

担子菌の発酵能による機能性大豆食品の開発

福田 祥子, 松井 徳光, 立花 宏美, 友田 智美, 大杉 匡弘
(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

Development of Functional Soybean Foods Produced by Fermentation with Mushroom mycelia

Shoko FUKUDA, Tokumitsu MATSUI, Hiromi TACHIBANA,
Tomomi TOMODA, and Masahiro OHSUGI

Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,

Mukogawa Women's University, 6-46 Ikebiraki-cho Nishinomiya, Hyogo, 663-8558, Japan

We evaluated the physiological activity of soybean fermented with mushroom mycelia. Without heating, fibrinolytic activity was observed in *Schizophyllum commune* (1418mm²), *Pleurotus cornucopiae* (1635mm²), *Hericium ramosum* (1608mm²) and NAPA (*Ganodermataceae* produced in Thailand) (1284mm²). The cell-free crude extract from *Schizophyllum commune* (563mm²) and *Pleurotus cornucopiae* (369mm²) showed the fibrinolytic activity. Concerning the antithrombin activity, the thrombin clotting time was more than 600 seconds for *Coriolus versicolor*, *Pleurotus cornucopiae*, *Lenzites betulina*, *Wolfiporia cocos*, *Schizophyllum commune*, NAPA, *Hericium erinaceum*, *Wynnea gigantea*, *Ramaria botrytis*, *Cordyceps militaris*, *Hericium ramosum* and *Stropharia rugosoannulata*. Even after heating, *Wolfiporia cocos* and *Macrolepiota procera* showed the clotting time of more than 600 seconds. Compared with the blank (soybeans before fermentation), the total amino acid level increased to 38-fold for *Schizophyllum commune* and *Pleurotus cornucopiae*, to 20-fold for *Hericium ramosum* and to 15-fold for NAPA. In addition, the possible conversion from the glycoside type of isoflavone to the aglycon type was suggested.

緒言

大豆は食品素材だけではなく、味噌、納豆、醤油など日本の伝統的な発酵食品として利用されており、近年、日本では大豆食品がブームとなっている。大豆の成分は、良質のタンパク質、脂質、食物繊維、リノール酸、大豆オリゴ糖、サポニン、レシチン、イソフラボンなどの有効成分が含まれている。これらの有効成分は生活習慣病をはじめ、脳卒中や心臓

性疾患などの予防効果があると報告されている。特に、イソフラボンは女性ホルモンと似た働きを持ち女性の美しさや若々しさに必要不可欠とされ、更年期障害の緩和¹⁾や骨粗鬆症予防²⁾に効果がある。また、女性特有の乳がんや子宮がんの抑制³⁾、男性の場合では、前立腺がんの抑制が期待される⁴⁾。さらにコレステロール低下、心疾患予防効果が期待できると報告されている⁵⁾。一方、担子菌は免疫賦活作用、抗がん作用、抗血栓症作用、抗コレステロール

作用, 抗酸化作用などの疾病予防に有効な作用がある。また, 食物繊維を多く含んでいることから便秘や肥満を解消するなどの作用を有する薬用効果が期待される機能性食品として注目されている。そこで本研究では, 栄養価の高い食品素材である大豆を材料として担子菌で発酵させ, 実用化に際して製造法が簡便で, さらに疾病予防に効果を示す機能性がある大豆食品の開発を目的として, 発酵大豆食品の製造を行い, その生理活性について調べたので報告する。

材料および実験方法

1. 供試菌株

実験に用いた担子菌は, NBRC よりスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*), ブクリヨウ (*Wolfiporia cocos*) を含めた 24 菌株, きのご関連業社よりサンゴハリタケ (*Hericium ramosum*), タモギタケ (*Pleurotus cornucopiae*) を含めた 18 菌株, タイ国の野生種 NAPA (マンネンタケ科) 1 菌株, 当該研究室で細胞融合した 1 菌株を用いた。

2. 発酵大豆の調製方法

一昼夜水に浸漬した大豆 (30g) を平底試験管に入れ, オートクレーブで滅菌した (120℃, 40 分)。冷却後, 無菌的に担子菌を植菌した。それぞれの担子菌は最適生育条件が異なるため発酵温度は, 担子菌の生育温度の基本である 25℃ と設定し培養した。本研究においては, 一定期間で生育が早いものについて選択した。

3. 線溶活性および抗トロンビン活性測定に用いる試料調製

発酵大豆半粒 0.3g と同量の低アルカリガラスビーズ (安井器械 (株) 製), 蒸留水 1.0ml を加えてマルチビーズショッカー (安井器械 (株), MB400U (S) 型) で破碎 (2,500rpm, 4℃, 40 秒) し, その上清液の無細胞抽出液を試料として用いた。非加熱試料はそのまま使用し, 加熱試料は沸騰湯浴中で 10 分間加熱処理を行ったものを用いた。

4. 線溶活性測定

線溶活性は Astrup and Mullertz⁶⁾ の方法により行った。すなわち, フィブリン平板 1 枚につき, 0.6% フィブリノーゲン (0.18M ホウ酸緩衝液 pH7.5 で溶解) 4ml と 10U/ml のトロンビン溶液 (0.1% 塩化カルシウムを含む 0.18M ホウ酸緩衝液 pH7.5 で溶解)

2ml を加えて, フィブリン平板を作成した。平板上に無細胞抽出液を 30 μ l 滴下し, 18 時間後のフィブリンの溶解面積 (長径 mm \times 短径 mm) を求めた。また, 発酵大豆原形においては, それぞれ 1 粒を平板に置き測定を行った。

3. 抗トロンビン活性測定

抗トロンビン活性は木下⁷⁾ の方法により行った。Amelung 社製の血液凝固自動測定装置 (KC1A micro) を用いた。すなわち, マイクロサンプルキュベットにスチールボールを入れ, 12.5NIHU/ml トロンビン溶液 50 μ l と無細胞抽出液 50 μ l を加え, 37℃, 5 分間プレインキュベーションを行った。次に, 0.33% フィブリノーゲン溶液 200 μ l を加えると同時に装置を動かし, スチールボールが停止するまでの凝固時間 (抗トロンビン時間 [秒]) を測定した。

4. SDS 電気泳動法によるタンパク質の測定

SDS 電気泳動法は Laemmli⁸⁾ の方法に従い, 12% アクリルアミド分離ゲルを用いて, 20mA / プレートで行った。泳動用のタンパク質試料液の調製は, 上記の試料調製方法によりマルチビーズショッカーで 3 分破碎した上清液の無細胞抽出液 12.5 μ l と 0.5 M Tris HCl (pH6.8) 2.5 μ l と 10% SDS 4 μ l と β -メルカプトエタノール 1 μ l を混合し, 沸騰湯浴中で 3 分間加熱後, BPB 溶液 5 μ l 加えたものを電気泳動に用いた。染色液はコマジープリリアントブルー R250 (ナカライテスク株式会社製) を用い, Protein Marker は Biolabs 社製の P7708S を用いた。

5. 遊離アミノ酸測定

試料の調製は発酵大豆 1g を磨砕後, 熱水 9ml を加え 10 分間煮沸した。遠心分離 (8,000rpm, 4℃, 10 分) し, 上清液 2ml に 99.5% エタノール 8ml を加え, 一晚放置 (4℃) 後, 除タンパクを行い, 再び遠心分離を行い, その上清液を減圧濃縮してエタノールを除去し, 蒸留水 10ml を加え溶解させた。次にその溶液はイオン交換クロマトグラフィー Amberlite IR-120 のカラムを用い, 3N アンモニア水で溶出させた。溶出液は減圧濃縮を行い, アンモニアを完全に除去した後 0.02N の塩酸で 10ml とし, ニンヒドリン比色定量法によりロイシン溶液でアミノ酸の検量線を作成し, アミノ酸濃度の推定をロイシンに換算して測定を行った。アミノ酸濃度の推定測定は, 試験管に試料溶液 0.2ml, 1.6% 塩化第一スズ溶液 0.04ml, ニンヒドリン溶液 (ニンヒドリン 5g を 2-メトキシエタノール 125ml に溶解後, 0.22N

クエン酸 - 水酸化ナトリウム緩衝溶液 pH5.2, 125ml を加えて混合した。) 0.8ml を加えて混合し, 20 分間加熱させた. 冷却後, 希釈液 (n-プロパノールと蒸留水が 1 対 1 の割合) 4ml を加えて分光光度計で 570nm 測定した. 次に濃度推定を行い必要なものは希釈した. その希釈液について, 日立(株)アミノ酸分析計 L-8800 型を用い遊離アミノ酸を測定した. ピークの同定は, 既知標品を用い, ピークの溶出時間により確認した.

6. イソフラボンの測定

マルチビーズショッカーで 3 分間破砕後, 大豆入り上清液 300 μ l に 99.8% メタノール溶液 700 μ l を加え, ボルテックスミキサーで 1 分攪拌抽出後, 遠心分離 (15,000rpm, 10 分) により上清を得た. 次に, その残渣について 70% メタノール溶液 100 μ l を加えて同様の抽出操作を 2 回を行い, 上清液と抽出液を合わせたものを試料液とした. イソフラボンの分析は Unison UK-C18 カラム (4.6mmI.D. \times 250mm) を用い, グラジエント条件でアセトニトリル 15 \rightarrow 35%/50min, 流速 1.0ml/min, 恒温槽 37 $^{\circ}$ C, 検出波長 254nm, 試料液注入量 65 μ l で測定した.

なお装置は, 東ソー(株)高速液体クロマトグラフィー (ポンプ DP-8020, 紫外可視検出器 UV-8020) を使用した. 標準イソフラボンはグリコシド型では, ダイジン, ゲニスチン, グリスチンを用い (和光純薬工業株式会社製), アグリコン型では, ダイゼイン, グリシテイン, ゲニステインを用いた (和光純薬工業株式会社製).

結果および考察

1. 担子菌による発酵大豆の製造

担子菌で発酵させた大豆の写真を Fig. 1. に示した. 担子菌で発酵させた大豆はほとんど 14 日目までに菌糸が充満する程度にまで生育した.

2. 発酵大豆の大豆原形における線溶活性

担子菌で発酵させた大豆の線溶活性測定の結果を

Table 1. Fibrinolytic activity of fermented soybean produced by mushroom mycelia

Mushroom used	Fibrinolytic activity (mm ²)	
	Fermented soybean	Crude extract
<i>Auricularia polytricha</i>	864	43
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	513	150
<i>Flammulina velutipes</i>	630	162
<i>Pleurotus eryngii</i>	314	175
<i>Gibellula formosana</i>	729	157
<i>Lenzites betulina</i>	650	28
<i>Coriolus versicolor</i>	779	196
<i>Hericiium ramosum</i>	1608	315
<i>Schizophyllum commune</i>	1418	563
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	1635	369
NAPA	1284	42
<i>Ganoderma lucidum</i>	531	68
<i>Lepisita nuda</i>	759	201
<i>Lyophyllum anthracophilum</i>	549	189
Blank ^{a)}	0	0
Control ^{b)}	0	0

a) : Soybean

b) : Distilled water

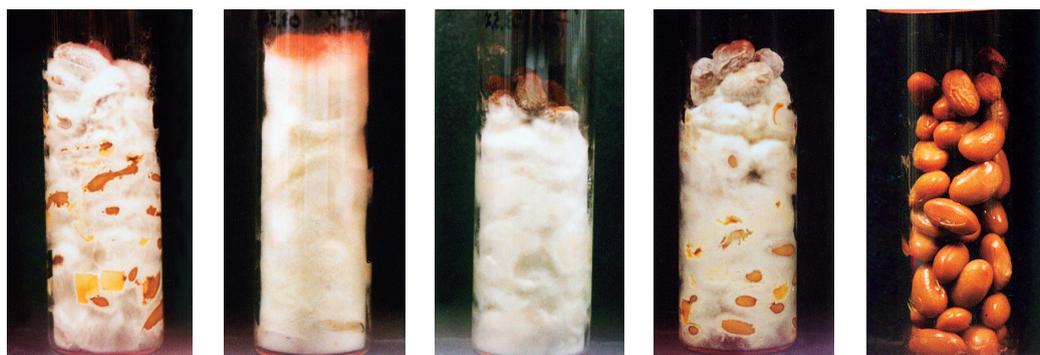


Fig. 1. Fermented soybean produced by mushroom mycelia.

- 1, *Hericiium ramosum*; 2, *Schizophyllum commune*;
- 3, *Pleurotus cornucopiae*; 4, NAPA; 5, Blank (soybean).

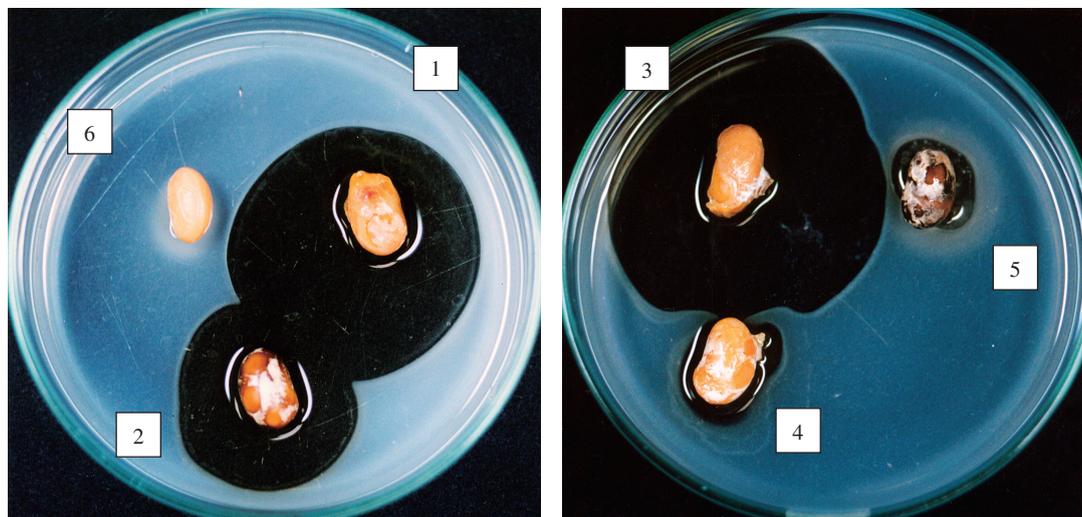


Fig. 2. Fibrinolytic activity of fermented soybean produced by mushroom mycelia.

- 1, *Pleurotus cornucopiae*; 2, *Auricularia polytricha*;
 3, *Hericium ramosum*; 4, *Stropharia rugosoannulata*;
 5, *Agrocybe praecox*; 6, Blank (soybean). A dissolved zone is shown on a fibrin plate.

Table 1. 写真を Fig. 2. に示した.

試料に線溶活性物質が含まれていればフィブリン平板を溶解し、活性が強いほど溶解面積が大きくなる。発酵大豆の原形における線溶活性は、ブランクの大豆には全く線溶活性は認められなかったが発酵後のスエヒロタケ(1418mm²), タモギタケ(1635mm²), サンゴハリタケ(1608mm²), NAPA(1284mm²)は顕著にフィブリンを溶解し線溶活性が認められた。日常生活において、これらの発酵大豆を食品として毎日摂取することにより、日々形成されつつある血栓を予防する可能性が考えられた。

3. 発酵大豆の無細胞抽出液における線溶活性

担子菌で発酵させた大豆の線溶活性測定の結果を Table 1., 写真を Fig. 3. に示した。

発酵大豆の無細胞抽出液における線溶活性はスエヒロタケ(563mm²), タモギタケ(369mm²), サンゴハリタケ(315mm²)が他の担子菌よりも高い活性が認められた。また、スエヒロタケは非加熱のみならず、95℃で加熱処理した場合においても活性が認められた。このことから、スエヒロタケを用いて発酵させた大豆には、熱に安定な線溶活性物質が存在している可能性が示唆された。

4. 発酵大豆における抗トロンビン活性

担子菌で発酵させた大豆の抗トロンビン活性測定の結果を Table 2. に示した。試料に抗トロンビン活

Table 2. Effect of fermented soybean produced by mushroom mycelia on thrombin time.

Mushroom used	Thrombin time (sec)	
	Non-heat-treated	Heat-treated
<i>Wolfiporia cocos</i>	600.0 ^{c)}	600.0 ^{c)}
<i>Flammulina velutipes</i>	279.1	54.5
<i>Pleurotus eryngii</i>	511.0	191.1
<i>Ramaria botrytis</i>	600.0 ^{c)}	58.5
<i>Lenzites betulina</i>	600.0 ^{c)}	54.3
<i>Macrolepiota procera</i>	64.0	600.0 ^{c)}
<i>Coriolus versicolor</i>	600.0 ^{c)}	258.2
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	600.0 ^{c)}	82.6
<i>Cordyceps militaris</i>	600.0 ^{c)}	60.9
<i>Hericium ramosum</i>	600.0 ^{c)}	70.0
<i>Schizophyllum commune</i>	600.0 ^{c)}	107.5
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	600.0 ^{c)}	85.7
NAPA	600.0 ^{c)}	31.8
<i>Ganoderma lucidum</i>	100.9	61.2
<i>Wynnea gigantea</i>	600.0 ^{c)}	47.4
<i>Hericium erinaceum</i>	600.0 ^{c)}	92.5
Blank ^{a)}	27.8	25.8
Control ^{b)}	22.5	22.5

a) : Soybean

b) : Distilled water

c) : More than 600.0 sec

性物質が含まれていれば、フィブリンが形成されるまでの時間が延長し活性が高まったことがいえる。非加熱試料におけるトロロンピン時間は、担子菌の発酵大豆の無細胞抽出液では、コントロールの水で22.5秒、発酵させていない大豆のブランクでは27.8秒となり、発酵処理を行わない大豆では全く抗トロロンピン活性を示さなかった。しかしながら、カワラタケ(*Coriolus versicolor*)、カイガラタケ(*Lenzites betulina*)、ブクリョウ、スエヒロタケ、タモギタケ、NAPA、ヤマブシタケ(*Hericium erinaceum*)、ミミブサタケ(*Wynnea gigantean*)、ホウキタケ(*Ramaria botrytis*)、サナギタケ(*Cordyceps militaris*)、サンゴハリタケ、サケツバタケ(*Stropharia rugosoannulata*)で発酵させた大豆において600秒以上のトロロンピン時間を示し顕著な活性が認められた。一方、95℃で加熱処理した試料においては、非加熱試料と比べ活性を失ったものが多かったが、カラカサタケ(*Macrolepiota procera*)およびブクリョウが600秒以上のトロロンピン時間を示し、両担子菌で発酵させた大豆には熱に安定な抗トロロンピン活性物質が存在している可能性が示唆された。通常、加熱試料の方が非加熱試料よりも活性が低下することが知られているが、カラカサタケにおいては、加熱処理を行うことによってトロロンピン時間が延長した。このこと

は加熱による物質の変性、あるいは新たな反応により生じた物質が活性に関与している可能性などが考えられる。しかし、詳細については今後の課題である。ブクリョウにおいては、漢方薬で煎じて飲用されているため、加熱処理後においても抗トロロンピン効果は保持され、血栓症予防効果が期待される。

5. 発酵大豆におけるタンパクの変化

現在わが国では、大豆は5大アレルギー(卵、牛乳、大豆、米、小麦)の一つとして挙げられているアレルギー食品である。一般にある食品に対してアレルギーが存在すると、その食品の原料とするものすべてを食事から除去する「除去食療法」がとられ、食品を制限してしまう可能性がある。そこで未発酵の大豆をブランクとして、担子菌で発酵した大豆と比較し、担子菌の発酵によって大豆タンパク質が分解され、アレルギーとしての働きが失われる可能性について検討した。試料は線溶活性、抗トロロンピン活性の結果が良好であったサンゴハリタケ、スエヒロタケ、タモギタケ、NAPAの発酵大豆を使用した。担子菌で発酵させた大豆のSDS電気泳動法による大豆タンパク質の変化の結果をFig. 4.に示した。

サンゴハリタケ、スエヒロタケについては大豆タンパク質のバンドは分解されて消失したが、発酵することによって新たに合成されたタンパク質が確認さ

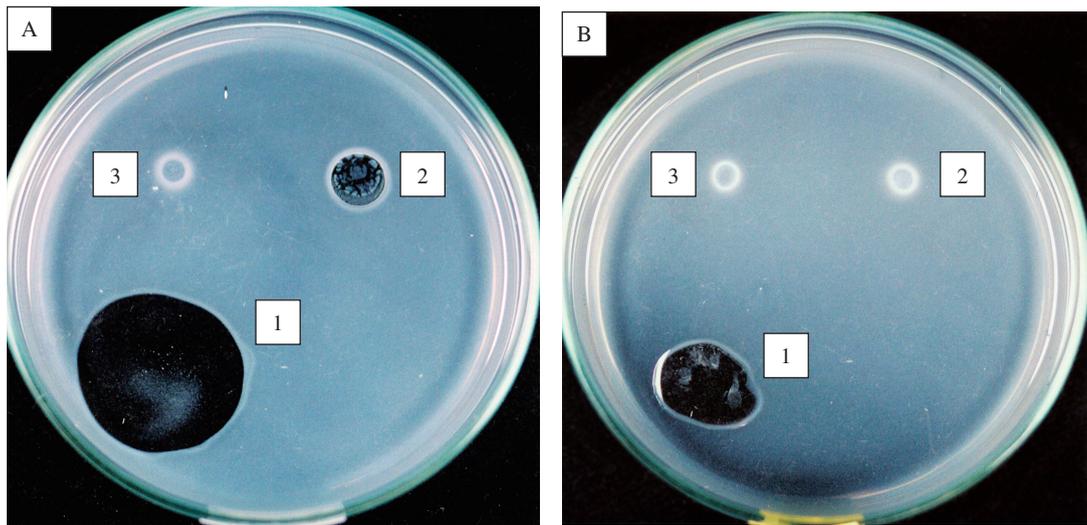


Fig. 3. Fibrinolytic activity of crude extract of fermented soybean produced by mushroom mycelia.

A: Non-heat-treated, B: Heat-treated

1, *Schizophyllum commune*; 2, *Hypsizygus marmoreus*;

3, Blank (soybean). A dissolved zone is shown on a fibrin plate.

れた。タモギタケはブランクとはほぼ同じ位置のバンドが存在していたが、バンドは薄く観察された。それに対してNAPAは大豆タンパク質のバンドが完全に消失していた。以上、担子菌で発酵させた大豆は、大豆タンパク質が分解され大豆アレルギーの低減化が期待される抗アレルギー食品である可能性が考えられた。しかし、詳細については今後の課題である。

6. 発酵大豆における遊離アミノ酸濃度

遊離アミノ酸は食品の味を考える上の重要な要素であるが、きのこ類には特殊な遊離アミノ酸を含むものも多いと言われている⁹⁾。担子菌で発酵させた大豆には、担子菌の発酵作用により大豆タンパク質が分解されていることがSDS電気泳動の結果から推測された。大豆タンパク質が分解すれば遊離アミノ酸が増加し、栄養価値のあるものに変化する。そこで、サンゴハリタケ、スエヒロタケ、タモギタケおよびNAPAの発酵大豆中の遊離アミノ酸の生成について調べた。担子菌で発酵させた大豆の遊離アミノ酸濃度測定の結果をTable 3.に示した。ブラン

Table 3. Contents of free amino acids in fermented soybean produced by mushroom mycelia.

	Amino acid content (mg/g)				
	<i>Hericium ramosum</i>	<i>Schizophyllum commune</i>	NAPA	<i>Pleurotus cornucopiae</i>	Blank ^{a)}
Asp	1.020	3.848	1.021	2.291	0.085
Thr	4.580	4.205	2.121	6.029	0.084
Ser	2.056	2.543	1.074	2.418	0.067
Glu	3.435	11.216	2.507	11.910	0.353
Gly	0.907	2.166	0.568	2.420	0.079
Ala	1.737	3.301	1.105	5.802	0.107
Cys	—	0.341	—	—	0.064
Val	2.647	4.933	1.808	4.482	0.114
Met	0.675	0.327	1.029	0.147	0.055
Ile	2.263	3.777	1.375	3.243	0.053
leu	2.727	5.869	1.784	3.634	0.068
Try	1.779	0.018	1.305	1.918	0.085
Phe	2.790	2.774	2.252	3.192	0.128
Lys	1.088	3.142	1.053	2.976	0.055
His	0.272	1.184	0.403	1.021	0.022
Arg	1.067	3.109	1.053	1.661	0.082
Pro	1.116	3.126	0.916	2.363	0.054
Total	30.159	55.879	21.373	55.507	1.473

— : Trans

a) : Soybean

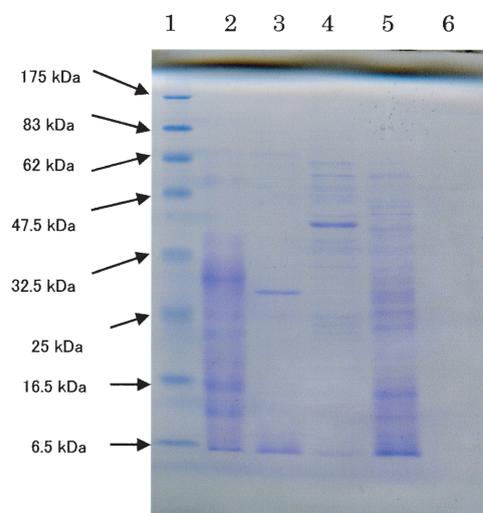


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of crude extract of fermented soybean produced by mushroom mycelia.

1. Molecular mass markers.
2. Blank (soybean).
3. *Hericium ramosum*.
4. *Schizophyllum commune*.
5. *Pleurotus cornucopiae*.
6. NAPA.

ク(大豆)とそれぞれの担子菌で発酵させた大豆を比較すると、総アミノ酸量はスエヒロタケ、タモギタケが高く38倍、次に、サンゴハリタケが20倍、NAPAが15倍増加した。個々のアミノ酸含量をみると、ブランクよりも必須アミノ酸(スレオニン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、トリプトファン、フェニルアラニン、リジン、ヒスチジン)、グルタミン酸を含むその他の必要なアミノ酸すべてが増加し、旨味が期待される。

7. 発酵大豆におけるイソフラボン含量

イソフラボンには糖質が結合したものであるグリコシド型イソフラボンと糖質が結合していないアグリコン型イソフラボンがある。アグリコン型は直接腸管から体内吸収され、一方、グリコシド型は糖質部位があるため、まず、腸内細菌によってアグリコンに変換されてから体内吸収されると考えられる¹⁰⁾。アグリコン型とグリコシド型のヒトに対する単回投与試験および4週間連続投与試験を行った結果、アグリコン型の吸収は早く、また吸収量も多いことが報告されている¹¹⁾。そこで担子菌の発酵によってグリコシド型の糖質部位を切断し、吸収が容易でさら

Table 4. Contents of isofuravone in fermented soybean produced by mushroom mycelia.

Mushroom used	Glucoside (mg/100 g)			Aglycon (mg/100 g)		
	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein
<i>Hericium ramosum</i>	0	0	0	9.8	0	7.8
<i>Schizophyllum commune</i>	0	0	0	7.0	0	0
NAPA	0	0	0	11.6	0.4	8.6
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	0	0	0	11.5	0	6.6
Blank ^{a)}	13.2	3.7	12.0	0.7	1.3	0.1

a) : Soybean

に活性を有するアグリコン型に変化するのではないかと考え、発酵後のイソフラボン量を測定した。試料はサンゴハリタケ、スエヒロタケ、タモギタケ、NAPAの発酵大豆について調べた。イソフラボン測定の結果をTable 4.に示した。ブランク(大豆)の場合、イソフラボン化合物はグリコシド型として存在しているが、担子菌で発酵することによってグリコシド型のダイジン、グリシチン、ゲニスチンは消失しアグリコン型に変化することが示唆された。

以上の結果より、担子菌の発酵能による新しい発酵食品の開発として、大豆は大変有効の食材であり、今後、大豆を利用した新たな機能性食品の応用が期待される。

要 約

担子菌で発酵させた発酵大豆の生理活性について調べた。線溶活性は、非加熱の場合において、スエヒロタケ(1418mm²)、タモギタケ(1635mm²)、サンゴハリタケ(1608mm²)、NAPA(タイ国産、マンネンタケ科の一種)(1284mm²)が活性を示した。無細胞抽出液の場合においては、スエヒロタケ(563mm²)、タモギタケ(369mm²)が活性を示した。抗トロンビン活性は、カワラタケ、タモギタケ、カイガラタケ、ブクリョウ、スエヒロタケ、NAPA、ヤマブシタケ、ミミブサタケ、ホウキタケ、サナギタケ、サンゴハリタケ、サケツバタケが600秒以上のトロンビン時間を示した。加熱の場合においては、ブクリョウ、カラカサタケが600秒以上のトロンビン時間を示した。総アミノ酸量は、ブランク(発酵前的大豆)と比較するとスエヒロタケ、タモギタケは38倍、サンゴハリタケは20倍、NAPAは15倍増加した。さらに、イソフラボンのグリコシド型からアグリコン型へ変換される可能性が示唆された。

参考文献

- 1) A. Brzezinski *et al.*, *Menopause.*, **4**, 89-94 (1997)
- 2) 家森幸男 他., *Bio Industry.*, **15**, 5-10 (1998)
- 3) H. Adlercreutz *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 1093-1100 (1991)
- 4) E.L. Wynder., *Nutr. Cancer.*, **22**, 1-10 (1994)
- 5) ジェース W. アンダーソン, デイリーフード冬季増刊号「大豆と技術」, 12-13 (2000)
- 6) Astrup, T. and Mullertz, S., *Arch. Biophys.*, **40**, 346-351 (1952)
- 7) Kinoshita, A. and Horie, N., *Jpn. Thromb. Hemost.*, **4**, 417-422 (1993)
- 8) Laemmli, U.K., *Nature.*, **227**, 680-685 (1970)
- 9) Hatanaka, S. and Terakawa, H., *Bot. Mag. Tokyo.*, **81**, 259-266 (1968)
- 10) J. Sfakianos *et al.*, *J. Nutr.*, **127**, 1260-1268 (1997)
- 11) T. Izumi *et al.*, *J. Nutr.*, **130**, 1695-1699 (2000)