

***Digitalis lanata* 현탁세포배양에서 *in situ* adsorption을 이용한 digoxin 생산성 증진**

홍희진, 김혜경, 김동일
인하대학교 공과대학 생물공학과

Enhanced Production of Digoxin Using *In situ* Adsorption in *Digitalis lanata* Suspension Cell Cultures

Hong, Hee-Jeon, Hye-Kyoung Kim, Dong-Il Kim

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon, Korea

서론

식물세포배양을 통해 생산되는 이차대사산물은 여타의 화학합성으로 만들어지는 물질들에 비해 수율이 낮고 희석된 상태로 존재한다. 또한 배지 내에 농축된 이차대사산물 대부분이 toxic한 경우가 많아 세포 활성을 저해하며 이미 생성된 목표산물이 변성될 가능성이 있기 때문에 지속적인 제거와 분리·정제는 매우 중요하다고 볼 수 있다.

Digitalis lanata 식물세포는 기질로 첨가되는 digitoxin을 12 β -hydroxylation, 16'-O-glucosylation 시켜 여러가지 강심성배당체(cardenolides)를 생산하는 생물학적 변환반응을 수행하는데 그 중에서도 특히 digoxin은 약효가 좋고 인체에 대한 부작용이 적으며 생성된 대부분이 세포 밖으로 배출되는 것으로 알려져 있다. 배지로 배출된 digoxin 수용체로서 Amberlite resin, silica 등 각종 흡착제가 사용될 수 있는데 세포배양중 이들 흡착제를 통한 digoxin의 *in situ* adsorption을 통하여 toxic한 이차대사산물의 제거로 인한 세포활성의 유지가 가능하며 목표산물의 변성을 방지할 수 있고 분리공정이 수월해지는 등의 이점을 갖게 된다. 또한 digoxin의 제거로 인한 feedback inhibition이 차단됨으로써 digitoxin의 생물학적 변환을 지속적으로 유도하여 digoxin의 수율을 증대시킬 수 있는 현상도 고려해 볼 수 있다.

실험방법

Digitalis lanata K3OHD 현탁세포는 독일 Tübingen 대학의 Dr. Wolfgang Kreis로부터 얻은 cell line K3OHD callus를 modified MS배지에 3.3%(w/v) glucose를 첨가하여 유지하였다. 성장배지에서 증식 후 8%(w/v) glucose 수용액에 옮겨 digitoxin을 기질로 생물학적 변환반응을 수행하는 2단계 배양방식을 사용하였다. 기질로 사용되는 digitoxin은 3%(w/v) DMSO 농축모액을 만들어 배지내에 200 ppm되게 첨가하였다. 생물학적 변환을 위해서는 암소의 회전식 진탕배양기에서 120 rpm, 25 $^{\circ}$ C를 유지하며 성장배지에서 9-10일 정도 자란 세포를 8% 당수용액 30 ml당 세포생체중량을 기준으로 8 g 접종하였다.

8% 당수용액상에서 생성된 digoxin을 흡착할 수 있는 수용체로는 nonionic exchanger인 Amberlite XAD-2, 4, 7, 8과 acidic cation exchanger인 Amberlite IRC-50과 200, Dowex-50W 그리고 basic anion exchanger로 Amberlite IRA-93과 IRA-400, Dowex 1 IX4-50 등과 cation 및 exchanger가 1:1로 혼합된 Mixed bed resin TMD-8을 사용하였다. Resin 투여방법으로는 3%(w/v) sodium alginate 용액과 함께 bead를 형성시켜 고정화하거나, 투과성막내에 resin을 담아 고정화하거나, 일회용 column과 유사한 형태로 유리관내에 담아 관 양끝 단면을 투과성막으로 막아 고정화하는 세가지 방법을 이용하였다.

모든 실험과정에 사용된 resin의 투여량은 배지부피의 5%(w/v)로 methanol과 증류수로 전처리한 후 건조시켜 가압증기살균하여 사용하였다. 고정화하지 않은 resin이 투여된 경우 세포를 포함한 배양액의 총부피를 측정하고 동량의 methanol을 첨가하여 20분간 초음파분쇄한 상등액을 취해 0.2 μm membrane filter에 여과하여 분석하며 고정화 resin을 투여한 경우는 배양액과의 분리가 가능하므로 분리해낸 resin을 methanol을 이용하여 추출하였다. 분석을 위해서는 영인과학 910 HPLC system 및 Phenomenex Curosil-G column(4.6 \times 259 mm, 6 μm)에 이동상으로 acetonitrile:water(35:65 v/v) 혼합용액을 사용하였고 유속은 1 ml/min, U.V.검출과장은 220 nm에서 수행하였다.

Amberlite XAD-8은 ICN사에서 구입하였고 기타 모든 resin과 digoxin, digitoxin 표준물질은 Sigma사에서 구입하였다. HPLC 분석용 용매는 Fisher사 제품의 HPLC 급을 사용하였다.

결과 및 토론

Digoxin, digitoxin의 nonionic exchanger에 대한 흡착 kinetics는 Fig.1, 2에 나타내었다. Amberlite XAD-8의 경우 흡착능이 가장 좋으며 흡착에 소요되는 시간도 2시간 이내인 것으로 나타났다. 그러나 Amberlite XAD-8 resin을 포함한 nonionic resin들은 digoxin뿐만 아니라 기질로 첨가되는 digitoxin에도 좋은 흡착능을 가지고 있기 때문에 첨가된 digitoxin이 생물학적 변환반응에 쓰여지고 배지 내에 거의 남아 있지 않으면서 생성된 digoxin의 농도가 최대가 되는 시기를 잘 선택하여 resin을 사용하는 것은 매우 중요하다. Resin의 첨가시기를 결정하기 위해 배양액 내에 digitoxin을 첨가한 이후 정해진 시간별로 resin을 투여해본 결과 digitoxin을 첨가한 후 30시간에서 36시간정도 지난 후에 resin을 투여한 경우, resin과 함께 배양액 전체의 추출에 의하여 얻은 digoxin 수율이 가장 높은 값을 보였으며 이는 digitoxin의 생물학적 변환반응에 의한 digoxin생성 경시적 변화를 측정된 결과에서 36시간 전후에 digoxin 농도가 최대가 되는 현상과 일치하는 것이다. 따라서 resin은 36시간째에 투여하는 것이 가장 적당한 것으로 여겨진다. 또한 세포생장에 대한 실험에서도 Amberlite XAD-8을 첨가한 경우 resin을 첨가하지 않은 대조군과 가장 적은 차이를 보이고 있으며 다른 resin에 비해서도 비교적 성장저해 정도가 덜한 것

으로 나타났다. Resin 투여 이후 배양액에서의 유지 시간으로는 6시간에서 12시간 정도가 바람직한 것으로 확인되었다.

Resin을 이용한 *in situ* adsorption은 세포 밖으로 배출된 목표산물을 효과적으로 흡착하여 세포 내에서 진행되는 생물학적 변환반응을 더욱 가속화함으로써 목표산물의 생산성을 증대시킬 수 있다는 잠재적인 가능성을 고려할 수 있다. 기질을 첨가한 후 resin의 최적투여시기로 결정된 36시간째에 투여시 가장 좋은 효과를 보였던 Amberlite XAD-8 사용시 resin을 투여하지 않은 대조군에서보다 약 20%나 높은 digoxin 수율을 보였다. 이는 resin을 이용한 *in situ* adsorption을 통해서 이차대사산물의 생산성 향상을 얻을 수 있다는 증거라 하겠다. 그러나 같은 조건으로 Amberlite XAD-7을 투여한 경우는 오히려 대조군보다 낮은 digoxin 수율을 나타냈으며 Amberlite XAD-8을 사용한 경우의 3분의 1에 해당하였다. 세포생장의 경우 Amberlite XAD-7 투여시 세포의 건조중량이 대조군에 비해 반도 못 미치는 값을 보였다. 따라서 세포생장에 저해 정도가 심한 resin의 경우는 *in situ* adsorption에 의한 목표산물의 생산성 향상은 기대할 수 없다고 할 수 있다.

또한 resin을 고정화하여 배양액 내에 투여한 경우도 resin을 첨가하지 않은 대조군에 비해 높은 digoxin 수율의 증가를 보였고 고정화하지 않은 resin을 사용한 경우와 비교하였을 때도 다소 높은 digoxin의 수율증가를 나타내고 있다. 투여방법의 차이에 의한 것으로는 투과성막으로 wood pulp를 사용하여 resin을 담아 고정화한 경우가 가장 효과적이었으며 이는 digoxin이 resin에 흡착되기 위하여 접촉가능한 면적을 가장 많이 제공하기 때문으로 사료된다. 고정화 resin의 사용은 고정화하지 않은 resin에 비해 digoxin 수율향상을 위해, 또는 분리공정상에 있어 몇가지 장점이 있는데 고정화에 의하여 배양액과 resin 사이에 경계면이 형성되므로 일단 resin으로 흡착된 digoxin에 대하여 경쟁적으로 작용하는 세포의 digoxin uptake 현상을

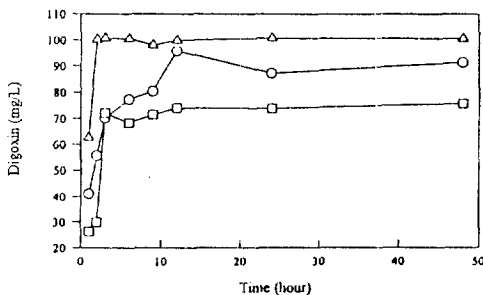


Fig.1. Adsorption Kinetics of digoxin

(Δ)XAD-8 (O)XAD-4 (\square)XAD-7

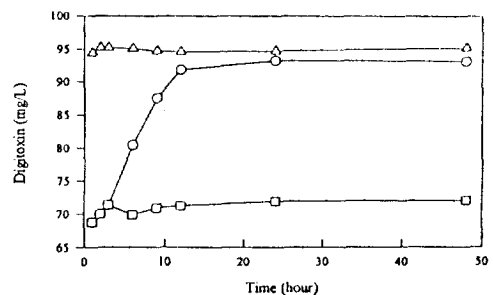


Fig.2. Adsorption Kinetics of digitoxin

(Δ)XAD-8 (O)XAD-4 (\square)XAD-7

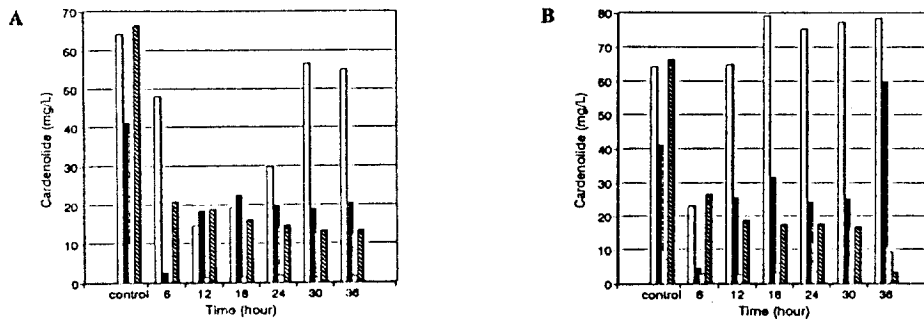


Fig.3. Effect of resin addition time on biotransformation of digitoxin

(A)Amberlite XAD-7, (B)Amberlite XAD-8

□ Deacetyllanatoside C ■ Digoxin ▨ Purpureaglycoside A ▩ Digitoxin

방지할 수 있어 digoxin의 다른 물질로의 변환을 막을 수 있다. 또한 고정화하지 않은 resin을 투여한 경우에 세포가 함께 존재하는 배양액과의 분리가 거의 불가능하나 고정화 resin을 사용하였을 경우는 배양액과 손쉽게 분리가 가능하기 때문에 분리공정상에 있어서의 문제점을 해결하면서 resin의 재사용 가능성의 여부도 고려해 볼 수 있다.

이상 언급한 resin들 이외에도 비슷한 효과를 보이는 것으로 silica를 들 수 있으며, 이러한 resin 사용의 장점들을 근거로 하여 *in situ* adsorption에 의한 digoxin 생산성 증진에 관한 공정연구를 계속 진행중에 있다.

참고문헌

1. Kreis, W. and Reinhard, E.: *J. Biotechnol.*, **26**, 257(1992).
2. Kreis, W. and Reinhard, E.: *Planta Med.*, 418(1986).
3. Gregory, F. P. and Nadine, N. P.: *Biotechnol. Lett.*, **10**, 187(1988).
4. Masanori, A. and Michael, L. S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 475(1989).
5. Gregory, F. P. and Michael, L. S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 922(1988).