

Bifidobacterium longum KCTC 3215에 의한 β -Galactosidase의 생산·정제 및 특성

강국희* · 민해기 · 이호근 · 장영호

성균관대학교 농과대학 낙농학과

Production, Purification and Characterization of β -Galactosidase from *Bifidobacterium longum* KCTC 3215

Kang, Kook-Hee*, Hae-Ki Min, Ho-Keun Yi and Young-Hyo Jang

Department of Dairy Science, College of Agriculture, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

Abstract — β -Galactosidase of *Bifidobacterium longum* KCTC 3215 was studied on the production, purification, and characterization. Optimum conditions for the enzyme production were in the medium of 1.0% lactose as carbon source, initial pH 7.0 and in 17 hours of cultivation at 37°C. The enzyme was purified 9.25 folds by protamine sulfate precipitation, ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography and Sephadex G-150 gel filtration. The maximal β -galactosidase activity was observed at pH 6.5 and at the temperature of 40°C. This enzyme was stable at pH 6.0~8.5. Metal ions such as Ca^{2+} and Co^{2+} , 2-mercaptoethanol, cysteine, and glutathione stimulated β -galactosidase activity. The enzyme activity was inhibited by addition of Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cs^{1+} , Li^{1+} , DETA, galactose, and ρ -chloromercuribenzoic acid. The kinetics of *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside and lactose were $K_m=1.66$ mM, $V_{max}=0.30$ mM/min·mg·protein and $K_m=3.18$ mM, $V_{max}=0.42$ mM/min·mg·protein, respectively. The molecular weight of native enzyme was about 360,000 dalton and the enzyme consisted of 2 identical subunits with a molecular weight of 180,000.

β -Galactosidase는 lactose를 glucose와 galactose로 분해하므로써 유당 소화장애의 개선, 농축 유제품과 냉동 유제품에서 유당 결정화 현상을 감소시켜 유제품의 품질을 향상시키는데 이용되고 있다(1, 2). 지금까지의 β -galactosidase는 대부분 효모, 세균, 곰팡이로부터 생산된 것이며(3), 이 효소의 생산 및 특성에 관한 연구가 계속되고 있다(4-6). 그러나 장내 유익한 세균으로 주목받고 있는 *Bifidobacterium*의 β -galactosidase에 관한 연구는 아직 그 보고된 것이 적다. 최근에 와서 이 균의 β -galactosidase에 대한 연구가 약간 보고되었다(7, 8). 따라서 본 연구는 *Bifidobacterium longum* KCTC 3215로부터 생산되는 β -galactosidase의 생성조건, 정제, 이화학적 및 효소학

적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

시험균주는 성균관대학교 낙농학과 미생물연구실에서 보존 중인 *Bifidobacterium longum* KCTC 3215를 사용하였다. Modified Rogosa's medium이 *Bif. longum* KCTC 3215의 β -galactosidase 생산을 위한 최적배지로 인정되어 본 실험에 사용하였으며, 시험용 배지에 10^7 /ml 균액을 접종하여 37°C에서 17시간 배양하였다. 배양이 끝난 배양액을 4°C로 급냉하고 Klett-Summerson Calorimeter(Red filter)를 이용하여 흡광도를 균체의 증식으로 나타내었다.

Key words: *Bifidobacterium longum*, β -galactosidase

*Corresponding autor

조효소액의 조제

배양이 끝난 후 배양액을 4°C로 급냉하고 저온(4°C)에서 7,000 rpm, 20분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 용액으로 세척하였다. 미리 냉각된 세포마쇄용 aluminum oxide(Junsei chemical Co., Ltd)를 균체무게에 대해 15:1 비율로 가하여 유발에 갈아서 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁시켜 10,000 rpm, 30분간 원심분리하여 분리된 상등액을 본 실험의 균체내 조효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정

효소의 활성은 Lederberg(9)의 방법에 따라 *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG, Sigma Chemical Co., Ltd)를 기질로 하여 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 ONPG를 5 mM이 되도록 용해한 기질 용액 2 ml를 37°C에서 이온화시킨 후, 적절히 희석한 효소액 0.5 ml를 가하여 37°C, 10분간 반응 후 냉각된 0.5 M Na₂CO₃ 용액 2.5 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음, 발색된 황색의 흡광도를 420 nm에서 측정하였으며, 효소의 활성은 ONP(*o*-nitrophenol) 표준곡선으로부터 산출하였다. 효소활성의 단위는 상기 조건에서 1분 동안에 1 μ mole의 *o*-nitrophenol을 유리시키는데 필요한 효소량을 1 unit로 하였다.

효소의 정제

조효소액을 ammonium sulfate 분획, protamine sulfate 처리에 의한 핵산 제거, DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography, Sephadex G-150 gel filtration 단계로 정제하였다.

분자량의 측정

효소정제 과정 중 효소단백질의 전기영동은 7.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 Laemmli(10)의 방법에 준하여 실시하였다. 효소의 분자량측정은 Whitaker(11), Weber와 Osborn(12)의 방법에 의하여 실시하였으며, 표준물질의 이동도와 분자량의 표준곡선으로부터 시료의 분자량을 산출하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 등(13)의 방법에 따라 측정하여 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., Ltd)을 표준단백질로 하여 정량하였다.

결과 및 고찰

효소생산에 대한 탄소원의 영향

각종 탄소원을 기본배지에 대해서 0.5%(W/V)씩 첨가한 후 배양액의 최종 pH와 효소활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다. Lactose를 탄소원으로 사용했을 때가 126.14 unit/ml로 가장 높았으며, glucose, galactose 첨가시는 lactose에 비해 17.34%, 88.71%로 나타났다. Citti 등(14)은 *Str. lactis*의 경우 galactose가 lactose보다 효과적이지는 못하지만 β -galactosidase의 유도물질이 될 수 있다고 하였다. Lactose의 첨가농도를 0.5~3.0% 범위로 하여 균체증식 및 효소활성을 조사한 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 균체증식은 1.5% 농도에서 가장 높았으나, 효소활성은 1.0%에서 가장 높게 나타났다.

효소생산에 대한 pH 및 배양온도의 영향

본 균주의 효소생산 및 균체증식에 최적배지의 초기 pH 결정을 위한 실험결과는 Fig. 2와 같다. 균체증식은 pH 7.0~8.0 사이의 범위에서 높게 나타났으며 효소의 최대활성은 초기 pH 7.0이었다. 배양온도가 효소생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다. 균체증식과 효소생산은 37°C에서 가장 좋았으며, 그보다 상승하면 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 1. Effect of carbon sources on production of β -galactosidase by *Bif. longum* KCTC 3215

Carbon source	Final pH	Enzyme activity (unit/ml)	Relative activity (%)
Control	6.90	0.00	0.00
Glucose	5.10	21.87	17.34
Galactose	5.16	111.89	88.71
Fructose	5.10	97.96	77.66
Lactose	5.18	126.14	100.00
Sucrose	6.43	49.47	39.22
Arabinose	6.40	24.37	19.32
Raffinose	6.28	67.37	53.41

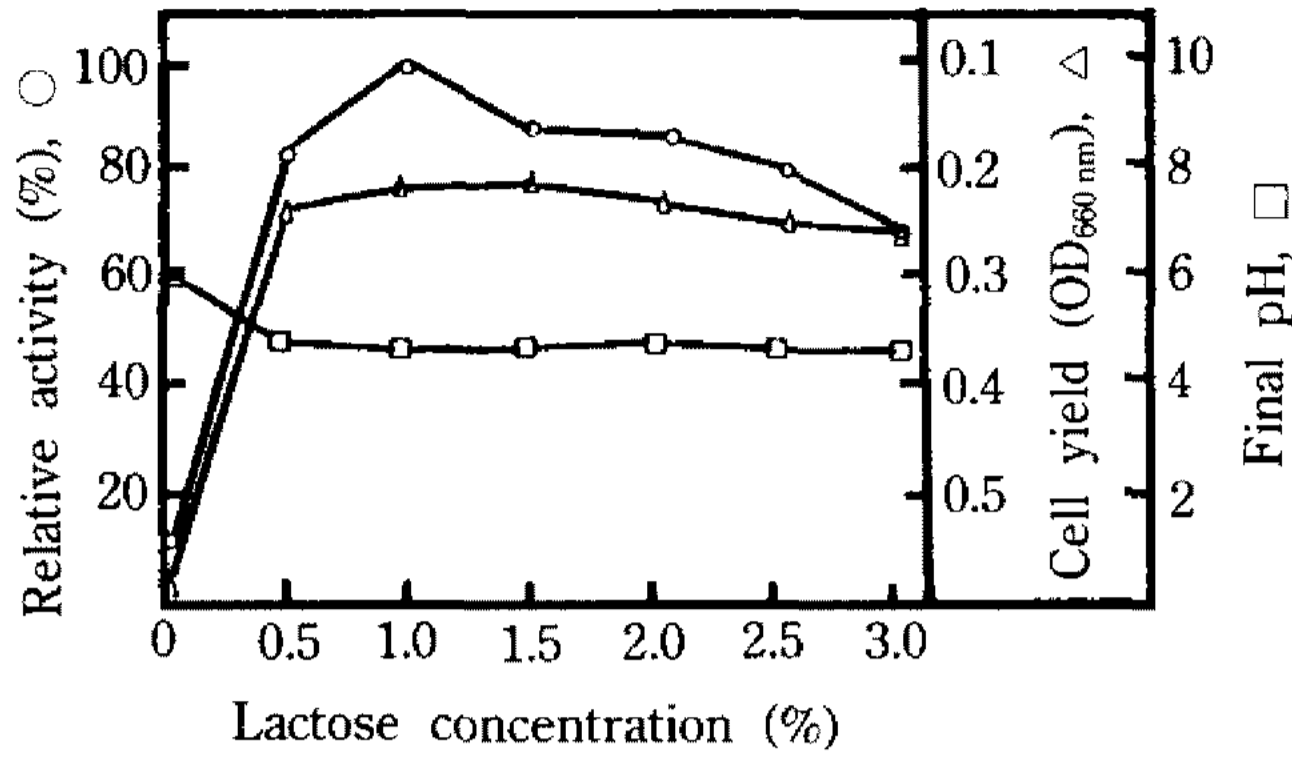


Fig. 1. Effect of lactose concentration on production of β -galactosidase by *Bif. longum* KCTC 3215.

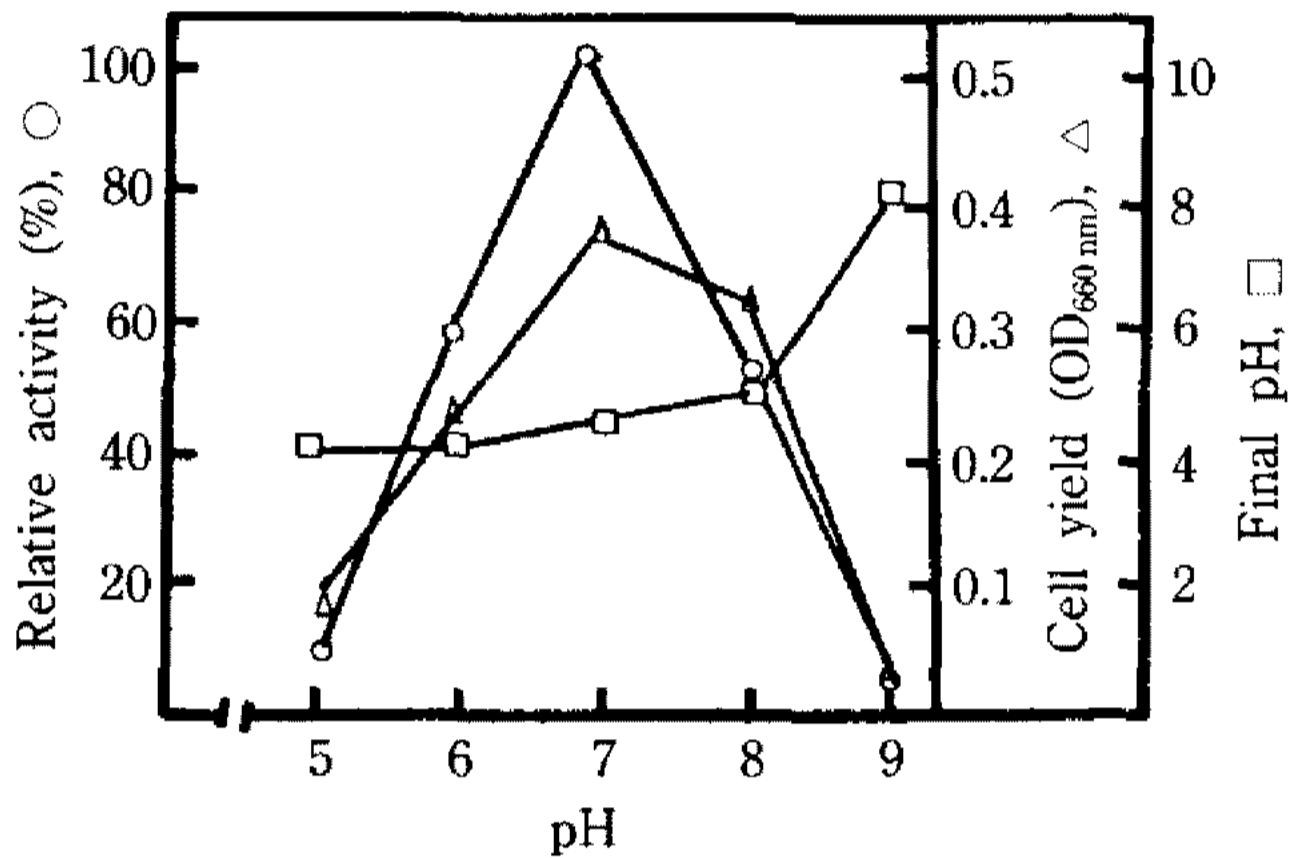


Fig. 2. Effect of initial pH of medium on production of β -galactosidase by *Bif. longum* KCTC 3215.

효소생산에 대한 배양시간의 영향

본 균주에 의한 β -galactosidase의 생성은 배양온도 37°C에서 23시간 동안 배양하면서 배양시간에 따른 균체증식과 효소활성 변화를 측정하여 Fig. 4와 같다. 배양 후 17시간이 경과하였을 때 효소의 활성이 가장 높았으며 그 이후부터는 효소활성이 감소하였다. 본 실험에 사용된 혐기성균인 *Bif. longum* KCTC 3215의 β -galactosidase는 Mahoney 등(15)과 Kang과 Park(6)이 보고한 *Str. thermophilus*의 β -galactosidase 생성조건과 유사하였다. 따라서 대수기 후반인 배양 17시간 후에 균체증식을 정지시킴으로써 최대 활성을 유지시킬 수 있었다.

효소의 정제

Ammonium sulfate fractionation : 조효소액에 고형 ammonium sulfate를 70% 농도로 포화시키고 4°C, 3시간 정치한 후 원심분리하여 침전된 효소단백질을 분획하여 소량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시킨 후 잔존하는 ammonium sul-

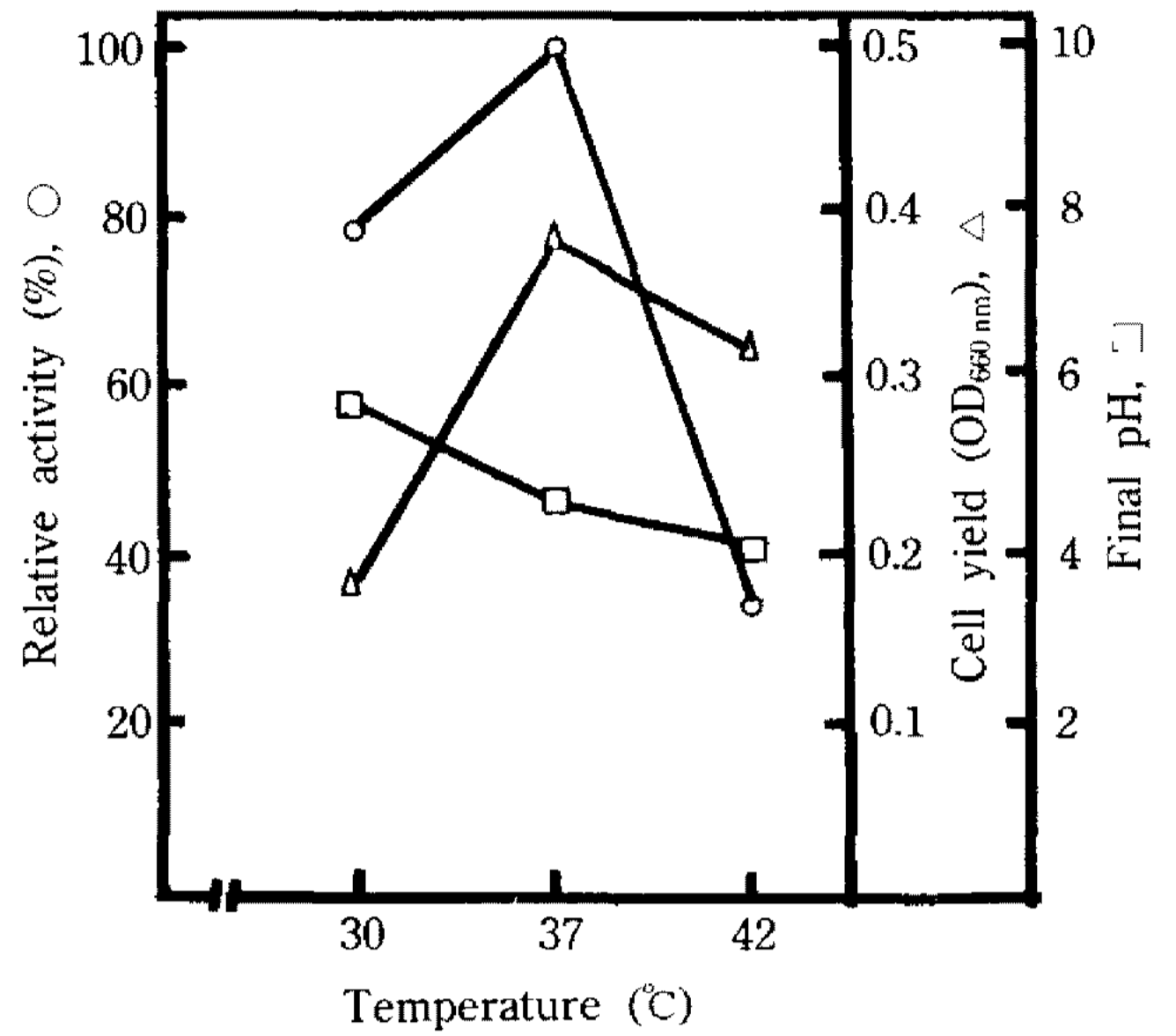


Fig. 3. Effect of incubation temperature on production of β -galactosidase by *Bif. longum* KCTC 3215.

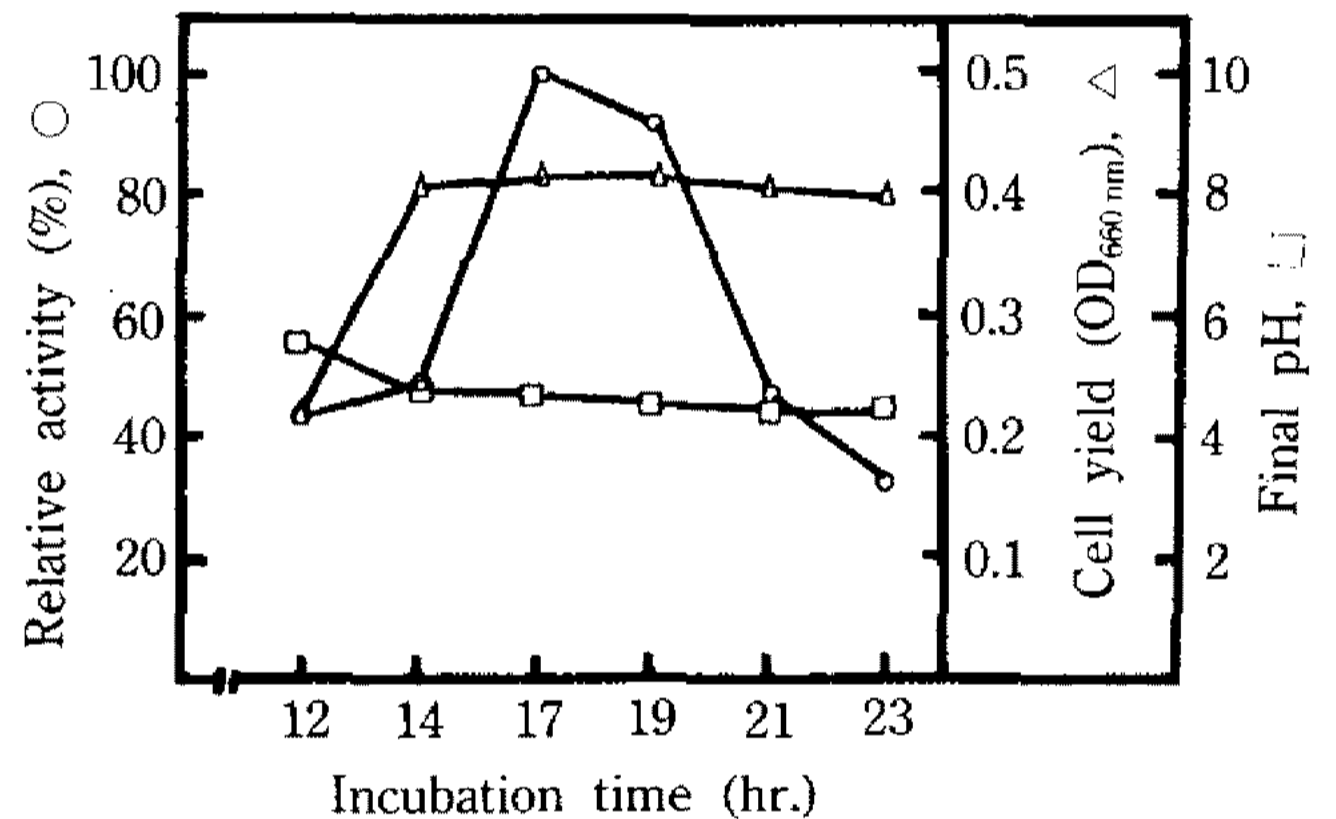


Fig. 4. Effect of incubation time on production of β -galactosidase by *Bif. longum* KCTC 3215.

fate를 제거하기 위하여 4°C에서 투석하였다.

Protamine sulfate에 의한 핵산제거 : Ammonium sulfate 처리가 끝난 시료에 1%의 protamine sulfate 용액을 첨가하여 4°C, 30분간 방치한 후 원심분리하여 침전된 핵산을 제거하였다. 첨가하는 protamine sulfate의 양은 시료의 단백질 1 mg당 0.15 mg이 되도록 첨가하였다.

DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography : 핵산을 제거한 효소액을 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 평형시킨 DEAE-Sephadex A-50 column (3.3×25 cm)에 흡착시켰다. 흡착된 효소는 0~1.0 M NaCl gradient로 시간당 20 ml의 유속으로 용출하여 tube당 3 ml씩 분획하고, #57-79의 활성분획을 얻었다(Fig. 5). Sephadex A-50 ion exchange chromatography를 통과시킨 결과 효소의

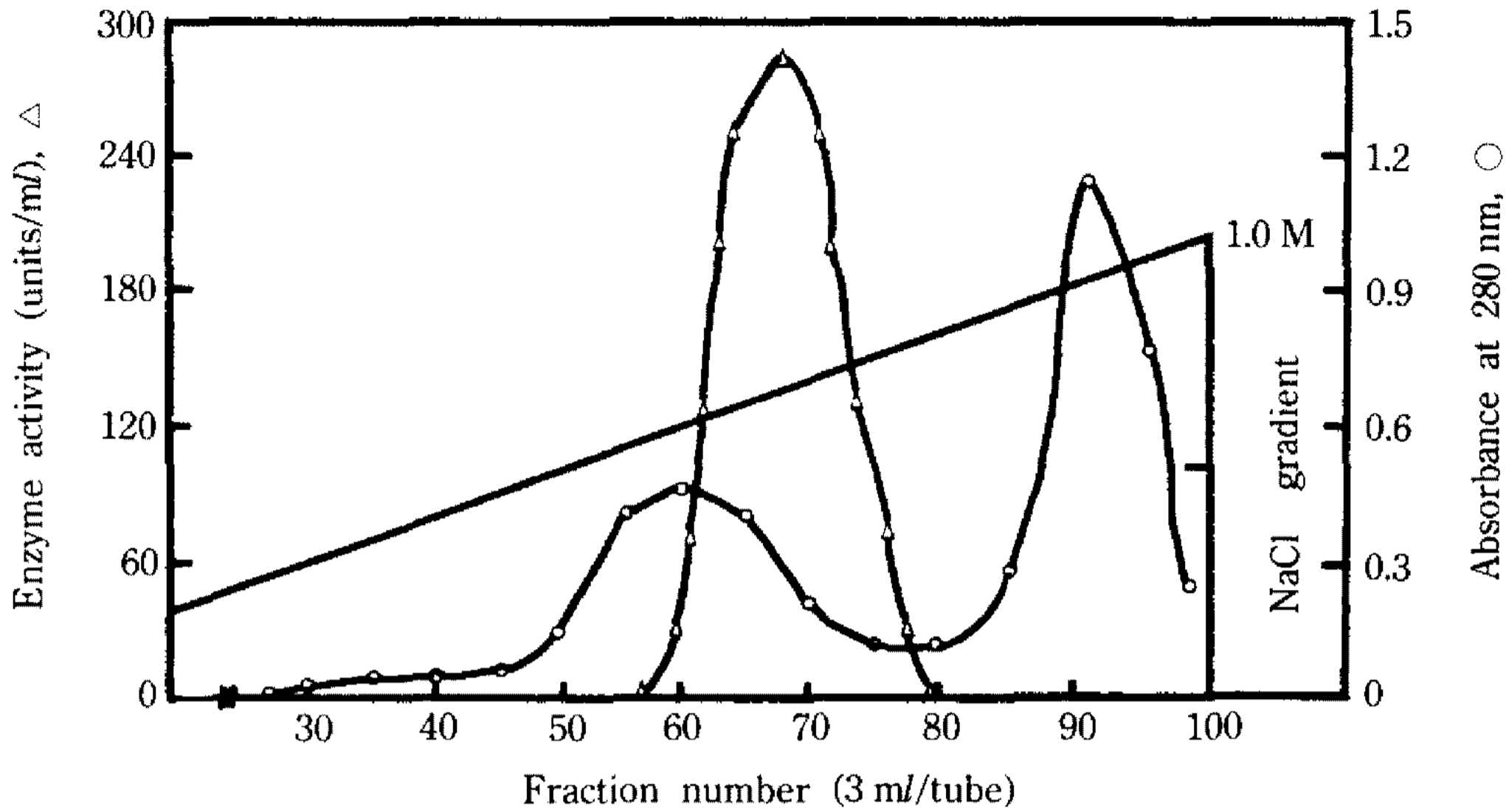


Fig. 5. DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatogram of β -galactosidase of *Bif. longum* KCTC 3215.

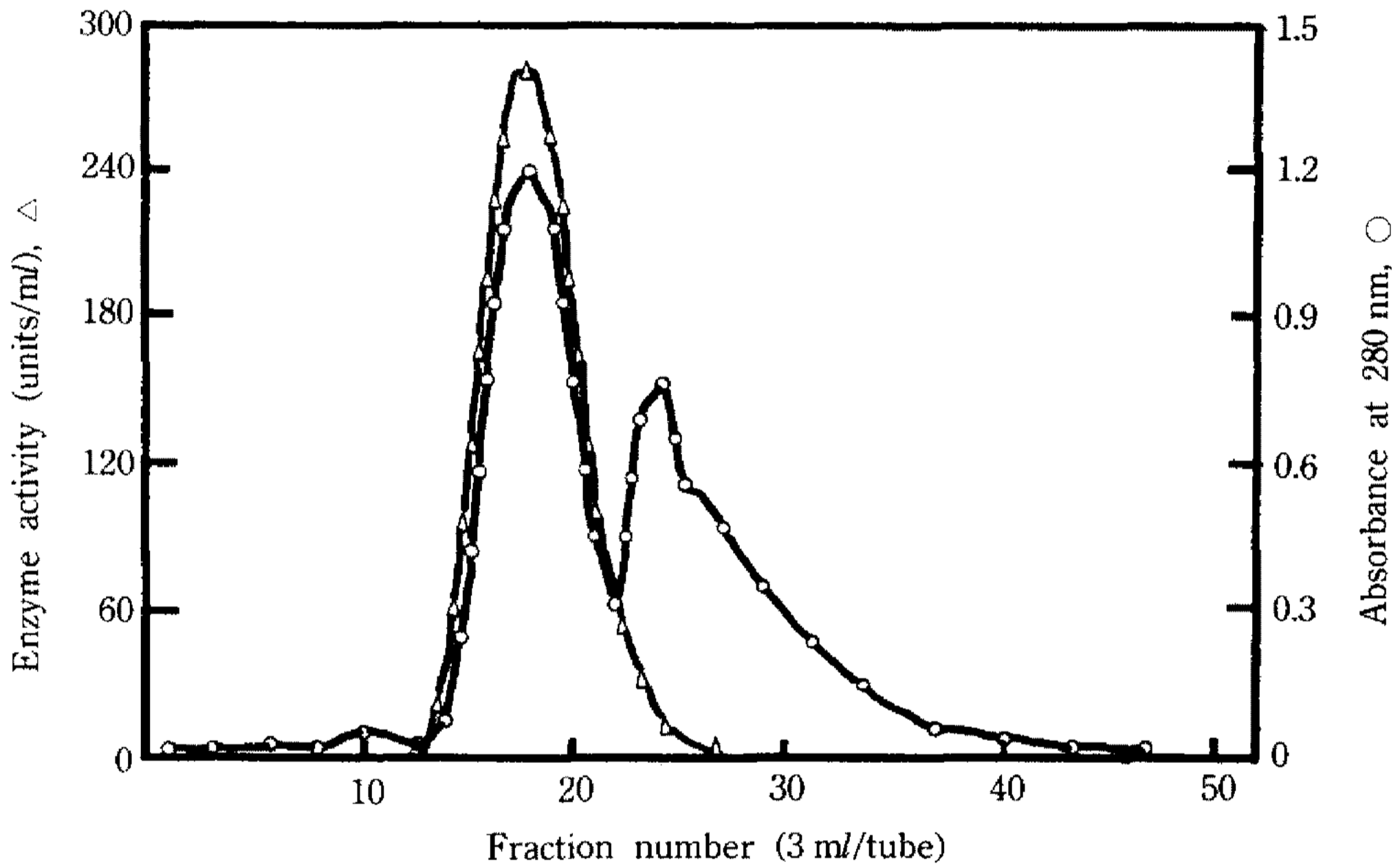


Fig. 6. Sephadex G-150 gel filtration chromatogram of β -galactosidase of *Bif. longum* KCTC 3215.

specific activity가 278.72 unit/mg·protein으로 약 4.57배 정제되었다.

Sephadex G-150 gel filtration : Ion exchange chromatography 여과에서 분획된 효소액을 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 Sephadex G-150 column(3.5×65 cm)에 주입하여 시간당 20 ml의 유속으로 tube당 3 ml씩 분획하였으며 (Fig. 6), 효소활성이 있는 것은 #13-27이었다. Gel filtration한 효소용출액의 specific activity(564.05 unit/mg·protein)는 cell free extract에 비해 9.25배 증가하였고, 수율은 56.38%이었다. 이상의 정제과정의 결과는 Table 2에 요약하였으며 정제된 β -galactosi-

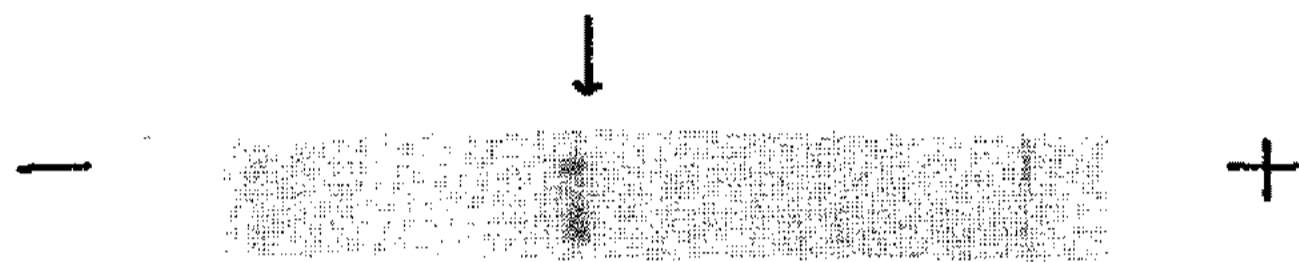
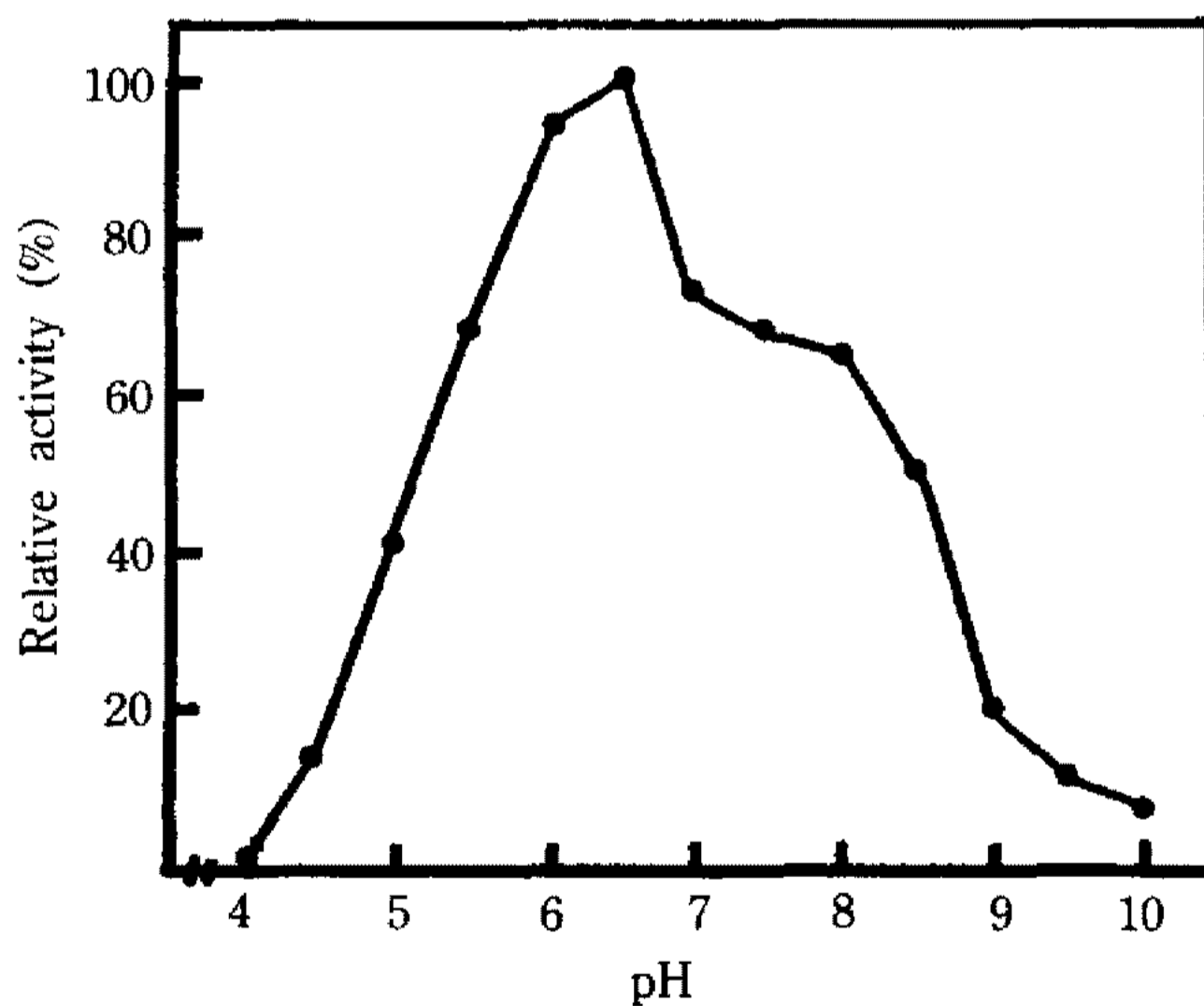
dase는 7.5% SDS-PAGE(Polyacrylamide gel electrophoresis)하여 순수하게 정제되었음을 확인하였다 (Fig. 7).

효소에 대한 pH의 영향

본 효소에 대한 최적 pH의 영향을 조사하기 위하여 pH 4.0~10.0 범위에서 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 8과 같다. Fig. 8에 나타난 바와 같이 pH 6.5에서 최대활성을 보였다. 이것은 Tochikura 등(7)의 보고와 일치하였다. 그러나 Ramana Rao와 Dutta(16) 및 Kang과 Park(6)이 보고한 *Str. thermophilus* 균주와는 다소 차이를 보였다. 그리고 반응시간 동안 각 pH에서

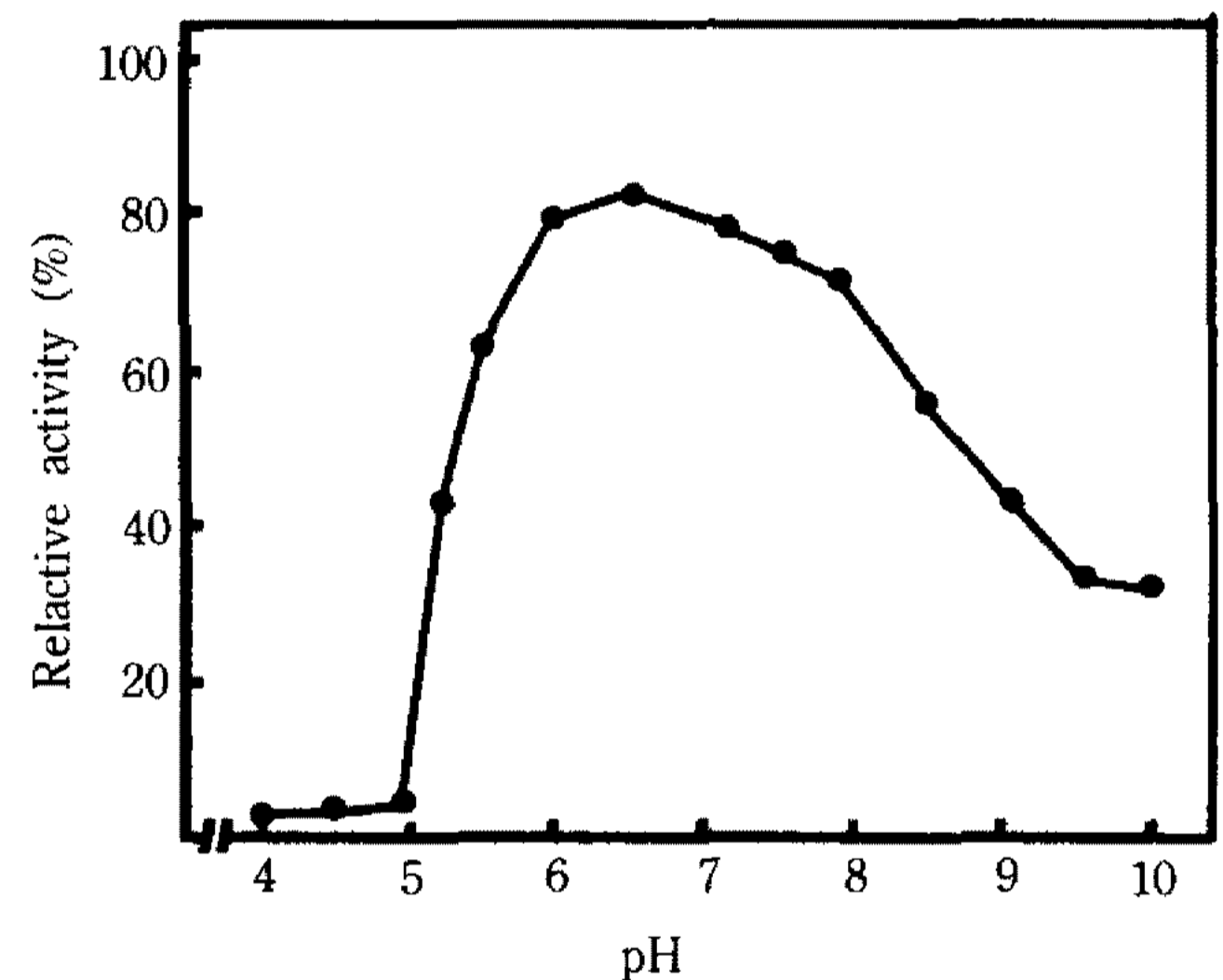
Table 2. Summary of purification of β -galactosidase from *Bif. longum* KCTC 3215

Procedure	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Fold purification
Cell free extract	6625.63	108.74	60.93	100.00	1.00
Protamine sulfate fractionation	5853.05	84.99	68.86	88.33	1.13
Ammonium sulfate (0~70% saturation)	4725.89	51.23	92.24	71.32	1.51
DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography	4066.13	14.58	278.72	61.36	4.57
Sephadex G-150 gel filtration	3735.83	6.62	564.05	56.38	9.25

Fig. 7. Photography of purified β -galactosidase on 7.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis from *Bif. longum* KCTC 3215.Fig. 8. Effect of pH on β -galactosidase activity of *Bif. longum* KCTC 3215.

효소활력의 안정성을 조사하기 위하여 효소용액을 37°C에서 60분간 정치한 후 잔존하는 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 9와 같다. 본 효소는 pH 6.0과 pH 8.0 사이에서 70% 이상의 효소활력이 유지되었다. 그러나 pH 5.5 이하와 pH 9.0 이상에서는 불활성화 현상이 뚜렷하였다.

정제효소에 대한 온도의 영향

Fig. 9. Effect of pH on β -galactosidase stability of *Bif. longum* KCTC 3215.

본 효소의 최적온도를 조사하기 위하여 30~70°C 사이의 온도에서 효소활성을 검토한 결과는 Fig. 10과 같다. 30~45°C 범위내에서는 비교적 높은 활성을 보였으며, 40°C에서 가장 좋았다. 그러나 50°C 이상에서는 활성이 급격히 감소하였다. 이러한 실험결과는 *Aspergillus oryzae*의 β -galactosidase 최적온도와 유사한 경향을 보였다(17). 그러나 유산균인 *Str. thermophilus*는 30~50°C로 본 효소보다 약간 높은 것으로 나타났다(6, 17). 또한 정제효소의 열안정성을 조사하기 위해 여러 온도에서 60분 동안 정치하면서 검토한 결과는 Fig. 11과 같다. 37°C와 45°C에서는 60분간 정치한 후에도 각각 98%, 51%의 효소활성이 잔존하였다. 그러나 50°C와 55°C에서는 10분 이내에 거의 불활성화되었다. 한편 *Kluyveromyces fragilis*의 경우 40°C

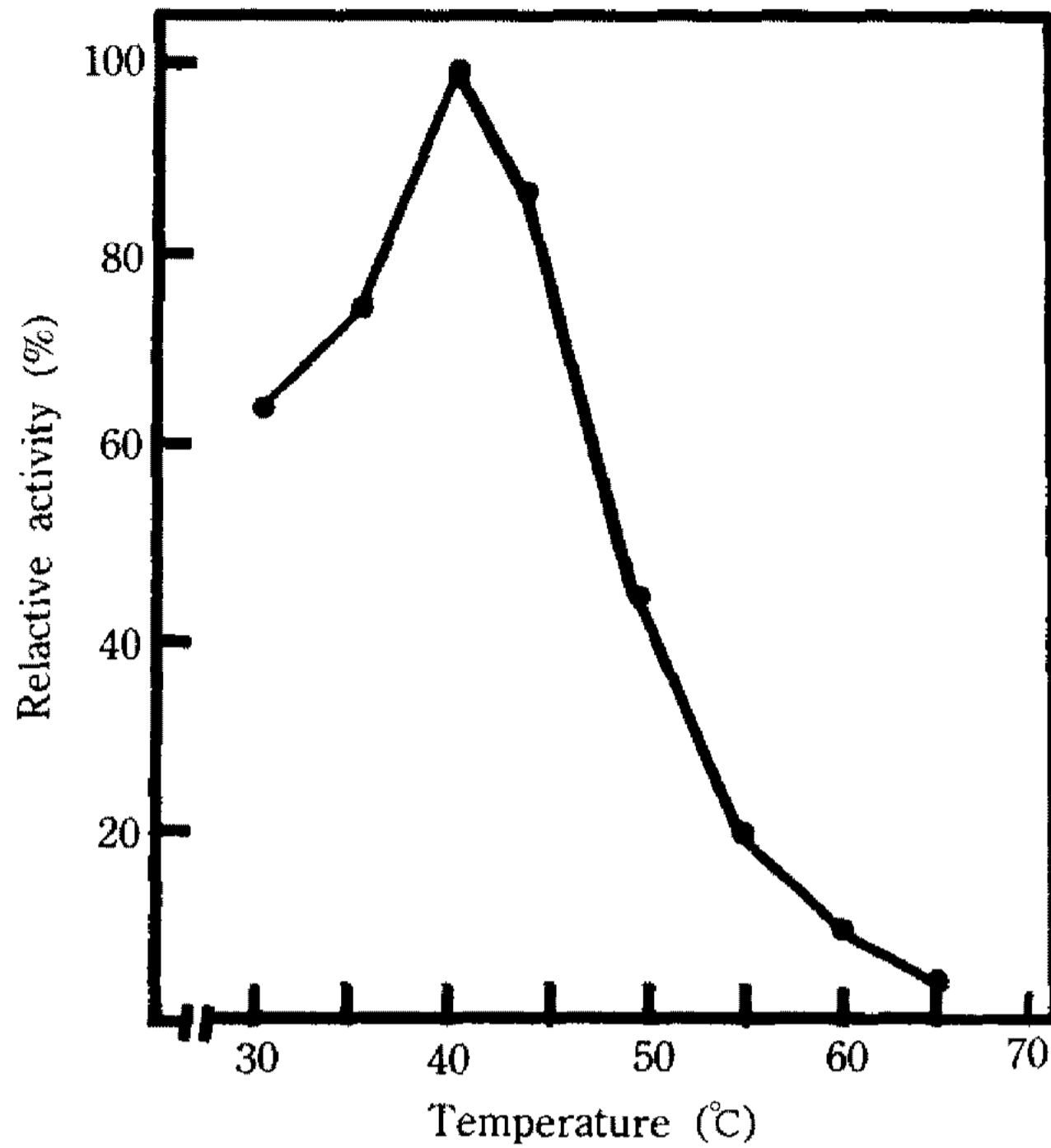


Fig. 10. Effect of temperature on β -galactosidase activity of *Bif. longum* KCTC 3215.

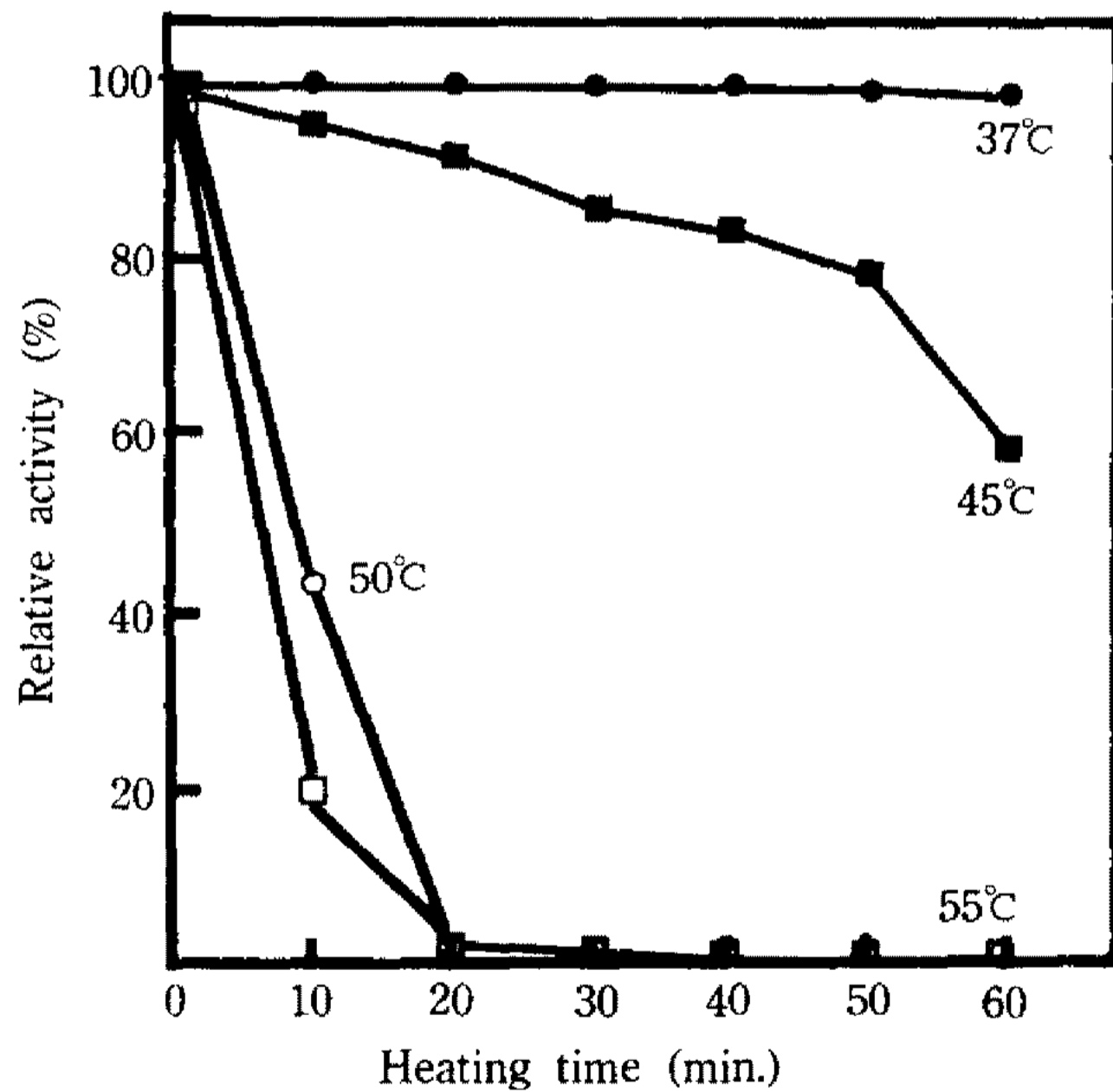


Fig. 11. Heat stability of β -galactosidase from *Bif. longum* KCTC 3215.

까지는 안정성을 유지하였고, 51°C에서 10분간 정치하면 36% 활성을 잃었다(18). 또한 *Str. thermophilus* 510으로부터 생성되는 β -galactosidase의 경우에는 55°C에서 60분간 정치 후에도 5% 정도의 활성을 유지하였다(6). 그러나 본 균주가 생성하는 β -galactosidase는 *Kluyveromyces fragilis*와 *Str. thermophilus* 510보다 열에 대한 안정성이 다소 낮게 나타났다.

Table 3. Effect of various reagents on the activities of β -galactosidase

Reagents (1 mM)	Relative activity (%)
No addition	100.00
CaCl ₂	104.05
CoCl ₂	105.24
CsCl	88.42
FeCl ₂	83.46
KCl	100.08
LiCl	86.32
MgCl ₂	58.82
MnCl ₂	99.80
RbCl	91.02
Cysteine	111.65
Glutathione	120.00
EDTA	83.76
2-Mercaptoethanol	110.05
Sodium bisulfite	106.31
Sodium fluoride	102.33
p-chloromercuribenzoic acid	11.00

정제효소에 대한 금속이온 및 Inhibitor의 영향

각종 reagents들을 각각 1 mM 농도로 효소액에 첨가하여 잔존 효소활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 금속이온들 중 Ca²⁺와 Co²⁺는 β -galactosidase 활성을 촉진시켰으며 Fe²⁺, Cs¹⁺, Li¹⁺, Mg²⁺, Rb¹⁺ 이온들은 저해효과를 보였다. Ca²⁺는 *Kluyveromyces fragilis*의 β -galactosidase에 영향이 없었으며(18), Ca²⁺는 *Kluyveromyces lactis*의 β -galactosidase를 억제하였다(19)는 보고와 다소 차이를 보였다. 또한 정제효소에 대한 각종 inhibitor의 영향을 조사한 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 본 효소는 p-chloromercuribenzoic acid와 ethylenediaminetetraacetate (EDTA)에 의해서 억제를 받은 것으로 나타났다. 그러나 Cysteine, Glutathione과 2-Mercaptoethanol에 의해서 촉진되었는데 이는 효소에 있는 많은 Sulfhydryl기들이 산화되어 disulfide 결합을 형성함으로써 효소활성이 촉진되기 때문이라고 하였다(6). 그러나 본 효소 inhibitor에 대한 실험결과는 Tochikura 등(7)의 보고와 대부분 유사하였으나 EDTA인 경우에는 다소 차이가 있는 것으로 나타났다.

정제효소에 대한 탄수화물의 영향

탄수화물이 β -galactosidase 활성에 미치는 여러

Table 4. Effect of carbohydrates on β -galactosidase activity

Carbohydrate	Relative activity (%)	
	1 mM	10 mM
Control	100.00	100.00
Glucose	104.19	98.73
Galactose	87.78	67.32
Ribose	93.46	92.90
Lactose	89.32	84.70
Xylose	91.35	89.76
Fructose	94.54	90.36
Mannose	98.72	94.86
Sucrose	102.97	109.63
Maltose	99.90	89.13
Glucosamine	104.82	92.20
Methyl-D-glucoside	106.95	99.25

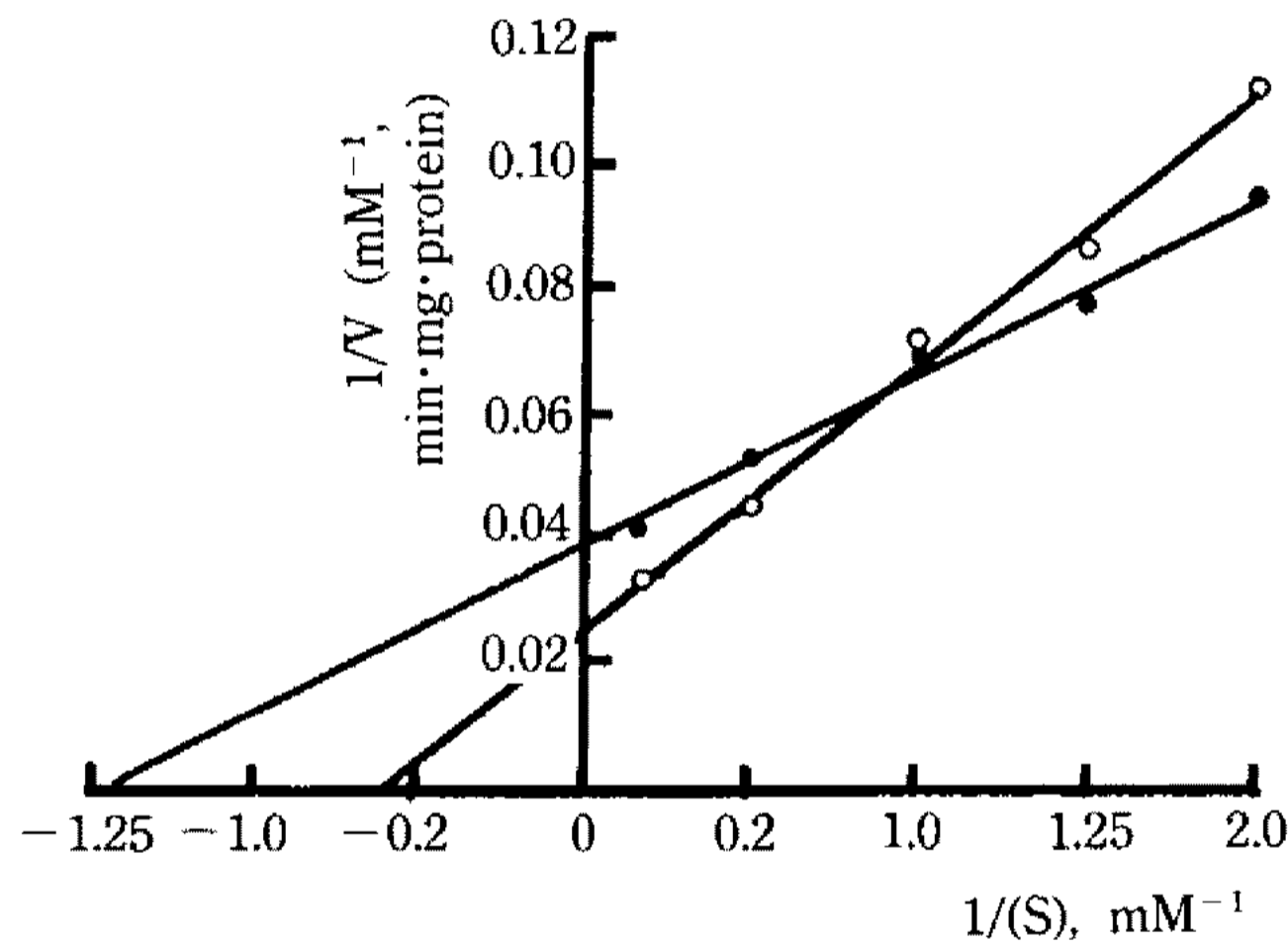


Fig. 12. Effect of substrate concentration on β -galactosidase activity from *Bif. longum* KCTC 3215.
ONPG, ●; Lactose, ○.

당류의 저해효과는 Table 4와 같다. Galactose, ribose, lactose, xylose, fructose, mannose 등의 당류를 1 mM, 10 mM 농도로 첨가하였을 때 ONPG 가수분해가 저해되었으며 galactose에 의한 저해효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 이것은 galactose가 다른 당류보다 활성부위에 결합하는 친화력이 강한 competitive inhibitor로 작용한 것으로 생각된다(17). 그러나 glucose, sucrose, methyl-D-glucoside 등에 의해서는 저해되지 않았다.

효소의 K_m 및 V_{max} 값

기질농도에 따른 반응속도를 Lineweaver-Burk

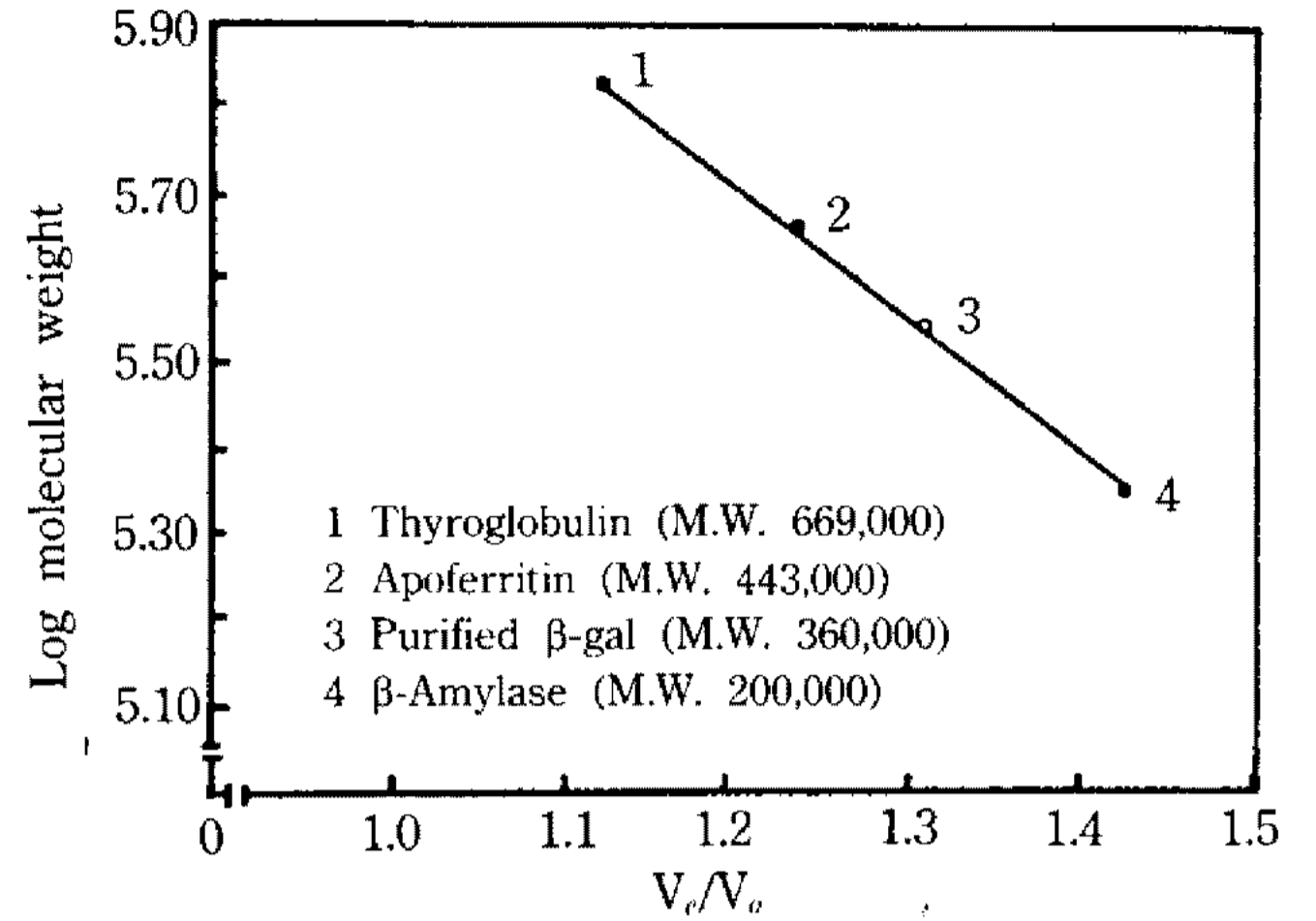


Fig. 13. Determination of the molecular weight of the *Bifidobacterium longum* β -galactosidase by Sephadex G-200 gel filtration.

Plot로 Michaelis Menten 상수(K_m)와 최대반응속도(V_{max})를 측정한 결과는 Fig. 12와 같다. 본 효소는 ONPG가 기질일 때 K_m 은 1.66 mM이고 V_{max} 는 0.30 mmole/min·mg·protein이었으며, Lactose의 경우에는 각각 3.18 mM과 0.42 mmole/min·mg·protein이었다. 이와 같은 결과는 β -galactosidase에 대한 기질친화력과 분해속도는 lactose보다 ONPG가 높게 나타났다.

효소의 분자량

본 정제효소의 분자량을 결정하기 위해서 Sephadex G-200 gel filtration을 이용하여 측정한 native β -galactosidase의 분자량은 360,000 dalton 정도로 추정되었다(Fig. 13). 또한 SDS-PAGE상의 이동도와 표준단백질과의 이동도를 비교한 결과는 180,000 dalton의 subunit 분자량을 확인하였다(Fig. 14). 이상의 결과로부터 native enzyme은 동일한 크기의 subunit로 구성된 dimer로 추정된다. Kang과 Park(6)은 *Str. thermophilus*가 생산하는 β -galactosidase 분자량이 약 520,000 dalton이고 분자량이 130,000인 동일한 subunit 4개로 구성된 tetramer라고 하였으며, Uwajima 등(18)은 *Sacch. fragilis*의 β -galactosidase 분자량은 203,000으로, Craven 등(20)은 *E. coli*가 생성하는 β -galactosidase의 분자량은 540,000이며 동일한 subunit 4개로 구성되었다고 보고하였다. 일반적으로 세균, 효모, 곰팡이로부터 생성되는 β -galactosidase는 크기가 일정치 않으며, dimer 혹은 tetramer 두 종류의 subunit로 구성되어 있는 것으로 알려져 있다.

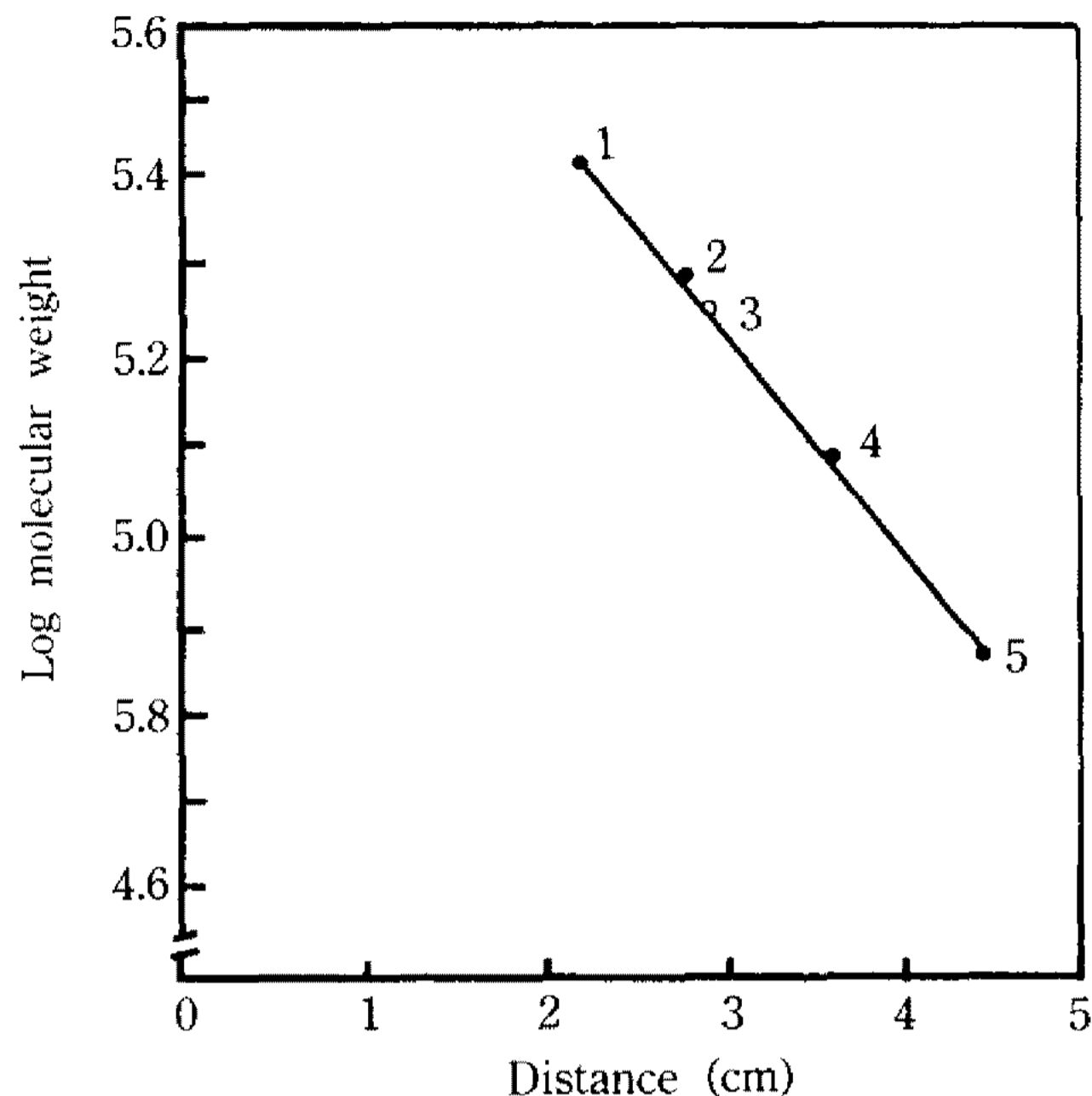


Fig. 14. Estimation of molecular weight of β -galactosidase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

1, Bovine albumin-tetramer (M.W. 264,000), 2, Bovine albumin-trimer (M.W. 198,000); 3, Purified β -galactosidase; 4, Bovine albumin-dimer (M.W. 132,000); 5, Bovine albumin-monomer (M.W. 66,000).

요 약

Bif. longum KCTC 3215에 의한 β -galactosidase의 최적생성조건은 탄소원으로 lactose 1.0%, 초기 pH 7.0, 배양온도 37°C 및 배양시간 17시간 후였다. 이 효소는 protamine sulfate, ammonium sulfate, DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography 및 Sephadex G-150 gel filtration 등 4단계 정제과정을 거쳐 9.25배 정제되었다. 정제효소의 활성 최적온도는 40°C, 최적 pH는 6.5이었으며, 효소활성이 Ca^{2+} , Co^{2+} , 2-mercaptoethanol, cysteine 그리고 glutathione에 의해 촉진되는 반면, Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cs^{1+} , Li^{1+} , ρ -chloromercuribenzoic acid와 galactose에 의해서는 저해되었다. 효소의 kinetics는 ONPG를 기질로 했을 때 $K_m = 1.66 \text{ mM}$, $V_{max} = 0.30 \text{ mM/min} \cdot \text{mg} \cdot \text{protein}$ 이었으며, 분자량은 360,000 dalton으로 분자

량이 동일한 두개의 subunit로 구성되어 있다.

참고문헌

- Rosensweig, N.S.: *J. Dairy Sci.*, **52**, 585 (1969)
- Young, C.K., J.W. Stull, R.R. Taylor, R.C. Angus and T.C. Daniel: *J. Food. Sci.*, **45**, 805 (1980)
- Blankenship, L.C. and P.A. Wells: *J. Milk Food Technol.*, **37**, 199 (1974)
- Toba, T., Y. Tomita, T. Itoh and S. Adachi: *J. Dairy. Sci.*, **64**, 185 (1981)
- Wierzbicki, L.E. and F.V. Kosikowski: *J. Dairy. Sci.*, **56**, 26 (1973)
- Kang, K.H. and S.I. Park: *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.*, **17**, 35 (1989)
- Tochikura, T., K. Sakal., T. Fujiyoshi, T. Tachiki and H. Kumagai: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2279 (1986)
- Sakal, K., T. Tachiki, H. Kumagai and T. Tochikura: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2287 (1986)
- Lederberg, T.: *J. Bact.*, **60**, 318 (1950)
- Laemmli, L.K. and M. Frave: *J. Mol. Biol.*, **80**, 575 (1973)
- Whitaker, J.R.: *Anal. Chem.*, **35**, 1950 (1963)
- Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969)
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- Citti, J.E., W.E. Sandine and P.R. Elliker: *J. Bacteriol.*, **89**, 987 (1965)
- Mahoney, R.R., T.A. Nickerson and J.R. Whitaker: *J. Dairy. Sci.*, **58**, 1620 (1975)
- Ramana Rao, M.V. and S.M. Dutta: *J. Food. Sci.*, **46**, 1419 (1981)
- Wierzbicki, L.E. and F.V. Kosikowski: *J. Dairy. Sci.*, **54**, 763 (1971)
- Uwajima, T., H. Yagi and O. Terada: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 570 (1972)
- Kuby, S.A. and H.A. Lardy: *J. Amer. Chem. Sci.*, **75**, 890 (1952)
- Craven, G.R., E. Jr. Steers and C.B. Anfinsen: *J. Biol. Chem.*, **240**, 2468 (1965)

(Received July 25, 1991)