

## 고구마 (*Ipomoea batatas*) 현탁배양에서 배지조성 및 세포접종량의 적정화에 의한 Peroxidase 생산성 향상

곽상수\*<sup>1</sup> · 김수경<sup>1,2</sup> · 정경희<sup>1</sup> · 유순희<sup>1</sup> · 박일현<sup>2</sup> · 유장렬<sup>1</sup>

<sup>1</sup>한국과학기술연구원 유전공학연구소 생물자원연구그룹,

<sup>2</sup>충남대학교 자연과학대학 생화학과

## Improvement of Peroxidase Productivity by Optimization of Medium Composition and Cell Inoculum Size in Suspension Cultures of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*)

S. S. KWAK\*<sup>1</sup>, S. K. KIM<sup>1,2</sup>, K. H. JUNG<sup>1</sup>, S. H. YOO<sup>1</sup>, I. H. PARK<sup>2</sup>, and J. R. LIU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bioresources Research Group, Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejeon, 305-606: and

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Chungnam National University, Taejeon, 305-764. \*Corresponding author.

To improve the productivity of peroxidase (POD) of cell line SP-47 derived from cell suspension cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv White Star), we optimized culture conditions including the composition and concentration of plant growth regulators and carbon source, and the cell inoculum size. When one g (fr wt) of cells was inoculated into 50 mL LS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 30 g/L sucrose in 300 mL Erlenmeyer flask at 25° C in the dark (100 rpm), the POD activity per g cell dry wt was maximized to be about 6,800 units after 25 days of subculture, which was about 30 times higher than that of intact roots of horseradish plants grown in the greenhouse, but the cell growth was maximum after 15 days of subculture. The protein content per g cell dry wt maintained almost plateau and after 25 days of subculture decreased as culture proceeded further, whereas the POD specific activity (unit/mg protein) was about two times higher after subculture and continuously increased from 12 days to the end of cultures (40 days). The POD isozyme patterns showed almost the same regardless of cell growth stage, but some acidic isozymes were slightly increased after 25 days of subculture. These results indicate that POD activity in suspension cultures of sweet potato is closely associated with cell growth and stresses derived from cell culture conditions and medium depletion. Due to its high POD activity, the SP-47 cell line seems to be suitable for the mass production of POD.

**Key words:** culture stress, horseradish, isozyme pattern

Peroxidase (POD, EC 1.11.1.7)는 고등식물에서 세포의 성장과 분화에 관여하는 중요한 효소로서 특히 과산화수소 존재에서 각종 기질을 산화시키는 반응이 민감하여 임상시험의 진단시약, 유기화합물의 산화반응 등에 사용되는 상업적으로 매우 중요한 효소이다(Henning and Nielsen, 1987;

Park et al., 1989; Sies, 1991; Krell, 1991). POD는 용도개발에 따라 의학, 식품, 화학분야 등에서 다양하게 이용될 수 있어 그 시장성이 증가될 것으로 기대된다. 최근 폐수 중의 phenol 및 방향족 화합물 제거에도 이용될 수 있음이 보고되어 있다(Klibanov et al., 1980).

POD는 식물을 포함한 대부분의 생물에 널리 존재하는데 특히 서양겨자무(*Armoracia rusticana*)의 주근에 많이 함유되어 있어 시판되고 있는 대부분의 POD는 이로부터 추출하여 공급되고 있다(Shannon et al., 1966). 그러나, 이 식물을 대량재배하려면 넓은 면적의 토지가 필요할 뿐만 아니라 여러가지 재배요인에 의해 수확량과 품질이 영향을 받는다. 따라서 안정적으로 높은 수율의 POD를 생산할 수 있는 새로운 경제적인 생산방법이 요구된다.

식물체에서 POD는 일반적으로 바이러스, 미생물, 곰팡이 등의 생물학적 스트레스와 급격한 환경변화, 공기오염물질, 상처 등의 비생물학적 스트레스에 반응하여 그 활성이 증가된다(Endress et al., 1980; van Huystee, 1987; Miller and Kelley, 1989; Bowles, 1990). 한편 식물에서 얻을 수 있는 유용물질은 식물의 기내배양을 통하여 얻을 수 있다. 특히 식물체가 여러가지 외부 스트레스에 의해 POD 활성이 증가되는 점을 고려해 볼 때 다양한 배양 스트레스에 의해 자라고 있는 식물배양세포는 POD 생산을 위한 좋은 재료가 될 수 있을 것으로 기대된다(Takeda et al., 1990).

식물세포배양에 의한 POD 생산에 대해서는 서양겨자무(Yamada et al., 1987; Parkinson et al., 1990), 무우(Moreno et al., 1989), 땅콩(van Huystee and Turcon, 1973; Sesto and van Huystee, 1989), 담배(Mader and Walter, 1986) 등 여러종의 식물에 대해 연구되어 왔다. 또한 *Agrobacterium rhizogenes*에 의해 형질전환된 모상근으로부터 POD 생산도 시도되고 있다(Masahito et al., 1989; Taya et al., 1989; Parkinson et al., 1990). 그러나 어느 배양세포도 생산성이 낮아 상업적인 생산에 이르지 못하고 있다. 우리들은 26종의 식물체로부터 다양한 조건에서 유도한 41종의 식물세포주에 대해 POD 활성을 조사하여 POD 고생산세포주로 고구마배양세포주 SP-47를 선발하였다(Kim et al., 1994). 특히 선발된 SP-47세포주는 하나의 isozyme이 강하게 발현(전체활성의 약 90%)될 뿐 아니라 높은 활성을 나타내어 새로운 POD 생산시스템에 활용될 수 있음이 시사되었다.

본 연구에서는 POD 고생산 고구마세포주 SP-47를 사용하여 식물생장조절제 및 탄소원의 조성, 세포 접종량 등 배양조건의 적정화를 통한 POD 생산성 향상을 위한 실험을 수행하였다. 아울러 현탁배양시기에 따른 POD의 비활성(unit/mg protein)과 isozyme pattern의 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 배양세포주 및 세포배양조건

고구마(*Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv White Star)의 현탁배양세포로부터 small-cell aggregate method에 의해 선발

된 POD 고생산세포주 SP-47를 사용하였다(Kim et al., 1994). 세포의 증식배지로는 1 mg/L 2,4-D과 30 g/L sucrose가 함유된 LS(Linsmaier and Skoog, 1965) 배지(이하 LS1D 배지로 약함)를 사용하였으며 세포의 계대배양은 10일 간격으로 하였다.

고구마배양세포주의 배양에 있어 특별히 언급이 없을 경우는 LS1D배지 50 mL이 들어 있는 300 mL Erlenmeyer flask에 세포생중량 0.5 g을 접종하여 100 rpm의 25°C 항온 gyratory 진탕기에서 암배양하였다. Auxin과 cytokinin의 조성도와 농도를 달리하여 실험을 할 경우, 1.0 mg/L 2,4-D 단독처리, 1 mg/L 2,4-D와 0.05 mg/L kinetin, 1.4 mg/L IAA와 0.05 mg/L kinetin, 1 mg/L NAA와 0.05 mg/L kinetin을 혼용처리하였다. 2,4-D 농도를 달리 할 경우는 2,4-D를 1L당 0.5, 1, 2, 4 mg으로하여 LS배지에 첨가하였다. 탄소원을 달리할 경우는 sucrose, glucose, fructose를 LS1D배지에 1L당 30 g씩 첨가하였으며 sucrose의 농도만을 달리 할 경우는 LS1D배지에 1L당 15, 30, 45 g으로 하였다. 접종농도를 달리할 경우는 LS1D배지에 세포생중량 0.5, 1, 1.5 g씩 첨가하였다. 온도와 빛이 세포생장과 POD 활성에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서는 온도를 20, 25, 30°C로 하였고, 20°C와 25°C에서는 암상태와 광상태로 나누어 배양하였다. 세포의 무게는 감압여과하여 생중량을 측정하고 이를 50°C에서 24시간 동안 건조한 후 건조량을 측정하였다.

### Peroxidase 활성 측정

POD 활성은 pyrogallol을 기질로 사용한 Sigma사의 방법에 따라 측정하였다. 배양세포(또는 식물체) 0.3 g을 0.1 M 인산 완충액 (pH 6.0) 10 mL과 함께 파쇄한 후, 8,000 g에서 10분간 원심분리 하였다. UV측정시 반응액의 흡광도가 0.4-0.7이 되도록 상등액을 희석하여 효소활성을 측정하였다. 효소액 100  $\mu$ L를 3 mL cuvette에 넣고, 0.1 M 인산 완충액 (pH 6.0) 0.32 mL, 0.147 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.16 mL, 5% pyrogallol 용액 0.32 mL과 증류수 2.1 mL을 함께 섞은 후, 420 nm에서 20초간 상온에서 흡광도변화를 측정하였다. POD 활성은 다음의 식으로부터 구하였다.

$$\text{POD 활성 (unit/g 시료)} = (\Delta A_{420} / 20 \text{ sec} \times \text{희석배율}) / (12^* \times \text{시료/mL 반응액})$$

(12\*: 420 nm에서의 흡광계수)

### Native PAGE

현탁배양세포 1 g을 막자사발에 넣고 액체질소와 함께 파쇄하여 증류수로 녹인 후 4°C 12,000 g에서 20분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 단백질함량을 측정하고 동일

량의 단백질농도가 되도록 조정하였다. 전기영동은 12.5% acrylamide 농도로 4°C에서 15 mA로 40분간 25 mA로 1시간 20분간 전개시켰다. POD 단백질의 발색반응은 benzidine 용액(benzidine 1 g, 빙초산 9 mL, 증류수 36 mL)과 3% 과산화수소 용액을 1:1 섞은 후, gel 상에서 반응시켜 수행하였다. 단백질정량은 Bradford 방법(1976)으로 하였다

### 결과 및 고찰

#### 식물생장조절제의 조성과 농도의 영향

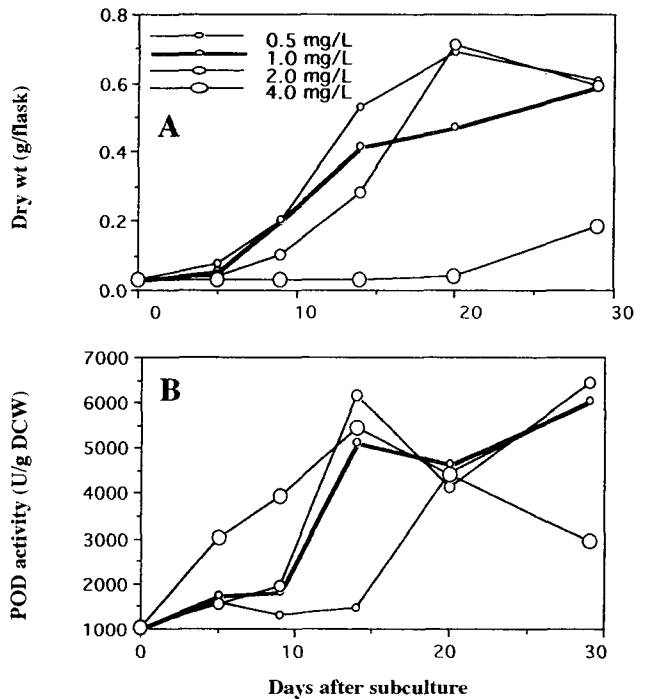
Auxin과 cytokinin의 조성을 달리하여 계대배양 후 10일째 세포의 성장을 조사한 결과, 1 mg/L 2,4-D 단독 처리시 가장 양호하였으며, NAA와 kinetin, IAA와 kinetin, 2,4-D와 kinetin 혼용 처리순으로 좋았다(Table 1). 또한 전체 POD 활성은 2,4-D 단독 처리에서 가장 높았으며, 다음으로 2,4-D와 kinetin, NAA와 kinetin, IAA와 kinetin의 혼용 처리순으로 높았다.

한편 2,4-D 농도를 달리하여 배양기간별 세포의 성장과 POD 활성은, 2,4-D 농도가 높아짐에 따라 세포의 성장속도는 떨어지나 POD 활성은 증가하였다(Figure 1). 단위 세포당 POD 활성(unit/g dry wt)은 배양 후 14일에서 1 mg/L 농도이상에서 약 5,500으로 높았으나, 4.0 mg/L 처리에서는 계속 배양함에 따라 활성이 현저히 감소하였다. 배양 14일째 flask당 전체활성은 2,4-D 1 mg/L을 처리하였을 때 약 2,300 unit로 가장 양호하였다. 배양초기에 2,4-D를 첨가하였을 때 농도가 증가함에 따라 세포생장은 감소시키지만 POD 활성을 증가시키는 서로 상반되는 결과를 보였으므로 배양후 12일째에 2,4-D 3 mg/L을 첨가해 본 결과, 그후의 세포생장에는 영향을 주지 않았지만 POD 활성은 오히려 감소하였다(data는 제시되지 않았음).

**Table 1.** Effects of plant growth regulators in LS medium on cell growth and POD activity in cell suspension cultures of sweet potato.<sup>a</sup>

Hormone (mg/L)	Dry cell wt (g/flask)	POD activity (units/g dry wt)	Total POD activity (units/flask)
2,4-D(1.0)	0.338	2,646	971
2,4-D(1.0)+ kinetin(0.05)	0.204	2,587	583
IAA(1.4)+ kinetin(0.05)	0.223	1,620	402
NAA(1.0)+ kinetin(0.05)	0.251	1,999	539

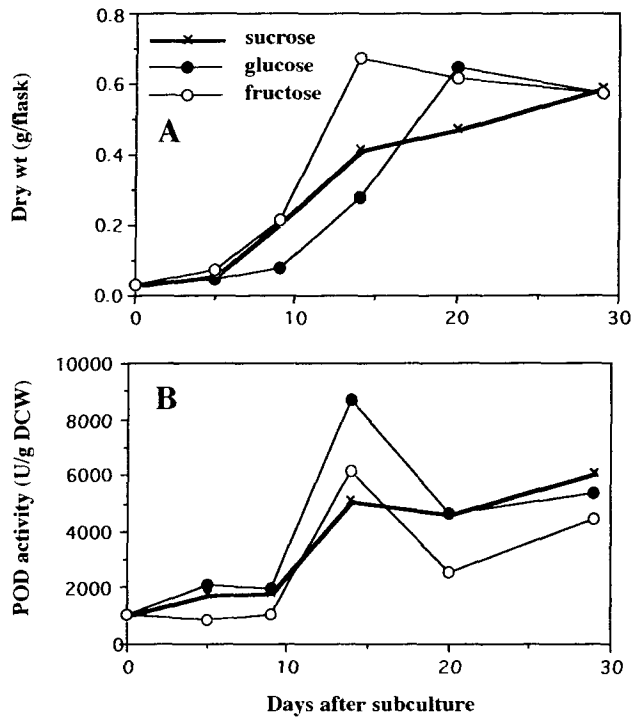
<sup>a</sup> The data were collected after 10 days of culture.



**Figure 1.** Effects of 2,4-D level on cell growth and POD activity in cell suspension cultures of sweet potato in LS medium. A: Time course of cell growth; B: Time course of POD activity on the basis of g dry cell wt.

#### 탄소원의 종류와 농도의 영향

세포생장과 POD 활성에 미치는 탄소원의 효과를 알아보기 위하여 탄소원으로 sucrose, glucose, fructose를 1L당 30g의 동일농도로 처리한 결과(Figure 2), 세포의 성장속도는 fructose를 탄소원으로 사용하였을 때 가장 빠르고 sucrose, glucose의 순으로 나타났고 단위세포당 POD 활성은 배양 24일째 glucose에서 가장 높았다. 그러나, 각각의 탄소원에서 자란 세포를 같은 탄소원을 사용한 배지에 다시 계대배양하였을 경우 glucose와 fructose에서 자란 세포는 생장이 크게 억제되어 고구마 세포배양의 적정 탄소원은 sucrose로 간주되었다(data는 제시되지 않았음). Sucrose의 농도에 따른 세포의 성장과 POD 활성에 미치는 효과를 조사한 결과(Figure 3), 세포의 성장과 POD 활성은 배양 후 14일째까지는 sucrose의 농도에 의해서 큰 영향을 받지 않았다. 그러나 flask당 세포전중량은 15 g/L sucrose 농도에서는 배양 후 14일에서 0.39 g, 45 g/L의 농도에서는 20일에서 0.94 g으로 생장이 최대치에 도달하였다. 배양후기의 세포생장은 sucrose가 고농도일수록 좋았다. 단위 세포당 POD 활성은 배양 10일경부터 증가하였는데 특히 15 g/L sucrose일 때 배양 후 20일에서 가장 높았다(7,000 unit/g dry wt). Sucrose가

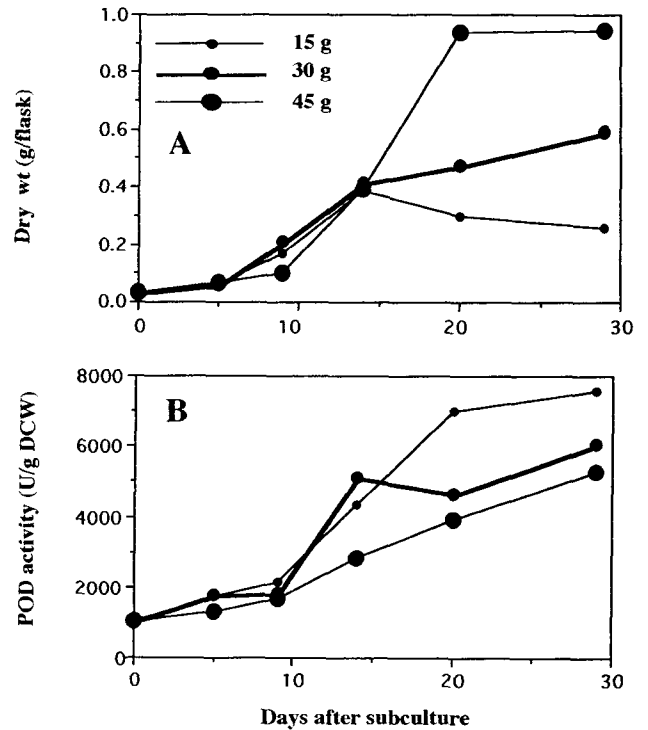


**Figure 2.** Effects of carbon source on cell growth and POD activity in cell suspension cultures of sweet potato in LS1D medium. A: Time course of cell growth; B: Time course of POD activity on the basis of g dry cell wt.

저농도일수록 단위세포 무게당 POD 활성이 배양후기에서 증가되는 것은 sucrose 고갈에 의한 스트레스와 노화에 기인하는 것으로 여겨진다. Flask당 전체활성은 배양 14일에서 30 g sucrose를 처리하였을 때 약 2,300 unit로 높았고 배양후기에서는 45 g에서 높았다.

**세포접종량의 영향**

LS1D배지에 초기세포 접종농도를 생중량 0.5, 1, 1.5 g으로 하여 세포의 성장과 POD 활성을 조사하였다(Figure 4). 1 g을 접종하였을 때 전형적인 시그모이드 성장곡선을 보였으며 배양 14일에 flask당 세포건중량은 1.72 g으로 양호하였다. 그러나 1.5 g 접종시에는 세포생장이 가장 저조하였다. 단위 세포당 POD 활성은 1.5 g에서 전반적으로 가장 양호하였으며 0.5 g과 1 g 접종시에는 큰 차이가 없었다. 한편 flask당 전체활성은 1 g 접종시 배양 24일 전후에서 약 3,900 unit로 가장 높았다. 특히 1 g 접종시에는 생산성 향상과 배양기간을 앞당기는 효과가 있어 본 세포주로부터 효율적인 POD 생산을 위한 공정에는 적정 접종농도가 중요한 요인이 시사되었다.



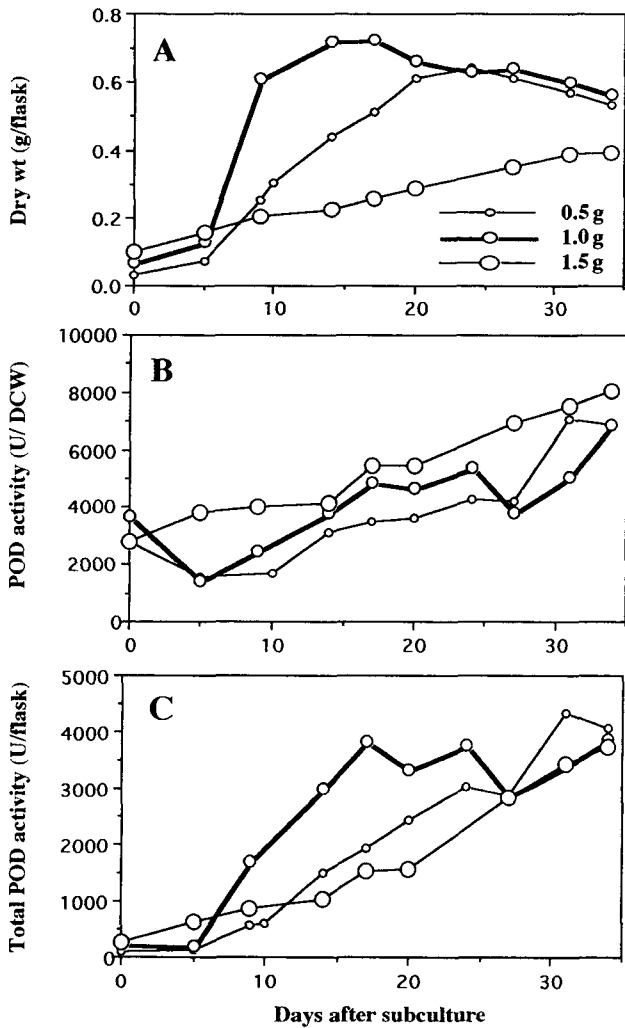
**Figure 3.** Effects of sucrose level on cell growth and POD activity in cell suspension cultures of sweet potato in LS1D medium. A: Time course of cell growth; B: Time course of POD activity on the basis of g dry cell wt.

**온도와 빛의 영향**

세포생장과 POD 활성에 대한 온도의 영향을 알아보기 위해서 20, 25, 30°C에서 배양한 결과, 세포의 생장은 25°C에서 최적의 성장을 보였으며 단위세포당 POD 활성은 온도가 증가함에 따라 높았다(data는 제시되지 않았음). 한편, POD의 기질로 이용되는 phenol계 화합물의 생합성에서 중요 효소인 phenylalanine-ammonia lyase (PAL)의 활성은 빛에 의해 증가되며, 배양세포에서 PAL 합성을 유도하는 물질이 POD 활성을 증가시킨 예도 있다(Kim and Yoo, 1992). 그러나 본 연구에서 사용한 고구마 배양세포에서 빛은 세포생장과 POD 활성에 뚜렷한 효과를 나타내지 않았다.

**배양시기별 POD 활성 및 Isozyme 변화**

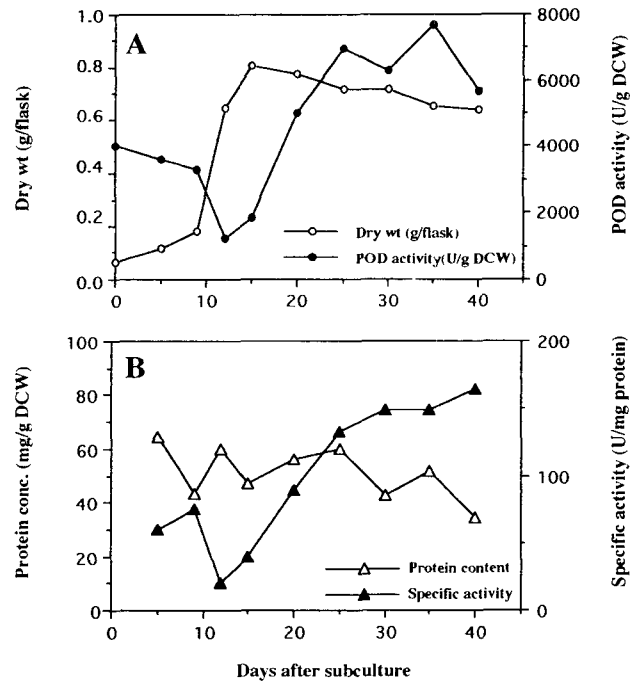
이상에서 확립한 적정배양조건에서 세포생장은 배양 후 10일부터 급격한 성장기에 진입하여 15일에 최고성장기에 이르는 전형적인 시그모이드 성장곡선을 나타내었다(Figure 5). 단위세포 건중량당 POD 활성은 계대배양 직후에 약 4,000 unit로 비교적 높았다. 이는 계대배양시 활성(배양 10일째의 활성에 해당함)의 약 2배로 계대배양에 따



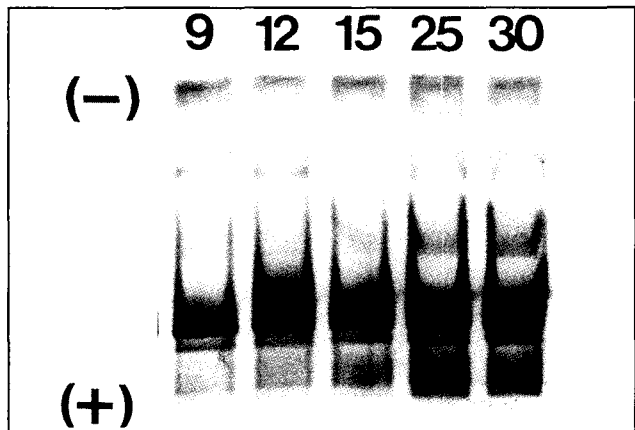
**Figure 4.** Effects of cell inoculum size on cell growth and POD activity in cell suspension cultures of sweet potato in LS1D medium. A: Time course of cell growth; B: Time course of POD activity on the basis of g dry cell wt.; C: Total POD activity on the basis of flask.

큰 스트레스에 기인하는 것으로 사료된다. 단위 세포당 POD 활성은 세포생장이 시작되는 시점보다 수일 후인 배양 후 15일경부터 급격히 증가하기 시작하여 배양 25일경에 정점에 도달하여 약 6,800 unit였으며 액체배지 1L로 환산한 효소활성은 약 98,000 unit였다. 고구마 현탁배양세포에서 POD 활성의 증가와 세포의 생장곡선은 수일간의 차이를 보여 지금까지 보고된 서양겨자무, 담배 등 대부분의 배양세포에서는 생장과 활성이 일치하여 증가되는 점과는 다른 양상을 보여 흥미로운 결과로 여겨진다(Mader and Walter, 1986; Taya et al, 1989; Parkinson et al, 1990).

배양시기별 세포의 단백질함량은 배양초기에 약간 높았으며 배양후 25일까지는 거의 일정한 값을 유지하다가 배



**Figure 5.** Changes of POD activity and protein content in cell suspension cultures of sweet potato in LS1D medium. A: Time course of cell growth and POD activity on the basis of g dry cell wt.; B: Time course of protein content(mg protein/g dry cell wt) and POD specific activity(unit/mg protein).



**Figure 6.** Changes of POD isozyme patterns in cell suspension cultures of sweet potato in LS1D medium. POD was detected by benzidine staining after native PAGE. The number indicates days after subculture.

양 30일 이후에서는 함량이 감소하였다. 한편 POD 비활성 (unit/mg protein)은 배양초기에서 비교적 높은 값을 보이다가 배양 12일경부터 25일까지는 급격한 증가를 보였으며 25일부터는 완만하지만 지속적인 증가를 보였다. 특이할만 것

은 배양후기에 세포생장이 억제되고 단위 세포당 단백질함량이 감소됨에도 불구하고 비활성이 증가되었는데 이는 배양후기의 배지고갈에 따른 세포의 노화에 기인하는 것으로 여겨진다. 세포생장이 억제되는 시기에 auxin을 분해하는 IAA oxidase로서의 POD 역할을 생각해 볼 수 있으나 배양 중간에 POD의 기질이 될 수 있는 3 mg/L 2,4-D를 첨가했을 때 POD 활성은 오히려 감소하는 것으로 보아 고구마 배양세포에서의 POD는 IAA oxidase의 기능으로 활성이 증가한다기보다는 세포벽의 물리적인 장벽인 lignin을 합성함으로써 세포를 보호하고 노화를 지연시키는데 관여하리라고 생각하며 이와 관련한 심도 있는 연구가 요구된다 (Birecka et al., 1979).

한편 배양시기별 POD isozyme 패턴은 배양 25일까지는 거의 변화가 없었으나 25일 이후 배양세포에서 강하게 발현되는 산성의 동위효소의 활성이 약간 증가되었다 (Figure 6). 배양후기의 POD 증가는 배지고갈에 따른 세포의 스트레스와 노화에 관련된 것으로 사료된다.

본 연구에서는 POD 고생산 고구마세포주 SP-47을 사용하여 30 g/L sucrose, 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 LS배지 50 mL을 함유한 300 mL Erlenmeyer flask에 세포생중량 1 g을 접종하여 25°C 암소에서 100 rpm으로 진탕배양하였을 때 POD 생산성을 향상시키는 배양조건을 확립하였다. 현재 elicitation에 의한 POD 생산성 향상과 배양세포로부터 POD를 정제하여 효소의 특성을 밝히는 연구를 수행하고 있다. 저자들에 의해 선발된 고구마 배양세포주 SP-47은 하나의 동위효소가 강하게 발현되어 높은 활성을 보임으로써 서양겨자무 POD를 대체할 수 있는 새로운 POD 생산시스템으로 활용될 수 있음이 기대된다.

## 적 요

고구마 현탁배양세포로부터 POD 고생산세포주로 선발한 SP-47세포주를 사용하여 POD 생산성을 향상시키기 위하여 식물생장조절제 및 탄소원의 종류와 농도, 세포접종량 등의 배양조건을 적정화하였다. 30 g/L Sucrose, 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 LS배지 50 mL을 함유한 300 mL Erlenmeyer flask에 세포생중량 1 g을 접종하여 25°C 암소에서 100 rpm으로 진탕배양하였을 때 세포생장은 배양 후 15일에 절정에 달하였으나 단위세포당 POD 활성(unit/g dry cell wt)은 배양 25일에 약 6,800으로 이는 실생 서양겨자무뿌리의 것보다 약 30배 높았다. 배양시기별 단위세포당 단백질 함량은 계대배양후 약간 높았다가 감소한 후, 배양 25일까지는 거의 일정한 값을 유지하다가 계속 배양함에 따라 감소하였으나 POD 비활성(unit/mg protein)은 배양후 12일부터 배양말기(40일)까지 계속하여 증가하였다. 배양시기별 POD 동위효

소의 패턴은 배양시기에 관계없이 거의 일정하였으나 배양 25일 이후 산성의 주요 동위효소들의 활성이 약간 증가하였다. 이러한 결과로부터 고구마 세포배양의 POD는 세포생장 및 계대배양과 배지고갈로 인한 배양스트레스와 밀접한 관련이 있을 것으로 간주된다.

본 연구에서 확립한 SP-47세포주는 하나의 동위효소가 강하게 발현되어 높은 활성을 보임으로써 새로운 POD 대량생산 시스템에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 인 용 문 헌

- Birecka H, Chaskes MJ, Goldstein J (1979) Peroxidase and senescence. *J Exp Bot* 30 : 567-573
- Bowles DJ (1990) Defence-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem* 59 : 873-907
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248-254
- Endress AG, Suarez SJ, Taylor OC (1980) Peroxidase activity in plant leaves exposed to gaseous HCl or ozone. *Environ Pollut* 22 : 47-58
- Henning D, Nielsen K (1987) Peroxidase-labelled monoclonal antibodies for use in enzyme-immunoassay. *J Immunoassay* 8 : 297-308.
- Kim SK, Kwak SS, Jung KH, Min SR, Park IH, Liu JR (1994) Selection of plant cell lines for high yields of peroxidase. *Korean Biochem J* (in press)
- Kim YH, Yoo YJ (1992) Production of peroxidase using carrot hairy roots Annual Symposium of Bioengineering Research Center, KAIST, pp 113-118
- Klibanov AM, Albert BN, Norriss ED, Felshin LM (1980) Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters. *J Appl Biochem* 2 : 414-421
- Krell HW (1991) Peroxidase : an important enzyme for diagnostic test kits. In Lobarzewski J, Greppin H, Penel C, Gaspar T, eds, *Molecular, and Physiology Aspects of Plant Peroxidases*, Univ Geneva, pp 469-478
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18 : 100-127
- Mader M, Walter C (1986) De-novo synthesis and release of peroxidases in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 169 : 273-277
- Masahito T, Akihito Y, Ryuji N, Osamu K, Chiaki M, Takeshi K (1989) Production of peroxidase with horseradish hairy root cells in a two step culture system. *J Ferment Technol* vol 67 No 1 : 31-34
- Miller AR, Kelley TJ (1989) Mechanical stress stimulates peroxidase activity in cucumber fruit. *HortScience* 24 : 650-652

- Moreno V OA, Vazquez-duhalt, Ochoa JU** (1989) Peroxidase activity in calluses and cell suspension cultures of radish *Raphanus sativus* var. Cherry Bell. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* **18** : 1-327
- Park IS, Kho SO, Nam I** (1989) Korean-radish peroxidase for enzymatic determination of glucose. *Korean Biochem J* **22** : 411-416
- Parkinson M, Cotter T, Dix PJ** (1990) Peroxidase production by cell suspension and hairy root cultures of horseradish (*Armoracia rusticana*). *Plant Sci* **66** : 271-277
- Sesto PA, van Huystee RB** (1989) Purification and yield of a cationic peroxidase from a peanut suspension cell cultures. *Plant Sci* **61** : 163-168
- Shannon LM, Kay E, Lew JY** (1966) Peroxidase isozymes from horseradish roots : Isolation and physical properties. *J Biol Chem* **241** : 2166-2172
- Sies, H** (1991) Oxidative stress : from basic research to clinical application. *The American J. Medicine* **91**(3c) : 31s-38s
- Takeda S, Sato F, Ida K, Yamada Y** (1990) Characterization of polypeptides that accumulate in cultured *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Cell Physiol* **31** : 215-221
- Taya M, Yoyama A, Nomura R, Kondo O, Matsui C, Kobayash T** (1989) Production of peroxidase with horseradish hairy root cells in a two step culture system. *J Ferment Technol* **67** : 31-34
- van Huystee RB** (1987) Some molecular aspects of plant peroxidase : Biosynthetic studies. *Annu Rev Plant Physiol* **38** : 205-219
- Yamada Y, Kobayashi S, Watanabe K, Hayashi U** (1987) Production of horse radish peroxidase by plant cell culture. *J Chem Tech Biotechnol* **38** : 31-39

(1994년 1월 3일 접수)