

고정화 Aminopeptidase M 컬럼 반응기를 이용한 메치오닐 인간성장호르몬으로부터 천연형 인간성장호르몬의 연속생산

†이 성 희 · 김 기 태 · 박 범 수 · 김 은 영 · *최 차 용 · 김 원 배 · 양 중 익
동아제약(주) 연구소, *서울대학교 공과대학 공업화학과

Continuous Production of Authentic Human Growth Hormone from Methionyl Human Growth Hormone Using the Column Reactor of Immobilized Aminopeptidase M

Sung-Hee Lee,† Ki-Tae Kim, Beom-Soo Park, Eun-Young Kim, Cha-Yong Choi*, Won-Bae Kim and Jung-Ick Yang

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd.,
Kyunggi-do 449-900, Korea

*Department of Chemical Technology, College of Engineering,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

The characteristics of aminopeptidase M(ApM) immobilized covalently on Cellufine Formyl and the continuous production of authentic human growth hormone(hGH) from methionyl human growth hormone(met-hGH) using the column reactor packed with immobilized ApM were investigated. Immobilized ApM with the proportion of 2.3mg ApM per 1g Cellufine Formyl gel had the highest met-hGH conversion activity. The optimum pH(7.0) and temperature(55°C) showed no appreciable difference between free and immobilized enzymes and the optimum temperature in continuous operation of the column reactor was also found to be 55°C. Under the conditions at which met-hGH was converted completely to hGH, the yield and productivity were about 77% and 0.8mg hGH/ml · h, respectively. In two column reactors of different sizes, met-hGH was converted to hGH with the same conversion rates and hGH yields at the same space velocities. The half-life of the reactor systems at 45°C and 55°C were projected from the continuous operations for 90 days to be 225 days and 81 days, respectively.

서 론

사람의 뇌하수체에서 추출한 성장 호르몬(pituitary human growth hormone, pit-hGH)이 뇌하수

체성 왜소증(hypopituitary dwarfism) 치료에 쓰일 수 있다는 가능성이 1958년 Raben(1)에 의하여 처음으로 제시된 이후 성장 호르몬의 수요는 급격히 증가하게 되었다. 그러나 성장 호르몬은 생물학적 활성이 종(species)간에 현저한 차이를 보이고 있는데, 계통발생학적 관점에서 상위 동물 성장 호르몬

† Corresponding Author

은 하위동물에는 유효하지만 그 역방향은 효과가 없기 때문에(2), 사람의 사체가 인간 성장 호르몬의 유일한 공급원이었다. 한편 뇌하수체 유래 성장 호르몬을 사용한 환자들에서 치명적 신경계 질환인 Creutzfeldt-Jacob 병이 종종 발생한다는 보고(3)가 나옴에 따라 뇌하수체 유래 인간 성장 호르몬의 사용은 거의 중단되기에 이르렀다.

최근에 유전공학 기술이 발전함에 따라 대장균(4-5)과 효모(6)에서 인간 성장 호르몬의 생산에 성공하였으며, 이들 재조합 인간 성장 호르몬은 뇌하수체에서 유래된 천연형 인간 성장 호르몬보다 아미노말단 메치오닌(amino-terminal methionine)이 더 첨가된 192개의 아미노산으로 구성되어 있는데 이는 대장균이나 효모의 단백질 합성 개시코돈 AUG에서 유래된 것이다. 메치오닐 인간 성장 호르몬(methionyl human growth hormone, met-hGH, somatrem)은 왜소증 치료 효과에서 뇌하수체 유래 성장 호르몬과 생물학적 활성이 동등하였으며 심각한 부작용을 나타내지 않았으나(7-9), 성장 호르몬에 대한 항체의 생성 정도가 비교적 높게 나타났다(9-11).

아미노말단 메치오닌이 없는 천연형 재조합 인간 성장 호르몬(human growth hormone, hGH, somatotropin)은 상대적으로 항원성이 작거나 없을 것으로 기대되어 왔는데 최근의 연구결과 천연형 아미노산 서열의 재조합 인간 성장 호르몬이 성장 호르몬 결핍증 소아의 치료에서 뇌하수체 유래 성장 호르몬, 재조합 메치오닐 인간 성장 호르몬과 마찬가지로 성장 촉진 효과가 있었으며, 성장 호르몬 항체 생성률이 상대적으로 낮아 면역원성이 작은 것으로 보고되었다(12-15).

천연형 재조합 인간 성장 호르몬을 만드는 방법은 대장균 또는 효모에서 met-hGH 또는 hGH의 아미노말단에 아미노산이 추가된 형태로 생합성된 pre-hGH에 효소를 반응시켜 아미노말단의 메치오닌 또는 추가 아미노산을 제거시켜 만드는 방법(16-18)과 signal peptide 유전자가 첨가된 hGH유전자를 갖는 plasmid를 이용하여 생합성한 후 periplasm 또는 배양액 중으로 분비되는 동안 천연형 hGH가 되도록 하여 만드는 방법(19-22) 등이 보고되어 있다.

met-hGH의 아미노말단 메치오닌을 제거하여 천연형 인간 성장 호르몬을 만들고자 할 때는 aminopeptidase M(ApM) 또는 특수한 aminopeptidase를 이용한다. ApM은 척추동물의 신장과 소장 존재하는 aminopeptidase로 단백질의 아미노산 분석

에 이용되어 왔으며(23), X-Pro bond 또는 Pro-X bond에는 작용하지 못한다는 보고가 있었다(24). Nakagawa등(16)은 ApM의 이러한 성질을 이용하여 돼지 신장 유래 ApM으로 met-hGH의 아미노말단 methionine을 제거하여 천연형 hGH를 얻을 수 있었다. 그러나 ApM을 이용하여 met-hGH로부터 천연형 재조합 인간 성장 호르몬을 대량생산하고자 할 때에는 값비싼 효소를 다량 사용해야 하는 경제적인 문제점이 발생하여 ApM의 효율적 이용이 필요하다.

한편 효소의 고정화는 효소를 재사용할 수 있다는 장점이 있으며, 안정성의 향상, 사용의 간편성 등의 장점을 가지는 경우가 있음이 보고되어 있다(25). 지금까지 고정화 단백질분해효소(Immobilized protease)의 연구는 대부분 펩타이드 합성(26-27), 아미노산 서열 분석(28-29), 단백질 전체의 가수분해(30-31), 또는 효소 전극(enzyme electrode)의 개발(32) 등에 응용되어 왔으며, 고정화 단백질분해효소를 이용한 재조합 단백질의 개량 연구는 met-IL-2의 amino-terminal methionine을 특이적으로 제거하여 IL-2를 생성시킬 수 있다는 보고(16)가 있을 뿐이며, 생산성 증대를 위한 체계적 연구나 고정화 효소 반응기 개발 등의 연구는 보고되어 있지 않다. 이에 본 연구에서는 ApM을 담체에 고정화시켜 고정화 ApM의 특성을 고찰하였으며 고정화 ApM을 충전한 column reactor를 이용하여 met-hGH로부터 천연형 hGH를 연속생산함으로써 hGH를 효율적으로 생산할 수 있는 방법에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

Aminopeptidase M(ApM, E.C. 3.4.11.2)은 Pierce사로부터 구입하였으며, 시약급의 ApM은 diisopropyl fluorophosphate(DFP)와 p-chloromercuribenzoic acid(PCMB)에 의해 활성이 저해되는 protease가 종종 오염되어 있을 수 있으므로(25), DFP와 PCMB를 처리하여 사용하였다. ApM에 의한 met-hGH의 hGH로의 전환반응의 기질로 사용한 met-hGH는 동아제약(주)에서 유전자 재조합 대장균으로부터 생산한 met-hGH로 SDS-PAGE 분석에서 90% 이상의 순도를 나타내었다. 고정화 담체는 Amicon사의 Matrex Cellulose Formyl을 사용하였으며 그 이외의 시약들은 모두

특급시약을 사용하였다. Column reactor용 column과 부속품은 Amicon사로부터 구입하였으며 peristaltic pump는 Pharmacia사의 것을 사용하였다.

ApM의 고정화

DFP와 PCMB 처리한 ApM을 고정화 완충용액인 0.2M 인산염 완충용액(pH 7.0)에 투석시킨 후 고정화 완충용액으로 여러 번 씻은 Cellufine Formyl gel과 각각 1g gel당 0.44, 1.1, 2.2, 4.5, 11.2mg ApM의 비율로 무게비를 달리하여 섞었다. 이들을 28°C에서 4시간 동안 약하게 orbital shaking한 후에 환원제로서 1g gel당 5mg의 NaBH_3CN 을 첨가하여 4°C에서 16시간 동안 약하게 orbital shaking하여 반응시켰다. 단백질과 결합하지 않은 gel의 formyl group을 blocking시키기 위하여 blocking 완충용액인 0.2M Tris·HCl용액(pH 7.0)으로 여러번 씻은 후 1g gel당 5mg의 NaBH_3CN 을 첨가하여 실온에서 5시간 동안 orbital shaking하였다. Blocking이 끝난 gel을 고정화 완충용액인 0.2M 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 씻은 후 고정화 완충용액과 gel의 부피비가 1:1이 되도록 완충용액을 첨가한 후 고정화된 ApM으로 사용하였다. 이때 이들의 고정화 효율과 ApM activity, met-hGH의 hGH로의 전환능력을 비교하였는데 대조로서는 고정화하지 않은 inhibitor 처리된 ApM용액을 사용하였다. 고정화 효율은 Gabel등(33)의 방법에 따라 gel에 결합된 단백질 양을 결정한 후 gel에 결합된 ApM과 첨가한 ApM의 비율을 백분율로 환산하여 결정하였고 ApM activity는 Pfeleiderer(34)의 방법을 변형하여 측정하였는데, 고정화 효소의 반응은 고정화 효소와 반응기질을 시험관에 넣고 뚜껑을 잘 막은 다음 end-to-end 교반하면서 반응시켰다. met-hGH의 hGH로의 전환율은 완충액(50mM TES HCl, pH 7.0, 0.15 M KCl, 1mM CoCl_2)에 met-hGH 3.2mg과 고정화하지 않은 효소 ApM 74 μg 또는 고정화 효소양이 74 μg 에 해당하는 양의 완충액으로 세척된 고정화효소 등을 넣고 완충액으로 1.6ml이 되도록 한 다음 50°C에서 end-to-end 교반하면서 13시간 반응시킨 후 반응액을 RP-HPLC로 분석하였다.

ApM의 활성 측정

ApM의 활성은 Pfeleiderer(34)의 방법을 다음과 같이 변형하여 측정하였다. 0.01% Triton X-100을 포함하는 0.05M TES·HCl 완충용액(pH 7.0)에

기질인 L-Ala-p-nitroanilide(L-Ala-pNA)를 1.66×10^{-3} M이 되도록 넣고(L-Ala-pNA 기질용액) ApM을 가하여 반응을 시작하였다. 이 때 최종 부피는 1.0ml로 하였으며 37°C로 맞추어진 spectrophotometer(Varian DMS 100S)로 405nm에서 L-Ala-pNA의 가수분해결과로 나타나는 흡광도의 증가를 측정하였다. 고정화 효소의 ApM 활성은 고정화 ApM과 L-Ala-pNA 기질용액을 시험관에 넣고 뚜껑을 잘 막은 다음 end-to-end 교반하면서 반응시킨 후 405nm에서의 반응액의 흡광도 증가로 측정하였다. p-nitroanilide의 분광계수(extinction coefficient)는 $9620\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하였다. 1 enzyme unit는 37°C에서 분당 1 μmole 의 p-nitroanilide를 생산하는 enzyme 양으로 정하였으며 specific activity는 1mg protein당 enzyme unit로 정의하였다.

반응물의 분석

met-hGH와 hGH는 역상 고압 액체 크로마토그래피(Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)를 이용하여 분석하였는데(36) 사용된 기기는 MAPS(Bio-Rad, USA)이며 column은 C₄계열인 Hi-pore[®] RP-304(4.6×250mm)를 사용하였고 hGH의 retention time이 약 32분이 되도록 n-propanol의 비율을 조정하여 n-propanol:50mM Tris·HCl 완충용액(pH 7.5)를 28:72 비율로 섞은 용매로 용출하였다. 시료는 20 μl 를 주입하였고 용매의 유속은 0.5ml/min, 온도는 45°C로 조절하였으며, UV detector(Single Path Monitor UV1, Pharmacia)를 이용하여 280nm에서 검출하였다. 이때 met-hGH, hGH의 농도와 각 피크의 높이는 각각 0.993, 0.997의 상관계수로 직선적으로 비례하였다. ApM에 의한 met-hGH의 hGH로의 전환반응에서 met-hGH의 전환율과 hGH 수율은 각각 전환율(%)=[(반응에 가해진 met-hGH의 양)-(반응액 중에 남아 있는 met-hGH의 양)]/(반응에 가해진 met-hGH의 양)×100, hGH 수율(%)=(생성된 hGH의 양)/(반응에 가해진 met-hGH의 양)×100의 식으로 계산하였다.

고정화 ApM의 반응 특성

고정화 효소의 최적 온도 결정 실험은 시험관에 고정화 효소 Cellufine-ApM 151.0 μg 과 met-hGH 2.5mg을 넣고 1mM CoCl_2 와 150mM KCl이 첨가된 50mM TES·HCl(pH 7.0) 완충용액을 최종부피가

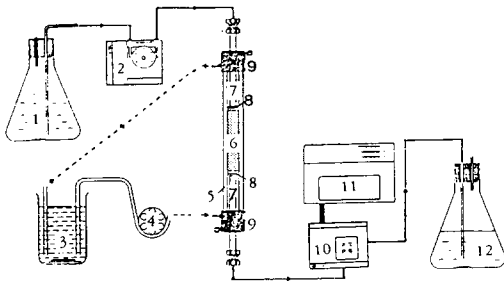


Fig. 1. Schematic diagram of the column reactor of immobilized ApM.

- 1. Substrate reservoir
- 2. Peristaltic pump
- 3. Water bath
- 4. Water circulation pump
- 5. Water jacket
- 6. Immobilized enzyme
- 7. Level adjusters
- 8. Support nets
- 9. Coupling rings
- 10. U. V. monitor
- 11. Recorder
- 12. Product reservoir

Table 1. The coupling efficiency, the ApM activity and met-hGH conversion at various ratios of ApM to Cellufine Formyl.

(E/CF) added (mg/g)	(E/CF) bound (mg/g)	Coupling efficiency (%)	ApM activity		Conversion	
			units/mg	Relative (%)	Rate (%)	Yield (%)
0.44	0.20	45.5	11.4	167.6	61.9	47.6
1.1	0.51	46.4	6.0	88.2	78.9	63.2
2.2	1.1	50.0	4.1	60.3	79.2	62.1
4.5	2.3	51.1	3.4	50.0	89.4	68.1
11.2	5.7	50.9	2.7	39.7	81.5	63.0
soluble	—	—	6.8	100.0	98.9	75.9

Coupling efficiency is the ratio of (E/CF) bound to (E/CF) added, E; ApM, mg, CF; Cellufine Formyl, g wet weight. ApM activity was assayed at room temperature in end-to-end mixing system using Ala-pNA as a substrate. Conversion experiment was performed by incubating met-hGH(3.2mg) with Cellufine-ApM(ApM, 74 μg) in end-to-end mixing system at 50°C for 13 hours and was analysed by RP-HPLC.

1.5ml이 되도록 가한 후 각각 40, 45, 50, 55, 60°C에서 end-to-end 교반하면서 22시간 동안 반응시켰다. met-hGH가 hGH로 전환된 정도는 반응액을 RP-HPLC로 분석하여 결정하였다.

한편, 최적 pH 결정 실험은 시험관에 고정화 효소 Cellufine-ApM 151.0 μg과 met-hGH 2.5mg을 넣

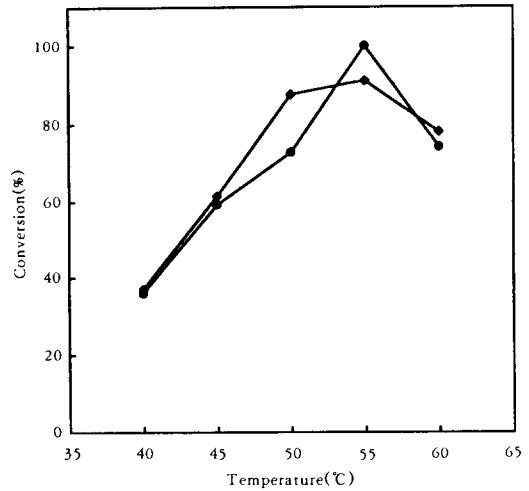


Fig. 2. Effect of temperature on the conversion of met-hGH by DFP- and PCMB-treated ApM and Cellufine-ApM. The conversion (%) was analysed by RP-HPLC with reaction mixture. Met-hGH(2.5mg) was incubated with DFP- and PCMB-treated ApM (31.3 μg) and Cellufine-ApM(151.0 μg), respectively, in 1.5ml of 50mM TES · HCl(pH 7.0) containing 0.15 M KCl and 1mM CoCl₂ at indicated temperatures for 22 hours. ◆-◆, ApM; ●-●, Cellufine-ApM.

고 1mM CoCl₂와 150mM KCl이 첨가된 다음의 각 pH의 완충용액을 최종부피가 1.5ml이 되도록 첨가한 후 45°C에서 end-to-end 교반하면서 22시간 동안 반응시켰다. 반응액은 RP-HPLC로 분석하였다. 각 pH에 사용된 완충용액은 다음과 같다. pH 5.0, 6.0 : 50mM citric acid · Na₂HPO₄ 완충용액; pH 6.5~8.0 : 50mM TES · HCl 완충용액.

고정화 ApM 효소반응기의 구성

고정화 효소 Cellufine-ApM을 충전한 컬럼 반응기(column reactor)의 전체적인 장치를 Fig. 1에 나타내었다. Water jacket이 부착된 유리 컬럼 내부에 지지망(support net)이 붙어 있는 하부 level 조절기(adjuster)의 위치를 고정한 후 그 위에 Cellufine-ApM을 충전하고 상부 조절봉으로 level을 조절한 후 고정시켰다. Water bath와 circulation pump로 컬럼 주변의 water jacket으로 온도 조절된 물을 순환시켰다. met-hGH 기질용액 (met-hGH,

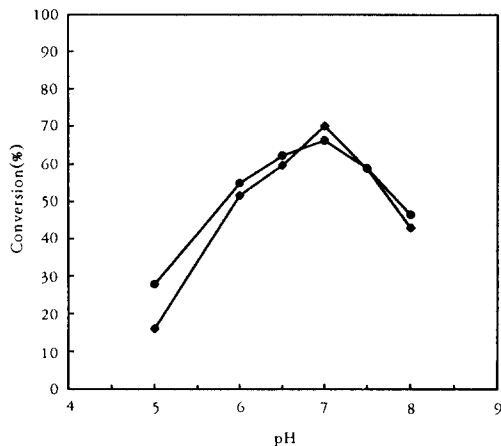


Fig. 3. Effect of pH on the conversion of met-hGH by DFP- and PCMB-treated ApM and Cellufine-ApM. The conversion(%) was analysed by RP-HPLC with reaction mixture. Met-hGH(2.5mg) was incubated with DFP- and PCMB-treated ApM(31.3 μg) and Cellufine-ApM(151.0 μg), respectively, at 45°C for 22 hours in 1.5ml of following buffer containing 0.15 M KCl and 1mM CoCl₂:pH 5.0, 6.0, 50mM citric acid-Na₂HPO₄ buffer; pH 6.5~8.0, 50mM TES · HCl buffer. ◆-◆, ApM; ●-●, Cellufine-ApM.

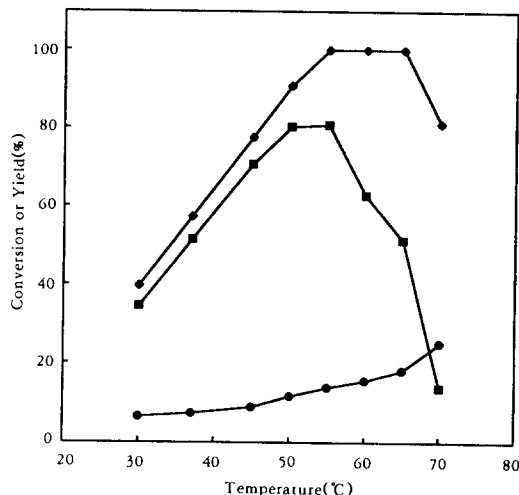


Fig. 4. Effect of temperature on the conversion of met-hGH in the column reactor. The reaction was carried out in a 7.2ml bed volume (1.0×9.2cm) column reactor fed with substrate solution(met-hGH 2mg/ml, 50 mM TES · HCl buffer, pH 7.0, 0.15 M KCl, 1 mM CoCl₂) at the space velocity of 0.5 hr⁻¹. The reaction was started at 30°C and analysis was made after 8 hours. This procedure was repeated at each temperature indicated on the figure. ◆-◆, conversion(%); ■-■, hGH yield(%); ●-●, hGH variant(%).

2mg/ml; 50mM TES · HCl, pH 7.0; 0.15 M KCl; 1mM CoCl₂)은 peristaltic pump를 이용해 컬럼 상부로 공급하였고 컬럼 하부로 나오는 반응액은 과장 280nm의 UV detector를 거친 후 product reservoir에 모이게 하였다. 반응기에 met-hGH 기질용액이 공급되면서 유출액의 흡광도 값이 증가하여 일정시간 경과 후에 흡광도 값이 일정하게 유지되는데, 이 때를 반응기의 정상 상태(steady-state)로 하였고 모든 분석은 정상상태에서 수행하였다.

결과 및 고찰

ApM과 Cellufine Formyl의 비율에 따른 고정화

ApM과 Cellufine Formyl gel의 비율을 달리하였을 때의 고정화 효율과 각각의 ApM activity, met-hGH의 hGH로의 전환율을 비교하였다. 고정화 효율은 Cellufine Formyl gel 1g당 0.44, 1.1, 2.2, 4.5, 11.2mg의 ApM을 첨가하였을 때 모두 약 46~51%

정도로 비슷하였으나 ApM activity는 고정화하지 않은 ApM의 activity에 비해 1g gel당 0.44mg ApM을 섞어준 것이 가장 높았으며 met-hGH의 hGH로의 전환율은 1g gel당 4.5mg의 ApM을 섞어준 것이 가장 높았다(Table 1). ApM 활성과 met-hGH 전환율에 대한 단위 g gel당 최적 ApM 비율이 다름을 알 수 있었는데 ApM 활성은 저분자 물질인 L-Ala-pNA를 기질로 하여 측정한 것이고, 전환율은 고분자 물질인 met-hGH가 기질로 이용된 것으로 고정화된 ApM의 밀도에 따라 고정화 ApM의 conformation과 주변 미세환경(microenvironment)이 달라지기 때문에 기질에 따라 차이가 나는 것으로 생각된다.

고정화 ApM의 반응 특성

ApM과 Cellufine-ApM에 의한 met-hGH의 hGH로의 전환반응에서 최적온도는 55°C로 동일하였다(Fig. 2). 최적 pH 역시 pH 7.0으로 동일하였

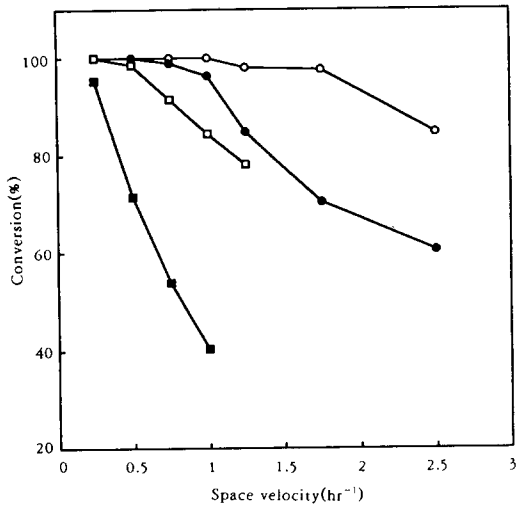


Fig. 5. Effect of flow rate and feed concentration on the continuous conversion of met-hGH to hGH in the column reactor. The reaction was carried out in a 1.96ml bed volume(1.0×2.5cm) column reactor fed with substrate solution of various met-hGH concentrations(met-hGH 1.0-8.0mg/ml, 50 mM TES · HCl buffer, pH 7.0, 0.15 M KCl, 1 mM CoCl₂) at 45°C and analysis was done at steady-state. ○-○, 1.0mg/ml; ●-●, 2.0mg/ml; □-□, 4.0mg/ml; ■-■, 8.0mg/ml.

으나 고정화에 의해 pH에 대한 민감도가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). 이는 ApM이 gel에 고정화 됨으로써 낮은 pH나 높은 pH에서의 conformation 변화 정도가 고정화되지 않은 것에 비해 작아지기 때문인 것으로 생각된다.

고정화 ApM 반응기에서 met-hGH의 hGH로 전환 고정화 ApM 반응기에서 met-hGH를 hGH로 연속적으로 전환시킬 때 온도의 영향을 조사해 본 결과 반응기 온도가 30°C에서 55°C로 높아지면서 met-hGH의 전환율이 39.7%에서 100%로 증가하였으며 60°C, 65°C에서도 100% 전환되었으나 70°C에서는 81.2%로 감소하였다(Fig. 4). hGH 수율은 55°C에서 80.8%로 가장 높았으며 60°C 이상의 온도로 높아지면서 감소하였는데, 이러한 결과는 온도가 높아지면서 변이체의 생성비율이 증가하고 또한 단백질 aggregates가 형성되었기 때문이다. 반응기

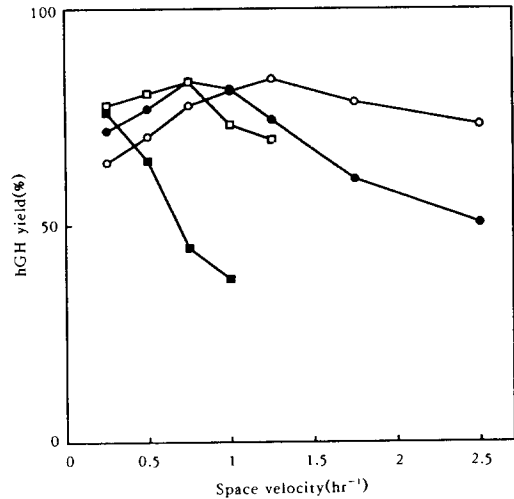


Fig. 6. Effect of flow rate and feed concentration on the yield of hGH production in the column reactor. The reaction was carried out in a 1.96ml bed volume(1.0×2.5cm) column reactor fed with substrate solution of various met-hGH concentrations(met-hGH 1.0-8.0mg/ml, 50 mM TES · HCl buffer, pH 7.0, 0.15 M KCl, 1 mM CoCl₂) at 45°C and analysis was done at steady-state. ○-○, 1.0mg/ml; ●-●, 2.0mg/ml; □-□, 4.0 mg/ml; ■-■, 8.0mg/ml.

의 연속운전시 최적온도는 55°C로 batch반응에서와 동일하였으나 ApM의 활성 안정성을 고려하여 45°C에서 운전하기로 하였다.

온도를 45°C로 고정시키고 met-hGH의 feed 농도를 1.0~8.0mg/ml, 운전유속을 SV(space velocity) 0.25~2.50hr⁻¹로 변화시키면서 고정화 ApM 반응기에서 met-hGH를 hGH로 전환시킬 때 feed 농도와 유속의 영향을 조사하였다. Fig. 5에서와 같이 feed 농도 1.0mg/ml에서는 운전유속 SV 1.0hr⁻¹ 이하에서, 2mg/ml에서는 SV 0.50hr⁻¹ 이하에서, 4mg/ml에서는 SV 0.25hr⁻¹에서 각각 met-hGH가 100% 전환되었고, 8mg/ml에서는 가장 낮은 유속에서 100% 전환되지는 않았으나 유속이 느린 경우에 전환율이 높은 것을 알 수 있었다(Fig. 5).

hGH 수율은 met-hGH 농도가 1mg/ml인 경우 100% 전환되는 유속 SV 1.0hr⁻¹일 때 81.0%의 수율을 나타냈으나 유속이 SV 0.75hr⁻¹ 이하로 작아

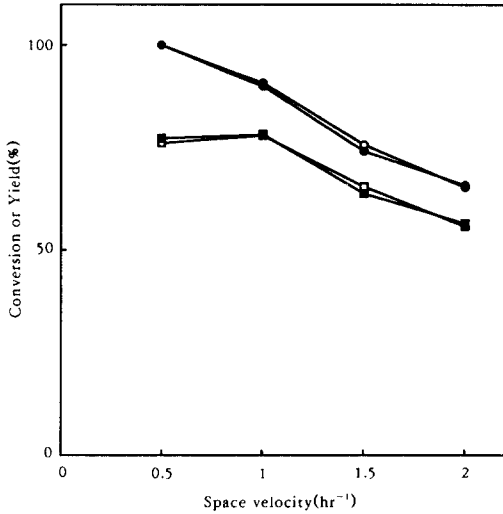


Fig. 7. Comparison of conversion and yield between two column reactors of different sizes. The reaction was carried out in the column reactor of two different sizes fed with substrate solution (met-hGH 2.0mg/ml, 50 mM TES · HCl buffer, pH 7.0, 0.15 M KCl, 1 mM CoCl₂) at various space velocities and temperature of 45°C. ○-○, conversion; □-□, hGH yield in 1.96ml reactor; ●-●, conversion; ■-■, hGH yield in 9.82ml reactor.

지면서 생성된 hGH의 변이체 생성량이 증가하여 hGH 수율은 감소하였다. 2mg/ml의 경우 100% 전환되는 유속 SV 0.50hr⁻¹일 때 76.8%의 수율을 나타냈으며, 4mg/ml의 경우 100% 전환되는 유속 SV 0.25hr⁻¹에서 77.7%의 수율을 나타내었다 (Fig. 6). 이상의 결과를 바탕으로 met-hGH 전환율이 100%일 때 hGH의 생산성(productivity)를 계산하면 met-hGH 농도가 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml의 경우 각각 0.81, 0.77, 0.78mg hGH/ml · h이었다.

1.96ml(1.0×2.5cm) column reactor와 5배 큰 9.82ml(1.0×12.5cm) column reactor를 제작하여 반응기 크기의 영향을 조사해 본 결과 (Fig. 7) 두 개의 반응기에서 유속 SV 값이 같을 때 met-hGH의 전환율과 hGH 수율이 거의 같은 값을 나타내었다. 이로부터 반응기를 pilot-scale로 scale-up할 때에도 같은 정도의 전환율과 수율로 hGH를 대량생산할 수 있을 것으로 예상해 볼 수 있었다.

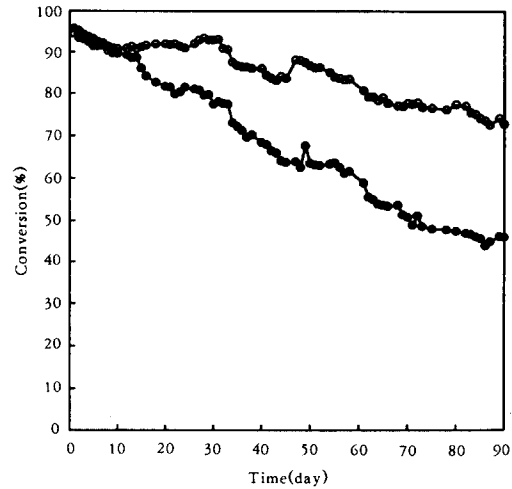


Fig. 8. Operational stability of the column reactor for the continuous conversion of met-hGH to hGH. The reaction was carried out in a 1.96ml bed volume(1.0×2.5cm) column reactor fed with substrate solution (met-hGH 2.0mg/ml, 50 mM TES · HCl buffer, pH 7.0, 0.15 M KCl, 1 mM CoCl₂) at the space velocity of 0.19hr⁻¹ at 45°C(○-○) and 0.24hr⁻¹ at 55°C(●-●).

고정화 ApM 반응기의 연속운전시 안정성

반응기에서 고정화 효소의 최적온도는 55°C로 나타났다지만, 반응기를 장기 운전할 때는 고정화 효소의 역가 안정성이 최고를 나타내는 최적 운전조건이 필요하다. 45°C와 55°C에서 장기 운전 안정성을 시험한 결과 (Fig. 8), met-hGH 전환율은 45°C에서 초기에 94.5%에서 90일 경과시 75.5%로 0.21%/day 비율로 감소하였고, 55°C에서는 초기에 95.8%에서 90일 경과시 42.8%로 0.59%/day 비율로 감소하였다. 90일간의 연속 운전결과로부터 예측한 Cellufine-ApM 반응기의 반감기는 45°C에서 225일, 55°C에서 81일로 본 연구에서 제작한 Cellufine-ApM 반응기는 비교적 오랜 시간 동안 운전이 가능한 우수한 반응기였다. 즉 Cellufine-ApM 반응기를 연속운전하여 천연형 인간 성장 호르몬을 대량생산함으로써 ApM을 재사용하는 효과를 얻을 수 있었으며 값비싼 효소인 ApM을 다량 사용할 때 생기는 경제적인 문제점을 해결할 수 있었다.

요 약

Aminopeptidase M(ApM)을 Cellufine Formyl 에 고정화시켜 고정화 효소의 반응특성을 고찰하고, 고정화 ApM을 충전한 column reactor를 이용하여 메치오닐 인간 성장 호르몬(met-hGH)으로부터 천연형 인간 성장 호르몬(hGH)의 연속 생산을 검토하였다. Cellufine Formyl 1g gel당 2.3mg의 ApM이 결합되었을 때 met-hGH의 hGH로의 전환능력이 가장 우수하였다. Soluble enzyme과 고정화 효소의 반응 최적 pH는 7.0, 반응 최적 온도는 55°C로 동일하였으나 고정화에 의해 pH 범위가 보다 넓어졌으며, column reactor에서 연속 운전시 최적 온도 역시 55°C로 나타났다. Column reactor를 이용한 천연형 hGH의 연속 생산시 met-hGH가 100% 전환되는 조건에서 hGH 수율과 생산성은 각각 약 77%와 약 0.8mg hGH/ml·h이었다. 반응기 크기를 5배 증가시켰을 때 두 반응기에서 유속 SV 값이 동일하면 met-hGH 전환율과 hGH 수율이 동일하였으며, 90일간의 연속 운전 결과로 예측한 column reactor의 반감기는 45°C에서 228일, 55°C에서 81일로 비교적 안정하였다.

참고 문헌

1. M. Raben(1958), *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **18**, 901.
2. E. Knobil, R. C. Wolf, R. O. Greep and A. E. Wilhelmi(1957), *Endocrinology*, **60**, 166.
3. M. A. Preece(1986), *Neuropathol. Applied Neurobiol.*, **12**, 509.
4. D. V. Goeddel, H. L. Heyneker, T. Hozumi, R. Arentzen, K. Itakura, D. G. Yansura, M. J. Ross, G. Miozzari, R. Crea and P. H. Seeburg(1979), *Nature*, **281**, 544.
5. M. Ikehara, E. Ohtsuka, T. Tokunaga, Y. Taniyama, S. Iwai, K. Kitano, S. Miyamoto, T. Ohgi, Y. Sakuragawa, K. Fujiyama, T. Ikari, M. Kobayashi, T. Miyake, S. Shibahara, A. Ono, T. Ueda, T. Tanaka, H. Baba, T. Miki, A. Sakurai, A. Oishi, O. Chisaka and K. Matsubara(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 5956.
6. T. Tokunaga, S. Iwai, H. Gomi, K. Kodama, E. Ohtsuka, M. Ikehara, O. Chisaka and K. Matsubara(1985), *Gene*, **39**, 117.
7. S. L. Kaplan, L. E. Underwood, G. P. August, J. J. Bell, S. L. Blethen, R. M. Blizzard, D. R. Brown, T. P. Foley, R. L. Hintz, N. J. Hopewood, A. Johansen, R. T. Kirkland, L. P. Plotnick, R. G. Rosenfeld and J. J. Van Wyk(1986), *Lancet*, **i**, 697.
8. H. Flodh(1987), *Acta Paediatr. Scand.*, **337** (suppl), 130.
9. R. D. G. Milner, N. D. Barnes, J. M. H. Buckler, D. J. Carson, D. R. Hadden, I. A. Hughes, D. I. Johnston, M. J. Parkin, D. A. Price, P. H. W. Rayner, M. O. Savage, C. S. Smith and P. G. F. Swift(1987), *Archiv. of Disease in Childhood*, **62**, 776.
10. M. A. Preece(1986), *Immunological Aspects of Human Growth Hormone* (eds Milner, R. D. G. and Flodh, H.), p. 9, Medical Education Services Oxford.
11. J. Tyllström, B. Karlen and O. Guilbaud(1986), *Immunological Aspects of human Growth Hormone* (eds Milner, R. D. G. and Flodh, H.), p. 19, Medical Education Services Oxford.
12. L. H. Rasmussen, M. Zachmann and P. Nilsson(1988), *Helv. Paediatr. Acta*, **43**, 443.
13. F. Buzi, C. R. Buchanan, D. J. Morrell and M. A. Preece(1989), *Clin. Endocrinol.*, **30**, 531.
14. K. Lundin, L. Berger, F. Blomberg and P. Wilton(1991), *Acta Paediatr. Scand.*, **372** (suppl), 167.
15. H. F. Kuo, P. C. Liu, K. C. Shih, T. S. Lee and L. T. Ho(1992), *Acta Paed. Sin.*, **33**, 12.
16. S. Nakagawa, T. Yomada, K. Kato and O. Nichimura(1987), *Biotechnology*, **5**, 824.
17. H. Dalbøge, H-H. M. Dahl, J. Pedersen, J. W. Hansen and T. A. Christensen(1987) *Biotechnology*, **5**, 161.
18. E. Franchi, F. Maisano, S. A. Testori, G. Galli, S. Toma, L. Parente, F. D. Ferrera and G. A. Grandi(1991), *J. Biotechnol.*, **18**, 41.
19. G. L. Gray, K. A. Mckeown, A. J. S. Jones, P. H. Seeburg and H. L. Heyneker(1984), *Biotechnology*, **4**, 161.
20. H. M. Hsiung, A. Cantrell, I. Luirink, B.

- Oudega, A. J. Veros and G. W. Becker (1989), *Biotechnology*, **7**, 267.
21. G. W. Becker and H. M. Hsiung(1986), *FEBS Letters*, **204**, 145.
 22. C. Kato, T. Kobayashi, T. Kudo, T. Furusato, Y. Murakami, T. Tanaka, H. Baba, T. Oishi, E. Ohtsuka, M. Ikehara, T. Yanagida, H. Kato, S. Moriyama and K. Horikoshi(1987), *Gene*, **54**, 197.
 23. R. J. Delange and E. L. Smith(1971), *The Enzymes*, **3**, 81.
 24. T. Yoshimoto and D. Tsuru(1983), *J. Biochem.*, **94**, 619.
 25. K. Mosbach(1976), *Methods in Enzymology*, **44**, (eds Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.) Academic press, New York.
 26. S. M. Cramer and C. Horvath(1988a), *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 344.
 27. S. M. Cramer and C. Horvath(1988b), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 74.
 28. G. Fleminger and A. Yaron(1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **743**, 437.
 29. R. D. Düa, P. Vasudevan and S. Kumar (1985), *J. Macromol. Sci. Chem.*, **22**, 1557.
 30. P. Südi, F. E. Dala and B. Svajani(1989), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **22**, 31.
 31. M. Hajjou and Y. E. Gal(1993), *J. Mar. Biotechnol.*, **1**, 51.
 32. G. L Radu and P. R. Coulet(1993), *Analytical Letters*, **26**, 1321.
 33. D. Gabel and R. Axen(1976). *Methods Enzymol.*, **44**, 383.
 34. G. Pfeleiderer(1971), *Methods Enzymol.*, **19**, 514.
 35. R. M. Rigglin, G. K. Dorulla and D. J. Miner (1987), *Anal. Biochem.*, **167**, 199.