

# 알콜 탈수소효소의 안정도에 미치는 전기 자극의 효과

이강민 · 김철생<sup>1</sup> · 이혜정<sup>2</sup> · 함대현<sup>2</sup> · 박충웅\*

전북대학교 자연과학대학 생물과학부, 1: 공과대학 전자공학부, 2: 경희대학교 동서의학대학원 침구경락학교실

## Effect of Electro-stimulation on Stability of Alcohol Dehydrogenase from Horse Liver

Kang-Min Lee, Chunl-Sang Kim<sup>1</sup>, Hye-Jung Lee<sup>2</sup>, Dae-Hyun Hahm<sup>2</sup>, Chung-Ung Park\*

*Division of Biology, College of Natural Science, Chonbuk National University,*

*1: Division of electronics, College of Engineering, Chonbuk National University,*

*2: Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University*

We investigated the activity and stability of alcohol dehydrogenase from horse liver (HLADH) under the electric stimulation. The activity and stability of alcohol dehydrogenase depended on electric output voltage, stimulation time, pulse duration and pulse interval, and temperature. HLADH retained about 23% of its activity in buffer but 78% in 10% trehalose solution under electric stimulation with 10V, 10min. The stabilizing of enzymes against electric stimulation by stabilizing additives showed a great potential use of enzymes in biotechnology and medical engineering fields.

Key words : Electro-stimulation, enzyme stability, alcohol dehydrogenase, horse liver

### 서 론

최근 의료계에서는 근육 마비환자의 재활치료나 신경마비환자의 신경치료에 전기 자극을 널리 응용하고자 시도하고 있다. 세포에 미치는 전기자극에 대한 연구는 영향은 의공학학과 생물공학에서 기본적인 기작 연구 뿐 만 아니라 그의 응용에서 매우 관심 있는 분야이다. 생물공학에서 효모와 같이 세포벽이 두꺼운 세포에 유전자를 주입한다든지 세포의 증식을 가속화하는데 전기자극 방법이 이용되고 있고, 세포수준에서 이로 인하여 세포분열, 효소반응, 효소합성, 세포막 이동, 세포의 면역력이 변할 수 있다.<sup>1-3)</sup> 또한 전기자극은 세포수준이 아닌 단백질 수준에서도 효소 반응속도, 효소의 전이 상태 안정화, 효소의 3차구조의 변화, 효소와 반응매질과 상호작용을 변화시킬 수 있다. 그러나 본 연구 과제인 효소의 안정도에 대한 전기자극의 영향은 거의 연구되지 않은 분야이다.

본 연구에 사용되는 말의 간에서 분리한 알콜 탈수소 효소는 (HLADH; alcohol dehydrogenase from horse liver) 산화환원 효

소로서 조효소인 NAD<sup>+</sup>와 complex를 이루어 가역적으로 1,2차 알콜을 알데히드와 케톤으로 산화시킨다. 알콜 탈수소효소는 bacteria, yeast, plant, liver, retina 등 다른 조직에도 존재한다. 이 효소는 ethanol에서 hexanol까지 여러가지 다양한 알콜과 산화 반응한다.<sup>4)</sup> 동시에 이 효소의 3차 구조 및 기능이 잘 알려져 있으므로 본 연구를 하는데 적절하다.

따라서 본 연구에서는 이 효소를 사용하여 효소의 활성화 및 안정도에 대한 전기자극의 출력전압, 자극시간, 자극간격에 따른 영향과 효소의 안정도를 증가시킬 수 있는 방법들을 연구하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 시료 및 시약

말의 간에서 분리한 알콜 탈수소효소(HLADH)는 Boehringer사로부터 구입하여 사용하였다. 조효소인 NAD<sup>+</sup>, 효소안정화에 필요한 CMC (carboxymethylchitosan), agarose, carbopol, trehalose, mannose, maltose, sucrose, inositol은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였고 완충용액은 50mM TES (pH7.0)을 사용하였다. 효소의 활성화 측정은 UV-visible spectrophotometer (HITACHI U-3300, Japan)를

\* 교신저자 : 박충웅, 전북 전주시 덕진구 덕진동, 전북대학교 자연과학대학

· E-mail : kmlee@chonbuk.ac.kr, · Tel : 063-270-3411

· 접수 : 2004/10/05 · 수정 : 2004/11/10 · 채택 : 2004/12/03

사용하였고, 효소반응에서 전기자극기는 BDS-301 Digital Electro-stimulator (BIOTRON, Korea)를 사용하였다.

2. 연구방법

1) 전기자극기

바이오트론에서 제작한 BDS-301 Digital Electro-stimulator 를 사용하였다. 이 기기는 출력전압이 0.01V~100V까지이며 다양한 강도, 시간, 양상의 변화가 가능한 것으로 생리학, 생화학 및 임상연구에 사용하는 전기자극용 실험 기기로서, 실험 전에 calibration 하여 사용하였다.

2) 말의 간으로부터 분리한 알콜 탈수소효소

알콜 탈수소효소는 Boehringer사로부터 구입하여 정제하여 사용하였다. 구입한 효소를 원심 분리하여 얻은 침전물을 50mM TES (pH 7.0) 완충용액으로 만든 0.2M sodium chloride 용액으로 녹인 후 원심 분리한 후 동일한 완충용액에 대하여 하루 동안 투석하여 사용하였다. 효소 활성도는 분광학적으로 340nm에서 조효소인 NADH의 증가를 통하여 결정하였다.

3) 전기자극하에 알콜 탈수소효소의 활성도

효소에 대한 전기자극 반응은 1.5ml eppendorf tube안에서 10mM ethanol, 1mM NAD<sup>+</sup>, 10µg 효소용액에서 행하였으며, 자극 종료 직후 UV-분광기를 사용하여 340nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 전기자극의 기본형태는 출력전압이 일정한 간격으로 지속되는 single pulse repeat type을 적용하였으며, 전도체로써 0.5cm 간격의 백금선을 사용하였다. 출력전압은 0.5V에서 40V까지 자극을 가했으며, 자극 지속시간은 10분에서 최대 40분까지 설정하였다. 자극지속간격의 범위는 0.05 msec에서 5sec까지 변화시켰다. 대조군으로서 알콜 탈수소효소의 반응을 연구하기 위하여 전기자극이 없는 상태에서 효소의 활성도를 측정하여 비교하였다.

4) 전기자극하에 알콜 탈수소효소의 안정도

전기자극의 증가가 효소의 안정도에 미치는 영향을 보기 위하여 반응조에 10µg/ml 효소를 반응조에 넣고 전기자극을 한 후 10mM ethanol, 1mM NAD<sup>+</sup> 넣은 후 UV-분광기를 사용하여 340nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 안정화의 효과는 효소와 안정제를 넣고 전기자극한 후 같은 방법으로 기질과 조효소를 넣고 흡광도의 변화를 측정하였다

5) 전기자극하에 첨가제에 의한 알콜 탈수소효소의 안정도와 활성도

알콜 탈수소효소의 안정화 효과를 보기 위하여 일반적으로 효소를 안정화시키는 당으로 알려진 trehalose, mannose, maltose, sucrose, inositol를 선택하여 알콜 탈수소효소가 전기자극에 대하여 얼마나 안정화될 수 있는지를 측정하였다. 또한 효소가 여러가지 히드로젤에 의하여 안정화되는 상태에 대하여 관찰을 하였다. 히드로젤은 CMC, agarose, carbopol을 사용하였고 이는 농도가 증가할수록 점성도가 증가해서 어느 농도 이상에서는 효소 활성도를 측정 할 수 없기 때문에 1% 농도에서 실험하였다. 출력전압 10V, 자극시간 10분, 자극의 지속 간격을 1초의 조건 하에서 당의 종류와 농도에 따른 안정화 효과를 확인하였

으며, 자극시간과 지속 간격은 동일하게 유지하여, 각 당과 히드로젤의 일정한 농도에서 출력전압의 변화에 따른 효소의 안정화 효과를 확인하였다.

6) 전기자극 하에 온도변화에 의한 알콜 탈수소효소의 안정도와 활성도

전기자극과 온도의 변화가 알콜 탈수소효소의 반응에 미치는 영향을 보기 위하여 먼저 온도가 20℃에서 전기자극시간을 40분까지 증가시키면서 효소의 반응을 관찰하였다. 그 다음 반응 온도를 30℃, 40℃로 증가 시킨 후 위와 같은 방법으로 위의 여러 전기자극 상태에서 반응을 관찰하였다.

7) 여러 온도변화에서 trehalose에 의한 알콜 탈수소효소의 안정도

전기자극하에서 온도의 증가에 의하여 비활성화된 효소를 안정화시키기 위하여 이 효소를 가장 안정화된 물질인 trehalose를 이용하는 효소 안정화 연구를 하였다. Trehalose가 효소 안정도와 활성도에 미치는 영향을 연구하기 위하여 온도 20℃, 30℃, 35℃, 40℃에서, 10% trehalose의 안정화제를 첨가하고 일정한 전기자극(10V, 10분)을 주면서 이 효소의 안정도를 결정하였다.

결 과

전기자극의 출력전압, 자극지속시간, 자극간격시간을 다양하게 변화시켜가며 알콜 탈수소효소의 활성을 확인하였다. 먼저 자극시간과 자극의 지속간격은 동일하게 설정하고, 출력전압을 변화시켜가며 그 효과를 확인하였다. 그 결과 전기 자극의 전압이 증가할수록 알콜 탈수소효소는 비활성화 되는 것으로 나타났다. 1V 전압의 자극에서는 40분 동안 전기자극을 주면 효소는 64% 이상의 활성도가 감소하였고, 20V로 자극을 주면 10분 만에 74% 이상의 활성도가 감소하였다. 전기 자극의 세기와 전기자극 시간이 증가 할수록 효소는 쉽게 비활성화 됨을 알 수 있었다 (Fig. 1). 이와 같은 현상은 알콜 산화효소의 경우와 비슷하나 알콜 산화효소보다 더 쉽게 비활성화 됨을 보였다.<sup>7)</sup>

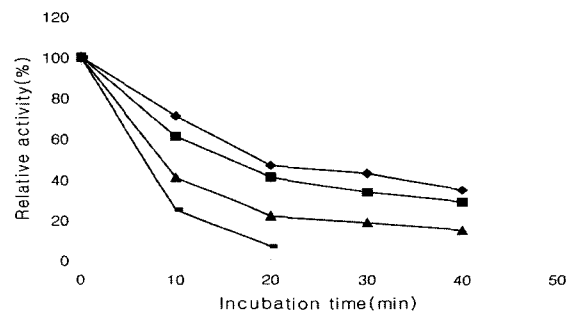


Fig. 1. Stability of HLADH as variation of output voltage and incubation times Electropulse is single pulse repeating type and both pulse interval and pulse duration are 1sec. Final concentrations of enzyme reaction mixtures were 10mM ethanol, 1mM NAD<sup>+</sup>, 10µg HLADH in 50mM TES buffer, pH 7.0 at 1volt(◆), 5volt(■), 10volt(▲), 20volt(○). The activity was determined at 340nm.

효소의 활성도가 전기자극의 형태에 의존하는가를 알기 위

하여 자극지속시간을 10분으로 고정하고, 전기자극이 가해지는 자극유지시간 (Pulse duration; PD)과 자극간격 (Pulse interval; PI)를 동일하게 변화시켜가며 자극세기를 10-40V의 증가에 따른 알콜 탈수소효소활성을 측정하여 비교 해보았다. 그 결과, PD와 PI가 작을수록 알콜 탈수소효소 활성이 더욱 저하됨을 확인할 수 있었다. 알콜 탈수소효소는 PI에 관계없이 전기세기가 커질 수록 더욱 빨리 비활성화 됨을 알 수 있다 (Fig. 2).

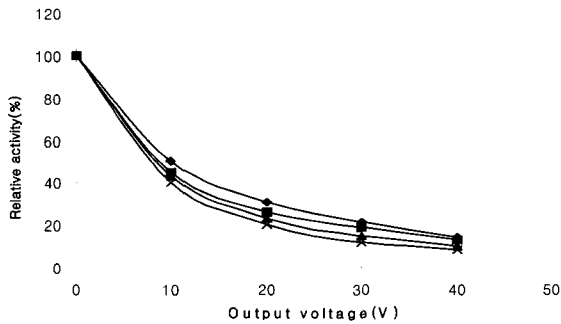


Fig. 2. Stability of HLADH as variation of pulse duration (PD), pulse interval (PI) and output voltage. Electropulse is single pulse repeating type and maintains for 10minutes. Final concentrations of enzyme reaction mixtures were 10mM ethanol, 1mM NAD+, 10ug enzyme in 50mM TES buffer, pH 7.0. HLADH were stimulated for 10 min from 10V to 40V with PD=PI=0.05msec(x), PD=PI=0.1msec(▲), PD=PI=1msec(■) and PD=PI=1sec(◆). The activity was determined at 340nm.

자극지속시간과 간격의 변화에 따른 알콜 탈수소효소 활성은 그 차이가 미세하여 경향을 명확하게 규정하기는 어려우나, 자극지속시간과 자극간격시간이 작을수록 알콜 산화효소에 전기 자극이 더욱 지속적으로 전달되기 때문에 전기자극의 전달이 효과적 일 수 있다.

전기자극에 의하여 비활성화 된 효소를 당을 사용하여 안정화시키는 방법을 연구한 결과에서는, 일반적으로 효소를 안정화하는 당 중, mannose, trehalose, maltose, inositol, sucrose을 선택하여 효소의 안정도를 결정하였다. 동일한 전기자극 세기와 시간 (10V, 10분), 동일한 당 농도(10%) 조건하에서 안정화 효과를 확인하였다. 전기자극에 대하여 효소를 안정화시키는 효과는 크게 나타남을 보였다. 당에 의한 효소의 안정화 실험에서는 trehalose, mannose, maltose, sucrose, inositol 순서대로 안정화 효과를 보였다 (Table 1).

Table 1. Relative activity of HLADH in 10% sugar solutions.

Sugar	Relative Activity(% A/Ao)
No sugar	23
Trehalose	78
Mannose	77
Maltose	52
Sucrose	35
Inisitol	31

Electropulse is single pulse repeating type(PD=PI=1sec) and maintains for 10min. Final concentrations of enzyme reaction mixtures were 10mM ethanol, 1mM NAD+, 10ug enzyme in 50mM TES buffer, pH 7.0. HLADH were stimulated at 10V in the presence various sugars. The activity was determined at 340nm.

이 효소는 10V, 10분간 전기자극을 주면 자극을 주지 않는

상태에 비해 단지 23%의 활성도를 갖는다. 그러나 10% trehalose 용액에서는 자극이 없는 상태에서보다 78% 높은 효소 활성도를 보였다. 이것은 10% trehalose 용액에서는 효소활성도가 295% 증가되었음을 의미한다. 이와 같이 당은 효소를 전기 자극으로부터 보호한다. 당에 의한 효소의 안정화는 많은 연구가 진행되고 있다. Chitosan, sucrose, raffinose, sorbitol, mannitol, glycerol이 invertase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, xylanase 등과 같은 효소를 안정시킨다는 사실은 이미 잘 알려져 있다.<sup>8,9)</sup>

알콜 탈수소효소의 안정화 효과가 가장 우수한 trehalose을 선택하여 동일한 전기자극 조건에서 각 당의 농도에 따른 안정화 효과를 살펴보았다. 출력전압을 10V, 자극지속시간은 10분, 자극지속간격을 1초의 조건으로 전기자극을 가했을 때, trehalose의 농도가 증가함에 따라, 전기자극에 대하여 효소를 안정화함을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). Trehalose의 농도가 증가함에 따라서 효소의 활성도는 크게 차이가 난다. 1% trehalose농도에서는 자극을 주지 않을 때는 주었을 때에 비하여 2.2배의 활성도를 갖으나 20% 일 때에는 10.3배의 활성도를 갖는다. 여기에서 trehalose의 농도 증가에 따라서 효소 활성도가 감소하는 것은 당의 농도가 증가 할수록 매질의 점도가 증가하기 때문일 수 있다. 이와 관련하여 Trehalose에 의하여 단일항체, subtilisin와 같은 단백질이 구조적으로 안정화 될 수 있음이 이미 보고 된 바 있다.<sup>10,11)</sup>

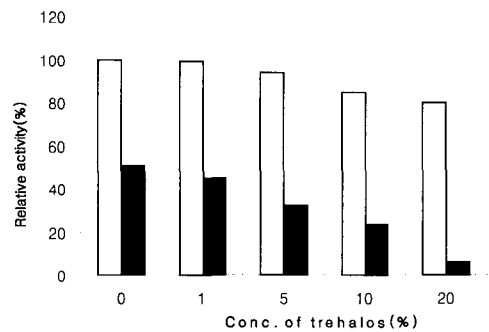


Fig. 3. Effect of trehalose on stability of HLADH under electric stimulation. Electropulse is single pulse repeating type (PD=PI=1sec) and maintains for 10min. Final concentrations of enzyme reaction mixtures were 10mM ethanol, 1mM NAD+, 10ug enzyme in 50mM TES buffer, pH 7.0. HLADH were stimulated at 10V in the presence of various concentration of trehalose without electrostimulation(□) with electrostimulation(■). The activity was determined at 340nm.

전기자극에 의하여 비활성화된 효소를 안정화하기 위하여 히드로젤을 사용하였다.<sup>12)</sup> 연구결과, 비활성화 된 효소는 1% CMC, agarose, carbopol용액에서 거의 비슷하게 안정화 되었다 (Fig. 4). 효소를 10V에서 20분 전기자극을 주었을 때 활성도는 거의 80%를 상실했지만 1% CMC, agarose, carbopol용액에서는 각각 35-40% 밖에 상실되지 않았다. 또한 1% CMC 용액에서 이 효소는 전기자극에 오래 노출 될수록 더욱 비활성화 되며 CMC는 비활성화로부터 보호 할 수 있음을 보여 준다 (Fig. 5). 이와 같이 히드로젤은 효소를 안정화 할 수 있다. 리파제(lipase)와 혈청알부민(BSA) 같은 단백질도 히드로젤에 의하여 구조적으로 안정화됨이 보고 된 바 있다.<sup>13)</sup>

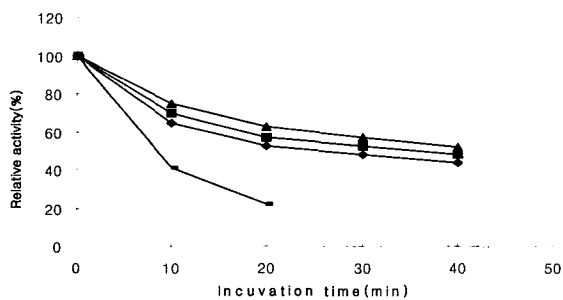


Fig. 4. Effect of hydrogel on stability of HLADH under electric stimulation. Electropulse is single pulse repeating type (PD=PI=1sec) and maintains for 40min. Final concentrations of enzyme reaction mixtures were 10mM ethanol, 1mM NAD+, 10ug enzyme in 50mM TES buffer, pH 7.0. HLADH were stimulated at 10V in 1% hydrogel (CMC(▲), carbopol(■) agrose(◆) without hydrogel(-). The activity was determined at 340nm.

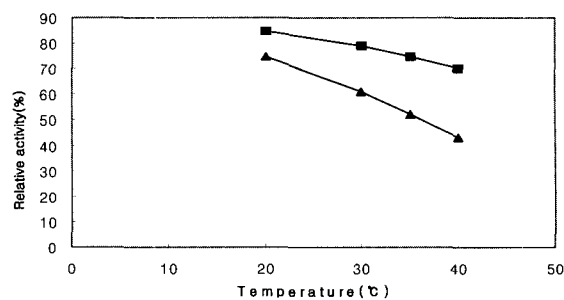


Fig. 7. Effect of trehalose on stability of HLADH under electric stimulation. Electropulse is single pulse repeating type (PD=PI=1sec) and maintains for 10minutes. Final concentrations of enzyme reaction mixtures were 10mM ethanol, 1mM NAD+, 10ug enzyme in 50mM TES buffer, pH 7.0. HLADH were stimulated at 10V in the presence of 10% trehalose(■) without (▲). The activity was determined at 340nm.

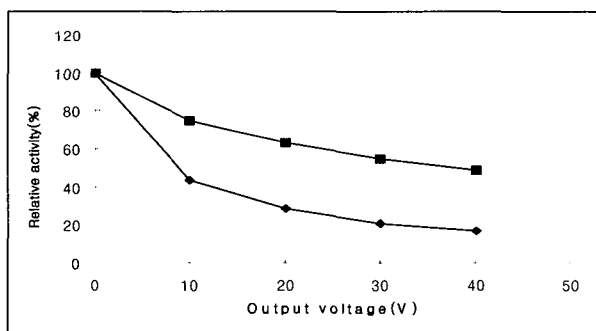


Fig. 5. Stability of HLADH in 1% CMC solution as variation of output voltage. Electropulse is single pulse repeating type and both pulse interval and pulse duration are 1sec. Final concentrations of enzyme reaction mixtures were 10mM ethanol, 1mM NAD+, 10ug HLADH in 50mM TES buffer, pH 7. HLADH were stimulated at 10V in 1% CMC(■) without CMC, (◆). The activity was determined at 340nm.

20-40°C의 여러 온도에서 전기자극이 효소의 안정도에 미치는 영향을 본 결과, 온도가 올라 갈수록 효소는 비활성화 되었다 (Fig. 6). 20°C에서는 비교적 안정되었지만 온도가 증가함에 따라서 현저히 감소하였다. 45°C에서는 10V, 10분 전기자극을 주었을 때 효소 활성도는 80% 감소하였다. 또한 더 높은 온도에서도 trehalose는 효소를 전기자극으로부터 안정화 시켰다. Trehalos는 온도와 관계없이 효소를 전기자극으로부터 안정화시키는 효과를 보였다 (Fig. 7).

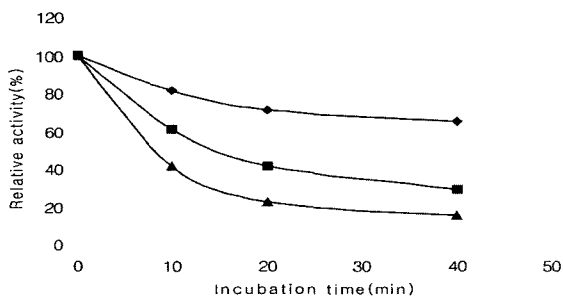


Fig. 6. Effect of temperature on stability of HLADH under electric stimulation. Electropulse is single pulse repeating type (PD=PI=1sec) and maintains for 10min. Final concentrations of enzyme reaction mixtures were 10mM ethanol, 1mM NAD+, 10ug enzyme in 50mM TES buffer, pH 7.0. HLADH were stimulated at 10V at temperature 20°C(◆), 30°C(■) and 40°C(▲). The activity was determined at 340nm.

## 고찰

인체의 대사기능을 조절하기 위한 방법으로 한의학에서도 통용되는 침자극을 비롯하여, 세포에 미치는 전기자극의 영향은 생물공학에서 기본적인 기작의 연구 분야 외에도 의용생체공학에까지 매우 관심 있는 분야이다. 최근 전기자극이 세포분열, 효소반응, 효소합성, 막이동을 변화시킨다는 보고를 볼 수 있다. 전기자극이 미치는 생물학적 효과에 대한 연구에 대해 지금까지 알려진 사실은 초보단계이나, 인체에 대한 직접적인 자극방법 이외에도 생물세포학적 관점에서도 동일한 양상의 반응조절 효과를 유도할 수 있다는 점에서 그 발전 가능성은 매우 큰 것으로 보인다.

Glutamic acid를 생산하기 위하여 발효에서 많이 사용되는 세포인 *Corynebacterium glutamicum*은 전기장에서 영향을 받는다는 사실을 발표하였다<sup>14)</sup>. 또한 전기자극에 의하여 면역도 증가될 수 있다. 전기자극은 대식세포에서 면역에 관련되어 NADPH 산화효소를 자극하여 산소를 환원시켜 superoxide anion과 산화물을 만들어 면역력을 증가시킨다.<sup>9)</sup> 인간 lymphocytes도 PEMP(Pulsed electromagnetic field)에서 3일 동안 배양했을 때 분화속도가 증가 하였다.<sup>15)</sup> 이러한 효과는 젊은 사람의 lymphocyte 보다 나이든 사람의 경우에 더 뚜렷하며, 뼈세포의 배양을 촉진하는 것으로 알려져 있다. MMB-1 cell line을 배양할 때 10-90Hz의 pulsed를 주면 세포분화를 촉진하여 습관성 골절 유착불능을 치료할 수 있는데, 이것은 osteoblast activating factor인 c-AMP를 감소시킬 수 있기 때문이다.

이와 같이 전기자극 방법은 한의학, 재활공학, 의용공학 분야를 포함하여 의약품을 합성하고 발효시키는 산업에 이르기까지 광범위하게 이용되고 있다. 전기자극을 생체에 적용할 때 전기자극이 생체분자, 특히 불안정한 단백질을 비활성화 하지 않도록 해야 하는데, 본 연구 결과에서 보는 바와 같이 전기자극 매질에 단백질을 안정화시키는 당을 사용한다면 단백질이 비활성화 되는 것으로부터 보호될 수 있는 것으로 나타났다.

## 결론

한의학의 침자극법 및 재활 의용공학 분야에서의 연구를

포함하여 의약품을 합성하고 발효시키는 산업에 이르기까지 광범위하게 이용되고 있는 전기자극법을 응용하여, 환경과 조건에 따라 상이해지는 효소들의 활성도를 조절하기 위한 본 연구 결과, 일반적으로 전기 자극에 의하여 효소는 비활성화 되고, 비활성화의 정도는 전압의 세기와 전기자극의 형태 즉 PI, PD에 의존적인 것으로 나타났다. 또한 전기 자극에 의하여 비활성화된 효소는 여러 종류의 당들에 의하여 안정화되었다. 이로써 전기 자극 하에서의 효소의 안정화에 대한 연구는 한의약 제형 연구를 비롯한 생물공학, 단백질공학에도 널리 응용 발전될 수 있으리라 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 2001년도 전북대학교 지원 연구비에 의하여 이루어진 것임.

### 참고문헌

1. Beg H : Possibilities and problems of low frequency weak electromagnetic fields in cell biology Bioelectrochem. Bioenerg. 38, 153-159, 1995.
2. Gamaley I, Augsten K, Berg H : Electrostimulation of macrophage NADPH oxidase by modulated high-frequency electromagnetic fields Bioelectrochem. Bioenerg. 38, 415-418, 1995.
3. Stalulions R : Electric pulse-induced precipitation of biological macromolecules in electroporation, Bioelectrochem. Bioenerg. 48, 249-254, 1999.
4. Samama JP, Lee KM and Biellmann JP : Enzymes and microemulsion : activity and properties of liver alcohol dehydrogenase in ionic water-in-oil microemulsion Eur. J. of Biochemistry, 163, 609-15, 1987.
5. Tsai SC, Klinman JP : Probes of hydrogen tunneling with horse liver alcohol dehydrogenase at subzero temperatures Biochemistry. 40, 2303-2311, 2001.
6. Adolph HW, Zwart P, Meijers R, Hubatsch I, Kiefer M, Lamzin V : Cedergren-Zeppezauer E., Structural basis for substrate specificity differences of horse liver alcohol dehydrogenase isozymes Biochemistry. 39, 12885-12897, 2000.
7. Lee K, Kim K, Park C : Activity and stability of alcohol oxidase from Hansenula sp. by electrostimulation. J. Kor. Chem. Soc. 48(2):171-176, 2004.
8. Gomez L, Ramirez H, Villalonga R : Stabilization of invertase by modification of sugar chains with chitosan Biotechnology Letters. 22, 347-351, 2000.
9. Davidson P, Sun WQ : Effect of sucrose/raffinose mass ratios on the stability of co-lyophilized protein during storage Pharmaceutical Research, 18, 474-479, 2001.
10. Draber P, Draberova E and Novakova M : Stability of monoclonal IgM antibodies freezed in the presence of trehalose J. Immunological Methods. 181, 1-7, 1995.
11. DePaz RA, Dale DA, Barnett C, Carpenter JF, Gaertner A, Randolph T : Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: role of protein conformation and molecular mobility, Enzyme and Microbial Technology, 31, 765-774, 2002.
12. Markvicheva EA, Tkachuk NE, Kuptsova SV, Dugina TN, Strukova SM, Kirsh YE, Zubov VP, Rumsh LD : Stabilization of proteases by entrapment in a new composite hydrogel Applied Biochem. Biotech. 61, 75-84, 1996
13. Basri M, Samsudin S, Bin Ahmad M, Razak C, Salleh AB : Lipase immobilized on poly(VP-co-HEMA) hydrogel for esterification reaction Applied Biochem. and Biotech. 81, 205, 1999.
14. Lei C and Berg H : Electromagnetic window effects on proliferation rate of Corynebacterium glutamicum Bioelectrochem. Bioenerg. 45, 261-269, 1998.
15. Kwee S, Rastma P : Changes in cell proliferation due to environmental non-ionizing radiation 1. ELF electromagnetic fields Bioelectrochem. Bioenerg. 36, 109-114, 1995.