

## 食肉由来機能性成分の畜種別差異の比較検討についてⅡ

Functional Components Sourced from Bovine, Porcine and Poultry :  
Comparative Study on Bioactive Peptides. Ⅱ

久保田大樹・河原 聡・六車三治男

(宮崎大学農学部)

Daiki Kubota, Satoshi Kawahara and Michio Muguruma

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

This research aimed to compare the biological and functional properties as well as physiological effects of beef, pork and chicken protein hydrolysates. Last year, we examined the antihypertensive effects by determining the  $IC_{50}$  value of the three mentioned species. This year, we aimed to check the antioxidative properties.

In the current study, we evaluated the antioxidative activity of hydrolysates of biceps femoris muscles from beef, pork and chicken. All the muscles separately hydrolyzed with pepsin and trypsin and then determined their antioxidative efficiency. The antioxidative activity of the hydrolysates was determined by the DPPH radical scavenging assay and the ORAC antioxidant assay. Meat hydrolysates showed the antioxidant activity ( $40\mu\text{M}$  Trolox equivalents (TE) /mg protein) by the DPPH radical scavenging assay. Meat hydrolysates also showed the high antioxidant activity ( $750\mu\text{M}$  TE/mg protein) by the ORAC antioxidant assay. Antioxidative activity increased with increasing meat hydrolysates concentrations. No significant differences in various edible meat peptides were detected by the DPPH radical scavenging assay and the ORAC antioxidant assay. However, there are differences in the other factors for giving the antioxidative activity including amino acid sequence of those hydrolysates. For instance, Cys shows strong antioxidant activity that is considered to be specific for electron transfer reaction. On the other hand, though Trp also has also been showing a strong activity, as it indicates only for transferring atom of hydrogen during its reactions. Beef and pork peptides may show antioxidant activity in specific manner that are influenced by His and Trp. Antioxidant activity of chicken peptides are small and far from other meat peptides especially when compared to beef and pork. In ORAC evaluation, Trp pattern similar to Trp in chicken one, in which we hypothesize that Trp may be very important amino acid that determine whether peptides is effective as antioxidative or not.

We conclude that meat in the three species contain peptides that may serve several purposes. Based on its remarkable antioxidative activity, we suggest that the functional peptides from meat hydrolysates may have potential applications as functional food, which could be used as sources of natural antioxidants for foods.

## 1. 目的

畜産食品の消費量は約半世紀の間に急増したが、これは我が国が長寿国になった一つの理由とも考えられる。一方、日本人のライフスタイルの変化に伴い、生活習慣病の患者が増加しており、国民の健康への関心は極めて高くなっている。そこで昨年度は、我が国の死亡原因の2～3位を占める心疾患、脳血管疾患の原因と深くかかわっている高血圧症の予防効果に及ぼす各種食肉ペプチドに焦点を当て比較検討した<sup>1)</sup>。

1981年以降、日本人の死因第一位になり、その増加が続いている現状を背景としてがん予防に関する早期研究が求められている<sup>2)</sup>。がんは様々な要因が複合的に働いた結果引き起こされる。このような危険因子の中で特に注目すべき物質は活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species) と呼ばれる悪性の酸素である。ROSは酸素が紫外線や環境中の様々な要因により化学変化を起こして生じる。通常、酸素はO<sub>2</sub>だが特殊な環境中では一重項酸素O<sub>2</sub><sup>-</sup>やペルオキシラジカルLOO<sup>-</sup>のように変化する。このように酸素は様々なROSへと変化し、細胞、DNA、タンパク質、脂質等に影響を与え、動脈硬化や心筋梗塞等を引き起こすと共に細胞のがん化が促進されると考えられている。また食品中の成分にもこのようなROSを消去する能力 (抗酸化能) があるとされている。これまでにポリフェノール、ビタミンE、グルタチオン、カルノシンなど様々な物質で抗酸化活性に関する報告がなされている<sup>3, 4)</sup>。従って食品成分の摂取で、日頃からROSを消去していくことは非常に効果的であると考えられる。またタンパク質を分解して生じるペプチドにも抗酸化活性を有するものがあるとされている。

食肉は良質なタンパク質を豊富に含み、近年、血圧降下作用などの保健的効果についての研究が

進められている<sup>5-13)</sup>。

抗酸化活性の測定には原理の違いにより、DPPH法、ORAC法、SOD様活性法、β-カロテン法、金属キレート活性法など多様な評価方法がある。現在主流になりつつあるのがORAC法とDPPH法である。特にORAC法は食品の抗酸化活性を評価するのに最も適した方法であると考えられ、米国を中心として世界的に統一されつつある評価方法である。ORAC法は2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) から誘導されるペルオキシラジカルにより蛍光プローブが分解されて蛍光を失う過程の抑制を評価することで抗酸化活性を測定する方法である。つまり抗酸化活性の持続能を評価できることがORAC法の特徴でもある。さらに生体に近い条件で測定できる事、そして親水性、親油性物質いずれの抗酸化物質も評価できる点が抗酸化活性測定法の標準として統一されつつある理由として考えられている。一方、DPPH法とは比較的安定な有機ラジカルであるDPPHラジカルを用い、520nmに吸収極大を有する紫色のDPPHラジカルが還元されて退色する性質を利用して試料の抗酸化活性を評価する方法である。操作が非常に簡単である事が長所であるが、生体に無いラジカルを使用していることが欠点である。ORAC法とDPPH法は原理が異なる。ORAC法は水素供与 (HAT: hydrogen atom transfer) 反応に基づく測定方法であり、DPPH法は電子供与 (ET: electron transfer) 反応に基づく測定方法である<sup>14, 15)</sup>。

現在、抗酸化ペプチドに関する詳細な研究はほとんど行われていない。例えば現在、ペプチドが抗酸化力を示す要因としてペプチドの「アミノ酸組成」および「構造」の違いが考えられているが、どちらの要因がどれだけ抗酸化活性に寄与しているのかなど基本的な考えさえも提唱されていない。

そこで本研究では、タンパク質を豊富に含む食肉を題材とし、ペプシン・トリプシン・パンクレアチンによる酵素分解で生じるペプチド混合物を調製する。さらにORAC法とDPPH法に焦点を絞り、食肉由来ペプチドの抗酸化力を評価する。またペプチドを構成する20種類のアミノ酸の抗酸化活性を測定し、食肉由来ペプチドが抗酸化活性を示す要因について考察していく。この研究により抗酸化ペプチドおよび食品化学の基礎的知見を与え、新規食品素材の開発・発展に貢献していくことが本研究の目的である。

## 2. 方 法

### 2.1 実験材料

市販の宮崎県産の各種食肉（牛肉・豚肉・鶏肉いずれもモモ肉）を実験材料に用いた。

### 2.2 食肉由来ペプチドの調製

食肉由来ペプチドの調製は以下のとおりである。各種食肉のミンチ肉に2倍量の蒸留水を添加してフードプロセッサー（Panasonic MK-K48）を用いて30秒間、2回ホモジナイズした。70℃で30分間インキュベート後、このホモジェネートを酵素未処理の加熱食肉タンパク質サンプル「Whole」とした。その後、このホモジェネートをHClでpH1.8に調整し、胃粘膜由来ペプシン（1：10000）（和光純薬工業株式会社製）をタンパク質量（食肉重量当たり20%のタンパク質が含まれることを仮定した）に対して1/1000倍量添加し、攪拌しながら37℃で2時間インキュベートした。NaOHを用いてpH6.8に調整し、10分間煮沸した後、溶液温度を40℃まで低下させた。この溶液をペプシン消化サンプル「ペプシン（2h）」とした。さらにトリプシン（和光純薬工業株式会社）およびパンクレアチン（同会社）をそれぞれペプシンと同量添加し、再び攪拌しながら37℃で2時間インキュベートした。最後に10分間煮沸した試

料を食肉由来ペプチドとした。この溶液をペプシン・トリプシン処理サンプル「ペプシン／トリプシン（4h）」とした。

なお、加熱食肉タンパク質「Whole」および各反応段階で得られた酵素消化により生じたペプチド混合物を0.45 $\mu$ mセルロースアセテートメンブレンフィルター（アドバンテック東洋（株））にてろ過した試料を実験に供した。

### 2.3 タンパク質の定量

酵素未処理の食肉タンパク質「Whole」の定量はBiuret法<sup>16)</sup>により行った。すなわち、タンパク質溶液に対し、4倍量のBiuret試薬を加えて常温で30分間反応させた。反応液をSHIMADZU（日本）製UV-VIS Spectrophotometer 1245型分光光度計（吸光度：540nm）にて測定した。また分解物であるペプチドについてはUV法<sup>17)</sup>を適用し、測定を行った。すなわちタンパク質溶液の215nmの吸光度から225nmでの吸光度を差し引き、144倍した時の数値をタンパク質濃度とした。測定には上記と同じ分光光度計を使用した。

### 2.4 DPPHラジカル消去活性の測定

DPPHラジカル消去活性の測定は、DPPH分光測定法に準じて行った<sup>18)</sup>。すなわち、400 $\mu$ M DPPH, MES (2-morpholino-ethanesulphonic acid) buffer, 20%エタノールを同量ずつ加え、混液を作製した。混液を0.9ml分注し、80%エタノールを240 $\mu$ lとサンプルを60 $\mu$ l加え、20分間反応させた。その後、サンプルを加えた順に前述の分光光度計にて吸光度520nmで測定した。また、サンプルの代わりに、0.2mM Trolox (Sigma社製) を使って標準として測定し、検量線からサンプルのTrolox相当量を算出した。MES BufferはMESを蒸留水に溶解し、NaOHでpH 6に調整したものを使用した。

### 2.5 ORAC法による抗酸化活性の測定

（独）農研機構九州沖縄農業研究センターの報

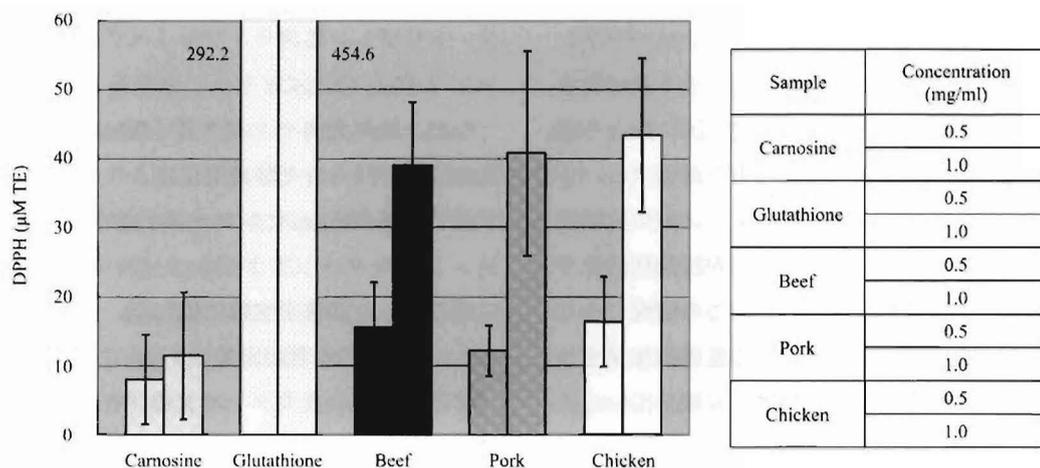


Fig. 1 Dual axis graph shows the value of DPPH radical scavenging activity of beef, pork and chicken hydrolysates. TE, Trolox Equivalent.

告をもとに改良して測定した<sup>19-22)</sup>。すなわち96wellマイクロプレートに81.6nMフルオレセインを200 $\mu$ l, サンプル20 $\mu$ lを添加し, マイクロプレートリーダー (TECAN GENios Multifunction Fluorescence Virginia, USA) にて37 $^{\circ}$ Cで励起波長485nm, 蛍光波長520nmにおける蛍光強度を測定した。10分後200mM AAPH 75 $\mu$ lを添加し, 同条件にて2分間隔で45回測定した。またORAC値は Net AUC (Area Under Curve) = AUC sample-AUC blankを用いて算出した。検量線作成にはTrolox (125, 250, 500, 1000 $\mu$ M)を使用した。

### 2.6 遊離アミノ酸分析

分析試料1gに対して3倍量の3%スルホサリチル酸を加え, 冷蔵庫で1時間静置してタンパク質を沈殿させた。その後, 3000rpmで15分間遠心分離を行った。上清をフィルター (Cellulose Acetate 0.45 $\mu$ m) でろ過し分析試料とした。これをアミノ酸自動分析機 (JIC-500) で分析した。

## 3. 結果と考察

各種食肉酵素分解物のタンパク質の分子量分布

については平成21年度報告書に掲載したとおりである<sup>1)</sup>。すなわちSDS-PAGEによるサンプル全体のタンパク質の分子量分布およびゲルろ過HPLCによる食肉タンパク質の経時的変化の観察と分子量分布の測定を行った。SDS-PAGEによって, 酵素処理時間に伴い, 各種食肉タンパク質の分解が進行したことが認められた。またHPLCの結果より分子量20,000Da以上の食肉タンパク質は6,000Da以下に分解されることが明らかとなった。

### 3.1 食肉由来ペプチドのDPPHラジカル消去活性およびORAC法による測定比較検討

抗酸化活性の評価に用いるタンパク質濃度の検討を行った。ゲルろ過HPLCカラムであるTSK-Gel G2000SW<sub>XL</sub>を用いて食肉ペプチド混合物に含まれるペプチドがすべて安定的に検出されるには0.1mg/ml以上が必要であることが明らかになった。従って本研究では主に0.5および1.0mg/mlの食肉ペプチドを抗酸化活性の評価に供与した。なお, 標準物質には抗酸化ペプチドとして知られているヒスチジン含有ペプチドのカルノシンおよびシステイン含有ペプチドのグルタチオンを用いた。

Fig. 1に各種食肉由来ペプチドおよび標準物質

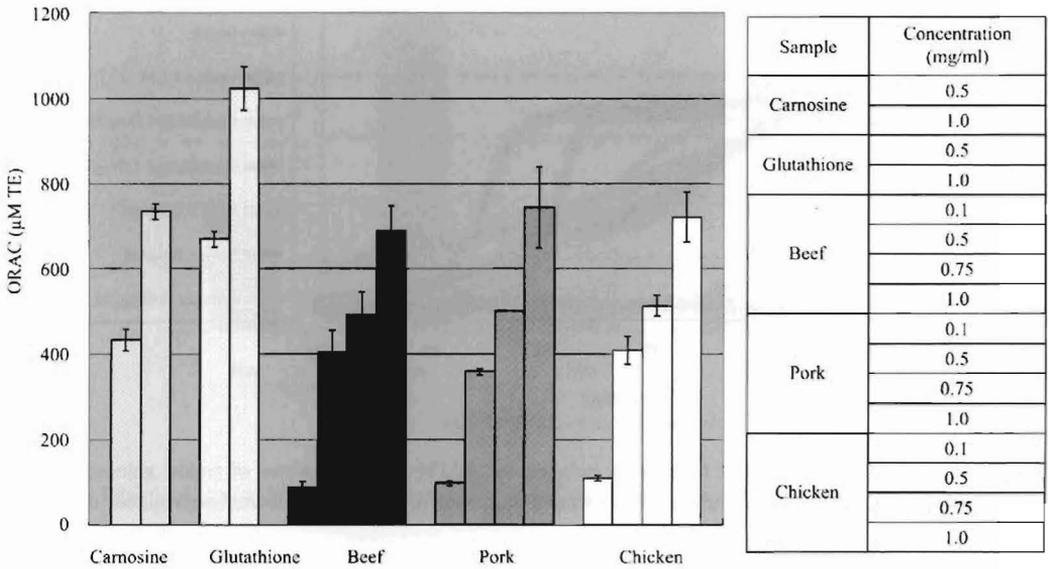


Fig. 2 - a Dual axis graph shows the value of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of beef, pork and chicken hydrolysates. TE, Trolox Equivalent.

のDPPHラジカル消去活性を示した。TEとは既知の抗酸化物質であるトロロックス相当量 (Trolox Equivalent) の略である。各種食肉間では1.0mg/ml濃度でおよそ40μM TEを示し、有意差は生じなかった。またカルノシンは痕跡程度の活性しか示さず、グルタチオンはDPPHの紫色が確認できないほど強力な抗酸化活性を示した。

この結果は柳内らの報告と一致した<sup>29)</sup>。これはグルタチオンが電子供与反応に基づく抗酸化力を有している証拠である。また食肉ペプチドがカルノシンよりも高い活性を示した理由としては、種々のペプチドによる相乗効果であると推測された。

Fig. 2 - a に各種食肉由来ペプチドおよび標準物質のORAC法により測定した結果を示した。カルノシン・グルタチオン共に0.5および1.0mg/mlを試験に供した。また食肉由来ペプチドは0.1, 0.5, 0.75および1.0mg/mlを試験に供した。どのサンプルも濃度上昇に伴い有意にORAC値が上昇

した。これはORAC法がDPPH法よりも非常に感度の高い評価系であることが理由として考えられる。また各種食肉間でORAC値の有意差は認められなかったが、食肉ペプチドは同濃度のカルノシンと近似したORAC値を示したことがわかる。またDPPH法と同様にORAC法でもグルタチオンは他のサンプルよりも高い活性を示した。

次に、ORAC法を用いて1.0mg/mlにおける抗酸化力持続能を調査した (Fig. 2 - b)。トロロックスとグルタチオンが似た性質、つまり、一定時間フルオレセインの分解を100%阻害し、ある時点から急激に抗酸化力が失われるパターンを持つことがわかった。一方、カルノシンや食肉由来ペプチドは徐々に活性を失っていくパターンを有していた。

Fig. 3 にORAC値およびDPPH値の相関関係を示した。食肉ペプチド間では相関係数  $r = 0.9905$ ,  $ORAC \text{ 値} = 12.375 \times DPPH \text{ 値} + 209.69$  となり、非常に高い相関関係を示した。一方、カルノシンと

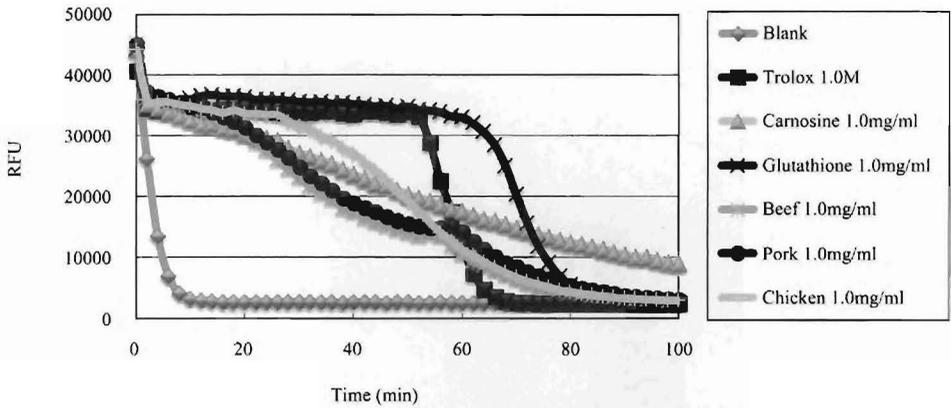


Fig. 2-b Fluorescence decay curves of fluorescein induced by AAPH in the presence of trolox, calnosine, glutathione and meat hydrolysates. RFU, relative fluorescence unit; AAPH, 2, 2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride.

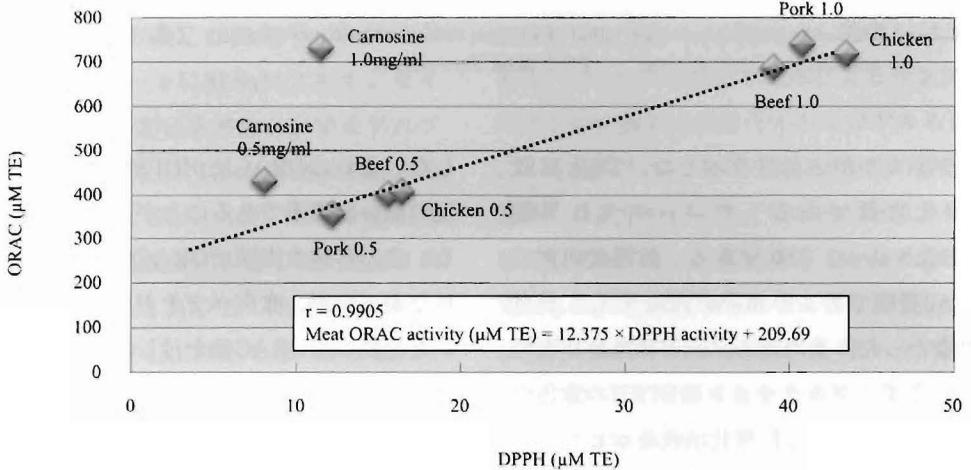


Fig. 3 Relationship between ORAC activity and DPPH activity. TE, Trolox Equivalent.

食肉ペプチドの間には相関関係は見られなかった。一般にORAC値はDPPH値よりも高い値を示す傾向があることが知られている<sup>14, 15)</sup>。本研究の結果もこの報告と一致した。ORAC値がDPPH値よりも高い値を示す理由は解明されていないが、本研究を進める過程でORAC法は食肉ペプチドが $1.0 \times 10^{-3}$  mg/ml以下でも測定可能なほど高感度であった事を確認した。従ってORAC値>DPPH値となる可能性が非常に高いと考えられた。

このようにペプチドが抗酸化活性を示す要因は何か。その要因の一つにはペプチドを構成するアミノ酸の種類が考えられる。そこで、次にアミノ酸の抗酸化活性について詳細に調査した。

### 3.2 アミノ酸の抗酸化活性

まず個々のアミノ酸単独の抗酸化活性をDPPH法により調査した。現在、抗酸化アミノ酸としてはヒスチジン (His)、システイン (Cys)、チロシン (Tyr) などが知られているが、どのアミノ

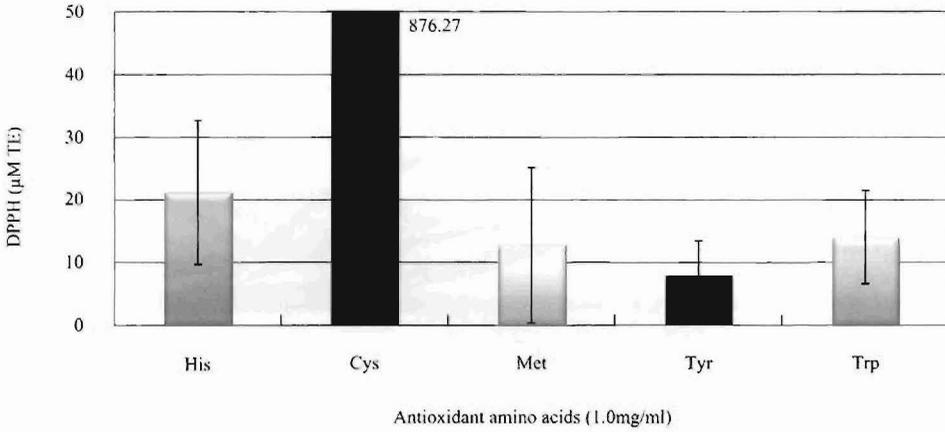


Fig. 4 - a Effects of antioxidant amino acids on DPPH radical scavending activity. TE, Trolox Equivalent.

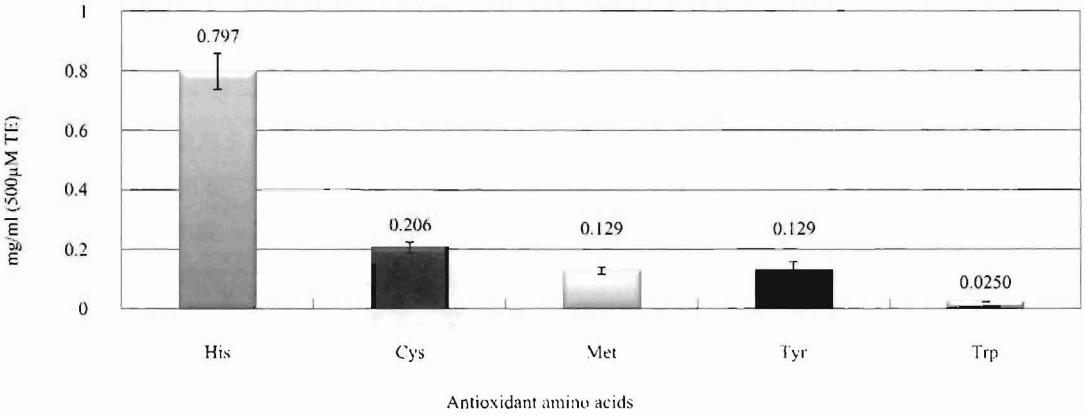


Fig. 4 - b Effects of antioxidant amino acids on ORAC activity. Vertical value showed the concentration that indicates 500μM TE. TE, Trolox Equivalent.

酸がどのような性質の抗酸化活性を示すかは明らかにされていない。Fig. 4 - a に供与濃度1.0mg/mlでDPPHラジカル消去活性を発現したアミノ酸を示した。His、メチオニン (Met)、Tyr、トリプトファン (Trp) はORAC値を示したためFig. 4 - aにも掲載したが、それらのDPPH活性は痕跡程度であった。従って明瞭な電子供与反応による抗酸化能を示したアミノ酸はCysだけであった。すなわち食肉由来ペプチドの電子供与反応活性はCys含有量に大きく左右されることが示唆さ

れた。

Fig. 4 - bにORAC法にて評価したアミノ酸の抗酸化活性の結果を示した。また評価方法として500μM トロロックス相当量を示すときのアミノ酸濃度 (mg/ml) を用いた。アミノ酸の抗酸化力はTrp>Tyr≒Cys>Hisの順に高い値を示した。特にTrpは他のアミノ酸よりも非常に強い活性を示した。従ってTrpは微量でも抗酸化活性に大きな役割を果たすことが示唆された。

Fig. 4 - c はアミノ酸の抗酸化持続能をORAC法

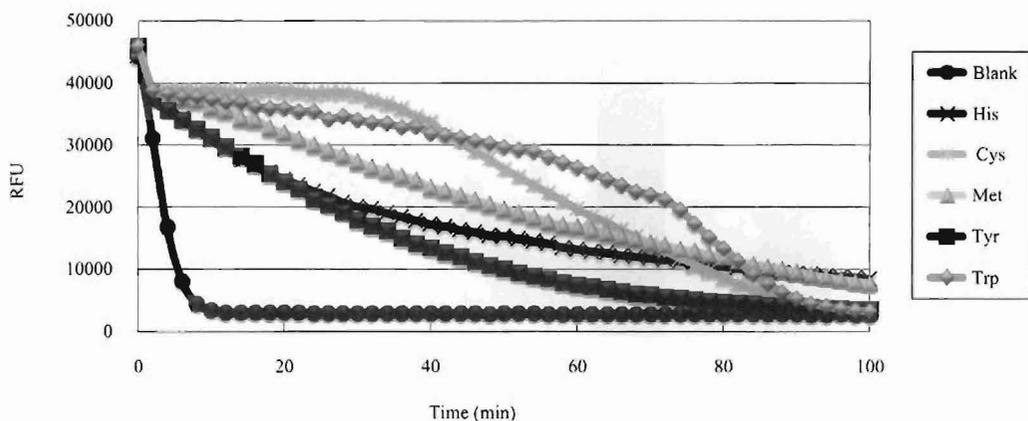


Fig. 4-c Fluorescence decay curves of fluorescein induced by AAPH in the presence of antioxidant amino acids. RFU, relative fluorescence unit; AAPH, 2, 2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride.

にて解析した結果である。また各アミノ酸濃度は一律でなく、同実験系に収まる濃度に設定した。この結果から抗酸化力には2つのパターンが存在することが示唆された。それらを1. 電子供与(ET)型, 2. 水素供与(HAT)型と名付けた。ET型とはここではCys, グルタチオン, トロロックスのようにDPPHラジカル消去活性が高く、一定時間フルオレセインの分解を100%阻害し、ある時点から急激に活性が低下するパターンを持つ物質のことをいう。HAT型とはHis, Met, Tyr, カルノシンなどを指し、経時的にフルオレセインが分解されていくパターンを持つ物質のことである。このように個々のアミノ酸やペプチドには特有の抗酸化活性を持つことが明らかになった。そこでアミノ酸やペプチドの持つこのような性質は食肉ペプチドの抗酸化活性にどのような影響を及ぼしているのか調査した。

### 3.3 各種食肉由来ペプチドとアミノ酸の抗酸化活性の関係

各種食肉由来ペプチドとアミノ酸の抗酸化活性の関係を示した (Fig. 5)。ここで注目すべき点は、牛肉・豚肉ペプチドと鶏肉ペプチドの違いである。牛・豚肉はHisに近い曲線を描いた。つま

り2段階のなだらかなカーブを持ち、フルオレセインが経時的に分解されるパターンを示した。また鶏肉はTrpの描くカーブと非常に近似していた。Trpは微量でも大きな抗酸化活性を示すアミノ酸である。従って牛・豚肉ペプチドはTrpやHisなどの影響が大きく、鶏肉はTrpの影響をそのまま反映した抗酸化力であることが示唆された。従って次にHisやTrpなど抗酸化アミノ酸の定量が必要であると考えられた。そこで各種食肉にどのようなアミノ酸が含まれているのか、特に抗酸化アミノ酸に注目して定量した結果をTable 1に示した。すでに報告はあるが、牛肉および豚肉は非常に類似したアミノ酸組成を持つ。しかし鶏肉は牛肉や豚肉と比較してカルノシンやアンセリンの含有量が異なる点が特徴である<sup>21)</sup>。データには示してはいないがアンセリンはカルノシンと同等のDPPH値およびORAC値を示すHis含有抗酸化ペプチドである。このように鶏肉は他の2種と比較してHis含有量が少なく、わずかなTrpを多く含む。しかし既述の通り、わずかなTrp量が抗酸化活性に影響を与えたと考えられる。従ってTrp含有量はペプチドの抗酸化力を大きく左右するアミノ酸であるといえる。

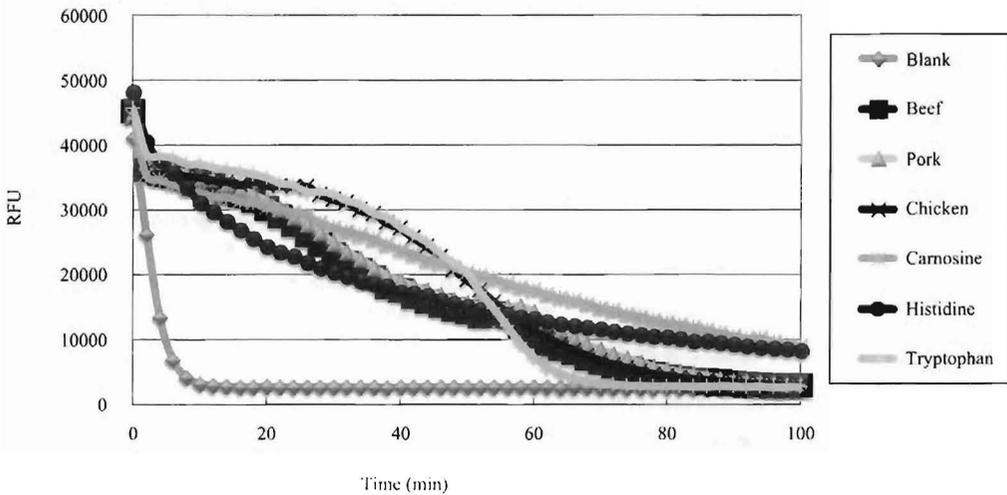


Fig. 5 Fluorescence decay curves of fluorescein induced by AAPH in the presence of meat peptides, carnosine, histidine and tryptophan. RFU, relative fluorescence unit; AAPH, 2, 2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride.

Table 1 The amounts of antioxidant amino acids, carnosine and anserine in beef, pork and chicken.

Antioxidant amino acids and peptides	Unit (mg/100g)		
	Beef	Pork	Chicken
His	2.15	1.48	4.74
Cys	0.19	0.21	N.D
Met	3.57	2.47	4.23
Tyr	10.79	10.15	12.49
Trp	8.39	7.34	9.17
Carnosine	208.31	243.80	44.26
Anserine	49.85	32.14	123.37

以上の結果から、食肉酵素分解物の抗酸化活性を評価した結果、単純に活性値を比較しただけでは各種食肉間に有意差は認められなかった。しかし、構成アミノ酸に注目して研究を進めた場合、牛肉・豚肉と鶏肉では抗酸化活性の性質が異なることが示された。また特にペプチドの抗酸化活性を左右する重要なアミノ酸は高い電子供与 (ET) 活性を示すCys、および高い水素供与 (HAT) 活性を示すTrpであることが示唆された。

一般にペプチドは多様な機構によって抗酸化活

性を発現しており、その活用においては個々のペプチドに適した使用条件の設定が必要である。そのため単一のペプチドよりは、タンパク質分解物の方がより多様な活性酸素種に対応できると考えられる<sup>25)</sup>。従ってタンパク質酵素分解物の抗酸化活性評価を行うことは重要な研究となってくるだろう。

そこで我々は今後もタンパク質酵素分解ペプチド混合物の抗酸化活性評価や抗酸化ペプチドの基礎的研究を行っていく。例えば、ペプチドが抗酸化活性を発現する要因である「アミノ酸組成」および「立体構造」のどちらが重要であるのか、調査していく必要がある。またそれら要因の抗酸化活性への寄与度を具体的に数値化し、食肉由来ペプチド等の抗酸化活性発現作用を明確にしていく必要がある。

#### 4. 要 約

本研究では、ORAC法とDPPH法に焦点を絞り、食肉由来ペプチドの抗酸化力を評価した。またペプチドを構成する20種類のアミノ酸の抗酸化活

を測定し、食肉由来ペプチドが抗酸化活性を示す要因についても考察した。

DPPH法にて調査した結果、各種食肉間ではタンパク質濃度1.0mg/mlでおよそ40 $\mu$ M トロロックス相当量の抗酸化活性を示したが、畜種間の活性に有意差は認められなかった。なお、食肉酵素分解物の添加濃度依存的に抗酸化活性は増加した。カルノシンは痕跡程度の活性しか示さず、グルタチオンはDPPHの紫色が確認できなくなるほど強力な抗酸化活性を示した。これはグルタチオンが電子供与反応に基づく抗酸化力を有している証拠であると考えられた。また食肉ペプチドがカルノシンよりも高い活性を示した理由としては、食肉が有する様々なペプチドによる相乗効果であると推測された。ORAC法にて測定した結果、各種食肉共に非常に高い抗酸化活性を有することが確認された。各種食肉間でそれらの値に有意差は認められなかったが、同濃度のカルノシンと近似した値が得られた。このように単純に活性値を比較しただけでは各種食肉間に有意差は認められなかったが、食肉を構成するアミノ酸に注目し、ORAC法による抗酸化活性の経時変化を見ると、牛肉および豚肉と鶏肉では抗酸化活性を左右するアミノ酸が異なることが明らかになった。特に重要なアミノ酸は高い電子供与活性を示すCys、高い水素供与活性を示すTrpであることが示唆された。

我々は今後も、抗酸化ペプチドの基礎的研究を行っていく。次なるステップとしてペプチドの「アミノ酸組成」および「構造」どちらが重要であるのか調査することにより、食肉由来ペプチドの抗酸化活性発現作用を明確にする必要がある。

## 文 献

- 久保田 大樹, アブドラティフ アーメド, 河原 聡, 六車 三治男:平成21年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, (財)伊藤記念財団, 28, 1~9, 2010.
- 日本生活習慣病予防協会データ: <http://www.seikatsusyukanbyo.com/>, 2009.
- 美濃 眞:がんの予防, 美濃 眞・糸川嘉則・小林 正 編, 学会センター関西, 15~37, 1997.
- 豊國伸哉:酸化ストレス・レドックスの生化学, 淀井淳司・谷口直之 編, 共立出版, 176~182, 2000.
- 在原圭三:最新畜産物利用学, 齊藤忠夫, 西村敏英, 松田 幹 編, 朝倉書店, 122~124, 2007.
- Katayama, K., Fuchu, H., Sakata, A., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *Asian-Aust. Anim. Sci. J.*, **16**, 417~424, 2003.
- Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *Anim. Sci. J.*, **74**, 53~58, 2003.
- Katayama, K., Tomatsu, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 771~775, 2004.
- Katayama, K., Jamhari, Mori, T., Kawahara, S., Miake, K., Kodama, Y., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Nakayama, M., Mayuyama, M., Muguruma, M.: *J. Food Sci.*, **72**, S702~S706, 2007.
- Katayama, K., Anggraeni, H.E., Mori, T., Ahhmed, A.M., Kawahara, S., Sugiyama, M., Nakashima, T., Mayuyama, M., Muguruma, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 355~360, 2008.
- Muguruma, M., Ahhmed, A.M., Katayama, K., Kawahara, S., Maruyama, M., Nakamura, T.: *Food Chem.*, **114**, 516~522, 2009.
- Ahhmed, A. M., Muguruma, M.: *Meat Sci.*, **86**, 110~118, 2010.
- Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, T., Itou, M.: *Meat Sci.*, **57**, 319~324, 2001.
- 渡辺 純, 沖 智之, 竹林 純, 山崎光司, 津志田 藤二郎:化学と生物, 日本農芸化学会誌, **47** (4), 237~243, 2009.
- 津志田 藤二郎:食品と開発, UBMメディア, **45** (6), 4~6, 2010.
- 奥村宣明:タンパク質実験ノート, 抽出と分離精製, 岡田雅人・宮崎 香 編, 羊土社, 27~31, 1996.
- Murphy J.B, Kies, M.W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 382~384, 1960.
- 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一:食品機能研究法, 光琳, 218~220, 2000.
- 沖 智之, 竹林 純, 山崎 光司:食品機能マニュアル集 第II集, (社)日本食品科学工学会, 79~86, 2008.
- Huang, D., Ou, B., Hmpsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Prior, R.L.: *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4437~4444, 2002.
- Garcia-Macias, P., Ordidge, M., Vysini, E., Waroonphan, S., Battey, N.H., Gordon, M.H., Hadley, P., John, P., Lovegrove, J.A., Wagstaffe, A.: *J. Agric.*

- Food Chem.*, **55**, 10168~10172, 2007.
- 22) Bao, L., Yao, X-S., Tsi, D., Yau, C-C., Chia, C-S., Nagai, H., Kurihara, H. : *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 420~425, 2008.
- 23) 西村敏英：脳内老化制御とバイオマーカー，基礎研究と食品素材，大沢俊彦・丸山和佳子 監，ジーエムシー出版，170~183, 2004.
- 24) 646食品成分表，646食品成分表編集委員会，一橋出版，160, 2004.
- 25) 村本光二，陳華敏：機能性ペプチドの最新応用技術，有原圭三 監，ジーエムシー出版，69~77, 2009.