

주목 현탁세포배양을 이용한 10-deacetylbaccatin III 생산

이 규 화 · †김 동 일
인하대학교 공과대학 생물공학과
(접수 : 1999. 11. 24., 게재승인 : 1999. 12. 18.)

Production of 10-deacetylbaccatin III in *Taxus cuspidata* Suspension Cell Culture

Gue-Wha Lee and Dong-Il Kim†

Department of Biological Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 1999. 11. 24., Accepted : 1999. 12. 18.)

In this study, enhanced production of 10-deacetylbaccatin III(10-DAB), a precursor of taxol in semisynthesis, was investigated in *Taxus cuspidata* cell suspension cultures. The effects of initial inoculum size and sugar concentration were examined to prove the relationship between the production of 10-DAB and cell growth. The cell growth was found to be stimulated in Schenk and Hildebrandt(SH) medium. The lower the inoculum size as well as initial sugar concentration, the faster the cell growth rate. When the initial sugar concentration was kept low, the production of 10-DAB was higher. In addition, perfusion culture was carried out to increase the productivity. It was noticed that the secretion of 10-DAB into medium was increased. By using perfusion culture, continuous cell growth was possible until the end of culture and more than 34.67 g/L of cell concentration could be obtained. This is about 2.5 times higher level than that of control batch culture.

Key Words : 10-deacetylbaccatin III, *Taxus cuspidata*, perfusion culture

서 론

인류 역사와 함께 시작한 생존을 위한 식물체의 이용은 식량 자원, 향료, 감미료, 의복, 색소, 의약품으로 다양하게 영역을 확대하였으며, 인간 복지를 위한 수단으로 아직 더 개발되고, 연구되어야 할 분야이다. 그러나 고도의 산업화로 인한 환경오염과 인구의 과도한 증가로 인하여 유용산물의 공급한계에 봉착하였고, 특히 희귀 식물에서의 유용물질 생산은 생산비의 상승을 초래하였다(1). 이러한 환경 요인과 수요 과잉에 의한 공급문제를 해결하기 위한 대안으로 제시된 것이 식물세포배양을 이용한 유용 이차대사산물의 생산이다. 식물세포는 식물체에 비해 성장속도가 빠르며 지역적, 기후적 제약을 받지 않고, 무균하에서 배양되므로 병충해에 의한 손실이 없다. 또한 인위적인 환경 조절이 가능하므로 최적의 조건에서 대사조절을 통해 특정한 이차대사산물의 생산을 촉진시킬 수 있다(2). 그러나 이러한 이점에도 불구하고 식물세포배양을 통한 유용물질의 생산은 몇 가지 외에는 상업화에 이르지 못하고 있다. 이것은 식물세포배양에서의 낮은 수율, 전단응력과 기포 형성 등의 생물배양기 내에서의 배양의

어려움, 세포주의 불안정성, 느린 성장에 의한 오염, 유용물질의 액포 존재에 의한 분리, 정제의 어려움 등 때문이다(3,4). 따라서 이러한 어려움을 극복하기 위해서는 높은 수율과 안정성, 빠른 성장의 세포주의 획득, 식물세포배양에 적합한 배양기의 조건 확립, 유용물질의 배지로의 배출, 적합한 농축, 분리 정제 방법 등이 이루어져야 한다.

유방암과 난소암을 포함하여 여러 가지 종류의 암에 대한 항암효과가 보고된 taxol은 taxane diterpenoid의 한 종류로서 oxetane ring 구조의 13번 탄소에 변형된 phenylalanine ester side chain을 가진 특이한 구조로 이루어져 있다(5). 주목에는 taxol 외에 유도체인 10-deacetylbaccatin III(10-DAB), baccatin III, 10-deacetyltaxol(10-DAT), 7-epi-10-deacetyltaxol(EDAT) 등이 함유되어 있으며, 현재까지 100 가지가 넘는 taxane 관련 물질들이 알려져 있다(6). 하지만 대부분의 2차대사산물의 생산에서와 마찬가지로 taxol의 경우에도 대량생산의 문제가 여전히 남아있다. Taxol의 생산은 화학적 방법에 의한 전합성 공정, 주목 잎이나 박피에서의 직접 추출에 의한 생산, 식물세포배양에 의한 taxol과 전구체 생산과 전구체의 화학 합성에 의한 반합성 공정, 미생물에서의 생산 방법 등이 있다. 전합성 방법은 1994년 Nicolau 등(7)에 의해 발표되었으나, taxol의 화학 구조가 크고 복잡하여 30여 합성단계를 거쳐야 하므로 경제적으로 불합리적인 방법이다(8,9). 주목에서의 직접 추출은 태평양 주목의 껍질로부터 얻는 것이기 때문에 나무의 재생이 불가능한 방법이다.

†Corresponding Author : Department of Biological Engineering,
College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : 032-860-7515, Fax : 032-875-0827
E-mail : kimdi@inha.ac.kr

그 외에도 1 inch 생장에 30년이 걸리는 느린 생장, 일정 지역에서만 자생하는 군락형태에 의한 재배의 어려움, 수피의 0.01-0.02%에 해당하는 낮은 taxol 함량 등이 문제이다(10). 미생물에서의 생산은 *Taxus brevifolia*에 서식하는 곰팡이의 일종인 *Taxomyces andreanae*에서 약 50 ng/L의 생산이 보고되었으며(11), *Taxus baccata*에 서식하는 *Pestalotia bicilia*에서는 1081 ng/L의 생산이 보고되었다(12). 그러나 아직은 수율이 낮은 단계에 있으므로 주목 세포배양에 의한 taxane 생산에서 taxol을 회수하거나 10-DAB와 같은 전구체를 회수한 후 반합성을 통해 taxol을 생산하는 것이 대안이라 할 수 있다(13-15).

미생물에 비해 상대적으로 느린 식물세포의 생장과 유용물질 생산의 낮은 생산성이 식물세포배양의 문제점이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해서는 식물세포생장과 이차대사산물 생산에 영향을 크게 미치는 초기 접종농도와 에너지원으로 사용되는 당의 영향을 조사해야 한다. 세포종과 생산하려는 유용물질의 종류에 따라 생장과 생산에 적합한 초기 접종농도와 당농도가 존재하며, 이에 따른 배양방법이 적용되어야 한다. 고농도 배양의 일종인 perfusion culture는 새로운 배지의 지속적인 공급에 의해 배양기간을 연장할 수 있으며, 연속적으로 물질의 회수가 가능하여 유용물질의 회수와 배양 중 생성된 성장저해물질을 제거할 수 있다. 따라서 시간, 장비, 비용의 절감 효과가 높다(16). 식물세포에 perfusion culture를 적용한 것으로 *Anchusa officinalis*에서 35 g/L의 고농도 세포당과 3.7 g/L의 rosmarinic acid를 얻은 보고를 들 수 있다(17).

본 연구에서는 taxol의 전구체이며, 배지로 배출되는 특성이 있는 10-DAB를 생산목적 물질로 하였으며, *Taxus cuspidata* 현탁세포배양에서의 초기 접종농도와 당농도에 따른 세포생장과 10-DAB 생산 변화를 관찰하였다. 또한 세포생장과 10-DAB 생산성 향상을 위한 perfusion culture의 적용을 연구하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 배지

본 연구에 사용된 *Taxus cuspidata* 현탁세포는 아주대학교 생물공학과에서 제공받았다. 주목 현탁배양에 이용한 생장배지는 Schenk와 Hilderbrandt(SH) 기본배지에 탄소원으로 자당을 20 g/L 첨가하였으며, α -naphthaleneacetic acid(NAA) 5 mg/L, 6-benzylaminopurine (BAP) 0.2 mg/L, vitamin 농축용액을 보충하였다. pH는 가압증기멸균 전에 1 N NaOH로 5.8이 되도록 하였다. 계대배양은 2주 간격으로 수행하였고, 암소의 회전식 진탕배양기에서 120 rpm, 25°C를 유지하였다. 생산배지는 Bringi 등(18)이 개발한 생산배지를 기본배지로 하여 NAA 10 mg/L, BAP 2 mg/L, vitamin 농축용액, amino acid 혼합용액을 첨가하였다. 탄소원으로는 자당 60 g/L를 첨가한 생산배지(PMB6S)와 과당 60 g/L를 첨가한 생산배지(PMB6F)를 이용하였다. pH는 가압증기멸균 전에 5.8이 되도록 하였다.

Perfusion culture

배지 교환 실험은 100-mL Erlenmeyer flask에 20 g/L의 자당을 첨가한 생장배지 30 mL를 첨가하고 3 g FCW를 접종하였다. 배양 10 일째부터 자당 60 g/L를 첨가한 생장배지를 1 mL/day로 교환하였다. 배지만을 교환하기 위한 세포와 배지의 분리는

Miracloth(Calbiochem, San Diego, USA)를 사용하였다.

세포중량 측정

세포의 생장을 측정하기 위해 세포생체중량(fresh cell weight, FCW)과 세포건조중량(dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 실험배지에서 배양한 시료의 배양액은 Buchner 깔때기를 이용하여 Whatman No. 1 여과지로 걸러냈다. 배지와 동량의 증류수로 2-3회 세척한 후 진공펌프를 이용하여 수분을 완전히 제거하여, 화학저울로 FCW를 측정하였다. FCW 측정 후 60°C로 고정된 dry oven에서 항량이 되도록 1 일간 건조하여 DCW를 측정하였다.

10-DAB 추출

Wani 등(5)의 방법을 변형하여 각 시료에 세포와 배지를 포함한 전체 배양액과 동량의 CH_2Cl_2 와 메탄올을 첨가한 후 얼음이 든 차가운 물에서 1 시간 동안 초음파 분쇄하였다. 4°C에 방치하여 상분리가 되면, 아래의 CH_2Cl_2 층에서 10 mL를 취하여 용매를 감압증발시켰다. 용매가 완전히 증발된 후 시료를 HPLC-grade 메탄올 2 mL에 녹이고 0.45 μm filter로 불순물을 제거하였다. 배지에서의 10-DAB 추출은 각 시료의 배양액을 Buchner 깔때기를 이용하여 걸러내어 세포와 배지를 분리하였다. 배지의 부피를 메스실린더로 측정된 후 배지와 동량의 CH_2Cl_2 와 메탄올을 첨가한 후 위와 같은 방법으로 추출하였다. 필요한 경우 배지를 걸러낸 후의 세포만을 따로 추출하였다.

10-DAB 분석

10-DAB 관련 taxane 분석은 오름테크 HPLC system을 이용하였다. Phenomenex Corasil-G column을 이용하였고, 이동상의 조성은 acetonitrile:water가 40:60이 되도록 하여 isocratic 조건에서 분석하였다. 전개용매의 유속은 1.0 mL/min으로 하였고, 227 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

당 분석

자당과 과당, 포도당의 분석은 HPLC system을 이용하여 측정하였다. 영인 pump(model 910)와 Waters사의 refractometer index (RI) detector를 사용하였으며, column으로는 Waters사의 carbohydrate column(4.6×250 mm)을 이용하였다. 이동상은 acetonitrile:water를 75:25로 사용하였고, isocratic 조건에서 1.0 mL/min 유속으로 하여 분석하였다.

결과 및 고찰

생장배지와 생산배지에서의 세포생장

세포생장이 일정 수준 이상으로 이루어져야 10-DAB 생산이 증대되므로 생산에 적합한 배지를 선택하기 위한 실험을 수행하였다. 생산배지는 taxol 생산을 최적화하기 위한 것이기 때문에 taxol의 side chain을 이루는 N_6 -benzyladenine, phenylalanine sodium acetate 등의 전구체 물질이 포함되어 있다. 하지만 화학구조상 10-DAB에는 side chain이 없으므로 생장에 유리한 생장배지(SH)에서 실험을 수행하였다. Figure 1은 Bringi 등(18)의 기본배지에 자당 60 g/L를 사용한 경우(PMB6S)와 과당 60 g/L를 사용한 경우(PMB6F), 그리고 20 g/L의 자당을 첨가한 변형된

SH 배양배지에서의 *Taxus cuspidata*의 성장을 나타낸 것이다. 세포생체중량으로 3 g를 접종하였을 때, 배양배지에서는 15일에 최고 세포농도에 도달하였고, 생산배지에서는 높은 당농도에 의해 배양 후반까지도 생장이 계속되는 결과를 보였다. 15일까지 SH 배지에서의 μ 는 0.046/day, PMB6F에서는 0.028/day, PMB6S에서는 0.022/day로 SH 배지에서의 성장속도가 가장 빠름을 보였다. 이것은 Kim 등(19)이 보고한 *Taxus brevifolia* 세포생장과 비교하여 생산배지에서의 세포성장변화는 다르지만 SH 배지가 세포생장에 가장 유리하였던 것은 일치하는 결과이다. 이것은 SH 배지에서 계대배양했던 세포를 생산배지로 옮겼기 때문에 환경 적응에 따른 문제를 유발한 것이라 사료된다. Martinez와 Park(20)도 배지의 조성이 변하였을 경우 preconditioned cell에 비해 배양초기 lag phase가 길어짐을 보고하였다.

초기 접종농도와 당농도에 따른 세포 성장

식물세포 현탁배양에서 초기 접종농도는 세포 성장에 많은 영향을 미치는 인자로 알려져 있으며(21), 또한 배지내 당농도는 이차대사산물의 생산과 삼투압에 영향을 준다고 보고되었다(22).

Figure 2는 배양배지에 초기 당농도를 20 g/L와 60 g/L으로 하고 세포생체중량으로 각각 3 g과 6 g으로 접종하였을 경우의 세포생장을 나타낸 것이다. 자당 20 g/L에 3 g의 FCW를 접종한 경우(20/3)는 최고 세포농도에 이르는데 15일이 걸렸으며 이것은 Figure 1의 SH 배지에서의 유사한 결과이다. 최고 세포농도는 13.02 g DCW/L, μ 는 0.060/day로 다른 경우보다 큰 값이었다. 자당 20 g/L에 FCW 6 g을 접종한 경우(20/6)에는 최고 세포농도가 12일째 15.12 g DCW/L, μ 는 0.050/day로 나타났다. 자당 60 g/L에 FCW 3 g을 접종한 경우(60/3)는 배양 종료시 17.55 g DCW/L($\mu=0.041/day$)였지만 생장이 지속되었으리라 추측되며, 이것은 생산배지에서의 성장곡선과 유사한 양상이었다. 자당 60 g/L에 FCW 6 g으로 접종한 경우(60/6)는 21일째 28.43 g DCW/L의 최고 세포농도를 얻었으며, μ 는 0.048/day였다. 급격한 성장 속도가 두 번 관찰되었는데, 이것은 배양 초기의 고농도의 당을 생장에 사용하고 여분의 당을 액포에 저장하였다가 배지내의 당이 고갈된 후 세포내 당을 이용하여 다시 생장을 증대시킨 것이라 사료된다(23). Zhang 등(24)은 배지의 초기 고농도의 당을 세포내에 가용성 당과 불용성 전분으로 저장하였다가 배양 후반에 먼저 가용성 당을 사용한 후 불용성 전분을 소비한다고 설명하였다. 또한, 자당 20 g/L에서의 비성장속도가 60 g/L에서 보다 빠름을 보고하였다. 낮은 당농도에서 초기 접종농도가 낮으면 세포생장이 빠른 반면 배양 후반의 당고갈로 고농도의 당의 경우보다 빠른 사멸기에 이름을 알 수 있었다. 이 결과는 다수의 보고들과 일치하는 것으로 Mantell 등(25)은 *Nicotiana tabacum* 세포의 현탁배양시 더 높은 당농도보다 20 g/L의 당농도에서 빠른 초기 세포성장속도를 보였으며, *Daucus carota* 세포에서도 높은 당농도보다 낮은 경우 더 빠른 성장속도를 보였다(26). 그러나 고농도의 당에서는 배지내의 잔당과 세포내 축적된 당에 의해 지속적인 생장이 이루어진다(20,24,27,28).

Figure 3은 FCW/DCW ratio(F/D ratio)를 나타낸 것이다. F/D ratio는 간접적으로 세포의 상태를 보여주는 척도로서 세포내의 수분함량과 세포의 크기를 나타낸다. 회분식 배양에서 초기 당농도가 높을 때 F/D ratio는 낮은 값을 보이나 배양 후반에 당이 고갈되면 급격한 증가가 나타난다(28,29). 이것은 탄소원으로 사

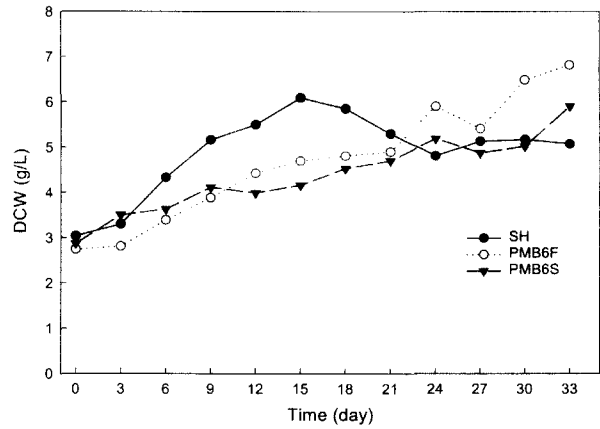


Figure 1. Time course changes of *Taxus cuspidata* cell growth in three different media.

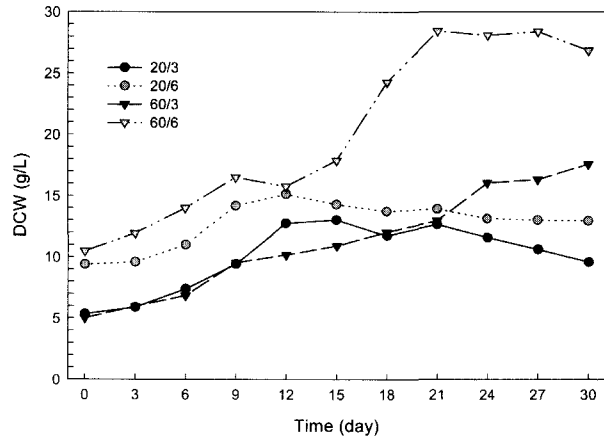


Figure 2. Time course changes of cell growth in *Taxus cuspidata* suspension culture with two different inoculum sizes at 20 and 60 g/L sucrose.

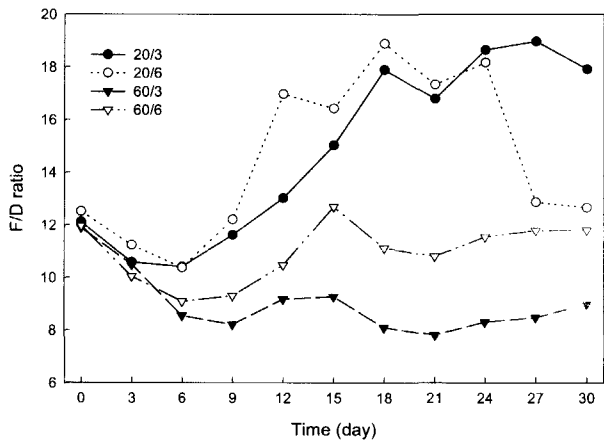


Figure 3. Profiles of FCW/DCW ratio in *Taxus cuspidata* suspension culture with two different inoculum sizes at 20 and 60 g/L sucrose.

용된 당의 농도변화로 배지내의 삼투압이 변화함으로써 세포내의 수분함량이 변화하기 때문이다. 배양 초기 6일까지는 F/D

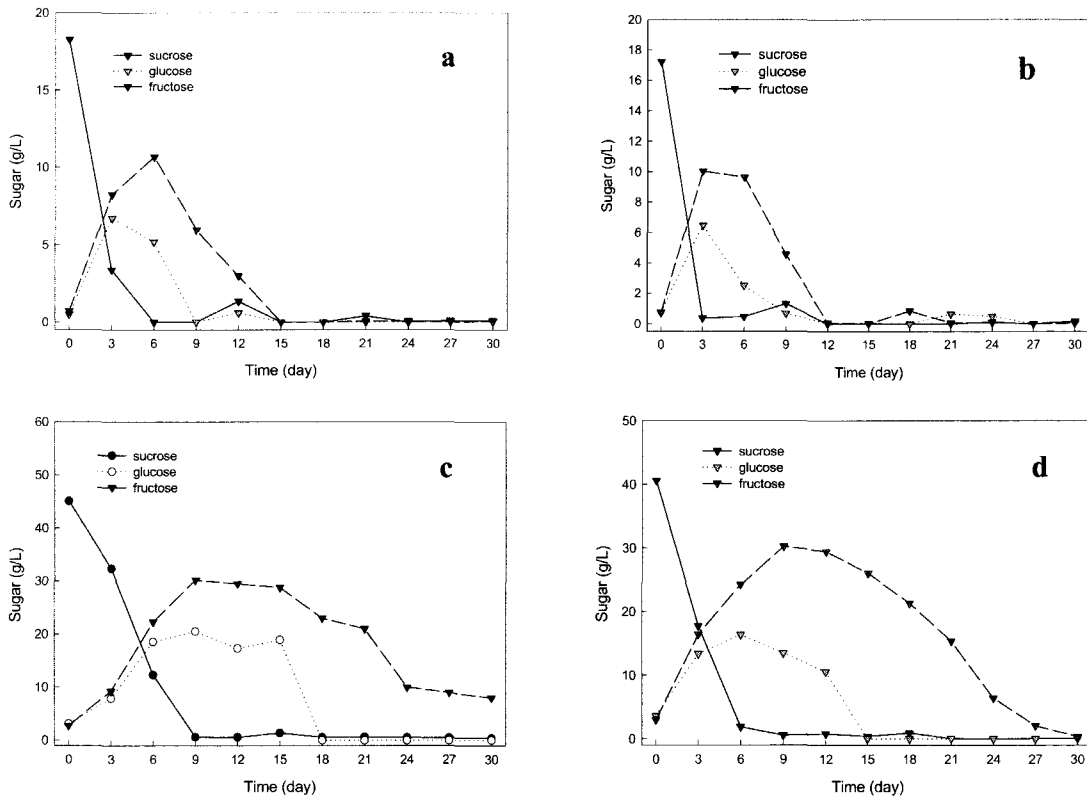


Figure 4. Time course changes of sugar consumption in *Taxus cuspidata* cell culture (a: Inoculum size 3 g FCW, Sucrose 20 g/L; b: Inoculum size 6 g FCW, Sucrose 20 g/L; c: Inoculum size 6 g FCW, Sucrose 60 g/L; d: Inoculum size 6 g FCW, Sucrose 60 g/L).

ratio가 감소하지만 그 후에는 세포 상태에 따라 다른 경향을 보였다. 20/3와 20/6의 경우 세포 생장이 급격히 이루어지면서 배지내 당을 소비하기 때문에 F/D ratio가 급증하였다. *Sanguinaria canadensis* 세포와 *Dioscorea deltoidea* 세포의 회분식 배양에서도 유사한 결과가 있었다(30,31). 이러한 현상은 일반적으로 stationary phase에서 관찰된다(29). 배양 24일 이후의 20/6에서의 급격한 F/D ratio 감소는 당고갈로 인한 세포 사멸에 의한 과쇄물이 증가하였기 때문이라 사료된다. 60/3과 60/6의 경우는 일정한 F/D ratio를 유지하고 있는데 이것은 고농도 당의 첨가에 의해 배양 후반까지도 배지내 당이 남았기 때문이다. 특히 60/3인 경우 낮은 접종농도로 고농도 당에 대한 적응이 늦고, 성장속도도 낮았기 때문에 배지내 잔당의 존재하여 낮은 F/D ratio를 나타냈을 것이다. 세포배양에서 초기 고농도의 당에 의해 삼투압이 증가하게 되고, 세포 크기는 줄어드는 것이 알려져 있다(32-34).

Figure 4는 각 조건에서의 첨가한 당의 농도 변화를 나타낸 것이다. 첨가한 당은 배지에서 3-6일 사이에 포도당과 과당으로 빠르게 가수분해된다. 이것은 배지와 세포벽에 존재하는 invertase에 의한 것이다(20,27). 먼저 포도당이 세포생장에 이용된 후 배양 후반에 과당이 쓰임을 알 수 있었다. 이런 경향은 *Coleus blumei*(20)와 *Catharanthus roseus*(27)에서도 관찰된 것이다. 하지만 포도당이나 과당의 세포 이용도는 배양되는 세포의 생리적 상태와 배지내 삼투압에 영향을 받는 것이다(24). 20/3은 9일경에 포도당이 고갈되고, 15일경에는 당성분이 모두 고갈되었다. 이때가 세포생장(Figure 2)에서 최고의 세포량에 해당한다.

20/6에서는 12일경에 모든 당이 고갈되며 마찬가지로 이 때쯤에 최고세포량을 얻었다. 60/3에서는 18일경에 포도당이 모두 쓰이며, 과당은 배양 후반까지도 남아있었다. 60/6에서는 60/3보다 약간 빠른 15일경에 포도당이 모두 쓰이며, 배양 말기까지 약간의 과당이 검출되었다.

초기 당농도와 접종 농도에 따른 10-DAB 생산

식물세포배양에서 초기접종농도는 세포의 성장 뿐만 아니라 이차대사산물의 생산 증대에도 관여한다. 접종농도의 증가에 따라 세포생장의 증진이 일어나며, 이차대사산물의 형성에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다(35). 또한 Su와 Lei(36)는 초기 접종농도를 다르게 한 *Anchusa officinalis* 배양에서 rosmarinic acid 생산시 초기 접종농도에 따라 생산성이 변한다고 보고하였다.

Figure 5는 초기 접종농도와 당농도를 다르게 하였을 때의 10-DAB 생산량을 나타낸 것이다. 20/3의 경우, 두 번의 최대점을 보였는데 각각 12일과 21일이었다. 12일째는 최고의 세포중량을 얻은 시기와 일치되는 것이었다. 20/6의 경우에서도 12일째 가장 높은 10-DAB의 생산이 있었으며, 60/3은 15일째에 최대농도를 보였다. 60/6의 경우는 12일과 27일에 10-DAB 농도가 높았으며 최고의 10-DAB 생산량은 27일로 21-27일 사이에 최고의 세포건조중량을 얻은 것과 관련된 것임을 알 수 있었다. Moreno 등(37)은 *Catharanthus roseus* 현탁배양에서 저농도로 접종할 경우 고농도에 비해 6배 이상의 ajmalicine이 생산되었다고 보고하였고, Zhong 등(38)은 *Perilla frutescens*의 회분배양에서 고농도 당에서 초기 접종농도가 높을 때 24 배의 productivity

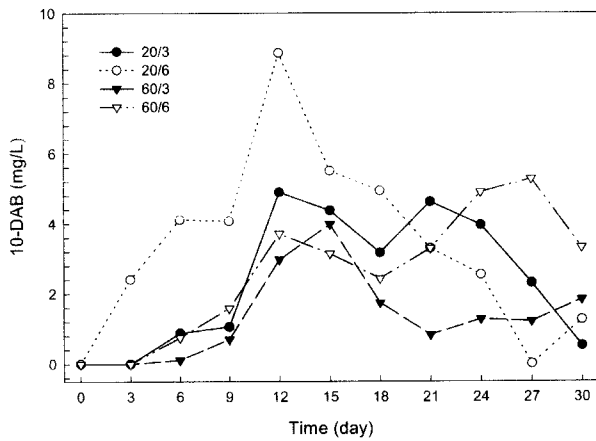


Figure 5. Profiles of 10-DAB production in *Taxus cuspidata* suspension cell culture with two different inoculum sizes at 20 and 60 g/L sucrose.

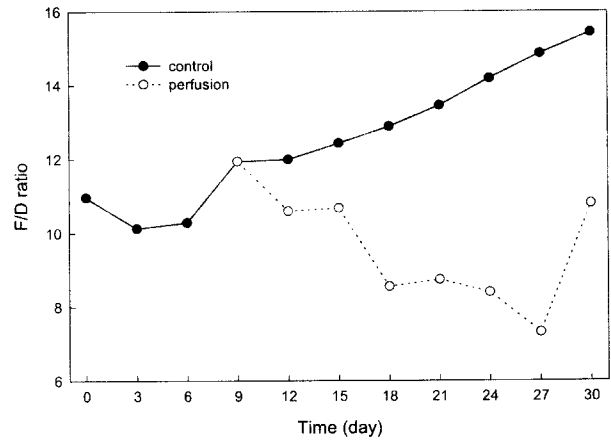


Figure 7. F/D ratio of *Taxus cuspidata* cells in perfusion culture.

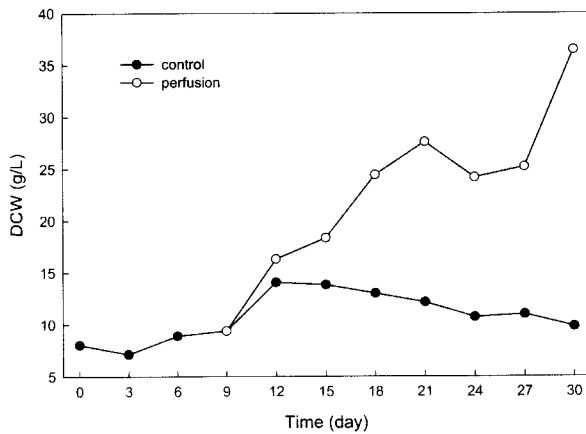


Figure 6. Cell growth of *Taxus cuspidata* in perfusion culture.

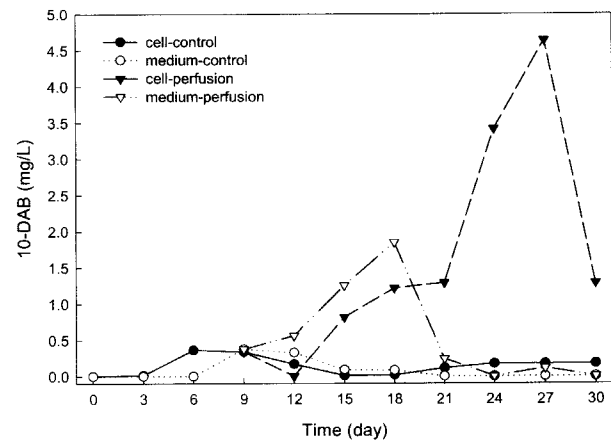


Figure 8. Effect of perfusion on 10-DAB production in *Taxus cuspidata* suspension culture.

향상을 보고하였다. 따라서 세포마다 다른 경향을 보임을 알 수 있었는데 *Taxus cuspidata*에서의 10-DAB의 생산은 같은 초기 당농도에서 비교하여 초기 접종농도가 높을수록 10-DAB의 생산이 증대되었다. 고농도 당에서의 생산증대의 결과를 보인 *Vitis vinifera*의 현탁배양에서의 anthocyanin 생산(33)과 *Daucus carota*에서의 carotenoid 생산과는 다르게 낮은 당농도에서 10-DAB의 생산이 증대되었다. 이것은 낮은 당농도의 영향보다는 우수한 세포생장에 의한 이차대사산물의 생산증대 결과라 사료된다. 각 경우의 최고 10-DAB 생산시 단위 건조세포중량당 10-DAB 생산량은 0.038, 0.059, 0.037, 0.019%이었다. 20/6의 배양 12일째에서 8.86 mg/L로 가장 높은 10-DAB 생산량을 보였는데 가장 빠른 배지내 당고갈과 높은 세포건조중량으로 미루어 10-DAB의 생산은 세포의 성장과 관련이 있음을 알 수 있었다.

Perfusion culture에서의 세포생장과 10-DAB 생산 변화

우수한 세포생장에서 10-DAB의 생산이 증대되었으므로 높은 농도의 세포생장이 가능한 perfusion culture를 도입하였다. Seki와 Furusaki(39)는 perfusion culture를 수행하여 상당량의 taxol이 배지로 배출되었음을 보고하였다.

Figure 6은 초기 접종농도 3 g/L FCW를 접종하고, 10일째 perfusion을 시작했을 때의 세포생장을 나타낸 것이다. 초기 당

농도는 20 g/L였고, 배양 10일째 이후 자당 60 g/L의 생장배지를 1 mL/day로 첨가하였다. Perfusion rate이 클 경우 세포생장이 저해되므로 낮게 설정하였다. 초기 접종농도와 당농도의 결정은 앞실험에서의 초기 세포생장의 경향 때문이었으며, 배지 교환에 60 g/L의 고농도 당이 첨가된 배지를 사용한 것은 배양 후반의 세포 크기를 줄인 고농도 배양을 위한 것이었다. Su와 Humphrey (40)도 *Anchusa officinalis*의 perfusion culture에서 세포생장에 영향을 주지 않을 정도의 당과 무기염류를 첨가해 삼투압을 높이고, 그에 따른 세포 크기 감소에 의해 세포생장 위한 공간을 확보하여 세포농도와 생산성을 증대시켰다. 본 연구에서도 대조구에서는 12일째 최고 세포생장을 보인 후 사멸기에 접어들지만, perfusion culture에서는 계속적으로 생장이 이루어지고 있음을 알 수 있었다. 이것은 배지교환에 의해 생장에 필요한 영양분이 계속 공급되고, 성장 저해 물질을 함유한 spent medium의 제거에 의한 것이라 할 수 있다(41). Figure 7은 perfusion culture 동안의 *Taxus cuspidata*의 F/D ratio를 관찰한 것이다. 60 g/L의 자당이 첨가된 배지로 spent medium을 교환하였기 때문에 삼투압에 영향을 주어 배양 후반의 F/D ratio가 작아졌다. 대조구의 최고 생장이 14.05 g DCW/L 일 때, perfusion culture에서는 34.67 g DCW/L로 2.5 배의 세포생장 증가가 관찰되었다. Su 등(17)은

perfusion culture를 도입하여 *Anchusa officinalis* 세포농도를 35 g DCW/L까지 증가시켰으며, 이 때 rosmarinic acid의 생산도 증가 되었다고 보고하였다. Figure 8은 perfusion culture에서의 10-DAB 생산과 배지로의 배출을 조사한 것이다. 대조구에서 세포와 배지의 10-DAB 총생산은 9일째가 가장 높았으며, 배양 초기에는 세포 내에 축적되어 있다가 9일경부터 배지로 배출됨을 알 수 있었다. 계대배양 시기인 14일 이후의 배양 후반에는 10-DAB의 생산이 세포에 축적될 뿐 배지로 배출되지 않았다. Perfusion culture에서는 perfusion이 시작된 후 10일 동안은 세포에 축적된 10-DAB 생산량보다 배지로 유출된 양이 많았으며, 배양 21일 이후에는 세포 내에 대부분 축적되고 배지로 나오지 않았다. 배지로의 10-DAB 방출은 고농도 당의 첨가에 따른 삼투압 변화 때문에 저장되었던 수분과 함께 나온 것이며, 그 후 환경에 적응하여 생산된 10-DAB를 세포내에 저장한 것이라 사료된다. 배양 마지막의 10-DAB의 감소는 F/D ratio의 증가와도 관계가 있는데, 이것은 세포생장이 최대로 이루어져 flask 내의 공간이 한계에 이르렀기 때문이라 추측된다.

요 약

본 연구에서는 식물 유래의 항암제인 taxol을 생산하는 주 목세포의 현탁배양을 통하여 taxol 반합성의 전구체인 10-deacetylbaecatin III(10-DAB)의 생산을 증대시키고자 하였다. 이 차대사산물의 생산이 세포생장과 관련이 있으므로 세포생장이 우수한 배지를 선택하기 위한 실험을 수행하였고, SH 배지에서 가장 우수한 세포생장이 관찰되었다. 또한 선택된 SH 배지에서 우수한 세포생장과 10-DAB 생산을 얻기 위해 초기 접종농도와 당농도의 변화를 관찰하였다. 초기 접종농도와 당농도가 낮을수록 세포생장이 빠르며, 낮은 초기 당농도와 초기 접종농도 6 g/L FCW 이었을 때 10-DAB의 생산이 우수하였다. 생산성을 높이기 위한 고농도 세포생장과 배지로의 10-DAB 분비를 목적으로 perfusion culture를 도입하였다. 고농도 당을 첨가한 배지로 perfusion을 수행한 결과 배양 후반까지 세포생장이 가능하였고, FCW/DCW ratio가 감소되어 대조구의 2.5배인 34.67 g/L의 높은 세포농도를 얻을 수 있었다. 10-DAB의 생산은 perfusion 시작 후 10일 동안은 배지로 배출된 양이 세포내보다 높았다.

감 사

본 연구는 1999년도 인하대학교 교수연구진흥비 지원에 의해 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Payne, G. F., V. Bringi, C. L. Prince, and M. L. Shuler (1991), Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems, p3, Oxford University Press, New York.
2. Taticek, R. A., M. Y. Murray, and R. L. Legge (1991), The Scale-up of Plant Cell Culture: Engineering Consideration, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **24**, 139-158.
3. Brodelius, P. M. (1985), The Potential Role of Immobilization in Plant Cell Biotechnology, *Trends Biotechnol.* **3**, 330-337.
4. Su, W. W., E. C. Asali, and A. E. Humphrey (1994), *Anchusa officinalis*: Production of Rosmarinic Acid in Perfusion Cell Culture, *Biotechnol. Agri. Forest.* **26**, 1-19.
5. Wani, M. C., H. I. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. Mcphail (1971), Enhanced Production of Taxol in Suspension Cultures of *Taxus chinensis* by Controlling Inoculum Size, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325-2327.
6. Richheimer, S. L., D. M. Tinnermeier, and D. W. Timmons (1992), High-performance of Liquid Chromatographic Assay of Taxol, *Anal. Chem.* **64**(20), 2323.
7. Nicolaou, K. C., Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantemet, R. K. Guy, C. F. Clalborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan, and E. J. Sorensen (1994), Total Synthesis of Taxol, *Nature* **367**, 630-634.
8. Borman, S. (1994), Anticipated New Synthesis of Taxol May Generate Beneficial Analogs, *Chem. Eng. News* **72**(8), 34-35.
9. Vaněk, T., D. Veselá, J. Malá, R. Podlipná, D. Šaman, and J. Kohoutová (1996), Production of Taxanes by *Taxus baccata* Plant Cells, *Biotechnol. Lett.* **18**(5), 501-504.
10. Borman, S. (1991), Scientists Mobilize to Increase Supply of Anticancer Drug Taxol, *Chem. Eng. News* **69**(35), 11.
11. Stierle, A., G. Strobel, and D. Stierle (1993), Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew, *Science* **260**, 214-216.
12. Strobel, G. A., W. M. Hess, E. Ford, R. S. Sidhu, and X. Yang (1996), Taxol from Fungal Endophytes and the Issue of Biodiversity, *J. Ind. Microbiol.* **17**, 417-423.
13. Denis, J. N., A. E. Greene, D. Guenard, F. Gueritte-Voegelein, L. Mangatae, and P. A. Potier (1988), A Highly Efficient Practical Approach to Natural Taxol, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5917-5919.
14. Ketchum, R. E. B. and D. M. Gibson (1996), Paclitaxel Production in Suspension Cell Cultures of *Taxus*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **46**, 9-16.
15. Seki, M., C. Ohzora, M. Takeda, and S. Furusaki (1997), Taxol(Paclitaxel) Production Using Free and Immobilized Cells of *Taxus cuspidata*, *Biotechnol. Bioeng.* **53**, 214-219.
16. Velez, D., L. Miller, and J. D. Macmillan (1989), Use of Tangential Flow Filtration in Perfusion Propagation of Hybridoma Cells for Production of Monoclonal Antibodies, *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 938-940.
17. Su, W. W., F. Lei, and N. P. Kao (1995), High Density Cultivation of *Anchusa officinalis* in a Stirred-tank Bioreactor with *in situ* Filtration, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 293-299.
18. Bringi, V., P. G. Kadkade, C. L. Price, B. F. Schubmehl, E. J. Kane, and B. Roach (1995), Enhanced Production of Taxol and Taxanes by Cell Cultures of *Taxus* Species, U.S. Patent 5,407,816.
19. Kim, J. H., J. H. Yun, Y. S. Hwang, S. Y. Byun, and D. I. Kim (1995), Production of Taxol and Related Taxanes in *Taxus brevifolia* Cell Cultures: Effect of Sugar, *Biotechnol. Lett.* **17**(1), 101-106.
20. Martinez, B. C. and C. H. Park (1993), Characteristics of Batch Suspension Cultures of Perconditioned *Coleus blumei* Cells: Sucrose Effect, *Biotechnol. Prog.* **9**, 97-100.
21. Van Gulik, W. M., A. M. Nuula, K. L. Vinke, H. J. G. Ten Hoopen, and J. J. Heijnen (1994), Effects of Carbon Dioxide, Air Flow Rate, and Inoculation Density on the Batch Growth of *Catharanthus roseus* Cell Suspensions in Stirred Fermentors, *Biotechnol. Prog.* **10**, 335-339.
22. Rajendran, L., G. A. Ravishankar, L. V. Venkataraman, and K. R. Prathiba (1992), Anthocyanin Production in Callus Cultures of *Daucus carota* as Influenced by Nutrient Stress

- and Osmoticum, *Biotechnol. Lett.* **14**(8), 707-712.
23. Berlin, J. (1988), Formation of Secondary Metabolites in Cultured Plant Cells and Its Impact on Pharmacy, *Biotechnol. Agri. Forest.* **4**, 37-56.
 24. Zhang, Y.-H., J.-J. Zhong, and J.-T. Yu (1996), Enhancement of Ginseng Saponin Production in Suspension Cultures of *Panax notoginseng*: Manipulation of Medium Sucrose, *J. Biotechnol.* **51**, 49-56.
 25. Mantell, S. H., D. W. Pearson, L. P. Hazell, and H. Smith (1983), The Effect of Initial Phosphate and Sucrose Levels on Nicotine Accumulation in Batch Suspension Cultures of *Nicotiana tabacum* L., *Plant Cell Rep.* **2**, 73-77.
 26. Yun, J. W., J. H. Kim, and Y. J. Yoo (1990), Optimizations of Carotenoid Biosynthesis by Controlling Sucrose Concentration, *Biotechnol. Lett.* **12**(12), 905-910.
 27. Merillon, J. M., M. Rideau, and J. C. Chenieux (1984), Influence of Sucrose on Levels of Ajmalicine, Serpentine, and Tryptamine in *Catharanthus roseus* Cells in vitro, *Planta Med.* **50**, 493-591.
 28. Battat, E., J. S. Rokem, and I. Goldberg (1989), Growth of *Dioscorea deltoidea* at High Sugar Concentrations, *Plant Cell Rep.* **7**, 652-654.
 29. Kim, D. I. (1989), Batch Time Course Behaviors of Growth and Berberine Production in Plant Cell Suspension Cultures of *Thalictrum rugosum*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **4**(3), 271-275.
 30. Rho, D., N. Chauret, N., Laberge, and J. Archambault (1992), Growth Characteristics of *Sanguinaria canadensis* L. Cell Suspension Cultures and Immobilized Cultures for Production of Benzophenanthridine Alkaloids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 611-617.
 31. Drapeau, D., H. W. Blanch, and C. R. Wilke (1986), Growth Kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in Batch Culture, *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 1555-1563.
 32. Cormier, F., H. A. Crevier, and C. B. Do (1990), Effects of Sucrose Concentration on the Accumulation of Anthocyanins in Grape (*Vitis vinifera*) Cell Suspension, *Can. J. Bot.* **68**, 1822-1825.
 33. Do, C. B. and F. Cormier (1991), Effects of Low Nitrate and High Sugar Concentrations on Anthocyanin Content and Composition of Grape (*Vitis vinifera* L.), *Plant Cell Rep.* **9**, 500-504.
 34. Panda, A. K., S. Mishra, and V. S. Bisaria (1992), Alkaloid Production by Plant Cell Suspension of *Holarrhena antidysenterica*: I. Effect of Major Nutrients, *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 1043-1051.
 35. Endress, E. (1994), *Plant Cell Biotechnology*, p188, Springer-Verlag, Berlin.
 36. Su, W. W. and F. Lei (1993), Rosmarinic Acid Production in Perfused *Anchusa officinalis* Culture: Effects of Inoculum Size, *Biotechnol. Lett.* **15**(10), 1035-1038.
 37. Moreno, P. R. H., J. E. Schlatmann, R. V. D. Heijden, W. M. V. Gulik, H. J. G. T. Hoopen, R. Verpoorte, and J. J. Heijnen (1993), Induction of Ajmalicine Formation and Related Enzyme Activities in *Catharanthus roseus* Cells: Effect of Inoculum Density, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 42-47.
 38. Zhong, J. J. and T. Yoshida (1995), High-density Cultivation of *Perilla frutescens* Cell Suspensions for Anthocyanin Production: Effects of Sucrose Concentration and Inoculumsize, *Enzyme Microb. Technol.* **17**(12), 1073-1079.
 39. Seki, M. and S. Furusaki (1996), An Immobilized Cell System for Taxol Production, *Chemtech* **26**(3), 41-45.
 40. Su, W. W. and A. E. Humphrey (1990), Production of Rosmarinic Acid in High Density Perfusion Cultures of *Anchusa officinalis* Using a High Sugar Medium, *Biotechnol. Lett.* **12**(11), 793-798.
 41. Su, W. W. and A. E. Humphrey (1991), Production of Rosmarinic Acid from Perfusion Cultures of *Anchusa officinalis* in Membrane-aerated Bioreactor, *Biotechnol. Lett.* **13**(12), 889-892.