

후지 사과 Polyphenol Oxidase의 특성 및 활성억제

최언호 · 정동선 · 조남숙 · 심영현*

서울여자대학 식품과학과, *영양학과

(1987년 9월 5일 수리)

Characteristics and Inhibition of Polyphenol Oxidase from Fuji Apples

Eon-Ho Choi, Dong-Sun Jung, Nam-Sook Cho and Young-Hyun Shim*

Department of Food Science and *Department of Nutrition,

Seoul Woman's University, Seoul, Korea

Abstract

As a basic research for inhibition of enzymatic browning of apples during dehydration or processing, polyphenol oxidase was extracted from Fuji apples to investigate heat inactivation, chemical inhibition and other properties. Polyphenol oxidase showed the highest activity at 20°C and pH 5.5 with catechol as substrate, and the Michaelis constant of 0.14 M under the same condition of substrate and pH. The thermal inactivation followed pseudo first-order kinetics to have activation energy of 23.0 kcal/mol and z value of 19.7°C. As for substrate specificity the polyphenol oxidase showed high affinity toward the *o*-diphenolic compounds, particularly chlorogenic acid. Neither the *m*- and *p*-dihydroxy phenols nor monophenols were attacked. Browning by polyphenol oxidase was completely inhibited at the concentrations of 10mM for potassiummetasulfite and thiourea and 1mM for L-cysteine, ascorbic acid and sodium diethyldithiocarbamate.

서론

식품가공 및 저장에서 문제가 되는 식품의 효소적 갈변은 인위적 또는 자연적으로 발생하는 산화 환원 반응의 결과이며¹⁾ 주로 polyphenol oxidase (*o*-diphenol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.1)가 관여하는 것으로 알려졌다. 과실의 갈변은 주로 과육이 물리적 손상을 입게될 때 과육내에 존재하는 polyphenol oxidase에 의해 phenol계 화합물이 quinone으로 산화되고 이것이 중합되어 melanine을 생성하여 일어난다.²⁾ Polyphenol oxidase의 최적 pH, 최적온도, 기질특이성, Km값, 활성화에너지, 열불활성화, 저해제, isoenzyme 등에 관한 연구는 배³⁾, 복숭아⁴⁻⁷⁾, 앵두⁸⁻⁹⁾, 바나나¹⁰⁻

¹⁴⁾, 포도¹⁵⁾, 망고¹⁶⁾, avocado¹⁷⁻¹⁸⁾, table beet¹⁹⁾, tomato²⁰⁾, 가지^{21,22)}, 감자²³⁾, velvet bean²⁴⁾ 등에서 수행되었으며 이들 식품에 있는 polyphenol oxidase의 특성은 식품의 종류 및 품종에 따라 차이가 있었다.

Harel²⁵⁾ 등은 Grand Alexander 사과에서 갈변 속도를 결정하는 요인은 *o*-diphenol 기질과 polyphenol oxidase의 양이라고 보고하였으며 Shannon²⁶⁾ 등은 Winesap, Cortlands 사과에서 여러 phenol계 화합물의 기질과 저해제에 관하여 연구하였다. 또한 Grimes Golden과 Golden delicious 사과껍질의 주요 갈변 기질은 L-epicatechin, Bramley's seedling 사과²⁷⁾의 주요 기질은 chlorogenic acid이라고 구명되었다. 국내에서는 홍옥²⁸⁾과 국광²⁹⁾의 polyphenol oxidase에 관한 최적 pH, 온도,

이 논문은 1986년도 문교부 학술연구조성비(제목: 사과의 갈변효소에 관한 연구)에 의하여 연구되었음

기질특이성, 저해제 등이 단편적으로 연구되어 있다. 최근 국내에서는 후지 사과의 생산량이 크게 증가하고 있어 이의 가공 및 저장에 대한 관심이 높아지고 있으므로 사과의 갈변억제는 필연적으로 해결되어야 될 것이다. 그러나 국내 후지 사과의 polyphenol oxidase에 관한 연구 결과가 보고되지 않았기에 본 연구에서는 그 기초자료를 얻고자 후지사과로부터 추출한 polyphenol oxidase의 일반적 특성과 활성억제에 미치는 가열 및 저해제의 효과를 조사하였으며 이에 그 결과를 보고한다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

경기도 김포군 대곶면 사과단지에서 1985~1986년도 수확기에 구입한 후지 사과를 4°C에 저장하여 실험재료로 사용하였다.

2. 조효소액의 조제

Flurkey와 Jen⁶⁾의 방법을 약간 변형하여 조제하였다. 즉 과육 30g을 3mm 두께로 썰어서 polyvinylpyrrolidone 3g과 4°C의 0.05M potassium phosphate 완충용액(pH 5.5) 60ml를 가하여 homogenizer로 2분간 균질화시키고 4°C에서 원심분리(15,000×g, 30분)한 상정액을 glass wool로 여과하여 여액을 조효소액으로 사용하였다.

3. 효소의 활성 측정

Flurkey와 Jen⁶⁾의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 즉 기질인 0.2M catechol 0.2ml에 0.05M potassium phosphate 완충액 2.0ml와 조효소액 0.3ml를 가하고, 대조용으로는 기질 또는 효소 대신에 증류수를 넣고 spectronic 710 (Baush & Lomb)을 사용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 이와 같은 조건하에서 효소 촉매반응의 초기 속도는 2분간 직선으로 나타났으며 이로부터 기울기를 계산하여 효소 활성을 구하였다. 효소의 활성은 1분간에 흡광도 0.001 증가시킨 것을 1 unit로 하였다.

4. pH에 따른 효소의 활성 측정

pH 2.5~8.0(0.5 pH 간격) 범위에서 polyphenol oxidase의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하였다. pH 2.5~5.0에서는 0.1M citrate-0.2M phosphate 완충액, pH 5.0~8.0에서는 0.5M po-

tassium phosphate 완충액을 사용하여 효소 활성을 측정하고 상대활성으로 나타내었다.

5. 온도에 따른 효소의 활성 측정

0.05M potassium phosphate 완충액(pH 5.5)에 조효소액 0.3ml를 넣어 0°C부터 70°C까지의 수조에서 20분간 항온시킨 후 효소활성을 측정하여 상대활성으로 나타내었다.

6. 기질의 종류와 농도에 따른 효소의 활성측정

Catechol의 농도를 0.01~1.0M로 조정하여 농도별로 polyphenol oxidase의 활성을 측정하여 Michaelis constant (Km)를 구하였다.

Polyphenol oxidase의 기질특이성을 o-diphenol은 catechol, chlorogenic acid, caffeic acid를, m-diphenol은 resorcinol, p-diphenol은 hydroquinone, trihydroxyphenol은 pyrogallol, mono-phenol은 tyrosine을 사용하여 측정하였으며, 각각의 농도는 용해도를 고려하여 0.01M에서 측정하고 tyrosine과 chlorogenic acid는 0.0025M과 0.005M에서 각각의 활성을 측정하였다.

7. 가열온도와 시간에 따른 효소의 활성 측정

65~85°C(5°C 간격)로 조정한 수조에서 충분히 예열시킨 각 시험관(1.0×15cm)에 조효소액을 2ml씩 넣고 40분 동안 가열하면서 조효소액을 일정 시간별로 취하여 즉시 냉각시킨 뒤 잔존 활성을 측정하였다.

8. 저해제의 처리

Polyphenol oxidase의 저해제로 알려져 있는 것 중에서 potassium metabisulfite, ascorbic acid, L-cysteine, sodium diethyldithiocarbamate, thiourea 등을 각각 0.1, 1.0, 10mM의 농도로 조정하여 0.2ml씩 반응혼합액에 첨가한 후 효소 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. Polyphenol oxidase의 활성에 미치는 pH와 온도의 영향

Polyphenol oxidase의 산화적 활성은 pH와 온도의 영향을 받는 것으로서²⁰⁾, 후지 사과의 polyphenol oxidase의 pH와 온도에 대한 반응을 조사한 결과는 그림 1과 같다.

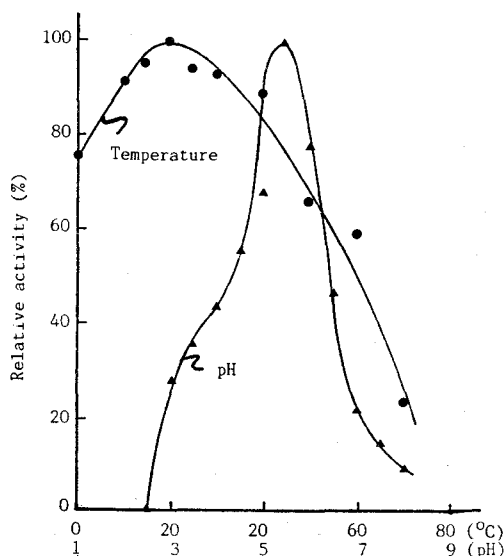


Fig. 1. Effects of pH and temperature on the activity of polyphenol oxidase from Fuji apples

Catechol을 기질로 하여 0.5M potassium phosphate 완충액에서 측정한 polyphenol oxidase의 최적 pH는 5.5로 나타났으며 이보다 pH 1.0이 높거나 낮으면 활성이 약 50%로 감소되었고, pH 7.0에서는 20%로 감소되었다. 알칼리쪽 pH에서는 기질인 catechol이 자동산화되는 것으로 알려졌다기 때문에 pH 7.0 이상에서의 결과는 효소 단독에 기인된 것은 아니라 생각되며 실제로 사과의 phenol 성 물질인 catechol이 pH 6.0 이상에서는 4°C에서도 자동산화가 일어났다는 보고가 있다.³¹⁾ Polyphenol oxidase의 최적 pH는 과실의 종류와 품종별로 달라서 사과의 경우 정^{28,29)} 등은 홍옥과 국광에서의 최적 pH가 각각 6.5와 6.0이라 하였고, Betrosian³²⁾은 pH 7.0, Walker³³⁾ 등은 pH 4.8~5.0, Shannon²⁸⁾은 pH 5.2 등으로 보고하였다.

Polyphenol oxidase의 활성에 대한 온도의 영향은 pH 5.5에서 조효소액을 0°C부터 70°C에서 20분간 항온시킨 후 효소활성을 측정할 때 20°C에서 최대 활성을 보였고, 10°C와 40°C 사이에서 90% 이상의 활성을 나타냈는데, 홍옥²⁸⁾의 경우는 30°C에서 최대 활성을 나타내었다고 하였다.

2. Polyphenol oxidase의 활성에 미치는 기질 특이성

Polyphenol oxidase는 기질의 형태에 따라 mo-

Table 1. Substrate specificity of polyphenol oxidase from Fuji apples

Substrate	Concentration (mM)	Activity (unit)	Relative activity (%)
Monophenol			
L-Tyrosine	2.5	0	0
o-Diphenol			
Catechol	10	23.5	100
Chlorogenic acid	5.0	103	438
Caffeic acid	10	1.93	8.20
m-Diphenol			
Resorcinol	10	0	0
p-Diphenol			
Hydroquinone	10	0	0
Trihydroxyphenol			
Pyrogallol	10	21.3	90.6

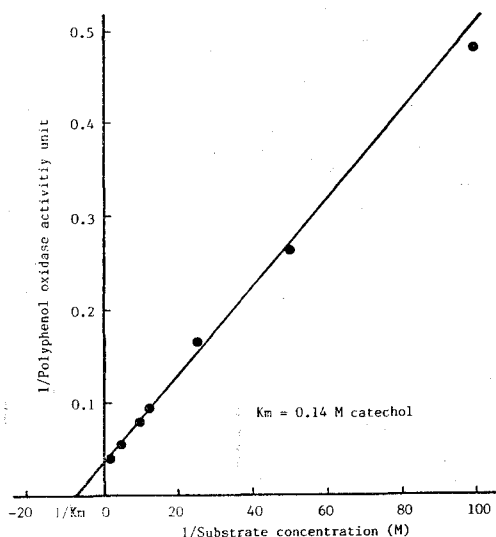


Fig. 2. Double reciprocal plot for polyphenol oxidase activity

nophenol을 산화시키는 cresolase와 diphenol을 산화시키는 catecholase, 그리고 monophenol과 o-diphenol, triphenol 및 p-diphenol 등을 산화시키는 laccase로 구분하기도 한다.¹⁾

사과 polyphenol oxidase의 기질 특이성을 조사한 결과는 표 1에 나타난 것과 같이 o-diphenol인 catechol, chlorogenic acid, caffeic acid와 trihydroxyphenol인 pyrogallol에는 활성을 나타내나,

m-diphenol인 resorcinol과 p-diphenol인 hydroquinone, monophenol인 tyrosine에는 전혀 활성을 나타내지 않았다. 또한 o-diphenol 중에서는 chlorogenic acid에서 가장 높은 활성을 나타내 사과 polyphenol oxidase의 갈변반응의 주요 기질을 chlorogenic acid라고 한 Walker 등³³⁾의 견해와 일치하였고 정 등의 홍옥²⁸⁾과 국광²⁹⁾에서 조사한 결과와도 일치하였다. 이외에도 사과 polyphenol oxidase의 기질로서 esculetin과 dihydroquercetin 그리고 l-epicatechin 등이 보고되었다.²⁶⁾

기질(catechol) 농도에 따른 polyphenol oxidase의 반응속도를 조사한 결과는 그림 2와 같이 Michaelis 상수(K_m)가 0.14M로 나타났으며 isozyme이 존재할 수 있으므로 이는 평균치 또는 근사치일 수 있다.

3. 효소의 열불활성화

Polyphenol oxidase의 열불활성화를 65~85°C에서 5°C 간격으로 조사한 결과는 그림 3과 같다. 65°C와 70°C에서는 가열 초기에 polyphenol oxidase의 활성이 오히려 증가하다가 각각 5분, 3분 뒤에는 감소하여 불활성화 곡선이 10분대에서 약간 꺾여진 biphasic 내지는 유사일차반응곡선(Pseudofirst order reaction)으로 나타났으며 75~85°C에서는 초기부터 가열시간에 따라 감소하는 유사일차반응을 나타내었다.

이와 같은 현상은 과일의 종류에 따라 차이가 있어 avocado¹⁷⁾의 경우 polyphenol oxidase의 활성이 70°C에서는 14분간 1차 반응속도에 따랐으나 74°C, 79°C에서는 1차 반응속도에 따르지 않았다고 하며, 배³⁴⁾, 망고¹⁶⁾의 경우는 1차 반응속도에 따랐고, 앵두는 75°C에서 7분 동안만 1차 반응속도에 따랐다고 보고되었다.

Polyphenol oxidase의 열불활성화 곡선에서 각 온도별 효소 활성을 90% 감소시키는데 필요한 가열시간(D)은 표 2, 그림 4에서와 같이 70°C에서 16.8분, 85°C에서 2.5분이었고, 이로부터 D 값을 90% 감소시키는데 필요한 온도(Z)를 구한 결과 19.7°C였다. 각 온도별 가열시간에 대한 활성도를 그래프로 나타내어 각 온도에서의 열불활성화 속도상수 K 값을 구하고, 이로부터 계산된 활성화에너지(E_a)는 23.0kcal/mol이었다.

Ravat 포도에서는 E_a 가 60.92kcal/mol, Wia-gara 포도에서는 36.65kcal/mol이고¹⁵⁾ 양송이³⁵⁾에서는 12.0kcal/mol로서 후지 사과의 polyphenol

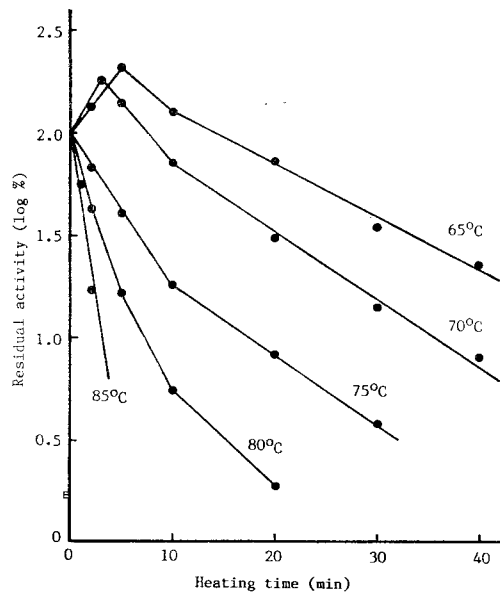


Fig. 3. Thermal inactivation of polyphenol oxidase from Fuji apples

Table 2. Thermal inactivation data of crude polyphenol oxidase from Fuji apples

Inactivation temp.(0°C)	D (min)	Z (°C)	K (sec ⁻¹ , 10 ⁴)	E_a (kcal/mol)
65	23.2	19.7	7.7	23.0
70	16.8		9.9	
75	13.4		13.7	
80	6.4		26.7	
85	2.5		55.4	

oxidase는 포도의 polyphenol oxidase보다 온도 변화에 따른 열저항성이 높으나 양송이 보다는 낮음을 알 수 있었다. 또한 홍옥²⁸⁾에서의 polyphenol oxidase의 반감기는 60°C에서 30분, 70°C에서 9분, 배는 70°C에서 11.7분, 80°C에서 2.24분, 망고¹⁶⁾는 80°C에서 4.0분, 85°C에서 2.1분이고, table beet¹⁹⁾는 70°C에서 6.8분, 80°C에서 2.6분 등으로 보고되었다. 후지 사과의 polyphenol oxidase는 활성을 90% 소실하는데 70°C에서 16.5분, 80°C에서 4.5분 소요되는 것으로 보아 후지 사과의 polyphenol oxidase의 열저항성이 이들보다 높은 것으로 나타났다

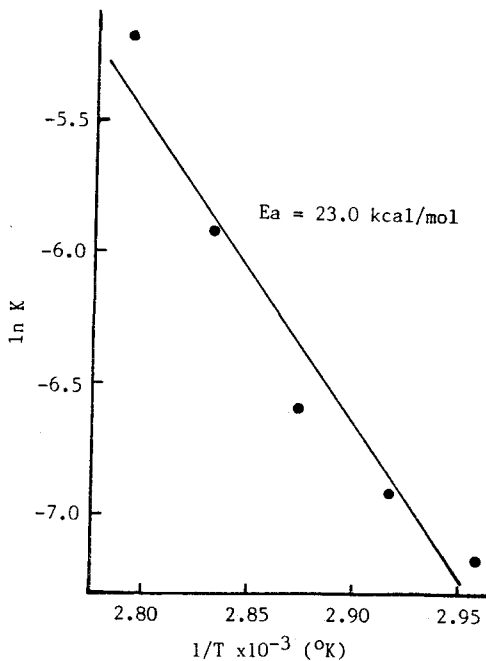


Fig. 4. An Arrhenius plot of polyphenol oxidase in Fuji apples

4. 효소의 활성억제에 미치는 저해제의 저해 효과

Polyphenol oxidase에 대한 저해제의 작용기작은 기질인 phenol을 우선적으로 산화시킴으로써 저해하는 것과 효소의 보결분자단과 복합체를 형성하거나 치환함으로써 저해하는 것, 기질과 복합체를 형성함으로써 저해하는 것 등이 있다.

본 연구에서는 효소의 초기 반응산물인 quinone과 복합체를 형성하여 갈변을 지연시키는 것으로 알려진 potassium metabisulfite, ascorbic acid, L-cysteine 등과 효소의 보결분자단과 반응하는 것으로 알려진 sodium diethyldithiocarbamate, thiourea 등을 각각 0.1, 1.0, 10mM의 농도로 만들어 효소액에 처리하였다. 저해효과는 각 효소의 활성 측정 파장에서의 흡광도 증가가 초기 60초간 지속된 직선의 기울기로부터 계산하되 저해제 첨가 후 흡광도 증가가 일어나지 않는 시간이 60초 이상일 때를 저해 효과 100%로 간주하였다.

각 저해제의 농도별 저해효과는 표 3과 그림 5, 6에 나타난 것과 같이 potassium metabisulfite, ascorbic acid, L-cysteine, sodium diethyldithiocarbamate, thiourea 등 사용한 모든 저해제의 저

해정도는 사용농도에 따라 달랐으며, 10mM 농도에서는 효소활성을 100% 저해하였다.

Copper chelating agents로서 polyphenol oxidase의 보결분자단인 Cu와 결합함으로써 억제하는 것으로 알려진³⁴⁾ sodium diethyldithiocarbamate는 1mM에서도 효소활성을 100% 저해하였으며 thiourea는 이보다 훨씬 저해력에 약하였다.

Potassium metabisulfite는 metabisulfite와 효

Table 3. Effect of various inhibitors on the activity of polyphenol oxidase from Fuji apples.

Inhibitor	Concentration (mM)	Percent inhibition
Potassium m-bisulfite	0.1	0
	1	78
	10	100
Ascorbic acid	0.1	0
	1	100
	10	100
L-Cysteine	0.1	0
	1	100
	10	100
Sodium diethyl-dithiocarbamate	0.1	16
	1	100
	10	100
Thiourea	0.1	0
	1	34
	10	100

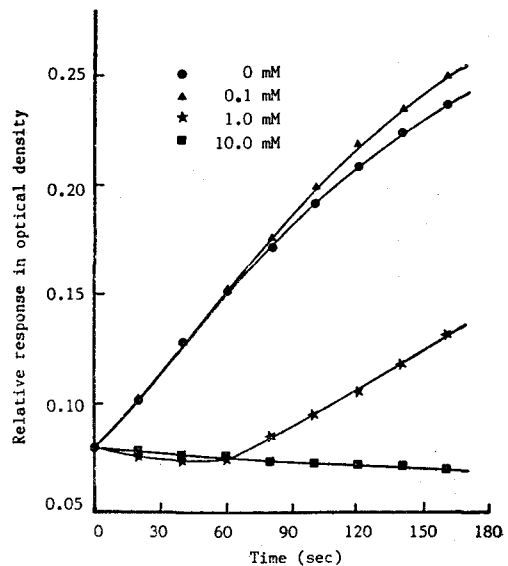


Fig. 5. Inhibition effect of ascorbic acid on browning by polyphenol oxidase of Fuji apples

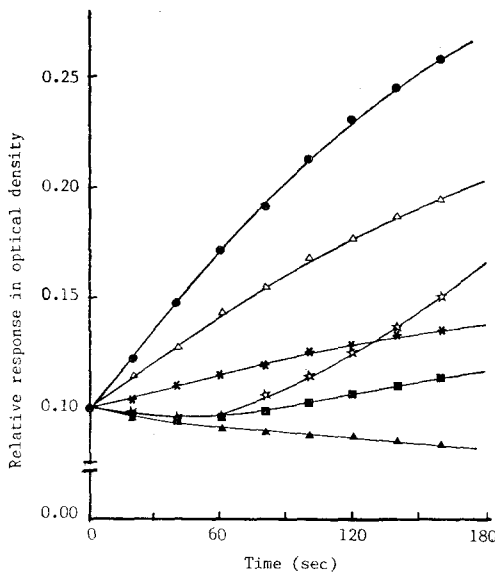


Fig. 6. Inhibition effect of chemical compounds (1mM) on browning by polyphenol oxidase of Fuji apples

●- : Control, △- : Thiourea
 * - : K-metabisulfite, ■ - : L-Cysteine
 ▲ - : Na-diethyldithiocarbamate
 ☆ - : Ascorbic acid

소반응의 초기 산물인 quinone과 복합체를 형성하여 갈변을 지연시키는 것으로서 복합체가 임계수치(critical value) 이하로 떨어지면 갈변이 다시 시작된다.³⁶⁾ Potassium metabisulfite에 의한 갈변 억제 효과는 사과, 배, 복숭아 등 여러 과일과 채소에서 보고되었다. 뿐만 아니라 potassium metabisulfite, sodium metabisulfite 등의 sulfiting agent들은 GRAS(generally recognized as safe) 품목으로 오래전부터 식품에 널리 이용되고 있으나 최근의 연구발표에 따르면 식품내에서 결합형으로 남아있는 sulfite가 천식을 유발함이 밝혀져 FDA에서 이들의 사용을 규제하고 있으며³⁷⁾ 국내에서도 몇몇 제품에 대한 규제가 발표되었다.

Ascorbic acid와 L-cysteine은 1mM에서도 두 효소를 100%저해하여 사용된 저해제 중에서 sodium diethyldithiocarbamate와 더불어 가장 효과가 좋았는데 이들은 국광²⁹⁾, 복숭아⁴⁾, 배^{3,6)}, 바나나¹⁰⁾ 등의 polyphenol oxidase에 대해서도 좋은 저해제로 보고되었다. Ascorbic acid는 o-quinone을 o-dihydroxy quinone으로 환원시켜 중합과 갈변을 방지하는 작용을 하고, L-cysteine은 quinone을 환

원시키거나 quinone과 부가 반응물을 형성함으로써 갈변을 지연시키는 것으로서, 이들에 의해서 갈변은 억제되지만 효소활성이 계속되므로 이들은 진정한 효소 저해제라기 보다는 항산화제로 작용하여 갈변을 지연시키므로 갈변 저해효과는 이의 첨가량에 비례할 것이고 이의 농도가 임계치 이하로 떨어지면 그 후에는 첨가하지 않았을 때와 마찬가지로 갈변이 일어난다.³⁸⁾ 본 연구 결과에서도 1mM의 ascorbic acid와 L-cysteine은 60~90 초까지는 100% 활성을 저해하였으나 그 후에는 첨가하지 않았을 때와 마찬가지로 점차 흡광도가 증가함을 알 수 있었다.

요 약

사과의 건조, 가공 중의 갈변을 방지하기 위한 기초 조사로서 후지 사과로부터 추출한 crude polyphenol oxidase의 특성과 열에 대한 저항성, 갈변 저해제의 저해 효과 등을 조사하였다.

Catechol을 기질로 사용하였을 때 polyphenol oxidase의 최적 pH는 5.5, 최적온도는 20°C, K_m 값은 0.14M이었고, 열불활성화는 유사일차반응을 보였으며 이때 활성화에너지(E_a)와 Z 값은 각각 23.0cal/kmol, 19.7°C였다. 기질에 따른 친화력은 o-diphenol, 특히 chlorogenic acid에 대하여 높았고, monophenol과 m-diphenol, p-diphenol에 대해서는 나타나지 않았다. Polyphenol oxidase에 의한 갈변은 thiourea와 potassium metabisulfite는 10mM에서, L-cysteine과 ascorbic acid, sodium diethyldithiocarbamate는 1mM에서 현저하게 저해되었다.

참 고 문 헌

1. Mayer, A.M. and Harel, E.: *Phytochemistry*, 18 : 193 (1979)
2. Fennema, O.R.: *Food Chemistry*, Marcel Dekker, Inc. New York, p.325~329
3. Halim, D.H. and Montgomery, M.W.: *J. Food Sci.*, 43 : 603 (1978)
4. Reyes, P. and Luh, B.S.: *Food Technol.*, 14 : 570 (1960)
5. Luh, B.S. and Phithakpol, B.: *J. Food Sci.* 37 : 264 (1972)

6. Flurkey, W.H. and Jen, J.J.: J. Food Sci., 43 : 1826 (1978)
7. Paulson, A.T., Vanderstoep, J. and Porritt, S.W.: J. Food Sci., 45 : 341 (1980)
8. Benjamin, N.D. and Montgomery, M.W.: J. Food Sci., 38 : 799 (1973)
9. Schaller, D.R. and Vonel, J.H.: J. Food Sci., 38 : 799 (1973)
10. Galeazzi, M.A.M. and Sgarbieri, V.C.: J. Food Sci., 46 : 1404 (1981)
11. Palmer, J.K. and Roberts, J.B.: Science, 157 : 200 (1967)
12. Montgomery, M.W. and Sgarbieri, V.C.: Phytochemistry, 14 : 1245 (1975)
13. Weaver, C. and Charley, H.: J. Food Sci. 39 : 1200 (1974)
14. Galeazzi, M.A.M., Sgarbieri, V.C. and Constantindies, S.M.: J. Food Sci., 46 : 150 (1981)
15. Wissemann, K.W. and Lee, C.Y.: J. Food Sci., 46 : 506 (1981)
16. Park, Y.K. Sato, H.H., Almedia, T.D. and Moretti, R.H.: J. Food Sci., 46 : 1619 (1980)
17. Kahn, V.: J. Food Sci., 42 : 38 (1977)
18. Kahn, V.: Phytochemistry, 15 : 267 (1976)
19. Lee, C.Y. and Smith, N.L.: J. Food Sci., 44 : 82 (1979)
20. Signoret, A. and Crouzet, J.: Agric. Biol. Chem., 42 : 1871 (1978)
21. Knapp, F.W.: J. Food Sci., 30 : 930 (1965)
22. Sakamura, S. Shibusa, S. and Obata, Y.: J. Food Sci., 31 : 317 (1966)
23. Constantinides, S.M. and Bedford, C.L.: J. Food Sci., 32 : 446 (1967)
24. Zeninn, C.T. and Park, Y.K.: J. Food Sci., 42 : 646 (1978)
25. Harel, E. Mayer, A.M. and Shain, Y.: J. Sci. Food Agric., 17 : 389 (1966)
26. Shamannon, C.T. Pratt, D.E.: J. Food Sci., 32 : 479 (1967)
27. Weurman, C. and Swain, T.: Nature, 172 : 678 (1953)
28. 정기택, 서승교, 송형익 : 한국영양식량학회지, 13(4) : 397 (1984)
29. 정기택, 서승교, 송형익 : 한국영양식량학회지 12(4) : 316 (1983)
30. Lu, A.T. and Whitaker, J.R.: J. Food Sci., 39 : 1173 (1974)
31. 정기택, 서승교, 송형익 : 한국식품과학회지, 16(4) : 413 (1984)
32. Bedrosian, K., Steinberg, M.P. and Nelson, A.I.: Food Technol., 14 : 480 (1960)
33. Walker, J.R.L. and Hulme, A.C.: Phytochemistry, 4 : 677 (1965)
34. Tate, J.N., Luh, B.S. and York, G.K.: J. Food Sci., 29 : 829 (1964)
35. McCord, J.D. and Kilara, A.: J. Food Sci., 48 : 1479 (1983)
36. Embs, R.J. and Markakis, P.: J. Food Sci., 30 : 753 (1965)
37. Taylor, S.L. and Bush, R.K.: Food Technol., 47 (1986)
38. Muneta, P. and Walradt, J.: J. Food Sci., 33 : 606 (1968)