

## Soybean peroxidase의 추출공정 및 안정성 특성

서 경 립 · 이 은 규

한양대학교 화학공학과 생물공정연구실  
(접수 : 1998. 7. 13., 게재승인 : 1998. 9. 29.)

### Extraction Process and Stability Characteristics of Soybean Peroxidase

Kyung Lim Suh and Eun Kyu Lee†

Dept. of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan, Korea 425-791  
(Received : 1998. 7. 13., Accepted 1998. 9. 29.)

Soybean peroxidase was extracted from soybean hulls and purified by ammonium sulfate precipitations (25% and 75% saturation), pl fractionation, and anionic exchange and gel filtration chromatographies (DEAE-Sephadex A-50 and Superose 12). Molecular weight and pl value were estimated to be ca. 45 kD and 4.2, respectively. Purified soybean peroxidase had an RZ value of 0.43. Compared with horseradish peroxidase, it showed superior thermal and pH stability. Assuming the first-order kinetics, the thermal deactivation rate constant of soybean peroxidase at 80°C was about 8 times lower than that of horseradish peroxidase. Deactivation energy was calculated to be 69.3 kcal/mol. Soybean peroxidase showed about 10% higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation capacity than horseradish peroxidase. Exploiting these advantages, the soybean peroxidase purified from the domestic soybean hull is expected to replace horseradish peroxidase in various applications.

Key Words : soybean peroxidase, horseradish peroxidase, thermal stability, pH stability

### 서 론

Peroxidase (donor hydrogen peroxide oxidoreductase, EC.1.11.1.7)는 대부분의 식물(양고추냉이(horseradish)뿌리, 무뿌리, 순무뿌리, 고구마, 배추뿌리 등) 세포와 동물세포 등에 존재하며 phenol이나 방향성 amine 등과 같은 다양한 물질을 과산화수소에 의해 산화시키는 반응을 촉매하는 효소이다(1-2). 이 peroxidase는 열 안정성이 비교적 높은 효소로 알려져 있고(3-4) 이 성질을 이용하여 과일이나 야채를 가공할 때 효과적인 열처리 index로 이용하고 있으며(5-6), 향원이나 향체 등에 결합시켜 과산화수소에 의한 발색반응을 유도하는 진단시약용 효소로도 쓰인다(7-9). 페놀수지 합성에서는 기존의 특성을 지닌 포름알데히드를 원료로 사용하는 방법을 대체하기 위해 peroxidase를 이용한 합성이 연구되고 있으며 이 효소촉매 방법으로 만들어진 페놀수지는 열에 강하고 전도체 고분자로 이용이 가능하며(10), 기존의 중합 방법보다 낮은 온도에서 촉매반응을 할 수 있어 에너지 비용을 절감할 수 있다(11). 많은 phenol류 물질들은 독성이 있기 때문에 반드시 폐수 내에서 제거되어야 하며 이들을 촉합반응을 통해 촉합제거시키는 기술로서 peroxidase와 과산화수소를 이용하는 효소적 분해가 연구 중에

있다(12-16). 이처럼 peroxidase는 다양한 산업적 이용이 모색되어 왔으나 phenol류 물질 제거와 같은 폐수처리공정에서는 효소의 낮은 안정성과 고비용때문에 대규모 산업공정에 적용하기에는 어려움이 따르고 있다.

이제까지 보고된 peroxidase 관련 문헌에는 horseradish peroxidase (HRP)에 관한 내용이 대부분을 차지하고 있으나 최근에는 soybean peroxidase(SBP)의 열 안정성이 다른 source에서 얻어지는 peroxidase에 비해 월등함이 밝혀지고 있다(16). 따라서 본 연구에서는 농산 부산물이고 경제적인 국내산 soybean hulls(대두피)로 부터 범용성 SBP를 추출, 정제하는 공정을 확립하고 정제된 SBP의 기초특성 및 열, pH 안정성을 알아보려고 하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

본 실험에서 사용한 대두피는 (주)삼양유지에서 제공받았으며 효소역가 측정에 이용한 pyrogallol과 guaiacol 및 reference standard로 이용한 SBP 및 HRP는 Sigma사에서 구입하였다. 과산화수소 분해 정도를 알아보기 위한 과산화수소(35%)와 TiSO<sub>4</sub>·8H<sub>2</sub>O는 일본의 Junsei Chemical Co.에서, 전기영동에 필요한 일체의 시약은 Bio-rad사에서 구입하였다. CaCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ammonium sulfate 등의 시약류는 시약급을 이용하였다.

† Corresponding Author : Dept. of Chemical Engineering,  
Hanyang University, Ansan, Korea 425-791  
Fax : 0345-408-3779

### 실험기기

흡광도 측정에는 Pharmacia Biotech의 Ultrospec 2000을 이용하였다. 이온교환 크로마토그래피의 경우 Pharmacia사의 TK26/40 칼럼에 DEAE-Sephadex A-50을 충전하였고 gel filtration 크로마토그래피로는 Pharmacia사의 FPLC system (Superose 12 HR10/30 칼럼)을 이용하였다. Bio-Rad사의 Rotofor system을 이용하여 pI fractionation을 수행하였고 SBP의 pI를 결정하였다

### SBP 추출 및 정제 공정

(주)삼양유지에서 얻은 대두피는 원두를 조쇄한 후 fan에 의해 비중 차이로 분리한 것으로 콩 조각을 다량 함유하고 있다 지방분 및 남아 있는 콩조각을 충분히 제거하기 위해서 fan에 의해 다시 한번 분리시킨 대두피만을 가지고 SBP 추출공정을 진행하였다. 먼저 대두피 120 g과 수돗물 1,000 ml을 40°C에서 30분 정도 교반한 후 배를 이용하여 대두피를 압착제거한 후 남은 여과추출액에 총 부피가 1,000 ml이 되도록 수돗물을 첨가한 후 대두피 120 g을 첨가하여 위와 같은 조건에서 (즉 40°C에서 30 분간 교반) 다시 대두피를 제거하는 과정을 6 회 반복하였다. 이렇게 얻은 추출액을 12,000 xg로 20 분간 원심하여 고형물을 1차제거하고 상층액을 회수하였다. 염처리 (CaCl<sub>2</sub> 1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%), pH 처리 (pH 9-11), 열처리 (80°C, 10 분 간)를 통해 침전된 고분자성 이물질들을 원심분리 (12,000 xg, 15 분)하여 제거하였다

이 효소 추출용액에 25% 포화농도로 ammonium sulfate를 넣고 4°C에서 30 분간 교반시킨 후 12,000 xg에서 15 분간 원심분리하였다 상층액을 수거하여 75% 포화농도가 되도록 ammonium sulfate를 첨가한 후 4°C에서 3 시간 동안 교반하였다 이 때 대부분의 SBP는 침전하며 12,000 xg에서 15 분간 원심하여 SBP pellet을 회수하여 0.05 M Tris-HCl (pH 6.8) 완충액에 재용해시킨 후 동일한 완충액에서 24 시간 동안 투석하였다 (Spectrapor membrane tubing MWCO 12,000-14,000, Spectrum Medical Industries, Inc USA). 투석액을 Rotofor system을 이용하여 pH 3에서 10까지 pH 구배를 주며 pI 값을 이용한 분획정제를 하였다. 총 20 개의 분획을 역가를 보이는 분획을 모아 투석시킨 후, 이 효소액을 Amicon사의 YM100 membrane을 이용하여 분자량 100,000 이상의 고분자 물질을 제거하고 YM30을 이용하여 농축시킨 후 이온교환 크로마토그래피의 시료로 이용하였다. 음이온 교환수지인 DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chemicals, AB, Uppsala, Sweden) 칼럼에 효소액을 흡착시킨 후 0.05 M Tris-HCl (pH 6.8) 완충액으로 1차 세척시킨 후 동일한 완충액내 NaCl 농도 0.5 M까지 2 ml/min 유속으로 선형 농도구배를 주었다. 효소 역가가 나타난 분획을 모아 YM30으로 농축한 후 Superose 12 칼럼에 0.5 ml/min의 유속으로 통과시켰다. 이 때 역가를 나타내는 분획을 수집하여 YM30으로 농축하여 정제된 효소를 얻었다.

### Peroxidase 역가 측정 및 단백질 정량

SBP 및 HRP의 역가분석은 Chance와 Maehly의 분석법에 따랐다(17). SBP 1 unit은 pH 6.0에서 20 초 동안 pyrogallol에서 1.0 mg의 purpurogallin이 생성되는 것으로 정의된다. 단백질 정량은 BSA를 표준물질로 하여 Bradford 분석법에 의해 측

정하였다(18)

### 정제된 SBP의 분자량, pI 및 RZ 값 측정

정제된 SBP의 분자량은 SDS-PAGE(12.5% gel)에 의해 결정하였다 pI 값은 Rotofor system을 이용하여 pH 3.0에서 5.0 까지 pH 구배를 준 후 20 개의 분획을 대상으로 역가분석을 통하여 결정하였다. RZ(Reinheitsszahl) 값은 heme peroxidase 내부의 heme이 차지하는 비율을 평가하는 지표로 이용된다. 본 실험에서는 A<sub>403nm</sub>/A<sub>275nm</sub>로 RZ 값을 결정하였다.

### SBP와 HRP의 열 및 pH 안정성 평가

SBP 및 HRP의 thermal deactivation energy를 구하기 위하여 80, 85, 90°C의 온도에서 불활화 속도상수를 구한 후 Arrhenius식으로부터 구하였다 pH 안정성을 보기 위하여 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>와 NaOH를 이용하여 pH 3에서 12까지의 완충액을 만든 후 효소 안정제로서 0.2 M CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 후 SBP 및 HRP를 각각의 pH에서 24 시간 동안 노출시킨 후 역가를 측정하였다.

### SBP 및 HRP의 과산화수소 분해능 평가

32 ppm과 71 ppm의 과산화수소 수용액에 3.2 unit/ml의 SBP (RZ=1.2)와 4.6 unit/ml의 HRP (RZ=0.5)를 각각 넣은 후 시간에 따른 잔존 과산화수소의 양을 측정하였다 과산화수소의 정량 분석은 Eisenberg의 방법을 따랐다(19).

## 결과 및 고찰

### SBP 추출 및 정제 공정

SBP의 추출원으로 사용된 대두피에 붙어 있는 작은 대두 조각들을 비중차에 의해 제거했을 때와 제거하지 않았을 때 추출된 효소역가와 단백질의 양을 살펴보았다 6 회 반복추출 후 specific activity는 각각 10.1 unit/mg과 4.6 unit/mg으로서 제거했을 때가 2 배 이상 높게 나타남으로써 대두 자체보다는 대두피에 SBP가 보다 고농도로 존재하고 있음이 유추되었다.

염 처리단계에서는 효소 추출액 50 ml (pH 5.5)에 CaCl<sub>2</sub>를 1%(w/v)이 되도록 첨가한 후 3 개의 aliquot으로 나누어 각각에 NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 각각 1%, 0.5%, 2% 농도로 첨가하고 교반한 후 원심분리시켰다. 상층액을 투석(MWCO 12,000-14,000)시킨 후 역가를 분석한 결과 CaCl<sub>2</sub>만을 첨가했을 때는 6.7 unit/mg, NaCl 1%를 첨가했을 경우는 6.5 unit/mg, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%와 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2%를 첨가했을 때는 각각 7.2 unit/mg과 6.8 unit/mg로 큰 차이는 없었으나 CaCl<sub>2</sub> 1%와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%를 넣은 경우가 비교적 좋았다. pH 처리효과도 1% CaCl<sub>2</sub>를 함유한 효소액을 pH 9, 10, 11에 노출 후 specific activity를 측정할 결과 각각 6.5 unit/mg, 7.3 unit/mg, 7.9 unit/mg로 나왔다 따라서 대두피에서의 SBP 추출공정은 대두피만을 이용하되 CaCl<sub>2</sub> 1%와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%를 첨가하고 pH를 11로 조정할 후 80°C에서 10 분간 염, pH, 열 처리를 동시에 수행하였다.

이와 같이 얻어진 추출액을 ammonium sulfate 침전법 (25%와 75% 포화), Rotofor fractionation, DEAE-Sephadex A-50 크로마토그래피, Superose 12 크로마토그래피를 통해 정제하였다. Table 1은 각 정제단계에서의 경제효과를 요약한 것이고,

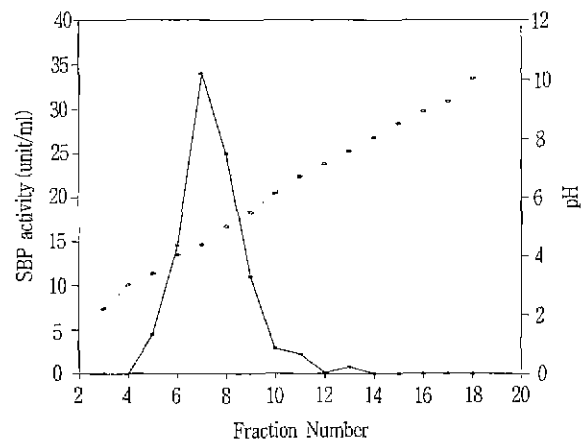
Figure 1은 SDS-PAGE 결과를 보여준다. Table 1에서 보듯이 추출액의 specific activity는 10.1 unit/mg이었고 염, pH, 열처리 후에는 17.5 unit/mg으로 약 1.7 배 정제되었다. 이 정제율은 기대에 못 미치는 것으로서 추출액내의 고분자성 단백질들이 그리 많지 않음을 알 수 있었다. 75% 포화된 ammonium sulfate에 의해 침전 후 재용해된 효소액은 24.8 unit/mg으로서 두 차례의 염석에 의해서도 SBP의 정제효과는 1.4 배로 미미한 것으로 나타났고 수율도 상당히 감소되었다. 한편 투석만으로 specific activity는 45.4 unit/mg으로 약 1.8 배 향상되었으며 이는 약 10 kD 이하의 저분자량 물질들이 주요 이물질들을 구성하고 있음을 제시하였다. Rotofor system을 이용한 pI fractionation 후에는 122.7 unit/mg으로 2.7 배 정도의 정제효율을 보임으로써 등전점 차이를 이용한 분리가 비교적 효율적임을 알 수 있었으나 이 때 수율은 상당히 감소되었다. 반면 DEAE A-50 칼럼 단계 후에는 105.9 unit/mg으로 저분

자 물질(약 30 kD 이하)이 감소되었다. Superose 12 칼럼 분리 후에는 270 unit/mg으로 약 2.2 배 정제되었다. 정제된 SBP의 분자량은 약 45 kD으로 (Figure 1 lane 7 참조). 이 분자량은 Sessa와 Anderson이 Amsoy "71" soybean으로부터 정제한 SBP(20)보다 약 8 kD 높은 값이다.

Figure 2는 투석액을 pH 3에서 10까지 pI fractionation한 결과를 보여 준다. SBP의 역가는 pH 3.5-5.4 사이에서 주로 검출되었으며 pH 4.2 부근에서 peak를 나타냈다. SBP 역가를 보이는 분획을 모아 DEAE-Sephadex A-50 칼럼에 흡착시킨 후 NaCl 농도가 0.5 M 될 때까지 선형 농도구배를 적용시키면서 용출시켰다. Figure 3은 DEAE 용출액의 흡광도와 효소역가 profiles를 보여 준다. SBP는 0.3 M 이상의 NaCl 농도에서 용출됨을 확인하였다. 효소역가가 검출된 30 번에서 50 번 사이의 분획을 취합하여 YM30으로 농축한 후 FPLC를 이용한 분리를 수행하였다. Figure 4에서 보듯이 40 분과 45 분대에 저분자량 이물질들이 용출되었으나 15 분에서 35 분 사이의 단일 띠에서 효소역가가 흡광도와 비례하여 검출되었으며 28-30 분대에서 peak를 보여 주었다. 이 부분을 취하여 농축시켜 정제된 SBP를 얻었다.

Table 1 SBP purification profile

Process Step	Total Activity (unit)	Total Protein (mg)	Specific Activity (unit/mg)	Purification Factor	Yield (%)
Crude Extract	6045	598	10.1	1.0	100
Salt, pH, Thermal Treatment	5580	318	17.5	1.7	92
Resolubilization of 75% Ammonium Sulfate Salting Out Pellet	3270	132	24.8	2.5	54
Dialysis	3220	71	45.4	4.5	53
Rotofor Fractionation	1350	13.2	102.3	10.1	22
DEAE A-50	540	5.1	105.9	10.5	9
Superose 12	162	0.6	270	26.7	3



(a)

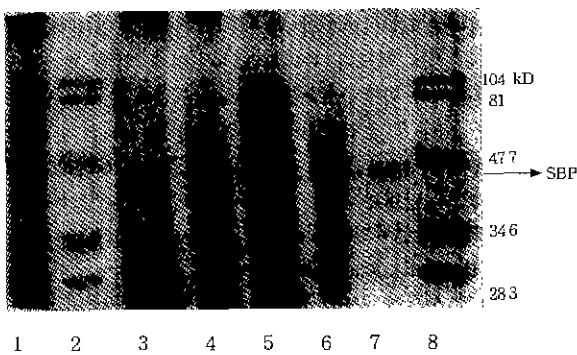


Figure 1 SDS-PAGE (12%) analysis of SBP purification proces.

Lane 1 : Crude extract

- 2, 8 : Molecular weight standards.
- 3 : Supernatant after salt, pH, thermal treatment
- 4 : Resolubilized pellet after 75% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation
- 5 : Rotofor fraction pool (pH 3.5-5.5)
- 6 : DEAE-Sephadex A-50 eluate pool
- 7 : FPLC Superose 12 fraction



(b)

Figure 2. Analysis of harvested Rotofor fractions.

(a) pH (◇) and SBP activity (●) distributions in Rotofor fractions.

(b) SDS-PAGE analysis of Rotofor fractions

Lane 1 and 9 : molecular weight standards

Lane 2 through 8 : fractions 4 through 10

Lane 10 : molecular weight standard (Ovalbumin 45 kD)

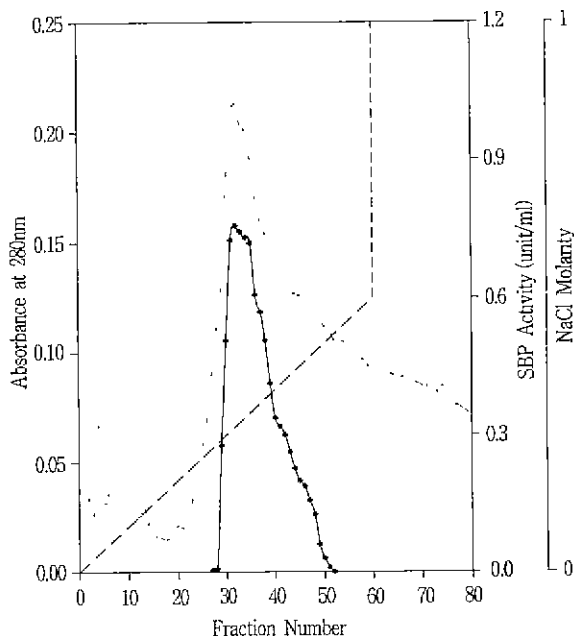


Figure 3. Elution profile from DEAE-Sephadex A-50 chromatographic column:  $A_{280}$  (.....), SBP activity (—◆—), NaCl gradient (---) Column size was  $2.4 \times 17$ cm. 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) was used for washing and elution. Each fraction was 4 ml.

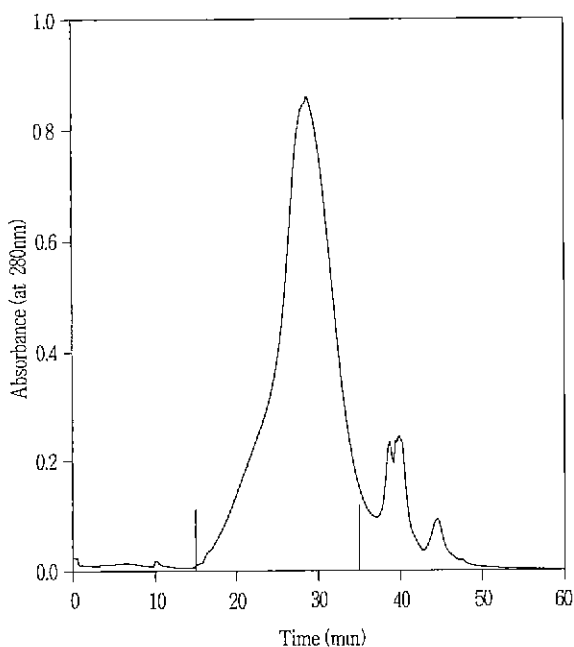


Figure 4. Elution profile from Superose 12 HR10/30 column chromatography 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) was used at 0.5 ml/min flow rate.

Figure 5는 정제된 SBP 용액을 scanning한 결과이다. 403 nm에서 peak가 나타나므로 본 SBP는 전형적인 heme protein임을 재확인할 수 있었다. 본 SBP의 RZ 값은 0.43으로 시판되는 HRP의 RZ 값 (0.5 이상), Amsoy "71" soybean으로부터 정제된 SBP의 RZ 값(2.6)(20), Japanese horseradish에서 정제

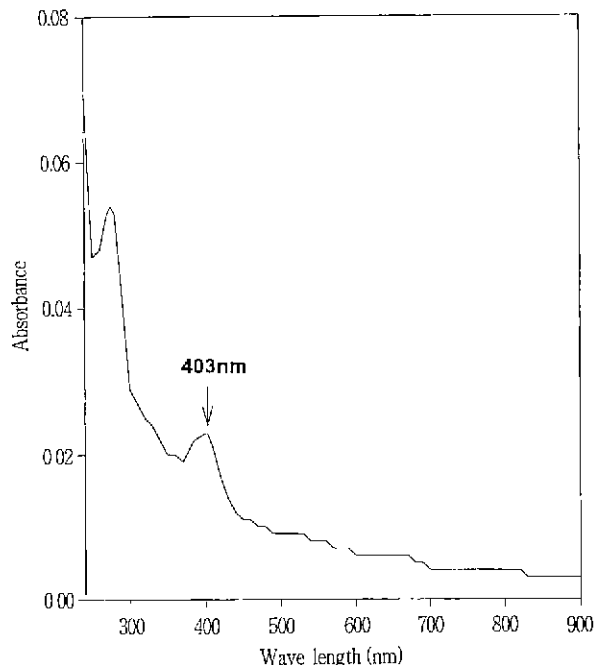


Figure 5. The absorption spectrum of the purified SBP The SBP showed a peak at 403 nm characteristic for the heme group.

한 HRP의 RZ 값 (3.7)(21), Theorell에 의해 순수 결정화된 HRP의 RZ 값 (3.04)(17)에 비해 비교적 낮았다.

#### SBP의 열 및 pH 안정성

SBP의 열 안정성을 알아보기 위하여 65°C와 80°C에서 노출 시간에 따른 역가의 변화를 HRP와 비교하여 Figure 6에 나타내었다. 65°C에서 SBP의 역가는 7 시간 동안 거의 변화가 없는 것으로 확인되었고 반면 HRP의 경우 100 분 후에 50% 정도 7 시간 후에는 약 80% 정도 감소하였다. 80°C에서는 HRP의 경우 5 분 이내에 50% 이상의 역가를 잃은 반면 SBP의 경우 5 시간 후에도 20% 정도가 유지되었다. 열에 의한 효소활성 감소는 1차반응이라 가정하고 불활화(deactivation) 속도상수를 구한 결과 (Figure 7 참조), HRP는 65°C와 80°C에서의 각각  $2.1 \times 10^{-3}$ ,  $2.0 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ 으로 계산되었고 SBP는 80°C에서  $2.4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ 으로 나타나 80°C에서의 경우 SBP가 약 8 배 정도 안정한 것으로 확인되었다.

SBP의 thermal deactivation energy의 값을 구하고자 80, 85, 90°C에서 시간에 따른 잔존 효소역가를 1차반응을 가정하여 plot하였다. Figure 8에서 보듯이 thermal deactivation은 1차반응속도에 비교적 잘 부합하였고, 각 온도에서 구한 불활화 속도상수( $k_d$ )는 80°C의 경우  $5.7 \times 10^{-3}$ , 85°C와 90°C의 경우 각각  $1.1 \times 10^{-2}$ 과  $8.7 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ 로 나타났다. 80°C에서 SBP의 경우 Figure 7에서 보다 약 2 배 이상 높은 불활화속도를 보였는데 이는 Figure 7 실험에서는 10 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 첨가하여 효소의 안정성이 향상된 반면 Figure 8 실험에서는  $\text{CaCl}_2$ 를 첨가하지 않아 안정성이 낮아졌기 때문이라 사료된다.

Figure 9는 불활화 속도상수를 Arrhenius식에 적용하여 deactivation energy( $\Delta E_d$ ) 값을 구한 것이다. SBP의 경우  $\Delta$

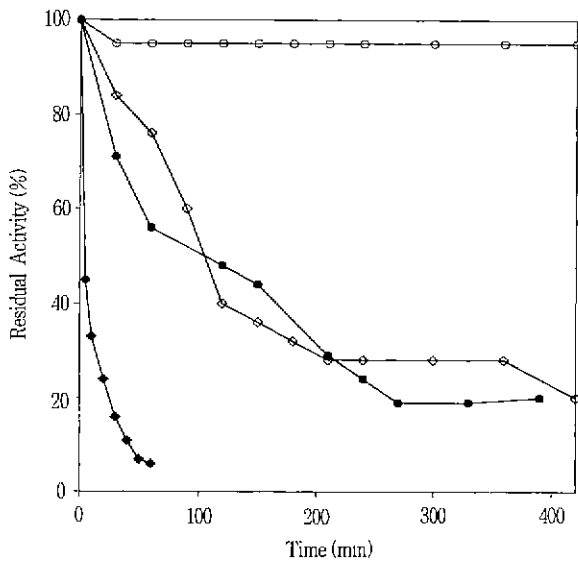


Figure 6. Deactivation profiles of SBP and HRP in DI water (pH 5.5) containing 10mM CaCl<sub>2</sub> at 65°C and 80°C: SBP at 65°C (○) and 80°C (●); HRP at 65°C (◇) and 80°C (◆)

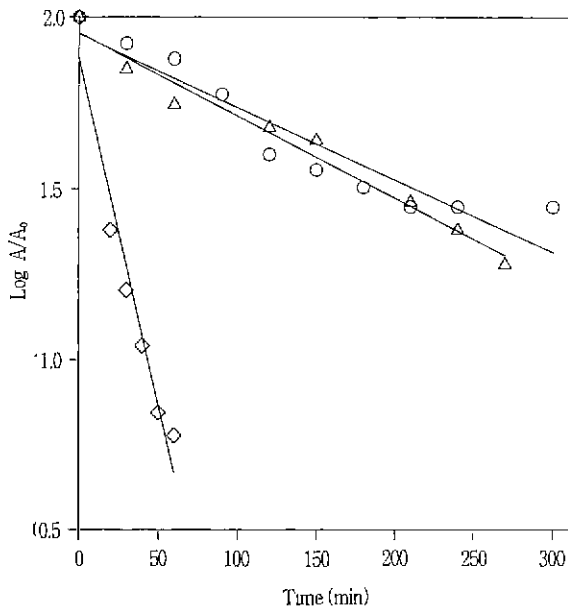


Figure 7 Log plots of thermal deactivation of HRP and SBP. Experimental conditions were as described in Fig. 6. HRP at 65°C (○):  $k_d = 2.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , HRP at 80°C (◇):  $k_d = 2.0 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ , SBP at 80°C (△):  $k_d = 2.4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ .

$E_d$ 는 69.3 kcal/mol로 McEldoon과 Dordick에 의해 얻어진 SBP의  $\Delta E_d$  (76.9 kcal/mol)과 큰 차이가 없었다(16). HRP의 경우도 35.5 kcal/mol로서 Lu와 Whitaker가 구한 값 (32.0 kcal/mol)와 거의 일치하였다(22) 이를 통해 본 실험에서 추출된 SBP가 HRP에 비해 열적 안정성이 탁월함이 재확인되었다.

Figure 10은 40°C부터 95°C까지 온도를 계속 올리면서 SBP와 HRP의 역가변화를 조사한 것이다. HRP는 50°C부터 역가가 급격히 저하되었으나 SBP는 70°C까지 역가가 거의 100% 유지되었다 HRP는 70°C에서 46%의 역가만이 75°C에서는 14%만의

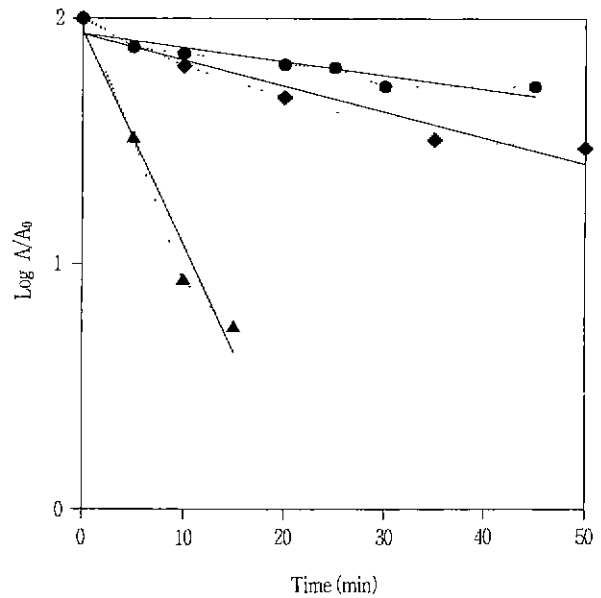


Figure 8. First-order deactivation rate constants of SBP at 80°C (● :  $5.7 \times 10^{-3}$ ), 85°C (◆ :  $1.1 \times 10^{-2}$ ) and 90°C (▲ :  $8.7 \times 10^{-2}$ ) in DI water (pH 5.5) free of CaCl<sub>2</sub>.

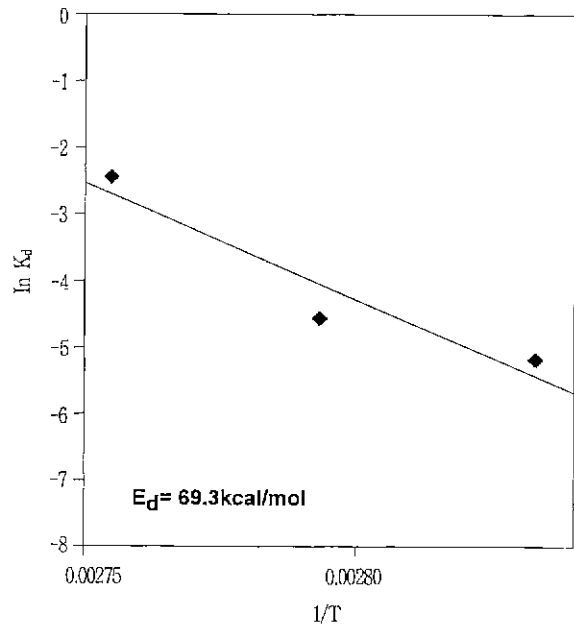


Figure 9. Arrhenius plots for calculation of thermal deactivation energy of SBP. The deactivation energy was calculated to be 69.3 kcal/mol.

역가가 남은 반면, SBP는 75°C에서도 80%의 역가가 유지되었다. 효소의 역가를 모두 잃어 버린 온도는 HRP가 80°C, SBP가 95°C로서 SBP가 HRP보다 열적으로 우수한 것을 확인할 수 있었다.

Figure 11은 Figure 10에서 얻은 불활성화 자료를 멸균시간과 온도와의 관계를 나타내는 Del factor에 적용시켜 효소활성이 50%와 10%로 각각 줄어드는 시간을 예측해 본 것이다. 65°C에서 HRP의 실제 반감기는 약 110 분 정도였으며 계산한 결과는 126 분으로 거의 일치하는 것을 확인 하였다.

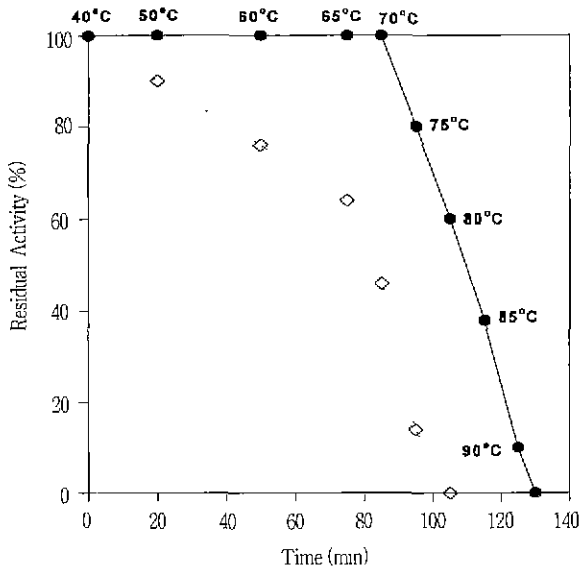


Figure 10 Deactivation profiles of SBP (●) and HRP (◇) under cumulative thermal treatment (at pH 5.5). 10 mM CaCl<sub>2</sub> was added as in Figure 6.

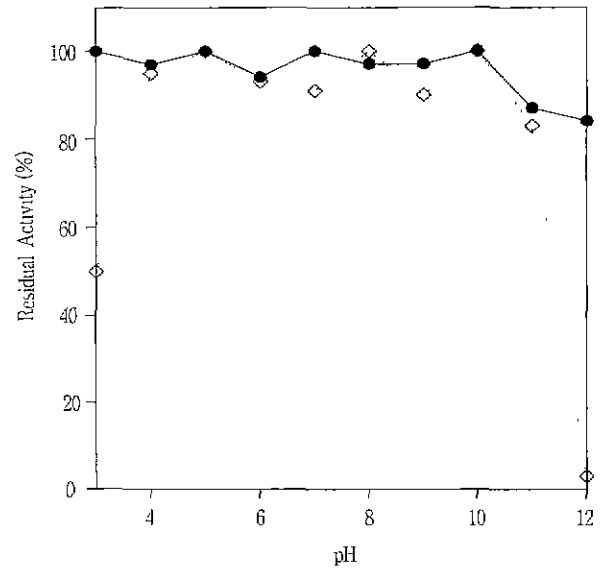


Figure 12. pH stability profiles of SBP (●) and HRP (◇) at 20°C in 0.2M CaCl<sub>2</sub> aqueous solution. Exposure time was 24 h.

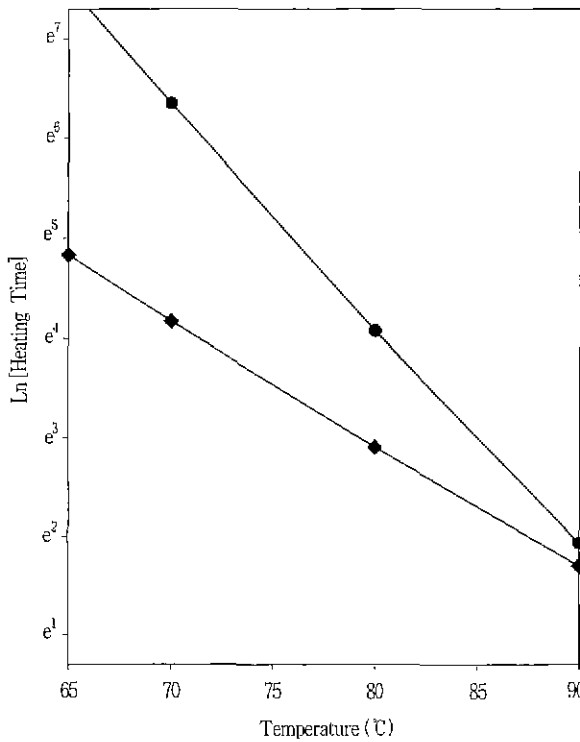


Figure 11. Effect of heating time and temperature on half life. Circle and diamond symbols represent SBP and HRP

Figure 12는 pH 3-12 범위에서 24 시간 동안의 pH 안정성을 보여주고 있다. SBP는 전구간에 걸쳐 80% 이상의 역가를 유지하는 pH 안정성을 보이고 있으나 HRP는 pH 3에서 50%, pH 12에서는 10% 미만의 역가만이 남아 있는 것으로 분석되었다. SBP의 경우 이러한 낮은 pH에서의 안정성을 이용하여 폐수 내 유기물 제거에 적용되는 Fenton 공정을 대체할 수 있는 peroxidase 공정에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

SBP의 과산화수소 분해 능력

SBP 및 HRP의 과산화수소 분해반응을 알아보기 위하여 32 ppm과 71 ppm의 과산화수소 수용액에 3.4 unit/ml의 SBP (RZ=1.2)와 4.6 unit/ml의 HRP (RZ=0.5)를 넣은 후 시간에 따른 잔존 과산화수소의 양을 측정하였다. Figure 13에서 보듯이 3.4 unit/ml SBP의 경우 32 ppm과 71 ppm의 과산화수소가 20 시간 후 각각 약 49%, 45%가 제거되었고, 4.6 unit/ml HRP의 경우 20 시간 후 각각 약 30%, 27%가 제거되었다. 본 실험에서는 peroxidase가 가지고 있는 역가보다 RZ값이 과산화수소의

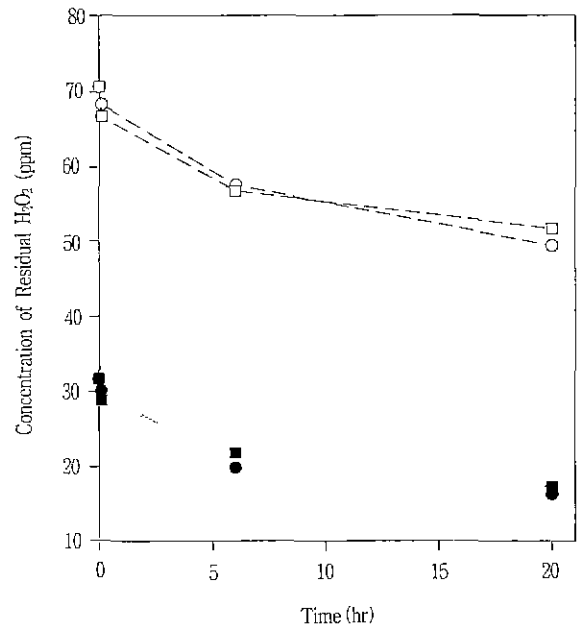


Figure 13. Degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by SBP (circles : 3.4 unit) and HRP (squares : 4.6 unit). Open symbols represent 71 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Closed symbols show 32 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

분해에 더 큰 영향을 보이는 것으로 관찰되었다. 앞으로의 실험에서는 heme를 가지는 정도인 RZ값과 과산화수소의 분해 정도의 상관관계를 밝힘으로써 peroxidase와 페놀 증합반응의 정량적인 관계를 알아 볼 계획이다(23).

## 요 약

국산 대두피내 SBP를 염, pH, 열처리,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  침전, pI fractionation, 음이온 교환 크로마토그래피 및 겔여과 크로마토그래피에 의해 SDS-PAGE상에서의 단일 밴드로 정제하였다. 추출액내 주 오염물질은 고분자성보다는 약 10 kD 이하의 저분자성 물질인 것으로 유추되었다. SBP 정제액내 총단백질 대비 specific activity는 270 unit/mg이었고 정제율은 27이었다. SBP의 분자량은 45kD, pI 값은 4.2로 관찰되었으며 heme의 흡광파장은 403 nm이었다. 온도에 의한 불활화반응의 속도상수를 비교할 때 80°C에서 SBP의 경우  $2.4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ 으로 HRP보다 약 8배 높은 안정성을 보여 주었다. SBP의 불활화 에너지는 63.9 kcal/mol로 산출되어 HRP의 35.5 kcal/mol보다 우수한 열 안정성이 확인되었다. pH 안정성 역시 SBP는 pH 3-12 사이에서 고른 안정성을 가지는 것으로 나타났다. 과산화수소의 분해에 있어서는 두 peroxidase가 비슷한 경향을 보였으나 RZ 값이 높은 SBP가 HRP에 비해 10% 정도 높은 분해능을 보였다. 값싼 대두피에서 추출된 열 및 pH 안정성이 우수한 SBP는 HRP를 대체할 수 있는 범용성이고 경제적인 peroxidase로 응용될 것으로 기대된다.

## 감 사

한양대학교 공학기술연구소의 1998년도 연구비 지원에 감사드립니다. 서경림 연구원은 교육부지정 국책대학원인 한양대학교 신소재공정공학원의 장학금 지원에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Lewis, R. J., Sr. (1993), *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, 12th ed., p888, Van Nostrand Reinhold Co., New York, U.S.A.
- Orten, J. M. and O. W. Neuhaus (1970), *Biochemistry*, 8th ed., pp.250-251. The C. V. Mosby Co., U.S.A.
- Ganthavorn, C. and J. R. Powers (1988), Changes in Peroxidase Activity, Hexanal, Ascorbic Acid and Free Sulfhydryl in Blanched Asparagus During Frozen Storage. *J. Food Sci.*, 53(5), 1403-1405.
- Ganthavorn, C., C. W. Nagel and J. R. Powers (1991). Thermal Inactivation of Asparagus Lipoxxygenase and Peroxidase, *J. Food Sci.*, 56(1), 47-49.
- Weng, Z., M. Hendrickx, G. Maesmans, and P. Tobback (1991), Immobilized Peroxidase: A Potential Bioreactor for Evaluation of Thermal Process, *J. Food Sci.* 56(2), 567-570.
- Walsh, G. and D. Headon (1994). *Protein Biotechnology*, pp.272-283, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Frew, J. E., P. Jones and G. Scholes (1983), Spectrophotometric Determination of Hydrogen Peroxide and Organic Hydroperoxides at Low Concentrations in Aqueous Solution". *Analytica Chimica Acta*, 155, 139-150.
- Bergmeyer, H. U., (1986), *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., pp.457-468, Vol X, VCH, Germany.
- Dordick, J. S., M. A. Marletta and A. M. Klibanov (1987), Polymerization of Phenols Catalyzed by Peroxidase in Nonaqueous Media, *Biotechnol Bioeng.*, 30, 31-36
- Wick, C. B., (1996), Enzymol International Shows Promise of Novel Peroxidase, *Genetic Engineering News*, 16(3), 1
- Arsegué, D. and M. Baboulene (1994), Removal of Phenol from Coupling of Talc and Peroxidase Application for Depollution of Waste Water Containing Phenolic Compounds, *J. Chem Tech Biotechnol*, 61, 331-335.
- Adler, P. R., R. Arora, A. E. Ghaouth, D. M. Glenn, and J. M. Solar (1994). Bioremediation of Phenolic Compounds from Water with Plant Root Surface Peroxidases", *J. Environ Qual*, 23, 1113-1117.
- Tatsumi, K., S. Wada and H. Ichikawa (1996), Removal of Chlorophenols from Wastewater by Immobilized Horseradish Peroxidase, *Biotechnol Bioeng*, 51(1), 126-130.
- Wu, J., K. E. Taylor, J. K. Bewtra and N. Biswas (1993). Optimization of the Reaction Conditions for Enzymatic Removal of Phenol from Wastewater in the Presence of Polyethylene Glycol, *Wat. Res.*, 27(12), 1701-1706
- Al-Kassim, L., K. E. Taylor, J. A. Nicell, J. K. Bewtra and N. Biswas (1994), Enzymatic Removal of Selected Aromatic Contaminants from Wastewater by a Fungal Peroxidase from *Coprinus macrorhizus* in Batch Reactors. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 61, 179-182.
- McEldoon, J. P. and J. S. Dordick (1996). Unusual Thermal Stability of Soybean Peroxidase, *Biotechnol Prog.* 12, 555-558
- Chance, B. and A. C. Maehly (1955), *Methods in Enzymology*. II, pp.773-775, New York
- Bollag, D. M. and S. J. Edelstein (1991), *Protein Methods*, pp. 50-55, Wiley-Liss, New York.
- Eisenberg, G. M. (1943), Colorimetric Determination of hydrogen peroxide, *Ind. Eng. Chem.*, 15(5), 327-328.
- Sessa, D. J. and R. L. Anderson (1981), Soybean Peroxidase Purification and Some Properties *J. Agric. Food Chem.* 29, 960-965.
- Tamura, Y. and Y. Morita (1975). Thermal Denaturation and Regeneration of Japanese-radish Peroxidase, *J. Biochem.*, 78, 561-571.
- Lu, A. T. and J. R. Whitaker (1974), Some Factors Affecting Rates of Heat Inactivation and Reactivation of Horseradish Peroxidase, *J. Food Sci.*, 39, 1173-1178.
- Walsh, C. (1979). *Enzymatic Reaction Mechanisms*, pp. 464-465, W. H. Freeman and company