

주목 세포배양에서 초기 접종농도와 기본배지가 세포증식과 Taxol 생산에 미치는 영향

황 용 순 · 김 석 우 · 김 진 우 · *변 상 요 · †김 동 일
인하대학교 생물공학과, *아주대학교 화학 · 생물공학부

Effects of Inoculum Density and Basal Media on Cell Growth and Taxol Production in *Taxus* Cell Suspension Cultures

Yong-Soon Hwang, Seok-Woo Kim, Jin-Woo Kim, Sang-Yo Byun*, and Dong-Il Kim†

Department of Biological Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
School of Chemical Engineering and Biotechnology, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea

ABSTRACT

Optimum inoculum concentration for the production of taxol was determined in *Taxus brevifolia* and *Taxus cuspidata* cell suspension cultures. By fresh weight, 2.5, 5, 7.5, 10 g/flask of cells were inoculated and cell growth as well as taxol production were examined. In both *Taxus* cell cultures, the higher the inoculum concentration, the shorter the length of the lag period. The optimum inoculum concentration for taxol production was found to be 5 g/flask. To produce taxol in large quantity, utilization of proper medium was thought to be important. In case of using a production medium with 6% sucrose, taxol production was noticed. Its level reached the maximum at the 9th day of culture and decreased afterwards. However, taxol was not detected from cell cultures in growth medium.

서 론

Taxol(paclitaxel)은 diterpene alkaloid의 일종으로 1971년 Wani 등(1)에 의해 태평양 주목(*Taxus brevifolia*)의 수피로부터 분리되어 그 구조가 최초로 규명되었다. 주목에는 taxol 및 그 유도체인 10-deacetylbaaccatin III, baaccatin III, 10-deacetyltaxol, cephalomannine, 7-epi-10-deacetyltaxol 등이 함유되어 있으며, 현재까지 무려 100가지가 넘는 taxane 관련 물질들이 알려져 있다. Taxol은 자궁암과 난소암을 포함한 여러 가지 종류

의 암에 대해 치료 효과를 보이고 있으며, 이들 암세포에 대한 taxol의 작용기작은 기존 대부분의 항암제들이 tubulin으로부터 microtubule의 형성을 방해하는 것과는 달리 microtubule의 합성을 촉진하고 안정화시켜 그 후의 분해 과정을 억제하는 특이한 기작을 갖는 것으로 알려져 있다(2). 이러한 작용기작 때문에 기존의 항암제에 내성을 보여 왔던 여러 종류의 암세포에 taxol이 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 예상되며 이로 인해 수요가 급증하고 있지만, 현재의 수피를 이용한 추출방법은 낮은 생산성과 생태계 파괴 등의 여러 문제점을 내포하고 있기 때문에 대체공급 방안이 여러 각도로 모색되고 있는 실정이다. 현재 가장 주목받고 있는 taxol의 대

† Corresponding Author

체공급 방안으로 세포배양에 의한 공급을 들 수 있는데 이미 *Taxus chinensis* 세포배양을 통해 150 mg/L 이상의 taxol 생산이 가능하다고 보고되었으며(3), 국내에서도 삼양제넥스사가 1997년까지 세포배양을 통한 taxol 생산과 시판 예정임을 발표한 바 있다.

하지만 세포배양을 통해 taxol과 같은 유용물질을 생산할 때 부딪히는 가장 큰 문제점은 느린 성장속도와 낮은 생산성을 들 수 있다. 느린 성장속도와 낮은 생산성을 극복하기 위해서는 배지조성, 온도, 빛 등의 여러 가지 조건들의 최적화 과정과 동시에 초기 접종농도의 최적화도 고려되어야 한다. 초기 접종농도가 고려되어야 하는 이유는 식물세포의 현탁배양에서 초기 접종농도는 이후의 세포의 성장뿐만 아니라 이차대사산물의 생산 경향에도 많은 영향을 미치게 되며(4), 일반적으로 너무 낮은 초기 접종농도는 세포의 생장이 계속되지 못하게 하는 영향을 주기 때문이다. Van Gulik 등(5)은 1.0 g/L 이하의 초기 접종농도에서는 세포의 생장이 중지하여 더 이상의 세포증식을 관찰할 수 없었다고 보고하였으며, Su와 Lei(6)는 *Anchusa officinalis* 현탁세포배양시 초기 접종농도를 증가시킴에 따라 lag phase의 기간이 줄어 세포의 성장을 빠르게 하는 효과가 있었으나 이차대사산물의 생산을 위해서는 가장 적절한 초기 접종농도가 존재한다고 보고하였다.

대개의 경우 식물세포의 성장 최적조건과 이차대사산물의 생산 최적조건은 다른 경우가 많으며 taxol의 생산도 일반적으로 이러한 경향을 따른다(3). 따라서 1단계에서는 세포의 성장에 적합한 성장배지를 선택하고 2단계에서는 이차대사산물의 생산에 적합한 생산배지를 이용하여 생산성을 높이는 2단계 배양법을 생각할 수 있다. 생산배지로는 모든 무기염류 성분을 배제한 8% glucose 수용액을 사용하여 *Catharanthus roseus* 배양에서 indole alkaloid의 생산을 증대시킨 것을 대표적인 예로 들 수 있으며(7), *Taxus* species의 배양에서도 taxol 생산용 배지를 사용하여 성장배지를 사용했을 때보다 증대된 taxol 생산이 가능했다는 보고가 있었다(3).

본 연구에서는 taxol을 생산하는 세포주인 *Taxus cuspidata*와 *Taxus brevifolia* 현탁세포배양에서 초기 접종농도의 변화에 따라 세포의 성장에 미치는 영향을 살펴보고자 하였으며, 이와 동시에 taxol과 관련 taxane의 생산에 미치는 영향을 조사하여 이를 바탕으로 세포의 성장과 taxol 생산에 가장 적합한 초기 접종농도를 찾고자 하였다. 또한 생산배지

를 이용하여 taxol을 생산할 때의 성장특성과 taxol과 관련 taxane의 생산경향도 살펴 보고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 배지

본 연구에서 사용한 *Taxus brevifolia* 현탁세포는 Dr. Henrik Pedersen(Rutgers University, USA)으로부터 제공받은 태평양 주목 절편에서 유도하였으며, *Taxus cuspidata*는 아주대학교 생물공학과에서 유도한 것을 사용하였다. 주목 현탁세포배양에 이용된 성장배지는 Schenk와 Hildebrandt(SH) 기본배지에 탄소원으로 sucrose를 20 g/L가 되도록 첨가해 주었으며, α -naphthaleneacetic acid(NAA) 5 mg/L, 6-benzylaminopurine(BAP) 0.2 mg/L 및 vitamin 농축용액을 보충하여 첨가하였다. 계대배양은 10일 간격으로 수행하였으며, 500 mL Erlenmeyer flask에 200 mL의 배지를 넣고 암소의 회전식 진탕배양기에서 120 rpm, 25°C를 유지하였다. 생산배지로는 Bringi 등(3)이 개발한 생산배지를 기본배지로 하여 NAA 10 mg/L, BAP 2 mg/L와 vitamin 농축용액, amino acid 혼합용액을 첨가하였고 탄소원으로는 자당 60 g/L를 첨가한 생산배지(PMB6S)를 이용하였다. 모든 실험은 100 mL Erlenmeyer flask에 30 mL의 성장배지 또는 생산배지를 넣고 120 rpm, 25°C로 유지시킨 진탕배양기에서 수행하였다.

세포량 측정

세포량을 결정하기 위해서는 세포생체중량(fresh cell weight, FCW)과 세포건조중량(dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 먼저 배양액을 Buchner 깔때기를 이용하여 Whatman No. 1 여과지로 걸러내고 동량의 물로 두 번 세척한 후 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고 세포를 계량접시에 옮겨 화학저울로 FCW를 측정하였다. FCW를 측정한 후 60°C로 고정된 dry oven에서 항량이 되도록 건조하여 DCW를 측정하였다. 충전 세포부피(packed cell volume, PCV)의 측정을 위해서는 배양액을 50 mL 눈금 실린더에 넣어 30분간 정치시킨후 세포량을 확인하고, 전체부피에 대한 백분율로 표기하였다.

Taxane 추출

용매를 이용한 추출방법은 Wani 등(1)이 기술한 방법을 수정하여 사용하였다. 각 시료에서 세포와

배지를 포함한 전체 배양액과 동량의 CH_2Cl_2 를 첨가한 후 1시간 동안 초음파 분쇄하였다. 30분간 5°C 에서 방치한 후 상 분리가 완전히 되면 CH_2Cl_2 층에서 10 mL을 취하여 용매를 감압증발시킨다. 용매가 완전히 증발된 후 시료를 HPLC-grade MeOH 2 mL에 다시 녹이고 0.2 μm filter(Gelman Science, FP-200)를 이용하여 불순물을 제거하여 HPLC 분석을 위한 시료를 준비하였다.

Taxane 및 당 분석

Taxol 및 관련 taxane의 분석은 HPLC를 이용하였다. HPLC는 영인 HPLC system에 Taxasil column(250×4.6 mm, MetaChem, USA)을 사용하였다. 전개용매의 조성은 MeCN:H₂O가 40:60이 되도록 하였고 isocratic 조건에서 분석하였다. 용매의 유속은 1.5 mL/min으로 하였고 227 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다. Taxol 및 taxane 표준시약은 National Cancer Institute(Drug & Chemistry Branch, Developmental Therapeutic Program, Division of Cancer Treatment)로부터 제공받아 사용하였다. 배지내의 총당 분석은 phenol-sulfuric acid 법을 사용하였다(8).

결과 및 고찰

초기 접종농도가 세포생장에 미치는 영향

Taxus brevifolia 배양에서 초기 접종농도를 달리 하여 접종하였을 때 현탁세포의 성장을 Fig. 1에 나타내었다. DCW로 2.5, 5, 7.5, 10 g/flask가 되도록 접종하였을 때 접종농도가 높아질수록 lag phase가 상대적으로 줄어드는 것을 보여주고 있는데, 이러한 경향은 Su와 Lei(6)가 *Anchusa officinalis* 현탁세포배양에서 초기 접종농도를 DCW로 1.2 g/L에서 10.7 g/L까지 증대시켜 주면서 세포의 성장을 측정하였을 때 초기 접종농도가 높아질수록 lag phase가 감소한다고 보고한 결과와 일치하고 있다. 하지만 초기 접종농도를 높여주었을 때 초기 비증식속도(μ)는 빨라졌지만 최대 세포농도는 일정한 수준에서 더 이상 증가되지 않는 것이 관찰되었다. Fig. 2는 taxol을 생산하는 또다른 세포주인 *Taxus cuspidata* 현탁세포배양에서 초기 접종농도를 FCW로 5, 10 g/flask로 달리하였을 때의 성장을 PCV로 측정된 것이다. 이와 같은 접종농도는 상당히 높은 편인데 그 이유는 2단계배양을 수행할 경우 생산배지에 접종할 경우로 가정하고 양

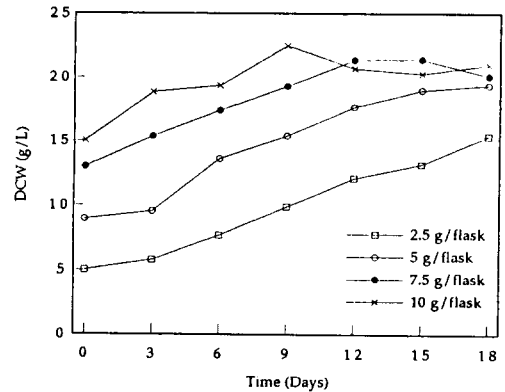


Fig. 1. Effect of inoculum density on cell growth of *Taxus brevifolia* in PMB6S (production medium B containing 6% sucrose). The inoculum densities were 2.5, 5, 7.5, and 10 g fresh cell weight per flask containing 30 mL of medium.

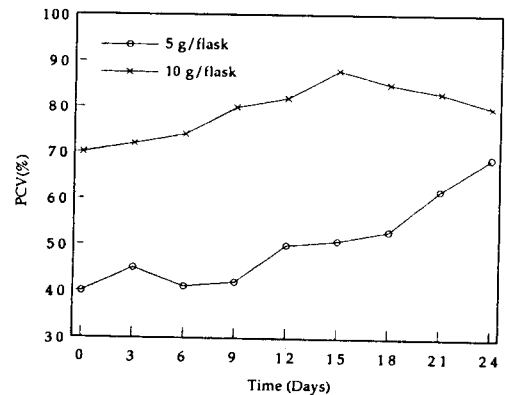


Fig. 2. Effect of inoculum density on cell growth of *Taxus cuspidata* in PMB6S. The inoculum densities were 5 and 10 g fresh cell weight per flask containing 30 mL of medium.

을 결정하였기 때문이다. 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 *Taxus cuspidata*의 경우에도 초기 접종농도가 세포생장에 미치는 영향은 *Taxus brevifolia*의 경우와 유사한 것으로 보아 세포 종에 상관없이 높은 접종농도는 lag phase를 줄여주며 초기 비증식속도를 높임을 알 수 있었다.

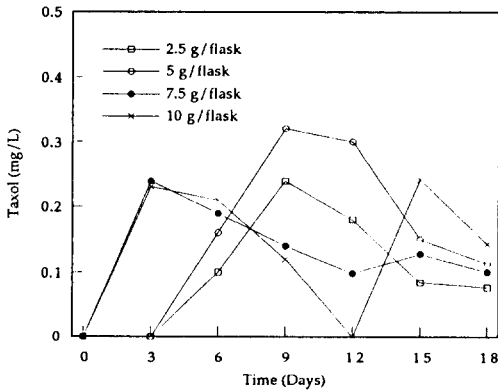


Fig. 3. Effect of inoculum density on taxol production in cell suspension cultures of *Taxus brevifolia* with PMB6S. The inoculum densities were 2.5, 5, 7.5, and 10 g fresh cell weight per flask containing 30 mL of medium.

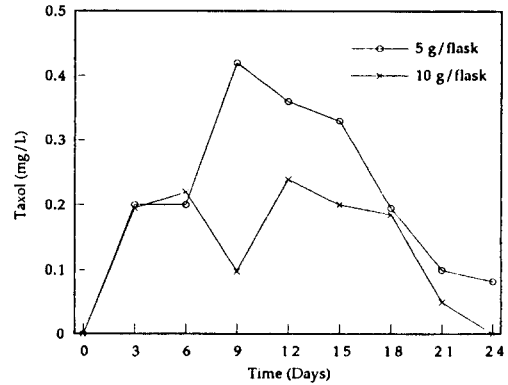


Fig. 4. Effect of inoculum density on taxol production in cell suspension cultures of *Taxus cuspidata* in PMB6S. The inoculum densities were 5 and 10 g fresh cell weight per flask containing 30 mL of medium.

초기 접종농도가 taxol 생산에 미치는 영향

초기 접종농도가 높아질수록 세포의 성장속도가 빨라진다고 할지라도, 일반적으로 이차대사산물의 생산은 세포의 성장과 반드시 비례하지는 않으므로 이차대사산물의 생산에 적합한 적정 접종농도를 찾는 것이 필요하다. *Anthusa officinalis* 배양을 통한 rosmarinic acid 생산의 경우 초기 접종농도에 따라 rosmarinic acid의 생산성이 변한다고 보고된 바 있다(6). 본 실험에서도 taxol의 생산에 가장 적합한 초기 접종농도를 찾을 수 있었는데 *Taxus brevifolia* 세포를 5 g/flask의 농도로 초기에 세포를 접종시켰을 때에 더 낮은 농도로 접종했을 때나 더 높은 농도로 접종했을 때보다 taxol의 생산에 적합하였다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). *Taxus cuspidata* 배양에서도 초기 접종농도를 5 g/flask와 10 g/flask로 변화하여 실험해 본 결과 *Taxus brevifolia*에서의 결과와 유사한 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

생장배지에서의 성장특성과 taxol 생산

Taxol 생산에 가장 적합한 초기 접종농도가 5 g/flask임을 확인한 결과를 토대로 *Taxus cuspidata* 현탁세포배양의 생장배지(SH medium)에서의 성장특성과 시간에 따른 taxol 생산을 파악하기 위해 24일간 배양하여 FCW, DCW, taxol 생산, 당의 소모

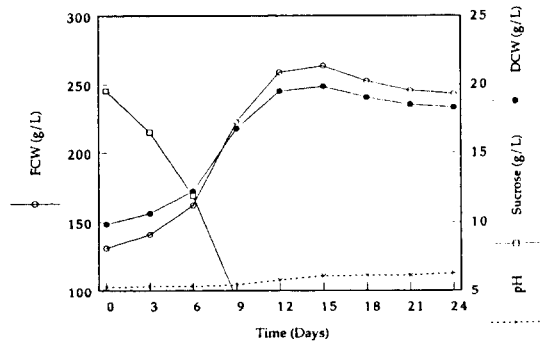
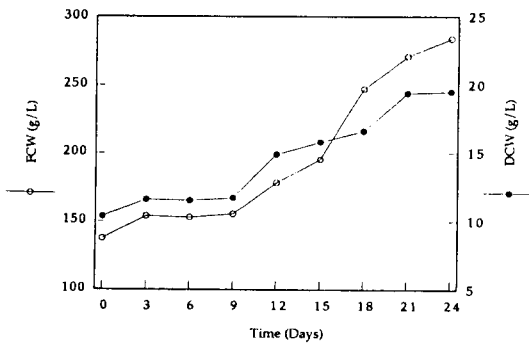


Fig. 5. Growth characteristics of *Taxus cuspidata* in growth medium(SH medium).

경향 등을 관찰하였다. Fig. 5는 시간에 따른 *Taxus cuspidata*의 DCW와 배지내 pH, 당소비의 변화를 나타낸 것으로 세포를 배지에 접종한 후 약 3일의 lag phase를 갖고 15일째 DCW로 최대 세포농도인 19.8 g/L에 도달하였으며 이후 감소하는 경향을 보여주고 있다. 비교적 세포크기가 크고 aggregate를 형성하는 특성을 갖는 *Taxus cuspidata*의 최대 세포농도가 DCW로 20 g/L에 근접한 높은 최대 세포농도를 보인 것은 초기 접종농도가 FCW로 5 g/flask (DCW로는 9.8 g/L)로 높게 접종되었기 때문이라 생각된다. 이 때 μ 는 0.084 day^{-1} 이었고 배기시간 (doubling time, T_d)은 8.2일이었다. 배지의 pH는 5.3에서 6.3사이에서 세포의 성장경향과 유사하게

Table 1. Comparison of growth rates in various cell suspension cultures of *Taxus* species.

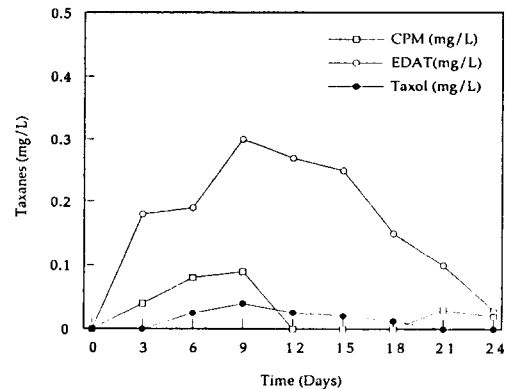
Cell line	Media	Specific growth rate(μ day ⁻¹)	DCW(g/L)	Doubling time(T_d , days)	Reference
<i>T. cuspidata</i>	SH	0.084	19.8	8.2	
<i>T. cuspidata</i>	PMB6S	0.055	19.5	12.6	
<i>T. brevifolia</i>	SH	0.062	16.5	11.2	(10)
<i>T. cuspidata</i>	SH	0.076	25	9.1	(11)
<i>T. baccata</i>	B5	0.17~0.19	10	4~5	(12)
<i>T. cuspidata</i>	B5C2	0.034	16.5	20.6	(13)

Fig. 6. Growth characteristics of *Taxus cuspidata* in PMB6S.

상승하는 경향을 보여주었으며 taxol은 검출되지 않았다.

생산배지에서의 생장특성과 taxol 생산

Bringi 등(3)은 생산배지를 이용한 이단계배양(2-stage culture)을 실시하였을 때 taxol의 생산이 더욱 증대되었다는 결과를 보고하였고, Kim 등(9)은 Bringi 등(3)의 생산배지를 기본으로 *Taxus brevifolia* 현탁세포배양에서 당종류와 당농도의 영향을 실험하여 6%의 과당과 6%의 자당이 taxol 생산에 적합하였다고 보고하였다. 그러나 6%의 과당을 이용한 생산배지에서는 세포접종 후 10일이 지나면서 세포의 갈변화가 관찰되고 갈변화와 동시에 세포의 생장이 거의 중지되는 현상을 보여 과당 대신 자당을 이용한 PMB6S(production medium B containing 6% sucrose)를 이용하여 *Taxus cuspidata* 세포의 생장과 시간에 따른 taxol의 생산을 조사하였다. 자당을 포함하는 생산배지를 이용하여 24일간 배양했을 때 μ 는 0.055 day⁻¹로 생산배지에 비해 다소 느린 생장을 보였지만, 이 기간동안 도달한 DCW로의 최고 세포농도는 19.5 g/L로 성장배

Fig. 7. Taxane accumulation of *Taxus cuspidata* in PMB6S: CPM, cephalomannine; EDAT, 7-epi-10-deacetyltaxol.

지에서의 최고 세포농도와 근사한 값을 나타내었다 (Fig. 6). 이때 lag phase는 9일 정도로 길게 나타났다. 여러 가지 *Taxus* species 현탁세포배양의 비증식속도와 배가시간을 비교하기 위해 Table 1에 본 논문의 결과와 함께 이미 발표된 문헌들의 결과를 정리하여 보았다. 이 표에서 볼 수 있는 바와 같이 세포의 종보다는 특정 세포주에 따라 증식속도가 달랐고 위에서 언급한 것처럼 배지의 종류도 영향을 미침을 알 수 있었다. Srinivasan 등(12)이 얻은 0.19 day⁻¹의 비증식속도는 목본류 세포배양으로서는 상당히 빠른 것으로 세포 증식 측면으로만 고려한다면 주목세포배양에 의한 taxol 생산의 상업화 가능성을 제시한다고 하였다. 최종세포농도의 경우 보통 15~20 g/L로 얻어지나 이는 당농도, 배양기간 및 초기 접종농도에 따라 이는 다소 차이가 있을 수 있으므로 직접적인 비교를 하기는 곤란하다. Fig. 7에는 PMB6S에서 시간에 따른 taxol 생산과 관련 taxane의 생산을 제시하였는데 taxol의 생산은 9일 째에 최대치를 보였으며 이후 감소하는 경향을 나타

내었다. 이러한 경향은 Fett-Neto 등(13)이 *Taxus cuspidata* 세포배양에서 초기에 다량의 taxol이 검출되다가 20일 이후 줄어드는 다음 30일 이후 다시 증가되는 경향을 보인다고 보고한 것과 유사하다고 할 수 있다.

요 약

*Taxus brevifolia*와 *Taxus cuspidata* 현탁세포배양에서 taxol의 생산에 가장 적합한 초기 접종농도를 결정하기 위해 접종농도를 세포생체중량으로 2.5, 5, 7.5, 10 g/flask가 되도록 변화시켜 세포의 성장과 taxol의 생산을 측정하였다. *Taxus brevifolia*의 경우 초기 접종농도가 높을수록 lag phase가 감소되는 경향을 보였으며, 두 가지 세포주(*Taxus brevifolia*와 *Taxus cuspidata*)에서 모두 초기 접종농도를 5 g/flask가 taxol의 생산에 최적임을 확인할 수 있었다. Taxol 생산에 가장 적합한 초기 접종농도로 생장배지와 생산배지에 세포를 접종시켰을 때 생장배지에서는 taxol이 검출되지 않았지만 6% 자당을 이용한 생산배지에서는 9일째 taxol이 최대량 생산되었다가 이후 다시 줄어드는 경향을 보였다.

감 사

본 연구는 1995년도 인하대학교 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail(1971), *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325.
2. K. C. Nicolaou, W. M. Dai, and R. K. Guy (1994), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 15.
3. V. Bringi, P. Kadcade, C. L. Prince, B. F. Schubmehl, E. J. Kane, and B. Roach(1995), US Patent 5,407,816.
4. P. R. H. Moreno, J. E. Schlatmann, R. van der Heijden, W. M. van Gulik, H. J. G. ten Hoopen, R. Verpoorte, and J. J. Heijnen (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 42.
5. W. M. van Gulik, A. M. Nuutila, K. L. Vinke, H. J. G. ten Hoopen, and J. J. Heijnen(1994), *Biotechnol. Prog.*, **10**, 335.
6. W. W. Su and F. Lei(1993), *Biotechnol. Lett.*, **15**(10), 1035.
7. K. H. Knobloch and J. Berlin(1980), *Z. Naturforsch.*, **35c**, 551.
8. M. F. Chaplin(1994), *Carbohydrate Analysis, A Practical Approach*(M. F. Chaplin and J. F. Kennedy, eds), p. 1, IRL press, Oxford.
9. J.-H. Kim, J.-H. Yun, Y.-S. Hwang, S.-Y. Byun, and D.-I. Kim(1995), *Biotechnol. Lett.*, **17**(1), 101.
10. J.-H. Yun, J.-H. Kim, Y.-S. Hwang, S.-Y. Byun, and D.-I. Kim(1995), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **10**(2), 143.
11. I.-S. Park, J.-H. Kim, J.-H. Yun, S.-Y. Byun, and D.-I. Kim(1994), *Better Living Through Innovative Biochemical Engineering*(W. K. Teo, M. G. S. Yap, and S. K. W. Oh, eds), p. 131, Continental Press, Singapore.
12. V. Srinivasan, L. Pestchanker, S. Moser, T. J. Hirasuna, R. A. Taticcek, and M. L. Shuler (1995), *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 666.
13. A. G. Fett-Neto, S. J. Melanson, S. A. Nicholson, J. J. Pennigton, and F. DiCosmo(1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 967.