温州ミカン未熟果よりクロロゲン酸類および フロリンの検出とそれらの酵素的褐変†

藤 田 修 二*・東 野 哲 三*

Occurrence of Chlorogenic Acid Analogues and Phlorin in Immature Fruit of Satsuma Mandarin and their Enzymatic Browning

(Studies on Enzymatic Browning of Citrus Fruit Part III)

Shuji FUJITA* and Tetsuzo TONO*

* Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture,
Saga University, Saga 840

Polyphenolic substances were extracted with ethanol from the immature fruit of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). The extract was fractionated into two lead precipitate fractions (F-I and F-II) and mother liquor fraction (F-III) by the reaction with lead acetate. F-I and F-II were obtained, respectively, under acidic and basic conditions. F-II was further separated into two fractions (F-II_A and F-II_B) by DEAE-cellulose chromatography. The polyphenolic substances responsible for the enzymatic browning were found in F-I and F-II_B. Absorption spectra and difference spectra of F-I and F-II_B were measured during the browning reaction by polyphenol oxidase of the immature fruit. These spectral profiles of the two fractions resembled closely those of chlorogenic acid. By the hydrolysis of F-I and F-II_B, caffeic acid and quinic acid were found as constituent of the polyphenolic substances. Two polyphenols (S₁ and S₂) associated with the enzymatic browning were detected in both F-I and F-II_B by two dimensional paper chromatography. The absorption spectra and color reactions of S₁ and S₂ were in good agreement with those of chlorogenic acid, although their R_f values were different from the values of chlorogenic acid, isochlorogenic acid and neochlorogenic acid. F-III containing phlorin was not oxidized by the polyphenol oxidase. From the above results, it was suggested that both S₁ and S₂, which were unknown chlorogenic acid analogues, play the most important role in the enzymatic browning of the immature fruit of Satsuma mandarin.

(Received Apr. 11, 1983)

これまでに著者らは温州ミカン未熟果の切断面にみられる赤褐色の変色が一種の酵素的褐変現象であることを認め、未熟果からその反応に関与するポリフェノール酸化酵素 (EC 1.10.3.1, PPO) としてフロログルシノール酸化酵素、ピロガロール酸化酵素およびクロロゲン酸化酵素を分離し、それぞれの酵素の性質等を明らかにしてきた^{1)~5)}。しかし、この未熟果の褐変反応の機構を解明するためにはこれら PPO に関する調査のみでは不十分であり、基質となるポリフェノール化合物 (PP) の

種類や含量についても明らかにする必要がある。しかしながら、これらカンキツ果実の PP に関する研究はきわめて少なく、わずかにレモン⁶⁾ やグレープフルーツ⁷⁾ においてフロログルシノールの β-グルコシドであるフロリンの存在が、オレンジ等⁸⁾⁹⁾ において極微量のクロロゲン酸やコーヒー酸等のフェノールカルボン酸類の存在が報告されているに過ぎない。前報¹⁰⁾ において著者らは温州ミカン未熟果のエタノール抽出液 (既報⁵⁾ と同様 PP 溶液と呼ぶ) のミカン PPO による褐変反応に関して吸

† カンキツ果実の酵素的褐変に関する研究 (第3報), (前報, 文献 10))

* 佐賀大学農学部 (〒840 佐賀市本庄町1番地)

収スペクトルの面から追究した。その結果、PP 溶液中にクロロゲン酸と類似する差スペクトルを示す化合物の存在を予測することができた。そこで、本実験においては温州ミカン未熟果の褐変の主反応系を明らかにするために、未熟果に含まれる PP の分別法について検討し、分別した各画分中の PP およびそれらの褐変反応について追究した。

実験方法

1. 加水分解

(1) 塩酸加水分解

酢酸鉛処理による PP 溶液の沈殿画分（後記）に同量の 2N 塩酸を加え、沸騰湯浴中で 2 時間加水分解した。加水分解液にエーテルを添加し、振盪、静置後、エーテル層と母液とに分け、それぞれを分析に供した。

(2) 酵素的加水分解

酢酸鉛処理後の母液 (3 ml) に 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 5 ml および β -グルコシダーゼ (シグマ社) 10 mg を加えて、37°C で 5 時間反応させ加水分解した。加水分解液に 5 倍量 (v/v) のエタノールを加え脱塩後、実験に供した。

2. ペーパークロマトグラフィー

PP 成分等の検索は東洋濾紙 No. 51 (20×20 cm) を使用するペーパークロマトグラフィー (PPC, 1 次元あるいは 2 次元上昇法、展開溶媒および呈色試薬はそれぞ

れ実験結果の項に示した) により行った。

3. フロリンの調製

標準物質のフロリンは VANDERCOOK および STEPHENSON の方法⁶⁾ にしたがってレモン果皮より中性酢酸鉛処理およびシリカゲルクロマトグラフィーにより調製した。この物質は呈色反応、加水分解反応、PPC 等により同定した²¹⁾。

なお、試料、試薬、PP 溶液の調製、酵素液の調製、褐変度の測定、PP 含量の測定、吸収スペクトルおよび差スペクトルの測定はすべて前報と同様である。

結果および考察

1. 酢酸鉛処理による PP の分別

中林¹²⁾がさきに報告した酢酸鉛処理による分別法に準じて、Fig. 1 に示す手順で未熟果の PP 成分を分別した。本分別法では中性酢酸鉛によりカテコール型およびピロガロール型の PP は沈殿するが¹¹⁾¹²⁾、フロログルシノール型の PP は沈殿しないといわれている⁶⁾。まず、酢酸酸性下で酢酸鉛処理することにより沈殿する画分 (F-I) を分離した。さらに、その母液をアンモニアにより微アルカリ性 (pH 8) とし、再び沈殿する画分 (F-II) を得た。また、この母液を硫化水素処理して鉛塩を除去したものを画分 F-III とした。それぞれの画分の 0.2 ml に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 2.7 ml およびミカン PPO を 0.1 ml 添加し、30°C で反応させた。こ

Fig. 1 Fractionation of Polyphenols by the treatment with lead acetate

Fig. 2 Browning reaction of the lead precipitate fractions (F-I and F-II) and mother liquor fraction (F-III) of the polyphenol extract

A reaction mixture was composed of 0.2 ml of each fraction, 2.7 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) and 0.1 ml of PPO solution. The reactions were carried out for 60 min at 30°C. Optical density of the reaction mixtures were measured at 470 nm.

の反応液の褐変度の変化を測定した。その結果、Fig. 2に示したように F-I および F-II が強く褐変したが、F-III は褐変しなかった。このように、PP 溶液中の褐変反応物質が沈殿画分に存在することから、それらはカテコール型あるいはピロガロール型である可能性が示唆された。

2. F-I および F-II の吸収スペクトルの変動

F-I および F-II を基質とする褐変反応系について、つぎに、吸収スペクトルの面から追究した。F-I にミカン PPO を作用させた際の反応液の吸収スペクトルおよび差スペクトルの変動を調べた結果を Fig. 3 に示した。F-I のスペクトルは 325 nm 付近に吸収のピーク、295 nm 付近に肩を有し、褐変反応の進行にともなって 370 nm より長波長側での吸光度の増加および 290~360 nm における著しい吸光度の減少 (差スペクトルでは負の増加) がみられた。このようなスペクトルの変動の特徴は前報¹⁰⁾のクロロゲン酸-PPO 反応系の場合と極めて類似した。クロロゲン酸類は通常酸性下では酢酸鉛処理により沈殿しないとされている¹¹⁾¹²⁾。しかし、Fig. 3 に示した F-I の吸収スペクトルおよびその変動が、クロロゲン酸類の特徴を示すものであること^{18)~19)}から、F-I に含まれる PP は新しい型のクロロゲン酸同族体である可能性が考えられる。

Fig. 3 Changes of absorption spectra and difference spectra of F-I during browning reaction by PPO

A reaction mixture of 0.2 ml of F-1, 2.7 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) and 0.1 ml of PPO solution was incubated at 30°C. After 0(a), 10(b), 20(c), 30(d) and 60(e) min, absorption spectra (A) and difference spectra (B) of the brown reaction mixtures were estimated by a Hitachi Model 557 recording spectrophotometer.

一方、Fig. 4 に示したように、F-II の吸収スペクトルは 280 nm および 325 nm 付近に吸収のピークを有し、クロロゲン酸のそれとはやや相違した。しかし、F-II に PPO を作用させた場合の差スペクトルの変動がクロロゲン酸の場合と類似することから、F-II の吸収スペクトルにみられる 325 nm 付近の吸収ピークはクロロゲン酸類^{18)~19)}のそれに由来することが考えられる。したがって、この場合にもクロロゲン酸類の PPO による酸化反応が褐変の主反応となることが予想された。

3. F-II の DEAE-セルロースによる分別

前記のように、吸収スペクトルの面からの追究により、F-II 画分には数種の PP が混在することが考えられたので、この画分についてさらに DEAE-セルロースによる分別を試みた。すなわち、F-II (10 ml) を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したカラム (2.0×9.0 cm) に添加し、同一緩衝液で洗浄後、吸着画分を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) および 0.2 M の塩化ナ

Fig. 4 Changes of absorption spectra and difference spectra of F-II during browning reaction by PPO

Estimations were carried out by the same method as in Fig. 3, except that F-I was replaced by F-II.

Fig. 5 Elution pattern of F-II on DEAE-cellulose

F-II (10 ml) was applied to the DEAE-cellulose column (2.0×9.0 cm) which was equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0). The column was stepwisely eluted with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) and the same buffer containing 0.2 M sodium chloride.

—●— OD₂₈₀ , —○— OD₃₂₀

Fig. 6 Changes of absorption spectra and difference spectra of F-II_B during browning reaction by PPO

Estimations were carried out by the same method as in Fig. 3, except that F-I was replaced by F-II_B.

Fig. 7 Changes of absorption spectra of F-II_A during browning reaction by PPO

Estimations were carried out by the same method as in Fig. 3, except that F-I was replaced by F-II_A.

トリウムを含む前記 0.05 M 緩衝液により段階的に溶出した。各画分は 5 ml ずつ分取し、それぞれについて PP の目安として 320 nm および 280 nm における吸光度¹⁶⁾¹⁷⁾を測定した。その結果、Fig. 5 に示したように素通り画分 (F-II_A) および 0.05 M リン酸緩衝液による溶出画分 (F-II_B) に大きなピークが認められた。これらのうち F-II_B はミカン PPO により強く褐変し、その際の反応液の吸収スペクトルの変動の特徴は Fig. 6 に示すように、F-I およびクロロゲン酸のそれらとほぼ一致した。一方、F-II_A の褐変度は低く、Fig. 7 に示したようにミカン PPO の作用により、270~330 nm における吸光度の増加の傾向がみられたがその変化量は小さかった。したがって、F-II_A に含まれる PP の未熟果の褐変反応に果たす役割はもしあるにしても著しく小さいものであると考えられる。

このように、酢酸鉛処理およびイオン交換クロマトグラフィーによって温州ミカン未熟果の主要褐変物質は F-I および F-II_B の画分に分別された。F-I および F-II_B の褐変反応にともなう反応液の吸収スペクトルおよび差スペクトルの変動の特徴がそれぞれクロロゲン酸のそれらとほぼ一致したことから、これら両画分に含まれる主要反応物質はクロロゲン酸あるいはその同族体であろうと推察される。

4. クロロゲン酸同族体の検出

F-I および F-II_B について 2% 酢酸 (AW 2:98) に

Fig. 8 Paper chromatogram of F-I and F-II_B

1; gallic acid, 2; *p*-coumaric acid, 3; pyrogallol, 4; phloroglucinol, 5; caffeic acid, 6; chlorogenic acid, 7; F-I, 8; F-II_B

▨ FeCl₃-K₃Fe(CN)₆

▤ Diazotized *p*-nitroanillin (DPNA)

○ Fluorescence under UV-light

よる 1 次元 PPC を行い、それらの呈色反応等を調べた。その結果、Fig. 8 に示したように F-I および F-II_B とともにジアゾ化パラニトロアニリン試薬¹²⁾ および塩化第二鉄-フェリシアン化カリウム試薬¹³⁾ 等 PP の呈色試薬に陽性のスポットが検出された。それぞれのスポットはクロロゲン酸と同様に PPO 処理 (0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) により 10 倍に希釈した酵素液を濾紙に噴霧後、30°C の恒温器中に 30 分放置する) により強く褐変した。また、紫外線下で青白い螢光を発し、それはアンモニア蒸気下で緑色に変化した。それらスポットの *R_f* 値もクロロゲン酸のそれと近接することが認められた。さらに、F-I および F-II_B を 1 N 塩酸中で加水分解し、それらの構成成分を調べた結果、両画分の加水分解液のエーテル抽出物より、Table 1 に示したようにコーヒー酸が検出された。一方、母液からは Table 2 に示したようにキナ酸が検出され、それ以外の成分 (例えばシキ

Table 1 Paper chromatography of the ether extract of the hydrolyzates* of F-I and F-II_B

	<i>R_f</i> values			
	BAW (4:1:2)	AW (2:98)	BeAW (125:75:3)	BPW (14:3:3)
F-I	0.84	0.24	0.53	0.57
F-II _B	0.84	0.24	0.54	0.57
Caffeic acid	0.84	0.24	0.54	0.57
Chlorogenic acid	0.65	0.56	0.14	0.24

Abbreviations: B; buthanol, A; acetic acid, W; water, Be; benzene, P; pyridine

* They were obtained by hydrolysis of PP with 1 N HCl.

Table 2 Paper chromatography of the mother liquor of the hydrolyzate of F-I and F-II_B

	<i>R_f</i> values		
	BAW (4:1:2)	EAW (9:2:2)	BFW (4:1:2)
F-I	0.39	0.14	0.42
F-II _B	0.39	0.14	0.41
Quinic acid	0.39	0.14	0.41
Shikimic acid	0.53	0.15	0.54

Abbreviations: B; buthanol, A; acetic acid W; water, E; ethyl acetate, F; formic acid

Fig. 9 Two dimensional paper chromatogram of F-I and F-II_B
 1; chlorogenic acid, 2; isochlorogenic acid, 3; neochlorogenic acid
 (A); F-I and F-II_B, (B); F-I, F-II_B and chlorogenic acid analogues
 (▨) FeCl₃-K₃Fe(CN)₆, (▤) DPNA, (○) Fluorescence under UV-light

ミ酸)は検出されなかった。これらの結果から、F-I および F-II_B に含まれる PP はクロロゲン酸様物質であることが認められた。そこで、F-I および F-II_B のポリフェノール含量をクロロゲン酸として定量した。その結果、両画分にはそれぞれ約 690 mg% および 250 mg%、合計 940 mg% の PP が含まれ、これは PP 溶液中の全ポリフェノール含量 (約 2480 mg%) の約 38% に相当することが認められた。

つぎに、F-I および F-II_B に含まれるクロロゲン酸様物質について PPC により検討した。すなわち、F-I について 2 次元 PPC を行った結果、Fig. 9 (A) に示したように前記の PP の呈色試薬に陽性のスポット S₁ および S₂ が見出された。これら S₁ および S₂ ともに紫外線下で青白い蛍光を発し、それはアンモニア蒸気下で緑色に変化した。また、両スポットともミカン PPO により褐変し、その褐変度は S₁ の方が S₂ より高かった。F-II_B についても同様に PPC を行った結果、前記 S₁ および S₂ と同じ R_f 値および呈色反応を示す 2 個の PP が検出された。また、F-I および F-II_B にクロロゲン酸を重ねてプロットし展開した場合の結果を Fig. 9 (B) に示した。なお、この図には文献^{(18)~(20)} の R_f 値より求めた位置にイソクロロゲン酸、ネオクロロゲン酸のスポットを記入している。この結果から明らかなようにスポット S₁ および S₂ の位置はクロロゲン酸あるいは既知のクロロゲン酸同族体のそれらと相違し、また、その位置はジカフェイルキナ酸であるイソクロロゲン酸と著しく異なるが、モノカフェイルキナ酸であるクロロゲン酸やネオクロロゲン酸のそれと近接することが認められ

た。これらの実験結果から、F-I および F-II_B に含まれる褐変反応成分 (S₁ および S₂) はモノカフェイルグループに属するクロロゲン酸同族体⁽¹²⁾であろうと考えられるが、その詳細は不明である。

5. S₁ および S₂ の吸収スペクトル

F-I および F-II_B のペーパークロマトグラム上のスポット S₁ および S₂ を切り取り、それぞれ 5 ml の水で抽出後、抽出液の吸収スペクトルを調べた結果が Fig. 10 である。S₁, S₂ 両成分ともに 325 nm 付近に吸収のピーク、295 nm 付近に肩を有し、それらスペクトルはクロロゲン酸のものとはほぼ等しいものであった。同様な吸収スペクトルはクロロゲン酸のほか種々のクロロゲン酸類^{(13)~(15)} においても認められている。このように、吸収スペクトルの面からも S₁ および S₂ がクロロゲン酸同族体であることが確かめられた。

Fig. 10 Absorption spectra of spot S₁ and spot S₂

S₁; Spot S₁, S₂; spot S₂, Chl; chlorogenic acid

Fig. 11 Two dimensional paper chromatogram of mother liquor (F-III) and its hydrolyzate

(A); F-III, (B); Hydrolyzate of F-III

▨ $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, ▩ DPNA, ⑦ Vaniline-HCl

6. フロリンの検出

前記酢酸鉛処理における母液 (F-III) の PP の検索を行った。この画分にはレモン果実の場合⁶⁾ フロリンが検出されており、温州ミカンの場合にもその存在が予測される。まず、F-III について 2 次元 PPC を行った結果、Fig. 11 (A) に示したように、この画分には前記の PP の検出試薬に陽性の 2 個のスポットが検出されたが、両スポットとも紫外線下で蛍光を発しなかった。このうち、スポット V はバニリン-塩酸試薬に陽性であり、その R_f 値および呈色反応はレモンより調製したフロリンのそれら²¹⁾と一致した。さらに、この化合物がフロリンであることを確かめるために、F-III に β -グルコシダーゼを作用させて得た加水分解液について PPC を行った。その結果、Fig. 11 (B) に示したようにスポット V は消失し、新たにスポット V' が生じた。この V' は呈色反応および R_f 値がフロログルシノールのそれら^{6) 21)}と一致し、ミカン PPO により酸化された。したがって、スポット V はフロリンであり、それが β -グルコシダーゼにより加水分解されてフロログルシノールを生じたものと考えられる。しかし、Fig. 2 に示したようにこのフロリンを含む画分 F-III はミカン PPO によりほとんど褐変しなかった。著者ら²⁶⁾はフロリンがクエン酸性下でも加水分解されることを認めており、もし、これが未熟果の β -グルコシダーゼによるかあるいは酸性下で加水分解されてフロログルシノールを生じたとしても、フロログルシノール酸化物の褐変度は既報¹⁾のように極めて低い。したがって、このフロリンが未熟果の褐変反応に寄与する割合は著しく低いものであろうと推定される。

以上のような温州ミカン未熟果の PP 溶液から分別された各画分の褐変反応、吸収スペクトルの変動および PPC の結果から、本実験の F-I および F-II_B に検出された未熟果の褐変反応の主要成分 S₁, S₂ の本体は未詳のクロロゲン酸同族体であると考えられ、それらの含量は約 940 mg% にも達することが認められた。このような褐変基質となる PP の種類および含量は食品の PPO の性質とくに基質特異性ととも、その食品の酵素的褐変反応を考察する上で重要な因子となるであろう。例えばリンゴの場合、その PPO はクロロゲン酸類に強く作用する²²⁾が、PP 含量はむしろカテキン類が高く、クロロゲン酸量は低いようである²³⁾。このリンゴの褐変反応に関して、大村および尊田^{24) 25)}は褐変色素液のゲル濾過パターンや吸収スペクトルの変化から検討し、リンゴの褐変の主反応系がカテキン酸化系であろうと推定している。温州ミカンの場合には既報^{1) ~ 6)}のように、粗酵素液はフロログルシノールやピロガロール等のトリヒドロキシベンゼン類を強く酸化するのに対し、クロロゲン酸酸化活性はやや弱いようであった。しかし、本実験において未熟果よりかなり多量のクロロゲン酸同族体が検出されたことから、この物質が未熟果の褐変反応の主要基質と考えられる。なお、フロリンの存在も認められたが、これはミカン PPO によってはほとんど褐変しないことから主要基質とは思われない。したがって、酵素活性はやや弱にしてもクロロゲン酸酸化酵素系が未熟果の褐変の主反応系であろうと推定される。

このようなクロロゲン酸類は成熟果にも少量含まれ²⁶⁾、これが虎斑症などの果皮褐変症の原因の一つとなることが考えられる。この果皮褐変症はネーブルオレンジ

ジなどの中・晩柑類の生産増大にともなう大きな問題となりつつあり、これについては今後の検討が待たれる。

要 約

温州ミカン未熟果の酵素的褐変反応機構の解明を目的として、その基質である PP について追究した。

Ⅱ (1) PP 溶液は酢酸鉛処理により酸性および塩基性で沈殿する画分 (F-I および F-II) と沈殿しない画分 (F-III) とに分別され、F-II はさらに DEAE-セルロースにより、2 画分 (F-II_A, F-II_B) に分別された。これら画分のうち F-I および F-II_B が酵素的に強く褐変した。

(2) F-I および F-II_B の褐変反応にともなう吸収スペクトルおよび差スペクトルの変動の特徴はクロロゲン酸の場合と酷似し、両画分の加水分解液からはコーヒー酸とキナ酸が検出された。また、両画分にはミカン酵素により呈色する 2 個の PP (S₁ と S₂) が検出された。S₁ および S₂ の吸収スペクトル、呈色反応等の性質はクロロゲン酸のそれと一致したが、PPC における R_f 値は既知のクロロゲン酸同族体のそれとは一致しなかった。

Ⅲ (3) F-III 画分にはフロリンが検出されたが、これはミカン PPO により褐変しなかった。

以上の結果より温州ミカン未熟果の褐変成分 (S₁, S₂) の本体は未詳のクロロゲン酸同族体であり、これらを基質とする反応系が未熟果の褐変の主反応系であろうと推定された。

本研究を行うにあたり御鞭撻を賜った九州大学大村浩久教授に深く感謝いたします。また、本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (昭和 57 年度、課題番号 57760033) の援助により行ったものであり、あわせて謝意を表します。

文 献

- 1) 東野哲三・藤田修二：栄養と食糧, **29**, 125 (1976).
- 2) 藤田修二・東野哲三：栄養と食糧, **29**, 457 (1976).

- 3) 藤田修二・東野哲三：農化, **53**, 233 (1979).
- 4) 藤田修二・東野哲三：農化, **54**, 201 (1980).
- 5) 藤田修二・東野哲三：日食工誌, **28**, 600 (1981).
- 6) VANDERCOOK, C. E. and STEPHENSON, R. G.: *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 450 (1966).
- 7) HORWITZ, R. M. and GENTILI, B.: *Arch. Bio-phys. Biochim.*, **92**, 191 (1961).
- 8) HORWITZ, R. M. and GENTILI, B.: *J. Org. Chem.*, **25**, 2183 (1960).
- 9) FREEDMAN, S. O., SIDDIQI, A. I., KRUPPEY, J. and SOHON, A. M.: *Am. J. Med. Sci.*, **244**, 548 (1962).
- 10) 藤田修二・東野哲三：日食工誌, **29**, 214 (1982).
- 11) 森 光国・原田陽一・坪井良至：日食工誌, **12**, 88 (1965).
- 12) 中林敏郎・木村 進・加藤博通：食品の変色とその化学 (光琳書院, 東京), p. 64~115 (1967).
- 13) 中林敏郎・渡辺千賀子：日食工誌, **23**, 124 (1976).
- 14) SCHALLER, D. R. and VONELBE, J. H.: *J. Food Sci.*, **35**, 762 (1970).
- 15) WALTER, Jr. W. M., PURCELL, A. E. and McCOLLUM, G. K.: *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 938 (1979).
- 16) 米山智恵子・櫛田忠衛：日食工誌, **27**, 623 (1980).
- 17) LATTANZIO, V. and MARCHESINI, A.: *J. Food Sci.*, **46**, 1907 (1981).
- 18) LUH, B. S., HSU, E. T. and STACHOWICZ, K.: *J. Food Sci.*, **32**, 251 (1967).
- 19) SCHALLER, D. R. and VENELE, J. H.: *J. Food Sci.*, **35**, 762 (1970).
- 20) WALTER, J. R. W. M., PURCELL, A. E. and McCOLLUM, G. K.: *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 938 (1979).
- 21) 東野哲三・藤田修二・森 欣也・中島憲次：日本栄養食糧学会, 日本栄養改善学会, 西日本支部・中国四国支部連合大会講演集, p. 98, 長崎 (1980).
- 22) 中林敏郎：農化, **28**, 212 (1954).
- 23) 中林敏郎：日食工誌, **15**, 73 (1968).
- 24) 大村浩久・尊田民喜：栄養と食糧, **23**, 367 (1970).
- 25) 尊田民喜・大村浩久：栄養と食糧, **26**, 531 (1973).
- 26) 東野哲三・藤田修二：未発表

(昭和 58 年 4 月 11 日受理)