

식물세포 배양으로 부터 Peroxidase 대량 정제를 위한 전처리 공정 개발

표 상 현·홍 승 서·*김 진 현
(주)삼양제넥스 생명공학연구소
(접수 : 2000. 6. 30., 게재승인 : 2000. 8. 17.)

A New Large-scale Pre-purification for Peroxidase from Plant Cell Cultures

Sang-Hyun Pyo, Seung-Suh Hong, and Jin-Hyun Kim†
Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejeon 305-348, Korea
(Received : 2000. 6. 30., Accepted : 2000. 8. 17.)

A novel pre-purification method was developed for producing peroxidase to guarantee high purity and yield from plant cell cultures in large-scale process. This method was a simple and efficient procedure for the isolation and pre-purification of peroxidase from the biomass consisting of active clay treatment, followed by cationic exchange chromatography. The use of active clay in the pre-purification process allows for rapid and efficient separation of peroxidase from interfering compounds and dramatically increases yield and purity of crude peroxidase for purification steps compared to alternative processes. This pre-purification process serves to minimize the buffer usage, size and complexity of the HPLC operations for peroxidase purification. This process is readily scalable to a pilot plant and eventually to a production environment where mass production of material are expected to be produced.

Key Words : peroxidase, pre-purification, active clay, adsorption, plant cell culture

서 론

Peroxidase(POD, EC 1.11.1.7)는 과산화수소 존재하에서 기질을 산화시키는 작용을 하는 효소이며 상업적으로 매우 중요한 효소로서 각종 임상시험용 진단시약, 화학분석용 시약, 유기화합물의 산화반응 등 다양하게 사용되고 있다(1,2,3). 이 효소는 식물에 널리 존재하는데 특히, 서양겨자무(*Armoracia rusticana*)의 주근에 많이 함유되어 있으며 현재 시약으로 이용되고 있는 대부분의 과산화효소는 이들을 재배하여 수확한 다음 추출/정제하여 이용하고 있다(4). 그러나 원료로 사용되는 식물의 대량 생산은 넓은 재배 면적이 필요할 뿐만 아니라 기후, 토양, 수확시기 등의 재배조건에 의해 수확량 및 품질이 영향을 받는 등 계획적인 생산에 어려움이 많다. 뿐만 아니라 겨자무를 이용하여 추출/정제할 경우 추출공정에서 겨자무의 자극적인 냄새와 활성손실 등으로 많은 제약을 받아 왔다. 이러한 문제점을 해결하는 방법으로 식물세포 배양에 의한 peroxidase 생산 방법이 제시 되어 왔으나(5,6) 생산성이 낮은 것으로

나타났다. 그러나 sweet potato 세포주를 이용한 식물세포 배양 방법이 보고 되면서 생산성이 상당히 향상 되었다(7,8). 그러나 적용된 추출/정제공정을 통해 정제하기 위해서는 12,000g이상의 고속원심분리 등 대량 생산에 많은 정제 설비와 비용이 소요되어 비경제적이며, 회수율도 높지 않은 단점도 가지고 있다.

본 연구는 이와 같은 단점을 극복하기 위해 활성백토(active clay)를 이용하여 미세한 세포 조각과 불순물을 효과적으로 분리시킨 후 감압 여과 또는 연속식 저속 원심분리기에 의해 경제적으로 peroxidase를 회수할 수 있는 방법을 개발하였다. 이러한 효과적인 전처리 공정은 최종 정제 공정인 크로마토그래피 공정에 많은 도움이 되었다. 또한 개발한 공정을 large-scale에 적용하여 식물세포배양으로부터 peroxidase의 대량 생산 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

식물세포 배양 및 실험재료

본 실험에 사용한 식물세포주는 한국과학기술원 부설 유전자 은행에 기탁된 KCTC 0086BP 세포주를 사용하였다. 2,4-Dichloroacetic acid (2,4-D)이 1 mg/L 첨가된 MS 배지 1750 mL에 동일한 배지에서 14일 동안 배양한 KCTC 0086BP 세포주 250 mL를 넣은 다음, 배양개시와 함께 3 %(w/v)의

†Corresponding Author : Samyang Genex Biotech Research Institute, 63-2 Hwaam-Dong, Yusung-Gu, Taejeon 305-348, Korea
Tel : 82-42-865-8392, Fax : 82-42-865-8399
E-mail : jhkim@genex.co.kr

당을 첨가하여 24℃에서 배양하였다. 배양 후 14일 제에 3%의 설당을 첨가하여 35일째에 배양을 끝내 추출/정제에 사용하였다. 대량 추출/정제를 위한 식물세포 배양은 3M³로 scale-up하여 실시하였고 배양 완료 후 데칸터 (Westfalia, CA 150 Clarifying Decanter)로 식물세포를 회수하여 대량 추출/정제 공정에 사용하였다. 흡착제 처리공정에 사용된 활성백토 (active clay)는 수택화학 (Japan)으로 부터 구입하여 사용하였다. 효소활성 측정에 사용한 pyrogallol과 standard로 이용한 HRP (Horse radish peroxidase)는 Sigma사에서 구입하였고, 과산화수소수(3%)는 Junsei Chemical Co., NaCl, Tris, K₂HPO₄, KH₂PO₄ 등의 시약류는 시약급을 이용하였다.

실험기기

흡광도 측정에는 분광광도계 (Kontron UVICON 933, USA)을 이용하였으며, 대량 추출/정제를 위해 사용한 세포 파쇄기는 Dyno-Mill (WAB KD-6DS, Switzerland)을 연속식 원심분리기로는 Alfa-Laval (Alfa Laval Separation AB, Separator CHPX407SGP-34CG, Sweden)을 이용하였다. 농축을 위해 10K cut-off membrane을 장착한 한외여과장치 (KOCH MEMBRANE SYSTEM INC, UF 2/1, USA)을 이용하였다. 이온교환크로마토그래피의 경우 XK-50/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) column에 DEAE-Sepharose FF Resin (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden)을 충전하여 AKTA Explorer System (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용하여 수행 하였다.

추출/정제 공정

배양으로부터 얻은 식물세포를 데칸터를 이용하여 회수한 후 50 mM phosphate를 이용하여 재현탁하여 Dyno-mill을 이용하여 세포를 파쇄하였다. 크로마토그래피를 위한 전처리 과정으로 일반적으로 고속원심분리를 이용하지만 대량 추출/정제를 위한 공정으로는 경제적 이유 등으로 적합하지 않기 때문에 흡착제 처리를 통한 감압여과 방법 또는 연속식 저속 원심분리 방법을 적용하였다. 따라서 흡착제 처리를 위한 조건실험으로 세포파쇄액 500 mL를 각각 준비하여 흡착제의 양을 0, 2, 5, 10, 20 % (w/v), 처리온도를 10, 20, 40, 60℃에서 30분간 교반 한 후 감압여과하여 활성, 단백질량, 비활성 (specific activity), 수율 등을 비교하였으며 감압여과 또는 원심분리 시 세척량을 0, 20, 40, 60, 80, 100%로 하였을 때 따른 비활성과 수율 등을 비교하였다. 또한 일반적으로 많이 사용되어지는 활성탄을 동일 조건 하에서 실험하여 비교하였다.

위의 조건 실험으로부터 얻은 결과를 이용하여 세포 파쇄 용액을 처리하여 세포 조각과 같은 미세한 부유 물질 등을 감압 여과 또는 Alfa-Laval을 이용하여 제거 된 용액을 KOCH사의 한외여과장치 (cut-off 10K)을 이용하여 농축하였다. 양이온 크로마토그래피를 위해 DEAE-Sepharose FF를 XK-50/30 column에 충전하여 실시하였다. 정제된 용액을 Amicon사의 YM10 membrance을 이용하여 탈염 및 농축하여 동결건조 하였다.

단백질 정량 및 Peroxidase 활성 측정

단백질 정량은 BSA를 표준물질로하여 Bradford 분석법

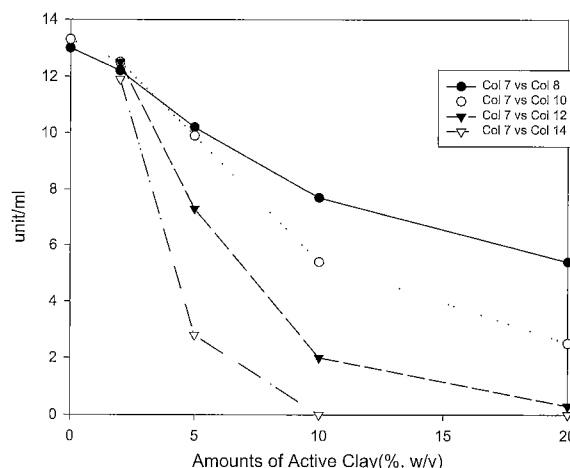


Figure 1. Effects of adsorbent amount and treatment temperature on activity.

(9)에 의해 측정하였다. Peroxidase의 활성은 과산화수소수 존재하에서 pyrogallol을 기질로 사용한 Sigma사의 방법에 의해 측정하였다. 측정하고자 하는 용액 100 (1를 3 mL cuvette에 넣고 0.1M 인산완충용액 (pH 6.0) 0.32 mL, 0.147M H₂O₂ 0.16 mL, 5% pyrogallol 수용액 0.32 mL과 증류수 2.1 ml을 함께 섞은 후 420 nm에서 20초간 상온에서 흡광도 변화를 측정하였다. UV 측정시 반응액의 흡광도가 0.4~0.7이 되도록 측정용액을 희석하여 효소활성을 측정하였다. Peroxidase 활성 (unit/mg 시료) = ((ΔAbs₄₂₀/20sec) × (희석배율)) / (12* × mg시료/mL 반응액) (12* : 420 nm에서의 흡광계수).

전기영동

18% acrylamide gel을 사용하여 SDS-PAGE를 수행하였으며, protein molecular weights standard로서 Bio-Rad의 low molecular weights standard로 비교하였다. 전개가 끝난후 Coomassie Brilliant Blue R-250로 염색하였다.

결과 및 고찰

흡착제 처리 공정

흡착제 처리량과 처리 온도별로 실험을 수행하여 peroxidase 활성 (수율)을 비교했을 때 온도가 높을수록 또한 처리량이 많을수록 전체 활성은 낮아짐을 알 수 있었다(Figure 1). 이는 흡착제에 불순물 뿐만 아니라 peroxidase도 함께 흡착이 일어나며 그 정도는 온도와 처리량에 따라 영향을 받음을 알 수 있었다. 반면에 비활성 (specific activity)을 비교 하였을 때는 낮은 온도하에서는 처리량이 증가 할수록 비활성이 증가 하였다. 이는 불순물인 단백질을 포함한 여러가지 불순물의 흡착정도가 peroxidase에 비해 강한 결과라 판단되며 온도가 높아질수록 그 선택성은 감소 하였다. 이 결과로부터 단순히 흡착제 처리만으로도 부분적인 정제가 이루어짐을 알 수 있었으며 수율 측면에서 적정 조건으로는 처리온도 20℃, 흡착제량 2%가 적당 하였다 (Figure 2).

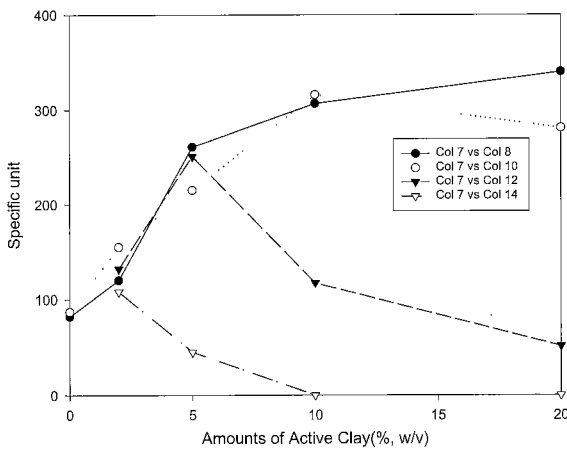


Figure 2. Effects of adsorbent amount and treatment temperature on specific activity.

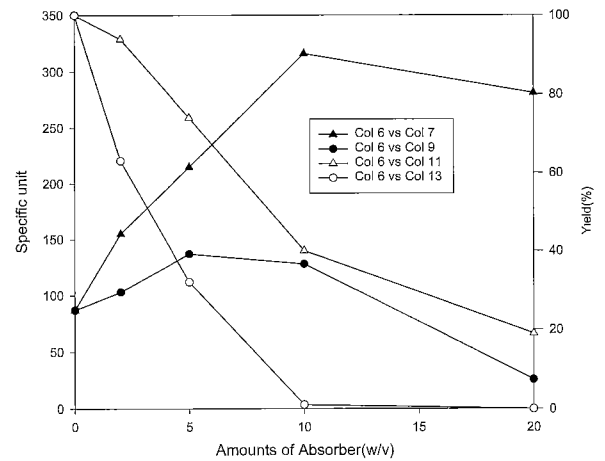


Figure 4. Comparison of yield and specific activity between active clay and activated charcoal.

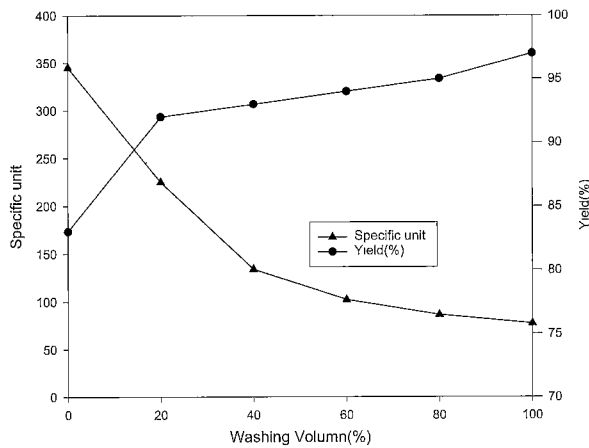


Figure 3. Effects of washing volume on specific activity and yield.

흡착제에 흡착된 peroxidase의 회수율을 높이고자 감압여과 또는 저속 원심분리 시 건조물 세척 정도에 관한 실험을 실시 하였다. 흡착된 peroxidase가 세척량을 증가해 줌에 따라 회수율이 높아짐을 알 수 있었다(Figure 3). 또한 비활성은 현저하게 감소하는 결과를 보여줌에 따라 이는 흡착제에 강하게 흡착되지 않아 세척을 많이 해주면 peroxidase의 회수와 함께 더 많은 비율의 불순 단백질도 현저하게 탈착되는 결과라 하겠다. 이는 흡착정도가 불순 단백질이 상대적으로 더 강한 결과라 볼 수 있다. 회수율과 비활성 측면에서 세척량은 20%가 적당함을 알 수 있었다.

흡착제의 선택적 흡착성을 비교하기 위해 일반적인 흡착제, 주로 탈색공정에 많이 사용되는(10) 활성탄 (activated charcoal)과 비교 실험을 하였다. Figure 4에서 보는 바와 같이 비활성을 비교할 때 활성백토의 경우 처리량을 증가

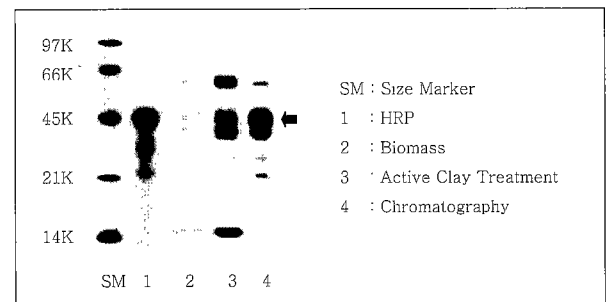


Figure 5. SDS-PAGE gel electrophoresis.

함에 따라 현저히 증가하는 반면 활성탄은 거의 변화가 없었다. 또한 수율면에서도 활성백토가 더욱 효과적임을 알 수 있었다. 이는 활성탄의 경우 peroxidase에 대해 선택성이 없이 흡착되는 결과라 판단된다. 이와 같은 흡착제 처리 공정을 통해 흡착제 2%, 처리온도 20°C에서 건조물 세척량 20%로 하여 저속 원심분리 또는 감압여과 하여 전처리를 한 후 한외여과를 통해 20배 농축하여 크로마토그래피 공정에 이용하였다.

크로마토그래피 공정

전처리된 용액을 50 mM Tris buffer (pH 7.5)에 의해 평형으로 준비된 DEAE-Sepharose FF column에 흡착시킨 후 0-0.5 M NaCl의 선형농도구배를 적용시켜 용출시켰다. 대량 정제를 위하여 0.1 M NaCl 세척 후 0.3 M NaCl 용출하여 얻은 용액을 모아 한외여과장치를 이용하여 탈염, 농축하여 동결 건조함으로써 정제를 완료하였으며, 실제로 대량 추출/정제에 적용한 결과를 Table 1에 나타내었다. 또한 정제 단계별 SDS-PAGE를 Figure 5에 나타내었다.

Table 1. The purification of peroxidase from plant cell cultures in large-scale process.

Step	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification folds
Biomass	13,000,000	75	100	1.0
Active clay treatment	11,800,000	245	91	3.3
Chromatography	9,300,000	1,480	72	20.0
Freeze drying	8,700,000	1,550	67	20.6

본 연구는 활성백토를 이용하여 크로마토그래피를 위한 전처리로서 충분하며 대량 추출/정제에 매우 유용하였다. 식물세포배양으로부터 peroxidase를 효과적으로 정제할 수 있었으며 peroxidase의 상업화를 위해 충분히 이용될 수 있는 공정이라 판단된다. 이러한 결과를 바탕으로 peroxidase를 비롯한 여러가지 효소뿐만 아니라 단백질 정제에 활성백토를 적용하여 대량 추출/정제공정에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

식물세포배양으로부터 peroxidase를 대량 생산하기 위한 분리/정제 공정으로서 세포를 파쇄하고 크로마토그래피 전처리로서 활성백토를 적용하였다. 활성백토는 미세한 세포 조각 뿐만 아니라 여러가지 불순물을 선택적으로 흡착하는 성질을 나타내었으며, 이를 통하여 효과적으로 정제 공정을 진행할 수 있었다. 흡착을 통한 전처리 후 한외여과장치를 이용하여 농축을 실시 하였으며, DEAE-Sepharose FF를 이용한 크로마토그래피를 통해 정제가 이루어졌다. 활성을 나타내는 용액을 탈염, 농축 후 동결 건조하였다. 이 공정은 상업화에 필요한 대량 정제를 가능하게 하였으며 수율과 정제비용 측면에서 상당히 경제적인 공정임을 입증하였다. 활성백토를 이용한 흡착공정은 다른 효소 및 단백질의 경제적인 대량정제에 적용될 수 있으리라 기대된다.

REFERENCES

1. Siddique, L. W., J. A. Brochot (1981), Development of a Novel Potentiometric Assay for Peroxidase and Peroxidase-Coupled Reactions Based on the Fluoride Ion-Selective Electrode, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **19**, 838.
2. Bollag, J. M., and J. Dec (1994), Use of Plant Material for the Decontamination of Water Polluted with Phenols, *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1132-1139
3. Klivanov, A. M., T. M. Tu, and K. P. Scott (1983), Peroxidase-Catalyzed Removal of Phenols from Coal-Conversion Waste Water, *Science* **221**, 259-261
4. Shannon, L. M., E. Kay, and Y. Lew (1966), Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots, *J. Biol. Chem.* **241**, 2166-2171
5. Parkinson M, T. Cotter, P. J. Dix (1990), Peroxidase Production by Cell Suspension and Hairy Root Cultures of Horseradish(*Armoracia rusticana*), *Plant Sci* **66**, 271-277
6. Sesto P. A., van Huystee R. B(1989), Purification and Yield of a Cationic Peroxidase from a Peanut Suspension Cell Culture, *Plant Sci.* **61**, 163-168.
7. Kim, S. K., S. S. Kwak, K. H. Jung, S. R. Min, I. H. Park, and J. R. Liu (1994), Selection of Plant Cell Lines for High Yields of Peroxidase, *Korean Biochem. J.* **27**, 132-137.
8. Kwak, S. S., S. K. Kim, M. S. Lee, K. H. Jung, I. H. Park and J. R. Liu(1995), Acidic Peroxidases from Suspension-Cultures Sweet Potato, *Phytochemistry*, **39**, 981-984.
9. Bollag, D. M and S. J. Edelman(1991), Protein Methods, pp. 50-55, Wiley-Liss, New York
10. Hong, S. S., B. K. Song, J. H. Kim, C. B. Lim, H. S. Lee, K. W. Kim, I. S. Kang and H. B. Park(1990) Method for purifying Taxol from Taxus Biomass, *U.S. Patent*, 5,900,979.
1. Siddique, L. W., J. A. Brochot (1981), Development of a Novel Potentiometric Assay for Peroxidase and Peroxidase-