

## Microwave를 이용한 식물세포배양으로부터 paclitaxel 추출

현 정 은 · † 김 진 현

공주대학교 화학공학부

(접수 : 2008. 2. 14., 게재승인 : 2008. 8. 1.)

## Microwave-assisted extraction of paclitaxel from plant cell cultures

Jung-Eun Hyun and Jin-Hyun Kim†

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

(Received : 2008. 2. 14., Accepted : 2008. 8. 1.)

A simple and efficient microwave-assisted extraction procedure was developed and optimized for the extraction of paclitaxel from the plant cell cultures of *Taxus chinensis*. The biomass, immersed in a methanol-water mixture, was irradiated with microwaves in a closed-vessel system. The microwave-assisted extraction was compared with the existing conventional solvent extraction in terms of yield, extraction time, and solvent consumption. The use of microwave energy allows rapid recovery of paclitaxel from biomass and dramatically reduces extraction time and solvent usage compared to conventional solvent extraction. The paclitaxel was completely extracted from biomass by microwave-assisted extraction for 3 min at 50°C, for 6 min at 30°C and 40°C, respectively.

**Key Words** : Paclitaxel, recovery, microwave-assisted extraction, plant cell cultures

### 서 론

Paclitaxel (화합식 :  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ , 분자량 : 854)은 주목나무 (yew tree)의 표피에서 발견된 diterpenoid 계열의 항암물질이다. 1992년 난소암, 1994년 유방암, 1997년 카포시 종양 (kaposi's sarcoma), 1999년 비소세포성 폐암 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 치료에 대해 FDA (Food and Drug Administration) 허가를 취득하여 현재 가장 많이 사용 되고 있는 항암제이다(1). 세계 시장규모는 3조원 (2003년 기준), 국내 시장규모는 553억원 (2003년 기준) 정도이며 현재 항암제 중 시장규모 1위, 주요 항암화학치료제 시장의 22% 정도를 점유하고 있다. 류마티스성 관절염, 알츠하이머 치료 등의 적응증이 계속 확대되고 있으며, 또한 여러 다른 치료 방법들과의 복합처방에 관한 임상시험이 진행 중에 있어 향후 paclitaxel 수요는 계속 늘어날 전망이다(2).

Paclitaxel의 주요 생산 방법에는 주목나무에서 직접 추출 (extraction)하는 방법, 주목나무의 잎에서 전구체를 얻어 side chain을 화학적으로 결합하는 반합성 (semi-synthesis) 방법, 주목 나무에서 callus를 유도하고 종균배양 (seed culture)을 거쳐

주배양기 (main bioreactor)에서 식물세포를 배양하여 얻는 방법 등이 있다(3-5). 식물세포 배양 방법은 기후, 환경 등의 외부 인자에 의한 영향을 받지 않고 생물반응기 내에서 안정적으로 생산이 가능하기 때문에 일정한 품질의 paclitaxel을 대량 생산할 수 있다는 장점이 있다. 식물세포 배양에 의하여 생산된 paclitaxel은 대부분 식물세포와 세포조각 (debris)에 포함되어 있으며(6), 회수율 증가 측면에서 세포 내에 포함되어 있는 paclitaxel을 효율적으로 추출하는 것이 매우 중요하다. 기존의 추출 방법은 주로 유기용매를 이용하여 biomass로부터 paclitaxel을 회수하는 방법으로 가장 많이 사용되고 있다 (7-9). 그러나 유기용매를 이용한 기존의 추출방법은 biomass로부터 높은 paclitaxel 회수에 많은 추출시간과 유기용매가 사용되는 단점이 있다. 이러한 단점들을 보완하기 위해 최근에는 microwave를 이용한 추출 방법에 대한 연구가 많이 진행되고 있다(10-12). Microwave를 이용한 추출 공정(microwave-assisted extraction, MAE)은 물질 내의 목적 성분만을 선택적으로 가열하여 추출할 수 있다는 점에서 매우 효과적인 방법이다. Microwave를 사용함으로써 선택적인 가열이 가능하고 물질 내에 깊이 침투한 microwave가 분자간의 결합 고리를 끊어 줌으로써 쉽게 추출이 가능하도록 도와준다. 이러한 microwave의 특성이 보다 광범위한 용매의 선택을 가능하게 하며, 기존의 추출 방법에 비하여 추출효율 향상, 조업시간 단축, 순도 향상, 그리고 에너지 절감 등 다양한 효과를 기대할 수 있다(12).

† 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

본 연구에서는 선택적인 가열방식을 가진 microwave를 이용하여 식물세포인 biomass로부터 paclitaxel을 효율적으로 추출할 수 있는 방법을 개발하였으며, 기존의 유기용매 추출 (conventional solvent extraction) 방법과 추출효율을 비교하였다. 이러한 연구 결과는 microwave의 사용으로 인해 높은 추출 효율 및 추출 시간 단축, 에너지 절감 효과를 얻을 수 있는 면에서 유용하게 사용되어질 수 있을 것으로 판단된다.

재료 및 방법

식물세포 배양

본 실험에 사용된 식물세포 배양액은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주 (cell line)을 이용하여 배양하였다(13). 배양액으로부터 식물세포 회수를 위하여 데칸터 원심분리기 (Westfalia, CA 150 Clarifying Decanter)를 이용하였으며, 식물 세포조각 (debris) 회수를 위하여 고속 원심분리기 ( $\alpha$ -Lavel, BTRX 205 GD-35 CDEFP)를 사용하였다. 회수한 식물세포와 세포조각을 합하여 biomass라 하였다. 본 연구에 사용된 biomass는 (주)삼양제넥스에서부터 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 C<sub>18</sub> UG 120 (250 mm×4.6 mm, Shiseido, Japan), column 온도는 40℃, 이동상은 acetonitrile/water (65/35~35/65, v/v gradient), 유속은 1.0 mL/min, 시료 주입량은 20  $\mu$ L이며, UV (227 nm) detector를 사용하였다(7). Paclitaxel 표준물질은 Sigma-Aldrich 제품 (순도: 95%)을 사용하였다.

Conventional solvent extraction (CSE)

기존의 연구에 의하면, 여러 가지 유기용매 (methanol, methylene chloride, methylene chloride/methanol, methyl-t-butyl ether, ethanol, isopropyl alcohol, chloroform, chloroform/methanol, diethylether, acetone 등)를 이용하여 세포배양액으로부터 회수한 biomass로부터 paclitaxel의 추출 경향을 조사한 결과 methanol의 경우 가장 적은 양으로 가장 높은 paclitaxel 회수율을 얻어 biomass로부터 paclitaxel의 추출에 가장 효과적임을 알 수 있었다(7, 14). 이를 바탕으로 본 연구에서는 biomass로부터 paclitaxel 추출을 위한 유기용매로 methanol을 선정하였으며 biomass와 methanol의 비율을 1/1 (w/v)로 하였다. 추출온도의 영향을 확인하기 위해 항온조 (PS-1000, EYELA, Japan)를 사용하였으며 추출온도는 각각 25, 30, 40, 50℃로 하였고, 추출시간은 3, 6, 10 min으로, 350 rpm으로 교반하였다. 추출 후 여과를 통해 여액을 회수하고, biomass에 새로운 methanol을 첨가하여 동일한 방법으로 4회 반복하여 추출을 수행하였다. 추출 여액을 모아 농축기 (CCA-1100, EYELA, Japan)에서 농축하고, 진공오븐 (UP-2000, EYELA, Japan)에서 24시간 건조시킨 후 HPLC로 분석하였다.

Microwave-assisted extraction (MAE)

Microwave power를 이용한 가열방식으로 추출온도를 조정

하였다. 추출온도는 30, 40, 50℃로 각각의 정해진 시간 동안 유지시켜 주었고, 그 외 추출조건은 CSE 방법과 동일하게 수행하였다. 또한 반응기 부피는 500 mL이며 최적의 biomass/methanol 비율을 확인하기 위해 50/50 (w/v), 50/40 (w/v), 50/30 (w/v) 비율로 각각 추출 실험을 수행하였다. 추출시간 동안 methanol의 증발을 방지하기 위해 microwave 추출 장치에 냉각시스템을 장착하였다(Fig. 1).

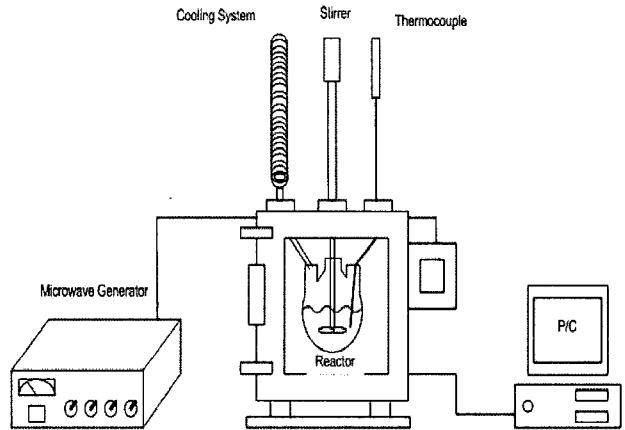


Figure 1. Schematic diagram of microwave-assisted extraction process.

결과 및 고찰

Conventional solvent extraction (CSE)에서 온도의 영향

Microwave를 이용한 용매추출 (microwave-assisted extraction) 방법과 비교하기 위해서 먼저 다음의 조건하에서 기존의 유기용매 추출 (conventional solvent extraction)을 수행하였다. Biomass와 methanol의 비율은 1/1 (w/v)로 하고, 추출온도의 영향을

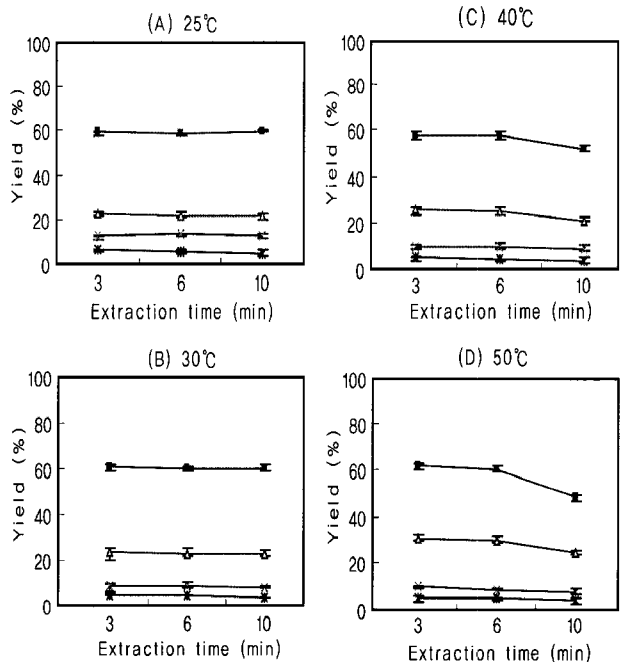
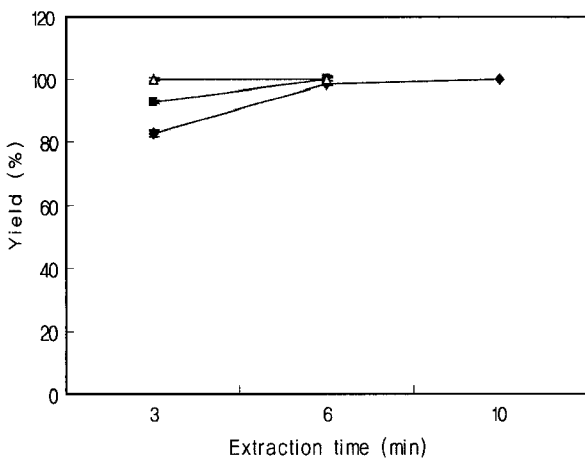


Figure 2. Effect of extraction temperature on paclitaxel yield in conventional solvent extraction (■ : first extraction, ▲ : second extraction, × : third extraction, \* : fourth extraction).

확인하기 위해 항온조를 사용하여 각각 25, 30, 40, 50°C로 온도를 유지시켜 주었으며, 각각의 온도에서 추출시간은 3, 6, 10 min으로 교반속도는 350 rpm로 추출하였다. 추출 후 여과를 통해 여액을 회수하고, biomass에 동일량의 새로운 methanol을 첨가하여 동일한 조건으로 4회 반복하여 추출한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 추출 온도 25, 30°C에서는 추출시간 (3, 6, 10 min) 변화에 따라 추출 수율에 거의 변화가 없어 온도의 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 반면, 추출 온도 40, 50°C에서는 추출 시간 6 min 이후에 추출 수율이 감소함을 알 수 있었다. 이는 추출 온도 25, 30°C에서는 추출 시간 (~10 min) 동안 온도에 영향을 받지 않는 반면 추출 온도 40, 50°C에서는 추출 시간이 길어지면 추출 동안에 paclitaxel 분해가 일어나는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 paclitaxel의 경우 매탄올 용액 상태에서 30°C 이하에서 안정한 것으로 보고된 것과 일치함을 알 수 있었다(2). 또한 biomass로부터 paclitaxel 추출 수율은 평균적으로 1회 methanol 추출 시 63% 회수되었으며, 2회 22%, 3회 10%, 4회 5% 정도 회수되어 총 4회의 추출로 식물세포 내 paclitaxel은 대부분 회수 가능하였다.

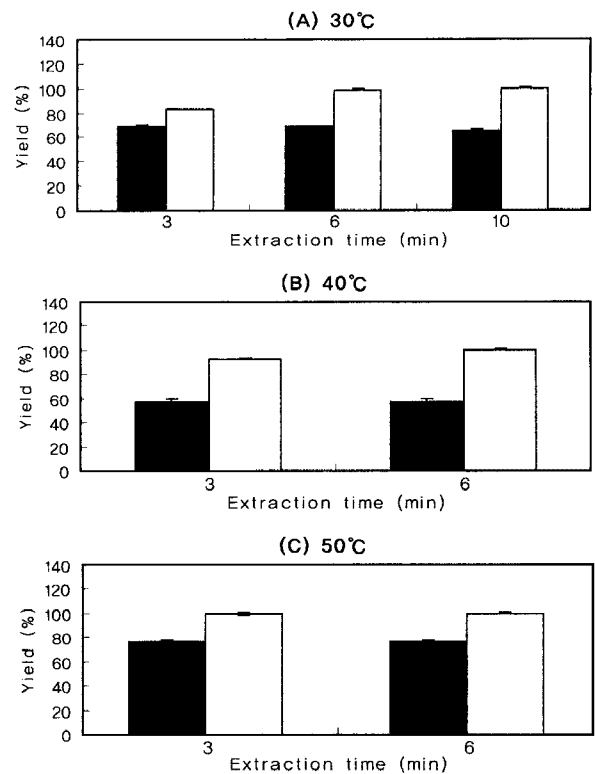
**Microwave-assisted extraction (MAE)에서 온도의 영향**

Microwave을 이용한 추출의 경우 최소한 상온 (25°C) 이상에서 추출 실험이 가능하였으며 또한 CSE 실험결과로부터 추출온도 40, 50°C에서는 추출시간 6 min 이상이면 paclitaxel이 분해되어 결국 MAE 실험 조건으로 30°C에서 3, 6, 10 min, 40, 50°C에서 3, 6 min으로 추출실험을 수행하였다.



**Figure 3.** Effect of extraction temperature on paclitaxel yield in microwave-assisted extraction (◆ : 30°C, ■ : 40°C, ▲ : 50°C).

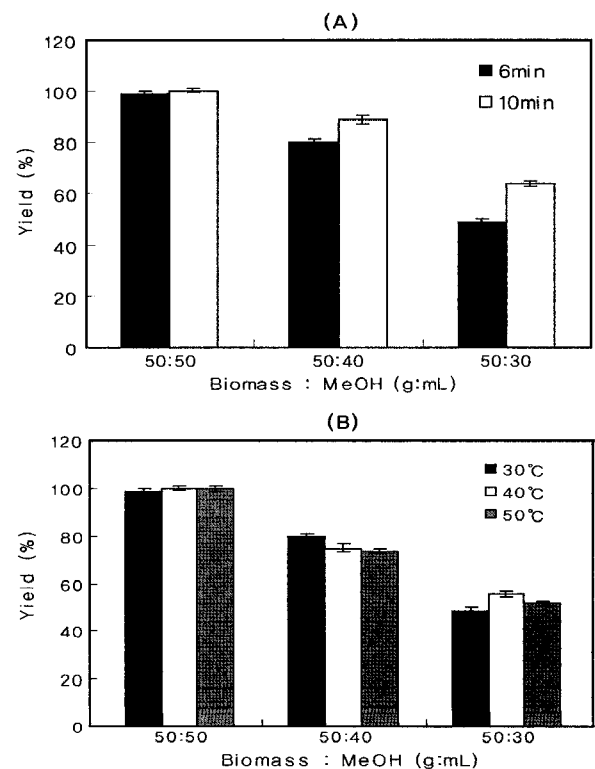
Fig. 3에서 보는 바와 같이 30, 40°C에서 추출시간 6 min, 1회 추출로 biomass로부터 대부분의 paclitaxel을 회수할 수 있음을 알 수 있었다. 50°C에서는 추출시간 3 min이면 biomass로부터 대부분의 paclitaxel을 회수할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 동일한 조건하에서 MAE가 얼마만큼의 높은 추출효율을 보였는지 알아보기 위해 CSE와 MAE의 1회 추출 수율을 비교하여 Fig. 4에 나타내었다. Biomass로부터 대부분의 paclitaxel을 회수 (>99%) 하기 위해 CSE 방법으로는 4회 추출해야하는 반면 MAE 방법은 1회 추출로 가능하여, 기존의 추출 방법에 비하여 microwave를 이용한 추출 공정이 높은 추출효율의 향상과 추출시간 단축, 그리고 에너지 절감 효과가 있음을 알 수 있었다.



**Figure 4.** Comparison of conventional solvent extraction (CSE) and microwave-assisted extraction (MAE) for recovery of paclitaxel from biomass (■ : first extraction using CSE, □ : first extraction using MAE).

**MAE에서 biomass/methanol 비율의 영향**

MAE 방법에서 사용되는 유기용매의 절감 효과를 알아보기 위하여 biomass/methanol의 비율을 변화시켜 실험을 수행하였다.



**Figure 5.** Effect of biomass/methanol ratio on paclitaxel yield in microwave-assisted extraction at constant extraction temperature, 30°C (A) and at constant extraction time, 6 min (B).

추출온도 30℃에서 biomass/methanol 비율을 각각 50/50 (w/v), 50/40 (w/v), 50/30 (w/v)으로 조건을 달리하여 실험한 결과 (Fig. 5A), biomass/methanol 비율이 50/50 (w/v), 즉 1/1 (w/v)에서 가장 높은 추출효율을 보였으며 methanol의 양을 더 줄일 경우 추출 시 혼합에 어려움이 있었다. 추출시간 6 min에서도 이와 마찬가지로 비율을 달리하여 실험한 결과 Fig. 5B에서 보는 바와 같이 biomass/methanol 비율이 50/50 (w/v), 즉 1/1 (w/v)에서 가장 높은 추출효율을 보였다. 결과적으로 biomass와 methanol의 비율은 50/50 (w/v), 즉 1/1 (w/v)이 가장 최적임을 알 수 있었다.

## 요 약

본 연구에서는 식물세포배양액에서 회수한 식물세포인 biomass로부터 항암제 paclitaxel을 효율적으로 회수하기 위해, microwave를 이용한 추출 (MAE) 방법을 도입하여 기존의 유기용매 추출 (CSE) 방법과 추출효율을 비교하였다. CSE 방법에서 추출 온도 25, 30℃에서는 추출시간 (3, 6, 10 min)에 대해 추출효율이 온도에 영향을 받지 않은 반면, 40, 50℃에서는 추출시간 10 min에서 paclitaxel 수율이 감소하는 경향을 보여 온도에 영향을 받음을 알 수 있었다. CSE 방법의 경우 총 4회의 추출로 식물세포 내 대부분의 paclitaxel을 회수 (>99%) 가능한 반면 MAE 방법의 경우 1회의 추출로 식물세포 내 대부분의 paclitaxel을 회수 (>99%) 가능하였다. MAE 방법이 CSE 방법보다 paclitaxel을 회수하는데 있어서 높은 추출효율, 공정시간 단축, 에너지 절감 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 MAE 공정에서 최적의 biomass/methanol의 비율은 1/1 (w/v)임을 알 수 있었다.

## 감 사

본 연구는 산업자원부 지정 공주대학교 자원재활용 신소재 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다. 또한 본 연구에 사용된 biomass는 (주)삼양제넥스로부터 제공 받았으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Kim, J. H. (2006), Paclitaxel : recovery and purification in commercialization step, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1-10.
2. Kim, J. H. (2007), Optimization of conditions of filtration and concentration of methanol extract for recovery of paclitaxel from plant cell culture, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **22**, 197-200.
3. 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.
4. Baloglu, E., and D.G. Kingston (1999), A new semisynthesis of paclitaxel from baccatin III, *J. Nat. Prod.* **62**, 1068-1071.
5. 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.
6. Kim, J. H., C. B. Lim, I. S. Kang, S. S. Hong, and H. S. Lee (2000), The use of a decanter for harvesting biomass from *Taxus* cell cultures, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 337-341.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Talebi, M., A. Ghassempour, Z. Talebpour, A. Rassouli, and L. Dolatyari (2004), Optimixation of the extraction of paclitaxel from *Taxus baccata* L. by the use of microwave energy, *J. Sep. Sci.* **27**, 1130-1136.
11. Ghassempour, A., M. Noruzi, M. Zandehzaban, Z. Talebpour, A. Y. Khosroshahi, N. M. Najafi, M. Valixadeh, T. Poursaberi, H. Hekmati, H. Naghdibadi and H. Y. Aboul-Enein (2008), Purification of paclitaxel isolated from *Taxus baccata* L. cell culture by microwave-assisted extraction and two-dimensional liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **31**, 382-394.
12. Mandal, V., Y. Mohan and S. Hemalatha (2007), Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal research, *Phcog. Rev.* **1**, 7-18.
13. 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.
14. Hong, S. S., B. K. Song, J. H. Kim, C. B. Lim, H. S. Lee, K. W. Kim, I. S. Kang and H. B. Park (1999), Method for purifying taxol from *Taxus* biomass, U.S. Patent, 5,900,979.