

담수어와 해수어의 근원섬유단백질의 열안정성에 관한 연구

신완철[†] · 송재철 · 최석영 · 홍상필*

울산대학교 식품영양학과

*한국식품개발연구원

Studies on the Thermostability of Myofibrillar Proteins from Fresh Water Fish and Sea Water Fish

Wan-Chul Shin[†], Jae-Chul Song, Suck-Young Choe and Sang-Pill Hong*

Dept. of Food and Nutrition, Ulsan University, Ulsan 680-749, Korea

*Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea

Abstract

Myofibrillar proteins were prepared from red muscle and white muscle of fresh water fish and sea water fish, and their thermostabilities and effect of temperature on the myofibrillar ATPase activities were compared. Differences in temperature dependency of myofibrillar ATPase activities were found between two species. Thermodynamic data for inactivation of myofibrillar proteins, such as D value, Z value, ΔH^* , ΔG^* and ΔS^* revealed that thermostabilities of myofibrillar proteins from fresh water fish were higher than those from sea water fish, and that myofibrillar proteins from red muscle were more heat labile than those from white muscle.

Key words: myofibrillar protein, fresh water fish and sea water fish, thermostability

서 론

동물은 체온조절 능력에 따라 크게 항온성 동물과 변온성 동물로 구분될 수 있다. 포유류와 조류는 체온이 외부의 온도와 관계없이 36~42°C의 항온성을 나타내는데 반하여 변온성 동물인 어류, 파충류 및 양서류 등은 체온이 외부의 온도에 따라 변하고 적절한 온도가 유지되는 장소에만 서식하는 온도 선호성을 가지고 있다. 이와 같은 변화는 많은 생리적 및 생화학적 특성이 환경 온도가 변함에 따라 보상적인 차원에서 적응되어 지기 때문인 것으로 보고되고 있다(1-3).

이상과 같이 어류는 다양한 온도적응 형태를 나타내고 있으나 이중 특히 진화적 적응을 나타내는 어류는 일정한 온도 대에서만 서식할 수 있고, 그 온도 대를 벗어난 경우에는 생존 할 수 없는 특정 온도 범위에 대한 온도 적응형태를 나타내는 특징을 가지고 있다. 따라서 어류의 근원섬유단백질의 생물활성은 서식하는 온도에 따라 다르다는 것이 보고되고 있으며, 또한 열안정성도 서식하는 어류의 환경온도가 영향을 주는 것으로 보고되고 있다(4). 그러므로 온도와 함께 주요한 환경인자로서 어류에 영향을 끼치는 영문도 어류의 생존, 성장, 생리학적인 변화 및 근육의 생화학적인 변화에 영향을 줌으로서 각각의 동물체는 주어진 환경 속에서 최적의 생물활성을 유지하도록 짜여진 생물체계를 가질 것으로 예상된다.

대부분의 육제품은 열 가공된 후에 소비되어지는데 가열은 육제품의 조직, 모양, 향미에 변화를 일으키며 식감에 상당한 영향을 준다. 이러한 변화의 대부분은 육단백질의 변형에 의해 서 일어난다. 그런데 근섬유를 구성하는 구조단백질의 경우 어류의 근원섬유단백질이 육상동물의 근원섬유단백질보다 불안정하다고 보고되고(5) 있을 뿐만 아니라 사후 근육에서의 desmin의 봉과 양과 속도도 종들간에 상당히 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(6). 또한 가공 육제품의 보수성과 결합성질에 중요 역할을 하는 myosin(7)과 육의 gel 형성능력은 ordinary muscle과 dark muscle 사이에 현저한 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(8).

따라서 본 연구에서는 담수어인 향어와 해수어인 방어의 white muscle과 red muscle로부터 육제품의 기능에 중요한 역할을 하는 근원섬유단백질을 조제하여 myofibrillar protein ATPase 활성에 대한 온도의존성과 열안정성을 실험함으로써 생육 환경조건이 다른 어류의 근원섬유단백질간에는 어떠한 차이가 있는지에 대하여 알고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서의 실험재료는 울산시 남구 무거동에 위치한 활어시장에서 구입하였다. 담수어로는 향어(Cyprinus carpio, Cy-

*Corresponding author. E-mail: wcshin@mail.ulsan.ac.kr
Phone: 82-52-259-2371, Fax: 82-52-259-2888

prinus carpio nudus) 그리고 해수어로는 방어(Yellow tail, *Seriola quinqueradiata temmink et schlegel*)를 사용하였다. 무게는 양시료 모두 1 kg 정도였고 필요시 수시 구입하였다. 실험 전에 white muscle과 red muscle로 분리하였으며, 지방 및 결체조직 등을 제거한 후 사용하였다.

근원섬유단백질의 조제

Myofibrill의 조제는 Yang의 방법(9)을 약간 변형하여 조제하였다. 시료를 chopping한 후 8배의 0.16 M KCl-0.04 M Tris-HCl(pH 7.5) 용액을 첨가하여 homogenizer(Ace homogenizer, AM-10, Japan)로 7,000 rpm에서 1분간 균질화시킨 후 2,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 침전물에 20배의 0.16 M KCl 용액을 첨가하여 2,000×g에서 10분간 원심분리시키는 과정을 3회 반복하였다. 반복 후 얻은 침전물에 10배의 0.16 M KCl 용액을 첨가한 다음 6 mesh nylon net에서 여과시킨 액을 시료로 사용하였다. Actomyosin의 조제는 Shin의 방법(10)에 따라 조제하였다.

ATPase의 활성 측정

0.25 mg/mL myofibrillar proteins, 1 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM ATP, 25 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)의 혼합액을 30°C의 water bath상에서 5분간 반응시켰다. 반응 5분 후 최종 농도 4% TCA를 첨가하여 ice bath상에서 반응을 정지시켰다. ATPase의 활성은 1 mg의 단백질에 의하여 1분간 유리되는 무기인산(Pi)을 μmole로 표시하였다.

열안정성 실험

단백질의 가열처리는 25 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5), 일정 이온강도, 1 mg/mL 단백질의 혼합액을 30~50°C 범위의 각 온도에서 행하였다. 각 온도에서 일정시간 간격으로 일정 액을 취하여 ice bath상의 ATPase 활성 측정용액에 넣어 가열반응을 정지시킨 후 기질을 첨가하여 30°C 항온조에서 5분간 반응시켜 효소의 잔존활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

근원섬유단백질의 활성에 대한 기질농도의 영향

근원섬유 구성단백질들은 근육 내에서 ATP와 무기이온들과 상호 작용하여 화학적 energy를 기계적 energy로 효율적으로 전환시켜 주고 있는데, 근육 운동의 조절 기작에 관한 연구는 Ebashi 등(11)의 Sr을 이용한 Ca binding protein인 tropinin의 규명과 함께 *in vivo* system에서의 근수축 조절물질로서 Ca의 조절기능이 밝혀짐으로써 Ca과 tropinin complex, actin, myosin, tropomyosin 등 근원섬유단백질의 상호작용에 의한 근수축-이온의 분자론적인 기작을 이해하는 것이 가능하게 되었다. 따라서 myofibril과 actomyosin의 Ca-ATPase활성은 근육운동 속도의 차이(12,13) 또는 sarcoplasmic reticulum에서의 Ca이온 축적 능력 등(14) 생물학적 기능의 차이를 반영함으로 담수어인 향어와 해수어인 방어의 myofibrillar protein ATPase에 대한 기질 친화성과 반응속

도를 비교하였다.

향어와 방어의 근원섬유단백질의 Ca-activated ATPase의 기질친화도와 V_{max}값을 Table 1에 나타내었다.

향어의 경우 V_{max}값에 있어서는 myofibril과 actomyosin 둘다 비슷한 값을 나타내 큰 차이를 보이지 않으나 기질친화도에 있어서는 myofibril이 actomyosin에 비해 상당히 큰 것으로 나타났다. 그리고 myofibril과 actomyosin 둘 다 white muscle이 red muscle보다 높은 기질친화도와 V_{max}값을 갖는 것으로 나타났다. 한편 해수어인 방어의 경우에 있어서도 myofibril이 actomyosin보다 높은 기질친화도를 나타내었으나 향어에 비해서는 미약하였으며 향어와는 달리 myofibril, actomyosin 둘 다 기질친화도에 있어서는 red muscle이 white muscle보다 높게 나타났다. 그리고 담수어인 향어에 비해 myofibril, actomyosin 둘 다 낮은 기질친화도와 V_{max}값을 나타내었는데 이와 같은 결과는 향어의 ATPase 활성이 방어의 ATPase 활성보다 높다고 보고한 전보(15)의 결과와 일치하는 것이었다. 따라서 겨울과 여름간에 수온의 차가 크며 염이 없는 담수에서 서식하는 향어와 수온차가 비교적 적고 염농도가 높은 해수에서 서식하는 방어간에는 환경적 여건에 의해서 근원섬유단백질간에 차이가 조성될 수 있을 것으로 보이며, 이에 따라 담수어와 해수어의 구성 근원섬유단백질간에는 생물학적인 차이를 나타낼 것으로 예상되었다.

근원섬유단백질의 ATPase 활성에 미치는 반응온도의 영향

육의 기능적 그리고 조직적 특성은 주로 근원섬유단백질에 달렸는데 이는 collagen함량 때문에 포유류보다 어류의 근육에서 더욱 중요한 것으로 보고되고 있고(16) 특히, 근원섬유단백질은 고도로 조직화된 근육의 구조를 갖고 있으며, 생세포의 수축을 위해 그리고 식품으로서의 고기의 질에 중요 역할을 하는 것(17)으로 밝혀지고 있다. 그런데 어류의 근원섬유단백질들은 육류의 red muscle의 근원섬유단백질보다도 불안정하며(18), 생물활성은 서식하는 온도에 따라 달라지는 것으로 보고되고 있고(19), 그리고 생체기능 단백질의 열안정성과 서식온도간에도 중요한 상관성이 있는 것으로 알려지고 있다(5). 따라서 담수어와 해수어의 근원섬유단백질간에도 염의 유무 및 생활온도 등의 환경적 요인이 다르므로 반응온도에 따라 근원섬유단백질의 ATPase 활성이 차이를 나타낼 것으로 사료되어

Table 1. Michaelis-Menten constants and maximum velocity of myofibrillar protein from leather carp and yellow tail muscle

Myofibrillar protein ¹⁾	Leather carp		Yellow tail	
	V _{max} (μM/min)	K _m (M)	V _{max} (μM/min)	K _m (M)
MF	white	0.70	6.81×10^{-3}	0.23
	red	0.58	4.67×10^{-3}	0.25
AM	white	0.61	0.60×10^{-3}	0.27
	red	0.53	0.45×10^{-3}	0.22

¹⁾MF: myofibril; AM: actomyosin.

myofibril과 actomyosin의 ATPase 활성에 대한 반응온도의 영향을 조사하였다.

Fig. 1과 Fig. 2는 담수어인 향어의 white muscle과 red muscle의 actomyosin ATPase에 의한 무기인산의 생성량을 반응온도에 따라 시간별로 나타낸 것이다. Fig. 1의 white muscle의 경우 30°C, 35°C, 40°C에서의 반응의 경우 7~10분까지는 반응

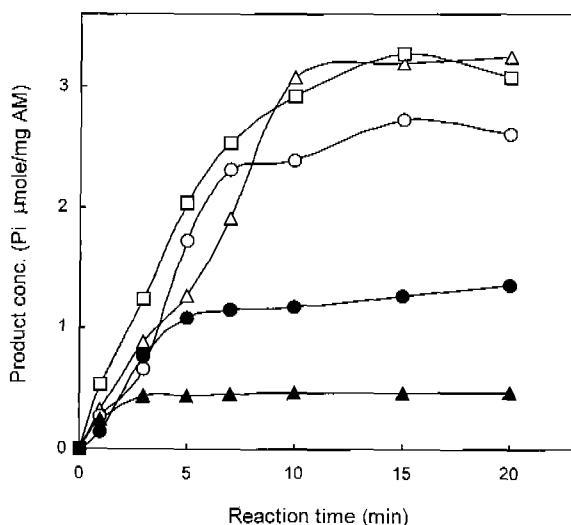


Fig. 1. Production of inorganic phosphate by actomyosin ATPase from leather carp white muscle as a function of time at various temperature.

Enz. assay : 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.1 M KCl, 10 mM CaCl₂, 1 mM ATP, 0.25 mg/mL AM.
Reaction temp. : 30°C (—○—), 35°C (—△—), 40°C (—□—), 45°C (—●—), 50°C (—▲—).

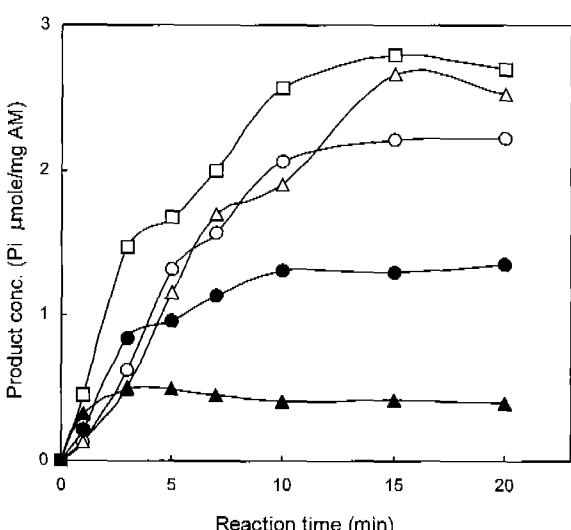


Fig. 2. Production of inorganic phosphate by actomyosin ATPase from leather carp red muscle as a function of time at various temperature.

Enz. assay : 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.1 M KCl, 10 mM CaCl₂, 1 mM ATP, 0.25 mg/mL AM.
Reaction temp. : 30°C (—○—), 35°C (—△—), 40°C (—□—), 45°C (—●—), 50°C (—▲—).

시간이 증가함에 따라 반응생성물이 급격히 증가하여 10~15분에서 거의 최대생성을 나타냈으며, 45°C와 50°C에서의 반응의 경우는 3~5분에서 최대생성을 나타냄과 동시에 반응생성물도 상당히 낮아 45°C의 경우에는 35°C, 40°C에 비해 약 1/3, 그리고 50°C의 경우는 45°C의 반응으로 나타났다. 반응온도 40°C까지는 반응생성물이 반응시간에 따라 증가하는 현상을 나타냈으나 45°C와 50°C에서는 반응시간에 따른 증가현상을 보이지 않았다. 이와 같은 현상은 단지 각 온도에서 반응시간에 따라 활성의 크기에 차이만 있었으며 Fig. 2의 red muscle에서도 같은 현상을 나타내었다.

해수어인 방어의 actomyosin의 경우에 있어서도(Fig. 3, 4) 담수어인 향어의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 단지 향어에 비해 낮은 활성과 향어 actomyosin의 경우 40°C까지는 반응시간에 따라 활성이 증가하는 현상을 나타냈으나, 방어 actomyosin은 40°C의 반응온도에서도 반응시간에 따라 거의 45°C, 50°C와 같은 수준의 반응생성물을 나타냄으로써 담수어인 향어와는 반응온도의 의존성에 차이를 나타내었다. 이는 다른 어종간의 myosin의 안정성은 어류가 사는 주위환경의 온도와 관련이 있다고 한 Howell 등(20)의 연구결과로 미루어 주위환경의 온도와 더불어 염분으로 인하여 생길 수 있는 대사의 차이 때문인 것으로 사료된다.

근원섬유단백질의 열안정성에 대한 온도의 영향

Johnston과 Goldspink(1)는 어류 근원섬유단백질의 활성에 대한 온도의존성의 연구로부터 어류 근원섬유단백질의 열안정성은 어류의 서식온도 순위로 나타난다고 하였다. 이와 유사한 결과를 Tsuchimoto 등(3)도 보고한 바 있으며 또한 Yang

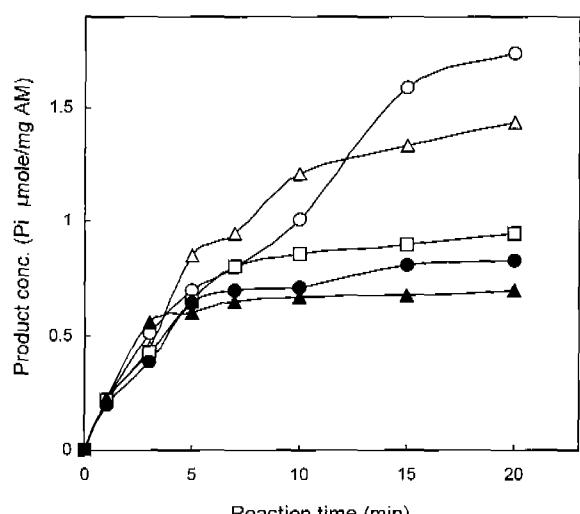


Fig. 3. Production of inorganic phosphate by actomyosin ATPase from yellow tail white muscle as a function of time at various temperature.

Enz. assay : 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.1 M KCl, 10 mM CaCl₂, 1 mM ATP, 0.25 mg/mL AM.
Reaction temp. : 30°C (—○—), 35°C (—△—), 40°C (—□—), 45°C (—●—), 50°C (—▲—).

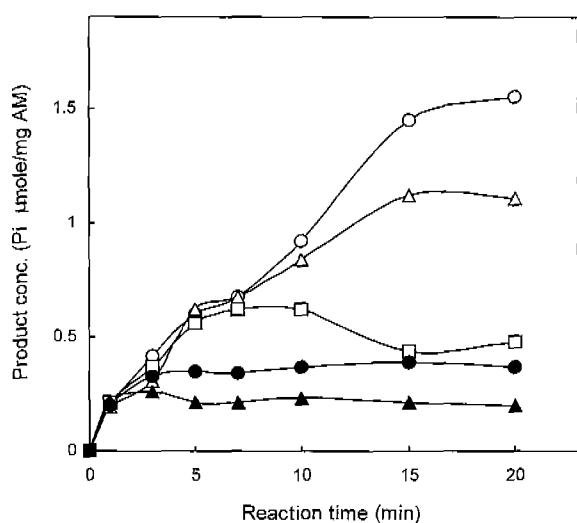


Fig. 4. Production of inorganic phosphate by actomyosin ATPase from yellow tail red muscle as a function of time at various temperature.

Enz. assay : 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.1 M KCl 10 mM CaCl₂, 1 mM ATP, 0.25 mg/mL AM.
Reaction temp. : 30°C (—○—), 35°C (—△—), 40°C (—□—), 45°C (—●—), 50°C (—▲—).

등(21)이 한류성어류와 난류성어류의 근원섬유단백질의 열안정성이 어류의 환경온도에 따라 명확한 차이를 나타낸다고 하였다. 따라서 해수어의 경우 염분이 어류의 생존, 성장 그리고 번식하는데 필요하므로 어류의 생리학적인 변화 이외에도 근육의 생화학적인 변화에도 기여할 가능성이 높으므로 향어와 방어간에도 열안정성에 차이를 보일 것으로 사료되었다.

Fig. 5와 6은 향어와 방어의 근원섬유단백질들의 변성속도의 의존성을 나타낸 Arrhenius plot로 이에 해당하는 열역학량을 Table 2에 나타내었다.

Fig. 5의 결과를 보면 담수어인 향어와 해수어인 방어의 경우 둘 다 각각 white muscle과 red muscle이 온도에 의존하는 유사한 경향의 변성속도를 나타내고 있으며, 또한 red muscle이 white muscle에 비해 낮은 열안정성을 나타내는 공통적인 현상을 보이고 있는데 이는 육상동물의 근원섬유단백질의 경우 white muscle보다 red muscle보다 높은 열안정성을 나타낸다. 고 한 Yang 등(21)의 보고와도 일치하는 결과이다. 또한 이러한 결과는 Fig. 6에 나타난 향어의 myofibril Ca-ATPase의

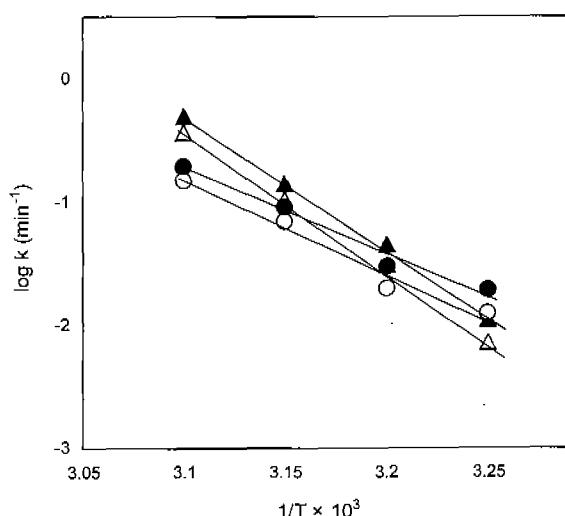


Fig. 5. Arrhenius plot of the effect of temperature on the rate of inactivation of actomyosin from leather carp (○, ●) and yellow tail (△, ▲) muscle.
(-○-, -△-) : white muscle, (-●-, -▲-) : red muscle.

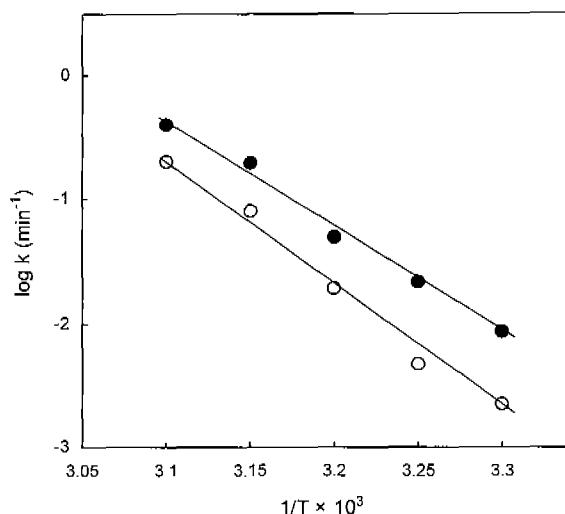


Fig. 6. Arrhenius plot of the effect of temperature on the rate of inactivation of myofibril from leather carp white (—○—) and red (—●—) muscle.

열안정성에서 보다 확실하게 확인되어졌다.

향어와 방어 actomyosin의 열안정성의 경우 Fig. 5와 Table

Table 2. D, Z-value and thermodynamic data for inactivation of myofibrillar protein from leather carp and yellow tail muscle

	Leather carp	MF ¹⁾	D (min)					Z (°C)	Ea (cal/M)	ΔH^\ddagger (cal/M)	ΔG^\ddagger (cal/M)	ΔS^\ddagger (cal/M/K)	
			30	35	40	45	50 (°C)						
Yellow tail	Leather carp	white	404	377	129	28	12	8.90	46,980	50,631	23,400	87	
		red	274	128	46	12	7	11.57	39,348	38,726	22,395	53	
	Yellow tail	AM ²⁾	white	-	256	153	25	15	11.29	40,673	40,051	23,485	53
		red	-	171	115	23	12	12.29	36,258	35,636	23,218	40	
	Yellow tail	AM	white	-	320	74	22	6	8.31	51,459	53,049	22,433	98
		red	-	209	51	18	5	8.62	49,174	51,061	22,831	90	

^{1,2)}See footnote of Table 1.

2에서 보는 바와 같이 둘 다 35°C 이하에서는 비교적 안정하나 40°C 이상으로 온도가 올라감에 따라 급격히 변성속도가 높아지는 것으로 나타났다. 이러한 온도에 따른 변성속도가 향어에 비해 방어가 상당히 높게 나타나는 것으로 보아 담수어인 향어의 근원섬유단백질이 해수어인 방어의 근원섬유단백질 보다는 비교적 열안정성이 높음을 알 수 있었다. 하지만 이러한 결과들이 근원섬유단백질과 기질간에 형성되는 weak bond의 차로 인한 것인지 또는 근원섬유단백질의 치밀도에 따른 구조적인 차로 인한 것인지는 좀더 연구가 되어야 할 것이다.

요 약

담수어인 향어와 해수어인 방어의 white muscle과 red muscle로부터 근원섬유단백질을 조제하여 생육 환경조건이 다른 어류의 근원섬유단백질간에는 어떠한 차이가 있는지에 대하여 알고자 myofibrillar protein ATPase 활성에 대한 온도의존성과 열안정성을 실험하였다. 향어와 방어 근원섬유단백질의 기질친화도와 V_{max} 값에 있어서는 향어가 방어에 비해 높은 값을 보였고, 활성에 대한 반응온도 및 반응시간에 따른 영향에 있어서는 myofibril의 경우 red muscle이 white muscle에 비해 낮은 활성을 나타냈으며, actomyosin의 경우에 있어서는 향어가 40°C에서도 활성증가를 나타낸 반면에 방어는 45°C, 50°C와 같이 반응시간에 따른 활성증가를 나타내지 않았다. 그리고 일반적으로 향어가 방어보다 그리고 white muscle이 red muscle에 비해 높은 반응생성물을 나타내었다. 열안정성에 대한 열역학량(D value, Z value, ΔH° , ΔG° , ΔS°)은 muscle 종류간 그리고 환경이 다른 어종간에 차이를 보였다. 향어와 방어 둘 다 white muscle이 red muscle에 비해 안정하였으며, 향어 myofibrillar protein이 방어 myofibrillar protein보다 열에 안정한 값을 보여 환경조건이 열안정성에 차이를 줄 수 있는 것으로 나타났다.

문 현

- Johnston, I.A. and Goldspink, G.: Thermodynamic activation parameters of fish myofibrillar ATPase enzyme and evolution to temperature. *Nature*, **257**, 620-623 (1975)
- Hashimoto, A. and Matsura, M.: Biochemistry of myosin and myofibrillar proteins of fish skeletal muscle. *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, **34**, 1279-1288 (1989)
- Tsuchimoto, M., Tanaka, N., Uesugi, Y., Misima, M., Tachibana, K., Yada, S., Senta, T. and Yasuda, M.: The influence of rearing water temperature on the relative thermostability of myofibrillar Ca-ATPase and on the lowering speed of freshness in carp. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **54**, 117-123

(1988)

- Hong, S.P.: Studies on the environmental temperature adaptation of fish muscle contractile proteins. *Ph.D. Dissertation*, Yonsei University (1992)
- Connel, J.J.: The relative stabilities of the skeletal muscle myosin of some animals. *Biochemical J.*, **80**, 503-509 (1969)
- Verrez-Bagnis, V., Noel, J., Sautereau, C. and Fleurence, J.: Desmin degradation in postmortem fish muscle. *J. Food Sci.*, **64**, 240-242 (1999)
- Jun-Ichiro, M. and Tomohiro, O.: Role of light chains in heat-induced gelation of skeletal muscle myosin. *J. Food Sci.*, **56**, 855-856 (1991)
- Jeng-Ren, L., Yoshinori, M., Yuji, N., Munehiko, T., Naomichi, I. and Takeshi, T.: Thermal transitions of myosins/fragments from black marlin (*Makira mazara*) ordinary and dark muscles. *J. Food Sci.*, **56**, 954-957 (1991)
- Yang, R., Okitani, A. and Fugimaki, M.: Postmortem changes in regulatory protein of rabbit muscle. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 555-562 (1978)
- Shin, W.C.: Studies on the species-characteristics and thermostability of myofibrillar protein. *Ph.D. Dissertation*, Yonsei University (1985)
- Ebashi, S., Kodama, A., and Ebashi, F.: Troponin, I. Preparation and physiological function. *J. Biochem.*, **64**, 465-477 (1968)
- Cassens, R.G. and Cooper, C.C.: Red and white muscle. In *Advance in Food Research*, Academic Press, New York, Vol. 19, p.1 (1971)
- Reis, D.J., Moorhead, D. and Wooster, G.F.: Differential regulation of blood flow to red and white muscle in sleep and defense behavior. *Amer. J. Physiol.*, **217**, 541-545 (1969)
- Watabe, S., Ushio, H., Iwamoto, M., Yamanaka, H. and Hashimoto, K.: Temperature-depending of rigor mortis of fish muscle; Myofibrillar Mg²⁺-ATPase activity and Ca²⁺ uptake by sarcoplasmic reticulum. *J. Food Sci.*, **54**, 1107-1110 (1989)
- Shin, W.C., Song, J.C., Hong, S.P. and Kim, Y.H.: Comparison of biochemical characteristics of myofibrillar protein from fresh water fish and sea water fish. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 292-298 (1999)
- Brown, W.D.: Fish muscle as food. In *Muscle as Food*, Bechtel, P.J. (ed.), Academic Press, Orlando, FL., Ch. 10, p.408 (1986)
- Ropson, R.M., Huiatt, T.W. and Parrish, F.C.: Biochemical and structural properties of titin, nebulin and intermediate filaments in muscle. Reciprocal meat conference proceedings, Vol. 44, p.1-5 (1991)
- Macdonald, G.A. and Lanier, T.C.: Actomyosin stabilization to freeze-thaw and heat denaturation by lactate salts. *J. Food Sci.*, **59**, 101-105 (1994)
- Shin, W.C., Song, J.C., Hong, S.P. and Yang, R.: Study on the temperature adaptation of contractile proteins from fish species. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **20**, 371-379 (1988)
- Howell, B.K., Matthew, A.D. and Donnelly, A.P.: Thermostability of fish myofibrils: a differential scanning colorimetric study. *I. J. Food Sci. Technol.*, **26**, 283-295 (1991)
- Yang, R., Hong, S.P., Shin, W.C. and Song, J.C.: Studies on the thermostability of contractile myofibrillar proteins from fish species. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **20**, 862-867 (1988)

(2001년 5월 24일 접수)