

식물세포배양으로부터 Paclitaxel 회수를 위한 메탄올 추출액의 여과 및 농축 조건 최적화

김진현

공주대학교 화학공학부

(접수 : 2007. 6. 11., 게재승인 : 2007. 8. 10.)

Optimization of Conditions of Filtration and Concentration of Methanol Extract for Recovery of Paclitaxel from Plant Cell Culture

Jin-Hyun Kim

Department of Chemical Engineering, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

(Received : 2007. 6. 11., Accepted : 2007. 8. 10.)

This study examined the conditions of filtration and concentration of methanol extract from biomass. Filtration efficiency was improved by adding diatomaceous earth as a filter aid. The optimal amount of diatomaceous earth was 6% (w/w) to reduce the filtration time. The filtration time was reduced by 4.2% in first extraction, 30.0% in second extraction, 22.8% in third extraction, and 19.0% in fourth extraction, respectively. The optimal temperature of water bath was below 50°C for preventing paclitaxel degradation during concentration of methanol extract using a rotary evaporator. The temperature of concentrated solution in rotary evaporator was relatively low compared to bath temperature because of latent heat of evaporation. The stopping point of concentration in rotary evaporator for the following step was at a specific gravity of 0.96 of the concentrated solution in terms of the purity and yield of paclitaxel. This information is very useful for mass extraction of biomass for the recovery of paclitaxel from plant cell culture.

Key Words : Paclitaxel, extraction, filtration, diatomaceous earth, concentration

서론

항암제 paclitaxel (화학식: $C_{47}H_{51}NO_{14}$, 분자량: 853.9, CAS number: 33069-62-4)은 주목 (yew tree)의 표피에서 발견된 diterpenoid 계열의 항암물질로 1992년 난소암, 1994년 유방암, 1997년 카포시 종양 (kaposi's sarcoma)에 대해 미국 FDA (Food and Drug Administration) 허가를 취득하여, 현재 가장 효과 있는 항암제로 사용되고 있다. 세계 시장 규모는 2조원 (2000년 기준), 국내 시장규모는 553억원 (2003년 기준) 정도이며 현재 항암제 중 시장규모 1위, 주요 항암화학치료제 시장의 22% 정도를 점유하고 있다. 또한 폐암, 류마티스성 관절염, 알츠하이머 치료 등에 적용증이 계속 확대되고 있으며, 여러 다른 약물들과의 복합처방에 관한 임상시험이 현재 180여건 진행 중에 있어 수요는 계속 늘어날 전

망이다(1).

Paclitaxel의 주요 생산 방법에는 주목나무에서 직접 추출 (extraction)하는 방법(2), 주목나무의 잎에서 전구체 (예, baccatin III, 10-deacetylbaccatin III, 10-deacetylpaclitaxel)를 얻어 side chain을 화학적으로 결합하는 반합성 (semi-synthesis) 방법(3), 주목나무에서 callus를 유도하고 종균배양 (seed culture)을 거쳐 주배양기 (main bioreactor)에서 식물세포를 배양하여 얻는 방법(4, 5)이 있다. 이들 중 식물세포배양에 의한 생산 방법은 원료의 안정적 공급 뿐만 아니라, 기후, 환경 등 외부인자에 의한 영향을 받지 않고 생물반응기 내에서 안정적으로 생산이 가능하기 때문에 일정한 품질의 paclitaxel을 대량 생산할 수 있다는 장점이 있다.

식물세포배양으로부터 항암제 paclitaxel의 분리 및 정제는 여러 단계의 추출 및 정제 공정을 거쳐 고순도 (>98%)의 제품을 생산하게 된다. 식물세포배양에서 생산된 paclitaxel은 대부분 식물세포와 세포조각 (debris) 내에 존재하는 세포내 제품 (intracellular product)으로 paclitaxel 분리 및 정제를 위해 먼저 원료인 biomass (paclitaxel을 함유한 식물세포)로부터 paclitaxel을 효율적으로 추출하는 것이 매

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea
Tel : +82-41-850-8642, Fax : +82-41-858-2575
E-mail : jinhyun@kongju.ac.kr

우 중요하다(6, 7). 지금까지 보고된 많은 문헌에 의하면 추출 과정은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 biomass로부터 먼저 유기용매를 사용하여 추출하고 추출물의 여과 및 농축 과정을 거쳐 다음 공정으로 이어지는 것이 가장 보편적이다(8-11). 이러한 추출 과정에서, 특히 추출물의 여과 및 농축 조건에 대한 연구는 상당히 부족한 실정이며, 추출물의 여과 및 농축 과정에 대한 충분한 이해 없이는 biomass로부터 paclitaxel을 대량으로 회수하는데 많은 어려움이 따른다.

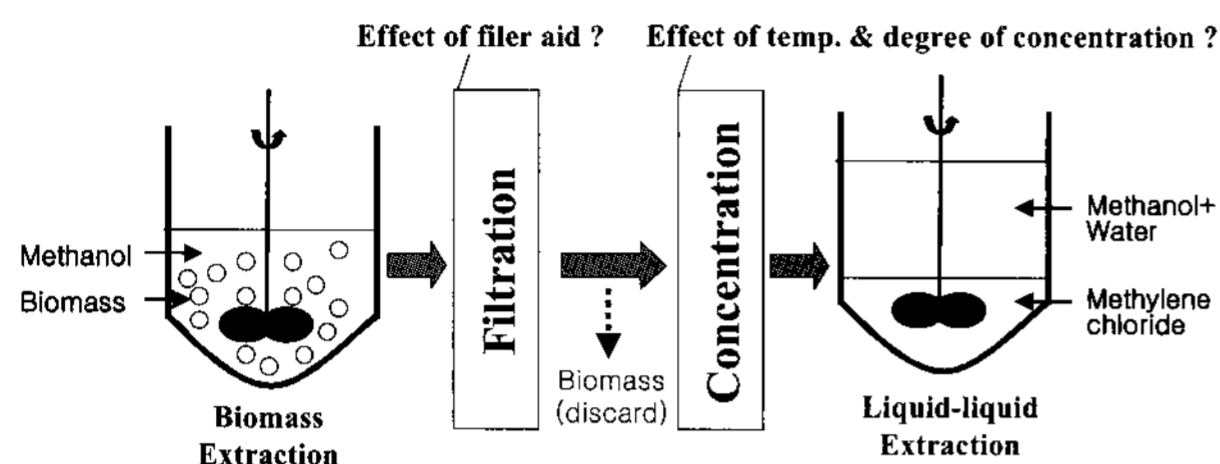


Figure 1. Schematic diagram of the extraction process for paclitaxel recovery from biomass.

따라서 본 연구는 식물세포배양으로부터 얻은 식물세포와 식물세포조각 (debris)에 포함되어 있는 paclitaxel을 효율적으로 대량회수하기 위한 추출물의 여과 및 농축 조건에 대한 이해와 이를 토대로 한 최적화에 그 목적이 있다.

재료 및 방법

식물세포 배양

본 연구에서는 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주 (cell line)를 이용한 세포배양액을 이용하였다(4). 식물세포배양으로부터 식물세포를 회수하기 위하여 데칸터 원심분리기 (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter)를 사용하였으며, 세포조각 (cell debris)은 고속 원심분리기 (α-Laval, BTPX 205GD-35 CDEFP)를 사용하여 회수하였다. 회수한 식물세포와 세포조각을 합하여 biomass라 하였다. 본 연구에 사용된 biomass는 (주)삼양제넥스로부터 제공받았다.

Paclitaxel 분석

HPLC (Waters)를 사용하여 paclitaxel의 함량을 분석하였으며 모든 분석 시료는 3개씩 취하여 분석 후 평균값으로 함량을 결정하였다. 분석에 사용한 column은 Capcell Pak C₁₈ UG 120 (250 mm × 4.6 mm, Shiseido, Japan), column 온도는 40°C, 이동상은 acetonitrile/water (20~100% gradient), 유속은 1.0 mL/min, 시료 주입량은 10 μL이며, UV (227 nm) detector를 사용하였다(6). Paclitaxel 표준물질은 Sigma-Aldrich 제품 (순도: 95%)을 사용하였다.

Biomass 추출

식물세포배양액으로부터 회수한 biomass를 메탄올을 이용하여 회분식으로 4회 추출하였다(6). 메탄올과 biomass 혼합비는 1/1 (250 g biomass/250 mL methanol)로 하였으며

추출시간은 1회 10분으로 하였다. Biomass 추출 후 추출물을 여과보조제 (filter aid) 첨가에 의한 여과 효율 확인 실험에 사용하였다.

Biomass 추출물 여과

추출물에 여과보조제인 규조토 (Sigma-Aldrich, 90% diatomaceous earth)를 첨가하여 여과 효율을 확인하였다. 직경 10 cm Buchner funnel에 먼저 filter paper (Whatman No.4)를 깔고 그 위에 일정량 (15~37.5 g diatomaceous earth/250 g biomass)의 규조토 (Sigma-Aldrich, 90% diatomaceous earth)를 덮는다. 회분식으로 추출한 biomass 추출물을 부어 여과하고 여과에 소요되는 시간을 측정하였다. 여과가 완료되면 biomass 부분을 걷어내어 다시 추출하고 이를 3회 반복하였다. 총 4회의 추출 및 각각의 추출물 여과에 소요되는 시간을 측정하여 첨가 여과보조제의 양에 따른 여과 효율을 확인하였다.

여과액 농축

여과를 거친 메탄올 추출액은 rotary evaporator (N-1000VW, EYELA, Japan)에서 농축을 수행하였다. 농축 온도의 영향을 확인하기 위하여 bath 온도를 각각 35, 40, 45, 50°C 조건에서 농축을 수행하였다. 또한 농축액의 온도를 확인하기 위해 thermcouple을 이용하여 농축과정 동안 농축액의 온도를 측정하였다. 농축 시 진공도는 760 mmHg이었다.

액-액 추출 (liquid-liquid extraction)

여과액의 농축 정도에 따른 영향을 확인하기 위하여 biomass 추출 다음 공정으로 액-액 추출 (liquid-liquid extraction)을 수행하였다(10). 액-액 추출은 농축된 메탄올 용액에 methylene chloride를 첨가하고 (concentrated methanol:methylene chloride = 5 : 1, v/v), 혼합하여 정제시켜 상 분리를 유도하였다. 상 분리로부터 paclitaxel이 포함되어 있는 하층 (methylene chloride 용액 층)을 회수하고 rotary evaporator (760 mmHg, 30°C)에서 농축/건조한 후 paclitaxel 순도와 수율을 측정하였다.

결과 및 고찰

메탄올 추출액 여과에 미치는 규조토의 영향

일반적으로 여과 과정에서 여과시간의 경과에 따라 여과 효율이 급속히 감소하여 여과 시간이 길어지는 것이 문제이다(12). 이러한 문제를 해결하기 위해 여과보조제 (filter aid)를 사용하는 경우가 많다. 유기용매를 이용한 biomass 추출 공정에서 추출 후 여과가 필수적인데 대량 생산의 경우 여과에 많은 시간이 소요되므로 이를 개선하는 것이 매우 중요하다. 본 연구에서는 식물세포배양으로부터 paclitaxel을 회수하기 위한 biomass 추출 후 추출물의 여과 과정에서 여과보조제인 규조토 사용에 의한 여과시간 단축 효과를 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 추출에 사용된 biomass 대비 6% (w/w) 규조토를 첨가하여

여과 할 경우 여과시간 단축 효과가 가장 좋음을 알 수 있었다. 규조토 6% (w/w)을 첨가하여 여과할 경우, 1회 추출물 여과 시 4.2%, 2회 추출물 여과 시 30.3%, 3회 추출물 여과 시 22.8%, 4회 추출물 여과 시 19.0%의 여과시간 단축 효과가 각각 있음을 알 수 있었다. 첨가되는 규조토의 양이 6% (w/w) 이상에서는 규조토 양이 증가할수록 오히려 여과시간이 증가함을 알 수 있었으며 이는 규조토가 새로운 여과 저항으로 작용하기 때문으로 판단된다. 여과 시 식물세포는 일반적으로 압축성 케익 (compressible cake) 이기 때문에 여과 조건에 따라 쉽게 밀도가 변화될 수 있어 여과 시간에 따라 여과 효율이 급속히 감소하는 경향이 있다(12). 여과 과정에서 여과보조제인 규조토는 압축성 케익을 비압축성 케익 (incompressible cake) 형태로 유지해 줌으로써 여과 효율을 향상시키는 효과가 있다. 이러한 여과보조제를 여과 공정에 사용할 경우 먼저 여과 과정을 통해 여과보조제로부터 어떠한 불순물도 검출되지 않음을 반드시 확인하는 것이 매우 중요하다.

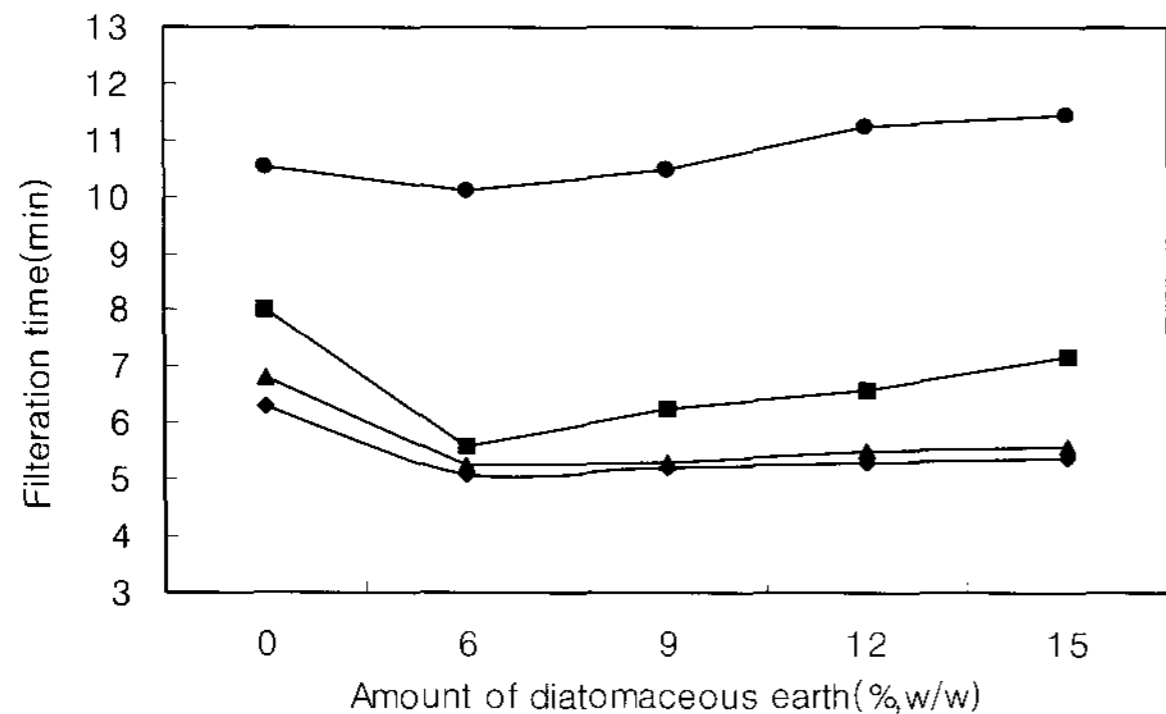


Figure 2. Effect of diatomaceous earth on filtration efficiency after biomass extraction (●, first extraction; ■, second extraction; ▲, third extraction; ◆, fourth extraction).

여과액 농축 온도의 영향

메탄올 추출물의 여과 후 여과액의 농축이 필수적이다. 농축온도의 영향을 확인하기 위하여 rotary evaporator의 bath 온도를 35~50℃로 변화시켜 농축온도의 영향을 확인하였다. 주어진 온도 범위 내에서는 온도 변화에 따른 paclitaxel의 순도와 수율은 거의 변화가 없었다(data not shown). 농축 시 bath 온도 50℃ 이하에서는 용매에 녹아 있는 paclitaxel이 안정한 것으로 보고 된 바 있으며 본 연구의 결과와도 잘 일치함을 알 수 있다(13). Bath 온도의 변화에 따른 농축되고 있는 용액의 온도변화를 확인하여 Fig. 3에 나타내었다. 농축은 감압 상태 (760 mmHg)에서 진행되고 thermcouple을 사용하여 농축 도중에 농축되고 있는 용액의 온도를 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 bath의 온도가 35, 40, 45, 50℃인 경우 농축되고 있는 용액의 온도는 각각 21, 23, 27, 30℃를 나타내어 농축 과정 동안 농축액의 온도는 bath의 온도에 비해 상당히 낮음을 알 수 있었다. 이러한 온도 차이는 용액의 증발잠열 (latent heat of vaporization)에 기인하는 것으로 판단된다. 보고 된 바에 의하면 paclitaxel의 경우 메탄올 용액 상태에

서 30℃ 이하에서 안정한 것으로 보고되어 농축 시 bath의 온도는 50℃ 이하 (농축되는 용액의 온도 30℃ 이하)로 운전하는 것이 바람직하였다. 또한 최종 농축 완료 시점을 농축액의 비중이 0.96이 될 때로 잡고 주어진 bath의 온도와 농축 시간과의 관계를 확인하여 Fig. 4에 나타내었다. Bath의 온도가 증가할수록 여과액 500 mL를 농축하는데 걸리는 농축 시간은 감소하였으며 bath의 온도가 50℃인 경우는 35℃인 경우에 비해 두 배 정도의 농축 시간이 단축됨을 알 수 있었다.

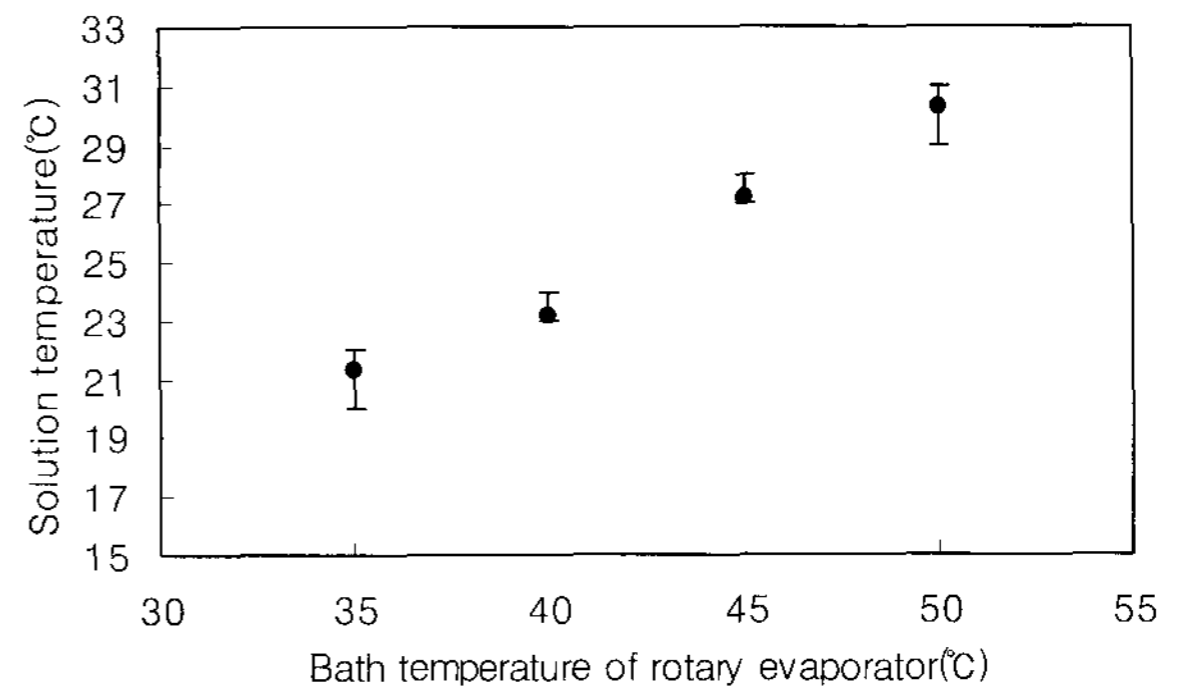


Figure 3. Experimental correlation between bath temperature and solution temperature during rotary evaporation.

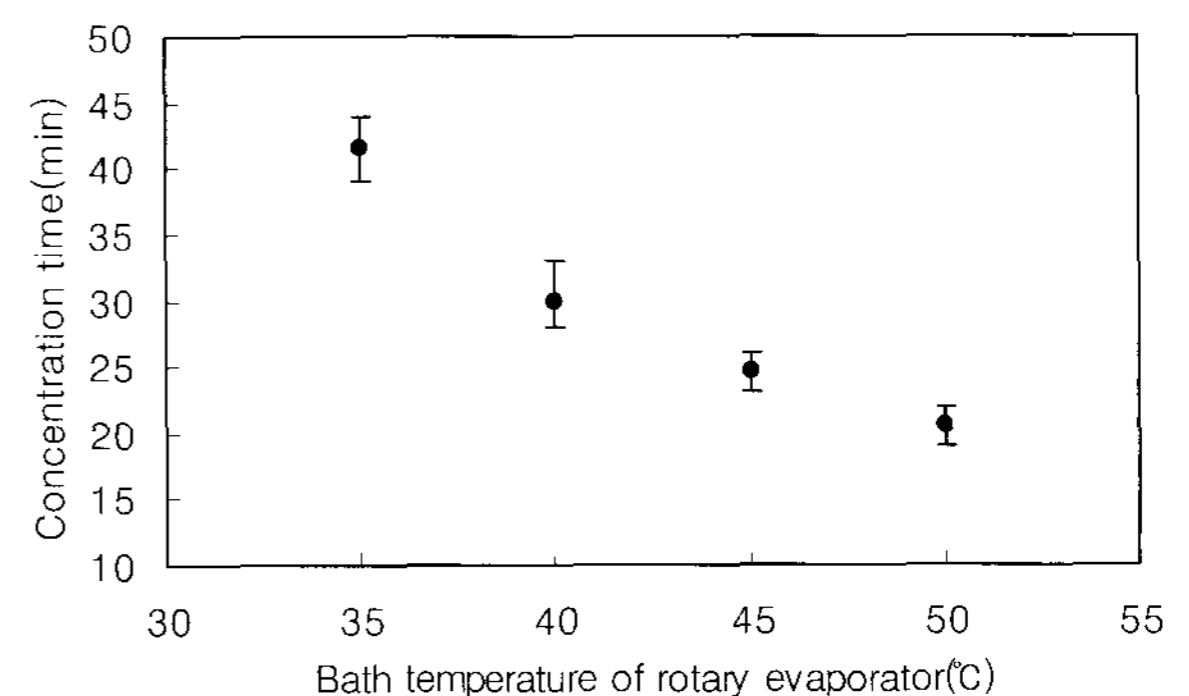


Figure 4. Experimental correlation between bath temperature and concentration time during rotary evaporation.

메탄올 여과액 농축 정도의 영향

농축액의 비중을 달리하여 각각의 비중 값에서 농축을 정지하고 다음 공정인 액-액 추출을 수행하여 paclitaxel의 순도와 수율을 확인함으로써 최적의 여과액 농축 완료 시점을 결정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 농축 완료 시점에서의 농축액의 비중이 0.975 이상에서는 paclitaxel의 순도 및 수율이 감소함을 알 수 있었다. 또한 각각의 비중을 얻기 위한 농축 시간과 각각의 비중에서 농축을 완료하여 액-액 추출을 수행할 경우에 액-액 추출에 소요되는 즉, 액-액 추출 시 상 분리 (phase separation)에 소요되는 시간을 확인하여 Fig. 6에 나타내었다. 농축 및 액-액 분리에 소요되는 시간은 비중 증가에 따라 증가함을 알 수 있었다. 특히, 액-액 추출 시 상 분리에 소요되는 시간의 경우 비중이 1.0에서부터 급격히 증가함을 알 수 있었다. 이

러한 현상은 농축 시간 경과에 따른 농축액의 조성 변화, 즉 메탄올 함량은 감소하고 물의 함량이 상대적으로 증가함에 기인하는 것으로 판단된다. 이상의 결과로부터 추출물 여과액의 농축 완료 시점은 농축액의 비중이 0.95일 때 가장 적당함을 알 수 있었다.

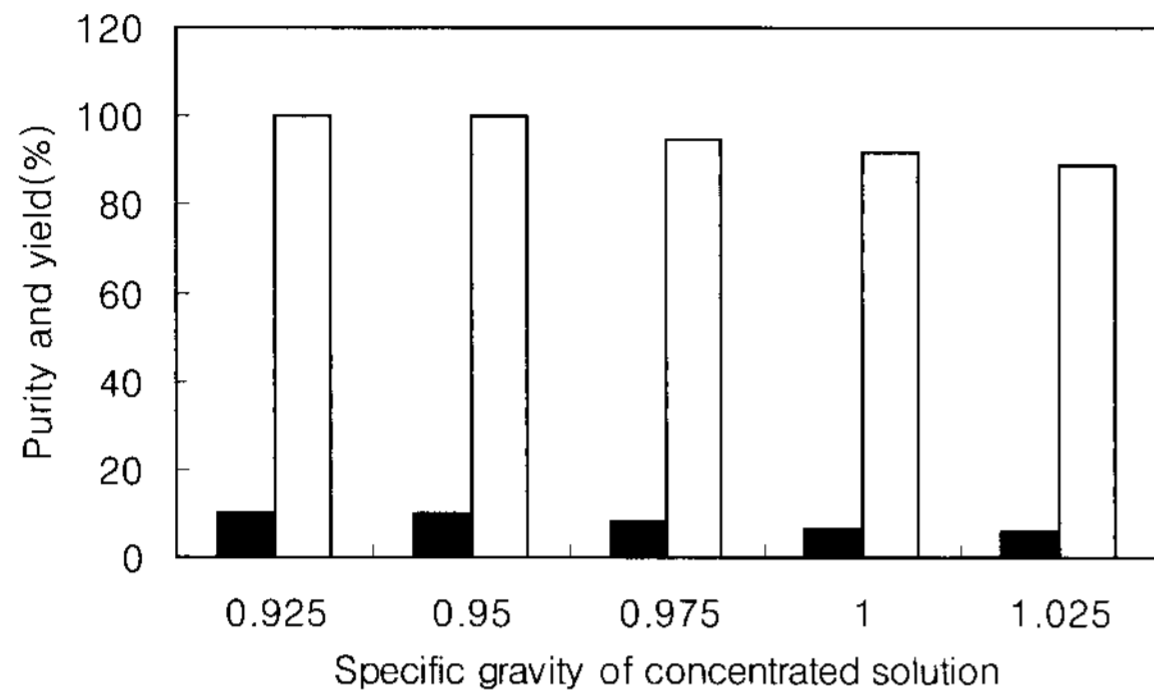


Figure 5. Effect of specific gravity of concentrated solution on the purity and yield of paclitaxel in liquid-liquid extraction step (■, purity; □, yield).

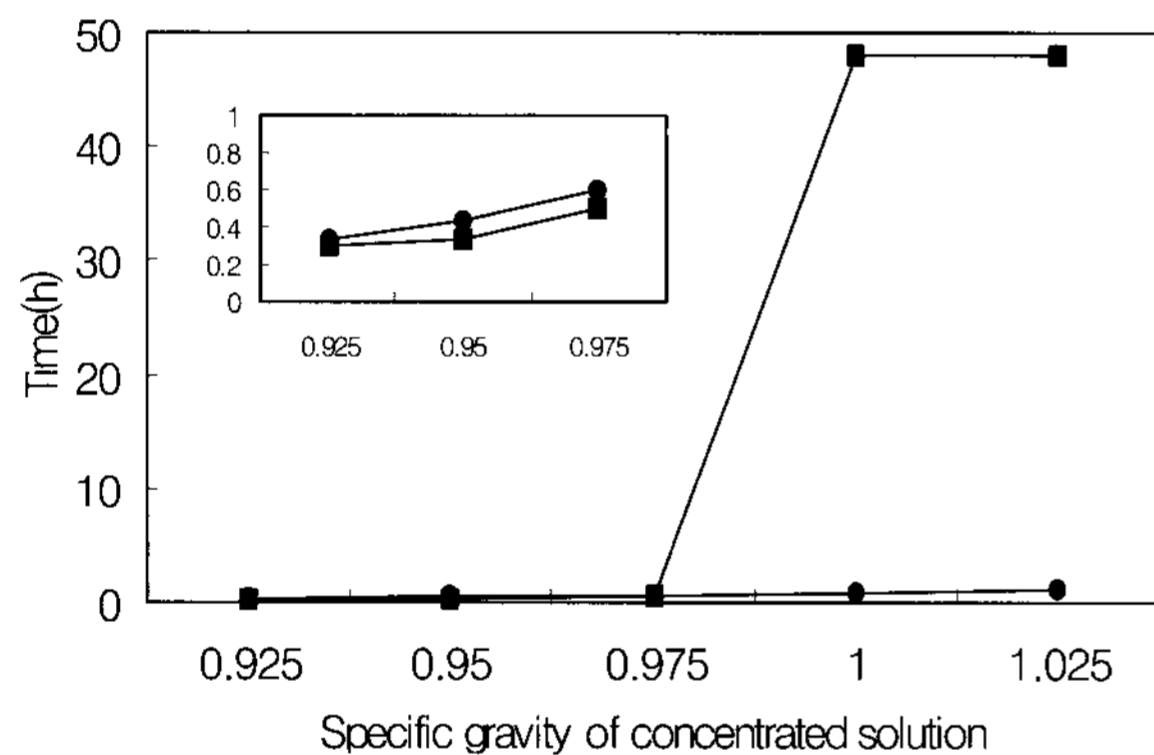


Figure 6. Effect of specific gravity of concentrated solution on the concentration time and liquid-liquid extraction time (●, concentration time of rotary evaporator; ■, phase separation time of liquid-liquid extraction).

요 약

식물세포배양으로부터 paclitaxel을 효율적으로 대량추출하기 위한 추출액의 여과 및 농축 조건을 최적화하였다. 메탄올을 이용한 biomass 추출물을 여과할 경우, biomass 대비 6% (w/w) 여과보조제인 규조토를 첨가할 경우 여과 시간 단축에 가장 효과적임을 알 수 있었다. 규조토 6% (w/w) 첨가를 통하여 1회 biomass 추출물 여과 시 4.2%, 2회 추출물 여과 시 30.3%, 3회 추출물 여과 시 22.8%, 4회 추출물 여과 시 19.0%의 여과시간 단축 효과를 각각 얻을 수 있었다. 여과액의 농축은 paclitaxel 순도 및 수율을 고려할 때 rotary evaporator의 bath 온도를 50℃ 이하로 운전하는 것이 바람직하였으며, 이때 농축액의 온도는 증발잠

열 때문에 실제 bath의 온도보다는 상당히 낮음을 알 수 있었다. 또한 여과액의 농축 완료 시점은 paclitaxel 순도, 수율, 농축시간, 액-액 추출에서의 상 분리 시간 등을 고려할 때 농축액의 비중이 0.95에서 종료하는 것이 가장 적당함을 알 수 있었다.

감 사

본 연구에 사용된 biomass는 (주)삼양제넥스로부터 제공 받았으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim, J. H. (2006), Paclitaxel : recovery and purification in commercialization step, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 21, 1-10.
- Rao, K. V., J. B. Hanuman, C. Alvarez, M. Stoy, J. Juchum, R. M. Davies, and R. Baxley (1995), A new large-scale process for taxol and related taxanes from *Taxus brevifolia*, *Pharm. Res.* 12, 1003-1010.
- Baloglu, E. and D. G. Kingston (1999), A new semisynthesis of paclitaxel from baccatin III, *J. Nat. Prod.* 62, 1068-1071.
- Choi, H. K., T. L. Adams, R. W. Stahlhut, S. I. Kim, J. H. Yun, B. K. Song, J. H. Kim, S. S. Hong, and H. S. Lee (1999) Method for mass production of taxol by semi-continuous culture with *Taxus chinensis* cell culture, U.S. Patent 5,871,979.
- Choi, H. K., S. J. Son, G. H. Na, S. S. Hong, Y. S. Park, and J. Y. Song (2002), Mass production of paclitaxel by plant cell culture, *Korean J. Plant Biotechnol.* 29, 59-62.
- Kim, J. H. and S. S. Hong (2000), Optimization of extraction process for mass production of paclitaxel from plant cell cultures, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 15, 346-351.
- Pyo, S. H., B. K. Song, C. H. Ju, B. H. Han, and H. J. Choi (2005), Effects of adsorbent treatment on the purification of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis* and yew tree, *Process Biochem.* 40, 1113-1117.
- Witherup, K. M., S. A. Look, M. W. Stasko, T. J. Ghiorzi, G. M. Muschik, and G. M. Cragg (1990), *Taxus* spp. needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation, *J. Nat. Prod.* 53, 1249-1255.
- Kim J. H., I. S. Kang, H. K. Choi, S. S. Hong, and H. S. Lee (2002), A novel prepurification for paclitaxel from plant cell cultures, *Process Biochem.* 37, 679-682.
- Pyo, S. H., H. B. Park, B. K. Song, B. H. Han, and J. H. Kim (2004) A large-scale purification of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis*, *Process Biochem.* 39, 1985-1991.
- Castor, T. P. and T. A. Tyler (1993), Determination of taxol in *Taxus media* needles in the presence of interfering compounds, *J. Liq. Chromatogr.* 16, 723-731.
- Belter, P. A., E. L. Cussler, and W. -S. Hu (1988), *Bioseparations*, 1st ed., p13, John Wiley & Sons, New York.
- Kim, J. H. (2004), Purification of paclitaxel by micelle and precipitation, *Process Biochem.* 39, 1567-1571.