

## 폐 바이오매스로부터 생리활성물질의 분리공정 개발

성주리, 김성문, 김진현\*  
공주대학교 공과대학 화학공학부

### Development of Separation Process for Active Ingredient from Waste Biomass

Ju-Li Sung, Seong-Mun Kim, and Jin-Hyun Kim\*  
Department of Chemical Engineering, Kongju National University,  
182 Shinkwan-Dong, Kongju 314-701, Chungnam, South Korea

#### Abstract

A novel prepurification method was developed aiming at increasing yield and purity, also reducing solvent usage for purification of paclitaxel. The use of a micelle and precipitation in the prepurification process allows for rapid separation of paclitaxel from interfering compounds and dramatically reduces solvent usage compared to alternative methodologies. The prepurification process serves to minimize the size and complexity of the HPLC operations for paclitaxel purification. The process is readily scalable to a pilot plant and eventually to a production environment where multikilogram quantities of material are expected to be produced. As much as possible, the process has been optimized to minimize solvent usage, complexity, and operating costs.

**Key Word** : Paclitaxel, Plant cell culture, Micelle, Precipitation, Purification

#### 1. 서론

최근 생물공학의 발달로 생물자원으로부터 유용물질 생산에 많은 관심을 보이고 있다. 그 중에서 특히 식물자원은 매우 유용하게 사용되고 있는데, 국내기업인 (주)삼양제넥스에서는 세계 최초로 식물자원으로부터 식물세포를 얻어 이를 생물반응기에서 대량 배양하여 항암제 paclitaxel (화학식:  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ , 분자량: 854) 생산에 성공하여 “제넥솔(Genexol)”이라는 상품명으로 시판하고 있다. 식물세포 배양은 미생물이나 동물세포 배양에 비하여 배양기간이 길기 때문에 배양도중 유전적변화로 인한 생합성활성 유지가 어렵고, 오염문제가 심각하여 대량배양이 상당히 어려운 실정이다. 또한 어렵게 배양에 성공하여 얻은 식물세포, 바이오매스내에 목적물질의 함량이 낮거나 또는 목적산물만을 회수한 후에 바이오매스는 대부분 폐기처분되고 있다. 이렇게 버려지는 폐 식물바이오매스 내에 목적물질 외에 다양한 종류의 유용 생리활성물질이나 유도체들이 포함되어 있다. 예를 들면 제넥솔 생산공정의 경우 목적물질인 항암제 paclitaxel을 제외한 baccatin III, taxol C, 10-deacetyltaxol, 13-deoxybaccatin III, cephalomannine 등과 같은 생리활성물질 및 그 유도체가 폐 바이오매스와 함께 버려지고 있다. 따라서 이렇게 버려지는 폐 바이오매스로부터 유용하고 고

부가가치의 생리활성물질 또는 그 유도체들을 분리하는 공정을 개발한다면, 생물자원의 재활용 뿐만 아니라 노동비, 생산비 등의 원가절감, 제품다양화 등의 효과도 기대할 수 있다.

폐 바이오매스로부터 paclitaxel 분리/정제는 여러 단계의 추출, 정제 공정을 거쳐 높은 순도(>98%)의 제품을 생산하게 된다. 정제 과정은 원료인 폐 바이오매스(paclitaxel을 함유한 식물체 또는 식물세포)로부터 paclitaxel을 먼저 유기용매로 추출하고, 전처리 공정을 거쳐 최종 정제를 통하여 제품을 생산하는 공정으로 이루어져 있다. 이 과정에서 특히 전처리 공정은 최종 정제 비용에 많은 영향을 미친다. 기존의 연구들은 정제를 위한 전처리 공정으로 고가의 크로마토그래피를 이용하고 있거나 전처리 없이 추출을 거친 crude 제품을 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)에 의해서 바로 최종 정제하여 경제적 측면에서 많은 문제가 있으며 또한 scale-up에 많은 어려움이 따른다. 대체로 biomass로부터 유기용매를 이용하여 paclitaxel을 추출하면 순도는 0.5% 이하이며, 간단한 전처리 공정 후에도 1~4% 정도의 순도로 매우 낮다. 이러한 샘플을 바로 HPLC에 의하여 최종 정제할 경우 많은 양의 유기용매 사용, column packing material(resin)의 수명 단축, 처리량 감소 등 상당히 비경제적이며 대량 생산을 위한 공정으로는 적합하지 않다. 전처리 공정을 통하여 샘플의 순도를 가능하면 높혀(최소 50% 이상) 주어야 최종 정제, 특히 HPLC를 이용한 정제에서의 비용을 줄일 수 있다. 따라서 본 연구에서는 폐 바이오매스로부터 생리활성물질을 저비용으로 대량 생산할 수 있는 효율적인 분리 및 정제공정을 개발하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 Taxus 식물세포 배양

본 연구에 사용된 배양액은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주(cell line)를 이용하여 32M<sup>3</sup> 대량 발효조에서 배양한 배양액을 이용하였다. 배양액으로부터 식물세포 회수를 위하여 Decanter (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter, Germany)를 이용하였으며, 식물세포조각의 회수를 위하여 고속 원심분리기 ( $\alpha$ -Laval, BTPX 205GD-35 CDEFP)를 사용하였다. 회수한 저함량 (<50ppm) 식물세포와 세포조각(debris)을 합하여 폐 바이오매스라 하였다.

### 2.2 Paclitaxel 분석

Paclitaxel 함량 분석은 HPLC(high performance liquid chromatography)를 사용하며, 모든 샘플은 3개씩 분석하여 평균값을 취하였다. 사용 column은 Capcell Pak C<sub>18</sub> UG 120 (250mm x 4.6mm, Shiseido, Japan)이며, column 온도는 40℃, 이동상은 acetonitrile/ water(20~100% gradient), 유속은 1.0 mL/ min, 샘플 주입량은 10  $\mu$ L, UV(227 nm) detector를 사용하였으며 paclitaxel 표준물질은 Sigma 제품을 사용하였다.

### 2.3 유기용매 추출 및 전처리 공정

유기용매를 이용하여 폐 바이오매스로부터 유용성분인 paclitaxel을 효율적으로 추출할 수 있는 방법과 전처리 공정으로 계면활성제의 일종인 CPC(N-cetylpyridinium chloride)를 이용하여 micelle 형성과 침전(precipitation)에 의한 정제의 가능성을 확인하였다. 효율적인 추출공정 개발을 위한 유기용매 선정조건은 추출 효율이 우수할 뿐만 아니라 추출 후 폐 유기용매의 효율적인 회수도 가능하여야 한다. 추출조건 최적화는 (1)유기용매 선정, (2)추출시간 결정, (3)추출횟수 결정, (4)추출방법 선정으로 이루어진다. Micelle 형성에 적합한 계면활성제의 선정조건은 (1)계면활성제의 hydrophilic group 내부로 paclitaxel의 용해도가 높아야 하며, (2)선택된 계면활성제가 상분리(phase separation)에 사용되는 유기용매에는 잘 녹지 않아야 하며, (3)상분리 후 paclitaxel이 포함되어 있는 수용액 층(phase)만 분리하고 최종정제 공정(HPLC 정제)을 위하여 이 수용액 층으

로부터 paclitaxel을 다시 회수하여야 하는데, 이때 수용액 층에 포함되어 있는 paclitaxel이 새로운 유기용매로 다시 잘 용해되어야 한다. 또한 상분리에 적합한 유기용매(추출공정에서 얻은 건조물을 녹이는 용매)의 선정도 매우 중요하다. 선정조건은 (1)수용액과 상분리가 잘 일어나야 하며, (2)계면활성제에 대한 용해도가 낮아야 하고, (3)상분리 후에도 micelle이 잘 유지되어 주어야 한다. 이러한 관점들을 중심으로 가장 효율적인 계면활성제와 유기용매를 선택하고, 선택된 계면활성제와 유기용매의 최적 농도, 반응 온도, pH, 반응시간, mixing 방법 등의 조건을 최적화하여 전처리 공정에서 높은 수율과 순도의 crude paclitaxel를 얻어 최종 정제공정(HPLC)에 사용되어 진다.

폐 바이오매스로부터 paclitaxel의 분리/정제 공정은 크게 3단계로 이루어진다 (Fig. 1). 첫 번째, 폐 바이오매스로부터 유기용매추출(solvent extraction) 단계, 둘째, 전처리(pre-purification) 단계, 셋째, 최종 정제(purification) 단계이다. 본 연구에서는 유기용매 추출공정, micelle 형성과 상분리(phase separation)에 의한 새로운 개념의 전처리 및 생산 공정 개발에 주요 목적이 있다. 생산 공정 개발을 위해 먼저 배양액으로부터 회수한 폐 바이오매스로부터 추출효율이 높은 유기용매를 선정하였다. 유기용매의 선정은 paclitaxel의 추출 수율과 불순물(극성 및 비극성) 포함 정도를 확인하여 선정하며 선정된 유기용매를 이용하여 최적의 추출조건들(추출 회수, 추출시간, 유기용매 양, 추출형태 등)을 얻었다. 이러한 최적의 조건에서 추출한 유기용매(추출액)를 건조하여 전처리 공정의 개발에 이용하였다. 본 연구에서 제안한 전처리 공정은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 micelle 형성과 상분리(phase separation)에 의하여 불순물을 제거하는 새로운 개념의 전처리 공정이다. "Micelle은 hydrophilic과 hydrophobic group으로 구성되어 있어 micelle 내부로는 물에 녹지 않는 paclitaxel을 hydrophobic group이 감싸게 되고 외부는 hydrophilic group이 되어 수용액에 용해될 수 있게 된다. 따라서 폐 바이오매스로부터 유기용매 추출액을 건조하고, 상분리에 적합한 유기용매에 녹이고 micelle 형성에 적합한 계면활성제(surfactant)를 첨가하고 교반하여 정제시키면 물에 녹지 않는 paclitaxel이 micelle 내부의 hydrophobic group에 감싸여 수용액 phase로 이동하고 paclitaxel을 제외한 여러 가지 불순물들(특히 lipid 성분들)은 유기용매 phase에 그대로 존재하게 되어 paclitaxel과 불순물을 효율적으로 분리하게 된다".

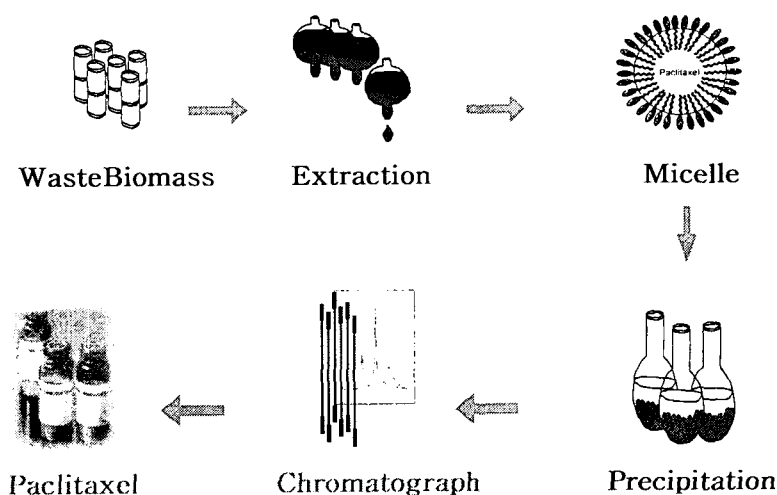


Fig. 1 Schematic of extraction and purification process from waste biomass.

### 3. 결과 및 고찰

여러 가지 유기용매(methylene chloride, methylene chloride/methanol, ethanol, isopropyl alcohol, chloroform/methanol, chloroform, diethylether, acetone, methanol, chloroform/methanol

등)를 이용하여 발효배양액으로부터 회수한 폐 바이오매스로부터 paclitaxel의 추출 경향을 조사한 결과 MeOH의 경우 가장 적은 양으로 가장 높은 paclitaxel의 회수율(>95%)을 얻어 폐 바이오매스로부터 paclitaxel의 추출에 가장 효과적임을 알 수 있었다. MeOH를 이용한 회분식 추출에서 폐 바이오매스 내 paclitaxel과 용매와의 평형상태는 추출시간 10분 정도이면 평형에 도달 하였다. 추출횟수와 폐 바이오매스로부터 paclitaxel 추출 정도는 1회 MeOH 추출시 40% paclitaxel이 회수 되었으며, 2회 32%, 3회 18%, 4회 9% 회수되어 총 4회의 추출을 통하여 폐 바이오매스 내 paclitaxel의 거의 대부분을 회수(99%)가능하였다 (Fig. 2). MeOH 추출 후 추출액의 농축은 rotary evaporator 에서 수행되며 농축조건은 25-27" Hg, 40℃에서 이루어 진다. MeOH 추출액을 농축하고(1/5~1/8) 농축액에 methylene chloride를 첨가하여(MeOH: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> =5:1) 액/액 추출을 MeOH 농축액에 존재하는 극성불순물을 먼저 제거하였다. 액/액 추출은 3회에 걸쳐 실시하였으며 1회 추출 시 66% paclitaxel 회수하였고, 2회 추출시 26%, 3회 추출시 6% 회수하여 3회 추출을 통하여 MeOH 농축액의 대부분의 paclitaxel 회수(>98%)가 가능하였다. 액/액 추출을 통하여 극성 불순물을 제거된 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 용액을 rotary evaporator (450 mmHg, 30℃) 에서 농축하고 건조하여 전 처리 공정에 이용하였다.

액/액 추출 및 농축에서 얻은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 건고물에는 타르 및 lipid 성분의 불순물이 다량 포함되어 있고 이들 불순물은 다음 단계의 여러 공정에 많은 악영향을 미쳐 paclitaxel 정제에 어려움이 따른다. 이러한 타르 및 lipid 성분을 제거하기 위하여 micelle 형성 공정을 도입하였다. 액/액 추출에서 얻은 건고물을 MtBE(methyl t-butyl ether)에 녹이고 동량의 hexane과 CPC (N-cetylpyridinium chloride) 용액(5%, w/v)을 첨가하여 혼합하였다. 혼합액을 정제시키면 상분리가 일어나 paclitaxel은 수용상인 CPC 용액에 micelle 형태로 존재하며 타르 및 lipid 성분과 같은 비극성불순물은 유기용매상(MtBE+hexane)으로 효율적으로 제거 가능하였다. 유기용매상(타르 및 lipid 성분 포함)을 제거한 후 MtBE를 사용하여 수용상인 CPC 층으로부터 paclitaxel을 다시 회수 하였다. Micelle 형성에 의한 타르 및 lipid 성분을 제거한 후 2단계의 침전공정을 수행하였다.

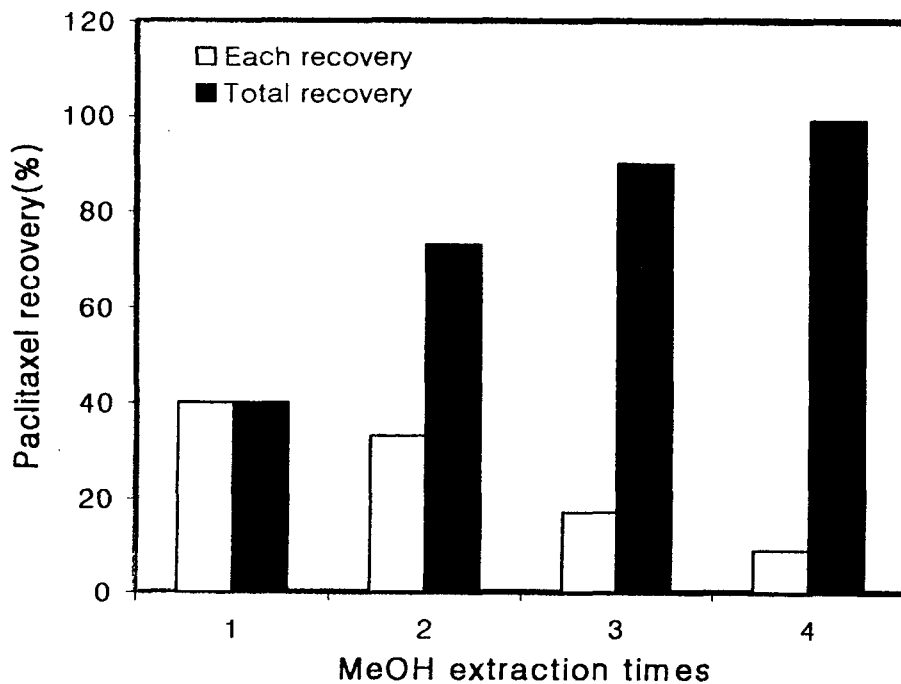


Fig. 2 Effect of extraction time on paclitaxel recovery from waste biomass.

첫 번째 침전은 전 단계에서 회수한 MtBE 용액과 hexane을 이용하여 침전을 유도하고 침전물을 회수하여 건조하였다. 두 번째 침전은 전 단계에서 얻은 건고물을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 에 녹이고 hexane을 이용하여 침전공정을 수행하였다. 이들 침전공정을 통하여 페놀성분(주 성분 : catechin)들을 효과적으로 제거할 수 있었다. 두 단계의 침전공정을 통하여 얻은 건고물은 최종 정제 단계인 HPLC 공정을 거쳐 제품이 된다. 이들 공정에서의 단계별 순도와 회수율을 Table 1에 나타내었다. 전처리 단계에서 65% 이상의 높은 순도의 paclitaxel을 얻을 수 있으며 이는 최종 정제단계인 HPLC 공정을 효과적으로 수행할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 1. Results obtained for the recovery/prepurification of paclitaxel from 200g of waste biomass.

Process step	Paclitaxel(mg)	Yield(%)	Purity(%)
Waste biomass	39	-	-
MeOH extract*	38	97	<0.5
MtBE extract	32	82	29.4
Precipitation** (Crude paclitaxel)	31	80	65.8

\*Four times extraction,

\*\*Two steps of precipitation

#### 4. 후기

본 연구는 한국과학재단 지정 공주대학교 자원재활용 신소재 연구센터의 지원에 의한 것입니다.

#### 5. 참고문헌

- [1] Castor, T.P., Tyler, T.A. 1993. Determination of taxol in *taxus media* needles in the presence of interfering compounds. *J Liq. Chromatogr.* 16: 723-731.
- [2] Choi, H.K., Adams, T.L., Stahlhut, R.W., Kim, S.I., Yun, J.H., Song, B.K., Kim, J.H., Hong, S.S., Lee, H.S. 1999. Method for mass production of taxol by semi-continuous culture with *Taxus chinensis* cell culture. U.S.Patent, 5,871,979.
- [3] Kim, J.H., Kang, I.S., Choi, H.K., Hong, S.S., Lee, H.S. 2002. A novel prepurification for paclitaxel from plant cell cultures. *Process Biochemistry* 37: 679-682.
- [4] Ma, W., Park, G.L., Gomez, G.A., Nieder, M.H., Adams, T.L., Aynsley, J.S., Sahai, O.P., Smith, R.J., Stahlhut, R.W., Hylands, P.J. 1994. New bioactive taxoids from cell cultures of *Taxus baccata*. *J. Nat. Products* 57: 116-122.
- [5] Stull, D.P., Scales, T.A., Daughenbaugh, R., Jans, N.A., Bailey, D.T. 1995. Taxol(Paclitaxel); Strategies to increase the supply of a new anticancer drug. *Appl. Biochem. Biotech.* 54:133-140.