

Digitalis lanata 혼탁세포배양에서의 생물학적 변환을 이용한 Digoxin 생산

김혜경 · 홍희전 · 김동일*

인하대학교 생물공학과

Digoxin Production by Using Biotransformation in Digitalis lanata Cell Suspension Cultures

Kim, Hye-Kyoung, Hee-Jeon Hong and Dong-Il Kim*

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon, Korea

Abstract — For the production of digoxin by using biotransformation in suspension-cultured *Digitalis lanata* cells, a two-stage culture process was optimized. Modified Murashige and Skoog medium was used for growth in the first stage and the cells were transferred to glucose solution for the production of digoxin from digitoxin via biotransformation in the second stage. When the cells were cultivated for 10 days in the growth period, 12 β -hydroxylation capacity was the best. It was found that the optimum amount of digitoxin as substrate was 400 mg/l with initial cell density of 21%. Maximum productivity was achieved 5 days after transfer of cells to production medium. Sucrose and fructose provided similar digoxin yield as that in glucose, and 6% was proved to be the best glucose solution. Most of the components of modified MS medium except phosphate reduced the efficiency of digoxin formation. Besides, peptone and beef extracts inhibited 12 β -hydroxylation, while promoting glucosylation. Finally, it was apparent that light enhanced the formation of digoxin significantly.

식물세포배양에 의한 생물학적 변환(biotransformation)이란 식물세포 내의 효소를 이용하여 유기합성물질 또는 천연유래물질인 전구체의 관능기(functional group)를 변환시키는 것을 의미한다. 미생물을 이용한 생물학적 변환은 오랜 연구 결과로 steroid를 포함한 여러 가지 유기물들을 합성하는데 중요하게 사용되고 있으나 식물세포배양에 의한 생물학적 변환 연구는 아직까지 미흡한 상태이다(1). 그러나, 의학적 가치가 높고 입체 특이적이어서 화학합성이 어려우며 미생물에 의한 생물학적 변환으로 효과가 없는 식물유래의 유용물질을 생산할 경우 식물세포배양을 이용하여 생물학적으로 변환시키는 것은 상당한 가치가 있다 하겠다. 이러한 생물학적 변환 연구의 대표적인 예로는 *Digitalis* 혼탁세포배양의 이용을 들 수 있으며 기내배양되는 *Digitalis* 세포의 경우 식물체로부터 추출되는 cardenolide 계열의 각종 강심성배당체(cardiac glycosides)를 직접 합성하지는 못하나 이들 물

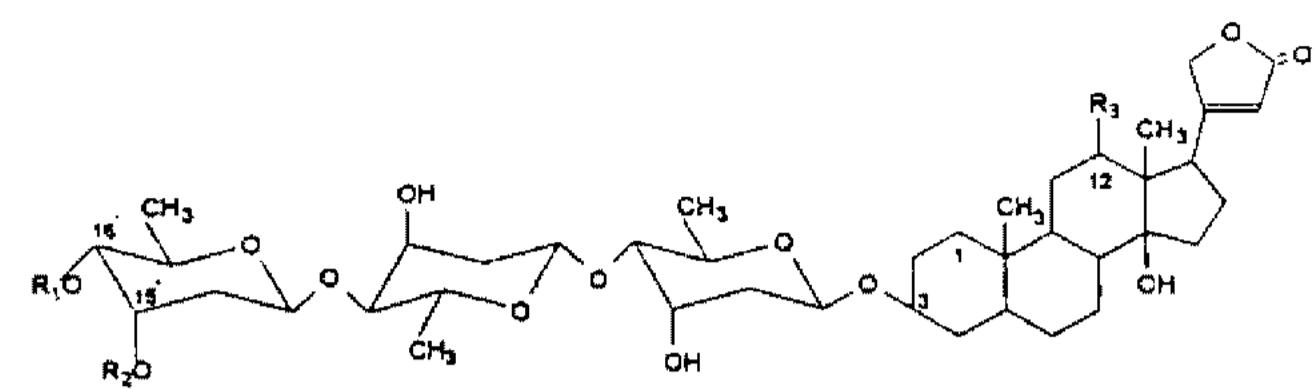
질의 전구체를 혼탁세포 배양액 내에 첨가하게 되면 여러 가지 효소반응에 의해 다양한 생물학적 변환을 일으킨다(2, 3).

Foxglove(*Digitalis purpurea* 및 *Digitalis lanata*)의 잎이나 *Strophanthus gratus*의 씨앗으로부터 추출하여 얻어지는 강심성 배당체는 만성 심장 질환과 부정맥(arrhythmia) 치료에 널리 사용되고 있는 의약품으로서 여기에 속하는 물질로는 digitoxin, digoxin 그리고 lanatoside C 등이 있다. 현재 digitoxin은 *Digitalis* 식물체로부터 다양 추출·정제되어 흔히 사용되고 있으나 효력이 약하고 다소 부작용이 있어 의약품으로서의 가치가 점점 떨어지고 있는 반면, digitoxin의 12번 탄소 위치에 수산화기(hydroxyl group)가 β -방향으로 결합된 형태의 화합물인 digoxin은 digitoxin에 비하여 부작용이 적고 치료제로서의 효능이 뛰어나 요구도가 날로 높아지고 있는 실정이다. 그러나, digoxin은 식물체로부터 직접 생산되는 양이 매우 적기 때문에 식물세포배양을 통한 생물학적 변환으로 이를 얻고자 하는 연구가 오랫동안 진행되어 왔다(4-11). Digitoxin과 그 유도체들의 화학구조는 Table 1에 정

Key words: Biotransformation, *Digitalis lanata*, digoxin, digitoxin

*Corresponding author

Table 1. Chemical structures of digitoxin and its derivatives



물질명	R ₁	R ₂	R ₃
Digitoxin	H	H	H
Digoxin	H	H	OH
Purpureaglycoside A	Glucosyl	H	H
Deacetyllanatoside C	Glucosyl	H	OH
Lanatoside A	Glucosyl	CH ₃	H
Lanatoside C	Glucosyl	CH ₃	OH
α-acetyldigitoxin	H	CH ₃	H
α-acetyldigoxin	H	CH ₃	OH

리하였다. *D. lanata* 세포의 생물학적 변환에 의해 digitoxin이 12β-hydroxylation이 되면 digoxin이 되고 16'-O-glucosylation 되면 purpureaglycoside A가 되며, 두 반응이 모두 진행되면 deacetyllanatoside C가 생성된다. 또한, 15'α-acetylation 될 경우에는 α-acetyl digitoxin이 얻어지게 된다.

Digitoxin을 기질로 하여 digoxin을 생산하고자 하는 생물학적 변환 연구는 여러가지 방향에서 수행되어 온 바 있다. 처음에는 12β-hydroxylation의 경쟁 반응인 16'-O-glucosylation을 막기 위해 전구물질인 digitoxin에 보호기(methyl group)를 붙여 β-methyldigitoxin 상태로 공급하고, β-methyldigoxin을 생산한 다음 다시 보호기를 제거하는 공정이 연구되었다(4-6). 그 후에는 deacetyllanatoside C를 생산한 후 효소를 사용하여 deglucosylation 함으로써 digoxin을 생산하고자 하였다(7-10). 그러나, 두 가지 모두 공정 단계가 어렵고 복잡하며 생산가가 높기 때문에 상업화에 이르지 못하였고, 최근에 들어서는 12β-hydroxylation 능력이 좋은 세포의 선별과 개발, 공정의 최적화 등으로 digitoxin으로부터 직접 digoxin을 생산하고자 하는 연구가 진행 중이나 아직은 좀 더 많은 연구가 필요한 상태이다(11).

식물세포를 이용하여 생물학적 변환을 수행할 경우 배양중 생장하는 세포에 대한 환경 인자들이 변환수율에 영향을 미칠 것은 분명하다. 그러므로, 본 연구에서는 1단계에 세포생장에 알맞은 생장배지(growth medium)로 세포를 증식시키고, 2단계에 목적산물 생산에 알맞은 생산배지(production medium)로 옮겨 목적산물로의 변환수율을 높이고자 하는 2단계 배양

방법을 채택하여 시간변화에 따른 digitoxin의 변환 과정을 확인하고 배지 성분이나 배양 조건이 digoxin 생성에 미치는 영향을 조사하였으며 생물학적 변환의 최적 시기, 기질의 투여량 및 투여시기 등을 결정하였다.

재료 및 방법

현탁세포 유도 및 배양

본 실험에 사용된 *Digitalis lanata* 현탁세포는 독일 Tübingen 대학의 Dr. Wolfgang Kreis로부터 얻은 cell line K3OHD 캘러스(6-8)를 modified Murashige and Skoog(MS) 액체배지에 현탁시켜 유도하였다. MS 기본배지에 KH₂PO₄ 농도를 340 mg/l로 강화한 modified MS 액체배지는 생장조절제를 첨가하지 않았으며 탄소원으로는 3.3% glucose를 첨가하고 pH를 5.5로 조정한 후 고압증기 살균하여 사용하였다. 캘러스로부터 유도된 현탁세포배양은 암소의 회전식 진탕배양기에서 120 rpm, 25°C를 유지하며 10일 간격으로 계대배양하였다.

생산배지

Digitoxin의 생물학적 변환을 수행하기 위한 모든 실험에서는 순수한 8% glucose 수용액 또는 다른 당수용액을 생산배지로 사용하였다. 8% glucose 수용액은 중류수에 glucose를 8%(w/v) 농도가 되도록 첨가한 후 0.1 N NaOH를 사용하여 pH 5.5가 되도록 조절하고 고압증기 살균하여 제조하였다. 다른 당수용액의 경우도 마찬가지로 pH를 5.5로 맞추어 사용하였다.

생물학적 변환 실험

생장배지(modified MS)에서 배양된 *D. lanata* 현탁세포를 Whatman No.1 여과지로 걸러 생산배지가 30 ml 담긴 100 ml flask에 세포생체중량을 기준으로 8 g 씩 접종하고 계획된 시기에 기질을 첨가하였다. 물에 잘 녹지 않는 기질인 digitoxin은 DMSO(dimethylsulfoxide)에 30 g/l 농도의 농축모액(stock solution)을 만들어 필요량 만큼 사용하였다(8).

추출 및 분석

Cardenolide 정량분석을 위한 분석시료는 세포를 포함한 배양액에 동량의 메탄올을 가하여 20분간 270 W/43 kHz로 초음파 파쇄시킨 후, 상등액을 뽑아 0.2 μm membrane filter로 여과하여 준비하였고 분석기 기로는 HPLC(영인과학 model 910)를 이용하였다.

Column은 Phenomenex Curosil-G(4.6×250 mm, 6 μm)를 사용하였으며, 이동상으로는 acetonitrile : water(35 : 65 v/v)을 사용하였고, 유속은 1 ml/min였다. 준비된 분석시료는 injection loop를 이용하여 20 μl 씩 주입하였으며, 검출은 220 nm에서 시행하였다. 모든 이동상 용매는 Fisher 제품의 HPLC 급을 사용하였으며, 표준물질인 digitoxin과 digoxin은 Sigma에서 구입하였고, deacetyllanatoside C는 Roth 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

8% glucose 수용액에서의 digitoxin 생물학적 변환

8% glucose 수용액은 Kreis와 Reinhard(7, 8)에 의해 deacetyllanatoside C를 생산하는데 알맞은 생산배지라고 보고된 바 있고, 이것은 12β-hydroxylation에 효과가 있음을 시사하고 있다. 따라서, 8% glucose 수용액상에서 *D. lanata* 혼탁세포는 시간변화에 따라 digitoxin의 생물학적 변환을 어떻게 나타내는지 살펴 보았다. 초기세포농도는 생체중량 기준으로 21% (w/v)였으며, digitoxin은 세포가 생장배지에서 8% glucose 수용액으로 옮겨진지 3일째에 대략 300 mg/l가 되도록 농축모액을 첨가하였다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 생산배지에 첨가된 digitoxin은 빠르게 변환되어 없어지는 것으로 확인되었고, 목적산물인 di-

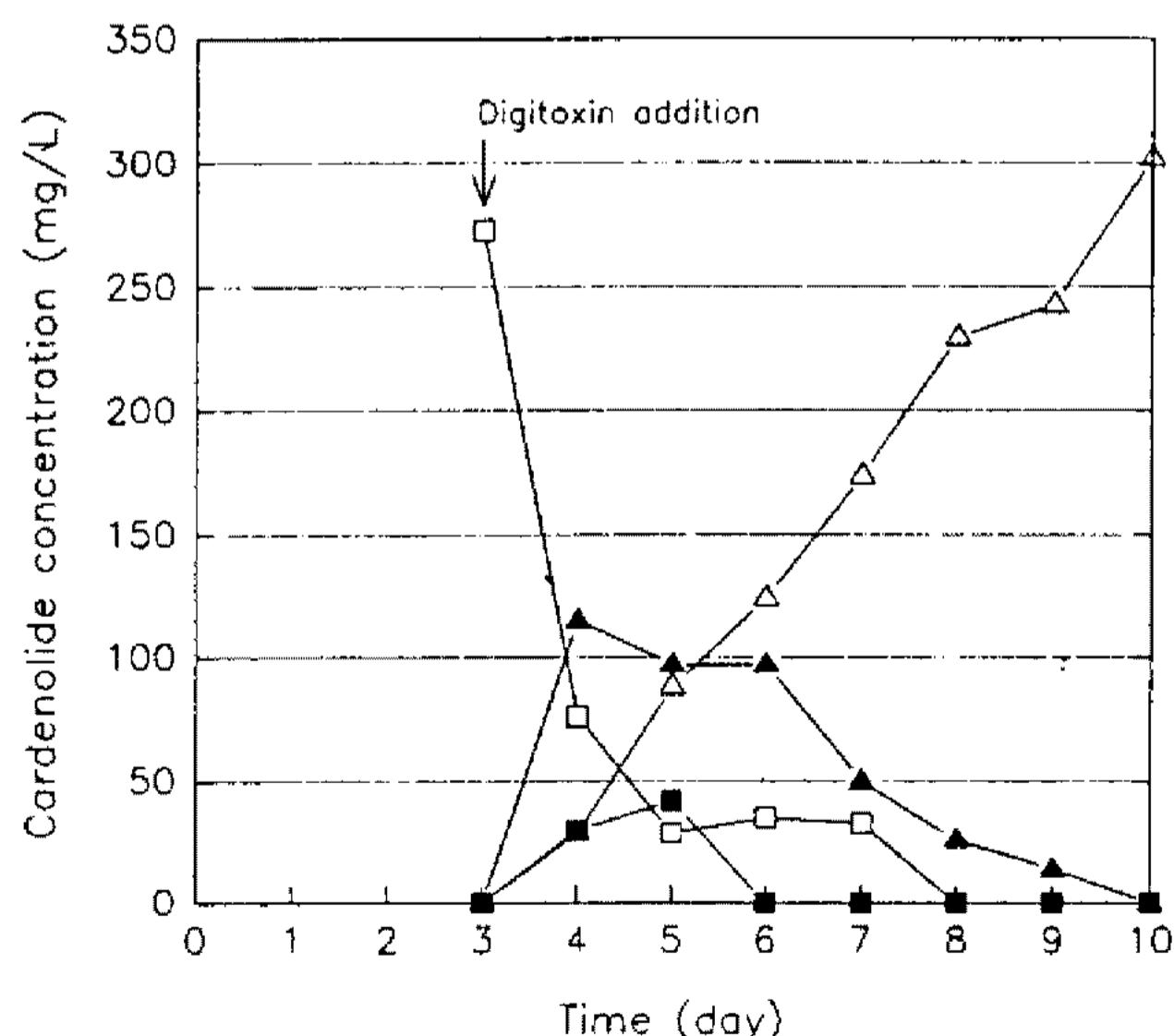


Fig. 1. Digitoxin biotransformation by suspension cultures of *Digitalis lanata* in 8% glucose solution.

Digitoxin was added 3 days after the transfer of cells

from growth medium to production medium.

□, Digitoxin; ■, Digoxin; △, Deacetyllanatoside C; ▲, Purpureaglycoside A

goxin은 기질첨가 이후 2일째에 최대로 생산되었다가 급격히 감소함을 보였다. 또한, purpureaglycoside A의 생산은 digoxin과 더불어 증가하다가 완만한 감소 추세를 보였으며 deacetyllanatoside C는 7일간 계속 하여 증가하였다. 결과적으로 세포 내로 들어간 digitoxin은 빠른 속도로 12β-hydroxylation 및 16'-O-glucosylation 되고, 목적산물인 digoxin은 중간산물로 잠시 생성되었다가 다시 deacetyllanatoside C로 변환되는 현상을 보이므로 digoxin의 최대 생산을 위해서는 반응을 최적 시간에 끝내어 생산성을 극대화할 수 있는 조건을 찾는 것이 필요하겠다.

Digoxin 생산성 비교

일반적으로 배지 성분의 차이가 변환 수율에 영향을 미치므로 deacetyllanatoside C 생산용 배지로 알려져 있는 순수한 8% glucose 수용액과 세포생장용 배지인 modified MS 배지에 8% glucose를 첨가한 경우 digitoxin의 생물학적 변환은 어떠한 차이를 보이는지 비교하여 보았다. Fig. 2는 digitoxin이 첨가된지 2일째에 생물학적 변환을 중지하고 cardenolide를 분석한 결과로, 8% glucose를 함유한 modified MS 배지에서는 digoxin 수율이 17.2%로 8% glucose 수용액에서의 23.0% 비하여 5% 가량 낮게 나타났다. 여기서 digoxin 수율이란 첨가된 digitoxin에 대한 생성된 digoxin의 양을 %로 표시한 것을 의미한다. 또한, modified MS 배지에서는 변환되지 않고 남아 있는 digitoxin의 양도 훨씬 많았다. 이러한 결과는 modified MS 배지 내에 들어있는 각종 무기·유기 성분이 digitoxin의 생물학적 변환에 영향을 주는 것으로 생각되어

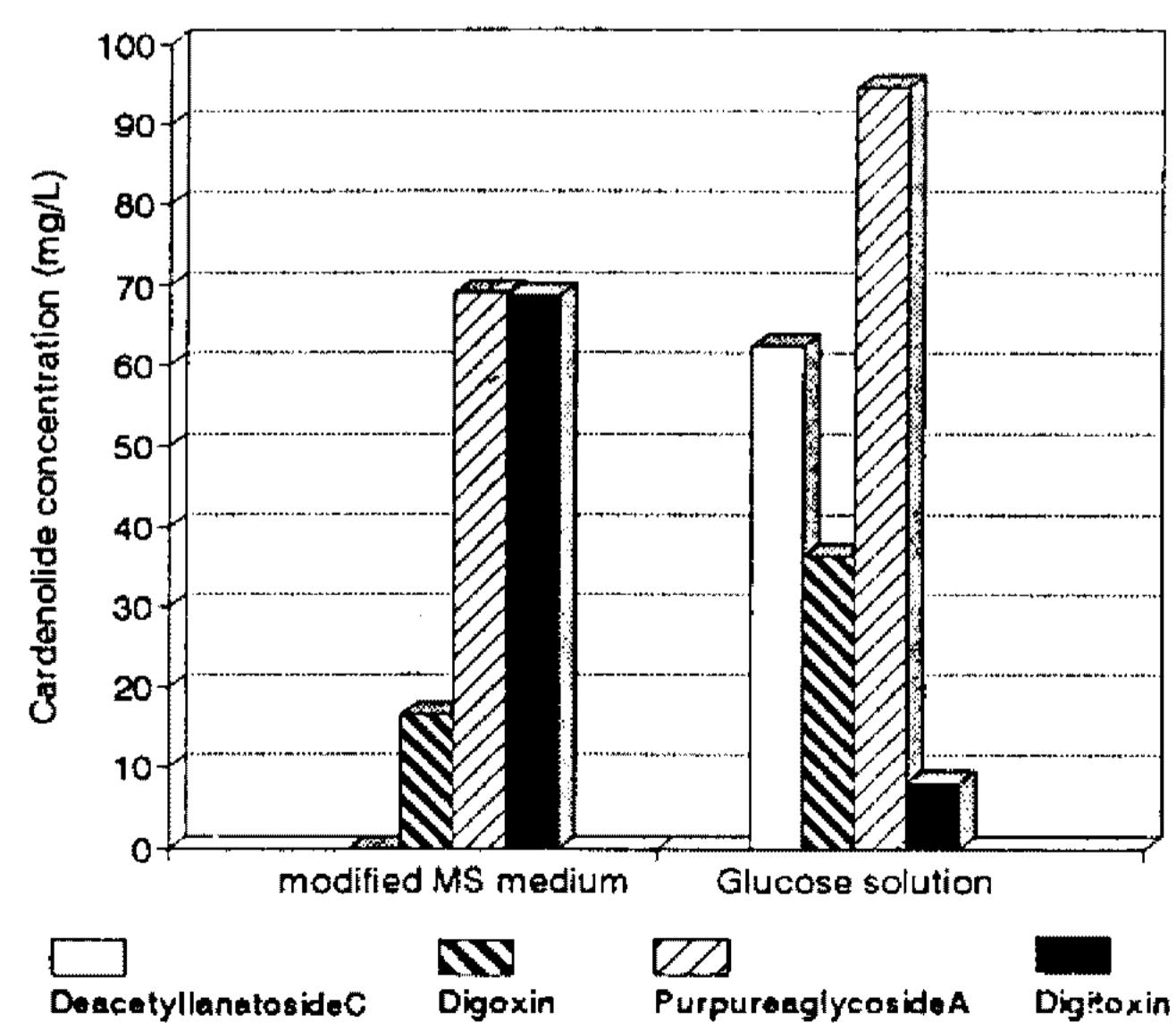


Fig. 2. Comparison of digitoxin biotransformation in modified MS medium and 8% glucose solution.

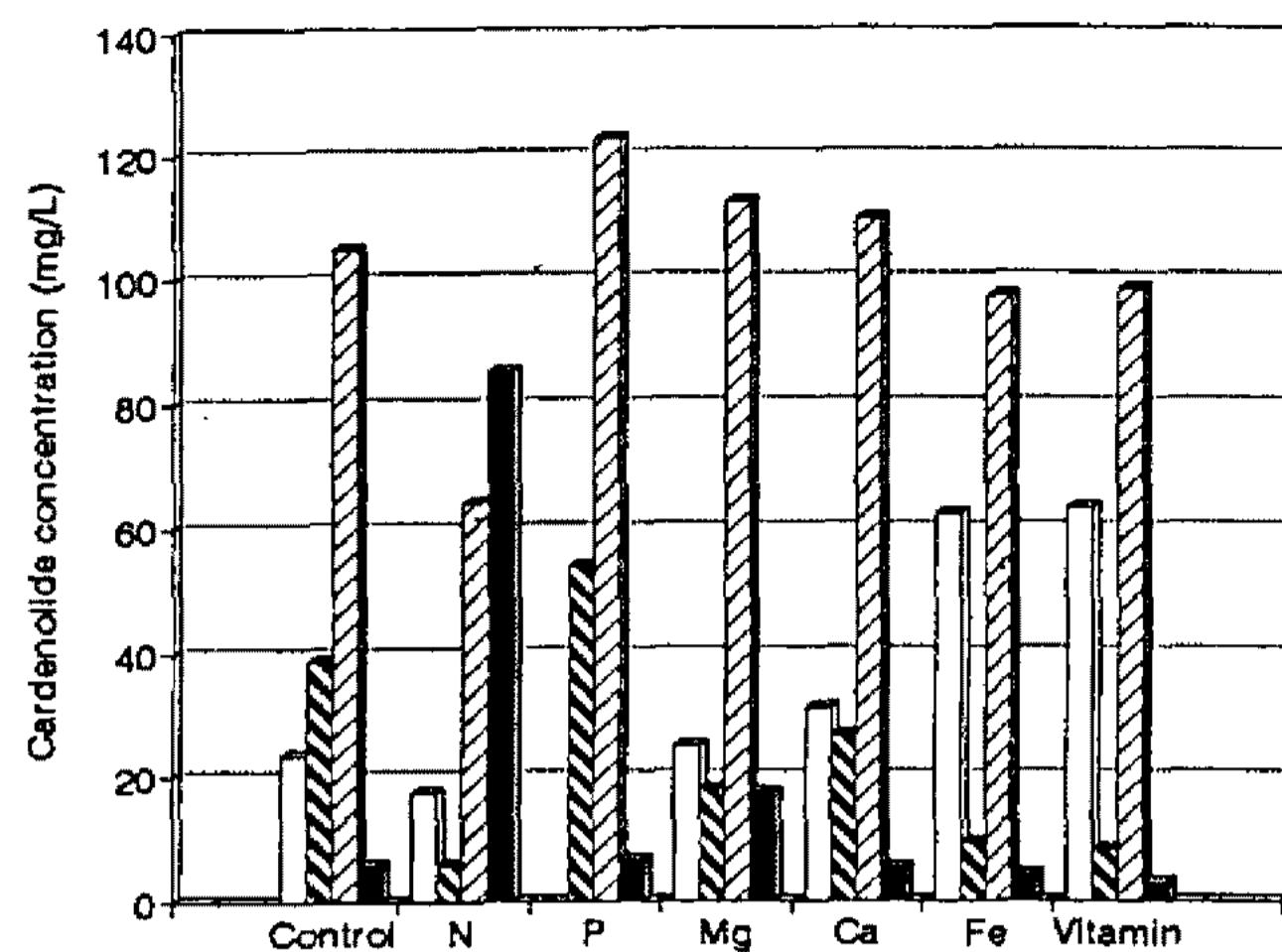


Fig. 3. Effect of components of modified MS medium on digitoxin biotransformation.

Control, pure 8% glucose solution; N, 20.6 mM NH₄NO₃+19.3 mM KNO₃; P, 2.5 mM KH₂PO₄; Mg, 1.5 mM MgSO₄·7H₂O; Ca, 3.0 mM CaCl₂·2H₂O; Fe, 0.05 mM FeSO₄·7H₂O; Vitamin, 2.0 mg/l glycine+100.0 mg/l myo-inositol+0.5 mg/l nicotinic acid+0.5 mg/l pyridoxine·HCl+0.1 mg/l thiamine·HCl. Symbols are the same as those in Fig. 2.

각각의 배지 성분이 미치는 영향을 분별하여 조사하였다.

Modified MS 배지 성분의 영향

Modified MS 배지 내에 함유된 성분인 질소원(20.6 mM NH₄NO₃, 19.3 mM KNO₃)과 인산염(2.5 mM KH₂PO₄), 마그네슘염(1.5 mM MgSO₄·7H₂O), 칼슘염(3.0 mM CaCl₂·2H₂O), 철염(0.05 mM FeSO₄·7H₂O) 그리고 유기영양원(2.0 mg/l glycine, 100.0 mg/l myo-inositol, 0.5 mg/l nicotinic acid, 0.5 mg/l pyridoxine·HCl, 0.1 mg/l thiamine·HCl) 등을 8% glucose 수용액에 modified MS 배지에서와 같은 농도로 첨가하여 각 성분에 의한 영향을 관찰하였다(Fig. 3). 질소원인 NH₄NO₃와 KNO₃을 첨가하였을 경우 세포의 생물학적 변환능이 현저히 감소하여 남아 있는 digitoxin의 양이 많고 생산된 digoxin은 매우 적음을 보였다. 다른 성분이 첨가된 경우에서도 digoxin 생성은 감소하는 현상을 보였으며, 인산염이 들어간 수용액에서만 순수한 당수용액에서 보다 digoxin 생성이 다소 증대되는 경향을 나타냈다. 결과적으로 인산염을 제외하면 modified MS 배지의 주요 성분들은 digoxin의 생성을 저해하는 것으로 확인되었다.

초기세포농도의 영향

생물학적 변환능은 첨가된 기질량에 대비한 세포량에 따라 달라지므로 생산배지에서의 초기세포농

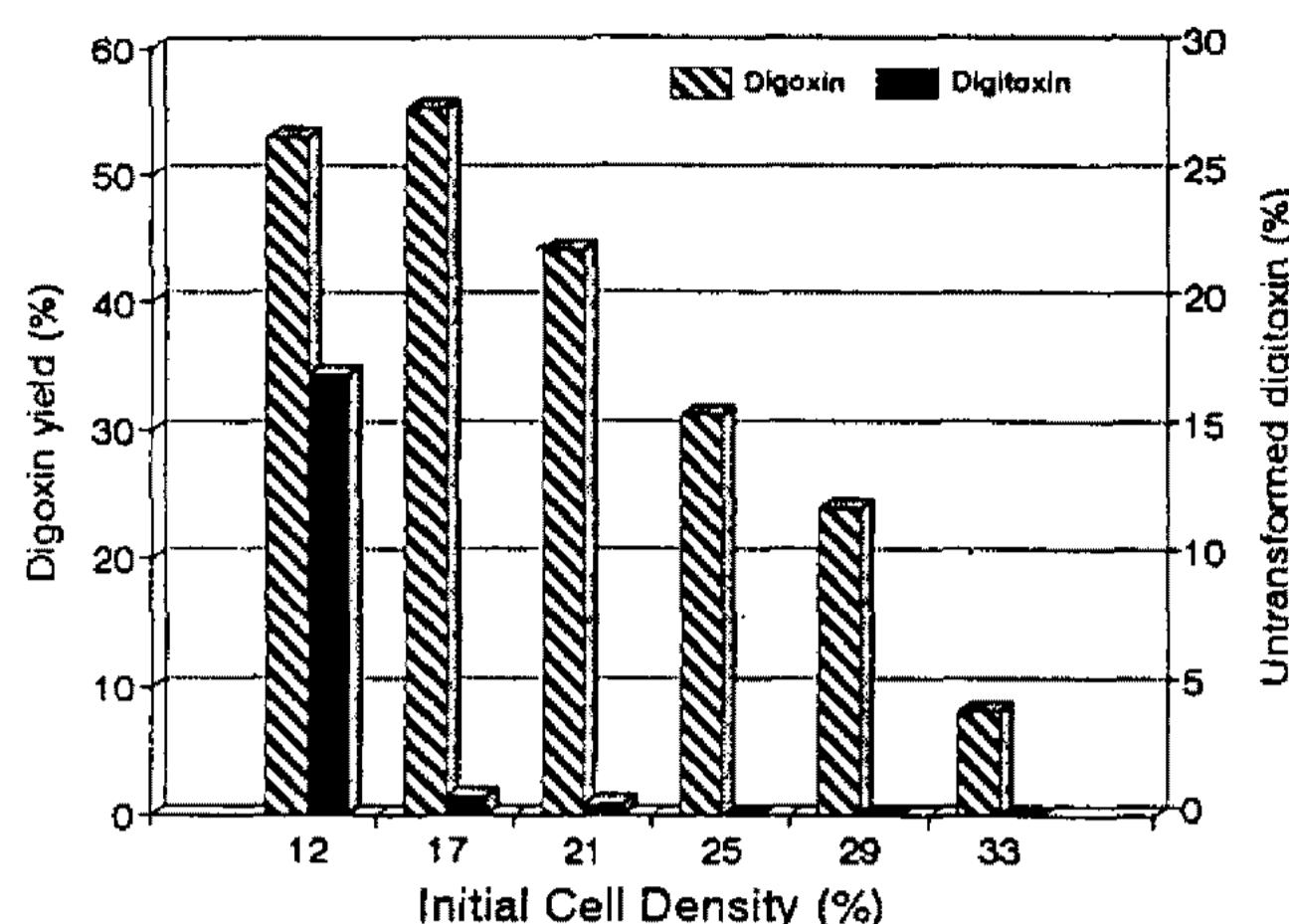


Fig. 4. Effect of initial cell density on digoxin yield in production medium.

도가 미치는 영향을 세포생체중량 기준으로 12%에서 33%(w/v) 범위에서 조사하였다(Fig. 4). 실험결과 digitoxin 200 mg/l를 2일간 생물학적 변환시켰을 때 가장 높은 digoxin 수율을 보인 초기세포농도는 17%였고, 21% 이상의 고농도에서도 첨가된 기질 모두가 변환되었으나 digoxin보다는 deacetyllanatoside C로의 변환율이 높았다. 이는 단위 세포당 제공된 기질의 양이 적은 경우 첨가된 기질이 빠르게 변환된 결과로 해석되며, digoxin 생성 수율이 가장 높았던 초기세포농도 17%에서 g 세포건조중량당 제공된 기질의 양은 34 mg이었다.

기질 첨가량의 최적화

초기세포농도가 생물학적 변환에 미치는 영향을 살펴 본 결과 최적의 세포농도가 존재함을 알 수 있었고 이것은 주어진 조건에서의 절대 세포농도도 중요하지만 단위세포당 첨가되는 기질의 양도 고려되어야 한다고 볼 수 있다. 따라서, 일정한 초기세포농도에서 기질의 첨가량을 변화시켜 이를 확인하고자 하였다. 초기세포농도 21%에서 기질농도를 100 mg/l부터 200, 300, 400, 500 mg/l로 변화시켜 생성되는 digoxin의 양을 측정한 결과 Fig. 5와 같았고, digoxin 수율이 가장 높게 나타난 기질 첨가량은 400 mg/l였다. 이와 같은 결과로 앞서 살펴 보았던 초기세포농도의 영향에서 볼 수 있었던 세포량에 대한 적절한 기질의 첨가량이 존재함을 재확인하였고, g 세포건조중량당 최적 기질의 첨가량은 약 30~50 mg인 것으로 계산되었다.

생산배지로의 전환시기에 따른 digoxin 수율 변화

1단계 생장배양에서 *D. lanata* 혼탁세포의 생장곡선을 관찰한 결과 제대 후 3~9일간 대수증식기를

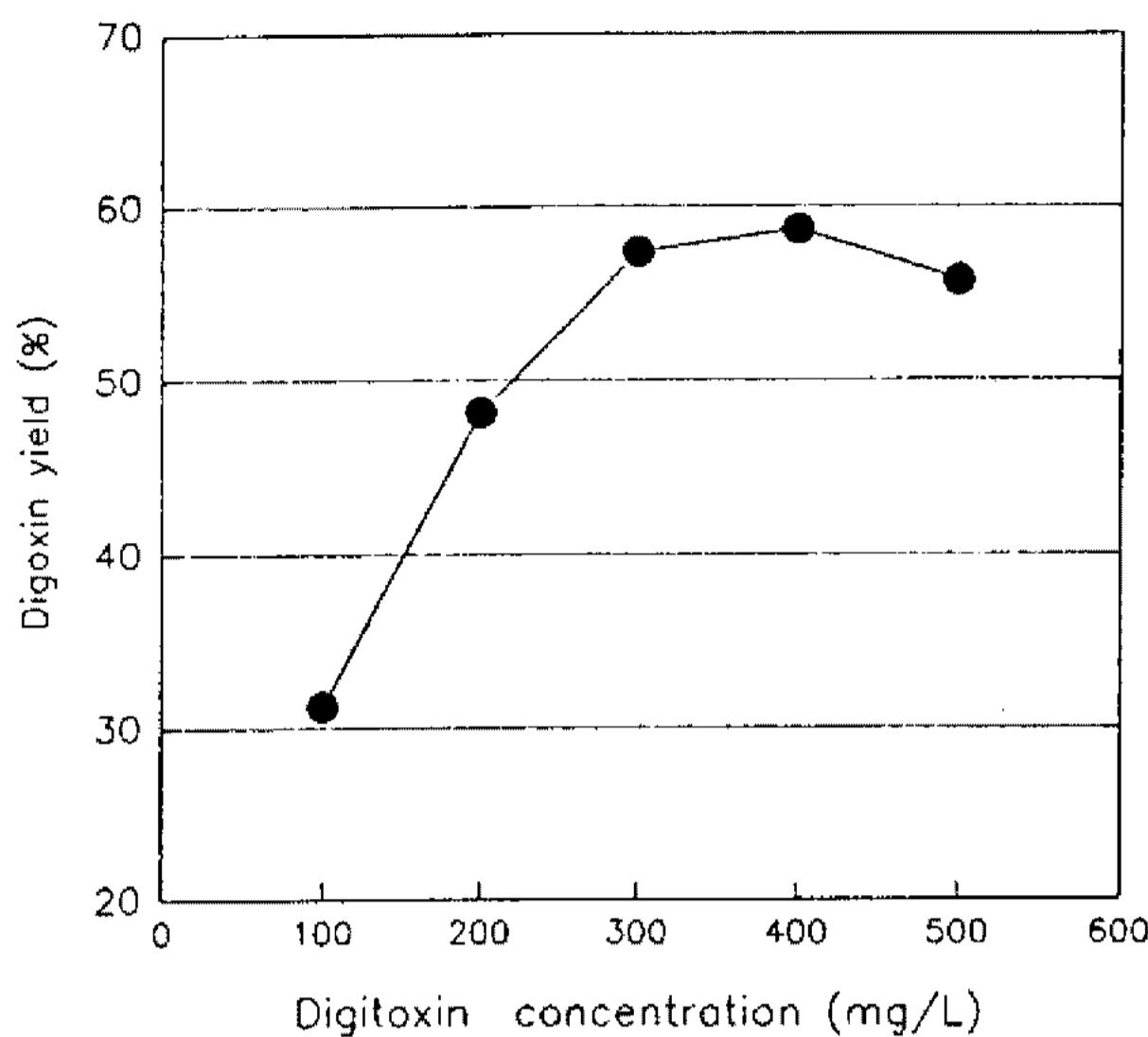


Fig. 5. Effect of substrate concentration on the production of digoxin.

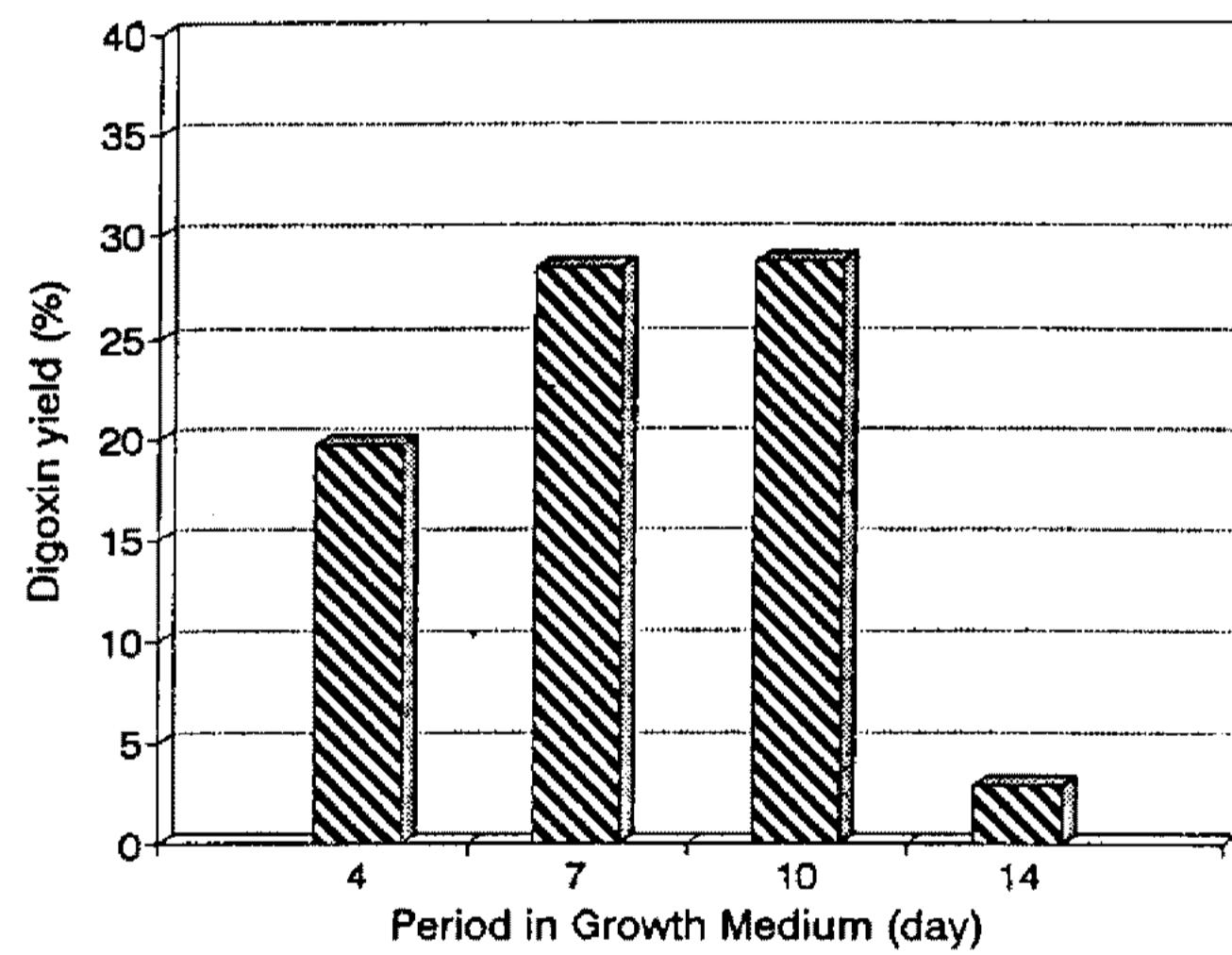


Fig. 6. Effect of period in growth medium on digoxin yield.

유지하였다. 이러한 사실을 바탕으로 생장배지에서 4일, 7일, 10일 그리고 14일간 배양된 세포를 2단계 생산배지로 옮겨 digitoxin의 생물학적 변환을 수행하였을 때에 각기 다른 생장시기에 생산배지로 옮겨진 세포는 생물학적 변환능에 차이를 보였고, 이때에 얻어진 digoxin 수율을 Fig. 6에 정리하였다. 실험결과 생장배지에서 대수증식기 말기나 정지기 초기 상태에 있는 세포를 생산배지로 옮겨 생물학적 변환을 수행하는 것이 digoxin 생성에 가장 효율적임을 확인하였고, 이는 Kreis와 Reinhard(8)가 C-series cardenolide에 대해 얻은 결과와 일치하는 것이다.

기질의 첨가시기에 따른 영향

생산배지에 옮겨진 세포에 기질을 첨가하는 시기

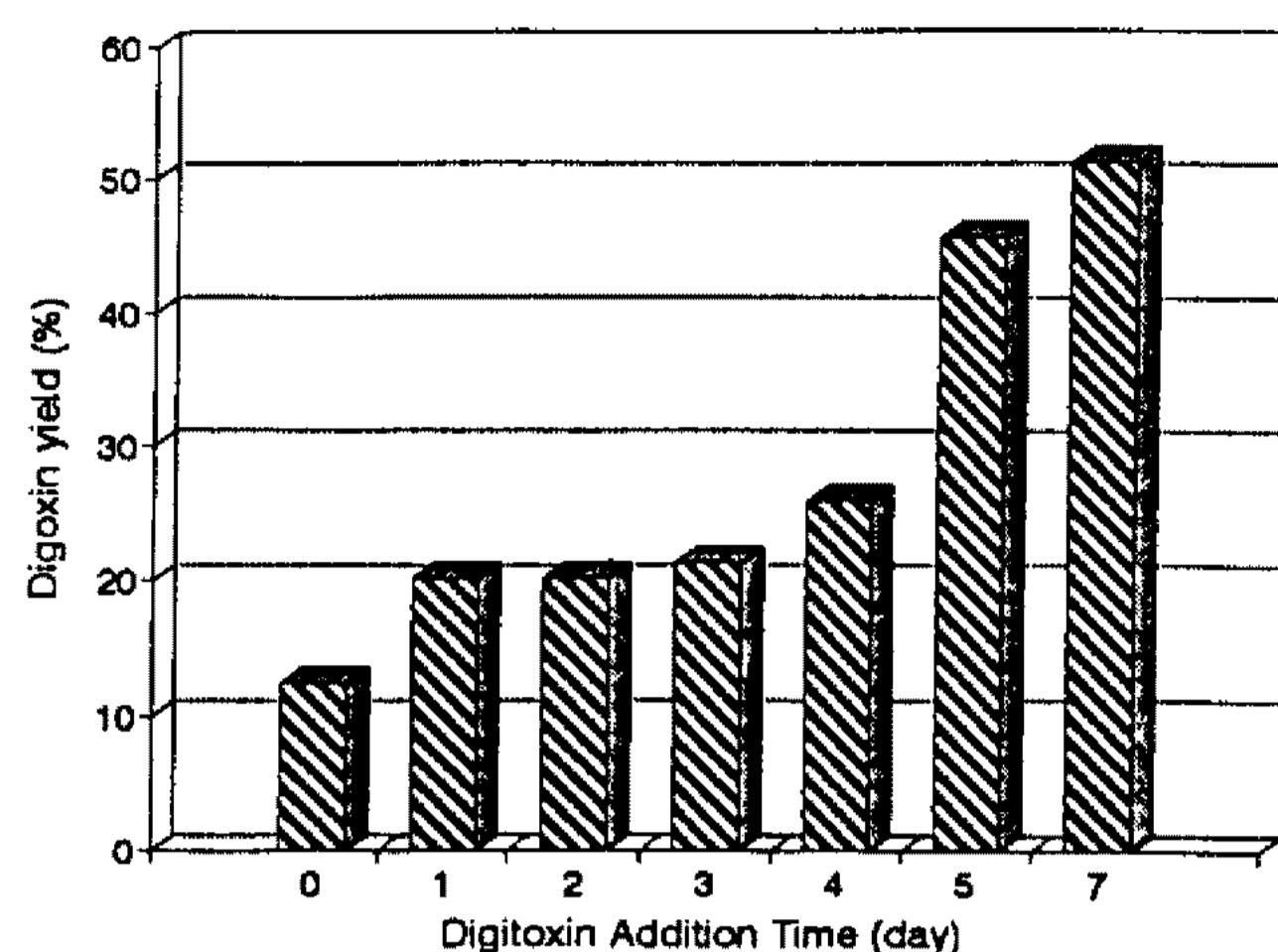


Fig. 7. Effect of the addition time of digitoxin on biotransformation in production medium.

또한 생물학적 변환능에 영향을 주게 된다. 기질의 첨가시기가 미치는 영향을 조사하기 위해서 세포를 생산배지로 옮긴 후 각기 다른 시기에 digitoxin을 첨가하고 2일간 배양을 수행하였으며 그 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 생장배지에서 10일간 배양된 세포를 생산배지로 옮김과 동시에 기질을 첨가하였을 경우 세포는 대부분의 기질을 변환시키지 못하였고, 새로운 배지에 대한 적응기간을 5일 이상 두고 기질을 첨가하였을 때 생물학적 변환에 관여하는 세포의 효소활성이 향상됨을 알 수 있었다.

여러 가지 당수용액에서의 생물학적 변환

식물세포배양에 의한 이차대사산물 생산시에는 배지중의 당 종류에 따라 생산성이 변화하는 것은 일반적 사실이다. 따라서, glucose 이외의 다른 당수용액을 생산배지로 사용하였을 경우 de novo 합성이 아닌 생물학적 변환에 의한 digoxin 생산에는 어떠한 영향을 미치는지 살펴 보았다. 8% sucrose, 8% maltose, 8% fructose, 8% mannitol 그리고 5% mannitol과 3% glucose를 혼합한 형태의 당수용액을 사용하여 생물학적 변환을 수행하였을 경우 digoxin 수율은 Fig. 8과 같았다. Maltose나 mannitol 수용액에서는 digoxin으로의 변환 수율이 매우 낮았고, fructose와 sucrose 수용액인 경우에는 다소 차이는 있지만 glucose 수용액에서와 유사한 결과를 보였다. 그러나, 변환 수율이 가장 높았던 것은 혼합형 당수용액으로 5% mannitol에 의한 삼투압 유지와 3%의 탄소원 공급이 생물학적 변환에 알맞은 조건을 제공한 것으로 보이고, 삼투압에 의한 효과와 탄소원의 농도변화에 따른 영향에 관한 연구가 좀 더 필요할 것으로 생각된다. 따라서, 주로 사용된 당인 glucose의

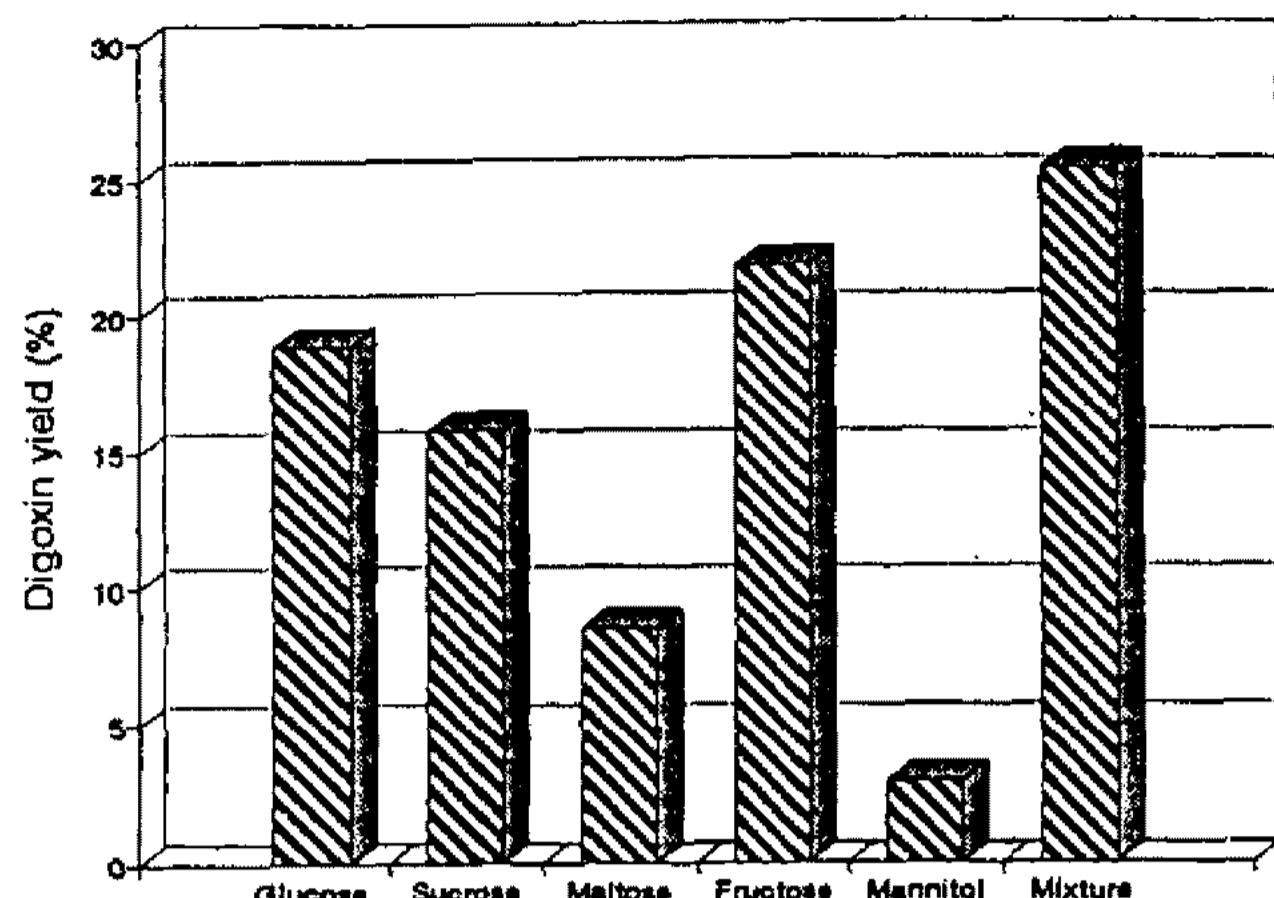


Fig. 8. Production of digoxin in various sugar solutions.
Concentration of each sugar was 8%(w/v), Mixture was consisted of 5% mannitol and 3% glucose.

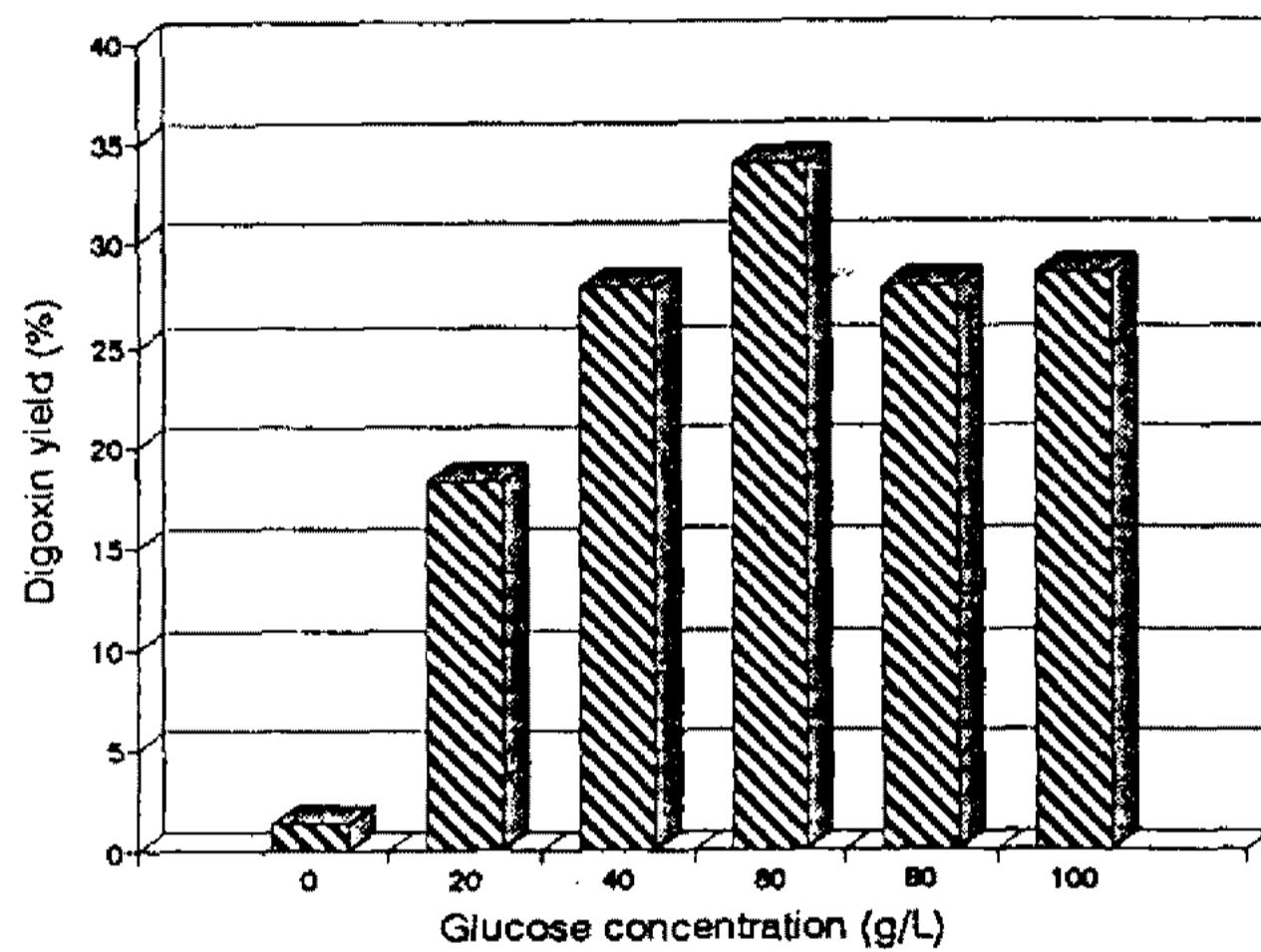


Fig. 9. Effect of glucose concentration on digoxin yield.

농도변화에 따른 영향을 조사하였다. Fig. 9에 나타낸 바와 같이 0, 2, 4, 6, 8, 10%(w/v) 농도의 glucose 수용액을 대상으로 digoxin 수율을 비교한 결과 6% glucose 수용액에서 수율이 가장 높은 것으로 확인되었고, 이는 Kreis 등(9)이 제시한 4% 이상의 glucose 수용액에서 12β -hydroxylation 변환반응이 우세하다고 한 것과 동일한 경향을 나타낸 것이다.

복합배지 성분의 영향

보통 미생물배양이나 식물세포배양에서 사용되는 복합배지 첨가물들은 여러 가지 생장인자, 비타민, 호르몬, 아미노산 그리고 미량원소 등을 함유하고 있어 세포의 생장과 대사 및 생물학적 변환에 관여하는 효소활성에 영향을 줄 것이다. 그래서, banana powder, coconut water, beef extract, malt extract, peptone, yeast extract 등의 복합배지 성분들을 8% glucose 수용액에 첨가하여 이들이 생물학적 변환에

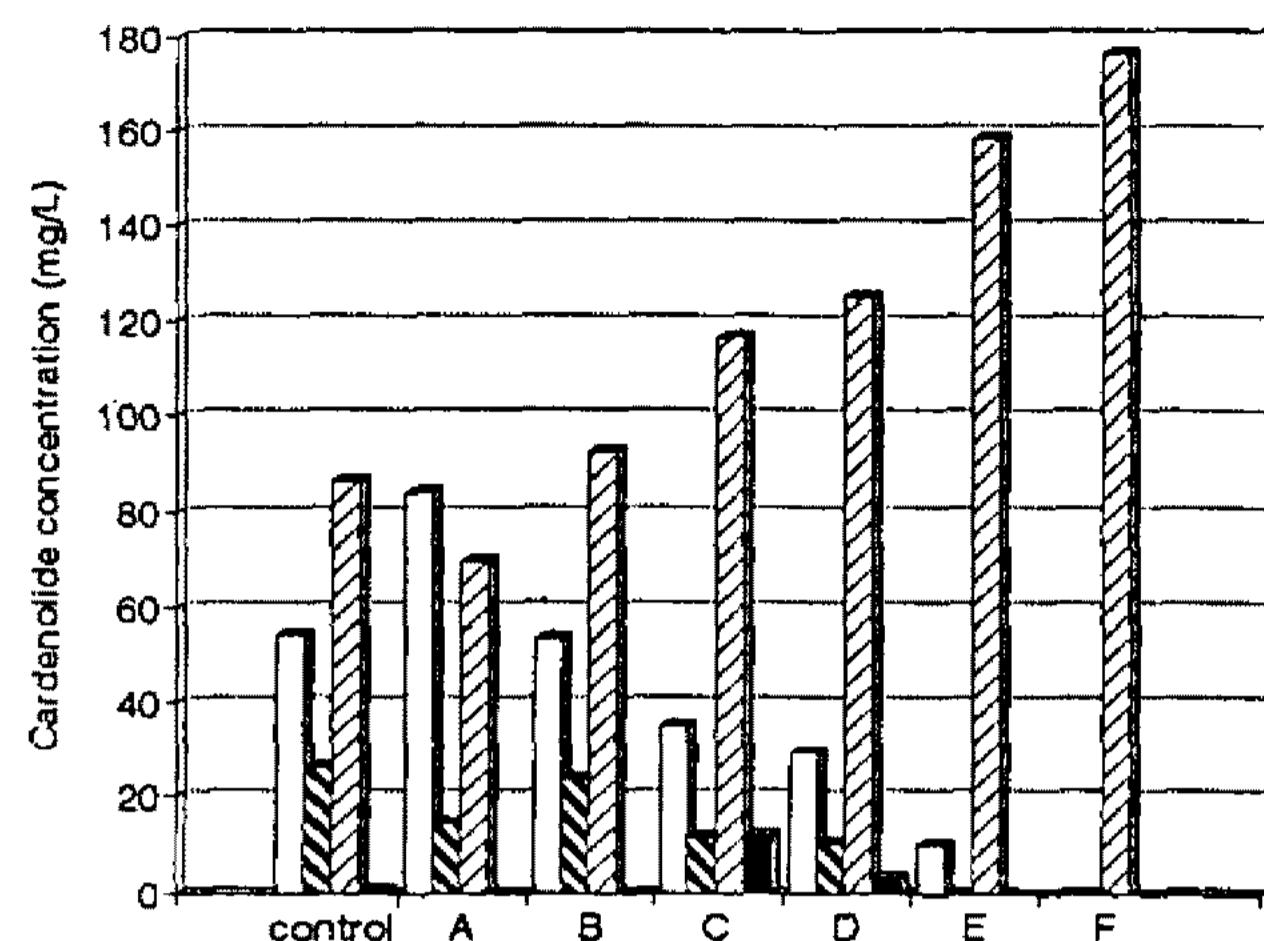


Fig. 10. Effect of complex nutrient on digitoxin biotransformation.

A, coconut water; B, malt extract; C, banana powder; D, yeast extract; E, peptone; F, beef extract. Symbols are the same as those in Fig. 2.

미치는 영향을 알아보았다(Fig. 10). 선택한 복합배지 첨가물들 가운데 digoxin 생성을 향상시키는 것은 없었고, 대부분의 물질들은 purpureaglycoside A의 생성을 증가시키는 것으로 확인되었다. 특히, peptone과 beef extract가 첨가된 배지에서는 공급된 digitoxin 모두가 12β -hydroxylation은 되지 않고 $16'\text{-}O$ -glucosylation 되어 purpureaglycoside A 만을 생산하는 특이한 현상이 나타났다.

빛의 조사에 따른 영향

식물세포배양에서 빛의 조사는 여러 가지 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 일부 효소들의 활성에도 영향을 미치게 된다. 여기에서는 암소의 생장배지에서 자라던 세포를 2단계 생산배양을 실시하는 동안 빛을 조사하고, 빛을 조사하지 않은 경우와 비교하였다(Fig. 11). 그 결과, 생산배지로 옮겨 생물학적 변환을 수행할 때 빛의 조사는 digoxin으로의 변환을 상승시키는 것으로 나타났다. 명조건에서의 digoxin 수율 증가는 조사된 빛이 12β -hydroxylation에 관여하는 효소 반응계의 활성을 향상시킨 것으로 생각된다. 그러나, *D. lanata* 배양에 의한 cardenolide 생산시에는 암조건이 유리함이 보고된 바 있으며(12), 고정화 세포에 의한 β -methyldigitoxin의 hydroxylation 경우에는 암조건이 약간 좋지만 명조건과 큰 차이를 보이지는 않았다(13). 이는 de novo 합성에 의한 생산이거나 glucosylation을 배제한 상태에서의 변환이므로 본 실험과 차이를 보인다고 판단된다. 한편, 빛의 조사 외에도 digitoxin 12β -hydroxylase와 보조효소인 cytochrome P-450, 그리고 다른 보조인자들의 특성과

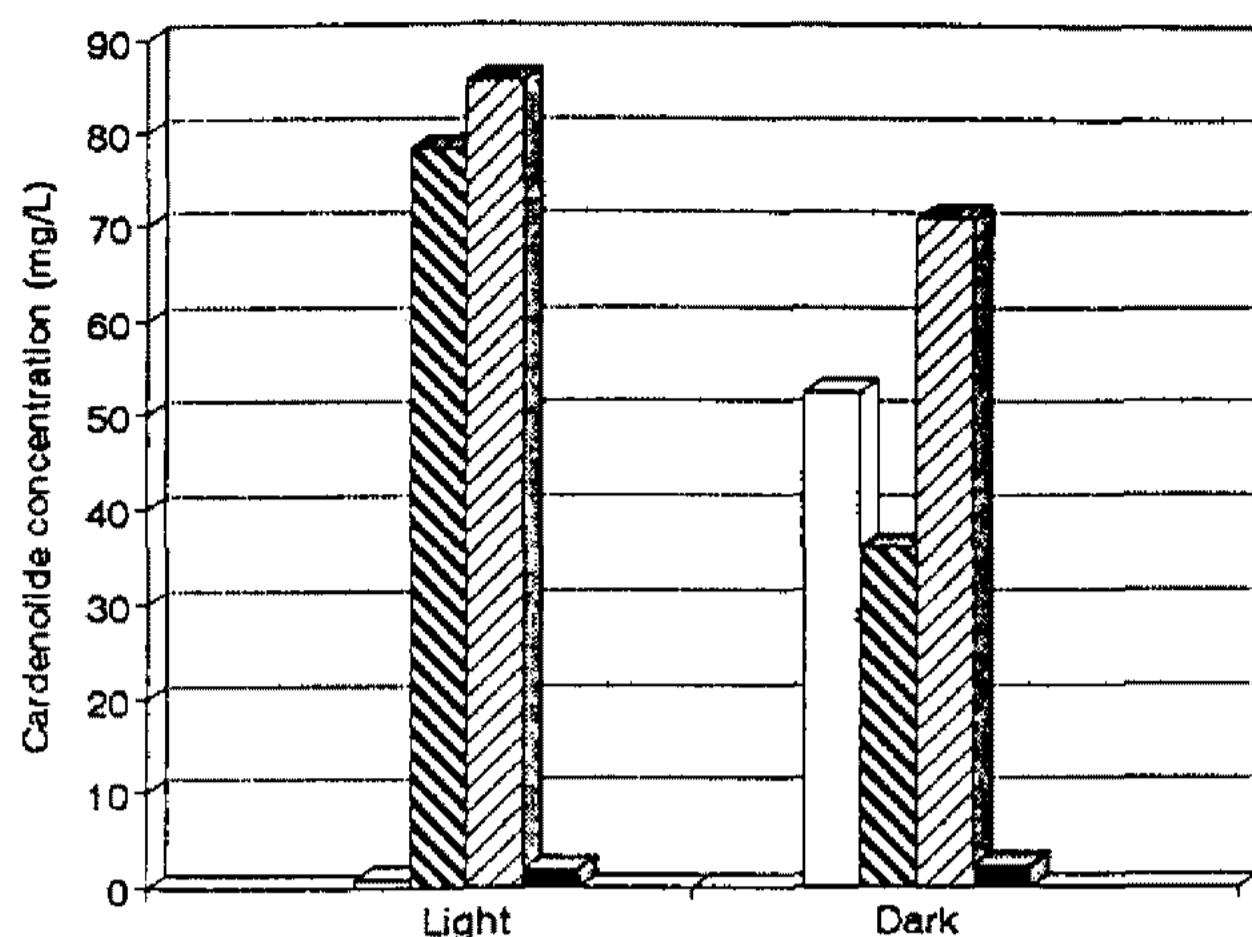


Fig. 11. Effect of light on digitoxin biotransformation. Light was illuminated only after the cells were transferred into production medium. Symbols are the same as those in Fig. 2.

활성에 영향을 주는 화학물질 또는 경쟁반응인 16'-O-glucosylation에 관여하는 효소의 활성저해제 등에 대한 확인이 digoxin의 수율을 향상시키기 위해 필요하겠다(14).

요 약

Digitalis lanata 혼탁세포의 생물학적 변환을 이용한 digoxin 생산을 위하여 2단계 배양공정을 최적화하였다. 1단계에서는 세포생장에 알맞은 생장배지로 modified MS 배지를 사용하였고, 2단계에서는 digitoxin으로부터 digoxin으로의 생물학적 변환에 적합한 생산배지로 순수한 당수용액을 사용하였다. 생장배지에서 대수증식기 말기인 배양 10일째되는 세포를 생산배지로 옮겼을 때 12 β -hydroxylation의 활성을 최대로 유지할 수 있었고, 생산배지에서의 초기세포농도 21%에서 가장 효율적인 기질의 첨가량은 400 mg/l 이었으며 기질의 첨가시기는 생산배지로 옮겨진 지 5일 이후가 좋았다. 또한, glucose 이외의 당을 생산배지로 사용한 결과 sucrose와 fructose는 glucose 수용액에서 유사한 digoxin 수율을 보였으며 glucose 수용액의 경우 당농도 6%에서 가장 좋은 결과를 얻었다. 8% glucose 수용액 내에서 modified MS 배지의 주요 성분들은 대부분 digoxin 생성을 저해하였고, 인산염만이 다소 향상된 digoxin 수율을 보였다. 조사된 복합배지성분 가운데 12 β -hydroxylation에 효과를 나타내는 것은 없었고, peptone과 beef extract의 경우는 오히려 16'-O-glycosylation에 의한 purpureaglycoside A의 생성을 향상시키는 것으로 나타났다. 그리고, 암조건에서 자라던 세포를 생산배

지로 옮겨 빛을 조사한 경우에 digoxin 생성은 암조건에서보다 명조건에서 2배 가량 더 높았다.

감사의 말

본 연구는 1992년도 과학재단 특정기초 연구비 지원(과제번호 92-50-00-01) 및 1993년도 인하대학교 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Steck, W. and F. Constabel. 1974. Biotransformations in Plant Cell Cultures. *Lloydia*. **37**: 185-191.
- Fruya, T., M. Hirotani, and T. Shinohara. 1970. Biotransformation of digitoxin by suspension callus culture of *Digitalis purpurea*. *Chem. Pharm. Bull.* **18**: 1080-1082.
- Döller, P.C. and E. Reinhard. 1979. Biotransformation of cardenolides: Comparative studies with cell cultures of *Thevetia nerifolia* and *Digitalis lanata*. *Planta Med.* **37**: 277-288.
- Heins, M., J. Wahl, H. Lerch, F. Kaiser, and E. Reinhard. 1978. Preparation of β -methyldigoxin by hydroxylation of β -methyldigitoxin in fermenter cultures of *Digitalis lanata*. *Planta Med.* **33**: 57-62.
- Spieler, H., A.W. Alfermann, and E. Reinhard. 1985. Biotransformation of β -methyldigitoxin by cell cultures of *Digitalis lanata* in airlift and stirred tank reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 1-4.
- Reinhard, E., W. Kreis, U. Barthlen, and U. Helmbold. 1989. Semicontinuous cultivation of *Digitalis lanata* cells: Production of β -methyldigoxin in a 300-L airlift bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 502-508.
- Kreis, W. and E. Reinhard. 1986. Highly efficient 12 β -hydroxylation of digitoxin in *Digitalis lanata* cell suspensions using a two-staged culture method. *Planta Med.* **418**-419.
- Kreis, W. and E. Reinhard. 1988. 12 β -Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells: Production of deacetyllanatoside-C using a two-stage culture method. *Planta Med.* **143**-148.
- Kreis, W., W. Zhu, and E. Reinhard. 1989. 12 β -Hydroxylation of digitoxin by *Digitalis lanata* cells. Production of deacetyllanatoside-C in a 20-litre airlift bioreactor. *Biotechnol. Lett.* **11**: 325-330.
- Kreis, W. and E. Reinhard. 1990. Two-stage cultivation of *Digitalis lanata* cells: Semicontinuous production of deacetyllanatoside-C in 20-litre air-

- lift bioreactors. *J. Biotechnol.* **16**: 123-136.
11. Kreis, W. and E. Reinhard. 1992. 12 β -Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells: Production of digoxin in 20-litre and 300-litre air-lift bioreactors. *J. Biotechnol.* **26**: 257-273.
12. Ohlsson, A.B., L. Björk, and S. Gatenbeck. 1983. Effect of light on cardenolide production by *Digitalis lanata* tissue cultures. *Phytochemistry* **22**: 2447-2450.
13. Alfermann, A.W., I. Schuller, and E. Reinhard. 1980. Biotransformation of cardiac glycosides by immobilized cells of *Digitalis lanata*. *Planta Med.* **40**: 218-223.
14. Petersen, M. and H.U. Seitz. 1985. Cytochrome P-450-dependent digitoxin 12 β -hydroxylase from cell cultures of *Digitalis lanata*. *FEBS Lett.* **188**: 11-14.

(Received August 24, 1994)