

돼지감자 Peroxidase의 분리와 특성

윤은석 · 강수정 · 노봉수 · 최인호

서울여자대학교 식품과학과

Isolation and Characterization of Peroxidase from Jerusalem Artichoke Tubers

Eun-Seok Yoon, Su-Jung Kang, Bong-Soo Noh and Eon-Ho Choi

Department of Food Science, Seoul Woman's University

Abstract

Peroxidase from Jerusalem artichoke tubers, which might be related to browning reaction, was purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose and Sephacryl S-200 chromatography. The optimum pH of the purified peroxidase was 5.0 and relatively stable at pH 5.0~6.0 using substrate of p-phenylenediamine and H₂O₂. D-values for thermal inactivation at 60, 70 and 80°C were 86, 45 and 33 sec, respectively. Activation energy was 4,111 J/mole. The enzyme showed the most sensitive specificity of substrate for p-phenylenediamine. The compounds such as 1 mM potassium cyanide, 10 mM sodium diethyldithiocarbamate, L-ascorbic acid, sodium hydrosulfite and L-cysteine inhibited completely while 1 mM of Ca²⁺ and Cu²⁺ activated the purified peroxidase.

Key words: Jerusalem artichokes, peroxidase, isolation of enzymes, inhibition, thermal stability

서 론

돼지감자(Jerusalem artichoke : *Helianthus tuberosus* L.)는 비 소화성 다당류인 이눌린이 주성분으로 저칼로리 식품의 공급원으로 연구대상이 되고 있을 뿐만 아니라 최근 들어 대체에너지 개발에 관한 많은 연구가 수행되고 있는데⁽¹⁻⁵⁾ 특히 biomass의 발효로부터 생산되는 알코올은 물리적, 연소적 특성이 석유 특성과 비슷하여 석유의 대체에너지로 가장 각광을 받고 있다. 그러나 산업화에 있어서는 아직 많은 문제를 내포하고 있으며 그러한 문제 중에서도 돼지감자의 저장성을 높이기 위한 방법으로 감자나 고구마처럼 절간 건조하거나 분말화하여 보관하는 방법을 생각할 수 있는데⁽⁶⁾ 이 과정에서 쉽게 갈변이 일어나며 이러한 갈변물질의 형성은 알코올 발효능을 억제하여 돼지감자를 이용하는데 문제점으로 대두되고 있다.

갈변화는 주로 polyphenol oxidase나 tyrosinase 등에 의하여 이루어지는 것으로 알려졌으나 Nebeskey 등⁽⁷⁾은 사과, 배, 포도, 복숭아, 살구쥬스 등이 peroxidase에 의해서도 갈변이 일어난다고 이미 보고하였다. 또한 복숭아가 산화 갈변되는 과정에서는 peroxidase가 polyphenol oxidase와 마찬가지로 갈변정도와 상관관계가 있음

이 computer image를 통해 보고되기도 하였다⁽⁸⁾. 뿐만 아니라 갈변화에 의하여 새로 생성된 갈변물질이 미생물의 발육에 영향을 미쳐 결국 알코올 생산 수율을 낮추게 하는 효과도 보고된 바 있다⁽⁹⁾. 따라서 이러한 갈변화 물질의 형성을 억제하기 위하여서는 갈변화에 관련된 물질을 형성하는 효소를 불활성화시키는 방법이 요구된다. 박 등⁽¹⁰⁾은 돼지감자에 존재하는 갈변화 효소중 polyphenol oxidase를 부분적으로 분리하고 불활성화시킬 수 있는 조건을 보고한 바 있으나 돼지감자 peroxidase에 관한 보고는 거의 없는 실정이다. 본 연구는 돼지감자에 존재하는 또 다른 갈변화 효소 중의 하나인 peroxidase를 분리하고 분리된 효소의 일반적인 특성과 더불어 여러 가지 저해제와 그 양을 설정하여 저해제를 이용한 효소의 불활성화 뿐만 아니라 열처리에 의한 열불활성화 조건등을 조사하였다.

재료 및 방법

효소의 분리

강원도 김화에서 수확하여 4°C에서 저장한 돼지감자를 실험재료로 사용하였으며 먼저 돼지감자 500g을 수세하여 5 mm 두께로 썰고 0.05 M 인산완충액(pH 5.5) 700 ml를 넣어 mixer로 2분간 마쇄한 후 면포로 압착 여과하고 4°C에서 30분간 원심분리(5,000×g) 한 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

조효소액 1l에 30~70%의 농도에 해당하는 ammo-

Corresponding author: Eon-Ho Choi, Department of Food Science, Seoul Woman's University, #126 Gonneungdong, Nowon-ku, Seoul 139-774, Korea

niun sulfate를 첨가하여 단백질을 석출시키고 원심분리(10,000×g, 50분)하여 얻어진 침전물을 반투석막(Spectra, molecular weight cut off : 12,000)을 사용하여 24시간 투석 후 DEAE-cellulose glass column(1.6×30 cm)에 주입하였다. 완충액을 통과시킨 다음, 완충액에 0~0.3 M NaCl의 linear gradient가 되도록하여 효소를 용출하였다. 이때 유속은 30 ml/hr이었으며 5 ml씩 분획하였다. 분획중 활성을 보여주는 부분을 Centricon 10(Amicon, molecular weight cut off : 10,000)으로 농축시켜 Sephacryl S-200(Sigma Chem. Co.) column(1.6×100 cm)에 주입하고 0.05 M 인산완충액을 15 ml/hr의 유속으로 5 ml씩 분획하였다.

효소의 활성 측정

인산완충액(0.05 M, pH 5.5) 1.5 ml에 효소액 0.2 ml, 기질로서 3 mM H₂O₂ 0.3 ml와 1% p-phenylenediamine(Junsei) 0.4 ml를 차례로 혼합한 후에 반응시켜 얻은 생성물의 흡광도를 475 nm에서 측정하였다. 이 때 1분당 흡광도의 변화(1.0/min)를 1 효소단위(arbitrary unit)로 정하였다.

단백질 농도 측정

Column 통과 후 얻은 각 분획의 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도로 측정하였으며 정제 단계에서 peroxidase의 역가가 나타난 분획별로 모은 효소액의 총 단백질 농도는 Bradford⁽¹¹⁾의 방법으로 정량하였다.

정제효소의 특성

Sephacryl S-200 column chromatograph를 통하여 분리된 효소를 사용하여 pH 3.0에서 4.5까지는 0.05 M citrate 완충액, pH 5.0에서 6.5까지는 0.05 M acetate 완충액, pH 7.0에서 8.5까지는 0.05 M phosphate 완충액, pH 9.0에서는 0.05 M Tris 완충액으로 각각 pH별로 효소활성을 측정하였다. pH 안정성은 여러 pH 완충액 1 ml에 효소액 100 µl씩을 가하여 혼합한 후 4°C에서 24시간 보존한 후 잔존 활성을 측정 비교하였다. 저장기간에 따른 안정성은 효소액을 pH 5.5의 인산완충액에서 4°C와 25°C로 각각 저장하면서 24시간 간격으로 7일 동안 잔존효소활성을 측정하였다.

이미 임의의 온도로 가열한 5 ml의 인산완충액에 효소액 0.2 ml를 가하여 60, 70, 80°C에서 각각 시간별로 가열한 후 0.1 ml씩을 채취하여 곧바로 얼음물에 넣어 냉각한 다음 잔존 활성을 측정하여 열불활성화 정도를 보았다.

기질특이성을 알아보기 위하여 다음과 같은 시약 o-phenylenediamine(Junsei Chemical Co.), p-phenylenediamin(Junsei), dihydroxyphenylalanine(Sigma), catechol(Junsei), resorcinol(Junsei), hydroquinone(Jansen), pyrogallol, gallic acid, 그리고 phloroglucinol(General purpose reagent)을 기질용액으로 각각 10 mM

백하고, 1 mM H₂O₂를 가하여 효소활성을 측정하였다.

Sodium diethyldithiocarbamate(Junsei), L-ascorbic acid(Hong Sung Pharm.), thiourea(Yoneyama Chem.), EDTA(Junsei), L-cysteine(Sigma), sodium bisulfate(Duksan Pharm.), sodium L-ascorbate(Showa Chem.), potassium cyanide(Hayashi Pure Chem.), magnesium sulfate(Yakuri Pure Chem.), sodium thiosulfate(Duksan Pharm.), potassium chloride(Yakuri Pure Chem.), sodium hydrosulfite(Hayashi), potassium metabisulfite(Wako)를 농도별로 작용시켜 효소활성을 측정하여 저해 정도를 백분율로 나타내었다. 각종 금속이온이 효소활성에 있어 저해제 또는 상승제로 작용하는지의 여부를 알아보기 위하여 CuSO₄, BaCl₂, HgCl₂, CaCl₂는 1 mM로, FeSO₄는 5 mM이 되게, NaCl, KCl, MgSO₄, Li₂SO₄는 10 mM이 되게 조정하여 여기에 효소액을 가한 다음 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Peroxidase의 분리

Ammonium sulfate 용액(70% 포화)에서 침전시켜 얻은 조효소액을 투석하여 DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 분리한 다음 그 중 효소활성이 있는 분획을 모아 농축시킨 후 Sephacryl S-200 column chromatography를 실시한 결과, Fig. 1에서와 같이 단일 peak의 효소활성을 보여주었다. 돼지감자 peroxidase의 전체적인 정제도는 Table 1에서 보는 바와 같이 Sephacryl S-200 column에서 얻은 분획이 조효소에 비해 specific activity가 36.65배 증가되었으며 효소활성을 기준으로 한 수율은 6.87%였다.

Peroxidase의 특성

pH가 효소활성에 미치는 영향 : Sephacryl S-200 co-

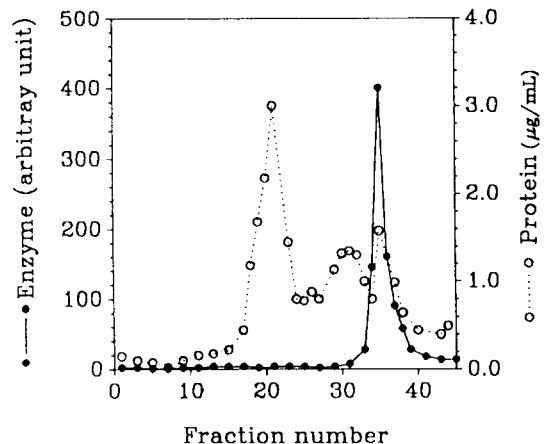


Fig. 1. Elution profile of peroxidase from Jerusalem artichoke tubers using Sephacryl S-200 (1.6×100 cm)

Table 1. Purification of peroxidase from Jerusalem artichoke tubers

Procedure	Volume (ml)	Protein (μg/ml)	Activity (unit/ml)	Specific activity (unit/μg)	Total Activity (unit)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	425	16.36	231.6	14.16	98,421.5	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ 30~70% sat.	25	7.04	1,178.0	167.33	29,450	29.92	11.82
DEAE-cellulose chromatography	4	8.70	2,701.6	310.53	10,805.4	10.97	21.93
Sephacryl S-200 chromatography	8	1.63	845.2	518.52	6,761.6	6.87	36.65

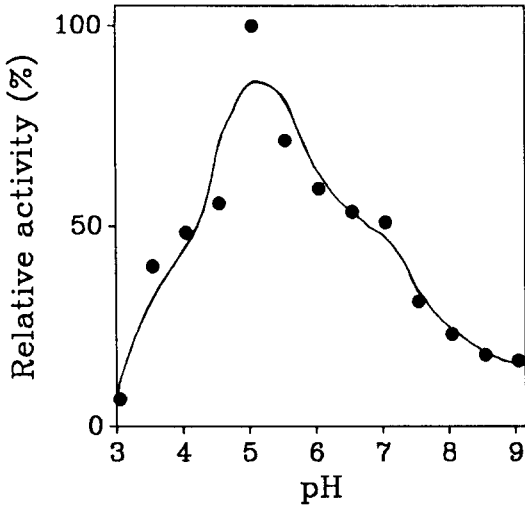


Fig. 2. Effect of pH on activity of peroxidase purified from Jerusalem artichoke tubers

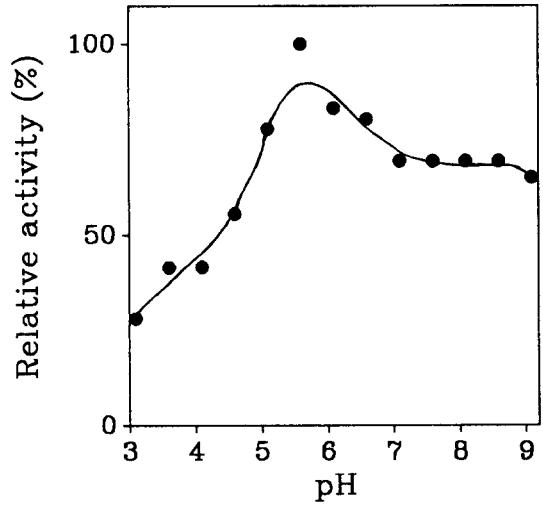


Fig. 3. Effect of pH on stability of peroxidase purified from Jerusalem artichoke tubers

lumn을 통과시켜 얻은 peroxidase의 활성 최적 pH를 알아본 결과는 Fig. 2와 같이 반응 최적 pH는 5.0이었으며, pH 4.0 이하와 pH 7.0 이상에서는 효소활성이 50% 이하로 떨어져 다른 과채류의 peroxidase에 비하여 최적 범위가 매우 좁게 나타났다. 이 결과는 green bean peroxidase⁽¹²⁾, turnip peroxidase⁽¹³⁾, 밤 peroxidase⁽¹⁴⁾, Fuji 사과 peroxidase⁽¹⁵⁾들의 최적 pH가 5.0, Kiwifruit peroxidase⁽¹⁶⁾가 5.5로 나타난 것과 유사하였다. 또한 pH가 효소의 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각 pH 별로 효소액을 4°C에서 24시간 보존한 후 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 3과 같이 pH 5.5에서 보존된 효소가 가장 잔존활성이 높아 pH 5.5에서 가장 안정한 것으로 생각되며, 산성 pH보다는 알칼리 pH범위에서 비교적 안정한 것으로 나타났다. 또한 crude peroxidase의 활성 최적 pH는 4.5인 것으로 조사되었으나 안정성에 문제가 있어 추출 및 정제시 사용한 모든 완충액의 pH는 5.5를 선택하였다.

열안정성: 돼지감자 peroxidase를 60~80°C에서 열불활성화 시킨 결과, Fig. 4와 같이 1차 곡선에서 벗어남을 알 수 있었다. 60, 70, 80°C에서의 초기 불활성화 곡선의 D값은 각각 86, 45, 33초였고 이 때의 Z값은 21°C이었

으며, 활성화에너지는 4,111 J/mole이었다. Papaya⁽¹⁷⁾에 있는 peroxidase의 D값은 70°C에서 485초, 75°C에서 345초, 80°C에서는 50초이었고, sweet corn⁽¹⁸⁾에 있는 peroxidase의 열불활성에 대한 실험 보고에서는 열저항성 부분의 D값은 93°C에서 660초, 143°C에서 45초로 1차 반응곡선을 따랐다. 서양고추냉이⁽¹⁹⁾에 있는 peroxidase에서는 isozyme에 따라 각기 다른데 70°C에서 264~14,500초였고 80°C에서는 78~2050초로 나타나 열에 저항성이 높은 것과 약한 isozyme간에 큰 차이가 있는 것으로 나타났다. 이러한 보고들과 본 실험 결과를 비교하여 보면 돼지감자 peroxidase가 다른 과채류의 peroxidase에 비하여 열 저항이 매우 낮은 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 전보에서 이미 보고한 돼지감자 polyphenol oxidase의 D값에 비하여도 훨씬 열에 약한 것으로 나타났다⁽¹⁰⁾. 이러한 결과는 온도에 대한 효소의 안정성에서도 확인할 수 있었다(Fig. 5). 0.05 M 인산완충액 10 ml에 정제된 효소액 2 ml를 넣어 4°C와 25°C에서 1주일 저장하면서 효소의 잔존활성을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 4°C에서 저장된 효소의 활성은 서서히 일정한 비율로 감소되었고, 25°C에서 저장한 경우 1일 후 활성이 50% 이하로 저하되었으며 2일 후에는 거의 활성이 나타나지

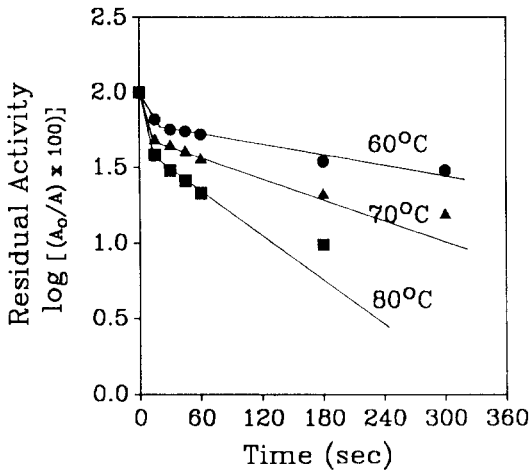


Fig. 4. Thermal inactivation of peroxidase from Jerusalem artichoke tubers

A₀: Activity at initial time
A: Activity after heating

않았다. 반면, 돼지감자 polyphenol oxidase의 경우에는 25°C 에서 2일 후부터 효소활성이 급격히 떨어지나, 4°C 에서는 저장성이 7일간 계속 유지된다고 보고하였다⁽¹⁰⁾. 이러한 결과로 볼 때 돼지감자 peroxidase는 갈변에 영향을 주는 다른 효소 즉 돼지감자 polyphenol oxidase에 비하여 열에 매우 불안정한 것으로 생각된다.

돼지감자 peroxidase의 기질특이성: 돼지감자 peroxidase의 기질특이성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 주로 amine류와 trihydroxyphenol류에서 활성을 나타내었는데 특히 p-phenylenediamine과 높은 친화력을 보여 주었고 이는 밤 peroxidase⁽¹⁴⁾가 p-phenylenediamine 보다 o-phenylenediamine에서 약 4.5배 이상의 높은 친화력을 보인 것과는 다른 경향을 보이고 있다. 그밖에 o-phenol류인 DL-β-3,4-dihydroxy-phenolalanine과 catechol에서도 약 1%의 활성을 나타내었으며 trihydroxyphenol류에서는 pyrogallol과 gallic acid가 10~20%의 활성을 나타내었으나 resorcinol, hydroquinone, phloroglucinol은 돼지감자 peroxidase의 기질이 아닌 것으로 나타났다.

저해제의 영향: Peroxidase에 대한 저해제의 작용 기작은 기질인 phenol을 우선적으로 산화시킴으로써 저해하는 것과 효소의 보결단과 복합체를 형성하거나 치환함으로써 저해하는 것, 기질과 복합체를 형성함으로써 저해하는 것 등이 있다. 본 연구에서는 효소의 초기 반응 산물인 semiquinoid를 환원시켜 갈변을 지연시키는 것으로 알려진 L-ascorbic acid, potassium metabisulfite, L-cysteine과 효소의 보결분자단과 반응하는 것으로 알려진⁽²⁰⁾ sodium diethylthiocarbamate, thiourea 외에 몇 가지 저해제를 종류 및 농도 별로 저해효과를 조사하여 백분율로 나타냈다(Table 3). 돼지감자 peroxidase는 po-

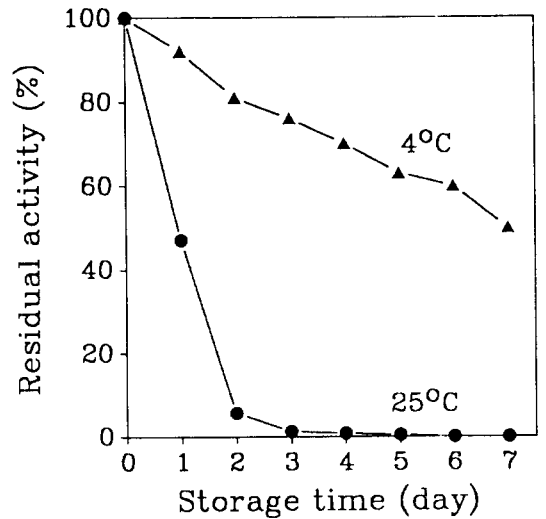


Fig. 5. Storage stability of purified peroxidase from Jerusalem artichoke in 0.05 M phosphate buffer (pH 5.5)

Table 2. Substrate specificity of peroxidase purified from Jerusalem artichoke tubers

Substrate (10 mM)	Activity (unit)	Relative activity (%)
Amine		
PPDA ^{a)}	320	100.0
OPDA ^{b)}	26	8.1
o-Diphenol		
DOPA ^{c)}	3	0.9
Catechol	3	0.9
m-Diphenol		
Resorcinol	0	0.0
p-Diphenol		
Hydroquinone	0	0.0
Trihydroxyphenol		
Pyrogallol	67	21.8
Gallic acid	31	10.1
Phloroglucinol	0	0.0

^{a)}p-Phenylenediamine

^{b)}o-Phenylenediamine

^{c)}DL-β-3,4-dihydroxyphenylalanine

tassium cyanide이 1 mM, sodium diethylthiocarbamate, L-ascorbic acid, sodium hydrosulfite, potassium metabisulfite, L-cysteine 등의 10 mM에서는 전혀 활성을 나타내지 못하였으며, 낮은 농도에서도 potassium cyanide는 저해 효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 또한 sodium diethylthiocarbamate가 0.1 mM, L-ascorbic acid 1 mM, sodium hydrosulfite 1 mM, potassium metabisulfite 0.1 mM, thiourea가 10 mM일 때는 활성의 50% 이상이 저해되었고, potassium chloride는 저해 정도가

Table 3. Effect of various inhibitors on the activity of peroxidase purified from Jerusalem artichoke tubers

Inhibitor	Concentration (mM)	Inhibition (%)
Potassium cyanide	10.0	100.0
	1.0	100.0
	0.1	99.0
	0.01	96.8
Magnesium sulfate	10.0	20.0
	1.0	21.0
	0.1	19.0
	0.01	15.0
Sodium diethyl dithiocarbamate	10.0	100.0
	1.0	88.6
	0.1	62.5
L-Ascorbic acid	10.0	26.8
	1.0	100.0
	0.1	58.8
	0.01	21.0
Potassium chloride	10.0	10.0
	1.0	22.0
	0.1	21.9
	0.01	16.0
Urea	10.0	7.2
	1.0	34.4
	0.1	34.2
	0.01	32.0
EDTA	10.0	24.8
	1.0	38.5
	0.1	24.2
	0.01	23.2
Sodium hydrosulfite	10.0	10.4
	1.0	100.0
	0.1	99.6
	0.01	34.4
Potassium metabisulfite	10.0	13.3
	1.0	100.0
	0.1	99.1
	0.01	62.0
L-Cysteine	10.0	29.0
	1.0	100.0
	0.1	47.5
	0.01	19.9
Thiourea	10.0	15.9
	1.0	79.8
	0.1	44.8
	0.01	28.0
		26.7

가장 적게 나타났다. 본 실험에서 사용된 thiourea와 sodium diethylthiocarbamate는 copper chelating agents로서 polyphenol oxidase의 경우와 마찬가지로 peroxidase의 보결원자단인 Fe²⁺와 화학적 유사성 때문에⁽²¹⁻²³⁾ 효소의 보결단과 복합체를 이루어 저해작용을 나타낸 것으로 판단된다. Ascorbic acid와 L-cystein은 10 mM에서 peroxidase의 활성을 100% 저해하는 것으로 나타났는데 ascorbic acid는 semiquinoid를 환원시켜 중합과

Table 4. Effect of metal ions on the activity of peroxidase purified from Jerusalem artichoke tubers

Metal ion	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control		100.0
Na ⁺	10	98.7
K ⁺	10	96.3
Mg ⁺	10	79.8
Li ⁺	10	86.6
Ca ⁺	1	101.3
	5	127.4
Fe ⁺	1	14.2
	5	8.5
Cu ⁺	1	278.0
Ba ⁺	1	99.6
Hg ⁺	1	55.6

갈변을 방지하는 작용을 하고 L-cysteine은 semiquinoid를 환원시키거나 이와 부가 화합물을 형성함으로써 갈변을 지연시키는 것이다. 따라서 이들 저해제가 산화된 후에는 semiquinoid의 산화가 진행되며 갈변 저해 효과는 이들의 첨가량에 비례할 것이라는 Bruemmer 등의 보고와⁽²⁴⁾ 유사한 경향을 보여주고 있다. 위에서 언급된 저해제들은 돼지감자의 갈변화를 억제하기 위하여 갈변화에 관여하는 효소인 polyphenol oxidase⁽²⁰⁾ 뿐만 아니라 peroxidase도 모두 저해시키는 효과가 있으므로 돼지감자의 가공중 갈변을 효과적으로 억제시킬 수 있을 것으로 생각된다.

각종 금속이온이 효소활성을 저해하거나 또는 촉진시키는 지의 여부를 알아보기 위하여 Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Li⁺는 각각 10 mM로, Ca²⁺, Fe²⁺는 1 mM과 5 mM로, Cu²⁺, Ba²⁺, Hg²⁺는 1 mM로 농도를 조정하여 효소활성을 측정된 결과는 Table 5와 같다. Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Li⁺, Ba²⁺는 효소활성을 저해시켰고 Ca²⁺는 1 mM에서 보다 5 mM에서 효소활성을 촉진시켰으며 Cu²⁺는 1 mM에서 활성이 크게 촉진되었다. Fe²⁺와 Hg²⁺ 1 mM 농도에서 효소의 활성이 급격하게 억제됨을 알 수 있었는데, 녹두 peroxidase⁽²⁵⁾의 경우 두 isozyme이 모두 1 mM의 Fe²⁺에 의해 활성이 촉진된 결과와는 다르게 나타났으며, 밤 peroxidase⁽¹⁴⁾에서는 Cu²⁺와 Fe²⁺이 0.1 mM 농도에서는 활성을 증가시켰으나 1 mM과 10 mM에서는 저해시켰다고 보고된 것들로 미루어 볼 때, 과량의 금속이온은 peroxidase의 활성을 저해한다고 생각된다.

요 약

가공 과정 중 갈변에 관여하는 돼지감자의 peroxidase가 ammonium sulfate, DEAE-cellulose column, Sephacryl S-200 column chromatography에 의하여 36.65 배로 정제되었다. 이 효소는 p-phenylenediamine을 기질로 사용하였을 때 pH 5.0가 활성 최적 pH이었으며 pH

5.0~6.0의 범위에서 비교적 안정하였다. 열 불활성화 곡선은 1차 곡선에서 벗어났고 60, 70, 80°C에서의 D값은 각각 86, 45, 33초이었으며 활성화에너지는 4,111 J/mole이었다. 이 효소의 기질특이성은 amine류 중에서 p-phenylenediamine과 가장 친화력이 좋았고 potassium cyanate, sodium diethyldithiocarbamate, L-ascorbic acid, sodium hydrosulfite, L-cysteine에 의해 활성이 완전히 억제되었으며 Ca^{2+} , Cu^{2+} 에 의해서는 활성이 촉진되었다.

감사의 글

본 연구는 동력자원부 대체에너지 기술개발 사업(1989-1992) “이눌린을 이용한 알코올 발효”의 지원 연구비에 의하여 이루어진 연구 결과의 일부로 동력자원부와 에너지관리공단에 깊은 감사의 바입니다.

문 헌

- 허병기, 김현성, 목영일 : 효모 *S. cerevisiae*의 돼지감자 알콜발효 특성과 발효 시간과의 함수관계. 한국생물공학회지, 4, 191(1989)
- 김진한, 허병기, 배천순, 김현성 : 효모 *K. marxianus*에 의한 돼지감자 착즙에 대한 에탈올 발효특성. 한국생물공학회지, 5, 75(1990)
- 채은미, 최연호 : 돼지감자 분말을 이용한 *Kluveromyces marxianus*의 알코올 발효. 한국산업미생물학회지, 19, 265(1991)
- Duvnjak, Z., Turcotte, G. and Duan, Z.D.: Production of sorbitol and ethanol from Jerusalem artichokes by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36859. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 711(1991)
- Rosa, M.F., Correia, I.S. and Novais, J.M.: Improvement in ethanol tolerance of *Kluveromyces fragilis* in Jerusalem Artichoke Juice. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 705 (1988)
- 최연호 : 이눌린을 이용한 알코올 생산. 동력자원부 보고서, (1990)
- Nebeskey, E.A., Esselen, W.B.Jr., Kaplan, A.M. and Fellers, C.R.: Thermal destruction and stability of peroxidase in acid foods. *Food Res.* 15, 114(1950)
- Stutle, G.W.: Quantification of net enzymatic activity in developing peach fruit using computer video image analysis. *Hort. Science*, 24, 113(1989)
- Lee, S.Y., Shin, Y.C., Kim, H.S. and Byun, S.M.: Ethanol fermentation of uncooked cassava starch. *J. Ferment. Technol.*, 63, 51(1985)
- 박은배, 아준식, 최연호 : 돼지감자 polyphenol oxidase의 분리와 특성. 한국식품과학회지, 23, 414(1991)
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248(1976)
- Gkinis, H. and Fennema, O.R.: Changes in soluble and bound POD during low-temperature storage of green beans. *J. Food Sci.* 43, 527(1978)
- Shuji, F. and Tetsuzo, T.: Purification of phloroglucinol oxidase from Turnip and its properties. *Nippon Nogekagaku Kaishi*, 54, 429(1980)
- 오석홍, 김용휘, 이서나 : 밤에 함유된 peroxidase의 정제 및 특성에 관한 연구. 한국식품과학회지, 19, 6 (1987)
- 지완정, 조남숙, 김인철, 박관화, 최연호 : 사과 peroxidase의 분리 및 특성. 한국식품과학회지, 23, 442(1991)
- Soda, I., Hasegawa, T., Suzuki, T., Ogura, N.: Purification and some properties of peroxidase from Kiwifruit. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1677(1991)
- 박관화, 김재욱, 신재우, 노봉수 : Papaya 중의 단백질 분해효소와 peroxidase의 열불활성화. 한국식품과학회지, 11, 3(1979)
- Yamamoto, H.Y., Steinberg, M.P. and Nelson, A.I.: Kinetic studies on the heat inactivation of peroxidase in sweet corn. *J. Food Sci.* 27, 587(1962)
- 윤정로, 박관화 : 서양고추냉이에 있는 퍼록시다아제 이소자임의 분리와 열 불활성화. 한국식품과학회지, 14, 125(1982)
- Vamod-Vigyazo, L.: Polyphenol oxidase and peroxidase in fruit and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutri. Sep.*, 49, (1981)
- Bakardjieva, N.T.: *In vitro* study of the effect of some ions on individual isozymes of pea and barley peroxidase. *Dokl. Bolg. Akad. Nauk.*, 30, 759(1977)
- Embs, R.J. and Markakis, P.: Bisulfite effect on the chemistry and activity of horseradish peroxidase. *J. Food Sci.* 34, 500(1969)
- Whitaker, J.R.: Principles of Enzymology for Food Science. Marcel Dekker, N.Y. p.591(1972)
- Bruemmer, J.H., Roe, B. and Bowen, E.R.: Peroxidase reaction and orange juice quality. *J. Food Sci.* 41, 186 (1976)
- 이상갑, 박우철, 홍종욱 : 녹두에서의 peroxidase 동위 효소들의 분리와 효소적 특성. 한국농화학회지, 29, 279 (1986)

(1993년 8월 23일 접수)