

아그배 Peroxidase의 정제 및 특성

양희천[†] · 손희숙* · 심규광** · 오찬호** · 최동성**

전주우석대학 식품공학과
*전북대학교 가정교육학과
**전주우석대학 생물공학과

Purification and Some Properties of Peroxidase from the Fruit *Malus sieboldii* (Regel) Rehder

Hee-Cheon Yang[†], Hee-Suk Son*, Kyu-Kwang Shim**
Chan-Ho Oh** and Dong-Seong Choi**

Dept. of Food Science and Technology, Jeonju Woosuk University, Samrye 565-800, Korea

*Dept. of Home Economics, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

**Dept. of Biotechnology, Jeonju Woosuk University, Samrye 565-800, Korea

Abstract

Peroxidase in the fruit of *Malus sieboldii* (Regel) Rehder was partially purified by DEAE-cellulose column chromatography and Ultro-AcA 54 gel filtration. The optimum pH of peroxidase was 4.5 and optimum temperature was 80°C. The enzyme was stable at pH 5.0 and below 30°C, and inactivated by heat treatment at 80°C for 15min. In the presence of 30mM H₂O₂ Km value on *o*-phenylenediamine as substrate was 1.65mM, and in the presence of 10mM *o*-phenylenediamine Km value on H₂O₂ was 7.97mM. L-Ascorbic acid and sodium L-ascorbate greatly inhibited the enzyme activity and among several metal ions Mn²⁺ only increased the activity at 5mM.

Key words : peroxidase, purification, *Malus sieboldii* (Regel) Rehder

서 론

시금치, 포도, 무화과, 사과, 복숭아, 고구마, 생강 등의 식물과 동물, 미생물에 널리 분포되어 있는 산화효소인 peroxidase (donor : H₂O₂, oxidoreductase, EC 1.11.1.7)는 heme을 함유하는 당단백으로, H₂O₂의 존재하에서 페놀류, cytochrome c, nitrite, leucodyes, 방향족 아민류, indole 등 다양한 수소 공여체

를 산화하여 갈변물질인 quinone을 생성하는 효소이다¹⁾. 또한 H₂O₂가 없더라도 NADH₂, NADPH₂, chalcones, tyrosine, tyramine, thiols 등을 산화시킬 수가 있으며²⁾, 과일과 채소중의 peroxidase는 식품으로 가공하는 공정에서 효소적 갈변을 유발하여 풍미를 저하시키는 원인이 되기도 한다³⁾. 이 효소는 비교적 열에 안정하여 데치기 공정후에 이 효소의 활성을 측정하므로써 적정 열처리 수준 판정의 지표효소로 이용되기도 한다⁴⁾. 한편 토마토중의 indole acetic acid

[†]To whom all correspondence should be addressed

(IAA)는 열매의 숙성을 지연시키는 물질로서 알려져 있는데⁶⁾, peroxidase가 IAA를 산화시켜⁶⁾ 숙성에 관여하기도 하며, 딸기와 앵두중의 anthocyanin을 분해하여 품질을 저하시키기도 한다⁷⁾. 또한 horseradish와 Korean-radish의 peroxidase는 효소적 방법으로 포도당을 정량하는데 있어 시약으로서도 사용되고 있다⁸⁾. 이러한 peroxidase의 정제 및 특성에 대해서는 토마토⁹⁾, 감자^{10,11)}, 양파¹²⁾, Cox's apple¹³⁾, 녹두²⁾, 사과³⁾, 밤¹⁴⁾, 대두¹⁵⁾, horseradish¹⁶⁾, Malvasia grape¹⁷⁾ 등 여러 식물체에서 연구되었다.

아그배나무 (*Malus sieboldii* (Regel) Rehder)는 황해도 이남에서 자라는 낙엽관목으로서 10월에 직경 6~8mm의 열매를 맺는다. 본 열매는 채취후 빠른 속도로 갈변이 진행되는데, 이는 열매에 존재하는 polyphenol oxidase나 peroxidase에 의한 효소적 갈변에 기인하는 것으로 추측되어진다. 이에 본 연구에서는 아그배로부터 peroxidase를 분리 정제하고, 그의 특성을 조사하여 갈변 원인의 구명과 효소화학 연구에 필요한 기초 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

효소의 정제

전북 완주군 봉동읍 야산에서 1990년 9월에 채취한 아그배를 -20℃에 저장하면서 실험재료로 사용하였다. 아그배 30g을 90ml의 0.1M citrate-0.2M Na₂HPO₄ 완충용액 (pH 5.0)에 혼합하여 믹서로 마쇄하고, 4℃에서 30분간 교반한 후 거즈로 고형분을 여과하여 얻은 여액을 4℃, 3500rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 상정액에 2배량의 아세톤(-20℃)을 가하여 30분간 방치한 후 원심분리하여 아세톤을 제거하고, 실온에 방치하여 잔사 중의 아세톤을 모두 휘발시켰다. 잔사에 0.1M 인산완충용액 (pH 7.0)을 가하여 용해하고 원심분리하여 불용성 물질을 제거하였

다.

DEAE-cellulose를 유리 칼럼 (3.5×20cm)에 충전한 다음 0.1M 인산완충용액으로 평형화시켰다. 이 칼럼에 상기의 효소액을 주입하고, 0.1M 인산완충용액과 0.5M NaCl을 함유한 동일 완충액을 linear gradient가 되도록 30ml/hr의 유속으로 용출시켰다. 용출액은 90 drop씩 분획하였다. Peroxidase의 활성이 있는 분획을 아세톤으로 침전시키고, 그의 잔사에 소량의 0.1M 인산완충용액을 가하여 용해시켰다.

Ultero-AcA 54를 유리 칼럼 (1.6×80cm)에 충전한 다음 0.1M 인산완충용액으로 평형화시켰다. 이 칼럼에 상기의 효소액을 주입하고, 0.1M 인산완충용액을 15ml/hr로 용출시키면서 2.5ml씩 분획하였다. Peroxidase의 활성이 있는 획분을 사용하여 효소의 제특성을 조사하였다.

효소활성의 측정

효소의 활성은 효소가 기질에 작용하여 quinone를 형성하는 초기속도의 변화로 430nm에서의 흡광도를 측정하여 정하였다. 즉 0.1M citrate-0.2M Na₂HPO₄ 완충용액 (pH 4.5), 10mM o-phenylenediamine(OPDA), 5mM H₂O₂를 혼합한 기질용액 5ml에 효소액 100μl를 가하여 60℃에서 1분간 반응시킨 후 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소활성 1 unit는 1분당 0.01의 흡광도를 변화시키는 효소의 양으로 정하였다¹⁸⁾.

단백질 농도의 측정

DEAE-cellulose 칼럼 크로마토그래피, Ultero-AcA 54 겔여과의 각 분획별 단백질 농도는 280nm에서 흡광도를 측정 비교하였으며, 효소의 정제 단계별 단백질의 농도는 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 Lowry 등의 방법¹⁹⁾으로 측정하였다.

Table 1. Summary of purification of peroxidase from the fruit of *Malus sieboldii* (Regel)Rehder

Step	Volume (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	82	29569	343.30	86.1	1.0	100
DEAE-cellulose chromatography	88	7653	6.60	1159.5	13.5	25.9
Ultero-AcA 54 gel filtration	25	6100	1.38	4420.3	51.3	20.6

결과 및 고찰

Peroxidase의 정제

조효소액을 DEAE-cellulose 칼럼 크로마토그래피와 Ultra-AcA 54 겔여과 (Fig. 1)를 행하여 부분 정제하였다. 분리정제 과정과 효소의 역가와의 관계는 Table 1에서 나타낸 바와 같이 조추출물중의 peroxidase의 고유활성도는 86.1units/mg 단백질이었고, DEAE-cellulose 칼럼 크로마토그래피에서는 고유활성도가 1159.5units/mg 단백질로 13.5배가 증가되었으며, 이때 회수율은 25.9%이었다. Ultra-AcA 54 겔여과에서는 고유활성도가 4420.3units/mg 단백질로 51.5배 증가하였고 회수율은 20.6%이었다.

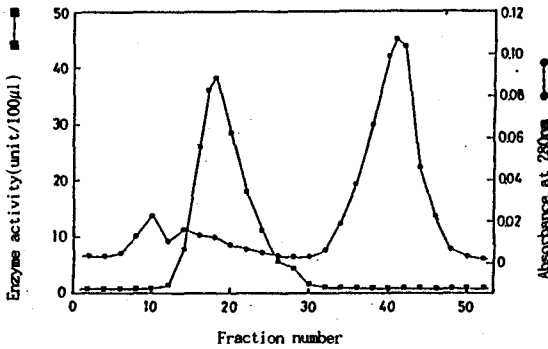


Fig. 1. Elution profile of partially purified peroxidase from the fruit of *Malus sieboldii* (Regel) Rehder on Ultra-AcA 54 gel filtration.

효소의 특성

반응최적 pH

정제효소의 반응 최적 pH를 알아보기 위하여 pH 3.0에서 7.0까지 각 pH별로 효소활성을 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다. 반응 최적 pH는 4.5이었고, pH 변화에 따라 효소활성이 영향을 받았으며 pH 3.0에서는 60%, pH 6.0에서는 70%의 효소활성이 감소되었다. 녹두 peroxidase²⁾의 최대활성 pH는 5.6, 사과 peroxidase³⁾의 peak I과 peak II 및 peak III의 최대활성 pH는 각각 5.0, 5.5, 밤 peroxidase⁴⁾의 최대활성 pH는 5.0, 대두 peroxidase¹⁵⁾의 최대활성 pH는 5.5, green bean, turnip²⁰⁾의 최대활성 pH는 5.0이라고 보고된 바 있는데, 야그배의 peroxidase는 이들보다

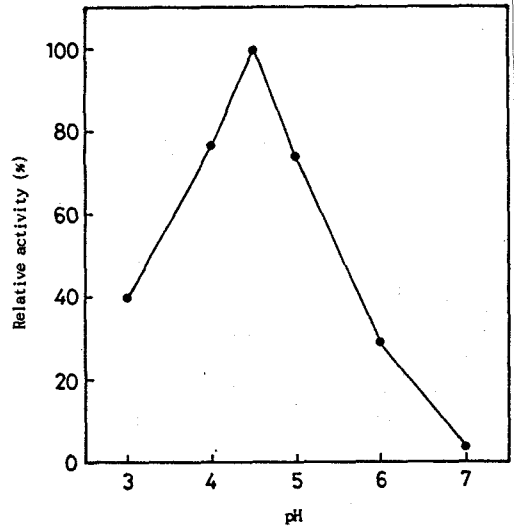


Fig. 2. pH-activity profile of purified peroxidase from the fruit of *Malus sieboldii* (Regel) Rehder.

The enzyme assays were carried out in 5ml of 0.1M citrate-0.2M Na₂HPO₄ buffer (pH 3.0 to 7.0), containing 10mM OPDA and 5mM H₂O₂ as described in the text, and expressed as relative activity.

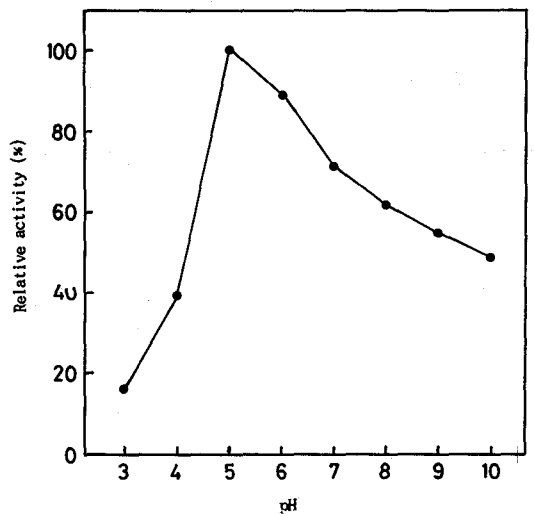


Fig. 3. pH-stability profile of purified peroxidase from the fruit of *Malus sieboldii* (Regel) Rehder.

The enzyme(0.2ml) was preincubated in 1.5ml of 0.1M citrate-0.2M Na₂HPO₄ buffer (pH 3.0 to 7.0) or Britten-Robinson buffer (pH 8.0 to 10) at 4°C for 24 hours, and then enzyme assays were carried out as described in the legend to Fig. 2.

더 산성쪽에서 최대활성을 나타내었다. Peroxidase의 반응최적 pH는 과일이나 채소의 종류에 따라 달라지나, 기질의 종류에 따라서도 다른 결과를 보이기도 하는데, guaiacol과 pyrogallol을 기질로 사용했을 때 토마토 peroxidase²¹⁾의 반응 최적 pH는 각각 5.5, 7.5로 보고되었다.

pH 안전성

각 pH별로 효소액을 4℃에서 24시간 보존한 후 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 본 효소는 pH 5.0에서 최대 잔존활성을 나타냈기에 pH 5.0이 가장 안정한 것으로 생각되며, pH 4.0 이하에서 보다 pH 6.0 이상에서 활성이 서서히 감소된 것은 본 효소가 약산성내지 중성에서 비교적 안정함을 시사하고 있다.

반응 최적온도

각 온도에서 활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 본 효소는 80℃에서 최대활성을 나타내었고, 60℃와 70℃에서는 95%의 상대활성을 나타내었으며, 90℃에서도 85% 이상의 상대활성을 유지하였다. 이 결과는 사과 peroxidase³⁾의 40℃, 밤 peroxidase¹⁴⁾의 50℃보다 월등하게 높았고, 녹두 peroxidase²⁾의 65℃와 비슷하였다.

열안정성

본 효소의 열안정성을 알아보기 위하여 효소액을 각 온도에서 20분간 보존하면서 경시적으로 효소액을 취하여 상대 잔존활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 30℃에서 20분간 보존시 10%의 활성이 감소되었고, 40℃에서는 10분 이상에서부터 활성이 서서히 감소하였으나, 50℃ 이상의 온도에서는 보존 초기부터 활성이 감소되기 시작하여 80℃의 경우 2분만에 70%가 불활성화되었으며, 15분만에 거의 완전히 실활되었다. 이 결과는 녹두²⁾의 peroxidase가 80℃에서 10분간 열처리했을때 대부분 불활성화되었다는 보고와 유사하였고, horseradish peroxidase²³⁾가 135℃에서 1.81분간 열처리했을때 90% 불활성화되었다는 보고보다는 낮았으나, 밤¹⁴⁾과 파파야²²⁾의 peroxidase가 80℃에서 각각 1.73분, 0.83분간 열처리했을때 90% 실활되었다는 보고보다는 약간 높았으며, cauliflower peroxidase²⁴⁾가 55℃에서 5분간 보존한 경우 완전히 불활성화되었다는 보고보다는 열안정성이 높았다.

기질 특이성

H₂O₂의 존재하에서 여러가지 방향족 아민류와

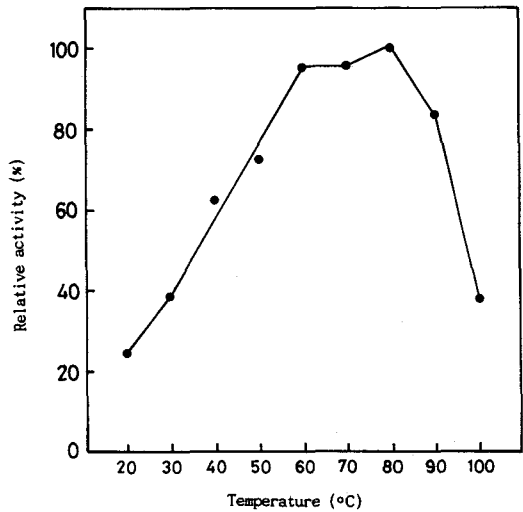


Fig. 4. Temperature-activity profile of purified peroxidase from the fruit of *Malus sieboldii* (Regel) Rehder.

Enzyme assays were carried out as described in the legend to Fig. 2 except pH 4.5 and various temperatures.

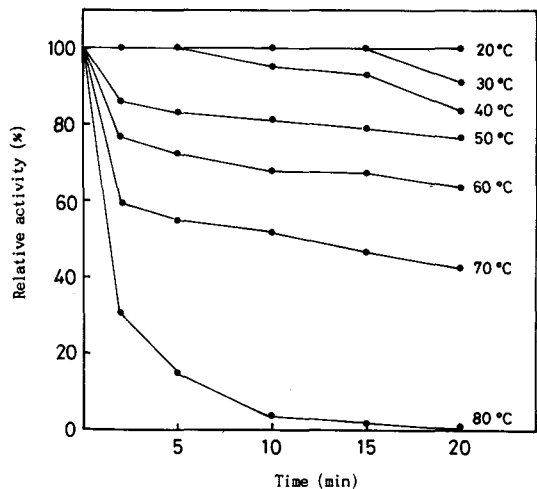


Fig. 5. Temperature-stability profile of purified peroxidase from the fruit of *Malus sieboldii* (Regel) Rehder.

The enzyme (0.7ml) was preincubated at various temperatures for 20 minutes, and then enzyme assays carried out as described in the legend to Fig. 2 except pH 4.5 and 80 °C.

phenol류를 사용하여 기질 특이성을 조사하였다 (Table 2). 방향족 아민류인 OPDA에 뚜렷한 활성을 나타내었으며, phenol류에서는 (+)-catechin, catech-

Table 2. Substrate specificity of peroxidase from the fruit of *Malus sieboldii* (Regel)Rehder

Substrate (10mM)	Relative activity (%)*
Aromatic amine	
OPDA	100.0
Monophenol	
L-tyrosine	0.8
<i>o</i> -Diphenols	
DL-DOPA	1.6
(+)-catechin	4.8
catechol	12.3
<i>p</i> -Diphenols	
hydroquinone	4.8
ferulic acid	0.0
Trihydroxyphenols	
pyrogallol	7.3
gallic acid	3.2

*Enzyme assays were carried out as described in the text

ol, hydroquinone, pyrogallol, gallic acid 등에 약간의 활성을 나타내었으나, 밤 peroxidase¹⁴⁾와는 달리 ferulic acid에서 활성을 나타내지 못했다. 이 결과로부터 아그베 peroxidase는 H₂O₂의 존재하에서 방향족 아민류에 대한 친화력이 높은 효소임이 시사되었다.

기질 농도의 영향

기질로 사용한 OPDA와 H₂O₂의 농도가 효소활성에 미치는 영향을 알기 위하여 OPDA는 30mM H₂O₂를 함유한 반응액 중에서, H₂O₂는 10mM OPDA를 함유한 반응액 중에서 조사하였다. 기질 농도가 증가함에 따라 가수분해율은 전형적인 Michaelis-Menten kinetics의 양식을 보이면서 증가하였으며(미발표 data), Lineweaver-Burk법에 의하여 구한 Km치는 각각 1.65mM, 7.97mM이었다.

저해제의 영향

각종 저해제가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 아그베 peroxidase의 활성은 thiourea 100mM, sodium metabisulfate 100mM에서 100% 저해되었고, thiourea 10mM, L-cysteine 0.1mM, sodium metabisulfate 10mM, KCN 0.1mM에서 각각 50~60% 정도의 활성이 저해되었다. Chelating agent인 EDTA는 100mM의 높은 농도에서도 효소의 활성을 그다지 저해하지 못하였으며, 5mM의 sodium diethyl-dithiocarbamate도 35.9%의 저해만을 나타내었다. 환원제인 L-ascorbic acid와 sodium L-ascorbate는 0.1mM의 낮은 농도에서 60% 정도의 효소활성을 저해하였는데, L-ascorbic acid는 효소 작용

Table 3. Effect of inhibitor on the peroxidase from the fruit of *Malus sieboldii* (Regel) Rehder

Inhibitor	Concentration (mM)	Inhibition (%)
Thiourea	100.0	100.0
	10.00	66.4
	5.00	52.7
	1.00	13.4
Sodium metabisulfate	100.0	100.0
	10.00	86.4
L-Ascorbic acid	1.00	44.9
	0.10	58.0
	0.05	49.2
Sodium L-ascorbate	0.01	29.2
	0.10	62.6
	0.05	30.5
L-Cysteine	0.01	20.3
	10.00	79.4
	1.00	78.0
KCN	0.10	55.8
	0.05	25.8
	1.00	80.9
	0.10	65.7
EDTA	0.01	18.3
	100.00	18.3
	10.00	15.4
Sodium diethyl-dithiocarbamate	1.00	11.7
	5.00	35.9
	1.00	30.1
	0.50	21.2
	0.10	6.9

Table 4. Effect of metal ion on the peroxidase from the fruit of *Malus sieboldii* (Regel) Rehder

Metal ion	Relative activity (%)	
	1mM	5mM
None	100.0	100.0
Na ⁺	78.5	101.1
K ⁺	78.7	103.0
Mg ²⁺	71.1	99.7
Ca ²⁺	60.2	103.0
Fe ²⁺	81.5	—
Ba ²⁺	64.6	43.9
Li ²⁺	59.1	42.0
Hg ²⁺	73.7	38.1
Mn ²⁺	90.3	117.1

— ; not detected.

으로 생성된 quinone류를 다시 *o*-diphenol류로 환원시키는 저해제로 알려져 있다²⁶⁾.

금속이온의 영향

1mM의 농도에서 모든 금속이온들이 효소의 활성

을 저해하였으나, 5mM의 농도에서 Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺은 효소의 활성을 저해하지 않았으며 Li²⁺, Ba²⁺, Hg²⁺만이 활성을 저해하였다. Mn²⁺은 5mM의 농도에서 효소활성을 17.1% 증가시켰다(Table 4). 오 등¹⁰은 Hg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺이 밤 peroxidase의 활성을 촉진함을 보고하였다.

Peroxidase는 식품에 있어 품미 저하의 원인³이기도 하나, 임상 검사용 시약, 효소 면역분석 및 단클론 항체의 스크리닝 분석의 검출용 시약으로서 뿐만 아니라 독성 폐기물 중의 방향족 화합물의 제거에 이용되고 있기도 한다²⁶. 또한 양배추나 고추냉이에서 분리된 peroxidase는 돌연변이원인 Trp-P-1과 Trp-P-2를 산화해서 그들의 돌연변이원성을 실험시키기도 하며, 타액 중에도 peroxidase가 함유되어 있으므로 Trp-P-1등을 함유하는 가열식품, 특히 불고기류는 잘 씹어 먹도록 권해지고 있다²⁷. 본 연구에서 밝혀진 아그배 조추출물 중의 peroxidase함량은 986unit/g 생체량으로 비교적 많은 양이 함유되어 있으며, 그의 효소학적 성질도 약산성내지 중성에서 비교적 안정하고(Fig. 3), 높은 반응 최적온도(Fig. 4)와 비교적 높은 열안정성(Fig. 5)을 나타내어 그의 산업적인 이용 가능성을 예상할 수 있으므로, 이 점에 대해서도 더 깊은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

요 약

아그배로 부터 아세톤 침전, DEAE-cellulose 칼럼 크로마토그래피, Ultro-AcA 54젤여과의 과정을 거쳐 peroxidase를 분리 정제하고, 그의 특성을 조사하였다. 아그배peroxidase의 반응 최적 pH는 4.5, 반응 최적 온도는 80℃이었고, 30℃ 이하의 온도와 pH 5.0에서 안정하였으며, 80℃에서 15분간 보존했을 때 거의 불활성화되었다. OPDA에 높은 활성을 나타내었으나, phenol류 기질에 대해서는 약간의 활성을 나타내었으며, OPDA와 H₂O₂에 대한 Km치는 각각 1.65mM, 7.97mM이었다. 아그배 peroxidase에 대한 저해작용은 L-ascorbic acid와 sodium L-ascorbate가 가장 컸고, 금속이온 중 Mn²⁺만이 5mM 농도에서 효소의 활성을 증가시켰다.

문 헌

1. Saunders, B. C., Sieddle, H. A. C. and Stark,

B. P. : *Peroxidase*, Butterworth, Washington, D. C. (1964)

2. 이상갑, 박우철, 홍종욱 : 녹두에서 peroxidase 등 위 효소들의 분리와 효소적 특성. *한국농화학회지*, **29**, 279(1986)

3. 지완정, 조남숙, 김인철, 박관화, 최언호 : 사과 peroxidase의 분리 및 특성. *한국식품과학회지*, **23**, 442(1991)

4. Morris, H. J. : Application of peroxidase test paper in food processing. *Food Technology*, **22**, 945 (1958)

5. Harrd, N. F. : Physiological roles of peroxidase in postharvest fruit and vegetables. In "*Enzymes in Food and Beverage Processing*" Ory, R. I. and angelos, A. J. (eds.), American Chemical Society, Washington, D. C. (1977)

6. Thomas, R. L. and Jen, J. J. : Preperation of a homogeneous tomato fruit peroxidase. *Prep. Biochem.*, **10**, 581(1980)

7. Grommeck, R. and Markakis, P. : The effect of peroxidase on anthocyanine pigments. *J. Food Sci.*, **29**, 53(1964)

8. Park, I., Kho, S. O. and Nam, I. : Korean-radish peroxidase for enzymatic determination of glucose. *Korean Biochem. J.*, **22**, 411(1989)

9. Kokkinakis, D. M. and Brooks, J. L. : Tomato peroxidase : purification, characterization, and catalytic properties. *Plant Physiol.*, **63**, 93(1979)

10. Weaver, M. L. and Hautala, E. : Study of hydrogen peroxidase, potato enzymes and blackspot. *Am. Potato J.*, **47**, 457(1970)

11. Espelie, K. E. and Kolattukudy, P. E. : Purification and characterization of an abscisic acid inducible anionic peroxidase associated with tuberization in potato. *Arch. Biochem. Biophys.*, **240**, 539(1985)

12. Twohing, F., Moore, D. and Vigil, E. L. : Properties and subcellular distribution of peroxidases of anion stem. *Proc. Indiana Acad. Sci.*, **83**, 86(1973)

13. Moulding, P. H., Sinsleton, D. E., McLellan, K. M. and Robinson, D. S. : Purification and heat stability of cox's apple pulp. *J. Food Sci. Technol.*, **23**, 343 (1988)

14. 오석홍, 김용휘, 이서나 : 밤에 함유된 peroxidase의 정제 및 특성에 관한 연구. *한국식품과학회지*, **19**, 506(1987)

15. Sessa, D. J. and Anderson, R. L. : Soybean peroxidase purification and some properties. *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 960(1981)

16. Wang, S. S. and Dimarco, G. R. : Isolation and characterization of the native, thermally inactivated and regenerated horseradish peroxidase isozymes. *J. Food Sci.*, **37**, 547(1972)

17. Scianclepore, V., Longon, V. and Alviti, F. S. : Partial purification and some properties of

- peroxidase from Malvasia grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 105(1985)
18. Chenchin, E. F. and Yamamoto, H. Y. : Distribution and heat inactivation of peroxidase isozyme in sweet corn. *J. Food Sci.*, **38**, 40(1973)
 19. Lowry, O. H., Rosebrough, A. L., Farr, A. L. and Randall, R. L. : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
 20. Zoueil, M. F. and Esselen, W. B. : Thermal destruction rates and regeneration of peroxidase in green bean and turnips. *Food Res.*, **24**, 119(1959)
 21. Jen, J. J., Seo, A. and Flurkey, W. H. : Tomato peroxidase, Purification via hydrophobic chromatography. *J. Food Sci.*, **45**, 60(1980)
 22. 박관화, 김재욱, 신재두, 노봉수 : Papaya중의 단백질 분해효소와 peroxidase의 불활성화. 한국식품과학회지, **11**, 171(1979)
 23. 박관화, Sthal, R., Srimani, B. N. and Loncin, M. : 110℃ 이상에서의 peroxidase의 열에 의한 불활성화. 한국식품과학회지, **9**, 165(1977)
 24. Lee, C. Y., Pennes, A. P. and Dickson, M. H. : Characterization of the cauliflower peroxidase isozyme. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 18(1984)
 25. Benjamin, N. D. and Montgomery, M. W. : Polyphenol oxidase of royal cherries, a purification and characterization. *J. Food Sci.*, **38**, 799(1973)
 26. 이해익, 박경숙, 최용순, 이상영 : 배추 기원 peroxidase의 정제 및 성질. 산업미생물학회지, **19**, 470(1991)
 27. 下位香代者, 富田 勳 : 食品に含まれる抗變異物質とその試験法. *フードケミカル*, **6**, 59(1990)
(1991년 10월 30일 접수)