

제2차년도  
최종보고서

635.34  
L293H  
V.2

배추 뿌리로 부터 유용 효소의 생산

Production of Useful Enzymes from Chinese Cabbage Roots

연 구 기 관  
강 원 대 학 교

농 립 수 산 부

# 제 출 문

농림수산부 장관 귀하

본 보고서를 “배추뿌리로부터 유용 효소의 생산” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1996 년 11 월 30 일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 이 해 익

연 구 원 : 정 연 호

# 요 약 문

## I. 제목 : 배추뿌리로 부터 유용 효소의 생산

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

Peroxidase(이하 POX로 약칭함)는 생물계에 보편적으로 존재하는 효소로서 과산화수소를 물로 환원시키며 이때 유기 화합물을 산화시키는 반응을 촉매한다. 본 효소는 임상 검사용 시약, enzyme immunoassay 및 monoclonal antibody의 screening assay의 검출용 시약으로 뿐만이 아니라 phenol과 같은 방향족 독성 폐기물의 제거에<sup>1)</sup>의 응용이 제시되고 있는 산업적 이용성이 다양한 효소의 하나이다. 현재 상기의 용도로 가장 일반적으로 이용되고 있는 것은 horseradish 기원의 POX이다. 그러나 본 효소는 전량 수입이 되고 또한 효소 정제도에 따라 mg당 0.16 - 9.1 \$로 그 가격이 상당히 비싸므로 본 연구실에서는 horseradish POX를 대체할 새로운 효소원의 개발 및 국산화를 목적으로 한 일련의 연구 결과 배추 뿌리에 다량의 POX가 분포함을 확인하였으며 이어 배추 뿌리 기원의 POX의 정제를 통하여 효소학적 특성을 밝힘과 동시에 산업적 이용 가능성을 제시한바 있다.<sup>2) - 4)</sup> 배추 뿌리 기원의 POX는 넓은 작용 pH 및 비교적 높은 열 안정성을 나타내어 산업적 이용 가능성은 매우 높은 것으로 판명이 되었다.<sup>2) - 4)</sup>

배추는 우리나라에서 많이 재배되고 있는 채소의 하나로서 매년 약 400 만톤 이상이 생산 되고 있으며 강원도 지역에서는 연간 30 만톤 이상이 생산 되고 있다. 그러나 배추는 식용 부분으로서 주로 지상 부분만을 이용하고 뿌리 부분은 극히 일부가 식용으로 이용 될 뿐 막대한 량의 생물자원이 폐기물로 방치되고 있는 실정이다. 배추 뿌리는 생산에 드는 비용과 시간이 거

의 없는 biomass이므로 POX 효소원으로서의 무한한 잠재력과 경제성을 지니고 있다.<sup>5) - 7)</sup> 따라서 본 연구에서는 배추 뿌리의 가공을 통한 고부가가치 산물로의 전환을 목적으로 소규모의 산지 가공 공장에서 가능한 POX의 대량 생산 방법을 개발하여 실용화하고자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

효소의 생산을 위한 효소의 추출 및 저장 조건등은 우선 구명되어야 할 기초적인 사안이다. 이를 위해서 1년차 연구에서는 다음과 같은 연구를 추진하였다.

#### 1) 효소의 정제 조건 검토

- ① 배추 뿌리의 효율적 저장 조건 검토
- ② 배추 품종간 효소 pattern 및 특성 규명
- ③ 배추 뿌리의 효율적 파쇄 방법
- ④ 파쇄물로부터 효소의 추출조건 확립
- ⑤ 이용성이 높은 품종의 선정

#### 2) Peroxidase이외의 유용 효소 활성 검색 및 응용

- ① 산업적 이용성이 높은 효소 활성의 검색
- ② POX의 산업적 응용

#### 3) 효소의 Quality Control

- ① 효소의 Q.C.를 위한 효과적 분석법 확립
- ② 효소의 저장, 보관 조건 확립

본 연구의 1년차에서는 수집한 뿌리의 적절한 효소활성을 유지하기 위하여 보존 방법의 강구, 배추 뿌리로 부터 효소를 효율적으로 추출하기 위하여 효과적인 추출방법 및 손쉬운 분석방법을 확립하여 quality control을 할 수 있는 조건을 설정하였다. 1년차 연구를 바탕으로 2년차 연구에서는 효소의 대량생산을 목표로 다음과 같은 목표를 설정하고 연구를 추진하였다.

1) 효소의 대량정제 방법 확립

- ① 대량처리에 의한 공업용 효소의 생산
- ② Chromatography에 의한 고도 정제 효소의 생산
- ③정제 과정의 scale up

2) Peroxidase의 응용성 검토

- ① Peroxidase의 산업적 이용성 검토
- ② 고도 정제 peroxidase의 이용성 검토

3) 분리 공정의 개발 및 설계

- ① 대량 파쇄기의 운용
- ② 분리 process의 설계

4) 경제성 및 공장 설립 검토

- ① 배추 뿌리 회수의 생력화
- ② 효소 생산 비용 평가
- ③ 공장 설립 비용 추산

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구의 1차, 2차년도에 계획한 효소의 대량 생산에 관한 기초 기술 및 대량 생산 조건의 검토는 성공적으로 이루어 졌으며 기술 수요업체에 이전 또는 산지 가공공장 설립을 통하여 기업화 하여야 할 것이다.

## SUMMARY

I. Title : The Production of Useful Enzymes from Chinese Cabbage Roots

II. The Goal and Rationale of Research

Peroxidase(POX) is a ubiquitous enzyme that catalyses the reduction of hydrogen peroxide into water, accompanied by the oxidation of organic substances. Peroxidase is one of the most promising enzymes for the various industrial applications since its applications have been suggested not only as reagents for clinical diagnosis and detecting reagents for screening assay of monoclonal antibody but also in the field of removal of toxic aromatic compounds such as phenol from waste water. So far, the major source of commercially available POXs for the above applications is roots of horseradish. However all horseradish POXs should be imported from abroad and the price range is between 0.16 to 9.1 \$ per mg according to the purity of enzyme, which is costly. Therefore a series of researchs for searching an alternative source of POX and for the domestic manufacturing of developed POXs had been carried out by our research group and it was discovered that substantial amounts of POX were distributed in the roots of Chinese cabbage. In addition to that, the catalytic feature was characterizd through the purification of POX from Chinese cabbage and the potential for industrial application has been suggested by our research group. The possibility of industrial application

is proved to be great since POX from Chinese cabbage roots showed good stability in the wide range of pH and also relatively good thermal stability.

Chinese cabbage is one of the most cultivating vegetables in Korea whose total production rate is about four million tons per year and more than three hundred thousands of Chinese cabbage are produced per a year in Kangwon area. However only upper part of Chinese cabbage is used for food materials while root part is rarely used for food. Besides, huge amount of root part is abandoned as agricultural wastes. Chinese cabbage root has great economic potential and feasibility as a POX source since it is one of biomass whose production cost is almost negligible. Therefore a practical process possible for the mass production of POX in the small scale processing plant located in the cultivating area will be developed and commercialized through this project in order to convert chinese cabbage roots into highly valuable products.

### III. Research Contents and Scope

The elucidation of optimum condition for enzyme extraction and enzyme storage is prerequisite for developing an economically succesful commercial production of POX from Chinese cabbage roots. Therefore the following researches have been carried out during the 1st year of research project.



1) Investigation of enzyme purification conditions

1. Investigation of efficient storage condition for Chinese cabbage roots
2. Elucidation of enzyme patterns and enzymatic characteristics between different cultivars of Chinese cabbage.
3. Search for an efficient disruption method for Chinese cabbage roots
4. Establishment of extraction condition from disrupted debris.
5. Selection of cultivar with most applicability.

2) Search for the other useful enzymes beside peroxidase and application of POX

1. Search for activities of industrially useful enzymes
2. Industrial application of POX

3) The quality control of enzymes

1. Establishment of efficient analysis methods for the quality control of enzymes
2. Establishment of optimum condition for the preservation and storage of enzymes

The elucidation of efficient storage condition for Chinese cabbage roots, establishment of extraction condition from disrupted debris and

efficient analysis methods for the quality control of enzymes have been established during the 1st year of research project. Therefore the following researches have been carried out during the 2nd year of research project based on the 1st year of research project.

1) Establishment of large scale purification methods

1. Production of industrially useful enzyme by large scale processing
2. Production of highly purified enzyme by chromatography method
3. Scale up of enzyme purification processing

2) Search for application of POX

1. Investigation of industrial application of POX
2. Investigation of application of highly purified POX

3) Process for POX separation and purification process

1. The operation of meccerator as a mass disruption
2. Design for separation processing

4) Elucidation of the great economic potential and processing plant

1. Collection of chinese cabbage roots from cabbage path crop
2. Elucidation of enzyme production expenses
3. Estimate of plant establishment expenses

#### IV. The Suggestion of Research Results and Applications

The investigation of fundamental technology for the mass production of enzyme has been successfully performed on schedule during 1st year of research. Once process development for enzyme mass production is accomplished after 2nd year of project, the accumulated technical data and information should be transferred to the demanding company or it should be industrialized through the installation of processing plant in the cultivating area.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction . . . . .	16
1.1 Research goal . . . . .	16
1.2 Current research trends . . . . .	19
1.3 Research objectives and scope . . . . .	23
Chapter 2. Investigation of Enzyme Purification Conditions . . . . .	27
2.1. Introduction . . . . .	27
2.2. Materials and methods . . . . .	28
1. Reagent . . . . .	28
2. Chinese Cabbage . . . . .	29
3. Measurement of peroxidase activity . . . . .	29
4. Purification using AOT reverse micelle . . . . .	30
5. Quantitative of proteins . . . . .	31
6. Electrophoresis . . . . .	31
2.3. Results and Discussions . . . . .	32
1. Disruption of chinese cabbage roots . . . . .	32
2. Fundamental experiment for mass purification . . . . .	33
3. Search for purify condition using AOT reverse micelle system . . . . .	38
4. Production of highly purified POX by chromatography . . . . .	47

Chapter 3. Search for Application of Peroxidases . . . .	50
3.1. Introduction . . . . .	50
3.2. Materials and methods . . . . .	51
1. Reagents . . . . .	51
2. Enzymes . . . . .	52
3. Measurement of peroxidase activity . . . .	52
4. Enzymatic Dyeing . . . . .	52
5. Assays of antibiotics . . . . .	53
6. Air lift reactor . . . . .	54
5. Assay of 2,4,-dichlorophenol . . . . .	57
3.3. Results and Discussions . . . . .	58
1. Enzymatic Dye . . . . .	58
2. Enzymatic synthesis of antibiotic using POX . . . . .	60
3. Phenol removal by an air lift reactor . . . .	62
4. Investigation of application of highly purified POX . . . . .	66
 Chapter 4. Process for POX separation and purification process . . . . .	 66
4.1 Introduction . . . . .	66
4.2 Process for POX separation and purification process . . . . .	67
1. The operation of meccerator as a mass disruption . . . . .	66
2. Design for separation processing . . . . .	69

Chapter 5. Elucidation of the great economic potential and processing plant . . . . .	73
5.1 Introduction . . . . .	73
5.2. Collection of Chinese cabbage roots from cabbage path . . . . .	73
5.3 Investigation of plant establishment . . . . .	75
 Chapter 6. Conclusions . . . . .	 101
 Reference . . . . .	 105

# 목 차

제 1 장 서론 . . . . .	16
제 1 절 연구목적 . . . . .	16
제 2 절 지금까지의 연구 동향 . . . . .	19
제 3 절 연구 목표 및 범위 . . . . .	23
제 2 장 효소의 대량 정제 . . . . .	27
제 1 절 서 설 . . . . .	27
제 2 절 재료 및 방법 . . . . .	28
1. 시약 . . . . .	28
2. 효소액의 조제 . . . . .	29
3. 효소의 활성 측정 . . . . .	29
4. AOT reverse micelle을 이용한 정제 . . . . .	30
5. 단백질 정량 . . . . .	31
6. 전기 영동 . . . . .	31
제 3 절 결과 및 고찰 . . . . .	32
1. 효소의 추출 . . . . .	32
2. 대량 정제를 위한 기초 실험 . . . . .	33
3. AOT reverse micelle system을 이용한 정제 조건 검토 . . . . .	38
4. Chromatography를 이용한 고도 정제 POX의 생산 . . . . .	47

제 3 장	효소의 응용성 검토	50
제 1 절	서 설	50
제 2 절	재료 및 방법	51
1.	시약	51
2.	조효소의 조제	52
3.	POX의 활성측정	52
4.	효소적 염색	52
5.	균의 배양	53
6.	항균성 물질의 검정	54
7.	Air lift reactor	57
8.	2,4-Dichlorophenol의 정량	57
제 3 절	결과 및 고찰	58
1.	효소적 염색	58
2.	저독성 살균제로의 이용	60
3.	Phenol성 폐수의 효소적 처리	62
4.	고도 정제 POX의 이용성 검토	65
제 4 장	분리공정의 개발 및 설계	66
제 1 절	서 설	66
제 2 절	분리공정의 개발 및 설계	66
1.	대량 파쇄기의 운용	66
2.	분리공정의 설계	69
제 5 장	경제성 및 공장 설립 검토	73
제 1 절	서 설	73
제 2 절	배추 뿌리 회수의 생력화	73



제 3 절 공장 설립 검토 . . . . .	75
제 6 장 총괄 결론 . . . . .	101
참 고 문 헌 . . . . .	105

# 제 1 장

## 서 론

### 제 1 절 연구 목적

Peroxidase(donor:hydrogen peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7, 이하 POX로 약칭함)는 생물계에 보편적으로 존재하는 효소로서 과산화수소를 물로 환원시키며 이때 유기 화합물을 산화시키는 반응을 촉매한다. 본 효소는 임상 검사용 시약, enzyme immunoassay 및 monoclonal antibody의 screening assay의 검출용 시약으로 뿐만이 아니라 phenol과 같은 방향족 독성 폐기물의 제거<sup>1) - 4)</sup>에의 응용이 제시되고 있는 산업적 이용성이 다양한 효소의 하나이다. 현재 상기의 용도로 가장 일반적으로 이용되고 있는 것은 horseradish 기원의 POX이다. 그러나 본 효소는 전량 수입이 되고 또한 효소 정제도에 따라 mg당 0.16 - 9.1 \$로 그 가격이 상당히 비싸므로 본 연구실에서는 horseradish POX를 대체할 새로운 효소원의 개발 및 국산화를 목적으로 한 일련의 연구 결과 배추 뿌리에 다량의 POX가 분포함을 확인하였으며 이어 배추 뿌리 기원의 POX의 정제를 통하여 효소학적 특성을 밝힘과 동시에 산업적 이용 가능성을 제시한바 있다. 배추 뿌리 기원의 POX는 넓은 작용 pH 및 비교적 높은 열 안정성을 나타내어 산업적 이용 가능성은 매우 높은 것으로 판명이 되었다.<sup>1) - 4)</sup>

배추는 우리나라에서 많이 재배되고 있는 채소의 하나로서 매년 약 400만톤 이상이 생산 되고 있으며 강원도 지역에서는 연간 30 만톤 이상이 생산되고 있다. 그러나 배추는 식용 부분으로서 주로 지상 부분만을 이용하

고 뿌리 부분은 극히 일부가 식용으로 이용 될 뿐 막대한 량의 생물자원이 폐기물로 방치되고 있는 실정이다. 배추 뿌리는 생산에 드는 비용과 시간이 거의 없는 biomass이므로 POX 효소원으로서의 무한한 잠재력과 경제성을 지니고 있다.

한편 본 연구의 필요성은 다음과 같은 맥락에서 살펴 볼 수가 있다.

### 1. 기술적 측면

효소의 가격은 정제도에 따라서 크게 변한다. 예를 들면 미국의 Sigma 사 에서 판매되는 horseradish POX의 경우를 보면 정제도가 낮은 Type I은 약 60 mg에 9.45 \$, 정제도가 높은 Type XII는 약 2 mg에 15.2 \$로 정제도의 상승만으로도 약 57배의 부가가치가 생성이 된다. 그러나 고도 정제 효소의 생산에는 숙련된 정제 기술과 인력이 필요하다. 본 연구에서 개발하고자 하는 1차적인 목표는 부락 단위의 소규모 가공공장에서 정제도가 비교적 낮은 공업용 효소의 생산이다. 본 효소의 산업적인 생산에 따른 know-how와 효소 정제 기술의 축적으로 최종적인 목표인 고도 정제 기술과 인력이 확보케 되므로 고가의 고도정제 효소의 생산을 위한 전 단계로서 매우 중요한 의미를 갖는다.

### 2. 경제적 측면

1987년도의 효소류의 전세계 판매량을 보면 4,500 만 \$에 이르고 있어 효소류의 시장이 매우 큼을 알 수가 있고 앞으로도 시장의 규모는 계속 확대 될 전망이다. 이러한 커다란 시장 중에서 큰 부분을 차지하는 효소는 정제도가 낮은 공업용효소이다. 현재 국내에서 생산되는 효소의 대부분은 식품공업용, 세제용 효소등 공업용 효소가 근간을 이루고 있으나 전세계 효소류 시장

에서 차지하는 비중은 매우 낮다. 본 연구에서 개발하고자 하는 POX의 대량생산은 효소원의 확보가 손쉬울 뿐 아니라 농산 폐기물을 이용하므로써 현재 까지 제시되고 생산되어온 어떠한 효소원 보다 경제성을 갖고 있다. 한편 배추는 출하량의 과다에 따른 가격 폭락이 자주 발생되어 사회적인 문제로 까지 연결되고 있는 작목이므로 가격 등락에 따른 농가의 피해를 완화할 수 있는 완충역할이 필요하다. 미국 Sigma사에서 판매하고 있는 가장 정제도가 낮은 POX (Type I)의 가격은 5,000 unit에 9.95 \$ 이다(1994 Sigma catalog). 본 연구실의 예비 실험 결과에 의하면 배추의 품종에 따라 차이는 있지만 하나의 배추 뿌리(평균중량 15 g)당 200 unit 전후의 POX가 추출되고 있다. 따라서 배추 뿌리의 자원화는 농가의 소득과 직접적으로 연결될 수 있는 매우 절실하고 필요한 과제이다.

### 3. 사회적 측면

Biomass란 태양에너지가 물질에너지의 형태로 변형되어 축적되어진 것으로 정의할수 있고 biomass의 적극적인 생산체계가 이른바 농수산업으로 일컬을 수가 있다. 농수산업을 통하여 생산되는 생산물은 특수한 이용성을 목적으로 하는 가공 과정을 통하여 생물자원의 많은 부분이 미이용 또는 폐기물로 남게 되고 있다. 미이용 또는 폐기 biomass로 부터의 잠재 생산성은 막대한 것으로 이를 효율적으로 이용하여 자원화시키는 것은 우리나라와 같이 자원 자급율이 극히 낮은 환경에서는 매우 중요하고도 시급한 사항이라고 할수 있다. 현재까지 비식량 biomass의 이용에 관한 연구 경향은 주로 석유 대체 에너지로 전환하고자 하는 것이 전반적인 추세였으나 우리나라의 경우 이용 가능한 biomass의 생산성 및 기후등의 여러가지 여건은 우리나라에서 경제성 있는 적용을 어렵게 하고 있다. 따라서 우리나라 특유의 biomass를 대체에너지 이외의 각도에서 종합적으로 이용할 수 있는 기술을

적극적으로 개발할 필요가 있다. 배추 뿌리로부터 효소의 생산은 한 예가 될것이다.

따라서 본 연구에서는 배추 뿌리의 가공을 통한 고부가가치 산물로의 전환을 목적으로 소규모의 산지 가공 공장에서 가능한 POX의 대량 생산 방법을 개발하여 실용화하고자 하였다.

## 제 2 절      지금 까지의 연구 동향

POX의 산업적이용 가능성은 여러 연구자들에 의하여 꾸준히 검토되어 왔다. Klibanov 등은 석탄 가공 폐수중에 존재하는 phenol성 화합물의 제거를 위하여 POX를 이용한 효소적 방법을 제시 한 바 있다. 그 결과 POX의 반응에 의해 실제로 방류되는 산업 폐수로 부터 97-99%의 phenol을 침전으로 제거할 수 있었다. 또한 POX의 선택적인 hydroxylation반응을 유기 합성에 이용하여 L-tyrosine으로 부터 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine(L-DOPA), D-(-)-p-hydroxyphenyl glycine으로 부터 D-(-)-3,4-dihydroxyphenylglycine, L-(-)-phenyl ephrine으로 부터 L-epinephrine (adrenaline)을 70% 이상의 높은 수율로 합성하였다. POX에 의한 phenol성 화합물의 중합화 반응을 폐수로 부터 phenol의 단순한 제거 뿐만이 아니라 새로운 전기 절연성 수지의 합성으로 연결하고자 하는 보고도 있다.<sup>7) - 10)</sup> POX를 이용한 폐수 처리의 또 다른 연구로는 pulp공장 폐수 중의 저분자 색소의 탈색을 시도하여 과산화수소만을 이용한 탈색보다 60% 이상의 탈색도를 이룬바 있다.<sup>11) - 15)</sup>

본 연구실에서는 horseradish POX를 대체할 새로운 효소원의 개발을 통한 국산화를 목적으로 한국내에 자생하고 있는 식물체중에서 horseradish가 속하여 있는 십자화과 식물을 대상으로하여 POX의 활성 분포를 조사하였다. 국내에서 재배한 horseradish(뿌리)를 포함하여 배추(잎 및 뿌리), 양배추(잎 및 뿌리), 무(잎 및 뿌리), 흥환무(뿌리), 나도 냉이(뿌리), 다닥냉이(뿌리), 콩다닥냉이(뿌리), 냉이(뿌리), 갓(뿌리)등 10종의 십자화과 식물의 뿌리 및 잎에 분포하는 POX의 활성을 검색하였다. 그중 냉이의 뿌리가 가장 높은 활성을 나타냈고(3.38 unit) 다음으로는 배추 뿌리(2.36 unit)였다. 나머지 식물종은 냉이와 배추 뿌리에 비하여 상당히 낮은 효소활성을 보였다. 따라서 본 연구의 목적에 맞춰 biomass의 대량 확보가 손쉬운 배추 뿌리를 효소원으로 하여 POX의 정제를 하였으며 효소학적 특성을 밝힘과 동시에 산업적 이용 가능성을 제시한바 있다. 정제된 효소는 분자량 50,000의 단량체로서 pH 7.0, 50℃에서 최적 활성을 나타내었다.<sup>16)</sup> 정제된 배추 뿌리 기원의 효소는 native polyacrylamide gel electrophoresis에서 horseradish와 같은 전기영동적 특성을 나타내었고 Ouchterlony immunodiffusion법으로 면역학적 유사성을 검토한 결과 horseradish POX에 대한 항혈청과 침강선을 형성하여 면역학적 성질이 horseradish 기원의 효소와 유사함을 밝혔다.<sup>17)</sup> 또한 배추 뿌리 기원의 효소는 넓은 작용 pH 및 비교적 높은 열 안정성을 나타내어 산업적 이용 가능성은 매우 높은 것으로 판명이 되었다. (이 해익, 박 경숙, 최 용순, 이 상영. (1991) 배추 뿌기 기원 Peroxidase의 정제 및 성질, 한국 산업 미생물학회지, 19, 470-476)<sup>18)</sup>

한편 본 연구의 1차년도 연구에서는 효소의 정제 조건 검토, 배추 뿌리의 효율적 저장 조건 검토, 배추 품종간 효소 pattern 및 특성 규명, 이용성이 높은 품종의 선정, 정제 효소의 quality control, 효소의 저장, 보관 조건 확립등에 관한 연구가 이루어 졌다. 1차년도의 결과에 의하면 배추 뿌리 기원의 효소 생산을 위한 가공 특성이나 안정성 등은 매우 좋은 것으로 나타났

다.<sup>19) - 21)</sup> 본 연구를 통하여 생산될 POX의 산업적 이용성을 제시하고자 폐수중 phenol성 화합물의 효소적 제거를 시도한바 있으며 결과의 일부는 Canada의 Vancouver에서 개최된 환경 독성 및 화학회 제2차 세계대회에서 발표를 한바 있으며 학회지를 통한 논문 발표도 이루어 졌다( 김영미, 한달호, 정연호, 이상영, 이해익, 배추 뿌리의 peroxidase를 이용한 phenol의 제거, 한국생물공학회지(1995) 10, 335-342). 이와 비슷한 연구는 현재 미국의 Pennsylvania주립대학의 연구자(Jean-March Bollag 박사)들에 의해 미국의 환경청으로부터 2억 팔천만원(\$ 350,000)의 연구비 지원으로 진행되고 있다. 이들은 horseradish의 pulp를 이용하고 있으나 경제성 면에서는 본 연구에서 사용한 농산 폐기물인 배추 뿌리가 앞서고 있는 것으로 판단된다.<sup>22) - 27)</sup>

일본의 대표적인 전자회사의 하나인 NEC group에서는 전자회사에서 다량으로 발생하는 phenol성 폐수의 POX를 이용한 효소적 처리방법을 개발하여 이미 특허를 출원하였으나 POX가격이 처리 비용에서 차지하는 비중이 너무 크므로 아직 실용화에는 이르지 못하고 또한 그들의 보고서에도 효소가격이 실용화의 가장 큰 걸림돌이 되고 있다고 기술하고 있다.<sup>28) - 31)</sup> 현재 POX의 세계 시장의 주종은 horseradish이나 아직도 높은 가격의 벽을 넘어서지 못하고 있는 실정이다. 이는 효소원이 재배를 하여 확보 할수 있는 작물이기 때문에 효소 가격에서 효소원으로서 horseradish의 가격이 차지하는 비중이 아직도 크기 때문이다.

또한 POX의 산업적 이용성의 하나로서 최근 세계 산업에 POX가 이용성이 적극적으로 검토되고 등록되고 있다. 최근 Seren등은 POX를 이용한 세계 연구를 진행중에 있으며 POX가 색상 직물로부터 무색상 직물로의 염색되는 것을 막는데 이용됨을 발견하였다. 또한 옷감에 있어 색상 염색의 표백에 대한 POX 혹은 laccase system의 사용은 공업용 세제에 대해 유용하게 사용될 것으로 기대된다.<sup>32) - 35)</sup>

한편, 생물 공학은 새로운 down stream 공정의 개발을 필요로 하고 주

목할 분리 기술은 효율적 이어야 하며 보다 쉬운 scale-up을 따라야 한다. 그래서 액-액 추출은 항생물질 산업에서 자주 사용되어져 왔으나 생물 공학의 일부 분야에서는 그 적용이 제한되어 왔다. 그래서 two-phase system(e.g. polyethylene glycol / salt)을 사용한 효소의 추출은 제안된 범위에서 사용되어져 왔다. 여기서 유기 용매들은 효소들이 유기 층에서 낮은 용해성과 유기 층과 접촉되면 활성을 잃어버리기 때문에 적당치 않았다. 그래서 다른 접근 방법이 ionic surfactant 함유 유기용제를 사용한 reverse micelle를 사용하여 효소를 추출하는 방법이었다. Reverse micelle은 즉각적이고 가역적으로 비극성 액상에서 amphiphilic 분자들의 구형 집합체를 형성한다. 이들의 inner core는 친수성 효소들과 같은 용해할 수 있는 극성 물질들인 수용액 미세층을 함유한다. 또한 reverse micelle에 용해된 효소들은 그들의 촉매 활성을 유지하며 reverse micelle의 수용액 미세층과 수용액층 사이에서 친수성 효소들의 충전이는 가역적이고 효소 활성에 영향을 미치지 않는다. 여러 kinetic의 data들을 종합하여 볼때 생물학에서 "cytosis"라고 불려졌던 것처럼 이해를 할 수 있으며 ionic surfactant의 AOT reverse micelle system에서 효소들의 partition coefficient는 polyelectrolytic와 극성화된 micellar wall의 electrostatic potential에 의해 좌우된다.<sup>34) - 40)</sup> 이것은 수용액층 pH의 조절로 맞출 수 있으며 reverse micelle에서 효소들의 용해성과 효소들의 액-액 추출은 여러 사람들에 의해 보고되어져 왔다. 그 예로 Morris등은 soybean protein으로부터 trypsin inhibitor의 분리에 대해 reverse micelle system을 이용하여 trypsin inhibitor를 분리 정제하였고 George 와 Hermut 등은 CTAB, CPC, CPB, BDBAC, TOMAC 등 여러 양이온 surfactant 등을 사용하여 *Bacillus licheniformis*로부터  $\alpha$ -amylase를 효율적(89% 수율, 8.9배)으로 분리 정제됨을 보고하였고, Goklen과 Rho 등은 음이온 surfactant인 sodium di-2-ethylsulfosuccinate(AOT)를 이용하여 reverse micelle내로의 단백질 이동 메커니즘에 관해서 연구를 한바 있다.<sup>41) - 45)</sup> 효소의 대량 분리



및 정제를 위해서 현재 활발히 연구되고 있는 생물 분리 공정 방법중에서 reverse micelle을 이용한 단백질 분리법은 일반 화학 공업에서 사용하고 있는 액-액 추출법과 유사하여 일반 추출 용매 대신 reverse micelle 용액을 사용하므로써 단백질을 대량으로 분리 정제할 수 있는 유망한 방법으로 제시되고 있다.<sup>38) - 45)</sup>

### 제 3 절 연구 목표 및 범위

#### 1. 최종 연구 개발 사업 목표

막대한 생산성을 갖는 배추 뿌리를 가공하여 고부가 가치의 산물, 즉 고價의 효소인 POX를 대량생산 할수 있는 방법을 체계화 하고 이를 Scale-up하여 산지 가공 공장 형태의 소규모 가공 공장으로 발전시킨다.

#### 2. 년차별 연구 개발 사업 목표

효소의 생산에 있어서 중요한 점은 효소의 활성이 유지된 신선한 원료의 안정적인 공급과 추출한 효소 원액의 일정한 효소 역가의 유지이다. 배추는 년중 생산되는 작물이 아니므로 수집한 뿌리의 적절한 효소활성이 유지되어야만 하므로 실정에 맞는 보존 방법을 강구하여야만 한다. 또한 배추 뿌리로 부터 효소를 효율적으로 추출하기 위해서는 효과적인 추출방법 및 손쉬운 분석방법을 통하여 quality control을 할수 있어야 한다. 따라서 효소의 역가를 최대한으로 유지시키기 위한 기본적인 조건구명과 효율적인 추출방법

의 설정이 필요하다. 이를 위해서 1차년도 및 2차년도 연구를 통해 다음과 같은 연구 범위를 설정하고 연구를 추진하였다.

### 3. 연구의 범위 및 내용

#### 1차년도

<p>효소의 정제 조건 검토</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 배추 뿌리의 효율적 저장 조건 검토</li> <li>0 배추 품종간 효소 pattern 및 특성 규명</li> <li>0 배추 뿌리의 효율적 파쇄 방법 파쇄물로부터 효소의 추출 조건 확립</li> <li>0 이용성이 높은 품종의 선정</li> </ul>
<p>Peroxidase이외의 유용 효소 활성 검색 및 응용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 산업적 이용성이 높은 효소의 검색</li> <li>0 Peroxidase의 산업적 응용</li> </ul>
<p>효소의 Quality Control</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 효소의 Q.C.를 위한 효과적 분석법 확립</li> <li>0 효소의 저장, 보관 조건 확립</li> </ul>

2차 년도

<p>효소의 대량정제 방법 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 대량처리에 의한 공업용 효소의 생산</li> <li>0 Chromatography에 의한 고도 정제 효소의 생산</li> <li>0 정제 과정의 scale up</li> </ul>
<p>Peroxidase의 응용성 검토</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 Peroxidase의 산업적 이용성 검토</li> <li>0 고도 정제 peroxidase의 이용성 검토</li> </ul>
<p>분리 공정의 개발 및 설계</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 대량 파쇄기의 운용</li> <li>0 분리 process의 설계</li> </ul>
<p>경제성 및 공장 설립 검토</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 배추 뿌리 회수의 생력화</li> <li>0 효소 생산비용 평가</li> <li>0 공장 설립비용 추산</li> </ul>

# 제 2 장

## 효소의 대량정제

### 제 1 절 서 설

산업적으로 사용이 되는 효소는 정제도가 낮은 공업용 효소와 정제도가 매우 높은 의약품, 시약용 효소로 구분을 할수 있다. 효소의 정제에는 많은 인력과 시간이 소요되므로 정제도에 따라서 값의 차이가 나타난다. 미국 Sigma사에서 판매하고 있는 peroxidase의 경우를 보면 정제도에 따라 mg당 0.16 - 9.1 \$로 그 가격이 효소의 정제도에 따라 가격의 폭은 매우 넓음을 알 수 있다(1994 Sigma catalog 기준). 고도 정제 효소를 생산한다는 것은 기술 집약적인 과정으로 앞에서 예를 든 peroxidase에서 보는 바와 같이 부가 가치의 상승이 뒤따르게 되므로 효소의 고도 정제는 큰 가치를 지닌다고 할 수 있다.

통상적으로 적절한 효소원이 확정이 되면 효소원으로 부터 원하는 효소를 추출하고 분리하는데 적합한 downstream processing이 디자인 되어야 한다. 본 연구자들은 peroxidase의 효소원으로서 농산 폐기물인 배추뿌리로 정하였으며 본 연구의 1차년도 에서는 가장 적합한 추출방법으로 소규모의 경우 가정용 녹즙기의 사용을 제시한바 있다. 녹즙기의 사용으로 많은 효소를 짧은 시간내에 추출할수 있었으며 부수적인 설비 투자도 최소한으로 할수 있었다.

따라서 본 연구에서는 배추 뿌리의 POX를 생산하여 농업 폐기물로부터

유용 물질의 생산을 통해 고부가가치 산물로의 전환을 목적으로 POX의 대량 정제 및 생산 방법을 개발하여 실용화 하고자 하였다. 최근 활발히 연구되고 있는 생물 분리 공정 중에서 reverse micelles을 이용한 단백질 분리법은 일반 화학공업에서 사용하고 있는 액-액 추출법과 유사하여 일반 추출 용매 대신 reverse micelle system을 사용함으로써 단백질을 대규모로 분리할 수 있는 유망한 방법이다. 또한 reverse micelles로 정제 과정을 최적화 하기 위해 수층의 pH 변화 효과와 ionic strength, buffer 및 염의 영향 그리고 적절한 AOT 농도 등을 검토하였다. 또한 reverse micelles를 이용한 system을 2 l 규모로 scale up 하였다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 시 약

본 연구에서 사용한 Aerosol-OT(AOT), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline- 6-sulfonic acid)(ABTS), Tris[hydroxymethyl]aminomethane 등은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, U.S.A.)제품을, iso-octane.은 藥理화학(大阪, 日本)제품을, copper(II) sulfate pentahydrate, potassium chloride, sodium chloride 등은 純正 화학(東京, 日本)제품을, sodium carbonate anhydrous, potassium tartrate 등은 昭和(東京, 日本)제품을, ammonium sulfate, phenol, 4-aminoantipyrine 등은 和光(東京, 日本)제품을 사용하였으며 기타 시약은 시판 특급 시약을 사용하였다.

## 2. 효소액의 조제

1995년부터 1996년 11월까지 강원도 일원에서 재배한 배추로부터 뿌리를 획득하였다. 채취한 뿌리는 즉시 세척하고 칼로 0.5 cm 정도의 크기로 잘라 혼합한 후 가정용 녹즙기(Green Power, 한국)로 착즙하여 juice 와 pulp로 분리하였다. 분리한 juice는 더 이상의 처리를 하지 않고 액상의 효소원으로, pulp는 분말상의 효소원으로 사용하였다. 이들 액상 및 분말상의 효소는 -20℃로 보관하면서 필요시에 꺼내어 사용하였다.

## 3. 효소의 활성 측정

### 1) 방법 1. 기질로서 aminoantipyrine을 이용하는 경우

20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3 ml, 20 mM aminoantipyrine 0.3 ml, 20 mM Phenol 0.3 ml, 1 M Tris-HCl (pH 7.0) 0.2 ml, 증류수 0.8 ml 을 37℃에서 10분간 반응시킨 후 반응액에 absolute ethanol 2 mL을 가하여 반응을 정지 시킨 후 효소에 의하여 생성된 quinoneimine의 붉은 색소의 양을 500 nm에서 정량하였다. POX 1 unit는 37℃에서 1분간 1 μmole의 quinoneimine 색소를 생성시키는데 필요한 효소의 양으로 하였으며 quinoneimine의 분자 흡광계수 (12.2 / cm<sup>2</sup> / μmole)로부터 생성된 색소의 양을 환산하였다.

### 2) 방법 2. 기질로서 ABTS를 이용하는 경우

20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3 ml, 20 mM ABTS 0.3 ml, 1 M Tris-HCl (pH 7.0) 0.2 ml, 증류수 0.8 ml, 그리고 적당히 희석한 효소 0.4 ml로 구성된 표준 반

용액(총 2.0 ml, Table 2.)을 37°C에서 반응시킨다. 반응을 10분 정도 시킨 후 ethanol을 가하면서 정확한 반응 시간을 재어 둔다. 반응 정지액은 5 ml용 cell에 옮기고 Spectronic 20으로 407 nm의 파장에서 흡광도를 읽는다. 측정된 흡광도와 산화 ABTS의 분자 흡광계수( $18.6 / \text{cm}^2 / \mu\text{mole}$ )로부터 1분간 산화된 ABTS의 양을 환산하였다. POX 1unit는 1  $\mu\text{mole}$ 의 ABTS를 산화시키는데 필요한 효소의 양이므로 효소의 활성도를 구한다.

#### 4. AOT-reverse micelle system을 이용한 정제

##### 1) POX의 forward transfer

각각의 pH와 50 mM의 이온 강도를 갖도록 조절된 단백질 수용액 5 mL과 isooctane에 녹인 100 mM AOT 5 mL를 1 : 1로 혼합한 후 100 mL 삼각 플라스크에 넣고 25°C의 water-bath에서 magnetic stirrer로 10 분간 교반한 다음 25°C에서 6,000 rpm으로 20 분간 원심 분리하여 수용액층과 AOT 층으로 분리하여 AOT층으로 transfer된 peroxidase와 transfer되지 않고 수층에 남아 있는 peroxidase의 양을 효소활성을 측정하여 구하였다.

##### 2) POX의 backward transfer

1)에서 원심분리하여 얻은 AOT층 5 mL과 pH 및 이온 강도가 조절된 새로운 수용액 5 mL를 100 mL 삼각 플라스크에 넣고 25°C의 water-bath에서 10분 동안 교반한후 25°C에서 6,000 rpm으로 20 분간 원심 분리하여 POX를 수용액상으로 backward transfer 하였다. 이때 AOT층과 수층의 POX 활성을 측정하여 backward transfer를 구하였다.



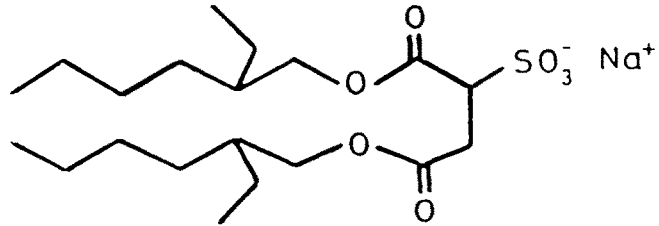


Fig. 1. Schematic structure of sodium bis-2-ethylhexylsulfosuccinate (AOT).

## 5. 단백질의 정량

단백질의 정량은 bovine serum albumine을 표준물질로하여 Lowry법으로 하였다.

## 6. 전기 영동

### 1) Native-Polyacrylamide gel 전기 영동

POX의 zymogram은 native polyacrylamide gel electrophoresis을 이용하였다. 효소의 활성 염색은 전기 영동이 끝난 gel을 100 mM Tris-HCl (pH

7.0), 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 mM 4-chloro-1-naphthol 등의 각종 기질 용액 속에 담그어 37°C에서 10분간 incubation하여 POX의 위치를 확인하였다. POX의 활성이 있는 부위는 착색이 되어 그 위치를 확인할 수 있었다.

## 2) SDS-polyacrylamide gel 전기 영동

Laemmli의 방법으로 SDS-PAGE 전기 영동을 행하여 단백질의 위치를 확인하였다.

# 제 3 절      결 과   및   고 찰

## 1. 효소의 추출

본 연구의 1년차 결과를 보면 녹즙기에 의한 추출이 가장 유효한 방법으로 나타났다. 더욱이 녹즙기의 경우 처리 시간이 가장 짧고 액과 잔사를 쉽게 분리할 수 있으므로 앞으로 모든 실험에 녹즙기를 사용하였다. 따라서 채취한 뿌리(1600g)를 즉시 세척하고 칼로 0.5 cm 정도의 크기로 잘라 혼합한 후 가정용 녹즙기(Green Power, 한국)로 착즙하여 juice와 pulp로 분리하였다. 분리한 juice는 더이상의 처리를 하지 않고 액상의 효소원으로(1000 ml), pulp는 분말상의 효소원으로 사용하였다. 이들 액상 및 분말상의 효소는 -20°C로 보관하면서 필요시 꺼내어 사용하였다.

## 2. 대량 정제를 위한 기초 실험

### 1) 열처리에 의한 POX의 정제

배추 뿌리에는 많은 종류의 peroxidase isozyme이 존재하나 주종을 이루는 peroxidase는 50℃, 20분간의 가열에도 효소 활성의 변화가 없는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 crude extracts(1,000 ml)를 가열하여 불필요한 단백질을 제거시킬 목적으로 crude extracts를 50℃에서 20분간 가열한 후 ice bath에서 30분간 방치한 후 12,000 x g, 4℃, 10분간 원심 분리하여 상등액(973 ml)을 얻었다. 상등액의 단백질량, 효소 활성을 측정하였으나 효소의 수율은 높았으나 약간의 단백질만이 제거되어 정제의 한 단계로 열처리를 이용하는 것은 비효율적인 것으로 판단되었다.

Table 1. Purification of peroxidase by heating during 20 min. at 50℃

Step	Protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit / mg)	Yield (%)	Fold
Crude extracts	41	122	3.01	100	1
Heat treatment	25	114	4.47	93	1.5

## 2) 등전점 침전에 의한 정제

단백질은 등전점 부근에서 침전되는 성질을 이용하여 등전점 침전법을 단백질의 대량 정제에 이용하고 있는 기술 중의 하나이다. 따라서 이 기술을 본 효소의 정제에 이용하고자 효소액의 pH를 조정하여 등전점 침전을 시도하였다. 즉, Crude extract 30 ml에 0.1 N HCl를 가하여 pH 4.0으로 조정 한 후 0.1 N NaOH를 가하여 pH를 10 까지 올려 가면서 pH 변화가 0.5 - 1 이 될 때 1 ml 씩 분취하여 ice bath에 보관하였다. 분취액을 ice bath상에서 30분 이상 방치한 후 원심 분리하여 침전을 분리하고 상등액에 남아 있는 효소의 활성을 분석하였다. pH 4에서 10까지의 넓은 영역에서 pH를 조절하였으나 효소의 침전은 관찰되지 않았다.

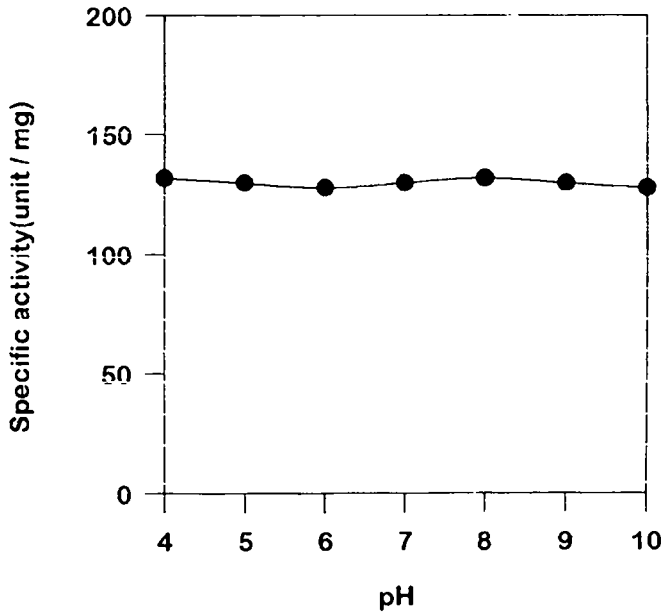


Fig. 2. Remained activity after isoelectro precipitation

### 3) Ion교환수지 처리에 의한 정제

여러 가지 pH 영역에서 DEAE-Cellulose를 이용하여 column chromatography기법이 아닌 batch처리를 시도하였다. 즉, 0.1g의 DEAE-Cellulose를 시험관에 각각 넣고 10 mM Citrate buffer(pH 3 - 5), 10 mM Potassium phosphate buffer(pH 6 - 7), 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8), 그리고 10 mM Glycine-NaOH(pH 9 - 10)을 가하여 DEAE-Cellulose를 각각의 완충 용액으로 평형화시켰다. 여기에 효소 용액 0.1 ml을 가하고 Vortexing 한후 ice bath에서 방치하여 효소를 흡착하였다. 30분후 원심 분리하여 상등액에 대하여 효소 활성을 측정하여 흡착 가능한 pH 영역을 조사하였다. 효소의 DEAE-Cellulose흡착 상태에서 각 상등액의 전기 영동 상의 활성 분포 양상을 Fig. 3에 나타냈다. Fig. 3에서 나타나는 바와 같이 pH 3 - 7까지는 band 는 같은 양상으로 나타났으나 pH 8 - 10일 때는 main band가 없어진 것을 확인할 수 있었다. 즉 효소가 DEAE-Cellulose에 흡착되었다고 판단할 수 있다. 또한 상등액중의 효소 활성과 단백질의 분포를 보면 pH 7부터 단백질 량과 효소의 활성이 감소되는 것으로 보아 DEAE-Cellulose에 이 pH부터 흡착이 시작되는 것을 알 수 있다(Fig. 4). pH 7 이상에서는 효소의 흡착뿐 아니라 다른 단백질도 함께 흡착되는 것으로 나타났다. 이로서 POX의 대량 정제를 위한 기초 실험으로서 DEAE-Cellulose상의 흡착 조건은 pH 8 - 9로 조정할 필요가 있다는 것을 확인하였다.

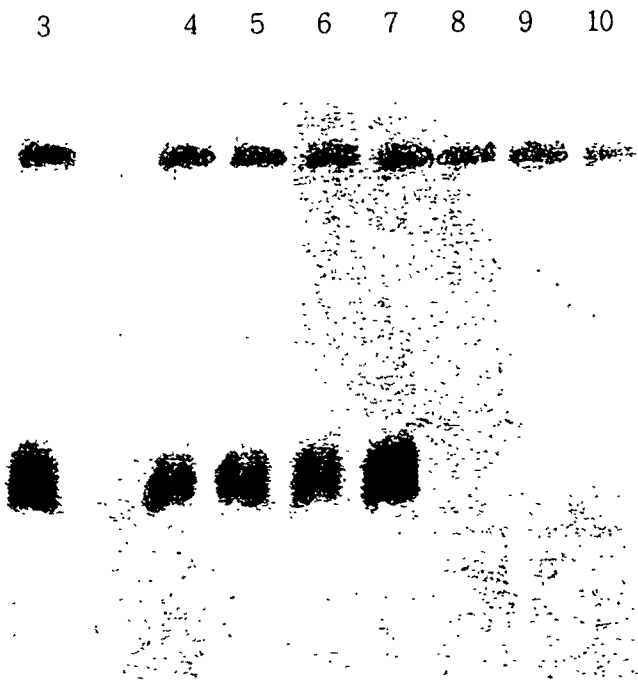


Fig. 3. Absorption of peroxidases on DEAE-Cellulose at various pHs. Activities of peroxidase were stained with 100 mM 4-chloro-1-naphthol.

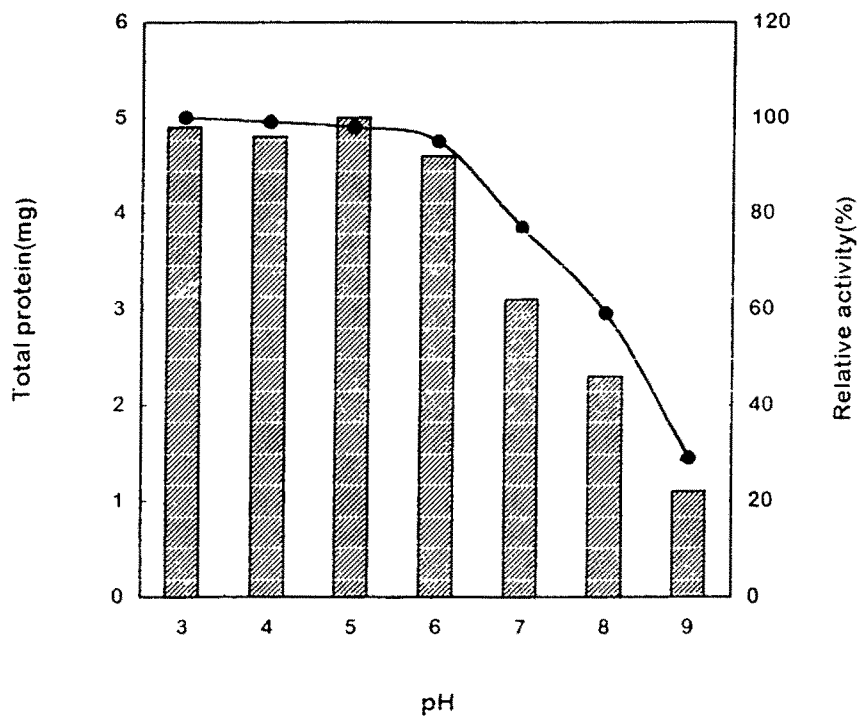


Fig. 4. Total protein and remained activity of supernatant on DEAE-Cellulose, treatment. Relative activity, the activity of the highest value was taken as 100%

### 3. AOT reverse micelle system을 이용한 정제 조건 검토

유기 용매 중의 계면활성제와 수층으로 구성된 2상 용액계에서 단백질의 선택적인 추출법은 이른바 reverse micelle system으로 알려져 단백질의 대량 정제에 최근 이용이 많이 되고 있는 강력한 방법의 하나이다. 본 연구에서는 이온성 계면 활성제인 Aerosol OT(AOT)를 isooctane에 녹인 후 조효소액과 혼합하여 효소를 AOT의 reverse micelle로 forward transfer하여 효소를 유기용매층으로 전이시킨다. 유기 용매(AOT)층을 원심 분리하여 얻은 후 높은 염용액이 함유된 완충 용액으로 다시 이상 분배(backward transfer)하므로써 효소만을 선택적으로 분배할 수 있다. 수층 용액의 pH, 염의 종류 및 이온 강도 등을 변화시켜 효소의 선택적 추출성을 조절하기 위하여 forward transfer 및 backward transfer의 조건에서 AOT의 농도, 수층의 pH, 염의 종류 및 농도가 미치는 영향을 다각도로 검토하였다.

#### 1) pH에 따른 POX의 추출 효율

일정 조건에서 pH를 변화시켰을 때 POX 추출에 미치는 pH의 영향을 조사하였다. 초기 수용액 층은 각각의 30 mM Buffer systems(pH 3.0 - 10.0), crude extract, 50 mM NaCl로 조절된 효소액 5 mL과 isooctane에 녹인 100 mM AOT를 1 : 1로 혼합한 후 100 mL 삼각 플라스크에 넣고 25°C로 맞춘 water-bath에서 10분간 교반한 다음 8,000 rpm, 25°C, 20 분간 원심 분리하여 POX를 reverse micelle내로 solubilization 하였다(foward transfer). 그 결과 forward transfer에서는 30 mM Tris-HCl, pH 8.0에서 가장 높은 POX solubilization(93% 추출 효율)을 보였다(Fig. 5). 그리고 POX가 solubilization된 reverse micelle용액 5 mL과 80 mM Buffer systems(pH 3.0 - 10.0)과 1 M KCl로 조절된 새로운 수용액 5 mL를 100 mL 삼각 플라스크



에 넣고 25℃로 맞춘 water-bath에서 10분 동안 교반하여 POX를 수용액상으로 이동시키고 8,000 rpm, 25℃, 30분 동안 원심 분리하여 POX를 수용액상으로부터 desolubilization하였다(backward transfer). 그 결과 backward transfer에서는 80 mM Tris-HCl, pH 7.0에서 가장 높은 POX desolubilization(64% 추출 효율)을 보였다(Fig. 5). 일반적으로 단백질은 등전점 이하의 pH에서는 (+)전하를 띠므로 AOT의 (-)전하를 띤 친수성 부분과 정전기적 인력이 작용하는 반면 등전점 이상의 pH 영역에서는 단백질들이 (-)전하를 띠므로 정전기적 반발력이 작용한다. 본 상황에서 POX desolubilization에 미치는 가장 큰 영향은 buffer의 pH, 염의 농도와 종류로 생각될 수 있다. 즉 FT에서 NaCl은 KCl 보다 이온의 반경이 작아 수용액 내에서 두꺼운 hydration shell을 형성하면서 이온의 극성이 감소되기 때문에 AOT 계면에서의 정전기적 상호작용에 screening 효과가 감소하여 solubilization이 유리해지는 것으로 생각되고 POX desolubilization에 있어서는 반대의 현상으로 이온들의 screening 작용에 의해 단백질과 AOT 계면 사이의 정전기적 인력이 감소되기 때문에 solubilization의 역효과를 받게 되기 때문이라고 판단된다. 결과적으로 단백질이 solubilization 되고 desolubilization 되는 영역은 pH와 이온 강도를 변화시키면서 적절히 조절할 수 있으며, 이는 각 단백질을 선택적으로 solubilization, desolubilization 시킬 수 있음을 의미한다.

## 2) POX forward transfer에서 염농도에 미치는 영향

Forward transfer에서 이온 강도의 영향을 알아보기 위해 FT의 조건을 30 mM Tris-HCl (pH 8.0), crude extract, 그리고 100 mM AOT로 고정하고 첨가한 염의 농도를 달리했을 때 AOT로의 POX solubilization을 나타낸 것

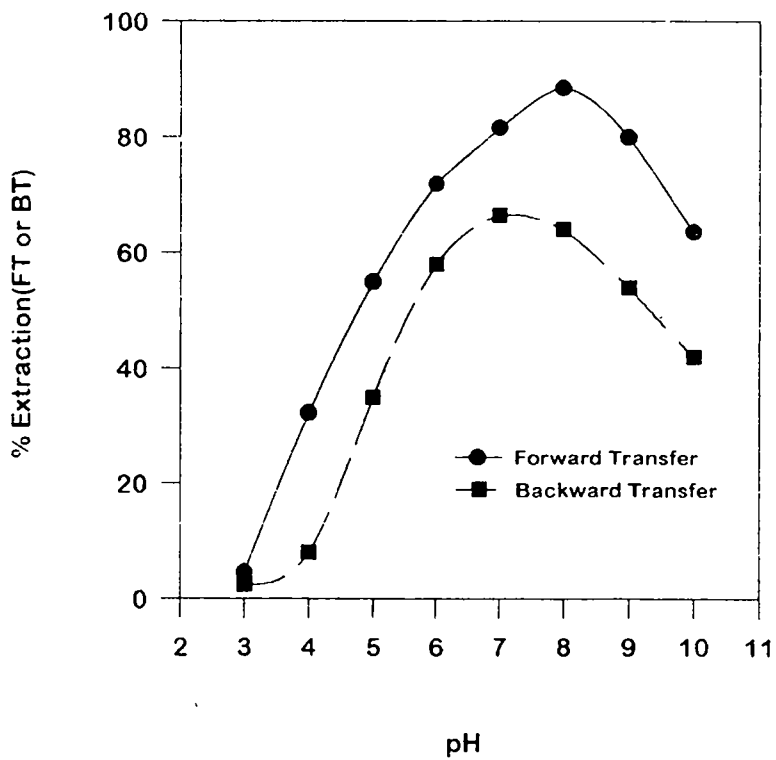


Fig. 5. pH dependence on forward transfer(FT) and backward transfer(BT) of peroxidases.

FT : 30 mM buffer systems, containing 50 mM NaCl.

BT : 80 mM buffer systems, containing 1 M KCl.

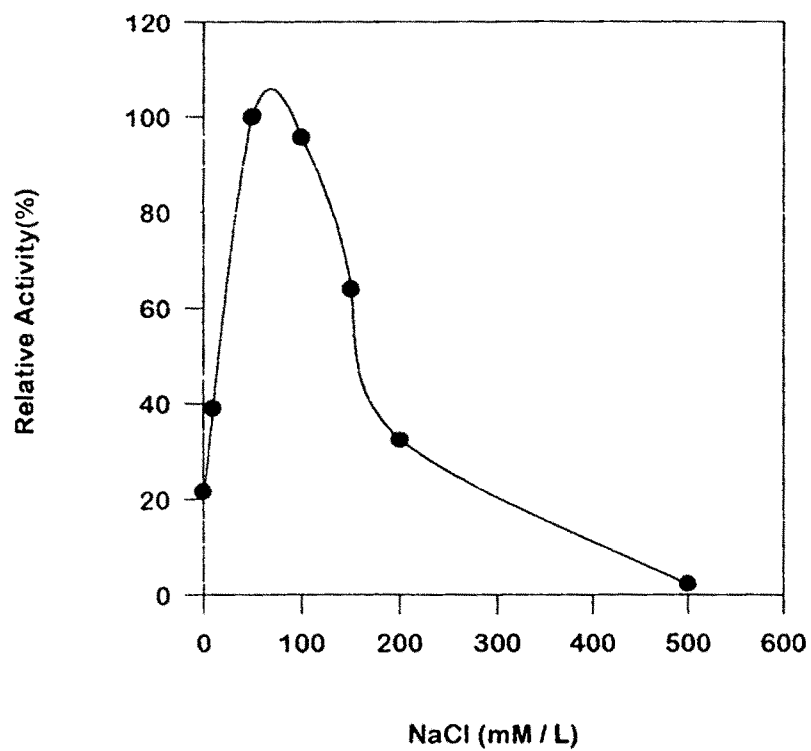


Fig. 6. Effect of ionic strength on forward transfer.  
System : 30 mM Tris-HCl (pH 8.0), containing various concentration of NaCl.

이다. 그 결과 Fig. 6에서 나타낸 바와 같이 50 mM NaCl의 농도에서 가장 높은 POX solubilization을 보였으나 전반적으로 이온 강도가 증가할수록 단백질의 solubilization 정도는 감소하는 경향을 보였다. 이러한 염농도가 POX-AOT solubilization에 미치는 영향은 POX(+ 전하)와 AOT 계면(- 전하)사이의 정전기적 상호작용에 대한 screening 효과가 증대되어 POX와 AOT 계면 사이의 인력이 감소하기 때문인 것으로 생각된다.

### 3) Backward transfer에서 염농도에 미치는 영향

Backward transfer에서 이온 강도에 미치는 영향을 실험하기 위해 각각 forward transfer조건을 30 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, crude extract, 100 mM AOT로 조정하고 BT의 조건을 80 mM Tris-HCl (pH 7.0),으로 맞추고 염의 종류와 농도를 달리 했을 때 POX desolubilization에 미치는 영향을 나타내었다. 앞의 조건에서 forward transfer 한후 backward transfer했을 때 이온의 종류와 농도에 따라 desolubilization이 다른 것을 보여주며 1 M NaCl 농도에서 가장 높은 POX desolubilization을 보여 이온의 종류와 농도에 따라 POX desolubilization이 다르게 나타난 것을 보여주고 있다. POX desolubilization에 미치는 영향은  $MgCl_2$ , KCl,  $CaCl_2$ , NaCl 순으로 높은 것으로 나타났다. 전반적으로 이온의 강도가 증가함에 따라 desolubilization이 증가하여 solubilization과는 반대 경향을 보였다. POX의 (+)전하와 AOT의 (-)전하의 정전기적 인력에 의해 POX가 역미셀계에 결합되어 있는 상태에서 (+)이온들의 계면의 (-)전하에 대해 POX의 (+)전하와 경쟁적으로 작용하여 desolubilization이 일어나므로 하전이 많이 되어 있는 단백질일수록 desolubilization 과정에서는 그만큼 더 많은 이온들을 필요로 할 것이다.

4) AOT농도에 따른 forward transfer에서 POX solubilization에 미치는 영향

Fig. 8은 AOT농도에 따른 forward transfer에서 POX solubilization에 미치는 영향을 실험하기 위해 forward transfer의 조건을 30 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, crude extract를 고정하고 AOT의 농도를 달리했을 때 forward transfer에서 POX solubilization에 미치는 영향을 나타내었다. 그 결과 AOT의 농도가 증가할 수록 POX solubilization은 증가하며 120 mM AOT 이상부터 감소하는 경향을 보여주고 있다. 이는 POX solubilization에 미치는 AOT의 적정 농도를 가지고 있음을 알 수 있었으며 POX의 forward transfer에는 110 mM의 AOT농도가 최적으로 판단 되었다.

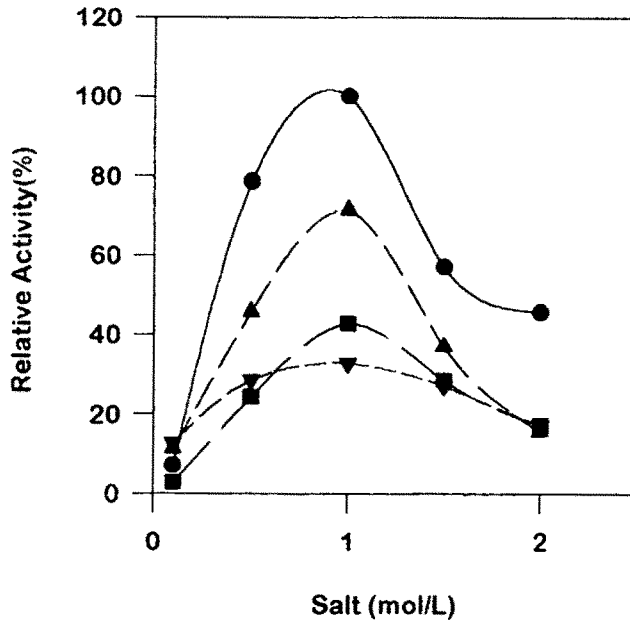


Fig. 7. Effect of ionic strength on backward transfer system.  
 System : 80 mM Tris-HCl (pH 7.0) containing various concentrations of NaCl.  
 ● NaCl, ■ KCl, ▲ CaCl<sub>2</sub>, ▼ MgCl<sub>2</sub>

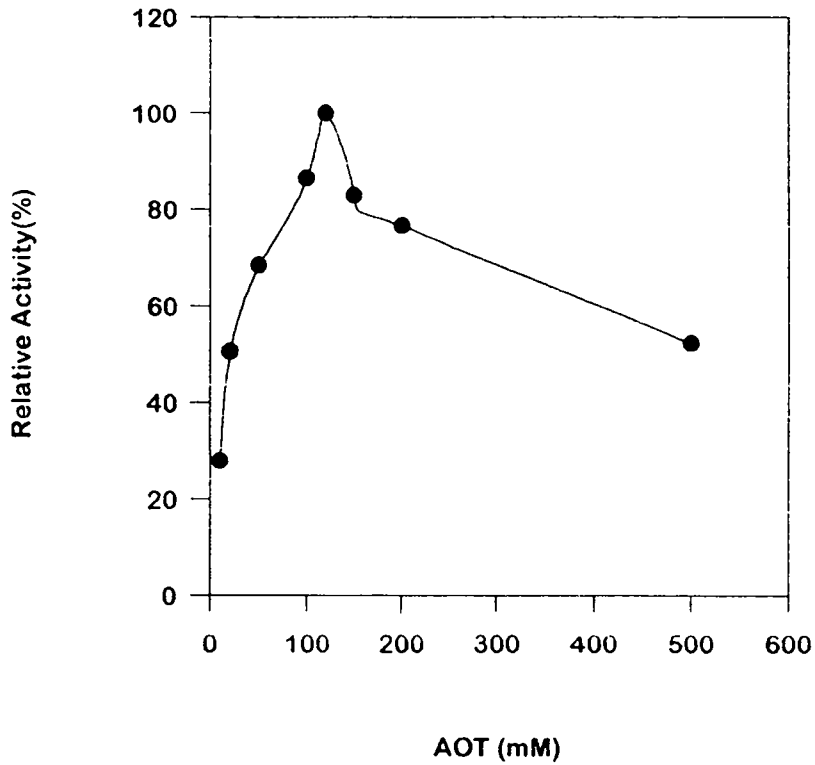


Fig. 8. Effect of AOT concentration on forward transfer system  
 System : 30 mM Tris-HCl (pH 8.0), containing various concentrations of AOT

5) Crude extract로부터 최적화된 reverse micelle system을 이용한 POX의 정제

이상의 결과를 종합하여 보면 배추 뿌리 중의 POX를 추출하기 위해서는 isooctane중의 최적 AOT농도는 110 mM, forward transfer의 조건에서는

30 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, backward transfer의 조건에서는 80 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 M NaCl이 최적임으로 나타났다. 또한 forward transfer, backward transfer 공히 유기 용매(AOT)층과 수층의 비율은 1 : 1(v/v) 이 가장 적합하였다. 지금까지 최적합한 reverse micelle을 이용한 peroxidase 정제과정의 체계도를 Fig. 9에 나타내었다.

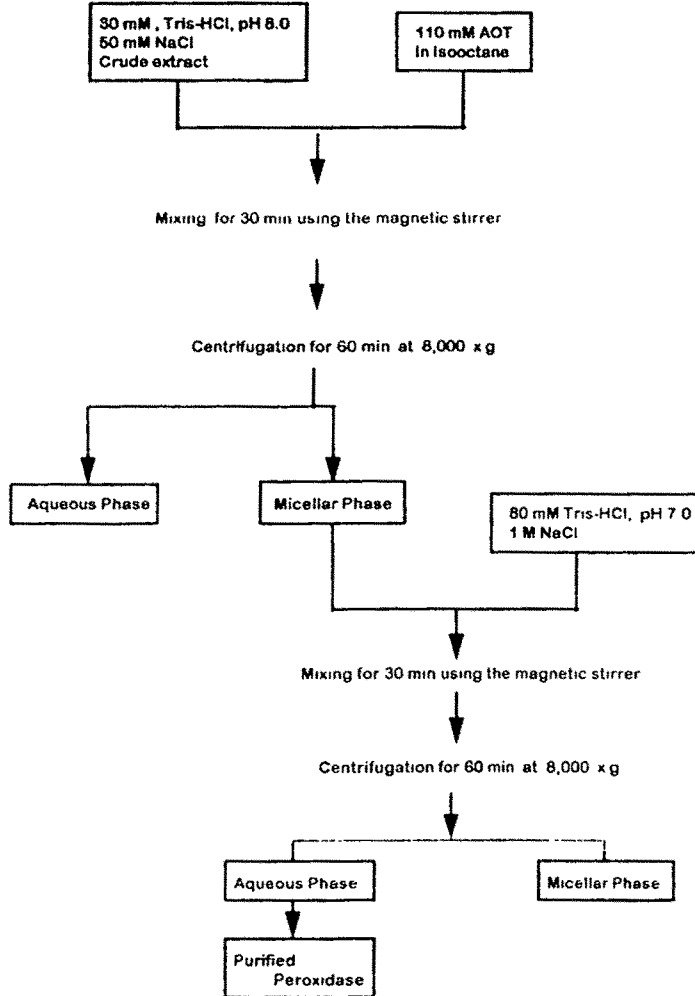


Fig. 9. Flow chart of peroxidase purification using AOT reverse micelle system.

6) AOT를 이용한 효소의 대량 정제

앞에서 설정한 조건으로 효소의 대량 정제를 다음과 같은 순서로 행하였다. 즉, 춘천시 서면 서상리에서 재배한 배추(품종 한여름)로부터 1996년 9월 17일 뿌리를 채취하여 물에 잘 씻어 흙을 제거한 후 5 kg을 대형파쇄기로 착즙하여 crude extracts 3,100 ml를 얻었다. Crude extracts 250 ml에 증류수 250 ml, 1 M NaCl 50 ml, 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 450 ml 가하여 총량이 1,000 ml이 되게 한후 110 mM AOT를 녹인 isooctane 1,000 ml를 가하고 실온에서 magnetic stirrer를 이용하여 30 분간 잘 교반 하였다. 얻어진 emulsion을 5,000 g 에서 60 분간 원심 분리하여 AOT층과 수층으로 분리하였다. 이때 AOT층은 810 ml이었다.

Table 2. Purification of peroxidase using AOT reverse micelle system from Chinese cabbage roots.

Step	Protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit / mg)	Yield (%)	Fold
Crude extracts	1,300	2236	1.72	100	1
AOT reverse micelle <sup>1</sup>	40	1349	33.7	60.3	19.6
AOT reverse micelle <sup>2</sup>	31	1920	29.9	41.1	17.4

Phase transfer was <sup>1</sup> centrifuged, <sup>2</sup> leaved.



AOT층을 잘 분리한 후 backward transfer를 위하여 80 mM Tris-HCl(pH 7.0), 1 M KCl로 구성된 수층 810 ml를 가하고 forward transfer와 마찬가지로 교반과 원심 분리를 하였다. 원심분리후 수층으로 transfer된 효소액(860 ml)을 분리하여 1차 정제를 마무리 하였다. 다음 Table 3.에서 알 수 있듯이 약 60% 의 높은 수율로 정제가 되어 AOT를 사용한 reverse micelle system이 강력한 효소 정제 수단이 될 수 있을 것으로 판단하였다. 한편, forward transfer, backward transfer의 진행시 AOT/수층의 현탁액으로부터 상(相)분리시 원심 분리를 이용하고 있으나 대량 분리 시에는 원심 분리 조작에만도 많은 노력 및 시간이 소요되므로 중력을 이용한 분리를 시도하였다. 조작은 두 과정이 똑 같으나 상분리의 방법이 원심 분리 또는 실온에 방치하는 것만이 달랐다. 두 가지 상분리 방법의 차이에 따른 효소의 정제 효율을 Table 2에 나타내었다. Table 2에서 알 수 있듯이 두 방법간에는 큰 차이가 없어 10 l 이상의 대량 분리 시에도 대형 원심분리기와 같은 시설 투자를 하지 않고 진행시킬 수 있을 것으로 판단된다.

#### 4. Chromatography에 의한 고도 정제 POX의 생산

AOT reverse micelle을 이용한 효소의 대량 정제는 정제 효율이나 수율 면에서 좋은 성적을 나타내었으므로 AOT reverse micelle system으로 부분 정제된 효소액에 대하여 DEAE-Toyopearl column chromatography를 이용하여 고도 정제를 수행하였다. 3-6)에서 얻어진 효소액을 10 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 대하여 하룻밤 투석한 후 10 mM Tris-HCl(pH 8.0)로 평형화한 DEAE-Toyopearl column(1.5 x 10 cm)에 도입하였다. 시료의 도입이 끝난 후 0 - 0.5 M NaCl을 함유한 10 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충 용

액(total volume 100 ml) 으로 linear gradient로 용출하였다. NaCl gradient 가 시작되면서 효소의 용출이 바로 이루어졌으며 이 과정을 정리하여 Table 3에 나타내었으며 단백질의 전기영동상은 Fig. 10에 나타내었다. 표와 그림 에서 알 수 있듯이 효소는 효과적으로 정제가 됨을 알 수 있으며 특히 이 과정은 3-6)에서 얻어진 효소액을 효과적으로 농축할 수 있을 뿐 아니라 정제 도 이루어짐을 알 수 있다. 본 과정을 이용하면 배추 뿌리의 파쇄로부터 고도 정제 효소의 생산까지 20시간 이내의 짧은 시간에 끝낼 수 있어 실제적 인 생산 과정에의 적용에 유리할 것으로 판단되고 있다.

Table 3. Purification of peroxidase by AOT reverse micelle system and column chromatography method.

Step	Protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit / mg)	Yield (%)	Fold
Crude extracts	1,300	2236	1.7	100	1
AOT reverse micelle <sup>1</sup>	40	1349	33.7	60.3	20
DEAE-Toyopearl	5.5	894	160	40	93

<sup>1</sup> Centrifuged

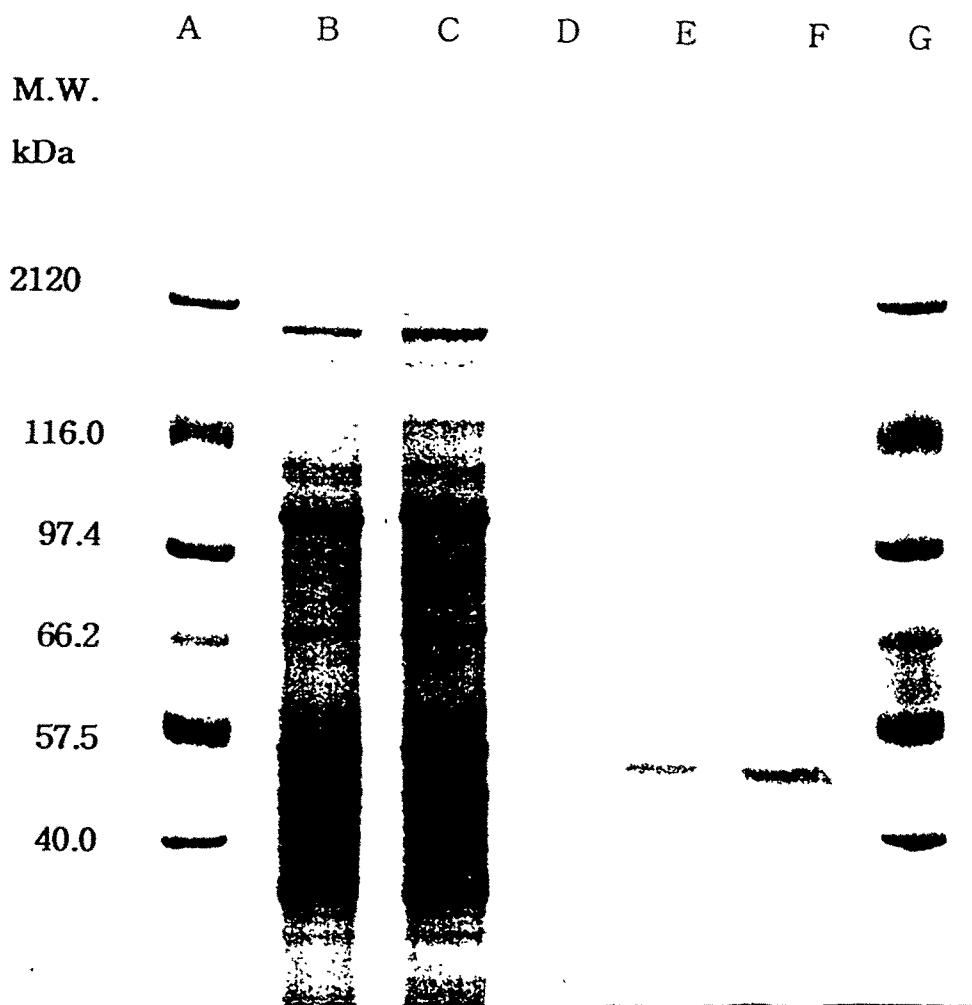


Fig. 10. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of each purification steps.  
 Lane A, G, marker protein ; Lane B, C, crude extract ;  
 Lane D, after bckward transfer ; Lane E, F, after  
 DEAE-Toyopearl column chromatography.

# 제 3 장

## 효소의 응용성 검토

### 제 1 절 서 설

POX의 넓은 기질 특이성으로 인하여 임상 분석용 시약으로부터 phenol 성 폐수의 제거를 위한 공업적 시약, 의약품의 산업적 이용 가능성은 여러 연구자들에 의하여 꾸준히 연구되어 그중에서 일부는 효소학적 성질이 밝혀짐과 동시에 유전자의 단리를 통하여 효소를 대량 생산할 수 있는 가능성을 제시하고 있어 산업적 이용성이 매우 높다.<sup>12) - 16)</sup> POX는 기질로 guaiacol, catechol, pyrogallol등 phenol성 화합물이 다양하게 이용되고 있다. 이들 기질은 POX에 의해 중합되어 다양한 물질을 합성한다. 즉, POX의 반응 생성물은 다양한 생리 활성 및 색상을 나타내므로서 이를 적극적으로 활용할 가치가 있다.

덜 익은 감을 이용하여 광목에 염색하는 이른바 갈옷 염색기법은 제주도에서 전통적으로 노동복(작업복)을 만드는데 활용되고 있다. 갈옷은 최근의 천연섬유 선호와 자연적인 색깔을 추구하는 경향과 맞물려 고급 의상 소재로도 개발 및 이용이 되고 있다. 갈옷의 염색 과정은 덜익은 감속에 들어 있는 phenol성 화합물과 polyphenol oxidase와의 반응을 이용한 것으로 판단된다. 그러나 감 생산의 계절적 제한으로 갈옷의 생산은 제한이 되고 있으므로 계절적 제한이 없는 새로운 방법을 개발할 필요가 있다. POX의 반응 생성물은 다양한 색조를 나타내므로 배추 뿌리 기원의 효소를 이용하여 대체

갈옷의 생산에의 이용 가능성을 가지고 있으므로 이를 검토하고자 하였다.

한편, 방향족 화합물에 대한 POX의 반응은 중합체 생성으로 요약할수 있다. POX의 반응 결과 생성된 화합물은 새로운 항생물질의 개발이나 phenol성 폐수의 처리등에 응용할수 있다. 따라서 본 연구에서는 POX의 중합반응 결과 생성되는 화합물을 항생물질로의 이용 가능성과 2,4-dichlorophenol의 제거에 적용하였다.<sup>30) - 32)</sup>

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 시 약

제 2 장 제 2 절 참조.

### 2. 조효소의 조제

제 2 장 제 2 절 참조.

### 3. 효소의 활성 측정

제 2 장 제 2 절 참조.

### 4. 효소적 염색

POX의 기질로 guaiacol, catechol, pyrogallol, gallic acid 등 phenol성 화합물이 다양하게 이용하였다(Table 1). Table 1의 기질과 배추 뿌리 추출 물을 효소원으로하여 옷감(광목 및 옥양목)을 반응액에 담근 후 과산화 수소를 가하여 37°C에서 반응을 개시하였다. 30분간 반응후 꺼내어 말리고 다시 위의 반응액으로 염색하는 과정을 3회 반복하여 생성된 색소가 직물 내에 어떠한 색으로 염색이 되는가를 관찰하였다.

Table 1. Composition of the reaction mixture for dyeing by crude peroxidases.

Reagents	Volume (ml)
40 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50
40 mM Substrate*	50
1 M Tris-HCl(pH 7.0)	50
100 mM Phenol	25
Crude extract	25
Distilled water	300
Total Volume	500

\* Substrate : guaiacol, catechol, pyrogallol, and gallic acid

## 5. 균의 배양

### 1) 세균의 배양

본 실험에 사용된 검정균주는 gram(-)으로는 *Escherichia coli* DH 5- $\alpha$ , gram(+)으로는 *Bacillus subtilis*를 사용하였다. Table 2의 배지를 500 ml 진탕 flask에 100 ml씩 분주하여 고압살균 한 뒤 각 균주를 1 백금이 접종하여 왕복 진탕기에서 107-108 rpm, 37°C, 24시간 동안 배양하였다.

Table 2. Composition of the medium for antibacterial tests

Nutrition	percents(%)
Glucose	0.1
Yeast extract	0.5
Polypeptone	1
Sodium chloride	0.5
pH 7.0	

## 2) 항균 활성 측정용 중층배지

Table 2의 배지로 Petri dish에 하층배지를 만든후 5-1)에서 배양한 각각의 검정균주를 접종한 상층배지를 그 위에 부어 항균 활성 측정용 중층배지를 만들었다.

## 6. 항균성 물질의 검정

Table 3, 4의 반응액에 과산화 수소를 첨가하여 반응을 개시한후 37℃에서 0, 0.1, 1, 5, 30, 60, 120, 180분후 끓는 물에서 3분간 가열하여 반응을 정지시켰다. 반응 정지액 50 μl로 paper disc를 적신후 각각의 검정균이 접종된 중층배지에 올려 놓고 37℃에서 하룻밤 배양하여 생육저지환을 관찰하였다.

Table 3. Composition of the reaction mixtures for production of antibiotics by crude peroxidases.

Reagents	Volume ( $\mu$ l)
40 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200
40 mM Substrate*	200
1 M Tris-HCl(pH 7.0)	200
100 mM Phenol	100
Crude extract	50
Distilled water	1250
Total Volume	2000

\* Substrate : aminoantipyrine, pyrogallol, guaiacol, and tanic acid



Table 4. Composition of the reaction mixture for production of antibiotics by peroxidase

Reagents	Volume ( $\mu$ l)
40 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200
100 mM Substrate*	200
1 M Tris-HCl(pH 7.0)	200
40 mM aminoantipyrine	200
Crude extract	50
Distilled water	1250
Total Volume	2000

\* Substrate : pyrogallol, guaiacol, tanic acid, and catechol

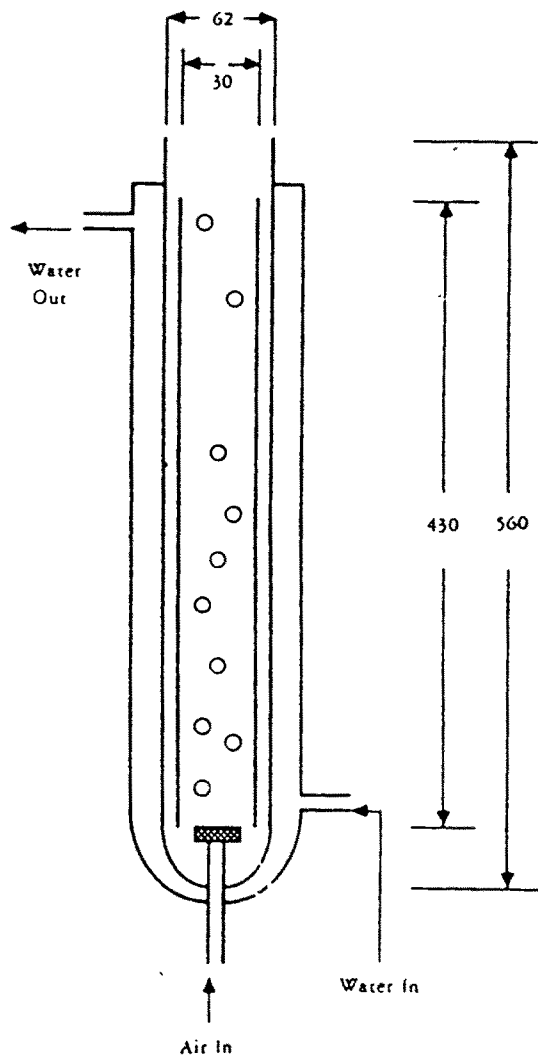


Fig 1. Schematic diagram of air lift reactor.  
Unit in mm

## 7. Air lift reactor

본 실험에 사용한 air lift reactor는 Fig. 1과 같은 구조를 하고 있다. reactor에 pulp 30 g을 가한 1,200 ml의 반응액을 37℃, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 반응 조건으로 유지하며 110 ppm의 DCP와 3시간 반응시켰으며 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1시간 동안 0.034 mM/min로 peristaltic pump를 이용하여 연속 주입하였다.

## 8. 2,4-Dichlorophenol(DCP)의 정량

POX에 의한 DCP 중합 제거 반응속도는 잔존 DCP의 양을 측정하여 구하였다. 즉 반응액 1ml에 1N HCl 0.2 ml를 가하여 반응을 정지시키고 1N NaOH 0.2 ml를 가하여 중화시킨 다음 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상등액 1 ml에 4% AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>12H<sub>2</sub>O 0.2 ml를 가하여 침전을 숙성시킨 다음 상등액에 남아 있는 DCP의 양은 POX를 이용한 효소적 방법으로 정량하였다.

## 제 3 절      결 과      및      고 찰

### 1. 효소적 염색을 통한 갈옷 대체 품의 개발

POX의 기질로는 guaiacol, catechol, pyrogallol등 phenol성 화합물이 다양하게 이용되고 있다. 이들 기질은 POX에 의해 중합되어 다양한 색깔을 나타내고 있다. 각각의 기질과 배추 뿌리 추출물을 효소원으로 하여 옷감(광목, 옥양옥)을 반응액에 담근 후 과산화 수소를 가하여 반응을 개시하였다. 30분간 반응후 꺼내어 말리고 다시 염색을 하는 과정을 3회 반복하여 생성된 색소가 직물 내에서 어떠한 색을 나타내는지 관찰하였다. Fig. 2에서 알 수 있듯이 기질의 종류에 따라서 나타내는 색깔이 각각 달랐으며 천의 종류에 따라서도 다른 색깔을 나타내었다. 나타난 색상은 갈 옷의 색상과 같은 느낌을 주는 중간색의 은은한 색상을 나타내어 실용적으로 응용될 수 있음을 보여주고 있다. 염색 산업에서 배출되는 난분해성 염료는 최근 심각한 환경문제를 유발하고 있다. 본 연구에서 시도한 효소적 염색법은 배출되는 폐수의 양이 현격하게 소량이고 천연물을 원료로 하기 때문에 생분해성의 문제가 없는 장점을 가지고 있다. 뿐만 아니라 화학적 염색법에서 쓰이는 중금속의 매염제 대신에 효소를 사용하였으므로 새로운 무공해 염색법으로 제시하고자 한다. 본 연구에서는 면직류만을 염색 대상으로 하였으나 염색할 직물의 다양화 및 염색후 색소의 안정성, 견뢰도 등은 앞으로 더욱 연구하여야 할 과제이다.

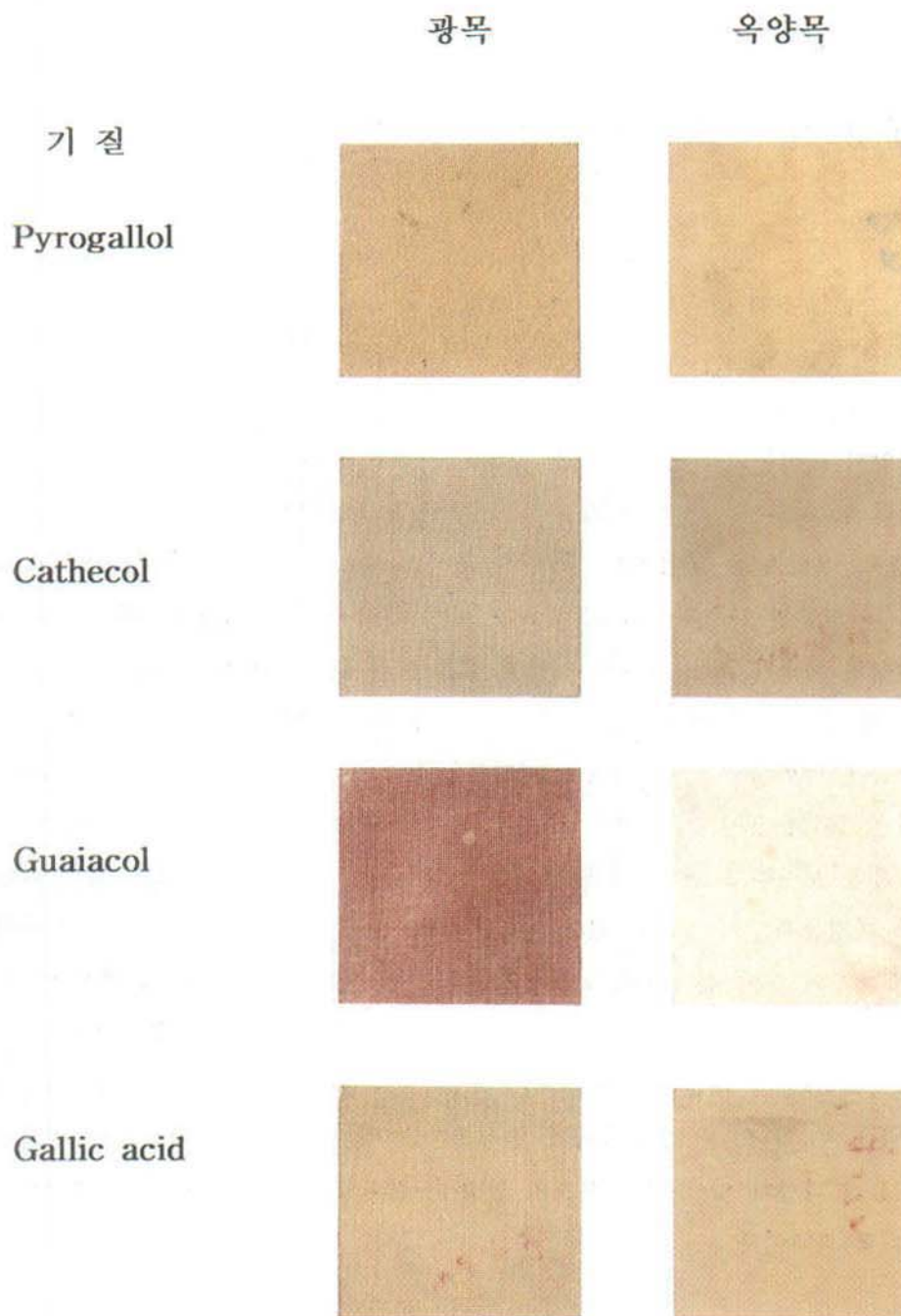


Fig. 2. Dyeing of cotton fabrics(cotton cloth and muslin) using peroxidase from Chinese cabbage roots.

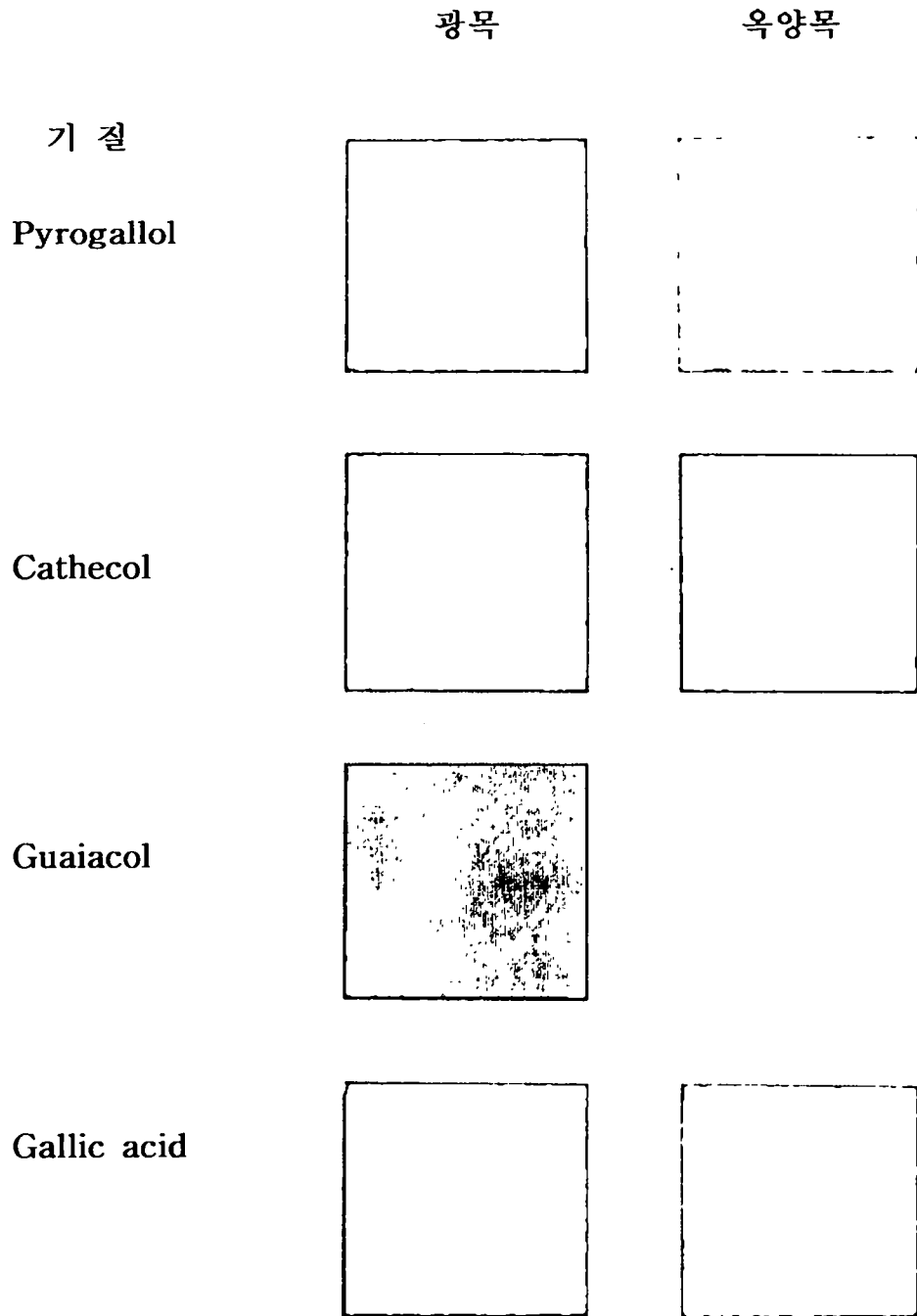


Fig. 2. Dyeing of cotton fabrics(cotton cloth and muslin) using peroxidase from Chinese cabbage roots.

## 2. 저독성 살균제로의 이용

Phenol, guaiacol등을 기질로 한 POX의 반응 생성물이 항균 활성을 갖는다는 것이 최근에 밝혀진바 있다. 본 연구에서는 농가에서 쉽게 구할 수 있는 배추 뿌리를 이용하여 농업용 항생물질의 농가 내에서의 합성을 통한 이용을 목표로 기질을 달리한 반응액의 항균 활성을 검색하였다. Gram(-)균으로는 *Escherichia coli*, Gram(+)균으로는 *Bacillus subtilis*를 검정 균으로 하여 항균 활성을 조사하였다. 우선 기질의 종류에 따른 항균성 물질의 생성은 Table 5와 같다.

Table 5. Enzymatic synthetics of antibiotic using peroxidase from Chinese cabbage roots.

Substrates	Strains	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Phenol		-	-
Phenol + aminoantipyrine		++++ <sup>1</sup>	++++
Phenol + pyrogallol		+	- <sup>2</sup>
Phenol + guaiacol		+	-
Phenol + tanic acid		+	-
Aminoantipyrine		-	-
Phenol + Aminoantipyrine		++++	+++
Guaiacol + Aminoantipyrine		++	++
Pyrogallol + Aminoantipyrine		+	+

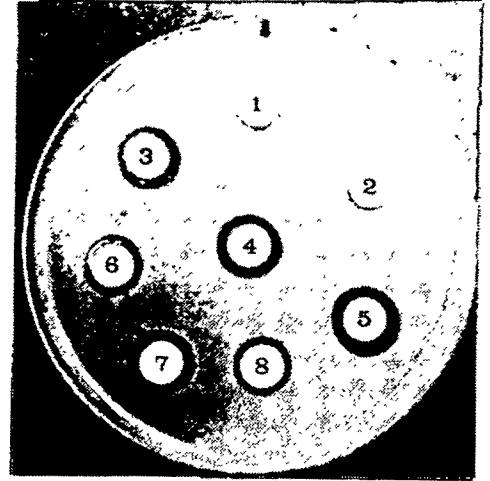
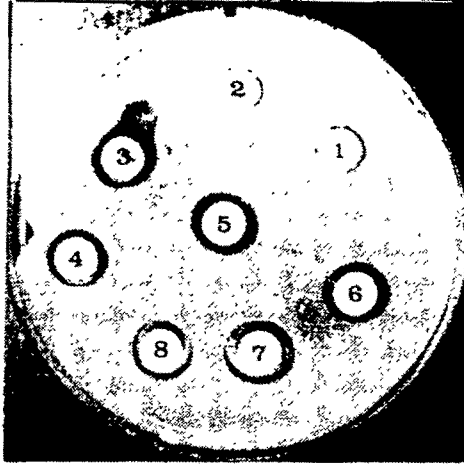
<sup>1</sup> + ; Good utilization , -; Poor utilization

*Escherichia coli*

*Bacillus subtilis*

기 질

Phenol  
+ Aminoantipyrine



*Escherichia coli*

*Bacillus subtilis*

Guaiacol  
+ Aminoantipyrine

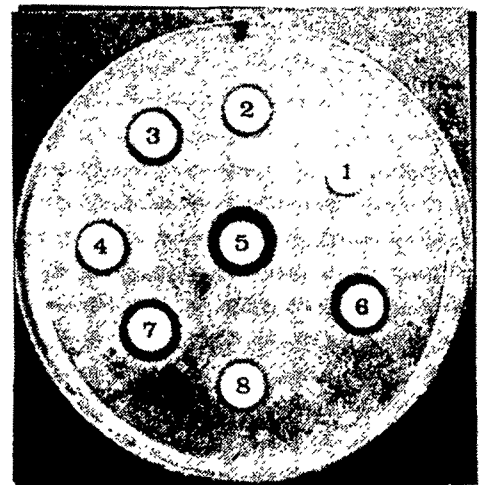
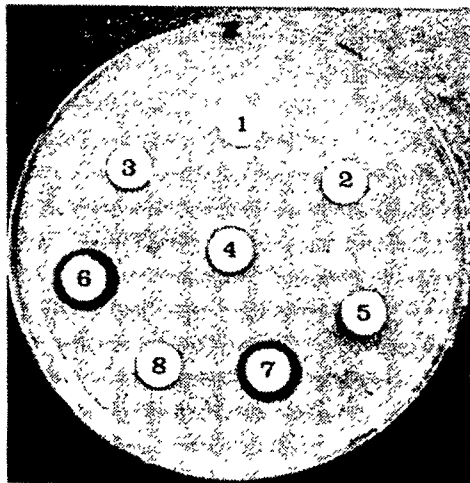


Fig. 3. Time scanning of antibiotics production using Chinese cabbage peroxidase.

Reaction time : 1 : 0min, 2 : 0.1min, 3 : 1min, 4 : 5min,  
5 : 30min, 6 : 60min, 7 : 120min, 8 : 180min.



Table 5에서 알 수 있듯이 항균성 물질의 효소적 합성을 위한 효소원으로 배추 뿌리 조효소액을 사용할 경우에는 기질로서 phenol 또는 guaiacol 과 aminoantipyrine을 사용할 때 가장 활성이 높은 물질이 합성되었다. 반응이 진행됨에 따라 생성되는 항생물질의 항균성 변화를 관찰하기 위하여 반응 시간별로 각각의 세균에 대한 감수성의 변화를 관찰하였다. 그 결과 반응 시간에 검정 균의 감수성 따라 조금씩의 차이는 있었으나 효소 반응 시간이 1분에서 60분 사이에서 항균성 물질의 생성이 많음을 나타내었다(Fig. 3.).

### 3. 페놀성 폐수의 효소적 처리

본 연구의 1차 년도 연구 결과에서 나타난 바와 같이 뿌리를 착즙기를 이용하여 효소를 추출하였을 경우 전체의 POX활성중 pulp에도 상당량 남아 있으므로 이를 이용할 방안으로 air lift reactor를 운전하여 유독성 화합물인 2,4-dichlorophenol(DCP)의 제거에 적용하였다. Fig. 1 의 구조를 갖는 reactor에 pulp 30g을 가한 1,200 ml의 반응액을 37°C, pH 8.0의 반응 조건으로 유지하며 3시간 반응시켰다. 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1시간 동안 0.034 mM/min로 peristaltic pump를 이용하여 연속 주입하였다. Fig. 4에서 나타나듯이 반응 초기의 110 ppm의 DCP가 POX를 이용한 3시간의 반응후 6 ppm으로 감소하였다. Fig. 4에서 알 수 있듯이 반응이 30분 지난 후 90%이상의 DCP가 제거되었고 1시간 전후로 효소적 반응이 종결됨을 알 수 있다.

본 연구 결과와 1년차 연구 결과를 종합하여 보면 배추 뿌리의 효소 추출 잔사인 pulp에 잔존하는 POX는 phenol 및 DCP와 같은 여러 가지 phenol 성 화합물의 제거에 충분히 이용될 만한 가치가 있다는 것을 나타내었다. 본 법은 여러 학자들에 의해 꾸준히 시도되어 왔으나 기존 효소의 가격이 비싸 실용화에 큰 걸림돌이 되어 왔으나 본 연구에서는 현재까지 제공된 어떠

한 효소보다도 값이 저렴한 재료를 사용하므로서 실용화에 가장 접근이 되어 있다고 할 수 있다.

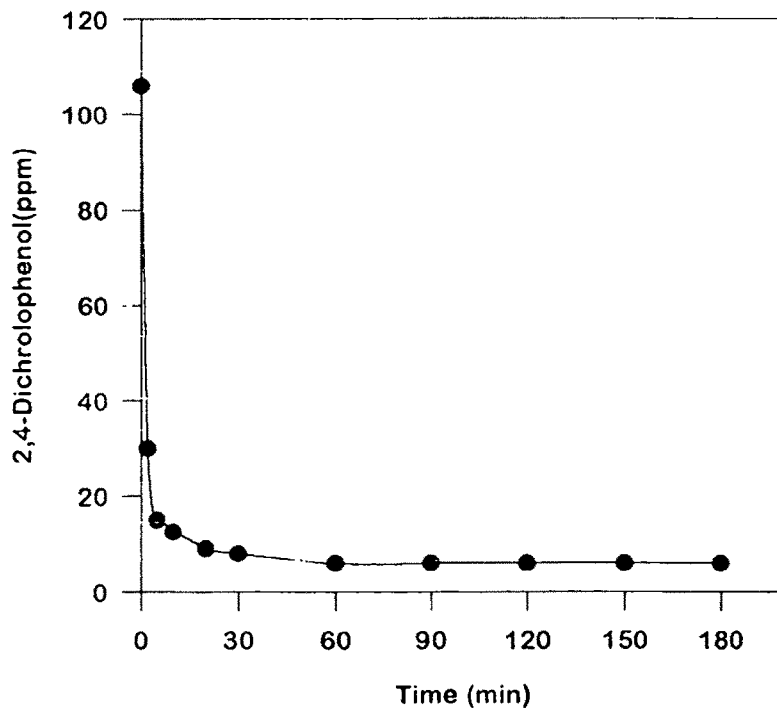


Fig. 4. Removal of DCP in air lift reactor by Chinese cabbage pulp. The reaction was carried out at 37°C in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 containing 110 ppm of DCP. The reaction volume was 1,200 ml and hydrogen peroxidase was fed at a rate of 0.034 mM/min.

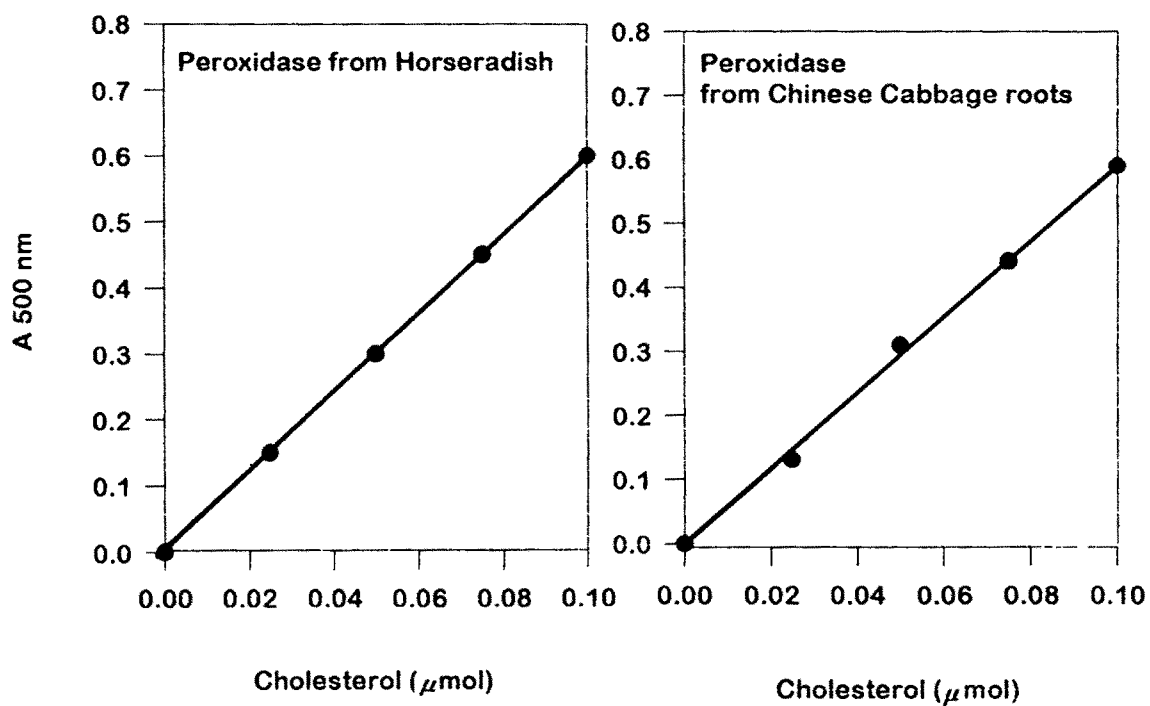


Fig. 5. Quantitative analysis of cholesterol by horseradish and Chinese cabbage peroxidases

#### 4. 고도 정제 POX의 이용성 검토

임상 검사용 시약으로 POX는 여러 가지 효소 반응의 최종 발색용 효소로서 광범위하게 이용되고 있다. 즉 임상 시료 중의 목적 화합물을 산화 효소(oxidase)류로 산화한 후 생성되는 과산화 수소를 POX와 chromogen의 존재 하에 발색시켜 목적 화합물의 양을 측정하는 system으로 이루어져 있다. 본 연구에서는 임상시약중 널리 사용되는 cholesterol 정량용 kit를 배추 뿌리 기원의 효소로 대체하여 응용 가능성을 검토하였다. 혈액 중의 cholesterol을 측정하는데 이용되는 cholesterol정량용 kit는 cholesterol oxidase와 POX 그리고 발색시약등으로 이루어져 있다. 따라서 최종적인 coupling enzyme으로 사용하는 POX를 시판의 것과 본 연구에서 정제한 효소로 구성하여 정량성 여부를 관찰하였다. 반응액은 2  $\mu$ mole aminoantipyrine, 35  $\mu$ mole phenol, 2 unit/ml horseradish 또는 배추 뿌리 POX 그리고 1 unit/ml cholesterol oxidase 로 이루어진 용액을 0 $^{\circ}$ C에서 잘 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 3분간 정치하였다. 농도가 다르게 cholesterol 을 효소 반응 용액에 첨가하여 반응을 개시하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 반응액을 끓는 물에서 3분간 가열하여 반응을 정지시키고 원심 분리 한 후 상등액의 흡광도를 500 nm에서 측정하였다. Fig. 5에서 나타나듯이 cholesterol의 농도가 증가함에 따라 500 nm에서의 흡광도가 정량적으로 증가함을 알 수 있었다. 또한 시판의 POX와도 흡광도의 증가 속도가 같아 배추 뿌리 기원의 효소가 임상 분석용 시약으로서도 충분히 사용될 수 있음을 보여 주었다. 이와는 별도로 과산화수소 또는 phenol의 정량에의 이용성을 검토한 결과도 마찬가지로 좋은 적용성을 나타내었다.

# 제 4 장

## 분리공정의 개발 및 설계

### 제 1 절 서 설

본 연구의 제 2 장에서는 AOT reverse micelle을 이용한 POX의 대량 생산을 위한 최적화 과정을 설정하였다. 이 과정을 중심으로 하여 산지 가공 공장 규모의 효소 생산 공장의 설립을 위한 분리공정을 설계하였다.

### 제 2 절 분리공정의 개발 및 설계

#### 1. 대량 파쇄기의 운용

소규모 산지 가공 공장에서 운영할 수 있는 규모의 배추 뿌리 파쇄기 (메서레이팅 장치)의 주안점은 높은 착즙률, 파쇄시 열 발생의 최소화, 시간 당 1톤의 처리용량등에 두었다. 공장 규모의 대량 파쇄를 위한 파쇄기는 농림수산부 애로 사항 연구 과제인 채소류 폐기물의 처리 시스템 개발에서 시제품으로 제작되어 있는 것을 사용하였으며 그 기본적인 구조와 배추 뿌리의 대량 파쇄에 사용한 파쇄기는 Fig. 1 과 2에 나타내었다.

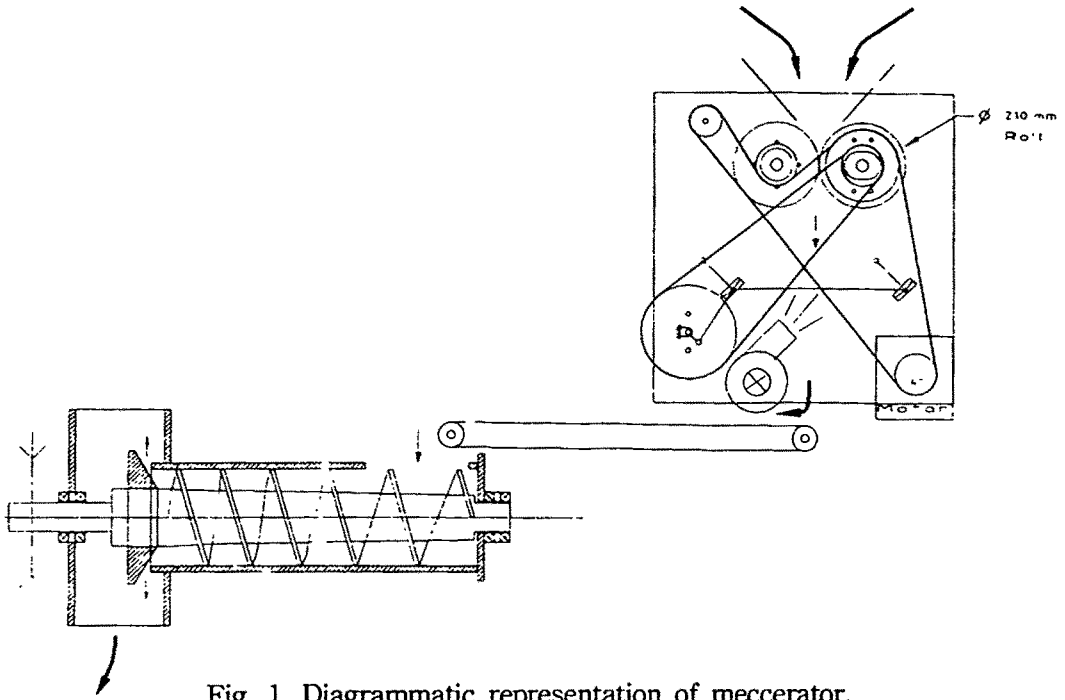


Fig. 1. Diagrammatic representation of meccerator.

본 파쇄기의 기본적인 파쇄 방법은 가정용 녹즙기와 비슷하나 착즙시 용량이 큰 extruder를 사용하므로 pulp의 기계내 체류 시간이 상대적으로 길어 착즙시 발생하는 열의 영향을 무시할 수 없다. 따라서 본 파쇄기의 효소 추출 효율, 처리 용량 등을 가정용 녹즙기와 비교하였으며 그 결과를 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보듯이 대량 처리에 있어 본 연구에서 사용된 대량 파쇄기는 높은 추출 효율과 처리 용량 등을 나타내고 있어 소규모의 공장에서 운영할 수 있는 적합한 파쇄기로 판단되었다.

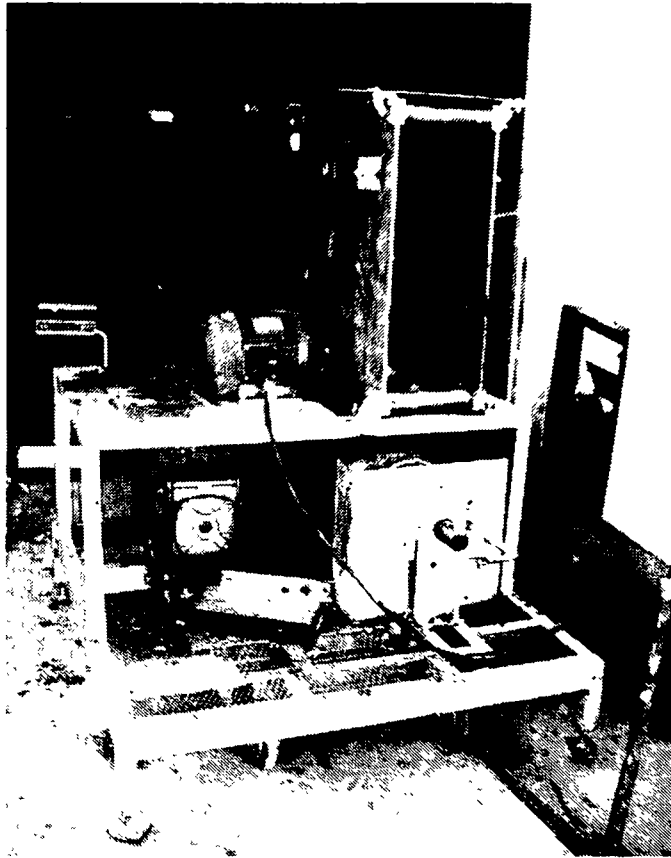


Fig. 2. Photograph of meccerator used in this study.

Table 1. Comparison of peroxidase extraction by juicer and meccerator

Machines	Roots (kg)	Total volume (ml)	Treatment time (min)	Total activity (unit)
Juicer	1	550	15	19.305
Meccerator	1	626	7	13.513

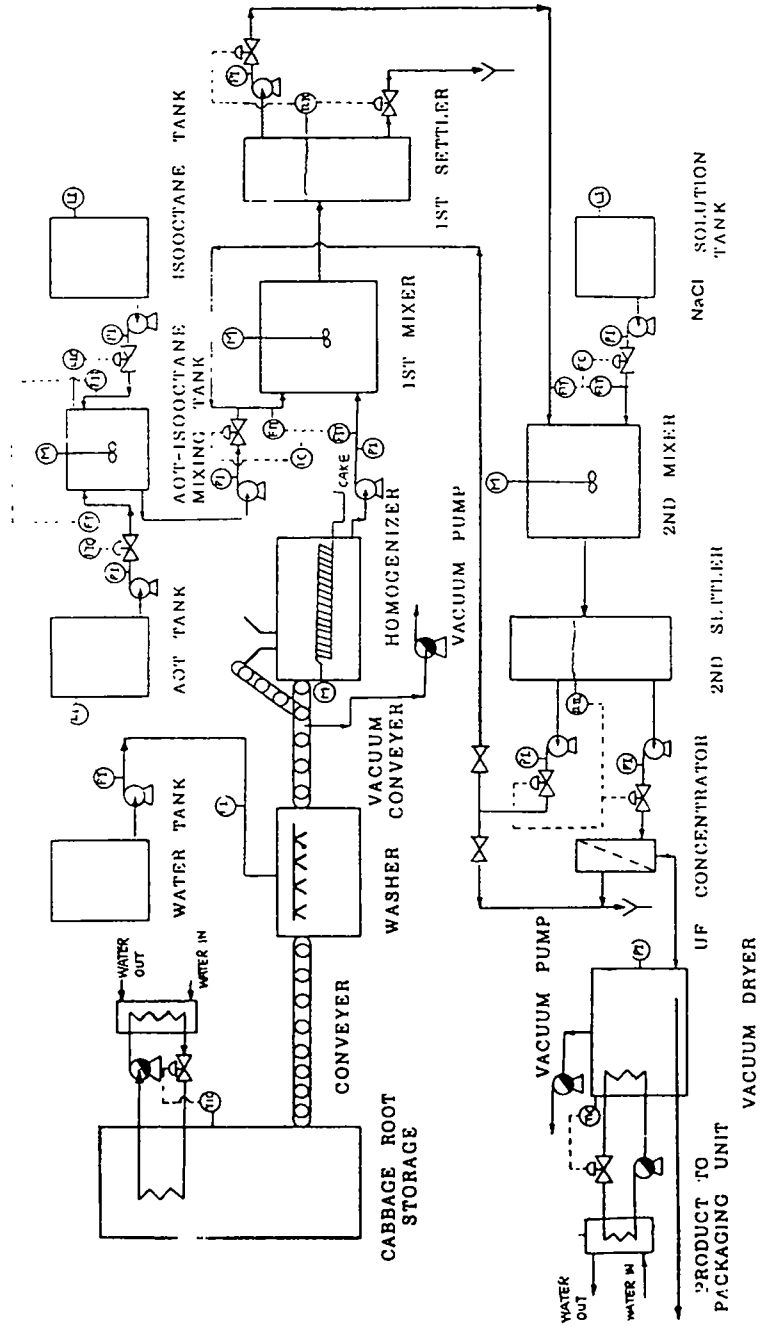
## 2. 분리 공정의 설계

수거된 배추 뿌리는 cabbage root storage에 냉장 보관된다. 이 저장실의 온도는 냉매의 압축, 냉각, 팽창, 열 흡수의 냉동 cycle을 이용하여 최적 저장 온도를 유지하도록 조절된다. 저장되었던 배추 뿌리는 conveyer를 이용하여 washer(세척조)로 이동하게 되어 여러 가지 불순물이 제거된다. 세척된 배추 뿌리는 vacuum conveyer에 의해 homogenizer로 이동하게 되는데 이때 conveyer 안쪽에 작용하는 진공 때문에 물이 탈수된다. 탈수된 배추 뿌리는 homogenizer의 hopper를 통하여 homogenizer안으로 이동하게 되고 이곳에서 기계적인 방법에 의해 배추 뿌리의 세포 조직이 파쇄되어 solid phase(cake)와즙(juice)상태의 aqueous phase로 나뉘어진다. 이때 대부분의 peroxidase는 다른 세포 구성물과 함께 aqueous phase에 노출된다. 이렇게 조성된 배추뿌리즙은 1st mixer에서 110mM AOT가 들어 있는 isooctane과 접촉하게 되는데, 이때 1st mixer로 공급되는 AOT-isooctane의 유량은 공급되는 배추뿌리즙의 유량에 비례하여 ratio controller에 의해 조절된다. Peroxidase는 1st mixer에서 접촉하는 동안 aqueous phase에서 micellar phase로 이동하게 된다(forward transfer). 한편 110mM AOT-isooctane solvent는 AOT-isooctane mixing tank에서 조성되는데 각각의 storage tank에서 ratio controller에 의해 정확한 AOT의 농도가 유지되도록 mixing tank로 공급된다. 1st mixer에서 접촉된 혼합물이 1st settler로 보내지면 연속으로 aqueous phase와 micellar phase가 분리되어 aqueous phase는 버리고 peroxidase가 들어 있는 micellar phase만 2nd mixer로 이동된다. 이때 버리거나 2nd mixer로 이동되는 유량은 1st settler안의 aqueous phase와 micellar phase 사이의 계면의 높이에 따라 조절된다. 2nd mixer로 이동한 micellar phase는 1M NaCl 용액(aqueous phase)과 접촉하게 된다. 이때 역시



공급되는 NaCl 용액의 유량은 공급되는 micellar phase의 유량에 비례하는 ratio controller에 의해 조절된다. Peroxidase는 2nd mixer에서 접촉하는 동안 micellar phase에서 다시 NaCl이 들어 있는 aqueous phase로 이동하게 된다(backward transfer). 2nd mixer에서 접촉된 혼합물이 2nd settler로 보내지면 연속으로 micellar phase와 aqueous phase가 분리되고, 이번에는 micellar phase는 버리거나 다시 recycle하여 1st mixer로 보내지고 peroxidase가 들어 있는 aqueous phase만 UF concentrator로 이동되어 농축된다. 이때 역시 버리거나 UF concentrator로 이동되는 유량은 2nd settler 안의 aqueous phase와 micellar phase 사이의 계면의 높이에 따라 조절된다. 정제되고 농축된 peroxidase는 vacuum dryer에 의해 powder 형태가 되고 packaging unit을 거쳐 상품화가 완성된다.

A schematic diagram of peroxidase production process



# 제 5 장

## 경제성 및 공장 설립 검토

### 제 1 절 서 설

본 연구의 1, 2차 년도 연구를 통하여 효소의 대량 생산에 따른 최적화 조건을 검토하였다. 본 연구의 결과가 바로 효소생산 공장의 설립에 그대로 적용될수는 없으나 본 연구의 제 4 장에서 제시된 효소의 생산 공정을 토대로 scale up을 통한 공장설립시 소요되는 시설의 규모와 이에 따르는 총 투자비와 운전비를 산출하여 이를 토대로 경제성 평가를 수행하므로서 공장 설립을 검토하였다.

### 제 2 절 배추 뿌리 회수의 생력화

Fig. 1은 배추밭에서 배추를 수확하고 난 후의 모습이다. 사진에서 나타나듯이 밭 위에는 상품성이 낮은 배추 및 배추 껍질등 폐기물이 널려져 있어 배추 뿌리 회수의 기계화가 어려운 실정이다. 즉 감자 굴착기 등을 이용하여 뿌리를 캐어 낸다고 하더라도 폐기물과 뿌리를 선별하여야 하는 과정을 거쳐야 하고 또한 흙을 적당히 털어야 하는 어려움이 있어 뿌리 회수의 기계화는 농기계 전문가 집단에 의해 다각도로 검토해야 할 사안이다.

한편, 배추 뿌리를 회수하는데 걸리는 시간을 측정하기 위하여 성인 남자 3명이 배추 뿌리 회수 작업에 드는 노동력을 검정하였다. 50분 작업 10분 휴식으로 4회 반복(총 작업 시간 200분 / 1인)하여 회수한 배추 뿌리의 양은 평균 2,000 뿌리로 잘 씻은 후의 총량은 약 40 kg으로 1일 작업 시간을 8시간으로 고려하면 1인당 80 kg(4,000 뿌리)의 채취가 가능할 것으로 계산이 된다. 이는 배추 뿌리 하나의 무게를 20 g으로 하였을 경우이며 보통 한 뿌리당 20 g이상 되므로 뿌리의 크기에 따라 채취량은 증가할 수 있을 것으로 판단한다.



Fig. 1. Photograph of Chinese cabbage patch crop after harvest.

### 제 3 절 공장 설립 검토

#### 1. 소요시설 내역 (Equipment list)

1) cabbage root storage refrigeration unit	10,230,000
2) water tank	2,970,000
3) water pump	1,950,000
4) conveyer	4,950,000
5) washer	1,320,000
6) vacuum conveyer	11,540,000
7) homogenizer	940,000
8) AOT tank	1,650,000
9) AOT pump	690,000
10) AOT-isooctane mixing tank	3,960,000
11) AOT-isooctane transfer pump	1,090,000
12) isooctane tank	3,960,000
13) isooctane pump	1,090,000
14) 1st mixer feed pump	1,090,000
15) 1st mixer	590,000
16) 1st settler	6,600,000
17) 2nd mixer feed pump	690,000
18) NaCl solution tank	3,000,000
19) NaCl transfer pump	690,000
20) 2nd mixer	520,000
21) 2nd settler	5,610,000

22) recycle pump	690,000
23) concentrator feed pump	690,000
24) ultrafiltration concentrator	430,000
25) vacuum pump	73,000,000

---

Total 139,940,000 ₩

## 2. 시설의 예비 설계와 가격 산출 (Equipment sizing and cost)

년간 1,000ton의 조효소액을 처리 할 수 있는 공장 규모이며 조효소액의 비활성 33 unit/mg , 단백질 47 mg/l를 기준으로 산출하였다.

### 1) cabbage root storage refrigeration unit

#### ① 저장 면적 소요량

##### a) 275일 / 년 작업일 기준

1000 ton	1 year	1 day	kg	= 152 kg/hr
year	275 day operation	24 hr	1 ton	

##### b) 배추 뿌리 소요량

본 연구 결과 250 ml의 crude extracts로 부터 860 ml의 정제 효소액 생산을 하며 crude extracts의 비중을  $1g / cm^3$  으로 계산하면 시간당 배추

뿌리의 처리량이 계산 된다.

152 kg	1 l purified enzyme	0.25 l crude extracts	5 kg cabbage roots
hr	1 kg	0.86 l purified enzyme	3.1 l crude extracts

= 71 kg of cabbage roots / hr

c) 평균 저장기간을 30일 로 산정하면

71 kg	1 ton	24 hr	30 days	= 51 ton
hr	1000 kg	1 day		

이상의 계산으로부터 51 ton을 저장 할수 있는 창고면 충분하다. 창고의 크기는 4 m x 10 m x 10 m 로 계산된다.

② 에너지 소요량의 산출

$$\text{Total heat load} = \begin{matrix} \text{heat of} & \text{heat evolved} & \text{heat loss} & \text{heat loss} \\ \text{respiration} & \text{+ by operation} & \text{+ through} & \text{+ through} \\ & \text{and lights} & \text{roof and walls} & \text{floor} \end{matrix}$$

a) heat of respiration (ref. 49 기준) = 51 x 150 = 7,650 W = 7.6 kW

b) heat evolved by operator and light = 무시

c) heat loss through roof and walls

창고의 단열재로 polyurethane foam을 300mm, 총 벽면적  $4 \times 10 \times 4 + 10 \times 10 = 260 \text{ m}^2$ , 외부온도  $25^\circ\text{C}$ , 창고내 온도  $4^\circ\text{C}$  기준으로 하고 열 전도율을  $0.026 \text{ W / m / K}$ 로 산정하면,

$$\frac{0.026 \times 260(25-4)}{0.3} = 473 \text{ W 의 전력이 소비된다.}$$

d) heat loss through floor

콘크리트 외벽의 두께 450 mm, 면적  $10 \times 10 = 100 \text{ m}^2$ , 토양온도  $10^\circ\text{C}$ , 실내온도  $4^\circ\text{C}$ , 콘크리트의 열전도율  $0.87 \text{ W / m / K}$ 로 산정하면,

$$\frac{0.87 \times 100(10-4)}{0.45} = 1160 \text{ W 의 전력이 소비된다.}$$

e) total heat load

따라서 총 열손실은

$$7.6 + 0.473 + 1.16 = 9.233 \approx 10 \text{ kW}$$

이것을 ton of refrigeration으로 환산하면



10 kW	1000 kW	1 (Joule/sec)	1 cal	1 ton of refrigeration
	1 kW	1 W	4.2 Joule	844 cal/sec

= 2,82 ton of refrigeration

③ cost of refrigeration unit (ref. 46)

1967년 CE equipment cost index 107.7 (ref. 47)

1995년 " " 428.0 이므로

Cost index는 428/107.7이 된다.

기준 단가는 \$ 3,100 이므로 따라서 cost index를 적용하면

$$\$ 3,100 \times \frac{428}{107.7} = 12,319 \text{ dollar} = 10,230,000 \text{ 원}$$

2) water tank

세척에 관한 성능 방정식은 다음과 같이 주어진다(ref. 48)

$$T = (1 - \epsilon)^n$$

T은 세척후 남아있는 고형물 회분, n은 여전히 남아 있는 물의 량과 세척수와의 부피 비,  $\epsilon$ 는 세척 효율이다.

배추 뿌리를 1%의 retained solid 만 남겨 세척하고 washing efficiency를

50%로 한다면,

$$(0.01) = (1-0.5)^n$$

$$n = 6.64$$

kg당 남아있는 물의 량을 보수적으로 200 ml이라고 하면(공극률 20%)

$$\text{kg당 필요한 세척수량} = 6.64 \times 0.2 \text{ l} = 1.33 \text{ l / kg}$$

$$\therefore \text{시단당 필요 세척 수량} = \frac{1.33 \text{ l}}{\text{kg}} \times \frac{71 \text{ kg}}{\text{hr}} = \frac{94.43 \text{ l}}{\text{hr}}$$

$$\therefore \text{저수량 (day tank 기준)} = \frac{94.43 \text{ l}}{\text{hr}} \times 24 \text{ hr} = 2266 \text{ l}$$

재질을 carbon steel로 하여 cost index를 적용하여 산출하면

$$\$ 900 \times \frac{428}{107.7} = 3,577 \$ = 2,970,000 \text{ 원}$$

### 3) water pump

유량: 94.43 liter / hr,  $\Delta P$  : spray 6[kgf/cm<sup>2</sup>], type : centrifugal을 기준하면

$$\Delta P_v = \frac{6 \text{ kgf}}{\text{cm}^2} \left| \frac{(100 \text{ cm})^2}{(1 \text{ m})^2} \right| \frac{1 \text{ m}^3}{1000 \text{ kg}} = 60 [\text{kg}_f - \text{m} / \text{kg}]$$

마찰 손실 : 무시, 높이 : 3 m로 설정하면,

$$\therefore W = (Z_2 - Z_1)g/g_c + \Delta P_v + F_f = 3 + 60 = 63 \text{ kg}_f - \text{m} / \text{kg}$$

$$\text{동력} = \frac{W_p V}{(3600)(76)\eta} = \frac{(63)(1000)(0.094)}{(3600)(76)(0.4)} = 0.05 \text{ hp}$$

Pump 가격은 유량 94.43 liter / hr 기준으로 하고 cost index를 적용하면(ref. 46),

$$\$ 590 \times \frac{428}{107.7} = 2,344 \$ = 1,950,000 \text{ 원}$$

4) conveyer

폭 16 inch , 길이 20 ft 기준으로 하고 Cost index를 적용하면(ref. 46),

$$\$1,500 \times \frac{428}{107.7} = 5,961 \$ = 4,950,000 \text{ 원}$$

5) washer

16 inch ; 60 lbs/linear ft, 처리속도 : 1,176 kg / hr를 기준으로 하면  
Conveyer linear velocity는

$$\frac{94 \text{ kg}}{\text{hr}} \left| \frac{\text{ft}}{60 \text{ lb}} \right| \frac{1 \text{ lb}}{0.454 \text{ kg}} \left| \frac{1 \text{ hr}}{60 \text{ min}} \right| = 0.058 \text{ ft} / \text{min}$$

washing time ; 30 min, washer length = 30 x 0.058 ft / min = 1.74  
ft = 2 ft, washer width ; 2 ft (16 inch conveyer), washer hight ; 3 ft 로  
설정하면,

$$\text{washer volume} = 2' \times 2' \times 3' = \frac{12 \text{ ft}^3 \left| \frac{7.48 \text{ gal}}{1 \text{ ft}^3} \right|}{1 \text{ ft}^3} = 90 \text{ gal}$$

기준 단가는 \$ 400 이므로 따라서 cost index를 적용하면(ref. 46)

$$400 \times \frac{428}{107.7} = 1,590 \$ = 1,320,000 ₩$$

6) vaccum conveyer

conveyer 기준(ref. 46) 4,950,000 ₩

power pack 의 단가를 산출하면(ref. 46),

$$2,000\$ \times \frac{428}{107.7} = 7,948 \$ = 6,590,000 \text{ 원}$$

따라서  $4,950,000 + 6,590,000 = 11,540,000 \text{ 원}$

7) homogenizer

crusher : 기준 100 ton/hr일 경우 22,000 \$이므로 용량 0.071 ton/hr의 경우 sixtenths factor rule 적용하면,

$$\therefore 22,000 \left( \frac{0.071}{100} \right)^{0.6} = 284 \$.$$

같은 cost index 적용하면(ref. 46),

$$\$284 \times \frac{428}{107.7} = 1129 \$ = 937,000 ₩$$

8) AOT tank

필요한 AOT의 량

152 kg	1 ℓ of purified enzyme	1 ℓ isooctane	110 mole AOT	1 mole	444.5 g
hr	1 kg	0.86 of purified enzyme	1 ℓ isooctane	1000mM	1 mol AOT

$$= 8,642 \text{ g / hr} = 8.642 \text{ kg / hr}$$

day tank로 가정하면

$$\text{용량} = \frac{8.642 \text{ kg}}{\text{hr}} \times 24 \text{ hr} = 207 \text{ kg}$$

50 % in solvent로 가정하면

tank 용량 = 414 liter = 109 gal.

Cost index를 적용하면(ref. 46),

$$\$500 \times \frac{428}{107.7} = 1987 \$ = 1,650,000 \text{ 원}$$

#### 9) AOT pump

유량 8.6 x 2 liter/hr = 0.08 gal/min.

head : 30 ft.

Cost index 를 적용하면(ref. 46),

$$\$210 \times \frac{428}{107.7} = 835 \$ = 690,000 \text{ 원}$$

#### 10) AOT-isooctane mixing tank

1 l AOT isooctane 은 860 ml purified enzyme solution에 해당하므로

$$\frac{152 \text{ kg}}{\text{hr}} \left| \frac{1 \text{ l of purified enzyme}}{1 \text{ kg}} \right| \frac{1 \text{ l of AOT isooctane solution}}{0.86 \text{ of purified enzyme}}$$

$$= 176 \text{ l AOT-isooctane/hr}$$

day tank 기준

$$\therefore \text{용량} = 176 \text{ l/hr} \times 24 = 424 \text{ liter}$$

$$\therefore \text{용량} = 176 \text{ l/hr} \times 24 = 424 \text{ liter} \approx \frac{4.22 \text{ m}^3}{\text{m}^3} \left| \frac{264.2 \text{ gal}}{\text{m}^3} \right.$$

같은 cost index 적용하면(ref. 46)

$$1200 \times \frac{428}{107.7} = 4768.8 \text{ ₩} = 3,960,000 \text{ ₩}$$

#### 11) AOT-isooctane transfer pump

$$\text{유량} = \frac{176 \text{ l}}{\text{hr}} \left| \frac{1 \text{ gal}}{3.875 \text{ liter}} \right| \frac{1 \text{ hr}}{60 \text{ min}} = 0.775 \text{ gal/min}$$

$$\text{Head} = 10 \text{ m} \approx 30 \text{ ft}$$

같은 cost index 기준(ref. 46)

$$\$330 \times \frac{428}{107.7} = 1311.4 \text{ \$} = 1,090,000 \text{ ₩}$$

12) isooctane tank

1 ℓ AOT isooctane 은 860 ml purified enzyme solution에 해당하므로

$$\begin{array}{c|c|c} 152 \text{ kg} & 1 \text{ ℓ of purified enzyme} & 1 \text{ ℓ of AOT isooctane solution} \\ \hline \text{hr} & 1 \text{ kg} & 0.86 \text{ of purified enzyme} \end{array}$$

= 176 ℓ AOT-isooctane/hr

day tank 기준

∴ 용량 = 176 ℓ/hr x 24 = 424 liter

∴ 용량 = 176 ℓ/hr x 24 = 424 liter ≈  $\frac{4.22 \text{ m}^3}{\text{m}^3} \mid 264.2 \text{ gal}$

같은 cost index 적용하면(ref. 46),

$$1200 \times \frac{428}{107.7} = 4768.8 \text{ ₩} = 3,960,000 \text{ ₩}$$

13) isooctane pump

$$\text{유량} = \frac{176 \text{ ℓ}}{\text{hr}} \mid \frac{1 \text{ gal}}{3.775 \text{ liter}} \mid \frac{1 \text{ hr}}{60 \text{ min}} = 0.775 \text{ gal/min}$$

Head = 10 m ≈ 30 ft

같은 cost index 기준 (ref. 46),



$$\$330 \times \frac{428}{107.7} = 1311,4 \$ = 1,090,000 ₩$$

14) 1st mixer feed pump

$$\text{유량} = \frac{176 \ell}{\text{hr}} \left| \frac{1 \text{ gal}}{3.875 \text{ liter}} \right| \frac{1 \text{ hr}}{60 \text{ min}} = 0.775 \text{ gal/min}$$

$$\text{Head} = 10 \text{ m} \approx 30 \text{ ft}$$

같은 cost index 기준 (ref. 46),

$$\$330 \times \frac{428}{107.7} = 1311,4 \$ = 1,090,000 ₩$$

15) 1st mixer

교반시간 30분 기준

$$\text{flow in} = \frac{176 \ell}{\text{hr}} (\text{crude extract}) + \frac{176 \ell}{\text{hr}} (\text{AOT-isooctane})$$

$$= \frac{352 \text{ l}}{\text{hr}}$$

$$\therefore \text{capacity} = \frac{352 \text{ l}}{\text{hr}} \times 0.5 \text{ (hr)} = 176 \text{ l} \approx 46.5 \text{ gal}$$

AOT isooctane mixing tank 3,960,000 ₩ (1115 gal) 기준

Six-tenths factor rule 적용

$$3,960,000 \times \left(\frac{46.5}{1115}\right)^{0.6} = 590,000 \text{ ₩}$$

#### 16) 1st settler

residence time을 2 일을 기준으로 하면

$$\text{용량} = \frac{352 \text{ l}}{\text{hr}} = 8448 \text{ l} = 2232 \text{ gal}$$

같은 cost index 적용 (ref. 46),

$$\$2,000 \times \frac{428}{107.7} = 7948 \$ \approx 6,600,000 \text{ ₩}$$

#### 17) 2nd mixer feed pump

$$\text{유량} = \frac{152 \text{ kg}}{\text{hr}} \left| \frac{1 \text{ l of purified enzyme}}{1 \text{ kg}} \right| \frac{0.81 \text{ l of AOT}}{0.86 \text{ l of purified enzyme}}$$

$$= 143 \text{ l/hr} = 0.63 \text{ gal/min}$$

head= 10 m = 30 ft

같은 cost index 적용(ref. 46),

$$\$210 \times \frac{428}{107.7} = 835 \$ \approx 690,000 \text{ ₩}$$

### 18) NaCl solution tank

day tank 기준

$$\text{용량} = \frac{143}{\text{hr}} \times 24 \text{ hr} = 3432 \text{ l} \approx 907 \text{ gal}$$

같은 cost index 적용(ref. 46),

$$\$907 \times \frac{428}{107.7} = 3,604 \$ \approx 3,000,000 \text{ ₩}$$

### 19) NaCl transfer pump

$$\text{유량} = \frac{152 \text{ kg}}{\text{hr}} \left| \frac{1 \text{ l of purified enzyme}}{1 \text{ kg}} \right| \frac{0.81 \text{ l of AOT}}{0.86 \text{ l of purified enzyme}}$$

$$= 143 \text{ l/hr} = 0.63 \text{ Gal/min}$$

head= 10 m = 30 ft

같은 cost index 적용(ref. 46),

$$\$210 \times \frac{428}{107.7} = 835 \$ \approx 690,000 ₩$$

20) 2nd mixer

교반시간 30분

$$\text{flow in} = \frac{143 \ell}{\text{hr}} + \frac{143 \ell}{\text{hr}} = \frac{286 \ell}{\text{hr}}$$

$$\text{capacity} = \frac{286 \ell}{\text{hr}} \times 0.5 = 143 \ell \approx 38 \text{ gal}$$

six-tenth factor rule 적용

$$3,960,000 \times \left( \frac{38}{115} \right)^{0.6} = 520,000 \text{ 원}$$

21) 2nd settler

residence time 2day 기준

$$\text{용량} = \frac{143 \ell}{\text{hr}} \times 48 = 6864 \ell = 1814 \text{ gal}$$

같은 cost index 적용(ref. 46),

$$\$1700 \times \frac{428}{107.7} = 6,756 \$ \approx 5,610,000$$

22) recycle pump

$$\text{용량} = \frac{286}{\text{hr}} - \frac{152}{\text{hr}} = \frac{134 \text{ l}}{\text{hr}} = 0.59 \text{ gal/min}$$

head : 10 m = 30 ft

cost of pump = 210 \$

같은 cost index 적용(ref. 46),

$$210 \$ \times \frac{428}{107.7} = 835 \$ \approx 690,000 ₩$$

23) concentrator feed pump

$$\text{용량} = \frac{152 \text{ l}}{\text{hr}} = 0.67 \text{ gal/min, head} = 10 \text{ m} = 30 \text{ ft}$$

cost of pump = 210 \$

같은 cost index 적용(ref. 46) = 690,000 ₩

24) ultrafiltration concentrator

$$\frac{152 \text{ l}}{\text{hr}} \times 24 \text{ hr} = 3,648 \text{ liter} = 963 \text{ gal}$$

cost = 130 \$ (cartridge type)

$$130 \$ \times \frac{428}{107.7} = 516 \$ = 430,000 ₩$$

25) vacuum pump(p 117 of ref 3)

evaporative capacity of tunnel dryer

0.3 lb water/hr/ft<sup>2</sup>

$$\frac{152 \text{ kg}}{\text{hr}} \left| \frac{1 \text{ lb water}}{0.434 \text{ kg}} \right| \left| \frac{(\text{hr} \cdot \text{ft}^2)}{0.3 \text{ lb water}} \right| = 1116 \text{ ft}^2$$

1116

$$\text{cost} : 20,000 \left( \frac{\quad}{1000} \right)^{0.6} = 21,361 \$$$

같은 cost index 적용(ref. 46),

$$21,361 \$ \times \frac{428}{107.7} = 84,888 \$ \approx 73,000,000 ₩$$

26) Estimation of fixed capital investment by percentage of delivered equipment cost (ref. 46),

Components	Cost
purchased equipment (delivered), E	139,940,000
purchased equipment installation 39% E	54,580,000
Instrumentation(installed), 28 % E	39,180,000
Piping(installed), 31 % E	43,380,000
Eletrical (installed) 10 % E	13,940,000
Building(including service) 22% E	30,790,000
Yard improvementes 10 % E	13,990,000
Service facilities(installed) 55 % E	76,970,000
Land 20 % E	27,990,000
	<hr/>
Total direct plant cost D	440,810,000
Engineering and supervision 32 % E	44,780,000
Construction expenses 34 % E	47,580,000
	<hr/>
Total direct and indirect cost (D+I)	533,170,000
Contractor's fee, 5 % (D+I)	26,650,000
Contingency, 10 % (D+I)	53,320,000
	<hr/>
Fixed-capital investment	613,150,000

3. 총생산비의 산정 (Estimation of total production cost)

1) direct production lost

① raw material cost/kg of enzyme

a) chinese cabbage

$$\frac{500 \text{ ₩}}{\text{kg}} \quad [ \text{1인 하루 인건비 40,000 ₩ 기준 1일 채취량 80 kg} ]$$

71 kg of chinese cabbage	500 ₩	= 233 ₩/kg
152 kg of enzyme	kg cabbage	

b) NaCl

1 l enzyme	500 l of 1 M NaCl	+	1 l enzyme	0.81 l of 1 M NaCl
kg enzyme	0.86 l enzyme (for forward transfer)		kg enzyme	0.86 l enzyme (for backward transfer)

$$= \frac{1.52 \text{ l of 1M NaCl}}{\text{kg}} \text{ 가 필요}$$

NaCl의 비용은

1.52 mole	58.4 g	1 kg	18000 ₩
kg	1 mole NaCl	1000 g	1 kg .



$$= \frac{1600 \text{ ₩}}{\text{kg}} \text{ for crude extract}$$

c) Isooctane

1 l enzyme	1 l of isooctane	86,000 ₩	=	100,000 ₩
kg enzyme	0.86 l enzyme	1 l		1 l

isooctane은 일부 회수해서 사용하고 20%정도가 손실된다면

$$\frac{20,000}{\text{kg}} \text{ ₩}$$

d) AOT

8.642 kg AOT	1 l AOT Solution(10%)	80,000 ₩	=	45,484 ₩
152 kg enzyme	0.1 kg AOT	1 l		kg

total raw materials = 67,317 원 / kg

② Operating labor

operator 2인 기준

$$\frac{\text{hr}}{152 \text{ kg}} \left| \frac{10000 \text{ ₩}}{\text{hr}} \right| \frac{2 \text{ 인}}{\text{hr}} = \frac{132 \text{ ₩}}{\text{kg}}$$

③ Supervisory and clerical labor

Operating cost의 20 %

$$\therefore \frac{26}{\text{kg}} \text{ ₩}$$

④ Utilities

power

refrigeration unit 10 Kw

Pumps 0.05 hp x 9 unit = 0.45 hp = 0.34 Kw

total 10.34 x 1.25 (contingency factor) = 13 Kw

$$\therefore \frac{13 \text{ Kw-hr}}{152 \text{ Kg}} \left| \frac{80 \text{ ₩}}{\text{Kw-hr}} \right| = \frac{7 \text{ ₩}}{\text{kg}}$$

water

$$\frac{1 \text{ l enzyme}}{\text{kg enzyme}} \left| \frac{1.56 \text{ l of isooctane}}{0.86 \text{ l enzyme}} \right| =$$

$$\frac{1.8 \text{ l enzyme}}{\text{kg enzyme}} \mid \frac{1 \text{ m}^3}{1000 \text{ l}} \mid \frac{300}{\text{m}^3} = \frac{0.54 \text{ ₱}}{\text{kg}}$$

⑤ Maintenance and repairs

10 % of FCI

$$\frac{61,315,000 \text{ ₱}}{1000 \text{ ton}} \mid \frac{1 \text{ ton}}{1000 \text{ kg}} = \frac{61 \text{ ₱}}{\text{kg}}$$

⑥ Lab charge

$$20 \% \text{ of operating labor} = \frac{26 \text{ ₱}}{\text{kg}}$$

⑦ Total direct production cost

$$\frac{67,570 \text{ ₱}}{\text{kg}}$$

2) Fixed charges

① depreciation 10% FCI

$$\frac{61,315,000 \text{ 원}}{1000 \text{ ton}} \Bigg| \frac{1 \text{ ton}}{1000 \text{ kg}} = \frac{61 \text{ 원}}{\text{kg}}$$

② Tax 5 % FCI

$$\frac{30,657,500}{1000 \text{ ton}} \Bigg| \frac{1 \text{ ton}}{1000 \text{ kg}} = \frac{31 \text{ 원}}{\text{kg}}$$

③ Insurance 1 % FCI

$$\frac{6 \text{ 원}}{\text{kg}}$$

$$\textcircled{4} \text{ Total Fixed Charge} = \frac{98 \text{ 원}}{\text{kg}}$$

3) Plant overhead costs

Overhead costs = 50 % operating labor + supervision + maintenance

$$= \frac{(132 + 26 + 61)}{\text{kg}} \times 0.5 = \frac{110 \text{ 원}}{\text{kg}}$$

4) Total manufacturing costs (A+B+C)

$$\frac{67,570 + 98 + 110}{\text{kg}} = \frac{67,778 \text{ 원}}{\text{kg}}$$

4. 경제성 검토 ( ROI, Rate of return on investment )

1) Annual profit

Sigma peroxidase type VI 가격을 적용하면

net sale은

1000 ton enzyme solution	1000 kg	1 l	40 mg	176 \$	830 원
year	1 ton	1 kg	0.86 liter	100 mg	1 \$

= 67,944,186,000원

production cost

65,778원	1000kg	1000 ton	= 6,777,800,000 원
kg	1 ton	year	

net profit = 67,944,186,000 - 67,778,000,000 = 166,186,000 원

## 2) Return on investment

$$\frac{166,186,000}{613,150,000} \times 100 = 27 \%$$

## 3) Economic feasibility

ROI 가 27 %로서 은행 이자율의 2배 이므로 충분히 실용화 가치가 있다고 판단되나 효소 판매가, 원료비 등의 가격 변동에 따라 사업성의 변화 폭이 있을 것으로 예측된다.

# 제 6 장

## 총괄 결론

현재 국내에서 막대하게 생산되나 적절한 용도가 없어 그냥 버려지는 배추 뿌리를 가공하여 고부가 가치의 산물, 즉 高價의 효소인 POX를 대량생산 할수 있는 방법을 체계화 하고 이를 Scale-up하여 산지 가공 공장 형태의 소규모 가공 공장으로 발전시키기 위하여 효소의 생산을 위한 대량 처리의 기본적인 조건을 확립하였으며 이를 근거로 소규모 산지 가공 공장 설립을 위한 분리 공정의 설계, 공장설립을 위한 비용을 추산하였다. 아울러 생산된 효소의 용도 개발을 위해 응용성등을 검토하였으며 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 효소의 대량 정제를 위하여 열처리, DEAE-Cellulose batch처리, 등전점 처리 등 기초적인 사항을 검토 하였으나 대량처리에는 비효율적인것으로 판단되었다.

2. 효소 생산의 일환으로 AOT reverse micelle system을 이용한 대량 정제 조건 검토를 검토하였으며 매우 효율적인 system으로 판정이 되었다.

3. 즉, 배추 뿌리로 부터 POX를 정제하기 위한 최적 AOT reverse micelle system 은 다음과 같다. 수용액층에 함유되어 있는 POX를 유기용매층으로 선택적으로 전이시키기 위하여 110 mM AOT를 함유한 isooctane 1 volume에 대하여 30 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl을 함유한 crude extract를 1 volume 가하여 진탕하여 forward transfer를 한다. Forward transfer에 의해 얻어진 현탁액을 원

심분리하여 AOT reverse micelle이 함유된 isooctane층을 분리한후 backward transfer를 한다. Backward transfer는 80 mM Tris-HCl(pH 7.0), 1 M KCl로 구성된 수층을 isooctane층과 같은 양(1/1, v/v) 가하고 forward transfer와 마찬가지로 교반과 원심분리를 하여 이루어 진다. 원심분리후 수층으로 transfer된 효소액을 분리하므로서 AOT reverse micelle을 이용한 1차 정제가 끝난다. 이 과정을 통하여 비활성도가 20배 증가하였으며 60% 의 높은 수율로 정제가 가능하였다.

4. AOT reverse micelle system으로 부터 얻은 부분 정제 효소액을 10 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 대하여 하룻밤 투석한 후 DEAE-Toyopearl column chromatography로 더욱 정제를 행하였으며 chromatography를 통하여 비활성도는 93배 증가하였으며 40%의 수율로 고도 정제가 가능하였다. AOT reverse micelle system과 DEAE-Toyopearl column chromatography를 이용한 본 과정을 이용하면 배추 뿌리의 파쇄로 부터 고도 정제 효소의 생산까지 20시간 이내의 짧은 시간에 끝낼 수 있어 실제적인 생산 과정에의 적용에 유리할 것으로 판단되고 있다.

5. POX의 산업적 이용성을 검토하기 위하여 조효소액을 이용하여 효소적 염색, 향균성 물질의 생산, 폐놀성 폐수의 효소적 처리 등에 적용하였다.

6. 효소적 염색을 통한 갈옷 대체 품의 개발을 목적으로 POX를 염색에 이용하였다. Guaiacol, catechol, pyrogallol등 사용한 기질의 종류에 따라서 나타내는 색깔이 각각 달랐으며 천의 종류에 따라서도 다른 색깔을 나타내었다. 나타난 색상은 갈 옷의 색상과 같은 느낌을 주는 중간색의 은은한 색상을 나타내어 실용적으로 응용될 수 있음을 보여주었다.

7. 향균성 물질의 효소적 합성을 위한 효소원으로서 배추 뿌리 기원 POX를 사용할 경우 기질로서 phenol 또는 guaiacol 과 aminoantipyrine을 사용할 때 가장 활



성이 높은 물질이 합성되었다. 반응이 진행됨에 따라 생성되는 항생물질의 항균성 변화를 관찰하기 위하여 반응 시간별로 각각의 세균에 대한 감수성의 변화를 관찰하였다. 그 결과 반응 시간에 검정 균의 감수성 따라 조금씩의 차이는 있었으나 효소 반응 시간이 1분에서 60분 사이에서 항균성 물질의 생성이 많음을 나타내었다.

8. 배추 뿌리를 착즙기를 이용하여 효소를 추출하였을 경우 전체의 POX활성중 pulp에도 상당량 남아 있으므로 이를 이용할 방안으로 air lift reactor를 운전하여 유독성 화합물인 2,4-dichlorophenol(DCP)의 제거에 적용하였다. Air lift reactor에 pulp 30g을 가한 1,200 ml의 반응액을 37℃, pH 8.0의 반응 조건으로 유지하며 3시간 반응시켰다. 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1시간 동안 0.034 mM/min로 peristaltic pump를 이용하여 연속 주입하였다. 그 결과 반응 초기의 110 ppm의 DCP가 POX를 이용한 3시간의 반응후 6 ppm으로 감소하였다. 반응이 개시되고 15분 지난 후 80%가량의 DCP가 제거되었고 1시간 전후로 효소적 반응이 종결됨을 알 수 있다. 본 연구 결과와 1년 차 연구 결과와 종합하여 보면 배추 뿌리의 효소 추출 잔사인 pulp에 잔존하는 POX는 phenol 및 DCP와 같은 여러 가지 phenol성 화합물의 제거에 충분히 이용될 만한 가치가 있다는 것을 나타내었다. 본 법은 여러 학자들에 의해 꾸준히 시도되어 왔으나 기존 효소의 가격이 비싸 실용화에 큰 걸림돌이 되어 왔으나 본 연구에서는 현재까지 제공된 어떠한 효소보다도 값이 저렴한 재료를 사용하므로써 실용화에 가장 접근이 되어 있다고 할 수 있다.

9. 고도 정제 POX의 이용성 검토하기 위하여 시판의 것과 본 연구에서 정제한 효소를 이용하여 cholesterol 정량에 적용하였다. 그 결과, cholesterol의 농도가 증가함에 따라 시판의 POX와 흡광도의 증가 속도가 같아 배추 뿌리 기원의 효소가 임상 분석용 시약으로서도 충분히 사용될 수 있음을 보여 주었다. 이와는 별도로 과산화수소 또는 phenol의 정량에의 이용성을 검토한 결과도 마찬가지로 좋은 적용성을 나타내었다.

10. 본 연구에서 설정된 AOT reverse micelle을 이용한 POX의 대량 생산을 위한 최적화 과정을 중심으로 하여 산지 가공 공장 규모의 효소 생산 공장의 설립을 위한 분리공정을 설계하였다.

11. 본 연구에서 제시된 효소의 생산 공정을 토대로 scale up을 통한 공장 설립시 소요되는 시설의 규모와 금액을 산출하여 공장 설립에 따른 기초 자료를 구축하였다.

12. 공장 설립시 소요되는 시설의 규모와 금액으로 부터 이 공정을 통하여 생산되는 효소의 경제성을 평가한 결과 ROI 가 27 %로서 은행 이자율의 2배 이므로 충분히 실용화 가치가 있다고 판단되나 효소 판매가, 원료비 등의 가격 변동에 따라 사업성의 변화 폭이 있을 것으로 예측되었다.

## 참 고 문 헌

1. S. F. Matzke, A. L. Creagh, C. A. Haynes, J. M. Prausnitz and H. W. Blanch(1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 91.
2. S. Barbaric, P. L. Luisi (1981), *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 4239.
3. D. Bratko, A. Luzar (1988), *Bioelectrochem. Bioeng.*, **20**, 291.
4. D. Bratko, A. Luzar (1988), *J. Chem. Phys.*, **89**, 545.
5. M. Caselli, M. Maestro, and G. Morea (1988), *Biotechnol. Prog.*, **4**(2),102.
6. M. Dekker, K. Van't Riet, S. R. Weijers and Baltussen (1986), *Chem. Eng. J.*, **33**, B27.
7. P. D. I. Fletcher, A. M. Howe, N. M. Perrins, and B.H. Robinson (1984), *Plenum. New York*.
8. K. E. Goklen, T. A. Hatton (1985), *Biotechnol. Prog.*, **1**, 69.
9. K. E. Goklen, T. A. Hatton (1987), *Sep. Sci. Technol.*, **22**, 831.
10. T. A. Hatton (1989), Marcel Dekker, *New York.*, 55.
11. M. E. Leser, G. Wei, P. L. Luisi, and M. Maestro (1986), *Biophys. Res. Commun.*, **135**, 629.
12. M. E. Leser, G. Wei, P. L. Luisi, and M. Maestro (1987), *J. Chim. Phys. Physicochim. Biol.* **84**(9), 1113.
13. S. S. Suh and F. H. Arnold (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 682.
14. S. S. Suh, B. L. Haymore and F. H. Arnold (1991), *Protein Eng.*, **4**, 301.
15. G. E. Wuenschell, E. Naranjo and F. H. Arnold (1990), *Bioprocess Eng.*, **5** 199.

16. S. D. Flanagan, and S. H. Barondes (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1484.
17. M. E. Leser and P. L. Luisi (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1140.
18. K. L. Kadam (1986), *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 266.
19. Manual of Pharmacia, Laboratory Separation Division (1987).
20. Bio-Rad Laboratory, Bulletin (1984), **1069**.
21. D. W. Armstrong and W. Li.(1986) *Anal. Chem.*, **60**, 86.
22. H. Walter, G. Johansson (1986), *Anal. Biochem.*, **155**, 215.
23. A. Veide, I. Strandberg, S. O. Enfors (1987), *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 730.
24. P. L. Luisi, M. P. Pileni, M. Giomin, B. H. Rovinson (1988), *Biochim. Biophys. Acta*, **947**, 209.
25. A. V. Levashov, Yu. L. Khmel'nitsky, N. L. Klyachko, V. Ya. Chernyak, and K. Martinek (1982), *J. Coll. Int. Sci.*, **88(2)**, 444.
26. S. L. Neidleman, J. Geigert, John Wiley and Sons (1986), *Inc. New York.*, **24**, 40.
27. K. S. Park (1992), *A master's thesis*
28. Y. M. Kim, D. H. Han, Y. H. Jeomg, S. Y. Lee and H. I. Rhee (1995), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 335
29. Sosaku Ichikawa, Masanao Imai, and Masaru Shimizu (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 20.
30. M. E. Leser, P. L. Luisi, and S. Palmieri (1989), *Biotech. Bioeng.*, **34**, 1140.
31. J. M. Woll, T. A. Hatton, and M. L. Yarmush (1989), *Biotech. Prog.*, **5**, 57.
32. J. Eastoe, G. Fragneto, B. H. Robinson and T. F. Towey (1992), *J. Chem. Soc. Trans.*, **88**, 461.

33. H. Wennerstrom , A. Khan and Lindman (1991), *Adv. Colloid Interface Sci.*, **34**, 433.
34. A. K. George and H. Helmut (1992), *Chem. Engien. Soc.*, **47**, 99.
35. M. Dekker, R. Hilhorst and C. Laanne (1989), *Analyt. Biochem.*, **178**, 217.
36. J. M. Woll, T. A. Hotton and M. L. Yarmush (1989), *Biotechnol. Prog.*, **5**, 57.
37. H. Hauser, G. Haering, A. Pande and P. L. Luisi (1989), *J. Phys. Chem.*, **93**, 7869.
38. E. G. Finer, A. Darke (1974), *Chem. Phys. Lipids.*, **12**, 1.
39. S. F. Matzke, A. L. Creagh, C. A. Haynes, J. M. Prausnitz and H. W. Blanch (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 91.
40. S. Barbaric, P. L. Luisi (1981), *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 4239.
41. D. Bratko, A. Luzar (1988), *Bioelectrochem. Bioeng.*, **20**, 291.
42. D. Bratko, A. Luzar (1988), *J. Chem. Phys.*, **89**, 545.
43. M. Caselli, M. Maestro, and G. Morea (1988), *Biotechnol. Prog.*, **4(2)**, 102.
44. M. Dekker, K. Van't Riet, S. R. Weijers and Baltussen (1986), *Chem. Eng. J.*, **33**, 27.
45. P. D. I. Fletcher, A. M. Howe, N. M. Perrins, and B.H. Robinson (1984), *Plenum. New York*, **2**, 153.
46. M. S. Peters, K. D. Timerhaus, " Plant Design and Economics for Chemical Engineers", McGraw-Hill, New York.
47. Staff of Chemical Engineering "Modern Cost Engineering Methods & Data", McGraw-Hill, New York.
48. P. A. Belter, E. L. Cussler, W. S. Hu " Biosperations", John Wiley & Sons, New York.
49. P. Fellow, " Food Processing Technology - Principles and Practice", VCH.