한국생물공학회지 제 13권 제 1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 13, No. 1, 26-30(1998)

Peppermint 세포 현탁배양에서 Cyclodextrin을 이용한 Menthol의 생산성 증대

†조 규 헌 · 임 철 호 · 박 세 춘 · 신 명 근
강원대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 1997. 8. 9., 게재승인 : 1997. 12. 2.)

Production Enhancement of Menthol in Suspension Cultures of Peppermint Using Cyclodextrin

Gyu Heon Cho†, Chul Ho Lim, Se Chun Park, and Myoung Keun Shin
Dept. of Chemical Engineering, College of Engineering, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701, Korea
(Received : 1997. 8. 9., Accepted : 1997. 12. 2.)

The suspension cultures of *Mentha piperita* produce menthol which has very low solubility in water due to its hydrophobicity. This can be considered as a factor for its low production in the suspension cultures. Cyclodextrin has the hydrophobic cavity inside the molecule in which menthol can be captured and allow to form a stable complex. The suspension culture of *Mentha piperita* showed 70% higher production enhancement in the medium containing 1.5%(w/v) β-cyclodextrin than the control. β-cyclodextrin had no adverse effect on the cell growth and showed the best result among α-, β- and γ-cyclodextrins tested in terms of menthol production. We demonstrated that β-cyclodextrin can be used to enhance the production of menthol in the suspension cultures by capturing hydrophobic menthol into the cavity of cyclodextrin molecules.

Key Words : Plant cell cultures, Cyclodextrin, *Mentha piperita*, Menthol

서 론

Peppermint는 다년생의 식물로 유럽과 북미, 일본, 브라질 등지에서 경작되고 있다. 잎과 줄기 등에 약 1%의 휘발성 오일이 함유되어 있으며, 그 중의 50%는 menthol 성분이고 10%는 menthone으로 구성되어져 있다. Menthol은 진통, 건위제로 쓰일 뿐 아니라, 독특한 향을 내기 위해 사용되므로 쵸코렛을 비롯한 음식물에 첨가되고 청량제로도 많이 사용되고 있어 국내 수요가 증가하고 있는 약용식물이다(1). 따라서 menthol의 식물세포 배양에 의한 연구가 비교적 많이 진행되고 있으나, menthol의 낮은 용해도 특성 및 불안정성으로 인해 식물세포 배양에 의한 생산성이 낮아, 현재 menthol의 공급은 직접 재배에 의해 이루어지고 있다. Menthol은 대부분의 식물세포 2차 대사물질과 마찬가지로 농도가 매우 낮은 상태로 세포 내에 축적되거나 세포 밖으로 배출되며 또한 방향성이 커서 매우 불안정하다. 그러므로 menthol은 수용액 상에서 용해도와 생산성이 낮아 분리 · 정제 공정이 까다로우며, 산업화 측면에서 경제성을 고려할 때 낮은 생산수율과 분리공정이 차지하는 비중이 매우 높게 나타난다. 이러한 여러 문제들은 식물세포 배양기술을 이용하여 휘발성 오일을 대량 생산하려는 공정에 있어서 나타나는 일반적인 장애 요소이다. 식물세포 배양의 실제 공정을 거쳐 목적 대사물질을 대량 생산하는데 있어서의 어려움은 보통의 경우 목적대사물질이 배지내에서 불안정한 상태로 존재하며, 매우 저농도로 생산된다는 것과 생산되어진 목적물질이 성장환경 등이 변화함에 따라 중간체나 다른 대사물질로 생전환을 하기도 해서 생산되는 농도가 매우 낮다는 것이다. 그러므로 이러한 문제를 최소화하기 위해 식물세포 배양시 전구물질, 흡착제, silicon 유체 등을 첨가하여 배양을 행하는 시도가 진행되어 왔고(2-4), 실제로 이들 방법은 식물 세포 배양으로부터 2차 대사물의 생산을 증대시키는데 이용되고 있다. 그러나 이들 방법은 세포 자체에 손상을 주거나 2차적인 처리를 필요로 하므로 보다 나은 새로운 방법의 모색이 필요하다고 인식되어 왔다. Cyclodextrin은 세포배양시 목적물질의 생산과 추출 과정 중 세포의 성장과 활성에 손상을 미치지 않고 *Californica poppy* 현탁 배양에 첨가하여 목적 물질인 sanguinarine의 생산성을 최고 40배 증가시켰다고 보고되었다(5).

본 연구에서는 molecular capsule이라 불리는 cyclodextrin (Figure 1)을 이용하여 peppermint의 현탁 배양에서 세포외

† Corresponding Author : Dept. of Chemical Engineering, College of Engineering, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701, Korea
Tel : 0361-250-6335, Fax : 0361-56-3566
E-mail : ghcho@cc.kangwon.ac.kr

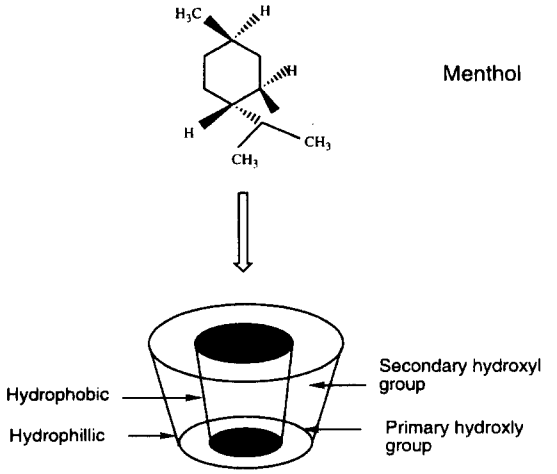

Figure 1. Schematic representation of cyclodextrin and structure of menthol.

부분으로 배출되는 유용물질인 menthol의 용해도와 안정성을 증가시킴으로써 안정한 menthol-cyclodextrin inclusion complex를 형성하여 생산성을 증대시킴으로 menthol의 불안정성과 상대적으로 많은 비용이 소요되는 분리공정을 보완하고자 하였다. 또한, β-cyclodextrin을 *Californica poppy* 현탁 배양에 첨가하여 목적 물질인 sanguinarine의 생산성을 증가시킨 보고(5)와 비교·고찰하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Peppermint 세포는 서울대 농화학과의 김수언 교수님으로부터 분양받아 실험하였다. 배지에 사용된 모든 시약은 SIGMA (St. Louis, USA)사의 시약을 사용하였으며, standard용 menthol도 SIGMA사로부터 구입하여 사용하였다. α-cyclodextrin, β-cyclodextrin, γ-cyclodextrin은 ENSUIKO SUGAR REFINING Co. Ltd.(Yokohama, JAPAN)에서 구입하였고, antifoam agent로 antifoam A(SIGMA), antifoam 289(SIGMA)를 사용하였다.

세포배양

Peppermint의 세포배양은 탄소원인 sucrose를 30g/L첨가하고 hormone으로 2,4-D를 9μM 첨가한 Lin-Staba배지에서 pH를 5.7로 조정하여 계대 배양하였다. 현탁배양은 배지가 100mL 들어있는 250mL 삼각플라스크에서 세포와 배지의 비율을 1:3으로 하여 10일 간격으로 계대 배양하였으며, 이때 배양온도는 암실에서 25℃를 유지하였고, shaker의 교반속도는 100rpm으로 하였다. 고체배양은 멸균된 petridish에 agar를 첨가한 배지를 20mL 부어 응고시킨 후 25일 간격으로 계대 배양하였다.

세포 성장의 측정

Peppermint의 현탁배양에 있어 관찰되는 것은 전체적으로 연두색을 띠며 응집이 잘 일어나는 것을 들 수 있다. Peppermint 세포의 세포 성장 특성을 조사하기 위한 회분배양은 세포접종시 동일한 조건을 갖추기 위해 250mL 삼각플라스크에서 배양중인 세포를 멸균된 500mL 삼각플라스크에 고루 섞은 후, 약한 진공하에서 여과하여 40mL의 배지가 들어있는 100mL 삼각플라스크에 신선중(FCW)으로 3.5g씩 접종하였으며 이때 배지에는 α-, β-, γ-cyclodextrin을 에 대하여 각각 0%, 1.0%, 1.5%, 2.0%(w/v)의 농도별로 첨가한 후 멸균하여 사용하였으며, 2일에 한 번씩 시료를 채취하여 세포성장과 menthol의 생산성을 조사하였다.

생물반응기 배양

배양에 사용된 생물반응기는 EYELA사의 5L-STR(stirred tank reactor)과 EYELA사의 1.5L air-lift bioreactor를 사용하였고, 이때 working volume은 각각 3.5L와 1.2L로 하였다. 초기 접종 농도는 3.0 g-cell/L(DCW)로 하였다.

Menthol의 분석

세포와 배지가 있는 현탁액을 약한 진공하에서 Whatman No.1 여과지로 여과하여 얻은 액을 세포외 생산에 대한 측정용 시료로 사용하였고 신선중 약 1g을 취하여 methanol 및 유기용매를 3mL 가하고 추출효과를 높이기 위해 30분간 sonication시킨 후 원심 분리하여 얻은 액을 GC 분석전에 15,000rpm에서 15분간 다시 원심 분리하여 세포내 생산에 대한 측정용 시료로 사용하였다.

분석은 gas-chromatography 5890 Ⅱ(Hewlett Packard Co. USA)을 사용하였다. column은 capillary HP-1 column(25m × 0.2mm × 0.11μm)을 사용하였고 column의 초기온도는 70℃에서 2분간 지체후 175℃까지 3℃/min의 속도로 증가하도록 하였다. Carrier gas는 He을 사용하여 1.0mL/min의 속도로 흘려 보냈으며, FID(flame ionization detector)로 분석하였다.

결과 및 고찰

세포 성장과 생산성에 대한 cyclodextrin의 영향

Peppermint의 세포 성장 경향을 조사하기 위해 18일간 배양하였다. Figure 2는 건중량(DCW)과 sucrose의 농도를 나타낸 것으로 지수성장기는 2일부터 8일까지로 나타났다. Peppermint 세포의 배가시간은 약 3.5일, 최고의 건중량은 8~10일 정도에서 관찰되어 비교적 빠른 성장을 보이고 그 이후에는 세포의 성장속도가 서서히 둔화됨을 볼 수 있었다.

α-, β-, γ-cyclodextrin을 0%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%(w/v)으로 각각 첨가하여 배양한 결과 β-cyclodextrin을 첨가한 것이 α-, γ-cyclodextrin을 첨가한 것에 비하여 menthol생산이 높았으며 (Figure 4), Figure 3에 나타나 있듯이 β-cyclodextrin 1.5%의 농도에서 menthol생산이 두드러졌다. 이러한 결과는 sanguinarine 생산성 증대의 보고(5)와 유사함을 알 수 있었다. 그러므로 본 실험의 결과 세포 현탁배양시 β-cyclodextrin 1.5%을 첨가하였을때가 2차 대사물의 생성에 있어서 β-cyclodextrin의 최적농도라는 것을 확인할 수 있었고 guest 분자마다 그 한계를 갖고 있는 것을 알 수 있었다. Higuchi(6)에 의하면 복합체의 고유의 용해도는 크게 상승형과 상승하강형으로 분류된다고 한다. 이는 cyclodextrin의 공동경에 guest분자의 포접이 불완전할때와 완전할때의 차이에 의하여 나타내는 것이라 보고하였다. 그러므로

본 연구에서도 Figure 4에서 보듯이 α-, β-, γ-cyclodextrin 중 β-cyclodextrin만이 농도에 따라 상승하강형을 보이는 것으로 보아 menthol이 β-cyclodextrin과 inclusion complex를 이루되 완전히 포접되는 것을 추론할 수 있고 α-cyclodextrin의 경우는 상승형을 보이는 것으로 보아 불완전한 포접을 이루는 것으로 추론된다. 또한 γ-cyclodextrin의 경우는 inclusion complex형성에 관여를 하지 않는 것으로 추론된다. 이러한 결과는 보고(5)의 양귀비 현탁배양에서의 결과와 약간의 차이를 보였으며 α-, β-, γ-cyclodextrin 공동경의 지름 및 분자구조에 따라 여러 가지 guest 분자를 선택적으로 포접한다라는 보고(7, 8)와 관련이 있는 것으로 사료된다. 또한 Figure 3의 peppermint 현탁배양시 대조구(control, β-cyclodextrin을 첨가하지 않음)에서는 소량의 menthol 생산이 되었지만 Figure 4의 대조구에서는 menthol이 생산되지 않은 것으로 보아 menthol이 세포배양으로 생산될 때 매우 불안정하게 존재함을 알 수 있었다. 그러나 β-cyclodextrin 첨가시 거의 같은 양이 생산되는 것으로 보아 β-cyclodextrin이 생합성 단계의 관련 효소들의 유도를 도왔거나 불안정한 수용액상에서의 용해도 및 안정성을 증가시켰을 가능성을 추론 할 수 있었다. Figure 5는 대조구(β-cyclodextrin을 첨가하지 않음)와 β-cyclodextrin 1.5%(w/v)를 첨가하여 18일간의 배양에서 두 조건하에서의 peppermint세포의 성장에 따른 건중량을 비교한 것이다. β-cyclodextrin을 첨가한 것의 건중량값이 더 큰 것은 β-cyclodextrin이 적어도 세포의 성장에 있어 장애요소로 작용하지는 않는 것으로 사료된다.

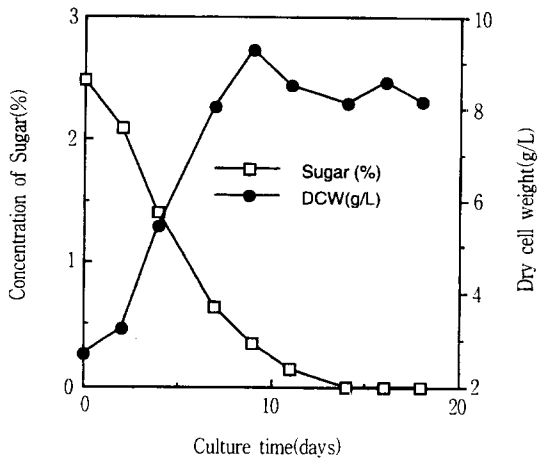

Figure 2. Cell growth curves in the suspension cultures of peppermint.

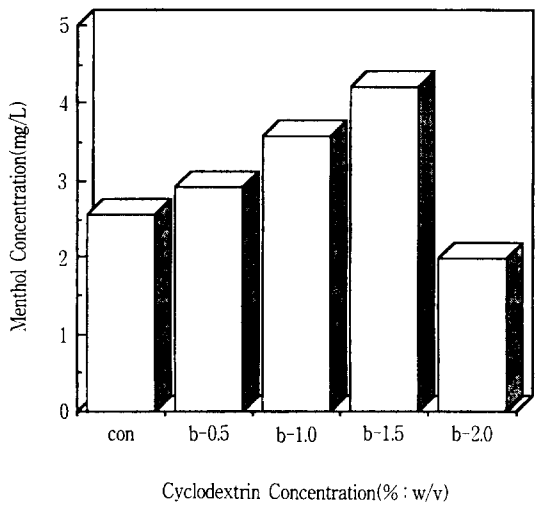

Figure 3. The effect of β-cyclodextrin(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% : w/v) on the menthol production in suspension cultures of peppermint. con, b-0.5, b-1.0 and b-2.0 represent for 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0% w/v of β-cyclodextrin, respectively.

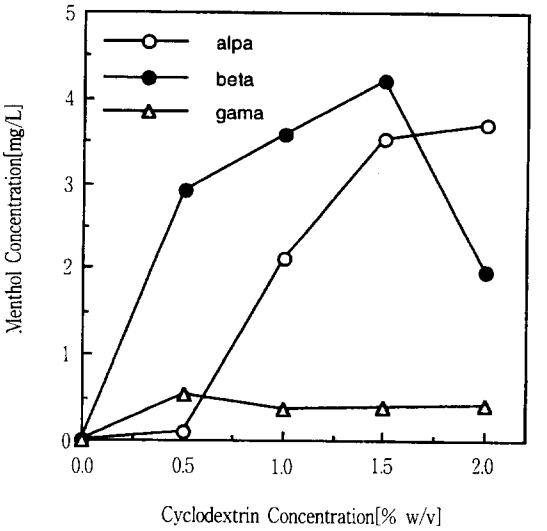

Figure 4. The effect of α-cyclodextrin, β-cyclodextrin and γ-cyclodextrin on menthol production in 9 day old suspension cultures of peppermint.

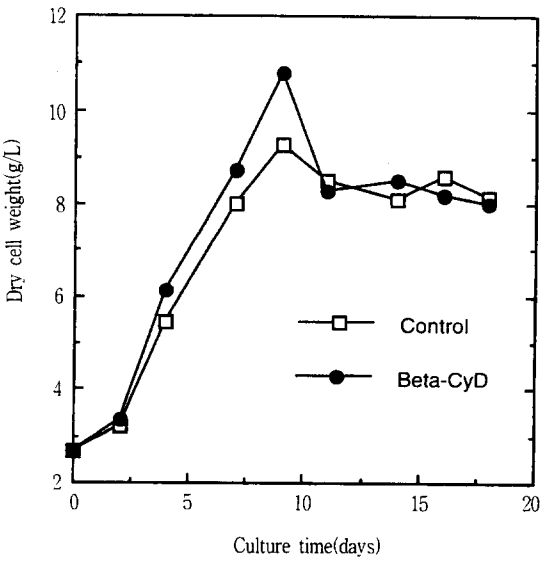

Figure 5. Comparison of the cell growth patterns between the control and β-cyclodextrin(1.5% w/v) added cultures.

현탁배양에서 yeast extract(100mg/L)와 cyclodextrin(1.5%(w/v)) 의 첨가에 대한 영향

대조구와 α-, β-, γ-cyclodextrin 1.5%(w/v)를 첨가한 것, 그리고 대조구에 yeast extract를 100mg/L첨가 한 것(con-Y), β-cyclodextrin 1.5% (w/v)와 yeast extract 100mg/L를 함께 첨가한 것(beta-Y)의 menthol 생산량은 Figure 6에 나타내었다. Yeast extract가 elicitor로서 peppermint 세포의 현탁배양에 미치는 영향을 알아보기 위해 yeast extract를 에탄올 침전법으로 전처리하여(9) Lin-Staba배지에 100mg/L를 첨가하여 사용하였다. 이러한 yeast extract를 이용한 elicitor의 첨가는 일반적으로 세포의 생육보다는 2차 대사산물의 생성을 촉진하기 위하여 실시되는데 식물세포의 종류나 배양조건에 따라 세포의 생육 자체에도 영향을 미치는 것으로 보고되어져 있다(10). 그러나 본 실험에서 elicitor의 사용은 menthol 생산에는 영향을 거의 미치지 못하고 세포의 성장이 조금 증가한 것으로 나타났다. Figure 6에서 알 수 있듯이 β-cyclodextrin 1.5%(w/v)을 첨가한 것이 대조구보다 약 1.7배의 menthol의 생산성 증대를 보였다. β-cyclodextrin과 yeast extract를 함께 첨가한 것은 대조구보다 약 1.3배의 menthol의 생산성 증대를 보였으나, β-cyclodextrin 1.5%(w/v)만 첨가한 배지에서의 생산량보다는 적은 양을 생산함을 알 수 있었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 본 연구에서 β-cyclodextrin을 배지에 첨가하여 사용하는 것은 peppermint세포의 성장 및 menthol의 생산에 대하여 모두 대조구보다 우수함을 알 수 있었다.

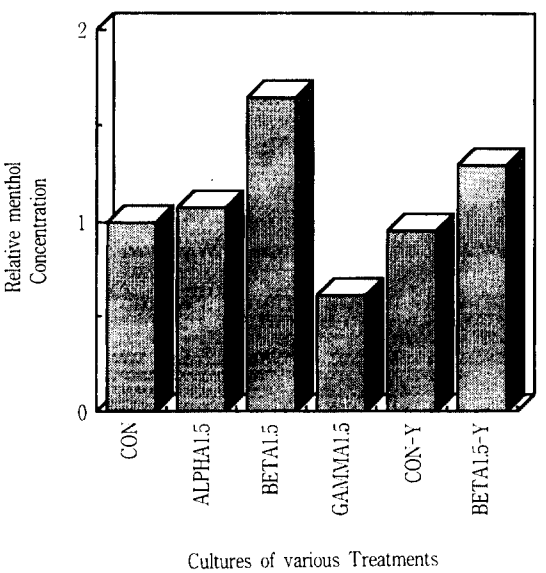

Figure 6. The effect of α-, β-, γ-cyclodextrin(1.5%:w/v) and yeast extract (100mg/L) on menthol production in 9 day old suspension cultures of peppermint. con: control, ALPHA 1.5: 1.5% of α-cyclodextrin added in liquid medium, BETA1.5: 1.5% of β-cyclodextrin added in liquid medium, GAMMA1. 5: 1.5% of γ-cyclodextrin added in liquid medium, CON-Y: Yeast extract added in liquid medium, BETA1.5-Y: 1. 5% of β-cyclodextrin and yeast extract added in liquid me dium.

생물반응기 배양에서 cyclodextrin의 영향

Stirred tank reactor(STR)와 air lift bioreactor 운전시 antifoam agent를 가하여 거품을 제거하려하였으나, β-cyclodextrin이 첨가된 본 실험에서는 β-cyclodextrin과 antifoam agent 사이에 밝혀지지 않은 반응으로 인하여 침전물이 발생하는 것으로 관찰되었다. 이때 회색침전은 menthol의 생산 농도를 저하시키고 aeration을 어렵게 만들었다. 이러한 문제를 해결하는 방법으로는 antifoam agent를 첨가하는 방법보다 물리적으로 배지 상부의 impeller축에 거품을 제거할 수 있는 장치를 설치하는 방법도 고려될 수 있으리라 생각된다. 그러나, cyclodextrin이 menthol을 포접한 상태에서 antifoam agent가 첨가되어 침전물을 형성할 수 있다면 cyclodextrin에 의한 2차 대사물질의 생산과 분리에 있어 새로운 가능성을 제시할 수 있을 것이다. Cyclodextrin은 포접작용에 의해 휘발성물질의 안정화, 산화 광분해물질의 보호, 용해도 향상, 유화작용 등과 같은 물성 개선 효과가 발현되며(11), 특히 수용액에서 난용성인 의약품을 cyclodextrin으로 complex 형태로 formulation하여 용해도를 증가시켜 그 효능을 증대, 지속시킬 수 있다. 따라서 cyclodextrin은 앞으로 세포배양의 여러 분야에 있어서 목적물질의 생산성의 증대와 분리공정의 단순화에 응용될 수 있을 것으로 사료된다(12). Menthol과 β-cyclodextrin의 포접 확인은 매우 중요한 연구 과제이며, 이러한 측면에서 β-cyclodextrin에 의한 menthol의 생산성 증대 효과는 inclusion complex 형성에 의한 안정성 증대뿐만 아니라, elicitor로서의 역할 등의 복합적인 요인을 생각해 볼 수 있다.

요 약

본 연구에서는, menthol의 소수성의 특성 및 불안정성으로 인한 낮은 생산성과 분리·정제의 어려움을 최소화하고 인체에 무해하며 목적물질과 포접하여 수용액에서 목적물질의 용해도를 증가시킬 수 있는 cyclodextrin을 이용하여 극복하고자 하였다. Peppermint는 Lin-Staba 기본배지와 기본배지에 cyclodextrin을 첨가한 배지에서 각각 배양하였다. 실험결과, α-, β-, γ- cyclodextrin을 농도별(0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%(w/v))로 기본배지에 첨가한 것, yeast extract를 첨가한 것, 그리고 기본배지에 세포를 성장시킨 것의 각각의 menthol의 생산량을 측정·비교하였을 때, α-, β-, γ-cyclodextrin 중 β-cyclodextrin 1.5%(w/v)를 첨가한 배지에서 대조구와 비교하여 약 1.7배 menthol의 생산성 증대를 보였다. 교반 생물반응기 운전시 antifoam agent와 cyclodextrin 사이의 예측하지 못한 반응에 의해 회색침전이 생겨났으며, 이러한 문제는 직접 aeration에 의한 bioreactor의 운전을 어렵게 하였다. β-cyclodextrin에 의한 menthol의 생산의 향상은 peppermint 이외의 식물세포에서도 현탁배양으로 2차대사물질을 생산하려는 여러 실험에 유용하게 적용될 수 있을 것이라 기대된다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Samuelsson, G. (1992), Drugs Natural Origin, p.113, Swidish

Pharmaceutical Press, Sweden.
2. Williams, R. D. and N. Chauret (1992), Effect of Polymeric Adsorbents on the Production of Sanguinarine by Papaver somniferum Cell Culture, *Biotechnol. and Bioeng.*, **40**, 971-977.
3. Cline, S. D. and C. J. Coscia (1988), Stimulation of Sanguinarine Production by Combined Fungal Elicitation and Hormonal Deprivation in Cell Suspension Culutres of Papaver bracteatum, *Plant Physiology*, **86**, 161-165.
4. Fukui, H., N. Yoshikawa, and M. Tabata (1984), Induction of Bensylquinone Formation by Activated Carbon in *Lithospernum erythorhizon* Cell Suspension Cultures, *Phytochem.*, **23**, 301-305.
5. 박세춘, 조규헌 (1996), 양귀비 세포 현탁배양계에서 Cyclodextrin을 이용한 Benzophenanthridine Alkaloids의 생산성 증대, *한국생물공학회지*, **11**(4), 411-419.
6. Higuchi, T. and H. Kristiansen (1970). Binding Specificity between Small Organic Solutes in Ageous Solution : Classification of Some Solutes into Two Groups According to Binding Tendencies, *J. Pharm. Sci.* **59**, 1601-1608.
7. Bar, R. (1983), Cyclodextrin-aided Bioconversions and Fermentation, *Trends in Biotech.*, **1**, 16-20.
8. Ikeda, K. and K. Uekama (1970), Inclusion Complexs of β-Cyclodextrin with Antiinflammatory Drugs Fenamates in Aqeous Solution, *Chem. Pharm. Sci.*, **59**, 1601.
9. Hahn, M. R. and P. Albersheim (1978), Isolation and Characterization of an Elicitor from Yeast Extract, *Plant Physiol.*, **62**, 107-111.
10. Fowler, M. R. and F. W. Rayns (1993), *In vitro* Cultivation of Plant Cells, Butterworth-Heinemann Ltd., pp.130-140, Oxford.
11. Szejtli, J. and M. S. Szente (1978), Hungarian. Pat. 180, 577 (C.A. 95:167384).
12. 조규헌 (1994), 식물세포 배양에 의한 2차 대사물의 생산성을 증가시키는 방법, 대한민국 특허출원, PA94131.