

スケトウダラ塩ずりみの坐りにおけるミオシン重鎖交差結合反応に及ぼす塩化カルシウムの影響

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	佐伯,宏樹 尾崎,弘忠 野中,道夫 関,伸夫 新井,健一
発行元	日本水産學會
巻/号	54巻2号
掲載ページ	p. 259-264
発行年月	1988年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



スケトウダラ塩ずりみの坐りにおけるミオシン重鎖
交差結合反応に及ぼす塩化カルシウムの影響^{*1}

佐伯宏樹, 尾崎弘忠, 野中道夫, 関伸夫, 新井健一

(1987年10月29日受理)

Effect of CaCl₂ in Frozen Surimi of Alaska Pollack on Cross-linking of
Myosin Heavy Chain in Salted Paste from the Same Material

Hiroki Saeki,^{*2} Hirotada Ozaki,^{*2} Michio Nonaka,^{*2}
Nobuo Seki,^{*3} and Ken-ichi Arai^{*3}

Five kinds of frozen surimi containing varied concentrations of CaCl₂ (0-50 mmol/kg) were prepared from Alaska pollack. The surimi was ground with 3% NaCl at the temperature below 8°C for 10 min. The salted paste thus obtained was incubated at 15°C or 30°C to induce setting (SUWARI). During the incubation, breaking stress (BS), solubility of protein in a medium containing SDS-urea-2-mercaptoethanol, and subunits composition of the soluble protein by SDS-PAGE were measured.

As a result, it was shown that the BS of the paste hardly increased and the protein in the paste remained fairly soluble with a setting at 15°C. On the other hand, at 30°C, the BS of the paste increased significantly and the protein in the paste turned into insoluble. In addition, the rate of decrease in myosin heavy chains (HC) in the pastes indicated that a cross-linking reaction of HC strongly occurred at 30°C but not at 15°C.

It was further found that the highest rates of increase in BS as well as of decrease in HC were obtained with the salted paste from the surimi containing 10-20 mmol CaCl₂ per kg. Decrease in HC in the paste containing 10 mmol CaCl₂ proceeded three times faster than that of the paste without CaCl₂.

These results indicate that CaCl₂ in the salted paste may enhance the gel (KAMABOKO) formation by acceleration of cross-linking reaction between myosin HCs.

魚肉すりみ製造時の晒用水に塩化カルシウムを添加するいわゆるカルシウム晒法では、カルシウムが脱水工程と塩ずり加熱工程の両方に影響を及ぼす可能性が考えられる。先に筆者らは、カルシウム晒しの作用原理について研究をおこない、カルシウムが魚肉の保水能と温度安

定性に及ぼす影響を魚種間で調べ、その相違について報告した。^{1,2)} また、カルシウム晒法が冷凍すりみの品質に及ぼす影響に関する研究としては、サバ、イワシ等の赤身魚、^{4,5)} サメ類、⁶⁾ ソコダラ類⁷⁾のすりみについての報告が見られる。しかし、塩ずり肉の坐りにおけるゲル

*1 本研究の概要は昭和 61 年度日本水産学会秋季大会にて報告した。

*2 大洋漁業(株)大洋研究所 (Taiyo Research Laboratory, Taiyo Fishery Co., Ltd., Tsukishima 3, Chuo, Tokyo 104, Japan).

*3 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

略語: SDS, Sodium Dodecyl Sulfate

TCA, Trichloroacetic Acid

SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

*4 志水 寛, 西岡不二男: 多獲性赤身魚の高度利用技術開発に関する総合報告書, 水産庁研究部, 1982, pp. 170-177.

*5 是枝 登: 昭和 56~57 年度未利用魚食用化技術開発研究成果の概要, 水産庁研究部, 1983, pp. 185-193.

*6 西 紘平, 高橋 玄夫, 野俣 洋, 鳥谷部 憲夫, 中村 全良: 昭和 56~57 年度未利用魚食用化技術開発研究成果の概要, 水産庁研究部, 1983, pp. 185-193.

*7 山内寿一, 村井裕一, 長谷川幸雄: 第 14 回水産物利用加工試験研究全国会議資料, 水産庁研究部, 1980, pp. 57-59.

化反応に及ぼす影響については, 若干の報告があるものの,^{3,4),*8,*9} まだ充分な検討がされていない。

近年沼倉らは,⁵⁾ スケトウダラ肉糊の坐りの分子機構について研究を行い, 坐り反応がミオン種鎖 (HC) 間の交差結合反応であることを明らかにした。そこで本研究では, 種々の濃度の CaCl_2 溶液で水晒しを行ってカルシウム含量の異なるスケトウダラ冷凍すりみを調製し, 坐りゲル形成時のミオン HC の交差結合反応速度を調べることにより, 晒し工程で添加されたカルシウムが, 魚肉ゲル形成の過程に及ぼす影響を明らかにしようとした。

実験方法

冷凍すりみの調製 ベーリング海にて漁獲されたスケトウダラ Alaska Pollack, *Theragra chalcogramma* から, 常法³⁾ により, 水晒し, 脱水工程を経た後, ショ糖 4%, ソルビトール 4%, 重合りん酸塩 0.3% を混合し, 冷凍すりみを得た。この際, 水晒しには, 清水と種々の濃度の CaCl_2 溶液を用い, カルシウム含量の異なる冷凍すりみ (以下カルシウム処理すりみ) を調製した。これら試料は, -30°C で 5~8 カ月間貯蔵した後, 品質判定の実験に供した。

冷凍すりみの成分分析 冷凍すりみの水分の定量は, 恒量乾燥法 (105°C)⁶⁾ を採用した。また, タンパク質含量は, ケルダール法⁷⁾ によって定量した全窒素量に, 6.25 を乗じて算出した。

冷凍すりみ中のカルシウム含量の測定 原子吸光分析法^{7,8)} によって測定し, 冷凍すりみ 1 kg あたりに含まれるカルシウムの mmol 数 (mmol/kg of surimi) で表示した。

坐りゲルの調製と物性の測定 冷凍すりみを解凍後, 3% NaCl を加えて塩すり, らい漬をおこない (すり上がりの品温は $5\sim 7^\circ\text{C}$ であった), 折り径 25 mm の塩化ビニリデン製ケーシングに充填し, 15°C または 30°C で加熱して坐りゲルを調製した。ゲルの物性は, レオメーター (不動工業 (株) 製, モデル NRM-2003J) で, 直径 5 mm の球状プランジャーを用い, 進入速度 6 cm/min で, 押し込み強度 (g) を測定した。

ゲルの可溶化と可溶化率の算出 沼倉らの方法⁵⁾ に準じ, 細切した坐りゲル 70 mg に, 5 ml の 2% SDS-8M 尿素 -2% 2-メルカプトエタノール -20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液 (以下可溶化液と称する) を加え, ウルトラディスペーサー (ヤマト科学 (株) 製, モデル LK-21)

Table 1. The contents of moisture, protein and calcium in frozen surimi from Alaska pollack.

Five kinds of Alaska pollack frozen surimi containing varied contents of CaCl_2 , designated as A (control), B, C, D and E were prepared by washing the fish mince with water containing various concentrations of CaCl_2 .

The moisture content was measured by the drying method at 105°C . The protein content was measured by the kjeldahl method. The calcium content was determined by atomic absorption method.

Sample	Calcium*	Moisture (%)	Protein (%)
A (control)	0.6	75.7	16.1
B	5.6	76.3	15.3
C	9.2	73.1	18.6
D	19.6	72.7	19.0
E	48.8	73.7	18.0

* mmol/kg of surimi.

でホモジナイズしたのち, 100°C で 2 分間加熱後, さらに室温で 22 時間攪はん可溶化した。可溶化した溶液は, $10000\times\text{g}$ で 20 分間遠心分離して上清液を得, 遠心分離前の全タンパク質量に対する量比を可溶化率 (%) として算出した。

可溶化液中のタンパク質濃度は, 試料に等量の 15% TCA を加え, 30 分放置後, $2100\times\text{g}$, 20 分の遠心分離によって得た沈殿を, 1 N NaOH に溶解した後, ビウレット法⁹⁾ により比色定量した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるすりみ中のタンパク質サブユニット成分の定量 前述の可溶化液を, Laemmli の方法¹⁰⁾ により, 5% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動に供した。泳動後のゲルは, 0.25% Coomassie brilliant blue R で染色後, 脱色を 50% メタノール -7% 酢酸で 6~8 時間, 次いで 7% 酢酸でバックグラウンドが完全に透明になるまでおこなった後, 各タンパク質成分のバンドを, デンシトメーター (島津製作所製, 二波長クロマトスキャナ CS-910) により, 640 nm と 700 nm の染色強度の差として測定した (可溶化率が異なる試料の定量については, 後に詳述する)。

結果

カルシウム晒しがすりみの坐りゲル形成に及ぼす影響種々の濃度の CaCl_2 溶液で水晒しをおこなって作成した 5 種類 (A, B, C, D, E で表示) のスケトウダラ冷

*8 飛嶋千尋, 猪上徳雄, 秋場 稔: 塩化カルシウム晒しにおけるコイ筋原繊維の挙動, 昭和 53 年日本水産学会春季大会公演要旨集, 202 (1978)

*9 猪上徳雄, 上野雄平, 秋場 稔: 魚肉のゲル弾性に対する塩化カルシウムの効果, 昭和 53 年日本水産学会秋季大会公演要旨集, 174 (1978)

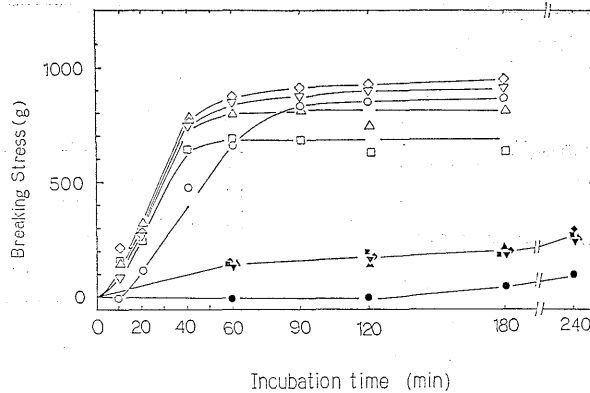


Fig. 1. Relation between CaCl_2 content of frozen surimi and change in gel strength of salted paste from the same material during incubation.

Five kinds of frozen surimi (A, B, C, D and E) shown in Table 1 were ground with 3% NaCl at the temperature below 8°C for 10 min. The fish pastes thus obtained were stuffed into polyvinylidene casing ($\phi 3 \times 18$ mm) and incubated at 15°C (closed symbols) or 30°C (open symbols) for various periods to induce the setting (SUWARI). The setting gels were sliced into 30 mm thickness and their breaking stress were measured by a rheometer equipped with a plunger of 5 mm in diameter at a speed of 6 cm/min.

Symbols are as follows: A (\circ , \bullet), B (∇ , \blacktriangledown), C (\diamond , \blacklozenge), D (\triangle , \blacktriangle), E (\square , \blacksquare). The calcium contents of samples assayed were shown in Table 1.

凍すりみの水分、タンパク質、カルシウム含有量を Table 1 に示した。これらを塩ずりし、成型後、 15°C および 30°C で加熱し、経時的に押し込み強度を測定して、坐りゲル形成におよぼすカルシウムの影響を調べ、その結果を Fig. 1 に示した。

まず 30°C の場合、試料 A (対照) は加熱 10 分後にはまだ肉糊のまま、押し込み強度は測定できなかった。その後ゲル化の進行とともに押し込み強度が増加し、90 分後には 850 g に達し、以後変化しなかった。一方、試料 B~C は加熱 10 分後に既に坐りゲルを形成しており、押し込み強度は 60 分後まで増加を続けたが、その後の増加は非常に緩やかになり、試料 B~D は 800~950 g に達した。また、最もカルシウム含量の高い試料 E も、試料 B~D と同様にすみやかにゲル化した。押し込み強度は最も水分含量が低いにもかかわらず約 700 g に達したのみであった。次に 15°C の場合、試料 A (対照) は加熱後 120 分まで全く坐りゲルを形成せず粘ちょうな肉糊の状態であり押し込み強度の測定はできなかった。また試料 B~E はいずれも速やかにゲル化し、カルシウム晒しによって坐りの進行が速められるのが観察された(しかし、押し込み強度は約 200 g と低い値にとどまっていた)。ただし、本測定条件では、カルシウム含有量の異なる試料間で押し込み強度の差は認められなかった。以上のようにいずれの温度でも、試料 B~E は試料 A に比べ速やかに坐りゲルを形成することが認められた。

SDS-尿素-メルカプトエタノール溶液による坐りゲルの可溶化 上記と同様に、 15°C または 30°C で肉糊を加熱して坐らせ、経時的に可溶化液で溶解してその可溶化率を測定し、結果を Fig. 2 に示した。まず、 30°C で坐らせた場合、試料 A のゲルは容易に溶解し、長時間の坐り後にはやや不溶化するが、可溶化率は 92~99% を示した。一方、試料 B~E のゲルは、坐りの進行に伴い可溶化率が明らかに低下した。すなわち、カルシウム処理すりみから形成された坐りゲルの可溶化率は、カルシウム含量に係わりなく、いずれも坐り時間が 30~60 分の後に約 50% まで速やかに低下し、さらに最小値が 30~45% まで達した。一方、 15°C で坐らせた場合には、可溶化率の低下はほとんど認められず、いずれの試料もその 95~99% が溶解した。

可溶化した坐りゲル中のタンパク質サブユニット成分の経時変化 前述のように可溶化した坐りゲルの一定容量を SDS ゲル電気泳動分析に供し、結果を Fig. 3 に示した。これは 30°C における試料 A と試料 B の坐りゲル中の、ミオシン HC とアクチンの染色強度の経時変化を示したものである。それぞれの成分の染色強度は、加熱前の各試料(可溶化率 100%)中のアクチンの染色強度に対する相対染色強度で示した。その結果、いずれの場合も試料中のアクチンの染色強度は、加熱時間や可溶化率には係わりなく、一定の値を示した。これは、坐りゲルの可溶化率が変化しても、その中のアクチンは完全に

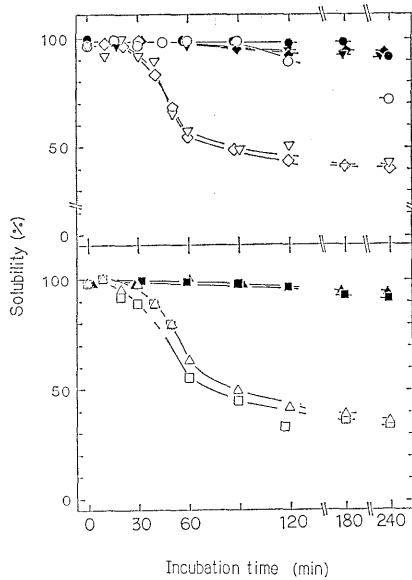


Fig. 2. Effect of CaCl_2 in frozen surimi on solubility of protein in salted fish paste from the same material in SDS, urea, and 2-mercaptoethanol medium.

The setting gels were prepared as in Fig. 1. Each 50 mg of the gels was homogenized by using a disperser with 5 ml of a medium containing 2% SDS, 8 M urea, 2% 2-mercaptoethanol, and 20 mM Tris-HCl (pH 8.0). After heating at 100°C for 2 min, followed by stirring at 20°C for 22 h, the mixture was centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min at room temperature, and the supernatant was mixed with the same volume of 15% TCA. After keeping 1 h at room temperature, the precipitate was collected by centrifugation at $2,100 \times g$ for 20 min. The precipitate thus obtained was dissolved with 1 N NaOH and protein concentration was determined by the biuret method.

The solubility was expressed as the ratio (%) of protein content in the supernatant, taking total content of those in supernatant plus precipitate as 100. Symbols used are the same as in Fig. 1.

溶解していることを示している。また、試料の総染色強度は、可溶化率の低下に伴って減少したが、(総染色強度)÷(可溶化率)は常に一定の値を示したので、可溶化したタンパク質成分はそのほとんどがゲル中に泳動したことを示唆している。これらの結果は、試料 C~E でも全く同様であった(結果は図示しない)。そこで、以下の実験では可溶化した試料はいずれも一定容量を電気泳動分

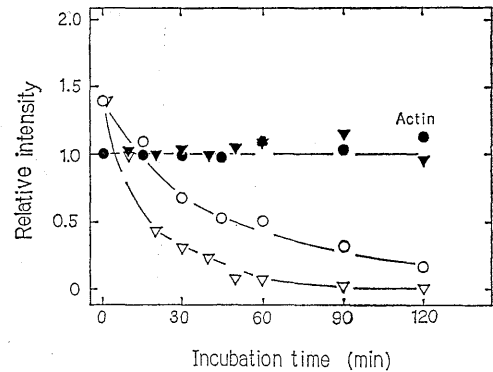


Fig. 3. Changes in the relative content of myosin heavy chain and actin in salted fish paste during incubation.

The setting gel prepared from the frozen surimi (samples A and B) as in Fig. 1, was solubilized with SDS-urea medium as described in Fig. 2. Each $5 \mu\text{l}$ of solubilized protein was loaded on 5% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS. SDS-PAGE was conducted by the method of Laemmli. The intensities of myosin heavy chain (MHC) and actin were determined by measuring the absorbance of protein bands at 640 nm. The relative intensities of MHC and actin were calculated as follows:

$$\text{Relative intensity} = \frac{(\text{Intensity of each protein band})}{(\text{Intensity of actin in unsalted surimi})}$$

sample A: actin (●), myosin heavy chain (○)

sample B: actin (▼), myosin heavy chain (▽)

析に供し、ミオシン HC はアクチンに対する相対染色強度で示すことにした。なお、いずれの場合にもミオシン HC の減少に対応するような易動度の大きい低分子成分の出現は全く認められず、⁹⁾ 泳動ゲルの上部に停滞して泳動しない高分子成分が存在することが観察された。

この方法によってミオシン HC の経時変化 (Fig. 3) を見ると、ミオシン HC は坐りに伴って減少するが、その減少はカルシウム処理すりみの肉糊のほうが速やかに進行することを示した。そこで、 15°C と 30°C で坐らせた試料 A~E の肉糊について、経時的にミオシン HC の量を測定し、それぞれの変化を Fig. 4 に示した。

坐りゲル中のミオシン HC の減少が一次反応に従って進行する事実は、既に西本ら^{*10)}によって報告されているが、カルシウム処理すりみの場合も同様に一次反応に従って進行することを認めた。そこで、試料 A と試料

*10 西本慎一郎・松田宏之・橋本昭彦・関 伸夫・新井健一: 坐り中のミオシン重鎖の変化に及ぼす諸要因の影響, 昭和 61 年日本水産学会春季大会公演要旨集, 807 (1986)

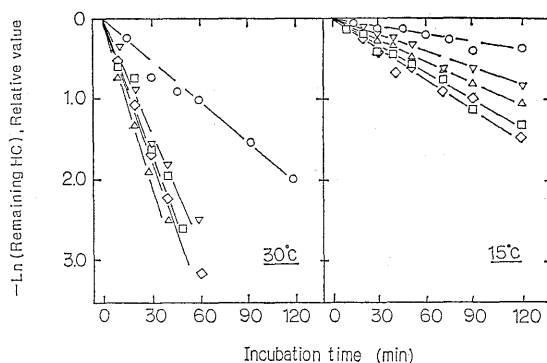


Fig. 4. Effect of CaCl₂ in frozen surimi on the rate of decrease in myosin heavy chain content in the salted paste from the same material during incubation at 30°C or 15°C. The solubilization of setting gel in the SDS-urea medium was conducted as in Fig. 2. The SDS-PAGE of the solubilized protein and determination of relative intensity of MHC were conducted as in Fig. 3. The logarithm of relative intensity of myosin heavy chain was plotted against incubation time. Symbols used are the same as in Fig. 1.

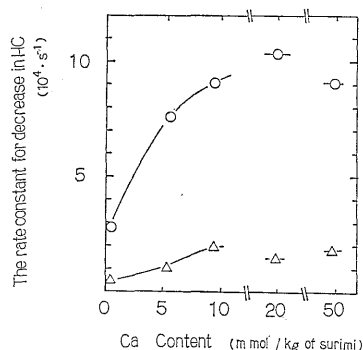


Fig. 5. Relation between the rate constant for decrease in myosin heavy chain in setting gel and calcium content in the frozen surimi.

Calcium content in frozen surimi was shown in Table 1. The rate constant for decrease in myosin heavy chain in the setting gel was calculated by the first order kinetics from the data shown in Fig. 4.

(○) setting at 30°C. (△) setting at 15°C.

B~E を比較すると、カルシウム処理すりみのほうがミオシン HC の減少が速やかに起こることが観察された。すなわち、まず 30°C の場合、試料 A では坐りゲルの押し込み強度が最大に達する 90~120 分後には 70~85% のミオシン HC が消失しており、また 3~5 時間後にはその 93% が消失していた。一方、試料 B~E では、その減少は著しく速く、いずれの試料の場合も、坐りゲルの押し込み強度が最大に達する 60~90 分後にミオシン HC の 95% 以上が消失しており、両者の変化は良く対応していた。次に 15°C の場合も、カルシウム処理すりみのほうが、ミオシン HC の減少が速やかに起こることが示されたが、30°C の場合に比べ、A と B~E の速度

の差が小さかった。

そこで、この減少速度 (K) を、ミオシン HC の交差結合反応の速度とみなし、Fig. 4 の直線の傾きから求め、試料中に含まれるカルシウム含量との関係を Fig. 5 に示した。その結果によると、15°C と 30°C のいずれの場合においても、すりみ中のカルシウム含有量の増加に伴って肉糊中のミオシン HC の減少速度 (K) の増加が起こることが明瞭であり、たとえば、試料 A (対照) に比べて、約 10 mmol/kg of surimi のカルシウムを含む試料 C の K は、30°C 坐りの場合で約 3 倍、15°C 坐りの場合で約 2 倍の加速が起こることが示された。また、カルシウム含有量が 20 mmol/kg ではほぼ最大の K に達することも示されている。

考 察

先に著者らは、カルシウム晒法が魚肉の保水能の低下 (脱水工程の効率化) に寄与する一方、筋原繊維タンパク質の温度安定性の低下をもたらす事実を明らかにした。^{1,2)} 本研究では、さらに、冷凍すりみの製造工程で採用されたカルシウム晒法が、ねり製品を製造する際の坐りの工程でどのような影響を及ぼすかについて検討した結果、重要な働きをしていることが示された。

まず、肉糊の坐りに伴うゲル形成を検討すると、カルシウム晒しを行ったすりみの肉糊では速やかに坐りゲルを形成することが示された。また、その SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析の結果によると、ミオシン HC の減少速度の増加が起こることも認められた。すなわち、晒工程で使用されたカルシウム (CaCl₂) は、坐りゲルの形成に寄与するミオシン HC の交差結合反応 (多量体の形成反応を反映している) を促進することが強く

示唆された。たとえば, 10 mmol/kg of surimi のカルシウムを含むスケトウダラすりみの肉糊の場合, 30°C におけるミオシン HC の交差結合反応の速度は, カルシウムを含まない冷凍すりみの肉糊の速度の約3倍になった。また, カルシウムで処理したすりみを用いた 30°C における坐りゲルの SDS-尿素-2メルカプトエタノール溶液に対する可溶化率は, 坐りの進行に伴い減少するが, その減少が起こった時間は坐りゲルの押し込み強度が最大値に達する時間とよく対応していた。しかし, 可溶化率の低下にもかかわらず, SDS ゲル電気泳動上のアクチン成分の量は変化しないことが示された。この時ミオシン HC の 90% 以上が消失しており, それに相当する量の新しい成分の生成が認められないことから, 不溶化した成分は主に巨大化したミオシン HC の多量体であることが強く示唆される。これらの結果は, かまぼこゲルの形成の主体がミオシンであるという主張^{11,12)}を支持していると思われる。

30°C における試料 A の肉糊中のミオシン HC の減少量は, 3~5 時間後には 90% 以上に達し, 試料 B~E の場合は約 60 分後に同じく 90% 以上に達するので, ほとんどのミオシン HC が多量体を形成したものと判断される。それ故, カルシウムは主に肉糊中のミオシン HC の交差結合反応の初速度を大きくするように働くことが明らかであった。また, この反応を最高に促進させるのに必要なカルシウム濃度は約 20 mmol/kg of surimi であった。しかし, ミオシン HC の減少量がほぼ等しい試料 A と試料 B~E の可溶化率(たとえば, 30°C における試料 A の 120 分後と試料 B~E の 40 分後を例とする)を比較すると, あきらかに後者の可溶化率が低かった。したがって, カルシウムはミオシン HC の多量体形成の初速度だけではなく, 多量体の組成と性状にも影響を及ぼしているように思われる。また, 加熱ゲルのテクスチャーにもなんらかの影響を及ぼすと考えられるので, この点は現在研究中である。

カルシウム晒しによって, スケトウダラすりみの肉糊中のミオシンが不安定化し,²⁾ またその大部分が速やかに多量体を形成するようになることが明らかになったので, この点に留意してねり製品の加工工程を慎重に管理する必要があり, 特に坐り反応が速く進むのが特徴であ

るから, その工程の制御が必要となることが予想される。肉糊の坐り反応中に起こるミオシン HC の多量体形成の反応機構は, なお明らかではなく, またカルシウムによるその反応促進の機構も不明であるが, カルシウムがミオシン HC 分子間の結合を強めて, 多量体形成を促進させていると推定される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり, 大洋漁業株式会社製造部, 野沢三郎氏, 鶴田正則氏, すりみ製造母船社洋丸乗員諸氏及び大洋研究所, 若目田 篤博士に多大な御援助を賜わった。ここに記して感謝する。

文 献

- 1) 佐伯宏樹, 尾崎弘忠, 野中道夫, 若目田篤, 信太茂春, 新井健一: 日水誌, **51**, 1311-1317 (1985).
- 2) 佐伯宏樹, 若目田篤, 尾崎弘忠, 野中道夫, 新井健一: 日水誌, **52**, 1771-1777 (1986).
- 3) 岡田 稔: 魚肉ねり製品(岡田 稔, 衣巻豊輔, 横関源延編), 恒星社厚生閣, 東京, 1981, pp. 169-224.
- 4) 西岡不二男: 魚肉ねり製品(志水寛編), 恒星社厚生閣, 東京, 1984, pp. 62-73.
- 5) 沼倉忠弘, 関 伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩蔵, 新井健一: 日水誌, **51**, 1559-1565 (1985).
- 6) 科学技術庁資源調査会: 三訂補日本食品標準成分表, 1980, pp. 11-12.
- 7) The Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis of the Assoc. Offic. Anal. Chemists, 12th edition, Washington D. C. 1975, pp. 22.
- 8) W. Slabin: *Atomic Absorption Newsletter*, **4**, 360 (1965).
- 9) A. G. Gornall, S. S. Bardwill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 10) U. K. Laemmli: *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 11) T. Yasui, M. Ishiorosi, H. Nakano, and K. Samejima: *J. Food Sci.*, **44**, 1201-1204 (1979).
- 12) T. Akahane, S. Chihara, Y. Yoshida, T. Tsuchiya, S. F. Noguchi, H. Ookami, and J. J. Matsumoto: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 1029-1033 (1984).