

배추 뿌리의 Peroxidase를 이용한 Phenol의 제거

*김 영 미 · 한 달 호 · 정 연 호 · *이 상 영 · †이 해 익

강원대학교 생물응용공학과 · 식품공학과*

Phenol Removal by Peroxidases Extracted from Chinese Cabbage Root

Young-Mi Kim*, Dal-Ho Han, Yeon-Ho Jeong, Sang-Young Lee* and Hae-Ik Rhee†

Department of Applied Biology and Technology, and *Department of Food Science and Technology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

ABSTRACT

Solid and liquid phase peroxidases were extracted from Chinese cabbage roots by using commercial juicer in order to use peroxidases from agricultural waste for industrial applications. Since peroxidases are distributed into 66 % in liquid (juice) and 34 % in solid phase (pulp), enzymes from both phases were applied to investigate the enzymatic removal of phenol from waste water. After contacting 150 ppm phenol solution with liquid phase enzyme (1,800 unit/ℓ) for 3 hours in a batch stirred reactor, 96 % of phenol could be removed through polymerization and precipitation. Also, phenol could be removed from initial 120ppm to 5ppm by applying solid phase enzyme in an air lift reactor (600 unit/ℓ). Almost equivalent efficiencies of phenol removal were observed between two systems, eventhough only one third of the enzymes in batch stirred reactor was applied in air lift reactor. The possible reason for this phenomenon is because peroxidases exist as immobilized forms in solid phase.

서 론

Peroxidase (donor : hydrogen peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7, POX)는 생물계에 보편적으로 존재하는 효소로서 과산화수소를 물로 환원시키며 이때 유기 화합물을 산화시키는 반응을 촉매한다. 본 효소는 효소의 반응이 예민한 점을 이용하여 임상 검사용 시약, enzyme immunoassay 및 monoclonal antibody의 screening assay의 검출용 시약으로 뿐만 아니라 독성 폐기물의 제거 등에 이용성이 제기되고 있다.

POX의 산업적 이용 가능성은 여러 연구자들에 의

하여 꾸준히 검토되어 왔다. Klibanov 등은 석탄 가공 폐수중에 존재하는 phenol성 화합물의 제거를 위하여 POX를 이용한 효소적 방법을 제시한 바 있다. 그 결과 POX의 반응에 의해 실제로 방류되는 산업 폐수로부터 97~99%의 phenol을 침전으로 제거할 수 있었다(1). 또한 POX의 선택적인 hydroxylation반응을 유기 합성에 이용하여 L-tyrosine으로부터 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine(L-DOPA), D-(-)-p-hydroxyphenylglycine으로부터 D-(-)-3,4-dihydroxyphenylglycine, L-(-)-phenylephrine으로부터 L-epinephrine (adrenaline)을 70% 이상의 높은 수율로 합성하였다(2). POX에 의한 phenol성 화합물의 중합화 반응을 폐수로부터

† Corresponding Author

phenol의 단순한 제거뿐만 아니라 새로운 전기 절연성 수지의 합성으로 연결하고자 하는 보고도 있다(3). POX를 이용한 폐수 처리의 또 다른 연구로는 pulp공장 폐수 중의 저분자 색소의 탈색을 시도하여 과산화수소만을 이용한 탈색보다 60% 이상의 탈색도를 이룬 바 있다(4).

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(5-8). 현재 사용되고 있는 POX는 horseradish 기원의 효소가 주류를 이루고 있으며 POX의 공업적 중요성으로 인하여 horseradish, 고구마 등의 조직 배양을 통한 대량생산이 시도되고 있으나(9, 10) 상업화 단계에는 이르지 못하고 있다. 한편으로는 POX 고생산 균주의 screening이 활발하게 이루어지고 있고 그 중에서 일부는 효소학적 성질(11-14)이 밝혀짐과 동시에 유전자의 단리(15, 16)를 통하여 효소를 대량생산 할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 저자들은 horseradish POX를 대체할 새로운 효소원의 개발을 목적으로 한국에 자생하고 있는 식물체 중에서 horseradish가 속하여 있는 십자화과 식물을 대상으로 하여 POX의 활성 분포를 조사한 바 있다. 그 결과 배추 뿌리에 다량의 POX가 분포함을 확인하여 배추 뿌리의 POX를 정제하여 효소학적 특성을 밝힘과 동시에 산업적 이용 가능성을 제시한 바 있다(17). 또한 배추 뿌리 기원의 효소는 넓은 작용 pH 및 비교적 높은 열안정성을 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, 분말상 효소는 air lift reactor를 이용하여 시도함으로써 농산 폐기물의 효과적인 이용 가능성을 타진하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

본 연구에 사용한 phenol, 4-aminoantipyrine, pyrogallol은 和光(東京, 日本) 제품을, acrylamide, glycine은 Sigma(MO, U. S. A.) 제품을 이용하였으며 기타시약은 시판 특급시약을 이용하였다.

시료

POX 효소원으로 사용한 배추 뿌리는 1994년 7

월 강원도 평창군 하진부에서 채취한 고냉지, 만점, 정상, 탐복, 삼미 등 5품종이었다. 채취한 시료는 당일 세절한 후 녹즙기(Angel 녹즙기, 한국)로 착즙하여 juice와 pulp로 분리하였다. 분리한 juice는 더 이상의 처리를 하지 않고 액상의 효소원으로, pulp는 분말상의 효소원으로 사용하였다. 이들 액상 및 분말상의 효소는 -20°C 로 보관하면서 필요시 꺼내어 사용하였다.

효소의 활성 측정

POX의 활성은 $4\text{mM H}_2\text{O}_2$, $4\text{mM 4-aminoantipyrine}$, 4mM phenol , $100\text{mM Tris-HCl (pH 8.0)}$ 그리고 적당량의 효소로 구성된 표준 반응액 속에서 효소에 의하여 생성된 quinoneimine의 붉은 색소의 양을 500nm 에서 정량하였다(1). POX 1unit는 37°C 에서 1분간 $1\mu\text{mole}$ 의 quinoneimine 색소를 생성시키는데 필요한 효소의 양으로 하였으며 quinoneimine의 분자흡광계수($12.2/\text{cm}^2/\mu\text{mole}$)로부터 생성된 색소의 양을 환산하였다. 반응 최적 pH는 각 pH범위에 해당하는 완충용액을 100mM 이 되게 가하여 위의 방법과 같게 측정하였다. 또한 반응 최적온도는 표준반응액에서 반응 온도를 달리하여 측정하였다. 단백질의 정량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry법(18)으로 하였다.

전기영동

POX의 zymogram은 native polyacrylamide gel electrophoresis을 이용하였다(17). 효소의 활성염색은 전기영동이 끝난 gel을 $100\text{mM Tris-HCl (pH 7.0)}$, $10\text{mM H}_2\text{O}_2$, 10mM pyrogallol 용액 속에 담그어 37°C 에서 10분간 incubation하여 POX의 위치를 확인하였다. POX의 활성이 있는 부위는 갈색으로 착색이 일어난다.

Air Lift Reactor

본 실험에 사용한 air lift reactor는 Fig. 1과 같은 구조를 하고 있으며 reactor의 working volume은 1.6l 이었다. Reactor의 jacket은 온수를 연결하여 reactor내의 온도를 37°C 로 유지하였으며 공기유속은 350ml/min 이었다.

Phenol의 정량

POX에 의한 phenol 중합제거 반응속도는 잔존 phenol의 양을 측정하여 구하였다. 즉 반응액 1ml

Table 1. Extraction of peroxidases from different cultivars of Chinese cabbage

Cultivars	Activity		Total Activity		Specific Activity
	Juice (unit*/ml)	Pulp (unit/g)	Juice (unit/100g root)	Pulp	Juice (unit/mg protein)
Gonaengji	56	67	3,527	1,767	5.7
Manjum	31	37	1,816	874	3.6
Jungsang	28	24	1,480	799	3.3
Tambok	23	42	956	2,079	3.3
Sammi	12	20	868	506	1.8

* μ mole quinoneimine/min.

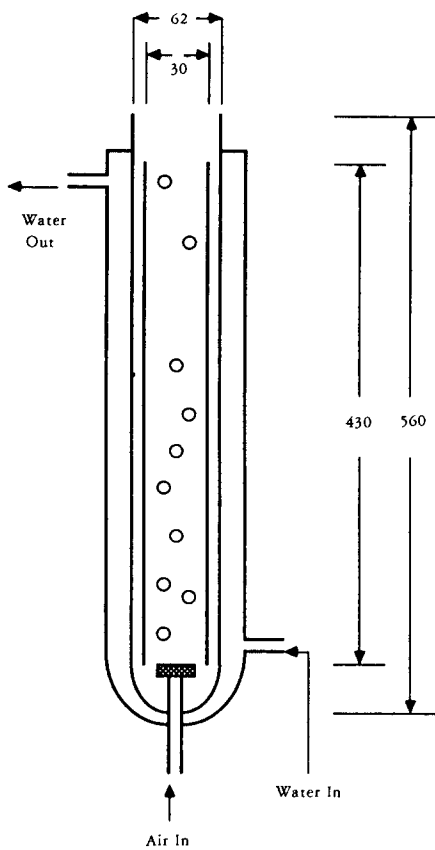


Fig. 1. Schematic diagram of air lift reactor.
Unit in mm.

에 1N HCl 0.2ml를 가하여 반응을 정지시키고 1N NaOH 0.2ml를 가하여 중화시킨 다음 10,000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액 1ml에 4%

AIK(SO₄)₂·12H₂O 0.2ml를 가하여 침전을 숙성시킨 후 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 phenol polymer를 침전으로 제거한 다음 상등액에 남아 있는 phenol을 정량하였다. Phenol 정량은 aminoantipyrine을 이용한 화학적 방법으로 하였다(19).

결과 및 고찰

POX의 활성 및 분포

POX는 생체 내에서 cytosol 또는 막계에 존재하므로 효소적 성질이 다르게 나타날 뿐 아니라 추출 방법도 대상 효소에 따라서 달라지게 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 Table 1에 나타내었다. 배추 뿌리를 세절한 후 녹즙기로 파괴시킬 경우 고형물은 수분 함량이 65% 정도의 고운 분말상으로 얻을 수 있었으며 1회 파괴 후 더 이상의 액상효소를 추출하지 않고 그대로 분말 효소원으로 이용하였다. Table 1에 나타난 바와 같이 품종간에 있어서 액상 효소와 분말상 효소의 활성 및 전체 활성 등이 다르게 나타났다. 고냉지 품종의 경우 뿌리당 존재하는 전체 POX 중 약 2/3가 액상으로 1/3이 분말상으로 존재하고 있어 추출하고 남은 고형물도 충분히 이용할 가치가 있음을 알 수 있었다. 시험한 5개 품종 중 고냉지 품종으로부터 가장 많은 효소를 얻을 수 있었으므로 다음의 phenol 제거 실험은 이 효소를 이용하여 행하였다. 위의 방법으로 얻은 액상효소의 활성 최적 pH 및 온도를 측정하였으며 그 결과를 Fig. 2 및 Fig. 3에 나타내었다. 이들 그림에서

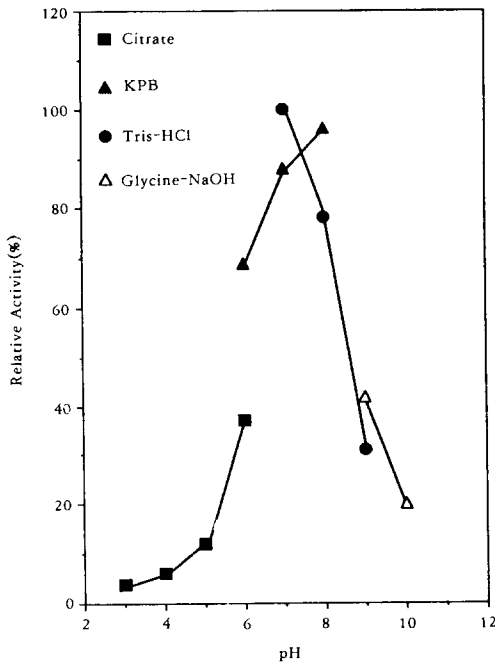


Fig. 2. Effect of pH on the Chinese cabbage peroxidase activity. The reaction was carried out as described in Materials and Methods.

알 수 있듯이 최대 활성은 품종간에 약간의 차이는 있으나 pH 7~8, 40~50°C에서 나타나 정제된 배추 뿌리 기원의 POX와 큰 차이가 없었다(17).

배추 품종간 POX의 isozyme 분포양상을 검토하기 위하여 액상 효소를 시료로 하여 native polyacrylamide gel electrophoresis를 한 후 활성 염색을 통하여 isozyme을 확인하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 5품종간에는 전기영동상으로 거의 유사한 isozyme이 존재하는 것을 알 수 있다. 이는 배추 뿌리의 가공을 통한 POX의 생산에 있어서 배추의 품종에 따른 isozyme의 변화 등을 고려하지 않아도 된다는 것을 말해 주고 있다.

Batch Reactor를 이용한 Phenol의 제거

액상의 POX를 이용하여 batch reactor에서 phenol의 제거를 검토하였다. 실제 방출되는 phenol폐수의 일종인 석탄 폐수는 phenol, ammonia, chloride 등을 함유하고 있으며 8.6 전후의 pH값을 나타내고 있다(1). 따라서 본 연구에서는 석탄 폐수를

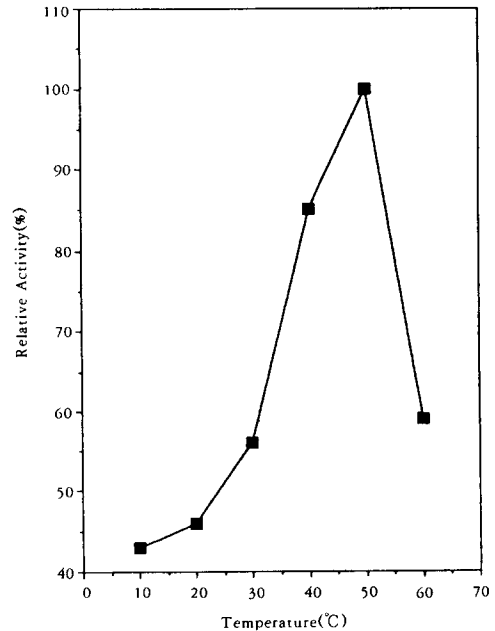


Fig. 3. Effect of temperature on the Chinese cabbage peroxidase activity. The reaction was carried out as described in Materials and Methods.

모델로하여 그와 비슷한 반응 조건인 pH 8.0에서 phenol의 제거를 검토하였다. 또한 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 반응 최적온도는 50°C로 나타났으나 실제 운전시의 에너지 소요를 고려하여 37°C를 반응 온도로 하였다. 따라서 앞에서 검토한 바와 같이 반응 조건은 300ml 비이커에 20mM Tris-HCl(pH 8.0), 각 농도의 phenol, 고냉지 액상효소(1,800 unit/ℓ) 그리고 과산화수소로 구성된 반응액 100ml를 37°C에서 300rpm으로 교반하여 반응시켰다. 반응액의 초기 phenol 농도는 각각 150, 200, 500ppm이었으며 과량의 과산화수소에 의한 효소의 불활성화를 최대한으로 억제하기 위하여 35% H₂O₂를 1시간 동안 각각 0.034, 0.068, 0.16mM/min의 속도로 peristaltic pump를 이용하여 공급하였다. 반응이 진행되면서 반응액에 잔존하는 phenol의 양을 정량하여 제거된 phenol의 양을 구하였다. 그 결과 Fig. 5에서 나타나는 바와 같이 각각의 phenol농도에서 모두 실제적인 반응이 1시간 전후에 종결함을 알 수 있다. 반응초기의 phenol농도가 500ppm

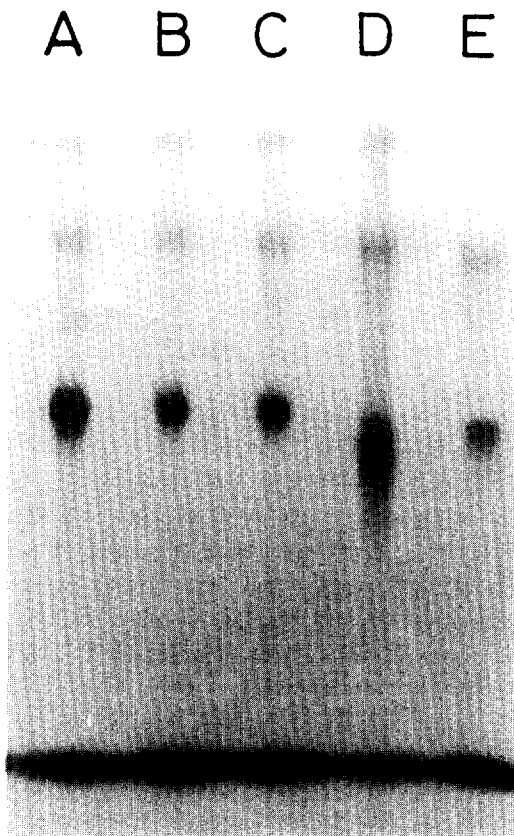


Fig. 4. Electrophoretic pattern of peroxidases in polyacrylamide gel. Lane A, crude extracts of Gonaengji, B, crude extracts of Manjum, C, crude extracts of Jungsang, D, crude extracts of Tambok, E, crude extracts of Sammi. Activities of peroxidase were stained with 10mM pyrogallol.

의 반응액인 경우에는 3시간 반응 후 잔존하는 phenol의 양은 215ppm인데 반하여 200ppm일 경우에는 잔존하는 phenol의 농도가 24ppm이었으며, 150ppm인 경우에는 잔존 phenol이 6ppm으로 각각 57, 88, 96%의 phenol이 제거되었음을 나타내고 있다. 초기 반응액의 phenol 농도가 높을수록 제거율이 낮은 것은 POX와 생성물인 phenol polymer 사이의 불가역적인 inactivation이 일어나는 결과로 판단된다(12). 또한 반응계 내의 낮은 POX농도는 효소의 불활성화를 촉진시켜 phenol의 불완전한 제거의 원인이 되는 것으로 나타나고 있어(1) 효소와 phenol의 균형있는 농도가 중요함을 알 수 있다.

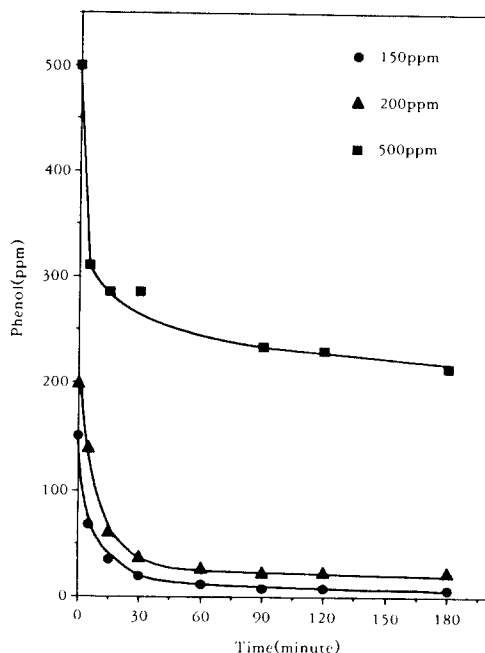


Fig. 5. Removal of phenol in a batch stirred reactor with crude extracts(juice). The reaction was carried out at 37°C in 20mM Tris-HCl(pH 8.0) containing 500, 200, 150ppm of phenol. The volume of reaction mixture was 100ml. The agitation speed was 300rpm and hydrogen peroxide was fed at a rate of 0.17, 0.068 and 0.034mM/min, respectively.

따라서 높은 농도의 phenol 폐수는 이를 희석시켜 150ppm 전후의 낮은 농도로 reactor에 공급하는 것이 바람직하다.

Air Lift Reactor에 의한 Phenol 제거

Table 1에 나타난 바와 같이 고냉지 품종의 경우 뿌리 전체의 POX활성 중 pulp에도 34%가 남아 있으므로 이를 이용할 방안으로 air lift reactor를 운전하였다. Fig. 1의 구조를 갖는 reactor에 600unit/l가 되게 pulp를 가한 1,200ml의 반응액을 37°C, pH 8.0의 반응조건으로 유지하며 3시간 반응시켰다. 35% H₂O₂를 1시간 동안 0.034mM/min로 peristaltic pump를 이용하여 연속주입하였다. 그 결과 반응초기의 120ppm의 phenol이 3시간 반응으로 잔존하는 phenol의 양은 5ppm이었다. Fig. 6에서 알

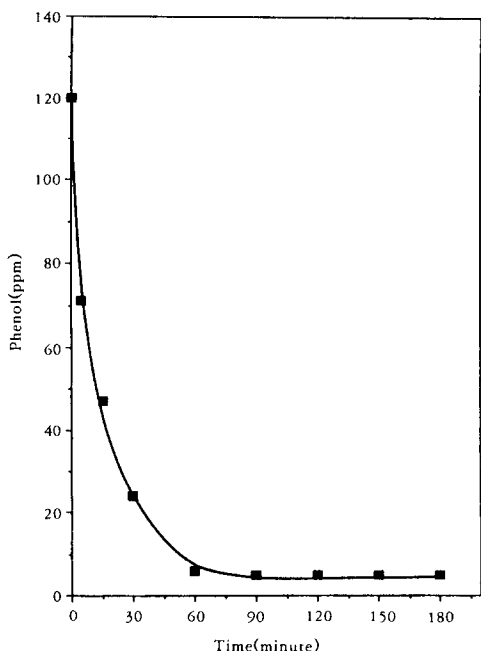


Fig. 6. Removal of phenol in air lift reactor with pulps. The reaction was carried out at 37°C in 20mM Tris-HCl(pH 8.0) containing 120ppm of phenol. The reaction volume was 1,200ml and hydrogen peroxide was fed at a rate of 0.034mM/min.

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 phenol 제거 효율을 나타내는 것은 POX가 고정화된 형태로 존재함으로써 나타나는 특징으로 추정된다. 이는 pulp가 배추 뿌리로부터 POX를 추출하고 남은 단순한 잔사가 아니라 막결합 형태의 POX를 이용하여 phenol 제거에 충분히 이용될 만한 가치가 있다는 것과 더불어 air lift reactor에서 더욱 유용하게 이용될 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

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(1, 2, 19, 20). 이는 실제적인 폐수 처리에서 본 연구에서와 같이 최소한의 가공을 거친 粗醣素상태로서도 충분히 적용될 수 있음을 나타내고 있다. 한편, 배추 뿌리를 착즙하여 juice와 pulp를 분리하는데 있어 pulp에도 뿌리 전체 효소량 중 34%가 존재함은 Table 1에서 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 착즙 후 남은 pulp는 평균 5mm 전후의 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 여러 가지의 반응조 중에서 air lift reactor를 채택하여 phenol 제거력을 검토하였다. Air lift reactor에 pulp를 가하여 POX의 활성을 이용한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 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 이용될 수 있음을 보여주고 있다.

POX는 자연계에 널리 존재하는 효소로서 고구마(10), kiwifruit(21), green pea(22)와 peanut(23) 등의 식물체 및 *Pellicularia filamentosa*(24), *Bacillus stearothermophilus*(25)과 *Halobacterium halobium*(26), *Streptomyces thermoviolaceus*(27) 등의 미생물 기원의 효소적 성질이 밝혀져 있다. 이들 여러 기원의 POX는 유해 물질의 제거와 같은 산업적 목적으로 다양한 적용이 모색되어 왔으나 처리공정 중 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 해소할 수 있게 될 것이다.

배추는 우리 나라에서 연간 400만톤 이상 재배되

는 주요 채소의 하나이나 식용으로는 지상부만 이용하고 뿌리 부분은 밭에서 그대로 폐기되고 있는 실정이다. 따라서 배추 뿌리는 생산을 위한 별도의 노력과 비용이 거의 들지 않으므로 지금까지 제시되어 온 어떠한 효소원보다 경제성을 가지며 대량 공급 및 안정적인 공급능력을 가진 유용한 biomass이라고 할 수 있다. 배추 뿌리 기원 POX의 생산성 및 효소적 특성은 산업적 이용성이 뛰어난 것으로 판명이 된다(1). 농산 폐기물인 배추 뿌리의 가공을 통하여 새로운 부가가치의 창출을 기대하며 배추 재배 농가의 소득 증대를 목표로 현재 배추 뿌리로부터 POX의 대량 생산, 정제 및 이용에 관한 연구가 진행중에 있다.

요 약

농산 폐기물인 배추 뿌리에 다량으로 존재하는 peroxidase를 산업적으로 이용하기 위하여 배추 뿌리를 juicer로 대량 추출하여 액상효소 부분과 고형물 부분을 얻었다. Peroxidase는 액상 부분에 약 66%, 고형물 부분에 34%가 분포되어 있으므로 두 부분을 모두 이용하여 phenol성 폐수의 효소적 처리를 검토하였다. Batch stirred reactor에서 액상효소(1,800unit/ℓ)를 이용하여 150ppm의 phenol 용액을 처리한 결과 3시간 후에 96%의 phenol을 중합시켜 침전으로 제거할 수 있었다. 한편 pulp를 이용한 air lift reactor(600unit/ℓ)에서는 120ppm의 초기 phenol 농도로부터 5ppm까지 제거할 수 있었다. Batch stirred reactor에 비하여 air lift reactor에 첨가된 효소의 양이 1/3임에도 불구하고 거의 비슷한 phenol 제거 효율을 나타내었다.

감 사

본 연구는 1994년도 농림수산부 현장애로 기술개발 사업비의 일부로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. A. M. Klivanov, T. M. Tu and K. P. Scott (1983), *Science*, **221**, 259.
2. A. M. Klivanov, Z. Berman and B. N. Alberti (1981), *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6263.
3. J. S. Dordick, M. A. Marletta and A. M.

- Klivanov(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, 광상수, 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. 이해익, 박경숙, 최용순, 이상영 (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.