

식물세포배양으로부터 Paclitaxel 정제를 위한 메조다공성 실리카의 기공크기 영향

오현정, 정경열*, 김진현*

Effect of Pore Size of Mesoporous Spherical Silica for the Purification of Paclitaxel from Plant Cell Cultures

Oh, Hyeon-Jeong, Kyeong Youl Jung*, and Jin-Hyun Kim*

접수: 2013년 5월 2일 / 게재승인: 2013년 6월 12일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Four types of mesoporous spherical silica adsorbents with different physical properties were prepared by spray pyrolysis and were used for the purification of the anti-cancer agent paclitaxel from plant cell cultures. Pore size had a greater effect on the removal of plant-derived impurities during the pre-purification of paclitaxel compared with surface area and pore volume. An appropriate pore diameter (~9.07 nm) was required to achieve the highest purity (~46.1%) and yield (~82.3%) of paclitaxel. These results were confirmed by HPLC analysis of the adsorbent after treatment and Thermogravimetric analysis of the organic substances bonded to the adsorbent.

Keywords: Paclitaxel, Purification, Mesoporous silica, Adsorbent, Pore size

1. 서론

Paclitaxel은 주목나무 (yew tree)의 표피에서 발견된 diterpe-

noid 계열의 항암물질로 난소암, 유방암, 카포시 종양 (Kaposi's sarcoma) 및 비소세포성 폐암 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 치료용으로 사용되고 있다 [1]. Paclitaxel의 주요 생산 방법에는 주목나무에서 직접 추출하는 방법 [2], 주목나무 앞에서 전구체를 얻어 반합성하는 방법 [3], 주목나무에서 callus를 유도하여 식물세포를 배양하는 방법 [4,5]이 있다. 식물세포배양 방법은 기후, 환경 등의 외부 인자에 영향을 받지 않고 생물반응기에서 일정한 품질의 paclitaxel을 안정적으로 대량 생산할 수 있다. 식물세포배양으로부터 paclitaxel의 분리 및 정제는 여러 단계의 추출 및 정제 공정을 거쳐 높은 순도 (> 98%)의 제품을 생산하게 된다. 일반적으로 분리 및 정제 과정은 원료인 바이오매스 (paclitaxel을 함유한 식물세포)로부터 paclitaxel을 먼저 유기용매로 추출하고, 전처리 공정을 거쳐 최종 정제를 통하여 제품을 생산하는 공정으로 이루어져 있는데, 이 과정에서 특히 전처리 공정은 최종 정제 비용에 많은 영향을 미친다 [6-8]. 따라서 전처리 공정을 통하여 시료의 순도를 가능하면 높여 주어야 최종 정제, 특히 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용한 정제에서의 비용을 줄일 수 있다.

전처리 공정으로 흡착제 처리 및 침전에 의해 고순도의 paclitaxel을 얻을 수 있는 방법이 보고되어 있다 [9]. 식물유래 타르 및 왁스 성분을 흡착제 처리로 제거한 후에 침전 공정에 의하여 높은 순도 (> 50%)의 paclitaxel을 얻을 수 있어 매우 간단하고 편리하게 전처리 할 수 있는 방법이다. 타르 및 왁스 성분은 paclitaxel의 분리/정제에 많은 악영향을 미치는데, 특히 HPLC 정제 공정에서 칼럼의 충전제 수명을 단축시킬 뿐만 아니라 처리량을 감소시키고 많은 양의 유기용매

공주대학교 화학공학부
Department of Chemical Engineering, Kongju National University,
Cheonan 330-717, Korea
Tel: +82-41-521-9365, Fax: +82-41-554-2640
e-mail: kyjung@kongju.ac.kr

Tel: +82-41-521-9361, Fax: +82-41-554-2640
e-mail: jinhyun@kongju.ac.kr

사용을 유발함으로써 전 처리 공정에서 반드시 제거되어야 한다 [1]. 상용흡착제인 sylopute의 주요성분인 실리카를 이용하여 흡착제 처리를 수행할 경우 식물유래 타르 및 왁스 성분 제거에 효과적이었다 [10]. 또한 실리카 흡착제의 물리적 특성 중 기공크기가 증가할수록 흡착제 처리 효과가 우수하였다. 하지만 실리카 흡착제의 최적 기공크기는 제시되지 못하였으며 기공크기에 따른 흡착 양상에 대한 구체적인 분석 또한 매우 미흡하였다. 따라서 본 연구에서는 분무열분해 공정에 의해 물리적 특성 (표면적, 기공부피, 기공지름)이 다른 메조다공성 실리카를 제조하여 식물세포배양 유래 paclitaxel 정제에 가장 효과적인 실리카 흡착제의 기공크기를 제안하고 기공크기에 따른 HPLC 및 TGA 분석을 통하여 paclitaxel 및 불순물의 흡착 양상을 조사하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 식물세포배양

본 실험에 사용된 식물세포배양액은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주 (cell line)를 이용하여 배양하였다. 현탁 (suspension) 세포는 수정된 Gamborg's B5 배지 [11]에서 24°C, 150 rpm, 암조건으로 배양하였다. 세포 배양은 2주마다 새로운 배지로 갈아주었으며 생산과 배양을 연장시키기 위해 7일과 21일째 되는 날에 1~2%의 maltose를 첨가해 주고 elicitor로서 배양 초기에 4 mM의 AgNO₃를 첨가해 주었다 [12]. 식물세포배양 후 배양액으로부터 decanter (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter)와 고속원심분리기 (α -Laval, BTPX205GD-35CDEEP)를 이용하여 식물세포(바이오매스)를 연속 조업으로 회수하였다. 본 연구에 사용된 바이오매스는 (주)삼양제넥스로부터 제공받았다.

2.2. 흡착제 처리를 위한 시료준비

식물세포배양액으로부터 회수한 바이오매스와 메탄올의 비율을 1:1 (w/v)로 하여 실온에서 30분 동안 추출하여 여과하고, 바이오매스에 새로운 메탄올을 첨가하여 동일한 방법으로 4회 반복하여 추출을 수행하였다 [9]. 추출 여액을 모아 농축기 (CCA-1100, EYELA, Japan)에서 40°C, 감압상태에서 농축 (원액의 30%)하고 농축액에 메틸렌 클로라이드를 첨가 (농축액의 25%)하고 실온에서 30분 동안 액-액 추출을 3회 반복 수행하였다. 액-액 추출 후 상 분리 (phase separation)를 통해 극성불순물은 상층인 메탄올 층으로 제거하고, paclitaxel은 하층인 메틸렌 클로라이드 층으로 회수하여 실온, 감압상태에서 농축/건조하였다. 건조된 시료를 흡착제 처리에 사용

하였다 [13]. 흡착제 처리에 사용된 시료의 순도는 6.7%이었다.

2.3. 메조다공성 실리카 흡착제 제조

분무열분해 (spray pyrolysis) 공정에 의해 메조다공성 실리카를 제조하였다. 실리카 전구체로 tetraethylorthosilicate (TEOS, Adrich, 97%)를 사용하였고, 기공 형성을 위한 주형제로는 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, Adrich), Pluronic P123 (EO₂₀PO₇₀EO₂₀, Adrich) 및 polystyrene (PS) 나노입자를 사용하였다. 크기가 다른 PS 나노 입자는 emulsion-free 중합법으로 제조하였고 평균 입자 크기는 18.7 nm와 35.0 nm였다. 분무용액은 500 mL 증류수에 5 mL HCl을 넣은 후 TEOS를 녹이고 이 용액에 계면활성제 혹은 PS 나노 입자를 첨가하여 제조하였다. 실리카 전구체의 전체 농도는 0.2 M로 고정하였다. 평균 기공크기 4.92 nm (silica I)는 CTAB과 P123을 혼합하여 제조하였는데, 이때 CTAB/P123/Si 몰비는 0.2/0.03/1.0 이었고, 기공 크기가 9.07 nm (silica II)는 P123을 TEOS 몰당 0.07몰 사용하여 합성하였고, 18.7 nm (silica III)와 35.0 nm (silica IV)은 PS 나노입자를 사용하여 제조하였고 이 때 PS/SiO₂ = 4 (무계비)로 고정하였다. 메조다공성 실리카 입자는 제조한 분무용액을 초음파 액적 발생장치 (1.7 MHz)를 이용하여 미세 액적으로 만든 다음 분무열분해 장치를 이용하여 건조/열분해시켜 제조하였다. 분무열분해 장치의 반응기는 건조부와 열분해 구역으로 나누어져 있으며 각각 직경 55 mm, 길이는 1200 mm인 석영관을 이용하였다. 건조부의 온도는 350°C, 반응부의 온도는 600°C로 각각 유지하였다. 분무열분해되어 얻어진 실리카 분말은 550°C (승온 속도: 1°C/min)에서 후 열처리하여 잔류할 수 있는 유기물을 완전히 제거하였다. 후 열처리된 메조다공성 실리카의 표면적은 질소 흡착으로 Brunauer-Emmett-Teller(BET) 식 [14]을 이용하여 계산하였고, 기공 부피는 상대압력 P/P₀ = 0.995에서 흡착된 질소 부피를 이용하였으며, 평균 기공크기는 질소 탈착 등온선을 이용하여 Barrett-Joyner-Halenda (BJH) 방법을 이용하여 측정하였다. 실험에 사용된 메조다공성 실리카 (silica I, silica II, silica III, silica IV)의 특성치는 Table 1에 나타내었다.

2.4. 흡착제 처리 및 핵산 침전

건조된 crude extract를 메틸렌 클로라이드에 20% (v/w) 비율로 녹이고 흡착제인 메조기공 실리카 (silica I, silica II, silica III, silica IV)를 건조된 crude extract 대비 50% (w/w) 비율로 첨가하여 40°C에서 30분 동안 교반하며 반응시킨 후 여과하였다. 여과액은 30°C, 감압상태에서 건조하여 핵산 침전에 이용하였다. 흡착제 처리 후 건조된 시료를 메틸렌 클로라이드

Table 1. Physical properties of silica I, silica II, silica III and silica IV

Silica	Surface area (m ² /g)	Pore volume (cm ³ /g)	Pore diameter (nm)
Silica I	955	1.47	4.92
Silica II	522	1.45	9.07
Silica III	204	1.13	18.70
Silica IV	83	1.71	35.00

에 녹여 헥산에 떨어뜨려 침전을 유도하여 비극성 불순물을 제거하였다 (메틸렌 클로라이드/헥산 = 1/10, v/v). 헥산 침전 후 여과를 통하여 얻어진 침전물을 35°C에서 24시간 진공 건조 하였다. 건조된 침전물의 순도와 수율을 측정 (HPLC 분석)하여 흡착제 처리 효과를 확인하였다.

2.5. Paclitaxel 분석

Paclitaxel 함량 분석을 위해 HPLC system (Waters, USA)과 Capell Pak C₁₈ (250×4.6 mm, Shiseido, Japan) 칼럼을 사용하였다. 이동상은 아세트니트릴과 증류수 혼합용액 (35/65~65/35, v/v, gradient mode)을 유속 1.0 mL/min으로 흘려주었다. 시료 주입량은 20 mL이며 227 nm에서 UV에 의해 검출하였다. HPLC 분석은 표준정량곡선을 이용하였으며 표준시료는 Sigma-Aldrich 제품(순도: 97%)을 사용하였다 [15].

2.6. Thermogravimetric analysis (TGA) 분석

TGA (SDTQ600, Shimadzu, Japan)를 사용하여 흡착제 처리 후 흡착제에 붙어있는 불순물 (유기물)의 양을 측정하였다. 온도를 변화시키기에 따른 무게의 변화를 측정하여 유기물의 양을 정량 분석하였으며 공기를 주입하고 온도는 800°C까지 변화시켰다.

3. 결과 및 고찰

분무열분해 공정에 의해 물리적 특성 (표면적, 기공부피, 기공지름)이 다른 네 종류의 메조다공성 실리카 (silica I, silica II, silica III, silica IV)를 제조하여 흡착제 처리 및 헥산 침전을 수행하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 silica I (기공지름: 4.92 nm), silica II (기공지름: 9.07 nm) 순으로 기공지름이 증가할수록 paclitaxel 순도와 수율이 증가하다 silica III (기공지름: 18.7 nm)에서 다시 순도와 수율이 감소하였다. Silica II를 사용하였을 때 가장 높은 순도(~46.1%)와 수율(~82.3%)의 paclitaxel을 얻을 수 있었다. 흡착제에 붙은 유기물의 경

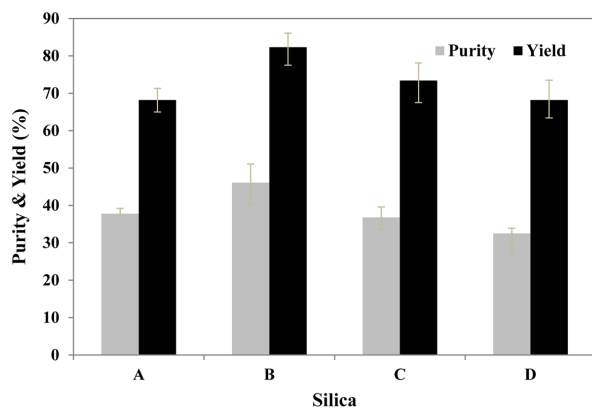


Fig. 1. Effect of adsorbent on the purity and yield of paclitaxel in hexane precipitation. (A) Silica I, (B) Silica II, (C) Silica III, (D) Silica IV.

향을 확인하기 위하여, 흡착제 처리 후 여과하여 흡착제를 회수하고 이를 메탄올로 세척하여 HPLC 분석을 수행하였다 [16]. Fig. 2에서 보는 바와 같이 silica I, silica III, silica IV에 비하여 silica II에서 많은 유기물이 흡착/제거됨을 알 수 있었다. 반면 silica I의 경우 paclitaxel 피크가 높게 나타나 상대적으로 많은 양의 paclitaxel이 흡착됨을 알 수 있었다. Silica I (기공지름: 4.92 nm)의 경우, space-filling model [17]에 근거한 paclitaxel 분자 크기 (1.0×1.5×2.0 nm)를 고려할 때 충분히 흡착제 기공 내로 확산될 수 있는 반면 분자 크기가 상대적으로 큰 불순물들은 기공 내로 확산되지 못하여 paclitaxel 피크는 크게 나타난 반면 다른 불순물들의 피크는 silica II에 비해 작게 나타난 것으로 판단된다. 즉, Fig. 3에서 보는 바와 같이 silica I의 경우 상대적으로 표면적은 매우 큰 반면 기공 크기가 작아 분자 크기가 큰 불순물들은 기공 내로 확산되지 못하여 흡착제의 기공 내 표면적을 충분히 활용하지 못하는 반면 silica II, silica III, silica IV는 상대적으로 큰 기공크기로 흡착제의 표면적을 충분히 활용하는 것으로 판단된다. 또한 silica III, silica IV의 경우 silica II에 비해 기공크기는 크나 표면적이 상대적으로 매우 작아 paclitaxel뿐만 아니라 불순물들이 많이 흡착되지 못하는 것으로 사료된다. Silica II의 경우 적절한 기공크기와 높은 표면적으로 다른 실리카들 (silica III, silica IV)에 비해서 paclitaxel 뿐만 아니라 식물유래 타르 및 왁스 성분과 같은 많은 종류의 불순물들이 효과적으로 제거되어 후속공정인 헥산 침전의 효율 (paclitaxel 순도, 수율)을 향상시키는 것으로 판단된다. 흡착제에 붙은 유기물의 양을 정량하기 위해 TGA 분석을 수행하였다 [10]. Fig. 4에서 보는 바와 같이 흡착제에 붙은 유기물의 양이 silica I (13.4 wt%), silica II (14.2 wt%), silica III (8.3 wt%), silica IV (3.1 wt%) 순으로 나타나 silica II에 가장 많은 유기물 (타르 및 왁스 성분 포함)이 흡착/제거됨을 정량적으로 확인할 수 있었다. 흡착제 silica II에 붙은 유기물의 무게는 350°C 근처에서 급격하게 감소하였으며 그 이후에는 500°C까지 완만하게 감소하였다 [10]. 이러한 결과로부터 실리카 흡착제의 물리적

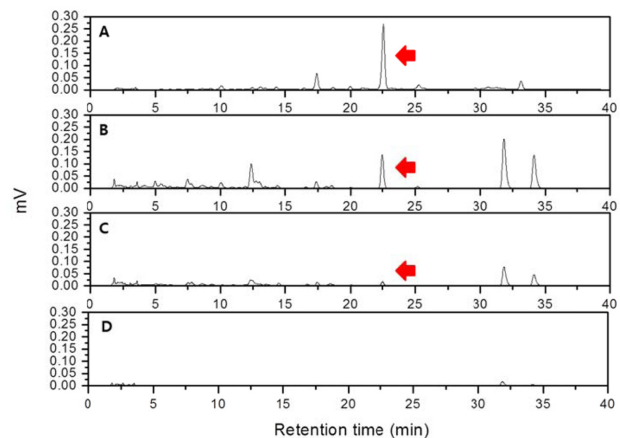


Fig. 2. HPLC chromatograms of adsorbent washing solution after adsorbent treatment. (A) silica I, (B) silica II, (C) silica III, (D) silica IV. The arrow indicates the position of paclitaxel.

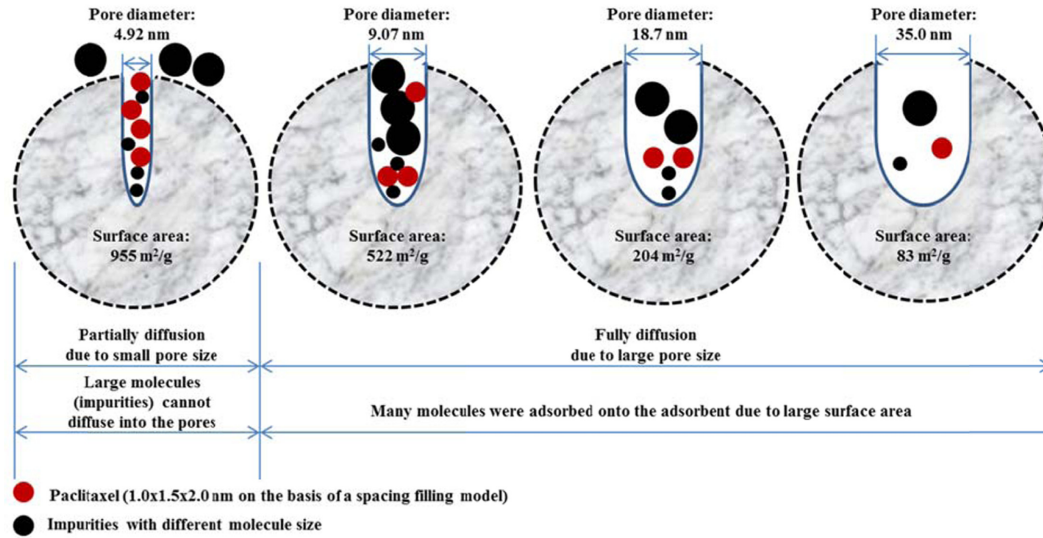


Fig. 3. A mechanism proposed to explain the adsorbing behavior of paclitaxel and impurities into the pores of silica adsorbents with different pore size.

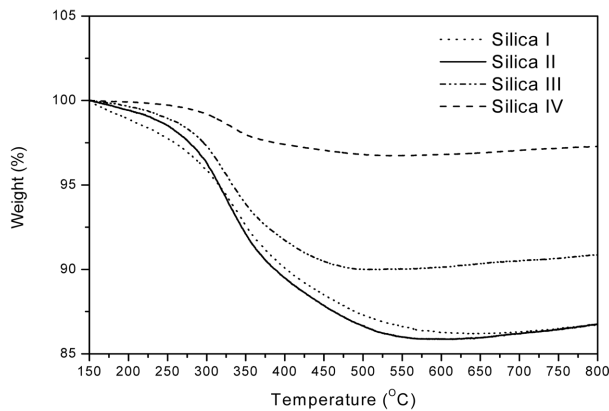


Fig. 4. TGA curves of four types of silica after adsorbent treatment.

특성에서 표면적과 기공부피 보다는 기공크기 (기공지름)이 흡착제 처리 효과에 많은 영향을 미침을 알 수 있었다. 특히 적절한 기공크기 (기공지름: ~9.07 nm)에서 식물유래 타르 및 왁스 성분을 포함한 불순물을 제거하는데 가장 효과적임을 알 수 있었다. 적절한 기공크기에서 불순물들이 효과적으로 기공 내부로 확산되어 흡착 제거되는 것으로 판단된다. 이러한 연구 결과는 활성탄을 이용하여 타르 성분을 효과적으로 제거하기 위해서는 적당한 기공크기의 활성탄이 요구된다는 기존 문헌 [18] 보고와 일치하는 것으로, 불순물 (타르 성분)이 흡착제에 효과적으로 흡착되기 위해서는 기공크기가 매우 중요한 역할을 하기 때문이다.

4. 요약

분무열분해 공정에 의해 물리적 특성이 다른 네 종류의 메조

다공성 실리카를 제조하여 식물세포배양 유래 항암물질 paclitaxel 정제에 사용하였다. 실리카 흡착제의 물리적 특성에서 표면적과 기공부피 보다는 기공크기 (기공지름)이 흡착제 처리 효과에 많은 영향을 미침을 알 수 있었다. 특히 적절한 기공지름 (~9.07 nm)에서 가장 높은 순도 (~46.1%)와 수율 (~82.3%)의 paclitaxel을 얻을 수 있었다. 이러한 불순물 (타르 및 왁스 성분 포함) 제거 효과는 흡착제 처리 후 흡착제를 메탄올로 세척한 시료의 HPLC 분석 결과와 흡착제에 붙은 유기물의 TGA 정량 분석 결과로도 확인할 수 있었다.

감사

본 연구는 한국연구재단 중견연구자지원사업 (과제번호: 2011-0010907)에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Kim, J. H. (2006) Paclitaxel: recovery and purification in commercialization step. *Korean 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. Georgiev, M. I., J. Weber, and A. Maciuk (2009) Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83:809-823.
5. Kolewe, M. E., V. Gaurav, and S. C. Roberts (2008) Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell cul-

- ture technology. *Mol. Pharm.* 5: 243-256.
6. Kang, I. and J. H. Kim (2012) Effect of reactor type on the purification efficiency of paclitaxel in the increased surface area fractional precipitation process. *Sep. Purif. Technol.* 99: 14-19.
 7. Lee, J. Y. and J. H. Kim (2012) Evaluation of the effect of crude extract purity and pure paclitaxel content on the increased surface area fractional precipitation process for the purification of paclitaxel. *Process Biochem.* 47: 2388-2397.
 8. Sim H. A., J. Y. Lee, and J. H. Kim (2012) Evaluation of a high surface area acetone/pentane precipitation process for the purification of paclitaxel from plant cell cultures. *Sep. Purif. Technol.* 89: 112-116.
 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 plant cell cultures of *Taxus chinensis*. *Process Biochem.* 39:1985-1991.
 10. Oh, H. J., H. R. Jang, K. Y. Jung, and J. H. Kim (2012) Evaluation of adsorbents for separation and purification of paclitaxel from plant cell cultures. *Process Biochem.* 47: 331-334.
 11. Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
 12. 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. *US Patent* 5,871,979.
 13. Han, M. G. and J. H. Kim (2012) Evaluation of a high surface area fractional precipitation process for the purification of paclitaxel from *Taxus chinensis*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 17: 1018-1024.
 14. Gregg, S. J. and K. S. W. Sing (1982) *Adsorption, surface area and porosity*: 2nd ed., pp. 41-110, Academic Press, NY, USA.
 15. Lee, J. Y. and J. H. Kim (2013) Influence of crude extract purity and pure paclitaxel content on fractional precipitation for purification of paclitaxel. *Sep. Purif. Technol.* 103: 8-14.
 16. 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.
 17. Hata, H., S. Saeki, T. Kimura, Y. Sugahara, and K. Kuroda (1999) Adsorption of taxol into ordered mesoporous silica with various pore diameters. *Chem. Mater.* 11: 1110-1119.
 18. Hu, X., T. Hanaoka, K. Sakanishi, T. Shinagawa, S. Matsui, M. Tada, and T. Iwasaki (2007) Removal of tar model compounds produced from biomass gasification using activated carbons. *J. Jpn. Inst. Energy* 86: 707-711.