

## 전기자극 하에서 알콜 산화효소의 안정화연구; 당, 히드로젤, 계면활성제 효과

<sup>1</sup>김 범 수 · <sup>1</sup>이 강 민 · <sup>2</sup>J. F. Biellmann · <sup>†</sup> <sup>1</sup>김 경 숙  
<sup>1</sup>전북대학교 자연과학대학 분자생물학과, <sup>2</sup>Institute of Chemistry, Louis Pasteur University, France  
(접수 : 2006. 8. 10., 게재승인 : 2006. 12. 4.)

## Stabilization of Alcohol Oxidase under Electrostimulation; Sugars, Hydrogels and Surfactants Effect

Beom-Su Kim<sup>1</sup>, Kang-Min Lee<sup>1</sup>, J. F. Biellmann<sup>2</sup>, and Kyung-Suk Kim<sup>† 1</sup>  
<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, College of Natural Science, Chonbuk University, Chonju 561-756, Korea  
<sup>2</sup>Institute of Chemistry, Louis Pasteur University, 1, rue Blaise Pascal, 67008 Strasbourg, France  
(Received : 2006. 8. 10., Accepted : 2006. 12. 4.)

We investigated the activity and stability of alcohol oxidase from *Hansenula sp.*, *Pichia pastoris*, and *Candida boidinii* under the electric stimulation. The activity and stability of alcohol oxidase depended on electric output voltage, electric stimulation time. This inactivation of the enzyme under electric stimulation could be recovered by stabilizing additives such as sugars, surfactants and hydrogels. These alcohol oxidase was more stable in trehalose, Triton X-100, Brji solution and alcohol oxidase from *Hansenula* is more stable than that from *P. pastoris*, and *C. boidinii*. The stabilizing of enzymes against electric stimulation showed a great potential use of enzymes in biotechnology and medical engineering fields.

**Key Words** : Electrostimulation, alcohol oxidase, stability

### 서 론

온도, 압력 뿐만 아니라 전기 또한 생명현상에 많은 영향을 준다. 전기자극은 세포수준에서 세포 내의 세포의 증식, 세포분열, 세포의 막 투과, 세포의 활성화에 많은 영향을 줄 수 있음이 알려져 있다(1-3). 뿐만 아니라 단백질 수준에서도 역시 전기자극은 효소 반응속도, 효소의 전이 상태 안정화, 효소의 3차구조의 변화, 효소와 반응매질과 상호작용에 크게 영향을 준다. 그러나 이들 전기자극이 생체 물질에 어떠한 영향을 주며, 어떠한 기작에 의해서 작용되는지 구체적인 연구는 거의 진행되어 있지 않다.

본 연구는 전기자극이 생체 단백질인 효소의 활성도와 안정도에 어떠한 영향을 주는가를 연구하고 당, 히드로젤, 계면 활성제가 전기자극하에서 효소의 안정도 미치는 영

향을 연구하였다.

본 연구를 위하여 최근 알콜 바이오센서에 널리 사용하고 있는 알콜 산화효소를 사용하였다. 알콜 산화효소 (E. C. 1.1.3.13)는 *Hansenula sp.*, *Pichia pastoris*, *Candida boidinii*와 같은 다양한 곳으로부터 분리되었으며 보통 8개의 subunit를 가지고 있으며 각각은 FAD를 보조인자로 가지고 있다(4, 5). 단백질에 결합되어 있는 보조인자는 주로 N-terminal에 결합되어 있는 아데닌에 의하여 결합되어 있다. 알콜 산화효소는 메탄올 에탄올과 같은 분자량이 작은 일차 알콜을 알데히드로 산화시킨다(6, 7). 이 연구에서 안정도는 메탄올 산화의 반응속도를 측정하여 결정하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료

*Hansenula sp.*, *C. boidinii*, *P. pastoris*로부터 분리한 알콜 산화 효소, peroxidase는 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 완충용액은 50 mM Potassium phosphate (pH 7.0) 완충용액을 사용하였다. 효소안정화에 필요한 CMC (carboxymethylchitosan), carbopol, agarose, trehalose, mannose,

<sup>†</sup> Corresponding Author : Department of Molecular Biology, College of Natural Science, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

Tel : +82-63-270-3341, Fax : +82-63-270-3345

E-mail : sukkim@chonbuk.ac.kr

maltose, sucrose, TritonX-100, Tween-80, Tween-20, Brij은 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. 효소의 활성도 측정은 UV-visible spectrophotometer (HITACHI U-3300, Japan)을 사용하였다. 효소반응에서 전기자극기는 BDS-301 Digital Stimulator (Biotron, 한국) 모델을 사용하였다.

**전기자극기**

국내 바이오트론에서 제작한 BDS-301 Digital 전기자극기를 사용하여 연구하였다. 이 기기는 생리학, 생물학, 임상연구에 사용하는 전기자극용 실험 기기로서 출력전압은 0.01 V~100 V까지이며 다양한 전기 자극강도, 자극시간 자극양상의 변화가 가능하다. 사용 전에 calibration하여 사용한다.

**알콜 산화효소 활성도 결정**

알콜 산화효소 활성도는 couple assay방법으로 측정하였다. 알콜 산화효소는 산소 존재 하에 알콜을 알데히드로 산화시키면서 산소를 과산화수소를 만든다. 이 때 생성되는 과산화수소는 peroxidase 존재 하에 ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)와 반응한다. 이 때 생성되는 물질을 UV-visible 분광기를 사용하여 420 nm에서 활성도를 측정하였다.

**전기자극하에서 알콜 산화효소 안정도 결정**

전기자극 안정도실험은 완충용액의 최종농도가 0.5 U 알콜 산화효소, 250 mM methanol, 100 U peroxidase, 50 μM ABTS 조건에서 효소 활성도를 결정하였다. 효소 안정도실험은 효소 (5 U/ml)를 완충용액에 넣은 후 전기자극기를 사용하여 출력 전압, 강도와 시간을 조절하면서 자극을 주었다. 자극 후 효소용액을 0.1 ml 취하여 위와 같은 조건에서 효소 활성도를 측정하였다.

**전기자극하에서 당에 의한 알콜 산화효소 안정화**

전기자극을 받으면 효소는 비활성화된다. 비활성화된 효소가 여러 가지 당에 의하여 안정화되는 연구를 하였다. 사용한 당으로 trehalose, mannose, maltose, sucrose를 사용하였다. 10% sugar 용액에 효소 (10 U/ml)를 넣고 자극을 준 후 0.1 ml을 취하여 기질물질을 메탄올을 넣고 위와 같은 효소 활성도 실험 조건에서 반응시켜 UV-visible 분광기를 사용하여 420 nm에서 효소 활성도를 측정하였다. 당을 넣지 않은 용액에서 위와 동일하게 전기자극을 가한 후 효소 안정도를 비교하였다.

**전기자극하에서 계면활성제에 의한 알콜 산화효소 안정화**

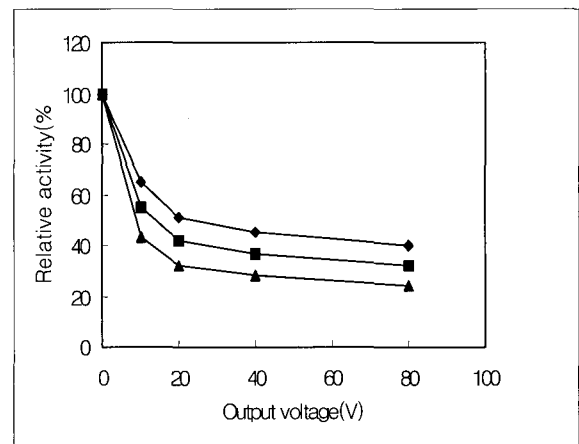
계면 활성제에 의한 효소의 안정화를 연구하기 위하여 TritonX-100, Tween-80, Tween-20, Brij와 같은 비이온성계면활성제를 사용하였다. 효소 활성도는 위와 같은 방법으로 결정하였다. 1% 계면활성제용액에 효소를 넣고 자극을 준 후 효소 용액에 기질물질을 넣고 반응시켜 위와 동일한 실험조건에서 효소 활성을 측정하였다.

**전기자극하에서 히드로젤에 의한 알콜 산화효소 안정화**

히드로젤은 CMC, agarose, carbopol을 사용하였다. 히드로젤은 농도가 증가할수록 점성도가 증가해서 어느 농도 이상에서는 효소 활성도를 측정할 수 없기 때문에 1% 농도에서 실험하였다. 위와 같은 실험 조건에서 반응시켜 생성되는 물질을 UV-visible 분광기를 사용하여 420 nm에서 활성도를 측정하였다. 히드로젤을 넣지 않고 전기자극을 가한 효소의 활성과 비교하였다.

**결과 및 고찰**

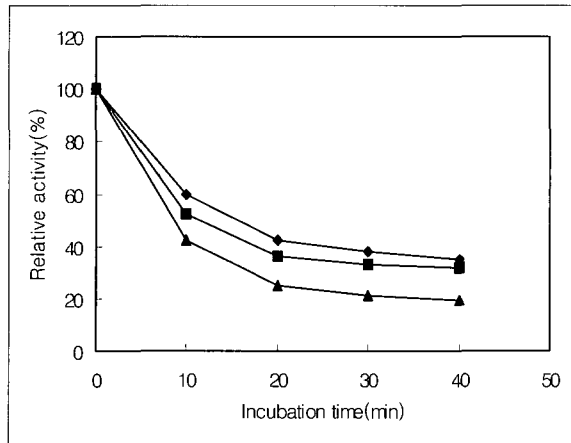
알콜 산화효소의 활성도가 전기자극의 형태에 의존하는가를 알기 위하여 전기자극이 가해지는 자극유지시간 (Pulse duration; PD)과 자극간격 (Pulse interval: PI)을 1분으로 고정하고 전기 자극세기를 10-80 V에서 10분 동안 전기자극을 하면서 알콜 산화효소활성을 측정하여 비교 해 보았다. 출력 전압 0.5 V 이하에서 80분 이상 전기자극을 주어도 알콜 산화효소의 활성도는 변하지 않았다. 그러나 전기자극의 전압이 1 V 이상 가해지면 알콜 산화효소의 활성도는 감소하기 시작하였다.



**Figure 1.** Stability of alcohol oxidase from *Hansenula sp.*, *P. pastoris* and *Candia boidinii* as variation of output voltage. Electropulse is a single pulse repeating type and both pulse interval and pulse duration are 1 sec. Final concentrations of enzyme reaction mixture were 0.5 U alcohol oxidase, 250 mM methanol, 25 ug peroxidase, 50 μM ABTS in 50mM phosphate buffer (pH 7.0). Enzymes, *Hansenula sp.*(◆) *Candia boidinii* (▲) and *P. pastoris*. (■) were stimulated for 10min from 10 to 80V and their activities was determined at 420 nm.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 전기 자극의 전압이 증가할수록 알콜 산화효소는 비활성화 됨을 알 수 있었다. 전기 세기에 대한 알콜 산화효소의 안정도는 효소가 분리된 균의 종류에 따라서 다르다. *Hansenula sp.*에서 분리한 효소가 가장 안정하였으며 *P. pastoris*, *C. boidinii* 순서로 안정하였다. *Hansenula sp.*에서 분리한 효소는 80 V로 10분간 자극을 주어도 40%의 활성도를 유지하고 있는 반면에 *P. pastoris*, *C. boidinii*에서 분리한 효소는 각각 32%, 24%의 활성도를 유지하였다. 이와 같은 현상은 알콜산화효소를

사용하여 만들어진 알콜산화효소 전극의 경우에도 비슷하게 나타남을 볼 수 있다(5). 포도주의 에탄올 농도를 결정하기 위하여 백금전극에 고정화한 알콜산화효소의 경우, 분리된 근원에 따라서 그의 활성도와 안정도가 다르게 나타나는데 *Hansenula sp.*에서 분리한 효소인 경우 제일 좋은 결과를 나타냈고 *P. pastoris*, *C. boidinii*에서 효소 순서로 안정하였다.



**Figure 2.** Stability of alcohol oxidase from *Hansenula sp.*, *P. pastoris* and *Candida boidinii* as variation of incubation times. Electropulse is a single pulse repeating type and both pulse interval and pulse duration are 1 sec. Final concentrations of enzyme reaction mixture were 0.5 U alcohol oxidase, 250 mM methanol, 25 µg peroxidase, 50 µM ABTS in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). Enzymes, *Hansenula sp.*(◆) *C. boidinii* (▲) and *P. pastoris*. (■) were stimulated at 20 volt for 10 min and their activities was determined at 420 nm.

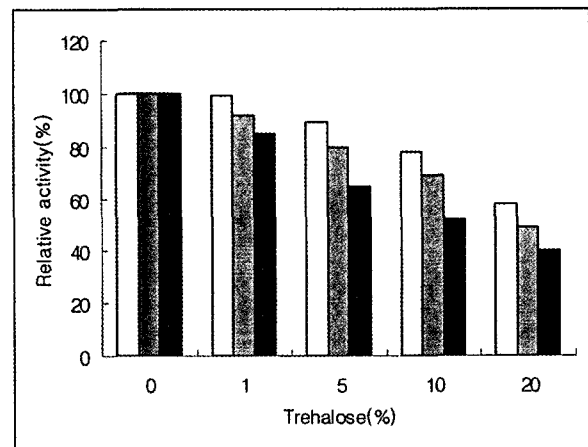
또한 알콜 산화효소에 대한 전기자극 시간에 따른 효소의 활성도는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 전기 자극의 시간이 증가할수록 알콜 산화효소는 비활성화 됨을 알 수 있었다. 20 V의 전압으로 10분간 자극을 주었을 때 *Hansenula sp.*에서 분리한 효소는 51%의 활성도를 유지하고 있는 반면에 *P. pastoris*, *C. boidinii*에서 분리한 효소는 각각 42%, 32%의 활성도를 유지하였다. 전기자극시간에 대한 효소의 안정도 역시 위와 동일하게 *Hansenula sp.*에서 분리한 효소가 가장 안정하였으며 *P. pastoris*, *C. boidinii* 순서로 안정하였다. 전기 자극에 의한 효소의 활성도감소는 용액 속에서 전압에 의하여 발생할 수 있는 온도의 변화에 의하여 발생할 수 있다. 효소를 같은 조건에서 출력전압 20 V에서 80분 동안 자극한 후에도 용액의 온도는 거의 변하지 않았다. 그러므로 효소의 비활성화 전기자극의 전압과 자극시간에 의존함을 알 수 있었다.

전기자극에 의하여 비활성화된 효소를 당을 사용하여 안정화하는 방법을 연구하였다. 일반적으로 효소를 안정화하는 당 중, mannose, trehalose, maltose, sucrose, fructose를 선택하여 효소의 안정도를 결정하였다. 동일한 전기자극의 세기와 시간 (20 V, 10 min), 동일한 당 농도 (10%) 조건하에서 안정화 효과를 확인하였다. 전기자극에 대하여 비활성화되는 효소는 Table 1에서 보는 바와 같이 10% 당 혼합용액에서 안정화되었으며, trehalose, mannose, maltose,

sucrose, fructose 순서대로 효과가 있었다. *Hansenula sp.*에서 분리한 효소는 전기자극 (20 V, 10 min)을 주면 전기자극을 주지 않는 상태에서의 단지 51%의 활성도를 갖는다. 그러나 10% trehalose 용액에서는 전기자극이 없는 상태에서 보다 78%의 효소 활성도를 갖는다. 반면에 *P. pastoris*, *C. boidinii*에서 분리한 효소는 각각 42%, 32%의 활성도를 유지하였고 각각 10% trehalose용액에서는 69%, 52%의 효소활성도를 유지하였다. 위의 조건에서 약 60%의 효소의 활성도가 회복됨을 알 수 있었다. 이 효소들은 모두 같은 당에 의하여 비슷한 비율로 안정화됨을 알 수 있었다.

**Table 1.** Relative activity of alcohol oxidase from *Hansenula sp.*, *P. pastoris* and *C. boidinii* in 10% sugar solutions under electric stimulation. Final concentrations of enzyme reaction mixture were 0.5 U alcohol oxidase, 250 mM methanol, 25 µg peroxidase, 50 µM ABTS in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). Enzymes from *Hansenula sp.*, *C. boidinii* and *P. pastoris*. were stimulated at 20 volt for 10 min and their activities was determined at 420 nm

Sugar	from <i>Hansenula sp.</i>	<i>Pichia Pastoris</i>	<i>Candida Boichinii</i>
no Sugar	51	42	32
Trehalose	78	69	52
Mannose	72	64	48
Maltose	62	53	45
Sucrose	60	51	41
Fructose	58	47	38



**Figure 3.** Effect of trehalose on the stability of alcohol oxidase from *Hansenula sp.*, *P. pastoris* and *C. boidinii* under electric stimulation. Electropulse is a single pulse repeating type and maintains for 10min. Final concentrations of enzyme reaction mixture were 0.5 U alcohol oxidase, 250 mM methanol, 25 µg peroxidase, 50 µM ABTS in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). Enzymes were stimulated in the presence of 1 to 20% of trehalose. Enzymes, *Hansenula sp.* (□) *C. boidinii* (■) and *P. pastoris*. (▨) were stimulated at 20 volt for 10 min and their activities was determined at 420 nm.

당에 의한 효소의 안정화는 많은 연구가 진행되고 있다. Chitosan, sucrose, raffinase, sorbitol, mannitol, glycerol 등이 invertase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, xylanase와 같은 효소를 안정화함이 알려져 있다(8, 9)

알콜 탈수소효소의 안정화 효과가 가장 우수한 trehalose을 선택하고, 동일한 전기자극 조건에서 각 당의 농도에

따른 효소안정화 효과를 살펴보았다. 출력전압을 20 V, 자극지속시간은 10분, 자극지속간격을 1초의 조건으로 전기자극을 가했을 때, Fig. 3에서 보는 바와 같이 trehalose의 농도가 증가함에 따라, 전기자극에 대하여 알콜산화효소는 안정화되었다. Trehalose가 존재하지 않는 용액에서의 활성도를 기준으로 할 때 효소 활성도는 trehalose의 농도 증가에 따라서 감소한다. 그러나 감소하는 속도는 trehalose가 존재하지 않는 상태에 비하여 매우 느리게 감소하였다. *Hansenula sp.*에서 분리한 효소는 20% trehalose 용액에서 53%의 활성도를 유지하지만 trehalose가 없는 상태에서는 단지 18%만을 유지하였다. 당 용액에서 효소의 안정도 역시 *Hansenula sp.*에서 분리한 효소가 가장 안정하였으며 *P. pastoris*, *C. boidinii* 순서로 안정하였다. Trehalose는 여러 종류의 단백질을 안정화함이 알려져 있기 때문에 생명공학에서 단백질 안정화를 위한 첨가제로 많이 사용되고 있다. 단일항체, subtilisin와 같은 단백질이 구조적으로 안정화될 수 있음이 알려져 있다(10, 11).

Table 2에서 보는바와 같이 1% 계면활성제 용액에서 효소는 안정화되었다. TritonX-100, Tween 80, Tween 20 Brij 와 같은 일반적으로 단백질을 안정화하는 계면활성제를 사용하였으며, SDS (Sodium dodecyl sulfate), CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide)와 같은 이온성 계면활성제는 대부분의 효소를 비활성화시키기 때문에 사용하지 않았다(12, 13). Table 2에서 보는 바와 같이 비이온성 용액에서 거의 비슷하게 효소는 안정화되었다. *Hansenula sp.*, *P. pastoris*, *C. boidinii*에서 분리한 효소들은 1% 계면활성제 용액에서 거의 70% 이상의 활성도를 유지하고, 그 중에서 triton, tween 용액에서 효소의 활성도가 Brij당 용액에서 보다 안정하였다.

**Table 2.** Relative activity of alcohol oxidase from *Hansenula sp.*, *P. pastoris* and *C. boidinii* in 1 % surfactant solutions under electric stimulation. Final concentrations of enzyme reaction mixture were 0.5 U alcohol oxidase, 250 mM methanol, 25 µg peroxidase, 50 µM ABTS in 50 mM phosphate buffer(pH 7.0). Enzymes from *Hansenula sp.*, *C. boidinii* and *P. pastoris* were stimulated at 20 volt for 10 min and their activities was determined at 420 nm

Surfactant	<i>Hansenula sp.</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>C. boichinii</i>
no surfactant	51	42	32
Triton X100	76	73	70
Tween 80	74	71	69
Tween 20	72	71	68
Briji	68	65	60

전기자극에 의하여 비활성화된 효소를 안정화하기 위하여 히드로젤이 사용됨이 알려져 있으며(14, 15), 특히 리파아제와 혈청알부민 (BSA)과 같은 단백질도 히드로젤에 의하여 구조적으로 안정화됨이 보고되었다(15). Table 3에서 보는 바와 같이 비활성화된 효소는 1% CMC, agarose, carbopol 용액에서 거의 비슷하게 안정화되었다. 효소를 20 V에서 10분 전기자극을 주었을 때 활성도는 거의 50 %를 상실했지만 1% CMC, agarose, carbopol 용액에서는 각각 25-35% 밖에 상실되지 않았다. 이와 같이 알콜 산화효소에 대하여 히드로젤이 효소 안정화에 영향을 미치는 것을 알

수 있었다.

**Table 3.** Relative activity of alcohol oxidase from *Hansenula sp.*, *P. pastoris* and *C. boidinii* in 1% hydrogel solutions under electric stimulation. Final concentrations of enzyme reaction mixture were 0.5 U alcohol oxidase, 250 mM methanol, 25 µg peroxidase, 50 µM ABTS in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). Enzymes from *Hansenula sp.*, *C. boidinii* and *P. pastoris* were stimulated at 20 volt for 10 min and their activities was determined at 420 nm

Hydrogel	<i>Hansenula sp.</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>C. boichinii</i>
no Hydrogel	51	42	32
CMC	78	69	59
Carbopol	72	64	54
Agarose	62	63	53

이런 전기자극에 대한 연구는, 전기자극이 흰쥐 피부의 비만세포 수 및 탈과립에 영향을 미친다는 연구가 발표되었고(16), 전기자극이 척수 후각세포의 활성에 영향을 미친다는 보고가 있다(17). 이 외에 물리적 방법으로서 흔히 사용되는 전기자극은 조직 재생과정을 촉진시켜 상처치유에 효과가 있음이 보고 되었다(18).

이처럼, 전기자극방법은 생물공학, 재활공학, 의용공학 분야를 포함하여 의약품을 합성, 발효산업에 이르기까지 광범위하게 이용되고 있지만, 전기자극을 생물공학에 응용하기 위해서 전기자극하에서의 생체분자의 안정성에 대한 연구가 더욱 필요하다.

그러나 아직 효소 단백질과 같은 생체분자에 미치는 전기자극의 효과에 대해서는 자세히 연구되고 있지 않다

본 연구에서는 전기자극에 대한 생체분자인 알콜 산화효소가 당, 계면활성제, 히드로젤에 의하여 안정화 될 수 있음을 연구하였다.

## 요 약

효소는 환경과 조건에 따라 상이한 활성도를 나타내며, 전기 자극에 의하여 비활성화된 알콜 산화효소는 당, 계면활성제, 히드로젤 들에 의하여 안정화되었다. 이들 효소는 trehalose, TritonX-100, Brij에서 보다 안정하였으며, 이들 효소의 안정도는 *Hansenula sp.*, *P. pastoris*, *C. boidinii*에서 분리된 효소가 순서적으로 보다 안정하였다. 전기자극하에서 효소의 안정화에 대한 이 연구는 생물공학, 단백질공학, 의료공학 분야에 널리 이용될 수 있으리라 사료된다.

## 감 사

이 논문은 2001년도 전북대학교의 지원 연구비 및 보건복지부 한방의학 R&D project (0405-OM00-0815-0001)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Beg, H. (1995), Possibilities and problems of low frequency weak electromagnetic fields in cell biology, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **38**, 153-159.
2. Gamaley, I., K. Augsten, and H. Berg (1995), Electrostimulation of macrophage NADPH oxidase by modulated high-frequency electromagnetic fields, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **38**, 415-418.
3. Stalulions, R. (1999), Electric pulse-induced precipitation of biological macromolecules in electroporation, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **48**, 249-254.
4. Azevedo A., J. Cabral, D. Prazeres, T. Gibson, and L. Fonseca (2004), Termal and operational of *Hansenula polymorpha* alcohol oxidase, *J. Mol. Cat. B; Ezymatic.* **27**, 37-45.
5. Patel. N., S. Meier, K. Cammann, and G. Chemnitiuis (2001), Screen-printed biosensors using different alcohol oxidase, *Sensors and Actuators B.* **75**, 101-110.
6. Burfeind, J., B. Weigel, G. Kretzmer, K. Schugerl, A. Huwig, and F. Giffhorn (1996), Determination of the concentration of higher alcohols with enzyme coupled flow-injection analysis in model system, *Anal Chim. Acta.* **322**, 131-139.
7. Liden, H., T. Buttler, H. Jeppsson, and G. Marko-verga (1998), Rapid alcohol determination in plasma and urine by column liquid chromatography with biosensor detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 1111-1128.
8. Davidson, P. and W. Q. Sun (2001), Effect of sucrose/raffinose mass ratios on the stability of co-lyophilized protein during storage, *Pharmaceutical Research* **18**, 474-479.
9. Gomez, L., H. Ramirez, and R. Villalonga (2000), Stabilization of invertase by modification of sugar chains with chitosan, *Biotechnology Letters* **22**, 347-351.
10. Draber, P., E. Draberova, and M. Novakova (1995), Stability of monoclonal IgM antibodies freezed in the presence of trehalose, *J. Immunolog. Methods* **181**, 1-7.
11. DePaz, R. A., D. A. Dal, C. Barnett, J. F. Carpenter, A. Gaertner, and T. Randolph (2002), Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: role of protein conformation and molecular mobility, *Enz. Microb. Technol.* **31**, 765-774.
12. Jean-Pierre Samama, K. M. Lee, and Biellmann Jean-Francois (1987), Enzymes and microemulsion: activity and properties of liver alcohol dehydrogenase in ionic water-in-oil microemulsion, *European J. Biochem.* **163**, 609-620.
13. Lee, K. M. and Biellmann Jean-Francois (1987), Enzyme and organic solvent: horse liver alcohol dehydrogenase in nonionic microemulsion: stability and activity, *FEBS Lett.* **224**, 33.
14. Markvicheva, E. A., N. E. Tkachuk, S. V. Kuptsova, T. N. Dugina, S. M. Strukova, Y. E. Kirsh, V. P. Zubov, and L. D. Rumsh (1996), Stabilization of proteases by entrapment in a new composite hydrogel, *Appl. Biochem. Biotech.* **61**, 75-84.
15. Basri, M., S. Samsudin, M. Bin Ahmad, C. Razak, and A. B. Salleh (1999), Lipase immobilized on poly (VP-co-HEMA) hydrogel for esterification reaction, *Appl. Biochem. and Biotech.* **81**, 205.
16. Lee, J. H., S. J. Lee, and Jekal (1999) Effects of Electrical stimulation on the Mast Cell of Skin in Rat, *J. Kor. Phys. Ther.* **11**, 81-87.
17. Choi, Y. J., K. H. Ko, and U. T. Oh (1993), Effect of electrical stimulation of the caudal ventrolateral Medulla on the Activity of Dorsal Horn Neurons of the Spinal Cord in the Ca, *J. Appl. Pharmacol.* **1**, 37-43.
18. Brown, M. and P. P. Gogia (1987), Electrical Stimulation effects on Cutaneous Wound Healing in Rabbit, *Phys. Ther.* **68**, 955-960.