報 文

酵素分解を用いた α -グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア
(酵素処理ステビア) 製品の成分分析法

(平成 17 年 6 月 8 日受理)

平田 恵子^{*,†} 島村 保洋^{*} 鈴木 敬子^{*}
貞升 友紀^{*} 伊藤 弘一^{*}A Method of Component Assay of α -Glucosyltransferase-treated Stevia
(Enzymatically Modified Stevia) Products Using Enzymatic HydrolysisKeiko HIRATA[†], Yasuhiro SHIMAMURA, Keiko SUZUKI, Yuki SADAMASU and Koichi ITO(Tokyo Metropolitan Institute of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku,
Tokyo 169-0073, Japan; [†]Corresponding author)

We have developed an analytical method for components of α -glucosyltransferase-treated stevia, a food additive product. Suitable conditions to separate additional sugar from α -glucosyltransferase-treated stevia by using glucoamylase were found (55°C for 3 hr with 250 U of glucoamylase in 10 mL of reaction solution). By solid-phase extraction using a C18 cartridge column, polysaccharides were excluded from the sample, and the glycosides and sugar obtained after hydrolysis with glucoamylase were separated on another C18 cartridge column. The glycosides and sugar contents were determined by HPLC. By this method, additional sugar was detected in all of three product samples tested and the sugar was glucose. The contents of glucose and total glycosides (minus unreacted glycoside) were 25–42% and 35.7–52.5%, respectively. In α -glucosyltransferase-treated stevia, the sum of total glycosides and glucose amounted to 77.5–80.4% of the total and their recoveries from samples from which polysaccharide had been excluded by C18 cartridge column processing were over 85%. The contents of α -glucosyltransferase-treated stevia obtained by multiplying the sugar content by the coefficient (0.9) for hydrolysis and converting on dry weight basis were all over 80.0% and met the standard set by the Japan Food Additives Association.

(Received June 8, 2005)

Key words: α -グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア α -glucosyltransferase-treated stevia; 酵素処理ステビア enzymatically modified stevia; ステビオシド stevioside; レバウディオシド A rebaudioside A; グルコアミラーゼ glucoamylase; グルコース glucose; 酵素分解 enzymatic hydrolysis; 固相抽出 solid-phase extraction; 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒 言

α -グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア (以下酵素処理ステビアと記す) はステビア抽出物に α -グルコシル転移酵素などを用いて、グルコースを付加して得られたものであり¹⁾ (Fig. 1), ステビア抽出物と同様に砂糖の代替品などとして食品に繁用されている。さらに、食品にステビア甘味料などと表示された場合、ステビア抽出物との区別はされていない。しかし、成分組成がステビア抽出物と異なるためステビア抽出物の分析方法をそのまま用いることができない。このようなことから、酵素処理製品の成分内容を明らかにするために、その分析方法の開発が必要

となっている。また、酵素処理ステビアは我が国においてまだ規格設定されていない既存添加物であることから、添加物の規格作成などに関して特に重要である。

酵素処理ステビアの成分分析法は日本食品添加物協会自主規格²⁾ (以下自主規格とする) があるが、酸加水分解によって配糖体および付加糖のすべての糖を離脱後、アグリコンを GC で分析する方法である。さらに糖については別に比色法で測定することから、繁雑であるとともに酵素処理前の配糖体や付加糖の種類を確認することは不可能である。一方、付加糖体のまま HPLC で測定する方法^{3), 4)} は標準物質がなく、また、分離が悪いため正確な含有量は得られにくい。

ステビア配糖体の分析⁵⁾ や、酵素処理ステビアの確認²⁾ の目的で酸加水分解を用いず酵素分解で行う方法がある。

[†] 連絡先^{*} 東京都健康安全研究センター: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

Fig. 1. Structures of α -glucosyltransferase-treated stevia

しかし、酵素処理ステビアの定量法に酵素分解を適用した方法はまだ確立されていない。そこで今回、グルコアミラーゼを用い付加糖のみを加水分解する条件を検討し、酵素処理ステビアの定量法への適用を試みた。

また、固相抽出を試料の精製および酵素分解後の配糖体と遊離糖の分離に用い、配糖体と糖の含有量はHPLCにより測定する簡易な分析方法を確立した。さらに、その方法を添加物製品に適用し、配糖体および付加糖の含有量を測定し、成分を明らかにしたので報告する。

実験方法

1. 試料

2000年に入手した市販の酵素処理ステビア3種類(A~C)を用いた。試料についての詳細は結果1に示した。

2. 試薬

標準品：ステビオシドおよびレバウディオシドAは和光純薬工業(株)製の純度99.7%および99.0%をそれぞれ用いた。グルコースは和光純薬(株)製特級品を用いた。

C18カートリッジカラム：バリアン社製メガボンドエルト(2g)およびボンドエルト(500mg)をアセトニトリルおよび水でコンディショニングしたものを用いた。

グルコアミラーゼ溶液(1,000 U/mL)：和光純薬工業(株)製のグルコアミラーゼ生化学用(No. 077-04071)10,000 U (EC 3.2.1.3)を水10 mLに溶解して用いた。

その他の試薬はすべて試薬特級を用いた。

3. 装置

恒温槽：タイテック(株)製モノードミニ

UV検出器および示差屈折(RI)検出器付き高速液体クロマトグラフ：日本分光工業(株)製PU-1580型ポンプ、UV-1570型UV検出器、RI-930型RI検出器、CO-1560型カラムオープン、AS-1550型オートサンプラー、デー

タ処理 JASCO BORWIN-NT

4. TLCおよびHPLCによる試料の定性試験

以下に示した5および6の方法により、対象とした試料の定性試験を行った。ただし、それぞれの試験溶液は試料0.25 gを50%アセトニトリル溶液10 mLに溶解し、0.45 μ mのマイクロフィルターでろ過したものを用いた。

5. TLCによる確認

前報⁶⁾と同様の条件を用いた。薄層板はHPTLCシリカゲル60、展開溶媒にクロロホルム-メタノール-水(15:12:3)を用い、薄層板の下端から1 cmのところに試験溶液を2 μ L塗布し、5 cm展開後10%硫酸を噴霧した後、100°C、10分間の加熱により発色した黒~褐色のスポットのR_f値およびパターンを観察した。

6. HPLC測定条件

条件Iカラム：昭和電工(株)製アサヒパックNH2P-50(4.6×250 mm)、温度：40°C、移動相：アセトニトリル-水(78:22)、流速：0.8 mL/min、注入量：20 μ L、検出：UV 210 nm。

条件IIカラム：ナカライテスク(株)製コスモシルC18AR-II(4.6×250 mm)、温度：40°C、移動相：アセトニトリル-水(30:70)、流速：0.8 mL/min、注入量：20 μ L、検出：UV 210 nm

試料の定性試験には条件I, IIを用いた。配糖体の分析には条件Iを使用し、糖分析は条件Iで、検出にRIおよびUV(210 nm)を用いて行った。

7. 検量線

ステビオシドおよびレバウディオシドAは50~500 μ g/mLの80%アセトニトリル標準溶液を用い、グルコースは1,000~5,000 μ g/mLの80%アセトニトリル標準溶液を用い前報⁶⁾に従い、それぞれ検量線を作成した。

8. 未反応配糖体の測定

4の定性試験の方法と同様の試験溶液を用い、6のHPLC法において7に示した標準溶液によりステビオシド、レバウディオシドAの測定を行い、両配糖体の和を算出した。ただし、試験溶液はさらに5~10倍に適宜希釈して用いた。

9. C18カートリッジカラム精製における試料の回収率

試料A, BおよびCの0.25 gについて自主規格の乾燥減量測定条件を準用²⁾し、105°C、4時間乾燥後の重量を測定した。次にその試料を水約10 mLに溶解した後C18カートリッジカラム(2g)に全量負荷し、水10 mLで洗浄後40%アセトニトリル9 mLおよび70%アセトニトリル1 mLで溶出させた。溶出液を水浴上で乾固し、再び105°C、4時間乾燥後の試料の重量を測定し、その重量と精製前の乾燥物重量との比を百分率で表すことにより試料の回収率を求めた。

10. 酵素量の検討

C18カートリッジカラム精製後の3試料A, BおよびCそれぞれについて付加糖の加水分解に用いるグルコアミラーゼ量を反応溶液10 mL中25~500 Uに変化させて

55°C 1 時間反応させた。脱離した糖の含有量を測定し、その反応曲線から加水分解に必要な酵素量を調べた。

11. 反応時間の検討

10 と同様の試料について反応溶液 10 mL 中グルコアミラーゼ 250 U を加えて 55°C で 0.5, 1, 3, 5, 24 時間反応させ、酵素量と同様な方法で反応に必要な時間について調査した。

12. 試験溶液の調製

分析方法の概要を Scheme 1 に示した。試料 0.25 g に水約 10 mL を加えて混和溶解したものを、C18 カートリッジカラム (2 g) に負荷した。水 10 mL で洗浄後、さらに 40% アセトニトリル 9 mL および 70% アセトニトリル 1 mL で酵素処理ステビアを溶出した。その溶液を 1/2 量になるまで水浴上で濃縮し室温まで放置した。次いで濃縮液にグルコアミラーゼ溶液 250 μ L を加え水で 10 mL にした後、その溶液を遠心沈殿管中で密栓し、55°C、3 時間反応させた。

反応液 1 mL を C18 カートリッジカラム (500 mg) に負荷し、水 2 mL を流した後、通過した溶液を 80% アセトニトリルで 5 mL とし 0.45 μ m のマイクロフィルターでろ過したものを糖分析用試験溶液とした。次に 80% アセトニトリル 10 mL で配糖体を溶出させ、適宜 2~5 倍に 80% アセトニトリルで希釈した後上記同様にろ過したものを配糖体分析用試験溶液とした。

結果および考察

1. TLC および HPLC による試料の定性

酵素処理ステビアは製品により、原料の配糖体の成分比

および付加される糖の数などがそれぞれ異なるため、対象とした試料についての TLC および HPLC による定性試験を行った。

TLC は試料中に多糖類を含有するかどうかの確認に用いた。多糖類を含有することが明確であったのは試料 A であり、原点付近にスポットが見られた。その他の試料については本試験の結果からは多糖類の存在は少量であると判断した。

HPLC は糖付加前の原料となる配糖体の種類および混合割合の違いなどを確認するために用いた。条件 I によるクロマトグラムを Fig. 2 に示した。

試料 A, B のクロマトグラムは類似しており、糖付加を受けていない配糖体のステビオシドおよびレバウディオシド A の比率が C と異なっていた。A, B はステビオシドの割合が高く、C はレバウディオシド A が高かった。Fig. 2 には条件 I のクロマトグラムを示したが、条件 II についてもピークの溶出順は逆で分離が悪いが、結果は同様な傾向を示していた。

このように試料 A, B および C で成分比などが異なることから、対象とした 3 試料に適用可能な分析方法を得るため、この 3 試料を用いた測定条件の検討を進めることとした。

2. C18 カートリッジカラム精製における試料の回収率

試料の精製に食品衛生検査指針⁴⁾を準用して C18 カートリッジカラムを用いることとし、0.25 g の試料を C18 カートリッジカラム (2 g) に付加したときの回収率を調べた結果を Table 1 に示した。

試料の回収率は 81.9~90.8% であった。この値を以後

Scheme 1. Analytical method for α -glucosyltransferase-treated stevia

Fig. 2. HPLC chromatograms of α -glucosyltransferase-treated stevia products

HPLC conditions: column Asahipak NH2P-50 (4.6 $\times$ 250 mm), column temp. 40°C, mobile phase acetonitrile-water (78:22), flow rate 0.8 mL/min, injection volume 20 μ L, detection UV (210 nm)
1: Stevioside, 2: Rebaudioside A

Table 1. Recovery of Samples from C18 Cartridge Column

Sample	Recovery ^{1), 2)} (%)	CV (%)
A	81.9 $\pm$ 3.7	(4.5)
B	90.8 $\pm$ 1.1	(1.2)
C	90.3 $\pm$ 1.0	(1.1)

¹⁾: (Weight of dried (105°C, 4 hr) sample after C18 cartridge column processing)/(Weight of dried (105°C, 4 hr) sample before C18 cartridge column processing) $\times$ 100

²⁾: Values are means of 6 trials and values in parenthesis are coefficient of variation.

の加水分解反応および HPLC 分析における一連の操作の回収率算出に用いた。なお、試料 A は TLC による定性の結果、多糖類を含有していたが、C18 カートリッジカラム処理を行ったことにより、多糖類と考えられる TLC 原点のスポットは消失した。

また、カートリッジ処理前と処理後の HPLC クロマトグラムを比較し、両者にほとんど差がないことを確認した。

3. 温度, pH, アセトニトリルの影響および酵素量の決定

α -1,4, α -1,6 結合に作用して末端よりグルコース単位で加水分解する酵素⁷⁾としてグルコアミラーゼを用い、付加糖の脱離に適切な量を検討した。なお、使用温度は自主規格確認法²⁾で用いている 55°C とした。pH についてはグルコアミラーゼ活性測定法⁸⁾中に示されている国際規格などにおいて、pH 4.2~5.0 の範囲で測定を行っていることから、弱酸性~中性近くで活性を示すと考えられた。その範囲を逸脱しないことを考慮した上で、他成分の混入を控えるため、特に調整はせず水溶液のままで行うこととした。

Fig. 3. Effect of the amount of glucoamylase on hydrolysis

Reaction conditions: temp. 55°C, time 1 hr

*: glucose separated by hydrolysis

Fig. 4. Effect of reaction time on hydrolysis

Reaction conditions: temp. 55°C, amount of glucoamylase 250 U/10 mL

*: see Fig. 3

また、反応溶液中のアセトニトリルの加水分解に対する影響を調べたところ、遊離グルコース量は 10% のアセトニトリルを含有する場合は 0% のときの 6 割、7.5% では 8 割であったが、5% ではほぼ 0% の値と差がなかった。そこで、アセトニトリルを除くため、C18 カートリッジカラム処理後の溶液を 1/2 量まで濃縮することとし、その溶液を水および酵素溶液で 10 mL とし、反応溶液として用いたところアセトニトリルの影響はなく、加水分解を行うことができた。

以上の条件でグルコアミラーゼ量を反応溶液 10 mL 中 25~500 U に設定し、1 時間反応させたときの遊離グルコース量を Fig. 3 に示した。反応溶液中の遊離グルコース量は、試料 A および C ではグルコアミラーゼ量が 100 U 以上で増加は微量であり、B でも 250 と 500 U の差が 5% の範囲内であった。そこでグルコアミラーゼは 3 試料において満足できる量として 250 U を用いることとした。

4. 反応時間

反応溶液 10 mL 中グルコアミラーゼ 250 U を用い、その他は上記と同様な条件で、0.5~24 時間反応させたとき

の遊離グルコース量を Fig. 4 に示した。試料 A, B および C すべて 1 時間以上ではほぼグルコース量は一定となった。また、24 時間後での増減も特に認められなかったため、反応時間は余裕を考慮した上で比較的短時間である 3 時間とした。

5. HPLC による遊離糖およびステビア配糖体の測定

実験方法 6 の条件 I により測定した加水分解後の遊離糖のクロマトグラムを Fig. 5 に、ステビア配糖体のクロマトグラムを Fig. 6 示した。

含有量測定において糖は RI 検出、配糖体は UV (210 nm) 検出の値を用いた。RI 検出において、ステビア配糖体のリテンションタイムがフルクトースおよびグルコースと接近しているため糖と配糖体が混在する場合は相互に測定の妨害となる。そこで、C18 カートリッジカラムを用いて糖とステビア配糖体を分離することとした。その結果、糖分析の RI 検出において配糖体による妨害はなく、分析が可能となった。分離が不十分な場合、糖および配糖

Fig. 5. HPLC chromatograms of separated sugar after hydrolysis

HPLC conditions: detection RI, others see Fig. 2

Fig. 6. HPLC chromatograms of stevia glycosides after hydrolysis

HPLC conditions: see Fig. 2

1: Stevioside, 2: Rebaudioside C, 3: Rebaudioside A, 4: Dulcoside A

体の分析値は正確性を欠くこととなるが、糖分析用試験溶液の測定において UV および RI 検出の両方をモニターすることにより、UV のクロマトグラムに配糖体のピークが検出されていないことを確認することで解消できた。

遊離糖 (Fig. 5) については試料 A, B および C について現れたピークを標準品と対比し、グルコースであることを確認した。

ステビア配糖体については、Fig. 2 と Fig. 6 のクロマトグラムを比較した結果、付加糖の離脱により、試料 A, B および C のいずれにおいてもレバウディオシド A より後方のピークが消失していることが確認できた。さらに、それぞれの配糖体の分離もよく、妨害ピークは認められないことから精度の高い定量が可能であった。

6. 付加糖、各配糖体総含有量および未反応配糖体含有量

試料 A, B および C について加水分解後の遊離糖、配糖体の含有量および実験方法 8 による未反応配糖体を HPLC で測定した結果を Table 2 に示した。

遊離糖であるグルコースの含有量は 25~42% であり、

Table 2. Contents of Glucose and Glycosides in Samples after Hydrolysis and Contents of Unreacted Glycoside in Samples

Sample	Glucose		Glycoside					Unreacted glycoside	Total glycoside (2)***
			Stevioside	Rebaudioside A	Rebaudioside C	Dulcoside A	Total (1)**		
	Content* (%)	CV (%)			Content* (%)			Content* (%)	Content* (%)
A	42	5.5	24.0	10.3	2.9	1.2	38.4	2.7	35.7
B	28	3.6	39.5	13.2	1.6	ND	54.3	1.9	52.4
C	25	9.8	10.5	41.7	4.4	ND	56.6	4.1	52.5

*: Values are means of 5 trials.

**: Containing unreacted glycoside

***: Unreacted glycoside was subtracted from total (1).

CV: coefficient of variation

ND: glucose; <1.5%, glycoside; <0.1%

比較的含有量は多いことが分かった。酵素処理ステビアは体内で加水分解によりグルコースを離脱し最終的にステビオールになるといわれている⁹⁾。そこで、低カロリー甘味料として用いる上では付加糖の含有量が高い場合、代謝後のグルコース量に留意する必要があると考える。RI 検出器を用いたグルコース測定は、5 回試行において CV 値に幅が見られた。

試料中の各配糖体含有量（未反応配糖体を含む）はステビオシドが 10.5～39.5%，レバウディオシド A は 10.3～41.7% の範囲であり、試料 A および B は糖付加前の原料ステビア配糖体中のステビオシドの含有量がレバウディオシド A の 2～3 倍で、試料 C はその逆にレバウディオシド A がステビオシドより 4 倍多く含有するものであることが分かった。また、4 種の配糖体総含有量 (1) は 38.4～56.6% であった。

なお、レバウディオシド C およびズルコサイド A は前報⁶⁾と同様に、それぞれレバウディオシド A およびステビオシドを標準品として用いて測定した。

また、各試料中の未反応配糖体の含有量は 1.9～4.1% であった。配糖体総含有量 (1) は、製造時に糖の付加を受けていない未反応配糖体も同時に測定されていることから、それを差し引いた配糖体総含有量 (2) を算出したところ 35.7～52.5% が得られた。

7. 酵素処理ステビア含有量および回収率

前出の 6 で得られた付加糖の含有量および配糖体総含有量 (2) との和から算出した試料中の酵素処理ステビアの含有量結果および回収率を Table 3 に示した。

酵素処理ステビア含有量は 77.5～80.4% であり、製品中の主成分含有量は約 80% と比較的高い純度のものであることが分かった。

C18 カートリッジカラム処理後の試料量を 100 として計算した回収率は 5 回試行の平均値が 85.8～94.9%，変動係数は 5.1～5.5% であった。定量限界は各配糖体について 0.1%，糖で 1.5% であった。

このように回収率が良好な値を示したことから、ステビア配糖体と α -1,4 結合した付加糖が酵素により定量的に加水分解されていると判断できた。

以上の結果を総合すると、本試験法は酵素処理ステビア

添加物製品の成分分析法として十分実用性のある方法と考える。

8. 自主規格値との対比

自主規格では糖の含量計算において、糖加水分解による水素量の増加などの調整のため係数 0.9 を乗じることになっている。その係数を乗じてグルコース含有量を計算すると試料 A, B および C ではそれぞれ 37.8, 25.2 および 22.5% となり、配糖体総含有量 (1) を加えた酵素処理ステビア成分含量は 76.2, 79.5 および 79.1% となる。さらに含量規格は、これを乾燥物換算することとなっている。そこで、実験方法 9 の方法で測定した試料 A, B および C の乾燥減量の 7.7, 7.0 および 7.0% を用いて成分含量を乾燥物換算すると、82.6, 85.5 および 85.1% となった。よって、これら成分含量値は協会の自主規格値の 80.0% 以上²⁾を満たす値であった。

なお、乾燥減量については今回の試料を入手当時に測定した値は前報⁶⁾に示したとおり 3.3～6.6% で、1 試料を除いて規格値の 6.0% 以下であったが、分析直前に測定した値は 7.0～7.7% であった。これは、今回は完全を期するため乾燥時間を規定の 2 時間より長い 4 時間で行ったことや前回からの保管中に水分含量が増加したものではないかと考えられる。

さらに自主規格には、未反応配糖体含量を 15.0% 以下と規定しているが、今回の結果から 1.9～4.1% で規格値の 15.0% 以下を満たした。

ま と め

食品添加物酵素処理ステビアの酵素分解を用いた成分分析法を開発した。

1. 付加糖を加水分解するためにグルコアミラーゼを用い加水分解条件を検討したところ、グルコアミラーゼ量は反応溶液 10 mL 中 250 U、反応温度および時間は 55℃、3 時間が分解に適切な条件であることが分かった。

2. 試料中の多糖類などの除去のため、C18 カートリッジカラム精製する方法を検討した。また、加水分解後の糖と配糖体の分離のため、C18 カートリッジカラムを用いたところ、HPLC の RI および UV 検出で妨害なく分析を行うことができた。

3. 回収率は C18 カートリッジカラム精製後の試料量を 100 とした場合、対象とした 3 試料についてすべて 85% 以上であり、変動係数は 5.1～5.5% であった。

4. 本法を用いて酵素処理ステビア製品を分析した結果、付加糖としてグルコースが検出され、その含有量は 25～42% で製品中の 3～4 割を示す値であり、含有量が高いことが分かった。また、未反応配糖体含有量を除いた 4 種の配糖体総含有量は 35.7～52.5% であり、両含有量を合計した酵素処理ステビア成分含量は 77.5～80.4% であった。

また、糖量に係数 0.9 を乗じ、さらに乾燥物換算により得られた成分含量値はすべての試料で 80.0% 以上であり、

Table 3. Contents of α -Glucosyltransferase-treated Stevia and Recoveries

	Content ^{1)*} (%)	Recovery ^{2)*} (%)	CV (%)
A	77.7	94.9	5.5
B	80.4	88.5	5.4
C	77.5	85.8	5.1

*: Values are means of 5 trials.

CV: coefficient of variation

¹⁾: Glucose + total glycoside (2) (see Table 2)

²⁾: (Content of α -glucosyltransferase-treated stevia) / (Sample weight after refining by C18 cartridge column) $\times$ 100

自主規格値を満たした。

謝 辞

本研究の実施に当たり、試料収集にご協力いただいた日本食品添加物協会および当所広域監視部の諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局長通知“既存添加物名簿収載品目リスト”平成8年5月23日，衛化第56号(1996).
- 2) 日本食品添加物協会“第三版既存添加物自主規格”2003, p. 142-143.
- 3) Senma, M., Fujii, M., Okada, Y., Kataoka, H., Ito, Y., Development of rapid analyses of stevia sweeteners and an approach to study the component of stevia by intestinal microbes. *Jpn. J. Food Chem.*, **8**, 105-111 (2001).
- 4) Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan “Shokuhin Eiseikensa Shishin” Tokyo, Japan, Food Hygiene Association, 2003, p. 555-563.
- 5) Sakamoto, I., Analysis of glycosides, Hiroshimaken Eiseikenkyusho Hokoku (Ann. Rep. Hiroshima Prefect. Inst. P.H.), **33**, 1-15 (1986).
- 6) Hirata, K., Uematsu, Y., Suzuki, K., Iida, K., Yasuno, T., Kamata, K., Analysis of stevia glycosides in stevia products of natural sweetening and evaluation of their chemical quality. Tokyo Eiken Nenpo (Ann. Rep. Tokyo Metro. Res. Lab. P.H.), **53**, 108-112 (2002).
- 7) Tsujisaka, Y. *et al.*, eds. “Oyo Koso Gaku” Tokyo, Kodansha, 1980, p. 40-42 (ISBN 3043-383005-2253).
- 8) Hirokado, M., Hirata, K., Uematsu, Y., Hatooka, U., Kazama, M., Assay for activities of β -amylase and glucosylase used in food processing. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **35**, 28-33 (1994).
- 9) Kakegawa, K., The newest safety evaluation for stevia sweeteners. *Gekkan Fudo Kemikaru (A Technical Journal on Food Chemistry & Chemicals)*, **12**, 41-46 (2001).