

액상 요구르트 제조시 발효지연과 Na-Caseinate 분해물의 첨가에 의한 개선

소 명 환

부천전문대학 식품영양과

Retarded Fermentation in Making Liquid-Yoghurts and Improvement by Addition of Na-Caseinate hydrolysates

Myung-Hwan So

Department of Food and Nutrition, Bucheon Junior College, Bucheon 421-735, Korea

Abstract

This study was carried out to clear up the cause of low-acid producing phenomenon occurred in non-fat dry milk during liquid-yoghurt fermentation by *Lactobacillus casei*, and to present its improving methods. All samples of non-fat dry milks which were low in TCA-soluble peptides showed low-acid production, but those high in TCA-soluble peptides showed high-acid production. The addition of trypsin-hydrolysate of Na-caseinate to non-fat dry milk showed some improving effect on acid production but that of papain-hydrolysate did not show any improving effect and that of bacterial neutral protease-hydrolysate showed some inhibitory effect. The improving effects on growth and acid production of lactic acid bacteria were more prominent when the trypsin-hydrolysate of Na-caseinate was added to such fermenting system in which the levels of TCA-soluble peptides and the proteolytic ability of starter bacteria were abnormally low. The liquid-yoghurt made with non-hydrolysed Na-caseinate and defective non-fat dry milk showed precipitate occurrence but that with trypsin-hydrolysate of Na-caseinate and defective non-fat dry milk did not make any precipitate during storage as with normal non-fat dry milk.

Key words : liquid-yoghurt, dry milk, pepides

서 론

액상요구르트는 탈지유에 산생성 능력이 높고 내산성이 강한 젖산균을 접종하고 다량의 젖산이 생산될 때까지 비교적 장기간 배양한 후 음용에 적합하도록 회석 및 조미한 것이다¹⁾.

이 제품은 액상의 음료이므로 유통중에 유단백질의 침전이 발생하지 않아야 한다. 친수성 콜로이드로 된 안정제의 첨가로 유단백질의 침전을 막을 수도 있지만²⁾ 유단백질의 분해 및 변성을 최소화 하고 등전점 이하의 pH를 유지시켜 주면 양으로 하전된 단백질 분자간의 반발력으로 안정제의 첨가 없이도 유단백질의 침전

발생을 막을 수 있다^{3, 4)}.

이러한 조건을 갖게 하기 위해서는 사용하는 젖산균 starter의 특성이 이에 적합하여야 한다. 즉, 단백질 분해능력이 높지 않고, 내산성이 강하고, 산생성 한계치가 높은 균주를 선택하여야 한다^{4, 5)}. 그러나 우유에는 젖산균이 증식하는 데 충분할 정도의 유리아미노산과 저분자 peptides가 존재하지 않으므로^{6, 7)} 젖산균의 단백질 분해능력이 낮으면 증식과 산생성이 억제된다^{4, 5, 8)}.

유제품 제조에 이용되는 젖산균들은 비록 활성이 낮은 하지만 세포벽에 부착된 proteinase를 보유하고 있으므로⁹⁾ 이것으로 우유단백질의 일부를 저분자 peptides로 분해시킨다. 생성된 저분자 peptides는 peptide permease^{10, 11)}와 peptidase^{12, 13)}의 작용으로 생

Corresponding author : Myung-Hwan So

육에 잘 이용되기 때문에 젖산균들은 유리상태의 아미노산들보다 저분자 peptides를 더 잘 이용하는 특성이 있다¹⁴⁻¹⁶⁾.

현재 우리나라의 액상요구르트 제조에서도 단백질 분해능력이 높지 않은 균주를 사용하고, 발효액의 pH가 3.5이하가 될 때까지 장기간 발효하는 방법으로 안정제의 첨가 없이도 침전발생이 없는 제품을 생산하고 있는 경우가 많다⁵⁾. 이 경우에 원료유 중에 유리아미노산과 저분자 peptides의 함량이 지나치게 낮을 경우에는 심각한 발효지연 현상이 나타날 것으로 생각된다. 특히, 여러 원인으로 starter의 단백질 분해능력이 약화되었을 때에는¹⁷⁻¹⁹⁾ 이러한 발효지연 현상이 더욱 크게 나타날 것이다.

실제 액상요구르트의 제조시에는 발효지연 현상이 가끔 나타나고 있는 실정이며 이는 생산현장에서 격게 되는 큰 어려움 중의 하나이다. 저자는 이러한 발효지연 현상의 주 원인을 규명하고 해결방안을 검토하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 탈지분유

국내의 유업체에서 생산되어 시판중인 것을 1994년 2월 중에 슈퍼마켓에서 구입하였다.

2. 젖산균

Lactobacillus casei E는 시중의 액상요구르트에서 분리하여 *Lactobacillus casei*로 동정된⁵⁾ 후 본대학의 미생물실험실에 보존중인 정상적인 균주이다.

Lactobacillus casei E1은 *Lactobacillus casei* E를 우유에서 계대배양하는 중에 나타난 변이주로 모균주보다 산생성 능력이 낮고 단백질 분해능력이 낮다.

3. 총단백질 및 TCA-soluble peptides 함량 측정

총단백질 함량은 Kjeldahl 질소 측정법²⁰⁾으로 질소 함량을 측정한 후 질소계수 6.38을 곱하여 구하였다.

TCA(trichloroacetic acid)-soluble peptides의 함량은 Hull²¹⁾의 방법에 준하여 5% 탈지환원유 5ml에 5% TCA 용액 15ml를 가하고 잘 혼합한 후 실온에서 20분간 방치한 다음 여과지(Whatman No. 5)

로 여과한 후 여과액을 Folin-Lowry법^{22, 23)}에 준하여 발색시켜 660nm에서의 OD값을 측정하였다. 이를 TCA-soluble peptides의 양으로 나타낼 때는 이와 동일한 OD값을 나타내는 casein의 양(%)으로 표시하였다.

4. Na-caseinate 분해물의 제조

5% Na-caseinate 용액 100ml에 trypsin(Novo Industrias Co. 2250 NF/mg), papain(Novo Industrias Co. 3.5 m Anson unit /mg) 또는 세균성 중성 protease(Novo Industrias Co. 1.5 Anson unit /g) 10mg을 가하고 40에서 3시간 가수분해시킨 후 진공건조하여 수분함량 10% 내외가 되게 하였다. 분해물 중 5% TCA 용액에 가용성인 것이 trypsin으로 분해한 것은 96%, papain 또는 세균성 중성 protease로 분해한 것은 99%이었다.

5. 배양 및 액상요구르트의 제조

Fig. 1에 도시된 바와 같이 10% 탈지환원유 용액에 포도당 3%와 Na-caseinate 분해물 또는 미분해물 5%를 가하고 2l 삼각플라스크에 1.5l 씩 넣고 솜마개를 한 후 110°C에서 15분간 멸균하고 곧 37°C로 냉각하여 젖산균 starter 0.2%를 접종한 다음 37°C에서 5일간 배양하여 요구르트 원액을 제조하였다. 액상요구르트를 만들 때에는 TA(titrable acidity)가 1.80%에 도달했을 때 배양을 완료하고 균질기를 사용하여 1단 150kg/cm², 2단 50kg/cm²의 조건으로 균질시

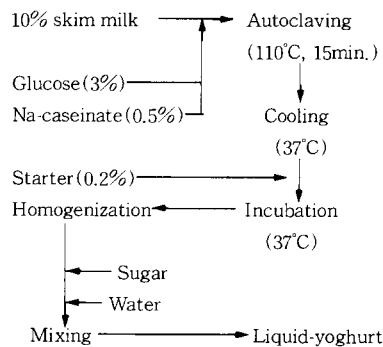


Fig. 1. Flow diagram for the preparation of liquid-yoghurt.

킨 후 균질액 100g에 대하여 설탕 45g과 이온교환수 155g을 가하여 유고형분 3.4%, TA 0.6%, 설탕 15%의 조성이 되도록 하였다.

6. 균수 및 TA 측정

젖산균 생균수 측정은 BCP agar(peptone 5g, yeast extract 2.5g, glucose 1g, tween 80 1g, L-cystein 0.1g, bromcresol purple 0.02g, agar 15g, distilled water 1000ml, pH 6.9)를 사용하여 평판계수법²⁴⁾으로 측정하였고, TA(titrable acidity)의 측정은 0.1N-NaOH로 중화적정하여 젖산의 함량(%)으로 나타내었다.

7. 액상요구르트의 단백질 안정성 측정

액상요구르트 20ml를 직경 12mm의 시험관에 넣고 cap을 씌운 후 5°C의 냉장고에 일정기간 보관한 후 상층액 10ml를 조심스럽게 취해내어 상층액 및 액상요구르트의 단백질 함량을 Folin-Lowry법^{22, 23)}으로 측정하고 다음식에 의하여 단백질의 안정도를 계산하였다.

$$\text{안정도}(\%) = \frac{\text{상층액 1ml 중의 단백질양}}{\text{액상요구르트 1ml 중의 단백질양}} \times 100$$

결과 및 고찰

1. 탈지분유의 TCA-soluble peptides 함량과 젖산균의 산생성

여러 탈지분유 sample의 총단백질 함량과 TCA-soluble peptides 함량 및 이들 각각으로 제조한 요구르트 원액의 TA를 측정한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에서 보면 탈지분유의 TCA-soluble peptides 함량은 발효유 제조시 TA의 함량과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. 즉, TCA-soluble peptides의 함량이 높은 탈지분유는 산생성량이 높고 TCA-soluble peptides의 함량이 낮은 탈지분유는 산생성량이 낮다.

탈지분유 시료번호 4번 및 7번의 경우에서와 같이 총단백질의 함량이 높더라도 TCA-soluble peptides의 함량이 낮으면 산생성량이 낮고, 반면 총단백질의

양이 높지 않더라도 TCA-soluble peptides의 함량이 높으면 산생성량이 높다.

발효유 제조회사에서 액상요구르트를 제조할 때에 유단백질의 함량이 정상적이고 항생물질의 검출에서도 정상이면서 산생성이 억제되는 산생성 불량분유를 종종 접하게 되는데 본 실험의 결과는 이러한 산생성 불량분유의 특성을 설명하는 좋은 자료가 되리라 생각한다.

2. Protease의 종류에 따른 Na-caseinate 분해물들의 산생성 촉진효과

앞의 실험에서 탈지분유의 TCA-soluble peptides의 함량이 액상요구르트의 제조시에 산생성에 영향을 미치는 중요한 인자이었으므로(Table 1), 요구르트 제조 시에 TCA-soluble peptides의 함량을 인위적으로 높여주면 산생성이 촉진될 것으로 생각되어 이것의 확인실험을 하였다.

즉, 요구르트제조시에 통상적으로 첨가하고 있는 Na-caseinate를 여러종류의 protease로 분해시킨 후 이를 정상적인 10% 탈지환원유에 0.5% 첨가하고 산생성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2).

Table 1. The contents of TCA-soluble peptides in samples of non-fat dry milks and acid production by *Lactobacillus casei* E

Sample No.	Total protein(%)	TCA-soluble peptides(%)	TA of yoghurt(%)
1	37.0	3.65	1.85
2	36.7	3.52	1.80
3	36.5	3.63	1.85
4	35.5	3.61	1.83
5	36.4	3.70	1.90
6	37.2	3.68	1.90
7	36.8	2.55	1.58
8	36.0	3.41	1.80
9	36.1	3.11	1.71
10	36.6	3.27	1.75
11	37.1	3.66	1.86
12	36.4	3.30	1.77
13	36.6	2.61	1.60
14	36.3	3.48	1.82

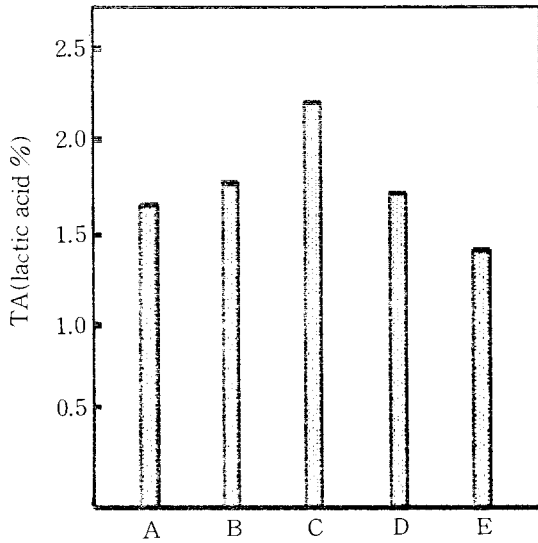


Fig. 2. Titrable acidity of yoghurts affected by the addition of Na-caseinates hydrolysed with different proteases.

A : 10% non-fat dry milk + 3% glucose
 B : A + 0.5% non-hydrolysed Na-caseinate
 C : A + 0.5% trypsin-hydrolysate of Na-caseinate
 D : A + 0.5% papain-hydrolysate of Na-caseinate
 E : A + 0.5% bacterial neutral protease-hydrolysate of Na-caseinate

Na-caseinate 미분해물 첨가는 미첨가에 비하여 산생성을 약간 촉진시켰고, Na-caseinate의 trypsin 분해물 첨가는 산생성을 현저히 촉진시켰다. 그러나 Na-caseinate의 파파인 분해물은 촉진효과가 거의 나타나지 않았고, 세균성 중성 protease 분해물은 억제 효과를 나타내었다.

Trypsin 분해물이 젖산균의 산생성을 크게 촉진시킨 것은 이 분해물 중에 젖산균의 증식을 촉진시키는 특수한 peptides 즉, streptogenin¹⁴⁾이 존재하고 있음을 의미하며, 이 물질이 젖산균의 permease에 의하여 쉽게 세포내로 수송되었기 때문인 것으로 생각된다.

또 세균성 중성 protease로 분해시킨 것이 산생성을 억제한 것은 이 분해물 중에 다른 peptides 또는 amino acids의 흡수를 경쟁적으로 억제하는 peptides

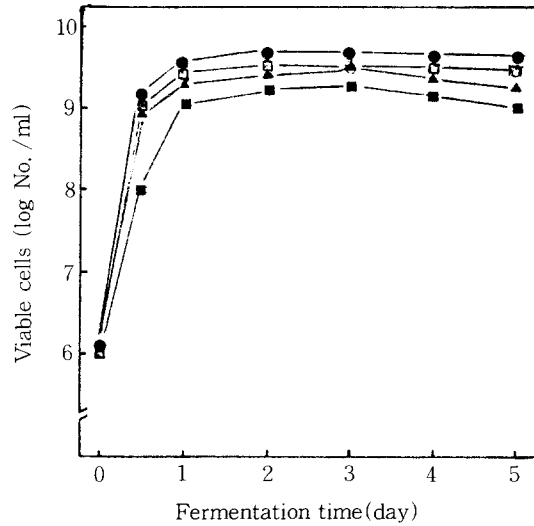


Fig. 3. Changes in viable cells during yoghurt fermentation with normal starter in normal milk or in defective milk supplemented with trypsin-hydrolysate of Na-caseinate.

● : normal milk + trypsin-hydrolysate of Na-caseinate, ▲ : normal milk + non-hydrolysed Na-caseinate, □ : defective milk + trypsin-hydrolysate of Na-caseinate, ■ : defective milk + non-hydrolysed Na-caseinate.

Normal starter was the culture of *Lactobacillus casei* E. Normal milk and defective milk were sample No. 1 and No. 2, respectively in Table 1.

또는 amino acids가 함유되어 있기 때문인¹⁶⁾ 것으로 해석된다.

3. Na-caseinate의 trypsin 분해물 첨가에 의한 산생성 불량분유의 개선

산생성이 불량한 분유는 TCA-soluble peptides 함량이 정상적인 분유보다 낮았고 (Table 1), Na-caseinate의 trypsin 분해물이 젖산균의 산생성을 촉진시키는 효과를 나타내었으므로 (Fig. 2), TCA-soluble peptides의 함량이 부족한 산생성 불량분유에 Na-caseinate의 trypsin 분해물을 첨가하면 개선 효과가 크게 나타날 것으로 생각되어 이의 확인 실험을 하였다.

Fig. 3에서 젖산균의 증식을 보면 정상분유 (Table

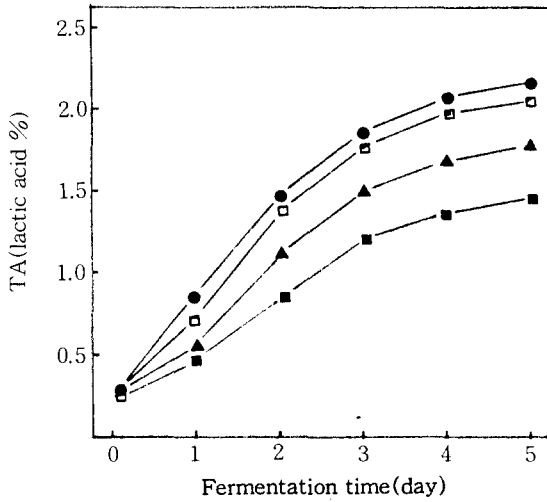


Fig. 4. Changes in titrable acidity during yoghurt fermentation with normal starter in normal milk or in defective milk supplemented with trypsin-hydrolysate of Na-caseinate.

—●— : normal milk+trypsin-hydrolysate of Na-caseinate, —▲— : normal milk+non-hydrolysed Na-caseinate, —□— : defective milk+trypsin-hydrolysate of Na-caseinate, —■— : defective milk+non-hydrolysed Na-caseinate.

Normal starter, normal milk and defective milk were the same as described in Fig. 3.

1의 시료번호 7번)는 Na-caseinate 미분해물 첨가시에는 매우 지연되었으나 Na-caseinate 분해물 첨가시에는 지연현상이 현저히 개선되어 정상분유 이상의 수준으로 증식하였다.

Fig. 4에서 산생성을 보면 정상분유에서는 Na-caseinate 분해물 첨가가 미분해물 첨가보다 약간 촉진되었다. 불량분유에 Na-caseinate 미분해물 첨가는 산생성이 매우 지연되었으나 Na-caseinate 분해물 첨가는 지연현상이 크게 개선되어 정상분유 이상의 수준으로 산생성이 이루어졌다.

4. Na-caseinate의 trypsin 분해물 첨가에 의한 불량 starter의 증식 및 산생성 촉진

요구르트 제조에 사용되는 젖산균을 계속하여 계대

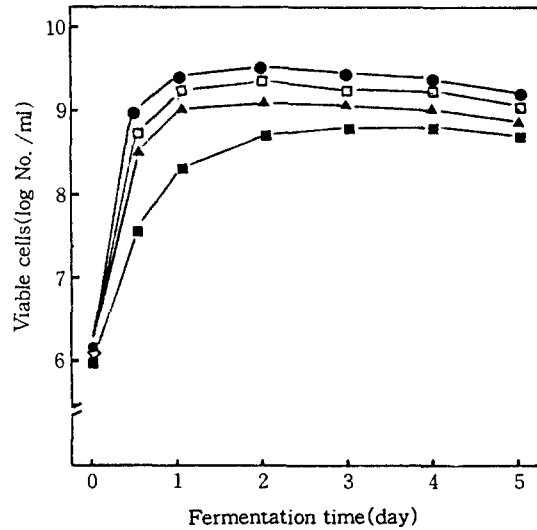


Fig. 5. Changes in viable cells during yoghurt fermentation with defective starter in normal milk or in defective milk supplemented with trypsin-hydrolysate.

—●— : normal milk+trypsin-hydrolysate of Na-caseinate, —▲— : normal milk+non-hydrolysed of Na-caseinate, —□— : defective milk+trypsin-hydrolysate of Na-caseinate, —■— : defective milk+non-hydrolysed Na-caseinate.

Defective starter was the culture of *Lactobacillus casei* E1 which had abnormally low-proteolytic ability, induced as a variant from the normal strain *Lactobacillus casei* E.

Normal milk and defective milk were the same as described in Fig. 3.

배양할 경우에 산생성 능력이 낮아지는 불량 starter가 되는 경우를 종종 경험한다. 이 경우에 starter의 젖산균을 분리하여 젖산균의 단백질 분해능력을 조사해 보면 단백질 분해활성이 낮아진 경우를 흔히 볼 수 있다. 이러한 불량 starter로서 요구르트를 제조할 때에 Na-caseinate의 trypsin 분해물 첨가는 젖산균의 증식과 산생성을 매우 촉진시킬 것으로 생각되어 그 효과를 확인해 보았다.

Fig. 5에서 젖산균의 증식을 보면 Na-caseinate 분

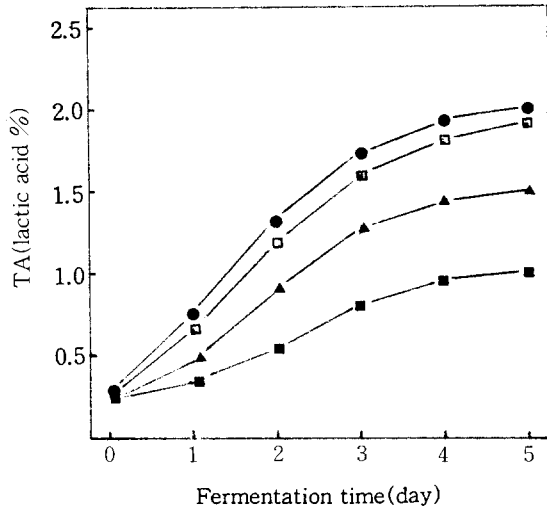


Fig. 6. Changes in viable cells during yoghurt fermentation with defective starter in normal milk or in defective milk supplemented with trypsin-hydrolysate of Na-caseinate.

● : normal milk + trypsin-hydrolysate of Na-caseinate, ▲ : normal milk + non-hydrolysed Na-caseinate, □ : defective milk + trypsin-hydrolysate of Na-caseinate, ■ : defective milk + non-hydrolysed Na-caseinate.

Defective starter, normal milk and defective milk were the same as described in Fig. 5.

해물의 첨가는 불량 starter의 증식을 촉진시켜주는데 특히, TCA-soluble peptides의 함량이 낮은 불량분유에서 그 촉진효과가 크게 나타났다.

이것은 불량분유는 젖산균이 이용할 수 있는 저분자 peptides가 부족하고, 또 젖산균 자체의 단백질 분해 능력도 낮아서 이들 두요인이 결정적인 증식장애 요인으로 작용하고 있는 발효계에 Na-caseinate의 trypsin 분해물 첨가는 젖산균의 증식에 필요한 저분자 peptides를 크게 보충해 주는 효과를 주었기 때문이라고 생각된다.

Fig. 6에서 산생성을 보면 Na-caseinate의 trypsin 분해물 첨가는 불량 starter의 산생성을 촉진시켜 주는데 특히, 불량분유에서 촉진 효과가 크게 나타났다.

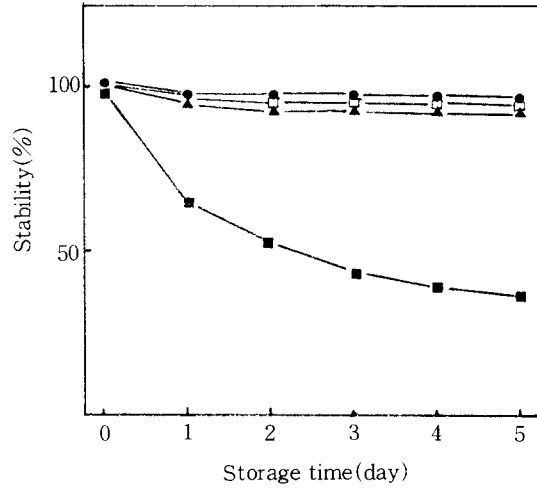


Fig. 7. Protein stability during storage of liquid yoghurds fermented with normal milk or with defective milk supplemented with trypsin-hydrolysate of Na-caseinate.

● : normal milk + trypsin-hydrolysate of Na-caseinate, ▲ : normal milk + non-hydrolysed Na-caseinate, □ : defective milk + trypsin-hydrolysate of Na-caseinate, ■ : defective milk + non-hydrolysed Na-caseinate.

Normal milk and defective milk were the same as described in Fig. 3.

5. Na-caseinate trypsin 분해물 첨가가 액상요구르트의 침전발생에 미치는 영향

정상적인 탈지분유와 불량탈지분유에 Na-caseinate 미분해물 또는 trypsin 분해물을 각각 첨가하고 정상적인 starter를 접종하여 37°C에서 5일간 배양시킨 후 균질 및 가당하여 액상요구르트를 제조하고 이를 5°C의 냉장고에 보관하면서 유단백질의 현탁 안정성을 조사해 보았다(Fig. 7).

정상탈지분유에 Na-caseinate 분해물 또는 미분해물을 첨가한 것은 모두 유단백질이 높은 안정성을 유지하였고 침전도 발생하지 않았다. 불량탈지분유에 Na-caseinate 미분해물을 첨가한 것은 유단백질의 안정성이 낮고 침전이 발생하였으나 Na-caseinate 분해물을 첨가한 것은 정상적인 탈지분유의 경우와 마찬가지로

지로 높은 안정성을 유지하고 침전 발생도 없었다.

불량탈지분유에 Na-caseinate 미분해물을 첨가한 것에서 유단백질의 안정성이 낮은 것은 산생성이 정상적으로 이루어 지지 않아서 유단백질을 등전점 이하에서 양으로 충분히 하전시킬 정도의 산성 pH를 유지하여 주지 못했기 때문인 것으로 생각된다.

요 약

액상요구르트의 제조시에 분유에 의한 산생성불량의 원인을 규명하고 이의 개선방법을 검토하였다. TCA-soluble peptides의 함량이 낮은 탈지분유는 모두 요구르트 제조시에 산생성이 불량하였고, TCA-soluble peptides의 함량이 높은 탈지분유는 모두 산생성이 양호하였다. TCA-soluble peptides의 함량이 낮은 불량탈지분유에 Na-caseinate의 trypsin 분해물 첨가는 젖산균의 산생성을 촉진시켰다. 그러나 Na-caseinate의 papain 분해물 첨가는 촉진효과를 나타내지 못했고, 세균성 중성 protease 분해물의 첨가는 억제 효과를 나타내었다. Na-caseinate의 trypsin 분해물 첨가는 탈지분유의 TCA-soluble peptides 함량이 낮고 starter 젖산균의 단백질 분해능력이 약할 경우에 젖산균의 증식 촉진효과와 산생성 촉진효과가 크게 나타났다. TCA-soluble peptides의 함량이 부족한 탈지분유에 Na-caseinate 미분해물을 첨가하여 발효시킨 액상요구르트는 유단백질의 침전이 발생하였으나, Na-caseinate의 trypsin 분해물을 첨가하여 제조한 것은 정상적인 탈지분유에서와 같이 단백질의 침전이 발생하지 않았다.

감사의 글

본 연구의 수행에 한국야쿠르트유업(주)의 도움을 입은 바 크므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김영교, 김영주, 김현욱 : 우유와 유제품의 과학, 신진분화사, P. 334(1979)
2. Dickinson, E. and G. Stainsby : *Collids in Food*, Applied Science Publishers, London, P. 98~100(1982)
3. Rasic, J. L. and J. A. Kurmann : *Yoghurt*, Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, P. 62(1978)
4. 소명환 : 액상발효유 제조시 유산균 starter의 단백질 분해능이 산생성 및 침전발생에 미치는 영향, 한국산업미생물학회지, 17(3), 285(1984)
5. 소명환 : 국내 액상발효유에서 분리한 유산균의 제품제조 적성, 한국식품과학회지, 17(3), 197(1985)
6. Alm, L. : Effect of fermentation on protein of Swedish fermented milk products, *J. Dairy Sci.*, 65(9), 1696(1982)
7. Thomas, T. D. and O. E. Mills : Proteolytic enzymes of starter bacteria, *Neth. Milk Dairy J.*, 35, 225(1981)
8. Singh, J. and A. K. Chopra : Accelerated fermentation of milk by nitrosoguanidine induced mutants of *Lactobacilli*, *J. Food Sci.*, 47, 1027(1982)
9. Law, B. A. and J. Kolstad : Proteolytic systems in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 225(1983)
10. Rice, G. H., F. H. C. Stewart, A. J. Hillier and G. R. Jago : The uptake of amino acids and peptides by *Streptococcus lactis*, *J. Dairy Res.*, 45, 93(1978)
11. Konings, W. N. and R. Otto : Energy transduction and solution transport in *Streptococci*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 247(1983)
12. Law, B. A. : Peptide utilization by group-N *Streptococci*, *J. Gen. Microbiol.*, 105, 113(1978)
13. Soda, M. E., J. L. Bergere and M. J. Desmazeaud : Detection and localization of peptide hydrolases in *Lactobacillus casei*, *J. Dairy Res.*, 45, 519(1978)
14. Kihara, H. and E. E. Snell : Peptides and bacterial growth(VIII), The nature of streptogenin, *J. Biol. Chem.*, 235, 1409(1960)

15. Kihara, H. and E. E. Snell : Peptides and bacterial growth (IX), Release of double inhibitions with single peptides, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1415(1960)
16. Leach, F. R. and E. E. Snell : The absorption of glycine and alanine and their peptides by *Lactobacillus casei*, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3523 (1960)
17. McKay, L. L. and K. A. Baldwin : Simultaneous loss of proteinase and lactose-utilizing enzyme activities in *Streptococcus lactis* and reversal of loss by transduction, *Appl. Microbiol.*, **28**, 342(1974)
18. Pearce, L. E., N. A. Skipper and B. D. Jarvis : Proteinase activity in slow lactic acid producing variants of *Streptococcus lactis*, *Appl. Microbiol.*, **27**, 933(1974)
19. McKay, L. L. : Microorganisms and their instability in milk and milk products, *Food Technol.*, May, **181**(1978)
20. Aurand, L. W., A. E. Woods and M. R. Wells : *Food Composition and Analysis*, Van Nostrand Reinhold, New York, P. 275~276(1987)
21. Hull, M. E. : Studies on milk proteins (II), Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk, *J. Dairy Sci.*, **30**, 881(1947)
22. Folin, O. and V. Ciocalteu : Tyrosine and tryptophane determinations in proteins, *J. Biol. Chem.*, **73**, 627(1927)
23. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Roudall : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
24. Cappuccino, J. G. and N. Sherman : *Microbiology, a laboratory manual*. Second edition, Benjamin Cummings Publishing Company, Menlo Park, California, P. 75~78(1987)

(1994년 6월 10일 수리)