

# *Taxus wallichiana* Zucc. 현탁세포에서 Jasmonic Acid-Cellulase 복합 Elicitor가 Paclitaxel 생합성에 미치는 영향

Nguyen Ngoc Hoi · Hoang Van Luong<sup>1</sup> · Nguyen Van Long<sup>1</sup> · Vu Binh Duong<sup>1</sup> · 변상요\*

아주대학교 대학원 응용생명공학과, <sup>1</sup>Vietnam Military Medical University

## Effects of Jasmonic Acid-Cellulase Combined Elicitors on the Paclitaxel Production in Suspension Cultures of *Taxus wallichiana* Zucc.

Nguyen Ngoc Hoi, Hoang Van Luong<sup>1</sup>, Nguyen Van Long<sup>1</sup>, Vu Binh Duong<sup>1</sup>, and Sang Yo Byun\*

Dept of Applied Biotechnology, Graduate School, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

<sup>1</sup>Vietnam Military Medical University, Hanoi, Vietnam

**Abstract** Cell cultures of *Taxus wallichiana* Zucc. were made to enhance the production of anticancer agent paclitaxel. In suspension cultures, the maximum cell growth rate in exponential growth phase was  $0.14 \text{ day}^{-1}$  which was correlated to 4.96 days of cell doubling time. The production of paclitaxel was non-growth associated. The paclitaxel production was started after the exponential growth phase and increased to declined phase where the maximum concentration was observed. Various elicitors were tested to enhance the production of paclitaxel. The combination of two elicitors of jasmonic acid and cellulase increased the production of paclitaxel 1.8 and 3.1 times compared to paclitaxel production by individual elicitor respectively.

**Keywords:** *Taxus wallichiana* Zucc., paclitaxel, jasmonic acid, cellulase

### 서 론

*Taxus wallichiana* Zucc.는 일명 히말라야 주목으로 불리고 있으며, 주로 파키스탄과 인도에 분포 서식하고 있다 [1]. 이 주목은 그 지역에서 전통요법 치료제로 다양하게 활용되고 있는데, 특히 잇은 asthma, indigestion, epilepsy 등에 효과가 있다고 전해지고 있다 [2]. 일반적으로 주목은 항암제 paclitaxel 또는 그 유도체들을 생합성하는 사실이 널리 알려져 있으며, *T. wallichiana*도 paclitaxel 뿐 아니라 새로운 유도체들이 발견되어 보고되고 있다 [3,4].

Paclitaxel은 유방암과 난소암을 포함한 여러 가지 종류의 암에 대해 탁월한 치료 효과를 보여 널리 사용되고 있는 항암물질이다. 암세포에 대한 paclitaxel의 작용기작은 기존

대부분의 항암제들이 tubulin으로부터 microtubule의 형성을 방해하는 것과는 달리 cell cycle 상의 G2 후반기 또는 M phase에 작용하여 microtubule의 합성을 촉진하고 안정화시켜 그 후의 분해 과정을 억제하는 특이한 기작을 갖는다 [5]. 미국에서는 1983년에 FDA에 의해 임상실험이 시작되어, 10년 후인 1992년에 난소암 치료제가 허가를 받아 Bristol-Myers Squibb사에 의한 판매가 허용되었으며 1994년에는 유방암의 치료에도 사용이 허가되었다. Paclitaxel의 생산 공급은 주로 주목 나무로부터 추출에 의존하여 왔으나, 환경과피의 문제 등으로 다양한 대체방법이 개발되었다. Paclitaxel의 전합성 뿐 아니라 전구체를 이용하는 반합성법, 그리고 주목 식물세포 배양을 통한 생산 방법 등이 개발되었다. 이러한 여러 방법 중에서도 가장 친 환경적이며 경제성이 우수한 방법으로 주목세포배양에 의한 paclitaxel 생산 방법이 인정되고 있으며, 이미 여러 국가에서 생산 중이거나 시도하고 있는 것으로 알려져 있다.

식물 또는 식물세포배양에서 이차대사산물의 생성을 촉진

### \*Corresponding author

Tel: +82-31-219-2451, Fax: +82-31-219-1610

e-mail: sybyun@ajou.ac.kr

하는 물질을 elicitor라고 하며 elicitor 처리에 의하여 축적되는 이차대사산물의 antibiotic 활성을 지닌 화합물을 일반적으로 phytoalexin이라 한다. Phytoalexin의 축적에 의한 antibiotic 방어는 식물의 방어기작의 하나로 매우 중요한 역할을 한다. 다양한 종류의 물질이 elicitor로서 작용할 수 있는데, elicitor는 크게 두 종류로 구분된다. 균류, 세균, 효모 등의 추출물로부터 또는 여과액 등과 같이 생물체로부터 얻어지는 화합물을 biotic elicitor라하고 chemical stress agent와 biotic elicitor 이외의 모든 물질들을 abiotic elicitor라 구분한다. Elicitor의 다양한 종류와 관련 작용 기작은 크게 네가지로 구분된다. 첫째 미생물에 의한 elicitor의 직접적 방출에 의하여 식물세포가 인식하는 과정으로 대두세포의 경우 elicitor receptor site가 원형질막에 위치하고 있음을 보여준다. 둘째로 미생물 유래의 효소로부터 식물세포벽의 구성성분이 분해되어 elicitor로 작용하는 방법으로 대표적으로 균류의 endopolygalacturonic acid lyase와 pectinase를 들 수 있다. 셋째로 식물세포의 효소에 의해 미생물 세포벽 성분이 방출되어 elicitor로 작용하는 과정으로 여기에 속하는 예로 chitosan과  $\beta$ -1,3-endoglucanase를 들 수 있다. 넷째로 여러 종류의 자극에 대하여 식물세포에 의하여 형성 또는 방출되는 elicitor로서 자연계에 endogeneous하고 constitutive한 특성을 지닌다 [6,7].

Elicitor의 사용은 식물세포배양에서 목적하는 이차대사산물의 생산성 향상으로 이어질 수 있어 식물세포배양에 의한 유용물질 생산의 상업화 과정에서 중요한 방법으로 적용될 수 있다. 또한 한 종류의 elicitor를 쓰는 것 보다 두 종류 또는 그 이상의 복합 elicitor를 적용하는 경우 이차대사산물 생성 증진 효과가 우수할 수 있다. 본 연구에서는 이러한 elicitor의 영향을 *T. wallichiana* 현탁배양에서 paclitaxel 생산 증진 연구를 통하여 밝히고자 한다. 특히 신호전달 물질인 jasmonic acid와 cellulase 복합 elicitor를 적용하여 paclitaxel 생성에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 세포 배양

본 연구에 이용된 *Taxus wallichiana* Zucc. 세포주는 2008년 베트남 국방의대 (military Medical University, Hadong, Hanoi)로부터 캘러스 형태로 분양되었으며 25°C, 암 조건에서 계대 배양 하였다. 캘러스 및 현탁 배양 배지로 SH (Schenk & Hildebrandt)배지를 이용하였으며, 탄소원으로 1.5% sucrose, 0.5% glucose, 생장조절제로 NAA 5  $\mu$ M, BAP 0.5  $\mu$ M을 첨가하였다. 배지의 pH는 1 N KOH와 1 N HCl을 이용하여 멸균전에 5.8로 적정하였다. 현탁 배양은 100 mL 배양 배지가 든 250 mL 삼각플라스크와 200 mL 배양배지가 든 500 mL 삼각플라스크를 120 rpm 회전교반기에서 유지하였으며 7-10일 간격으로 계대배양하였다. 또한 캘러스배양은

약 20-30 일 주기로 계대 유지 배양 중이다. 삼각플라스크 회전 배양 실험은 현탁 배양으로서 50 mL 삼각플라스크에서 액체 배지를 각각 20 mL 씩 넣고 세포를 접종하여 회전 교반 배양기에서 120 rpm으로 진탕 배양하였다. 접종 세포는 500 mL 삼각플라스크에서 배양 유지하던 대수증식기 중기의 세포를 이용하였으며 접종량은 20% (w/v)로 하였다.

### 시약

Paclitaxel 및 taxane 표준물질 및 배지 제조에 사용한 시약, 효소 및 식물호르몬 등은 Sigma-Aldrich Corp.로부터 구입하였다. Paclitaxel 및 taxane 분석에 이용한 전개용매인 H<sub>2</sub>O, acetonitrile 및 methanol은 HPLC grade 제품을 이용하였다.

### 분석

세포량은 배양된 세포의 fresh cell weight (FCW)와 dry cell weight (DCW)를 측정하여 세포생장을 측정하였다. FCW는 배양 세포를 진공펌프를 이용하여 Whatman No.1 여과지로 여과하여 수분을 제거한 후 배지와 세포를 분리시켜 g/L 단위로 측정하였다. DCW는 위에서 여과한 세포를 60°C 건조기에서 30시간 이상 건조하여 g/L 단위로 측정하였다. Paclitaxel 및 taxane 함량은 세포내 함량과 배지에 존재하는 세포의 함량으로 구분하였다. 세포내 함량은 fresh cell에 methanol을 가하고 초음파 파쇄하여 추출한 뒤 methylene chloride (MC)와 물을 (1 : 1, v/v) 이용해 partitioning하여 수용액 층을 제거한 후 MC를 진공 감압하여 제거하였다. 다시 methanol로 추출하여 0.45  $\mu$ m, 13 mm membrane filter (Baxter Scientific Products, U.S.A.)로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 배지에 존재하는 taxane은 일정량의 배지를 MC와 1 : 1로 partitioning하여 MC를 진공 감압한 후 methanol로 녹여 여과 후 분석하였다. 주목 세포배양에서 생성된 paclitaxel 및 유도체 taxanes 분석 방법으로 HPLC system을 이용하였다. Taxane분석에는 reversed phase pentafluorophenyl (PFP) HPLC column (4.6×250 mm 5  $\mu$ , 60 Å)을 이용하였다. PFP column을 이용한 분석에서의 이동상은 H<sub>2</sub>O와 acetonitrile을 62 : 38 (v/v)로 25분간 일정한 비율로 유지한 후 10분간 linear gradient로 57 : 3 (v/v)으로, 다시 5분간 linear gradient로 55 : 45 (v/v)로 유지하였다. 유속은 1.2 mL/min, sample 주입량은 20  $\mu$ L로 유지하였다. 검색 파장은 228 nm와 280 nm를 이용하였다.

### 결과 및 고찰

#### *Taxus wallichiana* Zucc. 현탁세포배양에서의 basic kinetics

현탁 배양 세포의 시간에 따른 세포 성장과 이차대사산물

인 paclitaxel의 생성을 나타내는 basic kinetics 특성을 조사하였다. 125 mL 삼각플라스크에서 탄소원으로 1.5% sucrose, 0.5% glucose, 생장조절제로 NAA 5  $\mu\text{M}$ , BAP 0.5  $\mu\text{M}$ 이 첨가된 SH 배지를 50 mL 넣고 여기에 *Taxus wallichiana* Zucc. 세포를 5 g (FCW)씩 접종하여 25°C, 암조건에서 120 rpm으로 배양하면서 시간별로 세포생장과 이차대사산물의 생성량을 측정하였다. Fig. 1에서 알 수 있듯이, lag phase가 약간 긴 편이며, 본격적인 세포생장은 4일째부터 시작되고, exponential phase 말기는 약 10일째 나타나며, 이때 DCW는 최고값인 11.7 g/L를 나타내었다. 그 후 3~4일 정도의 stationary phase 후에 DCW는 cell lysis에 의해서 계속적으로 감소하게 된다. Exponential growth phase에서의 비생장속도 ( $\mu$ )는 0.14  $\text{day}^{-1}$ 이며, 세포의 배가시간 ( $t_d$ )는 4.96 day이었다. *Taxus wallichiana* Zucc. 세포의 성장 형태를 다른 세포주, *Eschscholtzia californica*와 *Taxus baccata* 등과 비교하면, 이들은 lag phase가 2일 이하로 *Taxus wallichiana* Zucc. 세포가 다소 긴 편인데 이는 주위 환경에 대한 초기의 적응력이 낮다는 것을 의미한다. 그러나 비생장속도와 배가시간이 생장속도가 빠른 편인 *Eschscholtzia californica*는 0.25  $\text{day}^{-1}$ , 2.77일과 비교하면 늦은 편이지만, *Taxus baccata*의 0.104  $\text{day}^{-1}$ , 6.7일과 유사함을 알 수 있었다 [7,8]. 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 생장속도는 빠르지만 세포가 감소되는 시점이 배양일로부터 상당히 늦는 것과 탄소원이 그때까지 남아있는 것으로 보아 탄소원은 세포의 생장 이외에도 이차대사산물의 생산이나 세포 자체의 유지 등에도 많은 작용을 하는 것으로 생각된다.

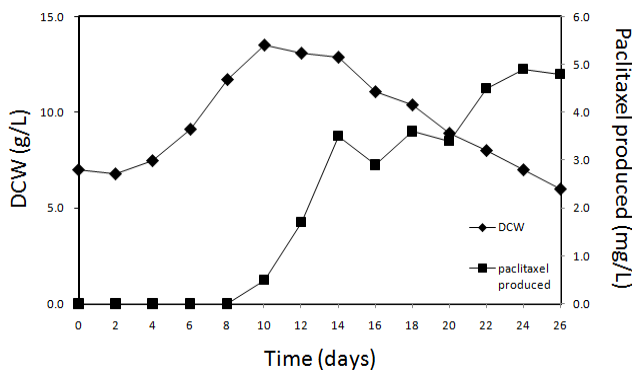


Fig. 1. Time course changes of cell growth and paclitaxel production in suspension cultures of *Taxus wallichiana* Zucc.

Paclitaxel의 생성 kinetics는 배양초기에는 거의 생성이 되지 않다가 exponential phase 말기부터 생성되기 시작해서 stationary phase에서 계속 증가하다 declined phase에서도 지속적으로 증가하였다. Declined phase에서 paclitaxel 생성

은 최고 4.9  $\text{mg/L}$ 까지 생성되었다. 배지 내에서는 paclitaxel가 검출되지 않았는데 이는 *Taxus wallichiana* Zucc. 세포는 세포내에 paclitaxel를 축적한다는 것을 암시한다. Paclitaxel의 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.

### Elicitor의 선별

식물세포 현탁배양에서 세포 생장의 최적 조건을 찾는 것은 세포배양에서 기본적인 것이라 할 수 있다. 하지만 오직 잘 자라기만 하는 세포주는 이차대사산물의 생성능력이 저하되는 경우가 많이 발생하게 된다 [8,9]. 하지만 이차대사산물의 생산을 증가시키기 위해서 세포의 성장을 억제하는 것은 좋은 방법이 아니다. 생장이 잘 되는 세포에 새로운 기작을 응용해서 이차대사산물의 생성을 증가시키는 것이 좋은 방법이라 할 수 있는데, 방법의 하나가 elicitation이라 할 수 있다. Elicitor로 처리된 세포는 이차대사산물의 생성기간을 단축시킬 수 있고, 생성량을 증가시킬 수 있다 [10].

본 연구에서는 3가지의 elicitor; jasmonic acid, pectinase, cellulase를 먼저 시험하였다. *Taxus wallichiana* Zucc. 현탁 세포 7 g을 50 mL의 배지가 들어있는 125 mL 삼각플라스크에 접종하고 그와 동시에 50  $\mu\text{M}$  jasmonic acid, 15 unit/gFCW pectinase, cellulase를 투여하고 72시간 후에 추출하여 분석하였다. 사용된 elicitor는 cold sterilization 방법으로 멸균을 수행하였다. 이 중 jasmonic acid와 cellulase에서 각각 6.5, 4.1  $\text{mg/L}$ 의 paclitaxel이 생성되었다 (Fig. 2).

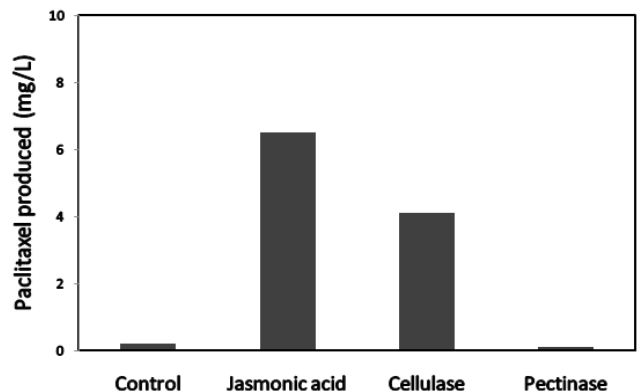
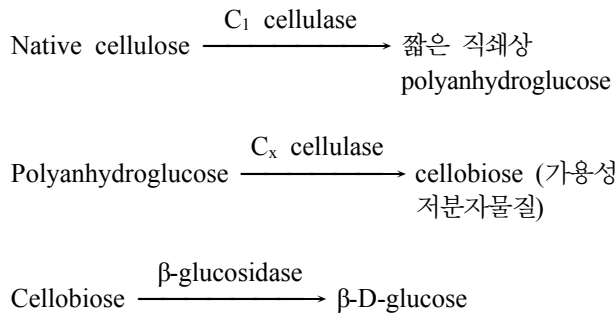


Fig. 2. Enhanced production of paclitaxel by various elicitors in suspension cultures of *Taxus wallichiana* Zucc.

Endogenous jasmonic acid는 식물 지방 유도체로서 식물의 상처 치유와 pathogen의 방어 기작 역할을 한다. 즉, 식물체에서 방어기작 유전자 유도를 조절하는 신호전달체계에 관여하고 있다. Kutchan [11]은 jasmonic acid의 축적은 방어 유전자 전사체의 축적에 영향을 미친다고 발표한 바 있다. Jasmonic acid는 C-11이나 C-12가 수산화 반응으로 11-OH

또는 12-OH로 전환되고 C-6 케토기가 환원되는 대사 과정을 통해 아미노산이나 에스테르가 생성된다.

Cellulase ( $\beta$ -1,4-glucan-4-glucanohydrolase)는 섬유소의  $\beta$ -1,4 포도당 결합을 분해하여 가용성인 다당류들이나 포도당으로 만들어준다. Cellulase는 단일 효소가 아니라 최소한 2종 이상의 효소가 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다.



이와 같이 복합효소로 되어있는 cellulase는 대체로 3가지로 구분할 수 있다. 첫째는 C<sub>1</sub> cellulase와 같이 섬유소 결정체에 작용하여 짧은 직쇄상 polyhydroglucoside를 생성해주는 효소이며, 둘째로는 섬유소를 cellodextrin, cellotriose 및 cellobiose로 분해시키는 endoglucanase (C<sub>x</sub> cellulase)이며, 셋째로는 cellodextrin 또는 cellobiose와 같은 저분자 물질에 작용하여 최종적으로 포도당을 생성해주는  $\beta$ -glucosidase이다. 이 같은 작용으로 식물세포에 cellulase를 투여하며 세포벽에 존재하는 cellulose를 분해하여, 생성된 다당류들이나 포도당이 pathogen으로 작용하여 세포 내로부터 이차대사를 유발시키는 결과를 가져온다. 위와 같은 효과에 의해 *Taxus wallichiana* Zucc. 세포에 적용되는 elicitor, 즉, jasmonic acid와 cellulase의 투여 농도와 시기에 대한 최적 조건을 찾음으로써 생산을 증진을 기대할 수 있다.

### Elicitor 투여 농도에 의한 영향

일반적으로 jasmonic acid는 많은 식물세포 배양에서 elicitor로써 효과를 보인 것으로 발표가 되고 있다 [11,12]. 앞에서 효과가 있었던 결과를 가지고 최적의 농도를 알아보기 위해 현탁배양 중인 *Taxus wallichiana* Zucc. 세포 7 g을 50 mL의 배지가 들어있는 125 mL 삼각플라스크에 접종하고 그와 동시에 다양한 농도의 jasmonic acid를 투여하고 3일간 배양하여 추출, 분석하였다. 농도에 따른 세포생장은 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보이고 있으며 paclitaxel의 생성 면에서는 50  $\mu$ M에서 가장 좋은 결과를 보이고 있다 (Fig. 3). 배지에서는 paclitaxel이 검출되지 않은 것으로 보아 jasmonic acid는 세포막의 permeability를 증가시키는 작용은 하지 않는 것으로 생각된다. 고농도로 갈수록 세포의 생장이 감소하는 것은 고농도의 jasmonic acid가 세포의 생장에 직접적인 저해인으로 작용한 것과 jasmonic acid가 녹아있는 ethanol의 양이 많아짐으로 인한 cell damage가

증가하는 것으로 생각된다. 그리고 그림에서는 나타내지 않았지만 동량의 ethanol만을 투여한 것에서는 paclitaxel이 생성되지 않았다. 따라서 ethanol에 의한 영향으로 paclitaxel이 생성되었다고는 말할 수 없을 것이다. 그리고 저농도에서는 낮은 농도의 elicitor가 세포의 신호를 받는 receptor와 반응의 정도가 낮기 때문에 약한 효과를 보인 것으로 생각된다.

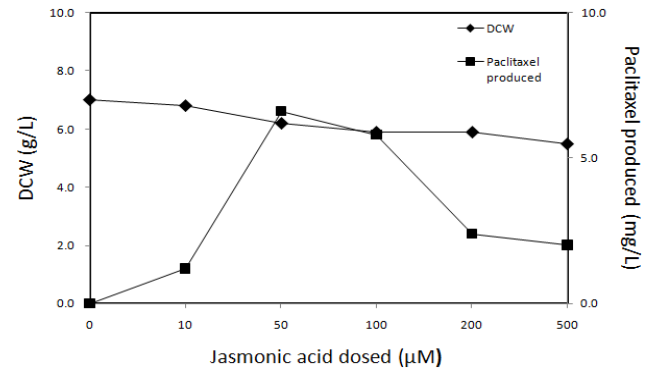


Fig. 3. Effects of jasmonic acid on cell growth and paclitaxel production in suspension cultures of *Taxus wallichiana* Zucc.

Jasmonic acid 이외에 cellulase에서도 효과를 나타내고 있는데, paclitaxel 생성에 있어서 최적의 농도를 찾아보았다. SH 배지 50 mL가 들어있는 125 mL 삼각플라스크에 *Taxus wallichiana* Zucc. 세포 7 g을 접종하고 그와 동시에 cellulase를 다양한 농도로 투여하여 3일간 배양 후 추출하여 분석하였다. 농도가 증가함에 따라 세포의 생장은 감소하는 경향을 보인다. Cellulase 농도에 따른 paclitaxel 생성은 20 units/gFCW까지 증가하다가 20 units/gFCW에서 가장 좋은 효과를 보이며 그 이후에 급격히 감소하였다 (Fig. 4). Cellulase는 세포벽의 cellulose를 분해하여 세포막의 permeability를 변화시켜 세포외부로 paclitaxel을 방출할 것으로 기대하였으나 배지에서는 검출되지 않았다. 전반적인 cellulase의 효과는 대조구보다는 좋은 효과를 보였으나 jasmonic acid에 비해 효과는 높지 않았다.

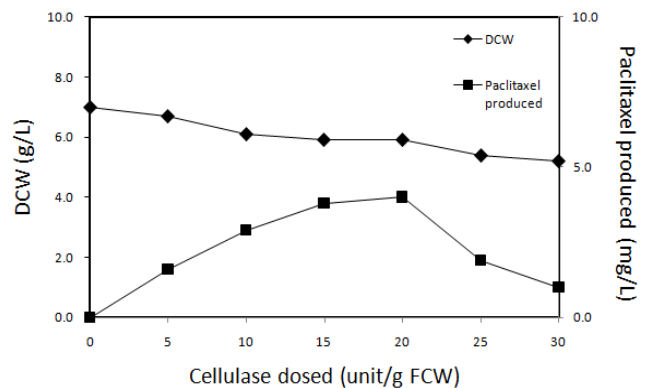


Fig. 4. Effects of cellulase on cell growth and paclitaxel production in suspension cultures of *Taxus wallichiana* Zucc.

## 투여 시기에 대한 영향

세포의 growth phase와 식물세포배양에서 이차대사산물 생성과의 관계는 많은 관심의 대상이 되고 있다. Elicitation 시 언제 elicitor를 투여하는 것이 좋은가를 결정하기 위하여 125 mL 삼각플라스크에 50 mL의 SH 배지를 넣고 *Taxus wallichiana* Zucc. 세포 7 g을 접종하고 각 growth phase별로 50 µg/gFCW의 jasmonic acid를 투여하고 3일 후에 추출하여 분석하였다. 세포성장 면에서 elicitor를 투여한 후에 세포의 생장이 감소함을 알 수 있었다. Lag phase에 투여한 것보다 exponential phase 초기에 투여했을 때 세포의 생장이 감소하는 경향이 강했으며, stationary phase 초기에 투여했을 때 세포의 생장이 가장 급격하게 감소하였다. 이것은 투여된 elicitor가 세포의 양에 따라 증가하여 elicitor와 함께 투여된 ethanol의 양이 많아짐으로 인한 결과라고 생각되어진다. 그 뿐만 아니라, elicitor의 양도 세포의 양에 따라 증가하여 고농도의 elicitor는 세포의 생장에 직접적인 저해요인으로 작용되었던 것으로 여겨진다. Paclitaxel 생성 면에서는 elicitor를 투여한 모든 growth phase에서 대조구보다 많은 paclitaxel이 생성되었지만, 접종과 동시에 투여했을 때 가장 좋은 결과를 보이고 있다. *Taxus wallichiana* Zucc. 세포는 exponential phase 초기와 stationary phase 초기에 jasmonic acid를 처리했을 때는 세포가 주변 환경에 완전히 적응이 되어 외부로부터 오는 신호에 대한 metabolic pathway의 활성화가 일어나지 않는 것으로 생각된다. 즉, *Taxus wallichiana* Zucc. 세포는 배양 초기의 환경에 대해 민감한 반응을 보이는 것으로 여겨진다.

## 복합 Elicitor의 영향

선행 연구에서 효과가 있었던 jasmonic acid와 cellulase를 가지고 비율을 달리하여 함께 투여할 경우 paclitaxel의 생산에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. 50 mL 배지가 들어있는 125 mL 삼각 플라스크에 *Taxus wallichiana* Zucc. 세포 7 g을 접종하고 그와 동시에 jasmonic acid와 cellulase의 양을 달리하여 함께 투여하고 2일 배양 후 추출, 분석하였다. Fig. 5에서 보면 가장 효과가 좋았던 50 µg/gFCW jasmonic acid에 cellulase의 양을 변화시켜서 투여하였다. 세포의 생장은 cellulase의 양이 증가함에 따라 점차 감소하는 경향을 보였으며 세포의 색깔도 진한 갈색을 띠고 죽은 세포도 많아졌다. 이것은 두 종류의 elicitor를 투여함으로써 상대적으로 과량의 elicitor로 세포의 생장에 저해를 일으킨 것으로 생각된다. Paclitaxel 생성면에서는 cellulase의 농도가 15 unit까지는 농도에 비례하여 증가하다가 최고 12.2 mg/L의 양을 나타내고 그 이후 감소하였다. 두 종류의 elicitor를 함께 투여함으로써 paclitaxel의 생산을 촉진하는 데 단일의 elicitor를 사용하는 것보다 생성시기를 단축시킬 수 있어 elicitation의 combination으로 그 생산성을 더욱 증가시킬 수 있었다. Jasmonic acid와 cellulase를

동시 투여하였을 때 각각 투여하였을 때보다 각각 1.8, 3.1배 paclitaxel 생산농도를 향상시킬 수 있었다. 이들은 elicitor로서 작용 메커니즘은 다르지만 이차대사산물의 생합성 증가시키는 측면에서 서로 상승효과를 유발함을 알 수 있었다. 복합 elicitor의 경우 각각의 최적 투여농도 최적화에 이어서 배양 과정에서 투여시기, 추출 시기 등의 최적화를 통해서 paclitaxel의 생산을 더욱 증가시킬 여지가 있을 것으로 생각한다.

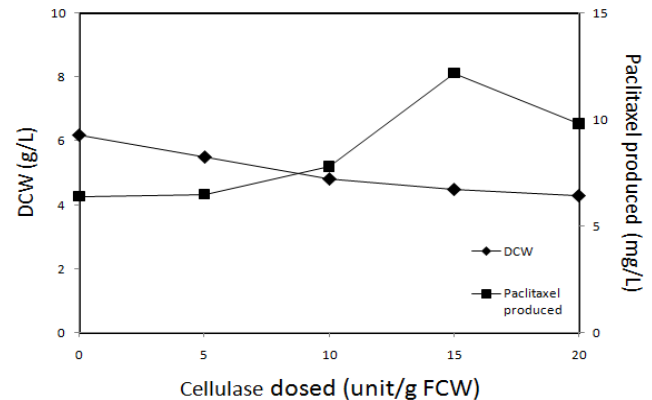


Fig. 5. Changes in cell growth and paclitaxel production by double elicitation with jasmonic acid (50 µg/gFCW) and various cellulase concentrations.

## 요약

*Taxus wallichiana* Zucc. 현탁세포배양에서 항암제 paclitaxel 생합성 연구를 수행하였다. 현탁세포배양에서 exponential phase의 최고 성장 속도는 0.14 day<sup>-1</sup>이었으며 배가시간이 4.96 day이었다. Paclitaxel은 배양초기에 생성되지 않고 exponential phase 말기부터 서서히 생성되어 stationary phase에서도 이어지며 declined phase에서 최고치를 나타내었다. Paclitaxel의 생산을 촉진하기 위하여 elicitor를 사용하였다. 여러 elicitor 중 jasmonic acid와 cellulase가 paclitaxel의 생성을 증가시켰다. Elicitor는 접종과 동시에 투여했을 때 가장 효과가 좋았으며, jasmonic acid와 cellulase의 combination으로 효과가 더욱 증진했는데 각각 투여할 때보다 1.8배 및 3.1배 paclitaxel 생성이 증가되었다.

## 감사

본 연구는 한국연구재단 한-베트남 협력기반조성사업의 연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2010년 3월 27일, 게재승인 : 2010년 4월 24일

## REFERENCES

1. Shresta, T. B., S. K. K. Chetri, A. H. Banskota, M. D. Manandhar, and W. C. Taylor (1997) 2-De acetoxytaxinine B: A new taxane from *Taxus wallichiana*. *J. Nat. Prod.* 60: 820-821.
2. Chattopadhyay, S. K., A. Pal, P. R. Maulik, T. Kaur, A. Garg, and S. P. S. Khanuja (2006) Taxoid from the needles of the himalayan yew *Taxus wallichiana* with cytotoxic and immunomodulatory activities. *Bioorg Med. Chem. Lett.* 16: 2446-2449.
3. Koyama, J., I. Morita, N. Kobayashi, K. Hirai, E. Simamura, T. Nobukawa, and S. Kadota (2006) Antiallergic activity of aqueous extracts and constituents of *Taxus yunnanensis*. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 2310-2312.
4. Yin, J., Y. Tezuka, S. L. Shi, M. Nobukawa, T. Nobukawa, and S. Kadota (2006) *In vivo* antiosteoporotic activity of isotaxiresinol, a lignan from wood of *Taxus yunnanensis*. *Phytomedicine* 13: 37-42.
5. Nicolaou, K. C., Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantemet, R. K. Guy, C. F. Clalborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, and K. Paulvannan (1994) Total synthesis of taxol. *Nature* 367: 630-634.
6. Yun, J. H., J. H. Kim, Y. S. Hwang, S. Y. Byun, and D. I. Kim (1995) Taxol production in *Taxus* cell cultures: effects of various elicitors. *Kor. J. Biotechnol.* 5: 143-148.
7. Yoo, B. S., W. J. Moon, J. Kim, D. I. Kim, and S. Y. Byun (1998) Studies on the production of (10-Deacetyl) baccatin III in cell cultures of *Taxus baccata pendula*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 13: 174-160.
8. 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: 631-638.
9. 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.
10. Drapeau, D., Y. Sauvaire, H. W. Blanch, and C. R. White (1986) Improvement of diosgenin yield from *Dioscorea deltoidea* plant cell cultures by use of non-traditional hydrolysis method. *Planta Med.* 6: 474.
11. Kutchan, T. (1991) 12-Oxo-phytodienoic acid induces accumulation of berberine bridge enzyme transcript in a manner analogous to methyl jasmonate. *J. Plant Physiol.* 142: 5502-5505.
12. Gundlach, H., M. Mueller, T. Kutchan, and M. Zenk (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 2389-2393.