

*Bacillus licheniformis*가 생산하는 α -Amylase의 열안정성에 미치는 금속이온 및 기질의 영향

윤종원 · 박관화

서울대학교 식품공학과, 농업생물 신소재 연구센터

Effect of Metal Ions and Substrate on the Thermostability of α -Amylase from *Bacillus licheniformis*

Jong-Won Yoon and Kwan-Hwa Park

Department of Food Science and Technology and
Research Center for New Bio-materials in Agriculture, Seoul National University

Abstract

The α -amylase from *Bacillus licheniformis* was purified and its thermostability in the presence of substrate and metal was ions investigated. Comparing D-values of the enzyme obtained in the presence of Ca^{++} , B^{+++} and both Ca^{++} and B^{+++} ions, the thermostability of the enzyme was markedly enhanced by the addition of metal ions. Ca^{++} and B^{+++} ions exhibited a protective action, the former ion being more effective, and both ions showed a synergistic effect. The enthalpy of activation for the thermal inactivation in the presence of metal ion was 320.2 kJ/mole for Ca^{2+} ion, 212.9 kJ/mole for B^{+++} , while it was 183.9 kJ/mole in the absence of metal ions. In the thermal inactivation for 30 min at 96°C, the residual activity in the presence of 30% (w/w) starch was 51.0%, whereas the presence of Ca^{++} ion additionally provided a remarkable thermo-resistance.

Key words: α -amylase, thermostability, *Bacillus licheniformis*, metal ion effect

서 론

효소의 열안정성을 증대시키는 것은 식품산업에서 중요한 의미를 갖는다. 효소반응속도는 Q_{10} 값이 2 이므로 반응 온도를 10°C 올림에 따라 반응 속도가 2배 빨라지게 되어 사용하는 효소량을 반으로 줄일 수 있으므로 효소의 비용이 낮아지며 60°C 이상의 온도에서 반응시키면 미생물의 번식 및 오염이 방지되어 공정상 유리한 조건으로 만든다. 세포내 존재하는 모든 효소는 지방, 다당류, 단백질 등 세포내의 구성 성분과 작용하여 새로운 안정화된 구조(supramolecular structure)를 형성하여 열안정성이 증대된다고 알려졌다⁽¹⁾. 효소의 열안정성에 결정적인 역할을 하는 것은 단백질 내의 비공유 결합으로 이온 결합, 수소 결합 및 소수성 작용에 따라 단백질의 2차, 및 3차 구조가 결정되며, 또한 단백질 분자 내의 S-S 결합도 열안정성을 증대시킨다고 알려져 있다. 따라서 효소의 구성 아미노산 조성을 일부 치환시켜주면 효소 단백질 내의 비공유 결합상태에 변화가 일어나 3차 구조가 바뀌게 되므로 열안정성이 증가 또는 감소하게

된다. Kochhar 등⁽²⁾에 의하면 *Bacillus amyloliquefaciens*가 생산하는 α -amylase의 active center 근처에 tryptophan 잔기가 있으며 이것을 변형시켰을 때 역가가 상실되었다고 보고하였다. Ortlepp 등⁽³⁾은 *Bacillus licheniformis*의 α -amylase gene을 *Bacillus subtilis*의 α -amylase negative 변이주로 옮겨서 내열성이 우수한 α -amylase를 생산하는 안정한 transformant를 얻었다고 보고하였다. 또한 Kim⁽⁴⁾ 및 Yuuki 등⁽⁵⁾은 *B. licheniformis*의 내열성 및 pH 내성 α -amylase를 *E. coli*로 cloning하고 gene의 완전한 핵산배열 및 α -amylase의 아미노산 배열을 밝혔다.

α -Amylase의 경우 Ca^{++} 가 효소의 안정화에 크게 기여한다고 알려져 있으며⁽⁶⁾ Hong⁽⁷⁾에 의하면 B^{+++} 는 Ca^{++} 와 함께 *B. licheniformis* α -amylase의 열안정성을 높이며 서로 상승효과가 있다고 했다. 또한 Rogers⁽⁸⁾는 식물, 동물 및 세균성의 α -amylase의 아미노산 배열에서 이들 효소가 3개의 공통되는 domains을 가짐을 관찰하고 이 중에서 barley enzyme의 첫번째 domain은 Ca^{++} binding site를 가진다고 했으며 이 공통되는 domain이 효소의 기능상 중요한 부위일 것이라고 추측하였다.

한편 기질이 효소의 안정화에 기여한다는 사실은 일반적으로 잘 알려진 사실이며 따라서 전분공업에서 고농도의 전분 존재하에 효소가 작용할 때의 열안정성은

Corresponding author: Kwan-Hwa Park, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Kyunggi-do 441-744, Korea

일반 완충액에서 보다 훨씬 높으리라 추측된다. Medda 등⁽⁹⁾은 *B. licheniformis* 및 *B. coagulans*의 α -amylase의 열불활성화 실험을 통하여 기질인 전분이 효소의 안정화에 영향을 미친다고 보고하고 있으나, 전분과 금속이온이 동시에 존재할 때의 영향에 대하여는 정량적인 열역학적 data가 부족하였다. 따라서 본 연구에서는 내열성 α -amylase를 생산하는 *Bacillus licheniformis*로부터 α -amylase를 생산하여 정제한 후 금속이온 및 기질이 효소의 열안정성에 미치는 영향에 대하여 조사하고 열역학적으로 분석하였다.

재료 및 방법

재료

α -Amylase의 생산, 분리 및 정제용 균주는 *Bacillus licheniformis* ATCC 27811을 사용하였다. 균주 저장용 배지는 Brain Heart Infusion(BHI) agar(Difco Co.)를 효소 생산을 위한 액체 배지로는 SH broth⁽¹⁰⁾를 사용하였다. 이온 교환 수지(DEAE-cellulose, CM-cellulose)와 Sephadex를 Sigma Co.(미국)에서 구입하였다.

효소 생산 및 정제

SH broth 100 ml에 *B. licheniformis* ATCC 27811을 한 백금이 접종한 후 50°C에서 24시간 진탕배양하였다. SH broth에 전배양액을 1%(v/v) 접종하여 50°C에서 9일간 배양하여 α -amylase를 생산하였다. 이 배양액을 4°C에서 10,000×g로 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 80% ammonium sulfate로 분획한 후 4°C에서 하룻밤 방치시키고 10,000×g로 20분간 원심분리하여 침전물을 얻고 0.05 M phosphate buffer(pH 7.5)에 용해시킨 다음, 0.01 M phosphate buffer(pH 7.5)에 대해 투석하여 염을 제거하였다. 이것을 DEAE-cellulose column(3×10 cm)에 가한 다음 0.05 M Tris-acetate buffer(pH 7.5)를 사용하여 20 ml/hr의 유속으로 용출시켰다. 효소 역가 peak 부분을 모아 gum arabic으로 농축한 용액을 0.05 M acetate buffer(pH 5.3)로 미리 평형시켜 놓은 CM-cellulose column(3×30 cm)에 가하고 KCl 0.8 M을 사용하여 linear gradient가 되도록 하고 유속은 50 ml/hr로 하였다. 용출된 효소활성 부분을 모아 pH를 7.5로 조정하여 효소용액을 안정화시킨 후 0.01 M Tris-acetate buffer(pH 7.5)에 대하여 투석하였다. 투석한 용액을 농축한 다음 Sephadex G-100 column(2.5×90 cm)에 가하여 gel filtration으로 정제하였다. 0.1 M NaCl을 함유하는 0.05 M Tris-acetate buffer(pH 7.5)를 사용하였으며 유속은 20 ml/hr로 하였다.

α -Amylase 역가 측정

1%(w/v)의 가용성 전분 기질액 0.5 ml와 0.02 M phosphate buffer(pH 7.5) 0.25 ml를 cap tube에 넣어 50°C 항온 수조에서 예열시킨 후 효소 용액 0.25 ml를 첨가

하여 30분 반응시키고 DNS 용액⁽¹¹⁾ 3 ml를 가하여 반응을 중지시켰다. 이것을 끓는 물에 5분 동안 방치하여 발색시키고 필요한 경우는 증류수로 희석하여 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 공시험은 기질과 buffer 혼합액에 3 ml의 DNS 용액을 먼저 가한 후 같은 효소액을 첨가하여 5분동안 끓여서 발색시켰다. 역가의 단위는 30분동안 반응하여 변화한 흡광도 즉, $\Delta\text{Abs}_{550}/30 \text{ min}$ 으로 표시하였다.

단백질 질량

Chromatography를 수행한 각 분획구의 단백질 정량은 다음 식 (1)에 의한 spectrophotometric method를 이용하였고, 그 밖의 경우에는 Lowry 등⁽¹²⁾의 방법에 의해 정량하였다.

$$\text{Protein}(\text{mg/ml}) = 1.55A_{280} - 0.76A_{260} \quad (1)$$

효소의 열안정성

시험관에 일정량의 완충용액을 채우고 항온 수조에서 예열시킨 후 효소 용액을 가하고 교반하면서 열불활성화시켰다. 일정 시간별로 반응액을 취해 얼음으로 미리 냉각시켜 놓은 시험관에 옮긴 다음 잔류 역가를 측정하였다. 금속 이온은 완충용액에 녹여서 실험하였다. 기질 존재하의 효소의 열불활성화는 먼저 시험관에서 전분용액을 농도별로 호화시키고 96°C에서 예열시키면서 효소 용액을 가한 후 30분 동안 열불활성화시키고 0°C의 완충용액을 가하여 열불활성화를 중지시켰다. 잔류 역가의 측정은 기질액 0.5 ml와 완충용액 0.25 ml에 열불활성화시킨 효소 용액 0.25 ml를 가하여 50°C에서 30분간 반응시킨 다음 생성된 환원당을 정량하였다. 공시험은 효소 용액을 넣기전에 DNS 용액을 가하여 열불활성화시키는 과정에 효소 작용에 의해 전분이 분해되어 생성된 환원당을 보정하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

*B. licheniformis*의 배양 상등액을 ammonium sulfate로 분획, DEAE-cellulose, CM-cellulose 및 Sephadex G-100을 통하여 정제한 결과 약 5.6배 정제되었다(Table 1).

효소의 열안정성

열처리 온도 70°C, 75°C, 80°C 및 85°C에서 잔류 역가를 시간에 따라 표시한 열불활성화 곡선은 Fig. 1과 같다. 70°C 및 75°C에서는 대체로 직선의 열불활성화 양상을 보이나 80°C 및 85°C에서는 biphasic하게 열불활성화되며 1차 반응에서 벗어남을 보여주고 있다. Fig. 1의 초기의 직선 부분으로부터 D-value를 구하여 Table 2에 표시하였다. 다시 log D를 온도에 대해 표시한 결과는 Fig. 2와 같으며 Fig. 2로부터 z-value를 구하고 Ta-

Table 1. Summary of purification of α -amylase from *Bacillus licheniformis*

Procedures	Total protein (mg)	Total activity (Δ Abs.)	Yield (%)	Specific activity (Δ Abs./mg protein)	Purification fold
Ammonium sulfate fractionation	309.6	143.3	100	0.463	1
DEAE-cellulose	42.9	81.5	59.9	1.900	4.1
CM-cellulose	26.7	66.6	46.5	2.494	5.4
Sephadex G-100	19.9	51.1	35.7	2.568	5.6

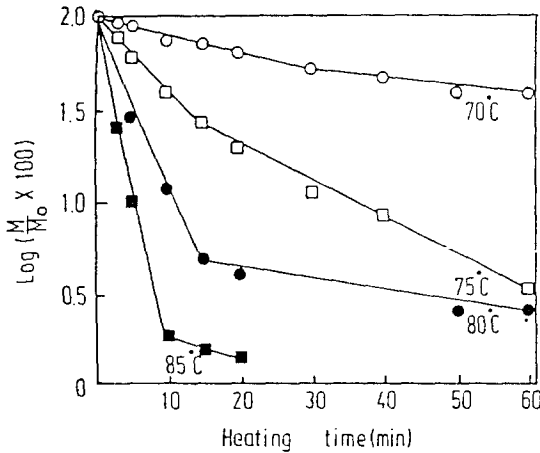


Fig. 1. Thermal inactivation of *B. licheniformis* α -amylase in 0.05 M Tris-acetate buffer (pH 7.5)
 M: Enzyme activity at heating time t, M₀: Enzyme activity at heating time 0

Table 2. First order reaction rate constants and D-values for inactivation of α -amylase from *B. licheniformis*

Heating temperature (°C)	D-value (sec)	Reaction rate constants k, (sec ⁻¹ ·10 ³)
70	6000	3.84
75	1575	14.62
80	660	34.89
85	330	69.79
Z-value	11.7°C	

Table 2에 표시하였다. 열불활성화 반응의 1차 반응 속도 상수, k는 $k=2.303/D$ 의 관계식에 의하여 구하였으며 $\log(k/T)$ 와 $1/T$ 의 관계를 Fig. 3에 표시하였다. Fig. 3으로부터 Eyring의 방법에 의하여 ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger 및 ΔG^\ddagger 를 구하여 Table 3에 표시하였다.

금속이온 존재하의 열불활성화

금속이온의 첨가 농도는 Ca^{++} , 25 mM 및 B^{+++} , 10 mM이고 Ca^{++} 와 B^{+++} 동시에 첨가하는 각각 5 mM로 하였으며 이는 Hong⁽⁷⁾의 보고에 따라 가장 높은 열안정성 효과를 보이는 농도를 선택하였다.

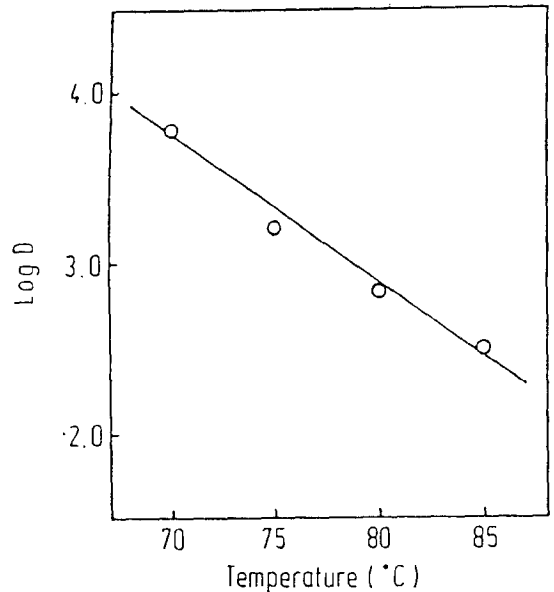


Fig. 2. Thermal destruction curve for *B. licheniformis* α -amylase

Fig. 4는 85°C 에서 대조구와 Ca^{++} 이온 25 mM, B^{+++} 이온 10 mM 및 Ca^{++} 와 B^{+++} 이온이 동시에 존재할 때의 효소의 열불활성화 곡선이며 각각의 경우 앞서와 같은 방법으로 구한 D-value를 Table 4에 나타내었다. Ca^{++} 이온 존재하에서는 85°C 에서의 D-value가 7,880 초로 대조구의 330초에 비하여 열안정성이 크게 증가함을 알 수 있었다. Hong⁽⁷⁾은 *B. licheniformis*가 분비하는 α -amylase에 Ca^{++} 이온을 첨가하였을 때 열안정성이 크게 증가하였으며 정제된 Termamyl[®]에 Ca^{++} 이온을 첨가하였을 때도 열안정성이 증대되었다고 보고하였다. α -Amylase에 Ca^{++} 이온을 첨가하면 Ca^{++} 이온이 효소 단백질과 결합하여 열안정성이 증대되며 Vallee 등⁽⁶⁾은 Ca^{++} 이온의 포화농도가 50 mM 정도라고 보고하였다. 또한 Kim⁽⁴⁾, Yuuki 등⁽⁵⁾은 *B. licheniformis*가 분비하는 α -amylase와 기타 세균에서 분비된 α -amylase의 유전자를 분리하고 이 유전자의 DNA 염기 서열로부터 구성 아미노산 잔기를 비교하고 *B. licheniformis*의 α -amylase는 hydrophilic하며 따라서 극성 아미

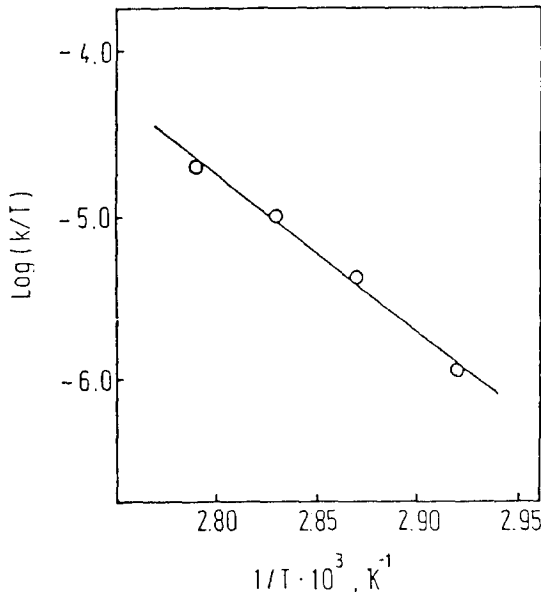


Fig. 3. Inactivation rate constant of *B. licheniformis* α -amylase as a function of temperature

Table 3. Thermodynamic constants for the inactivation of α -amylase from *B. licheniformis* at 85°C

Metal ion	ΔH^\ddagger (kJ/mole)	ΔG^\ddagger (kJ/mole)	ΔS^\ddagger (kJ/mole)
Control	183.9	102.9	226.2
Ca ⁺⁺ , 25 mM	320.2	112.3	580.7
B ⁺⁺⁺ , 10 mM	212.9	108.5	291.6
Ca ⁺⁺ + B ⁺⁺⁺ (5 mM each)	308.5	115.6	538.8

노산 사이에 salt bridge를 생성하기 때문에 열에 강한 특성을 보인다고 하였다. 본 연구에서 Ca⁺⁺ 이온이 열안정성을 증대시킨 것도 효소 단백질 내에서 salt bridge를 형성하여 안정한 구조를 이룬 것으로 판단된다. B⁺⁺⁺ 이온이 존재할 때 85°C에서의 D-value는 2,210초로 대조구에 비해 높으나 Ca⁺⁺ 이온의 경우보다는 낮았다. 따라서 B⁺⁺⁺ 이온은 Ca⁺⁺ 이온보다는 열안정화 효과가 낮음을 알 수 있었다.

그러나 Ca⁺⁺ 이온과 B⁺⁺⁺ 이온을 동시에 첨가하였을 때는 85°C에서의 D-value가 24,000초로 훨씬 증가하였다. 이것은 Ca⁺⁺ 이온 및 B⁺⁺⁺ 이온을 각각 처리하였을 때보다 더 높은 값으로 두 이온이 상승효과를 가지는 것으로 생각된다. Hong⁽⁷⁾은 α -amylase의 열안정성에 Ca⁺⁺와 B⁺⁺⁺ 이온이 상승효과가 있음을 보고하였는 바 본 연구와 일치하고 있다.

또한 열불활성화 곡선은 온도에 따라 꺾여지는 점을 볼 수 있었다. 즉, 열불활성화 속도가 초기에는 빠르나 일정한 열처리 시간 후 완만해지고 따라서 장시간 열처리

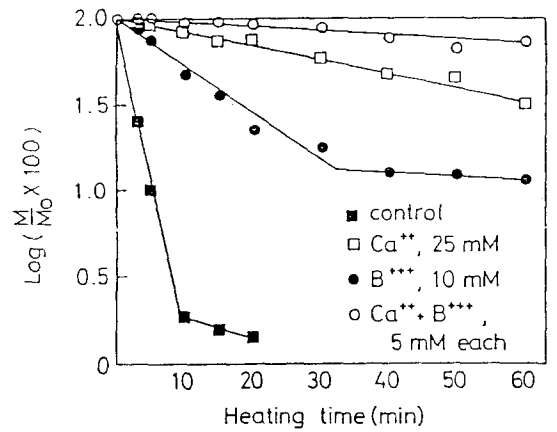


Fig. 4. Thermal inactivation of *B. licheniformis* α -amylase at 85°C in the presence of metal ion
Legends are the same as in Fig. 1

Table 4. D-values for the inactivation of α -amylase of *B. licheniformis* in the presence of metal ions at 85°C

Metal ion	D-value (sec)
Control	330
Ca ⁺⁺ , 25 mM	7880
B ⁺⁺⁺ , 10 mM	2210
Ca ⁺⁺ + B ⁺⁺⁺ (5 mM each)	2400

Table 5. Effect of substrate on the thermostability of *B. licheniformis* α -amylase

Concentration of starch (%)	Residual activity (%)	
	In buffer solution ¹⁾	In Ca ⁺⁺ solution
Control	100	100
10	32.2	100
20	49.2	100
30	51.0	67.8

¹⁾0.02 M phosphate buffer (pH 7.5)

후에도 효소 역가가 남아 있게 되는데 이는 효소의 불활성화가 1차 반응을 따르고 있지 않음을 보여주는 것으로 sweet corn peroxidase⁽¹³⁾, lipoxigenase 등에서도 이와 같은 경향을 볼 수 있다. 이러한 열불활성화 반응은 열을 받은 효소 분자들이 서로 응집하여 열안정성이 더 큰 aggregate를 형성한다는 설과 열안정성이 서로 다른 isoenzyme 중 열안정성이 더 큰 isoenzyme이 열처리 후반기에 남아 있어 완만한 열불활성화 속도를 보인다는 보고가 있다⁽¹⁴⁾. Saito⁽¹⁰⁾는 *B. licheniformis*의 α -amylase를 전기영동한 결과 효소 활성을 보이는 4개의 band를 관찰하고 이들이 isoenzyme일 가능성이 있다고 보고한 바 있다. 본 실험에서는 정제한 효소에도 2~3개의 isozyme이 관찰되었는데(미보고), 열저항성이 서로

다른 isoenzyme의 존재 때문에 1차 반응에서 벗어난 것으로 생각된다.

Table 3은 85°C에서 열불활성화시킨 각각의 경우에 있어 열역학적인 값들을 보여주고 있는데 ΔH^\ddagger 및 ΔS^\ddagger 는 편차가 심하나 ΔG^\ddagger 는 이들에 비해서는 비교적 일정한 값을 보였다. 여기서 ΔH^\ddagger 는 활성화에너지의 크기 및 온도에 대한 의존도를 나타내며 ΔS^\ddagger 는 효소단백질 자체와 단백질 주위의 물분자의 배열과 관련된 entropy의 합을 나타낸다. 또한 ΔG^\ddagger 는 단백질의 불활성화에 관련된 값으로 대부분의 효소단백질에 대해 그 값이 100~110 kJ/mole로 비슷하다. 이러한 현상은 감자 lipoxygenase⁽¹⁵⁾ 및 papaya latex에 있는 단백질 분해 효소들⁽¹⁶⁾의 열불활성화에서도 보고된 바 있다.

효소의 열안정성에 미치는 기질의 영향

기질인 가용성 전분 존재하에서 96°C, 30분 동안 열불활성화시킨 결과를 Table 5에 나타내었다. 기질이 존재하지 않았을 경우, 잔류역가는 0이었으나 전분농도가 10에서 30%로 증가함에 따라 잔류역가는 증가하는 경향을 나타내었다. Medda 등⁽⁹⁾은 *B. licheniformis* 및 *B. coagulans*가 생산하는 α -amylase의 열안정성을 유지하기 위해서는 기질의 존재가 필수적이라고 보고한 바 있다. 또한 기질 존재시 Ca^{++} 이온을 25 mM 첨가하였을 때에는 전분농도 10, 20%에서는 역가가 거의 완전히 유지됨을 알 수 있었다. Ca^{++} 이온 첨가시 기질 농도 30%에서는 잔류역가가 10, 20%에 비해 오히려 낮아졌는데 이는 고농도의 기질 존재시 기질 용액의 높은 점도로 인하여 열불활성화 과정에서 열전달 및 물질전달 계수가 달라지게 되어 실험 오차가 크게 된 탓으로 생각된다.

요 약

*Bacillus licheniformis*가 분비하는 α -amylase를 정제한 후 기질과 금속이온이 효소의 열안정성에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. Ca^{++} 이온 및 B^{+++} 이온의 존재 시에는 D-value가 7,880 sec 및 2,210 sec로 대조구에 비하여 높은 값을 보였으며 Ca^{++} 이온과 B^{+++} 이온이 동시에 존재할 때는 $D_{85} = 24,000$ sec로 상승효과를 보였다. Ca^{++} 이온 존재시 열불활성화에 대한 활성화에너지 (ΔH^\ddagger)는 320.2 kJ/mol이고 B^{+++} 이온의 경우에는 212.9 kJ/mol이었으며 대조구에서는 183.9 kJ/mol 이었다. 기질의 존재하에서는 α -amylase는 높은 열안정성을 보였는데 30% 전분의 존재하에 96°C, 30분 열처리한 결과 약 51%의 잔존역가를 검출하였으며 기질에 Ca^{++} 이온을 첨가하였을 때에는 열안정성이 더욱 증가하였다.

문 헌

1. Mozhaev, V.V. and Martiner, K.: Structure-stability

- relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 50(1984)
2. Kochhar, S. and Dua, R.D.: An active center tryptophan residue in liquefying α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **126**, 966(1985)
3. Ortlepp, S.A., Ollington, J.F. and McConnell, D.J.: Molecular cloning in *Bacillus subtilis* of a *Bacillus licheniformis* gene encoding a thermostable alpha amylase. *Gene*, **23**, 267(1983)
4. Kim, I.C.: Molecular cloning of thermostable α -amylase and maltogenic amylase from *Bacillus licheniformis* and characterization of their enzyme properties. *Ph. D. Thesis*, Seoul National University, Korea (1991)
5. Yuuki, T., Komura, T., Tezuka, H., Tsuboi, A., Yamagata, H., Tsukagoshi, N. and Udaka, S.: Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat- and pH-stable α -amylase of *Bacillus licheniformis*: Comparison of the amino acid sequences of three bacterial liquefying α -amylase deduced from the DNA sequences. *J. Biochem.*, **98**, 1147(1985)
6. Vallee, B.L., Stein, E.A., Sumerwell, W.N. and Fischer, E.H.: Metal content of α -amylases of various origins. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2901(1959)
7. Hong, S.S.: Thermostability of α -amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 27811. *M. S. Thesis*, Seoul National University, Korea (1986)
8. Rogers, J.C.: Conserved amino acid sequence domains in alpha-amylases from plants, mammals, and bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **128**, 470(1985)
9. Medda, S. and Chandra, A.K.: New strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing thermostable α -amylase active at alkaline pH. *J. Appl. Bacteriol.*, **48**, 47(1980)
10. Saito, N.: A thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 290(1973)
11. Miller, G.L.: use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426(1959)
12. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256(1951)
13. 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**, 113(1962)
14. Delincee, H. and Schäfer: Influence of heat treatments of spinach at temperatures up to 100°C on important constituents. -Heat inactivation of peroxidase isoenzymes in spinach. *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, **8**, 217(1900)
15. Lee, C.W.: Partial purification and thermal inactivation of lipoxygenase isozymes from potato tuber. *M.S. Thesis*, Seoul National University, Korea (1981)
16. Noh, B.S.: Heat inactivation of proteolytic enzymes in papaya latex. *M. S. Thesis*, Seoul National University, Korea (1980)