

## *Camptotheca acuminata* 현탁배양에서 세포응집이 Camptothecin 생산에 미치는 영향

최 훈·\*변 상 요  
아주대학교 공과대학 화학·생물공학부  
(접수 : 2000. 9. 27., 게재승인 : 2000. 11. 27.)

## Effect of Cell Aggregation on Camptothecin Production in Suspension Cultures of *Camptotheca acuminata*

Hoon Choi and Sang Yo Byun†

School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Kyunggi 442-749, Korea  
(Received : 2000. 9. 27., Accepted : 2000. 11. 27.)

Suspension cultures of *Camptotheca acuminata*, which is known to produce the anticancer indole alkaloid camptothecin and its derivatives, were made to increase camptothecin production. The capability of camptothecin production in suspended cells is decreased by repeated subculturing. Aggregated cells produced more camptothecin than single cells. Optimal cell aggregation was achieved in hybrid medium supplemented with 4% sucrose. Aggregated cells in hybrid medium with 4% sucrose produced  $18.04 \times 10^{-4}$  mg/L of camptothecin. The control of shaking speeds was effective at inducing cell aggregation and camptothecin production. A shaking speed of 100 rpm was found optimum to increase the cell aggregation with a camptothecin production of  $19.4 \times 10^{-4}$  mg/L.

**Key Words** : *Camptotheca acuminata*, camptothecin, cell aggregation

### 서 론

회수(*Camptotheca acuminata* Dence.(Nyssaceae))는 주로 중국 남부에서 발견되는 나무로 줄기와 수피에는 여러 종류의 alkaloid가 있는 것으로 알려져 있다. 특히 강한 항암 효과를 나타내는 이차대사산물인 camptothecin이 함유되어 있다(1). 세포독성이 강한 quinoline계 alkaloid인 camptothecin은 1966년 Wall과 동료연구원에 의해 *C. acuminata* Dence. 줄기와 껍질에서 처음으로 추출에 성공되었지만, 그 이후 강한 세포독성으로 인해 실험이 중단되었다. 그 후 1990년대부터 이러한 부작용이 없으면서 강력한 항암작용을 하는 camptothecin과 유도체를 합성하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다(2-4).

Camptothecin의 antitumor 작용 메카니즘은 기존의 여러 항암제의 작용과는 달리 DNA 복제시 DNA를 감고 푸는 작용을 하는 DNA topoisomerase I의 작용을 방해하여 DNA가 풀려지는 것을 방해함으로써 DNA와 RNA 합성의 강력한 억

제제로 작용하기 때문에 결국은 단백질 합성이 방해가 된다(5). 이 메카니즘은 triple complex의 안정화되는 정도에 따라 항암 활성이 좌우되며, 특히 lactone ring(E ring)이 여기에 관여한다. 암세포는 정상적인 세포에 비해 성장과 복제가 훨씬 빠르기 때문에 결과적으로 topoisomerase가 억제되면 성장을 하지 못하게 된다. 하지만 camptothecin의 모든 세포에 대한 강한 독성 때문에 이를 극복하고자 구조-활성간의 유도체 연구가 활발히 진행되었다. 그러한 노력의 일환으로 irinotecan과 topotecan이 94년부터 난치성 폐암, 난소암 등의 영역 등에서 임상실험이 진행되었고 FDA 승인을 받았다. 그 외에도 Glaxo-Wallcome, Daiichi 등의 기업에서 개발하고 있는 약 10개의 유도체들이 임상시험 중에 있고, 부작용 극복을 위한 노력이 진행되고 있다. 그리고 camptothecin 유도체는 간단한 반합성으로 camptothecin으로부터 쉽게 만들어질 수 있기 때문에 결국 유망한 암 치료제로 주목받게 될 것이다. 그러나 camptothecin을 추출할 수 있는 식물이 국내에서 자생하지 않고, 중국 본토에서 발견되어지기 때문에 결국 한정되는 식물에서의 직접 추출을 통한 camptothecin 공급의 한계성은 막대한 암 치료제 시장에 비추어 볼 때 camptothecin 대체 생산 기술 개발에 모든 연구 초점이 모일 것으로 예상된다.

본 연구에서는 이러한 식물에서의 직접 추출 방법의 한계를 극복하고자 *C. acuminata* 세포배양을 통하여 camptothecin

†Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea  
Tel : +82-31-219-2451, Fax : +82-31-214-8918  
E-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

을 생산하고자 하였다. 하지만 세포배양을 통하여 생산되는 camptothecin의 생산성이 매우 낮아(4) 이를 극복하는 것에 연구의 초점을 맞추게 되었다. 그중 세포 응집이 camptothecin 생산에 큰 영향을 미치는 것을 발견하여 관련된 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 세포주 및 배지 조성

본 연구에 사용된 세포주는 1995년 천리포 수목원에서 받은 씨앗을 재배하여 자란 식물체의 잎과 줄기로부터 callus를 유도하여(4) 25℃, 암 조건에서 계대 배양한 것이다. 배지에 첨가하는 성장조절제로는 2,4-D(5 μM)와 kinetin(0.5 μM)을 이용하였고, 탄소원으로 4%의 sucrose를 첨가시켰다. 배양배지로는 SH 배지와 MS 배지를 혼합한 hybrid 배지를 사용하였으며 배지의 pH는 1N KOH를 이용하여 5.8로 적정하였고, 현탁배양은 80 ml 배양배지가 든 250 ml 삼각플라스크와 125 ml 배양배지가 든 500 ml 삼각플라스크에서 7~10일 간격으로 세포와 배양배지의 비율을 1:3 정도로 하여 계대 배양하였다.

### 시약

Camptothecin 표준물질과 배지 제조에 사용된 시약 및 식물의 생장에 이용되는 식물호르몬, 탄소원으로 이용된 sucrose 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 구입하였다. 이차대사산물의 분석에 이용한 전계용매인 H<sub>2</sub>O, acetonitrile, chloroform 및 methanol은 Fisher Scientific Co.(Rochester, NY, U.S.A.)의 HPLC grade 제품을 이용하였으며 용매에 같이 투여되는 ion-pairing agent 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)와 Aldrich Chemical Co., Inc.(Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.)의 제품을 구입하였다. 기타 모든 시약도 특급이상의 시약을 사용하였다.

### 세포량 측정

세포량 측정은 배양된 세포의 fresh cell weight(FCW)와 dry cell weight(DCW)를 측정하여 세포 성장을 알아보았다. FCW는 배양 세포를 진공펌프를 이용하여 Whatman No.4 여과지로 여과하여 수분을 제거한 후 배지와 세포를 분리시켜 g/L 단위로 측정하였다. Dry cell weight(DCW)는 여과된 세포를 60℃에서 중량 변화가 없을 때까지 건조한 후 측정하였다.

### 추출 및 분석방법

Camptothecin 추출은 fresh cell에 methanol을 가하고 초음파 파쇄하여 추출을 한 뒤, H<sub>2</sub>O와 chloroform을 1:1(v/v)로 partitioning하여 chloroform 층을 따로 취한 뒤 진공 감압하여 증발시킨다. 증발시킨 잔유물은 다시 methanol로 추출을 하여 0.45 μm 막으로 여과하여 HPLC로 분석하였다. Camptothecin 분석은 HPLC system을 이용하였는데 mobile phase로는 0.075 M ammonium acetate buffer (ion pairing agent로 1 mM tetrabutylammonium phosphate)와 acetonitrile의 적절한 조합으

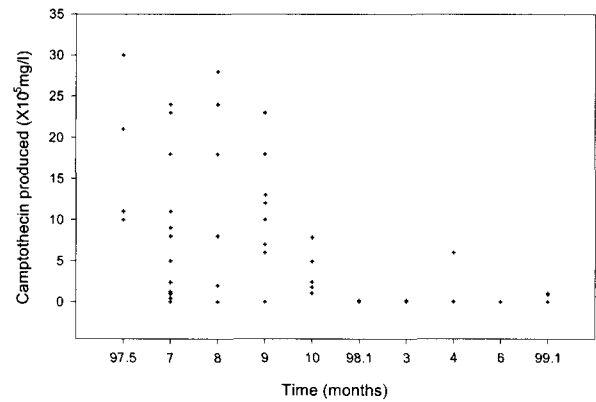


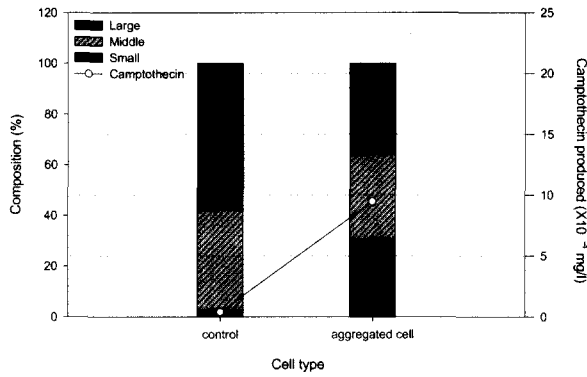
Figure 1. Fluctuation of the productivity of camptothecin in suspension culture of *Camptotheca acuminata*

로 이루어지는데 buffer: acetonitrile의 비율이 처음 15분동안 78:22 (v/v)의 일정비율로 유지하다가 15분에서 20분까지 78:22에서 50:50으로 linear gradient로 바꾸고 다시 20분에서 30분까지 50:50의 일정비율로 만들어 주었다. 사용된 컬럼은 C-18 column (Vydac C-18, 250x4.6 mm, 10 μm, 90 Å)이며, 유속은 1.2 mL/min으로 하였다. Fluorescence detector의 검색 파장은 350 nm(excitation)와 450 nm(emission)를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

일반적으로 분화되지 않은 상태, 즉, 미분화된 식물세포는 유전적으로 안정적이지 않으며 기내에서 장기배양을 할 경우 이차대사산물의 생산성이 감소하는 경향을 보인다(6). 본 연구에서도 희수의 잎, 줄기로부터 callus를 유도하여 현탁배양과 callus 배양을 수행한 결과, 시간이 지남에 따라서 camptothecin 생산능력을 상실하고 있는 경향을 보이고 있다. Figure 1은 97년 5월부터 99년 1월까지 *C. acuminata*에서 현탁배양한 세포의 camptothecin 생산량을 나타내고 있다. 그림에 나타낸 것과 같이 시간이 지남에 따라 camptothecin 생산량이 감소됨을 알 수 있다. 이것은 계속되는 계대 배양이 진행되는 동안 미분화된 현탁세포의 유전적인 불안정성에 의한 체세포 변이가 일어나 camptothecin를 생산하는 대사과정에 문제가 생긴 것으로 사료된다. 생산성의 변이를 유발시키는 원인은 아직 확실하게 규명된 것은 없지만, cell source의 이질성과 함께 유전적 요인이 작용하여 체세포 변이가 일어나고 그 결과로 alkaloid 생산량과 type 등의 차이를 가져오는 것으로 여겨진다.

이와 같이 장기배양 시 현탁세포의 이차대사산물 생산능력 상실에 따라 이를 극복하기 위해 고수율 세포주의 선발이 필요하게 된다. 고수율 세포주의 선발시 사용되는 방법은 여러 가지가 있는데, 그 중 형태학적인 선발을 이용하여 고수율 세포주를 선발할 수 있다. 현탁배양 식물세포를 보면 서로 상당히 다른 형태를 가진 세포들의 혼합체를 배양하고 있음을 관찰하게 된다. 즉, 세포의 형태학적 이질성이 높다는 것이다. 이는 식물세포 자체의 응집 특성 때문이라 할 수 있는데, 이들 세포는 단일세포(single cell)와 작은 세포 응집체(small aggregate) 및 큰 세포 응집체(large aggregate) 등으로



**Figure 2.** Effect of cell composition on the camptothecin production. Cell aggregation: small, <0.1 mm; middle, 0.1~1.5 mm; large, > 1.5 mm.

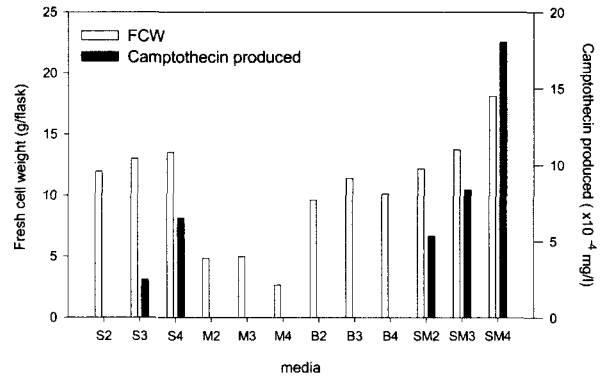
분류되기도 한다. 이들 분류된 집단 사이에 유용물질 생산능력에 차이를 보이는 경우가 많아 이를 고수율 세포주 선발에 이용할 수 있다. 이 방법의 대표적인 예로서 *Coffea arabica* 세포배양에 의한 caffeine 생산의 경우를 들 수 있는데, 선발된 0.5~2.0 mm 크기의 세포응집체들은 대조구보다 5배 정도 증가된 생산성을 보이는 보고도 있었다(7). 희수 세포의 경우 장기 배양할수록 처음 가지고 있던 형태학적 이질성을 잃어버리는 경향을 나타내는 데, 점차 single cell로 바뀌는 현상이 발생한다. 그리하여 single cell과 large aggregate cell의 camptothecin 생산량을 비교한 결과를 Figure 2에 나타난 것과 같이 cell composition이 58:39:3(small:middle:large), 36:33:31일 때, 각각 0.39,  $9.46 \times 10^{-4}$  mg/l로 large aggregate cell의 비율이 클수록 camptothecin의 생산량이 많았다. 따라서 이후의 연구에서는 세포 응집을 유도하기 위해 배지 종류 및 탄소원의 농도, shaking speed를 변화하여 camptothecin의 생산을 촉진하고자 하였다.

**배지와 탄소원에 의한 세포응집의 영향**

일반적으로 식물세포 현탁배양은 fine cell과 aggregated cell을 가지게 되는데, 이는 현탁배양세포는 각각의 세포들이 붙어있는 기관에서부터 유도되었기 때문에 점차로 응집하려는 성질을 가지고 있기 때문이다. 현탁배양에서의 세포응집은 세포간의 communication을 향상시킴으로 세포에서 생성된 nutrient들의 교환을 증진시키는 역할을 한다(8-10).

희수세포 현탁배양에서 cell aggregation을 유도하기 위해 배지와 carbon source의 종류에 의한 영향을 알아보았는데, 사용된 기본 배지로는 SH, MS, B5, SH와 MS를 혼합한 hybrid배지 등 4가지를 가지고 영향을 알아보았다. 여기에 성장조절제로 0.5 mg/l kinetin, 0.5 mg/L 2,4-D, 탄소원으로 sucrose 2, 3, 4%를 첨가하였다. 이들 배지를 125 mg 삼각플라스크에 50 mL씩 넣고 여기에 희수 현탁세포 fresh cell 5 g을 접종하여 shaking incubator에서 150 rpm으로 진탕배양하였다. 3주동안 7일간격으로 계대배양하고 마지막 계대 후 10일째 되는 날에 추출하여 분석하였다.

배지의 영향에 대한 결과를 보면, 세포 생장은 hybrid 배지에서 가장 좋았으며, SH배지에서는 세포생장은 잘 일어나지만 배양이 진행되는 동안 cell debris가 많아지는 것을 알 수 있었다. MS배지의 경우에는 세포응집이 일어나지 않고 오히려



**Figure 3.** Effects of various media and sucrose concentrations on alkaloid production. S2: SH 2% sucrose, S3: SH 3% sucrose, S4 : SH 4% sucrose, M2: MS 2% sucrose, M3: MS 3% sucrose, M4: MS 4% sucrose, B2: B5 2% sucrose, B3: B5 3% sucrose, B4: B5 4% sucrose, SM2: Hybrid 2% sucrose, SM3: Hybrid 3% sucrose, SM4: Hybrid 4% sucrose

**Table 1.** The cell compositions on various media and sucrose concentrations (%)

	SH 2%	SH 3%	SH 4%	MS 2%	MS 3%	MS 4%
Small	84	73	59	100	100	100
Middle	12	21	25	-	-	-
Large	4	6	16	-	-	-
	B5 2%	B5 3%	B5 4%	Hyb. 2%	Hyb. 3%	Hyb. 4%
Small	88	83	78	58	63	47
Middle	12	17	22	31	29	32
Large	-	-	-	11	18	21

려 single cell로 바뀌며 세포 생장이 감소하는 결과를 나타내었다. 이것은 희수세포가 배지의 농도에 따라서 영향을 받는 것으로 생각되는데, 고농도의 염을 갖고 있는 MS 배지에서는 세포의 분열이 잘 일어나지 못하고, 세포 자체도 생장에 저해를 받지만, 세포 자체가 깨어져서 cell debris를 만드는 경향은 아주 낮아 세포를 정제시켰을 경우 배지와 세포간의 구별이 뚜렷하게 나타났다. 하지만 저농도의 염을 가지는 B5 배지에서는 계대 배양 후 7일 정도면 약 2배의 세포량을 보이고 있지만 세포 응집은 형성되지 않았고, cell debris가 많이 형성되었다. Hybrid 배지에서는 sucrose 각각의 농도에서 세포 응집이 형성되며 sucrose의 농도가 높아질수록 그 정도가 더욱 많았다.

Camptothecin 생산 면에서 살펴보면, Figure 3에서 알 수 있듯이, 세포응집이 일어나지 않은 MS, B5 배지에서는 어느 sucrose 농도에서도 camptothecin은 생성되지 않았다. 그리고 어느 정도 세포 응집이 일어난 SH, Hybrid 배지에서 camptothecin이 생성되었다. 배지별, 탄소원의 농도별로 cell composition은 Table 1과 같다. SH 배지에서는 2, 3%에서 camptothecin이 생성되었으며, Hybrid 배지의 경우 4%의 sucrose에서 가장 많은  $18.03 \times 10^{-4}$  mg/l의 camptothecin이 생성되었다. Table 1을 참조하면 large aggregated cell의 함량이 많을수록 camptothecin의 생산능력이 좋음을 알 수 있다.

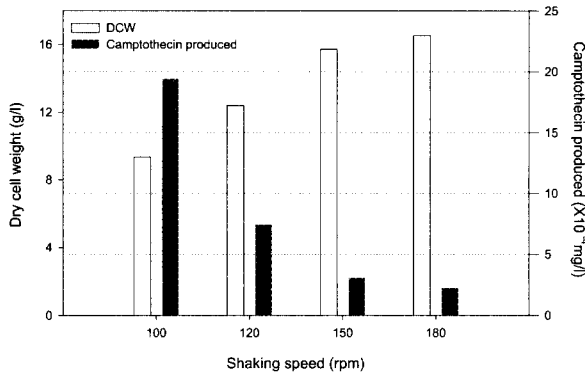


Figure 4. Effects of various shaking speed on cell aggregation

각각의 기본 배지에서 세포응집정도가 다르게 나타나고 있는데 기본 배지를 살펴보면, 배지의 구성 성분 중에서 질소의 차이가 가장 크게 나타나고 있다. 질소는 보통 nitrate ion이나 ammonium ion 형태로 사용되는데, 실제로는 KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 등과 같은 염의 형태로 넣어준다. 질소는 식물세포 배양시 성장에 근본적인 영향을 미친다. 질소는 생물체에서 환원형태로 존재하는데, 이 환원 반응은 에너지를 요구하는 반응이므로 환원된 형태로 질소를 첨가시키는 것이다. 또, 식물세포는 ammonium ion에 강한 내성을 보이고 있으므로 세포배양 시 유리하다. 하지만, ammonium ion보다 nitrate ion을 많이 이용하고 있는데 이것은 ammonium ion 흡수 시에 수소이온을 방출하게 되므로 pH가 급격히 떨어지게 된다. 이런 낮은 pH에 대한 buffering 과정에서 세포 생장의 저해가 일어날 수 있다(11). 이로써 이들 두 가지 질소원의 적절한 조합이 세포 성장 및 이차대사산물의 생산에 큰 영향을 미칠 것이다. 또한 탄소원의 농도가 높아질수록 배지 내 점도의 상승으로 세포의 응집이 유도되었을 것으로 생각된다.

#### 교반속도에 의한 세포 응집의 영향

회수세포의 현탁배양에서 교반기의 속도(rpm)가 세포의 응집에 미치는 영향에 대해 알아보았다. 교반은 세포가 배지 성분 및 산소와 접촉하는 데 필요하고 세포간 communication을 하기 위한 조건으로 필요하다. 식물세포를 배양하기 위해서 적합한 산소를 공급해주어야 하는데, 산소의 양이 너무 많으면 세포에 toxic한 영향을 끼치게 된다. 반대로 너무 산소의 양이 적으면 이것 또한 세포에 유해한 환경으로 작용하게 된다. 다시 말하면, 배지 내 존재하는 nutrients와 산소를 세포에 적절히 공급해 줄 수 있는 최소의 교반속도가 존재하는 것이다. 이번 실험에서는 교반기의 회전 속도가 세포의 응집을 유도하는 데 어떠한 영향을 미치며 이에 따라 camptothecin의 생산에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였다. 회전속도로는 100, 120, 150, 180 rpm을 사용했으며 stroke는 3~5 cm 이었다. Figure 4에 나타나듯이, 세포생장은 가장 높은 180 rpm에서 16.54 g DCW/L로 세포생장을 보였으며 교반속도가 낮아질수록 세포생장은 감소하였다. 반면에 교반속도가 가장 낮은 100 rpm에서 세포응집은 가장 많이 일어났으며, 이때 camptothecin의 생산량은  $19.4 \times 10^{-4}$  mg/l로 나타났다. 각 교반속도에서의 cell composition은 Table 2와 같다. Table에서 알 수 있듯이, large aggregated cell의 함량이 많을수록

Table 2. The cell compositions on various shaking speeds of suspended cells of *Camptotheca acuminata*

	Shaking speed (rpm)			
	100 rpm	120 rpm	150 rpm	180 rpm
Small	41	49	66	70
Middle	21	23	22	21
Large	38	28	12	9

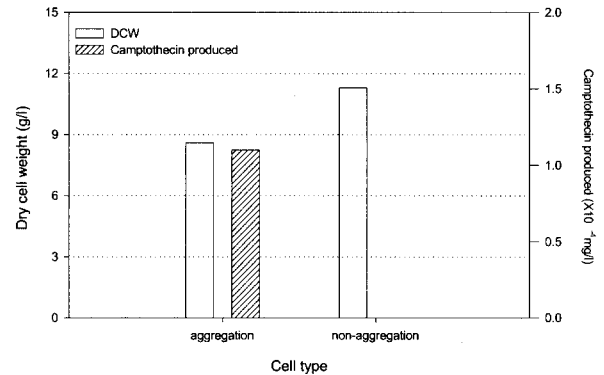


Figure 5. Effects of cell aggregation on alkaloid production

camptothecin의 생산량은 증가하고 있다. 여기에서 가장 낮은 100 rpm일 때 가장 높은 생산능력을 가지고 있었는데, 낮은 rpm에서는 nutrients나 산소의 mass transfer도 동시에 감소하게 된다. 따라서 이것이 stress로 작용하여 이차대사산물의 생산을 촉진할 수도 있기에 이것을 확인하기 위하여 aggregated cell과 non-aggregated cell을 동시에 100 rpm에서 배양해보았다. 이것의 결과는 Figure 5에서 보여지고 있다. 그림을 보면, 동일한 100 rpm에서 배양했을 때, 즉, mass transfer의 조건이 같을 때, aggregated cell에서만 camptothecin이 생성되었다. 이것으로 mass transfer의 감소로 인하여 camptothecin을 생산한 것이 아니라 세포응집에 의해서 생산된 것으로 확인되었다.

낮은 교반속도에서 세포가 응집되는 것은 교반속도가 낮기 때문에 세포가 받는 shear stress가 낮아짐으로 인한 세포의 파쇄현상이 감소하여 세포가 가지고 있는 고유의 성질인 응집현상이 충분히 일어난 것으로 보인다. 하지만 Figure 5를 보면 100 rpm에서는 세포 생장이 거의 일어나지 않고 장기적인 배양을 고려해볼 때 세포의 유지가 불가능하다고 생각된다. 따라서 세포의 배양을 100 rpm에서 수행하는 것은 세포 응집은 되지만 세포의 유지가 되지 않으므로 배양조건으로는 부적합하다고 하겠다. 따라서, 배양조건으로는 세포의 성장과 응집이 유지될 수 있는 120 rpm이 적합하기에 이후의 실험에 사용된 모든 세포의 배양조건에서 교반기의 교반속도는 120 rpm으로 하였다. 그리고 세포의 생장은 거의 일어나지 않지만 이차대사산물의 생산에 좋은 결과를 보인 100 rpm은 생산 조건, 즉, two-stage culture 방법을 이용한 production stage의 한 조건으로 생각할 수 있다.

#### 응집된 *C. acuminata* 현탁배양에서의 kinetics

지금까지 실험된 기초 결과를 바탕으로 회수세포 현탁 배양에서의 시간에 따른 세포 성장과 이차대사산물인 camptothecin의 생성을 알아보기 위하여 125 ml 삼각플라스크에

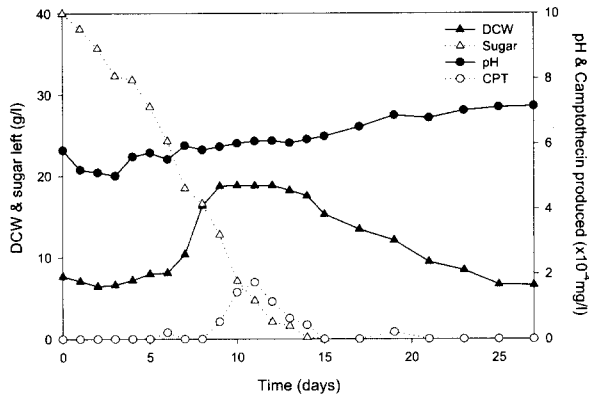


Figure 6. Cell growth and alkaloid production in suspension cultures of *C. acuminata*

서, 2,4-D 0.5 mg/L와 kinetin 0.5 mg/l 그리고 탄소원으로 sucrose 4%가 첨가된 hybrid 배지를 50 ml 넣고 여기에 회수 세포를 5 g FCW씩 접종하여 25°C, 압조건에서 120 rpm으로 배양하면서 시간별로 세포생장과 이차대사산물의 생성량을 측정하였다. Figure 6에서 알 수 있듯이, lag phase가 다른 세포주에 비해 약간 긴 편이며, 본격적인 세포생장은 6일째부터 시작되고, exponential phase 말기는 약 11일째 나타나며, 이때 DCW는 최고값인 18.85 g/l을 나타내었다. 그 후 3~4일 정도의 stationary phase 후에 DCW는 cell lysis에 의해서 계속적으로 감소하게 된다. Exponential growth phase에서의 비성장속도( $\mu$ )는 0.269 day<sup>-1</sup>이며, 세포의 배가시간( $t_d$ )는 2.58일이었다. 회수세포의 성장 형태를 다른 세포주, *Eschscholtzia californica*와 *Taxus baccata* 등과 비교하면, 이들은 lag phase가 2일 이하로 회수세포가 다소 긴 편인데 이는 주위 환경에 대한 초기의 적응력이 낮다는 것을 의미한다. 그러나 비성장속도와 배가시간이 성장속도가 빠른 편인 *Eschscholtzia californica*는 0.25 day<sup>-1</sup>, 2.77일이고 그 보다 늦은 *Taxus baccata*는 0.104 day<sup>-1</sup>, 6.7일과 비교했을 때 세포 성장속도가 빠르다는 것을 보여 주고 있다(12,13). 탄소원으로 sucrose를 이용하였는데, invertase에 의해서 sucrose는 glucose와 fructose로 빠르게 가수분해되어 배양 5일째 모두 소모되었다. 당 소모에 있어서 fructose에 비해 glucose의 소모가 더 빠르게 나타났고 glucose와 fructose도 배양 15일째, 즉, stationary phase 말기에 모두 소모되었다. 이것은 세포 성장속도는 빠르지만 세포가 감소되는 시점이 배양일로부터 상당히 늦는 것과 탄소원이 그때까지 남아있는 것으로 보아 탄소원은 세포의 성장 이외에도 이차대사산물의 생산이나 세포자체의 유지 등에도 많은 작용을 하는 것으로 생각된다.

시간에 따른 camptothecin의 생성경향은 배양초기에는 거의 생성이 되지 않다가 exponential phase 말기부터 생성되기 시작해서 stationary phase 초기에 최고 1.73 × 10<sup>-4</sup> mg/l이 생성되다가 그 이후에 급격히 감소하는 경향을 보였다. 배지 내에서는 camptothecin이 검출되지 않았는데 이는 회수세포는 세포내에 camptothecin을 축적한다는 것을 암시한다. camptothecin의 생성 경향을 보면 세포 생장이 최고에 달해 더 이상의 생장이 일어나지 않은 단계에서 생성이 되고 있어 식물세포가 불리한 주위 환경에 대한 대응으로써 이차대사산물이 축적된다는 사실과 비슷한 결과를 보인다. 또한, camptothecin은

어느 특정기간에만 생성되다가 사라지는데 이것으로 미루어 camptothecin은 이차대사산물 metabolic pathway 상의 최종 산물이 아닌 중간 산물일 가능성이 높은 것으로 생각된다.

## 요 약

최근 항암제로서 관심을 끌고있는 camptothecin을 생산하기 위한 회수(*Camptotheca acuminata*) 현탁세포 배양과 camptothecin의 생산을 촉진하는 연구를 수행하였다. 장기간 배양으로 발생하는 이차대사산물 생산능력의 변이가 관찰되어 이를 극복하고자 세포의 응집을 통한 camptothecin의 생산을 촉진하고자 하였다. 세포의 응집은 hybrid 배지와 sucrose 4%일 때에 가장 많이 유도되었고, 이때 camptothecin의 생산량도 18.04 × 10<sup>-4</sup> mg/L로 가장 높은 생산성을 가졌다. 또한, 세포의 응집을 유도하기 위한 일환으로 교반속도를 변화시켜 이에 대한 효과를 알아보았는데, 100rpm에서 가장 많은 세포응집이 유도되었으며, camptothecin의 생산 역시 19.4 × 10<sup>-4</sup> mg/L로 가장 높은 결과를 나타내었다.

## 감 사

본 연구는 한국과학재단지정 초정밀생물분리기술연구센터 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Hengel, A. J., M. P. Harkes, H. J. Wichers, P. G. M. Hesselink, and R. M. Buitelaar (1992), Characterization of Callus and Camptothecin Production by Cell Lines of *Camptotheca acuminata*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 11~18.
- Brodelius, P. (1985), The Potential Role of Immobilization in Plant Cell Biotechnology, *Trends Biotechnol.*, 3, 330~337.
- Su, W. W., E. C., Asali, and A., E., Humphrey (1994), *Anchusa officinalis* : Production of Rosmarinic Acid in Perfusion Cell Culture, *Biotechnol. Agric. Forest.*, 26, 1~19.
- Song, S. H. and S. Y. Byun (1999) Characterization of Cell Growth and Camptothecin Production in Cell Cultures of *Camptotheca acuminata*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 8(6), 631~638.
- Wall, M. E. and M. C. Wani (1995), Camptothecin and Taxol : Discovery to Clinic-Thirteenth Bruce F. Cain in Memorial Award Lecture, *Cancer Research*, 55, 753~760.
- DiCosmo, F. and G. H. N. Towers (1984) Recent Advances in Phytochemistry 18 (B. N. Timmermann, C. Steelink, and F. A. Loewus, eds.), *Plenum Press*, 97~175.
- Verporte, R., van der Heijden, R. (1993), Plant Cell Biotechnology for Production of Alkaloid., *J. Nat. Prod.*, 56(2), 186~207.
- Cho, G. H. (1987) Production of Purine Alkaloids and Bioreactor Operation Strategies for Plant Cell Cultures of *Coffea arabica*, Ph.D. thesis, Rutgers, The State University of New Jersey.
- Frischknecht, P., T. Baumann, and H. Wanner (1977) Tissue Culture of *Coffea arabica* Growth and Caffeine Formation, *Planta Med.*, 31, 344~350.

10. Kim, D. I. (1989) Process Strategies and Bioreactor Operation for Berberine Production in Cell Suspension Cultures of *Thalictrum rugosum*, Ph.D. thesis, Rutgers, The State University of New Jersey.
11. Jeffrey, W. P. and J. M. Walker (1990) Plant Cell and Tissue Culture, *Jumana Press*, 13~37.
12. Byun, S. Y. (1989) Studies on Elicitation and In-situ Recovery of Alkaloids in Suspension Cultures of *California Poppy*, Ph.D. thesis, Dept. of Chem. Eng., Rutgers, The State University of New Jersey.
13. Moon, W. J, B. S. Yoo, D. I. Kim, and S. Y. Byun (1998) Elicitation Kinetics of Taxane Production in Suspension Cultures of *Taxus baccata* Pendula, *Biotech. Tech.*, **12**(1), 79-81