

지렁이 Peroxidase의 특성 및 페녹시계 제초제의 분해

이 미 영 · 김 윤 경
순천향대학교 생명과학부

Characteristics of Peroxidase from the Earthworm, *Lumbricus rubellus* and Degradation of Phenoxyherbicides

Lee, Mi-Young and Yoon-Kyoung Kim

Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

ABSTRACT

Peroxidase has been isolated to apparent homogeneity from earthworm, *Lumbricus rubellus*, using ammonium sulfate fractionation, Sephacryl S-200 gel filtration, CM-cellulose cation exchange chromatography and native-PAGE elution. Some of its enzymatic characteristics were examined.

The optimum pH for guaiacol oxidation of earthworm peroxidase was determined to be 6.0, and the K_m values against guaiacol and H_2O_2 were 1.25 mM and 3.4 mM, respectively. When various compounds were tested as the possible substrates of the enzyme, o-dianisidine was used as the substrate. However, earthworm peroxidase could not oxidize esculetin and ferulic acid as substrates, suggesting the different characteristics of the enzyme from plant peroxidases.

The optimum pH for veratryl alcohol and H_2O_2 oxidation was determined to be 2.5 when lignin peroxidation activity was examined. The K_m values for veratryl alcohol and H_2O_2 were 0.02 mM and 0.13 mM, respectively. Furthermore, the earthworm peroxidase could oxidize phenoxyherbicides such as 2,4-D, 2,4-DP and MCPA as substrates. The optimum pHs for 2,4-D, 2,4-DP and MCPA were determined to be 4.0, 2.0 and 2.0, respectively. The most available substrate was 2,4-DP, followed by MCPA and 2,4-D when their peroxidation activities were compared.

Key words : Earthworm(*Lumbricus rubellus*), Peroxidase, Characteristics, Phenoxyherbicides

서 론

Superoxide radical (O_2^-), hydroxyl radical ($HO\cdot$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen ($\cdot O_2$) 등의 oxygen radical의 독성으로부터 생체를 보호하기 위하여 superoxide dismutase, catalase 및 peroxidase 등이 보여주는 생물학적 방어 기작의 중요성이 계속 보고되고 있으며 (Cameron 1932, Lassegues *et al.* 1981, Vaillier *et al.* 1985, Lassegues *et al.* 1989), 이들 효소의 유도

와 조절 기작이 진행 및 무핵 세포를 대상으로 밝혀지고 있다. 식물에 존재하는 peroxidase는 세포의 성장과 분화를 조절하는 중요한 효소로 알려져 있으며, indole-3-acetic acid의 산화(Welinder 1985), 환원형 pyridoxal과 관련된 화합물의 산화(Van Huystee 1987), lignification 및 병원체에 대한 방어(Laulan *et al.* 1985) 등의 기능을 가지고 있다. 동물에 존재하는 peroxidase로는 동물의 salivary peroxidase, thyroid peroxidase, glutathione peroxidase, lactoperoxidase, ovoperoxidase 등이 보고되어 있으며(Johansson and Soderhall 1989), 지

렁이의 경우 catalase와 함께(Seevers *et al.* 1971) chloragen cell에 있는 DOPA(dihydroxyphenylalanin) peroxidase의 존재가 확인되었다(Fischer 1978). 그러나 이 연구는 DOPA peroxidase와 catalase의 활성 비교에만 그쳤을 뿐 더 이상의 진진된 연구 보고가 없었다. 지렁이는 산화 환원 반응과 함께 여러 가지 유기 물질을 분해하는 특성을 가지고 있어서 환경문제의 생물학적 처리에 이용되고 있는데, *Eisenia foetida*와 *Lumbricus terrestris*의 체액에는 단백질을 분해시키는 단백질 분해효소가 존재하였고(Tuckova *et al.* 1986), *Lumbricus rubellus*의 체액에서는 강력한 fibrin 분해인자가 확인되었다(Park *et al.* 1989). 뿐만 아니라 지렁이에서 발견된 용혈소는 혈전용해제 개발에 많이 이용되고 있다(Du Pasquier and Duprat 1968).

본 연구에서는 붉은 지렁이(*Lumbricus rubellus*)에 존재하는 peroxidase를 분리하여, guaiacol peroxidase 활성과 lignin peroxidase 활성을 조사하고, 농약 성분인 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid), MCPA(4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid), 2,4-DP [2-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid] 등의 폐녹시계 제초제를 기질로 하여 peroxidase 활성을 살펴봄으로써, 지렁이를 이용한 난분해성 오염물질의 분해에 관한 기초 이론을 제공하고자 한다.

재료 및 방법

Peroxidase의 추출

동결된 *Lumbricus rubellus*를 sea sand, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)와 함께 막자 사발에 넣고 파쇄하였다. 10,000 × g에서 30분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 0~30% ammonium sulfate를 천천히 첨가하면서 녹였다. 다시 10,000 × g에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 취해 30~70% ammonium sulfate를 처리하고, 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)로 녹여 1시간 동안 투석시킨 후 미리 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)로 평형화 시킨 Sephacryl S-200 column (1.5 × 90cm)에 주입한 후 30 ml/hr의 속도로 용출시켰다. Peroxidase 활성이 높은 분획을 모아 7.5 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)로 평형시킨 CM-cellulose column (3.5 × 17cm)에 주입한 후 용출시켜서 peroxidase 활성을 보이는 분획만을 모아

native PAGE를 수행하였다. 전기영동이 끝난 후 활성 염색이 되는 위치를 잘라내어 4℃에서 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)에서 12시간 이상 용출시켜서 최종 효소원으로 사용하였다. 최종 효소원의 순도를 native-polyacrylamide gel electrophoresis를 수행한 후 단백질 염색과 활성 염색으로 확인하였다(Laemmli 1970). 단백질 정량은 Lowry의 방법을 이용하여 측정하였고, 표준 단백질로 bovine serum albumin을 사용하였다(Lowry 1951).

Guaiacol 산화 활성

효소 용액 60 μ l와 15 mM guaiacol에 5 mM H₂O₂를 가한 후 50 mM sodium acetate buffer (pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 5.5), 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0, 8.0 9.0)를 사용하여 반응 pH를 변화시켜 가면서 효소 활성의 최적 pH를 측정하였다.

Peroxidase의 활성은 guaiacol과 H₂O₂를 기질로 효소 용액 60 μ l와 15 mM guaiacol에 5 mM H₂O₂를 첨가한 후 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)를 가하여 최종 부피가 1 ml가 되도록 한 후에 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 470 nm에서의 흡광도의 변화량을 측정하였다.

Guaiacol에 대한 K_m 값은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)에서 H₂O₂의 농도를 5 mM로 고정시키고 guaiacol의 농도를 변화시켜 가면서, 470nm에서 효소 활성을 측정하고, double reciprocal plot하여 K_m 값을 결정하였다.

H₂O₂에 대한 K_m 값은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)에서 guaiacol의 농도를 15 mM로 고정시키고 H₂O₂의 농도를 변화시켜 가면서, 470nm에서 효소 활성을 측정하고, double reciprocal plot하여 K_m 값을 결정하였다.

알코올에 의한 peroxidase 활성 변화

유기 용매가 peroxidase 활성에 어떤 영향을 주는지를 알아보기 위하여 methanol, ethanol, butanol의 농도를 각각 5%, 10%, 15%, 20% 되게 하여 peroxidase 활성을 측정하였다.

Lignin 산화 활성

Lignin peroxidase 활성 측정은 효소 용액 200 μ l와 0.2 mM veratryl alcohol에 1 mM H₂O₂를 가한 후 50 mM sodium acetate buffer를 가하여 최종 부피가 1ml가 되도록 한 후에 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 310nm에서의 흡광도 변화량을 측정하였다.

Veratryl alcohol에 대한 K_m 값은 50 mM sodium acetate buffer (pH 2.5)에서 H₂O₂의 농도를 1 mM로 고정시키고 veratryl alcohol의 농도를 변화시켜 가면서, 310nm에서 효소 활성을 측정하고, double reciprocal plot하여 veratryl alcohol에 대한 K_m 값을 결정하였다.

H₂O₂에 대한 K_m 값은 50 mM sodium acetate buffer (pH 2.5)에서 veratryl alcohol의 농도를 0.1 mM로 고정시키고 H₂O₂의 농도를 변화시켜 가면서, 310nm에서 효소 활성을 측정하고, double reciprocal plot하여 H₂O₂에 대한 K_m 값을 결정하였다.

여러 가지 기질에 대한 peroxidase 활성

효소 용액 200 μ l와 1.5 mM 기질에 5 mM H₂O₂를 가한 후 50 mM sodium acetate buffer (pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 5.5), 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0, 8.0, 9.0)를 사용하여 반응 pH를 변화시켜 가면서 효소 활성의 최적 pH를 측정하였다.

식물 peroxidase의 기질로 알려진 o-dianisidine, esculetin, ferulic acid 등을 사용하여 400nm, 469nm, 320 nm 파장에서 흡광도의 변화량을 측정하였다.

여러 가지 기질에 대한 K_m 값은 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에서 H₂O₂의 농도를 5 mM로 고정시키고 기질의 농도를 변화시켜 가면서 효소 활성을 측정하고, double reciprocal plot하여 K_m 값을 결정하였다.

2,4-D, 2,4-DP, MCPA에 대한 peroxidase 활성

효소 용액 200 μ l와 0.2 mM의 2,4-D, MCPA, 2,4-DP를 기질로 하여 5 mM H₂O₂를 가한 후 50 mM sodium acetate buffer (pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 5.5), 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0, 8.0, 9.0)를 사용하여 반응 pH를 변화시켜 가면서 2,4-D는 283nm, MCPA는 279nm, 2,4-DP는 284nm의 파장에서 각각 흡광도의 변화량을 측정하여 최적 pH를 결정하였다. K_m 값은 50 mM sodium acetate buffer (pH 2.5)에서 H₂O₂의 농도를 1 mM로 고정시키고 기질의 농도를 변화시켜 가면서 double reciprocal plot하여 결정하였다.

결과 및 고찰

Peroxidase의 추출

파쇄된 지렁이 용액을 30~70% ammonium sulfate로 분별 침전시킨 후 Sephacryl S-200 gel filtration, CM-cellulose ion exchange chromatography 및 native PAGE 용출법을 사용하여 peroxidase를 분리하였다 (Table 1). 분리된 peroxidase의 단백질 수득률은 1.3%였고, native-PAGE 용출을 거친 후 최종적으로 94배의 정제도를 나타내었다.

분리된 효소액을 모아 native-polyacrylamide gel 전기영동을 수행한 후 Coomassie brilliant blue에 의한 단백질 염색과 기질인 3-amino-9-ethylcarbazole과 H₂O₂에 의한 활성 염색을 한 결과 모두 단일 띠로 나타났다 (Fig. 1).

Guaiacol 활성 측정

지렁이로부터 분리된 peroxidase의 특성을 규명하기 위하여 식물 peroxidase의 합성 기질로 널리 알려진 guaiacol에 대한 peroxidation 반응을 수행하였다 (Table

Table 1. Isolation of peroxidase from earthworm. Enzyme activity was expressed as the change in absorbance at 470nm per min. Specific activity equals to enzyme activity per mg protein

Fractions	Total protein (mg)	Total activity	Specific activity	Yield (%)	Purification fold
Crude supernatant	570	96	0.17	100	1
Ammonium sulfate (30~70%)	340	92	0.27	95.8	1.6
Sephacryl S-200	5.4	51	9.4	53	55.3
CM-cellulose	1.5	21	14	21.8	82.3
Native-PAGE elution	0.08	1.28	16	1.3	94

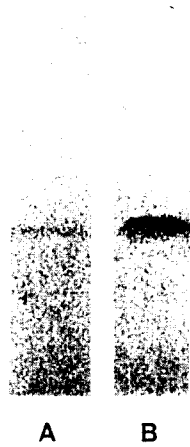


Fig. 1. Native-polyacrylamide gel electrophoregram of earthworm peroxidase after protein staining with Coomassie Brilliant blue(A) and activity staining with 3-amino-9-ethylcarbazole and H_2O_2 (B).

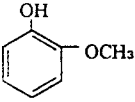
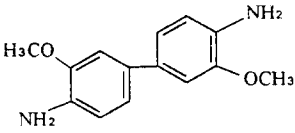
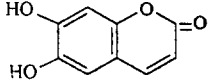
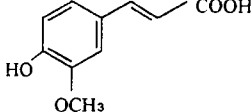
2). 그 결과 guaiacol 산화의 최적 pH는 6.0이었다. Double reciprocal plot에 의한 guaiacol에 대한 K_m 값은 1.25 mM로 나타났고, H_2O_2 에 대한 K_m 값은 3.4 mM로 나타났다.

한국산 무에 존재하는 여섯가지 peroxidase isozyme (C_1 , C_2 , A_1 , A_2 , A_m , A_3)의 guaiacol에 대한 K_m 값이 5.6에서 19.4 mM라는 보고 내용과 비교해 볼 때(Lee *et al.*, 1994), 지렁이에 존재하는 peroxidase가 guaiacol에 대하여 대단히 높은 기질 친화도를 가짐을 알 수 있다. 그러나 H_2O_2 에 대해서는 한국산 무 peroxidase isozyme보다 상대적으로 낮은 기질 친화도를 가지고 있음을 K_m 값을 통해 알 수 있다.

여러 가지 기질에 대한 peroxidase 활성 측정

여러 가지 기질에 대한 지렁이 peroxidase의 산화능력을 조사한 결과, 지렁이 peroxidase는 o-dianisidine을 기질로 사용했으며, pH 7.0에서 최대 활성을 나타냈고, double reciprocal plot 결과 o-dianisidine에 대한 K_m

Table 2. Summary of K_m values and optimum pHs for various substrates of peroxidase from earthworm

Substrate	Structure	Optimum pH	K_m (mM)
Guaiacol		6.0	1.25
H_2O_2		6.0	3.40
o-Dianisidine		7.0	1.72
Esculetin		*	*
Ferulic acid		*	*

* -: Not reactive

값은 1.72 mM로 나타났다 (Table 2). 한국산 무에 존재하는 여섯가지 peroxidase isozyme (A₁, A₂, A_{3a}, A₃, C₁, C₂)들의 o-dianisidine에 대한 최적 pH는 4.5에서 5.0 사이의 약산성 pH로 알려져 있으며 K_m 값은 0.6 mM에서 1.2 mM로 보고되었다(Lee and Kim 1994). 이러한 결과를 통해 지렁이 peroxidase는 o-dianisidine에 대하여 한국산 무 peroxidase와 비슷한 기질 분해능을 가지고 있음을 알 수 있다.

그러나 일반적인 식물 peroxidase와는 달리 esculetin과 ferulic acid를 기질로 사용하지 않는 것으로 보아 지렁이 peroxidase는 일반적인 식물 peroxidase와는 서로 다른 기질 특이성을 가질 것으로 추측된다 (Table 2).

알코올에 의한 활성도 변화

지렁이에 존재하는 peroxidase의 효소학적 안정성을 조사하기 위하여 우선 유기용매에 의한 활성도의 변화를 측정하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 methanol, ethanol, butanol 순으로 탄소의 길이를 늘려가면서 효소 활성을 측정할 결과, methanol의 농도가 증가함에 따라 peroxidase 활성이 높아졌다. 특히 methanol의 최종 농도가 15%인 경우 최대 2배 정도의 활성 증가현상을 나타냈다. 그러나 ethanol과 butanol로 갈수록 효소 활성이 전 농도구간에 걸쳐 감소되었다. 이러한 결과를 통해서 지렁이 peroxidase의 활성은 탄소의 길이에 반비례하여 감소됨을 알 수 있다.

Lignin peroxidase 활성 측정

식물 세포벽의 주요한 성분인 lignin은 거대한 페놀화합물 중합체로서 대부분의 미생물에 의한 분해에 저항성이 있다(Keyser et al. 1978). 지금까지 알려진 lignin 분해 미생물로는 white rot fungi와 wood decaying fungi가 알려져 있다(Gleen et al. 1992). 강력한 섬유

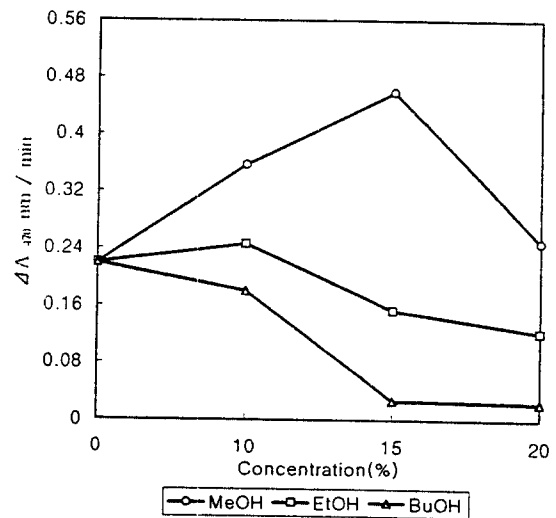
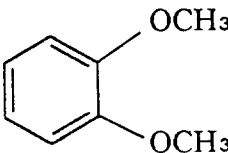


Fig. 2. Effect of various alcohols on the activity of peroxidase from the earthworm, *Lumbicus rubellus*. MeOH : methanol, EtOH : ethanol, BuOH : butanol.

소 분해능을 가진 지렁이로부터 섬유소 분해 효소를 분리 정제하여 특성을 규명하여 산업 폐기물의 처리 및 분해에 지렁이를 이용하기도 하지만, 이에 비해 lignin 분해 효소에 대한 연구는 상대적으로 미흡한 편이다.

지렁이에서 분리한 peroxidase가 lignin 분해능을 가지고 있는지를 알아보기 위하여 veratryl alcohol를 기질로 하여 효소 반응을 조사하였다. 지렁이의 lignin peroxidase 활성은 pH 2.5의 강산성 조건에서 최대 활성도를 나타냈고, veratryl alcohol에 대한 K_m 값은 0.02 mM, H₂O₂에 대한 K_m 값은 0.13 mM이었다 Table 3). Veratryl alcohol에 대한 K_m 값인 0.02 mM를 guaiacol에 대한 K_m 값 1.25 mM와 o-dianisidine에 대한 K_m 값 1.72 mM와 비교해 볼 때(Table 2), 지렁이에 존재하는 peroxidase는 guaiacol과 o-dianisidine에 비하

Table 3. K_m values and optimum pHs of lignin peroxidase activity against veratryl alcohol and H₂O₂

Substrate	Structure	Optimum pH	K _m (mM)
Veratryl alcohol		2.5	0.02
H ₂ O ₂		2.5	0.13

여 veratryl alcohol에 대하여 60여 배의 높은 기질 친화도를 가지고 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 지렁이에 존재하는 peroxidase가 강력한 lignin peroxidase 활성을 가진다는 의미를 가지며, 제지산업 등에서 lignin을 포함하는 오염물질을 분해하거나 난분해성 폐기물의 분해에 지렁이를 산업적으로 이용할 수 있음을 보여준다.

폐녹시계 제초제의 peroxidation

폐녹시계 제초제인 2,4-D와 2,4-DP 및 MCPA 등은 암이나 돌연변이를 유발시킬 수 있으며, 화학적 독성이 매우 강하기 때문에 심각한 환경오염의 원인이 되고 있다(Soderquist and Crosby 1975). 특히, 이들 제초제의 구조를 살펴보면 염소계 방향족 화합물로서 비염소계 화합물에 비해 화학적 분해나 미생물학적 분해가 어렵다고 보고되어 왔다. 일부에서는 이들 염소계 제초제들을 분해할 수 있는 미생물 균주들이 보고된 바 있으나, 분해능의 본체가 무엇인지에 대해서는 자세히 규명된 바 없다(Sinton *et al.* 1986, Pieper *et al.* 1988, Ditzelmuller *et al.* 1989).

최근 지렁이의 유기물 분해능을 이용하여 환경 문제

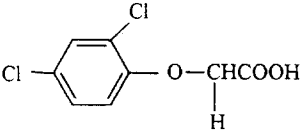
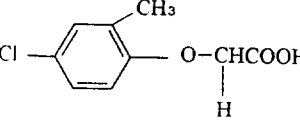
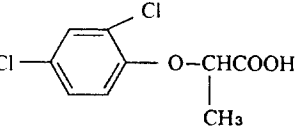
를 농업적으로 해결하고자 하는 노력이 진행되고 있으며, 지렁이로부터 섬유소 분해 효소, 단백질 분해 효소 등이 분리되어 효소학적 특성이 규명되기도 했다(Urbassek 1990, Tuckova *et al.* 1986).

Table 4에서 알 수 있듯이 지렁이로부터 분리한 peroxidase가 폐녹시계 제초제를 기질로 사용하는지를 조사했을 때, 2,4-D의 peroxidation 반응의 최적 pH는 4.0 이었고 MCPA와 2,4-DP에 대한 최적 pH는 모두 2.0으로 나타났다. 세가지 폐녹시계 제초제에 대한 peroxidase 반응을 비교해 보면 2,4-D, MCPA, 2,4-DP의 순으로 효소 활성이 높게 나타났으며 특히 2,4-DP에 대해서는 2,4-D보다 20여 배 이상의 높은 peroxidase 활성을 보였다. 이러한 결과는 지렁이를 이용하여 폐녹시계 제초제를 분해할 수 있는 가능성을 보여 줄 뿐만 아니라, 지렁이에 의한 생물학적 방법으로 환경 오염물질과 유기성 산업 폐기물을 처리할 수 있는 이론적 근거를 제시한다.

적 요

황산암모늄 분별 침전, Sephacryl S-200 gel filtration, CM-cellulose chromatography, native-PAGE 용출법 등

Table 4. Peroxidase activity of earthworm against phenoxyherbicides such as 2,4-D, MCPA and 2,4-DP. Peroxidase activity was expressed as the change in absorbance at 470nm per min

Substrate	Structure	Optimum pH	Activity
2,4-D(10 mM)		4.0	0.09
MCPA(10 mM)		2.0	0.136
2,4-DP(10 mM)		2.0	0.204

을 사용하여 붉은 지렁이로부터 peroxidase를 분리하였다. 분리된 peroxidase는 guaiacol을 기질로 사용하여 pH 6.0에서 최적의 활성을 보였고, guaiacol에 대한 K_m 값은 1.25 mM였으며, H_2O_2 에 대한 K_m 값은 3.4 mM로 나타났다.

여러 가지 기질에 대한 peroxidation 반응을 조사한 결과 o-dianisidine을 기질로 사용했으며, 최적 pH는 7.0이었고, K_m 값은 1.72 mM로 나타났다. 그러나 esculetin과 ferulic acid를 기질로 사용하지 않았다.

유기 용매인 methanol, ethanol, butanol에 의한 효소 활성 변화를 조사했을 때 methanol은 효소 활성을 증가시켰으나, ethanol과 butanol로 갈수록 효소 활성을 감소시켰다. Lignin 산화 활성을 조사했을 때, veratryl alcohol에 대한 K_m 값은 0.02 mM, H_2O_2 에 대한 K_m 값은 0.13 mM이었으며 최적 pH는 2.5로 나타났다.

또한 2,4-D, 2,4-DP 및 MCPA 등의 난분해성 물질에 대한 peroxidation 반응 조사한 결과 2,4-D, 2,4-DP, MCPA 산화의 최적 pH는 각각 4.0, 2.0, 2.0으로 나타났고, 2,4-D, MCPA, 2,4-DP의 순으로 peroxidase 활성이 높게 나타났다.

인용문헌

- Cameron, G.R. 1932. Inflammation in earthworms. J. Path Bact. 35: 993-972.
- Ditzelmuller, G., M. Loidl and F. Streichsbier. 1989. Isolation and characterization of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading soil bacterium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 93-96.
- Du Pasquier, L. and P. Duprat. 1968. Aspects humoraux et cellulaires d'une immunité naturelle non-spécifique chez l'oligochète *Eisenia fetida*. C.R. Acad. Sci. Paris 266: 583-541.
- Fischer, E. 1978. DOPA peroxidase activity in the chloragen cells of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L. Acta Histochem. 63: 210-223.
- Gleen, J.K., M.A. Morgan, M.B. Mayfield, M. Kumahara and M.H. Gold. 1992. An H_2O_2 requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *P. Chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 114: 1077-1083.
- Johansson, M.W. and K. Soderhall. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system Parasitol. Today 5: 171-176.
- Keyser, P., T.K. Kirk and J.G. Zeikus. 1978. Ligninolytic enzyme system of phanerochaete chrysosporium: Synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. J. Bacteriol. 135: 790-797.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature(London). 227: 680-685.
- Lassegues, M., P. Roch, P. Valembos and N. Davant. 1981. Action of some soil bacterial strains on the lumbricid *Eisenia fetida* Anderi. C.R. Acad. Sci. Paris 292: 731-734.
- Lassegues, M., P. Roch, P. Valembos. 1989. Antibacterial activity of *Eisenia fetida* Anderi: Coelomic fluid: Evidence, induction and animal protection. J. Invertebr. Pathol. 53: 1-6.
- Laulan, A., A. Morel, J. Lestage, M. Delaage and P. D. Duprat. 1985. Evidence of antibody synthesis of *Lumbricus terrestris* by specific substance in response to an immunization with a synthetic hapten. Immunolgy 56: 751-756.
- Lee, M.Y. and S.S. Kim. 1994. Characteristics of six isoperoxidases from Korean radish root. Phytochemistry 35: 287-290.
- Lee, M.Y., Y. Choi and S.S. Kim. 1994. Purification and immunological relationships of six radish isoperoxidases. Plant Physiol. Biochem. 32: 259-265.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 93: 265-275.
- Park, S., K.C. Kye, M. Lee, H. Sumi and H. Mihara. 1989. Biochemical characterization of fibrinolytic enzymes extracted from *Lumbricus rubellus*. Kor. J. Haematol 24: 295-296.
- Pieper, D.H. and W. Reineke. 1988. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-methylphenoxy acetic acid by *Alcaligenes eutrophus*. JMP134., Arch. Microbiol. 150: 95-102.
- Seevers, P.M., J.M. Daly and F.F. Cathedral. 1971. The role of peroxidase isoenzymes in resistance to wheat stem rust disease. Plant Physiol. 48: 353-

- 360.
- Sinton, G.L., L.T. Fan, L.E. Erickson and S.M. Lee. 1986. Biodegradation of 2,4-D and related xenobiotics compounds. *Enz. Microb. Technol.* 8: 395-403.
- Soderquist, C.J. and D.G. Crosby. 1975. Dissipation of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid in a rice field. *Pestic. Sci.* 6: 17-33.
- Tuckova, L., J. Rejnek, P. Sima and R. Ondrejova. 1986. Lytic activities in coelomic fluid of *E. foetida* and *Lumbricus terrestris*. *Dev. Comp. Immunol.* 10: 181-189.
- Urbassek, E. 1990. Cellulase activity of in the gut of some earthworm. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* 27: 21-28.
- Vaillier, J., M.A. Cadoret, P. Roch and P. Valembois. 1985. Protein analysis of earthworm coelomic fluid. III. Isolation and characterization of several bacteriostatic molecules from *Eisenia fetida* a Anderi. *Dev. Comp. Immunol.* 9: 11-20.
- Van Huystee, R.B. 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 205-219.
- Welinder, K.G. 1985. Plant peroxidase : Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome C peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 15: 497-504.

(1997년 12월 9일 접수)