凍結乾燥筋原繊維タンパク質の変性に及ぼすスクロースの影響

松 田 由 美 子

(1978 年 11 月 29 日受理)

Influence of Sucrose on the Protein Denaturation of Lyophilized
Carp Myofibrils during StorageYumiko MATSUDA*¹

The effect of various concentrations of sucrose on the quality change of lyophilized myofibrils during storage was examined. Myofibrils from live carp, *Cyprinus carpio*, were ground with polyphosphates and sucrose. The mixtures were freeze-dried at 35°C, ground into powder, packed in 0.1 mm thick polyethylene bags, and stored for 6 months at 20°C. At suitable intervals, aliquots of the mixtures were taken out and examined as to quality, using as indexes the solubility in 0.6 M KCl, the relative viscosity, and the ATPase activity of the 0.6 M KCl extractable protein, and the total ATPase activity.

The higher the concentration of sucrose, the better was the quality retention of the powder. Above 5 per cent in a wet basis before freeze-drying, however, there was no significant difference in the effect of sucrose. It was also noted that protein denaturation was accelerated in the powder to which but polyphosphates had been added.

これまでの実験¹⁻³⁾において、保護物質を添加してあるスケトウダラ冷凍すり身を凍結乾燥するとかまぼこ形成能を保持している魚粉が得られること、ならびにその後の貯蔵中においても適当な条件下に置くことにより、かまぼこ形成能を長く保持しうることを明らかにしてきた。本実験において、更に、このようなかまぼこ形成能のある魚粉の製造と貯蔵に関する基礎的研究を行うこととし、コイの筋原繊維を用いて魚肉タンパク質に対するスクロースの保護効果を検討した。

保護効果の判定は 0.6 M KCl 可溶性窒素量、粘度、ならびに ATPase 活性を測定することにより行うこととした。可溶性窒素量はかまぼこ形成能の指標とは必ずしもなり得ないことがすでに示唆されているが⁴⁾、かまぼこ形成能の指標となりうる測定法はいまだに見出されていない。高次構造を持つタンパク質の性質を一つの測定結果から論ずるのは危険とされていることから、三つの測定を合せて行うこととした。更に、川島ら⁵⁻⁸⁾がすり身のかまぼこ形成能は比活性と溶解量を勘案したところの全 ATPase 活性と最も相関が高く、10 g のすり身中の全 ATPase 活性の表示を提唱しているが、本実験でもこれに類似した表示を行い、総合的に保護効果を判定することとした。

冷凍すり身の添加糖量は無塩すり身では陸上 5%、洋

上 8%、加塩すり身では陸上、洋上ともに 10% に規格化されている。なお、無塩と、最近では陸上加塩すり身にもポリリン酸塩が 0.2% 添加されている。本実験ではコイ筋原繊維にポリリン酸塩 0.2% とスクロース 10% 以下を添加し、凍結乾燥後、貯蔵中におけるスクロースのタンパク質保護効果と至適濃度を検討した。

実験方法

材料 市販のコイ、*Cyprinus carpio* の活魚、体長 30 cm、重量約 1 kg を供試した。

コイ筋原繊維粉末の調製 筋原繊維の抽出は PERRY⁹⁾ 原法の簡易法^{*2}によった。コイ活魚を延髄即殺し、流水で切口を洗いながら十分脱血後、断頭した。三枚に卸し、普通肉のみを取り出し、ポリエチレン袋に入れ、外側から氷水で冷却した。筋肉をチョッパーにかけ、10 倍量の 0.12 M KCl 溶液を加え、泡止めブレンダー（回転数 7,000 rpm）で 30 秒間ずつ 2 回細碎し、15 デニールのナイロン布で濾過して結合組織を除去後、濾液を 5,000×g で連続冷却遠心分離した。得られた沈殿を再度同じ操作により洗浄し、遠心分離し、筋原繊維試料を得た。本試料の水分、粗タンパク質はそれぞれ 89.6、8.6% であった。

本試料にポリリン酸塩（ピロリン酸ナトリウムとトリ

*¹ 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, 5-7, Konan 4, Minato-ku, Tokyo 108).

*² 野口 敏・松本重一郎：未発表

Fig. 1. Preparation of lyophilized myofibrillar powder from carp muscle.

ポリリン酸ナトリウムを等量混合したもの; PP) 0.2% とスクロースを 0, 1, 3, 5, 8, 10% の割合で添加混合し, 真空凍結後, 板温度 35°C で 15 時間乾燥した。その間品温は -42~+25°C であった。乾燥終了の判定は次の方法によつた。つまり試料温度の上昇, ピラニー真空計の変動, コールドトラップ温度の降下がほとんどなくなつてほぼ一定値を保つようになった時, 全てのバルブを閉じ, 一定時間のピラニー真空計の指針の変動を測定することを何回か繰返し, 変動が小さくなつた時をもつて行つた。乾燥後はただちに乳鉢で粉碎して, コイ筋原繊維粉末を得た。操作法の概要を Fig. 1 に示す。

粉末はただちに約 1 g ずつ精秤し, パラフィン紙に包み, 厚さ 0.1 mm のポリエチレン袋に真空包装し, 20°C に貯蔵した。また, 無添加の筋原繊維を同様に処理して対照とした。

品質判定 凍結乾燥直後と貯蔵中に一部を取り出し, 次の測定方法により品質を判定した。

1. 可溶性窒素量: 試料約 1 g に 5°C に予冷した 0.6 M KCl 溶液 (WEBER—EDSALL 溶液, pH 7.3) 50 ml を加え, 真空容器中で真空度 50 Torr に約 5 分間保ち, 5°C に 1 時間放置した後 0.6 M KCl を加えて総量を 200 ml とし, 泡止めブレンダー (回転数 2,000 rpm) で 30 秒間ずつ 2 回細砕し, 5,000×g で 20 分間冷却遠心分離した。上澄液中の窒素量をマイクロケルダール法で測定し, 0.6 M KCl 可溶性窒素量を全窒素に対する%で示した。

2. 粘度: 0.6 M KCl 可溶性タンパク質の溶液を適宜 4 段階に 0.6 M KCl で希釈し, キャノンフェンスケ粘度計 No. 50, 動粘度係数 0.005 前後のものをを用い, それぞれの粘度を 25°C で測定し, タンパク質濃度 2 mg/ml

における相対粘度を補間法により求めた。

3. ATPase 活性: NOGUCHI ら¹⁰⁾の方法に従つた。0.6 M KCl 可溶性タンパク質の溶液 1 ml を 25 ml 容共栓試験管にとり, トリス・マレート緩衝液 (pH 6.3) 1 ml, 1.7 M KCl (0.6 M KCl と同様に調製したもの) 1.6 ml, 10 mM CaCl₂ 0.4 ml を順次混合後, 25°C に 10 分間保ち, それに 6.6 mM ATP 2.0 ml を加えて 1, 2, 3 分間反応させ, 10% TCA (0°C) 5 ml を加えて反応を止めた。氷水中に保つて完全にタンパク質を沈殿させた後, 東洋濾紙 No. 7 で濾過し, 濾液中の無機リンを FISKE—SUBBAROW¹¹⁾ 原法の改良法^{12,13)}により測定した。この反応系の最終濃度は Table 1 に示すごとくである。

ATPase 活性はタンパク質 1 mg 当り 1 分間に生成する無機リンの μmol 濃度で表示した。

4. 全 ATPase 活性: かまぼこ形成能は溶出タンパク質の比活性と溶解量とのかかわりあいでは決まると考えられるところから, 可溶性窒素量に ATPase 比活性を乗じたもの, つまり, 試料総タンパク質 1 mg 当り 1 分間に生成する無機リンの μmol 濃度でそれを表示した。

結 果

可溶性窒素量 Fig. 2 に示すごとく, 乾燥直後にスク

Table 1. Reaction mixture of ATPase activity

40 mM Tris-maleate (pH 6.3)
0.7 mM CaCl ₂
0.56 M KCl
2.2 mM ATP
0.2~0.5 mg protein/ml

The reaction was carried out for 1-3 min at 25°C.

Fig. 2. Effect of sucrose of various concentrations on the changes in soluble nitrogen content of lyophilized carp myofibrillar powder during storage at 20°C.

Fig. 3. Effect of sucrose of various concentrations on the changes in relative viscosity of 0.6M KCl soluble protein in lyophilized carp myofibrillar powder during storage at 20°C.

ロース濃度による相違が認められた。0.2% PP だけ添加したものでは値が低く、しかも貯蔵 1/4 カ月後に激減した。この低下は対照よりも大きく、PP だけの添加では保護効果を示さず、むしろ変性促進の傾向が示された。一方、スクロース濃度を増すと低下が抑えられたが、8% と 10% 添加したものでは大差は認められなかった。

粘度 Fig. 3 に示すごとく、0.2% PP だけ添加したものでは大きく低下した。一方、スクロース添加は低濃度でも保護効果を示し、濃度が増すと低下が抑えられた。ただし、6 カ月貯蔵後には 5~10% 添加したものでは相違がみられなかった。

ATPase 活性 Fig. 4 に示すごとく、0.2% PP だけ

添加したものではむしろ変性促進が認められた。スクロース添加により保護効果が現れ、濃度が増すにつれて活性の低下が抑えられた。4.5~6 カ月貯蔵後には 5~10% 添加したものでは相違がみられなかった。

全 ATPase 活性 Fig. 5 に示すごとく、0.2% PP だけ添加したものでは対照より低く、明らかに変性促進が認められた。また添加糖濃度が増すと、保護効果が増すことが認められた。

考 察

凍結乾燥コイ筋原繊維に対するスクロースの保護効果は 10% 以下の添加では濃度が増すほど大きいこと、しかし、5% 以上では差が小さいことが認められた。

Fig. 4. Effect of sucrose of various concentrations on the changes in ATPase activity of 0.6M KCl soluble protein in lyophilized carp myofibrillar powder during storage at 20°C.

Fig. 5. Effect of sucrose of various concentrations on the changes in total ATPase activity of lyophilized carp myofibrillar powder during storage at 20°C.

The total ATPase activity of materials seems correlated with the amount and the specific activity of soluble actomyosin which in turn related to kamaboko-forming ability. The total ATPase activity is the product of soluble nitrogen content by ATPase activity, expressed as μmol free phosphate per min, per mg total sample protein.

スクロースのタンパク質保護効果については冷凍中では田元¹⁴⁾, IKEUCHI^{18,19)}がすり身, SIKAMA^{17,18)}がカタラーゼ, YASUI¹⁰⁾, HASHIMOTO²⁰⁾がミオシン, 川島⁹⁾, 新井^{21,22)}, NOGUCHI²³⁾がアクトミオシンについて報告している。凍結乾燥中では上岡²⁴⁾が魚肉, HASHIMOTO²⁰⁾, YASUI²⁵⁾がミオシン, 花房^{26,27)}がカタラーゼとミオシン, 新井²¹⁾がアクトミオシンについて報告している。大小の相違はあるがいずれでもスクロースがタンパク質保護効果を持つこと

が認められている。ただし、これら既往の文献には凍結乾燥後の貯蔵中の保護効果に関しては何等記載されていない。

ここでタンパク質が凍結とそれに続く乾燥と貯蔵によってどのような変化をするのか、次いでスクロースが保護効果をどのようにして現すのかについて²⁸⁻³¹⁾論及したい。

まだ明らかにされていない部分が多いが、タンパク質の凍結乾燥による変性は主に水が氷に状態変化すること

と、水がほぼ完全に除かれることによつていよう。近年、水溶液中のタンパク質分子の安定化における最も重要な役割を担うものはそれととりまく水の構造と疎水結合であるとされている³²⁻³⁷⁾。普通の生理的温度では、非極性分子が溶けていると、その囲りに水分子同志が水素結合した会合体(クラスレート、アイスバーグ)を作る性質を有し³⁸⁾、温度が低くなると会合体は安定化して増す。一方、タンパク質は天然の状態では規則性のある折りたたみ構造(folding structure)をとるが、その安定性は共有結合の他に非共有結合によるところが大きい。水溶液中では非極性基がそれととりまく水のクラスレートの一部を破壊して、水を排除して接近し、疎水結合を形成すること、およびポリペプチド鎖中の水素結合し得る全ての残基が水素結合を形成することによつて折りたたみ構造の安定性が保たれていると考えられる。その他にタンパク質の表面の極性基の囲りにはいろいろな型の水和水があり、水和水は主に水素結合によつて保たれていると考えられる。

疎水結合は 18°C で最も安定であることが知られ³⁹⁾、それより温度が高くとも低くとも不安定となる。従つて、水が凍つてクラスレートを安定化する時、疎水結合は破壊される。

凍結に続く凍結乾燥では水は氷結したまま昇華により除かれ、水分 0 近くにまで達する。その際水和水までも除かれ、極性基が露出される。もつともこの変化は凍結状態でも水和水がクラスレートに移行するような低温では起こると考えられる。

疎水結合と水和の破壊は次いで構造上の再配列をもたらし、変性へと導くが、凍結乾燥直後のまだ非極性基が移動せずに接近して存在する間は、復水すると疎水結合は元に戻ると考えられる。これは、非極性基はランダム状態からでさえ元の折りたたみ構造へと可逆的に移行しうる性質を熱エネルギー的に持つ³⁹⁾ことによつていよう。また水和水も元に戻ると考えられるが、その可逆性は疎水結合と比べるとずっと小さい³⁹⁾。しかし、全体としては元の折りたたみ構造に戻ると思われる。本実験でも、スクロース無添加の対照が凍結乾燥直後には高い測定値を示していたことから、これら推察の妥当性が認められた。

貯蔵中に水和の破壊された極性基がタンパク質分子間に新たな水素結合を形成することにより、凍結乾燥直後に保持されている折りたたみ構造は変化していく。それはタンパク質分子は溶液中にあるよりも非水状態にある時この変化を受け易く、しかも、水素結合は供与体と受容体原子の性質に基づき特徴のある長さや結合角度を維持する⁴⁰⁾ため、新たな水素結合を形成する時、タンパク質分子は形の変化を伴うことになる。おそらく脱水によ

り破壊された疎水結合は折りたたみ構造をもはや保てず、折りたたみ構造は部分的にほどけてランダム状態になり、再配列されてβ-型をとることになろう。分子がほどける際に水和の部位が更に乱されて、復水しても元に戻らなくなると考えられる。

このようなタンパク質の変性を防止する上から、NOGUCHI ら^{40,41)}はタンパク質保護物質は親水性基を二つ以上持ち、ある立体構造を持つ必要があることをアクトミオシンの凍結実験から指摘し、MORICHI ら⁴²⁻⁴⁵⁾も細菌の凍結乾燥に対する保護物質に関して同様のことを認めている。水素結合は特徴のある長さや結合角を持つという先の記載からも保護物質がある立体構造を持つことの必要性が示唆される。

本実験で検討したスクロースは多数の OH 基を持つが、その OH 基により水分子間に介在して凍結によるクラスレートの安定化を阻止し、またタンパク質分子と水分子の間に介在して水和の部位を保護し、凍結乾燥後の貯蔵中の疎水結合と水和の破壊を防止することによりタンパク質保護効果を発現すると考えられる。

本実験では PP を 0.2% 添加している。PP 0.2% だけの添加では無添加の対照よりも乾燥直後の測定値が低く、その後の貯蔵中の低下も速く、PP がタンパク質の変性をむしろ促進することが示された。また図には示さなかつたが、筋原繊維に対するスクロースと PP の併用効果はほとんど認められなかつた。無機リン酸塩とタンパク質の相互作用に関しては FUKAZAWA ら⁴⁶⁾、YASUI ら^{47,48)}がピロリン酸、トリポリリン酸、ヘキサメタリン酸と天然のアクトミオシンの相互作用を調べ、ピロリン酸だけがアクトミオシンの大きさと形を変える作用を示し、ソーセージの結着性と保水性を改良するのに有効であると記載している。冷凍中では西谷ら⁴⁹⁾、田元ら¹⁴⁾がすり身に対する PP の保護効果と、PP と糖の顕著な併用効果とを認めているが、川島ら⁷⁾は PP の効果をほとんど認めていない。花房²⁰⁾はミオシンに対しピロリン酸は保護効果を示さないことを、NOGUCHI ら⁶⁰⁾、MATSUMOTO ら⁶¹⁾はアクトミオシンに対しトリポリリン酸ナトリウムが変性抑制効果を示すが、ピロリン酸ナトリウムは示さないことを報告している。凍結乾燥においては岡ら⁶²⁾、上岡ら²⁴⁾は魚肉に対しピロリン酸ナトリウム、ならびにそのスクロースとの混液浸漬が吸水率を増大し、品質を向上させることを認めている。しかし、花房^{20,27)}はピロリン酸ナトリウムがミオシンとカタラーゼの変性を促進することを、新井ら²¹⁾もアクトミオシンの冷凍および凍結乾燥に対し PP、ならびに PP とスクロースとの併用が効果を示さないことを報告している。このように既往の文献によつてもリン酸塩の効果に関する見解は一致していない。更に、リン酸塩の効果において

はイオン強度による違いが考えられることから、PP の併用効果についても一つの実験結果から断定することは難しい。

要 約

1. コイ筋原繊維にポリリン酸塩 0.2% とスクロース 10% 以下を添加し、凍結乾燥後、厚さ 0.1 mm のポリエチレン袋に封入し、20°C で貯蔵し、スクロースのタンパク質保護効果を比較した。

2. 品質判定は 0.6 M KCl 可溶性窒素量、粘度、ATPase 活性、および全 ATPase 活性の測定により行つた。

3. スクロース濃度が増すほど保護効果は大きいこと、しかし、5% 以上では大差がないことが認められた。

4. ポリリン酸塩 0.2% だけの添加ではタンパク質の変性をむしろ促進することが認められた。

本研究の遂行に当り終始ご懇篤なるご指導を賜わつた東京水産大学教授田中和夫博士に深く感謝いたします。また、上智大学教授松本重一郎博士、大洋漁業(株)野口敏博士には有益なご助言を賜わつたこと、ならびに本実験に東京水産大学学生片山博視、駒木 勝両君の協力を得たことを記し、厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 松田由美子: 日水誌, 37, 130-134 (1971).
- 2) 松田由美子: 日水誌, 37, 135-139 (1971).
- 3) 松田由美子: 日水誌, 45, 511-515 (1979).
- 4) 松田由美子: 日水誌, 45, 517-521 (1979).
- 5) Y. MATSUDA: in "Proceedings of the XIIIth International Congress of Refrigeration Washington DC 1971", Vol. 3, AVI, Westport, 1973, pp. 749-756.
- 6) 川島孝省・新井健一・斎藤恒行: 日水誌, 39, 207-214 (1973).
- 7) 川島孝省・新井健一・斎藤恒行: 日水誌, 39, 525-532 (1973).
- 8) 川島孝省・大場明子・新井健一: 日水誌, 39, 1201-1209 (1973).
- 9) S.V. PERRY: *Biochem. J.*, 51, 495-499 (1952).
- 10) S. NOGUCHI and J.J. MATSUMOTO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 36, 1078-1087 (1970).
- 11) C.H. FISKE and Y. SUBBAROW: *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400 (1925).
- 12) 古川美探・種田雅子・中村康吉・春日誠次, 吉川春寿: 生化学, 24, 76-82 (1952).
- 13) 高橋泰常: 生化学領域における光電比色法, 各論 2 (関根隆光・笠川泰治・森田茂広・木村徳次・倉富一興編), 第 2 版, 南江堂, 東京, 1960, pp. 8-11.
- 14) 田元 肇・田中 修・武田二美雄・福見 徹・西谷喬助: 北水研報, No. 23, 50-60 (1961).
- 15) T. IKEUCHI and W. SIMIDU: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 29, 157-160 (1963).
- 16) T. IKEUCHI and W. SIMIDU: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 29, 258-262 (1963).
- 17) K. SHIKAMA and I. YAMAZAKI: *Nature*, 190, 83-84 (1961).
- 18) K. SHIKAMA: *Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. IV (Biol.)*, 29, 91-106 (1963).
- 19) T. YASUI, J. MORITA, and K. TAKAHASHI: *J. Biochem.*, 60, 303-316 (1966).
- 20) Y. HASHIMOTO and T. YASUI: *Nature*, 211, 194-195 (1966).
- 21) 新井健一・高橋英明・斎藤恒行: 日水誌, 36, 232-236 (1970).
- 22) 新井健一・高士令二: 日水誌, 39, 533-541 (1973).
- 23) S. NOGUCHI, K. OOSAWA, and J.J. MATSUMOTO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 42, 77-82 (1976).
- 24) 上岡康達・岡 弘康・末光榮充・杉本 剛: 食品工誌, 13, 475-480 (1966).
- 25) T. YASUI and Y. HASHIMOTO: *J. Food Sci.*, 31, 293-299 (1966).
- 26) 花房尚史: 低温科学, B 27, 11-22 (1969).
- 27) 花房尚史: 低温科学, B 32, 1-8 (1974).
- 28) 花房尚史: 凍結・乾燥と細胞障害 (根井外喜男編), 東大出版会, 東京, 1970, pp. 1-19.
- 29) 花房尚史: 凍結・乾燥と保護物質 (根井外喜男編), 東大出版会, 東京, 1972, pp. 10-23.
- 30) 花房尚史: 食品の水一水分活性と水の挙動 (日本水産学会編), 水産学シリーズ 3, 恒星社厚生閣, 東京, 1973, pp. 9-24.
- 31) 花房尚史: 冷凍, 48, 713-722 (1973).
- 32) I.M. KLOTZ: *Science*, 128, 815-822 (1958).
- 33) W. KAUZMAN: in "Advances in Protein Chemistry" (ed. by C.B. ANFINSEN, M.L. ANSON, K. BAILEY, and J.T. EDSALL), Vol. 14, Academic Press, New York, 1959, pp. 1-63.
- 34) 浜口浩三・黒野朝子・後藤幸男: 生物物理, 1, 176-180 (1961).
- 35) G. NEMETHY and H.A. SCHERAGA: *J. Phys. Chem.*, 66, 1773-1789 (1962).
- 36) K. SHIKAMA: *Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. IV (Biol.)*, 31, 67-73 (1965).
- 37) J.L. KAVANAU: *Structure and Function in Biological Membranes*, Vol. 1, Holden-Day, San Francisco, 1965, pp. 171-248.
- 38) H.S. FRANK and M.W. EVANS: *J. Chem. Phys.*, 13, 507-532 (1945).
- 39) R.H. HASCHEMEYER and A.E.V. HASCHEMEYER: *Proteins—A Guide to Study by Physical and Chemical Methods*, Wiley, New York, 1973, pp. 109-129.
- 40) S. NOGUCHI and J.J. MATSUMOTO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 41, 243-249 (1975).
- 41) S. NOGUCHI and J.J. MATSUMOTO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 41, 329-335 (1975).
- 42) T. MORICHI, R. IRIE, N. YANO, and H.

- KEMBO: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 9, 149-161 (1963).
- 43) T. MORICHI, R. IRIE, N. YANO, and H. KEMBO: *Agr. Biol. Chem.*, 29, 61-65 (1965).
- 44) 森地敏樹: 生細胞の凍結乾燥 (根井外喜男編). 日本学術振興会, 東京, 1965, pp. 38-47.
- 45) T. MORICHI: in "Proceedings of the First International Conference on Culture Collections" (ed. by H. IIZUKA and T. HASEGAWA), Univ. of Tokyo Press, Tokyo, 1970, pp. 351-361.
- 46) T. FUKAZAWA, Y. HASHIMOTO, and T. YASUI: *J. Food Sci.*, 26, 550-555 (1961).
- [47) T. YASUI, M. SAKANISHI, and Y. HASIMOTO: *J. Agr. Food Chem.*, 12, 392-399 (1964).
- 48) T. YASUI, T. FUKAZAWA, K. TAKAHASHI, M. SAKANISHI, and Y. HASHIMOTO: *J. Agr. Food Chem.*, 12, 399-404 (1964).
- 49) 西谷喬助・武田二美雄・田元 馨・田中 修・福見 徹・久保 正・鳥谷部憲男: 北水試月報, 17, 373-384 (1960).
- 50) S. NOGUCHI and J.J. MATSUMOTO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 37, 1115-1122 (1971).
- 51) J.J. MATSUMOTO and S. NOGUCHI: in "Proceedings of the XIIIth International Congress of Refrigeration Washington DC 1971". Vol. 3, AVI, Westport, 1973, pp. 237-241.
- 52) 岡 弘康・末光栄充・上岡康達: 愛媛総指報, 2号, 32-35 (1965).