

固定化 酵素를 利用한 명태고기풀 水洗液으로부터 Peptide 生産에 關한 研究

申錫雨 · 末綱邦男*

麗水水産大學校 食品工學科 · *下關水産大學校 食品工學科

Peptide Production from the Washing Liquid of the Fish Paste of Alaska pollak (*Theragra chalcogramma*) by Immobilized Enzyme

Suk-U SHIN and Kunio SUETSUNA*

Department of Food science and Technology, Yosu National Fisheries University, Yosu 550-749, Korea

*Department of Food Sience and Technology, Shimonoseki University of Fisheries, Shimonoseki 759-65, Japan

Peptides separated from fish paste washing liquid of an Alaska pollak (*Theragra chalcogramma*) were purified and characterized. The fish paste washing liquid (supernatant) was separated by centrifugation of fish paste homogenate. The fish paste washing liquid of 0.5% concentration was hydrolyzed for 24 hour at 50°C by immobilized protease in bioreactor and decomposing liquid of protein having 50% decomposing rate (OPA method) was obtained. The crude peptide fractions were obtained from this liquid by Dowex 50w (H⁺) column chromatography.

Purified peptides (SP-fraction peptides) were fractionated by using SP-Sepadex C-25 (H⁺) column chromatography. Molecular weights and amino acid compositions of these peptides were estimated by Sephadex G-50 column chromatography and HPLC, respectively.

When the washed peptides was eluated with 0.6~0.9% and 1.2~2.0% of NaCl, peptides composed of weakly basic amino acids and strongly basic amino acid were respectively eluted. Molecular weights of each peptide fractions showed the broad distribution from 1,000 Da to 3,000 Da in the order of SP-4>SP-3>SP-2>SP-1.

Peptides contained a large quantity of glycine, arginine, glutamic acid, and alanine in the washed peptide and its SP-fractions, respectively.

Key words : fish paste, immobilized protease, bioreactor, crude and purified peptides

서 론

최근 수산자원의 유효이용이 종종 검토되고 있는 가운데 고기풀 수세폐액, 통조림 공장의 자숙폐액, 어분사료 제조시의 탈수 폐액등 미이용 단백질의 식품원료화 및 그 응용에 대해 관심이 집중되고 있다 (Ninomiya et al., 1985, Oh et al., 1987, Kim et al., 1993, Shin et al., 1989, Kim et al., 1994). 이 중에서 어묵제조에 사용되는 냉동고기풀의 생산 공정에서 4~5회의 수세과정을 거치기 때문에 어체단백질 중 30~45%의 수용성 단백질이 용출되어 (Niki et al., 1985) 오수처리후 폐기되고 있는 실정이다 (Tagawa et al., 1976). 이들 단백질은 지방질이 혼재되어 있고 정미성이 약할 뿐만 아니라 어취가 강한 것이 문제되어 단순회수로서 이용하기는 곤란하지만 가수분해한 정제 추출물을 사용하여 조미료, 아미노산, peptide 등의 소재로 이용범위를 확대할 수 있다 (Suh et al., 1994).

근년 어패류 단백질을 이용한 단백질 농축물의 가공 (Suzuki et al., 1978, Lee et al., 1991a, 1991b, Kim and Ha et al., 1995) 및 기능성 peptide (Suetsuna and Osajima, 1986, 1989, Matumoto et al., 1994, Seki et al., 1993, Yeum et al., 1993, Kim et al., 1989; 1996)에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 식품가공에 있어서 단백질 분해는 효율이 좋고 값이 저렴하며 조작이 간편한 산분해법이 널리 이용되고 있지만 산분해의 경우 tryptophane, tyrosine 등의 방향족 아미노산이나 cysteine, methionine 등의 함유량 아미노산이 분해되어 유해물질이 생성되는 부반응이 일어나기 쉽고 염산을 사용하기 때문에 상품에 대한 인식이 좋지 않은 단점이 있다. 따라서 산분해법 대신에 효소분해법을 사용할 경우 아미노산이 분해되지 않는다는 이점이 있지만 산분해와 비교해서 효율이 낮고 효소가 회수되지 않아 생산비가 많이 들며 생산품에 쓴 맛을 남기는 단점이 있다. 이들 효소분해의 단점을 보완하기

이 논문은 1995년도 교육부 학술연구조성비 (해양·수산과학분야)에 의하여 연구되었음.

위해 고정화 효소를 사용함으로써 효소의 회수 및 반복 사용, 반응생성물의 고순도, 효소의 안정성 향상, 반응공정의 간단한 관리 및 효소당 생산성 증가 등 많은 이점이 있어 고정화 효소 bioreactor가 식품산업에 비상한 관심을 끌고 있다(Koseko et al., 1993). 본 연구에서는 고정화 효소 생물반응기를 이용하여 고기풀 수세액 단백질을 효소로 가수분해시켜 gel여과법 및 이온교환크로마토그래피법을 이용하여 peptide를 분리, 정제 하였으며, 그 특성을 조사하여 peptide 생산을 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

1. 고기풀 수세액 단백질의 조제

고기풀 제조에 가장 보편적으로 이용되는 Alaska pol-lak (*Theragra chalcogramma*)으로 제조된 동결 고기풀 (日本青葉化成製品)를 해동한 후 2차증류수에 침지, 수세하여 3회 원심분리 (8,000×g, 15분)한 다음 상등액을 분리하여 동결건조해서 공시료 (단백질 함량: 42.6%)로 하였다.

2. 효소의 고정화

千畑 (1975)의 방법에 따라 2% protease (한국 태평양 화학 製: 역가 70,000 pc/g) 130 ml에 chitopearl 담체 BGM-2510 (일본동양방직 製) 100 ml을 가해 4℃, 30분간 교반하였다. 그 후 2% glutaraldehyde (일본 和光純藥製) 130 ml을 가해 4℃, 60분간 교반하였다. 효소를 고정화한 chitopearl을 glass column (φ1.0×15.0cm)에 기포가 들어가지 않도록 채워 4시간 2차 증류수로 세정한 후 사용하였다.

3. 생물반응기에 의한 고기풀 수세액단백질의 가수분해

효소고정화법에 의한 고기풀 수세액 단백질의 가수분해는 Fig. 1과 같은 생물반응기 장치를 이용하여 수행하였다. 즉, 고정화 효소 22 ml (효소량 약 400 mg)을 내경 16 mm×120 mm의 jacket가 부착된 glass column에 채우고 생물반응기를 각각 37℃와 50℃로 조절한 0.5% (w/v) 고기풀 수세액 단백질 용액 500 ml을 유속 8 ml/min으로 순환시키면서 가수분해하였다. 생물반응기 운전 개시 0 분, 2시간, 6시간, 12시간, 24시간 간격으로 분취한 10 ml의 분해액을 10% TCA 용액 4 ml에 넣고 원심분리 (3,500 ×g, 20 min)하여 상층액 중의 저분자의 수용성 단백질량을 Lowry법 (Lowry et al., 1951)으로 측정하여 pro-

tease의 가수분해정도를 검토하였다. 또한 분해에 의해 생긴 peptide와 아미노산의 양은 ninhydrin법으로 측정하였으며, 단백질의 분해율은 Swaisgood et al. (1983)의 방법 (O-Phthalaldehyde, OPA법)에 준해서 전체 peptide 결합수에 대한 분해된 peptide 결합수의 비율을 측정하여 가수분해율 (%)을 계산하였다. 상기 실험을 토대로, 본 실험에 사용한 고기풀 수세액 단백질의 고정화 효소 생물반응기에 의한 가수분해는 50℃에서 6시간 순환시킨 효소분해액을 사용하였다.

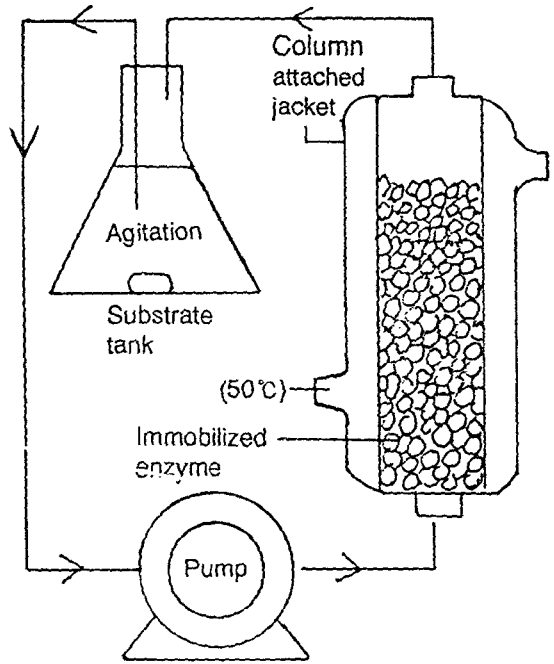


Fig. 1. Bioreactor system.

4. Dowex 50w (H⁺) column chromatography에 의한 조 peptide의 정제

생물반응기 장치에서 분해된 고기풀 수세액 단백질을 양이온 교환수지 Dowex 50w (H⁺ type, 50~100 mesh)가 충전되어 있는 column (φ4.5×20 cm)에 용해시킨 후 2차 증류수로 충분히 세정하여 2N-NH₄OH로서 peptide를 용출 (유속: 100 ml/hr)하였다. 감압농축에 의해 암모니아를 제거하고 동결건조해서 조peptide 분말을 얻었다.

5. SP-sephadex C-25 (H⁺) column chromatography에 의한 peptide의 정제

상기 조peptide 분말 2g을 2차 증류수 20 ml에 용해하여 SP-Sephadex C-25 (H⁺) column (φ1.7×46 cm)에 주입흡착시켜 탈이온수와 3% NaCl 용액 각 1ℓ로서 농도

구배하에서 용출분획 (분획량 : 10 ml, 유속 : 100 ml/hr) 하였다. 용출분획을 모아 동결건조하여 Fig. 2에서와 같이 정제 peptide 분말 (SP분획)을 얻었다.

6. Sephadex G-50 column chromatography에 의한 peptide의 분자량 측정

고기풀 수세액단백질, extract 및 정제 peptide 분말 (SP-분획) 각각 200 mg을 0.1 M 인산완충액 (pH 7.0)

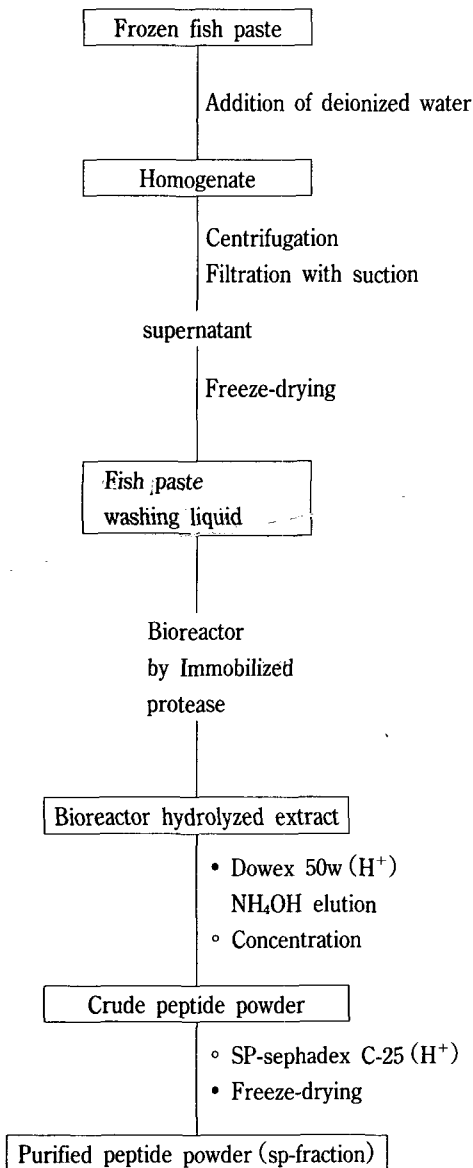


Fig. 2. Purification of peptides from hydrolysate by bioreactor system.

1 ml에 용해한 액을 Sephadex G-50 column (φ2.5×150 cm)에 넣고 0.1 M 인산완충액을 유속 30 ml/hr, 분획량 10 ml로 용출시켰다. Peptide의 분자량을 측정하기 위해 사용된 marker로서 cytochrom C (분자량 : 12,384Da), substance P (분자량 : 1,348Da), pepstatin A (분자량 : 687Da)을 이용하였다.

7. PICO-TAG™HPLC에 의한 아미노산 분석

정제 peptide 분말 (SP-분획) 용액 (200 ml/μl) 각각 20 μl에 6N HCl 200μl을 가해 봉관후 108°C, 24 hr 가수분해 하였다. 가수분해후 phenylisothiocyanate (PTC, 화광순약제)을 유도화제로 하여 PTC-아미노산을 생성시켜 HPLC에 의해 아미노산 조성을 분석하였다. Column은 PICO-TAG™ 역상 column (φ3.9×150 mm)을 사용하였으며, column 온도는 38°C, 이동상은 A용매로 6% acetonitril액을 이용하여 직선적 농도구배법으로 용출했다. 유속은 1 ml/min, 흡광도는 254 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 생물반응기에 의한 고기풀 수세액 단백질의 분해

Fig. 1에 나타낸 고정화 효소 생물반응기에 0.5% 고기풀 수세액 단백질을 상항류에 의해 순환시키면서 반응온도 37°C와 50°C에서 고기풀 수세액 단백질을 저속분해하였다. 분해개시 0분, 2시간, 6시간, 12시간, 24시간마다 분취하여 분해과정을 분석하였다. Fig. 3에 Lowry법에 의한 저분자 단백질량을 측정한 결과 분해개시 2시간 후에 TCA에 가용한 저분자 단백질량은 최대가 되어 protease에 의한 어육단백질의 분해는 급격하게 진행됨을 알 수 있었다. Fig. 4에 ninhydrine법에 의한 peptide, 아미노

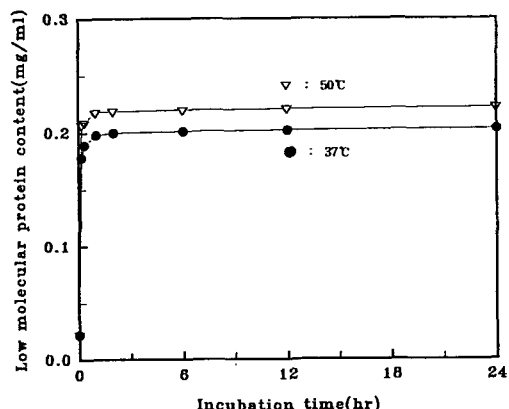


Fig. 3. Low molecular protein contents by Lowry method.

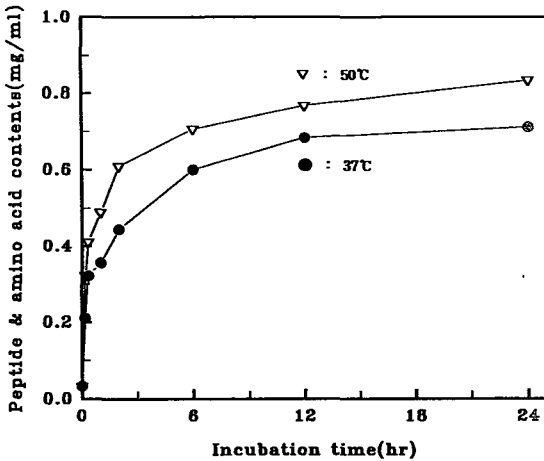


Fig. 4. Peptide and amino acid contents by Ninhydrine method.

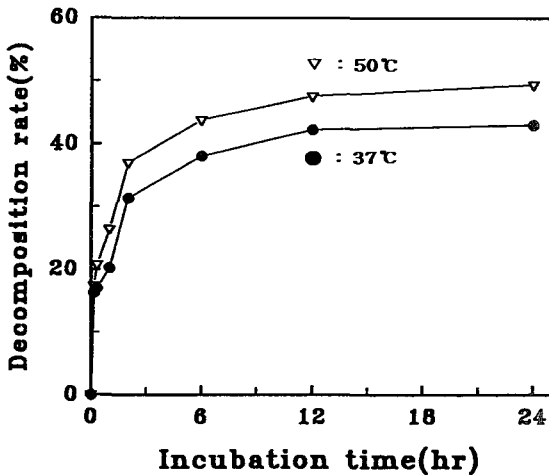


Fig. 5. Decomposition rate of protein by o-phthalaldehyde (OPA) method.

산 양을 측정 한 결과를 나타내었다. Peptide, 아미노산양은 분해개시 2시간째까지 급격히 진행하다가 그 이후 부터는 점진적으로 진행하여 24시간 이후에도 증가하는 경향을 보여, peptidase에 의한 단백질의 peptide, 아미노산으로의 분해가 진행중에 있음을 알 수 있었다. Fig. 5에 OPA법에 의한 단백질 분해율 (%)의 측정결과를 나타내었다. 반응온도 37°C와 50°C의 단백질 분해율은 각각 약 42%, 50%로 근소한 차를 보였고, 생성물의 중합도는 depeptide의 분해물이 얻어졌다. 이 결과로부터 분해개시 1시간 후 분해율의 증가경향은 depeptidase에 의한 것이며, Fig. 4~5를 통해 반응온도의 차이에 의한 분해 정도는 효소의 최적온도에 가까운 50°C가 37°C에 비해서 분해도가 높은 것으로 나타났다.

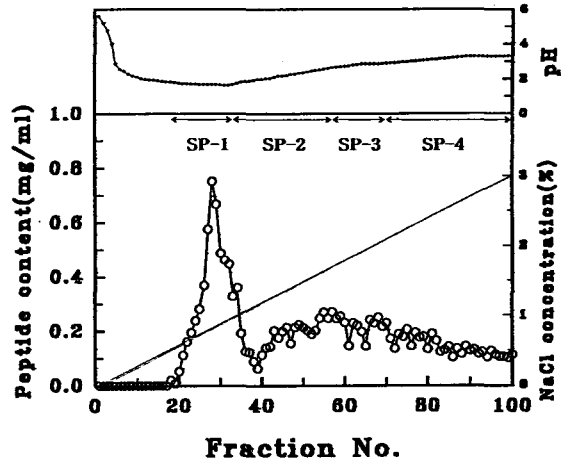


Fig. 6. Sp-Sephadex C-25 (H⁺) Column chromatogram of the washing crude peptide of the fish paste.

2. SP-sephadex C-25 (H⁺) column chromatography에 의한 peptide의 정제

생물반응기 분해액 (반응온도 50°C, 24시간)으로부터 peptide 성분을 정제하기 위해 강산성 양이온 교환수지 Dowex 50w (H⁺) column chromatography를 행하였다. 이 방법에 의해 분해액 중 약 30% 정도의 peptide 성분이 회수되어 분해액중의 유리아미노산은 거의 검출되지 않은 것으로 추정되었다. Dowex 50w (H⁺) column 흡착탈착 조작에 의해 얻어진 조 peptide 분말을 이용해 SP-Sephadex C-25 (H⁺) column chromatography에 의해 정제 peptide 분말을 얻었다. 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Fraction 번호 20~35를 용출분획 SP-1, 번호 36~61을 용출분획 SP-2, 번호 62~71을 용출분획 SP-3, 번호 72~100을 용출분획 SP-4로 분획하였다. 그 결과 용출시의 식염농도가 0.6% 이상에서 염기성이 약한 아미노산을 함유하는 peptide 분획 (SP-1 분획)이 용출되었고 0.9% 부근에서 최대량을 나타내었다. 그때의 pH는 2~2.5 정도로 낮았다. 또한 용출시의 식염농도가 1.2~2.0% 내에서는 염기성이 강한 아미노산을 함유한 peptide 분획이 용출되었고 pH는 2.0~3.2로 상승하였다.

3. Sephadex G-50 column chromatography에 의한 고기물 수세액단백질 및조peptide의 분자량 측정

Gel 여과 column chromatography에 의한 단백질과 peptide의 분자량 측정을 위해 marker로서 cytochrome C (분자량 12,384Da), substance P (분자량 1,348Da), pepsatin A (분자량 678Da)를 이용하였다.

고기물 수세액의 Sephadex G-50 column chromato-

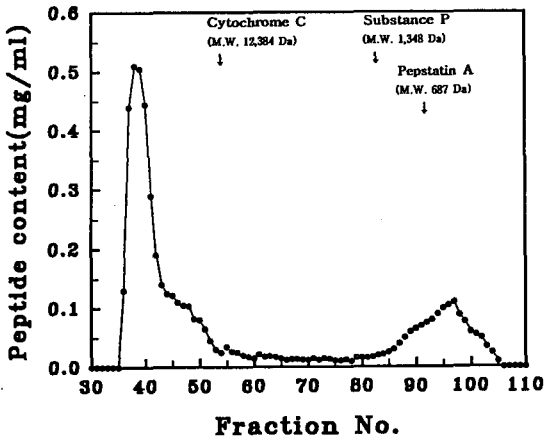


Fig. 7. Sephadex G-50 column chromatogram of the fish paste washing liquid.

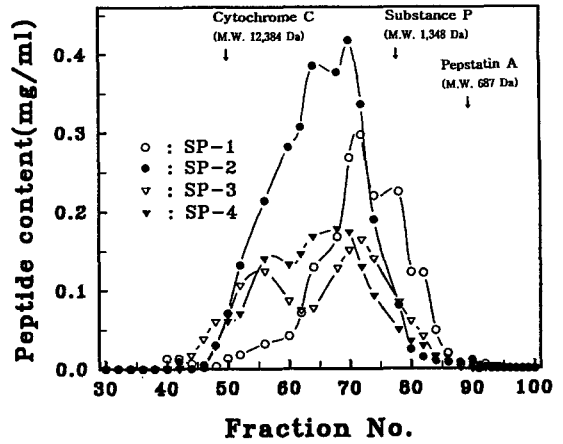


Fig. 9. Sephadex G-50 column chromatogram of the purified peptide powder (SP-fraction).

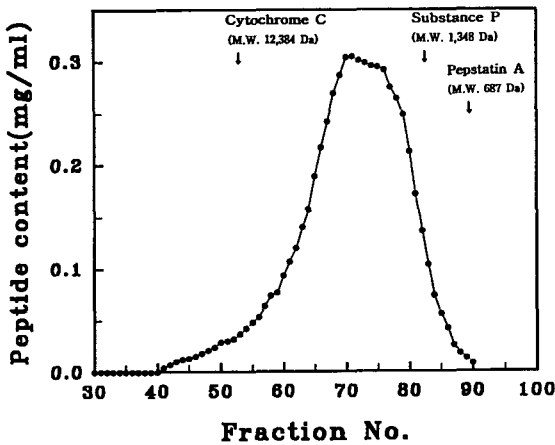


Fig. 8. Sephadex G-50 column chromatogram of the bioreactor hydrolyzed extract.

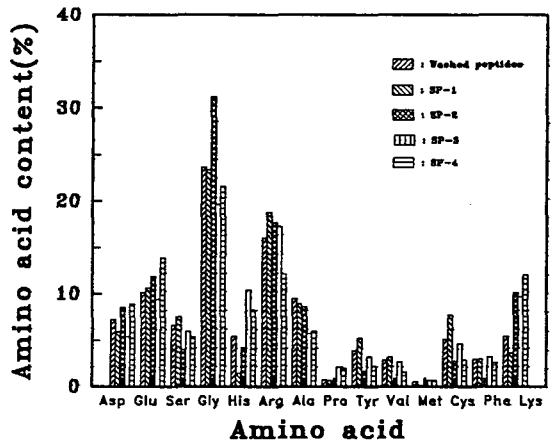


Fig. 10. Amino acid composition of the purified peptide powder (SP-fraction).

graphy를 Fig. 7에 나타내었다. 그 결과 고기풀 수세액 단백질은 Sephadex G-50의 최저배척 (排斥)한계로부터 분자량 4~5만을 peak로 하여 1~2만 까지의 분자량 분포를 나타내었고, 분자량 약 1,000Da 이하에서 200Da 정도의 저분자 peptide는 소량밖에 검출되지 않았다.

고기풀 수세액을 생물반응기에서 분해한 분해액 중에서 저분자 peptide를 분리하기 위한 gel여과로서 먼저 Dowex 50w (H⁺) column에 흡착탈착 처리한 조peptide 분획을 Sephadex G-50 column chromatography하여 Fig. 8에 나타내었다. 그 결과 분자량이 큰 것은 12,000Da, 적은 것은 600Da 정도의 폭넓은 분자량 분포를 나타내었고 대개 분자량 1,000~2,000Da의 peak가 0.3 mg/ml였다.

4. Sephadex G-50 column chromatography에 의한 정제된 peptide (SP-분획)의 분자량 측정

조 peptide 분획을 SP-Sephadex C-25 (H⁺) column chromatography에 의해 분리한 정제 peptide 분획 (SP-분획)에 대해 Sephadex G-50 column chromatography하여 분자량 측정을 행한 결과는 Fig. 9에 나타내었다. SP-1 peptide 분획의 분자량 peak는 비교적 저분자로 분자량 2,000Da 전후의 peak였고 SP-3 peptide 분획의 분자량 분포는 3,000Da 전후와 1,000Da 전후의 두개의 peak로 나누어졌다. 또한 SP-2, SP-4 분획의 peptide의 분자량 분포도 SP-1, SP-3과 거의 동일한 pattern으로 2,000Da 전후의 분자량 peak를 나타내었다.

5. HPLC에 의한 peptide SP-분획의 아미노산 조성 분석

PICO-TAG™HPLC에 의해 분석한 수세 및 SP-분획에 대한 peptide의 아미노산 조성을 분석한 결과는 Fig. 10에 나타내었다. 수세 및 SP-분획 peptide는 glycine, arginine의 함량이 각각 23%, 19%로 가장 많았고, 그의 glutamic acid, alanine, aspartic acid 등이 함유되어 있었다. SP-분획 1,2,3,4에서도 glycine과 arginine으로 수세 peptide와 거의 같았으며, SP-2에서 glycine의 함량이 33% 정도로 아미노산 중 가장 높았으나, SP-3,4에는 glutamic acid, histamin, lysine이 특징적으로 상당량 함유되어 있었다.

요 약

명태 (Alask pollack, *Theragria chalcogramma*) 고기풀 수세액 중의 단백질 활용방안으로 기능성 peptide 생산을 위해 고정화 protease를 이용한 생물반응기에서 가수분해하여 gel 여과후 정제 peptide의 특성 및 아미노산 존재 여부를 파악하기 위해 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 0.5% 농도의 고기풀 수세액을 반응온도 50°C에서 24시간 가수분해 하였을 때 분해율은 50% (OPA법)였다.

2. Sephadex G-50 column chromatography에 의한 고기풀 수세액과 조peptide의 분자량은 각각 10,000~50,000 Da과, 600~12,000Da의 광범위한 분포를 나타내었다.

3. SP-Sephadex C-25 (H⁺) column chromatography에서 식염농도 0~3%의 농도구배에서 0.6~0.9% NaCl, pH 2 범위에서 염기성이 약한 아미노산을 함유하였고, 1.2~2.0%에서는 염기성이 강한 아미노산을 함유하는 peptide가 용출되었다.

4. SP-Sephadex C-25 (H⁺) column chromatography에서 분획한 SP-분획을 Sephadex G-50 colum chromatography에서 peptide의 분자량 측정 결과는 대개 저분자로 분자량 1,000Da에서 3,000Da 범위였고, SP-4>SP-3>SP-2>SP-1의 순으로 분자량 분포를 나타내었다.

5. 정제 peptide의 아미노산 조성은 수세 peptide에서 glycine, arginine이 가장 많이 함유하였으며 그의 glutamic acid, alanine, aspartic acid 등이었고, SP-분획 peptide는 수세 peptide와 대동소이하였으나 SP-2에서 glycine이 33%로 가장 높았다.

참 고 문 헌

Kim, K. S., B. S. Ha, T. J. Bae, J. H. Jin and H. J. Kim. 1993a.

Comparison of food components in the raw, cooked meat and cooked meat extracts of cockle shell. 1. Proximate compositions and lipid components. Bull. Korean Fish. Soc., 26 (2), 102~110.

Kim, K. S., B. S. Ha, T. J. Bae, J. H. Jin and H. J. Kim. 1993b. Comparison of food components in the raw, cooked meat and cooked meat extracts of cookle shell. 2. Nitrogenous compounds and minerals. Bull. Korean Fish. Soc., 26 (2), 111~119.

Kim, S. B., D. M. Yeum, S. G. Yea, C. I. Ji, Y. W. Lee and Y. H. Park. 1989. Antioxidative effects of Food protein hydrolysates by protease. Korean J. food Sci. Technol., 21 (4), 492~497.

Kim, S. K., H. C. Lee, H. G. Byun and Y. J. Jeon. 1996. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. J. Korean Fish. Soc., 29 (2), 246~255.

Kim, S. M. and J. U. Ha. 1995. Utilization of the protein hydrolysates of skipjack Tuna Visce. Korean J. food Sci Technol., 27 (2), 141~146.

Kim, W. J., T. J. Bae, J. D. Choi, J. H. Choi and M. H. Ahn. 1994. A study of exploiting raw material of seasoning by using fish and shells. 1. On composition of seasoning materal in cooking by-product. Bull. Korean Fish. Soc., 27 (3), 259~264.

Koseko, S., M. Hisamatsu, M. Matsunaga and T. Yamada. 1993. Study on soy sauce production from soy sauce-Moromi Mash by using bioreactor systems. Nippon shokuhin kogyo Gakkaishi, 40 (8), 558~567.

Lee, S. W., D. S. Joo, J. S. Kim, P. H. Kim and E. H. Lee. 1991a. A study on the processing of sardine protein concentrate with good rehydration capacity. 1. Processing and product quality of sardine protein concentrate. Bull. Korean Fish. Soc., 24 (2), 137~143.

Lee, S. W., D. S. Joo, J. S. Kim, C. B. Ahn and E. H. Lee. 1991b. A study on the processing of sadine protein concentrate with good rehydration capacity. 2. Changes of quality in sardine protein concentrate during storage and its utilization. Bull. Korean Fish. Soc., 24 (2), 144~151.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 165~275.

Matsumoto, K., A. Ogikubo, T. Yoshino, T. Matsui and Y. Osajima. 1994. Separation and purification of angiotensin-1 converting enzyme inhibitory peptide in peptic hydrolysate of oyster. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 41 (9), 589~594.

Niki, H. T. Kato, E. Deya and S. Igarashi. 1985. Recovery of protein from effluent of fish meat in producing surimi and utilization of recovered protein. Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 51 (6), 959~964.

Ninomiya, K., T. Ookawa, T. Tsuchiya and J. Matsumoto.

1985. Recovery of water soluble proteins in waste wash water of fish processing plants of ultrafiltration. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 51 (7), 1133~1138.
- Oh, K. S., E. H. Lee, M. C. Kim and K. H. Lee. 1987. Antioxidative activities of skipjack meat extract. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 20 (5), 441~446.
- Shimizu, Y., and K. Ikeda. 1979. Precipitation of saroplasmic proteins of red-meat fish caused by interaction with myofibrils at low ionic strengths. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 45 (4), 533~536.
- Shin, S. U., K. J. Jung, S. W. Kim and S. H. Park. 1989. Identification of the protease producing bacteria to use fish meal wastewater and the producing conditions for the enzyme. *Bull. Korean. Fish. Soc.*, 22 (3), 138~146.
- Suetsuna, K. and K. Osajima. 1986. The inhibitory activities against angiotensin-1 converting enzyme of basic peptides originating from sardine and Hair Tail meat. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52 (11), 1981~1984.
- Suetsuna, K. and K. Osajima. 1989. Blood pressure reduction and vasodilatory effects in vivo of peptides originating from sardine muscle. *J. Japan Soc. Nutr. and Food Sci.*, 42 (1), 47~54.
- Suh, J. S., S. Y. Cho, K. T. Son, J. S. Kim and E. H. Lee. 1994. Recovery and utilization of proteins and lipids from the washing wastewater in marine manufacture by isoelectric point shifting precipitation method. 2. Utilization of the recovered proteins as the material of a processed food. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 27 (5), 495~500.
- Suzuki, T., K. Kanna and T. Yagi. 1978. Manufacture of meat-texture fish protein concentrate from Alaska Pollack. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 44 (7) 781~788.
- Swaigood, H. E., F. C. Church, D. H. Porter and G. L. Catignani. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.*, 66, 1219.
- Tagawa S., M. Kochi, Y. Oba and K. Yamada. 1976. A note on the removal of constituents of the wastewater discharged from mackerel canning plants by the method of pH shifting. *J. Shimonoseki Univ. Fish.*, 25 (1), 75~82, 1976.
- Yeum, D. M., T. G. Lee, J. R. Do, O. K. Kim, Y. B. Park, S. B. Kim and Y. H. Park. 1993. Characteristics of angiotensin-1 converting enzyme inhibitors derived from fermented fish product. 2. Characteristics of angiotensin-1 converting enzyme inhibitors of fish sauce prepared from sardine, *sardinops melanosticta*. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 26 (5), 416~423.
- 千畑一郎. 1975. 固定化酵素, 固定化酵素および固定化微生物の製法. 日本 講談社, pp. 9~85.

1996년 12월 5일 접수

1997년 5월 8일 수리