

유기용매에서의 CiP (*Coprinus cinereus* peroxidase)의 안정성

김 한 상 · 조 대 행 · † 김 용 환
광운대학교 화학공학과
(접수 : 2008. 5. 2., 게재승인 : 2008. 8. 8.)

In the presence of organic solvent stability of CiP (*Coprinus cinereus* peroxidase)

Han Sang Kim, Dae Haeng Cho, and Yong Hwan Kim†
Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul, Korea
(Received : 2008. 5. 2., Accepted : 2008. 8. 8.)

Coprinus cinereus peroxidase (CiP) was often used as a catalyst for oxidative polymerization of a variety of phenol derivatives to produce a new class of polyphenols. Economical point of view, to know the mechanism of enzyme deactivation is significantly important because cost of enzyme is critically high. Hydrogen peroxide being used as oxidizing agent induced deactivation of peroxidase by destruction of heme structure. In the presence of hydrogen peroxide the stability of peroxidase was unexpectedly improved by adding organic solvent. Especially 2-propanol significantly improved enzyme stability among tested solvents. Radical scavenging by organic solvents may play a major role in protecting peroxidase from the oxidation of oxidizing radicals.

Key Words : *Coprinus cinereus* peroxidase, peroxidase, enzyme stability, organic solvent, hydrogen peroxide

서 론

포토레지스트는 반도체 작업과정에 필수적인 화합물이며, 특히 LCD같은 공정에서 상당한 위치를 차지한다. LCD공정에서는 RGB 컬러 디스플레이의 패턴을 형성하는데 상당히 많은 포토레지스트가 소비가 되고 있고, 이러한 경향에 맞추어서 그 요구량도 증가가 되고 있는 실정이다. 따라서 이러한 요구에 발맞추기 위해, 현재는 좋은 분해능과 해상력을 가진 고분자를 만들기 위해서 많은 연구가 진행 중이다. 기존의 일반적인 포토레지스트는 *o*-cresol phenol계와 formaldehyde에서 합성이 된 novolac 레진과 diazonaphthoquinone (DNQ) photoactive 화합물로 구성이 된 것을 많이 사용 하였다. 그 이유는 novolac 레진은 필름형성 능력과 좋은 부착성, 식각 저항성과 알칼리인 용액에 용해성이 좋기 때문이다. 하지만 독성적인 formaldehyde를 사용을 하기 때문에, 많은 여러 대체물질을 찾기 위해 많은 연구가 행하여지고 있다. 하지만 효소를 이용한 phenol계의 고분자화는 formaldehyde를 사용하지 않은 이점과 같은 여러 이점

이 있는 것으로 보고가 되어있다. 특히 CiP (*Coprinus cinereus* peroxidase)를 이용하여 bisphenol A를 고분자하여 포토레지스트로 쓰일 수 있는 가능성을 제시한 경우도 있다(1). 그리고 그 외에도 phenol계 고분자를 합성하기 위한 peroxidase의 연구가 많이 이루어지고 있다(2-4). 따라서 이러한 상황에 발맞추어서 peroxidase를 특히 값싸게 대량으로 얻을 수 있는 fungal peroxidase, CiP (*Coprinus cinereus* peroxidase)는 앞으로 산업적으로 응용을 할 수 있는 가능성이 많이 내포가 되어있다(5). 하지만 일반적으로 효소를 얻는 것은 쉬운 일이 아니며, 경제적인 관점에서 볼 때도 가격이 높기 때문에 효소를 안정화시키는 방법이 많이 연구가 되고 있다.

CiP는 우선적으로 과산화수소에 의해서 산화가 되어서 compound I를 형성을 한다. 그다음 phenol 계열의 기질이 이 구조로 들어가면 산화가 되고 이때 기질의 전자 한 개가 효소의 활성부위인 heme으로 이동을 하여서 Compound II를 형성을 한다. 그러나 과산화수소가 들어갈 경우에는 compound I에서 산소분자를 발생시키며 처음의 상태로 돌아가거나 superoxide 라디칼을 발생시키면서 Compound II를 형성을 한다. 여기서 phenol 계열의 기질이 다시 compound II로 들어가게 되면, 다시 처음의 상태로 돌아가게 된다. 그러나 Compound II가 기질의 농도가 낮거나 혹은 과량의 과산화수소가 존재 하는 경우에는 과산화수소와 반응을 하게 되어 compound III가 형성

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Kwangwoon University, Seoul, Korea
Tel : +82-2-940-5675, Fax : +82-2-940-1785
E-mail : metalkim@kw.ac.kr

이 된다. Compound III가 형성이 되었을 경우에는 3가지의 경로를 가지게 된다. 첫 번째는 peroxy 라디칼이 porphyrin ring을 산화를 시키는 것이다. 이것으로 인해 heme의 구조가 tetrapyrrole의 형태가 되어서 heme에 있는 철이온이 빠지게 된다. 따라서 이러한 경우에는 효소의 활성을 영구적으로 잃어버린 형태지만 단백질은 그대로 남아 있게 된다. 따라서 이러한 경우에는 heme의 구조가 파괴가 일어났기 때문에, heme의 농도와 관련이 깊은 400 nm에서의 흡수가 적어지게 된다. 두 번째의 경우는 Compound III에 결합을 하고 있는 peroxy 라디칼이 주변의 아미노산을 산화시키고, 다시 처음의 상태로 돌아가는 것이다. 이 경우에는 단백질내에 산화된 아미노산의 잔기를 가지게 된다. 마지막으로 세 번째 가능성은 peroxy 라디칼이 heme에서부터 떨어져 나와서 다른 단백질을 공격하게 되어서 결국에는 산화적인 단백질의 비활성화가 일어나는 것이다(6-8).

효소를 이용한 촉매 반응이 산업적으로 응용이 가능을 하려면 기질을 용해시키는 것이 필요하다. 따라서 이를 위해서 유기용매를 사용을 해야만 한다(9). 그러나 유기용매 상에서 단백질은 불활성이 일어나기가 쉽다(10-11). 따라서 이와 같은 이유가 있기 때문에 완충액과 섞어서 사용을 하게 된다. 실제로 유기용매와 완충용액을 섞어서 반응을 하여, 높은 수율과 높은 분자량을 가진 고분자를 합성을 한 경우가 있다(12-13). 하지만 유기용매의 종류와 완충용의 비율에 따라서 효소의 반응성을 저해시키는 정도는 다르게 나타난다(14). 앞에서 언급이 된 것 같이 일반적으로 유기용매가 효소를 활성도를 저해시키는 연구는 이미 많은 연구가 진행이 되었다. 그러나 실제로 반응에서 산화제로 쓰이는 과산화수소를 포함한 반응조건의 연구는 활발하게 연구가 되어 있지가 않았다. 따라서 이에 따른 적절한 용매 선택의 방법을 제시할 수 있는 토대를 마련하는 것이 필요하였다. 따라서 이러한 필요를 충족시키기 위해서 본 연구에서는 실제 반응과 유사하게 물과 섞일 수 있는 다양한 유기용매를 완충용액과 다양한 비율로 섞어서 효소의 활성도를 측정용 하였다. 또한 효소의 활성도를 과산화수소가 포함된 조건과 포함하지 않은 조건을 비교를 하여, 실제로 반응에 응용이 될 때 효소의 저해요인을 알아보았다. 그리고 이들이 서로 다른 조건에서 효소의 안정성이 차이가 나는 이유를 모색 하였다.

재료 및 방법

Peroxidase의 생산과 정제

C. cinereus IFO 8371를 peroxidase를 생산하는 균주로 선택을 하였다. 배지에는 30 g/L 글루코오스와 5 g/L 펩톤 (Difco Lab., USA), 그리고 3 g/L 효모추출물 (Difco Lab., USA)의 성분으로 배양을 하였다. 배양의 시작은 고체 배지에서 30초 동안 흔들 배지의 윗부분의 5 ml의 포자 현탁액을 500 ml의 플라스크에 있는 70 ml의 배지에 접종을 하였다. 그리고 이것을 shaking 배양기에서 120 rpm과 30°C로 배양을 하였다. 배양은 10개의 플라스크에서 시행이 되었고, 각각의 플라스크에 있는 액체 배양액은 샘플로 사용하였다. 배지는 여과막 (pore size : 0.45 μ m, Whatman)을 사용을 하여서 여과를 하였다.

액체 배양액의 상등액은 울트라여과지 (Amicon Ultra-4

centrifugal filter, 10 kDa MWCO)를 통해서 농축이 되었으며, 0.1 M의 phosphate buffer (pH 5.0)를 사용을 하여서 염을 제거 하였다. 염이 제거된 CiP 용액은 silica-based 컬럼 (Bio-Sil SEC 125, Bio-Rad)과 이동상을 0.1 M의 phosphate buffer (pH 5.0)를 사용하는 크기배제 크로마토그래피 (SEC)를 통해서 농축이 되었다. 모여진 CiP의 부분은 울트라여과지 (Amicon Ultra-4 centrifugal filter, 10 kDa MWCO)를 통해서 다시 농축이 되었다.

효소의 활성도 측정

Peroxidase의 활성도는 (U/ml)로 정의를 하여 평가를 하였다. 50 mM phosphate buffer (pH 5.0)에 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)를 농도가 0.18 mM인 3ml 용액에 몇 마이크로리터의 측정용액을 떨어뜨리고 나서 15% H_2O_2 용액을 색깔이 띠는 개시제로 1 μ L를 넣는다. Peroxidase의 Unit의 정의는 25°C에서 분당 1 μ mol의 ABTS ($\epsilon=34,700\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$)를 전환시킬 때에 소비되는 효소의 양으로 정의가 된다. 기타 유기용매들은 시약급을 사용을 하였다.

CiP의 분광학적 분석법

CiP를 각각 최종적인 부피가 3.0 ml인 완충용액에 300 μ L (25000 Unit/ml)를 넣고 Shimadzu UV-1650을 사용을 하여서 200 nm에서 600 nm까지 흡수도를 10 mm cell에서 측정용 하였다.

유기용매를 포함한 효소의 안정성 실험

유기용매가 효소의 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위해서 phosphate 완충용액 100 mM와 각각의 부피별로 유기용매를 섞은 후에 효소 (25 U/ml)를 넣고 25°C를 유지 하면서 각각의 시간별로 효소의 활성도를 ABTS를 사용을 하여서 측정용 하였다. 과산화수소를 포함한 조건은 앞과 동일한 조건에서 10 mM 과산화수소를 한꺼번에 넣고 효소의 활성도를 각각의 시간별로 측정용 하였다. 이때 측정된 효소의 활성도는 지수 함수적인 감소를 나타내었으며, 이것을 아래와 같은 식으로 계산을 하여 효소 비활성도 속도계수 (k_d)로 표현을 하였다.

$$\frac{\ln(E_{\text{residual enzyme activity}})}{\ln(E_{\text{initial enzyme activity}})} = -k_d t$$

효소의 활성도의 반감기는 아래와 같은 식으로 계산을 하였다.

$$\frac{\ln 2}{k_d} = t_{1/2}$$

결과 및 고찰

다양한 유기용매에서 효소안정성

본 실험에서는 일반적으로 널리 쓰인 유기용매 중에서 acetone과 2-propanol과 methanol과 같이 완충용액과 섞일 수 있는 용매를 선택을 하여서 실험을 하였다. 우선 각각의 용매가 효소의 비활성도를 일으키는 정도를 알아보기 위하여, 우리는 순수한 용매와 각각의 용매를 완충용액과 섞어서 효소의

활성도를 측정을 하였다. 유기용매만이 있을 경우에는 효소의 활성도는 급격하게 감소가 되어, 효소의 활성도 반감기가 크지가 않았다. 하지만 각각의 용매를 완충용액과 함께 섞었을 경우에는 효소의 활성도가 크게 증대가 되었으며, 반감기 또한 상당히 크게 증가가 되었다.

Table 1. The half time of CiP enzyme activity in different solvent, buffer (100 mM phosphate buffer, pH 6.0) ratio

Half time of enzyme activity (hr)	Solvent	Buffer content in % (v/v)
12	Acetone	0
198	Acetone	84
346	Acetone	91
4	2-propanol	0
11	2-propanol	84
25	2-propanol	91
2	Methanol	0
204	Methanol	84
433	Methanol	91

Table 1에서 보는 것처럼 완충용액의 비율을 높일수록 효소의 활성도가 증가가 되는 경향을 나타냈으며, 그로 인해 반감기가 증가되는 것을 볼 수가 있었다.

Fig. 1에서는 완충용액과 부피비로 각각의 유기용매를 16%를 섞었을 때, 효소의 활성도를 측정을 한 것이다. 이 그림을 보면 methanol과 acetone는 순수한 완충용액과는 비슷한 효소의 활성도를 나타냈다. 하지만 2-propanol의 경우에는 methanol과 acetone과는 달리 가장 낮은 효소의 활성도를 나타내었지만 순수한 용매보다는 높은 활성도를 나타냈다. 그러나 Fig. 2에 표현되었듯이 똑같은 조건에서 과산화수소가 있는 경우에는 이와는 다른 결과가 나타났다.

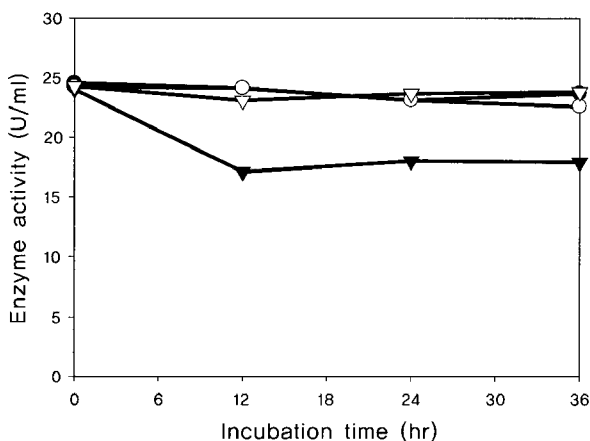


Figure 1. CiP (25 U/ml) was incubated in phosphate buffer pH(6.0)(●) and buffer solvent mixture of acetone 16% (v/v)(▽) or 2-propanol 16% (v/v)(▼) or methanol 16% (v/v)(▽).

Fig. 2를 보면 효소의 활성도는 완충용액만이 있을 경우가 가장 낮게 나타났으며, 유기용매와 완충용액을 섞은 조건이 완충용액보다 높은 활성도를 가지고 있었다. 각각의 유기용매를 섞은 조건들 중에서 acetone과 methanol은 서로 효소의 활성도가 서로 큰 차이가 나지가 않았다. 그러나 Fig. 1과는 다르게 순수한 유기용매를 섞은 모든 조건이 완충용액보다

높은 활성도를 가졌다. 특히, 눈여겨 볼 것은 2-propanol의 경우인데 과산화수소가 포함이 되지 않은 조건에서와는 다르게 가장 높은 활성도를 나타내었다.

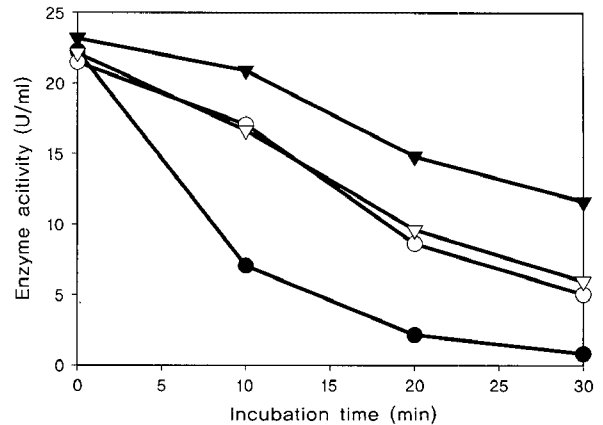


Figure 2. Effect of incubation on CiP inactivation when hydrogen peroxide(10 mM) is added, CiP(25 U/ml) was incubated in phosphate buffer pH(6.0)(●) and buffer solvent mixture of acetone 16% (v/v)(○) or 2-propanol 16% (v/v)(▼) or methanol 16% (v/v)(▽).

이처럼 과산화수소가 있을 경우와 없을 경우는 서로 상당한 효소의 활성도의 차이와 서로 다른 경향을 나타내었다. 우선 과산화수소가 없는 경우인 Fig. 1를 보면 효소의 활성도가 12시간이 지나도 모든 경우에서 처음 활성도의 50% 이상 잔류 하였으나, Fig. 2에서 보듯이 과산화수소가 있는 경우에는 모든 경우에서 30분이 지나자 대부분의 조건에서 효소의 활성도가 초기 활성도의 60% 이상 사라지는 것을 관찰할 수가 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, 효소의 활성에 큰 영향을 끼치는 것은 과산화수소라고 판단을 할 수가 있었다.

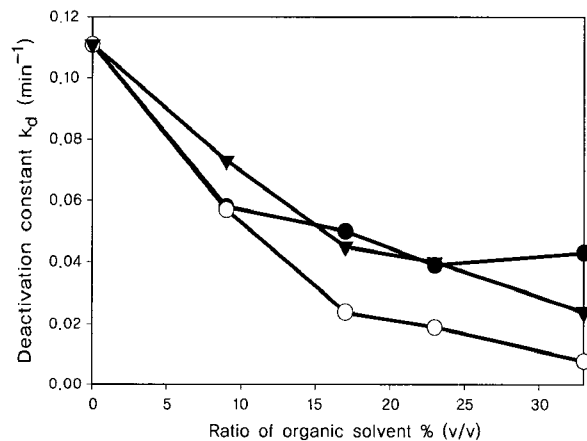


Figure 3. Effect of ratio of organic solvent on the deactivation constant of CiP. acetone(●), methanol(▼), 2-propanol(○).

Fig. 3은 과산화수소가 용액에 있을 경우에는 유기용매의 비율이 증가를 시키면서 효소의 활성도를 효소의 불활성 계수로 표현을 한 것이다. Fig. 3을 보면 유기용매가 증가 가 될 수록 효소의 불활성 계수가 전체적으로 감소가 되는 것을 관찰을 할 수가 있다. 특히 2-propanol의 경우에는 acetone과 methanol과는 다르게 용매의 비율을 증가 시킬수록 효소의 안정성이 크게 증가가 되는 것을 관찰을 할 수가 있었고,

33%의 비율에서는 순수한 완충용액보다 효소의 활성도가 13배가 증가되는 것이 관찰이 되었다. 그러나 일반적으로는 용액에 유기용매 있을 경우에는 효소의 활성이 완충용액에 비하여 감소가 된다. 그러나 이번 실험과 같이 과산화수소와 같은 강력한 산화제가 포함이 된 경우에는 다른 결과가 발생 하였다.

이번 실험과 같이 용액에 용매를 첨가함으로써 효소의 안정성이 증대가 되는 것은 CiP가 과산화수소와 반응을 하여서 생성이 된 반응성이 강한 라디칼을 유기용매가 포착 하여서 효소를 안정시킨 것이라고 판단이 된다. 특히 본 실험에서 사용한 acetone, methanol, 2-propanol은 라디칼 포착제 (scavenger)로 의 역할을 하고 있다고 보고가 되었다(15-17).

다양한 유기용매에서 효소안정성이 증가된 원인

유기용매의 라디칼 포집능력이 효소의 안정성에 어떠한 영향을 주는 지를 알아보기 위해서 본 실험에서는 400 nm에서 흡광도를 측정을 해보았다. 400 nm에서의 흡광도는 CiP의 기질 반응부위인 heme의 농도와 비례한다. 따라서 heme의 구조가 변형이 되었다면 흡수가 400 nm에서 줄어들 것이다.

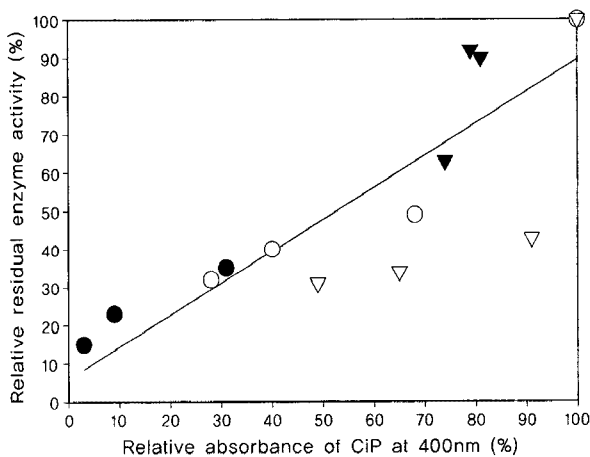


Figure 4. The relation between absorbance of CiP at 400 nm and residual enzyme activity. CiP was incubated in phosphate buffer pH (6.0)(●) and buffer solvent mixture of acetone 33% (v/v)(○) or 2-propanol 33% (v/v)(▼) or methanol 33% (v/v)(▽) containing 10 mM hydrogen peroxide. Each of data was measured at 0 min, 10 min, 20 min, 30 min respectively.

Fig. 4는 효소의 활성도와 400 nm에서의 흡광도의 관계를 표현한 그림으로 전체적으로 효소의 활성도 비율이 높을수록 400 nm에서 상대적인 흡수비율이 첨가된 유기용매나 완충용액과 관계없이 주로 높게 나왔다. 이와는 반대로 효소의 활성도 감소가 될수록 400 nm에서 효소의 흡수 비율이 감소가 되었다. 특히, 그중에 2-propanol의 경우에는 효소의 활성도 및 400 nm에서 상대적인 흡광도 비율이 시간이 지나도 다른 용매나 완충용액보다는 높게 나타났다.

Fig. 4에 표현이 되었듯이, 유기용매가 있을 경우 모두 400 nm에서의 흡광도가 높게 나왔으며, 효소의 활성도 또한 높게 나왔다. 이러한 결과로 비추어 생각을 해볼 때에 효소의 활성도가 높은 이유는 반응성이 높은 라디칼들이 효소의 활성화 부위인 heme의 구조가 변형하는 것을 유기용매가 이러한 라디칼들을 포착하여서 효소의 heme의 구조적 파괴를 막기 때문이라고 판단이 된다.

또한 추가적으로 Fig. 4을 보면, 효소의 활성도가 2-propanol, methanol, acetone의 순으로 효소의 활성도가 증가가 되는 것을 볼 수가 있다. 이러한 이유를 유기용매의 logP와 효소의 활성도에 대한 관계를 알아보았으나 서로 상호관계가 없는 것으로 관찰이 되었다. 그러나 유기용매의 점도와 효소의 활성도를 연관시켜 보았을 때는 경향성이 있는 관계를 관찰을 할 수가 있었다. 실제로 효소의 불활성도 계수 (K_d)와 시험한 용매의 점도의 상관관계를 Table 2에 나타내었는데, Table 2을 보면 용매의 점도가 증가가 될수록 효소의 불활성도의 계수가 감소하는 것을 관찰을 할 수가 있다.

Table 2. The relation between deactivation constant and the viscosity of the organic solvents

Deactivation constant k_d (min^{-1})	Organic solvent content in % (v/v)	Pure solvent viscosity (cP) at 298 k
0.058	Acetone 9%	0.302
0.057	Acetone 17%	0.302
0.039	Acetone 23%	0.302
0.057	2-propanol 9%	0.199
0.024	2-propanol 17%	0.199
0.019	2-propanol 23%	0.199
0.073	Methanol 9%	0.636
0.045	Methanol 17%	0.636
0.04	Methanol 23%	0.636

이러한 이유는 이번 실험에서 기질로 작용하는 과산화수소가 효소에 느리게 확산이 되면서 효소의 안정성이 증대가 되는 것으로 판단이 되었다. 실제로 용액의 점도가 증가하면 기질의 확산속도가 감소하여 효소의 반응성은 감소한다고 알려져 있다 (18). 따라서 용액의 점도가 증가되면 과산화수소가 느리게 효소에 확산이 되어 불활성 계수가 감소하는 것이라고 판단이 된다.

요 약

CiP를 이용한 유기합성은 주로 유기용매와 완충용액을 섞어서 반응을 한다. 하지만 단순히 유기용매 상에서 효소의 활성도를 측정하는 것이 아니라, 과산화수소가 있을 경우에 효소의 활성도를 측정하는 결과는 예상과는 다르게 순수한 완충용액에서보다 유기용매를 포함하고 있는 것이 더 높게 나타났다. 또한 유기용매의 비율을 증가가 될수록 효소의 활성도가 더 높게 나타났으며, 특히 2-propanol이 33%가 포함이 된 경우에는 순수한 완충용액보다 효소의 활성도가 크게 증가가 되는 것을 관찰을 할 수가 있었다. 이러한 효소의 활성도가 유기용매가 포함이 된 조건에서 높게 나는 이유는 유기용매가 CiP에 의해 생성된 반응성이 높은 라디칼을 포착을 하여서, CiP의 활성 부위인 heme의 파괴를 막는 것에 크게 기여하는 것으로 판단이 되었다.

REFERENCES

- Kim, Y. H. and Song, B. K. (2007), Polymerization of bisphenol a using *Coprinus cinereus* peroxidase and its application as a photoresist resin, *J. Mol. Catalysis B* **44**, 149-154.

2. Z. Xia, T. Yoshida, and M. Funaoka. (2003), Enzymatic synthesis of polyphenols from highly phenolic lignin-based polymers (lignophenols), *Biotechnol. Lett.* **25**, 9-12.
3. A. Cui, A. Singh, and D. L. Kaplan, (2002), Enzyme-Based Molecular Imprinting with Metals, *Biomacromolecules*. **3**, 1353-1358.
4. J. Kadota, T. Fukuoka, H. Uyama, K. Hasegawa, and S. Kobayashi, (2002), New Positive-Type Photoresists Based on Enzymatically Synthesized Polyphenols, *Macromol. Rapid Commun.* **25**, 441-444.
5. Y. H. Kim, Won, J. M. Kwon, H. S. Jeong, S. Y. Park, E. S. An, and B. K. Song, (2005), Synthesis of polycardanol from renewable source using a fungal peroxidase *Coprinus cinereus*, *J. Molecular Catalyst B. Enzymatic* **34**, 33-38.
6. Park, J. B. and Clark D. S. (2006), Deactivation mechanism of chloroperoxidase during biotransformations, *Biothenology and Bioengineering*, **93**(6).
7. Grey, C. E. and Adlercreutz, P. (2007), A mass spectrometric investigation of native and oxidatively inactivated chloroperoxidase, *ChemBio Chem.* **8**, 1055-1062.
8. Valderrama, B. and Ayala, M. and Vazquez-Duhalt, R. (2002). Suicide inactivation of peroxidase and the challenge of engineering more robust enzymes, *Chem Biol.* **9**, 555-565.
9. J. S. Dordick, H. Marletta, and A. M. Klivanov (1986), Peroxidases depolymerize lignin in organic media but not in water **83**, 6255-6257.
10. M. Akita, D. Tsutumi, M. Kobayashi, and H. Kise, (2001), Structural change and catalytic activity of horseradish peroxidase in oxidative polymerization of phenol, *Biotechnol. Biochem* **65**, 1581-1588.
11. J. A. Akkara, K. J. Senecal, and D. L. Kaplan (1991). Synthesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane, *J. Polym Sci A Polym Chem.* **29**, 1561.
12. H. Tonami, H. Uyama, S. Kobayashi, K. Rettig, and H. Ritter, (1999). Chemoenzymatic synthesis of a poly (hydroquinone), *Marcromol Chem Phys.* **200**, 1998-2002.
13. H. Tonami, H. Uyama, S. Kobayashi, and M. Kubota, (199), Peroxidase-catalyzed oxidative polymerization of m-substitued phenol derivates, *Marcromol Chem Phys.* **200**, 2365-2371.
14. K. Ryu and J. S. Dordick (1992), How do organic solvents affects peroxidase structure and function?, *Biochemistry* **31**, 2588-2598.
15. C. M. Miler, K. C. Bower, and C. Rise, (2003), Fenton's reagent degraation of 2,4-dinitrotoluene in water-acetone mixture, *Environ eng sci.* **2**, 65-69.
16. J. Marugan and D. Hufschmidt, (2006), Photonic efficiency for methanol photooxidation and hydroxyl radical generation on silica-supported TiO2 photocatalysts, *Applied catalysis B* **62**, 201-207.
17. A. Brant and J. Richard (2004), Idenfication of the reactive oxygen species responsible for carbon tetrachloride degradation in moified fenton's system, *Envrion sci techol.* **38**, 5465-5469.
18. Y. Pocker and N. Janjic, (1987), Enzyme kinetics in solvent of increased viscosity. Dynamic aspects of carbonic anhydrase catalysis, *Biochemistry* **26**, 2597-2606.