

희수(*Camptotheca acuminata*) 현탁세포배양에서 복합 Elicitor에 의한 항암제 Camptothecin 생산 촉진

최 훈·*변 상 요
아주대학교 공과대학 화학·생물공학부
(접수 : 2000. 6. 19., 게재승인 : 2000. 8. 20.)

Enhanced Production of Anticancer Agent Camptothecin by Double Elicitors in Suspension cultures of *Camptotheca acuminata*

Hoon Choi and Sang Yo Byun*

School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Kyunggi 442-749, Korea
(Received : 2000. 6. 19., Accepted : 2000. 8. 20.)

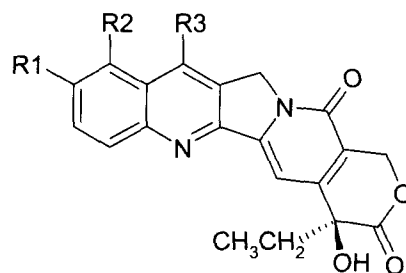
Cell cultures of *Camptotheca acuminata*, which is known to produce the anticancer indole alkaloid camptothecin and its derivatives, were made to enhance the productivity of camptothecin. In suspension cultures, the maximum cell growth rate in exponential growth phase was 0.269day^{-1} which was correlated to 2.58 days of cell doubling time. The production of camptothecin was non-growth associated. The camptothecin production was the highest at 11th day from inoculation and then it decreased. Various elicitors were applied to enhance the production of camptothecin. Both of jasmonic acid and cellulase increased the production of camptothecin. The optimal dosing time of elicitor was the beginning of the cultures. The combination of two elicitors was more effective to produce camptothecin than single applications. $20.42 \times 10^{-3}\text{mg/l}$ of camptothecin was obtained with combined application of two elicitors in two days.

Key Words : *Camptotheca acuminata*, camptothecin, jasmonic acid, cellulase

서 론

식물세포 및 조직배양은 많은 항암제의 생산을 위한 방법으로 이용되어 왔다. 희수(희수)라고 불리는 *Camptotheca acuminata* Dence(Nyssaceae)는 주로 중국에서 발견되는 나무로 줄기와 수피에는 여러 종류의 alkaloid가 있는 것으로 알려져 있다. 특히 강한 항암효과를 나타내는 이차대사산물인 camptothecin(CPT)(Figure 1)이 함유되어 있다(1). *C. acuminata*는 나사나무속에 속하며 비교적 온화한 중국 남쪽지방에서 자생하는 낙엽고목으로 높이가 30 m에 달하며 잎은 타원장란형 또는 장타원형이다. 중국에서는 주로 암치료를 위한 한약재로 사용되는데 희수의 뿌리, 줄기, 잎, 과실의 ethyl alcohol 추출액은 각종 암세포에 대해 항암작용을 나타내며, 황색포도구균, 녹농균에 대한 항균작용도 있다(2).

Cytotoxic한 quinoline계 alkaloid인 CPT는 1966년 Wall과 동



Compound	Substituent group		
	R1	R2	R3
Camptothecin	H	H	H
10-hydroxy-camptothecin	OH	H	H
Camptothecin-11		H	CH2CH3
9-amino-camptothecin	H	NH2	H
Topotecan	OH	CH2N(CH3)2	H

Figure 1. Chemical structures of camptothecin and its derivatives

료연구원에 의해 *C. acuminata* Dence 줄기와 껍질에서 처음으로 추출에 성공되었지만, 그 이후 severe toxic effects로 인해

*Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea

Tel : +82-331-219-2451, Fax : +82-331-214-8918

E-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

실험이 중단되었다. 그후 1990년대부터 이러한 부작용이 없으면서 강력한 항암작용을 하는 CPT와 유도체를 합성하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 예로, 1989년 Research Triangle Institute(U.S.A.)에서 개발한 9-aminocamptothecin을 인간의 암세포조직을 이식한 50마리의 쥐에 투여한 결과 거의 모든 쥐의 종양이 완화되고 부작용도 일어나지 않았다. Topotecan은 10-hydroxycamptothecin의 analogue로써 SmithKline Beecham Pharmaceuticals에서 발견되었으며 FDA로부터 난소암의 치료제로 승인받았다. 또한 다른 유도체인 CPT-11(Irinotecan)은 일본에서 난소암 치료제로 사용되고 있다. 임상실험을 통해 topotecan은 난소암을 포함한 다양한 암에 대해 activity를 보였으며 Phase III 단계에서는 기존의 치료를 통해 회복되지 않은 환자들 중 10~15%가 치료가 가능하였다. 한 연구에서는 taxol이 12%의 완치율을 나타내는 반면 topotecan은 20%의 완치율을 나타내는 것으로 보고되었다(3-5).

CPT의 antitumor 작용 mechanism은 기존의 여러 항암제의 작용과는 달리 DNA 복제시 DNA를 감고 푸는 작용을 하는 DNA topoisomerase I의 작용을 방해하여 DNA가 풀려지는 것을 방해함으로써 DNA와 RNA 합성의 강력한 억제제로 작용하기 때문에 결국은 단백질 합성이 방해가 된다(6). 이 mechanism은 triple complex의 안정화되는 정도에 따라 항암 활성이 좌우되며, 특히 lactone ring(E ring)이 여기에 관여한다. 암세포는 정상적인 세포에 비해 성장과 복제가 훨씬 빠르기 때문에 결과적으로 topoisomerase가 억제되면 성장을 하지 못하게 된다. 하지만 CPT의 모든 세포에 대한 독성 때문에 이를 극복하고자 구조-활성간의 유도체 연구가 활발히 진행되었다. 그러한 노력의 일환으로 irinotecan과 topotecan이 94년부터 난치성 폐암, 난소암 등의 영역 등에 확보하기 위해 임상실험을 진행하였고, 그 외에도 Glaxo-Wallcome, Daiichi 등의 기업에서 개발하고 있는 약 10개의 유도체들이 임상시험을 수행하고 있고 부작용 극복을 위한 노력을 하고 있다. 그리고 CPT 유도체는 간단한 반합성으로 CPT에서 쉽게 만들어질 수 있기 때문에 결국 유망한 암 치료제로 주목받게 될 것이다. 그러나 CPT가 추출되는 식물이 국내에서 자생하지 않고, 중국 본토에서 발견되어지기 때문에 결국 한정되는 식물에서의 직접 추출을 통한 CPT 물질 공급의 한계성은 막대한 암 치료제 시장에 비추어 볼 때 CPT 물질 대체 생산 기술 개발에 모든 연구 초점이 모일 것으로 예상된다.

본 연구에서는 이러한 식물에서의 직접 추출 방법의 한계를 극복하고자 *C. acuminata* 현탁세포배양을 하였고, CPT의 생산에 있어서 복합 elicitor를 적용하여 그 생산성을 증진하고자 하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배지 조성

본 연구에 사용된 세포주는 1995년 천리포 수목원에서 받은 씨앗을 아주대학교 연구실내에서 화분에 직접 심어 재배하여 자란 식물체의 잎과 줄기로부터 callus를 유도하여 25°C, 암조건에서 계대배양 중이다. 사용된 배지 중, 성장조절제로는 kinetin과 2,4-D를 이용하였고, 탄소원으로 4%의 sucrose를 첨가시켰으며, 배양배지로는 SH 배지와 MS 배지를 혼합한

hybrid 배지를 사용하였다. 배지의 pH는 1N KOH와 1N HCl을 이용하여 5.8로 적정하였고, 현탁배양은 80 ml 배양배지가 든 250 ml 삼각플라스크와 125 ml 배양배지가 든 500 ml 삼각플라스크에서 7~10일 간격으로 세포와 배양배지의 비율을 1:3 정도로 하여 계대배양하였다.

시 약

CPT 표준물질과 배지 제조에 사용된 시약 및 식물의 생장에 이용되는 식물호르몬, 탄소원으로 이용된 sucrose 등은 Sigma Chemical Co.(ST. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하였다. 사용된 elicitor로는 jasmonic acid, pectinase, 그리고 cellulase를 사용하였다. 이차대사산물의 분석에 이용한 전개용매인 H₂O, acetonitrile, chloroform 및 methanol은 Fisher Scientific Co.(Rochester, NY, U.S.A.)의 HPLC grade 제품을 이용하였으며 용매에 같이 투여되는 ion-pairing agent 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)와 Aldrich Chemical Co., Inc.(Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.)에서 구입하였다. 기타 모든 시약도 특급이상의 시약을 사용하였다.

세포량 측정

세포량 측정은 배양된 세포의 fresh cell weight(FCW)와 dry cell weight(DCW)를 측정하여 세포 성장을 알아보았다. FCW는 배양 세포를 진공펌프를 이용하여 Whatman No.4 여과지로 여과하여 수분을 제거한 후 배지와 세포를 분리시켜 g/l 단위로 측정하였다.

추출 및 분석방법

CPT 추출은 fresh cell에 methanol을 가하고 초음파 파쇄하여 추출을 한 뒤, H₂O와 chloroform을 1:1(v/v)로 partitioning하여 chloroform 층을 따로 취한 뒤 진공 감압하여 증발시킨다. 여기에 다시 methanol로 추출을 하여 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC 분석하였다.

CPT 분석은 HPLC system을 이용하였는데 mobile phase로는 0.075M ammonium acetate buffer(ion pairing agent)로 1mM tetrabutylammonium phosphate와 acetonitrile의 적절한 조합으로 이루어지는데 buffer:acetonitrile의 비율이 처음 15분동안 78:22(v/v)의 일정비율로 유지하다가 15분에서 20분까지 78:22에서 50:50으로 linear gradient로 바꾸고 다시 20분에서 30분까지 50:50의 일정비율로 만들어 주었다. 사용된 컬럼은 C-18 column(vydac reversed phase)이며, 유속은 1.2 ml/min으로 하였다. Fluorescence detector의 검색 파장은 350 nm(ext)와 450 nm를 이용하였다.

결과 및 고찰

C. acuminata 현탁세포배양에서의 basic kinetics

현탁 배양 세포의 시간에 따른 세포 성장과 이차대사산물인 camptothecin의 생성을 알아보기 위하여 125 ml 삼각플라스크에서 2,4-D 0.5 mg/l 와 kinetin 0.5 mg/l 그리고 탄소원으로 sucrose 4%가 첨가된 hybrid 배지를 50 ml 넣고 여기에 희수세포를 5 g FCW씩 접종하여 25°C, 암조건에서 120 rpm으로 배양하면서 시간별로 세포생장과 이차대사산물의 생

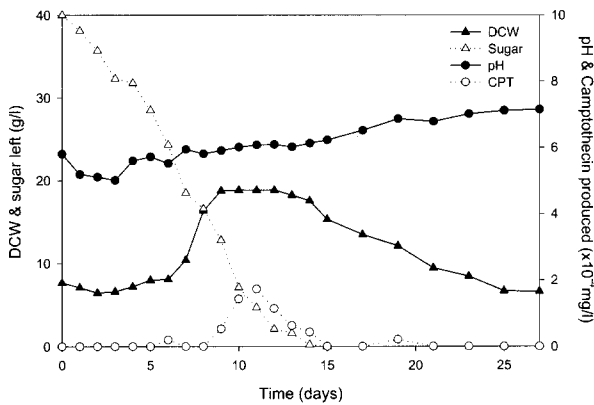
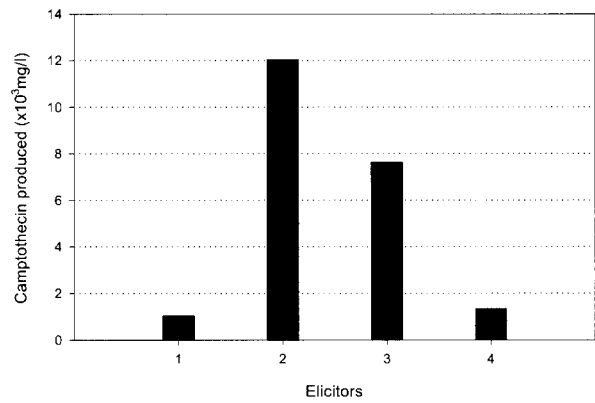


Figure 2. Time course changes of cell growth, camptothecin production, pH, and sugar consumption in suspension cultures of *C. acuminata*

성량을 측정하였다. Figure 2에서 알 수 있듯이, lag phase가 다른 세포주에 비해 약간 긴 편이며, 본격적인 세포생장은 6 일째부터 시작되고, exponential phase 말기는 약 11일째 나타나며, 이때 DCW는 최고값인 18.85 g/l 을 나타내었다. 그 후 3~4일 정도의 stationary phase 후에 DCW는 cell lysis에 의해서 계속적으로 감소하게 된다. Exponential growth phase에서의 비성장속도(μ)는 0.269day^{-1} 이며, 세포의 배가시간(t_d)는 2.58일이었다. 회수세포의 성장 형태를 다른 세포주, *Eschscholtzia californica*와 *Taxus baccata* 등과 비교하면, 이들은 lag phase가 2일 이하로 회수세포가 다소 긴 편인데 이는 주위 환경에 대한 초기의 적응력이 낮다는 것을 의미한다. 그러나 비성장속도와 배가시간이 성장속도가 빠른 편인 *Eschscholtzia californica*는 0.25day^{-1} , 2.77일이고 그 보다 늦은 *Taxus baccata*는 0.104day^{-1} , 6.7일과 비교했을 때 세포 성장 속도가 빠르다는 것을 보여 주고 있다(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 성장 속도는 빠르지만 세포가 감소되는 시점이 배양일로부터 상당히 늦는 것과 탄소원이 그때까지 남아있는 것으로 보아 탄소원은 세포의 성장 이외에도 이차대사산물의 생산이나 세포자체의 유지 등에도 많은 작용을 하는 것으로 생각된다.

시간에 따른 CPT의 생성경향은 배양초기에는 거의 생성이 되지 않다가 exponential phase 말기부터 생성되기 시작해서 stationary phase 초기에 최고 1.73×10^{-4} mg/l 이 생성되다가 그 이후에 급격히 감소하는 경향을 보였다. 배지 내에서는 CPT가 검출되지 않았는데 이는 회수세포는 세포내에 CPT를 축적한다는 것을 암시한다. CPT의 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. 또한, CPT가 어느 특정기간에만 생성되다가 사라지는데 이것으로 미루어 CPT는 이차대사산물 metabolic pathway 상의 최종 산물이 아닌 중간 산물일 가능성이 높은 것으로 생각된다.



1. Control 2. Jasmonic acid 3. Cellulase 4. Pectinase

Figure 3. Camptothecin production with various elicitors

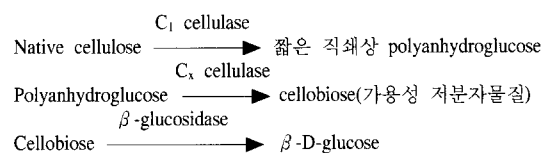
Elicitor의 선별

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(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.

본 연구에서는 3가지의 elicitor; jasmonic acid, pectinase, cellulase를 사용하였다. 회수 현탁세포 5 g을 50 ml의 hybrid 배지가 들어있는 125 ml 삼각플라스크에 접종하고 그와 동시에 $50 \mu\text{M}$ jasmonic acid, 15unit/g FCW pectinase, cellulase를 투입하고 72시간 후에 추출하여 분석하였다. 사용된 elicitor는 cold sterilization 방법으로 멸균을 수행하였다. 이 중 jasmonic acid와 cellulase에서 각각 12.03, 7.64×10^{-3} mg/l 의 CPT가 생성되었다(Figure 3).

Endogenous jasmonic acid는 식물 지방 유도체로서 식물의 상처 치유와 pathogen의 방어 기작 역할을 한다. 즉, 식물체에서 방어기작 유전자 유도를 조절하는 신호전달체계에 관여하고 있다. Kutchan(10)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(11).

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



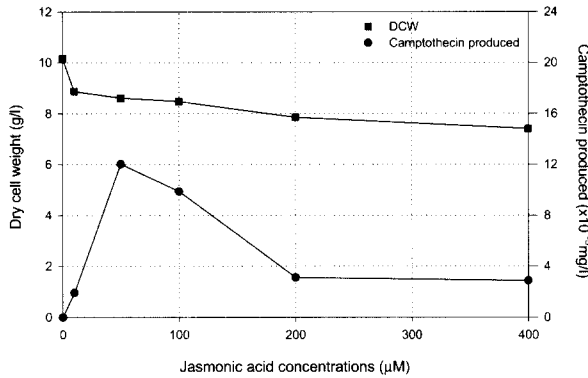


Figure 4. Effects of jasmonic acid on cell growth and camptothecin production

이와 같이 복합효소로 되어있는 cellulase는 대체로 3가지로 구분할 수 있다. 첫째는 C₁ cellulase와 같이 섬유소 결정체에 작용하여 짧은 직쇄상 polyanhydroglucose쇄를 생성해주는 효소이며, 둘째로는 섬유소를 cellobiose, cellobiose로 분해시키는 endoglucanase(C_x cellulase)이며, 셋째로는 cellobiose 또는 cellobiose와 같은 저분자 물질에 작용하여 최종적으로 포도당을 생성해주는 β-glucosidase이다. 이 같은 작용으로 식물세포에 cellulase를 투여하며 세포벽에 존재하는 cellulose를 분해하여, 생성된 다당류들이나 포도당이 pathogen으로 작용하여 세포 내로부터 이차대사를 유발시키는 결과를 가져온다 (12-14). 위와 같은 효과에 의해 희수세포에 적용되는 elicitor, 즉, jasmonic acid와 cellulase의 두여 농도와 시기에 대한 최적 조건을 찾음으로써 생산을 증진시킬 수 있을 것이다.

Elicitor 투여 농도에 의한 영향

일반적으로 jasmonic acid는 많은 식물세포 배양에서 elicitor으로써 효과를 보인 것으로 발표가 되고 있다. 앞에서 효과가 있었던 결과를 가지고 최적의 농도를 알아보기 위해 현탁배양 중인 희수 세포 5 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 CPT의 생성 면에서는 50 µM에서 가장 좋은 결과를 보이고 있다(Figure 4). 배지에서는 CPT가 검출되지 않은 것으로 보아 jasmonic acid는 세포막의 permeability를 증가시키는 작용은 하지 않는 것으로 생각된다. 고농도로 갈수록 세포의 생장이 감소하는 것은 고농도의 jasmonic acid가 세포의 성장에 직접적인 저해요인으로 작용한 것과 jasmonic acid가 녹아있는 ethanol의 양이 많아짐으로 인한 cell damage가 증가하는 것으로 생각된다. 그리고 figure에서는 나타나지 않았지만 동량의 ethanol만을 투여한 것에서는 CPT가 생성되지 않았다. 따라서 ethanol에 의한 영향으로 CPT가 생성되었다고는 말할 수 없을 것이다. 그리고 저농도에서는 낮은 농도의 elicitor가 세포의 신호를 받는 receptor와 반응의 정도가 낮기 때문에 약한 효과를 보인 것으로 생각된다.

Jasmonic acid 이외에 cellulase에서도 효과를 나타내고 있는데, CPT 생성에 있어서 최적의 농도를 찾아보려 하였다. Hybrid 배지 50 ml가 들어있는 125 ml 삼각플라스크에 희

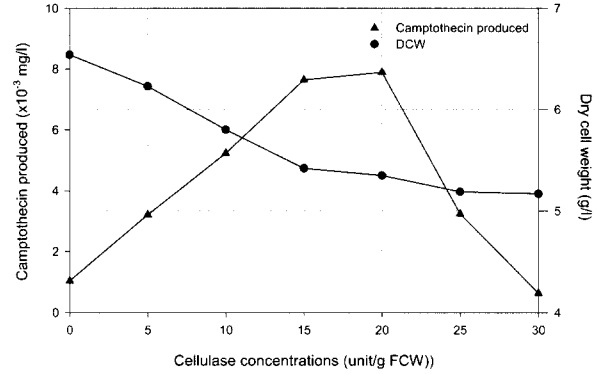


Figure 5. Effects of cellulase on cell growth and camptothecin production.

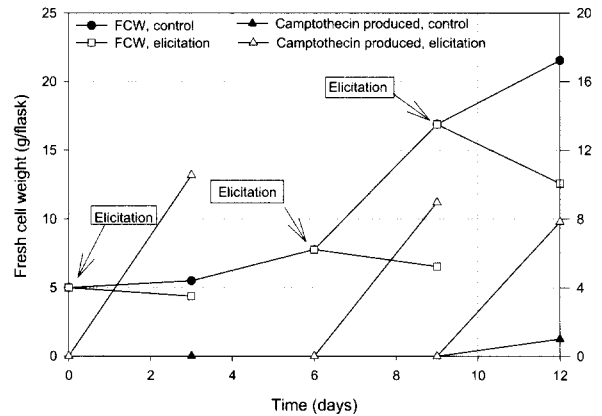


Figure 6. Changes in cell growth and camptothecin production by elicitation with jasmonic acid(50µg/g FCW) at different growth phases.

수세포 5 g을 접종하고 그와 동시에 cellulase를 다양한 농도로 투여하여 3일간 배양 후 추출하여 분석하였다. 농도가 증가함에 따라 세포의 생장은 감소하는 경향을 보인다. Cellulase 농도에 따른 CPT 생성은 20 units/g FCW까지 증가하다가 20 units/g FCW에서 가장 좋은 효과를 보이며 그 이후에 급격히 감소하였다(Figure 5). Cellulase가 세포벽의 cellulose를 분해하여 세포막의 permeability를 변화시켜 세포외부로 CPT를 방출할 것으로 기대하였으나 배지에서는 검출되지 않았다. 전반적인 cellulase의 효과는 대조구보다는 좋은 효과를 보였으나 jasmonic acid에 비해 낮은 효과를 보이고 있다.

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 hybrid 배지를 넣고 희수세포 5 g을 접종하고 각 growth phase별로 50 µg/g FCW의 jasmonic acid를 투여하고 3일 후에 추출하여 분석하였다. Figure 6을 보면, 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

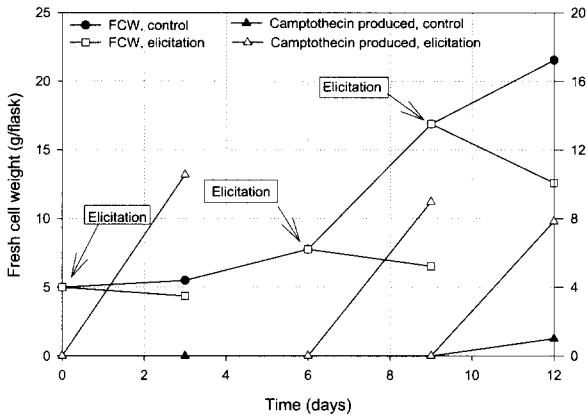


Figure 7. Changes in cell growth and camptothecin production by elicitation with cellulase(20units/g FCW) at different growth phases.

ethanol의 양이 많아짐으로 인한 결과라고 생각되어진다. 그 뿐만 아니라, elicitor의 양도 세포의 양에 따라 증가하여 고농도의 elicitor는 세포의 성장에 직접적인 저해요인으로 작용되었던 것으로 여겨진다. CPT 생성 면에서는 elicitor를 투여한 모든 growth phase에서 대조구보다 많은 CPT가 생성되었지만, 접종과 동시에 투여했을 때 가장 좋은 결과를 보이고 있다 ($10.54 \times 10^3 \text{ mg/l}$). 희수세포는 exponential phase 초기와 stationary phase 초기에 jasmonic acid를 처리했을 때는 희수세포가 주변 환경에 완전히 적응이 되어 외부로부터 오는 신호에 대한 metabolic pathway의 활성화가 일어나지 않는 것으로 생각된다. 즉, 희수세포는 배양 초기의 환경에 대해 민감한 반응을 보이는 것으로 여겨진다.

Cellulase elicitation에 의한 CPT의 생성 경향을 알아보기 위해 실험을 수행하였다. Growth phase별로 cellulase를 20units/g FCW씩 투여하여 Jasmonic acid의 경우와 같은 방법으로 추출, 분석하였다. Figure 7에서 볼 수 있듯이, 세포의 성장은 대조구에 비해 elicitor를 투여한 후에 배양이 진행됨에 따라 감소함을 알 수 있었다. Ethanol에 녹아있던 jasmonic acid와 같이 급격한 감소는 관찰되지 않았다. 하지만, 세포벽의 cellulose를 분해하기 때문에 shear stress를 심하게 받아 세포의 성장이 저해된 것으로 여겨진다. CPT 생성 면에서는 jasmonic acid와 마찬가지로 접종과 동시에 투여했을 때 가장 좋은 효과를 보이고 있으며, 세포 성장이 진행 될수록, 다시 말하면, 세포가 주변환경에 완전히 적응한 후에는 elicitation 효과가 감소함을 알 수 있었다.

복합 Elicitor의 영향

앞에서 효과가 있었던 jasmonic acid와 cellulase를 가지고 비율을 달리하여 함께 투여할 경우 CPT의 생산에 어떤 영향을 미치는 지 알아보았다. 50 ml 배지가 들어있는 125 ml 삼각 플라스크에 희수세포 5 g을 접종하고 그와 동시에 jasmonic acid와 cellulase의 양을 달리하여 함께 투여하고 2일 배양 후 추출, 분석하였다. Figure 8에서 보면 가장 효과가 좋았던 50 μg/g FCW jasmonic acid에 cellulase의 양을 변화시켜서 투여하였다. 세포의 성장은 cellulase의 양이 증가함에 따라 점차 감소하는 경향을 보였으며 세포의 색깔도 진한 갈색을 띠고 죽은 세포도 많아졌다. 이것은 두 종류의 elicitor를

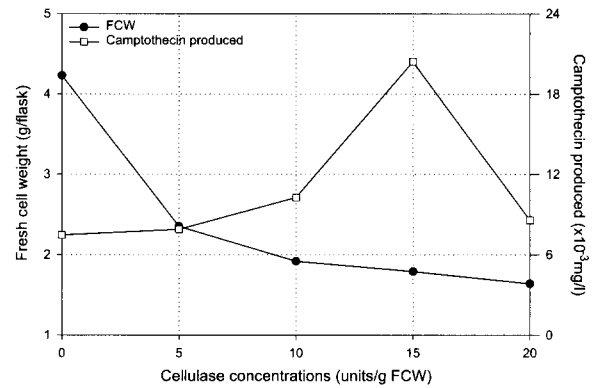


Figure 8. Changes in cell growth and camptothecin production by double elicitation with jasmonic acid(50μg/g FCW) and various cellulase concentrations

투여함으로 상대적으로 과량의 elicitor로 세포의 성장에 저해를 일으킨 것으로 생각된다. CPT 생성면에서는 cellulase의 농도가 15 unit까지는 농도에 비례하여 증가하다가 최고 $20.42 \times 10^3 \text{ mg/l}$ 의 양을 나타내고 그 이후 감소하였다. 두 종류의 elicitor를 함께 투여함으로써 CPT의 생산을 촉진하는 데 단일의 elicitor를 사용하는 것보다 생성시기를 단축시킬 수 있었다. Elicitation의 combination으로 그 생산성을 더욱 증가시킬 수 있었는데, jasmonic acid로만 처리하지 않고 cellulase와 함께 사용하였을 때 약 3배로 생산성을 향상시킬 수 있었다. 투여 농도뿐 아니라 한 종류 이상의 elicitor를 사용할 경우 투여시기, 추출 시기 등의 최적화를 통해서 CPT의 생산을 더욱 촉진할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

희수 (*Camptotheca acuminata*) 현탁세포배양에서 최근 항암제로서 관심을 끌고있는 camptothecin을 얻기 위하여 연구를 수행하였다. 현탁세포배양에서 exponential phase의 최고 성장속도는 0.269day^{-1} 이었으며 배가시간이 2.58일이었다. Camptothecin은 배양초기에 생성되지 않고 exponential phase 말기부터 서서히 생성되어 stationary phase 초기에 최고를 나타내고 이후 급격히 감소하였다. Camptothecin의 생산을 촉진하기 위하여 elicitor를 사용하였다. 여러 elicitor 중 jasmonic acid와 cellulase가 camptothecin의 생성을 증가시켰다. Elicitor는 접종과 동시에 투여했을 때 가장 효과가 좋았으며, jasmonic acid와 cellulase의 combination으로 효과가 더욱 증진했는데 대조구에 비하여 약 20배 정도 증가한 $20.42 \times 10^3 \text{ mg/l}$ 의 camptothecin이 생성되었다. 이것은 생산량을 증가시킨 것뿐만 아니라 생산기간도 약 1/4로 단축시키는 결과를 얻을 수 있었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단지정 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Hengel, A. J., M. P. Harkes, H. J. Wichers, P. G. M. Hesselink, and R. M. Buitelaar (1992), Characterization of callus and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acuminata*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 11~18.
2. Perdue, R. E., R. L. Smith, M. E. Wall, J. L. Hartwell, and B. J. Abbott (1970), *Camptotheca acuminata* Decaisne (Nyssaceae), source of camptothecin, an antileukemic alkaloid, Technical Bulletin, No. 1415, U.S. Department of Agriculture, *Agricultural Research Service*, Washington, D.C.
3. Brodelius, P. (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. Agric. Forest.*, 26, 1~19.
5. Song, S. H., S. Y. Byun (1999) Characterization of cell growth and camptothecin production in cell cultures of *Camptotheca acuminata*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 8(6), 631~638.
6. 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.
7. Byun, S. Y. (1989) "Studies on elicitation and In-situ recovery of alkaloids in suspension cultures of *California Poppy*", Ph.D. thesis, Dept. of Chem. Eng., Rutgers, The State University of New Jersey.
8. Moon, W. J. (1997) "Studies on the production enhancement of (10-deacetyl) baccatin III and paclitaxel in suspension cultures of *Taxus baccata* Pendula", MS thesis, Dept of Biotechnology, Ajou University, Korea.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Kim, S. S. (1969) "Studies on the cold precipitation of apple juice", MS thesis, Sookmyung Woman's University, Korea.
13. Park, J. S. (1969) "Pectinase - characteristics of the pectinase produced by *Aspergillus aureus* L.", MS thesis, Choongnam University, Korea.
14. Song, S. H. (1998) "Studies on the production of anticancer agent camptothecin and its derivatives in cell cultures *Camptotheca acuminata* MS thesis, Dept of Biotechnology, Ajou University, Korea.