

液体クロマトグラフィーによる食品成分の分離分析および食品酵素の精製

大槻 耕三・松尾 亜希子・尾原 宏美・宮田 真理子・
村西 映美・佐藤 健司・中村 考志

Separation analysis of some food constituents and purification of enzyme in food by liquid chromatography

KOZO OHTSUKI, AKIKO MATSUO, HIROMI OBARA, MARIKO MIYATA,
TERUMI MURANISHI, KENJI SATO and YASUSHI NAKAMURA

Abstract : Liquid chromatography and HPLC were successfully used for the determination of some food constituents and the purification of an enzyme in food. Free and total amino acids, water extracts and 6N-HCl vapor hydrolysates in foods were analyzed in an ion-exchange HPLC-amino acid analyzer with lithium citrate buffers and post-column fluorimetric detection with o-phthalaldehyde - N-acetyl-L-Cysteine reagent. Tryptophan content in green tea, Mat-Cha, was also analyzed in an HPLC with fluorimetric detector, exci. 280nm, emi. 350nm, after barium hydroxide hydrolysis in a Teflon test tube and a 45 ml screw-capped vial *in vacuo* at 110°C.

For the purification of ginger aminopeptidase, ion-exchange chromatography on Toyopearl SuperQ 650S and hydrophobic interaction chromatography on Octyl-Sepharose CL-4B were shown to be effective to speed up the purification.

For the determination of the phytic acid in roasted brown rice flour and brown rice bread, an HPLC of Toyogel DEAE-5PW with a post-column detection system of Wade-reagent was very useful after 0.65 N HCl treatment of the foods at 25°C for 2 hr.

Analyses of catechins and caffeine in various green-tea extracts were carried out on a single run of reverse phase HPLC and UV-detection at 280 nm and this method was convenient to evaluate the qualities among the various teas by comparing of their chromatograms. Liquid chromatography and HPLC were thus shown to be useful and simple for the analyses of the food constituents.

(Accepted September 10, 2004)

I 緒 言

食品に含まれる各種栄養成分や、生理活性物質やその他の化学成分を分析する場合、過去においては発色試薬による比色法等が主流であった¹⁾。しかし、これらの方法だけでは、分析対象の食品中の各種化学成分が混合している状態であって、分析目的の成分と発色試薬とを反応させたつもりでも化学構造の良く似た他の成分にも反

応し過剰評価することになる。また、反応試薬が、混在する化学成分により妨害や干渉を受けた場合には過小評価する危険性がある。このような危険性を避けるため分析目的成分のみを分離し、これを分析するために、抽出やclean upや液体クロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が必要、不可欠となってきた。

最近の食品分析法では、上記の過大評価や過小評価を無くすために、多くの場合、液体クロマトグラフィーや

高速液体クロマトグラフィーを利用して目的物質を分離し、それについて分析定量しているから測定精度が、以前に比べかなり高まってきた^{2) 3) 4)}。

食品分析における留意点は、試料が水分や有機物を多く含み、それらが容易に変化する。例えば、室温に放置すれば、水分含量が減少し他の成分含量がそれに応じて増加したり、密封されていないと空気酸化されたり、食品内に含まれる酵素により様々な酵素反応が起こり成分は変化する。だから可能な限り食品試料は迅速に前処理し、迅速に分析に供せねばならない。また測定値に再現性があり、分析法が簡易で迅速に、かつ誰にでも実施できることも重要である。これらの点を解決する方法として、HPLCは目的に最もかなうものである。本報告においては、数種の食品においてHPLCを利用したアミノ酸分析やその他の食品成分の分析について、また食品中に含まれる酵素のHPLCによる分離・精製について述べる。

II 実験材料および実験装置

(1) 実験材料

食品試料および材料は京都市内のスーパーマーケットで購入した。緑茶については、京都府下の茶園で栽培・加工されたものを分析に使用した。生姜は京都市内のスーパーマーケットで購入した。麹菌フィターゼ（フィターゼ3000）については天野エンザイム株式会社（名古屋市）から購入した。

分析用の各種特級試薬はナカライテスク社（京都市）または和光純薬工業株式会社（大阪市）から購入した。

(2) 実験装置

HPLC装置は島津社製高速液体クロマトグラフLC-6A型、または低圧グラジエントLC-980-02付き日本分光社

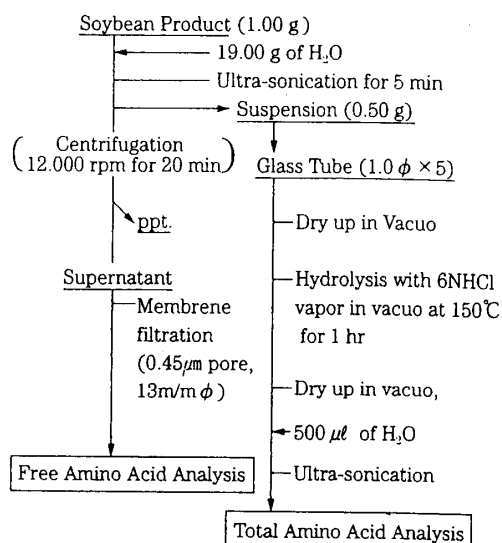


Fig. 1. Preparation of Extract and Hydrolysate of Food Product for the Analysis of Free and Total Amino Acids.

製高速液体クロマトグラフLC-900型を使用した。分光蛍光光度計は日本分光社製FP-550型にマイクロフローセルを取り付けHPLCの蛍光検出器として使用した。分光光度計は日立社製100-10型を使用した。データの記録および定量計算は島津社製クロマトパックCR-6Aによって行った。

III 結果および考察

(1) アミノ酸分析^{5) ~8) 14~22)}

食品中のアミノ酸は遊離状態で存在するものと、たんぱく質やペプチドとして結合状態で存在するものがありこれら両者を合わせたものが総アミノ酸である。通常の商品アミノ酸分析データ⁷⁾は総アミノ酸についてのみ記載されている。本報告では遊離アミノ酸と総アミノ酸の分析定量について述べる。前処理法を、Fig.1に示すように行うが、抽出は蒸留水または75%エタノールを使用する。試料量がかかなり少量なので、微粉末や液体状にするなどして充分、均一にする必要がある。大豆食品についての結果は既に報告した²²⁾。抹茶試料の場合は試料量が少量で、既に報告したように²¹⁾、試料量としては30mgをポリ製エッペンドルフ社製小型遠心チューブに精秤量し、1.5mlの蒸留水を加え超音波器（ブランソン社製220型）に5分間照射・抽出した。

- ①総アミノ酸の分析のために、上記懸濁液0.50gを分取し、そのうちの100mgを1.0×5cmのガラス製ミニ試験管にいれ、25ml容ミニナートバイアル（Pierce

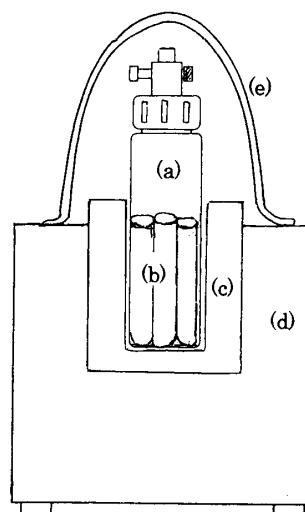


Fig. 2. Cross Section of a Hydrolysis Furnace. (a) Screw-capped vial with Mininert push-button Teflon valve, a 25 ml vial and 1 cm φ × 5 cm glass test tube for the HCl vapor hydrolysis; a 45 ml vial and 1 cm φ × 7.5 cm Teflon test tube for the barium hydroxide alkaline hydrolysis. (b) Test tubes. (c) Aluminium block. (d) Electric furnace, Pierce Reacti-Therm, at 150°C for the HCl hydrolysis and 110°C for the alkaline hydrolysis. (e) Glass-cloth cover.

社製) 中で真空乾燥させる。ミニ試験管は3本まで25ml容ミニナートバイアルに入れられる。このバイアルの底部に6N塩酸0.5ml (少量のフェノールを含む。塩酸がミニ試験管に入らないように注意する。) を入れ、真空ラインにつなぎ脱気する。これをFig.2に示したように150℃の加水分解炉に1~2時間入れ6N塩酸蒸気で加水分解する^{18)~20)}。なおミニ試験管は予め150℃, 6N塩酸蒸気で空加水分解しておかないとアスパラギン酸の回収率が悪くなる。アミノ酸分析機はFig.3に示したHPLC装置で、リチウムバッファー・イオン交換樹脂とオルトフタルアルデヒド・N-アセチル-L-システイン (OPA-Ac-Cys) による第1アミンを検出する蛍光法によるポストカラム法である^{16) 17)}。本報告ではOPA試薬やNaClO試薬の溶媒に、炭酸バッファー¹⁷⁾ や0.4Mホウ酸, pH10.4, を使用した。この蛍光検出法はニンヒドリン法^{5) 6)} よりも感度が50~100倍高く、更にOPA-Ac-Cys試薬やアミノ酸と反応生成した蛍光物質のイソインドール誘導体が室温でも安定であった。そこでFig.3の (f) で採取された物質は確認や更なるHPLCによる分析が可能である。特に、これを更に逆相HPLCにかけるか、または6方バルブを介して第2のHPLC (逆相) を行えば、アミノ酸の光学分割 (DとLの分割) 定量が可能である¹⁶⁾。または共溶出しているかもしれない未知物質の分離が可能で、目的の物質の定量精度が上昇することになり、より好ましい装置といえる (2次元HPCL)。クエン酸リチウム・イオン交換HPLCによるアミノ酸分析

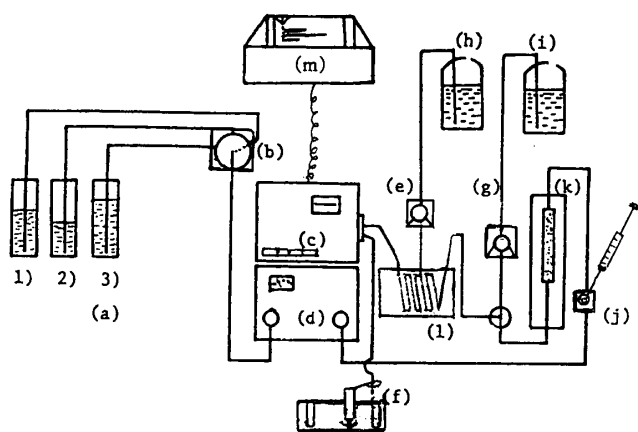
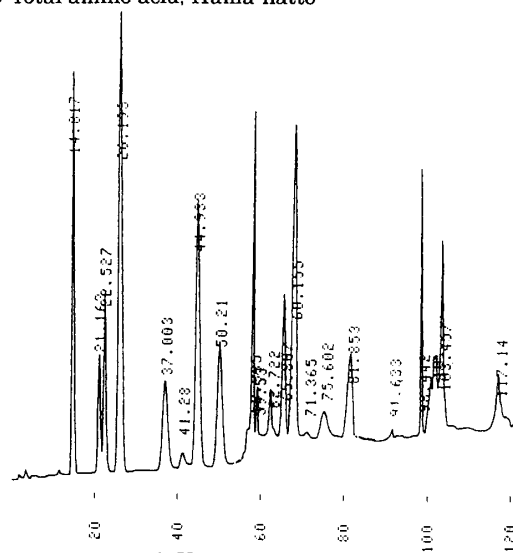


Fig. 3. Flow Diagram of the HPLC for Amino Acid Analysis. (a) Lithium citrate buffers. (b) Buffer solution changer. (c) Fluorometer with a flow cell and a black-light. (d) Buffer solution pump. (e) OPA- Ac-Cys solution pump, Perista mini Atto Co.Ltd. (f) Fraction collector. (g) NaClO solution pump. (h) 0.08% OPA+0.1% N-Ac-Cys / 0.4M borate, pH 10.4. (i) NaClO solution, 0.4 ml of Antiformin / l of 0.4 M borate, pH10.4. (j) Injection port. (k) Cation-exchange resin column, Mitsubishi CK-10U, 0.46 cm ϕ \times 15 cm, at 40℃. (l) Reaction coil, 0.5 mm ID \times 2 m, x2. (m) Recorder, Shimadzu Chromatopac CR-6A.

法はクエン酸ナトリウム系の方法よりも分析時間は長いがより分離能が良く、未知物質の発見が容易である。この方法は食品や動植物の生体液中の遊離アミノ酸分析には必須の方法である。

②遊離アミノ酸の分析は、Fig.1の懸濁液を遠心分離とセルロースアセテート膜 (0.45 μ m, 13mm ϕ , Advantec社製) で濾過し、清澄液を得る。これの一定量を①と同じアミノ酸分析機で分析・定量する。この結果のクロマトグラムをFig.4に示すが、浜納豆の遊離アミノ酸 (B) のクロマトグラムから判ることは、この発酵食品では、普通の食品や不発酵の食品に見られるアスパラギンやグルタミン (両者はグルタミン酸のピークの前後に出る。) が全く検出されていないことである。なお、緑茶の遊離ア

(A) Total amino acid, Hama-natto



(B) Free amino acid, Hama-natto

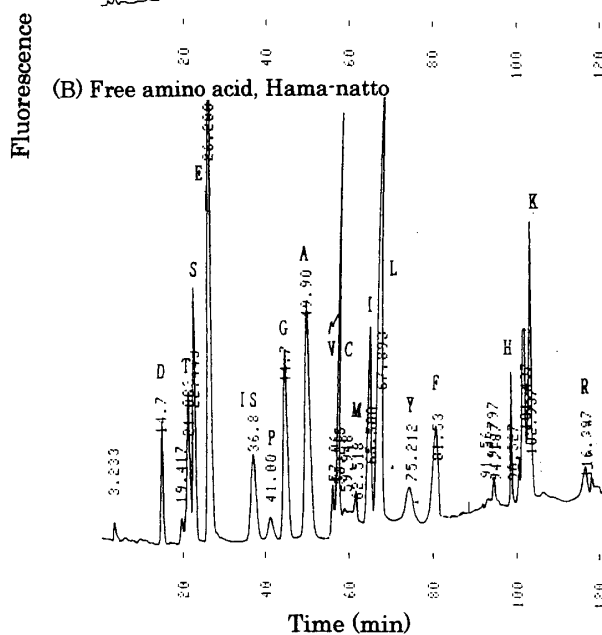


Fig.4. Chromatograms of Total and Free Amino Acids in a Fermented Soybean Product, Hama-natto. (A) Total amino acid, 6 N HCl vapor hydrolysate. (B) Free amino acid, water extract. D, Asp; T, Thr; S, Ser; E, Glu; IS, internal standard; P, Pro; G, Gly; A, Ala; V, Val; C, Cys; M, Met; I, Ile; L, Leu; Y, Tyr; F, Phe; H, His; K, Lys; R, Arg.

ミノ酸は主に旨味成分のテアニンであるが、これはクエン酸Na系HPLCでは単離されず定量不可能である。テアニンはFig.4の32分間の位置に単離されるのでクエン酸Li系HPLCは必須である^{11) 12) 13) 21) 41)}。その他、特殊なアミノ酸の分析にはこのアミノ酸分析法が有用である^{9) 10) 22)}。

- ③食品中のトリプトファンは、普通の塩酸加水分解法や上記①の塩酸蒸気法でも、ほとんど破壊されるため、アルカリ加水分解法が必要である⁷⁾。その他にはメチオニンが弱く酸化された物質のメチオニンスルフォキサイドもアルカリ加水分解法が必要である⁸⁾。本報告でのアルカリ加水分解法はTable1に示したように、水酸化バリウムで、110℃、12~16時間の加水分解を行った結果である。この例ではトリプトファンの特異的な蛍光を検出しているため紫外吸光度法に比べ未知ピークの妨害が殆ど無く簡便で正確である。

Table 1 Analysis of Tryptophan in Green Tea, Mat-Cha, by Alkaline Hydrolysis and Reverse Phase HPLC-Fluorimetric Detection Method.

Hydrolysis Time (hr)	Tryptophan (mg/100g) *
12	607 ± 2
14	615 ± 26
16	572 ± 7

* Means ± SD, n = 3

Mat-Cha, 30mg, was added with 390mg of Ba(OH)₂, 15μl of thiodiethylene glycol, and 225μl of water, in a Teflon test tube, 1cmø × 7.5cm. The tubes were evacuated in a 45 ml screw-capped vial added with water, 0.5ml, and capped with Mininert push-button Teflon valve. The vial was heated in a furnace, Pierce Reacti-Therm, at 110℃ for 12 to 16 hr. After cooling, the hydrolysates were neutralized with 5% sulfuric acid, filled up to 5ml, and filtered with cellulose acetate membrane, Advantec, 0.45μm pore. The filtrate was injected on a column, Cosmosil 5C-18-AR, 0.46 × 15 cm, with an iso-cratric elution, methanol: 0.1% phosphoric acid (14:86), in a Jasco Tri-rotar HPLC with fluorescence detector, Jasco FP-550.

(2) 酵素タンパク質の液体クロマトグラフィーによる精製

液体クロマトグラフィーによるタンパク質や酵素の精製は、イオン交換樹脂法^{24~26) 29) 31)~33)}やゲル濾過法³⁰⁾やアフィニティークロマトグラフィー^{23) 27)~29)}など種々行ってきたが、それぞれ特徴のある液体クロマトグラフィーである。本報告では、ショウガ根茎アミノペプチダーゼの分離・精製の結果について述べる。ショウガには数種類のプロテアーゼが含まれており、これらから液体クロマトグラフィーによりアミノペプチダーゼのみを分離することが出来た^{34)~36)}。この酵素はショウガ中には

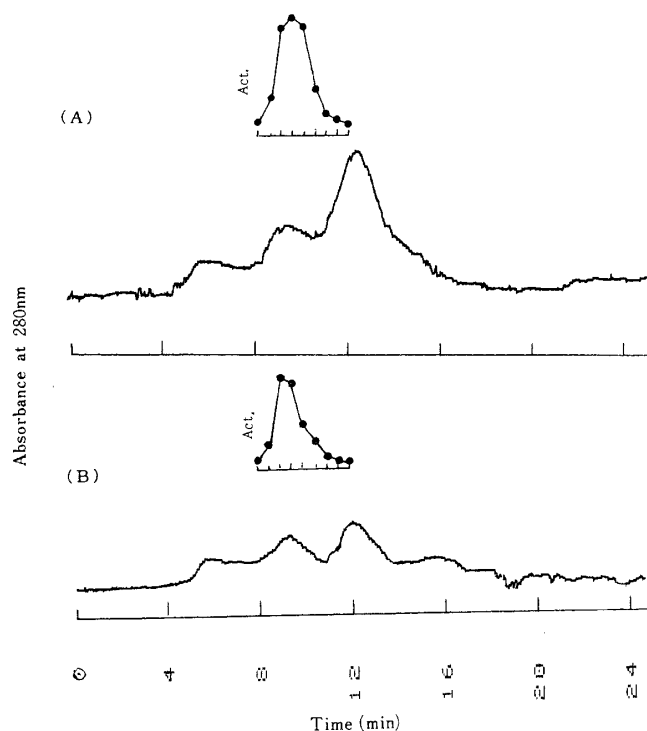


Fig.5. Gel Chromatography of Purified Ginger Aminopeptidase on TSKgel G3000 SWXL. Ginger aminopeptidases purified by (A) Anion-exchange chromatography (AEC), Toyopearl SuperQ 650S, first and then hydrophobic interaction chromatography (HIC), Octyl Sepharose CL4B, and (B) HIC first and then AEC. Act: aminopeptidase activity against Leu-p-nitroanilide substrate.

少量しか含まれていないため、精製法の改良により収率を高める目的で、精製の初期段階でイオン交換クロマトグラフィーと疎水クロマトグラフィーを行った。それらのクロマトグラフィーの順序を変えた場合の精製酵素の純度検定をFig.5に示したようにTSKgel G3000 SWXLのHPLCと比較検討した。その結果、活性な酵素は9~10.5分に溶出し、(A)では(B)に比べまだ不純物が多いことが判明した。また(B)からは不純物は少ないことが示された。両者ともまだ不純物が含まれており、さらにゲルHPLCで分子量的に精製することも必要であることが判明した。

(3) フィチン酸の分析

玄穀類や豆類に含まれるフィチン酸 (IP6) はミネラル栄養吸収の阻害となるものであるが、分子そのものに可視光・紫外線吸収性が無いためHPLCにおいて検出が困難な物質である。IP6はWade試薬 (0.3%スルホサリチル酸0.03%塩化第二鉄水溶液) で比色定量されてきたが、試料中に混在するIP2~IP5やEDTAやクエン酸なども反応するから過大評価するので分離分析が必要である。アニオン交換樹脂によりIP2~IP5との分離はFig.6 (A) のように可能であった。玄米粉やその加工品の分析例もFig.6 (B), (C) に示す。

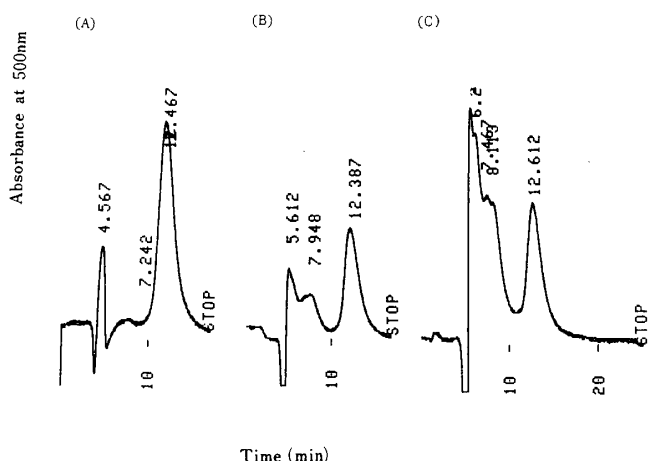


Fig.6. Chromatograms of Phytic Acid, IP6, Analyses. (A) Standard IP6, at 12.46 min. (B) IP6, at 12.4 min, and IP5~IP2, at 7.9~5.6 min, in roasted brown rice flour. (C) IP6, at 12.6 min, and IP5~IP2, 8.1~6.2 min, in 50% brown rice bread added with *Aspergillus niger* phytase. Column, Toyogel DEAE-5PW, 0.46 cm φ × 12.5 cm, and post-column detection with Wade reagent were used.

(4) カテキンとカフェインの分析

緑茶中のカテキン類とカフェインのHPLC分析は、逆相HPLCとアセトニトリルのグラジエント溶出法で行った。他の報告ではODS系の例が多いが、我々のFig.7の例ではカラムがRP-8で、ODS系より疎水性の弱いカラムであるので、没食子酸 (Gallic acid) とのエステルであるEGCGやECGなどがODS系の場合より早く溶出される。さらに、EGCGやECGは加水分解されるとそれぞれEGCとGallic acid, ECとGallic acidになるから、これらの変化をクロマトグラム上から定量的に把握することができる。またこれらカテキン類量とカフェイン量との比を同一クロマトグラム上で比較できる。Fig.7の結果からはいずれもカフェインとEGCGの量が多いが、水出し煎茶・玉露や番茶はカテキン類がカフェイン量に比べ少量である。また番茶についてはGallic acid量が多くエステルの加水分解が進んでいる事を示している。

(5) その他の食品成分の分析

食品中の比較的多量含まれる糖の分析については、ゲルHPLCやホウ酸系アニオン・イオン交換樹脂HPLCによるものがルーチンワークとしては簡便である⁴⁰⁾。ビタミンCの分析には普通はNH₂-をリガンドとするシリカ系HPLCが多いがリガンドが脱離しやすく保持時間が不安定なのが欠点である。しかし我々はToyopearl amide-80, 0.46cm φ × 25cm, アセトニトリル:0.05Mりん酸, pH 5.0 (75:25) イソクラテック溶出, 試料をDTTで還元, 268 nm の紫外吸光で検出, の条件で分析した⁴¹⁾。ビタミンEについては試料をケン化した後, Cosmosil-NH₂と n-ヘキサン:イソプロパノール (98:2), 分光蛍光検出 (励起光295nm, 蛍光320nm) 等の条件で分析した⁴¹⁾。

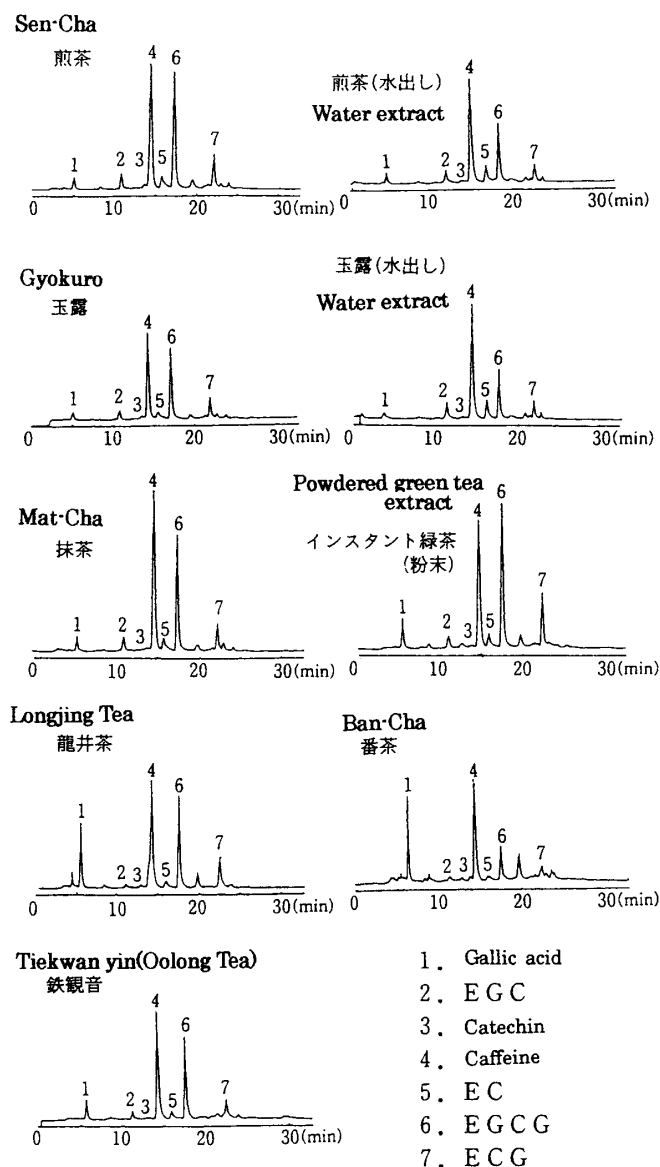


Fig.7. Analyses of Catechins and Caffeine in Various Tea Extracts. Tea powder, 1.0g., was extracted with 50ml of hot water, 80°C, for 30min and then filtered with Advantec, cellulose acetate, 0.4μm pore. The filtrate, 10μl, was injected on a column, Lichrosorb RP-8, 0.46 × 25 cm, with a gradient elution from 7% to 50% acetonitril in 0.01 M phosphate, pH 2.6, in a Jasco Tri-rotar HPLC with UV-detection at 280 nm.

IV 要 約

食品の成分分析や食品酵素の精製を液体クロマトグラフィーとHPLCによって行った。食品中の遊離アミノ酸や6N塩酸蒸気法による総アミノ酸の分析をクエン酸リチウム・イオン交換HPLCとo-フタルアルデヒド・N-アセチルシステイン試薬のポストカラム法で分析した。この方法はクエン酸ナトリウム・イオン交換HPLCよりも時間を要するが分離能がよく未知物質を分離し、またここでラベル化された物質は更に逆相HPLCによる解析が

可能である。トリプトファン分析にはマイクロ化した水酸化バリウム加水分解法を試みた。また、酵素タンパク質のシヨウガ・アミノペプチダーゼの精製にはToyopearl SuperQ SとOctyl-Sepharose CL-4Bが有効であった。玄米粉やその加工品中のフィチン酸の分析にはToyogel DEAE-5PWのイオン交換HPLCとWade 試薬によるポストカラム検出が有効であった。各種緑茶抽出液中に含まれるカテキン類とカフェインについては逆相HPLCと280nmの紫外検出で分析でき、同一クロマトグラム上で緑茶の成分評価をする事ができる。以上のように液体クロマトグラフィーとHPLCは食品分析には大変有用である。

文 献

- 1) 三訂・日本食品標準成分表, 科学技術庁資源調査会, 大蔵省印刷局 (1964)
- 2) 新・食品分析法, 日本食品科学工学会新・食品分析法編集委員会編, 光琳 (1996)
- 3) 五訂・日本食品標準成分表, 科学技術庁資源調査会, 大蔵省印刷局 (2000)
- 4) 長谷川喜代三, 食品分析, 食物・栄養科学シリーズ 19, 培風館 (1993)
- 5) S.Moore, D.H.Spackman and W.H.Stein, Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins, *Anal.Chem.*, 30, p1185 (1958)
- 6) J.V. Benson Jr. and J.A.Patterson, Accelerated chromatographic analysis of amino acids commonly found in physiological fluids on a spherical resin of specific design, *Anal.Biochem.*, 13, p265 (1965)
- 7) 改訂・日本食品アミノ酸組成表, 科学技術庁資源調査会, 大蔵省印刷局 (1986)
- 8) 大槻耕三, 波多野博行, 酸加水分解に不安定なアミノ酸の自動分析のためのアルカリ加水分解法, *日本化学雑誌*, 91巻11号p120 (1970)
- 9) C.L.Liu, K.Ohtsuki, H.Hatano, Inactivation rhodotorula glutinis acid protease by diazoacetyl compounds, *J. Biochem.*, 73, P671 (1973)
- 10) K.Ohtsuki, H.Hatano, Ion-exchange chromatography of amino acids and aromatic amino acid derivatives by a single-column method, *J. Chromatogr.*, 148, p536 (1978)
- 11) K.Ohtsuki, M.Kawabata, K.Taguchi, H.Kokura, S.Kawamura, Determination of S-methylmethionine, vitamin U, in various teas, *Agric. Biol. Chem.*, 48, p2471 (1984)
- 12) K.Ohtsuki, M.Kawabata, H.Kokura and K.Taguchi, Simultaneous determination of S-methylmethionine, vitamin U and free amino acids in extract of green tea with an HPLC-amino acid analyzer, *Agric. Biol. Chem.*, 51, p2479 (1987)
- 13) 大槻耕三, 河端 信, 田口邦子, 食品中のビタミン U および酸加水分解による変化, 京都府大・学術報告, 第40号p19 (1989)
- 14) T.Hibino, K.Kidzu, T.Masumura, K.Ohtsuki, K.Tanaka, M.Kawabata, S.Fujii, Amino acid composition of rice prolamin polypeptide, *Agric. Biol. Chem.*, 53, p513 (1989)
- 15) K.Sato, Y.Tsukamasa, C.Imai, K.Ohtsuki, Y.Shimizu, M.Kawabata, Improved method for identification of ϵ -(γ -glutamyl) lysine crosslink in protein using proteolytic digestion and derivatization with PITC followed by HPLC separation, *J.Agric. Food Chem.*, 40, p806 (1992)
- 16) N.Nimura and T.Kinoshita, o-Phthalaldehyde-N-acetyl-L-cysteine as a chiral derivatization reagent for liquid chromatographic optical resolution of amino acid enantiomers and its application to conventional amino acid analysis, *J.Chromatogr.*, 352, p169 (1986)
- 17) 島津アミノ酸分析システム・応用データ集, C190-0033A, 島津製作所
- 18) 小林龍二, G.E.Tarr, 蛋白質・核酸・酵素 (共立出版), 17, p991 (1986)
- 19) 網沢 進, 崎山文夫, 今井一洋, 萩原健一, 中嶋暉躬, 平野 久, 池中徳治, 長谷純宏, 妻鹿友弘, 組成分析と末端分析, 続生化学実験講座2, タンパク質の化学 (上), 今堀和友, 崎山文夫, 鈴木絃一編, 東京化学同人, p187 (1985)
- 20) 網沢 進, 崎山文夫, タンパク質構成成分の定量分析, 生物化学実験のてびき2, 泉 美治, 中川八郎, 三輪谷俊夫編, 化学同人, p50 (1985)
- 21) 大槻耕三, 奥野 忍, 谷田恭子, 佐藤健司, 中村考志, 抹茶の総アミノ酸および遊離アミノ酸のHPLC-Aミノ酸分析機による分析, 京都府大・学術報告, 人環・農, 第50号p27 (1998)
- 22) 大槻耕三, 久保山晶子, 遠藤英子, 佐藤健司, 中村考志, 麴納豆 (塩納豆, 浜納豆, 大徳寺納豆) に含まれる総アミノ酸および遊離アミノ酸の分析, 京都府大・学術報告, 人環・農, 第52号p1 (2000)
- 23) 大槻耕三, 河端 信, 田口邦子, 鶏卵フラボプロテインのアガロースゲル (セファロース4B) への固定化, 京都府大・学術報告, 第28号p31 (1977)
- 24) 大槻耕三, 河端 信, 田口邦子, ショウガ・プロテアーゼの精製と安定化, 京都府大・学術報告, 第40号p19 (1989)
- 25) 小路庸子, 大槻耕三, 佐藤健司, 河端 信, ショウガ根茎プロテアーゼの分離精製とその性質, *農化誌*, 70, p150 (1996)
- 26) K.Ohtsuki, K.Taguchi, K.Sato, M.Kawabata, Purification of ginger proteases by DEAE-Sepharose and isoelectric focusing, *Biochim.Biophys.Acta*, 1243, p181(1995)
- 27) S.Hirose, M.Naruse, K.Ohtsuki, T.Inagami, Totally

- inactive renin zymogen and different forms of active renin in hog brain tissues, *J.Biol.Chem.*, 256, p5572 (1981)
- 28) T.Inagami, H.Okamoto, K.Ohtsuki, K.Shimamoto, J.Chaos, H.S.Margolius, Human plasma inactive renin; purification and activation by proteases, *J.Clin. Endocrinol. Metab.*, 55 p619 (1982)
- 29) T.Inagaki, K.Ohtsuki, T.Inagami, Mouse submaxillary renin has a protease activity and converts human plasma inactive prorenin to an active form, *J.Biol. Chem.*, 48, p7476 (1983)
- 30) 大槻耕三, 河端 信, 田口邦子, 納豆菌の菌対外セルラーゼおよびキシラナーゼ, 京都府大・学術報告, 第27号p21 (1976)
- 31) 大槻耕三, 三宅智恵子, 佐藤健司, 河端 信, キーウィフルーツプロテアーゼの分離精製 (新しいイオン交換充填剤 ベーカーボンドWP-PEIによる分離), 京都府大・学術報告, 第44号p37 (1993)
- 32) S.Sugiyama, K.Ohtsuki, K.Sato, M.Kawabata, Purification and characterization of six kiwifruit proteases isolated with two ion-exchange resins, Toyoparl-Super Q, and Bakerbond WP-PEI, *Biosci.Biotechnol. and Biochem.*, 60, p1994 (1996)
- 33) S.Sugiyama, K.Ohtsuki, K.Sato, M.Kawabata, Enzymatic properties, substrate specificities and pH-activity profiles of two kiwifruit proteases, *J.Nutr. Sci.Vitaminol.*, 43, p581 (1997)
- 34) 大槻耕三, 江角尚子, 伊藤由香里, 中村考志, 佐藤健司, ショウガ根茎アミノペプチダーゼの精製とその性質, *農化誌*, 72, p152 (1998)
- 35) 大槻耕三, 高橋典果, 廣瀬香絵, 中村考志, 佐藤健司, ショウガ根茎アミノペプチダーゼの性質, *農化誌*, 74, p243 (2000)
- 36) 大槻耕三, 佐藤健司, 中村考志, 生姜アミノペプチダーゼのペプチド性食品に対する利用, 浦上財団報告書 (浦上食品・食文化振興財団), Vol.8, p1~9 (2000年11月)
- 37) 大槻耕三, 佐藤健司, 中村考志, 麴納豆に含まれるフィターゼとフィチン酸およびCaの利用効率の改良, 平成10~12年度文部省科学研究費補助金研究成果報告書, 基盤研究C(2) (2001年3月)
- 38) 大槻耕三, 佐藤健司, 中村考志, 麴納豆に含まれるフィターゼの利用, 大豆たん白質研究 (不二たん白質研究振興財団), Vol.4, P33 (2001年10月)
- 39) 大槻耕三, 玄米パンに含まれるフィチン酸の麴フィターゼによる除去と微量ミネラル栄養の改良, 平成13年度報告書, p195, 14年度報告書, p212 (エリザベス・アーノルド富士財団) (2002年7月, 2003年7月)
- 40) 大槻耕三, 河端 信, 田口邦子, キーウィフルーツに含まれる糖の分析, 京都府大・学術報告, 第35号 p21 (1984)
- 41) 大槻耕三, 抹茶の化学, p83~p105 「茶の湯と科学」堀内国彦編, 茶道学大系第8巻 千 宗室監修, 淡交社 (2000)