

Paclitaxel 대량생산을 위한 추출공정 최적화

*김진현·홍승서
(주)삼양제넥스 생명공학연구소
(접수 : 2000. 6. 30., 게재승인 : 2000. 8. 21.)

Optimization of Extraction Process for Mass Production of Paclitaxel from Plant Cell Cultures

Jin-Hyun Kim* and Seung-Suh Hong
Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejeon 305-348, Korea
(Received : 2000. 6. 30., Accepted : 2000. 8. 21.)

Several solvents or combinations of solvents were tested for the extraction of wet or dried biomass at different extraction mode from plant cell cultures. Methanol gave the highest paclitaxel recovery with the least amount of solvent usage. Before extraction, drying of biomass was helpful to decrease solvent usage in extraction step. In this case, drying method was very important to obtain high yield from dried biomass. In the mode of operation, counter-current extraction process can be able to decrease solvent usage, but paclitaxel recovery was almost same with both batch and counter-current mode of operation. The number of extraction times was at least four to obtain high yield (>99%) from cell and one to obtain high yield (>96%) from cell debris in batch mode. Equilibrium (i.e., the ratio of paclitaxel in biomass to paclitaxel in the extraction solvent) was reached within 5 minutes. The minimum methanol concentration (90%) and solvent amount (biomass : solvent=1 Kg : 1 L) are enough to obtain high yield (>98%) for extraction from biomass.

Key Words : paclitaxel, plant cell culture, biomass, solvent extraction

서론

Paclitaxel (Taxol)은 현재 가장 중요한 항암제로 1971년 Wani 등에 의하여 paclitaxel의 화학적 구조가 발표되었다 (1). 1977년 paclitaxel에 대한 전임상 (Preclinical) 시험이 시작되었으며 1980년 paclitaxel에 대한 독성연구가 시작되었다. 1983년 1단계 임상시험, 1985년 2단계 임상시험이 시작되었으며 1988년 말기 난소암 환자에 대하여 30%, 1990년 유방암 환자에 대하여 48%의 치유효과가 있음을 확인하였다(2-3). 1992년 난소암에 대해 FDA허가를 취득하였으며 1994년 유방암에 대해 FDA 허가를 취득하여 현재 가장 중요한 항암제로 사용되고 있다. 항암제 paclitaxel은 복잡하고 독특한 구조를 갖고 있을 뿐 아니라 매우 새로운 방식의 항암기작 때문에 많은 사람들의 관심을 받아 왔으며 다른 항암제와는 달리 작용기작이 독특하기 때문에 많은 사람들에 의해 다른 항암제에 내성을 가지고 성장하는 암

을 치료하는데 효과적인 것이라고 관심이 모아지고 있다.

Paclitaxel의 공급방법은 다양하지만 주목으로부터 직접 추출하지 않고 paclitaxel을 대량으로 공급할 수 있는 대체 방안으로 크게 유기합성과 식물세포 배양에 의한 paclitaxel의 생산으로 나눌 수 있다(4-6). Paclitaxel의 구조가 복잡하고 분자량 (MW=853)이 크기 때문에 전합성 (total synthesis)은 가능하지만 많은 반응과정을 거쳐야 하는 등 어려움이 따르고 있으며 현재 실용화되고 있는 합성 방법에는 주목 외에 존재하는 paclitaxel의 전구체인 10-deacetylbaaccatin III에 paclitaxel side chain을 화학 결합시켜 paclitaxel을 반합성 (semisynthesis)하는 공정이 있다. Paclitaxel의 side chain을 합성하는 방법과 baaccatin III와 paclitaxel side chain을 결합하는 방법에 대해 많은 보고가 있으나(4-6) 주목의 오히려로부터 baaccatin III을 공급 받는 과정에 어려움이 따르며 최근의 보고에 의하면 baaccatin III의 함량이 이전에 보고된 함량보다 적다고 재평가되고 있다(7).

이와 같은 상황에서 볼 때, 식물세포 배양의 경우 경제성 측면에서 paclitaxel을 대량 공급할 수 있는 차세대 방법으로 유력시 되고 있으며, 추출/정제 공정에서의 수율 증대를 위한 연구들을 많이 하고 있다(8-13). 식물세포 배양에 의하여 생산된 paclitaxel은 대부분 식물세포와 세포조각

*Corresponding Author : Samyang Genex Biotech Research Institute, 63-2 Hwaam-Dong, Yusung-Gu, Taejeon 305-348, Korea
Tel : 82-42-865-8392, Fax : 82-42-865-8399
E-mail : jhkim@genex.co.kr

(debris)에 포함되어 있으며(13), 회수율 증가 측면에서 먼 저 세포내에 포함되어 있는 paclitaxel을 효율적으로 추출하는 것이 매우 중요하다. Witherup 등(8)에 의하여 *Taxus brevifolia* 의 잎으로부터 methylene chloride (CH₂Cl₂)과 methanol (MeOH)을 이용한 paclitaxel 추출에 관하여 보고 하였으며, Cardellina II(9)에 의하여 *Taxus brevifolia* 의 껍질로부터 MeOH로 paclitaxel 분리하는 공정에 관하여 보고 하였으며, Vanhaelen-Fastri 등(10)도 유기용매를 이용한 추출에 관한 보고를 하였다. 이와 유사한 방법으로 Zhang 등(11), Castor 등(12), Rao 등(13)에 의하여도 건조된 식물체를 유기용매로 paclitaxel을 추출하는 방법을 보고 하였다. 이와 같이 그 동안 많은 사람들이 의하여 유기용매를 이용하여 식물체로부터 paclitaxel을 추출하고 정제하는 방법에 대해서 보고하였으나 추출공정 자체에 대한 깊이 있는 연구는 상당히 부족한 실정이다. 결국 이러한 추출공정에 대한 자세한 이해 없이는 식물체로부터 paclitaxel 대량생산과 고수율 회수 공정의 개발에도 많은 어려움이 따른다.

본 연구는 텍서스속 (*Taxus genus*) 식물세포 배양액으로부터 회수한 식물세포와 식물세포조각 (debris)에 포함되어 있는 paclitaxel을 효율적으로 대량 추출할 수 있는 공정에 대한 이해와 이를 토대로 한 최적화에 목적이 있다.

실험재료 및 방법

텍서스속 식물세포 배양

본 연구에 사용된 배양액은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 cell line을 이용하여 3000 L 발효조에서 배양한 배양액을 이용하였다(14). 배양액으로부터 식물세포 회수를 위하여 데칸터 (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter)를 이용하였으며, 식물세포조각 회수를 위하여 고속 원심분리기 (α -Laval, BTPX 205GD-35 CDEFP)를 사용하였다. 식물세포 회수후 건조를 위하여 drying oven (JISICO, J-DV01, Korea)과 freeze dryer (LABCONCO, 77555, USA)를 사용 하였다. 회수한 식물세포와 세포조각 (debris)을 합하여 biomass라 하였다.

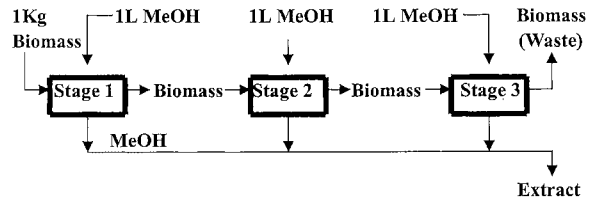
세포내의 수분함량 측정

세포내의 수분함량을 측정하기 위하여 회수된 세포 5 g을 채취하고 수분측정기 (Sartorius, MA30)를 이용하여 수분을 측정하였다. 분석조건은 120℃, 20분이며 모든 샘플은 3개씩 취하여 분석 후 평균값을 취하였다.

Paclitaxel 함량 분석

HPLC (Waters) 분석 방법에 의하여 paclitaxel 함량을 분석하였으며(15) 모든 샘플은 3개씩 취하여 분석 후 평균값을 취하였다. 채취한 샘플 2 mL에 내부 표준 (internal

BATCH PROCESS



COUNTER-CURRENT PROCESS

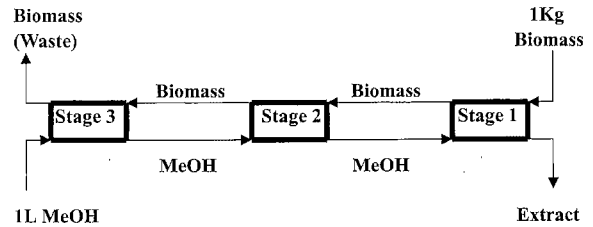


Figure 1. Batch vs. counter-current extraction processes.

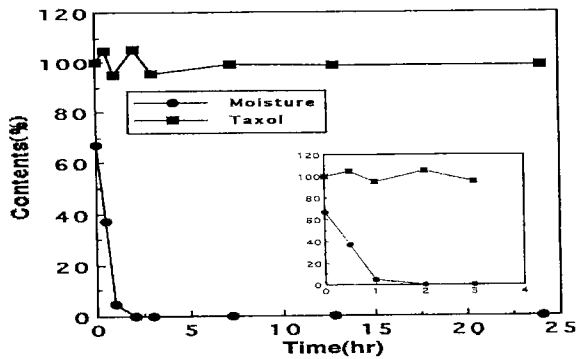
standard) 용액 100 μ L (6.25 mg N-propyl paraben/5 mL methanol), CPC 용액 200 μ L (10 g cetyl pyridinium chloride/100 mL distilled water), methyl-t-butyl ether 2.5 mL를 첨가하고 밤새 교반하였다. 교반 후 상등액을 취하여 amino propyl SPE cartridges (Alltech, Cat. #211025)를 통과시킨 후 methyl-t-butyl ether/methanol (85/15, v/v) 용액 3 mL로 세척하고 여액을 건조한 후에 0.5 mL 메탄올에 녹여 분석하였다. 분석에 사용한 컬럼은 Capcell Pak C18 UG 120 (250 mm X 4.6mm), 컬럼 온도는 40℃, 이동상은 CH₃CN/Water (20-100% gradient), 유속은 1.0 mL/min, 샘플 주입량은 10 μ L이며, UV (227 nm) detector를 사용하였다. Paclitaxel 표준물질은 Sigma 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

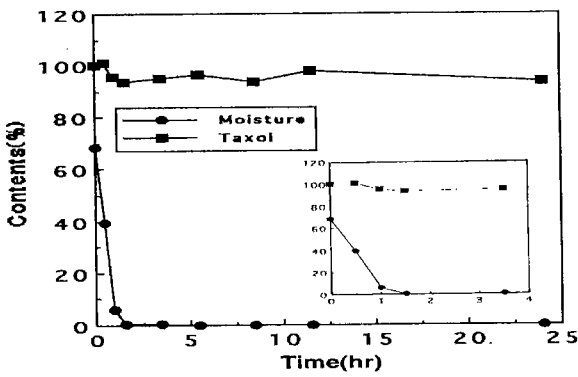
여러가지 유기용매 (methylene chloride, methylene chloride/methanol, methyl-t-butyl ether, ethanol, isopropyl alcohol, chloroform, chloroform/methanol, diethylether, acetone, methanol 등)를 이용하여 발효배양액으로부터 회수한 biomass로부터 paclitaxel의 추출 경향을 조사한 결과 메탄올 (MeOH)의 경우 가장 적은 양으로 가장 높은 paclitaxel 회수율을 얻어 biomass로부터 paclitaxel의 추출에 가장 효과적임을 알 수 있었다(15). Biomass 추출에서는 여러가지 조업방법이 가능하나 Figure 1에서 보는 바와 같이 크게 batch와 counter-current 형태로 나누어 작업이 가능하다. 이들 방법에 따른 paclitaxel 회수율은 Table 1에서 보는 바와 같이 거의 차이

Table 1. Recovery of paclitaxel using batch and counter-current extraction processes (Paclitaxel of biomass = 28.3 mg/Kg biomass).

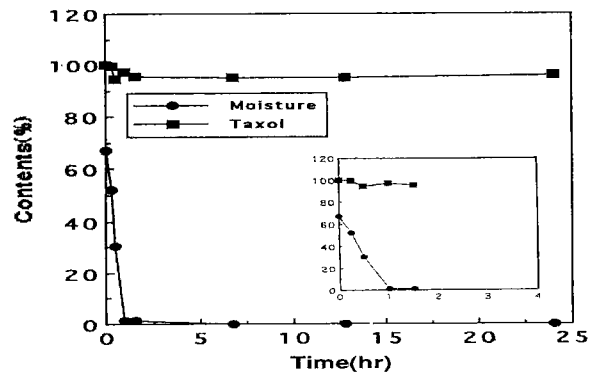
Process	Lot Number	MeOH(L)/Biomass(Kg)	Paclitaxel Recovery(mg/Kg)
Batch	1	3	26.5
Countercurrent	1	1	28.1
Batch	2	3	26.7
Countercurrent	2	1	25.5



(A)



(B)



(C)

Figure 2. Paclitaxel (Taxol) and moisture contents of biomass during drying at 50°C(A), 60°C(B), and 70°C(C) in dry oven.

가 없음을 알 수 있었으며 (90%이상 회수) 다만 counter-current 형태를 사용할 경우 용매사용량을 줄일 수 있었다. 그러나 counter-current 형태의 경우 작업의 복잡성 때문에 대부분 batch 형태의 조업을 택하고 있다(13). 본 연구에서도 batch 형태의 추출방법과 메탄올을 이용하여 biomass (식물세포 및 세포조각)로부터 paclitaxel를 추출하는 공정을 최적화 하였다.

식물세포 내 수분 함량에 따른 영향

식물세포 배양액으로부터 회수한 식물세포 내 수분 함량에 따른 추출효율을 비교하여 Figure 2 에 나타내었다.

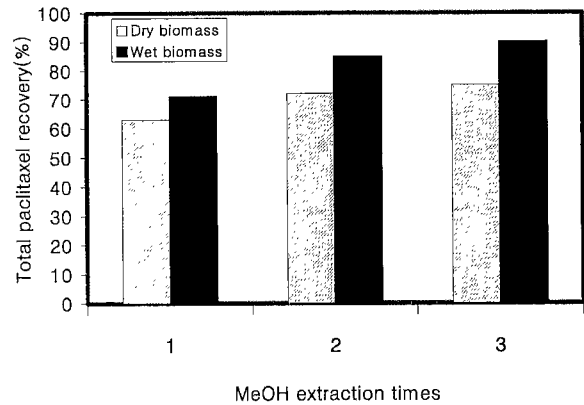


Figure 3. Effect of dry and wet biomass on recovery at different MeOH extraction times.

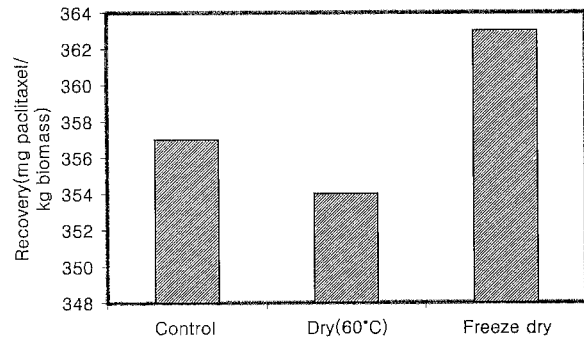


Figure 4. Effect of drying method on paclitaxel recovery from dried biomass.

데칸터로부터 회수한 식물세포 내의 수분함량은 70% 정도이며 dry oven을 이용하여 각각 50°C, 60°C, 70°C에서 건조한 결과 50°C에서는 2 hr, 60°C에서는 1.5 hr, 70°C에서는 1 hr후면 식물세포는 완전히 건조됨을 알 수 있었다. 또한 이들 온도조건에서 건조 동안 식물세포 내 paclitaxel 함량 변화는 5% 이내로 무시할 수 있었다. 이렇게 건조된 식물세포를 이용하여 메탄올 추출 (식물세포/메탄올=1 Kg/1 L)를 한 결과 Figure 3 에서 보는 바와 같이 추출 효율이 조금 감소함을 알 수 있었다. 이러한 현상은 건조 동안 식물세포 표면의 수축에 의한 표면경화 (casehardening) 현상 때문으로 판단된다(16). 즉, 식물세포가 건조될 때 수축현상이 생기며 이러한 수축과 확산도의 강하로 식물세포 내부로 유기용매가 스며들기 어렵게 되기 때문이다. 이를 확인하기 위하여 건조 방법을 달리하여 추출 효율을 확인한 결과 Figure 4 에서 보는 바와 같이 건조기에서 건조할 경우에는 추출효율이 조금 떨어지는 반면 동결건조 (freeze drying)한 경우에는 추출효율이 오히려 증가함을 알 수 있었다. 즉, 동결건조의 경우에는 표면경화가 생기지 않아 식물세포 표면이 다공성을 유지한 상태로 건조되기 때문에 유기용매 침투가 용이하여 추출효율이 증가하는 것으로 사료된다(16). 또한 추출 전 건조공정의 도입으로 추출 공정에서 사용되는 유기용매의 질약이 가능 하였다. 유기용매를 이용한 추출공정에서 식물세포 건조는 건조방법에 따른 영향이 있기 때문에 이를 충분히 고려하는 것이 때

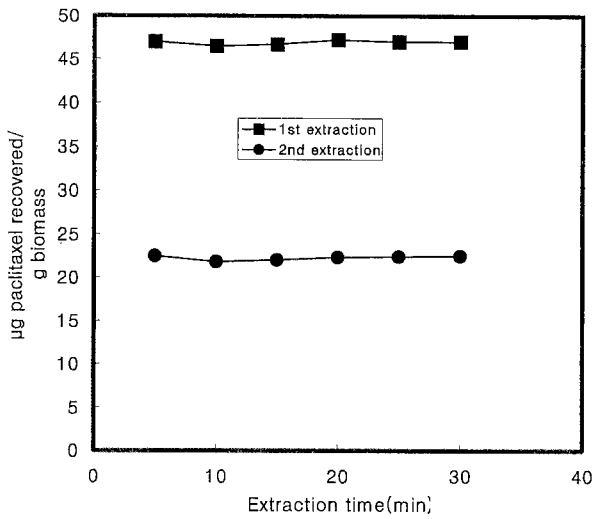


Figure 5. Effect of extraction time on paclitaxel recovery from wet biomass (moisture = 70%).

우 중요할 것으로 생각된다.

메탄올 추출 공정의 최적화

메탄올 추출에서 식물세포내 paclitaxel과 유기용매와의 평형상태는 Figure 5에서 보는 바와 같이 추출시간 5분 정도이면 평형에 도달 하였다. 또한 평형과 추출시간에 미치는 온도의 영향은 5℃-50℃에서는 거의 영향이 없었다. 추출횟수와 biomass로부터 paclitaxel 추출 정도는 이미 보고 한 바와 같이 1회 메탄올 추출시 40% paclitaxel이 회수 되었으며, 2회 32%, 3회 18%, 4회 9% 회수되어 총 4회의 추출로 식물세포 내 paclitaxel은 대부분 회수 (99%) 가능 하였다(15). 추출에 사용된 메탄올의 농도 변화에 따른 추출 효율을 Table 2에 나타내었다. 70% 메탄올을 이용하여 추출하였을 경우 4회에 걸친 추출에서 식물세포 내 paclitaxel의 73%만이 회수 가능하였으며, 75% 메탄올인 경우 81%, 80% 메탄올인 경우 88%, 85% 메탄올인 경우 91%, 90% 메탄올인 경우 98%, 95% 메탄올인 경우 99% paclitaxel이 회수되어 추출에 사용되는 메탄올의 농도가 90% 이상만 되면 식물세포 내 존재하는 대부분의 paclitaxel 회수 (>98%)가 가능하였다. 또한 메탄올 추출시 식물세포와 메탄올의 혼합비율에 따른 추출효율에는 거의 영향이 없었다 (Figure 6). 따라서 혼합비율, 즉 식물세포/메탄올=1 Kg/1 L조건이 가장 경제적이며 메탄올의 양을 더 줄일 경

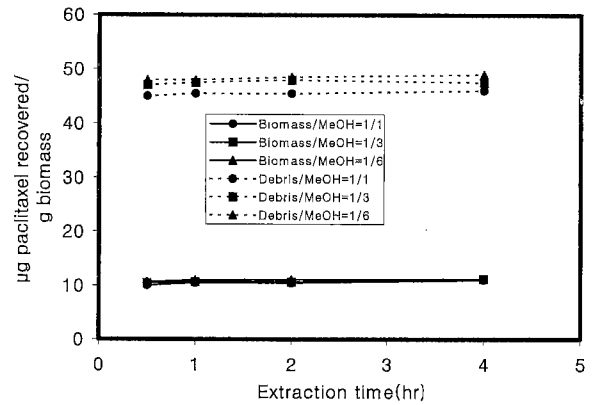


Figure 6. Effect of extraction time on paclitaxel recovery at different mixing ratio of biomass and solvent.

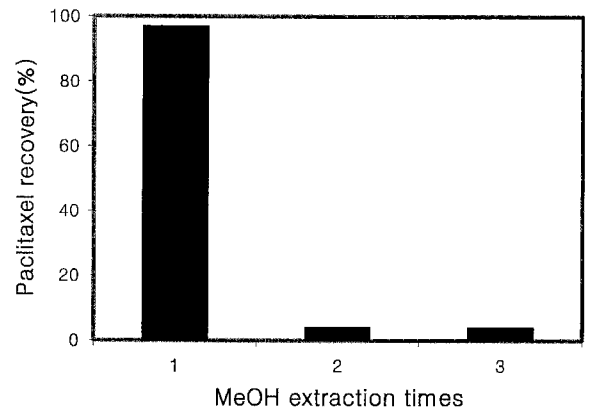


Figure 7. Effect of extraction times on paclitaxel recovery from debris.

우 혼합에 어려움이 있었다. Witherup 등(8)에 의하면 Taxus brevifolia 의 잎으로부터 CH₂Cl₂ 과MeOH을 이용한 paclitaxel 추출에서 식물체와 유기용매의 비가 1 Kg biomass/16 L solvent로 상당히 많은 양의 유기용매를 사용 하였다. 식물세포조각인 debris의 경우에도 Figure 6에서 보는 바와 같이 debris와 메탄올의 혼합비(1:1-1:6)에 거의 영향이 없으며, debris:메탄올비가 1:1(1 Kg debris:1 L MeOH)인 경우 1회 추출시 96%, 2회 추출시 2%, 3회 추출시1% 회수되어 debris의 경우 1회 추출로 대부분의 paclitaxel을 회수 할 수 있었다 (Figure 7). 또한 추출시간은 식물세포의 경우와 마찬가지로5분 이상이면 충분하였다. 메탄올 추

Table 2. Effect of MeOH concentration on extraction efficiency.

Extraction times	Recovery(%)					
	70% MeOH	75% MeOH	80% MeOH	85% MeOH	90% MeOH	95% MeOH
1	1	21	31	31	36	37
2	40	33	32	35	32	33
3	30	24	23	21	24	24
4	2	3	2	4	6	6
Total Recovery(%)	73	81	88	91	98	100

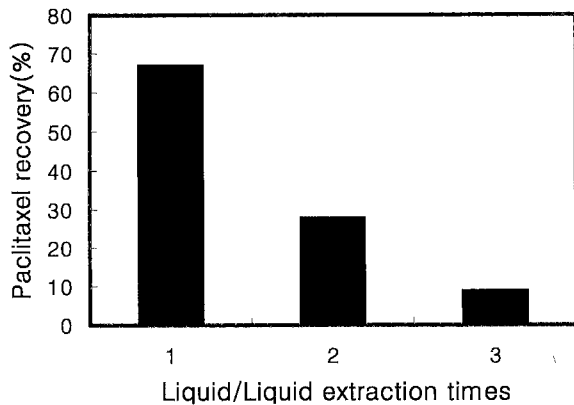


Figure 8. Effect of extraction times on paclitaxel recovery from methylene chloride/ MeOH extraction.

출 후 추출액의 농축은 rotary evaporator에서 수행되며 농축조건은 635 mmHg, 40°C에서 이루어 진다. 농축시간은 농축량에 따라 차이가 있으나 농축과정에서의 paclitaxel의 손실은 거의 없었으며 60°C, 2 hr 정도의 농축조건에서의 paclitaxel 손실은 거의 발생되지 않았다. 과도하게 메탄올 추출액이 농축되었을 경우 농축액내 타르성분이 침전되며 이러한 현상은 다음단계의 작업에 악영향을 미치게 된다. 만약 농축도중에 타르성분이 침전되었을 경우에는 새로운 메탄올에 다시 용해시켜 재농축을 실시 하였다. 메탄올 추출액을 농축하고 (1/5-1/8) 농축액에 CH₂Cl₂를 첨가하여 (MeOH: CH₂Cl₂=5:1) 액/액 추출을 실시하여 메탄올 농축액에 존재하는 극성불순물 (polar impurity)을 먼저 제거하였다. 액/액추출은 Figure 8에서 보는 바와 같이 3회에 걸쳐 실시하였으며 1회 추출시 66% paclitaxel회수하였고, 2회 추출시 26%, 3회 추출시 6% 회수하여 3회 추출을 통하여 대부분의 paclitaxel 회수 (>98%)가 가능하였다. 액/액 추출을 통하여 극성불순물을 제거된 CH₂Cl₂ 용액을 rotary evaporator (450 mmHg, 30°C)에서 농축하고 건조하여 다음 공정에 이용하였다.

요 약

식물세포 배양액으로부터 회수한 식물세포 내 수분 함량에 따른 추출효율은 건조 정도 보다는 건조방법에 상당히 영향을 받음을 알 수 있었으며 건조하여 추출할 경우 사용되는 추출용매를 절약할 수 있었다. 여러가지 유기용매를 이용하여 paclitaxel의 추출 경향을 조사한 결과 메탄올의 경우 가장 적은 양으로 가장 높은 paclitaxel 회수율을 얻어 가장 효과적임을 알 수 있었다. 추출방법의 경우 counter-current 형태를 사용할 경우 batch형태에 비하여 용매 사용량을 줄일 수 있으며 paclitaxel 회수율은 거의 차이가 없음을 알 수 있었다. Batch 형태를 이용한 메탄올 추출시 식물세포의 경우 4회 (회수율>99%), 식물세포조각의 경우 1회 (회수율>96%)의 추출로 대부분의 paclitaxel 회수가 가능 하였다. 또한 메탄올 추출시 90% 이상의 메탄올 농도이면 충분하며 (회수율>98%), 추출시biomass와 메탄올의 혼합비 (Kg biomass: L MeOH)는 1:1, 추출시간은 1회 5

분 이상이면 적당 하였다. 메탄올 추출물에 포함된 극성불순물들은 다음 공정인 액/액 (methylene chloride/ MeOH)추출로 제거하여 정제공정에 사용되어 진다.

REFERENCES

1. Wani, M.C., H. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, and A.T. McPhail (1971), Isolation of Taxol, A Novel Antileukemic Agent from *Taxus brevifolia*, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325-2326.
2. Rowinsky, E.K., L.A. Cazenave, and R.C. Donehower (1990), Review ; Taxol : A Novel Investigational Antimicrotubule Agent, *J. of the National Cancer Institute*, **82**, 1247-1257.
3. Kingston, D.G.I., G. Samaranyake, and C.A. Ivey (1990), The Chemistry of Taxol, A Clinically Useful Anticancer Agent, *J. Nat. Prod.*, **53**, 1-12.
4. Nicolaou, K.C., Z. Yang, J.J. Llu, H. Ueno, P.G. Nantermet, R.K. Guy, C.F. Clalborne, J. Renaud, E.A. Couladouros, K. Paulvannan, and E.J. Sorensen (1994), Total Synthesis of Taxol, *Nature*, **367**, 630-633.
5. Holton, R.A., C. Somoza, H.B. Kim, F. Liang, R.J. Biediger, P.D. Boatman, M. Shindo, C.C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K.K. Murthi, L.N. Gentile, and J.H. Liu (1994), First Total Synthesis of Taxol. 1.Functionalization of the B Ring, *J. of American Chemical Society*, **116**, 1597-1598.
6. Holton, R.A., H.B. Kim, C. Somoza, F. Liang, R.J. Biediger, R.J. Biediger, P.D. Boatman, M. Shindo, C.C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K.K. Murthi, L.N. Gentile, and J.H. Liu (1994), First Total Synthesis of Taxol. 2.Completion of the C and D Ring, *J. of American Chemical Society*, **116**, 1599-1600.
7. Chun, J.W.(1994), Studies on Cell Cultures of *Taxus* Species and Biosynthesis of Anticancer Agent Taxol, MS Thesis, Ajou University.
8. Witherup, K.M., S.A. Look, M.W. Stasko, T.J. Ghiorzi, G.M. Muschik (1990), *Taxus* spp. Needles Contain Amounts of Taxol Comparable to the Bark of *Taxus brevifolia*: Analysis and Isolation, *J. Nat. Prod.*, **53**, 1249-1255.
9. Cardellina II, J.H. (1991), HPLC Separation of Taxol and Cephalomannine, *J Liq. Chromatogr.*, **14**, 659-665.
10. Vanhaelen-Fastre, R., B. Diallo, M. Jaziri, M.L. Faes, J. Homes, M. Vanhaelen (1992), High-Speed Countercurrent Chromatography Separation of Taxol and Related Diterpenoids from *Taxus baccata*, *J. Liq. Chromatogr.*, **15**, 697-706.
11. Zhang, Z., Z. Jia (1991), Taxanes from *Taxus chinensis*, *Phytochem.*, **30**, 2345-2348.
12. Castor, T.P., T.A. Tyler (1993), Determination of Taxol in *Taxus* Media Needles in the Presence of Interfering Compounds, *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 723-731.
13. Rao, K.V., J.B. Hanuman, C. Alvarez, M. Stoy, J. Juchum, R.M. Davies, R. Baxley (1995), A New Large-Scale Process for Taxol and Related Taxanes from *Taxus brevifolia*, *Pharm. Res.*, **12**, 1003-1010.
14. Choi, H.K., T.L. Adams, R.W. Stahlhut, S.I. Kim, J.H. Yun, B.K. Song, J.H. Kim, S.S. Hong, and H.S. Lee

- (1999), Method for Mass Production of Taxol by Semi-Continuous Culture with *Taxus chinensis* Cell Culture, U.S.Patent, 5,871,979.
15. Hong, S.S., B.K. Song, J.H. Kim, C.B. Lim, H.S. Lee, K.W. Kim, I.S. Kang, and H.B. Park (1999), Method for Purifying Taxol from Taxus Biomass, U.S. Patent, 5,900,979.
16. Riegel, E.R.(1953), Chemical Process Machinery, 2nd ed., Chap.17, Reinhold, New York.