

## 無花果에서 Ficin의 分離 및 精製

金俊平 · 徐在信 · 金貞淑\*

中央大學校 食品加工學科 · \*家政學科

### Isolation and Purification of Ficin from Fig Latex

Jun-Pyoung Kim, Jai-Sin Suh and Jung-Sook Kim \*

Department of Food Science and Technology, \*Department of Home Economics  
Chung-Ang University Seoul, Korea

#### Abstract

Ficin, a proteolytic enzyme in Fig latex, was extracted and purified with using ammonium sulfate and CM-cellulose column chromatography, respectively, and studied for its chemical properties. The disc gel electrophoresis showed one major and three minor bands for  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  extract and only one band showed after CM-cellulose chromatography. The optimum conditions for ficin activity was found to be pH 7.0 and 50°C. The amino acids composition of the purified ficin were 21.8% as acidic, 3.5% as basic and 74.7% as neutral amino acids. The amino acids analysis indicated that the ficin was composed of 174 amino acids residue having molecular weight of 19,500.

#### 서 론

무화과에는 단백질 분해효소인 ficin을 다량 함유하고 있어서 소화촉진 및 연육제 효과가 있기때문에 서양에서는 예로부터 잘 알려져 왔으며 익은 열매는 生食의에도 乾果, 잼, 제리, 통조림 등 여러가지 가공식품으로 이용되고 있다.

Ficin은 Ficus속 나무로부터 흐르는 乳汁에서 발견할 수 있는 효소로서 papain과 같이 연육효소로 이용될 수 있으며<sup>1-3)</sup> rennet의 대용으로도 이용되고 있다.

Walti가 무화과 latex에서 처음으로 결정을 얻은 이후<sup>4)</sup> 많은 연구가 다각적으로 이루어지고 있다.

즉, 염분획과 CM-cellulose에 의해 ficin을 분리 정제한 후 이들의 특성을 연구한 보고가 있고 Kramer 등<sup>5)</sup>과 Sugiura 등<sup>6-7)</sup>은 ficin의 물리화학적 성질에 관하여, Williams 등<sup>8)</sup>은 16종류의 *F. carica*의 proteolytic activity에 대한 조사 및 단백질의 성분 특성을 전기영동과 chromatography로 분석하였다.

또한 Jones 등<sup>9)</sup>은 *F. glabrata* latex에서 4개의 ficin 성분들을 분리하여 이들을 비교하였고 Whitaker<sup>10)</sup>는 우유응고에 대한 ficin의 활성과 특성에 대하여, Hammond 등<sup>11)</sup>과 Bernhard 등<sup>12)</sup>은 Ficin을 분리한 후 촉매반응의 기구에 대하여 보고한 바 있다.

그리고 Lowe<sup>13)</sup>는 식물성 단백질 분해효소인 papain, ficin, bromelain, proteinase 등의 아미노산 배열과 기능

에 대하여 조사하였고, Wong, Husain 등<sup>15)</sup>은 active center의 아미노산 배열에 대하여, Brocklehurst<sup>16)</sup>은 ficin과 papain의 active center 반응기구와 아미노산 배열의 차이점에 대하여 보고한 바 있다.

한편 ficine 성분의 분리과정중에 나타나는 성분간의 상호전환 및 복합분자 형태에 관한 연구와 ficin의 tenderization과 ficin의 activator 및 inhibitor에 대한 연구 보고도 있다.

또 Glazer 등<sup>17)</sup>은 Fig latex로부터 lysozyme을 분리하여 특성을 조사하는 등 이화학적 면에서 많은 연구가 진행되었다.

그러나 국내에서는 申<sup>18)</sup>에 의한 무화과 효소의 이용성에 대한 고찰과朴 등<sup>19)</sup>의 무화과 재배분포 및 수익성에 대한 보고, 그리고 金<sup>20)</sup>의 국내의 무화과 품종간의 성분비교 및 저장성에 대한 연구조사가 있을 뿐 그 외에는 연구보고가 없는 실정이다.

따라서 본 실험에서는 한국산 무화과의 latex에서 ammonium sulfate 분획 및 CM-cellulose chromatography로 ficin을 분리하여 효소의 화학적 성질과 분자량, 아미노산 조성등을 연구하고자 시도하였다.

#### 재료 및 방법

재료

가. 시료 latex

본 실험에서 사용한 무화과(*Ficus carica* L.) latex는 1984년 7월 전라남도 영암에서 집단 재배되고 있는 蓬萊柿 품종의 미숙 무화과를 절단하여 나오는 乳汁를 수집하여 즉시 동결시킨 후 냉동실에 보관하여 사용하였다.

나. 시약

Sodium tetrathionate는 Gilman 등<sup>21)</sup>의 방법에 따라 제조한 후 냉장고에 보관하여 사용하였다.

CM-cellulose는 Sigma社(capacity 0.7 meg/mg)의 제품을 사용하였고 EDTA는 純正化學(株)제품, L-cysteine은 林純藥工業(株)제품을 사용하였다.

Acrylamide는 Kokusan chemical Co. 제품을, coomassie brilliant blue는 Sigma chemical Co. 제품을 사용하였다.

다. 사용기기

냉동원심분리기는 MSE社 Europa 24M Refrigerated centrifuge를, UV-visible spectrophotometer는 Cecil社의 CE 292 Digital ultraviolet spectrophotometer를, Densitometer는 Gelman sci. acid-18을 사용하였다.

HPLC는 Water社의 GPCII 제품을, 아미노산 분석기는 Biochrom社의 LKB 4150 Amino acid analyzer를 사용하였다.

실험방법

가. 일반성분분석

Fig latex의 수분, 조단백질, 회분은 常法에 준하여 정량하였고 환원당은 Somogy 방법에 의하여 정량하였으며 gum 질은 20,000rpm으로 4°C에서 1시간동안 원심분리하여 얻었다.

나. Ficin의 분리

염분획에 의한 Fig latex의 ficin 분리는 Fig. 1과 같이 Williams 등<sup>21)</sup>의 방법에 따라 실시하였다.

즉 Fig latex 71 ml (step 0)를 20,000rpm으로 4°C에서 1시간동안 원심분리하여 gum 질과 침전물을 제거한 다음 상등액(step 1)에 H<sub>2</sub>O 40ml와 cysteine 0.01M를 첨가하고 4°C에서 3시간 교반 후 sodium tetrathionate 0.05M를 가하여 냉동 원심분리하였다.

상등액(step 2)을 위해 1.0×10<sup>-4</sup>M sodium tetrathionate 1.0×10<sup>-4</sup>M EDTA 용액으로 16시간 냉장실에서 투석하고 solid ammonium sulfate를 50%로 포화되도록 가하여 0°C에서 3시간 교반 후 원심분리하였다.

여기서 얻어진 침전물을 소량의 냉수로 용해시켜 같은 투석용액으로 16시간 냉장실에서 투석하고(step 3) solid ammonium sulfate를 30% 포화되도록 가하여 0°C에서 3시간 교반 후 원심분리하였다. 원심분리 후 얻어진 침전물을 같은 방법으로 투석하고(step 4) 이 용액을 Sgarbieri 등<sup>22)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 chromatography 하였다.

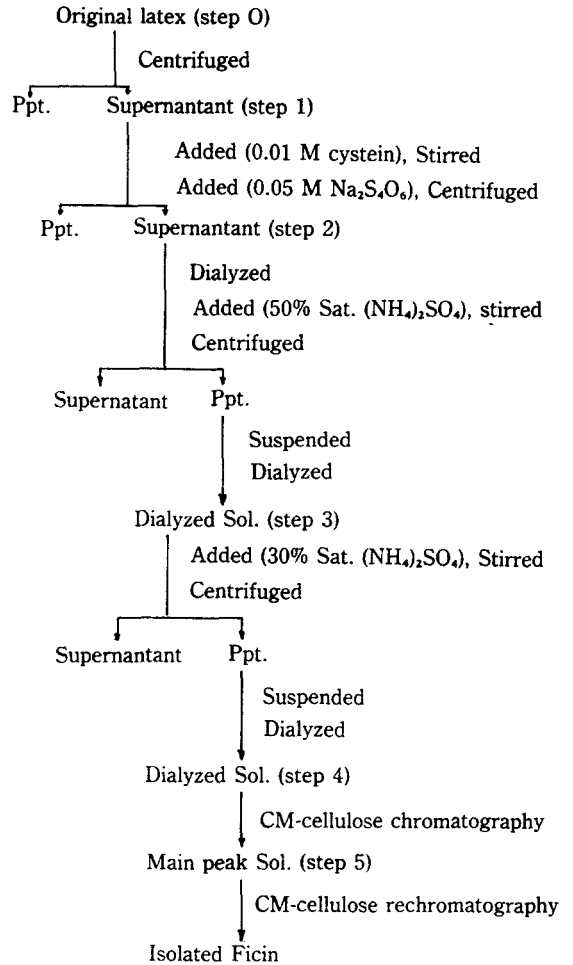


Fig. 1. Isolation Procedure of Ficin from *Ficus Carica*

graphy 하였다.

먼저 CM-cellulose activation은 Devenzi 등<sup>23)</sup>의 방법에 따라 증류수에 CM-cellulose를 넣고 침지 팽윤시킨 후 알카리처리 및 산처리를 하여 활성화시켰다.

CM-cellulose를 elution하지 않은 상태로 시료흡착을 시키면 단백질의 흡착력이 높게 되므로 Sgarbieri 등의 방법에 따라 다음과 같이 시료흡착을 시켰다.

활성화한 CM-cellulose 일부를 0.01M citric acid-0.02M sodium phosphate buffer(pH 4.9)로 평형화시켰다. 이때 사용한 column(2.0×40cm)에 최초 elution buffer로 평형시킨 후 시료를 column 상단에 주입하였다. elution에 사용한 buffer는 0.12M NaCl에서 0.5M NaCl를 함유한 앞의 buffer(pH 7.0)을 사용하였으며 gradient는 Devenzi 등의 방법<sup>23)</sup>에 따랐다.

Flow rate 1.5ml/min, 각 fraction 용량 10ml의 조건에서 4°C로 이온교환 chromatography 하였다. Chromatography한 후 얻어진 main peak(step 5)을 같은 방법

으로 rechromatography하여 하나의 성분으로 간주되는 ficin(step 6)을 분리하였다.

그리고 ficin을 분리하는 과정 중 얻어지는 각각의 step들을 효소활성 및 단백질 측정 시료로 사용하였다.

#### 다. Ficin의 활성측정

Ficin의 활성은 Kunitz<sup>24)</sup>, Colowick 등<sup>25)</sup>, Sgarbieri 등의 방법을 수정하여 다음과 같이 측정하였다.

0.1M-sodium phosphate에 casein을 1%가 되도록 넣고 끓은 물에서 15분간 가온하여 용해시킨 후 cysteine과 EDTA를 각각 0.011M 넣어서 pH 7.0으로 조절하였다. 이 1% casein 용액을 기질용액으로 하고 사용시에는 35°C water bath에서 약 5분간 가온하여 사용하였다.

측정방법은 시험관에 시료 0.5ml와 1% casein 기질용액 1.5 ml를 가하고 35°C에서 20분간 반응시킨 다음 5% TCA 3ml를 넣고 실온에서 1시간 방치하여 원심분리 후 상등액의 흡광도를 280nm에서 측정하였다. Blank로 기질용액 1.5ml와 5% TCA 3ml를 가한 후 효소액 0.5ml를 넣고 35°C에서 20분간 반응시킨 다음 실온에서 1시간 방치하고 원심분리하여 상등액의 흡광도를 측정하였다. 효소단위는 tyrosine standard curve로부터 해당 흡광도의 tyrosine 양을 산출하여 ml당 1분간에 1 $\mu$ g tyrosine 상당량의 물질이 생성되는 단위를 1unit로 하였다.

#### 라. 단백질 정량

Fig latex와 ficin의 단백질 정량은 Lowry 등<sup>26)</sup>과 中尾 등<sup>27)</sup>의 방법에 따라 660nm에서 흡광도를 측정하며 standard curve로부터 산출하였다. 이때 standard로는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였다.

#### 마. 전기영동

분리한 ficin의 전기영동은 Reisfeld 등<sup>28)</sup>의 방법에 따라 small pore gel의 acrylamide 농도를 7.5%로 하여 중합시킨 후 gel tube 당 30~50 $\mu$ g/50ml의 시료를 주입하고 6mA의 전류를 통하여  $\beta$ -alanine buffer(pH 4.5)에서 2시간 30분 동안 영동시켰다. 영동이 끝난 gel은 0.3% coomassie brilliant blue 용액에서 3시간 염색한 후 10% acetic acid-10% methanol 용액으로 2일간 탈색하여 7% acetic 용액에 보존하였다.

Polyacrylamide get scanning은 densitometer를 사용하여 575nm에서 실시하였다.

#### 바. Ficin의 화학적 성질

분리된 ficin을 사용하여 Sugiura 등<sup>29)</sup>의 방법에 따라 pH 및 열에 대한 영향과 안정성을 조사하였다.

pH에 대한 영향은 각각 1% casein을 함유하는 pH 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 8.0의 0.1M-sodium phosphate buffer를 만들어 효소를 각각의 buffer에 작용시키고 해당 pH의 활성을 측정하였다.

열에 대한 영향은 1% casein 용액을 기질로 하여 20,

30, 40, 50, 60, 70, 80°C의 각 온도에서 분리한 ficin을 작용시켜 활성을 측정하였다.

pH 안정성은 0.1M-sodium citrate buffer (pH 1.5, 2, 3, 4, 5), 0.1M-sodium phosphate buffer(pH 6, 7, 8) 0.1M-carbonate buffer (pH 9, 10)를 각각 그 배양액 가한 후 냉장실에서 24시간 방치한 다음 투석시키고 각 용액을 pH 7.0으로 환원시켜 측정하였다.

열안정성은 분리한 ficin을 0, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 70, 80°C의 각 온도에서 30분간 항온시킨 후 기질을 가하고 반응시켜 효소활성을 측정하였다.

#### 사. 분자량 측정

분리된 Ficin의 분자량은 HPLC를 사용하여 측정하였다.<sup>32)</sup>

Standard로 bovine serum albumin(Mw 68,000), sweet potato  $\beta$ -amylase(Mw 50,000), ovalbumin(Mw 45,000), trypsin(Mw 24,000), myoglobin(Mw 16,900) 각각 10mg을 증류수 10ml에 용해하여 20 $\mu$ l를 주입한 후 나타난 retention time과 해당분자량을 대수표에 도식하고 같은 조건으로 시료를 주입시켜 얻어진 retention time에 의해 산출하였다.

#### 아. 아미노산 분석

분리한 ficin 1ml(0.92mg of protein)와 특급 HCl 1ml를 시험관에 넣고 N<sub>2</sub> gas로 산소를 차단시키고 110°C  $\pm$ 1°C에서 24시간 가수분해 한 다음 HCl를 제거하고 Na-citrate buffer(pH 2.2) 2ml에 용해시켜서 LKB 4150 amino acid 분석기를 사용하여 분석하였다<sup>(31)</sup>.

이때 계산은 LKB 2220 recording intergrater로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 무화과 latex의 일반성분

무화과 latex의 일반성분은 Table 1과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 조단백질의 양은 9.0%, gum 질은 20.3%로 Sgarbieri 등의 10~17.5%, 30%와는 약간 차이가 나타나지만 이는 품종, 성숙도, 재배조건 등에 따른 것으로 생각된다.

이들 단백질의 약 90%는 proteolytic activity를 갖는다고 보고되고 있다.<sup>22)</sup>

Table 1. The composition of Fig latex

Moisture	Ash	Reducing Sugar	Crude Protein	Gum
65.6	2.6	2.5	9.0	20.3

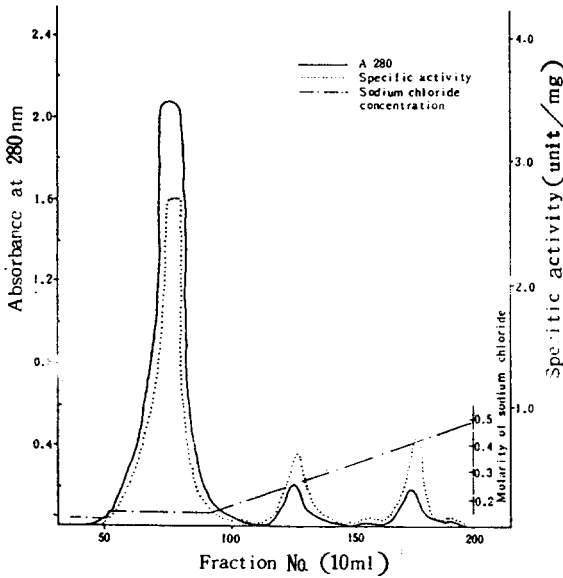


Fig. 2. CM-cellulose chromatography of salt-isolated *Ficus carica* (step 4)

Ficin의 분리

가. 염분획 및 chromatography

Ficin의 분리단계에 따른 분석치는 Table 2와 같다.

즉 specific activity는 처음단계에서 0.65 unit/mg<sup>1)</sup>이고 4단계에서 1.61 unit/mg<sup>2)</sup>으로서 Williams등<sup>21)</sup>의 0.603 unit/mg, 1.35 unit/mg에 비해 약간 높고 회수율은 59%로 Williams등의 51.3%에 비해 역시 약간 높지만 전체적으로 비슷한 결과로 나타났다.

4단계를 CM-cellulose가 충전된 column에 넣어 chromatography한 결과 Fig. 2와 같다.

즉 염분획 후 chromatography 한 결과 3개의 peak로 분리되었다.

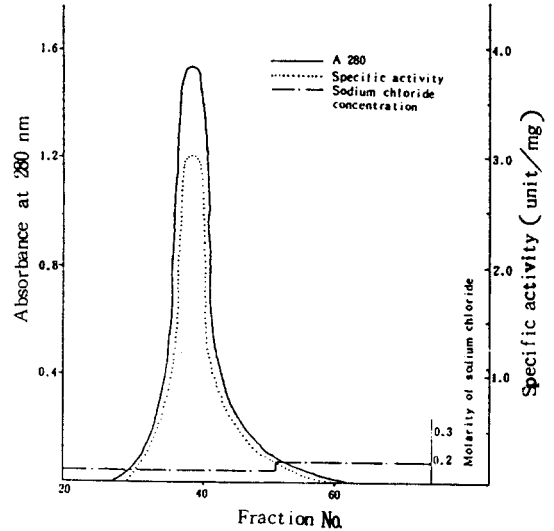


Fig. 3. CM-cellulose rechromatography of salt-isolated *Ficus carica* (step 5)

이중 주 peak I를 농축하여 rechromatography한 결과는 Figure 3과 같다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 rechromatography 후 단일 peak가 이루어졌으므로 이 peak부분을 하나의 ficin 성분으로 간주하고 이의 확인실험 및 특성검토 실험을 하였다.

Table 2에서 나타난 바와 같이 분리된 ficin의 specific activity는 3.16 unit/mg인데 Sgarbieri등<sup>22)</sup>과 Williams등<sup>21)</sup>은 2.55 unit/mg와 2.66 unit/mg으로 보고한 바 있고 회수율은 31%를 나타냈으나 Sugiura등<sup>23)</sup>은 29.1%로 보고한 바 있다. 무화과에서 최종 분리된 ficin은 31%의 수율과 4.86배의 분리효율, 3.16 unit/mg의 specific activity를 나타냈다.

Table 2. Isolation of ficin by ammonium sulfate fractionation and chromatography

Step	Condition	Total volume (ml)	Activity (unit/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (unit/mg protein)	Fold purification	Total activity	Activity recovery (%)
0	Original latex	71	126.7	194.9	0.65	1	9000	100
1	Removal of gum	60	117.8	184.7	0.64	0.98	7070	79
2	Extract	87	76.9	104.6	0.74	1.14	6690	74
3	50% Sat. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	85	67.7	81.7	0.83	1.28	5750	64
4	30% Sat. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	96	55.7	34.6	1.61	2.48	5350	59
5	Chromatography of step 4	110	44.5	16.5	2.70	4.15	4900	54
Isolated ficin	Rechromatography of step 5	70	40.1	12.7	3.16	4.86	2810	31

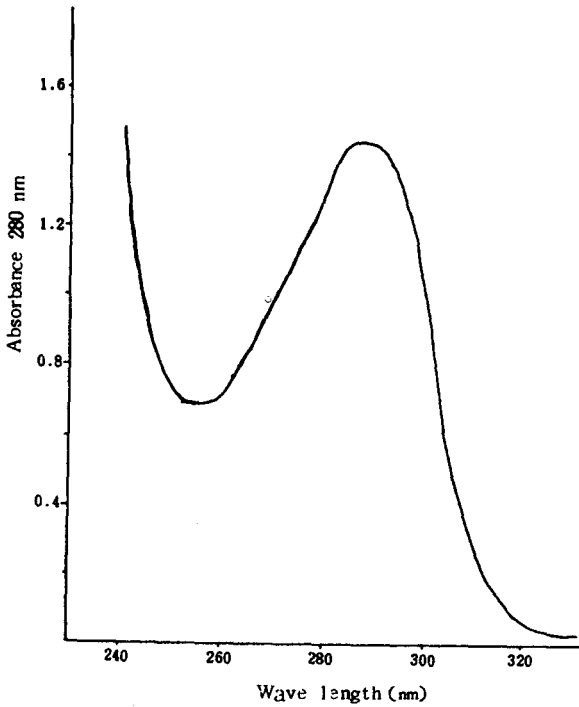


Fig. 4. UV-absorption spectrum of isolated ficin

나. UV-spectrum

분리한 ficin의 UV-spectrum은 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 분리된 ficin의 UV-spectrum은 전형적인 단백질의 특성을 나타냈고 260 nm에 대한 280 nm의 흡수비율은 1.85로 Kramer 등<sup>9)</sup>의  $1.88 \pm 0.05$ , Sgarbieri 등<sup>23)</sup> Englund 등<sup>4)</sup>의 1.95보다 약간 낮게 나타났다.

다. 전기영동상

Original latex와 분리한 ficin의 전기영동은 Fig. 5, Fig. 6과 같다.

Fig. 5와 6에서 보는 바와 같이 original latex에서는 9개 정도의 band가 나타났으나 분리된 ficin은 main band와 3개의 minor band가 나타나고 main peak의 정제에서 얻은 ficin은 단일 band로 나타났다.

Ficin의 화학적 성질

가. PH 및 열의 영향

PH를 달리한 여러 조건에서 분리한 ficin의 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 7과 같고 효소작용 온도를 달리하여 활성을 측정된 결과는 Fig. 8과 같다. Fig. 7과 8에서 보는 바와 같이 분리한 ficin의 pH는 7.0에서 최적작용을 나타냈다. 이 결과는 Sugiura 등<sup>29)</sup>, Kramer 등<sup>5)</sup>이 보고한 최적 pH 7.0~7.5와 유사한 결과이다.

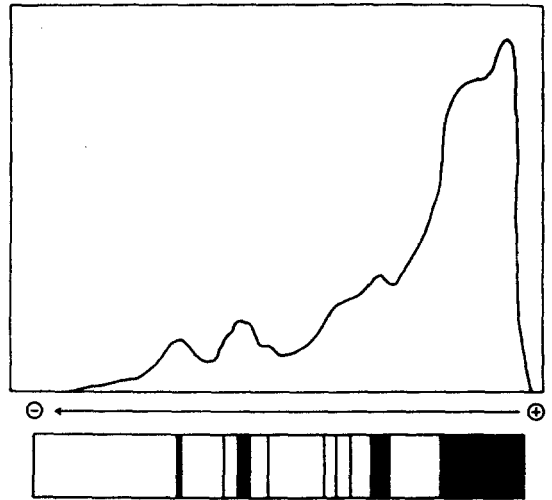
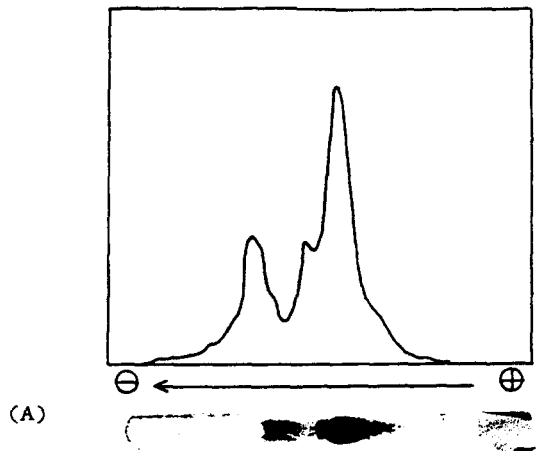
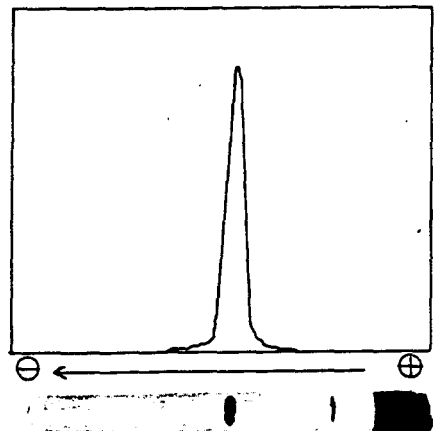


Fig. 5. Electrophoretic pattern of original latex (30 μg/50 μl)



(A)



(B)

Fig. 6. Electrophoretic patterns of crude ficin (A) and purified ficin (B)

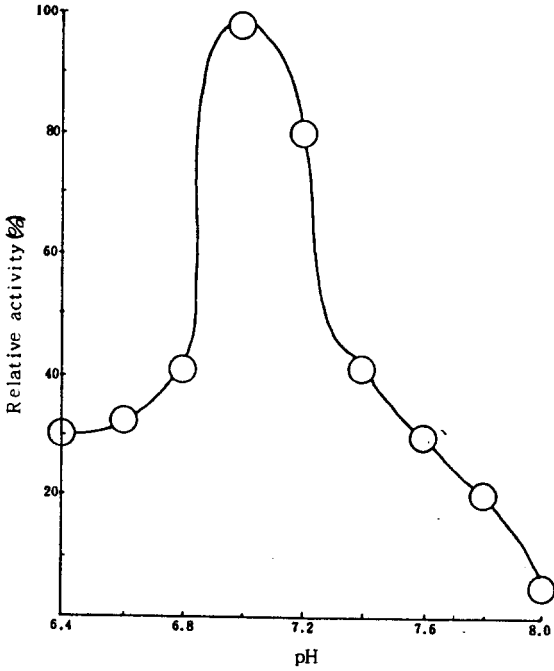


Fig. 7. Effect of pH on activity of isolated ficin

그리고 Sugiura 등의 결과와 같이 60°C 에서 최적작용 온도를 나타내었고 그 이하의 저온이나 그 이상의 고온으로 갈수록 반응성은 현저히 감소하였다.

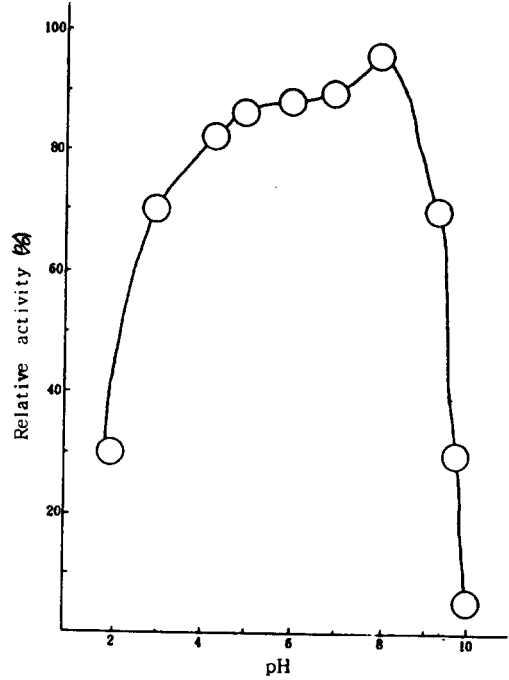


Fig. 9. pH-stabilities of isolated ficin

나. PH 및 열 안정성

pH를 달리한 해당 buffer 용액에 분리한 ficin을 냉장실에서 24시간 방치후 활성을 측정한 결과는 Fig. 9와 같

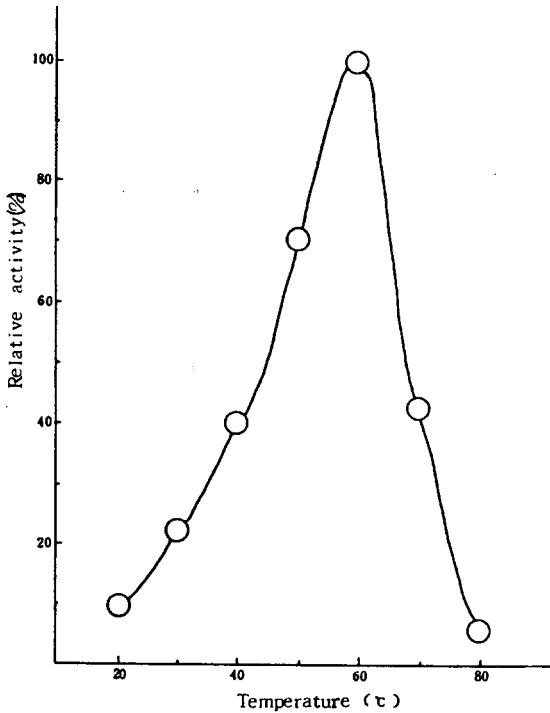


Fig. 8. Effect of temperature on activity of isolated ficin

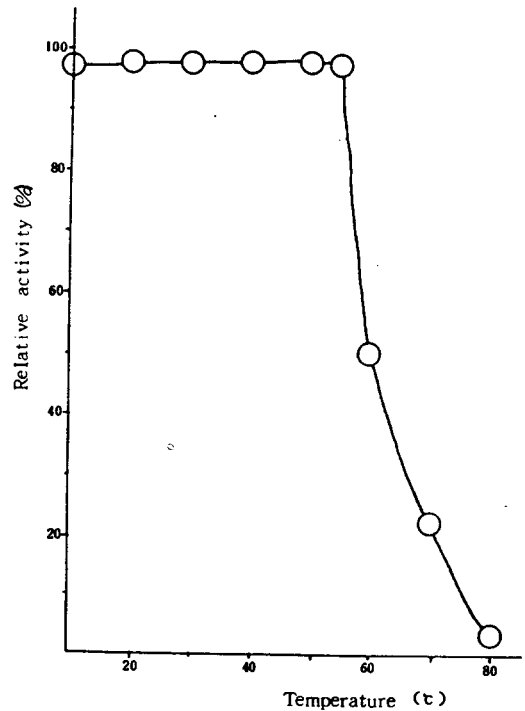


Fig. 10. Thermal stabilities of isolated ficin

고, 온도를 달리한 각 조건에서 30분간 항온시킨 후 기질을 가해 측정된 결과는 Fig. 10과 같다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 분리된 ficin은 pH 2~8로 비교적 넓은 범위에서 안정성을 나타내었다. 이 결과는 Sugiura 등의 결과와 일치하고 Hammond 등<sup>11)</sup>의 pH 3.0~9.0에 비해서는 pH 범위가 약간 낮은 쪽에서 안정성을 갖는 것으로 나타났으며 열에 대한 안정성은 Kramer 등<sup>5)</sup> Sugiura 등의 결과와 같이 0~55°C 까지 안정하였다.

#### Ficin의 분자량

분리한 ficin의 분자량을 HPLC로 측정한 결과는 Fig. 11과 같다. Fig. 11에 나타난 바와 같이 분리한 ficin의 분자량은 19500으로 Kramer 등<sup>30)</sup>의 18320과는 유사하게 나타났으나 Williams 등<sup>21)</sup>의 16500, Sugiura 등<sup>6)</sup>의 24000 그리고 Jones 등<sup>8)</sup> Englund 등<sup>4)</sup> Lowe<sup>13)</sup>의 25000과는 차이가 나타났다.

#### Ficin의 아미노산 조성

분리한 ficin을 LKB 4150 amino acid analyzer을 사용하여 아미노산 조성을 분석한 결과는 Table 3과 같다. Table 3에서 보는 바와 같이 분리된 ficin의 아미노산 조성은 이미 보고된 것들과 대체로 유사한 조성을 보여

주고 있으나 arginine의 함량이 매우 낮은 결과가 주목된다. 산성·염기성·중성 아미노산 조성은 21.8%, 3.5%, 74.7%로 나타났으며 cystine과 tryptophan을 제외한 아미노산 잔기수는 174로 나타났다.

#### 요 약

Ammonium sulfate 염분획과 CM-cellulose chromatography로 Fig latex에서 ficin을 분리하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 분리한 crude ficin을 전기영동한 결과 main band와 3개의 minor band로 나타났으며 main peak의 정제에서 얻은 ficin은 단일 band로 나타났다. 분리한 ficin의 pH 및 열에 대한 영향을 pH7.0, 60°C에서 최적 작용을 나타내었다. 분리한 ficin의 pH에 대한 안정성은 pH 2~8로 비교적 넓은 범위로 나타났고 열에 대한 안정성은 0~55°C의 범위로 안정성이 나타났다. 분리한 ficin의 분자량은 19500으로 나타났다. 산성 아미노산 21.8%, 염기성 아미노산 3.5%, 중성 아미노산 74.7%로 나타났으며 cystine과 tryptophan을 제외한 아미노산 잔기수는 174로 나타났다.

Table 3. Amino acid composition of ficin

(Unit: residues per 25,000g of protein)

	Williams	Kramer	Sugiura	Jones	The suggested method (per 19,500g protein)
Aspartic acid	19.0	27.3	21.9	20.7	24 ( 19)
Threonine	8.9	16.8	13.5	9.6	16 ( 13)
Serine	14.3	18.2	14.6	16.6	20 ( 15)
Glutamic acid	23.2	24.6	24.0	25.2	25 ( 19)
Proline	11.1	9.5	9.4	11.5	11 ( 9)
Glycine	30.8	25.3	24.0	32.3	29 ( 22)
Alanine	19.5	19.5	16.7	21.4	23 ( 18)
Valine	16.8	20.1	19.8	16.2	22 ( 17)
Methionine	3.6	2.1	2.1	2.9	1 ( 1)
Isoleucine	9.1	12.8	9.5	9.4	14 ( 11)
Leucine	16.5	12.1	11.5	16.6	16 ( 13)
Tyrosine	14.4	11.8	12.5	14.3	10 ( 8)
Phenylalanine	5.7	3.6	3.1	5.4	4 ( 3)
Histidine	1.8	2.6	2.1	1.7	2 ( 1)
Lysine	7.8	14.9	13.5	7.6	5 ( 4)
Arginine	8.7	9.9	8.3	7.3	1 ( 1)
1/2-Cystine	6.3	6.1	7.3	9.0	—
Tryptophan	10.9	6.5	6.3	6.2	—
Total	228.4	243.5	220.1	233.9	223 (174)

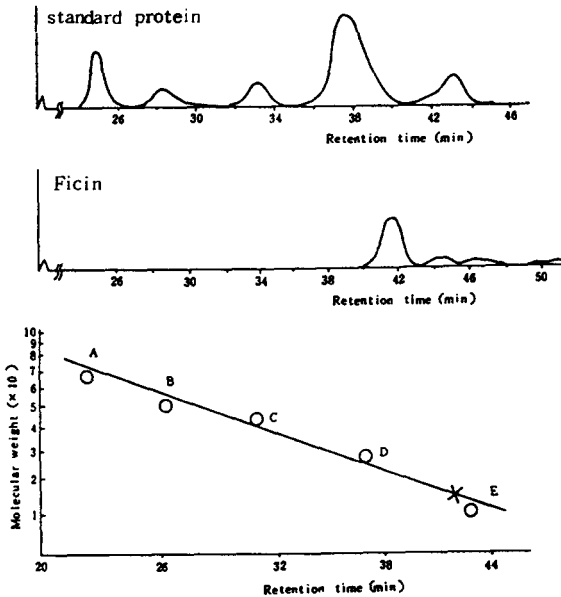


Fig. 11. Determination of molecular weight of isolated ficin by HPLC

Standard Protein

- A: Bovine serum albumin (M. W. 68,000)
- B: Sweet potato  $\beta$ -amylase (M. W. 50,000)
- C: Ovalbumin (Mw 45,000)
- D: Trypsin (Mw 24,000)
- E: Myoglobin (Mw 16,900)
- X: Isolated ficin

문헌

1. Kang, C.K. and Warmer, W.D.: *J. Food Sci.*, **39**, 812 (1974)
2. 노봉수, 박관화: 한국식품과학회지, **12**(3), 209(1980)
3. 尹政義, 梁隆: 한국식품과학회지, **6**(3), 163(1974)
4. Englund, P.T., King, T.P., Craig, L.C. and Walti, A.: *Biochemistry*, **7**(1), 163 (1968)
5. Kramer, D.E. and Whitaker, J.R.: *J. Biol. Chem.*, **239**(7), 2178 (1964)
6. Sugiura, M. and Sasaki, M.: *藥學雜誌*, **93**(1), 63 (1973)
7. Sugiura, M. and Sasaki, M.: *藥學雜誌*, **93**(3), 338 (1973)
8. Williams, D.C., Sgarbieri, V.C. and Whitaker, J.R.: *Plant Physiol.*, **43**, 1083 (1968)
9. Jones, I.K. and Glazer, A.N.: *J. Biol. Chem.*, **245** (11), 2765 (1970)
10. Whitaker, J.R.: *Food Technology*, **2**, 86 (1958)
11. Hammond, B.R. and Gutfreund, H.: *Biochem. J.*, **72**, 349 (1959)
12. Bernhard, S.A. and Gutfreund, H.: *Biochem. J.*, **63**, 61 (1956)
13. Lowe, G.: *Tetrahedron*, **32**, 291 (1976)
14. Wong, R.C. and Liener, I.E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**(5), 470 (1964)
15. Husain, S.S. and Lowe, G.: *Biochem. J.*, **117**, 333 (1970)
16. Brocklehurst, K. and Malthouse, J.P.G.: *Biochem. J.*, **191**, 707 (1980)
17. Glazer, A.N., Barel, A.O., Howard, J.B. and Brown, D.M.: *J. Biol. Chem.*, **244**(13), 3583 (1969)
18. 申秀澈: 順天農業專門大學論文集, **17**, 527(1980)
19. 朴秉昊, 朴炫九: 順天農業專門大學論文集 **1**(1976)
20. 金吉煥: 한국식품과학회지, **13**(2), 165(1981)
21. Williams, D.C. and Whitaker, J.R.: *Plant Physiol.*, **44**, 1574 (1969)
22. Sgarbieri, V.C., Gupte, S.M., Kramer, D.E. and Whitaker, J.R.: *J. Biol. Chem.*, **239**(7), 2170 (1964)
23. Devenyi, T. and Gergely, J.: *Amino Acids Peptides and Proteins*, Elsevier Scientific Publishing Co., 193 (1974)
24. Kun, M.: *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291 (1947)
25. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.: *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc, New York, **2**, 26 (1955)
26. Lowry, O.H., Rosenburgh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
27. 中尾順子, 中尾眞: 生化學實驗講座 5 酵素研究法(上), 19(1975)
28. Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. and Williams, D.E.: *Nature*, **195**(4838), 281 (1962)
29. Sugiura, M. and Sasaki, M.: *藥學雜誌*, **91**(4), 457 (1971)
30. Kame, D.E. and Whitaker, J.R.: *Plant Physiol.*, **44**, 1566 (1969)
31. Schram, E., Moore, S. and Bigwood, E.J.: *Biochem. J.*, **57**, 33 (1954)
32. Rockusica, S., Ohkawa, T. and Hatano, H.: *J. Chromat.*, **176**, 390 (1979)

(1986년 4월 30일 접수)