

果実,そ菜のアスコルビン酸に関する生理化学的研究 第3報

誌名	園藝學會雑誌
ISSN	00137626
著者	山内, 直樹 緒方, 邦安
巻/号	47巻1号
掲載ページ	p. 121-127
発行年月	1978年6月

果実、そ菜のアスコルビン酸に関する
生理化学的研究 (第3報)

青果物の Oxidized ascorbate reductase の特性と
貯蔵中の変化について

山内直樹・緒方邦安
(大阪府立大学農学部)

Physiological and Chemical Studies on Ascorbic Acid
of Fruits and Vegetables

III. The Characteristics of Oxidized Ascorbate Reductase and
Changes of the Enzyme Activity during Storage of Fruits
and Vegetables

Naoki YAMAUCHI and Kuniyasu OGATA
College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka

Summary

The changes of L-ascorbic acid (ASA) content during storage in fruits and vegetables depends on interaction between ascorbate oxidase (E.C. 1.10.3.3) and peroxidase (E.C. 1.11.1.7) which oxidize ASA and oxidized ascorbate reductase (E.C. 1.6.5.4) which reduces oxidized ascorbate. The object of this experiment is to determine characteristics of oxidized ascorbate reductase and differences of this enzyme's activities in several fruits and vegetables. We also investigated the changes of the activities during development of chilling injury (browning) and yellowing that a decrease of ASA content was remarkable.

The results obtained were as follows :

1. This enzyme catalyzed the reduction of L-monodehydroascorbic acid (MDHA) by means of NADH as a coenzyme and showed high activity in tris-HCl buffer.
2. The optimum pH and temperature of this enzyme were about 7.5—8.0 and 35 °C, respectively.
3. This enzyme was extremely sensitive to SH reagents such as p-hydroxy mercuribenzoate (PHMB), 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and monoiodoacetic acid and inhibited by chlorogenic acid. It was also inhibited by AgNO₃ (1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M) and FeCl₂ (1×10^{-3} M), but other metal ions didn't actually exert on its activity.
4. The activities of this enzyme were high in pumpkin, cucumber, and carrot in which ascorbate oxidase activities were high, while in leaf vegetables, potatoes, and sweet potatoes its activities were low.
5. This enzyme's activities during development of chilling injury in sweet pepper seeds and sweet potatoes in which ASA content decreased remarkably increased temporarily before occurrence of chilling injury and then declined with the advance of chilling injury.
6. The activity of this enzyme in spinach leaves lowered with the decrease of ASA content with yellowing.

緒言

青果物の貯蔵中における還元型アスコルビン酸 (ASA) の変化は, ASA を酸化する酵素である Ascorbate oxidase (E.C. 1.10.3.3) ならびに Peroxidase (E.C. 1.11.1.7) と, 酸化されたアスコルビン酸を ASA に還元する Oxidized ascorbate reductase (E.C. 1.6.5.4) の相互作用によるところが大きい. この ASA の酸化に関与する Ascorbate oxidase Peroxidase の性質や貯蔵中の変化については, これまで多くの研究がなされている (1, 3, 5, 7, 14, 19, 20, 22). しかし, ASA の保持に関与する Oxidized ascorbate reductase の研究は, Nason ら (18), Marrè ら (13), 玉山ら (23) の二, 三の研究にとどまり, その性質や青果物の貯蔵中の動向についてはほとんど解明されていない. 本研究はアスコルビン酸の生理化学的研究の一環として, 今回は Oxidized ascorbate reductase の特性について検討するとともに貯蔵中アスコルビン酸が急減する低温障害発生時, および葉菜類の黄化時における本酵素活性の変化について調べ, 二, 三の知見を得たので報告する.

実験材料および方法

実験材料 供試材料としてキュウリ (久留米H), カボチャ (小菊), ピーマン (サキガケミドリ), シュンギク (晩抽株張), ホウレンソウ (ニューアジア), ジャガイモ (メークイン) など, 大阪府立大農場産および市販の青果物を用い, 熟度は収穫適期のものを使用した. 青果物の貯蔵は有孔ポリエチレン袋 (厚さ 0.03mm, 直径 6mm の孔 4個/49×26cm) 詰とし, 1°C, 15°C, 20°C, 25°C で行なった.

粗酵素の抽出 粗酵素の抽出は 0.05M トリス緩衝液 (pH 7.6) で, フェノールの多い青果物 (ピーマン種子, ジャガイモ, サツマイモ, シュンギク) に対しては Dithiothreitol (2.5~10mM), ポリクラ AT (4%) を同時に用い, 乳鉢を使用し石英砂とともに磨砕した. このホモジネートを 4層ガーゼで口過し, 口液を 11,000g

で 15 分遠心分離を行ない, 上澄を粗酵素液とした. ホウレンソウの場合に限り, この粗酵素液とさらにこれを飽和の硫酸で処理し, 透析して得られた酵素液の両方を用い行なった.

分析方法 Oxidized ascorbate reductase 活性の測定は Marrè ら (13) の方法に準じた. すなわち 0.05M トリス緩衝液 (pH 7.6) 3ml 中に酵素液 0.5ml, 0.1M ASA (Na 塩) 0.1ml, 5×10^{-3} M NADH 0.1ml, 5×10^{-5} M CuSO₄ 0.2ml を混和し, 25°C で反応を開始し NADH の酸化による 340nm の O.D. の吸収減少を比色計 (Hitachi model 200-10) を用いて測定した. 酵素活性 1 Unit は 1分間 O.D. 340nm 0.01 の吸収減少で表わした. またアスコルビン酸の分析はヒドラジン法 (21) によった. 阻害剤, 金属イオンの添加は, クロロゲン酸の場合 pH 6.5 で行なったのを除いてその他のものはすべて pH 7.6 で行なった.

実験結果および考察

1. Oxidized ascorbate reductase の特性

1) 補酵素および緩衝液による Oxidized ascorbate reductase 活性の相違

第1図に ASA の代謝を示したが, ASA はまず L-Monodehydroascorbic acid (MDHA) に, つづいて L-Dehydroascorbic acid (DHA) に代謝される. Oxidized ascorbate reductase は ASA と DHA の中間体, すなわち MDHA を基質とし (2, 9, 23), NADH, NADPH を補酵素とする酵素である. そこでまずこの酵素の特性を明らかにするため, 補酵素による活性の比較を調べたところ第1表に示したように, NADH を補酵素として用いる方が活性が強く, NADPH は NADH の約3分の1であった. 第1表に示した結果はキュウリのものであるが, カボチャ, ピーマン種子についても同様の結果が得られた. また緩衝液による本酵素活性の相違をみたところ (第2表), トリス緩衝液での活性が高く, ホウ酸緩衝液ではトリス緩衝液の約2分の1の活性を示した. これらの結果から以下の実験には補酵素として NADH を使用し, トリス緩衝液を用いた.

Table 1. Effects of coenzyme on oxidized ascorbate reductase activity of cucumber.

Coenzyme	Specific activity
NADH	213* ¹ (100)* ²
NADPH	81 (38)

*¹ Unit/mg protein

*² %

Condition : pH 7.6, Temp. 25°C

Unit=O.D. 340 nm 0.01/min.

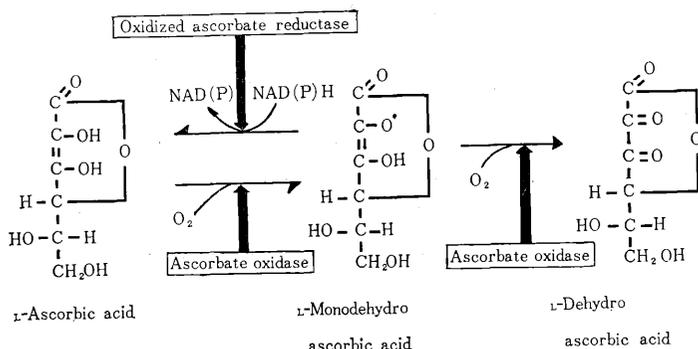


Fig. 1. Oxidation-reduction system of L-ascorbic acid.

Table 2. Oxidized ascorbate reductase activity of cucumber in different buffers.

Buffer	Specific activity
Tris-HCl buffer (1/20 M)	192* ¹ (100)* ²
Phosphate buffer (1/15 M)	142 (74)
Borate buffer (1/10 M)	100 (52)

*¹ Unit/mg protein

*² %

Condition : pH 7.6, Temp. 25°C

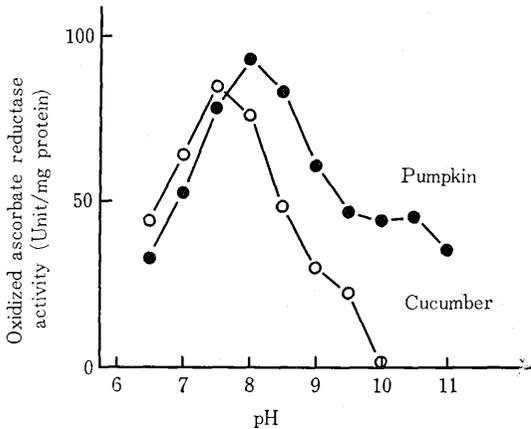


Fig. 2. Activities of oxidized ascorbate reductase at various pH's in borate buffer. Condition : Temp. 25°C

2) Oxidized ascorbate reductase の pH および温度特性

Oxidized ascorbate reductase の pH 特性をキュウリ，カボチャを用いて調べたところ，第2図に示したようにキュウリで7.5前後，カボチャで8.0前後と pH 7.5~8.0 に至適 pH をもっていることがわかった。ASA を酸化する Ascorbate oxidase, Peroxidase の至適 pH は 5.0~6.0 であることから(5, 6, 15, 17)，このような ASA の酸化酵素と還元酵素の至適 pH の相違は生体内の酸化還元反応に影響を及ぼしているのかも知れない。つぎに本酵素の温度特性をみたところ(第3図)，35°C 付近に最適反応温度を持っていることがわかった。

3) Oxidized ascorbate reductase 活性に及ぼす阻害剤および金属イオンの影響

Oxidized ascorbate reductase 活性に及ぼす阻害剤の影響をみたところ(第3表)，メルカプチド形成試剤である *p*-Hydroxy mercuribenzoate (PHMB), Disulfide 形成試剤である 5, 5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) で著しく活性が阻害された。また SH 基のアルキル化剤であるモノヨード酢酸 (3×10⁻³ M) でも阻害を受けたが，PHMB, DTNB の阻害に比較すると阻害

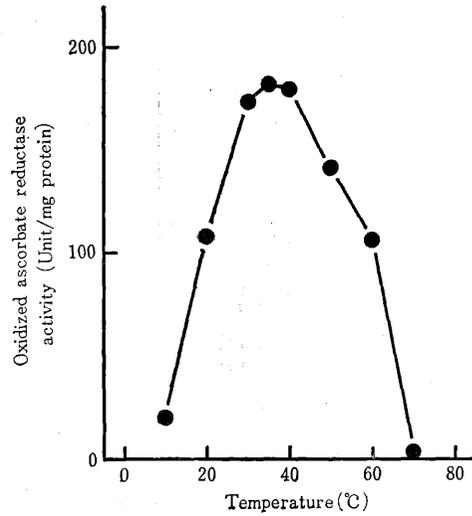


Fig. 3. Effects of temperatures on oxidized ascorbate reductase activity of cucumber. Condition : pH 7.6

Table 3. Effects of several inhibitors on oxidized ascorbate reductase activity of cucumber.

Inhibitor	Concentration	Relative activity
Control		100* ¹
PHMB* ²	1×10 ⁻³ M	2
	1×10 ⁻⁴ M	17
DTNB* ³	1×10 ⁻³ M	0
	1×10 ⁻⁴ M	58
Monoiodoacetic acid	3×10 ⁻³ M	78
	1×10 ⁻³ M	95
Sodium fluoride	1×10 ⁻³ M	95
	1×10 ⁻⁴ M	108
Thiourea	5×10 ⁻³ M	102
	1×10 ⁻³ M	91
	1×10 ⁻⁴ M	94
Chlorogenic acid	1×10 ⁻³ M	0
	1×10 ⁻⁴ M	88

*¹ : Specific activity=213 Unit/mg protein

*² : *p*-Hydroxy mercuribenzoate

*³ : 5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)

程度が少なかった。フッ化ナトリウム，チオ尿素による本酵素の阻害はみられなかった。さらにクロロゲン酸による阻害をみたところ，1×10⁻³ M で強い阻害をうけることから生体内においても本酵素活性はフェノール類の影響を強く受けていることが推察された。つぎに金属イオンの本酵素活性に及ぼす影響をみたところ(第4表)，AgNO₃(1×10⁻³, 1×10⁻⁴ M), FeCl₂(1×10⁻³ M) で阻害がみられたが，他の金属イオンの本酵素に及ぼす影響はみられなかった。以上のことから本酵素は SH 酵素で，

Table 4. Effects of several metal ions on oxidized ascorbate reductase activity of cucumber.

		Relative activity
Control		100*
MgCl ₂	1 × 10 ⁻³ M	92
	1 × 10 ⁻⁴ M	96
MnCl ₂	1 × 10 ⁻³ M	85
	1 × 10 ⁻⁴ M	95
CaCl ₂	1 × 10 ⁻³ M	96
	1 × 10 ⁻⁴ M	94
KCl	1 × 10 ⁻³ M	95
	1 × 10 ⁻⁴ M	97
NaCl	1 × 10 ⁻³ M	100
	1 × 10 ⁻⁴ M	104
FeCl ₂	1 × 10 ⁻³ M	63
	1 × 10 ⁻⁴ M	91
AgNO ₃	1 × 10 ⁻³ M	49
	1 × 10 ⁻⁴ M	56

* Specific activity=213 Unit/mg protein

Table 5. Differences in oxidized ascorbate reductase activity of several fruits and vegetables.

Material	Specific activity*
Pumpkin (flesh)	186.8
Cucumber (flesh)	212.9
Sweet pepper (flesh)	42.2
(seed)	2.1
Carrot "Gosun" (root)	67.3
Carrot "Kintoki" (root)	96.9
Spinach (leaf)	23.4
Garland chrysanthemum (leaf)	16.6
Sweet potato (rhizome)	4.1
Potato (tuber)	3.2

* Unit/mg Protein

主に NADH を補酵素とし、pH 7.5~8.0 付近に至適 pH, 35°C 付近に最適反応温度のある金属イオンを activator としない酵素であると思われる。ただここで使用した酵素は粗酵素であるため得られた結果が本酵素の特性を明確に示しているとは言えないので、酵素の精製を行いさらに検討する必要がある。

2. 数種青果物における Oxidized ascorbate reductase 活性

数種青果物を用いて Oxidized ascorbate reductase 活性の比較を行なった (第5表)。Ascorbate oxidase 活性が強いとされているカボチャ、キュウリ、ニンジンで本酵素活性も強いのにに対し、葉菜類やジャガイモ、サツマイモのようなものでは弱いことがわかった。このように Ascorbate oxidase が強いカボチャなどで本酵素活性も強いことから生体内の ASA 含量の保持に本酵素が作用しているように考えられ、貯蔵中における ASA

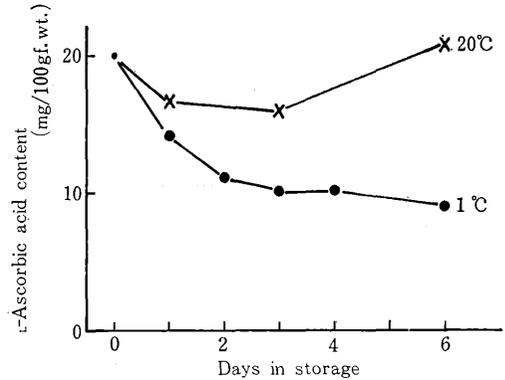


Fig. 4. Changes of L-Ascorbic acid content in sweet pepper seeds during storage.

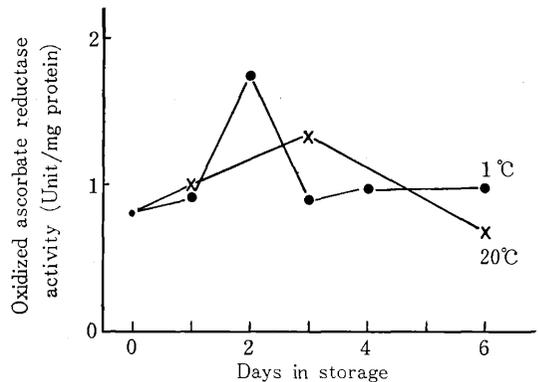


Fig. 5. Changes of oxidized ascorbate reductase activity in sweet pepper seeds during storage.

含量の減少は何らかの原因で本酵素活性の低下が生じた時に起こるものと考えられる。

3. 貯蔵に伴う Oxidized ascorbate reductase 活性の変化

貯蔵中 ASA 含量の顕著な減少は前報(25)で報告した低温障害の一つであるかっ変発生時や、葉菜類などでみられる葉の黄化時(26)に生じる。そこで ASA 含量の動向と Oxidized ascorbate reductase の作用を調べるため、まずピーマン種子、サツマイモを用い低温障害発生時における本酵素の変化を調べた。ピーマン果実は 1°C で貯蔵すると 3 日前後に種子のかっ変が生じる。貯蔵ピーマン果実の種子における ASA 含量の変化をみると (第4図), 20°C では貯蔵中の変化はあまりみられないが, 1°C では貯蔵当日約 20mg/100g あったものが, かっ変発生がみられる貯蔵 3 日では約半分の 10mg/100g に減少した。つぎに貯蔵に伴う本酵素活性の変化は, 第5図に示したように 1°C では貯蔵後急激に活性が高まり, かっ変の発生に伴い低下することがわかった。さら

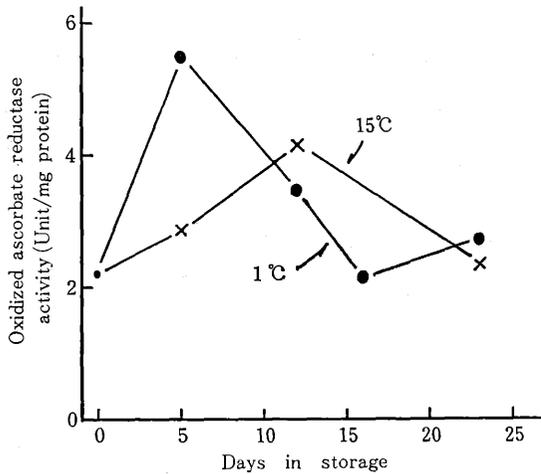


Fig. 6. Changes of oxidized ascorbate reductase activity in sweet potatoes during storage.

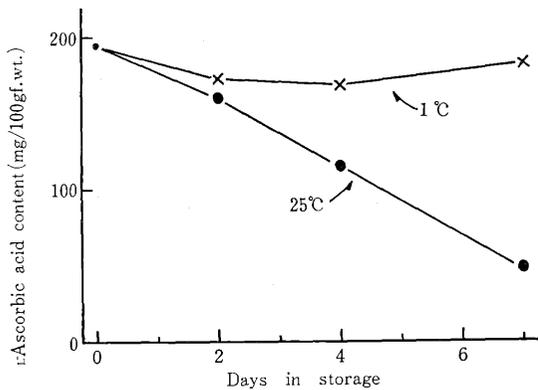


Fig. 7. Changes of L-ascorbic acid content in spinach leaves during storage.

にサツマイモの貯蔵に伴う本酵素活性の変化を調べたが(第6図)、サツマイモもピーマン種子と同様1°C貯蔵でかっ変の発生が貯蔵14日頃からみられ、本酵素活性の変化はピーマン種子の場合と同様、貯蔵後急激に高まり、かっ変の発生に伴い活性の低下がみられた。Liebermanら(11)はサツマイモを7.5°Cで貯蔵するとASA含量は減少し、一方でクロロゲン酸含量が増加することを報告している。また小机ら(10)は、ピーマン種子のクロロゲン酸含量が1°C、貯蔵1日で当日の約3倍になることを報告している。このようにサツマイモ、ピーマン種子を低温貯蔵するとクロロゲン酸の増加がみられること、また第3表で示したようにクロロゲン酸が本酵素の活性を阻害することから、本酵素は1°C下でのASAの減少によりASA保持のために活性化されるが、クロロゲン酸の増加により活性が低下していくものと考えら

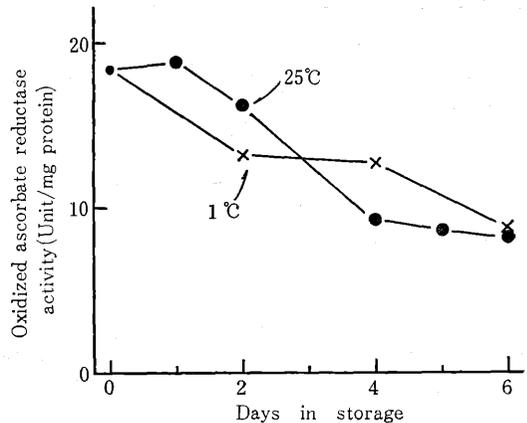


Fig. 8. Changes of oxidized ascorbate reductase activity in spinach leaves during storage.

れる。つぎにハウレンソウを用い葉の黄化に伴う本酵素活性の変化を調べた。ハウレンソウを25°Cで貯蔵すると貯蔵3日頃から葉の萎凋および黄化がみられるが、ASA含量の変化は第7図に示したように黄化が生じる25°Cでは貯蔵当初約200mg/100gあったものが貯蔵4日で約半分、黄化が著しい7日頃では約50mg/100gまで減少した。黄化が生じない1°Cでは貯蔵中の変化はみられなかった。この時の本酵素の貯蔵に伴う活性の変化をみると(第8図)、25°Cでは貯蔵当初、活性の変化はみられないが黄化に伴い著しく活性の低下することがわかった。しかしASAが減少しない1°Cでも本酵素活性の低下がみられた。

Karら(8)は、rice leaf (*Oryza sativa* L. cv. Ratna)の黄化にともなって Peroxidase 活性が増加することを報告している。本研究においてもハウレンソウで黄化に伴うASAの急減がみられたが、このASAの急減はASAの酸化酵素である Peroxidase の増加と本酵素活性の低下によって生じるものと思われた。またさきの1°CでのASA減少がみられない場合でも本酵素活性の低下がみられたが、これは1°Cでは黄化の場合とは逆にASAの分解に働く Peroxidase, Ascorbate oxidase 活性が低下するため本酵素活性の低下もみられるものと考えられる。さらに低温障害発生時にも Peroxidase や Ascorbate oxidase 活性が増加することが知られており(5, 16)、植物体における本酵素活性と Peroxidase, Ascorbate oxidase 活性とのバランスの崩壊がASAの減少を導く一因となっているものと考えられる。いずれにしても本実験の結果、貯蔵中ASAの減少が著しい低温障害(かっ変)発生時、黄化時に本酵素の急激な活性の低下がみられ、本酵素がASAの減少と密接な関係の

あることが推察された。

なお Mapson ら(12), Crook ら(4), Yamaguchi ら(24) は生体内の還元型グルタチオンを用いて DHA を ASA に還元する Dehydroascorbic acid reductase (E. C. 1. 8. 5. 1) の存在を報告しているが、本酵素と Dehydroascorbic acid reductase との生体内で ASA の保持作用に対する相違および酵素の細胞内分布などの点については今後の検討を要するところである。

摘 要

本研究は青果物の還元型アスコルビン酸 (ASA) 保持に作用する Oxidized ascorbate reductase の特性について検討するとともに貯蔵中アスコルビン酸が急減する低温障害発生時、および葉菜類の黄化時における本酵素活性の変化について調べ、青果物における本酵素の役割を明らかにしようとした。

1. 本酵素は基質として L-Monodehydroascorbic acid (MDHA) に作用し、補酵素として主に NADH を用い、トリス緩衝液中で高い活性を示すことがわかった。

2. 本酵素の pH および温度特性をみたところ pH 7.5 ~ 8.0 付近で至適 pH を持ち、35°C 前後で最適反応温度を持つことがわかった。

3. 阻害剤および金属イオンの本酵素に及ぼす影響は、SH 基の不活性剤である *p*-Hydroxy mercuribenzoate (PHMB), 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), モノヨード酢酸で活性が阻害され、またクロロゲン酸でも強い阻害がみられた。金属イオンについては AgNO_3 (1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M), FeCl_2 (1×10^{-3} M) で阻害されたのを除いて、他の金属イオンは本酵素に影響を与えないことから、本酵素は SH 酵素であり金属イオンを activator としない酵素であると考えられた。

4. 数種青果物における本酵素の活性は、Ascorbate oxidase 活性が強いとされているカボチャ、キュウリ、ニンジンなどで強いものに対し、葉菜類やジャガイモ、サツマイモのようなものでは弱いことがわかった。

5. ASA の減少が著しいピーマン種子およびサツマイモの低温障害発生に伴う本酵素活性の変化をみたところ、障害発生前に一時急増し発生に伴い低下することを認め、この活性の低下の一因としてクロロゲン酸の増加が考えられた。

6. ホウレンソウを用い黄化に伴う本酵素活性の変化を調べたところ、貯蔵当初は活性の変化がみられないが、黄化に伴い ASA の減少と平行して本酵素の活性も低下することが明らかになった。

本研究の一部は 1977 年園芸学会春季大会で発表した。

引用文献

1. 荒木忠治. 1969. 植物 Peroxidase. 食研・新庄. 研究と展望. 2: 7—20.
2. BEEVERS, H. 1954. The oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide by an ascorbate system from cucumber. *Plant Physiol.*, 29: 265—269.
3. BURNETTE, F.S. 1977. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. *J. Food Sci.*, 42: 1—6.
4. CROOK, E.M. and E.J. MORGAN. 1944. The reduction of dehydroascorbic acid in plants. *Biochem. J.*, 38: 10—15.
5. HAARD, N.F. and D. TIMBIE. 1973. Chilling injury in green banana fruit: Changes in peroxidase isozymes in soluble and particulate pools. *J. Food Sci.*, 38: 642—645.
6. 本田幸一郎. 1963. Ascorbic acid oxidase. 酵素研究法 2. 赤堀四郎編. p. 368—377. 朝倉書店
7. 岩崎康男・田中康彦. 1952. 甘藷の生化学的研究 (第 2 報). 成育並に貯蔵期間に於けるカタラーゼ, オキシダーゼ及びパーオキシダーゼの消長. 園学雑. 21: 55—57.
8. KAR, M., and D. MISHRA. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.*, 57: 315—319.
9. KERN, M., and E. RACKER. 1954. Activation of DPNH oxidase by an oxidation product of ascorbic acid *Arch. Biochem. Biophys.*, 48: 235—236.
10. 小机信行・緒方邦安. 1971. 貯蔵ピーマン果実の低温障害に関する生理化学的研究 (第 2 報). 低温障害に伴うかっ変基質ならびに中間代謝物質の変化. 園学雑. 40: 300—304.
11. LIEBERMAN, M., C.C. CRAFT, and M.S. WILCOX. 1959. Effect of chilling on the chlorogenic acid and ascorbic acid content of Port Rico sweet potatoes. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 74: 642—648.
12. MAPSON, L.W., and E.M. MOUSTAFA. 1956. Ascorbic acid and glutathione as respiratory carries in the respiration of pea seedling. *Biochem. J.*, 62: 248—259.
13. MARRÈ, E., and O. ARRIGONI. 1958. Ascorbic acid and photosynthesis. I. "Monodehydroascorbic acid" reductase of chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta.*, 30: 453—457.
14. McCOMBS, C.L. 1957. Ascorbic acid oxidase activity of certain vegetables and changes in the content of reduced and dehydroascorbic acid during shelf-life. *Food Research*, 22: 448—454.
15. 三上雅章. 1970. レンコンのペルオキシダーゼに関する化学的研究 (第 1 報). レンコンのペルオキ

- ンダーゼの性質とそのゾーン電気泳動. 食品工誌. 17: 182—186.
16. 邨田卓夫・緒方邦安. 1966. パナナ果実の追熟生理および貯蔵に関する研究(第4報). 果実の低温障害に伴う生理化学的变化(そのI). 食品工誌. 13: 367—370.
 17. NAGLE, N. E., and N. F. HAARD. 1975. Fractionation and characterization of peroxidase from ripe banana fruit. *J. Food Sci.*, 40: 575—579.
 18. NASON, A., W. D. WOSILAIT, and A. J. TERRELL. 1954. Enzymatic oxidation of reduced pyridine nucleotide by an oxidation product of ascorbic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 48: 233—235.
 19. 根岸正好・瓜谷郁三. 1964. 青果物の冷凍に関する研究(第1報) そ菜の超低温における酵素活性の変化. 食品工誌. 11: 371—376.
 20. RANADIVE, A. S., and N. F. HAARD. 1972. Peroxidase localization and lignin formation in developing pear fruit. *J. Food Sci.*, 37: 381—383.
 21. ROE, J. H., B. M. MARY, M. J. OESTERLING, and M. D. CHARLOTTE. 1948. The determination of diketo-L-gulonic acid, dehydroascorbic acid, and L-ascorbic acid in the same tissues extract by the 2,4-dinitrophenyl hydrazine method. *J. Biol. Chem.*, 174: 201—208.
 22. STARK, G. R., and C. R. DAWSON. 1962. On the accessibility of sulfhydryl groups in ascorbic acid oxidase. *J. Biol. Chem.*, 237: 712—716.
 23. 玉山誠一・原田順厚・岡本辰夫. 1973. リンゴ果実 Calville Blanc 中の L-Ascorbate の代謝に関する研究. 弘大農報., 21: 82—95.
 24. YAMAGUCHI, M., and M. A. JOSLYN. 1952. Purification and properties of dehydroascorbic acid reductase of peas (*Pisum sativum*). *Arch. Biochem. Biophys.*, 38: 451—465.
 25. 山内直樹・南出隆久・緒方邦安. 1975. 果実，そ菜のアスコルビン酸に関する生理化学的研究(第2報) 低温障害発生時におけるアスコルビン酸の挙動について. 園学雑. 44: 303—307.
 26. 山内直樹・南出隆久・緒方邦安. 1975. 果実，そ菜のアスコルビン酸に関する生理化学的研究(第5報) 青果物の黄化時におけるクロロフィルとアスコルビン酸の関係について. 園芸学会研究発表要旨(昭和50年度秋季大会): 448—449.