한국생물공학회지 제 13권 제 4호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 13, No. 4, 352-356(1998)

Digitalis lanata 세포배양에 의한 생물학적 변환에서의 cyclodextrin의 이용

이 종 은 · 최 연 숙 · 안 지 은 · †김 동 일
인하대학교 공과대학 생물공학과
(접수 : 1998. 2. 13., 게재승인 : 1998. 4. 27.)

Utilization of Cyclodextrin in Biotransformation by *Digitalis lanata* Cell Cultures

Jong-Eun Lee, Yeon-Sook Choi, Ji Eun Ahn, and Dong-Il Kim†
Department of Biological Engineering, College of Engineering, Inha University, Inchon 402-751, Korea
(Received : 1998. 2. 13., Accepted : 1998. 4. 27.)

Addition of cyclodextrin in the biotransformation of digitoxin into digoxin by *Digitalis lanata* cell suspension cultures enhanced the conversion yield. Presence of cyclodextrin also supported good stability of the intermediate product, digoxin, for long time. Among several kinds of cyclodextrins, β-cyclodextrin provided the best results. It was found that the optimum form of cyclodextrin utilization was the external addition of inclusion complexes between digitoxin and β-cyclodextrin at 1:2 molar ratio from the beginning of biotransformation. With the optimized conditions, addition of β-cyclodextrin enhanced the production of digoxin up to 1.55 fold. In this case, not only digitoxin consumption was increased, but also the production of by-product was reduced.

Key Words : Cyclodextrin, Biotransformation, Digitoxin, *Digitalis lanata*

서 론

식물세포배양에 의한 생물학적 변환(biotransformation)이란 식물세포 내의 특정 효소를 이용하여 외부에서 공급해 준 화학물질이나 다른 종 유래의 중간산물 혹은 자체에서 생성되는 기질의 관능기를 변환시키는 것을 의미한다. 미생물을 이용한 생물학적 변환은 이미 여러 가지 유기물질들을 합성하는데 중요하게 사용되고 있으나 식물세포배양에 의한 생물학적 변환 연구는 아직까지 미흡한 상태이다(1). 그러나, 의학적 가치가 높고 입체특이적이어서 화학 합성이 어려우며 미생물에 의한 생물학적 변환으로 효과가 없는 식물유래의 유용물질을 생산할 경우 식물세포배양을 이용하여 생물학적으로 변환시키는 것은 상당한 가치가 있다. 이러한 생물학적 변환 연구의 대표적인 예로는 *Digitalis* 현탁세포배양의 이용을 들 수 있다(2). *Digitalis* 배양세포의 경우 식물체로부터 추출되는 cardenolide 계열의 각종 강심성 배당체(cardiac glycoside)를 직접 합성하지는 못하나 이들 물질의 전구체를 현탁세포 배양액 내에 첨가하게 되면 여러 가지 효소반응에 의해 다양한 생물학적 변환을 일으킨다. Digitoxin은 *Digitalis* 식물체로부터 다량 얻어지나 효과가 약하고 부작용이 있어 의약품으로의 가치가 낮은 반면, digitoxin의 12번 탄소에 hydroxyl group이 β-방향으로 결합된 형태의 화합물인 digoxin은 부작용이 거의 없고 효능이 뛰어나 요구도가 높은 실정이다. 그러나 digoxin은 식물체로부터 직접 생산되는 양이 매우 적기 때문에 식물세포배양을 통한 생물학적 변환으로 이를 얻고자 하는 연구가 오랫동안 진행되어왔다(3).

Cyclodextrin(CD)은 전분으로부터 효소에 의해 얻어지는 고리 모양의 탄수화물이다. CD는 세 가지 종류가 알려져 있으며 glucopyronose가 6개로 구성된 α-CD, 7개로 구성된 β-CD, 8개로 구성된 γ-CD로 분류된다(4). 이들 세 가지 모두 결정을 이루며 흡습성이 없는 물질이다. 또한 수용액상에서는 친수성의 외부와 소수성의 내부를 지닌 원통형의 구조를 지녀 내부의 빈 공간에 비극성 분자를 수용하여 포획복합체(inclusion complex)를 형성함으로 용해도를 높여 주는 특성을 보인다(5). 이러한 성질로 인해 CD는 의약품의 생산, 생물공학적 연구, 식품산업 등에 광범위하게 사용되고 있다. 다양한 용도로 인해 CD는 이미 양산이 되고 있으며 그 가격도 점차 낮아져 왔다. 가장 많이 사용되며 값이 싼 α-CD와 β-CD 이외에도 hydroxypropyl-β-CD, dimethyl-β-CD 등의 유도체나 불용성의 β-CD 고분자도 생산이 되고 있다(6).

식물세포배양에 의한 2차대사산물의 생산에서는 일반적으로 기질과 생성물이 소수성을 띠므로 물에 대한 용해도가 낮은 편이며, 이것이 생산성 증대에 큰 저해 원인이 될 수 있다. 특히, 수상계인 배지에서 이루어지는 생물학적 변환에서 소수성 유기물질인 기질의 낮은 용해도는 세포에 독성을 미치거나 기질 공

† Corresponding author : Department of Biological Engineering, College of Engineering, Inha University, Inchon 402-751, Korea
Tel : 032-860-7515, Fax : 032-875-0827
e-mail : kimdi@dragon.inha.ac.kr

급 저해 현상을 초래하게 된다. 이와 같은 문제를 해결하기 위한 방법중의 하나로 CD의 이용을 들 수 있다. CD의 첨가는 소수성의 guest 분자를 포획하여 복합체를 형성하며 용해도를 높여 주는 효과를 나타낸다. 또한 물질의 독성 부분을 감추어 주어 독성을 감소시킬 수도 있고, 결합 부위가 효소에 의해 공격받는 부분일 경우에는 그 공격을 막아 주는 역할을 할 수도 있다(7). CD는 생물학적 친화성이 높은 물질이므로 효소나 세포에 전혀 손상을 주지 않는다(8). 이러한 장점을 이용하기 위하여 미생물을 이용한 생물학적 변환에서는 이미 CD를 사용하는 연구가 다수 수행되었으며, 대부분의 경우 미생물이나 효소 고유의 특성을 크게 변화시키지 않으면서 기질의 용해도를 증진시키고 재현성도 좋은 것으로 보고되었다(9-11). 그러나 식물세포배양에 의한 생물학적 변환에 CD를 사용한 연구는 극소수이다. *Podophyllum hexandrum* 세포배양에서 coniferyl alcohol로부터 podophyllotoxin의 생산(12)과 *Mucuna pruiens* 세포배양에서의 17β-estradiol의 생물학적 변환(13)이 그 예라 할 수 있다. 이 두 경우 모두 CD의 첨가가 기질의 용해도 증대를 유발하며 생산성이나 변환율을 높여주는 결과를 보인 바 있어 식물세포배양에 의한 생물학적 변환에서도 다양한 배양계에서 CD의 이용에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 *Digitalis lanata* 세포배양에 의한 생물학적 변환인 digitoxin으로부터 digoxin의 생산에서 CD를 이용하여 생산성을 향상시키고자 하였다. 이를 위하여 여러 가지 종류의 CD 중에서 digoxin 생산을 가장 높여주는 것을 찾아, 첨가 시기와 방법, 몰 비 등이 미치는 영향을 조사하고 최적의 첨가 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

식물세포주 및 배양조건

본 연구에서 사용한 *Digitalis lanata* 배양세포는 독일 Tubingen대학의 Dr. Wolfgang Kreis로부터 제공받아 Murashige와 Skoog(MS) 배지에서 유지하였다. 탄소원으로는 33 g/L의 glucose를 첨가하였고, KH_2PO_4 170 mg/L와 vitamin 농축용액을 첨가하였다. pH는 가압증기멸균하기 전에 5.5로 맞춰 주었다. 현탁배양은 암소의 회전식 진탕 배양기에서 120 rpm, 25℃로 유지하였으며, 10일 간격으로 계대 배양하였다.

Digitoxin의 생물학적 변환

Digitoxin의 생물학적 변환용 생산배지로는 증류수에 glucose를 8% 농도가 되도록 첨가한 후 0.1 M NaOH를 사용하여 pH 5.5가 되도록 조절하고 가압증기멸균하여 제조하였다. 생물학적 변환 실험시 30 mL의 생산배지를 넣은 100 mL flask를 이용하였고, 생장배지에서 계대 배양한지 10일 된 *D. lanata* 현탁세포를 생체중량(fresh weight) 기준으로 8 g 접종하였다. 변환용 기질인 digitoxin은 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 이용하여 30 g/L 농축모액으로 제조한 후 세포접종 3일 후 각 flask마다 200 mg/L 되게 첨가하여 digoxin 생산을 유도하였다(3).

Cardenolide 분석

Digitoxin및 digoxin의 분석시료는 세포를 포함한 배양액에 같은 부피의 methanol을 가하여 40분간 초음파 파쇄시킨 후, 상등액을 0.2 ㎛ 막여과지로 여과하여 준비하였다. 정량분석을 위해서는 오롬테크 Vintage 2000 LC HPLC와 Phenomenex Curosil-G column(4.6 × 250 ㎜)을 사용하였다. 이동상으로는 acetonitrile:water(35:65, v/v) 혼합 용액을 사용하였고, 유속은 1 mL/min이었으며 영인과학 UV detector를 이용하여 220 nm에서 검출하였다.

결과 및 고찰

Cyclodextrin의 종류가 digitoxin 생물학적 변환에 미치는 영향

Cyclodextrin(CD)의 종류는 다양하며, 그 종류에 따라 용해도, 내부의 크기 등이 다르기 때문에 결합되는 소수성 물질도 달라지게 된다(9). *S. cerevisiae*를 이용한 androstenedione으로부터 testosterone으로의 생물학적 변환의 경우 첨가되는 CD의 종류에 따라 기질의 용해도에 큰 차이를 보인 바 있다(10). 따라서, CD의 종류에 따라 digoxin 생산량과 안정화에 큰 영향을 미칠 수 있으므로 CD를 선별하기 위한 실험을 수행하였다. CD로는 α-, β-, γ-, methyl-β-, hydroxypropyl-β-CD를 선택하여 실험하였으며, 그 결과를 Figure 1에 나타내었다. 배양시간이 지남에 따라 β-CD와 γ-CD를 첨가한 경우에는 digoxin이 배지 내에서 안정한 농도로 유지되는 경향을 보여주었다 이는 CD를 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 digoxin이 배지 내에서 안정화되는 것을 보여주는 것이다. 대부분의 CD의 첨가의 경우 배양 후반에 대조구보다 높은 digoxin 생산을 보이며 β-CD를 첨가한 경우가 가장 현저한 digoxin 생산 향상을 보였다. 또한 다른 CD와 비교해 안정화에도 더 좋은 효과를 나타내었다. 따라서, 이 후의 연구에서는 가장 효과적인 β-CD를 이용하였다. β-CD는 다른 종류의 CD보다 가격이 저렴하기 때문에 경제적 측면에서도 가장 유리하다고 할 수 있다.

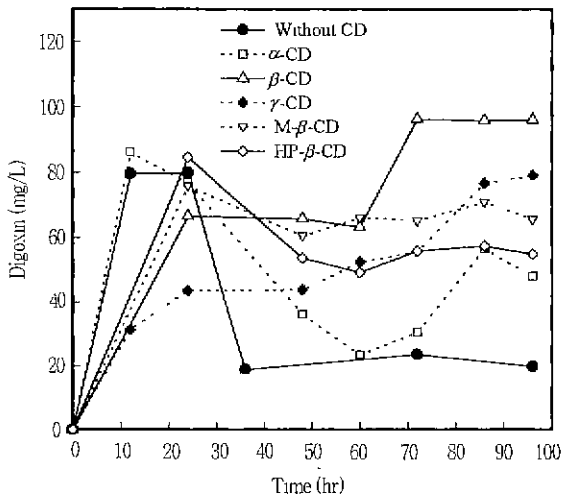

Figure 1. Effect of various kinds of cyclodextrin(CD) on biotransformation: M, methyl; HP, hydroxypropyl.

Cyclodextrin의 첨가 시기

생물학적 변환에서 CD의 존재로 인해 기질의 용해도 증가, 기질의 운반, 배지 내에서의 복합체 형성에 의한 산물의 안정화,

산물의 용해도 증가에 따른 산물 저해 작용의 감소 등의 결과를 예상할 수 있다. CD를 첨가하는 시기에 따라 각각의 반응에서의 역할이 다르게 나타날 것이다. CD를 기질과 함께 첨가할 경우는 기질에 주로 영향을 미치고, 변환과정 중간에 첨가한 경우는 기질보다 산물에 영향을 미칠 것이다. 이렇게 공급 시기에 따라 다른 역할을 할 것으로 예상되기 때문에 본 실험계에서의 역할을 알아내는 것이 digoxin의 생산성 향상 방안 모색에 중요할 것이다. Figure 2는 초기에 배지 내에 β-CD를 첨가한 것과, 기질 공급 15시간 후에 β-CD를 첨가한 경우를 비교한 실험 결과이다. β-CD를 첨가하지 않은 대조구와 digoxin의 생산성을 비교하여 볼 때 초기에 β-CD를 첨가한 경우는 최종 digoxin 생산이 높고 산물 생산 중간에 첨가한 경우는 상대적으로 낮은 것으로 나타났다. 생성된 digoxin의 안정화 측면에서는 대조구를 제외한 두 경우가 모두 대조구보다 더 안정적인 경향을 보이는 것으로 나타났다. 결과적으로 초기에 β-CD를 공급한 경우 기질의 용해도 증가에 영향을 미쳐 digitoxin의 공급을 도와 더 높은 digoxin 생산을 보인 것으로 생각된다. 따라서 *Digitalis lanata*의 생물학적 변환에서 β-CD의 역할은 산물 digoxin의 안정화와 함께 기질인 digitoxin의 용해도를 증가시켜 더 높은 digoxin 생산을 보이는 것으로 판단된다.

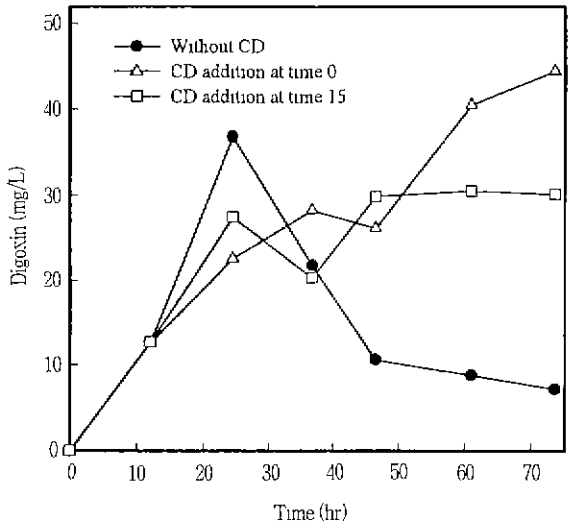

Figure 2. Effect of β-cyclodextrin addition time on biotransformation.

Cyclodextrin의 첨가 방법

기질의 용해도를 증가시키기 위하여 기질과 β-CD를 함께 공급하면서 첨가하는 방법을 변형시켜 기질의 용해도를 더욱 증가시킬 수 있다면 더 높은 digoxin의 생산을 유도할 수 있을 것이다. 기질의 용해도 증가는 digitoxin과 β-CD의 복합체 형성으로 나타나는 현상이다. 따라서 복합체 형성에 더 도움을 줄 수 있는 공급 방법을 찾아서 β-CD을 첨가하면 digoxin 생산성 향상에 긍정적인 영향을 미칠 것이다. 이를 확인하기 위하여 배지 내에 β-CD를 미리 첨가한 경우, digitoxin의 DMSO 농축모액을 첨가하면서 β-CD는 분말 상태로 첨가한 경우, 농축모액에 β-CD를 녹여 복합체를 형성한 후 첨가한 경우로 나누어 비교 실험하였고, 그 결과를 Figure 3에 정리하였다. 앞에서와 마찬가지로 β-CD를 첨가한 모든 경우에는 배양 후반에 이르러도 digoxin의 양이 감소되지 않았다. β-CD는 본 실험에서의 세포 배양조건인 25℃에서 물 30 mL에 최대 540 mg이 용해될 수 있는 것으로 알려졌다(14). 이 실험에서는 30 mL 배지에 18 mg의 β-CD가 첨가되므로, 첨가된 β-CD는 모두 용해되리라 예상되지만, 이때의 β-CD는 순수한 물이 아닌 배지에서 용해되는 것이므로 예상과는 다른 결과를 초래할 수도 있다. 따라서 β-CD를 분말상태로 첨가한 경우 digoxin이 적게 생산되는 이유는 β-CD가 배지 내로 첨가된 후 용해될 시간이 필요했기 때문이라 사료된다. 배지 내에 β-CD를 첨가한 경우는 β-CD가 모두 용해되어 공급된 형태지만 복합체를 형성하여 첨가해 준 경우에 비해 낮은 생산량을 보였다. 이는 기질이 첨가된 후 β-CD와 복합체를 형성하기 위한 시간이 필요하기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 digoxin의 생산성은 β-CD와 digitoxin간의 복합체 형성 시기와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. 여기서는 β-CD를 digitoxin 농축모액에 첨가하여 녹인 후 공급한 경우가 가장 높은 생산을 나타내었다. 이 경우 β-CD가 DMSO에 용해되어 기질과 복합체 형태로 공급되기 때문에 복합체 형성을 위한 시간이 필요치 않았기 때문인 것으로 판단된다. β-CD는 DMSO에 대한 용해도가 높은 것으로 알려져 있다(8). 따라서 기질 공급 후에도 배지 내에 존재하며 산물과 복합체를 형성하여 digoxin의 안정화와 용해도 증가에 영향을 미쳐 생산성 향상에 도움을 주는 것으로 보인다.

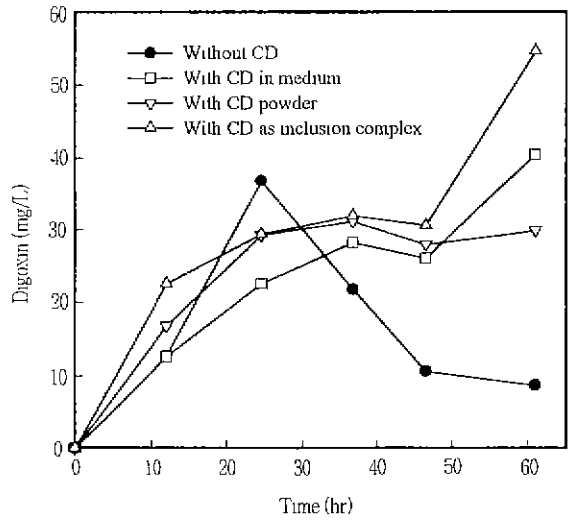

Figure 3. Effect of β-cyclodextrin addition method on biotransformation.

Cyclodextrin의 첨가 몰 비

Cholesterol 산화의 경우 첨가되는 β-CD의 농도에 따라 생물학적 변환의 수율이 다름이 보고된 바 있다(11). 이는 물질과 β-CD의 복합체 형성 여부와 비례하여 변환량이 변하기 때문이다. 따라서, digoxin의 생산도 기질과의 복합체(digitoxin-β-CD)와 생성물과의 복합체(digoxin-β-CD) 형성 정도에 따라 변화할 수 있다. CD 복합체는 두 물질의 몰 단위로 이루어지는 것이므로, digitoxin과 β-CD의 첨가된 몰 비에 따라 digoxin 생산에 큰 영향을 미칠 수 있다(10). 따라서, 최적 몰 비를 결정

하기 위하여 digitoxin의 DMSO 농축모액에 digitoxin:β-CD 몰 비를 각각 1:2, 1:3, 1:5, 1:7로 첨가하여 생물학적 변환을 수행하였으며, 그 결과를 Figure 4에 정리하였다. 1:2 이상의 첨가가 digoxin 생산을 저해 또는 지연시키는 결과를 보여주었으나, digitoxin:β-CD가 1:2로 첨가되었을 경우는 첨가하지 않은 경우와 비교해 유사한 생산 속도를 보임과 동시에 높은 digoxin 생산을 보였다. 이는 1:2의 몰 비가 digoxin 생산을 위해 최적이며, digitoxin이 β-CD와 1:2의 몰 비로 복합체를 형성한다는 사실을 유추할 수 있는 근거이다. 실제로 digitoxin과 유사한 steroid계열의 물질들은 일반적으로 β-CD와 1:2의 몰 비로 결합한다고 보고된 바 있다(15).

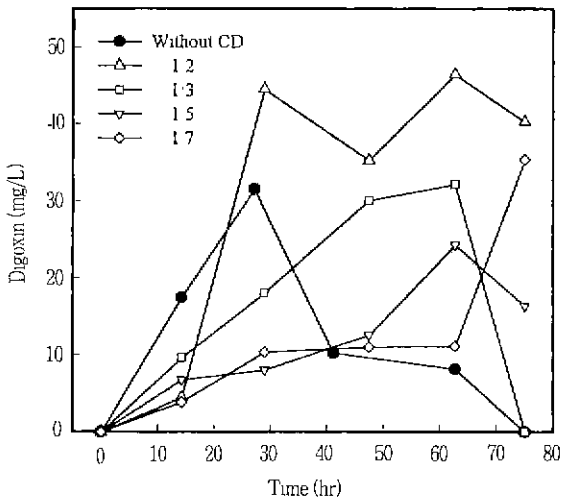

Figure 4. Effect of digitoxin:β-cyclodextrin molar ratio on biotransformation.

Cyclodextrin의 최적 첨가 조건

앞에서는 digoxin 생산을 위한 최적의 CD 첨가 조건을 알아보기 위한 실험들을 수행하였다. 즉 첨가되는 CD 종류, 첨가 시기, 첨가 방법, 첨가되는 digitoxin과 CD의 몰 비 등에 대한 실험을 통하여 각각의 최적 조건을 확인하였다. 따라서, 이상의 결과를 종합하여 CD를 첨가하지 않은 경우와 각각의 최적 첨가 조건을 복합하여 처리한 경우의 비교 실험을 수행한 결과를 Figure 5에 나타내었다. β-CD를 첨가하지 않았을 경우 digoxin은 빠르게 생산되었다가 세포 내로 재흡수된 후, glycosylation되어 deacetyllanatoside C(DC)로 전환되며 그 생산량은 계속적으로 증대된다. β-CD를 첨가하였을 경우 digoxin의 생산속도는 다소 느리나, 생산량이 첨가하지 않았을 경우에 비해 높았다. 또한 digoxin 생산은 후반까지 안정하였으며, 이로 인해 deacetyllanatoside C의 생산량은 첨가하지 않았을 경우에 비해 적었다. β-CD를 첨가하였을 경우 digoxin의 최대 생산량이 첨가하지 않았을 경우의 최대 생산량에 비해 1.55배 증가한 것으로 나타났으며, 다른 두 생산물의 최대 생산량의 경우는 β-CD를 첨가하지 않은 경우보다 낮은 값을 나타내고 있다. Digitoxin의 잔존량을 비교할 경우 β-CD의 첨가는 digitoxin의 더 많은 소모를 유도한다고 볼 수 있다. 각 시간에서의 digoxin 생성을 비교해 보면 초기에는 생산 속도가 다소 느리지만, 시간이 지남에 따라 급격히 생성량이 상승하는 것을

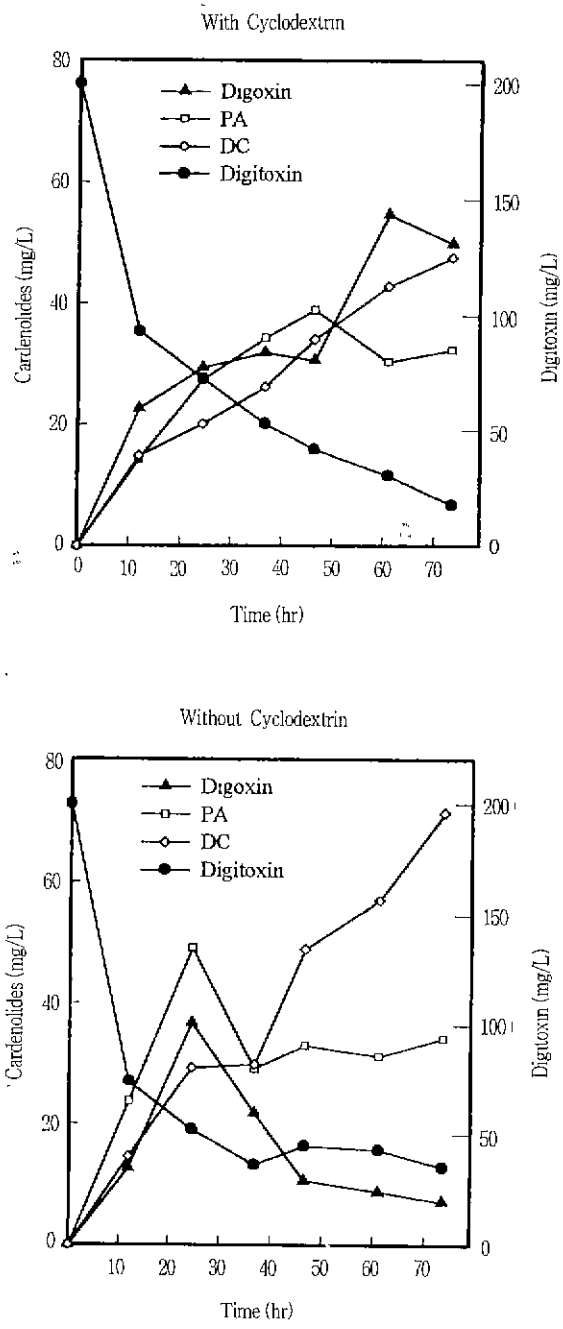

Figure 5. Time course of digitoxin biotransformation with or without β-cyclodextrin: PA, purpureaglycoside A; DC, deacetyllanatoside C.

알 수 있다. 이것은 대조구의 경우 digoxin이 반응 후반에 안정화하지 못하고 부산물로 변환하는 반면, β-CD를 첨가하여 준 경우는 digoxin이 안정화되어 배지 내에 일정한 농도로 존재하기 때문이다. Digitoxin의 경우는 초기에 β-CD에 잡혀 소비속도가 느리지만 반응 후반으로 갈수록 공급이 더 원활하여 급속히 사용되는 현상을 보여주고 있다. 기질인 digitoxin이 hydroxylation되지 않고 glycosylation된 부산물인 purpureaglycoside A(PA)와 목표 생성물인 digoxin이 glycosylation된 부산물인 DC의 경우 낮은 값을 유지하므로 β-CD의 첨가는

digitoxin에서 다른 부산물의 생산보다는 digoxin 생산을 유도한다고 생각할 수 있다. 이상의 결과를 정리하면 부반응이 존재하며 중간 생성물이 목표산물인 digitoxin으로부터 digoxin으로의 생물학적 변환에서 cyclodextrin을 첨가하면 기질의 용해도를 높이고 목표 생성물을 안정화시켜 부산물을 줄이면서 높은 생산 수율을 얻을 수 있음을 확인하였다.

요 약

Digitalis lanata 식물세포 현탁배양에 의한 digitoxin으로부터 digoxin으로의 생물학적 변환에 cyclodextrin을 첨가할 경우 digoxin 생산이 향상되었으며, 배양이 지속되어도 중간생성물인 digoxin의 농도가 안정하게 유지됨을 알 수 있었다. 여러 가지 종류의 cyclodextrin을 비교한 결과 β-cyclodextrin의 첨가가 가장 높은 digoxin 생산을 유도하는 결과를 보였으며, 첨가 시기는 기질 공급시에 함께 넣어주는 것이 바람직하였다. 첨가 방법으로는 기질과의 복합체 형태인 digitoxin-β-cyclodextrin complex를 미리 제조하여 용해나 복합체 형성과정을 줄여주는 것이 필요함을 확인하였고, digitoxin:β-cyclodextrin 첨가 몰비는 1:2일 때 최적의 생물학적 변환 결과를 나타내었다. 이상의 최적 첨가 조건하에서 cyclodextrin을 첨가한 경우 digoxin 생산량이 1.55배 증가하였으며 부산물의 생산은 현격히 감소하였다.

감 사

본 연구는 1996년도 인하대학교 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Steck, W. and F. Constabel (1974), Biotransformation in Plant Cell Cultures, *Lloydia*, **37**, 185-191.
2. Kreis, W. and E. Reinhard (1987), Selective Uptake and Vacuolar Storage of Primary Cardiac Glycosides by Suspensioncultured *Digitalis lanata* Cells, *J. Plant Physiol.*, **128**, 311-326.
3. Kreis, W. and E. Reinhard (1992), 12β-Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells: Production of digoxin in 20-liter and 300-liter bioreactor, *J. Biotechnol.*, **26**, 257-273.
4. Bar, R (1989), Cyclodextrin-aided Bioconversion and Fermentation, *Trends Biotechnol.*, **7**, 2-4.
5. Otero, C., C. Cruzado, and A. Ballesteros (1991), Use of Cyclodextrins in Enzymology to Enhance the Solubility of Hydrophobic Compounds in Water, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **27**, 185-194.
6. Nagatomo, S. (1985), Cyclodextrins - Expanding the Development of their Functions and Applications, *Chem. Econ. Eng. Rev.*, **17**, 28-33.
7. Hesselink, P.G.M., S. van Vliet, H. de Vreis, and B. Witholt (1989), Optimization of Steroid Side Chain Cleavage by *Mycobacterium* sp. in the Presence of Cyclodextrins, *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 398-404.
8. Saenger, W. (1980), Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry, *Angrew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 19, 344-362.
9. Jadoun, J. and R. Bar (1993), Microbial Transformation in a Cyclodextrin Medium: Enzyme vs Microbial Oxidation, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, **40**, 477-482.
10. Singer, Y., H. Shity, and R. Bar (1991), Microbial Transformation in a Cyclodextrin Medium: Reduction of Androstenedione to Testosterone by *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **35**, 731-737.
11. Jadoun, J. and Bar, R. (1993), Microbial Transformation in a Cyclodextrin Medium: Cholesterol Oxidation by *Rhodococcus erythropolis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 230-240.
12. Woerdenbag, H. J, W. van Uden, H.W. Frilink, C. F. Lerk, N. Pras, and T.M. Malingré (1990), Increased Podophyllotoxin Production in *Podophyllum hexanderum* Cell Suspension Cultures after Feeding Conileryl Alcohol as a β-cyclodextrin Complex, *Plant Cell Rep.*, **9**, 97-100.
13. Woerdenbag, H.J., N. Pras, H.W. Frijlink, C F. Lerk, and T.M. Malingré (1990), Cyclodextrin-facilitated Bioconversion of 17β-estradiol by a Phenoloxidase from *Mucuna pruriens* Cell Cultures, *Phytochemistry*, **29**, 1551-1554.
14. 이종은, 최연숙, 김동일 (1997), 주목 세포배양에 의한 Taxane 생산에서 Cyclodextrin 이용의 최적화, *한국생물공학회지*, 12(1), 108-122.
15. Uekama, K., T. Fujunaga, M.O Hirayama, and M Yamasaki (1982), Inclusion Complexations of Steroid Hormones with Cyclodextrins in Water and in Solid Phase, *Int. J. Pharm.*, **10**, 1-15.