

식물세포 현탁배양에 의한 생물학적 변환에서 cyclodextrin 이용의 최적화

이 중은, 최연숙, 김동일
인하대학교 공과대학 생물공학과

Optimization of Cyclodextrin Utilization in the Biotransformation Using Plant Cell Suspension Cultures

Jong-Eun Lee, Yeon-Sook Choi, Dong-Il Kim
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon, Korea

서론

식물세포배양에서는 식물세포내의 효소를 이용한 생물학적 변환방법이 많이 연구되고 있다. 이 중의 하나가 *Digitalis lanata* 현탁세포배양에 의한 digitoxin으로부터 digoxin의 생산이다. 생산에 사용되는 기질인 digitoxin과 산물인 digoxin은 모두 소수성 물질로 배지에 대한 용해도가 낮은 문제점이 있다. 이 문제를 해결하기 위해 유기용매가 사용되어 왔다. 그러나 대부분의 유기용매는 식물세포에 유해하여 사용되는 양의 한계가 있어서 기질의 공급을 제한한다. 또한 산물인 digoxin은 배지에 존재하는 대사과정의 중간산물이기 때문에 배지 내에서의 산물의 안정화는 산물의 생산성 문제와 즉결되는 사항이다.

생물학적 변환과정에서의 기질의 용해도 증가와 산물의 안정화를 도와주는 물질로 cyclodextrin을 들 수 있다. Cyclodextrin은 6, 7, 8개의 glucose가 고리 모양으로 연결된 cyclic oligosaccharide로 각각을 α -, β -, γ -cyclodextrin이라 명한다(1). Cyclodextrin은 소수성을 띠는 내부 공간과 친수성을 띠는 외부로 가지고 있으며 각 종류마다 다른 크기의 내부 공간을 가지고 있다. 또한, 소수성 물질 중 내부 공간과 맞는 크기를 가진 부분이 있는 경우 복합체를 형성하는 성질도 지니고 있다. 이렇게 형성된 복합체들은 본래에 비하여 높은 용해도를 가지며 식물세포와의 접촉도 더욱 용이해져 소수성 기질의 공급 문제를 해결해 줄 수 있다(2). 한편 cyclodextrin은 기질뿐만 아니라 산물과도 결합을 할 수 있다는 장점을 지니고 있다. 이와 같이 cyclodextrin과의 복합체들은 결합된 물질의 용해도, 안정성, 생체에서의 이용도를 높이는 장점 때문에 식물세포배양을 통한 이차대사산물의 생산에 도움을 준다고 알려져 있다(3).

본 연구에서는 *Digitalis lanata* 현탁세포배양을 이용한 생물학적 변환에 사용되는 소수성 물질인 digitoxin과 digoxin에 가장 잘 맞는 내부 공간을 가진 cyclodextrin을 찾아서 산물의 생산성 향상에 도움을 주고 선택된 cyclodextrin을 이용하여 digoxin의 생산성 증대를 위한 최적의 사용 조건을 찾고자 하였다.

실험 방법

Digitalis lanata 현탁세포는 독일 Tübingen 대학의 Dr. Wolfgang Kreis로부터 얻은 cell line K3OHD callus를 modified MS 배지에 3.3% glucose를 첨가하여 유지하였다. 성장배지에서 증식 후 생산 배지인 8%(w/v) glucose 수용액에 옮겨 digitoxin을 기질로 생물학적 변환 반응을 수행하는 2단계 배양 방식을 사용하였다(4). 기질로 사용되는 digitoxin은 3%(w/v) DMSO 농축모액을 만들어 배지 내에 200 mg/l 되게 세포접종 후 3일 후에

첨가하여 주었다. Cyclodextrin의 첨가는 DMSO 농축모액에 녹여서 사용하거나 분말 상태를 증기멸균하여 사용하였으며, 초기에 cyclodextrin을 첨가하여 준 경우는 배지제조 시 함께 넣어 증기 멸균시켰다. 생물학적 변환을 위해서는 암소의 회전식 진탕배양기에서 120 rpm, 25℃를 유지하며 성장배지에서 9~10일 자란 세포를 생산배지 30 ml 당 세포생체중량 기준으로 8 g을 접종하였다. 세포를 포함한 배양액의 부피를 측정하고 동량의 methanol을 첨가하여 40분간 초음파 분쇄하여 추출한 후 상등액을 취해 0.22 μm membrane filter로 여과하여 분석시료를 준비하였다. 분석을 위해서는 영인과학 910 HPLC system 및 Phenomenex Curosil-G column(4.6 × 259 mm, 6 μm)을 이용하였다. 이동상으로 acetonitrile:water(35:65 v/v) 혼합 용액을 사용하였고 유속은 1 ml/min, UV 검출 파장은 220 nm이었다.

결과 및 토론

Cyclodextrin은 고리를 이루고 있는 glucose의 수와 붙어 있는 관능기에 따라 내부 공간의 크기와 구조가 변하게 된다. 따라서 기질과 산물로 사용되는 digoxin, digoxin과 복합체를 형성할 경우 사용되는 cyclodextrin의 종류에 따라 결합하는 정도의 차이가 있을 수 있다(1). 결합 정도가 큰 cyclodextrin은 많은 양의 기질과 복합체를 형성하여 기질의 용해도를 증가시키고 세포의 이용도도 증가시킨다. 또 산물과 결합 정도가 크면 배지내에서 산물의 안정성을 증가시키기 때문에 사용되는 cyclodextrin의 종류에 따라 digoxin 생산 증가에 큰 영향을 미친다. α-, β-, γ-Cyclodextrin, β-cyclodextrin을 변형시킨 methyl-β-cyclodextrin, 2-hydroxy-propyl-β-cyclodextrin을 가지고 실험한 실험 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 사용된 모든 cyclodextrin은 digoxin과 결합을 하여 중간 산물인 digoxin

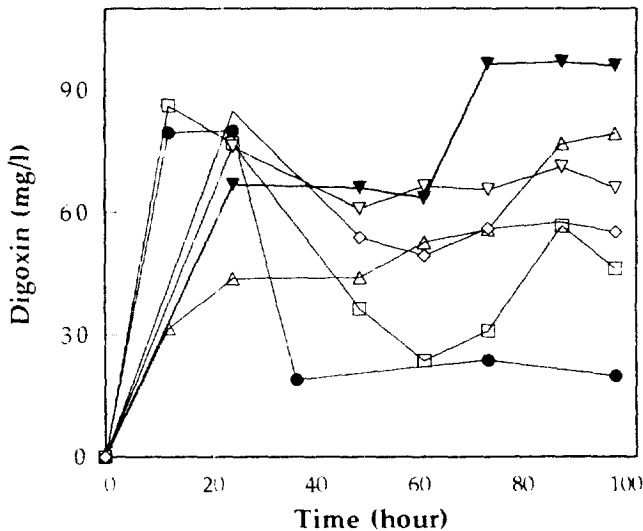


Fig. 1. Time courses of digoxin production: without cyclodextrin(CD) (●), with α-CD (□), with β-CD (▼), with γ-CD (△), with methyl-β-CD (▽), with 2-hydroxy-propyl-β-CD (◇)

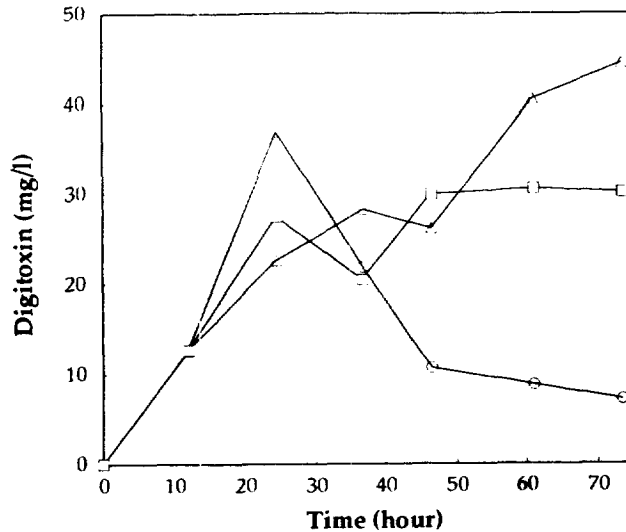


Fig. 2. Time courses of digoxin production: without CD (○), CD in medium (△), CD powder addition during the biotransformation (□)

이 세포내로 들어가 양이 감소되는 것을 막아 주었다. 특히 β -cyclodextrin을 첨가하여 준 경우는 cyclodextrin을 첨가하지 않은 경우와 비교하여 높은 digoxin 생산량을 보였으며 생산된 digoxin이 β -cyclodextrin과 결합하여 안정화된 것으로 생각된다. 높은 digoxin생산은 β -cyclodextrin이 digoxin과도 결합을 하여 기질의 용해도를 증가시켜 기질을 더욱 많이 공급했기 때문일 수도 있다. 이후의 실험은 가장 좋은 생산성을 보인 β -cyclodextrin만을 이용하였다.

Cyclodextrin의 공급 시기에 따라 생물학적 변환 초기에 공급되는 cyclodextrin은 기질 용해도 증가 측면에 영향을 미치고 산물 생산 중간에 공급되는 cyclodextrin은 산물의 안정화 측면에 더 많은 영향을 미친다. 이렇게 cyclodextrin의 공급시기에 따라 다른 영향을 나타내기 때문에 공급되어지는 시기에 따라 digoxin 생산량이 다르게 나타날 수 있다. 배지내에 cyclodextrin을 첨가한 것과 기질 공급 후 15시간 후에 cyclodextrin을 공급한 경우에 대해 실험한 결과는 Fig. 2와 같다. Cyclodextrin을 첨가하지 않은 경우와 비교하여 볼 때 초기에 cyclodextrin을 첨가한 경우는 digoxin의 생산이 높고 산물 생산 중간에 첨가한 경우는 낮은 것으로 나타났다. 두 경우 다 산물을 안정화시키는 경향을 보이지만 초기에 cyclodextrin을 공급하여 기질의 용해도를 증가시키는 것이 digoxin 생산성 향상에 더 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 생물학적 변환 과정에서 기질의 용해도로 인한 기질의 공급문제가 산물의 생산성을 저해시키는 큰 요인으로 작용한다는 것을 알 수 있다.

기질의 용해도를 증가시키기 위하여 기질과 cyclodextrin을 함께 공급하면서 첨가하는 방법을 변형시켜 기질의 용해도를 더욱 증가시킬 수 있다면 더 높은 digoxin의 생산을 가져오게 될 것이다. 기질의 용해도 증가는 복합체 형성으로 나타나는 현상이다. 따라

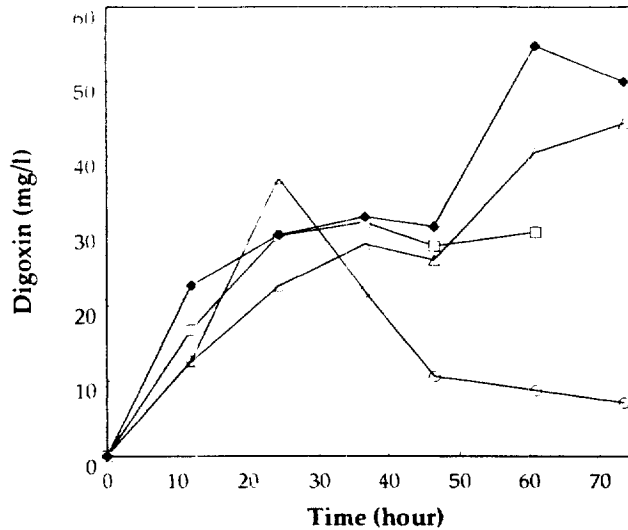


Fig. 3. Time courses of digoxin production: without CD (○), CD in medium (△), with CD powder (□), with CD complex (◆)

서 복합체 형성에 더 도움을 줄 수 있는 공급 방법을 찾아서 cyclodextrin을 첨가하여 주면 digoxin의 생산성 향상에 좋은 결과를 보일 것이다. 배지내에 cyclodextrin을 첨가한 경우, 기질인 digitoxin DMSO 농축모액을 첨가하면서 cyclodextrin은 분말 상태로 첨가한 경우, 농축모액에 cyclodextrin을 녹여서 첨가한 경우로 나누어 실험을 하였으며 그 결과를 Fig. 3에 정리하였다. Cyclodextrin을 분말 상태로 첨가한 경우를 제외한 두 경우 모두 첨가하지 않은 경우와 비교하여 높은 digoxin 생산을 보였다. 특히 cyclodextrin을 농축모액에 첨가하여 녹인 후 공급한 경우가 가장 높은 생산을 나타내었다. 이것은 cyclodextrin이 다 녹은 상태로 배지에 공급되며 농축모액 내에서 이미 복합체를 형성하여 공급되기 때문에 기질의 용해도를 극대화시킨 것으로 사료된다(5).

결론적으로, Cyclodextrin의 이용은 *Digitalis lanata* 세포의 생물학적 변환에 의한 digoxin 생산을 증가시키는 것으로 나타났다. 생산성 증대를 위하여 첨가량이나 공정이 더욱 최적화 되면 더 높은 수율을 가져오리라 기대된다.

참고문헌

1. Nagatomo, S.: *Chem. Econ. & Eng. Rev.*, **17**, 28(1985)
2. Hesselink, P.G.M., van Vliet, S., de Vries, H. and Witholt B.: *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 398(1989).
3. Uden, W., Woerdenbag, H.J., and Pras, N.: *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **38**, 103(1994).
4. Kreis, W. and Reinhard, E.: *Planta Med.*, **54**, 143 (1988).
5. Woerdenbag, H.J., van Uden, W., Frijlink, H.W., Lerk, C.F., Pras, N. and Malingré, T.M.: *Plant Cell Rep.*, **9**, 97(1990)