

魚鱗コラーゲンのペプシン消化物からの抗酸化ペプチドの分離と同定

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 水産大学校 公開日: 2024-10-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 末綱, 邦男, 前川, 敬世, 陳, 俊栄, 原田, 和樹, 浜田, 盛承, 申, 錫雨 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2011774

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



魚鱗コラーゲンのペプシン消化物からの 抗酸化ペプチドの分離と同定*¹

末綱邦男*²・前川敬世*³・陳 俊栄*⁴・原田和樹*²・浜田盛承*²・申 錫雨*⁵

Separation and Identification of Antioxidative Peptides from Peptic Digest of Fish Scale Collagen*¹

Kunio Suetsuna*², Keisei Maekawa*³, JIUN-RONG CHEN*⁴, Kazuki Harada*²,
Moritsugu Hamada*², and SUK-U SHIN*⁵

A peptidic fraction having antioxidant activity was separated from the peptic digest of mackerel pike scale collagen by ion-exchange, gel-filtration chromatography, and HPLC. Peptides obtained by SP-Sephadex C-25 chromatography of the most active fraction (SP-Ⅲ) were further separated using ODS HPLC. The amino acid sequences of these peptides were Leu-His-Gln-Pro-Val-Pro-Glu (LHQPVPE) and Val-Ser-Gln-Pro-Ile-Gln-Gln-Glu (VSQPIQQE). The IC₅₀ values of LHQPVPE and VSQPIQQE for hydroxyl radical scavenging activity were 27.3 μM and 7.53 μM, respectively.

1 諸 言

近年、生体内で発生する活性酸素やフリーラジカル等による酸化ストレスが、悪性新生物（ガン）、脳血管疾患（脳卒中）、心疾患を代表とする生活習慣病などの疾病を引き起こす要因であることが明らかになってきた。そのため、食品成分による酸化ストレスの防止や抑制の観点から、活性酸素やフリーラジカル等を捕捉、消去する物質が多く含まれる食品を摂取することにより、これら疾病を予防することに期待が集まっている。¹⁾ 現在、ブチルヒドロキシルアニソール（BHA）、ジブチルヒドロキシルトルエン（BHT）等の合成抗酸化剤は効力や安定性に優れているという理由から食品添加物として使用されてきたが、安全性の面で問題があることから、安全性が高くしかも有効な天然抗酸化剤の開発が望まれている。このような背景のもと、種々の天然物から抗酸化成分が分離される中で、著者らは食品タンパク質のプロテアーゼ消化物から数多くの抗酸化ペプチドを分離、同定してきた。²⁻⁹⁾

一方、サンマ水揚漁港では、水揚げの際にサンマ魚体から剥がれ落ちる大量廃棄物の鱗が問題となっており、これら水産廃棄物を有用な資源に変換することが求められている。今回、サンマ鱗を酢酸抽出して得たコラーゲンをペプシン分解し、得られたペプチド画分から抗酸化活性およびヒドロキシルラジカル消去能の強い画分を見出し、さらに、活性画分より抗酸化ペプチドを分離精製すると共に、アミノ酸配列決定を行った。

2 実験方法

2.1 試料

千葉県銚子漁港の魚市場の側溝で採取したサンマ *Coloabis saira* 鱗を洗浄、乾燥、およびジェットミルによる微粉碎化して鱗粉末を得た。鱗粉末500gに2N酢酸液5lを加え、室温にて1週間攪拌抽出を行った。抽出液をろ紙（東洋ろ紙No. 2）ろ過後、減圧濃縮、凍結乾燥してサンマ鱗由来のコラーゲン粉末とした。¹⁰⁾

2003年8月21日受付. Received August. 21. 2003.

- * 1 魚介類由来の生理活性ペプチドに関する研究—Ⅶ (Studies on Biologically Active Peptide Derived from Fish and Shellfish—Ⅶ)
- * 2 水産大学校食品化学科 (Department of Food Science and Technology, National Fisheries University)
- * 3 高田製薬株式会社 研究開発部 (Department of Research and Development, Takata Seiyaku Co. Ltd.)
- * 4 台北医学大学保健栄養系 (School of Nutrition Health Science, Taipei Medical University, E-mail:synei@tmn.edu.tw)
- * 5 麗水水産大学校 食品工学科 (Department of Food Science and Technology, Yosu National Fisheries University)

2.2 サンマ鱗由来コラーゲン粉末のペプシン分解およびペプチド精製

サンマ鱗由来のコラーゲン粉末40gに脱イオン水400mlを加え、1 N HClでpH2.0に調整し、ペプシン（豚由来、和光純薬工業製）1.2gを添加後、37℃で20時間酵素分解を行った。酵素分解終了後、直ちに反応液を透析チューブに詰め、脱イオン水1 lに対して2日間冷所（5℃）にて透析を行った。透析外液をDowex 50W×4カラム（H⁺型、50～100mesh、2.3×20cm）に加え、カラムを脱イオン水で十分洗浄した後、2 N NH₄OH 500mlで溶出した。減圧濃縮によりアンモニアを除去した後、凍結乾燥して粗ペプチド粉末を得た。この粗ペプチド粉末1.5gを脱イオン水20mlに溶解後、SP-Sephadex C-25カラム（H⁺型、1.5×47.2cm）に添加、脱イオン水500mlから1.5% NaCl溶液500mlでの濃度勾配法により溶出した。各溶出画分（SP-I、SP-II、SP-III画分）を再度Dowex 50W（H⁺）カラムクロマトグラフィーで脱塩後、凍結乾燥して精製ペプチド粉末（SP画分）とした。これら精製ペプチド粉末を0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解後、予めリン酸緩衝液で平衡化したSephadexG-25カラム（2.3×140cm）に負荷し、同緩衝液でゲルろ過した。標準ペプチド・アミノ酸としてInsulin（MW=6,000）、Insulin B chain（MW=3,500）、Insulin A chain（MW=2,550）、Bacitracin（MW=1,450）、Glycine（MW=75）を用い分子量の測定を行った。ペプチドの定量は牛血清アルブミンを標準としてLowry法¹¹⁾に準じて行った。

2.3 抗酸化活性の測定

(1) 山口らの方法¹²⁾に準じて、99.5%エタノール4.052ml、0.05Mリン酸緩衝液（pH7.0）4.0ml、蒸留水1.948mlの混合液にリノール酸（和光純薬工業製）の最終濃度が0.02Mになるように調整した。この溶液を、予め精秤した試料を加えたねじ付き試験管（20×125mm）に入れ、密栓して60℃の恒温器中に静置した。コントロールとして α -トコフェロール（和光純薬工業製）1 mgを、また、精製ペプチド粉末（SP画分）1 mgを用い、ロダン鉄法によってリノール酸の過酸化物量を測定した。すなわち、試料液0.1mlに75%エタノール4.7ml、30%ロダンアンモニウム水溶液0.1ml、0.02M塩化第一鉄の3.5%塩酸溶液0.1mlを加え、3分後に500nmにおける吸光度を測定した。その際500nmの吸光度が0.300に達するまでの日数を誘導期間すなわち抗酸化活性とした。

(2) 原田らのケミルネッセンス法¹³⁾による抗酸化活性測

定を行った。すなわち、2-2'-アゾビス（2-アミノプロパン）二塩酸（AAPH）を加温による熱分解を行って2ラジカル（2A \cdot ）と窒素（N₂）を生成する。次に、緩衝液を加えると、ラジカルが緩衝液中に溶存する酸素と結合して、ペルオキシラジカル（AOO \cdot ）を生成する。次に、ルミノール試薬を加えると、ペルオキシラジカルがルミノール試薬中に溶存する酸素およびセミキノンと結合してAOOHおよびセミキノンラジカル（Q \cdot ）を生成する。次に、セミキノンラジカルは溶存する酸素と反応してスーパーオキシドアニオン（O₂ \cdot ）とセミキノン（Q）を生成する。生成されたスーパーオキシドアニオンとセミキノンラジカルからの発光を430nmで測定する方法である。測定としては、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分取したペプチドフラグメント画分を凍結乾燥した後、ペプチドフラグメント画分を含む試験管に40mM AAPH液200 μ lを加え、37℃で2分間反応させた。反応後、ルミノール試薬200 μ lを加え430nmの化学発光を測定した。ルミノール試薬は、0.11mM ルミノール、4.00 μ Mチトクロームc、および100mM ホウ酸緩衝液（pH 9.3）：メタノール=1：3溶液を加えて調製した。

2.4 電子スピン共鳴（ESR）によるヒドロキシルラジカル消去能の測定

バイヤル瓶に1 mM 硫酸第二鉄液100 μ l、試料100 μ l、90mM PBN（ α -フェニル-N-t-ブチルニトロン）液40 μ l、過酸化水素100 μ lを順次加え、攪拌後、扁平セルに移し、電子スピン共鳴装置（日本電子社製ESR、JES-FR30型）にてヒドロキシルラジカル量を測定した。測定条件は、出力4 mT、磁場掃引幅342.796 \pm 5 mT、掃引時間4 min、磁場変調0.079mT、増幅率1250、応答時間1 secで行った。¹⁴⁾ここで、PBN-OHのESRスペクトルをFig. 1に示すが、内部標準物質であるマンガングナルピーク（MnO）の高さで、低磁場から2番目のシグナルピーク（PBN-OH）の高さで割った値、すなわち相対信号強度（I）を求めた。コントロール

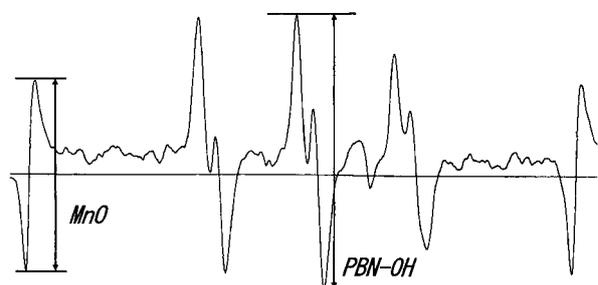


Fig. 1. Typical ESR spectrum of PBN-OH.

ルの相対信号強度を I_0 、試料の相対信号強度を I_n とし、 $(I_n/I_0) \times 100$ から減少率 (%) を求めた。減少率が50%濃度を示す試料濃度 (mg/ml) を IC_{50} 値とした。

2.5 逆相HPLCによるペプチドの単離精製

精製ペプチド粉末 (SP画分) 7 mgを0.05%トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む25%アセトニトリル溶液25 μ lに溶解しHPLCに付した。カラムにはDevelosil ODS-5 (4.6 \times 250mm, 野村化学製) を用い、溶離液は0.05% TFA溶液から0.05% TFAを含む25%アセトニトリル溶液への濃度勾配法 (3時間) で行った。流速は1.0ml/min, 検出波長は220nmで行った。逆相HPLCで得られたフラグメント画分の抗酸化活性は、上記2.3 (2) ケミルネッセンス法を用いて測定した。

2.6 ペプチドのアミノ酸配列決定とペプチド合成

HPLCで得られた抗酸化活性の高いペプチドフラグメントのアミノ酸分析は、常法により塩酸加水分解後、PICO-TAGTMアミノ酸分析計 (Waters社製) を用いて行った。ペプチドのアミノ酸配列は477A型プロテインシーケンサー (Applied Biosystem社製) を用いて行った。

抗酸化ペプチドの合成は、4-ヒドロキシフェノキシメチルアミノ酸樹脂154mg (C末端アミノ酸含量0.65mmol/g, スチレン1%ジビニルベンゼン共重合体) を出発原料とし、433A型プロテイン合成装置 (Applied Biosystem社製) によりFmoc固相法により行った。脱保護は、ペプチド結合樹脂に対して95%トリフルオロ酢酸を加え1.5時間攪拌した。反応後、冷ジエチルエーテルを加え生成物を沈殿させて合成ペプチドを分離した。

3 結果および考察

3.1 サンマ鱗からのコラーゲンの抽出

魚市場で採取したサンマ鱗を十分洗浄、乾燥した後、微粉砕して鱗粉末500gに、2N酢酸液を加え抽出を行った。酢酸抽出液を減圧濃縮、凍結乾燥した後、サンマ鱗由来のコラーゲン粉末179gを得た。竹中らの報告¹⁵⁾によれば、希塩酸処理によるマイワシ鱗からのコラーゲン量 (収率) は約40%であり、今回の酢酸処理によるサンマ鱗からのコラーゲン量35.8%に近い値であった。

鱗は主に無機成分としてヒドロキシアパタイト、CaおよびPを、有機成分としてコラーゲンで構成されている。このコラーゲンは繊維状の三重らせん構造をしており非水溶性であるが、加熱すると変性して水溶性のゼラチンとなり、食品、医薬品および化粧品分野で幅広く実用化されている。¹⁶⁾ このようにコラーゲン、ゼラチンの需要が高まっている中で、2001年9月に日本国内で初めてBSE (牛海綿状脳症、狂牛病) の感染が確認されたことにより家畜類由来のコラーゲンが敬遠されるに至り、海産物由来のコラーゲンに注目が集まってきた。

3.2 サンマ鱗コラーゲンのペプシン分解およびペプチド粉末の精製

鱗コラーゲンのペプシン分解物を透析、Dowex50W吸着・脱着して得た粗ペプチド粉末をSP-SephadexC-25カラムクロマトグラフィーに付した。Fig. 2に示すように、分画番号31~45をSP-I画分、分画番号46~70をSP-II画分および分画番号71~100をSP-III画分として集め、再度Dowex50W吸着・脱着、凍結乾燥して精製ペプチド粉末 (SP画分) とした。これら精製ペプチド粉末の分子量測定としてSephadex G-25カラムクロマトグラフィーした。Fig. 3に示すように、各SP画分の分子量分布は、大きいものは5,000程度、小さいものは500程度で、分子量ピークは2,000~3,000程度であったが、SP-II画分>SP-III画分>SP-I画分の順に分子量ピークが高かった。

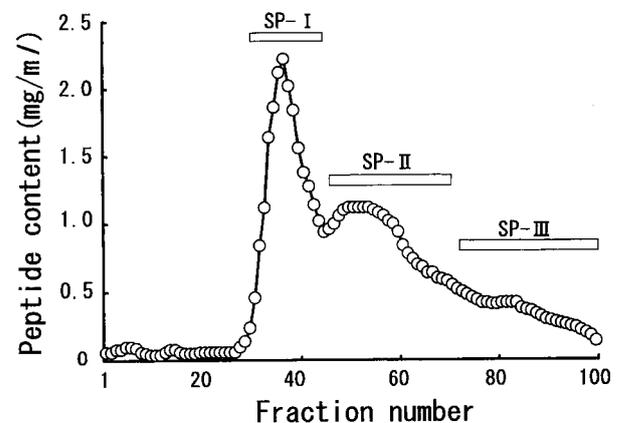


Fig. 2. SP-Sephadex C-25 chromatogram of peptic digest of mackerel pike collagen. Solvent system; (1) 500ml of H₂O, (2) 500ml of 1.5%NaCl. Linear gradient from (1) to (2). Fraction; 10ml. Flow rate; 90ml/h.

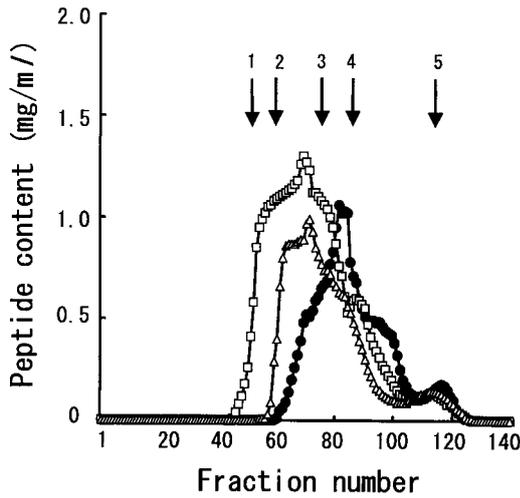


Fig. 3. Sephadex G-25 chromatogram of peptide fraction obtained by SP-Sephadex C-25 chromatography. Elution; 0.1M phosphate buffer (pH7.0). Fraction; 8.6ml. Flow rate; 30ml/h. 1; Insulin (MW=6,000), 2; Insulin B chain (MW=3,500), 3; Insulin A chain (MW=2,550), 4; Bacitracin (MW=1,450), 5; Glycine (MW=75). —●—; SP-I, —□—; SP-II, —△—; SP-III.

3.3 精製ペプチド粉末の抗酸化活性

上記SP-SephadexC-25カラムクロマトグラフィーで精製した精製ペプチド粉末 (SP画分) について、リノール酸を基質とする抗酸化活性の測定を行った。Fig. 4 に示すように、コントロールとして用いた α -トコフェロールの抗酸化活性としての誘導期間17.5日に対して、SP-III画分; 30.8日、SP-II画分; 27.1日およびSP-I画分; 22.5日であった。

同様に、上記SP-SephadexC-25カラムクロマトグラフィーで精製した精製ペプチド粉末 (SP画分) について、ESRを用いてヒドロキシルラジカル消去活性の測定を行った。Fig. 5 に示すように、コントロールとして用いたカルノシンの IC_{50} 値; 0.01mg/mlに対し、粗ペプチド粉末; 0.19mg/ml, 精製ペプチド粉末SP-III画分; 0.013mg/ml, SP-II画分; 0.017mg/mlおよびSP-I画分; 0.049mg/mlであった。これらの結果、ヒドロキシルラジカル消去活性の強いカルノシンには及ばないものの、鱗コラーゲン由来ペプチドも強いヒドロキシルラジカル消去活性を示し、さらに、リノール酸を基質とする系の抗酸化活性と高い活性相関を示した。

3.4 抗酸化ペプチドの単離精製とアミノ酸配列

抗酸化活性およびヒドロキシルラジカル消去活性の強かった精製ペプチド粉末SP-III画分を、さらに、逆相

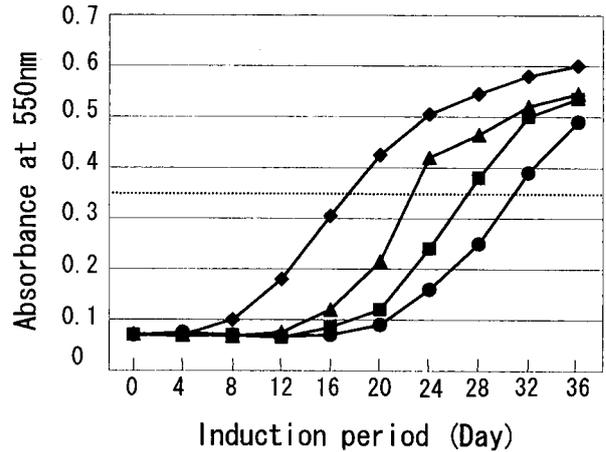


Fig. 4. Antioxidant activity of the peptide fraction obtained by SP-Sephadex C-25 chromatography. The peptide fraction (1 mg) and α -tocopherol (1 mM) were added to the oxidation system. The vial was kept at 60°C, and the rate of oxidation was measured by the ferric thiocyanate method. —◆—; α -tocopherol, —▲—; SP-I, —■—; SP-II, —●—; SP-III.

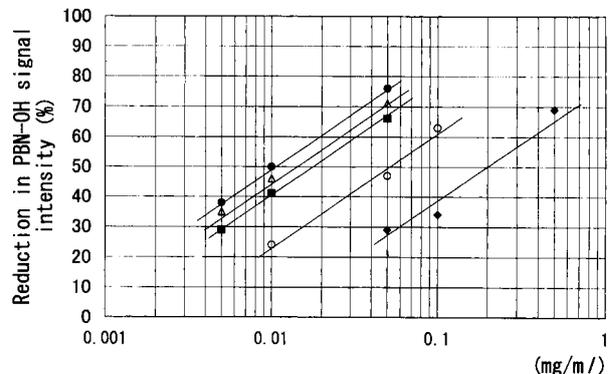


Fig. 5. Hydroxyl radical scavenging activities of the peptide fractions. Defining the signal intensity in the case of the control distilled water as 100, the percentage reduction in the signal intensities were calculated when the test sample were used. IC_{50} indicates the concentration of the test sample at 50% of control signal intensity by using ESR. —●—; Carnosine, —◆—; Crude peptide powder, —○—; SP-I, —■—; SP-II, —△—; SP-III.

HPLCでペプチドフラグメントに分離し、抗酸化活性測定をケミルネッセンス法で行ったところ、Fig. 6 に示すように溶出時間63分および71分に抗酸化活性の強いペプチドが得られた。次に、アミノ酸分析およびアミノ酸シーケンサーにより、これら2種類の抗酸化ペプチドの構造解析を行ったところ、Table 1 に示すように Leu-His-Gln-Pro-Val-Pro-GluおよびVal-Ser-Gln-Pro-Ile-Gln-Gln-Gluと決定できた。これら分離してきた2種類の抗酸化ペプチドの

Table 1. Analytical data and hydroxyl radical scavenging activity of the isolated peptides by HPLC

Retention time (min) ¹⁾	Peptide	Amino acid ratio ²⁾	IC ₅₀ value (μ M) ³⁾
63	Leu-His-Gln-Pro-Val-Pro-Glu	Leu 1.00, His 0.97, Gln 0.99 Pro 2.03, Val 1.04, Glu 0.98	27.3
71	Val-Ser-Gln-Pro-Ile-Gln-Gln-Glu	Val 1.02, Ser 1.05, Gln 3.06 Pro 0.97, Ile 1.10, Glu 0.99	7.53

All amino acids were of L-configuration.

1) Expressed from the results of HPLC (Fig. 6).

2) Hydrolyzed with 6 N HCl at 110°C for 24h.

3) The concentration of the synthetic peptide at 50% of control signal intensity by using ESR.

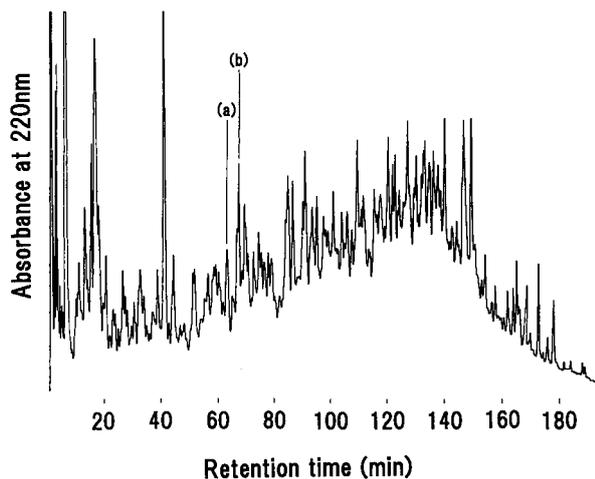


Fig. 6. Reverse-phase HPLC of SP-III fraction. Column; Develosil ODS-5 (4.6×250mm). Solvent system; (1) 0.05% trifluoroacetic acid, (2) 25% acetonitrile in 0.05% TFA. Linear gradient from (1) to (2) for 3 hours. Flow rate; 1 ml/min. Monitoring absorbance; 220 nm. The peaks marked (a) Leu-His-Gln-Pro-Val-Pro-Glu, (b) Val-Ser-Gln-Pro-Ile-Gln-Gln-Glu.

アミノ酸配列決定に基づき、合成ペプチドとして LHQPVPPEおよびVSQPIQQEを合成した。さらに、これら合成ペプチドを用いてESR法によるヒドロキシルラジカル消去活性を測定した結果、LHQPVPPE IC₅₀値; 27.3 μ M, VSQPIQQE IC₅₀値; 7.53 μ Mが認められ、対照として用いたカルノシン (IC₅₀値; 44.2 μ M) より強い活性を示した。

タンパク質の抗酸化作用については、Yamashojiら¹⁷⁾は、金属-カゼインタンパク質の複合体形成能と酸化触媒作用との関連で報告しており、また、山口¹⁸⁾は、大豆タンパク質の部分加水分解物中に分子量2,000~3,000の抗酸化ペプチドの存在を示唆した。さらに、川島ら¹⁹⁾は、トリプトファン、メチオニン、プロリンおよび分岐鎖アミノ酸が、抗酸化効果が優れていると報告した。最近、拓植ら²³⁾は、卵アルブミン由来の抗酸化ペプチドとしてAla-His-Lys,

Val-His-His, Val-His-His-Ala-Asn-Glu-Asnを、また、Chenら²⁰⁾は、大豆タンパク質由来の抗酸化ペプチドとしてLeu-Leu-Pro-His-Hisを骨格ペプチドとして、抗酸化ペプチドの構造活性相関について検討を行い、さらに、工藤ら²¹⁾は発酵乳から抗酸化ペプチドとしてAla-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Metを報告しているが、これら一連の抗酸化ペプチドはN末端から2番目から4番目にヒスチジンを持つことが共通している。著者らは、これまでグルタミンを含む抗酸化ペプチドとして、マイワシ筋肉由来の抗酸化ペプチド⁵⁾としてLeu-Gln-Pro-Gly-Gln-Gly-Gln-Glnを、小麦グルテン由来の抗酸化ペプチド⁹⁾としてLeu-Gln-Pro-Gly-Gln-Gly-Gln-GlnおよびAla-Gln-Ile-Pro-Gln-Glnを、さらに、大豆由来の抗酸化ペプチド³⁾としてLeu-Val-Pro-Pro-Gln-Glu-Glu-Gln-Lysを発見してきた。今回、サンマ鱗コラーゲンのペプシン分解物から単離した2種類の抗酸化ペプチドは、その構造中にグルタミンを含むことが特徴的であった。また、サンマ鱗コラーゲン由来の抗酸化ペプチドは、その構造中にプロリンを含むことも特徴的であるが、川島らは既にプロリン含量の高いゼラチン部分加水分解物の抗酸化性をみており、このことをも裏付けている。

一方、ラジカル反応による過酸化脂質の生成に関与する活性酸素種としては、スーパーオキシド (O_2^-), 過酸化水素 (H_2O_2), ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$), 遷移金属錯体と酸素の複合体があげられる。その中で、過酸化脂質の初期段階に直接作用するのはヒドロキシルラジカル、金属錯体および過酸化脂質から二次的に派生するアルコキシラジカル ($LO\cdot$) である。今回のESRによるヒドロキシルラジカル消去活性測定の結果から、サンマ鱗コラーゲン由来ペプチドの脂質の過酸化を抑制する機序は、過酸化水素を水に変えることにより、過酸化水素からFenton型Harber-Weiss反応 ($O_2^- + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + OH^-$) によって、

反応性の高いヒドロキシルラジカルが生じるのを防止する作用と考えられた。²²⁾ 今回分離したペプチドのアミノ酸配列と活性酸素生成抑制・除去系との相関を今後さらに検討する必要がある。

文 献

- 1) 二木鋭雄・島崎弘幸・美濃真：抗酸化物質-フリーラジカルと生体防御-, 学会出版センター, 東京, 1994年, pp. 3-15.
- 2) 柘植信昭・永川由美・野村幸弘・山本正典・杉澤公：農化誌, 65, 1635-1641 (1991).
- 3) 末綱邦男：栄食誌, 52, 225-228 (1999).
- 4) 末綱邦男：日水誌, 65, 92-96 (1999).
- 5) 末綱邦男：日水誌, 65, 1096-1099 (1999).
- 6) K. Suetsuna, H. Ukeda, and H. Ochi: *J. Nutr. Biochem.*, 11, 128-131 (2000).
- 7) K. Suetsuna: *Mar. Biotechnol.*, 2, 5-10 (2000).
- 8) K. Suetsuna and J-R Chen: *J. National Fish. Univ.*, 51, 1-5 (2002).
- 9) K. Suetsuna and J-R Chen: *Food Sci. Technol. Res.*, 8, 227-230 (2002).
- 10) 浜田盛承, 熊谷洋：日水誌, 54, 1987-1992 (1988).
- 11) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 12) 山口直彦, 横尾良夫, 藤巻正生：日食工誌, 22, 431-435 (1975).
- 13) K. Harada, C. Okano, H. Kadoguchi, Y. Okubo, M. Ando, S. Kitao, and Y. Tamura: *Int. J. Mol. Med.*, 12, 621-625 (2003).
- 14) M. Sato, N. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, M. Takeuchi, and H. Ochi: *J. Agric. Food Chem.*, 44, 37-41 (1996).
- 15) 竹中淳司・岡田公・岩井健太・綾木義和：食科工誌, 50, 67-71 (2003).
- 16) 藤本大三郎：コラーゲン物語, 東京化学同人, 東京, 1999年, pp. 144-153.
- 17) S. Yamashoji, H. Yoshida, and G. Kajimoto: *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1947-1951 (1977).
- 18) 山口直彦： *New Food Industry*, 31, 18-22 (1989).
- 19) 川島啓助, 伊藤博, 千畑一郎：化学と生物, 20, 215-217 (1982).
- 20) H-M. Chen, K. Muramoto, F. Yamauchi, and K. Noki-hara: *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2619-2623 (1996).
- 21) 工藤康文・松田茂樹・井越敬司・沖智之：食科工誌, 48, 44-50 (2001).
- 22) 日本栄養・食糧学会監修：活性酸素と栄養, 光生館, 東京, 1995年, pp. 13-35.