

반응표면 분석법에 의한 crude papain 추출 조건의 최적화

오훈일 · 오상준 · 김정미*

세종대학교 식품공학과, *연세대학교 식품영양과학연구소

Optimization of Crude Papain Extraction from Papaya Latex Using Response Surface Methodology

Hoon-Il Oh, Sang-Joon Oh and Jeong-Mee Kim*

Department of Food Science and Technology, Sejong University

*Research Institute of Food and Nutritional Science, Yonsei University

Abstract

Crude papain was extracted from papaya latex under various conditions. Extraction conditions of crude papain were optimized by the response surface methodology (RSM). Extraction yield of papain was affected by concentration of NaHSO₃, extraction time and pH. Three independent factors were chosen to determine their effects on the various responses and the function was expressed in terms of a quadratic polynomial equation, which measures the linear, quadratic and interaction effects. According to the results of RSM, the stationary point for quantitatively dependent variable was found to be the maximum point for extraction yield. Optimum conditions of papain extraction were 4% of NaHSO₃, 120 min of extraction time and pH 7.6. Under these conditions, 793.16 mg of papain per g latex was extracted from papaya latex.

Key words: papain, extraction, response surface methodology, optimization

서 론

식품 산업에 이용되고 있는 대표적인 식물 기원 효소 중의 하나인 papain (E.C. 3.4.4.10)은 멕시코가 원산지인 열대 과일 papaya (*Carica papaya*, L.)에 함유되어 있으며, 단백질 및 펩타이드 안에서 leucine과 glycine 및 염기성 아미노산에 작용하는 단백질 가수 분해 효소로서 papaya 유액으로부터 쉽게 얻을 수 있다. Papaya 유액은 성숙하지 않은 과실에 칼자국으로 상처를 내어 유출되는 즙액을 그릇에 모아 교반하면서 응고시키고, 이것을 분말화하여 저장하거나 또는 즙액을 일광하에서 박층으로 하여 건조시킨 것이다^(1,2).

Papain은 ficin이나 bromelain과 같은 다른 식물 기원의 protease보다 활성도가 높아^(3,5)소의 근육 단백질의 용해 실험 결과 다른 식물 기원의 효소보다 그 기능이 우수하다는 것이 밝혀졌다⁽⁶⁾. Papain의 일반적 성질은 청산염, H₂S, cystein, ascorbic acid 및 glutathione 등의 환원제가 활성을 갖게 하며, H₂O₂, 요오드, 산소,

적혈염과 같은 산화제에 의하여 활성을 잃게 된다⁽⁷⁾. Brocklehurst와 Little⁽⁸⁾은 방향족 disulfide (2,2'-dipyridyl disulfide, 4,4'-dipyridyl disulfide)를 활성제로 사용하여 papain의 반응 과정을 연구한 결과, 이들 방향족 disulfide 활성제가 papain의 활성 부위에 정확하게 작용하여, 활성을 일으킬 수 있는 능력이 L-cysteine, β-mercaptoethanol 보다 10배 이상인 것으로 나타났다.

Papain 추출에 미치는 영향 인자로서 추출 온도, 시간과 용액의 농도 등을 들 수 있는데 이러한 인자들의 추출 조건을 통계적으로 최적화하기 위하여 반응표면 분석법(Response Surface Methodology: RSM)⁽⁹⁾을 이용하였다. 이 방법은 Box와 Wilson⁽¹⁰⁾이 1951년 처음 소개한 방법으로서 종속 변수에 대하여 각 독립 변수의 영향이 어느 정도인가를 듣고 분석으로 확인할 수 있도록 고안한 것으로 RSM을 식품에 이용한 연구로는 Mudahar 등⁽¹¹⁾이 당근의 탈수율, 밀도, carotene 손실도 등을 종속 변수로 하여 모델 식으로부터 최적 탈수 공정 과정을 추정하였고, Floros와 Chinnan⁽¹²⁾은 pimiento 후추의 표피, 질감, peeling loss과 수율 등의 부분요인 분석실험법에 의하여 최적 탈피 공정 조건의 예측치를 추정하였다. 국내에서는 김 등⁽¹³⁾이 옥분의

Corresponding author: Jeong-Mee Kim, Research Institute of Food and Nutritional Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

압출 가공시 이축 압출 성형기의 system parameter의 조건을 2차 반응 표면 polynomial 식에 의하여 최적화하였고, 강 등⁽¹⁴⁾은 오미자 음료 제조의 최적 조건을 모델식에 의한 등고 분석을 수행하여 설정하고 그 예측치를 보고하였다.

지금까지의 papain에 대한 연구는 경제성이 고려되지 않은 복잡한 방법으로 정제한 papain을 소재로 그 특성을 연구하였을 뿐 추출 수율이나 추출 조건을 최적화시킨 연구는 거의 없었다. 따라서 본 연구에서는 효율적이고도 경제적인 papain의 추출을 위해, 다양한 조건으로 papaya 유액을 추출하여 crude papain을 분리하였다. 또한 추출 수율과 추출 조건을 최적화시키기 위하여 추출 수율에 대한 추출 조건의 다중 회기 분석을 실시하고 모델을 설정하여 반응표면 분석을 이용한 등고 분석과 3차원 분석(3-D plot)을 수행하여 그 유의성을 조사함으로써 추출 조건의 타당성을 검토하여 최적화된 추출 조건을 산출하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 papaya latex는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 구입하여 사용하였다.

통계적 실험 설계

Papain 추출의 최적 조건을 얻기 위해 Statgraphics (STSC Inc., Rockville, MD, U.S.A.) 프로그램 내의 중심합성 계획법 (central composite design)을 이용하여, 추출 조건인 NaHSO₃의 함량, EDTA의 함량, 추출 시간, buffer의 pH 등을 주요 독립 변수로 선정하고 실험 규모를 3단계 4요인의 부분요인 실험법(fraction factorial block)으로 설정하였다. +α (max)와 -α (min) 값의 범위는 Burke 등⁽¹⁵⁾의 연구 결과를 참고하여 pH 범위는 최소값 5, 최대값 9와 중간값 7을, 추출 시간은 30분, 120분과 중간값 75분을 설정하였다. 효소를 추출하고 분리할 때 효소의 SH 그룹과 중금속의 결합제로서 EDTA를 최소값 0.5%, 최대값 3.0%, 중간값으로 1.75% 첨가하였으며 효소의 활성제로서 NaHSO₃를 최소 1%, 최대 4%, 중간값으로 2.5% 되도록 첨가하여 4변수를 3수준의 부분요인 실험법에 의하여 실험구를 Table 1과 같이 조합하였다.

Crude papain의 추출 및 분리

Papaya 유액 4.5 g을 100 mL 삼각 flask에 넣은 후

Table 1. Fraction factorial block of experimental design for protein extraction performance test

Treatment No.	Coded variables ¹⁾				Process variables			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	-1	-1	-1	+1	1.0	0.50	30	9
2	-1	-1	+1	-1	1.0	0.50	120	5
3	-1	+1	-1	-1	1.0	3.00	30	5
4	-1	+1	+1	+1	1.0	3.00	120	9
5	+1	-1	-1	-1	4.0	0.50	30	5
6	+1	-1	+1	+1	4.0	0.50	120	9
7	+1	+1	-1	+1	4.0	3.00	30	9
8	+1	+1	+1	-1	4.0	3.00	120	5
9	0	0	0	0	2.5	1.75	75	7
10	0	0	0	0	2.5	1.75	75	7
11	-1	-1	-1	-1	1.0	0.50	30	5
12	-1	-1	+1	+1	1.0	0.50	120	9
13	-1	+1	-1	+1	1.0	3.00	30	9
14	-1	+1	+1	-1	1.0	3.00	120	5
15	+1	-1	-1	+1	4.0	0.50	30	9
16	+1	-1	+1	-1	4.0	0.50	120	5
17	+1	+1	-1	-1	4.0	3.00	30	5
18	+1	+1	+1	+1	4.0	3.00	120	9
19	0	0	0	0	2.5	1.75	75	7
20	0	0	0	0	2.5	1.75	75	7
21	+1	0	0	0	4.0	1.75	75	7
22	-1	0	0	0	1.0	1.75	75	7
23	0	+1	0	0	2.5	3.00	75	7
24	0	-1	0	0	2.5	0.50	75	7
25	0	0	+1	0	2.5	1.75	120	7
26	0	0	-1	0	2.5	1.75	30	7
27	0	0	0	+1	2.5	1.75	75	9
28	0	0	0	-1	2.5	1.75	75	5
29	0	0	0	0	2.5	1.75	75	7
30	0	0	0	0	2.5	1.75	75	7

¹⁾X₁: sodium bisulfate value (%), X₂: EDTA value (%), X₃: time (min), X₄: buffer pH.

부분 실험 계획법 (fraction block design)에 따라서 0.1 M citrate buffer (pH 5.0)나 0.1 M carbonate buffer (pH 9.0) 10.5 mL와 EDTA, NaHSO₃를 넣고 shaking incubator (20°C)에서 흔들어 추출한 후 고속 원심분리기(Du Pont Inst. Co.)로 8,000×g에서 15분간 원심분리한 후 여과(Whatman filter paper No. 1)하여 제조하였다.

Crude papain의 단백질 양과 추출 수율 측정

원심 분리하여 얻어진 단백질의 양은 Lowry 방법⁽¹⁶⁾으로 측정하였고, 추출 수율은 micro-Kjeldahl 법⁽¹⁷⁾으로 총 단백질 양을 측정하여, 단백질 양(mg)/g latex × 100으로 crude papain의 추출 수율을 계산하였다.

반응 표면 분석에 의한 추출 조건의 최적화

Crude papain을 추출하기 위한 NaHSO₃, EDTA, 추

출 시간, pH의 조건을 각각의 독립 변수로 선정하고, Lowry법으로 측정된 papaya 유액 중의 단백질 양을 종속 변수 Y로 선정하여 Statgraphics 프로그램을 이용하여 다중 회귀 분석하고 반응 변수에 대한 모델을 추정하여 이를 다항 회귀 모형식으로 변환하였다. 또한 추출 수율과 추출 조건을 최적화시키기 위해 추출 수율에 대한 추출 조건의 다중 회귀 분석, 분산 분석, F검정 및 t검정을 하여 종속 변량의 최적화를 확인하였고 반응표면 분석에 의한 최대 정상점을 구하였으며, 등고분석(contour plot)과 3차원 분석(3-D plot)을 통하여 추출 조건의 최적화를 실시하였다.

결과 및 고찰

Crude papain 추출에 대한 부분 요인 실험법과 추출 수율

최근 식품 또는 첨가물의 제조, 가공시에 최적 조건을 설정하기 위하여 반응표면 분석법을 이용하는 연구가 증가하고 있는데, 이 방법의 특성은 최종 생산물의 품질을 크게 좌우할 수 있는 요소를 찾아 독립 변수로 지정하여 예비 실험이나 문헌적인 배경을 근거로 그 요소들의 수준을 정한 후 중심 합성법에 따라 실험 설계하고 전체요인 실험법이나 부분요인 실험법에 의하여 실험을 수행한다. 이 때 실험에서 얻은 값을 종속 변수로 회귀 분석하고, 회귀 분석에 대한 분산 분석을 통해 모델식을 결정하고 또한 결정된 모델식을 독립 변수가 2개가 되도록 고정하여 등고 분석이나 3차원 분석을 수행한 후 최고의 반응값을 찾는다. 이 때 고정되어진 조건과 최고 반응값이 출력된 독립 변수의 좌표를 읽어 그 조건대로 최종 생산물을 생산하는 방법으로써 시간적, 경제적 이득이 있다. 본 연구에서는 Statgraphics 프로그램 내의 실험 디자인 프로그램의 하나인 중심 합성 계획법을 이용하여 papaya 유액으로부터 crude papain 추출에 대한 부분요인 실험을 설정하여 종속 변수인 추출량을 Lowry 방법으로 측정하였고 그 결과는 Table 2와 같다. 16번 처리구인 NaHSO₃ 4%, EDTA 0.5%, 추출 시간 120분, pH 5 일 때 crude papain이 유액 g당 484.2 mg 추출되어 가장 높은 반응값을 보였으며, 추출 수율이 가장 낮은 것은 28번 처리구로 NaHSO₃ 2.5%, EDTA 1.75%, 추출 시간 75분, pH 5일 때 crude papain이 유액 g당 366.0 mg이 추출되어 가장 낮은 반응값을 보였다. 또한 papaya 유액에서 추출된 crude papain 용액을 각 처리구 별로 micro-Kjeldahl법⁽¹⁷⁾을 이용하여 전체 단백질 양을 구한 결과 crude papain의 추출 수율은 38.5%~48.4

Table 2. Fraction factorial block of experimental design for protein extraction performance test and extraction yield

Treatment No.	Coded variables ¹⁾				mg protein /g latex	Extraction yield (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄		
1	-1	-1	-1	+1	410	45.6
2	-1	-1	+1	-1	409	45.4
3	-1	+1	-1	-1	406	41.9
4	-1	+1	+1	+1	410	45.8
5	+1	-1	-1	-1	433	43.7
6	+1	-1	+1	+1	430	43.4
7	+1	+1	-1	+1	430	43.5
8	+1	+1	+1	-1	432	43.7
9	0	0	0	0	382	38.7
10	0	0	0	0	382	38.7
11	-1	-1	-1	-1	426	48.4
12	-1	-1	+1	+1	409	45.9
13	-1	+1	-1	+1	414	46.0
14	-1	+1	+1	-1	433	43.9
15	+1	-1	-1	+1	420	45.5
16	+1	-1	+1	-1	484	48.0
17	+1	+1	-1	-1	460	42.5
18	+1	+1	+1	+1	452	44.1
19	0	0	0	0	382	38.7
20	0	0	0	0	382	38.7
21	+1	0	0	0	407	41.2
22	-1	0	0	0	394	39.1
23	0	+1	0	0	405	39.0
24	0	-1	0	0	404	38.8
25	0	0	+1	0	380	41.4
26	0	0	-1	0	396	38.5
27	0	0	0	+1	394	40.4
28	0	0	0	-1	366	42.1
29	0	0	0	0	382	38.7
30	0	0	0	0	382	38.7

¹⁾X₁: sodium bisulfate value (%), X₂: EDTA value (%), X₃: time (min), X₄: buffer pH.

%이었다. 이것은 crude papain 추출시 활성제인 NaHSO₃가 1%와 4% 사이에서 농도가 증가함에 따라 crude papain 추출량이 2차 함수적인 증가를 나타냈기 때문에 4%에서 높은 종속 변수값이 나온 것으로 보이며, EDTA는 추출 자체에는 별다른 영향을 주지 못하였고 추출 시간은 120분, pH는 5에서 최고값을 나타냈다. 이와같은 결과는 papaya 유액을 pH 5, 10 mM acetate buffer를 이용하여 37%로 만들어 crude papain을 추출할 때 추출 시간 120분, pH 5, β-mercaptoethanol 4%의 경우 가장 많은 crude papain이 추출된 Burke 등⁽¹⁸⁾의 연구와 매우 유사한 결과를 나타내었다. 추출 수율이 유액(latex) g당 추출된 단백질 양과 일치하지 않는 것은 Kjeldahl 법은 질소 화합물을 측정하는데 반하여 Lowry 방법은 단백질 양을 측정하였기 때문이라고 생각된다.

Table 3. Values of regression coefficients calculated for the amount of protein extracted

Independent variables	Coefficient	Standard error	t-value
CONSTANT	29.0630	5.7306	4.9547
X ₁	0.1713	0.0738	-0.9135
X ₂	0.0003	0.0121	0.0091
X ₃	-2.5812	1.4060	-1.8359
X ₄	149.3208	17.4738	8.5454
X ₁ X ₂	0.0677	0.1131	0.0341
X ₁ X ₃	0.0064	0.1069	0.0595
X ₁ X ₄	-2.8451	2.3565	-1.2073
X ₂ X ₃	0.0239	0.0471	0.0460
X ₂ X ₄	0.0198	0.1046	0.0342
X ₃ X ₄	-0.0670	0.0785	-0.8537
X ₁ ²	13.1705	7.2134	1.8258
X ₂ ²	0.0572	0.0368	0.0107
X ₃ ²	0.0208	0.0080	2.5960
X ₄ ²	-9.8494	1.7296	-5.6945

(Significance at p<0.001)

X₁: sodium bisulfate value (%), X₂: EDTA value (%), X₃: time (min), X₄: buffer pH.

추출 조건의 최적화

Papaya 유액으로부터 crude papain을 추출하기 위하여 X₁-X₄의 4가지 요인을 독립 변수로 설정하고, Lowry 법으로 측정된 단백질 양을 종속 변수 Y로 설정하여 다중 회귀 분석을 수행한 결과(Table 3)를 근거로 t-value의 절대값이 1.75 이상인 항은 다중 회귀

분석 모델식에 채택하고 t-value의 절대값이 1.75 미만인 항은 기각하였다. 각 인자의 변수에 대한 회귀 계수는 1차 선형 효과와 반응 표면이 곡면을 이루는 2차 모형의 곡선 효과 분석치와 추출 인자 간에 상호작용이 있다. 독립 변수 중 X₂ 항인 EDTA, 상호작용을 나타내는 모든 계수와 또한 동일한 독립 변수 간의 상호작용을 나타내는 2차항 중에서 EDTA 항이 기각되어 다음 모델식 $Y=29.0630-2.5812X_3+149.3208X_4+13.1705X_1^2+0.0208X_3^2-9.8494X_4^2$ ($r=0.9951$)을 얻었다. 이는 Burke 등⁽¹⁵⁾ 이 papaya 유액으로부터 crude papain을 추출할 때 EDTA는 추출 수율에 큰 영향을 주지 못하는 것으로 보고한 바와 일치하였다. 다중 회귀 분석 전체에 대한 분산 분석의 결과 다중 상관 계수의 제곱 합은 5004587, 잔차의 제곱 합은 17723.5 이었고 또한 유의 수준을 검정하는 자유도와 F-value도 99.9% 수준에서 (P<0.001) 유의성을 나타내어 다중 회귀 분석에 의하여 각 변수가 선별되어 설정된 모델식이 99.9% 수준에서 유의성이 있었다. 다중 회귀 분석에 의하여 설정된 모델식을 분석할 때 독립 변수에 대하여 미분하여 해당 독립 변수의 최적값을 찾아내는 방법과 3차원 분석 상에서 나타난 종속 변수값이 모든 독립 변수의 최소·최대값에서 나타날 때 3차원 분석의 독립 변수 좌표를 직접 읽어 최적값을 찾는 방법으로 반응 표면 분석법을 수행하여 Fig. 1~3과 같은 결과를 얻었다. 독립 변수 NaHSO₃를 고정하여 분석한 결과 최적 추출 조

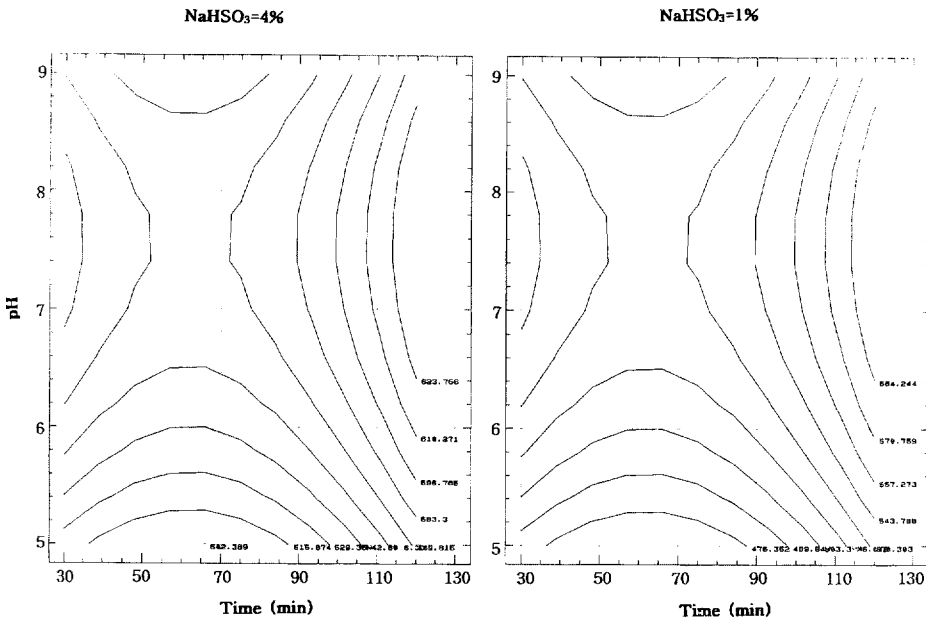


Fig. 1. Contour plots of the amount of protein extracted at constant NaHSO₃ concentration of 4% and 1%, respectively.

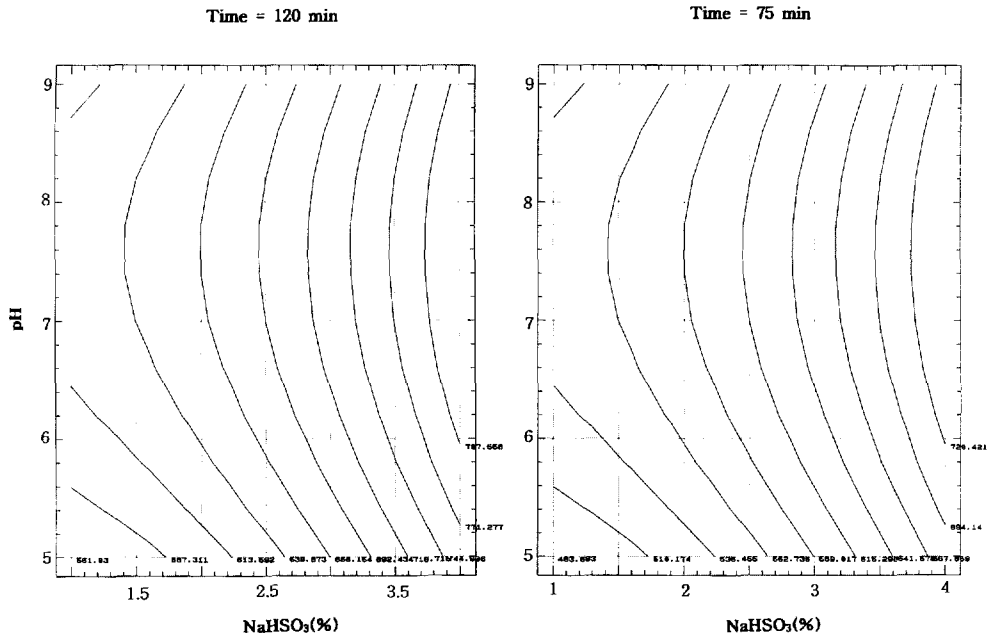


Fig. 2. Contour plots of the amount of protein extracted at constant shaking time 120 min and 75 min, respectively.

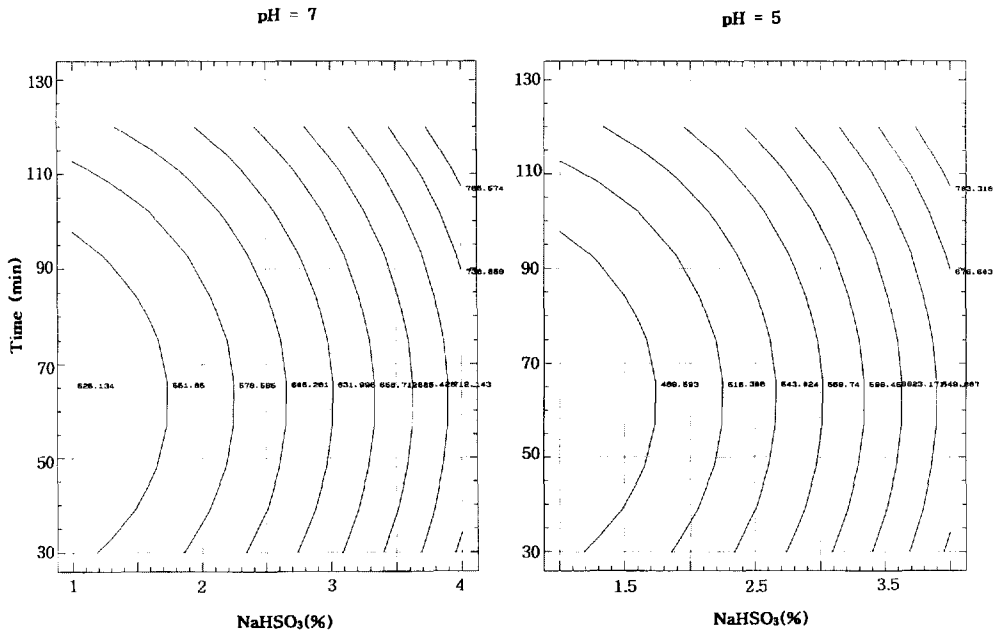


Fig. 3. Contour plots of the amount of protein extracted at constant pH 7 and pH 5, respectively.

전은 pH 7.5 부근과 추출 시간 120분일 때였으며 NaHSO₃ 농도가 4%인 경우 반응값이 623.8 mg prot./g latex로 최고값을 나타냈으며, NaHSO₃가 1%일 경우에는 반응값이 584.2 mg prot./g latex로 가장 낮았다 (Fig. 1). 한편 독립 변수인 추출 시간을 고정하여 분석

한 결과 반응값은 pH 7.5 부근과 NaHSO₃ 농도 4%일 때가 최적 조건으로 추출 시간 75분일 때 720.4 mg prot./g latex로 가장 낮았고 120분일 때는 반응값이 797.6 mg prot./g latex로 나타나 추출 시간이 120분일 때 가장 높은 추출치를 보였다(Fig. 2). 독립 변수 pH

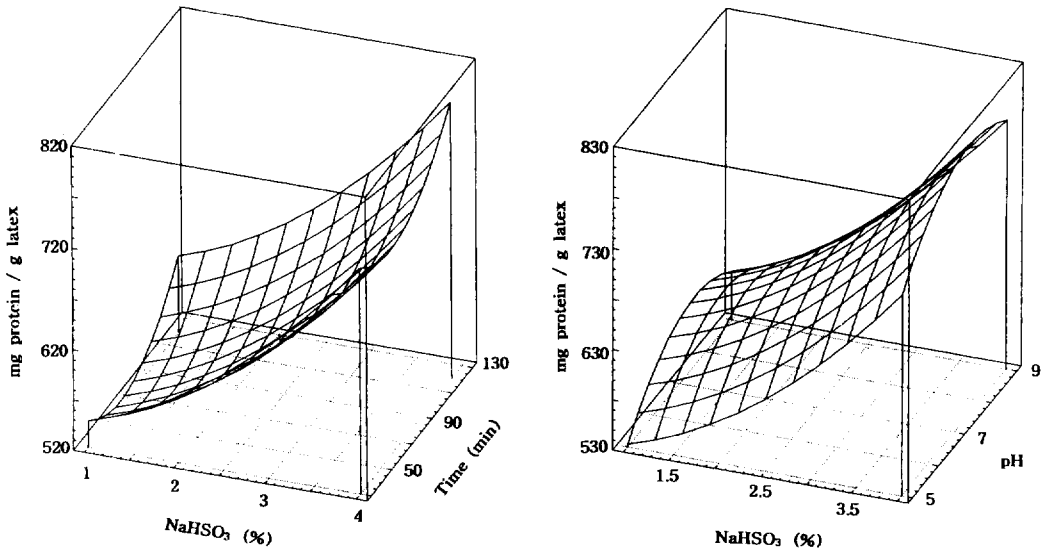


Fig. 4. Response surfaces of the amount of protein extracted at NaHSO₃ concentration (%), shaking time (min) and pH, respectively.

를 고정하여 분석한 결과 추출 시간 120분, NaHSO₃ 농도 4%였을 때 최적 조건을 보였으며, pH 5인 경우 반응값은 703.3 mg prot./g latex 로 가장 낮았고 pH 7일 때는 반응값이 765.6 mg prot./g latex로 가장 높은 값을 나타냈다(Fig. 3). 이상과 같이 독립 변수의 고정 에 따른 종속 변수의 반응값을 조사한 결과 효소 단백질이 가장 많이 추출되는 조건은 NaHSO₃ 농도 4%, 추출 시간 120분이었으며(Fig. 4) pH는 위의 모델식을 미분하여 pH 7.6의 최적 조건을 설정하였다. 이 최적 조건 하에서 crude papain을 추출하였을 때 종속 변수 값인 단백질 양은 793.16 mg prot./g latex였으며, 모델 식을 이용한 단백질 양의 예측치는 모델식에 각 독립 변수의 최적값을 대입하여 구하였고 실험치는 각 독립 변수의 최적값으로 실험을 수행하여 6회 반복 평균 값으로 구하였다. 6회 반복 평균값은 793.16 mg prot./g latex로서 예측치 795.60 mg prot./g latex와 유사한 값을 나타내 r=0.9951의 높은 상관 관계를 보였다.

요 약

식품공업과 의학, 의료, 화장품 등 많은 분야에서 널리 이용되고 있는 단백질 분해 효소의 하나인 papain을 papaya 유액으로부터 추출해내기 위한 최적 조건을 반응표면 분석법(RSM)을 이용하여 결정하였다. 중심 합성법에 의한 실험 계획을 설정하여 부분요인 실험법에 의하여 crude papain을 추출 및 분리하고 선정

된 독립 인자의 반응 표면에 대한 영향을 분석하여 다중 회귀 분석으로 다음과 같은 모델식(Y)을 얻었으며, EDTA는 다중 회귀 분석에 의하여 제거되었다.

$Y = 29.0630 - 2.5812X_1 + 149.3208X_2 + 13.1705X_1^2 + 0.0208X_2^2 - 9.8494X_1^2$. 따라서 이 결과 papain 추출은 NaHSO₃ 농도가 4%, 추출 시간은 120분, pH는 7.6일 때 최적 조건이 된다. 이러한 최적 추출 조건으로 얻은 효소 단백질 추출 양의 실험치는 793.16 mg prot./g latex로, 이는 효소 단백질 추출 예측치인 795.60 mg prot./g latex와 매우 근접한 값을 나타냄으로써 r=0.9951의 높은 상관 관계를 입증하였다.

문 헌

1. 정동효: 효소학 개론. 대광 서림, p.148 (1977)
2. Taylor, K.D.A. and Lewis, R.J.: *Food Additives Handbook*. Van Nostrand Reinhold Press, p.333 (1989)
3. Jasim, M.A., Halland, G.M. and Mann, J.: Enzymes in the food industry. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **40**, 251 (1987)
4. Fennema, O.R.: *Food chemistry*. Marcel Dekker. Inc., p. 400 (1985)
5. 이서래, 신효선: 최신식품화학. 신광출판사, p.212 (1988)
6. Kang, C.K. and Rice, E.E.: Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. *J. Food Sci.*, **35**, 563 (1970)
7. 萩原文二: 酵素研究法. 第 2卷, 赤堀糠, p.294 (1956)
8. Brocklehurst, K. and Little, G.: Reaction of papain and low molecular weight thiols with some aromatic disul-

- fides. *Biochem. J.*, **133**, 67 (1973)
9. Myers, R.H.: *Response Surface Methodology*. Allyn and Bacon Inc., Boston (1971)
 10. Box, G.E.P. and Wilson, K.B.: On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Roy. Statist. Soc., B* **13**, 1 (1951)
 11. Mudahar, G.S., Toledo, R.T., Floros, J.D. and Jen, J.J.: Optimization of carrot dehydration process using response surface methodology. *J. Food Sci.*, **54**(3), 714 (1989)
 12. Floros, J.D. and Chinnan, M.S.: Seven factor response surface optimization of a double stage lye (NaOH) peeling process for pimiento peppers. *J. Food Sci.*, **53**(2), 631 (1988)
 13. 김지용, 김종태, 김철진 : 육분 압출 가공시 이축 압출 성형기의 system parameter에 따른 압출물의 특성 변화. 한국식품과학회지, **23**, 88 (1991)
 14. 강규찬, 박재한, 백상봉, 진홍승, 이규순 : 반응 표면 방법에 의한 오미자 음료 제조의 최적화. 한국식품과학회지, **24**, 74 (1992)
 15. Burke, D.E., Lewis, S.D. and Shafer, J.A.: A two step procedure for purification of papain extract of papaya latex. *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 30 (1974)
 16. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
 17. A.O.A.C.: *Official Methods of Analysis*. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., p.342 (1990)

(1997년 1월 23일 접수)