

在來種 赤色자두(*Prunus salicina*) Polyphenol oxidase의 一般的的 性質

咸昇市·洪銀姬·大村浩久*

江原大學校 食品工學科, *九州大學 食糧化學教室
(1987. 3. 20 접수)

Properties of Polyphenol Oxidase from *Prunus salicina* (Red)

Seung-Shi Ham · Eun-Hee Hong and Hirohisa Omura*

Department of Food Science and Technology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

*Food Science and Technology Institute, Kyushu Univ., Fukuoka, Japan

(Received. March. 20. 1987)

Abstract

Polyphenol oxidase in *Prunus salicina* (Red) was extracted, some properties and its partially purification were investigated as follows;

Polyphenol oxidase was purified about 15 folds after ammonium sulfate saturation and about 64 folds after Sephadex G-100 column chromatography.

Polyphenol oxidase showed optimum pH for activity at 6.5 and optimum temperature at at 35°C and high affinity to catechol in o-diphenol compounds.

Thermal stability were about 85% and 75% of initial polyphenol oxidase activity remained after heating at 50°C for 5 minutes and 30 minutes respectively.

The Michaelis constant of the enzyme was 2.58mM.

L-cysteine, glutathione, ascorbic acid and potassium cyanide appeared to be most effective inhibitors. EDTA showed a slight inhibition.

緒論

食品中에는 polyphenol oxidase를 비롯해서 각 종 polyphenol類와 蛋白質을 포함한 SH化合物이存在하고 있다. 이러한 成分들이 共存하면 당연히 그 褐變化에는 上記의 SH置換quinone이 관여하게 되는 것이다. 따라서 食品의 褐變化 현상을 이해하기 위해서는 polyphenol oxidase와 quinone reductase 그리고 그 基質이 되는 遊離quinone 및 SH置換quinone과 그들의 還元型의 3者가 포함된相互作用을 추구하지 않으면 안된다. polyphenol

化合物를 含有하는 植物에는 一般的으로 이것을 酸化하는 酶素가 含有되어 있으며, 이 polyphenol을 酸化하는 酶素에는 peroxidase와 같은 鐵porphyrin 酶素와 polyphenol 酸化酶素와 같은 銅酶素의 2種類가 있다. 그러나 peroxidase에 의한 polyphenol 酸化에 필요한 過酸化水素가 植物體에 多量으로 存在한다고는 생각되지 않으며, 共存하는 catalase의 活性은 극히 높아서 生成된 過酸化水素를 立即 分解하기 때문에 peroxidase가 褐變의 主原因이 된다고는 볼 수 없다. 물론 오늘 날에 와서는 polyphenol 酸化酶素(EC 1.10.3.1,

o-diphenol: oxygen oxidoreductase, PPO)가 중요하다고 알려져 있다.¹⁾ 이 PPO에 의한 酶素的褐變現像은 食品材料의 變色 뿐만 아니라 營養價의 감소라든가 香氣變化 등의 食品變質을 초래하기 때문에 一般的으로 그 製品의 商品의 價值를低下시키는 경우가 많다. 한편 polyphenol 化合物 및 PPO는 널리 植物界에 分布하고 있기 때문에 植物體에 있어서 polyphenol 化合物의 合成經路 혹은 그들의 역할인 生理的測面에서의 研究^{2~4)}도 상당히 행해지고 있다. 이와 같은 研究의 進前에 따르면 각 酶素는 植物에 따라 基質特異性 등의 性質이 다르고 또 그 酶素에 많은 lysozyme이 存在한다는 것도 증명되었다.^{5~15)} 한편 같은 植物에서도 品種이나 系統 혹은 果實의 熟度나 部位, polyphenol 化合物의 種類 혹은 量이 다르다는 것도 지적되고 있으나 그러한 酶素의 大부분은 chlorogenic acid, catechol, DL-dopa 등의 *o*-diphenol類를 강하게 酸化한다고 報告^{16~20)}되어 있다. 이와 같이 果實 및 그 加工品의 酶素的褐變을 抑制하기 위해서는 PPO의 一般的性質로서 最適pH, 最適溫度, 基質特異性 및 熱安定性 등을 調査할 必要가 있다. 이러한 目的을 為해 사과^{21~25)}, 포도^{26~27)}, avocado²⁸⁾, 배²⁹⁾, 벼섯³⁰⁾, 복숭아^{31~32)}, 바나나^{33~34)}, 감자^{35~36)} 등에 대해서 많은 研究가 되어 있다. 本研究에서는 자두류의 褐變과 밀접한 관계를 가지고 있는 PPO를 確認하기 위하여 在來種 赤色자두(*Prunus salicina*)로부터 PPO를 抽出, 精製하여 그 酶素學의 性質을 檢討하여 몇 가지 結果를 얻었으므로 이를 報告하고자 한다.

材料 및 方法

1. 材 料

本實驗에 使用한 試料는 在來種 赤色자두(*Prunus salicina*)로서 市販되고 있는 것을 購入하여 水洗한 후 4℃에서 하루 貯藏하여 試料로 하였다.

2. 實驗方法

1) 酶素液의 調製

酶素液은 常法³⁷⁾에 따라 酶素標準品을 調製한 다음 大村³⁸⁾等의 方法에 準하여 酶素液을 調製

하였다(Fig. 1)

常法에 의해 調製한 acetone powder 1g을 McIlvaine buffer(pH 6.5) 溶液 80ml로 磨碎抽出하여 吸引濾過한 후 濾液을 0~4℃, 10,000rpm에서 30分間 遠心分離하였다. 上澄液에 (NH₄)₂SO₄를 添加하여 80%로 포화시킨 다음 遠心分離하여沈澱物을 얻었다. 이沈澱物을 磷酸緩衝溶液으로 溶解시킨 다음 동일 緩衝溶液으로 4℃에서 48時間 透析하여 Sephadex G-100 column에서 gel에 과하였다.

2) Sephadex G-100 column chromatography.

精製過程을 통해 얻은 粗酶素液 2ml를 NaCl을 含有하는 0.02M 磷酸緩衝液(pH 7.0)에 의해 平衡化한 column(2.1×40cm)에 添加하고 同一緩衝液를 使用해서 溶出하였다. 溶出速度는 6ml/hr로 調整하였으며, 각 分획마다 蛋白質과 酶素活性을 測定하였다.

3) 酶素活性 測定

Polyphenol oxidase活性測定은 Joslyn과 Ponting³⁹⁾의 方法에 따라 測定하였다.

Sephadex G-100 column 분획 중에서 가장活性이 높은 分획을 酶素活性測定의 試料로 使用하였다, 反應液은 10mM catechol 2ml와 McIlvaine buffer(pH 6.5) 0.8ml를 cuvette에 넣고 安定化시킨 다음 酶素液 0.2ml를 넣어 35℃에서 反應시켜 420nm에서 吸光度를 測定하였으며 1分間에 酶素液 1ml當 吸光度 0.01의 증가를 1단위로 하여 酶素活性을 表示하였다.

4) 蛋白質 定量

蛋白質含量은 Lowry 等의 phenol 시약법⁴⁰⁾에 準하였다며 標準品인 bovine serum albumin (sigma社)의 檢量선에 의하여 계산하였다.

5) 最適溫度

本酶素液의 最適溫度는 反應液의 溫度를 20℃에서 50℃까지 變化시켜 가면서 酶素活性을 測定하였다.

6) 最適 pH

자두 PPO의 最適 pH의 測定은 反應液의 pH를 5.0에서 8.0까지 0.1M citrate-0.2M phosphate buffer로 조정하여 測定하였다.

7) 热安定性

자두 PPO의 热安定性을 檢討하기 위하여 溫度를 40℃에서 80℃까지 變化시키면서 酶素液을 5

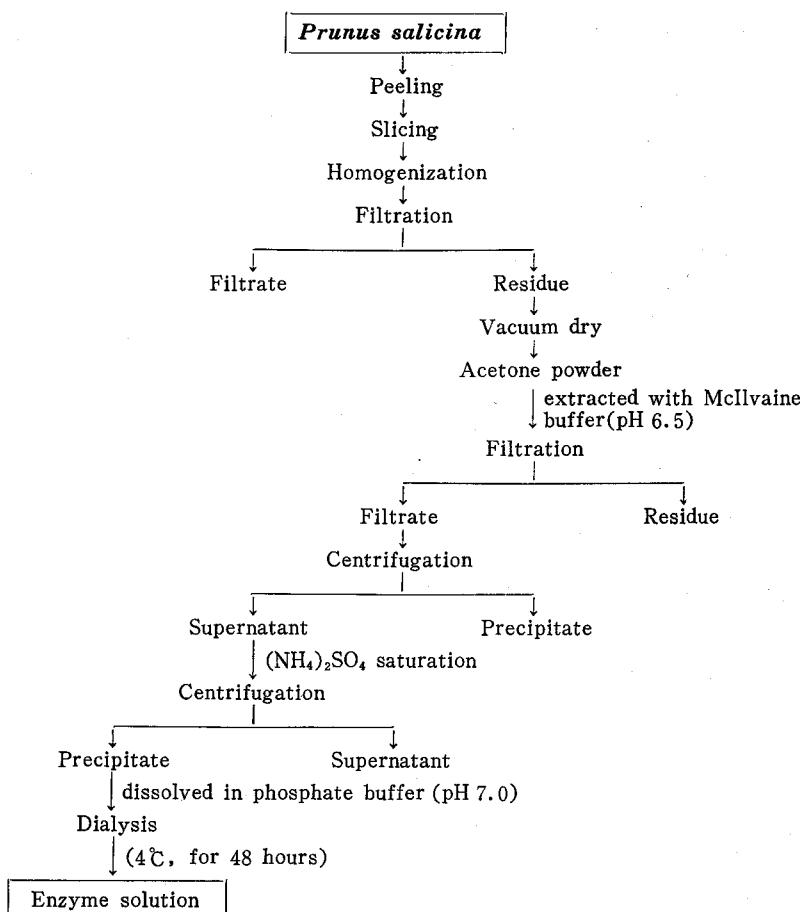


Fig. 1. Schematic diagram for preparation of enzyme solution.

分, 30分間 處理한 후 殘存活性을 測定하였다.

8) 基質 特異性

基質에 대한 特異性은 基質로서 *m*-diphenol, *o*-diphenol과 trihydroxyphenol인 catechol, pyrogallol, 3,4-dihydroxytoluene, chlorogenic acid, dopamine, gallic acid, hydroquinone, phloroglucinol 및 caffeic acid를 使用하였다. 이때 各基質의 濃度는 1mM로 하여 酶素活性을 測定하였다.

9) 沖害劑의 影響

沖害劑가 자두酶素의 活性에 미치는 影響을 調查하기 위하여 PPO의 沖害劑^{41~44}로 알려져 있는 化合物 중에서 L-cysteine, ascorbic acid, glutathione, potassium cyanide 및 EDTA를 使用하였으며 5×10^{-5} M에서 10^{-3} M의 濃度로 하여 酶素活性을 測定하였다.

10) K값의 測定

酶素에 대한 基質濃度의 影響을 알아보기 위하여 反應溫度를 35°C 그리고 pH 6.5에서 基質인 catechol의 濃度를 2×10^{-2} M에서 1×10^{-3} M까지 變化시키면서 酶素活性을 測定하여 Lineweaver-Burk⁴⁵ 方法에 따라 Michaelis constant(K)를 測定하였다.

結果 및 考察

1) Sephadex G-100 column chromatography

粗 PPO의 Sephadex G-100에 의한 gel여과의 様相을 Fig. 2에 나타내었다. 各各의 分획에 대한 酶素活性을 測定한 結果 fraction number 19~21에 酶素活性이 集中되어 있었다. 酶素活性이 集

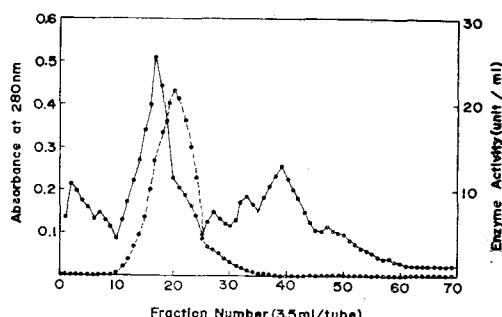


Fig. 2. Sephadex G-100 column chromatography.

Enzyme solution was applied to the column (2.1×40) of Sephadex G-100 equilibrated with 0.02M phosphate buffer (pH 7.0)

●—● protein (OD 280)
●···● enzyme activity.

中되어 있는 분획을 모아 部分精製 標品으로서 이하의 實驗에 使用하였다. 이 部分精製의 各段階에 있어서의 酶素活性, 蛋白質量 등을 測定한結果 table 1과 같다. 最終段階에 있어서 자두酶素의 精製倍率은 약 64倍였으며 이와 같은結果는 藤田⁽⁴⁶⁾의 温州 柚子酶素의 精製倍率 약 97倍에 비해 多少 낮았으나 그 이유는 柚子酶素의 경우 DEAE-cellulose와 CM-Sephadex G-100 column chromatography gel여과 하였기 때문인 것으로 料된다.

2) 最適 温度

赤色자두 PPO의 活性에 미치는 温度의 影響은 Fig. 3과 같이 反應溫度가 20°C에서는 20% 정도의 活性을 나타내었으며 温度가 上升함에 따라 급격히 증가하여 35°C에서 最大活性를 나타내었다.

Table 1. Purification of *Prunus salicina* polyphenol oxidase

Purification procedure	PPO activity (units*)	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)
Crude extract	40.00	0.87	45.98	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation	200	0.29	689.66	15
Sephadex G-100	15.75	0.005	2949	64

* One unit of PPO activity is defined as the amount of enzyme that cause a 0.01 extinction change in absorbance per min, at 420 nm.

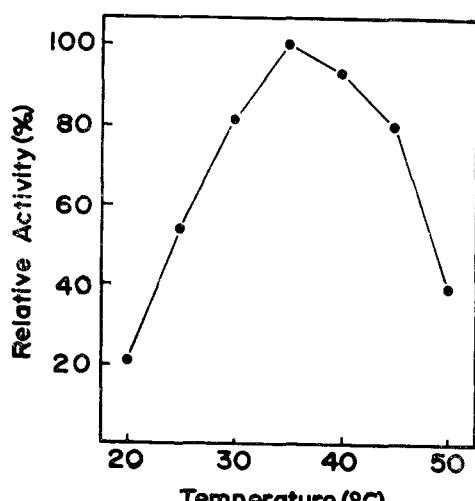


Fig. 3. Effect of temperature on polyphenol oxidase activity.

The PPO activity as a function of temperature was determined with 10 mM catechol as the substrate in 0.1M citrate-0.2M phosphate buffer at pH 6.5 at various temperature from 20°C to 50°C.

이같은結果는 Takeo⁽⁴⁷⁾ 等이 茶葉PPO의 isozyme을 CM-cellulose column chromatography와 starch gel electrophoresis로 分離한結果와 같은結果를 나타냈으며, 포도⁽²⁶⁾나 table beet⁽⁴⁸⁾의 最適溫度 25°C보다 多少 높았으며, 송이버섯⁽⁴⁹⁾의 45~55°C보다 낮은 温度였다.

3) 最適 pH

赤色자두 PPO의 最適 pH는 pH 5.0에서 相對活性이 약 40% 程度였으며, pH가 증가함에 따라活性이 증가하여 pH 6.5에서 가장 높은活性를 나타내었고 그 이상의 pH에서는活性이 감소하였다(Fig. 4). 그러나 Walker와 Hulume⁽²¹⁾는 사과 PPO의 最適 pH가 4.8에서 5.0, Bedrosian 等⁽⁵⁰⁾은 pH 7.0이라고 報告하였으며 品種別로는 배가 pH 6.2⁽⁵¹⁾와 pH 7.0⁽¹²⁾, 포도가 pH 5.5⁽²⁶⁾와 pH 5.0⁽²⁷⁾ 그리고 avocado가 pH 5.5에서 6.0⁽²⁸⁾과 pH 4.7에서 4.8⁽³²⁾이라 報告한 点으로 보아 같은果實이라도 品種이나 緩衝溶液 및 反應條件 等의 差異에 의해서 最適 pH가 달라짐을 알 수 있다.

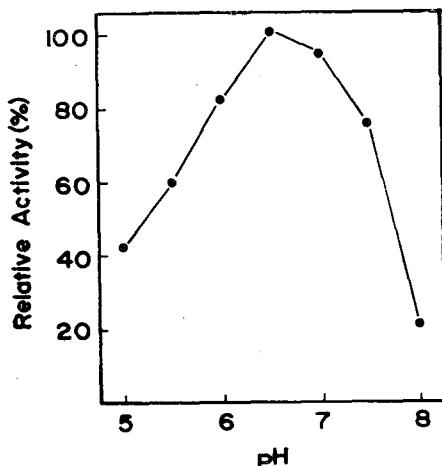


Fig. 4. Effect of pH on polyphenol oxidase activity.

The PPO activity as a function of pH was determined with 10mM catechol as the substrate in 0.1M citrate-0.2M phosphate buffer ranging from pH 5.0-8.0.

4) 热安定性

赤色자두 酶素의 安定性에 미치는 温度의 影響을 調査한 結果는 Fig. 5에 나타난 바와 같다. 50℃에서 5分 후에 80%, 30分 후에는 65%의 活性이 維持되었고, 60℃에서는 5分 후 40%, 30分 후에는 25%의 酶素活性이 維持되었다. 80℃에서는 5分 후에 10%活性이 維持되었으나 30分 후에는活性이 전혀 나타나지 않았다. 대부분의 果實에 들어있는 PPO의 酶素活性이 50%로 減少되는 温度와 時間은 banana³⁴⁾의 경우는 55℃에서 30分, avocado¹²⁾에서는 58℃에서 16分間熱에 安定한 것으로 報告하였다. 배³³⁾의 PPO는 70℃에서 12分, table beet⁴⁸⁾의 PPO는 60℃에서 9分 그리고 dates⁵²⁾의 PPO는 67℃에서 15分이라는 報告에 比해 赤色자두의 PPO는 酶素活性이 50% 감소되는 데는 55℃에서 10分으로 나타나 다른 果實보다 热에多少不安定한 것으로 나타났다.

5) 基質 特異性

Table 2는 赤色자두에서 分離한 PPO의 各種基質에 대한 活性을 测定한 結果로서 자두PPO는 *o*-diphenol인 catechol에서 가장 높은 親和性을 나타내었으며, 다음으로는 trihydroxyphenol인 pyrogallol, 그리고 *o*-diphenol인 3,4-dihydroxy-

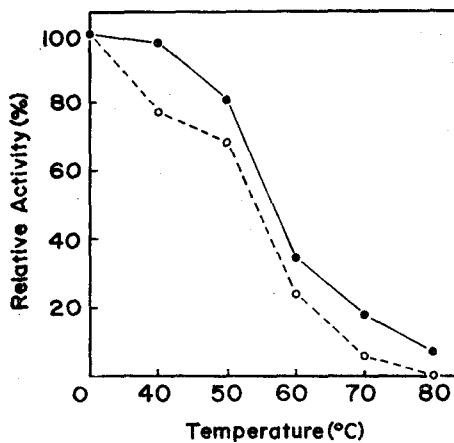


Fig. 5. Thermal stability of *Prunus salicina* polyphenol oxidase.

The enzyme solutions were heated at various temperature(40-80°C) for 5 and 30 min. After heating, the remaining enzyme activities were determined with catechol as substrate at pH 6.5 and 35°C.

●—●, 5min. ○····○, 30min.

Table 2. Substrate specificity of *Prunus salicina* polyphenol oxidase

Substrate(10mM)	Relative activity(%)
Catechol	100
Pyrogallol	87.5
3,4-Dihydroxytoluene	81.3
Chlorogenic acid	43.8
Dopamine	12.5
Gallic acid	3.1
Hydroquinone	0.0
Phloroglucinol	0.0
Caffeic acid	0.0

toluene 순으로 나타났다. Chlorogenic acid와 dopamine, 그리고 gallic acid에 대해서는 낮은活性를 나타내었고, 그 외의 hydroquinone, phloroglucinol 그리고 caffeic acid에는活性를 나타내지 않았다. 이 結果로 미루어 보아 赤色자두의 PPO는 *o*-diphenol 化合物을 가장 잘 酸化하므로 포도나 배, 복숭아, 그리고 banana에서와 같이

o-diphenolase인 것으로 料된다.

6) 沢害劑의 影響

數種의 沢害劑가 本 酶素活性에 미치는 影響을 調査한 結果는 table 3과 같다. 저해제의 種類 및 濃度에 따라 沢害率은 달리 나타났다. 1mM濃度의 L-cysteine, ascorbic acid 그리고 glutathione 은 酶素活性을 완전히 저해하였으나 potassium cyanide는 4% 그리고 EDTA는 66%의活性이 남아 있었다. 이들 沢害劑의 沢害作用은 反應生成物과 附加化合物를 生成하거나 還元시키기 때문인 것으로 報告^{25,34,52)}되었다.

EDTA의 경우는 Kahn⁹⁾과 Luh와 phithakpol⁵³⁾의 報告에 의하면 沢害效果가 거의 없는 것으로 나타났으나 本 實驗에서는 약간의 沢害效果가 있음이 確認되었다.

Table 3. Effect of various inhibitors on polyphenol oxidase activity

Inhibitor	Relative activity(%)			
	Concentration(mM)			
	0.05	0.1	0.5	1
None	100	100	100	100
L-cysteine	64	61	0	0
Ascorbic acid	78	68	0	0
Glutathione	86	74	2	0
Potassium cyanide	68	63	47	4
EDTA	89	71	67	66

7) K값의 測定

Fig.6은 赤色자두 PPO의 基質親和性을 나타낸 것으로서 酶素의 濃度를 一定하게 固定하고 反應溫度를 35℃, pH를 6.5에서 基質인 catechol의 濃度를 變化시켜면서 Michaelis定數(K)를 測定하였다. 즉 各種濃度의 catechol에 酶素를 作用시켜 基質濃度와 反應速度와의 관계를 測定하여 Lineweaver-Burk의 方法에 의해 나타낸 結果 K값은 2.58mM이었다. 藤田⁵⁴⁾ 등은 温州감을 幼果酶素를 DEAE-cellulose와 CM-Sephadex G-100 column chromatography gel 여과로 分離하여 pyrogallol 酸化酶素에 대해서 염기성 級分의 酶素를 pyrogallol 酸化酶素B, 산성級分의 酶素를 pyrogallol 酸化酶素A로서 pyrogallol에 대한 K

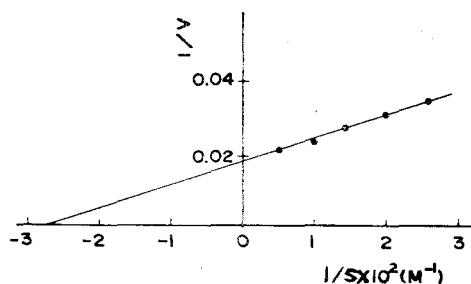


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot for polyphenol oxidase activity. Concentration of substrate ranging from 1 to 20mM in 0.1M citrate-0.2M phosphate buffer pH 6.5 were used for this study.

값을 구하여 7.1mM과 0.97mM임을 밝히고 pyrogallol의 酸化에는 2종류의 서로 다른 酶素界가 存在하여 각各性質이 다르다는 것을 밝혔다.

要 約

在來種 赤色자두(*Prunus salicina*)로부터 酶素를 抽出 精製하여 그 性質을 調査한 結果는 다음과 같다.

1. 赤色자두의 PPO는 crude extract보다 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 飽和했을 때 15倍, 그리고 Sephadex G-100 column chromatography를 행하였을 때 64倍로 精製되었다.

2. 酶素反應의 最適條件은 最適溫度 및 pH가 35℃, 6.5였으며 主要基質은 *o*-diphenol인 catechol로 나타났다.

3. 赤色자두 PPO의 熱安定性은 50℃에서 5分間處理하였을 때 初期 PPO의活性中 85%, 30分間處理時에는 75%의 残存活性를 나타내었다.

4. 本 酶素의 K값은 2.58mM이었다.

5. 沢害剤의 effect 중 L-cysteine, glutathione, ascorbic acid와 potassium cyanide는 1mM濃度에서 완전히 酶素活性을 沢害하였으나 EDTA는 沢害效果가 대단히 약하게 나타났다.

考 考 文 獻

- Joslyn, M. A. and Ponting, J. D.; *Adv. Food Res.*, 3, 1(1951).

2. 瓜谷郁三；岩波講座，現代生物化學(第11卷)，天野恒久，植竹久雄，福見秀雄編，p.203，岩波書店，東京(1975)。
3. Uritani, I; *Progress in Phytochemistry*, Vol. 5, ed. by Reinhold, L. Harborn, J.B. and Swain, T., P.29, Pergaman Press, Oxford (1978).
4. McClure, J.W.; Biochemistry of plant Phenolics, ed. by Swain, T. Harborn, J.B. and VonSumere, C.F., p.525, Plenum Press, New York London.
5. 塩田芳之；日食工誌, 15, 547(1968).
6. Wong, T.C. Luh, B.S. and Whitaker, J.R.; *Plant Physiol.*, 48, 19(1971).
7. Benjamin, M.D. and Montgomery, M.W.; *J. Food Sci.*, 38, 799(1973).
8. Montgomery, M.W. and Sgarbieri, V.C.; *Phytochemistry*, 14, 1245(1975).
9. Kahn, V.; *Phytochemistry*, 15, 267(1976).
10. Kahn, V.; *J. Sci. Food Agric.*, 28, 233 (1977).
11. Zenin, C.T. and Park, Y.K.; *J. Food Sci.*, 43, 646(1978).
12. Halin, D.H. and Montgomery, M.W.; *J. Food Sci.*, 43, 603(1978).
13. Park, Y.K., Sato, H.H. Almeida, T.D. and Moretti, R.H.; *J. Food Sci.*, 45, 1619 (1980).
14. Paulson, A.T., Vanderstoep, J. and Porritt, S.W.; *J. Food Sci.*, 45, 341(1980).
15. Galeazzi, H.A.M., Sgarbieri, V.C. and Constantinidus, S.M.; *J. Food Sci.*, 46, 150(1981).
16. Harel, E., Mayer, A.M. and Lener, H.R.; *J. Sci. Food Agric.*, 21, 542(1970).
17. Flukey, W.H. and Jen, J.J.; *J. Food Sci.*, 43, 1826(1978).
18. Shalon, N.B., Kahn, V., Harel, E. and Mayer, A.M.; *J. Food Agric.*, 28, 545 (1977).
19. Kahn, V.; *J. Food Sci.*, 42, 38(1977).
20. Glennie, C.W.; *J. Agric. Food Chem.*, 29, 33(1977).
21. Walker, J.R.L. and Hulme, A.C.; *Phytochem.*, 4, 667(1965).
22. Bedrosian, K., Nelson, A.I. and Steinberg, M.P.; *Food Technol.*, 13, 722(1959).
23. Constantinidus, S.M. and Bedford, C.L.; *J. Food Sci.*, 32, 466(1967).
24. David, A.S., Akhtar, S. and Ribeiro, S.; *Phytochem.*, 11, 35(1972).
25. Hulme, A.C.; *Advan. Food Res.*, 8, 297 (1958).
26. Wissemann, K.W. and LEE, C.Y.; *J. Food Sci.*, 46, 506(1981).
27. Harel, E. and Mayer, A.M.; *Phytochem.*, 10, 17(1971).
28. Knapp, E.W.; *J. Food Sci.*, 30, 930(1965).
29. Rivas, N.D.J. and Whitaker, J.R.; *Plant Physiol.*, 52, 501(1979).
30. Smith, J.L. and Krueger, R.C.; *J. Biol. Chem.*, 237, 1121(1962).
31. Luh, B.S. and Phithakpol, B.; *J. Food Sci.*, 37, 264(1972).
32. Reyes, P. and Luh, B.S.; *Food Technol.*, 14, 570(1960).
33. Weaver, C. and Charley, H.; *J. Food Sci.*, 39, 1200(1974).
34. Galeazzi, M.A.M. and Sgarbieri, V.C.; *J. Food Sci.*, 46, 1404(1981).
35. Alberghina, F.A.M.; *Phytochem.*, 3, 65 (1964).
36. Patil, S.S. and Zucker, M.; *J. Biol. Chem.*, 240, 3938(1965).
37. 大村浩久，專田民喜；榮養と食糧, 23, 367 (1970).
38. 大村浩久，專田民喜，淺田要一良；日食工誌, 22, 387(1975).
39. Ponting, J.D. and Joslyn, M.A.; *Arch. Biochem.*, 19, 47(1948).
40. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.; *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951).
41. Muneta, P. and Walradt, J.; *J. Food Sci.*, 33, 606(1968).
42. Macrae, A.R. and Duggleby, R.G.; *Phy-*

- tochem.*, **7**, 855(1968).
43. Palmer, T.K. and Roberts, J.B.; *Science*, **157**, 200(1967).
44. Mayer, A.M., Harel, E. and Shain, Y.; *Phytochem.* **3**, 447(1964).
45. Lineweaver, H. and Burke, D.; *Am. Chem. Soc.*, **56**, 685(1934).
46. 藤田修二; 日本 佐賀大農彙, **57**, 1(1984).
47. Takeo, T.; *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 558 (1965).
48. Lee, C.Y. and Smith, N.L.; *J. Food Sci.*, **44**, 82(1979).
49. 梁熙天·洪載植·李泰圭·孫姬淑; 韓國 農化學會誌**26**, 41(1988).
50. Bedrosian, K., Seinberg, M.E. and Nelson, A.I.; *Food Technol.*, **14**, 480(1960).
51. Tate, J.N., Luh, B.S. and York, C.K.; *J. Food Sci.*, **29**, 829(1964).
52. Hasegawa, M.; *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 5(1980).
53. Luh, B.S. and Phithakpol, B.; *J. Food Sci.*, **37**, 264(1976).
54. 藤田修; 日本 佐賀大農彙, **57**, 35(1984).