

## 酵素的 褐變反應 生成物에 對한 Rec-assay

### 및 DNA 切斷 作用

#### —銅 Ion 濃度の 影響—

咸昇市 · 朴富吉 · 李相榮 · 李鎮夏 · 姜昌基 · 李得植 · 大村浩久\*

江原大學校 食品工學科, 九州大學 食糧化學工學科\*

(1984년 11월 12일 수리)

## Rec-assay and DNA-breaking Action on the Enzymatic

### Browning Reaction Products

#### —Influence of Cupric Ion Concentration—

S.S. Ham, B.K. Park, S.Y. Lee, J.H. Lee, C.K. Kang, D.S. Lee and  
Hirohisa Omura\*

Dept. of Food Science and Technology, National Univ., Chun-cheon, Korea. Kang-weon  
Food Science and Technology Institute, Kyushu University, Fukooka,\* Japan

#### Abstract

In order to obtain mutagenic data of enzymatic browning reaction products, we investigated their mutagenicity. The rec-assay with *Bacillus subtilis* strains H17(rec<sup>+</sup>) and M45(rec<sup>-</sup>) were carried out with their spores. Detection of double strand breakage in calf-thymus DNA was investigated into sample solution with and without Cu<sup>2+</sup> by the agarose slab gel electrophoresis. In the rec-assay, catechol, pyrocatechol, DL-dopa, 3,4-dihydroxytoluene, hydroquinone, hydroxyhydroquinone with and without Cu<sup>2+</sup> in 0.05M and 0.1M at the enzymatic browning reaction products showed mutagenic action. And also browning solution of 0.05M hydroxyhydroquinone and catechol with Cu<sup>2+</sup>, hydroquinone with and without Cu<sup>2+</sup> of 0.1M at the enzymatic browning reaction products were strong mutagenic action. The DNA breakability of the enzymatic browning reaction products of 0.1M pyrogallol was stronger than that of 0.05M pyrogallol browning solution with Cu<sup>2+</sup> and 3,4-dihydroxytoluene browning solution was stronger than that of 0.01M 3,4-dihydroxytoluene browning solution.

#### 緒 論

食品添加物을 비롯한 食品의 自然發生 毒性物  
質과 各種農藥의 濫用에 依한 農作物의 汚染物質

그리고 環境汚染物質들에 依한 突然變異 誘發與否  
에 對해서 많은 사람들의 關心을 불러 일으키고  
있다<sup>1,2,3)</sup>. 따라서 이에 關한 많은 研究者들은 各種  
發癌物質을 確實하게 糾明하여 癌을 豫防하려는  
데 많은 努力을 기울여 왔으며, 突然變異 物質이

\* 本 研究은 1984年度 文敎部 學術研究助成費에 依해 研究되었음.

근 발암물질임이 밝혀진 以後에는 突然變異原성에 關한 研究가 活潑히 進行되어 왔다. 1980년대에 들어와서는 食品의 發癌物質에 關한 關心이 높아져 日本의 美奈子<sup>4)</sup>는 日常食品中の 突然變異原物質에 對한 研究에서 各種 香辛料와 절임 食品 그리고 高사리等의 植物性食品과 飲料系統으로서 coffee, 紅茶, 綠茶와 alcohol性 飲料等에 對하여 突然變異原성을 試驗하였고 加熱食品에 對해서는 燒肉, 燒魚等에 對하여 試驗하여 새로운 突然變異原物質 即 發癌物質을 分離하였다. 한편 村上은 食品成分으로서 植物 組織中에 단독 혹은 配糖體로서 널리 含有되어 있는 polyphenol化合物이 腫瘍抑制作用이 있음을 밝혔고<sup>5,6)</sup> 그 原因이 polyphenol化合物에 依한 DNA의 切斷에 基因한다는 것을 豫상하고 그것을 實證하기 위해서 檢討를 거듭하여 各種 polyphenol化合物이 DNA를 切斷하는 機構를 상세하게 밝혔다.

本 研究에서는 食品中에 含有되어 있는 各種 成分이나 各 成分들의 相互作用에 依해 形成되는 物質들에 對한 突然變異原성과 關聯하여 食品의 加工, 貯藏中에 形成되는 酵素的 褐變物質에 對한 突然變異 誘發 與否를 檢討하기 위하여 사과로부터 polyphenol oxidase를 抽出하여 그 酵素液을 polyphenol 化合物에 作用시켜 褐變反應 生成物을 얻어 突然變異原성을 檢討 하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 材 料

本 實驗에 使用된 사과(紅玉)는 市中에서 購入하여 水洗한 後 實驗에 使用하였다. calf-thymus DNA는 sigma社 試藥을 使用하였으며 polyphenol 化合物은 wako社 및 sigma社 試藥을 使用하였다. 그의 試藥은 市販用 特級品을 使用 하였다.

### 2. 實驗方法

#### 가. 酵素標品の 調製

大村等의 方法<sup>7)</sup>에 準해서 市販사과(紅玉)의 果肉을 小片으로 細切하여 미리 氷冷해둔 acetone溶液에 投入한 後 waring blender로 磨碎하여 吸引濾過하였다. 殘渣를 다시 acetone으로 5回 反復處理하여 脫水하였다. 얻어진 白色의 粉末을 desiccator 中에서 減壓乾燥한 後 -20°C 冷凍室에 保存하면서 試驗에 使用하였다.

#### 나. 사과 酵素液의 調製

acetone으로 處理한 사과粉末 1g을 常法<sup>8)</sup>에 準

해서 McIlvaine 緩衝液(pH6.0) 80ml로 乳鉢中에서 磨碎 抽出하여 吸引濾過 後 濾液을 80004Xg에서 30分間 遠心分離한 後 上澄液을 酵素液으로 使用하였다.

#### 다. 褐變反應液의 調製

Polyphenol 化合物은 catechol, pyrogallol, pyrocatechol, DL-dopa, dopamine, 3,4-dihydroxytoluene, gallic acid, hydroquinone, hydroxyhydroquinone의 0.05M과 0.1M溶液 그리고 chlorogenic acid 0.05M溶液을 調製하여 이 化合物들을 基質로 하여 褐變反應을 시켰으며 褐變反應은 魯田等의 方法<sup>9)</sup>에 따라 polyphenol化合物 溶液 10ml에 McIlvaine 緩衝液 6ml와 酵素液 4ml를 加하여 30°C에서 振盪하면서 30時間 反應시켜 褐變反應液을 生成 시켰다.

#### 라. 酵素活性 測定 및 蛋白質 定量

Polyphenol oxidase의 活性 測定은 Ponting과 Joslyn의 方法<sup>10)</sup>을 약간 修整하여 使用하였으며, 反應液은 10mM의 基質溶液 2ml와 pH6.0의 McIlvaine 緩衝液 0.8ml를 cell에 넣고 30°C로 安定化 시킨다음 酵素液 0.2ml를 加하여 反應시키고 420nm에서 吸光度를 測定 하였다. 1分間에 酵素 1ml當 吸光度 0.1의 增加를 1 unit로 하였다.

蛋白質 定量은 Lowry等<sup>11)</sup>의 phenol 試藥法에 依하여 含量을 算出 하였다.

#### 마. Rec-assay

Kada等의 方法<sup>12,13)</sup>에 準해서 *Bacillus subtilis* H17(rec<sup>+</sup>) 및 M45(rec<sup>-</sup>) 菌株의 胞子를 調製하였으며, 胞子形成에 使用한 培地組成은 nutrient broth 16g, kcl 2g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 19.8mg, FeSO<sub>4</sub> 1g, bacto agar 15g을 1l의 蒸溜水에 溶解하였다. 胞子寒天 plate의 調製는 8g의 nutrient broth를 1l의 蒸溜水에 溶解한 後 15g의 difco agar를 加하여 autoclave에서 120°C로 15分間 殺菌하였다. 같은 培地를 2本 調製하여 plate上에 分注器로 10ml씩 分注하여 M45 및 H17 寒天을 各各 固化시킨 後 直徑 8mm, 두께 1.2mm의 paper disc를 plate당 3枚씩 올려 놓고 試料 溶液을 20μl, 40μl, 60μl씩 加하였다. 또한 金屬이온의 影響을 알아보기 위하여 25mM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O溶液을 5μl씩 添加한 後에 37°C에서 20時間 培養한 後에 paper disc주위에 生成된 生育阻 止帶의 直徑을 測定하였다.

#### 바. DNA 切斷試驗

DNA溶液은 李의 方法<sup>14)</sup>에 따라서 calf-thymus

DNA를 25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 12.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 緩衝液(pH6.6)에 溶解하여 polyphenol化合物의 褐變反應液과 混合하여 反應液으로서 使用하였다. 各 試料 25 $\mu$ l와 DNA溶液(500 $\mu$ g/ml) 25 $\mu$ l로 混合液을 만들었으며, 金屬이온의 影響을 알아보기 爲해 試料 20 $\mu$ l와 DNA溶液 25 $\mu$ l 그리고 25mM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 溶液 5 $\mu$ l를 混合하였다. Control은 蒸溜水 25 $\mu$ l와 DNA溶液 25 $\mu$ l를 混合하여 使用하였다.

各 試料 50 $\mu$ l의 混合物들은 37°C의 incubator에서 1, 3, 6, 9時間別로 反應시킨 後 反應을 停止 시키기 爲하여 10 $\mu$ l의 EDTA를 各 反應液에 添加하였다. 다시 10 $\mu$ l의 0.05% bromophenol blue(BP B)溶液과 함께 0.7%의 agarose를 1.0mM EDTA, 18mM NaCl 및 0.4mg/ml ethidium bromide를 ris-acetate 緩衝液(pH8.6)에 溶解하여 製作한 slab gel上에 spotting하여 나타나는 各 試料의 spot 流動性을 電氣泳動 分析하였다. 電壓은 30 volt에서 15時間동안 展開시켰으며 中間體와 結合된 DNA-ethidium bromide 混合物를 長波長의 UV-lamp 照射下에 red filter를 使用하여 촬영하였다.

結果 및 考察

1. 酵素 活性

本 實驗에 使用한 酵素의 活性을 測定한 結果 表 1과 같다. 表에서 나타난 바와 같이 hydroxyhydroquinone과 catechol에 對한 polyphenol oxidase의 活性이 높았으며 gallic acid와 hydroquinone에 對하여는 活性이 거의 없었다. 活性이 높은 hydroxyhydroquinone, catechol, 3,4-dihydroxytoluene, chlorogenic acid, dopamine等은 褐變反應을 시켰을때 時間이 經過함에 따라 進한 褐色으로 變하면서 30時間 後에는 褐變이 最大로 일어나 暗褐色을 나타내었다. 그러나 活性이 낮은 gallic acid나 hydroquinone은 褐變度가 다소 떨어지는 淸은 暗褐色을 나타내었다.

2. 孢子法에 依한 rec-assay

*B. subtilis*의 wild type인 H17(rec<sup>+</sup>)과 mutant type인 M45(rec<sup>-</sup>)의 polyphenol化合物의 褐變反應液에 對한 두 菌株의 相對的인 敏感性을 比較하는 것은 M45(rec<sup>-</sup>)의 阻止帶에서 H17(rec<sup>+</sup>)의 阻止帶를 變 差異로서 判정 하였다. Fig. 1은 0.05M과 0.1M의 hydroxyhydroquinone褐變液의 spore

Table 1. Activity and specific activity of polyphenol oxidase from apple acetone powder.

Substrate	Activity (units)	Protein concentration (mg/ml)	Specific activity (units/mg)
Catechol	3.7	0.19	19.5
Pyrogallol	0.8	0.19	4.2
Hydroxyhydroquinone	4.2	0.19	22.1
Hydroquinone	0	0.19	—
Pyrocatechol	0.9	0.19	4.7
3,4-dihydroxytoluene	2.4	0.19	12.6
Gallic acid	0.04	0.19	0.2
Chlorogenic acid	2	0.19	10.5
DL-dopa	0.7	0.19	3.9
Dopamine	1.4	0.19	7.4

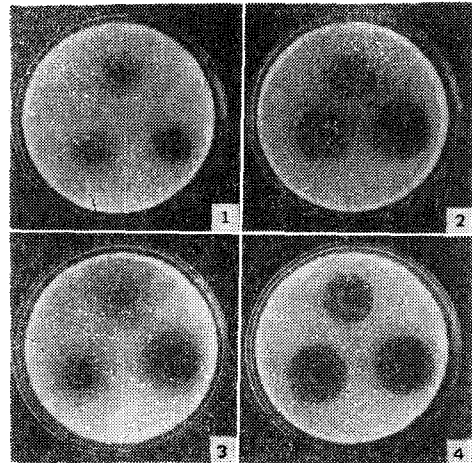


Fig. 1. Photographs of the spore rec-assay plates

- 1. *B. subtilis* H17 (HHQ\*0.05M)
  - 2. *B. subtilis* M45 (HHQ 0.05M)
  - 3. *B. subtilis* H17 (HHQ 0.1M)
  - 4. *B. subtilis* M45 (HHQ 0.1M)
- \*HHQ : Hydroxyhydroquinone

rec-assay의 結果를 撮影한 것이다. 그림에서 나타난 바와 같이 H17은 阻止帶의 形成이 M45보다 훨씬 작게 나타났으며 生育阻止帶 差의 結果 陽性을 나타내었다.

Polyphenol 化合物의 褐變液에 對한 試驗結果는 表 2와 같다. 表에 나타난 바와 같이 0.05M catechol, pyrocatechol, DL-dopa, 3,4-dihydroxytoluene의 褐變液에서는 褐變液 單獨인 경우나

**Table 2.** Results of the rec-assay on the enzymatic browning reaction products at 0.05M.

Test compounds(0.05M)	Inhibition zone(mm)		Difference	Conclusion
	H17(Rec <sup>+</sup> )	M45(Rec <sup>-</sup> )		
Catechol BRP	0	7	7	+
Catechol BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	7	7	+
Pyrogallol BRP	0	0	0	-
Pyrogallol BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	6	6	+
Pyrocatechol BRP	0	3	3	±
Pyrocatechol BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	9	9	+
Chlorogenic acid BRP	0	0	0	-
Chlorogenic acid BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	0	0	-
DL-dopa BRP	0	5	5	+
DL-dopa BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	8	8	+
Dopamine BRP	0	0	0	-
Dopamine BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	2	2	±
3,4-dihydroxytoluene BRP	0	4	4	±
3,4-dihydroxytoluene BRP+Cu <sup>2+</sup>	2	7	5	+
Gallic acid BRP	0	0	0	-
Gallic acid BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	0	0	-
Hydroquinone BRP	0	10	10	+
Hydroquinone BRP+Cu <sup>2+</sup>	6	11	5	+
Hydroxyhydroquinone BRP	0	12	12	‡
Hydroxyhydroquinone BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	7	7	+

BRP : Browning reaction product

- : No inhibition zone

+ : Length of inhibition zone is less than 5.0mm.

± : 5~10mm of inhibition zone

‡ : More than 10mm of inhibition zone

‡‡ : More than 20mm of inhibition zone

Cu<sup>2+</sup>이共存해 있을 경우나 生育阻止帶의 큰 差異를 나타내지 않았다. 그리고 pyrogall과 dopamine의 褐變液에 있어서는 褐變液 單獨으로는 阻止帶가 나타나지 않았으나 Cu<sup>2+</sup>의 共存下에서는 약한 阻止能力을 나타내었다. 그리고 chlorogenic acid와 gallic acid 褐變液에서는 Cu<sup>2+</sup>의 共存下에서도 阻止帶가 나타나지 않았다. 그러나 hydroquinone과 hydroxyhydroquinone의 경우는 褐變液 單獨으로서도 강한 生育阻止帶를 나타 내었으며 Cu<sup>2+</sup>의 共存下에서는 오히려 阻止力이 減少하는 結果를 보였다.

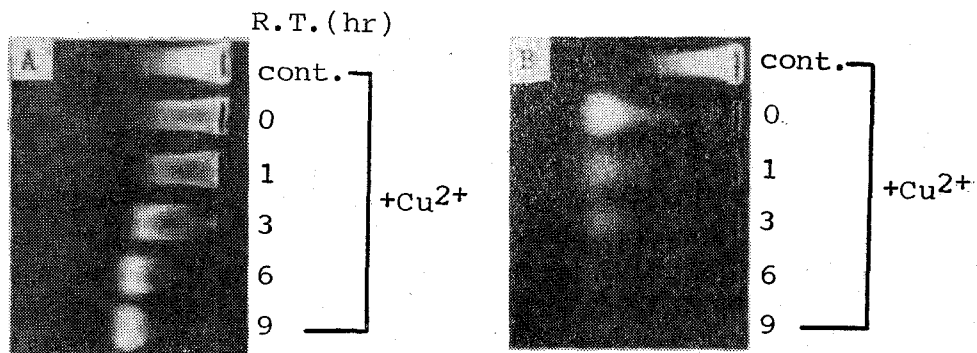
表 3은 0.1M polyphenol化合物의 褐變液으로서 gallic acid의 경우는 0.05M 溶液에서와 같이 H17이나 M45에 對해서 阻止帶를 나타내지 않았으며 pyrogallol, pyrocatechol, DL-dopa, dopamine,

3,4-dihydroxytoluene 그리고 hydroxyhydroquinone의 褐變液은 M45에 對한 H17의 生育阻止帶 差가 認定 되었으나 阻止力이 弱했다. Catechol과 hydroquinone 褐變液은 위 褐變液보다 阻止能力이 強했으며 M45와 H17의 生育阻止帶 差도 크게 나타났다. 0.05M과 0.1M의 褐變液에 대한 阻止能力을 비교해 보면 gallic acid를 제외한 catechol, DL-dopa, dopamine, 3,4-dihydroxytoluene 그리고 hydroquinone의 경우는 濃度 增加에 따라 阻止能力도 增加하는 경향을 보였고 pyrogallol, pyrocatechol의 경우는 差異가 없었다. 그러나 hydroxyhydroquinone 褐變液의 경우는 濃度 增加에 따라 阻止能力이 減少하는 경향을 보였다.

### 3. calf-thymus DNA 切斷作用

**Table 3.** Results of the rec-assay on the enzymatic browning reaction products at 0.1M.

Test compounds (0.1M)	Inhibition zone(mm)		Difference	Conclusion
	HI7(Rec <sup>+</sup> )	M45(Rec <sup>-</sup> )		
Catechol BRP	0	10	10	+
Catechol BRP+Cu <sup>2+</sup>	2	17	15	#
Pyrogallol BRP	0	4	4	±
Pyrogallol BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	5	5	+
Pyrocatechol BRP	0	7	7	+
Pyrocatechol BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	5	5	+
DL-dopa BRP	0	7	7	+
DL-dopa BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	10	10	+
Dopamine BRP	0	0	0	-
Dopamine BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	4	4	±
3,4-dihydroxytoluene BRP	1	6	5	+
3,4-dihydroxytoluene BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	9	9	+
Gallic acid BRP	0	0	0	-
Gallic acid BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	0	0	-
Hydroquinone BRP	0	14	14	#
Hydroquinone BRP+Cu <sup>2+</sup>	0	12	12	#
Hydroxyhydroquinone BRP	3	12	9	+
Hydroxyhydroquinone BRP+Cu <sup>2+</sup>	1	10	9	+
4NQO(4-nitroquinoline-N-oxide, 1μg)	0	14	14	#
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O(25mM, 20μl)	1	3	2	±



**Fig. 2.** Agarose slab gel electrophoresis of the DNA treated with 0.05 M, 0.1M pyrogallol BRP (A, B) at 37°C for 0 to 9 hours.

Fig. 2는 0.05M과 0.1M의 pyrogallol 褐變液에 對한 DNA 切斷作用을 나타낸 것으로서 DNA-ethidium bromide 混合物을 長波長의 UV lamp 를 照射하여 촬영한 電氣泳動 사진이다. 그림 2에 나타난 바와 같이 Cu<sup>2+</sup>의 共存下에서 0.05M pyrogallol 褐變液은 反應時間이 경과 함에 따라 切

斷活性이 현저 하였으며 0.1M의 경우는 反應 1時間 後부터 강한 切斷活性을 나타내었다.

村上<sup>15)</sup>는 polyphenol 化合物의 切斷活性에는 2價 銅이온의 共存이 必須的이고 polyphenol 化合物이 DNA의 切斷活性을 갖는 때에는 ortho 및 para dihydroxy基가 必要하며 그 活性은 phenol基와

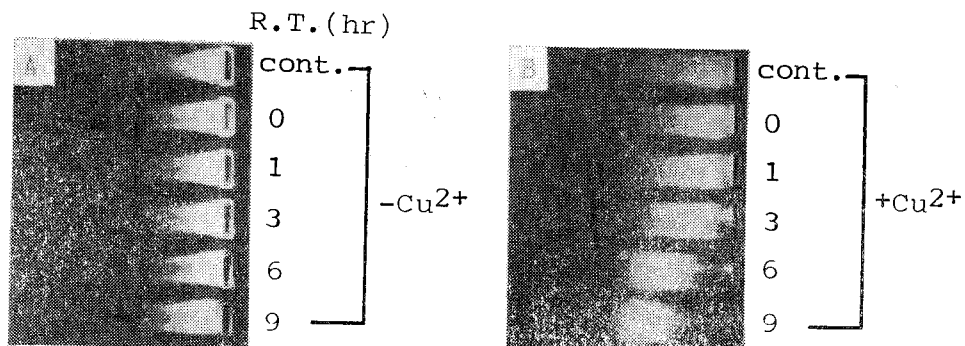


Fig. 3. Agarose slab gel electrophoresis of the DNA treated with 0.05M 3,4-dihydroxytoluene BRP (A, B) at 37°C for 0 to 9 hours.

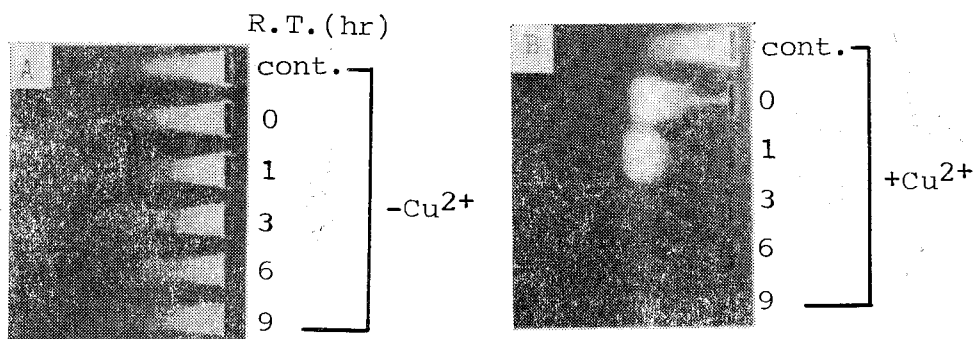


Fig. 4. Agarose slab gel electrophoresis of the DNA treated with 0.1M 3,4-dihydroxytoluene BRP(A, B) at 37°C for 0 to 9 hours.

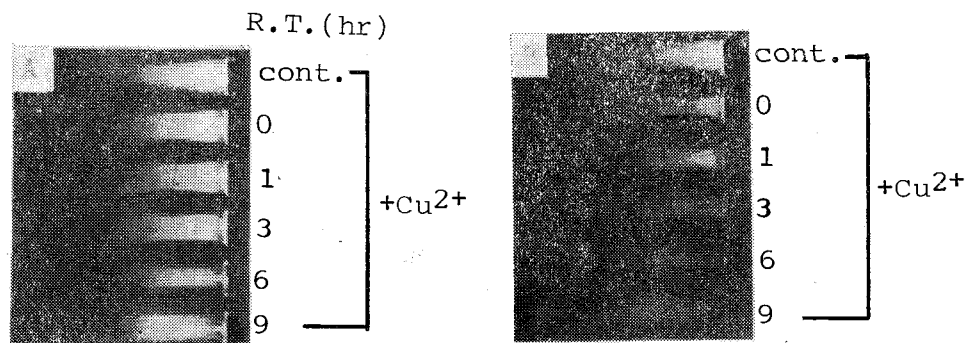


Fig. 5. Agarose slab gel electrophoresis of the DNA treated with 0.05M, 0.1M hydroquinone BRP(A, B) at 37°C for 0 to 9 hours.

치환된 다른 官能基의 種類에 依해서 影響을 받는다고 報告하였는데 pyrogallol도 이와 일치하는 것으로 思料된다.

Fig. 3은 0.05M 3,4-dihydroxytoluene의 褐變液을 DNA에 作用시킨 경우의 電氣泳動 사진으로서 褐變液 單獨으로서는 切斷되지 않았으나  $Cu^{2+}$

의 共存하에 6時間까지 부터 弱한 切斷活性이 認定 되었으며 9時間反應 시켰을 경우 切斷活性이 촉진됨을 나타내었다.

Fig. 4는 0.1M 3,4-dihydroxytoluene의 褐變液을 DNA에 作用시킨 경우의 電氣泳動 사진으로서 褐變液 單獨으로는 切斷活性이 전혀 나타나지 않

았으나 Cu<sup>2+</sup>의共存下에서 1시간 反應시켰을 경우 강한 切斷活性을 나타내므로서 Cu<sup>2+</sup>의 影響을 크게 받는 것으로 나타 났다.

Fig. 5는 0.05M과 0.1M hydroquinone의 褐變液에 對한 電氣泳動 사진으로서 Cu<sup>2+</sup>의 共存下에서도 切斷作用이 일어나지 않았다. 卽 hydroquinone의 경우는 Cu<sup>2+</sup>의 影響을 받지 않는 것으로 나타 났다. 그의 0.05M chlorogenic acid의 褐變液은 Cu<sup>2+</sup>의 共存에 關係없이 切斷活性이 認定되지 않았으며 hydroxyhydroquinone만이 Cu<sup>2+</sup>의 共存下에서 강한 切斷作用을 나타 내었다.

村上<sup>16)</sup>는 Cu<sup>2+</sup>의 DNA에 對한 切斷反應은 polyphenol이 Cu<sup>2+</sup>에 依해 酸化되는 過程에서 일어난다고 報告하였다. 따라서 Cu<sup>2+</sup>은 polyphenol이 DNA의 磷酸 ester를 切斷하는데 觸媒役割을 해 줌으로서 相乘效果를 나타내는 것으로 思料된다.

要 約

사과로부터 polyphenol oxidase를 抽出하여 數種의 polyphenol化合物과 反應시켜 얻어진 酵素의 褐變反應生成物에 對한 突然變異原性을 檢討하기 위하여 in vitro實驗을 通하여 突然變異 誘起作用의 與否를 調査하였다.

Rec-assay結果 0.05M catechol, pyrocatechol, DL-dopa, 3,4-dihydroxytoluene, 그리고 hydroquinone褐變液의 경우 Cu<sup>2+</sup>의 共存 與否에 關係없이 阻止帶에 큰 差가 없었으며 hydroxyhydroquinone의 경우는 褐變液 單獨으로서도 강한 阻止帶을 나타 내었으나 Cu<sup>2+</sup>의 共存下에서는 오히려 阻止能力이 減少하였다. 0.05M과 0.1M의 gallic acid 褐變液의 경우는 Cu<sup>2+</sup>의 共存與否에 關係없이 阻止帶가 나타나지 않았다. 0.1M의 pyrogallol, pyrocatechol, DL-dopa, 3,4-dihydroxytoluene 그리고 hydroxyhydroquinone의 褐變液은 모두 生育阻止帶을 나타내므로서 弱한 陽性으로 判定되었으며 catechol과 hydroquinone 褐變液의 경우는 위 褐變液보다도 褐變液 單獨일 때나 Cu<sup>2+</sup>共存下에서 阻止帶가 크게 나타났다. 따라서 陽性으로 判定 되었다. 全體적으로 볼때 polyphenol의 濃度가 增加함에 따라 生育阻止力도 促進되는 傾向을 보였으며 Cu<sup>2+</sup>에 의해 阻止帶가 커지는 傾向이었다.

Calf-thymus DNA 切斷活性에 對해서는 0.05M

pyrogallol 褐變液의 경우 反應 6時間程度에서 切斷活性을 나타내었고 0.1M의 경우는 反應開始부터 切斷活性을 나타내어 1時間 後부터는 강한 切斷作用이 일어났다. 0.05M 3,4-dihydroxytoluene의 褐變液에서는 褐變液 單獨으로서는 切斷活性이 없었으나 Cu<sup>2+</sup>의 共存下에서는 6時間째 부터 切斷活性이 認定되었다. 0.1M의 경우도 褐變液 單獨으로서는 切斷活性이 없었으나 Cu<sup>2+</sup>의 共存下에서는 反應 開始와 同時 切斷作用이 일어났으며 1시간 後 부터 강한 切斷活性을 나타 내었다.

參 考 文 獻

1. Ueno, S., Oyamada, N., Kubota, K., Kurosawa, K. and Ishizaki, M.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 30(3) : 172(1983)
2. 西岡：遺傳, 36(2) : 9(1982)
3. 白順泰彦：遺傳, 36(2) : 7(1982)
4. 長尾美奈子：變異原と毒性, 4(4) : 20(1980)
5. K. Yamafuji and H. Murakami: *Enzymologia*, 35, 139(1968)
6. K. Yamafuji and H. Murakami and M. Shinozuka: *Z. Krebsforsch.*, 73, 195(1970)
7. 大村浩久·尊田民喜：營養と食糧, 23 : 367(1970)
8. 大村浩久·尊田民喜：營養と食糧 22 : 497(1969)
9. 尊田民喜·稻稻富良文·淺田要一郎·吉州秀樹 大村浩久：九州大學農藝化學會誌, 29(3) : 71(1974)
10. Ponting, J.D. and Joslyn, M.A.: *Arch. Biochem.*, 19 : 47(1948)
11. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193 : 265(1951)
12. Kada, T., Tutikawa, K. and Sadaie, Y. *Mutation Res.*, 16 : 165(1972)
13. 田島彌太郎·吉田俊秀·賀田恒夫(編)：化學物質の突然變異性 檢出法, p.188. 講談社, 東京 (1978)
14. Lee, J.H.: *J. Korean Biochem.*, 16 : 240(1983)
15. 村上浩紀：日本農藝化學會誌, 57(1) : 55(1983)