

제1차년도
년차보고서

배추 뿌리로 부터 유용 효소의 생산

Production of Useful Enzymes from Chinese Cabbage Roots

연구 기관
강원대학교

농림수산부



제 출 문

농림수산부 장관 귀하

본 보고서를 “배추뿌리로부터 유용 효소의 생산” 과제의 1년차 보고서로 제출합니다.

1995년 12월 일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 이 해 익

연구 원 : 정 연 호

 " : 박 광 순

 " : 이 병 길

 " : 박 영 훈

 " : 최 승 신

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 제거에의 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.

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 이용하고 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. 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

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구의 1차년도에 계획한 효소의 대량 생산에 관한 기초 기술 검토는 성공적으로 이루어 졌으며 2차 년도의 효소 생산 기술에 관한 연구가 완료되면 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

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	15
1.1 Research goal	15
1.2 Current research trends	18
1.3 Research objectives and scope	21
Chapter 2. Investigation of Enzyme Purification Conditions	23
2.1. Introduction	23
2.2. Materials and methods	24
1. Chinese cabbage	24
2. Facilities and Instruments	25
3. Reagents	26
4. Measurement of peroxidase activity	26
5. Disruption of Chinese cabbage roots	28
6. Electrophoresis	29
2.3. Results and Discussions	30
1. Investigation of efficient storage condition for Chinese cabbage roots	30
2. Elucidation of enzyme patterns and enzymatic characteristics between different cultivars of Chinese cabbage	33

3. Analysis of peroxidase characteristics between different cultivars of Chinese cabbage	41
4. Search for an efficient disruption method for Chinese cabbage roots	42
5. Establishment of extraction condition from disrupted debris	45
6. Selection of cultivar with most applicability	49

Chapter 3. Search for the Other Useful Enzymes Beside Peroxidase and Application of Peroxidases . . . 50

3.1. Introduction	50
3.2. Materials and methods	53
1. Reagents	53
2. Enzymes	53
3. Measurement of peroxidase activity	54
4. Incubation of <i>Erwinia carotovora</i>	54
5. Treatment of Elicitor	55
6. Airlift reactor	55
7. Assay of phenol	57
8. Measurements of activities of other enzymes	57
3.3. Results and Discussions	60
1. Activity and distribution of peroxidase	60

2. Phenol removal by a batch reactor	63
3. Phenol removal by an air lift reactor	66
4. Changes of POX activity after infection of <i>Erwinia carotovora</i>	69
5. Induction of POX synthesis by Elicitor	69
6. Search for the other useful enzymes beside peroxidase	69
Chapter 4. The Quality Control in Peroxidase Productuion	71
4.1. Introduction	74
4.2. Materials and methods	75
1. Crude enzymes	75
4.3. Results and Discussions	77
1. Establishment of efficient analysis methods for the quality control of peroxidase	77
2. Establishment of optimum condition for the preservation and storage of peroxidase	80
3. Storage methods for partially purified peroxidase	84
Chapter 5. Conclusions	91

목 차

제 1 장	서론	15
	제 1 절 연구목적	15
	제 2 절 지금까지의 연구 동향	18
	제 3 절 연구 목표 및 범위	21
제 2 장	효소의 정제조건 검토	23
	제 1 절 서 설	23
	제 2 절 재료 및 방법	24
	1. 배추	24
	2. 사용기기	25
	3. 시약	26
	4. POX의 활성 측정	26
	5. 배추 뿌리의 파쇄	28
	6. 전기 영동	29
	제 3 절 결과 및 고찰	30
	1. 배추 뿌리의 효율적 저장조건 검토	30
	2. 배추 품종간 효소 pattern 및 특성 규명	33
	3. 품종간 POX 특성 분석	41
	4. 배추 뿌리의 효율적 파쇄 방법	42
	5. 파쇄물로부터 효소의 효율적 추출조건 확립	45

6. 이용성이 높은 품종의 선정	49
제 3 장 Peroxidase이외의 유용효소 활성 검색 및 응용	50
제 1 절 서 설	50
제 2 절 재료 및 방법	53
1. 시약	53
2. 효소	53
3. POX의 활성측정	54
4. <i>Erwinia carotovora</i> 의 배양	54
5. Elicitor 처리	55
6. Air lift reactor	55
7. Phenol의 정량	57
8. 기타 효소의 활성 측정	57
제 3 절 결과 및 고찰	60
1. POX의 활성 및 분포	60
2. Batch reactor를 이용한 phenol의 제거	63
3. Air lift reactor에 의한 phenol의 제거	66
4. <i>Erwinia carotovora</i> 감염후 POX 활성의 변화	69
5. Elicitor를 이용한 POX의 합성 유도	69
6. POX이외의 효소의 활성 검색	71
제 4 장 효소의 Quality Control	74
제 1 절 서 설	74
제 2 절 재료 및 방법	75
1. 조효소	75

제 3 절	결과 및 고찰	77
1.	효소 Q.C.를 위한 효과적인 분석법 확립	77
2.	효소의 저장, 보관 조건 확립	80
3.	부분 정제 효소의 저장 방법	84
제 5 장	총괄 결론	91

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 제거에의 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 제시한 바 있다. 배추 뿌리 기원의 POX는 넓은 작용 pH 및 비교적 높은 열 안정성을 나타내어 산업적 이용 가능성은 매우 높은 것으로 판명이 되었다.

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 이용하고 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 Sigma사에서 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 계

속 확대될 전망이다. 이러한 커다란 시장 중에서 큰 부분을 차지하는 효소는 정제도가 낮은 공업용 효소이다. 현재 국내에서 생산되는 효소의 대부분은 식품공업용, 세제용 효소등 공업용 효소가 근간을 이루고 있으나 전세계 효소류 시장에서 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(평균 중량 15 g)당 200 unit 전후의 POX가 추출되고 있다. 따라서 배추 뿌리의 자원화는 농가의 소득과 직접적으로 연결될수 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 biomass로부터의 잠재 생산성은 막대한 것으로 이를 효율적으로 이용하여 자원화시키는 것은 우리나라와 같이 자원 자급율이 극히 낮은 환경에서는 매우 중요하

고도 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 기후 등의 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 산물로 의 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 검토 되어 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. POX를 이용한 폐수 처리의 또 다른 연구로는 pulp공장 폐수 중의 저분자 색소의 탈색을 시도하여 과산화수소만을 이용한 탈색보다 60% 이상의 탈색도를 이룬바 있다.

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°C에서 최적 활성을 나타내었다. 정제된 배추 뿌리 기원의 효소는 native polyacrylamide gel electrophoresis에서 horseradish와 같은 전기 영동적 특성을 나타내었고 Ouchterlony immunodiffusion법으로 면역학적 유사성을 검토한 결과 horseradish POX에 대한 항혈청과 침강선을 형성하여 면역학적 성질이 horseradish 기원의 효소와 유사함을 밝혔다. 또한 배추 뿌리 기원의 효소는 넓은 작용 pH및 비교적 높은 열 안정성을 나타내어 산업적 이용 가능성은 매우 높은 것으로 판명이 되었다. (이 해익, 박 경숙, 최 용순, 이

상영. (1991) 배추 뿌리 기원 Peroxidase의 정제 및 성질, 한국 산업 미생물학회지, 19, 470-476)

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 나타났다. 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 환경청으로 부터 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.

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 효소 가격이 실용화의 가장 큰 걸림돌이 되고 있다고 기술하고 있다. 현재 POX의 세계 시장의 주종은 horseradish이나 아직도 높은 가격의 벽을 넘어 서지 못하고 있는 실정이다. 이는 효소원이 재배를 하여

확보 할수 있는 작물이기 때문에 효소 가격에서 효소원으로서 horseradish의 가격이 차지하는 비중이 아직도 크기 때문이다.

제 3 절 연구 목표 및 범위

1. 최종 연구 개발 사업 목표

막대한 생산성을 갖는 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 발전시킨다.

2. 당해년도 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 추출방법의 설정이 필요하다. 이를 위해서 1년차 연구에서는 다음과 같은 연구 범위를 설정하고 연구를 추진하였다.

3. 연구의 범위 및 내용

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

제 2 장

효소의 정제 조건 검토

제 1 절 서 설

적절한 효소 또는 단백질 공급원이 결정되면 목적 단백질을 분리하는데 필요한 적절한 downstream process를 디자인 할 필요가 있다. Downstream process에는 출발 재료로부터 단백질의 정제 뿐 아니라 quality control을 위한 검증, 최종 생산물의 안정화, 일정 기간동안의 활성 유지, 적당한 형태로의 포장등을 위한 여러 조치 들이 포함이 된다. Downstream process상의 여러 조치들을 하기 위하여는 단백질 생산에 관련된 여러가지 기초적인 사항들이 구명되어야 한다.

배추는 년중 생산이 되는 것이 아니고 생산 지역 마다 계절적으로 출하되기 때문에 수확한 배추 뿌리를 효율적으로 관리하고 또한 효율적으로 추출하여 배추 뿌리의 이용성을 극대화 시킬 필요가 있다. 따라서 본 장에서는 효소의 정제에 관련한 다음과 같은 기초적인 사항을 검토하였다.

1. 수확한 뿌리를 효과적으로 이용하기 위하여 산지 가공 공장 규모에서 저장할수 있는 조건, 즉, 냉동, 냉장, 실온 보관, 동결건조등의 조건이 효소 활성에 미치는 영향을 검토하였다.

2. 배추의 품종은 매우 다양하여 현재 시중에서 판매되고 있는 것만 하여도 30여종을 상회하고 있다. 배추의 품종간에는 상이한 POX isozyme이 존재 가능하므로 균일한 효소를 생산 하기 위하여는 이들의 isozyme분포를 비교하여 볼 필요가 있다. 이러한 목적으로 고냉지, 춘하

왕, 정상, 장수여름, 신화왕, 신춘1호, 미원여름, 고냉지여름, 속성얼갈이, 노랑봄, 탐복, 삼미, 만점 등 10여종의 배추를 품종별로 50 - 60 일간 재배하여 isozyme의 분포 양상을 검토하였다.

3. 배추 뿌리로 부터 효율적으로 POX를 추출하기 위하여 여러가지 파쇄기기를 이용하여 배추 뿌리의 파쇄 방법을 비교하였다. 4. 효소를 파쇄한 배추뿌리로 부터 효율적으로 추출하기 위하여 파쇄한 배추 뿌리를 물, 완충 용액, 염용액, 유기용매, 계면활성제 등을 이용하여 추출을 하여 추출된 효소의 총 활성을 비교하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 배추

1995년 5월부터 7월까지 춘천시 사우동에서 재배한 고냉지, 춘하왕, 정상, 장수여름, 신화왕, 신춘1호, 미원여름, 고냉지여름, 속성얼갈이, 노랑봄, 탐복, 삼미, 만점 등 13종의 봄배추 및 1995년 9월부터 11월까지 춘천시 서면 방동리에서 재배한 가락신 1호, 정1품, 청원, 탐복, 만추, 삼진, 복돌이, 뿌리배추, 월하, 서울배추, 신기원등 11종의 가을배추로부터 뿌리를 획득하였다. 채취한 뿌리는 즉시 세척하고 칼로 0.5 cm 정도의 크기로 잘라 혼합한후 5g을 취하여 유발에 넣고 sea sand 15g, 10 mM Tris-HCl(pH 7.0) 5 ml를 가하여 ice bath에서 마쇄하였다. 마쇄한후 4℃에서 10,000 x g로 원심분리한후 상등액을 취하여 조효소액으로 하였다.

2. 사용 기기

본 연구에서 사용한 기기는 다음의 표 1과 같다.

표 1. 본 연구에 사용한 기기 일람표

명 칭	용 도	제작사(국명)
냉동원심분리기	시료 조제	Beckman (독일)
미량원심분리기	"	한일원심기 (한국)
Spectronic 20	흡광도 측정	Milton Roy (미국)
Spectrophotometer	"	Hitachi (일본)
녹즙기(알트란)	세포 파괴	그린파워사 (한국)
전기맷돌	"	Omni사 (한국)
Polytron	"	Nissei (일본)
Mixer(multi cutter)	"	Matsushita Electric Co., (Japan)
Protean II	전기영동	Bio-Rad (미국)
Power Supply	"	" (")
Water bath	항온	Vision (한국)
pH meter	pH 측정	Horiba (Japan)

3. 시약

본 연구에 사용한 phenol, 4-aminoantipyrine, pyrogallol은 和光(東京, 日本)제품을, acrylamide, glycine, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)등은 Sigma(Mo, USA)제품을 이용하였으며 기타시약은 시판 특급시약을 이용하였다.

4. POX 의 활성 측정

표 2의 POX 활성 측정용 표준 반응액을 37°C에서 10분간 반응시킨 후 반응액에 absolute ethanol 2 ml을 가하여 반응을 정지시킨 후 효소에 의하여 생성된 quinoneimine의 붉은 색소의 양을 500 nm에서 정량하였다. POX 1 unit는 37°C에서 1분간 1 μ mole의 quinoneimine 색소를 생성 시키는데 필요한 효소의 양으로 하였으며 quinoneimine의 분자흡광계수 (12.2 /cm²/ μ mole)로 부터 생성된 색소의 양을 환산하였다. 반응 최적 pH는 각 pH범위에 해당하는 완충용액을 100 mM이 되게 가하여 위의 방법과 같게 측정하였다. 또한 반응 최적온도는 표준 반응액에서 반응 온도를 달리하여 측정하였다.

표 2. POX 활성 측정 표준 용액표

시 약	액 량(μ l)
20 mM H ₂ O ₂	300
20 mM Aminoantipyrine	300
20 mM Phenol	300
1 M Tris-HCl(pH 7.0)	200
Crude extract	100
Distilled water	800
Total Volume	2000

5. 배추 뿌리의 파쇄

가. Polytron

배추 뿌리를 약 2-3 mm 두께가 되게 잘게 자른후 뿌리 100g당 200 ml의 냉각한 10 mM Tris-HCl(pH 7.0)를 가하고 Polytron 에서 마쇄하였다. 마쇄조건은 시료를 넣은 beaker를 ice bath상에서 냉각하면서 1분간 마쇄, 1 분간 냉각을 반복하여 총 마쇄 시간이 5분이 되도록 하였다. 마쇄후 냉동 원심 분리기에서 10,000 g로 10분간 원심분리하여 상등액을 시료로 하였다.

나. 녹즙기

배추 뿌리를 3-4cm 크기로 대충 자른후 녹즙기로 착즙하였다. 착즙액은 그대로 효소원으로 사용하였다.

다. 믹서

배추 뿌리를 약 2-3 cm 두께가 되게 잘게 자른후 뿌리 100g당 200 ml의 냉각한 10 mM Tris-HCl(pH 7.0)를 가하고 믹서에서 마쇄하였다. 마쇄조건은 1분간 마쇄후 jar를 ice bath에서 1 분간 냉각하였으며 이를 반복하여 총 마쇄 시간이 5분이 되도록 하였다. 마쇄후 냉동 원심 분리기에서 10,000 g로 10분간 원심분리하여 상등액을 시료로 하였다.

라. 전기맷돌

배추 뿌리를 약 2-3 mm 두께가 되게 잘게 자른후 뿌리 100g당 200 ml의 냉각한 10 mM Tris-HCl(pH 7.0)를 가하여 부유시키면서 전기땀들의 투입구에 투입하여 마쇄하였다. 마쇄후 냉동 원심 분리기에서 10,000 g로 10분간 원심분리하여 상등액을 시료로 하였다.

마. 유발

뿌리를 0.5 cm정도의 크기로 자른후 100g당 sea sand 300g, 10 mM Tris-HCl(pH 7.0) 200 ml를 유발에 가하여 ice bath에서 마쇄하였다. 마쇄한후 4°C에서 10,000 x g로 원심분리한후 상등액을 취하여 시료로 하였다.

6. 전기영동

POX의 zymogram은 native polyacrylamide gel electrophoresis을 이용하였다. 효소의 활성염색은 전기 영동이 끝난 gel을 100 mM Tris-HCl (pH 7.0), 10 mM H₂O₂, 10 mM pyrogallol, guaiacol, 4-chloro-1-naphthol, ABTS, cathecol 등의 각종 기질 용액 속에 담그어 37°C에서 10분간 incubation하여 POX의 위치를 확인하였다. POX의 활성이 있는 부위는 착색이 되어 그 위치를 확인 할수 있다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 배추 뿌리의 효율적 저장 조건 검토

수확한 뿌리를 효과적으로 이용하기 위하여는 효과적인 뿌리의 저장 조건이 제시되어야만 한다. 따라서 산지 가공 공장 규모에서 저장할수 있는 조건을 검토하였다. 즉, 냉동, 냉장, 실온 보관, 동결건조등의 조건에서 채취한 뿌리를 저장하면서 그 효소 활성의 변화를 관찰하였으며 그 결과를 그림 1 에 나타내었다. 냉동의 경우 2개월 이상 활성의 커다란 변화 없이 보관을 할수 있었으나 4℃에서 냉장 보관 할 경우 3-4일의 단기 보관은 가능하였으나 10일 이후 부터는 조직의 부패가 시작되어 일주일 이상의 장기 보관 방법으로는 적합하지 않았다. 실온 보관의 경우 3-4일 후 부터 부패 및 조직의 연부가 시작되어 온도의 조절에 의한 저장 방법중 가장 나쁜 것으로 나타났다. 한편 채취후 즉시 동결 건조하여 실온 또는 냉장으로 보관할 경우 모두 동결건조에 의해 효소의 총 활성이상당히 수준으로 감소하였다(그림 2). 동결 건조의 경우 건조된 상태에서는 효소의 활성이 장기간 유지되는 이점은 있으나 동결 건조에 따른 총활성의 감소, 건조에 따른 새로운 시설 및 에너지의 추가 부담이 요구되므로 뿌리의 적절한 보존 방법으로 사용 되기에는 어려운 점이 많은 것으로 판단이 된다. 이상의 여러 조건을 검토하여 보면 뿌리 자체를 보관하기에는 냉동에 의한 방법이 가장 효율적인 것으로 검토되었다.

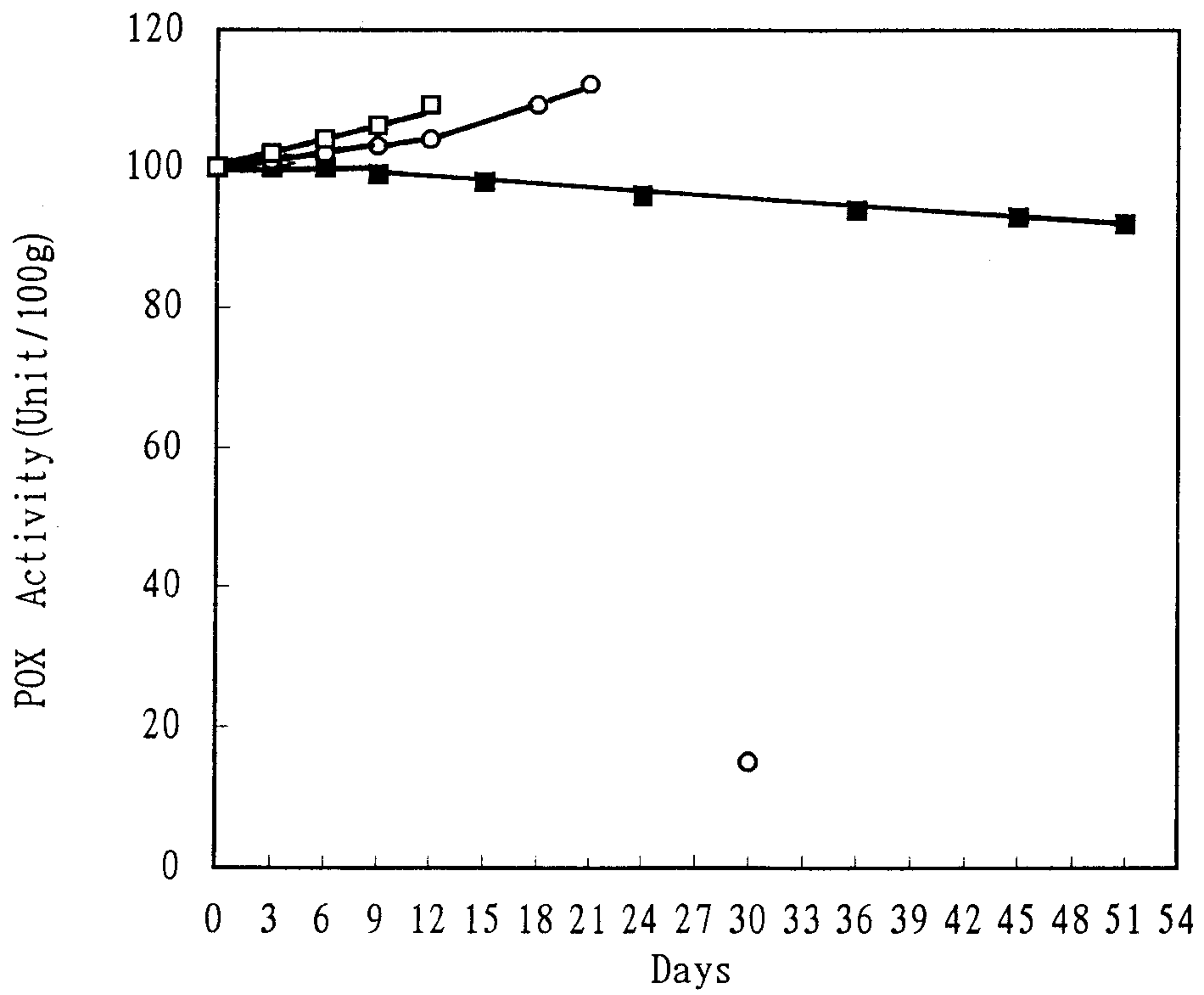


그림 1. 배추 뿌리의 저장 방법에 따른 Peroxidase의 활성 변화

■ : 냉동, ○ : 냉장, □ : 실온

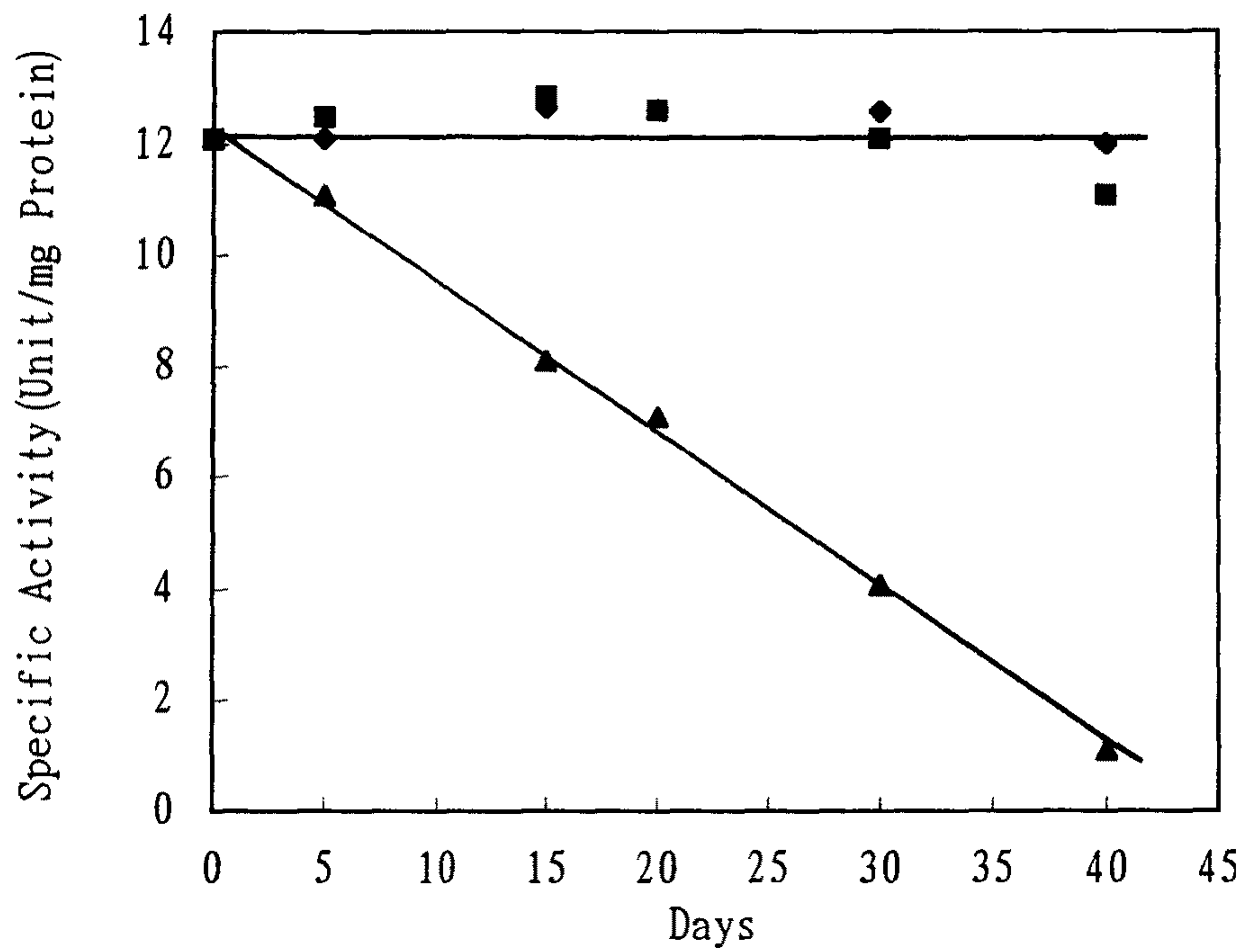


그림 2. 동결 건조한 배추뿌리의 저장 조건에 따른 Peroxidase의 활성 변화

◆ : 냉동, ■ : 냉장, ▲ : 실온

2. 배추 품종간 효소 pattern 및 특성 규명

배추의 품종은 매우 다양하여 현재 시중에서 판매되고 있는 것만 하여도 30여종을 상회하고 있다. 배추의 품종간에는 상이한 POX isozyme 이 존재 가능하므로 균일한 효소를 생산 하기 위하여는 이들의 isozyme 분포를 비교하여 볼 필요가 있다. 이러한 목적으로 고냉지, 춘하왕, 정상, 장수여름, 신화왕, 신춘1호, 미원여름, 고냉지여름, 속성얼갈이, 노랑봄, 탐복, 삼미, 만점, 가락신 1호, 정1품, 청원, 만추, 삼진, 복돌이, 뿌리배추, 월하, 서울배추, 신기원등 등 20여종의 배추를 품종별로 50 - 60 일간 재배하여 배추 뿌리를 획득하였다. 채취한 뿌리는 즉시 세척하고 칼로 0.5 cm 정도의 크기로 잘라 혼합한후 5g을 취하여 유발에 넣고 sea sand 15g, 10 mM Tris-HCl(pH 7.0) 5 ml를 가하여 ice bath에서 마쇄하였다. 마쇄한후 4°C에서 10,000 x g로 원심분리한후 상등액을 취하여 조효소액으로 하였다. Isozyme pattern분석은 7% polyacrylamide gel 상에서 전기영동을 하여 분리하였다. 전기영동이 끝난 gel은 pyrogallol, guaiacol, 4-chloro-1-naphthol, ABTS, cathecol 등을 기질로하는 반응용액에 담그어 POX 활성이 있는 곳을 검출하였다. Native PAGE에 의한 isozyme pattern의 변화를 실험한 결과의 일부는 그림 3 - 5에 나타내었다. 그림 3 - 5에서는 pyrogallol, guaiacol, 4-chloro-1-naphthol에 의한 활성 염색의 결과를 나타내고 있다. 한편 ABTS 및 cathecol을 기질로 한 activity staining에서는 반응 초기에는 활성을 나타내는 band가 나타나나 생성된 색소가 불안정하여 기록으로는 남길수가 없었다. 그림 3 - 5에서 나타나는 바와 같이 품종간의 POX활성분포는 조금씩 다르게 나타나고 있다. 전반적으로 주된 POX활성 band는 4-5개가 공통적으로 나타나고 있으며 1-2개의 isozyme변화가 인정되고 있다. 한편 주된 효소는 활성의 강약에

는 다소 차이는 나타나고 있으나 품종간의 변화폭은 크지 않은 것으로 나타났다. 이 결과로 부터 고도 정제를 위한 배추의 품종은 다소 제한이 될수 있으나 단순한 POX 활성을 이용하는 경우에는 품종간의 차이가 별 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

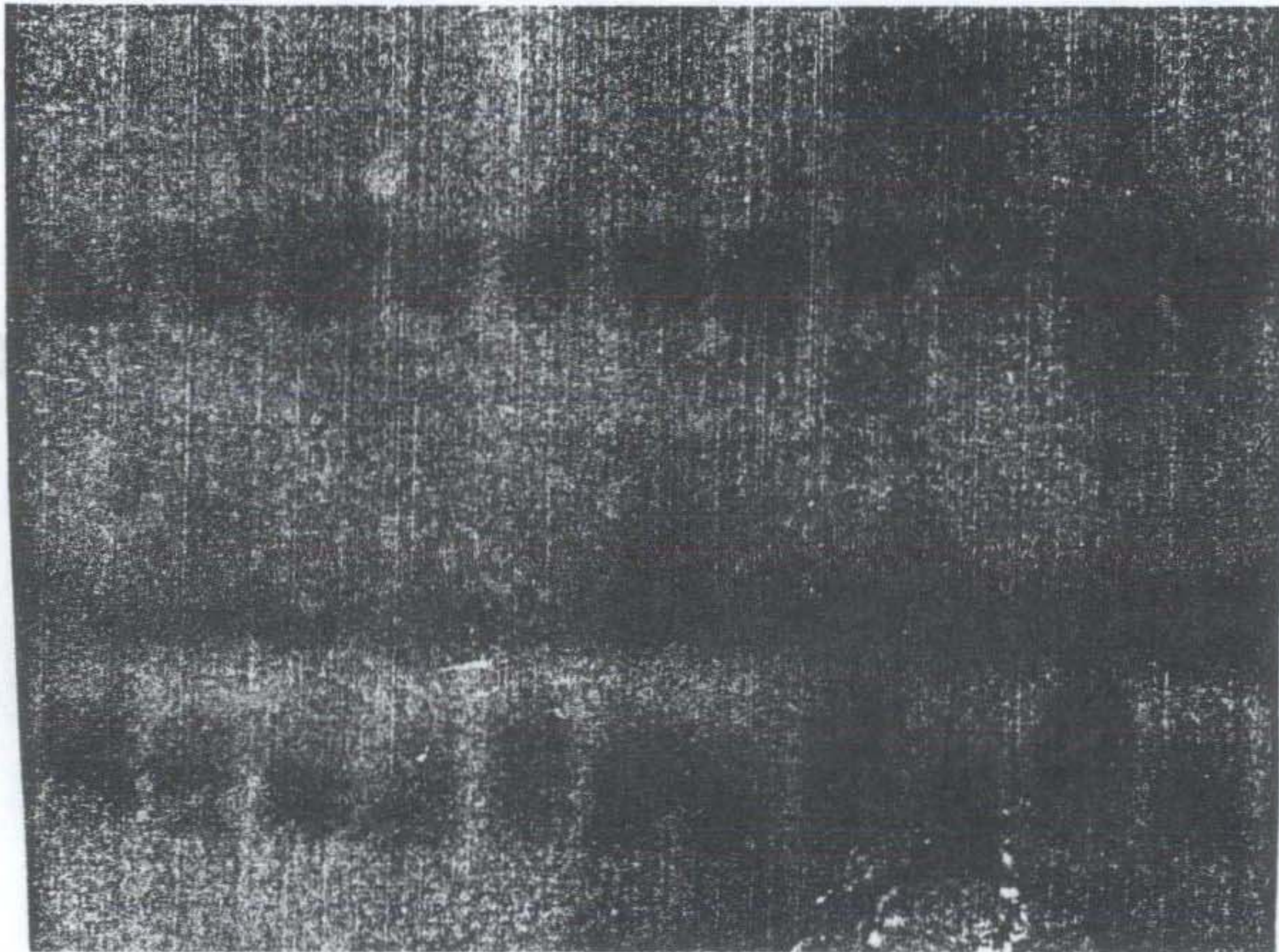


그림 3. 몇가지 배추 품종의 peroxidase isozyme pattern

기질 : pyrogallol

1. 가락신 1호
2. 정1품
3. 청원
4. 탐복
5. 만추
6. 삼진
7. 복돌이
8. 배추뿌리
9. 월하
10. 서울배추
11. 신기원

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



그림 4. 몇가지 배추 품종의 peroxidase isozyme pattern

기질 : guaiacol

1. 춘하왕 2. 정상 3. 장수여름 4. 신화 5. 신춘1호 6. 미원여름
7. 고냉지여름 8. 고냉지 9. 속성얼갈이 10. 풋 11. 노랑봄

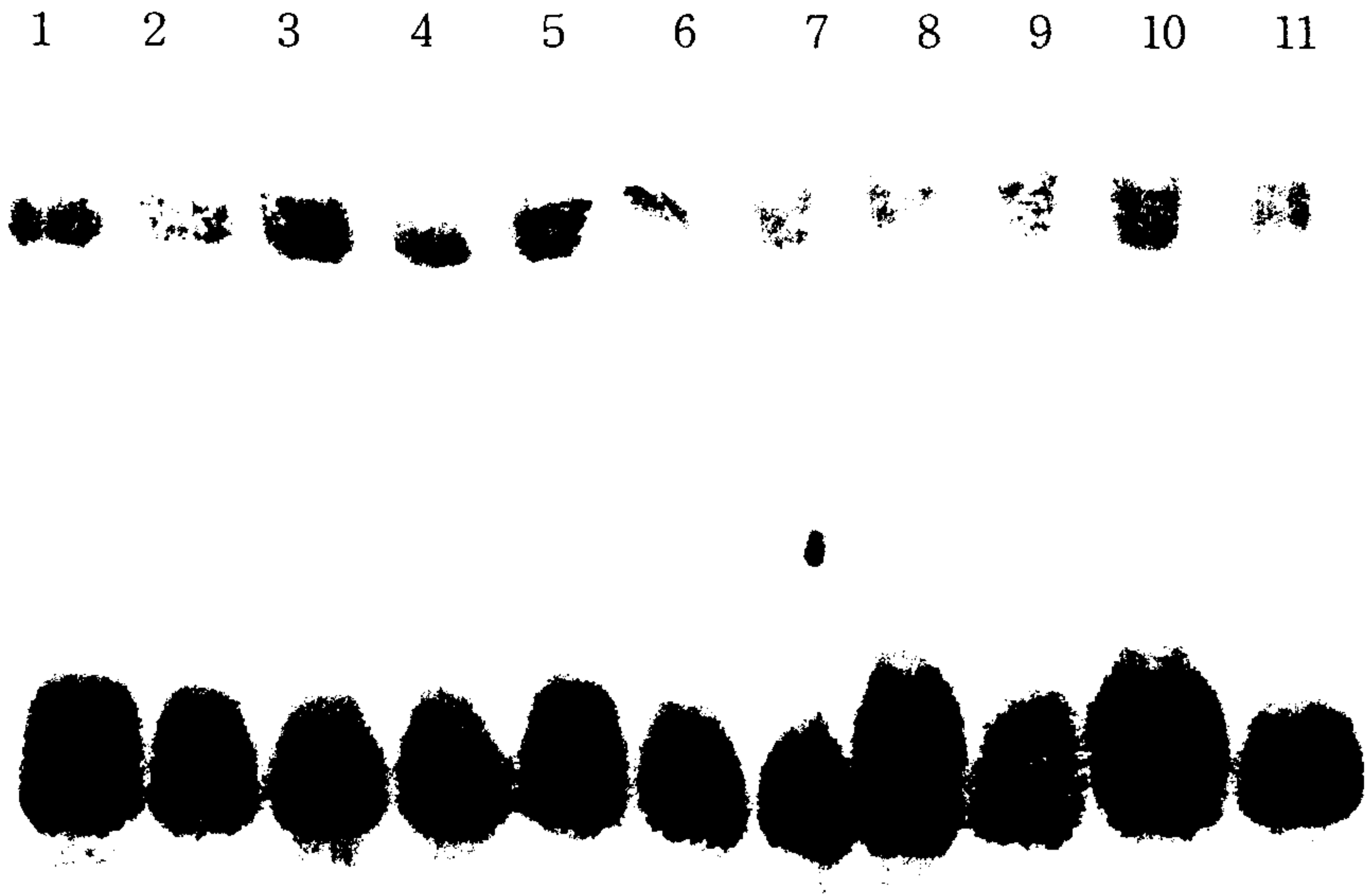


그림 5. 몇가지 배추 품종의 peroxidase isozyme pattern

기질 : 4-chloro-1-naphthol

1. 가락신 1호 2. 정1품 3. 청원 4. 탐복 5. 만추 6. 삼진
7. 복돌이 8. 배추뿌리 9. 월하 10. 서울배추 11. 신기원

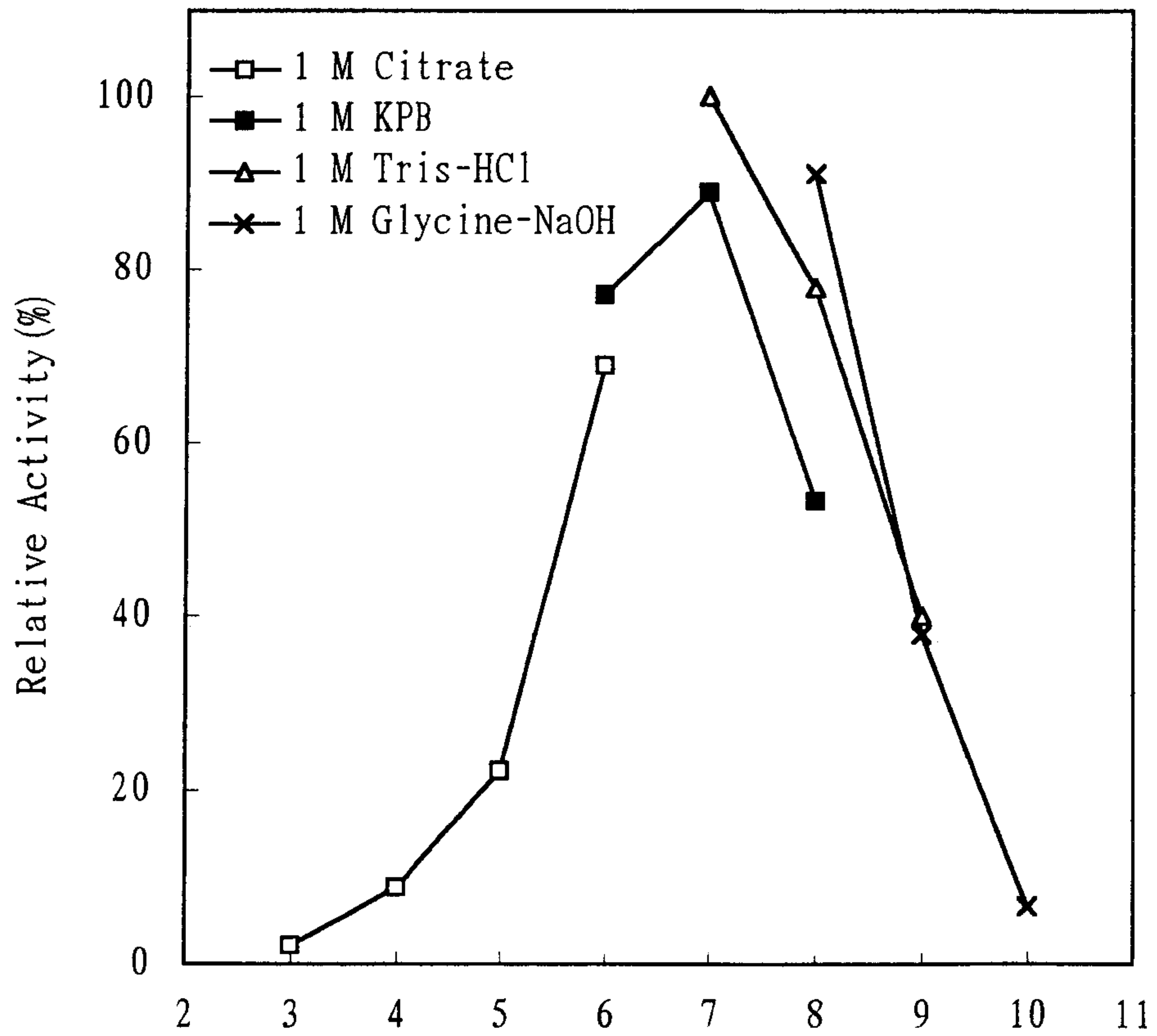


그림 6. 배추 뿌리 기원 Peroxidase의 활성 최적 pH

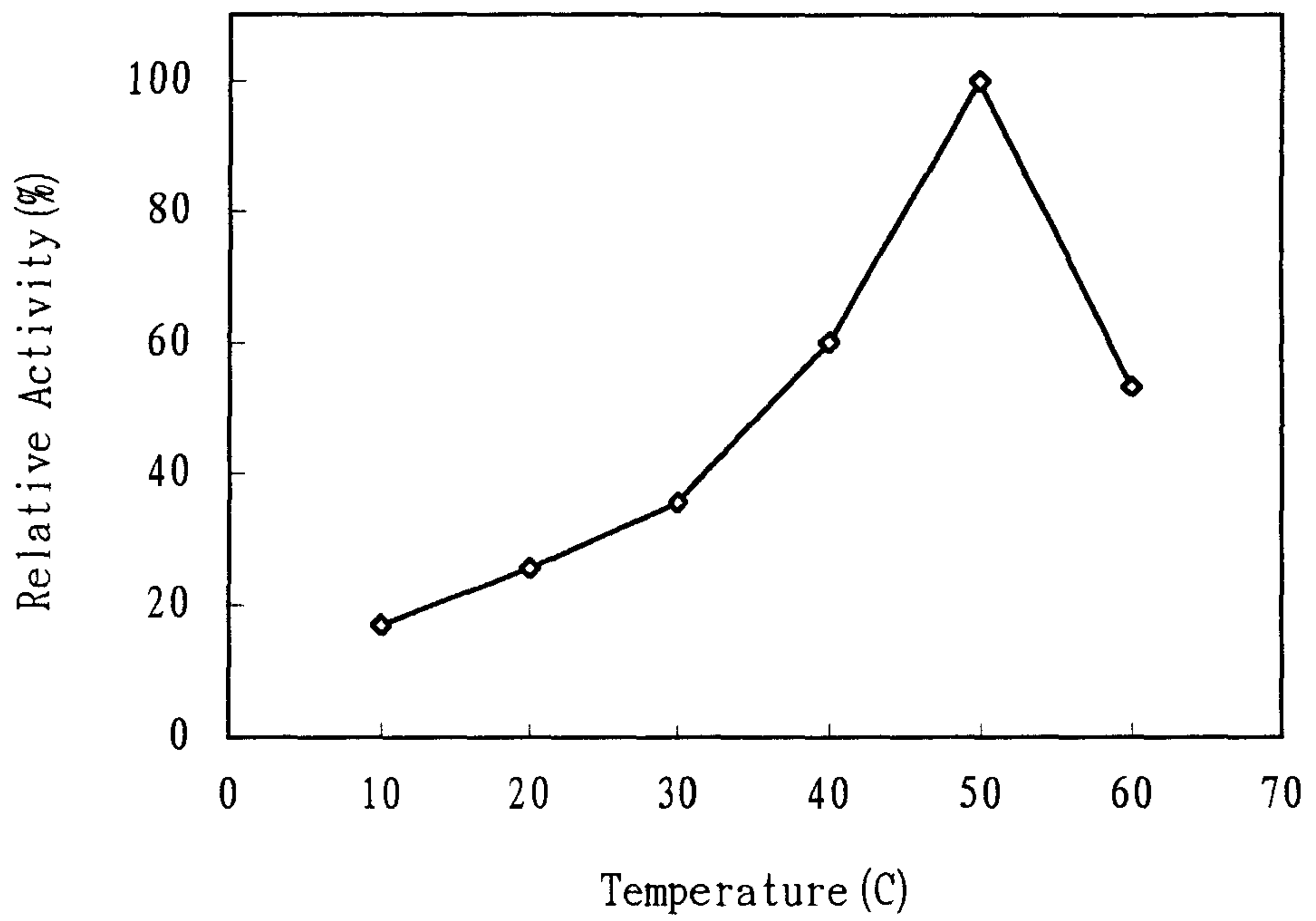


그림 7. 배추 뿌리 기원 Peroxidase의 활성 최적 온도

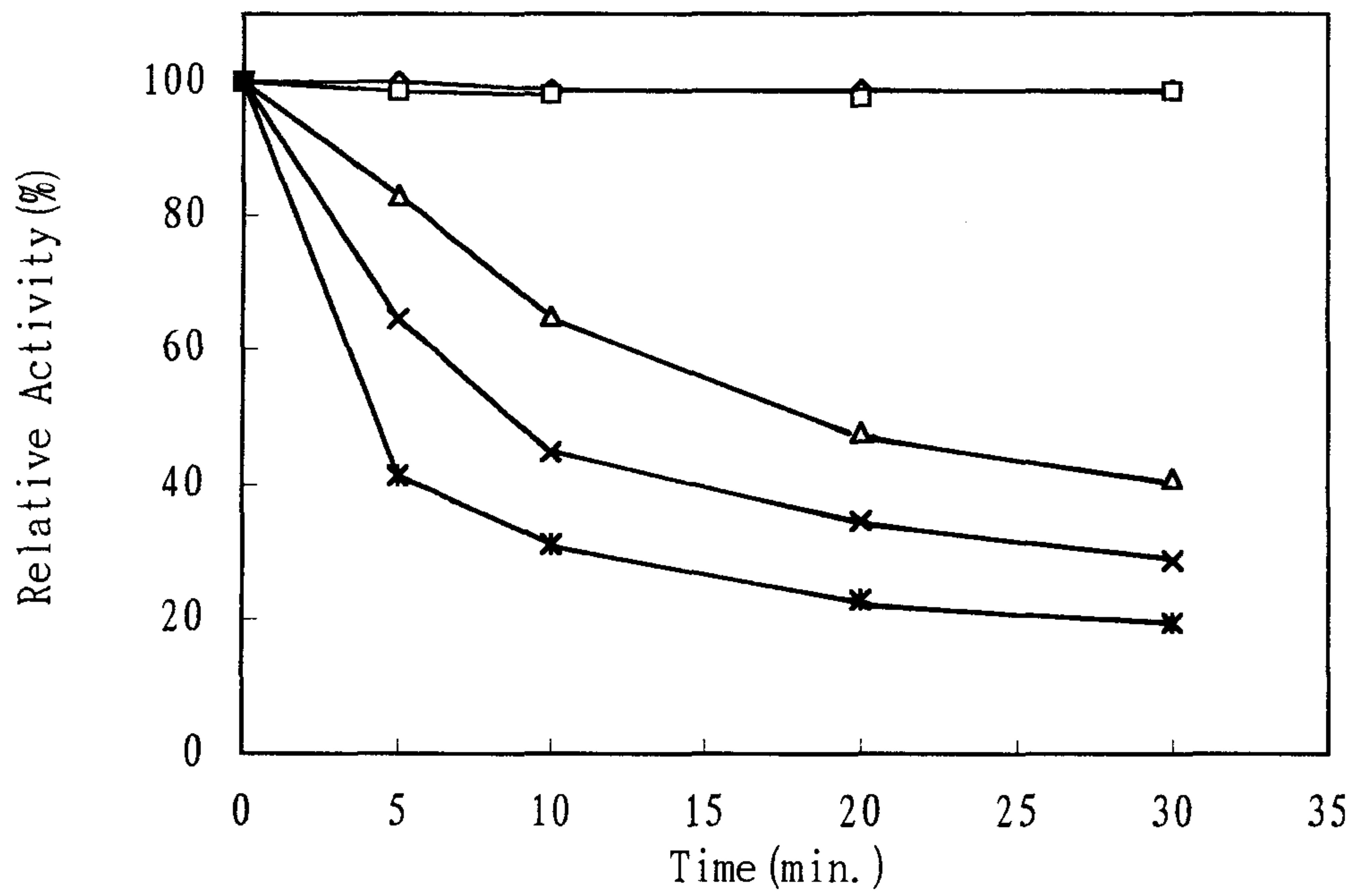


그림 8. 배추 뿌리 기원 Peroxidase의 내열성

◆ : 40°C, ■ : 50°C, ▲ : 60°C, × : 70°C, * : 80°C

3. 품종간 peroxidase 특성 분석

2 항에서 취득한 시료를 이용하여 crude extract상에서 품종간 POX의 활성 최적 pH, 활성 최적 온도, 내열성등 효소의 활성에 미치는 물리적 영향을 조사하였다.

활성 최적 pH는 표2의 표준반응용액에서 완충용액인 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0) 대신 1 M Potassium phosphate buffer(KPB)(pH 6.0 - 8.0), 1 M Citrate buffer(pH 3.0 - 6.0), 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0 - 9.0), 또는 1 M Glycine-NaOH buffer(pH 8.0 - 10.0) 를 최종 농도가 0.100 mM이 되게 가하여 각각의 pH로 조정 한 후 37℃에서 10분간 반응시켜 효소 활성을 측정하였다. 그 결과의 일부를 그림 6에 나타난 바와 같으며 품종간에 큰 차이 없이 활성 최적 pH는 7 - 8 로 나타났다.

본 효소의 활성에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 표 2의 표준 반응용액으로 각 온도에서의 효소활성을 측정하였으며 그 결과의 일부는 그림 7에 나타내었으며 품종간의 큰 차이 없이 40℃ 전후에서 최고 활성을 나타내었다.

본 효소의 열안정성을 알아보기 위하여 효소를 각각 40, 50, 60, 70, 80도씨에서 가온하면서 5분, 10분, 20분, 30분 마다 효소액을 취하여 급냉한후 표 2의 표준 반응용액으로 잔여활성을 측정하였다. 대상으로한 20여종의 배추 품종에 대하여 모두 본 실험을 행하였으며 그 결과의 일부는 그림 8에 나타내었다. 그림에서 나타난바와 같이 60℃의 30분간 가열에도 75% 이상의 잔존 활성을 나타내고 있어 중등도 이상의 내열성을 가지고 있음을 알았다. 한편 70℃이상의 온도에서는 급격히 활성이 감소하여 본 효소의 사용 온도 범위는 50℃이내가 가장 안전한 것으로 판단된다.

4. 배추 뿌리의 효율적 파쇄 방법

배추 뿌리로 부터 효율적으로 POX를 추출하기 위하여 여러가지 파쇄기기를 이용하여 배추 뿌리의 파쇄 방법을 비교하였다. Polytron, 녹즙기, 믹서, 전기맷돌, 유발등을 이용하여 냉동 또는 생 뿌리를 이용하여 각 방법에 의해 추출되는 효소의 총량을 비교하였다.

표 3. 각종 파쇄방법에 따른 생 뿌리로부터 효소의 추출 효율

추출방법	Total activity (unit/ 100 g)
Polytron	2165
Mixer	3774
Mat Dol	1713
Juicer	4340
Pestle	3737

표 4 각종 파쇄방법에 따른 냉동 뿌리로부터 효소의 추출

추출방법	Total activity (unit/ 100 g)
Polytron	1667
Mixer	2005
Mat Dol	1006
Juicer	2064
Pestle	3829

추출되는 효율로 보면 생뿌리의 경우에는 녹즙기, Polytron, 유발, Mixer에서 다소 간의 차이는 인정이 되었으나 비슷한 수준으로 추출이 되었으며 전기 맷돌이 가장 낮은 효율을 나타내었다(표 3). 반면 냉동시킨 뿌리의 경우에는 동결 및 해동에 따른 뿌리 조직의 변화로 생뿌리의 경우와는 다른 추출 효율을 보여 주고 있다(표 4). 이 경우 Mixer와 Juicer가 좋은 추출 효율을 보여주고 있어 산업적 생산에 적용될수 있는 가능성을 제시하고 있다. 한편 맷돌의 경우 생뿌리나 냉동뿌리 공히 낮은 추출율을 보여 조작의 간편화 및 scale up이 용이한 점등이 있으나 실제 사용에는 문제가 있음이 나타났다.

한편 Polytron, Mixer, 녹즙기, 전기 멧들, 유발등 본 연구에서 사용한 각종 파쇄기구로 실제 파쇄를 하였을때 소요되는 처리시간을 산출 하였으며 그결과는 표 5에 나타내었다. 표 5에서 나타나듯이 처리시간 및 노동력을 녹즙기에서 가장 효율적인 것으로 나타났다. 표 3, 4 의 결과로부터 추출 효율을 감안하더라도 녹즙기에 의한 추출이 가장 유효한 방법으로 나타났다. 더우기 파쇄기의 대형화에 관한 연구가 일부의 연구자에 의해 추진되고 있음으로 녹즙기의 이용이 타당한 방법으로 판단이 된다.

표 5 각종 파쇄방법에 처리 소요시간(100g당)

추출방법	처리시간 (min)	원심분리 (min)	총처리시간 (min)
Polytron	10	20	30
Mixer	7	20	27
Mat Dol	30	20	50
Juicer	3	0	3
Pestle	40	30	70

따라서 각 추출방법을 비교하여 보면 다음과 같은 결론을 내릴수 있다.

① Mixer, Polytron, 녹즙기, 유발등은 배추 뿌리로 부터 높은 효율로 POX를 추출할수 있는 파쇄 방법으로 이용할수 있다. 그러나 유발의 경우에는 많은 시간과 노력이 드는 단점이 있어 실제적인 대량 파쇄의 경우에는 적용하기 어려운 점이 있다.

② 효율및 대량처리 면에서는 Polytron, Mixer, 녹즙기 모두 유효하나 공장 규모의 대량처리로는 각 방법이 몇가지의 문제점을 가지고 있다. 즉, Polytron, Mixer의 경우 조직을 파쇄한후 원심분리 또는 여과 과정을 거쳐야 하는 부수적인 처리 단계를 필요로 한다.

③ 녹즙기의 경우 처리 시간이 짧고 액과 잔사를 쉽게 분리 할수 있으므로 가장 효율적인 방법으로 판단이 된다.

5. 파쇄물로부터 효소의 추출조건 확립

효소를 파쇄한 배추뿌리로 부터 효율적으로 추출하기 위하여 파쇄한 배추 뿌리를 물, 완충 용액, 염용액, 유기용매, 계면활성제 등을 이용하여 추출을 하여 추출된 효소의 총 활성을 비교하였다.

식물조직내의 POX는 가용성 또는 막결합성으로 존재하는바, 추출 조건에 따라서 추출되는 단백질의 양과 종류가 크게 달라진다. 따라서

추출액의 이온강도 변화 및 계면활성제의 첨가가 추출효율에 미치는 영향을 검토하였다. 즉, 15g의 시료에 냉각시킨 각종 추출완충액을 각각 가하여 Waring Blendor에서 60초간 homogenize한후 원심분리하여 얻어진 잔사를 같은 방법으로 3회 반복하여 추출하였다. 원심분리후 상등액에 대하여 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 추출완충액에 500 mM이상의 염이 존재할 경우 증류수나 10mM Tris-HCl과 같이 이온 강도가 낮은 추출액의 경우보다는 약 1.5배이상의 높은 효소활성이 추출액에서 나타났다. 한편 Tween 20 이나 Triton X-100과 같은 비이온성 계면활성제의 첨가도 비교적 높은 추출율을 보였다(표 6).

표 6. Peroxidase 추출 조건의 검토

추출완충액	상대 활성(%) ¹⁾
Distilled Water	59
10 mM Tris-HCl(pH 7.0)	68
" + 500 mM NaCl	88
" + 1000 mM NaCl	100
" + 500 mM KCl	81
" + 1000 mM KCl	98
" + 10% Triton X-100	86
" + 10% Tween 20	69
" + 10% SDS	83

1)상대활성은 최대 활성치를 100%로 환산하여 나타내었다

표 7. Peroxidase의 유기용매에 대한 안정성

	잔존활성(%)
무처리	100
Ethanol 처리	
상등액	31
침전	trace
Acetone 처리	
상등액	trace
침전	12

효소 정제 단계에 있어서 유기용매의 사용 가능성을 타진하기 위하여 본 효소의 수용성 유기용매에 대한 안정성을 검토하였다. 즉, 배추 뿌리 50g을 200 ml의 10 mM Tris-HCl(pH 7.0)으로 추출하여 얻은 조효소액에 -20℃로 냉각한 acetone, ethanol을 각각 동량 가하여 ice bath상에서 10분간 방치한후 원심분리하여 상등액과 침전물의 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 30%이상의 활성이 실활되어 유기용매 처리에 의한 효소정제는 비효율적임을 알았다(표 7).

6. 이용성이 높은 품종의 선정

상기 2, 3 항의 결과를 바탕으로 다음과 같은 결론에 도달하였다.

① 고도 정제를 요하나 POX활성 자체 만을 요구하는 분석 시약의 경우 : 전 품종에서 생산 가능함.

② 고도 정제를 요하며 면역학적 특성을 요구하는 분석 시약의 경우 : 몇 개의 그룹으로 나누어진 품종만 가능함.

③ POX 활성 만을 요구하는 공업용 효소의 경우 : 전 품종이 가능함.

④ 페놀성 폐수처리용의 경우 : 전 품종의 추출물 및 추출 폐기물 (찌꺼기)이 이용 가능함.

제 3 장

Peroxidase이외의 유용효소 활성화 검색 및 응용

제 1 절 서 설

POX의 산업적이용 가능성은 여러 연구자들에 의하여 꾸준히 검토 되어 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. POX를 이용한 폐수 처리의 또 다른 연구로는 pulp공장 폐수 중의 저분자 색소의 탈색을 시도하여 과산화수소만을 이용한 탈색보다 60% 이상의 탈색도를 이룬바 있다.

이상에서 열거한 바와 같이 POX의 다양한 산업적 활용 가능성에도 불구하고 현재 산업적인 이용이 제한되고 있는 것은 주로 효소 활성의 불안정성, 높은 분리 및 정제 비용 등을 열거할 수 있다. 현재 사용되고 있

는 POX는 horseradish기원의 효소가 주류를 이루고 있으며 POX의 공업적 중요성으로 인하여 horseradish, 고구마등의 조직 배양을 통한 대량 생산이 시도 되고 있으나 상업화 단계에는 이르지 못하고 있다. 한편으로는 POX 고생산 균주의 screening이 활발하게 이루어 지고 있고 그 중에서 일부는 효소학적 성질이 밝혀짐과 동시에 유전자의 단리를 통하여 효소를 대량 생산할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 저자들은 horseradish POX를 대체할 새로운 효소원의 개발을 목적으로 한국에 자생하고 있는 식물체중에서 horseradish가 속하여 있는 십자화과 식물을 대상으로하여 POX의 활성 분포를 조사한 바 있다. 그 결과 배추 뿌리에 다량의 POX가 분포함을 확인하여 배추뿌리의 POX를 정제하여 효소학적 특성을 밝힘과 동시에 산업적 이용 가능성을 제시한바 있다. 그 결과 배추 뿌리 기원의 효소는 넓은 작용 pH 및 비교적 높은 열 안정성을 나타내어 산업적 이용 가능성은 매우 높은 것으로 판명이 되었다. 본 연구에서는 농산 폐기물인 배추 뿌리를 가공하여 높은 POX 활성의 액상과 분말상의 효소를 얻었으며 이를 이용한 phenol성 폐수의 효소적 처리를 액상효소는 batch stirred reactor를, 분말상효소는 air lift reactor를 이용하여 시도함으로써 농산 폐기물의 효과적인 이용 가능성을 타진하고자 하였다.

식물 병리학적 측면에서 식물들은 수 많은 다양한 방어 반응들에 의해 파괴된 조직을 외부의 감염으로부터 보호한다. 이러한 방어반응은 미생물 또는 미생물에 의해 분해된 세포 화합물(Elicitor)등에 유도가 되며 이때 여러가지 생리적인 변화가 수반된다. Peroxidase activity는 식물방어체계와 연관된 반응으로 제안되어 왔으며 많은 식물들의 상처난 조직에서 peroxidase 활성과의 연관성이 보고되고 있다. 즉 상처난 조직에서는 특이적으로 peroxidase의 활성이 증가되며 특히 pectin 분해물과 같은

elicitor가 존재할때 POX isozyme의 특이적 합성이 유도되며 전체 활성도 증가를 가져온다. 이러한 일련의 변화는 POX가 lignin과 같은 세포내 구조물의 합성과 관련되므로 일어나는 것으로 이해되고 있다. 따라서 본 연구에서는 수확후 뿌리내에서 POX의 합성을 유도하여 전체 POX활성을 높일 목적으로 배추 무름병을 유발시키는 *Erwinia carotovora*균주를 수확한 배추 뿌리에 감염 시킨 뒤 효소의 활성 변화 및 native PAGE에 의해 isozyme 분포 양상을 관찰하였다.

한편, 상업적으로 이용이 되고 있는 효소의 기원은 식물, 동물, 미생물로 나눌수 있다. 응용 미생물학의 발달 및 그와 관련된 기술 즉, 유전공학, 배양공학 기술의 발달로 동,식물 기원의 유용 효소의 상당수가 미생물 기원의 효소로 전환되어 생산이 되고 있다. 미생물 기원 효소의 생산은 생물량(biomass)가 계절의 제약을 받지 않고 거의 무한대로 확보 할수 있다는 장점을 지니고 있을 뿐아니라 생산량 또한 유전공학과 배양공학 기술의 접목으로 획기적으로 증대시킬수 있어 동식물 기원의 효소 보다 훨씬 높은 경제성을 지니고 있다고 할 수 있다. 그러나 미생물 기원 효소는 식품의 가공과 같은 인간이 직접 섭취를 하는 경우에는 안전성의 면에서 사용의 제약이 따르게 된다. 예를 들면 Phytase는 phytate를 가수분해시키는 효소로서 동식물계에 널리 분포되어 있다. 본 효소의 활성은 많은 미생물에도 분포하고 있으며 그중 일부는 효소학적 성질이 밝혀져 있다. 미생물 기원의 phytase는 대량으로 생산하여 사료 효율을 높일 목적으로 동물 사료에 첨가하고 있으며 사료첨가제로 시판이 되고 있는 실정이다. 그러나 미생물 기원의 phytase는 인체에 대한 안전성을 고려하면 식품에의 직접적인 적용은 곤란한 실정이다. 식품 가공용의 효소는 인체에 대한 철저한 안전성이 검증되어야 비로소 사용을 할수 있으나 통상적으로 인간이 전통적으로 식품 가공에 이용한 미생물 기원에 한해서

그 사용이 허용되고 있다.

배추는 지상부 뿐만이 아니라 뿌리 부분도 식용으로 이용하고 있다. 따라서 배추 뿌리로 부터 peroxidase이외의 유용한 식품 가공용 효소를 생산하는 것은 배추 뿌리의 이용성을 높이는 한 방법이 될 것으로 기대한다. 본 장에서는 배추뿌리에 peroxidase 이외의 유용효소의 분포를 살펴보고자 amylase류, catalase, protease, phytase등 식품 산업 에서 많이 이용되는 효소의 활성을 측정하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 시약

제 2 장 제 2 절 참조.

2. 효소

POX 효소원으로 사용한 배추 뿌리는 1994년 7월 강원도 평창군 하진부에서 채취한 고냉지, 만점, 정상, 탐복, 삼미 등 5 품종 이었다. 채취한 시료는 당일 세절한 후 녹즙기로 착즙하여 juice와 pulp로 분리하였다. 분리한 juice는 더 이상의 처리를 하지 않고 액상의 효소원으로, pulp는 분말상의 효소원으로 사용하였다. 이들 액상 및 분말상의 효소는 -20℃로 보관하면서 필요시 꺼내어 사용하였다.

3. POX의 활성측정

POX의 활성은 4 mM H₂O₂, 4 mM 4-aminoantipyrine, 4 mM phenol, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 그리고 적당량의 효소로 구성된 표준 반응액 속에서 효소에 의하여 생성된 quinoneimine의 붉은 색소의 양을 500 nm에서 정량하였다. POX 1 unit는 37°C에서 1분간 1 μmole의 quinoneimine 색소를 생성시키는데 필요한 효소의 양으로 하였으며 quinoneimine의 분자흡광계수(12.2 /cm²/μmole)로 부터 생성된 색소의 양을 환산하였다. 단백질의 정량은 bovine serum albumine을 표준물질로 하여 Lowry법으로 하였다.

4. *Erwinia carotovora*의 배양

본 실험에 사용한 *Erwinia carotovora*는 강원대학교 농생물학과 임춘근 교수로부터 분양받아 사용하였다. 균주의 배양은 30°C에서 진탕 배양을 하였으며 사용한 배지의 조성은 다음 표와 같다.

Mannitol	10
Glutamic acid	2
KH ₂ PO ₄	0.5
NaCl	0.5
MgSO ₄ ·H ₂ O	0.5
Yeast Extract	0.25
Distilled water	1000
pH	7.0

5. Elicitor 처리

본 실험에 사용한 배추 뿌리는 1995년 7월 8일에 강원도 횡성군 우천에서 수확한 탐복배추 뿌리를 실험 재료로 하였다. 수확한 배추 뿌리는 먼저 잘 세척하고 난 뒤 잘게 썰은(3 mm) 다음 300g을 취한 뒤 하루 전날 preculture한 *Erwinia carotovora* 균주(3×10^7 cell/300g)를 배추 뿌리에 접종하였다. 접종된 시료는 30°C에서 배양하였으며 2시간 간격으로 sampling을하여 그 각각을 냉동 보관하였고, 그후 감염된 배추 뿌리 3g에 9 ml의 10 mM Tris-HCl(pH 7.0)와 5g의 sea sand를 가하고 유발에서 마쇄한후 10분간 4°C에서 $12,000 \times g$ 로 원심분리 하였다. 원심 분리후 상등액을 취하여 효소활성 측정과 isozyme 분석에 이용하였다.

6. Air lift reactor

본 실험에 사용한 air lift reactor는 그림 9와 같은 구조를 하고 있으며 reactor의 working volume은 1.6 l이었다. Reactor의 jacket은 온수를 연결하여 reactor내의 온도를 37°C로 유지하였으며 공기유속은 350 ml/min 이었다.

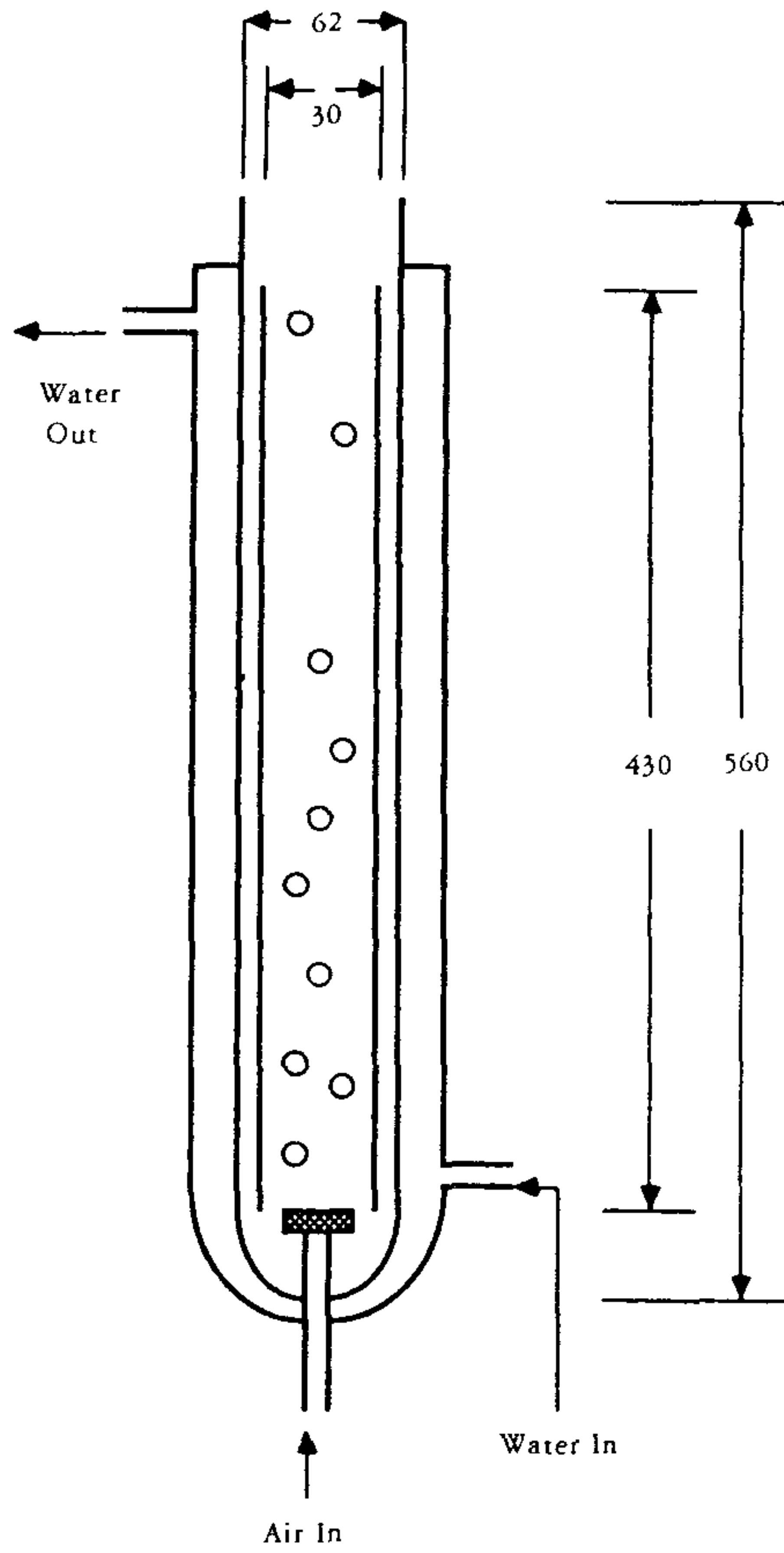


그림 9. Air lift reactor의 구조
단위 : mm

7. Phenol의 정량

POX에 의한 phenol 중합제거 반응속도는 잔존 phenol의 양을 측정하여 구하였다. 즉 반응액 1 ml에 1N HCl 0.2 ml를 가하여 반응을 정지시키고 1N NaOH 0.2 ml를 가하여 중화시킨 다음 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액 1 ml에 4% AlK(SO₄)₂·12H₂O 0.2 ml를 가하여 침전을 숙성시킨 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 phenol polymer를 침전으로 제거한 다음 상등액에 남아있는 phenol을 정량하였다. Phenol 정량은 aminoantipyrine을 이용한 화학적방법으로 하였다.

8. 기타 효소의 활성 측정

가. α -Amylase의 활성 측정

시 약	액 량(μl)
Crude extract	500
1% Soluble starch	2500
100 mM Acetate buffer(pH6.0)	2500
Total Volume	5500

상기 반응액을 40°C에서 10분간 반응시킨후 0.1 N HCl 5 ml을 첨가하여 반응을 정지시킨다. 원심분리후 상등액 500 μl에 Iodine solution 5

ml을 가하고 660 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

나. β -Amylase 활성 측정

시 약	액 량 (μ l)
2% Soluble starch	250
200 mM Acetate buffer(pH6.0)	250
Crude Extract	500
Total Volume	1000

상기 반응액을 30℃에서 3분간 반응시킨후 1 ml DNS 시약(10g NaOH, 10g Dinitrosalicylic acid, 2g Phenol, 0.5g Na₂SO₃, 200g Rochelle Salt를 500 ml 증류수로 녹인 용액)을 가하고 끓는 물에서 5분간 가열한 후 증류수 10ml을 가하여 생성된 maltose의 양을 흡광도 540nm에서 측정하였다.

다. Catalase 활성 측정

시 약	액량(μ l)
40 mM H ₂ O ₂	250
1 M Tris-HCl, pH7.0	100
Distilled water	550
Total Volume	1000

상기 반응액을 30℃에서 반응시키면서 과산화수소의 분해의 결과로 나타나는 240 nm에서의 흡광도 변화를 1분간 측정하여 구하였다.

라. Phytase 활성 측정

시 약	액량 (μ l)
4 mM Phytate	1250
1 M Tris-HCl, pH7.0	250
Distilled water	750
Crude extract	250
Total Volume	2500

상기 반응액을 37℃에서 30분간 배양한후 10% TCA용액 1 ml을 가하여 반응을 정지시킨후 원심분리하고 상등액을 ammonium molybdate를 이용하여 phytase에 의해 phytate로 부터 유리된 인을 정량하였다.

마. Protease 활성 측정

시 약	액량 (μl)
1.5% Casein(pH 10.4)	1000
Crude extract	100
Total Volume	1100

상기 반응액을 60℃에서 30분간 반응시킨 후 0.4 M TCA 2.0ml을 첨가하여 반응을 정지 시켰다. 상온에서 20분간 방치한후 12,000 rpm, 10분동안 원심분리 시켜 상등액을 얻고, 그 상등액 0.5ml를 취하여 분해되어 나온 peptide의 량을 Lowry법으로 측정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. POX의 활성 및 분포

POX는 생체내에서 cytosol 또는 막계에 존재하므로 효소적 성질이

다르게 나타날 뿐 아니라 추출 방법도 대상 효소에 따라서 달라 지게 된다. 막계에 존재하는 효소는 일반적인 수용성 조건하에서는 추출이 되지 않고 불용성인 생체 조직들과 함께 침전으로 남게 된다. 따라서 본 연구에서는 cytosol 존재 효소와 막계 효소를 모두 이용할 목적으로 가정용 녹즙기를 이용하여 배추 뿌리를 액상(juice) 부분과 고형물(pulp) 부분으로 분리하여 각 부분의 효소활성을 측정하여 그 결과를 표 1에 나타 내었다. 배추 뿌리를 세절한후 녹즙기로 파괴시킬 경우 고형물은 수분함량이 65% 정도의 고운 분말상으로 얻을수 있었으며 1회 파괴 후 더 이상의 액상효소를 추출하지 않고 그대로 분말 효소원으로 이용하였다. 표 8에 나타난 바와 같이 품종간에 있어서 액상 효소와 분말상 효소의 활성 및 전체 활성 등이 다르게 나타났다. 고냉지 품종의 경우 뿌리당 존재하는 전체 POX중 약 2/3가 액상으로 1/3이 분말상으로 존재하고 있어 추출하고 남은 고형물도 충분히 이용할 가치가 있음을 알수 있었다. 시험한 5개 품종중 고냉지 품종으로부터 가장 많은 효소를 얻을수 있었으므로 다음의 phenol제거 실험은 이 효소를 이용하여 행하였다.

표 8. 녹즙기에 의한 효소 추출시 효소 활성의 분포

품 종	활 성		총 활 성		비 활 성
	Juice	Pulp	Juice	Pulp	Juice
	(unit*/mL)	(unit/g)	(unit/100g root)		(unit/mg protein)
고냉지	56	67	3,527	1,767	5.7
만 점	31	37	1,816	874	3.6
정 상	28	24	1,480	799	3.3
탐 복	23	42	956	2,079	3.3
삼 미	12	20	868	506	1.8

*, $\mu\text{mole quinoneimine} / \text{min.}$

2. Batch reactor를 이용한 phenol의 제거

액상의 POX를 이용하여 batch reactor에서 phenol의 제거를 검토하였다. 실제 방출되는 phenol폐수의 일종인 석탄 폐수는 phenol, ammonia, chloride등을 함유하고 있으며 8.6 전후의 pH값을 나타내고 있다. 따라서 본 연구에서는 석탄 폐수를 모델로하여 그와 비슷한 반응 조건인 pH 8.0에서 phenol의 제거를 검토하였다. 또한 그림 7에서 나타난 바와 같이 반응 최적온도는 40 - 50℃로 나타났으나 실제 운전시의 에너지 소요를 고려하여 37℃를 반응 온도로 하였다. 따라서 앞에서 검토한 바와 같이 반응 조건은 300 ml 비이커에 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 각 농도의 phenol, 고냉지 액상효소 (1,800 unit/l) 그리고 과산화수소로 구성된 반응액 100 ml를 37℃에서 300 rpm으로 교반하여 반응시켰다. 반응액의 초기 phenol 농도는 각각 150, 200, 500 ppm이었으며 과량의 과산화수소에 의한 효소의 불활성화를 최대한으로 억제하기 위하여 35% H₂O₂를 1 시간 동안 각각 0.034, 0.068, 0.16 mM/min의 속도로 peristaltic pump를 이용하여 공급하였다. 반응이 진행되면서 반응액에 잔존하는 phenol의 양을 정량하여 제거된 phenol의 양을 구하였다. 그 결과 그림 10에서 나타나는 바와같이 각각의 phenol농도에서 모두 실제적인 반응이 1 시간 전후에 종결함을 알수 있다. 반응 초기의 phenol농도가 500 ppm의 반응액인 경우에는 3시간 반응 후 잔존하는 phenol의 양은 215 ppm인데 반하여 200 ppm일 경우에는 잔존하는 phenol의 농도가 24 ppm이었으며, 150 ppm인 경우에는 잔존 phenol이 6 ppm으로 각각 57, 88, 96%의 phenol이 제거되었음을 나타내고있다. 초기 반응액의 phenol 농도가 높을수록 제거율이 낮은 것은 POX와 생성물인 phenol polymer사이의 불가역적인

inactivation이 일어나는 결과로 판단된다. 또한 반응계 내의 낮은 POX 농도는 효소의 불활성화를 촉진시켜 phenol의 불완전한 제거의 원인이 되는 것으로 나타나고 있어 효소와 phenol의 균형있는 농도가 중요함을 알 수 있다. 따라서 높은 농도의 phenol 폐수는 이를 희석시켜 150 ppm 전후의 낮은 농도로 reactor에 공급하는 것이 바람직하다.

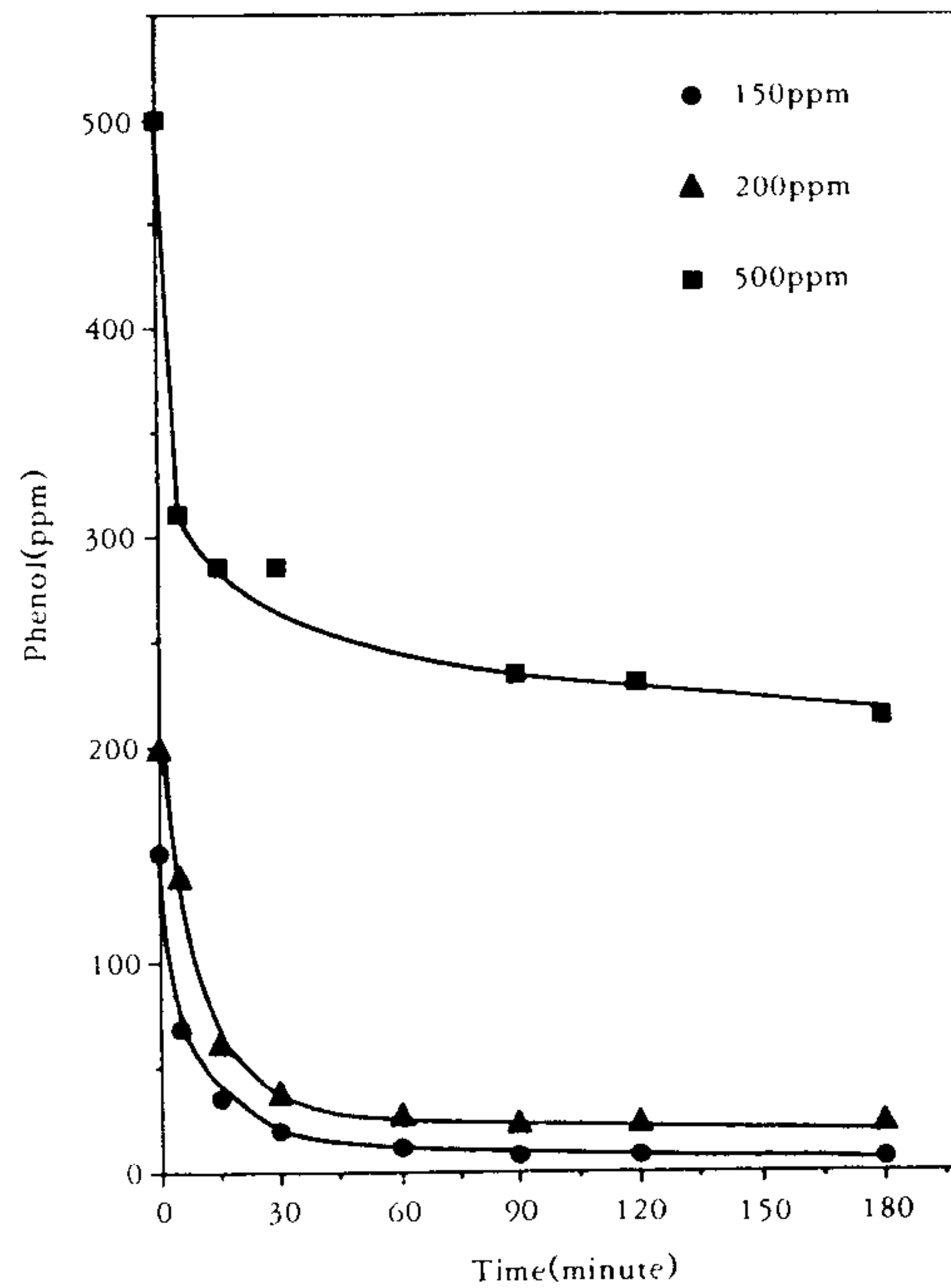


그림 10. Batch reactor에서 액상 효소를 이용한 phenol의 제거

반응 조건은 300 ml 비이커에 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 각 농도의 phenol, 고냉지 액상효소 (1,800 unit/l) 그리고 과산화수소로 구성된 반응액 100 ml를 37°C에서 300 rpm으로 교반하여 반응시켰다. 과량의 과산화수소에 의한 효소의 불활성화를 최대한으로 억제하기 위하여 35% H₂O₂를 1 시간 동안 각각 0.034, 0.068, 0.16 mM/min의 속도로 peristaltic pump를 이용하여 공급하였다.

3. Air lift reactor에 의한 phenol 제거

표 8에 나타난 바와 같이 고냉지 품종의 경우 뿌리 전체의 POX 활성중 pulp에도 34%가 남아 있으므로 이를 이용할 방안으로 air lift reactor를 운전하였다. 그림 9의 구조를 갖는 reactor에 600 unit/l가 되게 pulp를 가한 1,200 ml의 반응액을 37°C, pH 8.0의 반응조건으로 유지하며 3시간 반응시켰다. 35% H₂O₂를 1시간 동안 0.034 mM/min로 peristaltic pump를 이용하여 연속주입 하였다. 그 결과 반응초기의 120 ppm의 phenol이 3시간 반응으로 잔존하는 phenol의 양은 5 ppm이었다. 그림 11에서 알 수 있듯이 batch reactor에서와 마찬가지로 반응이 15분 지난 후 반응의 80%가량의 phenol이 제거되었고 1시간 전후로 효소적 반응이 종결됨을 알 수 있다. 반응계에 첨가된 효소량이 batch reactor의 액상효소에 비해 1/3임에도 불구하고 거의 비슷한 phenol제거 효율을 나타내는 것은 POX가 고정화된 형태로 존재하므로 나타나는 특징으로 추정된다. 이는 pulp가 배추 뿌리로부터 POX를 추출하고 남은 단순한 잔사가 아니라 막결합 형태의 POX를 이용하여 phenol 제거에 충분히 이용될만한 가치가 있다는 것과 더불어 air lift reactor에서 더욱 유용하게 이용될 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

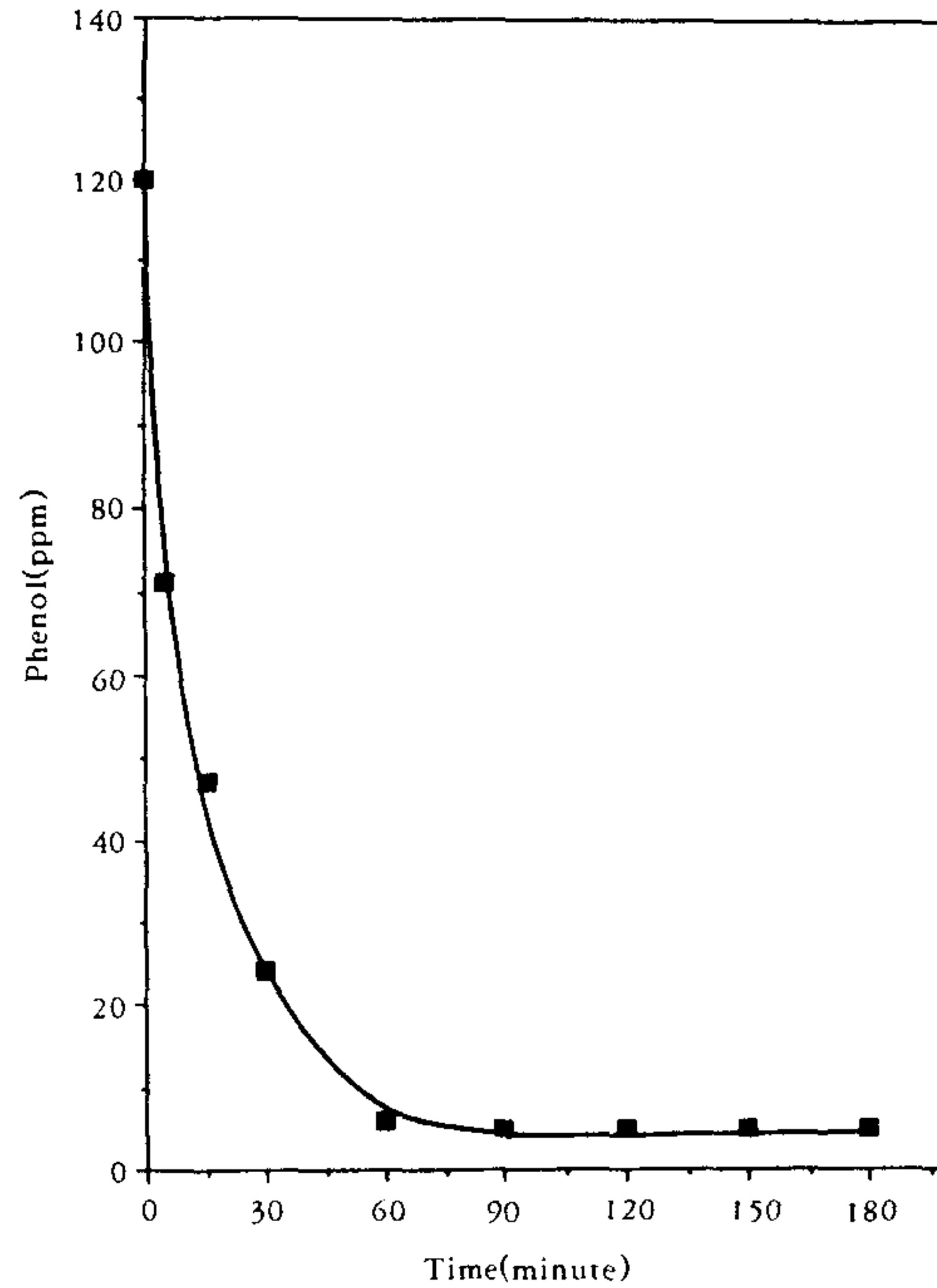


그림 11 Air lift reactor에서 고휘효소(pulp)를 이용한 phenol의 제거

반응조건은 reactor에 600 unit/l가 되게 pulp를 가한 1,200 ml의 반응액을 37℃, pH 8.0의 반응조건으로 유지하며 3시간 반응시켰다. 35% H₂O₂를 1시간 동안 0.034 mM/min로 peristaltic pump를 이용하여 연속주입 하였다.

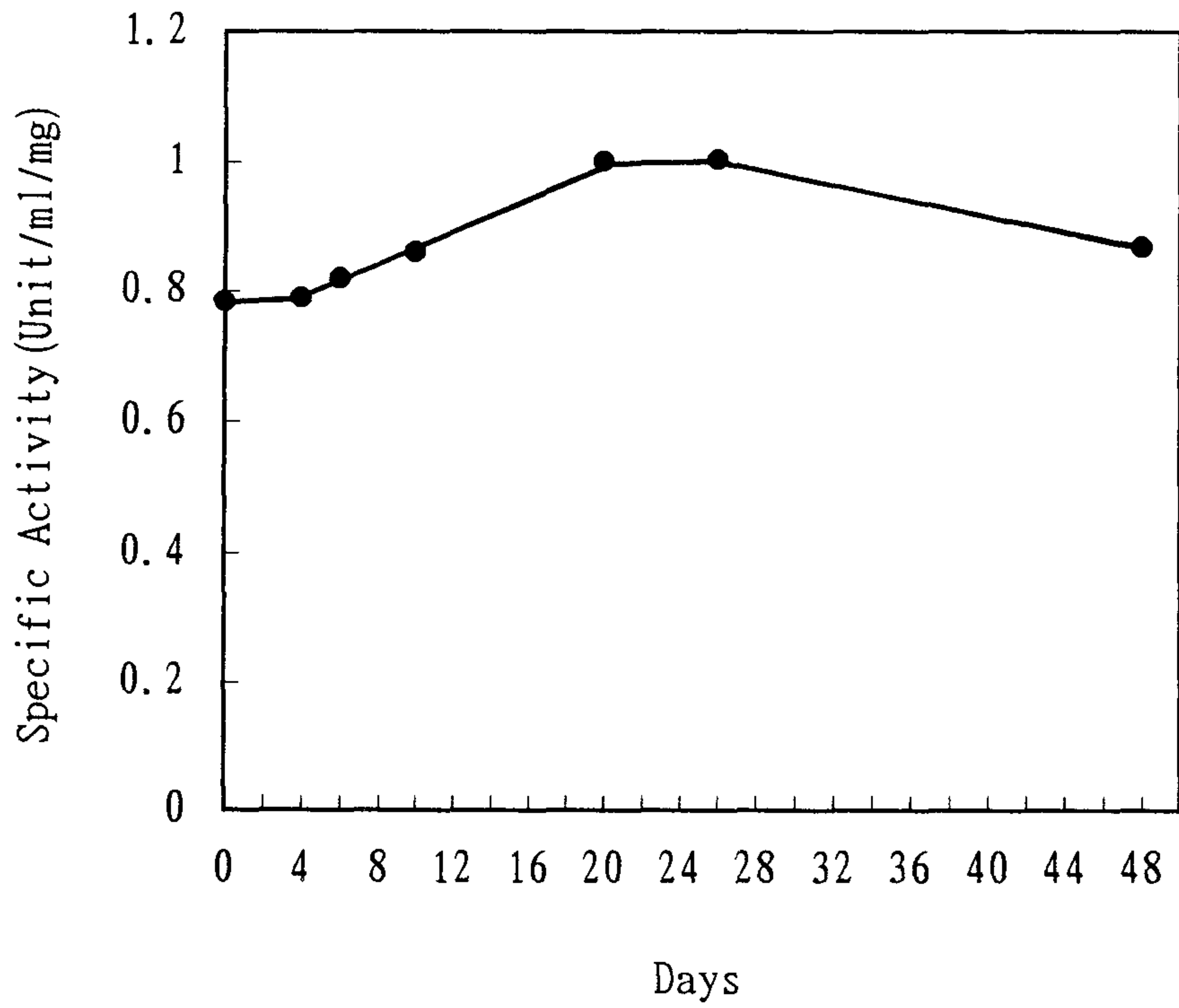


그림 12. 배추뿌리에 *E. carotovora* 감염시킨 후 POX활성의 변화

4. *E. carotovora* 감염후 POX활성의 변화

*E. carotovora*는 배추의 무름병을 유발하는 병원균으로 본 실험에 사용한 균주는 무름병이 걸린 감자로 부터 분리한 것을 사용하였다. 본 균주는 식물세포의 pectin질을 가수분해하는 pectinase를 세포외로 다량 분비하므로 이 균에 감염된 식물체의 조직은 무르게 된다. Pectin은 hemicellulose로 분류되는 다당류로서 pectinase에 의해 분해되어 oligosaccharide로 된다. Pectin의 oligosaccharide를 식물 배양세포에 첨가하면 POX의 유도 합성을 유발하는 elicitor로서 작용을 하게 된다. 따라서 본 실험에서는 elicitor를 직접 사용하지 않고 elicitor를 산생할수 있는 능력을 가진 미생물 즉, *E. carotovora* 를 배추 뿌리에 접종하므로써 POX의 유도를 피하였다. 그림 12에서 나타나는 바와 같이 *E. carotovora* 접종후 4 시간 이후 부터 점차 증가를 하고 있어 POX가 새로 합성이 됨을 나타내며 30 시간 까지 꾸준히 증가를 하고 있다. 48시간 배양후 배추 뿌리의 연부는 상당히 진행되었으며 POX의 전체 활성은 감소하였다.

5. *E. carotovora* 감염후 POX isozyme pattern의 변화

Elicitor의 존재하에서 새로운 POX isozyme의 합성은 여러 연구자들에 의해 보고되고 있다. 앞에서 살펴본 바와 같이 *E. carotovora*의 접종으로 인하여 총 효소활성은 증가되고 있으므로 합성된 POX의 변화 pattern 을 관찰할 필요가 있다. *E. carotovora*에 감염시킨 배추 뿌리를 시간 별로 취하여 POX isozyme pattern을 관찰하였다. 그림 13에서 나

48 20 18 12 10 8 6 4 2 0



그림 13. *E. carotovora* 감염후 POX isozyme pattern의 변화

Native PAGE 후 guaiacol을 기질로 하여 발색

타나듯이 감염후 12시간 부터 새로운 활성 band가 나타나고 있다. 새로이 합성된 POX isozyme은 시간이 지남에 따라 그 량이 증가함을 그림을 통하여 관찰 할수 있다. 그러나 배양 시간이 길어져 48시간이 되면 기존에 존재하던 band 는 모두 없어지고 전혀 다른 형태의 band가 주된 POX활성을 나타내고 있다. 12시간 부터 새로이 나타난 band나 48시간대의 band는 모두 신선한 뿌리 기원의 것과는 다르다. 이러한 POX isozyme이 *E. carotovora* 의 작용에 의해 뿌리내에서 새롭게 합성 된 것인지 또는 *E. carotovora*기원의 것인지 또는 기존의 POX가 protease등의 작용을 받은 결과인지 현재의 상태로는 확인을 할 수 없으므로 추후 자세한 연구가 필요하다. 앞으로 POX isozyme의 변화에 관한 연구가 계속 되어야 할 것이며 이의 산업적 이용도 검토할 필요가 있는 것으로 판단된다.

6. POX이외의 효소의 활성 검색

Phytase, catalase, amylase, protease등 산업적 이용성이 많은 효소의 활성을 조사하였다. 그러나 조사한 효소의 활성이 매우 낮은 수준이어서 산업적으로 이용하기에는 전혀 기대할수 없었다.

본 연구에서는 배추 뿌리의 가공으로 생산되는 POX를 최대한으로 이용하여 phenol성 폐수의 효소적 처리를 검토하였다. Batch reactor를 이용한 phenol의 효소적 제거는 지금까지 보고된 horseradish POX를 이용한 연구 결과와 차이점을 나타내지 않고 있다. 이는 실제적인 폐수 처

리에서 본 연구에서와 같이 최소한의 가공을 거친 粗酵素상태로서도 충분히 적용될수 있음을 나타내고 있다. 한편, 배추뿌리를 착즙하여 juice와 pulp를 분리하는데 있어 pulp에도 뿌리 전체 효소량중 34%가 존재함은 표 8에서 나타난 바와 같다. 막에 결합이 되어 있는 POX는 배추 뿌리의 섬유질과 함께 고형물로 존재하고 또한 적당한 particle size를 갖고 있으므로 천연상태의 고정화 효소의 개념으로 이해될 수 있고 이용도 가능하다. Pulp의 잔존 효소는 막결합형 효소와 조직에 흡착된 소량의 가용성 POX로 판단된다. 막결합형 효소는 계면 활성제나 고농도의 염, 유기용매 처리 등으로 추출이 가능하나 처리 과정이 복잡하고 번거로우나 수용액 상태에서는 활성이 용출되지 않는 점을 이용할 수 있다. 따라서 적당한 조건의 reactor를 운전하여 배추 뿌리의 이용성을 극대화시키고자 하였다. 배추 뿌리를 착즙후 남은 pulp는 평균 5 mm전후의 particle size를 갖는 전형적인 섬유상을 나타내고 있으나 입도가 낮은 입자도 상당히 함유되어 있어 그대로 fixed bed packed column에 적용하기에는 유속 및 압력손실 문제가 뒤따르게 된다. 본 실험에서는 이러한 점들을 고려하여 여러가지의 반응조중에서 air lift reactor를 채택하여 phenol 제거력을 검토하였다. Air lift reactor에 pulp를 가하여 POX의 활성을 이용한 결과는 그림 12 에서 보는 바와같이 batch reactor보다 더 적은 효소량으로도 효율적으로 phenol을 제거할 수 있어 pulp도 유효하게 이용할 수 있음을 나타내었다. 이상의 결과는 배추 뿌리의 단순한 가공을 통하여 POX가 효율적으로 이용 될수 있음을 보여주고 있다.

POX는 자연계에 널리 존재하는 효소로서 고구마, kiwifruit, green pea 와 peanut 등의 식물체 및 *Pellicularia filamentosa*, *Bacillus stearothermophilus*과 *Halobacterium halobium* , *Streptomyces thermoviolaceus* 등의 미생물 기원의 효소적 성질이 밝혀져있다. 이들

여러 기원의 POX는 유해 물질의 제거와 같은 산업적 목적으로 다양한 적용이 모색되어 왔으나 처리과정중 효소 비용이 차지하는 비율이 너무 커 실제적인 공정에 적용하기에는 어려움이 뒤따르고 있다는 것이 큰 문제로 대두되고 있다. 본 연구에서 제시한 배추 뿌리 기원의 POX는 이러한 점을 크게 해소 할 수 있게 될것이다.

제 4 장

효소의 Quality Control

제 1 절 서 설

본 장에서는 효소의 생산 과정중 효소의 quality control에 필요한 사항 즉, 신속하고 안정적이며 간단한 효소의 활성 측정 방법 그리고 정제된 효소의 효율적인 저장방법을 규명하고자 하였다.

POX의 활성 측정 방법은 기질로서 aminoantipyrine이나 ABTS등과 같은 chromogen을 이용하여 효소의 작용으로 발색을 하는 강도를 측정하고 있는 것이 일반적인 방법이다. 그러나 기존의 연구실에서 다루는 방법을 그대로 산지공장 수준에 적용시키기에는 문제가 있다. 산지 공장의 간단한 설비에서도 손쉽게 활성을 측정하기 위해서는 효소 활성 측정 방법의 규격화가 필요하며 활성 측정시 나타나게 될 여러가지 문제점을 짚어 놓을 필요가 생기게 된다. 실제로 발색된 색소는 효소 반응을 정지시키는 과정 즉, 산이나 알칼리 처리 또는 가열등에 대해 서로다른 안정성을 나타내므로 여러 조건에서의 색소 안정성을 검토할 필요가 생긴다. 따라서 기존의 효소 활성 측정 방법을 이용하여 상기의 목적에 맞는 분석 방법을 제시하고자 한다.

한편, 효소는 보존방법에 따라서 안정도가 크게 변하게 된다. 일반적으로 동결에 의한 보존을 가장 안전한 것으로 판단하고 있으나 효소에 따라서는 동결에 의하여 비가역적인 실활을 초래하는 수도 있다. 효소의

안전한 장기 저장을 위해서는 보존 최적조건, 효소의 활성 연장에 도움이 될수 있는 첨가물등을 고려하여야 한다. 본 연구에서는 냉동, 냉장, 실온 저장시 나타나는 문제점을 효소의 활성을 추적하여 파악하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 조효소

배추 뿌리를 3-4cm 크기로 대충 자른후 녹즙기로 착즙하였다. 착즙액을 조효소원으로 하였으며 ammonium sulfate로 30 - 90 % 포화농도에서 fractionation하여 부분 정제한 효소를 조제 하였다. Ammonium sulfate 분별법을 이용한 부분 정제과정은 다음 그림 14와 같다.

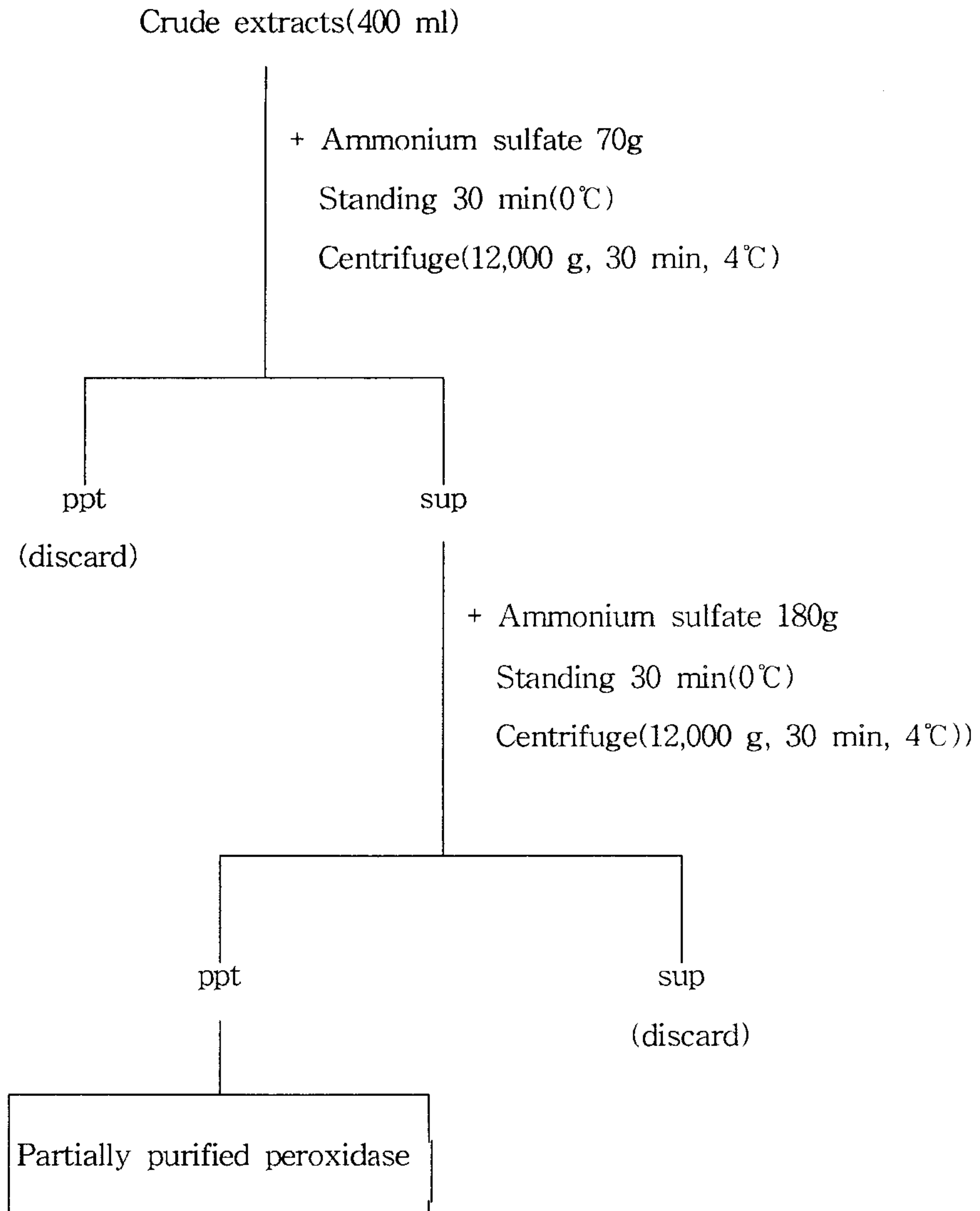


그림 14. Ammonium sulfate 분별법에 의한 Peroxidase의 부분 정제

제 3 절 결과 및 고찰

1. 효소의 Q.C.를 위한 효과적 분석법 확립

효소의 생산시 신속한 Quality control을 위해서는 신속하고 안정적이며 간단한 분석방법이 필요하다. 기존의 효소 활성 측정 방법을 이용하여 상기의 목적에 맞는 분석 방법을 확립하였다.

POX의 활성 측정은 보통 amino antipyrine이나 ABTS와 같은 발색 시약을 쓰며 amino antipyrine의 경우 끓는 물에서 3분간 가열, ABTS의 경우에는 10% TCA를 첨가하여 반응을 정지시키는 것이 일반적으로 이용이 되는 방법의 하나이다. 반응을 정지시킨후 생성된 색소의 양을 구하여 효소의 활성치를 계산한다. 이 과정에서 생성된 색소의 양은 효소의 활성치와 직결되므로 효소 반응 정지가 신속하게 이루어지고 또한 생성된 색소의 파괴가 없어야 한다. 따라서 동일한 조건으로 효소 반응을 진행시킨후 여러가지 방법으로 효소 반응을 정지시켜 생성된 색소의 양을 비교하였다. 그 결과는 표 8, 9에 나타난바와 같다. 즉 amino antipyrine 의 경우 산처리에 의해 생성된 색소가 가장 많이 파괴되며 가열에 의해서도 생성된 색소가 파괴됨을 알수 있었다. 따라서 amino antipyrine을 기질로 사용하는 경우에는 100% ethanol을 반응액과 동량 가하여 반응을 정지시키는 것이 가장 효율적임을 알았다. ABTS의 경우에는 산처리 또는 유기용매 처리에 의하여 생성된 색소의 흡광도가 변하기 않음을 알수 있었으며 가열 처리에 의해서도 색소가 감소하였다.

표 9. Aminoantipyrine을 기질로 사용할 때

반응정지방법	흡광도(Abs)
Boiling	0.4112
10% TCA	0.0967
50% Ethanol	0.6073
0.1 N HCl	0.1957
0.01 N HCl	0.3193

표 10. ABTS를 기질로 사용할 때

반응정지방법	흡광도(Abs)
Boiling	2.1234
10% TCA	1.5214
50% Ethanol	1.5242
0.1 N HCl	1.5136
0.01 N HCl	1.4609

이상의 결과로 부터 산지 가공 공장에서 효과적인 효소 활성 측정방법을 설정하여 보면 다음과 같다.

방법 1) 기질로서 amino antipyrine을 이용하는 경우

20 mM H₂O₂ 0.3 ml, 20 mM 4-aminoantipyrine 0.3 ml, 20 mM phenol 0.3 ml, 1 M Tris-HCl (pH 7.0) 0.2 ml 그리고 적당히 희석한 효소 0.4 ml로 구성된 표준 반응액(총 2.0 ml)을 37°C에서 반응시킨다. 반응을 10분 정도 시킨후 ethanol 2.0 ml를 가하여 반응을 정지시킨다. 이때 ethanol을 가하면서 정확한 반응 시간을 제어 둔다. 반응 정지액은 5 ml용 cell에 옮기고 Spectronic 20으로 500 nm의 파장에서 흡광도를 읽는다. 측정된 흡광도와 quinoneimine의 분자흡광계수(12.2 /cm²/μmole)로부터 1분간 생성된 quinoneimine의 양을 환산한다. 효소 1 unit는 1 μmole의 quinoneimine 색소를 생성시키는데 필요한 효소의 양이므로 효소의 활성도를 구한다.

방법 2) 기질로서 ABTS를 이용하는 경우

20 mM H₂O₂ 0.3 ml, 20 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(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 반응액(총 2.0 ml)을 37°C에서 반응시킨다. 반응을 10분 정도 시킨후 ethanol 2.0 ml를 가하여 반응을 정지시킨다. 이때 ethanol을 가하면서 정확한 반응 시간을 제어 둔다. 반응 정지액은 5 ml용 cell에 옮기고 Spectronic 20으로 470 nm의 파장에서 흡광도를 읽는다. 측정된 흡광도와 산화 ABTS의 분자흡광계수(18.6 /cm²/μmole)로부터 1분간 산화된 ABTS의 양을 환산한다. 효소 1 unit는 1 μmole의 ABTS를 산화시키는데 필요한 효소의 양이므로

효소의 활성도를 구한다.

2. 효소의 저장, 보관 조건 확립

추출한 효소를 효율적으로 저장하기 위하여 여러가지 조건에서 저장 기간중의 활성 변화를 검토하였다. 본 실험에는 고냉지 배추 뿌리를 녹즙기로 착즙하여 나온 즙액을 조효소로하여 실험을 진행하였다. 조효소를 그대로 -20°C 냉동, 조효소에 glycerol을 30% 첨가하여 -20°C 냉동, 조효소를 4°C 에서 냉장, 그리고 실온(평균 23°C)에서 보관하면서 정기적으로 효소의 활성을 측정하여 최적 저장 조건을 검토하였다.

가. 냉동 저장

glycerol을 첨가한 것이나 첨가하지 않은 것이나 모두 -20°C 에서 40일간의 저장에도 효소활성의 변화는 관찰 할수 없었다(그림 15).

나. 냉장 저장

조효소를 4°C 의 냉장 상태로 보관할때 40일간의 저장에도 효소 활성의 변화는 관찰할수 없었다(그림 16).

다. 실온 저장

실온 저장시 효소 활성은 조금씩 감소하여 16일이 되는 시점에서는 50%의 잔존 활성을 나타내어 약 1주일 정도는 효소의 활성에 큰 변화가 없이 실온에서도 보존 할수 있음이 나타났다. 활성의 변화는 그림 17에 나타내었다.

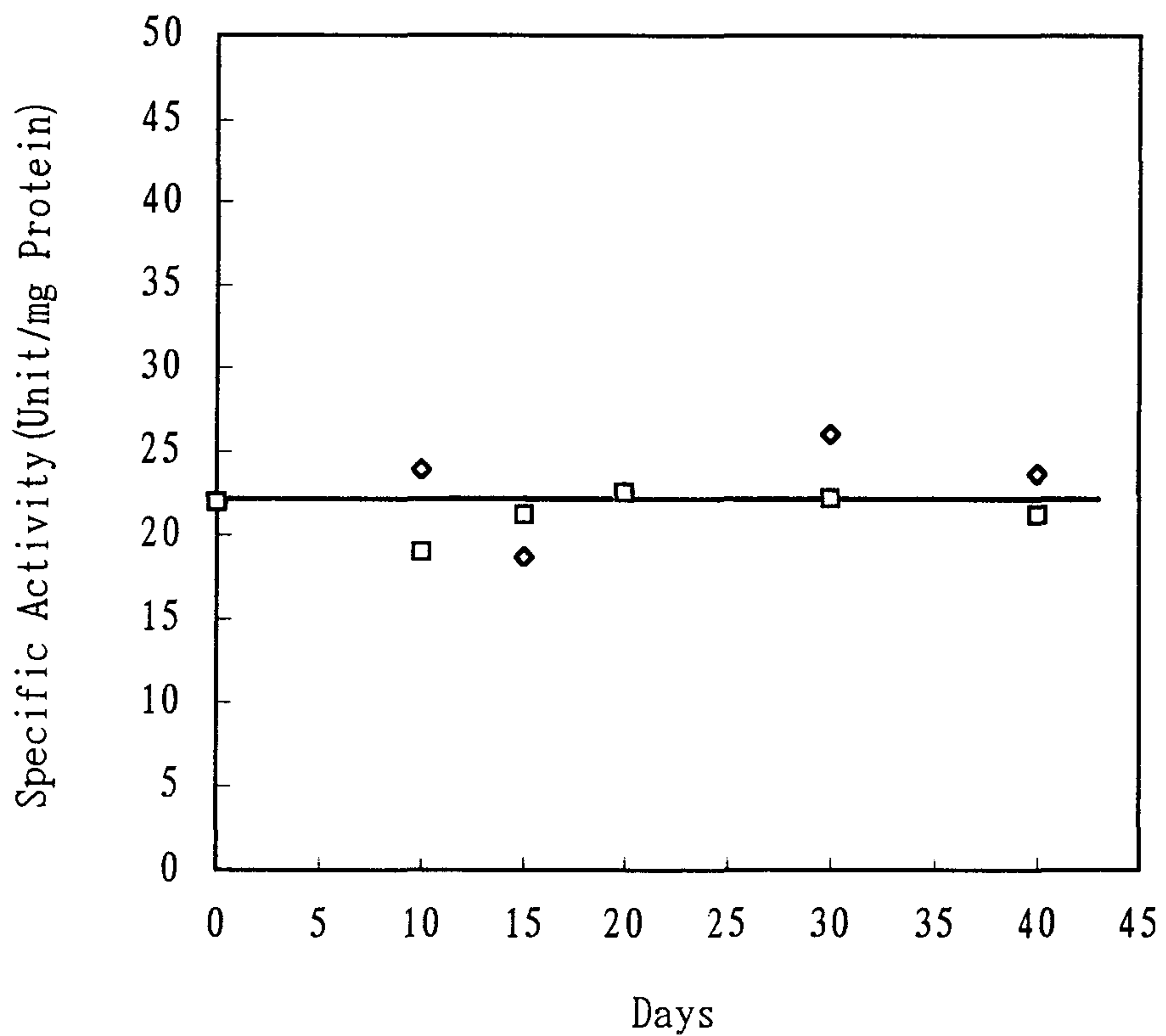


그림 15. 조효소액의 냉동 저장에서 peroxidase 활성의 변화

◇ : 30 % glycerol 첨가, □ : 30 % glycerol 무첨가

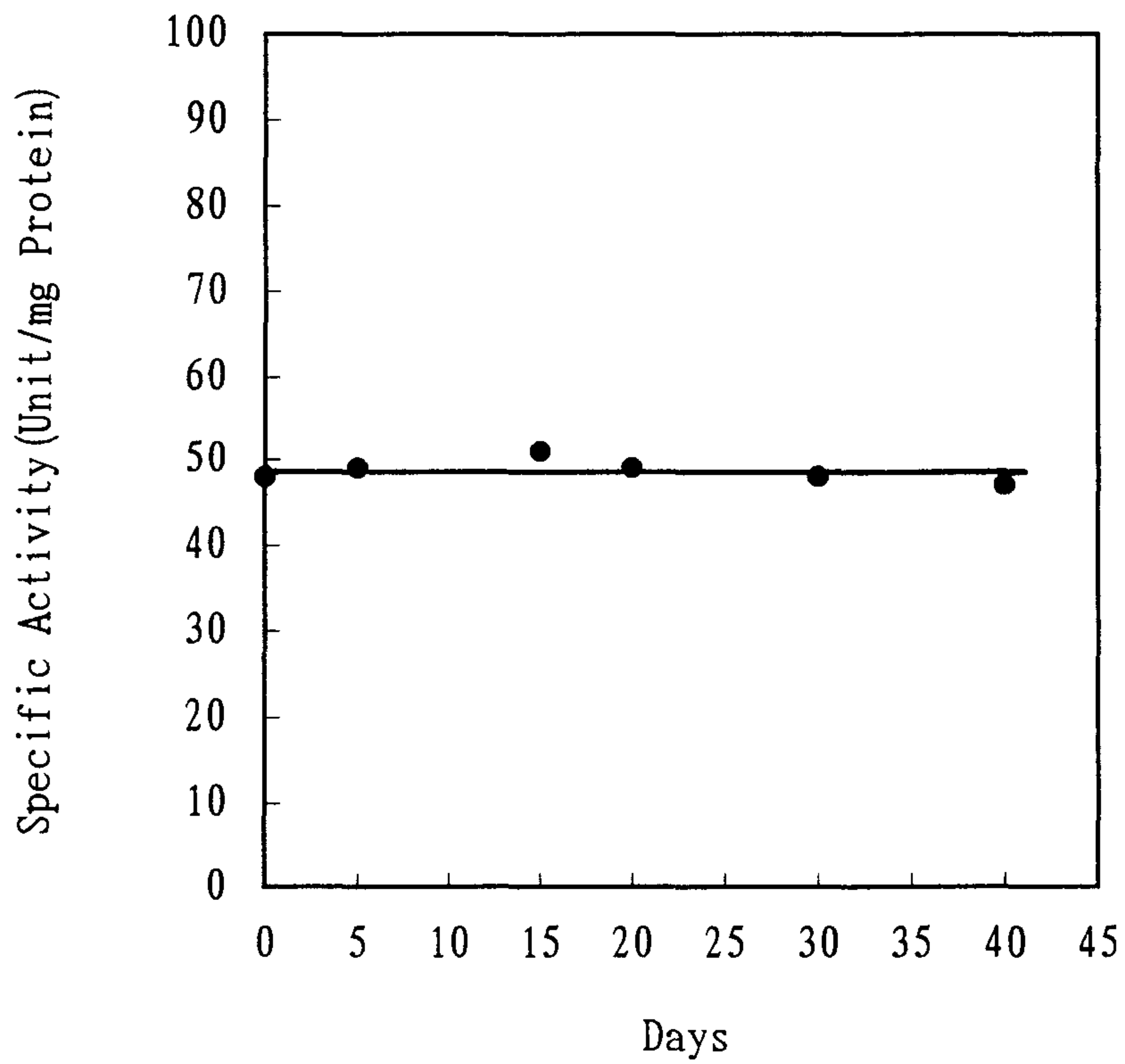


그림 16. 조효소액의 냉장 저장에서 peroxidase 활성의 변화

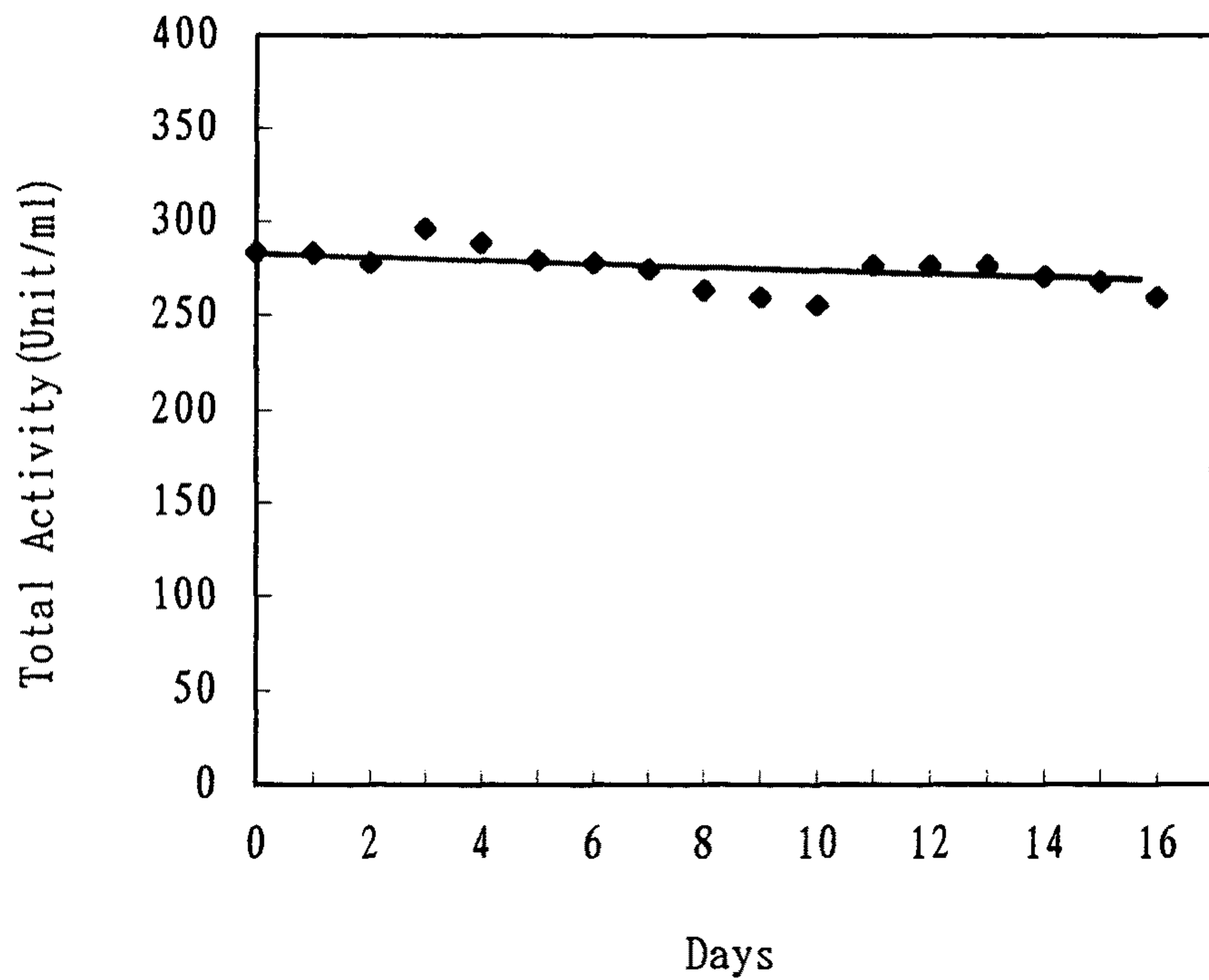


그림 17. 조효소액의 실온 저장에서 peroxidase 활성의 변화

3. 부분 정제 효소의 저장 방법

2 항의 조효소액에 황산암모늄을 가하여 부분 정제한후 여러가지 조건에서 효소의 저장 조건을 검토하였다. 즉 조효소액에 황산암모늄을 30%포화가 되도록 가한후 원심분리하여 침전을 제거시키고 상등액에 황산암모늄을 90%포화가 되도록 가하여 POX 활성이 있는 부분을 침전으로 획득하였다. 침전을 다음의 여러가지 조건으로 저장하면서 효소 활성을 측정하였다.

가. 침전을 그대로 -20°C 에서 저장

40일의 저장 과정중 50%의 효소활성의 감소가 나타났다. 활성 측정의 결과는 그림 18에 나타내었다.

나. 침전을 투석후 -20°C 에서 저장

40일의 저장 과정중 20%의 효소활성의 감소가 나타났다(그림 19).

다. 침전을 투석후 glycerol을 30%가하여 -20°C 에서 저장

40일의 저장 과정중 10%의 효소활성의 감소가 나타났다(그림 20).

라. 침전을 2M 황산암모늄에 현탁한 후 -20°C 에서 저장

40일의 저장 과정중 효소활성의 변화가 거의 나타나지 않았다. 활성 측정의 결과는 그림 21에 나타내었다.

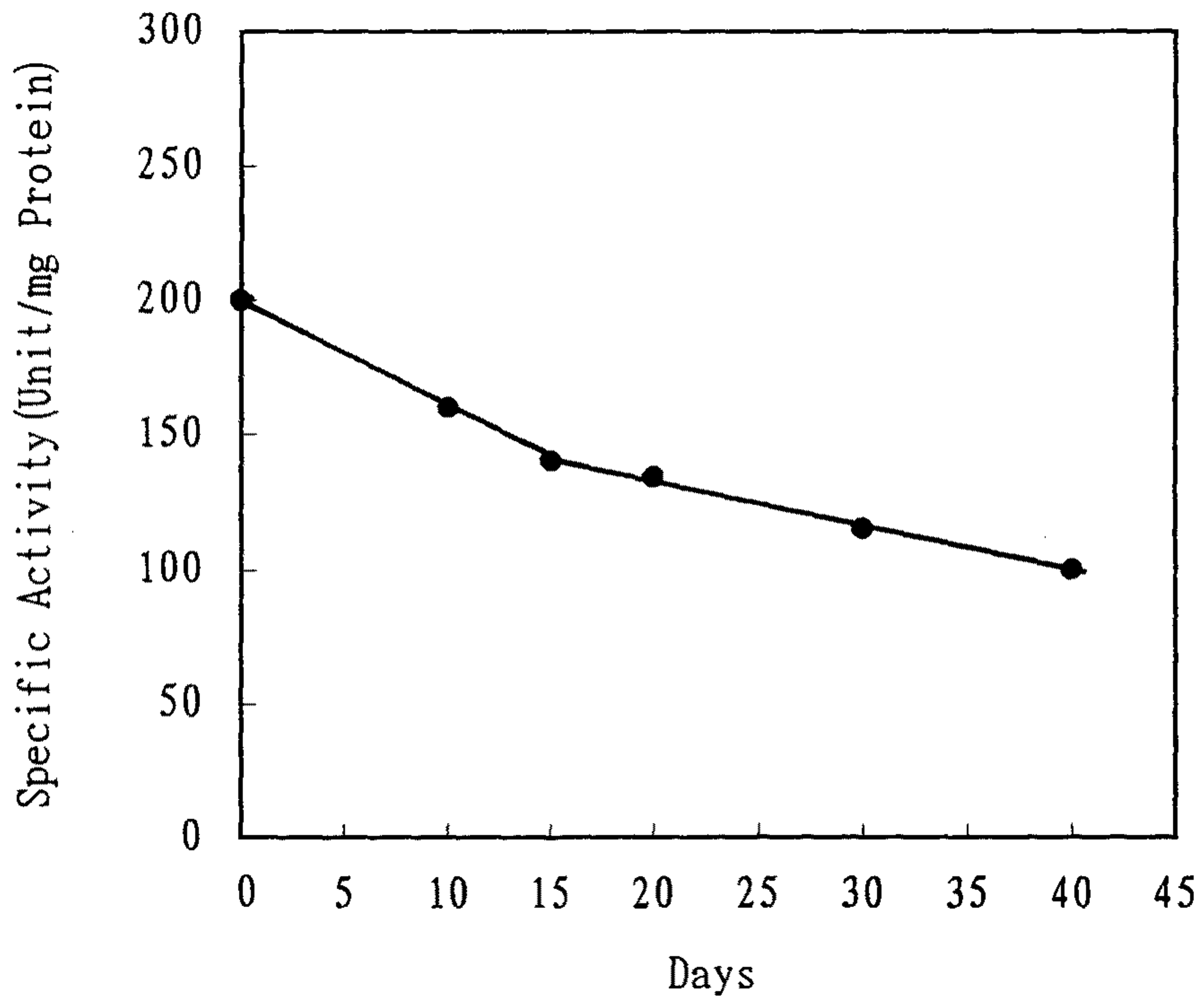


그림 18. 황산암모늄 분획의 침전을 그대로 -20°C 에서 저장시 peroxidase활성의 변화

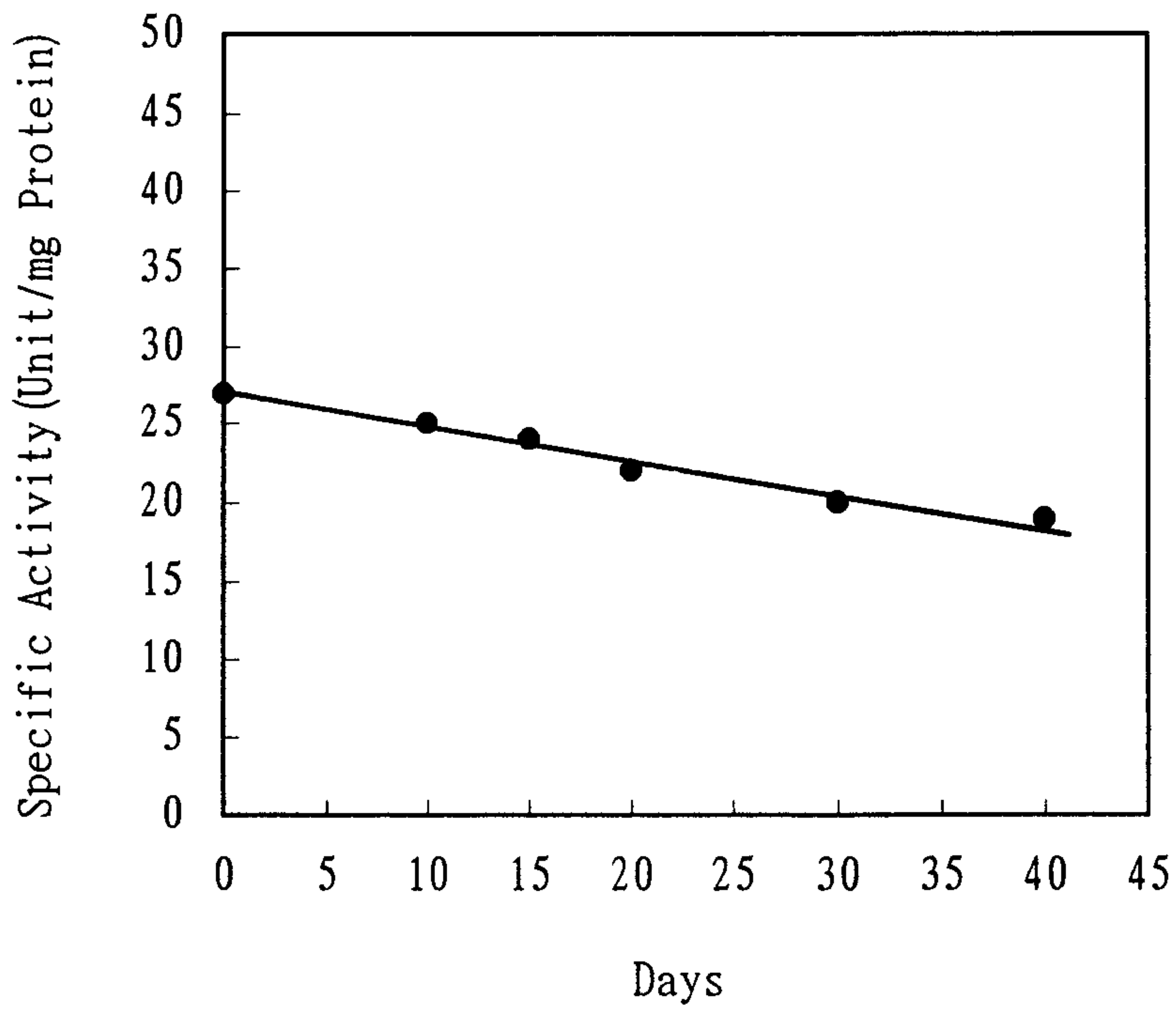


그림 19. 황산암모늄 분획의 침전을 투석후 -20°C 에서 저장시 peroxidase 활성의 변화

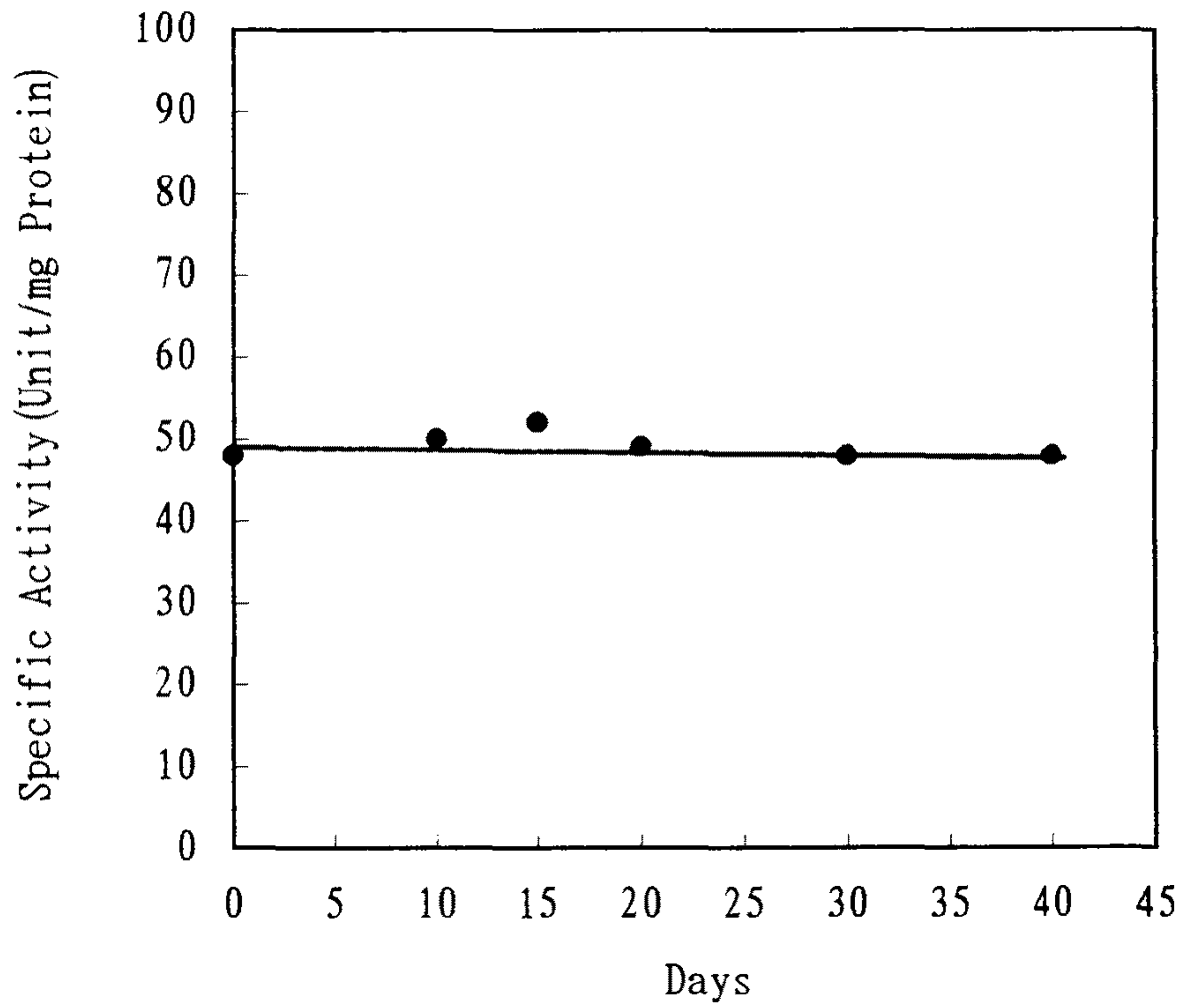


그림 20. 황산암모늄 분획의 침전을 투석후 glycerol을 30%가하여
-20°C에서 저장시 peroxidase 활성의 변화

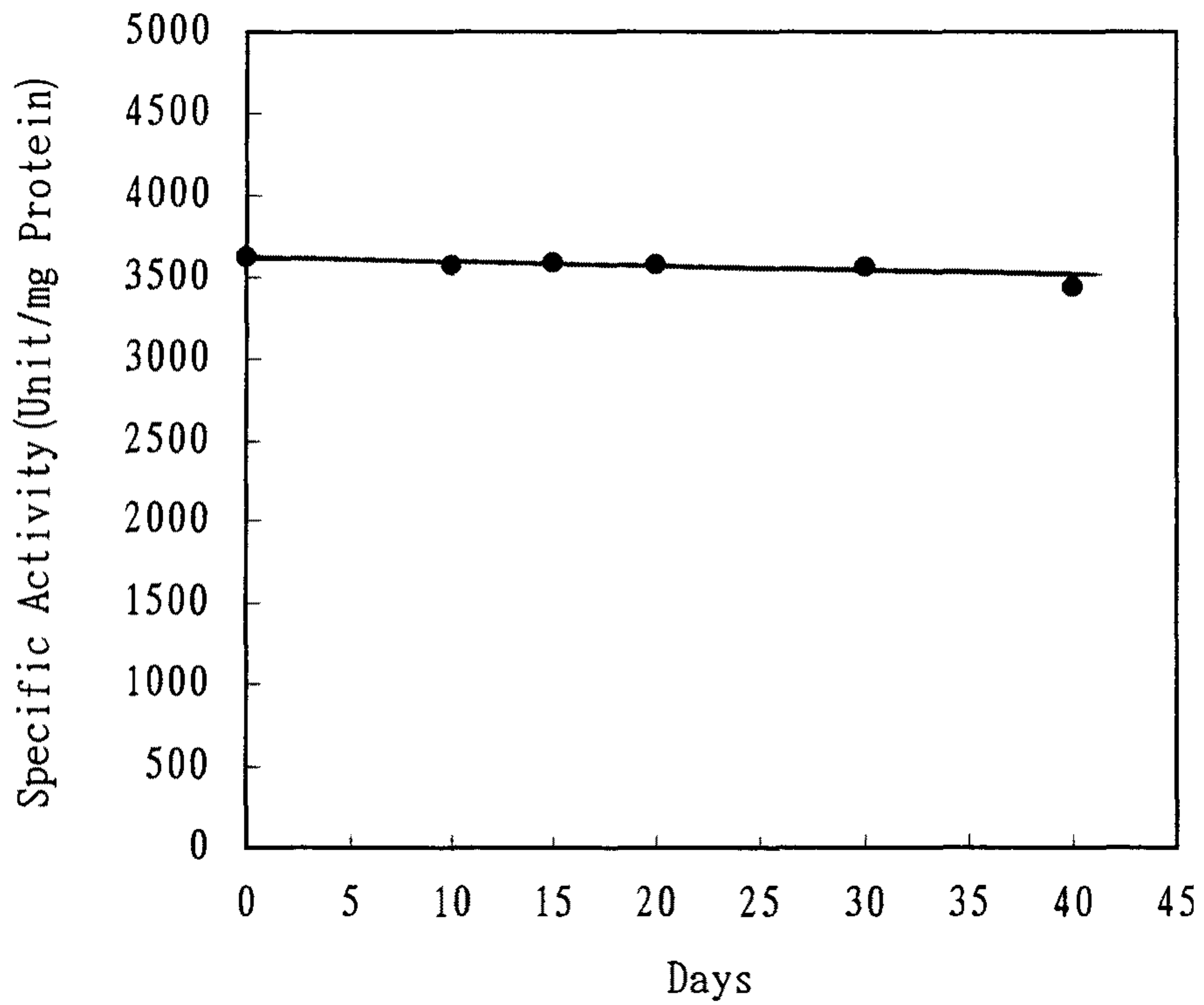


그림 21. 황산암모늄 분획의 침전을 2M 황산암모늄에 현탁한 후 -20°C에서 저장시 peroxidase 활성의 변화

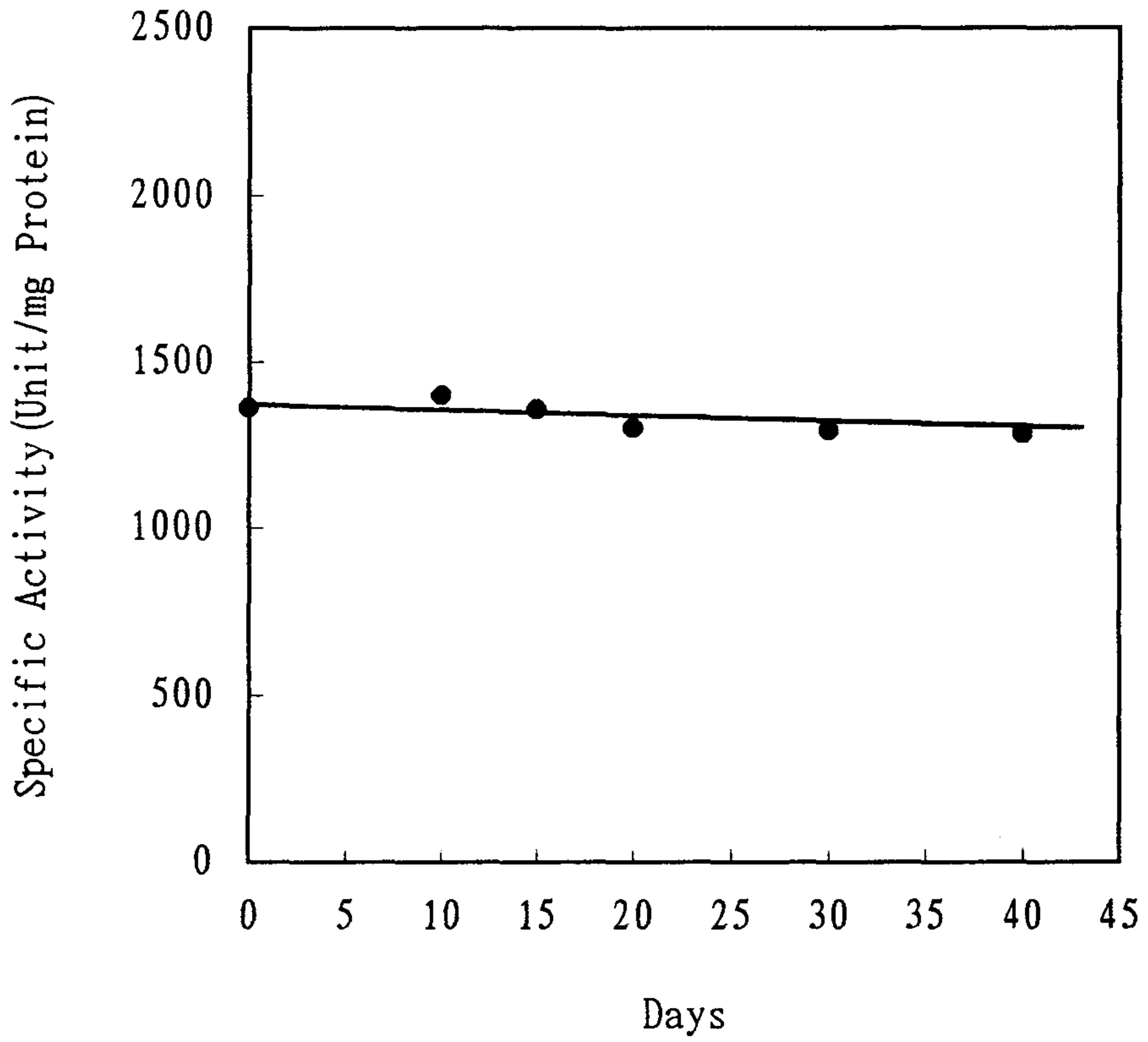


그림 22. 황산암모늄 분획의 침전을 2M 황산암모늄에 현탁한 후 4°C에서 저장시 peroxidase 활성의 변화

마. 침전을 2M 황산암모늄에 현탁한 후 4°C에서 저장
40일의 저장 과정중 약 5%의 효소활성의 감소가 나타났다(그림 22).

이상의 결과로 부터 황산암모늄 분별에 의해 부분 정제된 효소는 투석을 하여 황산암모늄을 효소용액으로 부터 제거한 상태로는 오래 보존할수 없음을 알았다. 한편 투석을 하지 않고 황산암모늄이 존재하는 상태, 또는 투석후 glycerol이 존재하는 조건에서 효소는 효율적으로 저장할수 있음을 알았다. 즉 POX의 활성 유지를 위해서는 고농도의 황산암모늄 또는 glycerol의 공존이 필수적임을 알았다.

제 5 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 발전시키기위하여 효소의 생산에 따른 기본적인 조건구명과 효율적인 관리방법의 설정이 필요하다. 이를 위해서 총 2개년도 연구를 계획하였으며 1차 년도인 본 연구에서 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 배추 뿌리의 효율적 저장을 위하여 배추 뿌리를 냉동, 냉장, 실온 보관, 동결건조 보관등 여러조건을 검토하였다. 그 결과 실온 및 냉장 저장은 배추 뿌리의 연부가 1주일 이내에 시작되었으나 냉동의 경우에는 2개월 이상의 저장에도 효소의 활성에 큰 변화는 없었다. 한편 뿌리를 동결 건조 하였을 경우 동결건조에 의해 효소의 총 활성이 20 - 30 % 수준으로 감소하였다. 따라서 여러 저장 조건을 검토하여 보면 뿌리 자체를 장기 보관하기에는 냉동에 의한 방법이 가장 효율적이었다.

2. 배추 품종간 POX isozyme pattern을 Native PAGE를 이용하여 분석하였다. 그 결과 전반적으로 주된 POX활성 band는 4-5개가 공통적으로 나타나고 있으며 1-2개의 isozyme변화가 인정되고 있다. 한편 주된 효소는 활성의 강약에는 다소 차이는 나타나고 있으나 품종간의 변화폭

은 크지 않은 것으로 나타났다.

3. Crude extract상에서 품종간 POX의 활성 최적 pH, 활성 최적 온도, 내열성등 효소의 활성에 미치는 물리적 영향을 조사한 결과 품종간의 큰 차이는 나타나지 않았다.

4. 배추 뿌리로 부터 효율적으로 POX를 추출하기 위하여 여러가지 파쇄기기를 이용하여 배추 뿌리의 파쇄 방법을 비교하였다.

추출 효율로 보면 생뿌리의 경우에는 녹즙기, Polytron, 유발, Mixer에서 다소 간의 차이는 인정이 되었으나 비슷한 수준으로 추출이 되었으며 전기 맷돌이 가장 낮은 효율을 나타내었다. 반면 냉동시킨 뿌리의 경우에는 동결 및 해동에 따른 뿌리 조직의 변화로 Mixer와 녹즙기가 좋은 추출 효율을 보여주었다. 처리 소요시간과 추출 효율을 종합하여 보면 녹즙기의 이용이 가장 효율적인 방법으로 판단 되었다.

5. 상기 1, 2 항의 결과를 바탕으로 품종간 배추 뿌리의 이용성은 다음과 같다.

- ① 고도 정제를 요하나 POX활성 자체 만을 요구하는 분석 시약의 경우 : 전 품종에서 생산 가능함.
- ② 고도 정제를 요하며 면역학적 특성을 요구하는 분석 시약의 경우 : 몇 개의 그룹으로 나누어진 품종만 가능함.
- ③ POX 활성 만을 요구하는 공업용 효소의 경우 : 전 품종이 가능함.
- ④ 페놀성 폐수처리용의 경우 : 전 품종의 추출물 및 추출 폐기물(찌꺼기)이 이용 가능함.

6. Batch stirred reactor에서 액상효소(1,800 unit/l)를 이용하여 150 ppm의 phenol 용액을 처리한 결과 3시간 후에 96%의 phenol을 증합시켜 침전으로 제거할수 있었다. 한편 pulp를 이용한 air lift reactor (600 unit/l)에서는 120 ppm의 초기 phenol 농도로부터 5 ppm까지 제거 할 수 있었다. Batch stirred reactor에 비하여 air lift reactor에 첨가된 효소의 양이 1/3임에도 불구하고 거의 비슷한 phenol제거 효율을 나타내었다. 따라서 배추 뿌리를 녹즙기로 가공하여 얻은 액상(juice) 및 고형상(pulp)의 POX는 Phenol성 폐수의 처리에 효율적으로 적용될수 있었다.

7. 녹즙기로 파쇄를 할 경우 뿌리당 존재하는 전체 POX중 약 2/3가 액상으로 1/3이 분말상으로 존재하고 있어 추출하고 남은 고형물도 phenol성 폐수의 처리등에 충분히 이용할 가치가 있음을 알수 있었다.

8. 배추 뿌리로 부터 Phytase, catalase, amylase, protease등 산업적 이용성이 많은 효소의 활성을 조사하였으나 조사한 효소의 활성이 매우 낮은 수준이어서 산업적으로 이용하기에는 전혀 기대할수 없었다.

9. 효소의 Q.C.를 위한 효과적이고 신속한 POX활성 측정법을 확립 하였다(부록).

10. 녹즙기로 착즙한 조효소액의 저장은 냉동이 가장 효율적이었으나 냉장 보관의 경우에도 40일 이상의 저장이 가능하였다.

11. Ammonium sulfite 분별법에 의해 부분 정제한 효소의 저장 방

법을 추구한 결과 POX의 활성 유지를 위해서는 고농도의 황산암모늄 또는 glycerol의 공존이 필수적이었다.

(부 록)

1. Peroxidase의 활성 측정 방법

방법 1) 기질로서 amino antipyrine을 이용하는 경우

1) 소요 장비

- 가) 화학천칭 : 측정범위 0.01 - 300 g의 화학천칭 1대
- 나) Spectronic 20 : 또는 이와 같은 성능의 것 1대
- 다) Micro pipet : 200 μ l, 1000 μ l, 5000 μ l 용 각 1개
- 라) 순환 항온조 : 1 대
- 마) 초시계 : 1 대
- 바) pH meter : 1 대

2) 시약의 조제

- 가) 20 mM H_2O_2 : 시판 특급 과산화수소수(35% 용액, 10 M 농도에 해당) 0.2 ml 를 증류수 100 ml에 희석한다. 희석

한 과산화수소 용액은 분해되므로 냉암소에 보관을하며 일주일마다 새로 조제한다.

나) 20 mM 4-aminoantipyrine : 시판 특급 4-aminoantipyrine($C_{11}H_{13}N_3O$, 98% 이상 순도, 분자량 203.25) 0.407 g을 저울로 재어 증류수 100 ml에 용해시킨후 냉암소에 보관을 한다.

다) 20 mM phenol : 시판 특급 phenol(C_6H_5OH , 98.5% 이상 순도, 분자량 : 94.11) 0.18 g을 저울로 재어 증류수 100 ml에 용해시킨후 사용한다.

라) 1 M Tris-HCl (pH 7.0) : 시판 Tris[hydroxymethyl]aminomethane ($C_4H_{11}NO$, 순도 99% 이상, 분자량 121.1) 12.11 g을 저울로 재어 50 ml 속의 물에 용해한 후 pH meter에서 pH 를 보아가며 pH 7.2 부근까지 진한 염산을 가한다. pH 가 7.2 부근이 되면 1 N 염산을 조심스럽게 가하여 pH 7.0으로 맞춘다. pH 7.0으로 조절이 되면 증류수를 가하여 총 액량이 100 ml가 되게하여 사용한다.

마) Ethanol : 시판 특급 ethanol을 그대로 사용

3) 반응

시 약	액 량(μ l)	최종농도(mM)
20 mM H ₂ O ₂	300	3
20 mM Aminoantipyrine	300	3
20 mM Phenol	300	3
1 M Tris-HCl(pH 7.0)	200	100
Crude extract	100	-
Distilled water	800	-
Total Volume	2000	-

20 mM H₂O₂ , 20 mM 4-aminoantipyrine, 20 mM phenol, 1 M Tris-HCl (pH 7.0), 증류수를 위의 표에서 정한양을 시험관에 micropipet을 이용하여 넣고 37°C로 맞추어 놓은 순환 항온조에 넣고 3분간 예열 시킨다. 측정하고자 하는 효소용액 100 μ l를 예열이 된 시험관에 넣고 잘 흔들어 준 다음 항온조에 넣고 초시계를 누른다. 반응을 10분 정도 시킨후 ethanol 2.0 ml를 가하여 반응을 정지시킨다. 이때 ethanol을 가하면서 정확한 반응 시간을 제어 둔다. 반응 정지액은 5 ml용 cell에 옮기고 Spectronic 20으로 500 nm의 파장에서 흡광도를 읽는다. 이때 측정한 값이 1.0을 넘으면 효소의 활성을 정확히 측정할수 없으므로 효소를 희석하여 다시 측정한다. 측정한 흡광도와 quinoneimine의 분자흡광계수(12.2 /cm²/ μ mole)로부터 1분간 생성된

quinoneimine의 량을 환산한다. 효소 1 unit는 1 μ mole의 quinoneimine 색소를 생성시키는데 필요한 효소의 양이므로 다음의 식에 의해 효소의 활성도를 구한다.

4) 효소 활성치의 계산

$$\text{총활성 (unit)} = \frac{A_{500\text{nm}}}{12.2} \times \text{효소희석배수} \times \frac{2 \text{ ml}}{0.1} \times \text{총효소량} \times 2 \text{ (ml)}$$

추출한 조효소의 단백질을 Lowry법으로 측정하여 효소의 비활성 (specific activity)를 구한다.

$$\text{비활성도 (unit/ mg 단백질)} = \frac{\text{총활성(unit)}}{\text{총단백질(mg)}}$$

방법 2) 기질로서 ABTS를 이용하는 경우

1) 소요 장비

가) 화학천칭 : 측정범위 0.01 - 300 g의 화학천칭 1대

- 나) Spectronic 20 : 또는 이와 같은 성능의 것 1대
- 다) Micro pipet : 200 μ l, 1000 μ l, 5000 μ l 용 각 1개
- 라) 순환 항온조 : 1 대
- 마) 초시계 : 1 대
- 바) pH meter : 1 대

2) 시약의 조제

- 가) 20 mM H₂O₂ : 앞과 동일.
- 나) 20 mM ABTS : 시판 특급 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(순도 99% 이상, 분자량 548.7) 1.097 g을 저울로 재어 증류수 100 ml에 용해한다. 냉암소에 보관하며 사용한다.
- 다) 1 M Tris-HCl (pH 7.0) : 앞과 동일.
- 라) Ethanol : 시판 특급 ethanol을 그대로 사용

3) 반응

시약	액량	최종농도
20 mM H ₂ O ₂	300 μ l	3 mM
20 mM ABTS	300 μ l	3 mM
1 M Tris-HCl(pH 7.0)	200 μ l	100 mM
H ₂ O	1100 μ l	-
Enzyme solution	100 μ l	-
Total volume	2000 μ l	

20 mM H₂O₂ , 20 mM ABTS, 1 M Tris-HCl (pH 7.0), 증류수를 위의 표에서 정한양을 시험관에 micropipet을 이용하여 넣고 37°C로 맞추어 놓은 순환 항온조에 넣고 3분간 예열 시킨다. 측정하고자 하는 효소용액 100 μ l를 예열이 된 시험관에 넣고 잘 흔들어 준 다음 항온조에 넣고 초시계를 누른다. 반응을 10분 정도 시킨후 ethanol 2.0 ml를 가하여 반응을 정지시킨다. 이때 ethanol을 가하면서 정확한 반응 시간을 제어 둔다. 반응 정지액은 5 ml용 cell에 옮기고 Spectronic 20으로 470 nm의 파장에서 흡광도를 읽는다. 이때 측정한 값이 1.0을 넘으면 효소의 활성을 정확히 측정할수 없으므로 효소를 희석하여 다시 측정한다. 측정한 흡광도와 산화 ABTS의 분자흡광계수(18.6 /cm²/ μ mole)로부터 1분간 산화된 ABTS의 량을 환산한다. 효소 1 unit는 1 μ mole의 ABTS를 산화시키는데 필요한 효소의 양이므로 다음의 식으로부터 효소의 활성도를 구한다.

4) 효소 활성치의 계산

$$\text{총활성도 (unit)} = \frac{A_{470\text{nm}}}{18.6} \times \text{효소희석배수} \times \frac{2 \text{ ml}}{0.1} \times \text{총효소량 (ml)} \times 2$$

추출한 조효소의 단백질을 Lowry법으로 측정하여 효소의 비활성 (specific activity)를 구한다.

$$\text{비활성도 (unit/ mg 단백질)} = \frac{\text{총활성(unit)}}{\text{총단백질(mg)}}$$

참 고 문 헌

1. A. M. Klibanov, T. M. Tu and K. P. Scott (1983), *Science*, **221**, 259.
2. A. M. Klibanov, Z. Berman and B. N. Alberti (1981), *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6263.
3. J. S. Dordick, M. A. Marletta and A. M. Klibanov (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 31.
4. M. G. Paice, and L. Jurasek (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 477.
5. J. F. Kennedy, and J. M. S. Cabral (1987), *Enzyme Technology*, **7a**, 347, VCH Publishers.
6. R. P. Martyn, S. C. Branzei and G. T. Sperl (1981), *Bios.*, **52**, 8.
7. S. L. Neidleman, and J. Geigert (1986), *Biohalogenation*, 56, John Wiley & Sons, Inc., New York.
8. T. A. Kadima, and M. A. Pickard (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3473.
9. Y. Yamada (1984), *Plant Cell Culture*, 84, Kodansha, Tokyo.
10. 김수경, 곽상수, 정경희, 민성란, 박일현, 유장렬 (1994), *한국생화학회지*, **27**, 132.
11. S. Loprasert, S. Negoro and H. Okada (1988), *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1971.
12. D. R. Morris, and L. P. Hager (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 1763.
13. M. A. Pickard, and A. Hashimoto (1988), *Can. J. Microbiol.*, **34**, 998.
14. Y. Shinmen, S. Asami, T. Amachi, S. Shimazu and H. Yamada (1986), *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 247.

15. G. H. Fang, P. Kenigsberg, M. J. Axley, M. Nuell and L. P. Hager (1986), *Nucleic Acids Res.*, **14**, 8061.
16. M. J. Nuell, G. H. Fang, M. J. Axley, P. Kenigsberg and L. P. Hager (1988), *J. Bacteriol.*, **170**, 1007.
17. 이 해익, 박 경숙, 최 용순, 이 상영 (1991), 한국산업미생물학회지, **19**, 470.
18. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1953), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
19. S. Nakamoto and N. Machida (1992), *Water Res.*, **26**, 49.
20. J. S. Dordick, M. A. Marletta and A. M. Klivanov, (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 31.
21. G. Prestamo (1989), *J. Food Science* , **54**, 760.
22. B. Halpin, R. Pressey, J. Jen and N. Mondy (1989), *J. Food Science*, **54**, 643.
23. R. N. Chibbar and R. B. van Huystee (1984), *Plant Physiol.*, **75**, 956.
24. K. Ichikawa, K. Okazaki, K. Kimoto and Y. Watanabe (1981), *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1297.
25. S. Loprasert, S. Negoro and H. Okada (1988), *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1971.
26. Y. Fukumori and T. Yamanaka (1985), *J. Biochem.*, **98**, 1055.
27. M. Iqbal, D.K. Mercer, P.G.G. Miller and A.J. McCarthy (1994), *Microbiology*, **140**, 1457.
28. 박근형, 김선재, 박종대, 이란숙, 현규환, 곽상수, 유장렬 (1993), 식물조직배양 **20**, 71.
29. D. J. Bowles (1990), *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 873.
30. M. M. Bradford (1976), *Anal. Biochem.*, **72**, 248.

31. M. Parkinson, Cotter, and P. J. Dix (1990), *Plant Science*, **66**, 271.
32. Y. K. Arora and D.S. Wagle (1985), *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **180**, 75.
33. 김영미, 한달호, 정연호, 이상영, 이해익 (1995), *한국생물공학회지*, **10**, 335.
34. P. Ander, K. E. Eriksson, M. C. Kolar, and K. P. Kringstad (1977), *Papperstidn*, **80**, 454.
35. H. Galliano, G. Gas, J. L. Seris, and A. M. Boudet (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 478.
36. R. Kondo, K. Kurashiki, and K. Sakai (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 921.
37. U. Malolepsza and H. Urbanek (1994), *J. Phytopathology* **141**, 314.
38. N. Katagiri, Y. Tsutsumi, and T. Nishida (1995), *Appl. Environ. Microb.*, **61**, 617.
39. A. Kobayshi, Y. Koguchi, and H. Kanzaki (1994), *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 133.
40. G. R. Siragusa, and M. G. Johnson (1989), *Appl. Environ. Microb.*, **55**, 2802.
41. R. J. Bruce and C. A. West (1989), *Plant Physiol*, **91**, 889.