

Flavobacterium meningosepticum 기원 Peroxidase의 정제 및 특성

최양문* · 조홍연¹ · 양한철²

고려대학교 생물공학연구소, ¹고려대학교 생명공학원 및 연세대학교 생물산업소재연구센터,
²고려대학교 생명공학원

Purification and Properties of Peroxidase from *Flavobacterium meningosepticum*. Yang-Mun Choi*, Hong-Yon Cho¹ and Han-Chul Yang². Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 135-075, Korea, ¹Graduate School of Biotechnology, Korea University and Bioproducts Research Center of Yonsei University, Seoul 120-749, Korea, ²Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 135-075, Korea – Peroxidase was purified to homogeneity from cell free extract of *Flavobacterium meningosepticum*. The molecular weight of the enzyme estimated by gel filtration column chromatography was 220,000. A identical subunit (54,000) was detected on SDS-PAGE of the enzyme. From these results, the enzyme was supposed to have four identical subunits. On the basis of the visible absorption spectra of the purified enzyme, the enzyme was a typical hemoprotein. The isoelectric point of the enzyme was 4.1. On using *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-*m*-toluidine (Toos) as a hydrogen donor, the enzyme showed optimum activity at the pH 5.5 and 50°C. The enzyme activity was inhibited by carbonyl reagent and Hg²⁺.

일반적으로 peroxidase(EC.1.11.1.7) 또는 hydrogen peroxidase로 알려진 broad specificity peroxidase는 수소공여체의 존재 시 H₂O₂를 H₂O로 환원시키는 효소로서 주로 horseradish의 뿌리(1), 시금치 잎(2), 토마토(3), kiwi(4) 및 배추뿌리(5) 등의 식물체에 널리 존재하는 효소로서 알려져 있다. 미생물에서는 cytochrome c peroxidase(EC.1.11.1.5)(6, 7), NAD⁺ peroxidase(EC.1.11.1.5)(8), chloroperoxidase(EC.1.11.1.5)(9), *o*-dianisidine peroxidase(10) 등의 specific peroxidase가 보고되어 있으나 광범위한 기질특성을 나타내는 peroxidase는 거의 연구된 바 없다.

이 효소의 주된 산업적 이용은 glucose oxidase(EC 1.1.3.4)(11, 12), urinate oxidase(EC 1.7.3.3)(13) 및 cholesterol oxidase(EC1.1.3.6)(14)에 의해 생성된 H₂O₂를 비색적으로 정량함으로써 각각의 효소기질의 농도를 측정하는데 사용되는 임상진단 시약으로서 주로 horseradish로부터의 peroxidase가 산업적으로 생산되고 있다. 최근 저렴하고 대량생산이 가능한 미생물로부터의 peroxidase의 screening이 활발하게 진행되고 있으며 *Copronus*(15-17), *Pellicularia*(18) 및 *Arthromyces*(19, 20) 등의 곰팡이로부터의 peroxidase 보고가 있었지만 세균으로부터는 peroxidase와 catalase활성을 동시에 갖고 있는 효소가 *Bacillus stearothermophilus*(21)와 *Halobacterium halobium*(22)으로부터 생산된다는 보고가 있었을 뿐 peroxidase 활성만 갖는 효소에 관한 보고는 거의 없었다.

본 연구에서는 *Flavobacterium meningosepticum*으로부터 nucleoside oxidase(23)의 생산조건을 검토하는 과정에서 이 세균이 peroxidase를 생산하는 것을 발견하고, 이 효소를 정제하고 효소학적 특성을 밝히는 동시에 산업적 이용 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

시약

본 연구에 사용된 기질인 H₂O₂, phenol, 2,4-dichlorophenol, *N,N*-diethylaniline, *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-*m*-toluidine(Toos), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS) 및 guacol은 Wako Pure Chemical Industries 제품을, DEAE-sephacel, phenyl-cepharose CL-4B, sephacryl S-300은 Pharmacia 제품을 사용하였다. 기타 시약은 1급 이상의 시약을 사용하였다.

사용균주

전보에서 보고한 바와 같이 토양에서 분리한 *Flavobacterium meningosepticum*(23)을 사용하였다.

배양조건

Peroxidase 생산을 위한 배양조건은 전보에서 보고(23)한 nucleoside oxidase 생산을 위한 방법과 동일하게 하였다.

효소활성 측정

효소의 활성은 1.0 mM 과산화수소, 0.6 mM Toos,

*Corresponding author.

Key words: *Flavobacterium meningosepticum*, peroxidase

1.5 mM 4-aminoantipyrine, 50 mM acetate buffer(pH 5.5)로 구성된 반응액 1 ml에 효소용액 20 μ l를 첨가하고 37°C에서 5분간 반응 후 0.5% SDS 용액 2.0 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 555 nm에서 생성된 보라색 색소를 측정하였다. 효소활성 단위는 37°C에서 1분당 1 μ mole의 H₂O₂를 분해하는 효소량을 1 unit라 하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Biorad protein assay kit(24)를 사용하여 측정하였으며, peroxidase의 정제를 위한 column chromatography의 용출액 단백질 농도는 280 nm 흡광도에서 측정하였다.

Peroxidase의 순도 검정

정제된 peroxidase는 Orstein과 Davis 방법(25)에 준하여 disc PAGE로 검정하였다. 본 실험에서는 slab gel kit을 사용하여 3.0% stacking gel과 7.5% separating gel을 만든 후 20 μ g peroxidase를 loading 하여 20 mA에서 30분 영동 후 30 mA에서 4시간 전기영동 하였다. 전기영동을 마친 gel은 coomassie brilliant blue 0.1% 용액에서 염색 후 acetic acid 7.5%, MeOH 5.0%, H₂O 87.5%의 탈색액으로 탈색하였다.

Peroxidase의 absorption spectra

산화형은 1.13 mg/ml peroxidase 효소액을 spectrophotometer로 흡광도 190~700 nm을 scanning 하고 환원형은 3 ml 효소액에 Na₂S₂O₄ 1M 50 μ l을 첨가하여 산화형과 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

조효소액의 조제 및 DEAE-Sephacel treatment

*Flavobacterium meningosepticum*의 배양액을 원심분리(14,000×g, 30분) 하여 얻은 균체를 Dyno-Mill로 마쇄하여 얻은 조효소액을 1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)를 사용하여 pH 7.0로 조정 후, 원심분리한

상등액을 cell free extract로 사용하였다. Cell free extract(8.0 l)는 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)으로 평형되어진 DEAE-sephacel(1,000 ml)에 첨가하고 1시간 동안 서서히 교반하여 흡착시킨 후 peroxidase가 흡착된 DEAE-sephacel을 Buchner funnel에서 0.1 M NaCl이 포함된 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)으로 세척하였다. DEAE-sephacel에 흡착되어 있는 peroxidase는 1.5 M NaCl이 포함된 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 용출시켰다. 이때, 용출된 비효소활성은 4.33 units/mg이었으며 총활성은 12,000 units였다(Table 1). 용출된 효소액은 10 mM potassium phosphate buffer에 대하여 5~10시간 간격으로 3회 투석하였다.

DEAE-Sephacel column chromatography 전단계에서 투석된 효소액은 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 DEAE-sephacel column (6.5×30 cm)에 흡착시키고 동 완충액에서 0~1.0 M NaCl 용액을 이용하여 직선적으로 gradient elution을 행하여 활성분획은 모아서 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 대하여 투석한 후 YM-30 membrane을 장착한 amicon 한외여과기를 이용하여 농축하였다.

Q-Sephacel column chromatography 농축효소액은 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 평형시킨 Q-sephacel column(4.5×40 cm)에 흡착시킨 후 동 완충액에서 0~0.8 M NaCl을 첨가시킨 동 완충액으로 용출하였다. 비활성이 높게 나타난 분획은 모아서 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 대하여 투석한 후 YM-30 membrane으로 장착한 amicon 한외여과기로 농축하였다. 이때 비효소활성은 15.9 units/mg이었으며 조효소액으로부터의 정제도는 17.1 배였다(Table 1).

Phenyl-sephacel CL-4B column chromatography 전단계에서 농축된 효소액은 pH 7.0으로 조정하면서 4.0 M이 되게 NaCl을 첨가한 후, 4.0 M NaCl이 포함된 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 평형시킨 phenyl sephacel CL-4B column(3.2×40 cm)에 흡착시켰다. 흡착된 효소는 4.0~0 M NaCl을 포함한

Table 1. Purification of peroxidase from *Flavobacterium meningosepticum*

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Fold	Yield (%)
Cell free extract	18,300	17,000	0.9	1.0	100
DEAE-Sephacel	2,770	12,000	4.3	4.7	70.6
DEAE-Sephacel	1,020	8,180	8.0	8.6	48.0
Q-Sephacel	380	6,050	15.9	17.1	35.6
Phenyl-Sephacel CL-4B	150	2,920	19.5	21.0	17.2
Hydroxyapatite	41.5	1,950	47.0	50.5	11.5
Sephacryl S-300	22.0	1,380	61.9	65.6	8.0

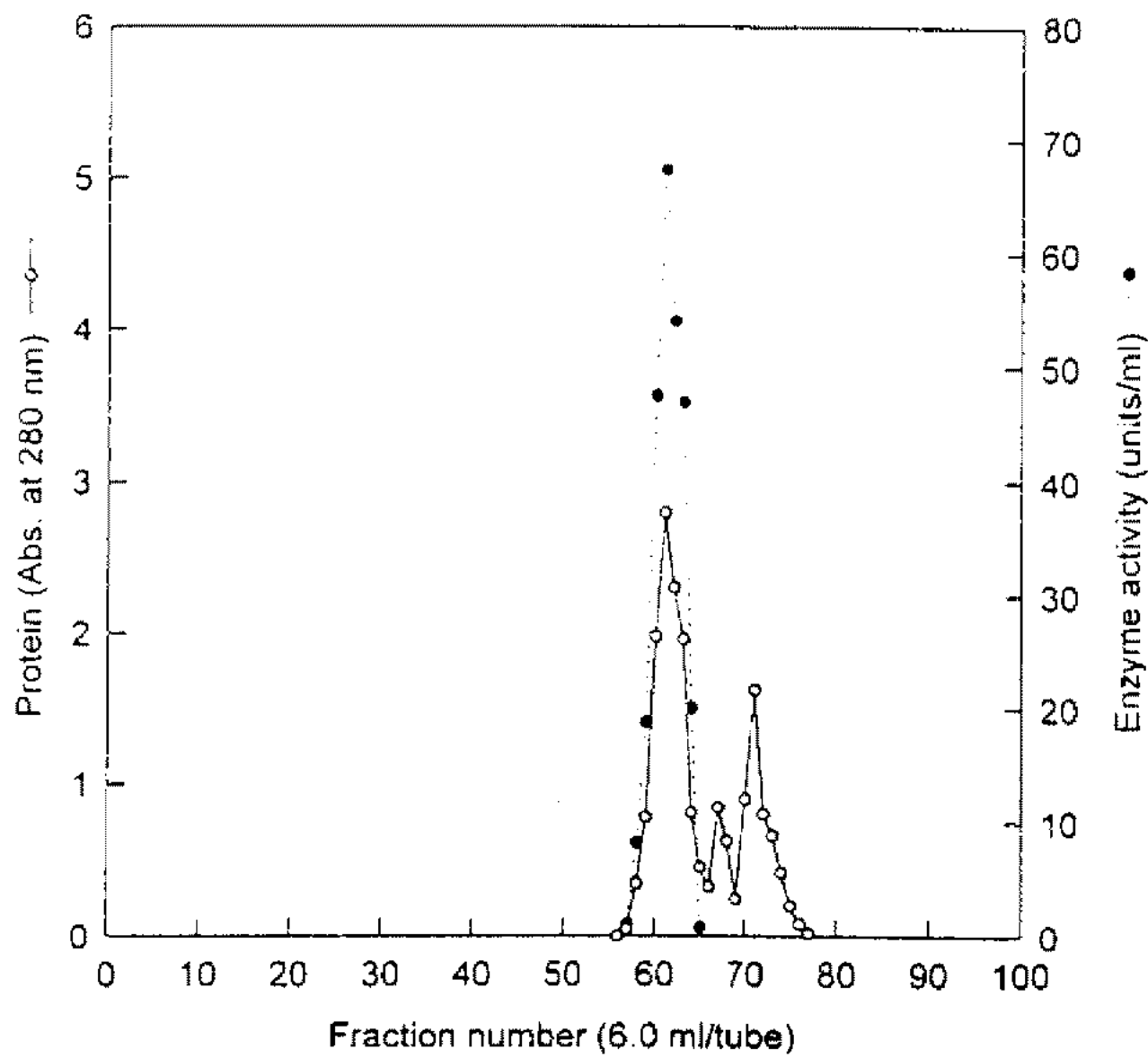


Fig. 1. Gel filtration of peroxidase on Sephacryl S-300. The enzyme was eluted with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.2 M NaCl. The flow rate and fraction volume were 12 ml/h and 6 ml, respectively.

10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 직선적 gradient elution을 행하였다. 효소활성을 나타낸 분획을 모아서 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 대하여 투석한 후 YM-30 membrane을 장착한 amicon 한외여과기로 농축하였다. 이때 비활성은 21.0 units/mg이었으며 정제도는 21.0배, 수율은 17.2%였다 (Table 1).

Hydroxyapatite column chromatography Hydroxyapatite를 5 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)으로 수회 세척 후 2.5×45 cm column에 충전하고 동완충액으로 평형시키고 전단계에서 투석한 효소액은 hydroxyapatite column에 흡착시켰다. 흡착된 효소단백질을 5 mM부터 400 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)으로 직선적 gradient elution을 행하였으며 비활성이 높은 분획을 모아 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 대하여 투석하고 YM-10 membrane으로 장착한 Amicon 한외여과기로 농축하였다. 이때 비효소활성은 47.0 units/mg이었다(Table 1).

Sephacryl S-300 column chromatography Sephacryl S-300을 3.5×85 cm column에 충전시키고 농축된 효소액을 loading 후 0.2 M NaCl이 포함된 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)으로 용출시킨 결과는 Fig. 1과 같았다. 활성을 나타낸 분획들에서 활성 peak와 단백질 농도를 나타내는 280 nm의 흡광도가 일정한 비례를 가져 peroxidase가 정제되었음을 추측하였다. 이때 효소비활성은 61.9 units/mg이었으며 조효소액으로부터의 최종 정제도는 Table 1에 나타낸 것과 같이 65.6배이고 수율은 8.0%이었다.

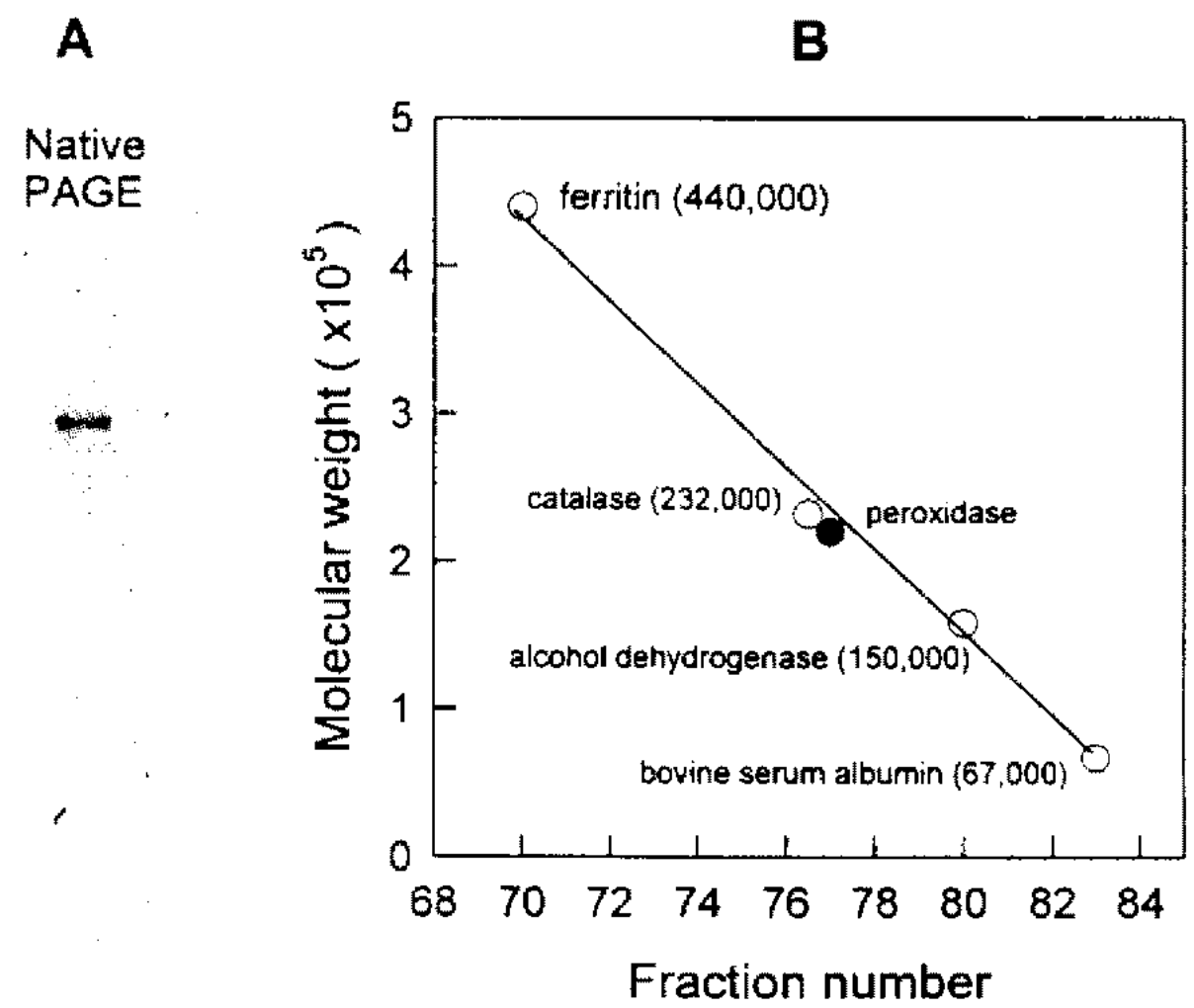


Fig. 2. Homogeneity of purified peroxidase by polyacrylamide Disc gel electrophoresis (A) and molecular weight determination of purified peroxidase by Sephacryl S-300 gel filtration (B).

A: The purified enzyme solution containing 15 µg protein was electrophoresed on a 7.5% gel at pH 8.9.

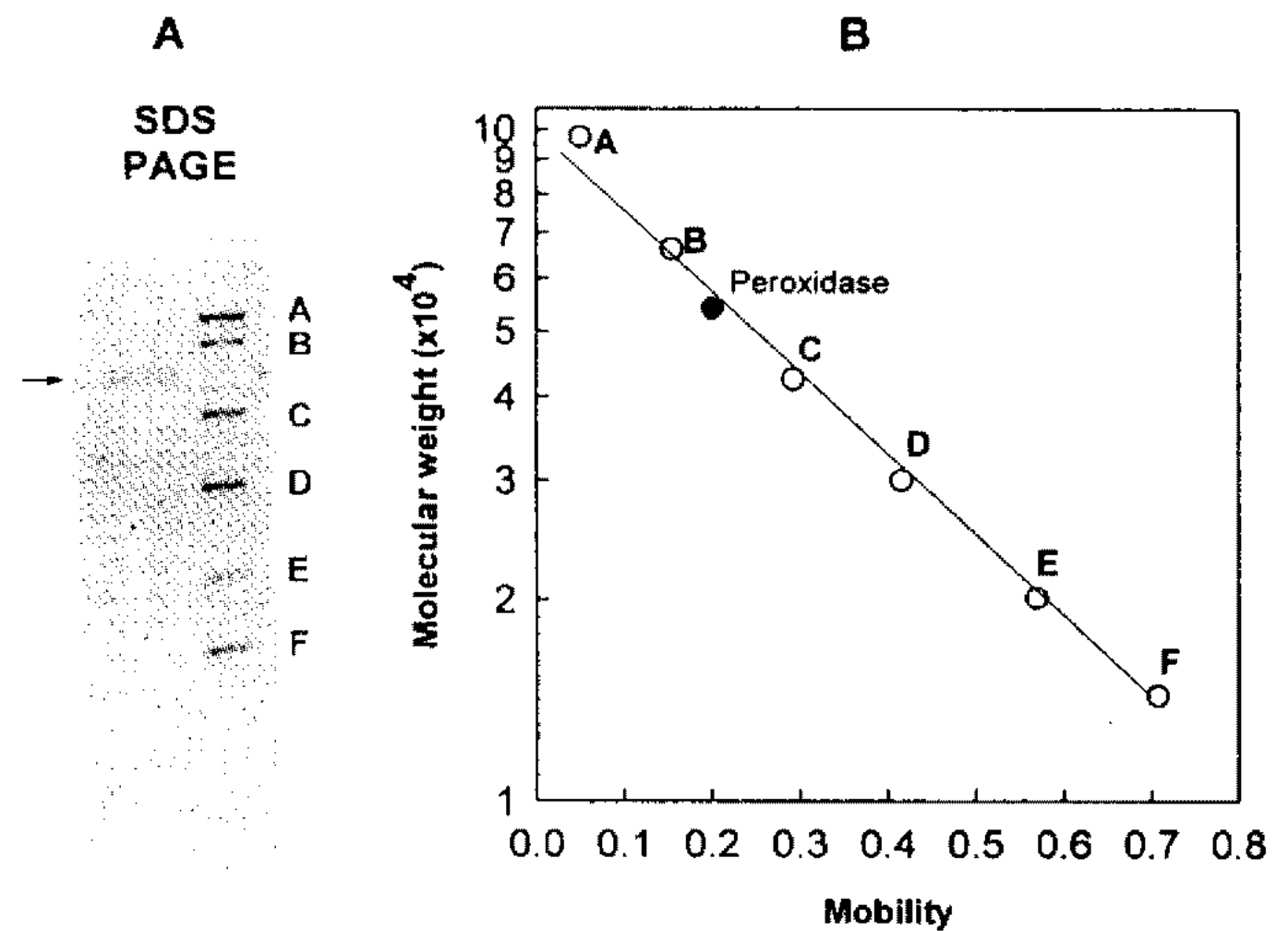


Fig. 3. Molecular weight determination of peroxidase subunit by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

The purified enzyme solution containing 15 µg protein was electrophoresed on a SDS-polyacrylamide gel.

A: Phosphorylase (97,400), B: Bovine serum albumin (66,300), Ovalbumin (42,400), C: Carbonic anhydrase (30,000), D: Trypsin inhibitor (20,100), E: Lactalbumin (14,400)

Peroxidase의 분자학적 성질

효소의 분자량, subunits 구조 및 등전점 정제된 peroxidase는 7.5% polyacrylamide gel에서 단일 band를 나타냈다(Fig. 2). Peroxidase의 분자량은 Sephacryl S-300으로 측정하였으며 그 결과는 Fig. 2와 같았다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 native 분자량은 220,000으로 추정되었으며, subunits의 구성을 알아보기 위하여 SDS-PAGE를 행한 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 subunit는 54,000에서 단일 band를 나타내어 peroxi-

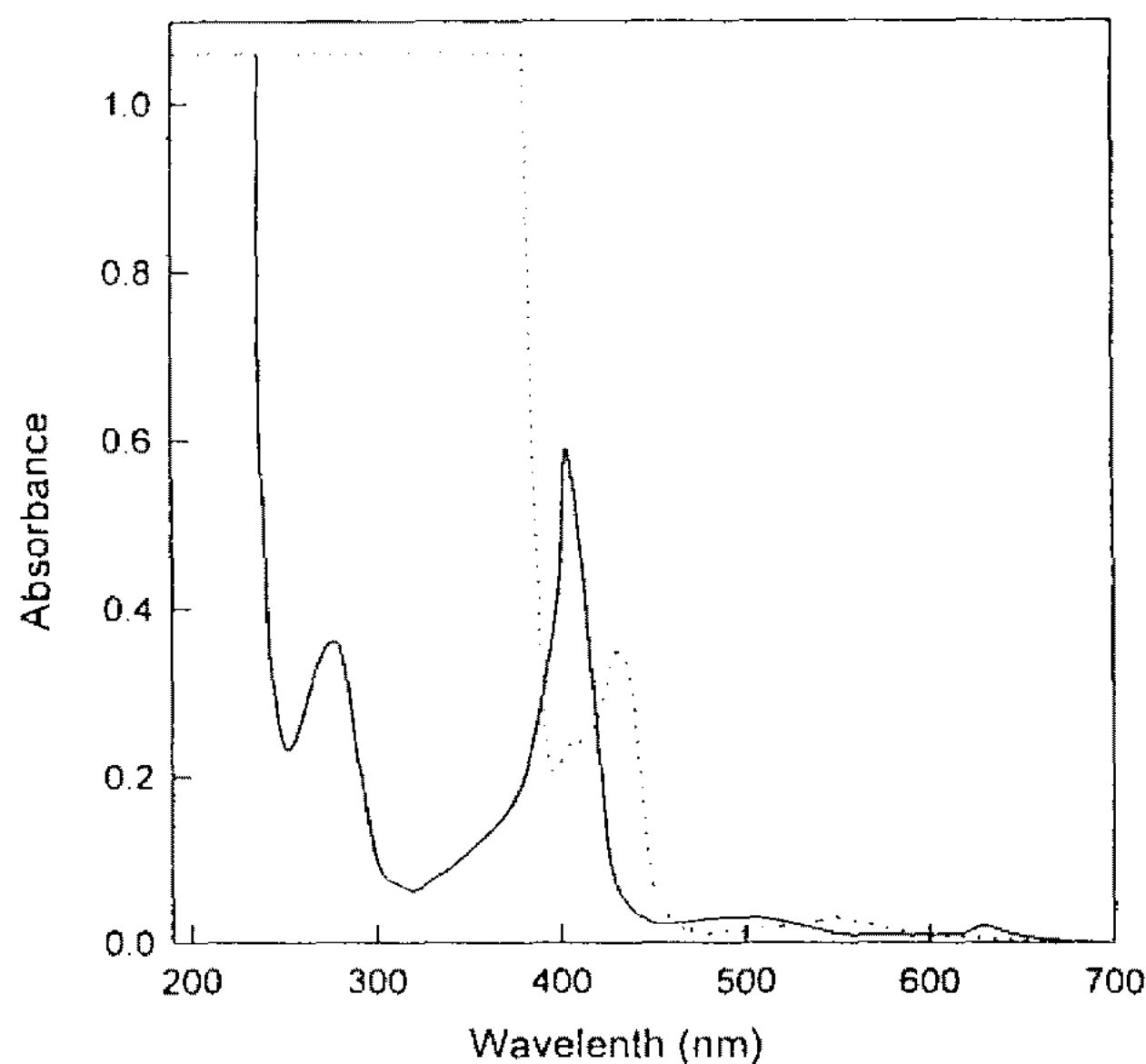


Fig. 4. Absorption spectra of purified peroxidase. Solid line: oxidized form, Broken line: reduced form

dase는 4개의 동일한 크기의 subunits로 구성되었음을 알 수 있었다. *Arthromyces*(19), *Pellicularia*(18) 및 *Coprinus*(17)로 부터의 peroxidase의 분자량은 각각 41,000, 28,000, 및 41,600이며, 이들의 subunit의 분자량은 모두 native 분자량과 같은 1개의 subunit라고 보고되었다. 또한 최근 배추기원의 peroxidase도 단일 subunits의 분자량 50,000이라고 보고(5)한 것에 비하여 본 효소는 다른 식물 및 미생물 기원의 peroxidase보다 분자량 및 subunits가 많은 것이 특징이다.

Ampholyte electrofocusing 한 결과 등전점은 4.2로서 본 효소의 구성 아미노산은 산성 아미노산이 염기성 아미노산 보다 상대적으로 많을 것으로 추정되었다. *Arthromyces*(19), *Pellicularia*(18), *Coprinus*(17)속의 peroxidase의 등전점은 각각 3.4, 7.3 및 3.5라고 보고되었다.

Absorption spectra 정제 peroxidase의 soret band는 410 nm였으며 maximum peak는 270, 500, 및 630 nm였다. 또한 sodium dithionate에 의한 효소 환원형은 500, 630 nm peak가 사라지고 430 및 550 nm에서 새로운 peak를 나타냈다(Fig. 4). 이러한 결과는 peroxidase가 전형적인 hemoprotein임을 나타내고 있다.

Peroxidase의 기질 특이성 Peroxidase의 기질 특이성은 aminoantipyrine과 phenol에 의해 생성된 색소형성력을 100으로 할 때 여러가지 수소공여체를 기질로 사용하여 pH 5.5 및 7.0에서 활성을 측정, 비교 검토한 결과를 Table 2에 표시하였다. pH 5.5에서는 Toos가 가장 높은 상대 색소를 형성하였고, pH 7.0에서는 *N,N*-diethylaniline이 상대 색소 형성이 가장 높았다. 측정된 모든 기질에 대하여 활성을 나타냄으로써 본 효소가 다양한 조건에서 임상진단용 효소로 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

Table 2. Substrate specificity of peroxidase from *Flavobacterium meningosepticum*

Substrate	Relative color intensity (%)	
	pH 5.5	pH 7.0
Phenol	100	100
2,4-Dichlorophenol	260	450
<i>N,N</i> -Diethylaniline	380	550
Toos ^{a)}	420	388
Guaiacol	160	138
ABTS ^{b)}	350	75

^{a)} *N*-Ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-*m*-toluidine

^{b)} 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sufonic acid)

Table 3. Effect of various compounds on enzyme activity

Inhibitor	Relative activity (%)
None	100
EDTA	100
8-Hydroxyquinoline	100
<i>p</i> -Phenanthroline	100
α, α' -Dipyridyl	100
NaCN	75
NaF	100
NaN ₃	100
NH ₂ OH·HCl	21
NaAsO ₂	95
Phenylhydrazine	0
Semicarbazine	68
Iodoacetate	100
<i>p</i> -Chloromercuribenzoate	100
<i>N</i> -Ethylmaleimide	98
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoate	100
HgCl ₂	16
MnCl ₂	97
NaCl	95
CaCl ₂	100
MgCl ₂	97
SnCl ₂	96

금속이온 및 저해제의 영향 효소반응액에 각종 금속염 및 저해제를 1 mM 되게 첨가하여 그 영향을 Table 3에 나타냈다. Hemoenzyme 저해제로 알려진 NaCN, NaF와 NaN₃ 중 NaCN에 의해서만 25%의 활성저해를 받았다. Iodoacetate, *p*-chloromercuribenzoate, *N*-ethylmaleimide 및 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate 등 sulfhydryl reagent와 8-hydroxyquinoline, *o*-phenanthroline, α, α' -dipyridyl 등의 chelating reagent에 의해서는 거의 활성을 저해 받지 않았으나, NH₂OH·HCl, NaAsO₂, phenylhydrazine 및 semicarbazidine 등의 carbonyl reagent에 의해 각각 79, 5, 100 및 32%의 활성저해를 받

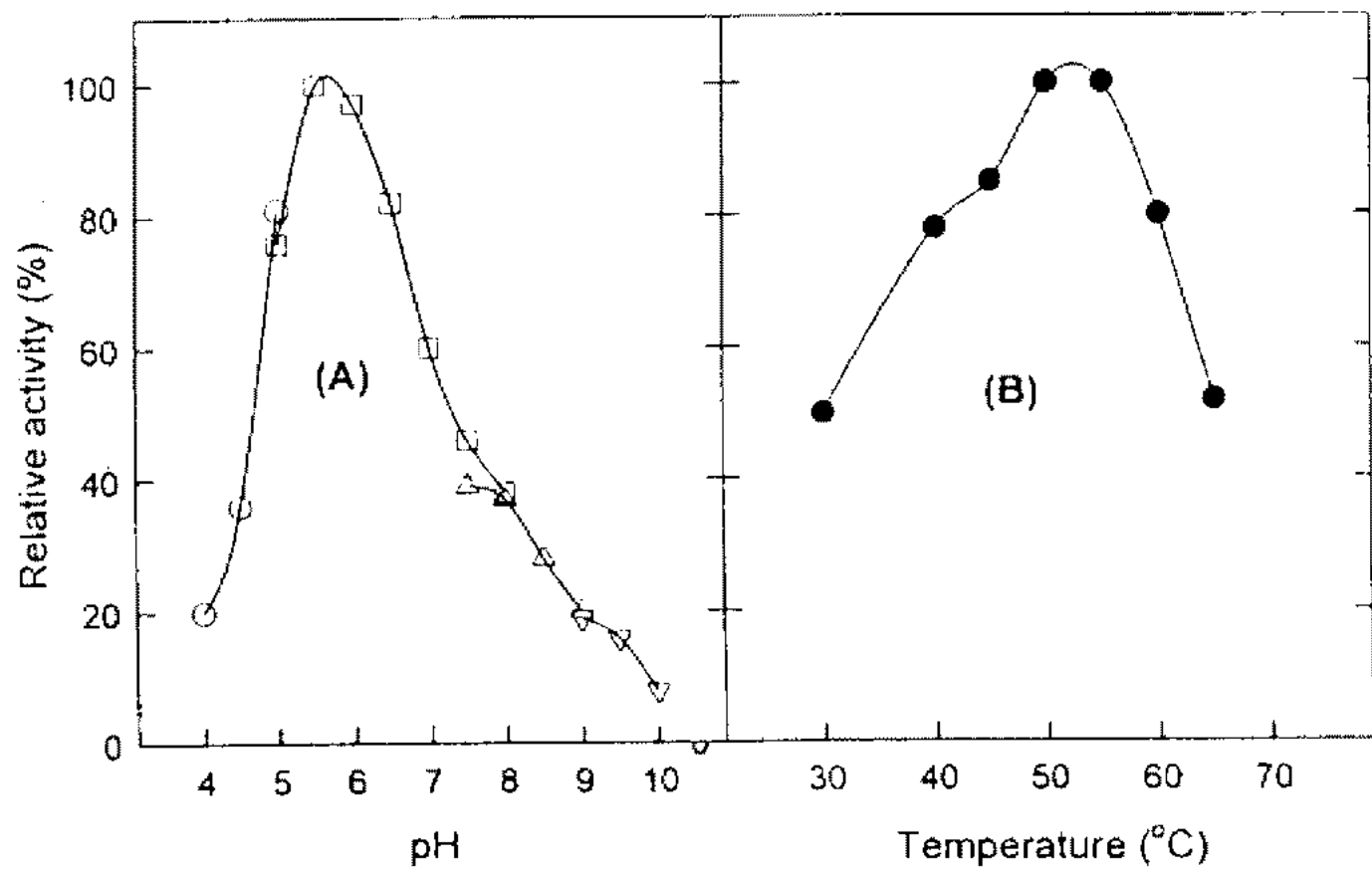


Fig. 5. Effect of pH (A) and temperature (B) on peroxidase activity.

A: Each enzyme activity was assayed with 40 mM buffer of pHs as indicated under the standard condition. Buffers used were sodium acetate (○), potassium phosphate (□), Tris-HCl (△) and glycine-NaOH (▽).

B: Each enzyme activity was assayed at various temperature under the standard condition.

았다. 금속이온으로서는 Hg²⁺ 이온에 의해 84%의 활성저해를 받았으나, Mn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Sn²⁺ 금속이온에 대해서는 거의 저해를 받지 않았다.

효소의 일반적 성질

반응 최적 pH 및 온도 Peroxidase의 pH에 따른 효소활성은 각 buffer를 사용하여 pH 4.0~10.0에서 효소활성을 측정하였다. 효소활성을 수소공여체로서 Toos를 사용하여 측정한 결과, Fig. 5와 같이 pH 5.5에서 최대 활성을 나타내었다. 효소반응 온도는 acetate buffer를 사용하여 각 온도에서 5분간 효소반응을 시킨 결과 50°C에서 최대효소활성을 나타냈다(Fig. 5).

pH 및 열 안정성 각 buffer로 pH를 조절한 각 pH에서 25°C, 30분 incubation 후 pH 5.5 효소반응액에서 활성을 측정한 결과 buffer의 종류에 따라 차이는 있었으나 pH 5.5부터 7.5 사이에서 80% 이상의 활성이 남아 있었다(Fig. 6). Peroxidase의 열 안정성 검토는 0.1 M acetate buffer(pH 5.5)을 사용하여 20°C부터 75°C까지에서 각각 10분간 처리한 후, 37°C 효소반응액에서 활성을 측정한 결과는 Fig. 6에 나타낸 것과 같이 55°C 이하에서는 90% 이상의 활성을 유지하였다.

요 약

Peroxidase를 *Flavobacterium meningosepticum*의 cell free extract로부터 약 8%의 수율로 80배 정제하였다. Peroxidase의 분자량은 Sephacryl S-300으로 측정된 결과 220,000이었으며, subunits는 SDS-PAGE에 의해 54,000의 동일한 크기의 4개로 구성되어진 것으로

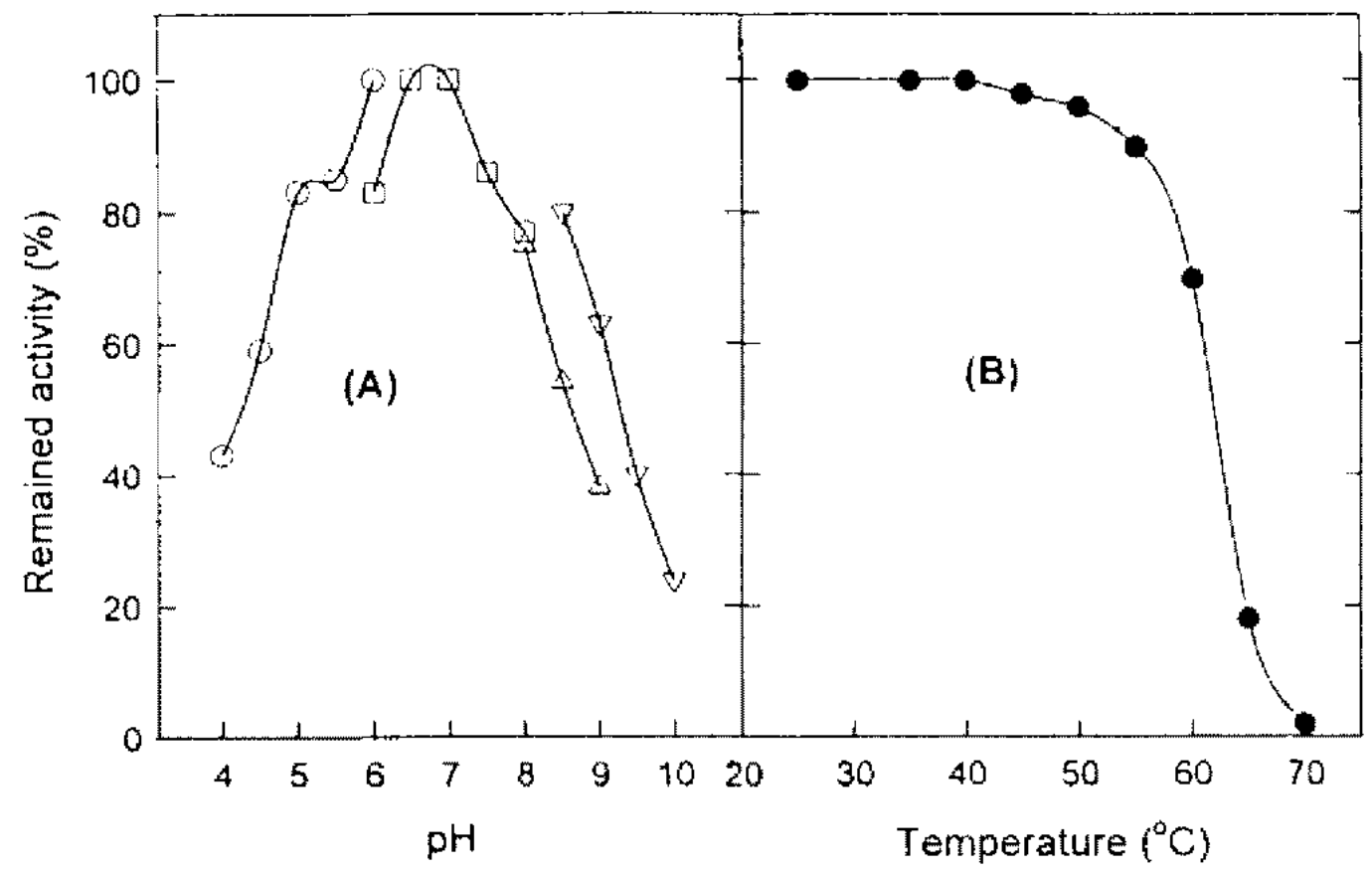


Fig. 6. Effect of pH (A) and pH (B) on peroxidase stability.

A: The enzyme was incubated in 100 mM buffers of various pHs as incubated at 25°C for 30 min, and then the remained enzyme activity was assayed at pH 5.5. Buffers used were sodium acetate (○), potassium phosphate (□), Tris-HCl (△) and glycine-NaOH (▽).

B: The enzyme solution was incubated for 10 min at various temperatures. The remained enzyme activity was measured under the standard assay conditions. The relative activity is expressed as the percentage of the maximum remaining activity.

추정되었다. 본 효소의 visible absorption spectra는 410, 500 및 630 nm에서 최대흡수를, 환원형에서는 435와 500 nm에서 최대흡수를 나타내어 전형적인 hemoprotein으로 관찰되었으며, 등전점은 4.1이었다. 수소공여체로서 *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-*m*-toluidine(Toos)를 사용할 때 반응최적 온도는 50°C, 반응 최적 pH는 5.5였으며, carbonyl reagent 및 Hg²⁺ 이온에 의해 효소활성저해를 받았다.

감사의 말

본 논문은 연세대학교 생물산업소재연구센터의 지원에 의해 수행된 결과입니다.

참고문헌

- Shannon, L.M., E. Kay and Y. Lew. 1966. Peroxidase isozymes from horseradish roots. *J. Biol. Chem.* **241**: 2166-2171.
- Asada, K. and M.A. Takashashi. 1971. Purification and properties of cytochrome c and two peroxidases from spinach leaves. *Plant and Physiol.* **12**: 361-373.
- Jen, J.J., A. Seo and W.H. Flurkey. 1980. Toamto peroxidase: Purification via hydrophobic chromatography. *J. of Food Sci.* **45**: 60-63.
- Soda, I., T. Hasegawa, T. Suzuki and N. Ogura. 1977. Purification and some properties of peroxidase from Kiwifruit. *Agri. Biol. Chem.* **55**: 1677-1678.
- 이해익, 박경수, 최용순, 이상영. 1991. 배추 기원 peroxi-

- dase의 정제 및 성질. 산업미생물학회지 **19**: 470-476.
6. Yonetani, T. and G.S. Ray. 1965. Studies on cytochrome c peroxidase. *J. Biol. Chem.* **240**: 4503-4508.
 7. Frinzel, B.C., T.L. Poulos and J. Kraut. 1984. Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **259**: 13027-13036.
 8. Dolen, M.I. 1975. Reduced diphosphopyridine nucleotide peroxidase. *J. Biol. Chem.* **250**: 310-317.
 9. Wiesner, W., K.H. van Pee and F. Lingens. 1979. Purification and characterization of a novel bacterial non-heme chloroperoxidase from *Pseudomonas pyrocinia*. *J. Biol. Chem.* **263**: 13725-13732.
 10. Claiborne, A. and I. Fridovich. 1979. Purification of the *o*-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **254**: 4245-4249.
 11. Swoboda, B.E.P. and V. Massay. 1965. Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* **240**: 2209-2215.
 12. Yoshimura, T., and T. Isemura. 1971. Subunit structure of glucose oxidase from *Penicillium amagasakense*. *J. Biochem.* **69**: 839.
 13. Aebi, H. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 3, 3rd edn. Pp. 581.
 14. Uwajima, T., H. Yagi and O. Terada. 1974. Properties of crystalline 3 β -hydroxysteroid oxidase of *Brevibacterium sterolicum*. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 1149-1156.
 15. 日本 公開特許 昭 61-254189: パオキシダゼの製造法.
 16. 日本 公開特許 昭 61-104784: ペルオキシダゼの製造法.
 17. Morita, Y., H. Yamashita, B. Mikami, H. Iwamoto, S. Aibara, M. Terada and J. Minami. 1988. Purification, crystallization, and characterization of peroxidase from *Coprinus cinereus*. *J. Biochem.* **103**: 693-699.
 18. Ichikawa, K., K. Okazaki, K. Kimoto and Y. Watanabe. 1981. Partial purification and characterization of peroxidase from *Pellicularia filamentosa*. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 1297-1299.
 19. 日本 公開特許 昭 61-43987: ペルオキシダゼ及びその製造法.
 20. Shimmen, Y., S. Asami, T. Amachi and S. Shimizu. 1986. Crystallization and characterization of extracellular fungal peroxidase. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 247-249.
 21. Loprasert, S., S. Negoro and H. Okada. 1988. Thermostable peroxidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of General Microbiology* **134**: 1971-1976.
 22. Fukumori, Y., T. Fujiwara, Y. Okada, Y. Mukohata and T. Yamanaka. Purification and properties of a peroxidase from *Halobacterium halobium* L-33. *J. Biochem.* **98**: 1055-1061.
 23. 최양문, 조홍연, 양한철. 1993. *Flavobacterium meningosepticum*이 생산하는 nucleoside oxidase 정제 및 stoichiometry. 산업미생물학회지 **21**: 23-29.
 24. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-252.
 25. Ornstein, L. 1964. Disc Electrophoresis I. *Ann. NY Acad. Sci.* Pp. 321-339.

(Received 18 July 1996)