

ニホンナシ果実の酵素的褐変反応の 吸収スペクトルによる検討

藤田修二・東野哲三

(園芸工学研究室)

昭和61年5月7日受理

Spectrophotometric Research on the Enzymatic Browning of Japanese Pear Fruit.

Shuji FUJITA and Tetsuzo TONO

(Laboratory of Food Science and Horticultural Engineering)

Received May 7, 1986

Summary

A spectrophotometric investigation was undertaken to obtain information on the mechanism of the enzymatic browning reaction in Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd var. *culta*) fruit. Polyphenoloxidase (EC 1. 10. 3. 1) was partially purified from the fruit by a combination of ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose chromatography and Sephadex G-50 gel filtration. The enzyme oxidized *o*-diphenols such as chlorogenic acid, catechol and dopamine, but did not *m*- and *p*-diphenols such as resorcinol and hydroquinone. Optimum pH of the enzyme was about 6. The enzyme activity was inhibited by sodium diethyldithiocarbamate, potassium cyanide and L-ascorbic acid.

Natural substrates were extracted from the peel and pulp of the pear by ethanol. The natural substrates as well as *o*-diphenolic compounds were oxidized by the enzyme and a remarkable darkening of their reaction mixtures was observed. The difference spectra of these natural substrates during the browning reactions showed a negative peak at 325nm and positive ones at 260nm and 380nm. The profiles of the difference spectra were similar to that found in the enzymatic browning of chlorogenic acid.

緒 言

園芸食品に含まれるポリフェノール化合物 (PP) やポリフェノール酸化酵素 (PPO, EC 1. 10. 3. 1) については、それらが加工・貯蔵時のいわゆる酵素的褐変反応の原因となることから、古くより多くの研究が行われ、それぞれの食品に含まれる PP の種類や PPO の性質等がかなり明らかにされてきた^{1, 2, 3, 10, 11, 18, 22}。顕著な褐変現象が観察されるナシ果実においても、Bartlett 種や d'Anjou 種等のセイヨウナシ (*Pyrus communis* L. var. *sativa* DC.) では、含有される PP や PPO に関する報告^{15, 16, 17, 19, 21}がみられる。しかし、ニホンナシ (*Pyrus serotina* Rehd var. *culta*) のそれらについての報告はきわめて少なく、わずかに中林¹²が幼果に含まれる PP としてクロロゲン酸類及びカテキン類を検出しているにすぎず、その PPO に関してはほとん

ど知られていない。著者ら⁸⁾はさきに園芸食品中のクロロゲン酸類の簡易定量法について検討し、その中でニホンナシ果実にかなり多量のクロロゲン酸類が存在することを認めたが、その褐変反応の機構やPPOの性質等については未検討であった。そこで、本実験ではニホンナシ果実の酵素的褐変反応に関する基礎的知見を得るために、まず、そのPPOを部分精製し、性質等を調べた。ついで、酵素的褐変反応の機構について、既報^{6,7)}のウンシュウミカン幼果の場合と同様に、吸収スペクトルの面から追究した。

材料及び方法

1 材 料

ニホンナシ(新興)を市場より購入し、使用した。

2 PPO活性の測定

ウンシュウミカンPPO^{4,5)}の場合と同様に酵素吸収量及び褐変度を測定し、それらの値より酵素活性を求めた。

3 PP抽出液の調製

マイクロ波加熱処理によって酵素を失活させたニホンナシ果皮部(200g)及び果肉部(600g)をそれぞれ4倍量(W/V)のエタノールとともに室温にて磨砕後、湯浴(90°C)を用いて3時間還流抽出し、PP抽出液を得た。この抽出液を吸引濾過し、濾液についてエタノール臭のなくなるまで減圧濃縮した。濃縮液中の不溶物を遠心分離(3000rpm, 20分)により除去した後、その上澄液に水を加えて100mlとしたものをそれぞれのPP抽出液とした。

4 吸収スペクトル及び差スペクトルの測定

前記ニホンナシPP抽出液及び種々のPP標品にPPOを作用させた際の反応液の吸収スペクトル及び差スペクトルを、ウンシュウミカン幼果^{6,7)}の場合と同様にして、日立557型分光光度計により測定した。

実 験 結 果

1 PPOの部分精製とその性質

(1) PPOの部分精製

ニホンナシ果皮部を同量の氷冷した0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0)とともに磨砕後、綿布濾過し、その濾液を8000rpmで15分間遠心分離(以後、特記しない限り遠心分離はこの条件で行う)した。その上澄液に0.8飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、塩析される画分を遠心分離により集めた。同画分を少量の0.05Mリン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解後、Visking tubeを用いて同一緩衝液に対して透析した。遠心分離により不溶物を除去した後の膜内液を粗酵素液とした。この粗酵素液に含まれるPPOをカテコールの褐変度を指標として以下のように部分精製した。

粗酵素液を0.05Mリン酸緩衝液(pH 7.0)により平衡化したDEAE-セルロースカラム(2.0×30cm)に添加後、吸着されたタンパク質を0.2M, 0.3Mついで0.5Mの塩化ナトリウムを含む同一緩衝液で段階的に溶出した。その結果、PPO活性の90%以上が、0.2M塩化ナトリウム含有緩衝液により溶出されたので、この活性を有する画分を集め、メンブランフィルター(アミコン社, PM10メンブラン使用)により濃縮した。

濃縮液を0.02Mリン酸緩衝液(pH 7.0, 0.2M塩化ナトリウム含有)で平衡化したセファデッ

クスG-50カラム(2.2×50cm)に添加後、同一緩衝液により溶出した。その結果、Fig. 1に示したようにフラクション番号12~20の画分にPPO活性が認められたので、この画分を集め、部分精製酵素標品として以下の実験に使用した。これらの操作によって本酵素は粗酵素液の約65倍に精製された (Table 1)。

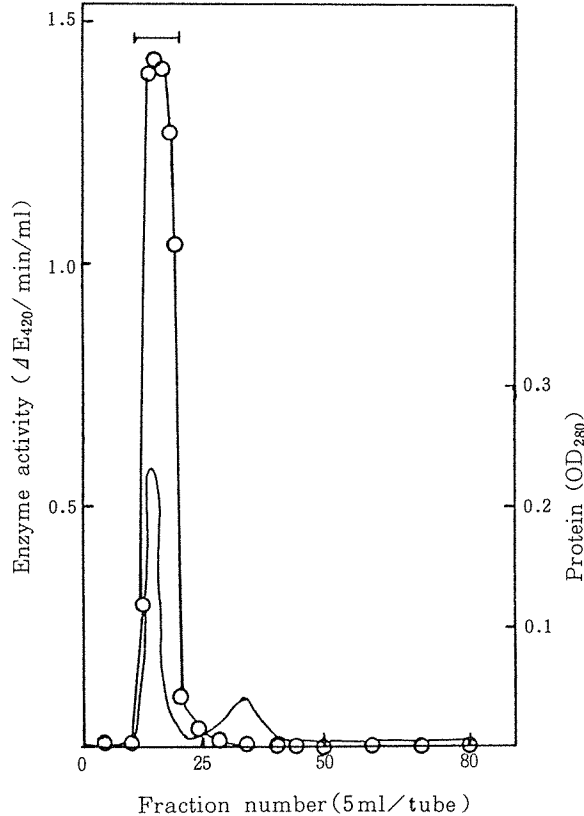


Fig. 1 Gel Filtration of Polyphenoloxidase on Sephadex G-50. DEAE-cellulose fraction was applied into the Sephadex G-50 column (2.2×50cm) equilibrated with 0.02M phosphate buffer (pH 7) containing 0.2M sodium chloride and eluted with the same buffer.

○—○ enzyme activity, — protein (OD₂₈₀),
— fraction pooled.

Table 1 Purification of Polyphenoloxidase from Japanese Pear Fruit

Procedure	Volume (ml)	Protein (μg/ml)	Activity (unit/ml)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude enzyme	280	168.4	68.6	40.7	1.0	100
DEAE-cellulose	443	35.5	22.8	642.3	15.8	53
Sephadex G-50	160	19.1	50.2	2628.3	64.6	42

(2) PPOの性質

基質特異性：本酵素標品の種々のPPに対する酸化活性及び反応液の褐変速度を調べた。結果は酵素液ml当りの毎分の酸素吸収量 ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{ml}$) 及び470nmにおける吸光度の増加量 ($\Delta E_{470}/\text{min}/\text{ml} \times 100$) で表わし、Table 2に示した。本酵素はクロロゲン酸、カテコール、ドーパミン等の *o*-ジフェノール類を強く酸化した。1,2,3-トリヒドロキシベンゼンであるピロガロールはわずかに酸化されたが、没食子酸及び1,3,5-トリヒドロキシベン

ゼンであるフロログルシノールは本酵素によっては全く酸化されなかった。褐変反応においてはドーパミン及びカテコールの反応液は速やかに変色したが、クロロゲン酸及びコーヒー酸の反応液の褐変速度は前二者に比べるとやや低かった。また、レゾルシノール、ヒドロキノン等の *m*-及び *p*-ジフェノール類は本酵素によって全く酸化されず、反応液の変色もみられなかった。

最適 pH：本酵素活性に及ぼす pH の影響をカテコールを基質として (以下同様に行う) 検討した。その結果は最大活性値を100とした相対値で表し、Fig. 2に示した。本酵素の最適 pH は6付近に認められた。

pH 安定性：本酵素標品を pH 3~11の各種緩衝液⁴⁾により20時間処理後、残存する酵素活性

Table 2 Substrate Specificity of Polyphenoloxidase

Substrate	Oxidation O_2 -uptake ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{ml}$)	Browning Absorbance ($\Delta E_{470}/\text{min}/\text{ml}$)
Chlorogenic acid	77.5	38.0
Caffeic acid	15.0	33.0
Catechol	53.8	87.0
Dopamine	42.5	110.0
DL-dopa	3.8	2.8
Pyrogallol	3.5	2.4
Gallic acid	0	0
Phloroglucinol	0	0
Resorcinol	0	0
Hydroquinone	0	0

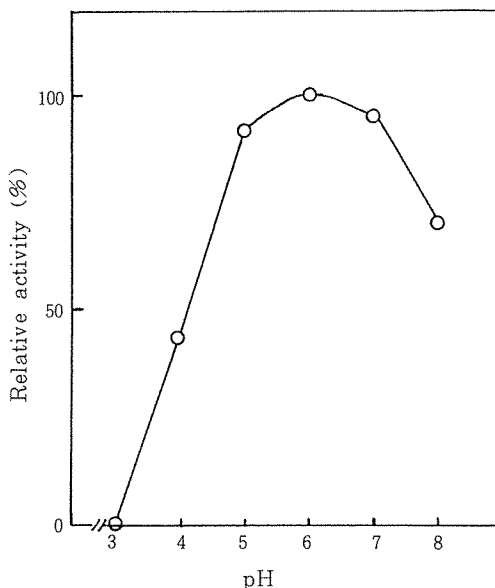


Fig. 2 Effect of pH on Polyphenoloxidase Activity.

Enzyme activities were measured at various pH values and the activities expressed as a percent of maximum activity.

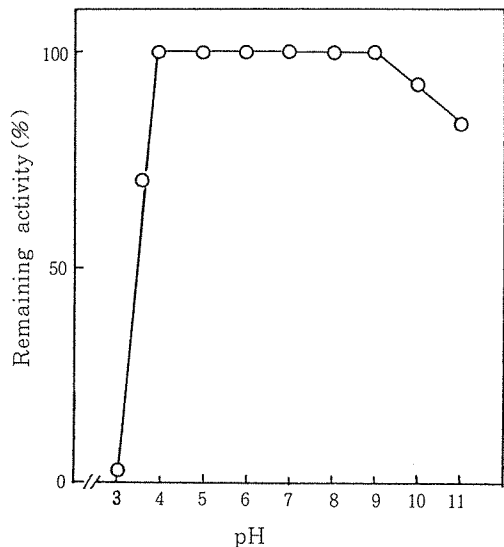


Fig. 3 Effect of pH on the Stability of Polyphenoloxidase.

The enzyme was preincubated at 5°C for 20 hr in the buffers of various pH values, and the residual activities were measured under standard conditions (pH 6, 30°C).

を pH 6 において調べた。結果は最大活性値を100とする相対値で示した。Fig. 3 から明らかなように本酵素は pH 4～9 の範囲でほぼ安定であった。

熱安定性：本酵素液を30～90°Cの各温度で5分間または30分間加熱処理した後、残存する酵素活性を30°Cにおいて測定した結果が Fig. 4 である。本酵素は50°C、30分間の加熱処理に対しては安定であったが、それ以上の高温では不安定となり、80°C、30分あるいは90°C、5分間の加熱処理によりほぼ完全に失活した。

種々の化合物の影響：種々の化合物を $5 \times 10^{-4}M$ となるように反応系に添加し、本酵素活性に及ぼすそれらの影響を調べた。無添加の場合を100とした相対値でそれらの結果を表わし、Table 3 に示した。本酵素活性はジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムによってほぼ完全に、シアン化カリウム及びL-アスコルビン酸によってかなり強く阻害されたが、銅、亜鉛などの金属イオンによってはほとんど阻害されなかった。

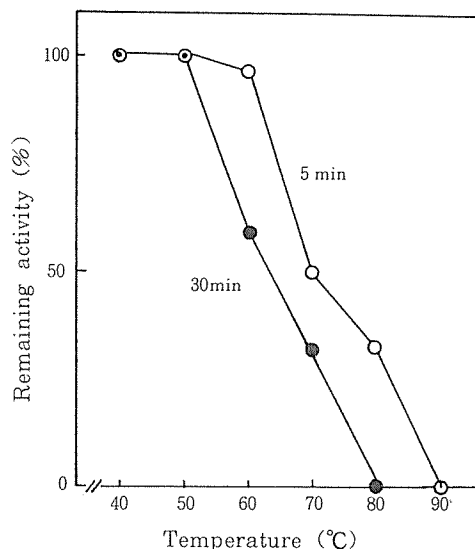


Fig. 4 Effect of Temperature on the Stability of Polyphenoloxidase.

The enzyme was preincubated at various temperatures for 5 or 30 min, and residual activities were measured under the standard conditions.

2 ニホンナシの酵素的褐変反応機構の吸収スペクトルによる検討

(1) ナシ PP 抽出液の褐変と褐変液の吸収スペクトル及び差スペクトル

果皮部 PP 抽出液に PPO を作用させた場合、褐変反応は速やかに進行し、反応液の吸収スペクトル及び差スペクトルは Fig. 5 のような変動を示した。すなわち、その吸収スペクトルは Fig. 5 (A) のように紫外部 (本実験の場合、230～350nm) では 280nm 及び 325nm 付近に吸収のピークを示したが、可視部 (350～600nm) においては明瞭なピークあるいは肩はみられなかった。また、褐変反応の進行に伴って、可視部のほぼ全域及び 280nm より短波長側での吸光度の増加と 280～350nm の波長域における吸光度の減少が認められた。その際の差スペクトル (Fig. 5 (B)) から明らかなよう

Table 3 Effect of Various Compounds on Polyphenoloxidase Activity

Compound	Relative activity (%)
None	100
Potassium cyanide	65
Sodium diethyldithiocarbamate	0
Ethylendiaminetetraacetic acid	81
L-ascorbic acid	64
MnCl ₂	101
CuSO ₄	96
ZnSO ₄	97
FeSO ₄	95
CoCl ₂	98
NiCl ₂	94

(Final concentration of compounds, $5 \times 10^{-4}M$)

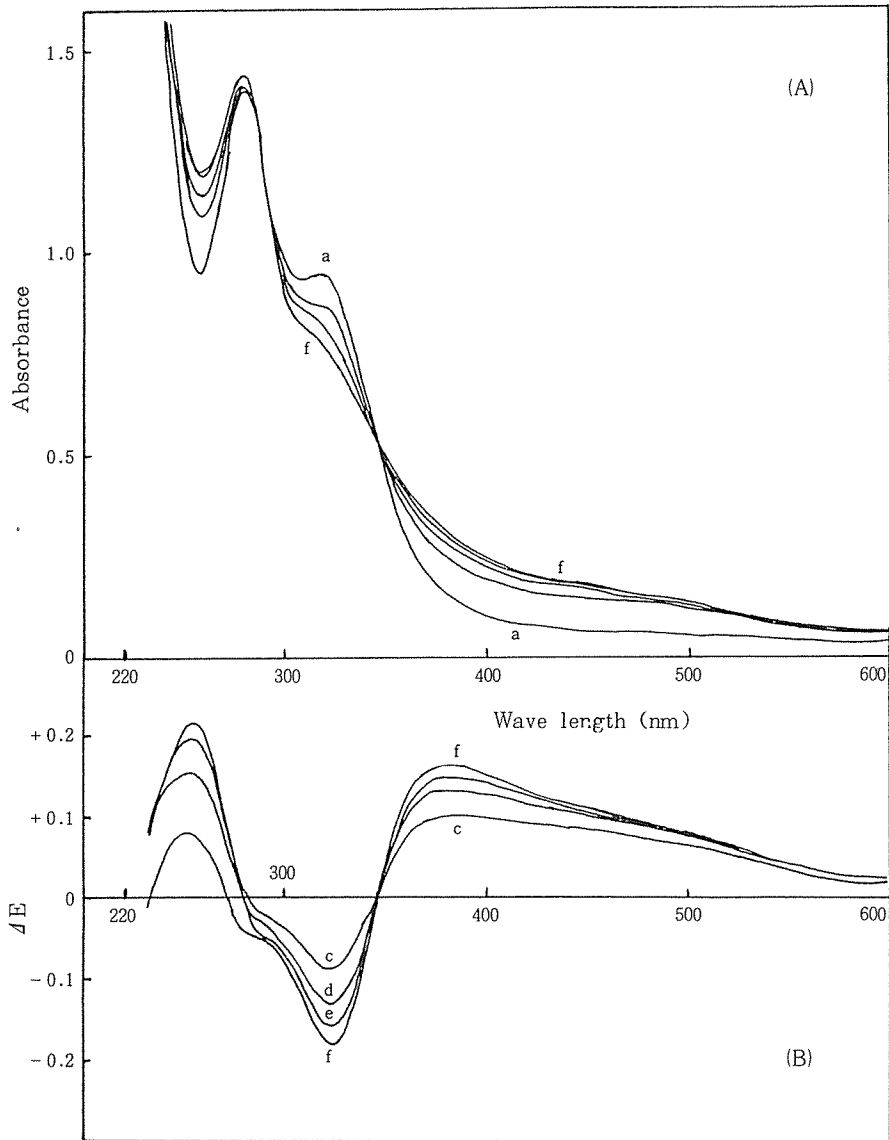


Fig. 5 Changes of Absorption (A) and Difference Spectra (B) during Browning Reaction of the Extract of Japanese Pear Peel.

The absorption and difference spectra were measured by use of an Hitachi model 557 spectrophotometer.

a; 0 min, b; 5 min, c; 10 min, d; 20 min, e; 30 min, f; 60 min.

に、吸光度の増加は、260nm および380nm 付近で、その減少は325nm 付近で大きく、それぞれ正または負のピークを示した。

果肉部 PP 溶液の場合にも Fig. 6 (A) 及び (B) に示したように、その吸収スペクトル及び褐変反応に伴うその変動は前記の果皮部 PP 溶液のそれらとかなり類似したが、その褐変反応速度は低く、スペクトルの変動も果皮部 PP 溶液と比べかなり小さかった。

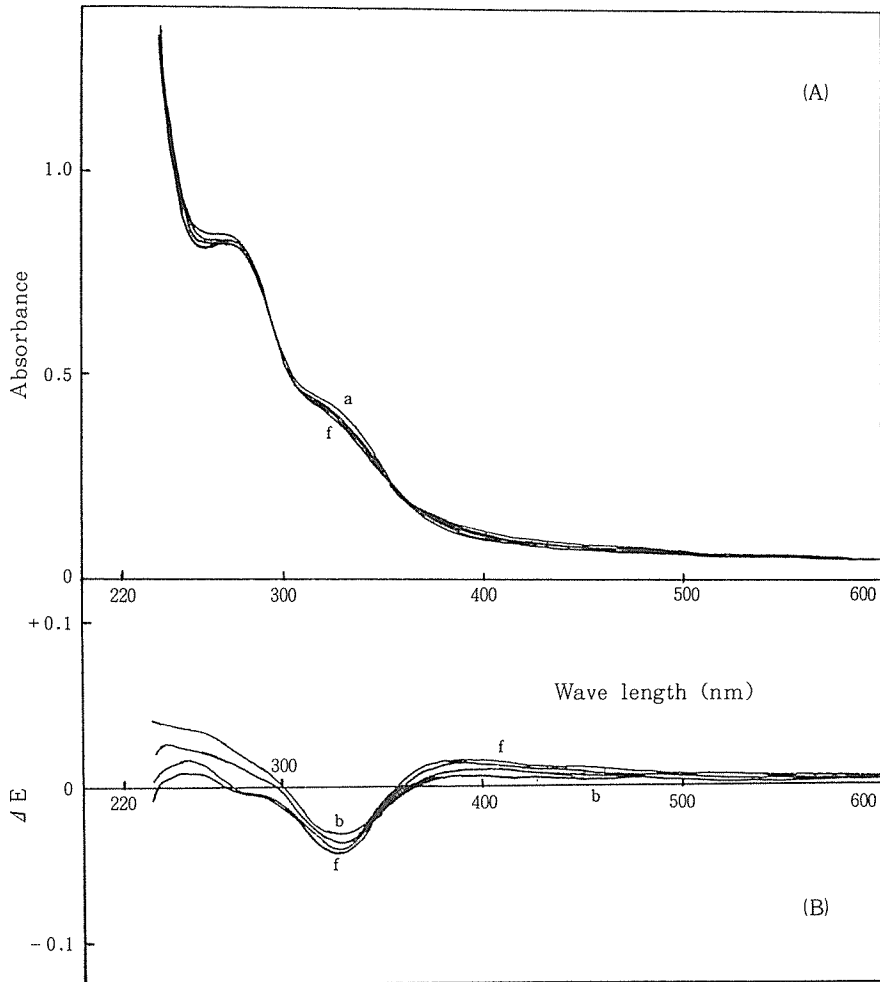


Fig. 6 Changes of Absorption (A) and Difference Spectra (B) during Browning Reaction of the Extract of Japanese Pear Pulp. Symbols are the same as that in Fig. 5.

(2) 種々のPP溶液の褐変反応と反応液の吸収スペクトル及び差スペクトル

Table 2 に示したようにニホンナシ PPO によってクロロゲン酸、カテコール、ドーパミン、コーヒー酸等の *o*-ジフェノール類が強く酸化され、それらの反応液は著しく褐変することが認められた。その際の褐変液の吸収スペクトル及び差スペクトルの変動を測定した結果が Fig. 7 ~10 である。

クロロゲン酸の場合には Fig. 7 (A) に示したように、325nm 付近に吸収のピーク、295nm 付近に肩を有する吸収スペクトルを示し、褐変反応の進行に伴って370nm より長波長側での吸光度の増加と280nm~370nm におけるその減少が認められた。Fig. 7 (B) の差スペクトルから明らかなように吸光度の減少は325nm 付近で最も著しく、その増加は380~400nm において大きかった。

コーヒー酸の場合にも褐変反応に伴う可視部での吸光度の増加と紫外部でのその減少が観察されたが、スペクトル変化の様子はクロロゲン酸の場合とはやや相違していた。すなわち、コーヒー酸溶液は Fig. 8 (A) のように285nm 及び310nm 付近にピークを示す吸収スペクトルを有し、

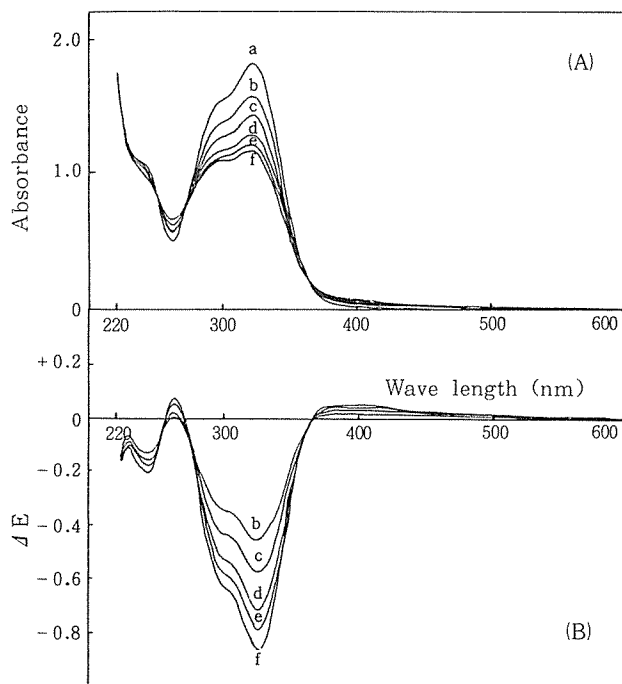


Fig. 7 Changes of Absorption (A) and Difference Spectra (B) during Browning Reaction of Chlorogenic Acid.

Symbols are the same as that in Fig. 5.

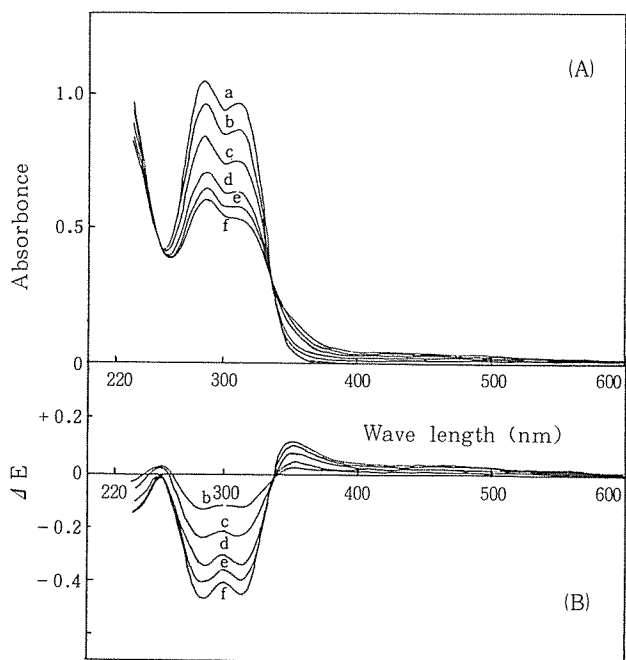


Fig. 8 Changes of Absorption (A) and Difference Spectra (B) during Browning Reaction of Caffeic Acid.

Symbols are the same as that in Fig. 5.

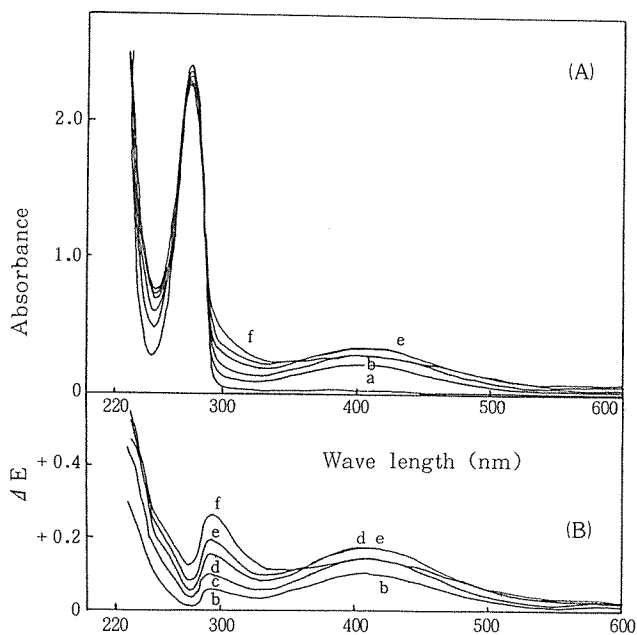


Fig. 9 Changes of Absorption (A) and Difference Spectra (B) during Browning Reaction of Catechol.
 Symbols are the same as that in Fig. 5.

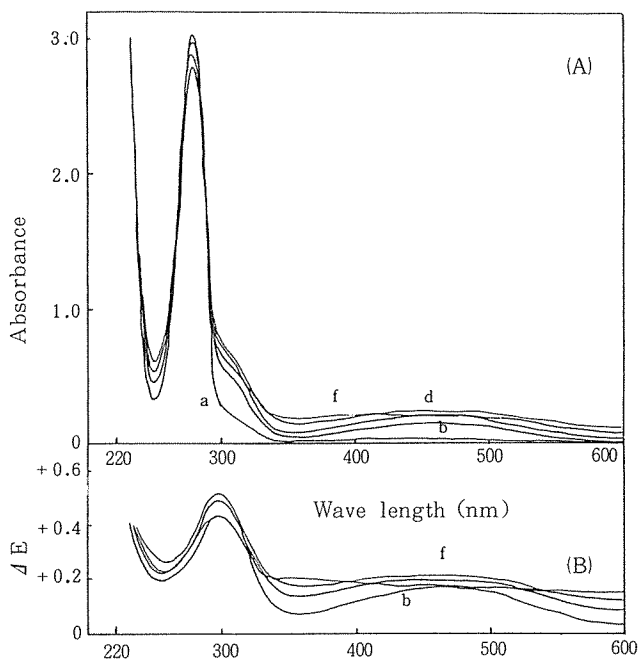


Fig. 10 Changes of Absorption (A) and Difference Spectra (B) during Browning Reaction of Dopamine.
 Symbols are the same as that in Fig. 5.

褐変反応に伴う260~330nmにおける吸光度の減少と330nmより長波長側でのその増加が認められた。Fig. 8 (B)の差スペクトルにみられるように吸光度の増加は350nm付近で最も大きく、その減少は吸収スペクトルのピークの波長である285nm及び310nm付近で顕著であった。

一方、カテコール及びドーパミンは前記の二者とは著しく異なった変動を示した。すなわち、Fig. 9 (A)及び Fig. 10 (A)にみられるようにこれらはいずれも280nm付近にピークを有する吸収スペクトルを示し、褐変反応の進行に伴って測定波長のほぼ全域にわたる吸光度の増加が認められた。Fig. 9 (B)及び Fig. 10 (B)に示したそれぞれの差スペクトルの変化から明らかなように、カテコールの場合には290nm及び405nm付近に、ドーパミンの場合には300nm及び470nm付近に吸光度増加のピークが観察された。

また、わずかに褐変したドーパ及びピロガロールの場合にもカテコール等と同様に褐変反応の進行に伴って測定波長のほぼ全域にわたる吸光度の増加がみられたが、その変化量は他のPPに比べると著しく小さかった。

考 察

ニホンナシ果実より硫酸分画、DEAE-セルロースクロマトグラフィー及びゲル濾過によって、粗酵素液の約65倍に精製されたPPOの部分精製酵素標品を得た (Fig. 1, Table 1)。

本酵素はクロロゲン酸、カテコール等の *o*-ジフェノール類を強く酸化し、それらの反応液は褐変した (Table 2)。このような本酵素の基質特異性は d'Anjou 種等のセイヨウナシ PPO のそれらと同様であった^{9, 16, 19}。また、これらのPPの酸化速度と褐変速度とは必ずしも一致しなかった (Table 2) が、同様な関係についてはリンゴ¹⁴、ウンシュウミカン²⁰等他の果実のPPOにおいても認められており、それは褐変反応がPP酸化後に起こる二次的反応であること、また、生成したメラノイジン等の褐色色素の色調の相違等の理由によるものであると考えられる。

本酵素の最適 pH は 6 付近に認められ (Fig. 2)、これは Bartlett 種のセイヨウナシ PPO¹⁹ のそれ (pH 6.2) と類似した。また、d'Anjou 種のセイヨウナシ⁹にも pH 7 の中性付近に最適値を有する PPO が見出されており、他の果実でも pH 6~7 に最適値を有する PPO が多いようである^{1, 2, 3, 10, 11, 18, 22}。これに対して、Rivas と Whitaker¹⁶は、Bartlett 種のセイヨウナシよりクロロゲン酸を基質とした場合に、pH 4 付近に最適 pH 値を有する 2 種の PPO を検出しているが、これらは前記の PPO とは異なった PPO のアイソザイムであると考えられる。著者らもニホンナシ幼果に pH 4 付近に最適 pH 値を有する PPO を見出しており、この酸性 PPO の性質等については現在検討中である。

本酵素は50°C、30分間の加熱処理では安定であったが、それ以上の温度では不安定となり、80°C、30分あるいは90°C、5分間の加熱処理によってほぼ完全に失活した (Fig. 4)。このような酵素の熱安定性は前記の d'Anjou 種⁹及び Bartlett 種¹⁹の PPO のそれらと同様であった。さらに、Table 3 に示した本酵素活性に及ぼすシアン化カリウム、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム等、種々の化合物の影響もこれらセイヨウナシの場合と高い類似性を示した。また、このような種々化合物の影響はサクランボ等、他の多くの果実野菜類において認められている^{1, 2, 3, 4, 11, 18, 22}。

以上のような性質を有する PPO によりニホンナシ PP 抽出液及び種々 PP 溶液は酸化され、それらの反応液は著しく褐変した。その際の褐変液の吸収スペクトル及び差スペクトルは、それぞれの基質に特有の変動を示した (Fig. 5~10)。そこで、これらのスペクトルの変動の特徴を比較することにより、ナシで起こる褐変反応の機構を推定しようと試みた。

まず、可視部 (350~600nm) のスペクトルは反応液の色とかなり直接的に関係するものと考えられるので、前記の反応系におけるそれらを比較した。その結果、いずれの反応系においてもこの波長域における褐変液の吸光度は反応時間の経過とともに増加することが認められた。このような可視部における吸光度の増加はリンゴ等、他の果実^{6, 7, 13, 14)}の場合にも観察されており、それはメラノイジン等の褐色色素の生成に由来するものと思われる。この可視部の増加速度は各基質により若干相違し、また、その際の差スペクトルにはそれぞれの基質によって増加のピークを示す波長はやや異なるものの、可視部の変化は小さく、これらのスペクトルのみを比較することによりナシ果実の褐変の主反応系を推測することは困難であると思われる。

これに対して、紫外部 (230~350nm) の吸収スペクトルは色とは直接的には関係しないが、それぞれの基質 PP に特有の吸収のピークを示し、それらスペクトルは PPO による酸化反応の進行に伴って著しく変化した。これらのスペクトル変化の特徴は差スペクトルにおいて明確に認められたので、各々の PP 溶液の吸収スペクトル及び差スペクトルの変化とナシ PP 抽出液のそれらを比較し、可視部での結果と合わせてナシの褐変反応の機構について追究した。

すなわち、ナシ PP 抽出液の場合には果皮、果肉部とも 280~350nm の波長域における吸光度の減少が認められ、それは 325nm 付近で顕著であった (Fig. 5, 6)。これら紫外部のとくに差スペクトルの変動の特徴は、Fig. 7 (B) に示したクロロゲン酸のものときわめて類似していた。コーヒー酸の場合にも Fig. 8 に示したように 260~330nm における吸光度の減少はみられるが、その極大値を示す波長 (285nm 及び 310nm) はナシ PP 抽出液及びクロロゲン酸のそれ (325nm) と相違していた。中林¹²⁾および著者ら⁹⁾が報告しているように、ナシ果実にはかなりの量のクロロゲン酸同族体が存在している。したがって、Fig. 5 及び 6 の吸収スペクトルにみられる 325nm 付近のピークは、これらクロロゲン酸同族体由来し、それらがナシ PPO により酸化されて、同図にみられるような吸収スペクトル及び差スペクトルの変動の一因となるものと考えられる。

一方、Fig. 5~7 から明らかなように、紫外部及び可視部における吸光度の増加速度の比 ($\Delta E_{325}/\Delta E_{400}$) には著しく相違が認められる。すなわち、果肉部 PP 抽出液及び果皮部 PP 抽出液の増加速度の比 (-9.2 及び -1.3) は、クロロゲン酸のそれ (-23.0) と比べると著しく大きい。このことはナシ PP 抽出液中にクロロゲン酸の他にとくに可視部の吸光度を増加させる PP が存在することを示唆する。前記したようにクロロゲン酸及びコーヒー酸を除いた他の *o*-ジフェノール類の場合には、測定波長のほぼ全域にわたる吸光度の増加がみられ、ニホンナシ PPO はこれら PP をかなり強く酸化する。さらに、ニホンナシ果実にはクロロゲン酸の他にカテキン類の存在も報告^{8, 12)}されている。これらのことから、ナシ PP 抽出液とクロロゲン酸にみられる吸光度の増加速度の比の相違は PP 抽出液中でクロロゲン酸同族体とともにカテキン類などの *o*-ジフェノール類が PPO によって酸化されるために起こるものと考えられる。なお、著者らはニホンナシ幼果にカテキン類とくにエピカテキンを強く酸化する PPO の存在を見出しており、その PPO の性質等については現在検討中である。

摘 要

ニホンナシ果実のポリフェノール酸化酵素 (PPO) を部分精製し、その性質等を調べるとともに、本酵素が関与する酵素的褐変反応の機構についてモデル反応液のスペクトルの面から追究した。

(1) 硫安分画、DEAE-セルロースクロマトグラフィー及びセファデックス G-50ゲル濾過により、ニホンナシ PPO を約 65 倍に精製した。本酵素はクロロゲン酸、カテコール等の *o*-ジフェ

ノール類を強く酸化した。本酵素の最適 pH は 6 付近であり、pH 4～9 の範囲で安定であった。本酵素は 50°C、30 分間の加熱処理に対しては安定であったが、それ以上の温度では不安定となり、80°C、30 分あるいは 90°C、5 分間の加熱処理によりほぼ完全に失活した。本酵素活性はジエチルシチオカルバミン酸ナトリウムによりほぼ完全に、シアン化カリウム及び L-アスコルビン酸によって強く阻害された。

(2) ニホンナシ果皮部及び果肉部のポリフェノール (PP) 抽出液、種々の PP 溶液は前記 PPO により酸化され、それらの反応液は著しく褐変した。その際の褐変液の吸収スペクトル及び差スペクトルは、それぞれ基質に特有の変動を示した。ニホンナシの両 PP 抽出液の場合、褐変反応の進行に伴って 280～350nm の波長域における吸光度が減少し、325nm 付近に減少のピークがみられた。この紫外部におけるスペクトルの変動、とくに差スペクトルの変動はクロロゲン酸を基質とする場合と類似していた。一方、紫外部及び可視部における吸光度の増加速度の比 ($\Delta E_{325}/\Delta E_{400}$) において両者でかなりの相違がみられたが、このことから PP 抽出液中にカテコール等のような紫外から可視部の全域にわたって吸光度を増加させる PP が存在することが示唆された。

なお本研究の概要は、1983年 4月 5日、日本食品工業学会第30回大会 (於大阪) で報告した。

文 献

- 1) Benjamin, N. D. and M. W. Montgomery (1973). *J. Food Sci.*, **38**, 799.
- 2) Betrosian, K., M. P. Steinburg and A. I. Nelson (1960). *Food Technol.*, **14**, 480.
- 3) Chan, H. T. and H. Y. Yang (1971). *J. Food Sci.*, **35**, 169.
- 4) 藤田修二・東野哲三 (1979). 農化**53**, 233.
- 5) 藤田修二・東野哲三 (1981). 日食工誌, **28**, 600.
- 6) 藤田修二・東野哲三 (1982). 日食工誌, **29**, 214.
- 7) 藤田修二・東野哲三 (1983). 日食工誌, **30**, 650.
- 8) 藤田修二・川崎宏隆・東野哲三 (1985). 佐賀大農彙, **59**, 27.
- 9) Halim, D. H. and M. W. Montgomery (1978). *J. Food Sci.*, **43** 603.
- 10) Joslyn, M. A. and J. D. Ponting (1951). *Adv. Food Res.*, **3**, 1.
- 11) Montgomery, M. W. and V. C. Sgarbieri (1975). *Phytochemistry*, **14**, 1245.
- 12) 中林敏郎 (1968). 日食工誌, **15**, 73.
- 13) 大村浩久・尊田民喜 (1969). 栄養と食糧, **22**, 497.
- 14) 大村浩久・尊田民喜 (1970). 栄養と食糧, **23**, 367.
- 15) Ranadive, A. S. and N. F. Harrod (1971). *J. Sci. Food Agric.*, **22**, 86.
- 16) Rivas, N. J. and J. R. Whitaker (1973). *Plant Physiol.*, **52**, 501.
- 17) Sioud, F. B. and B. S. Luh (1966). *Food Technol.*, **20**, 534.
- 18) Stelzig, D. A., S. A. Akhtar and S. Ribiero (1972). *Phytochemistry*, **11**, 535.
- 19) Tate, J. N., B. S. Luh and G. K. York (1964). *F. Food Sci.*, **29**, 829.
- 20) 東野哲三・藤田修二 (1976). 栄養と食糧, **29**, 125.
- 21) Wang, C. Y. and W. M. Mellethin (1973). *Hortsci.*, **8**, 321.
- 22) Wong, T. C., B. S. Luh and J. R. Whitaker (1971). *Plant Physiol.*, **48**, 19.