

식물세포배양으로부터 Paclitaxel 분리를 위한 액-액 추출 조건의 최적화

김진현

공주대학교 화학공학부

Optimization of liquid-liquid extraction conditions for paclitaxel separation from plant cell cultures

Jin-Hyun Kim

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

Abstract In this study, the process parameters of liquid-liquid extraction were optimized to obtain a high purity and yield of paclitaxel in a pre-purification step. The optimal solvent ratio (methylene chloride/concentrated methanol extract ratio), extraction times, mixing time, and standing time for liquid-liquid extraction were 0.28 (v/v), 3(times), 30 min, and 40 min, respectively. The polar impurities from the biomass extraction were efficiently removed by liquid-liquid extraction. The complete concentration of liquid-liquid extract by rotary evaporator was reliable enough to obtain a high purity and yield of paclitaxel for subsequent purification steps.

Keywords: paclitaxel, separation, liquid-liquid extraction, process parameters, optimization

서론

Paclitaxel (화학식 : $C_{47}H_{51}NO_{14}$, 분자량 : 853.9, CAS number : 33069-62-4)은 현재 가장 많이 사용되고 항암제 중의 하나로 주목 (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) 치료에 대해 미국 FDA (U.S. Food and Drug Administration) 허가를 취득하였다. 세계 시장규모는 3조원 (2003년 기준), 국내 시장규모는 553억원 (2003년 기준) 정도이며 현재 항암제 중 시장규모 1위, 주요 항암화학치료제 시장의 22% 정도를 점유하고 있다. 또한 류마티스성 관절염, 알츠하이머 치료 등에 적용증이 계속 확대되고 있으며, 여러 다른 약물들과의 복합처방에 관한 임상시험이 진행 중에 있어 수요는 계속 늘어날 전망이다(1). Paclitaxel의 주요 생산 방법에는 주목나무에서 직접

추출 (extraction)하는 방법(2), 주목나무의 잎에서 전구체 (예, baccatin III, 10-deacetylbaaccatin III, 10-deacetylpaclitaxel)를 얻어 side chain을 화학적으로 결합하는 반합성 (semi-synthesis) 방법(3), 주목나무에서 callus를 유도하고 종균 배양 (seed culture)을 거쳐 주배양기 (main bioreactor)에서 식물세포를 배양하여 얻는 방법(4, 5) 등이 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.

식물세포 배양에 의하여 생산된 paclitaxel은 대부분 biomass 내에 포함되어 있으며(6), 식물세포배양으로부터 항암물질 paclitaxel의 생산은 여러 단계의 추출 및 정제 공정으로 이루어져 있다(7-9). 경제적인 관점에서 우선 추출 공정에서 높은 수율로 paclitaxel을 분리/회수하는 것이 매우 중요하다. 보고된 문헌(4, 10)에 의하면, 추출 공정은 먼저 메탄올을 이용한 biomass 추출 후 추출액에 존재하는 다량의 극성불순물 (polar impurity)은 액-액 추출 (liquid-liquid extraction)에 의해 제거하는 것이 일반적이다. 여러

*Corresponding author

Tel: +82-41-850-8642, Fax: +82-41-858-2575
e-mail: jinhyun@kongju.ac.kr

가지 유기용매 (methylene chloride, chloroform, diethylether, hexane/methylene chloride 등)를 이용하여 액-액 추출 경향을 조사한 결과 methylene chloride의 경우 가장 높은 paclitaxel 순도 및 수율을 얻어 액-액 추출에 가장 효과적임을 알 수 있다. 하지만 액-액 추출 공정에서의 주요 공정 변수인 유기용매 첨가량, 추출횟수, 혼합시간, 상 분리에 소요되는 정체시간 등에 대한 정보는 매우 부족한 실정이다. 또한 액-액 추출 후 추출액의 농축 정도에 대한 정보 또한 미흡하여 대량 추출공정 개발에 한계가 있다. 따라서 본 연구에서는 액-액 추출을 통하여 식물세포배양으로부터 항암물질 paclitaxel을 효율적으로 분리할 수 있는 최적의 조건을 선정하고자 하며 궁극적으로 공정 변수를 최적화하고자 한다. 이러한 연구결과는 식물세포배양으로부터 항암물질 paclitaxel을 대량으로 추출하는데 상당히 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

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 CDFP)를 사용하여 회수하였다. 회수한 식물세포와 세포조각을 합하여 biomass라 하였다. 본 연구에 사용된 biomass는 (주)삼양제넥스로부터 제공 받았다.

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 μ L이며, UV (227 nm) detector를 사용하였다(4). Paclitaxel 표준물질은 Sigma-Aldrich 제품 (순도 : 95%)을 사용하였다.

Biomass 추출 및 액-액 추출 (liquid-liquid extraction)

식물세포배양액으로부터 회수한 biomass를 메탄올을 이용하여 실온에서 회분식으로 4회 추출하였다(4). 메탄올과 biomass 혼합비는 1/1 (g biomass/mL methanol)로 하였으며 추출시간은 1회 10분으로 하였다. Biomass 추출 후 메탄올 용액을 rotary evaporator (760 mmHg, 40°C)에서 원액의 30%까지 농축하였다. 액-액 추출은 농축된

메탄올 용액에 methylene chloride을 첨가하고, 혼합하여 정체시켜 상 분리 (상층 : 메탄올 농축액 층, 하층 : methylene chloride 용액 층)를 유도하였다. 액-액 추출에서의 주요 공정 변수인 methylene chloride 첨가량, 추출횟수, 혼합시간, 정체시간을 각각 최적화 하였다. 액-액 추출 후 상 분리로부터 paclitaxel이 포함되어 있는 하층 (methylene chloride 용액 층)을 회수하고 rotary evaporator (760 mmHg, 30°C)에서 농축하고 진공건조 (30°C, overnight)하여 HPLC 분석을 통하여 paclitaxel 순도와 수율을 계산하였다.

액-액 추출액의 농축 정도에 따른 영향 확인

액-액 추출 후 추출액의 농축방법 (농축정도)에 따른 영향을 확인하기 위하여 추가로 흡착제 처리 (adsorbent treatment)와 침전 (precipitation)을 수행하였다. 액-액 추출액을 여러 가지 조건 (조건1 : 액-액 추출액을 rotary evaporator로 완전 농축한 후에 진공건조를 통하여 완전히 건조한 경우, 조건2 : 액-액 추출액을 rotary evaporator로 완전히 농축한 경우, 조건3 : 액-액 추출액을 rotary evaporator로 원액의 1/10로 부분 농축한 경우, 조건4: 액-액 추출액을 rotary evaporator로 원액의 1/5로 부분 농축한 경우)으로 농축 또는 건조하였다. 액-액 추출액의 농축은 rotary evaporator (760 mmHg, 30°C)를 이용하였으며 추가적인 건조는 vacuum dryer (30°C, overnight)에서 수행하였다. 여러 조건으로 농축 또는 건조된 시료에 일정량의 흡착제 (active clay)를 첨가 (액-액 추출액의 건조물/흡착제=1/1, w/w)하여 40°C에서 30 min동안 반응시킨 후 여과하였다. 건조된 시료의 경우 흡착제 처리를 위해 일정량의 methylene chloride를 첨가하여 녹인 후 흡착제 처리를 수행하였다. 흡착제 처리 후 여과액을 hexane에 첨가 (여과액/hexane = 1/10, v/v)하여 침전을 유도하고 침전 후 여과를 통하여 얻어진 침전물을 건조하고 HPLC 분석을 통하여 paclitaxel 순도와 수율을 분석하여 액-액 추출액의 농축 정도의 영향을 확인하였다.

결과 및 고찰

식물세포 배양에 의하여 생산된 paclitaxel은 대부분 biomass에 내포되어 있으며(6), 식물세포배양으로부터 항암물질 paclitaxel의 생산을 위해서는 먼저 유기용매를 이용하여 biomass 추출이 이루어지게 된다. 유기용매 (메탄올)를 이용한 biomass 추출물에는 다량의 극성불순물(polar impurity)이 포함되어 있는데 methylene chloride를 이용한 액-액 추출 공정에 의해 이러한 극성불순물을 매우 효과적으로 제거할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). 액-액 추출 공정에서의 주요 공정 변수인 유기용매 첨가량, 추출횟수, 혼합시간, 상 분리에 소요되는 정체시간 선정은 식물세포배양으로부터 paclitaxel을 대량으로 추출하는데 매우

중요하다. 주요 공정 변수를 최적화하기 위해 유기용매 첨가량 (methylene chloride/concentrated methanol extract = 0.20~0.32, v/v), 추출횟수 (1~5회), 혼합시간 (10~50 min), 정체시간 (10~80 min)을 각각 달리하여 실험을 수행하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 액-액 추출을 위한 최소한의 유기용매 (methylene chloride) 사용량, 추출시간, 높은 paclitaxel 수율 (>95%) 측면에서 methylene chloride/concentrated methanol extract 비는 0.28 (v/v), 추출횟수는 3회, 혼합시간은 30 min, 정체시간은 40 min이 가장 적합함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 액-액 추출을 위한 유기용매 첨가량 0.25 (v/v), 추출횟수 3회, 혼합시간 30 min으로 보고한 Pyo 등(11), Jeon과 Kim(12)의 보고와 비슷한 결과를 보임을 알 수 있었다. 또한 액-액 추출 후 추출액의 농축 정도가 후속 공정에 미치는 영향을 조사하였다.

Table 1. Effect of solvent ratio, extraction times, mixing time, and standing time on the purity and yield of paclitaxel in liquid-liquid extraction

Solvent ratio*	Extraction times	Mixing time (min)	Standing time (min)	Purity (%)	Yield (%)
0.20	3	30	40	8.57	92.50
0.24	2	20	20	7.79	91.44
0.24	2	20	60	8.15	91.42
0.24	2	40	20	8.48	93.19
0.24	2	40	60	8.70	93.15
0.24	4	20	20	8.79	91.52
0.24	4	20	60	8.41	94.34
0.24	4	40	20	8.93	93.24
0.24	4	40	60	8.81	94.49
0.28	1	30	40	8.91	89.65
0.28	3	10	40	8.49	92.11
0.28	3	30	10	8.63	94.36
0.28	3	30	40	8.79	96.51
0.28	3	30	80	8.84	98.50
0.28	3	50	40	8.98	97.72
0.28	5	30	40	8.38	98.15
0.32	2	20	20	8.16	92.41
0.32	2	20	60	8.60	92.34
0.32	2	40	20	8.56	94.12
0.32	2	40	60	8.68	94.73
0.32	4	20	20	9.08	94.47
0.32	4	20	60	9.26	93.00
0.32	4	40	20	8.77	94.92
0.32	4	40	60	9.54	97.49
0.36	3	30	40	9.34	96.37

*Methylene chloride/concentrated methanol extract ratio for liquid-liquid extraction.

네 가지 종류의 농축 조건 (조건1 : 액-액 추출액을 rotary evaporator로 완전히 농축 한 후에 30°C에서 진공건조를 통하여 완전 건조한 경우, 조건2 : 액-액 추출액을 rotary evaporator로 완전히 농축한 경우, 조건3 : 액-액 추출액을 rotary evaporator로 원액의 1/10로 부분 농축한 경우, 조건4 : 액-액 추출액을 rotary evaporator로 원액의 1/5로 부분 농축한 경우)에 따른 후속 공정 (hexane 침전 공정)

에서의 paclitaxel 순도 및 수율을 Fig. 2에 나타내었다. 네 가지 방법에 따라 완전 건조, 완전 농축, 부분 농축된 시료를 이용하여 흡착제 처리 및 hexane 침전을 수행한 결과, 조건1에서는 hexane 침전물의 순도 33% (수율 : 95%), 조건2에서는 hexane 침전물의 순도 33% (수율 : 96%), 조건3에서는 hexane 침전물의 순도 24% (수율 : 99%), 조건4에서는 hexane 침전물의 순도 21% (수율 : 99%)의 paclitaxel을 각각 얻을 수 있었다. 부분 농축의 경우 완전 건조 및 완전 농축 조건에 비해 후속공정 (흡착제 처리 및 hexane 침전 공정)에서의 불순물 제거에 상대적으로 어려움이 있음을 알 수 있었다. 따라서 액-액 추출 후 농축조건으로는 후속공정에서의 높은 순도의 paclitaxel 뿐만 아니라 작업의 용이성 측면에서 조건2 (액-액 추출액을 rotary evaporator로 완전히 농축한 경우)가 가장 바람직함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 액-액 추출액을 완전히 농축하여 후속 공정에 사용한 Pyo 등(11)의 보고와 비슷한 결과를 보였다.

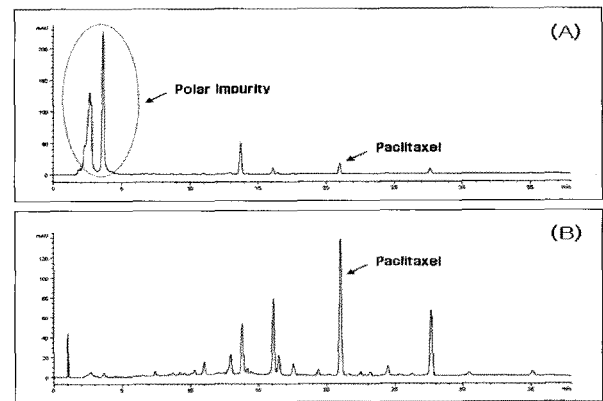


Fig. 1. Chromatogram of crude extract before (A) and after (B) liquid-liquid extraction analyzed using RP-HPLC. The methylene chloride/concentrated methanol extract ratio, extraction times, mixing time, and standing time were 0.28 (v/v), 3 (times), 30 min, and 40 min, respectively.

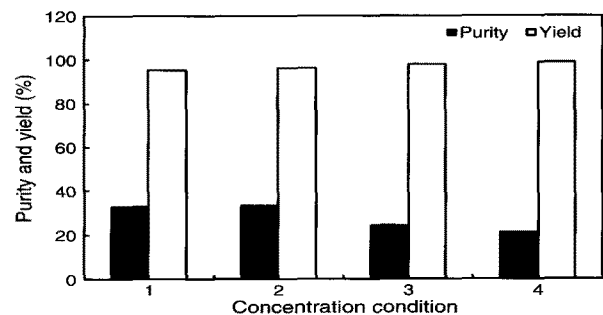


Fig. 2. Effect of concentration method on the purity and yield of paclitaxel in subsequent purification step (1: complete concentration and drying by rotary evaporator and vacuum dryer, 2: complete concentration by rotary evaporator, 3: partial concentration of liquid-liquid extract until 10% of original volume by rotary evaporator, 4: partial concentration of liquid-liquid extract until 20% of original volume by rotary evaporator).

요약

본 연구에서는 식물세포배양으로부터 항암물질 paclitaxel 을 고 순도, 고 수율로 분리 가능한 액-액 추출 공정에서의 주요 공정 변수들을 최적화 하였다. 액-액 추출을 위한 최적의 유기용매 (methylene chloride) 첨가량, 추출횟수, 혼합시간, 정제시간은 각각 0.28 (v/v), 3 (times), 30 min, and 40 min임을 알 수 있었다. 액-액 추출 공정은 특히 메탄올을 이용한 biomass 추출물에 포함되어 있는 다량의 극성불순물을 제거하는데 매우 효과적이었다. 또한 액-액 추출 후 농축조건으로는 후속공정에서의 높은 순도의 paclitaxel 뿐만 아니라 작업의 용이성 측면에서 액-액 추출액을 rotary evaporator로 완전히 농축하는 것이 가장 바람직함을 알 수 있었다.

감사

본 연구는 중소기업청의 산학공동기술개발지원사업에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

접수 : 2009년 3월 16일, 게재승인 : 2009년 3월 31일

REFERENCES

1. Kim, J. H. (2006), Paclitaxel : recovery and purification in commercialization step, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1-10.
2. 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.
3. Baloglu, E. and D. G. Kingston (1999), A new semisynthesis of paclitaxel from baccatin III, *J. Nat. Prod.* **62**, 1068-1071.
4. Hyun, J. E. and J. H. Kim (2008), Microwave-assisted extraction of paclitaxel from plant cell cultures, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **23**, 281-284.
5. Kolewe, M. E., V. Gaurav, and S. C. Roberts (2008), Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology, *Mol. Pharm.* **5**, 243-256.
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., H. K. Choi, S. S. Hong, and H. S. Lee (2001), Development of high performance liquid chromatography for paclitaxel purification from plant cell cultures, *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 204-210.
8. 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.
9. Kim, J. H., I. S. Kang, H. K. Choi, S. S. Hong, and H. S. Lee (2002), A novel pre-purification for paclitaxel from plant cell cultures, *Process Biochem.* **37**, 679-682.
10. 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.
11. Pyo, S. H., H. B. Park, B. K. Song, B. H. Han, and J. H. Kim (2004), A large-scale purification of paclitaxel from plant cell cultures of *Taxus chinensis*, *Process Biochem.* **39**, 1985-1991.
12. Jeon, K. Y. and J. H. Kim (2008), Effect of surfactant on the micelle process for the pre-purification of paclitaxel, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **23**, 557-560.