

ウニ塩辛に関する研究—Ⅶ*

バフンウニ, ムラサキウニおよび
アカウニのヌクレオチド類について

河 内 正 通

Studies on "Uni-Shiokara" - VII.
The Nucleotide Composition of Fresh Sea-Urchin Gonad

By
Masayuki KŌCHI

As a series of chemical studies on "Uni-Shiokara", a kind of fermented fish paste, the fatty acid composition of lipids from its raw material, *i. e.*, sea-urchin gonad was reported in the preceding paper¹⁾. This paper deals with the nucleotide composition from the same raw material.

The acid-soluble nucleotides in the fresh raw material of three kinds, *Strongylocentrotus pulcherrimus*, *Anthocidaris crassispina* and *Pseudocentrotus depressus* were fractionated by means of an ion-exchange column chromatography.

Separated nucleotide was identified with its absorption spectrum, its elution pattern and the results obtained from the subsequent separation by a paper-partition chromatography.

The results obtained are as follows:

- 1) The major nucleotides found in fresh sea-urchin gonad were generally cytidylic, adenylic and guanylic acids. A small amount of uridylic acid, adenosine diphosphate and adenosine triphosphate was also noticed in all the samples examined.
- 2) Both 5'-cytidylic acid and 5'-guanylic acid infrequently distributed in tissues of marine animals were detected in all the samples, but 5'-inosinic acid could not be identified in any samples.
- 3) Such nucleotides as 2'- and 3'-cytidylic, adenylic and guanylic acids were found in samples in a considerable amount, in spite of their rare distribution in animal tissues.
- 4) The nucleotide contents of same species varied with specimens in a pretty large extent.

* 水産大学校研究業績 第669号, 1972年7月11日 受理.
Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 669.
Received July 11, 1972.

1. 緒 言

水産物中の 5'-ヌクレオチド類については、魚類の鮮度または加工品の呈味などとの関連から多数の報告²⁾⁻⁹⁾がある。

しかしながら、ウニのヌクレオチド類については、ムラサキウニのイノシン酸含量を測定した藤田¹⁰⁾の報告およびウニエキスの呈味成分の解明を目的とした小俣¹¹⁾の報告があるに過ぎず、新鮮な生殖巢中の酸可溶性ヌクレオチド類に関する研究は見当たらない。

そこで、ウニ塩辛のおもな原料となる 3 種のウニについて、漁獲直後の新鮮な生殖巢中のヌクレオチド類をイオン交換カラムクロマトグラフィーによって分析したので、その結果を報告する。

2. 実験方法

2・1 試料：下関市吉見町沿岸において12月中旬および1月中旬にそれぞれ採捕したバフンウニ(*Strongylocentrotus pulcherrimus*)、ムラサキウニ (*Anthocidaris crassispina*) およびアカウニ (*Pseudocentrotus depressus*) を生簀中で1ないし10時間飼育し、その中から比較的大形のもの(年齢2年ないし4年)を10ないし15個体あて選んで供試した。

2・2 ヌクレオチド類の抽出：ウニを生簀から取り出し、直ちに殻割りして生殖巢を摘出し、あらかじめ冷却しておいた10%過塩素酸溶液中に浸漬して磨砕した。さらに、これを氷冷下でよくホモジナイズしたのち、中島¹²⁾の方法にしたがってヌクレオチド類を抽出した。

2・3 イオン交換カラムクロマトグラフィー：BERGKVIST 法¹³⁾を一部改変した中島らの方法¹⁴⁾に準じて行なった。すなわち、DOWEX 1×8、ギ酸型樹脂(200~400メッシュ)を内径1cmのカラムに約6cmの高さまで充填し、85%ギ酸を約40ml流下させたのち、よく水洗した。

これにアンモニア水で pH9.4 に調整した試料抽出液を通し、ヌクレオチド類を吸着させたのち、第1および2図に示すようなギ酸およびギ酸ナトリウムからなる溶離液を1分間1mlの流速で順次流下させて、各成分を溶出させた。

2・4 ヌクレオチド類の同定：イオン交換カラムクロマトグラフィーにおける溶出位置¹³⁾¹⁴⁾、紫外部吸収曲線¹⁵⁾ならびにペーパークロマトグラフィー(以下ペーパークロマトと略す)などの結果を総合して同定した。すなわち、カラムからの溶出液のうち、波長260m μ の吸光値が最大となる画分について、それぞれ210m μ から300m μ まで10m μ 間隔に吸光度を測定して紫外部吸収曲線をとって、標準試薬を同組成の溶離液に溶解させた溶液の吸収曲線と比較して塩基の推定をした。

また、イオン交換カラムクロマトグラフィーによって分画した各画分をピークごとに集め、活性炭に吸着¹⁶⁾¹⁷⁾させたのち、水洗し、1.4%アンモニア含有50%エタノール水溶液でヌクレオチド類を再溶出させた。この液を減圧下で乾固したのち、少量の蒸留水に再溶解させた。この濃縮液の一部をとってペーパークロマトを行なった。また、残りの一部に5'-ヌクレオチダーゼ¹⁶⁾¹⁸⁾を37℃で90分間作用させたもの、または1N塩酸¹⁹⁾²⁰⁾を加えて100℃で60分間加熱したものについても同様にペーパークロマトを行なった。ペーパークロマトの溶媒¹⁴⁾としては、飽和硫酸アンモニウム溶液・n-ブチルアルコール・0.025Nアンモニア水(160:3:40)を用い、上昇法で行なった。展開後、紫外線下でスポットを検出し、同時にスポットして展開した標準試薬の R_f 値と比較した。

2・5 ヌクレオチド類の定量：カラムからの溶出液はフラクション・コレクターを用いて10mlあてに分画し、それぞれ同組成の溶離液を対照として波長260m μ における吸光度を測定し、分子吸光係数から各ヌクレオチドの含量を算出した。分子吸光係数¹⁴⁾($\text{cm} \cdot \text{M}^{-1}$)としては、アデニル酸(AMP)14,200、シチジル酸(CMP)6,200、グアニル酸(GMP)11,800、およびウリジル酸(UMP)9,900を用いた。

3. 結果および考察

12月中旬採捕したムラサキウニ（ムラサキⅠ）のヌクレオチド類のイオン交換カラムクロマトグラムを第1図に示す。同時に採捕したパフンウニ（パフンⅠ）およびアカウニ（アカⅠ）からもほぼ類似のクロマト

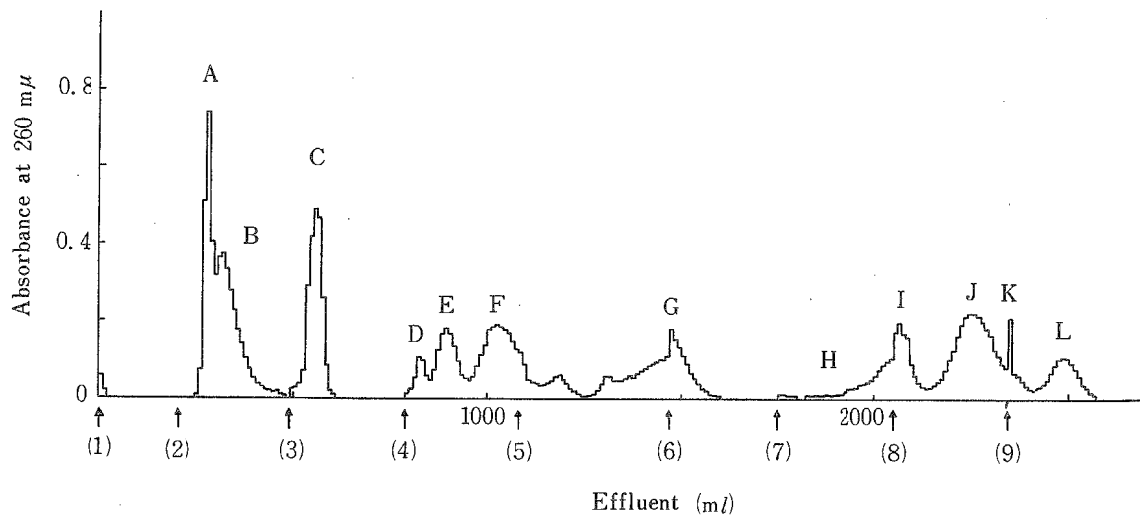


Fig. 1. Column chromatogram of nucleotides from the gonad of sea-urchin, *Anthocidaris crassispina*.

Specimen, collected on December 16, 1966 (Murasaki-I); exchanger, Dowex 1×8 (formate, 200~400 mesh), 1×6 cm; flow rate, 1 ml/min.; column temperature, 5°C~10°C

Eluting agents:

- | | | | |
|-------------------------|-------------------------|--|--|
| (1) water | | | |
| (2) 0.005 M formic acid | | | |
| (3) 0.02 M " " | | | |
| (4) 0.1 M " " | | | |
| (5) 0.1 M " " | + 0.05 M sodium formate | | |
| (6) 0.1 M " " | + 0.1 M " " | | |
| (7) 0.1 M " " | + 0.3 M " " | | |
| (8) 0.1 M " " | + 0.6 M " " | | |
| (9) 0.2 M " " | + 0.8 M " " | | |

Identity of peaks:

- | | | |
|--------------------------|-----------|-----------|
| A) nucleosides and bases | E) 2'-AMP | I) 2'-GMP |
| B) 2'- and 5'-CMP | F) 3'-AMP | J) 3'-GMP |
| C) 3'-CMP | G) 5'-UMP | K) ADP |
| D) 5'-AMP | H) 5'-GMP | L) ATP |

グラムが得られた。また、1月中旬採捕したパフンウニ（パフンⅡ）、ムラサキウニ（ムラサキⅡ）およびアカウニ（アカⅡ）では溶離液組成を一部変更して11種類で溶出を行なった。その代表的なアカⅡのクロマトグラムを第2図に示す。そのほかの試料からも類似したクロマトグラムが得られた。

分画されたおもな画分AからLの紫外吸収曲線およびペーパークロマトグラムをそれぞれ第3および4図に示す。

以上の実験結果から、下記のように各画分を同定した。

画分A：この画分の組成は試料によって多少異なったが、核酸塩基およびヌクレオシドの混合物であった

ため、正確な同定は行なわなかった。

画分B：アカIIのペーパークロマトグラム上に R_f 0.69 および 0.64の2個のスポットが確認され、 R_f 0.69のスポットは5'-CMPと一致した。両スポットとも塩酸分解後もその R_f 値は移動しなかった。また、この画分の紫外外部吸収曲線は標準5'-CMPのそれと類似しており、最大吸収波長は $279\text{m}\mu$ であった。このことから、この画分の構成塩基はシトシンであることが判明した。したがって、 R_f 0.69のスポットは5'-CMP

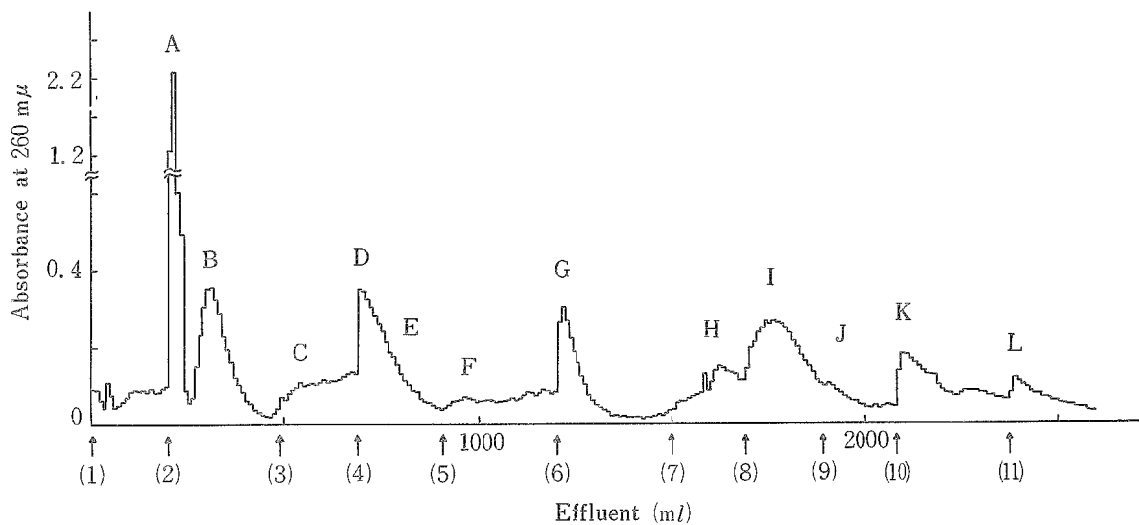


Fig. 2. Column chromatogram of nucleotides from the gonad of sea-urchin, *Pseudocentrotus depressus*.

Specimen, collected on January 19, 1968 (Aka-II); chromatographic conditions and identity of the peaks, legend as in Fig. 1.

Eluting agents:

(1)	water						
(2)	0.005	M	formic acid				
(3)	0.02	M	〃	〃			
(4)	0.05	M	〃	〃			
(5)	0.1	M	〃	〃			
(6)	0.1	M	〃	〃	+ 0.05	M	sodium formate
(7)	0.1	M	〃	〃	+ 0.1	M	〃
(8)	0.1	M	〃	〃	+ 0.2	M	〃
(9)	0.1	M	〃	〃	+ 0.3	M	〃
(10)	0.1	M	〃	〃	+ 0.6	M	〃
(11)	0.2	M	〃	〃	+ 0.8	M	〃

と同定し、 R_f 0.64のスポットは溶出位置および R_f 値から2'-CMPであろうと推定した。このクロマトグラフィーの条件では、5'および2'-CMPの分離が悪く、2'-CMPが5'-CMPに続いて溶出し、ショルダーとなったものと考えられる。

画分C：ムラサキIIの紫外外部吸収曲線からシトシン塩基をもつ化合物と推定された。また、ムラサキIのペーパークロマトの R_f 値が2'-CMPの R_f 値よりもやや小さく、塩酸分解後も変化しなかったことおよび溶出位置からこの画分の成分は3'-CMPであろうと推定した。

画分DおよびE：ムラサキIでは分離した2つのピークとなったが、アカIIでは分離していなかった。

ムラサキIから得られた画分Dのペーパークロマトでは、その R_f 値は5'-AMPと一致し、塩酸分解後の

R_f 値はアデニンと一致した。また、画分Eの R_f 値は2'-AMPと一致し、塩酸分解後のそれはアデニンと一致した。

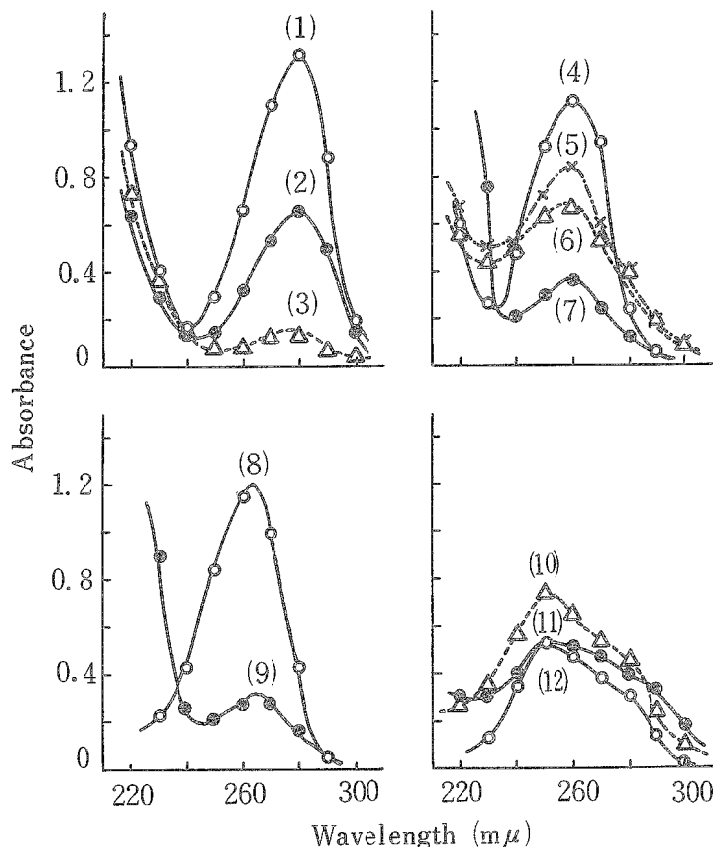


Fig. 3. Absorption spectra of authentic nucleotides and those from separated fractions.

Specimen, *Anthocidaris crassispina* (Murasaki-II) and *Pseudocentrotus depressus* (Aka-II).

Authentic nucleotides:

(1) 5'-CMP, (4) 5'-AMP, (8) 5'-UMP, (12) 5'-GMP

Nucleotides from separated fraction as below:

(2) fraction B (Aka-II) (3) fraction C (Murasaki-II)

(5) " L (Aka-II) (6) " K (Aka-II)

(7) " D (Aka-II) (9) " G (Aka-II)

(10) " I (Aka-II) (11) " H (Aka-II)

アカIIのペーパークロマトでは、 R_f 0.32 と 0.27 の2個のスポットが確認され、それぞれ5'-および2'-AMPの R_f 値と一致した。5'-ヌクレオチダーゼ処理をすると、 R_f 0.32 のスポットは消失し、新しくアデニンと一致するスポットが現われたが、 R_f 0.27 のスポットはそのまま残存した。また、これらの画分の紫外外部吸収曲線は5'-AMPのそれと類似しており、構成塩基はアデニンであることが判明した。以上の諸結果から、画分DおよびEの成分はそれぞれ5'-および2'-AMPであると同定した。

画分F：ムラサキIのペーパークロマトでは、 R_f 値が3'-AMPと一致し、塩酸分解後の R_f 値はアデニンと一致した。また、最大吸収を示す画分の E_{280} / E_{260} は0.21であった。これらの結果から、この画分の成分は3'-AMPであると同定した。

画分G：アカIIのペーパークロマトでは、5'-UMPとほぼ一致するスポットが確認され、塩酸分解後もそのスポットは存在した。また、紫外吸収曲線は5'-UMPのそれと類似し、最大吸収波長は265m μ であった。しかし、 E_{250}/E_{230} が標準5'-UMPの0.74と比べて0.79とやや高い値を示したことから、この画分に2'-UMPが少量混在しているとも考えられるが、ペーパークロマトグラム上には、2'-UMPに相当するス

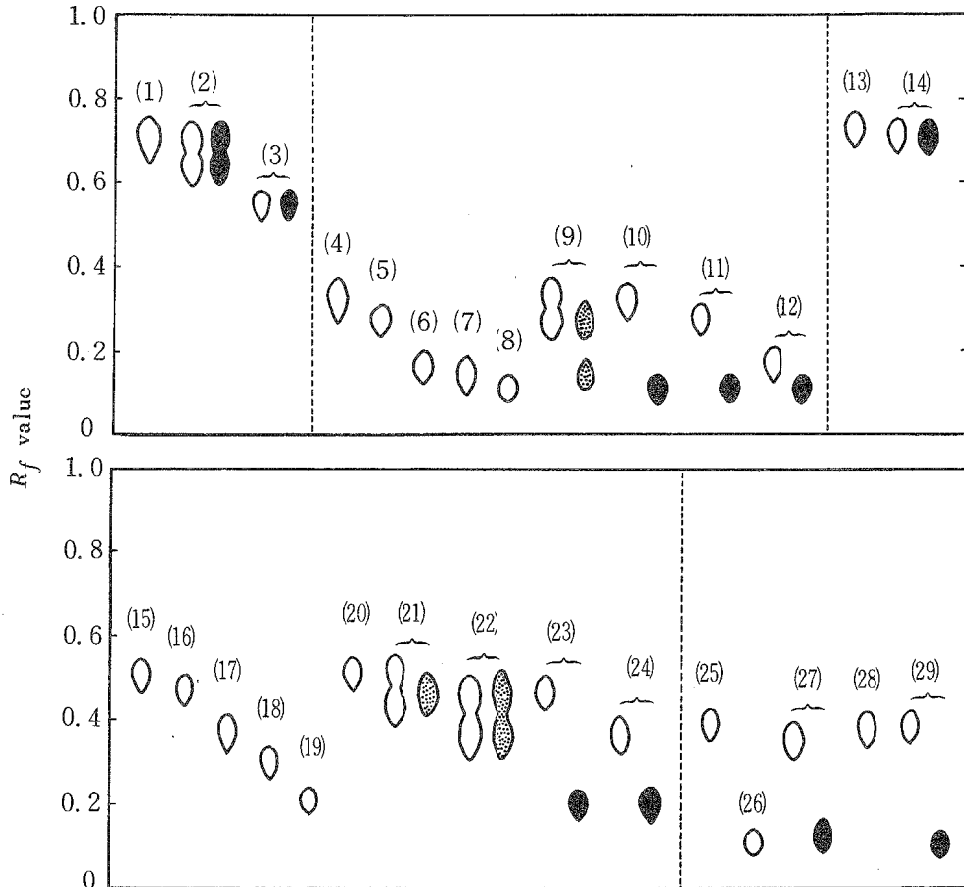


Fig. 4. Paper chromatograms of authentic nucleotides and those from separated fractions.

Specimen, *Strongylocentrotus pulcherrimus* (Bafun-I), *Anthocidaris crassispina* (Murasaki-I) and *Pseudocentrotus depressus* (Aka-I and -II).

Authentic reagents:

- | | | | |
|---------------|--------------|----------------|--------------|
| (1) 5'-CMP | (4) 5'-AMP | (5) 2'-AMP | (6) 3'-AMP |
| (7) adenosine | (8) adenine | (13) 5'-UMP | (15) 5'-GMP |
| (16) 2'-GMP | (17) 3'-GMP | (18) guanosine | (19) guanine |
| (25) ATP | (26) adenine | | |

Nucleotides from separated fraction as below:

- | | |
|-------------------------|-----------------------------|
| (2) fraction B (Aka-II) | (3) fraction C (Murasaki-I) |
| (9) " D (Aka-II) | (10) " D (Murasaki-I) |
| (11) " E (Murasaki-I) | (12) " F (Murasaki-I) |
| (14) " G (Aka-II) | (20) " H (Aka-I) |
| (21) " H (Aka-II) | (22) " I (Aka-II) |
| (23) " I (Murasaki-I) | (24) " J (Murasaki-I) |
| (27) " K (Aka-II) | (28) " L (Aka-II) |
| (29) " L (Bafun-I) | |

■, Acidic hydrolysate; ▨, enzymic hydrolysate with 5'-nucleotidase.

ポットが認められなかった。したがって、この画分の成分は5'-UMPであると同定した。

画分H：アカⅡのペーパークロマトでは、 R_f 0.51および0.47の2個のスポットが確認され、それぞれ5'および2'-GMPの R_f 値と一致した。この画分を5'-ヌクレオチダーゼ処理すると、 R_f 0.47のスポットはそのまま残存したが、 R_f 0.51のスポットは消失した。しかし、その分解生成物すなわちグアノシンに相当するスポットは確認できなかった。また、この画分の紫外外部吸収曲線は5'-GMPのそれと類似し、構成塩基はグアニンであることが判明した。

アカⅠのペーパークロマトでは、 R_f 値が5'-GMPと一致する単一のスポットのみが確認された。以上の諸結果から、この画分の主成分は5'-GMPであると同定した。

画分IおよびJ：ムラサキⅠでは両画分がほぼ完全に分画されたが、アカⅡでは分画が不完全であった。ムラサキⅠのペーパークロマトでは、画分IおよびJの R_f 値がそれぞれ2'-および3'-GMPと一致し、塩酸分解後の R_f 値はいずれもグアニンと一致した。

アカⅡから得られた画分Iのペーパークロマトでは、2個のスポットが確認され、それらの R_f 値はそれぞれ2'-および3'-GMPのそれと一致した。これらのスポットは5'-ヌクレオチダーゼ処理後も変化なく、そのまま確認された。また、この画分の紫外外部吸収曲線はグアニン塩基に特有な曲線を示した。

以上の諸結果から、画分IおよびJの成分は、それぞれ2'-および3'-GMPであると同定した。

画分K：アカⅡのペーパークロマトの R_f 値はアデノシン三リン酸(ATP)のそれよりもやや小さく、0.35であり、塩酸分解後の R_f 値はアデニンと一致した。また、紫外外部吸収曲線はアデニン塩基のそれと類似した。以上の諸結果ならびにカラムクロマトグラフィーの溶出位置から、この画分の成分はアデノシン二リン酸(ADP)であろうと推定した。

Table 1. Contents of the nucleotides in sea-urchin gonad.

(μ moles/g·fresh)

Nucleotide	Bafun		Murasaki		Aka	
	I	II	I	II	I	II
5'-CMP	1.65	0.21	2.31	1.96	1.31	0.86
2'-CMP	1.05	0.11	0.51	1.07	1.38	0.09
3'-CMP	1.95	0.22	2.30	0.21	0.58	0.10
5'-AMP	0.33	0.09	0.17	0.05	0.37	0.43
2'-AMP	1.33	0.04	0.49	0.05	1.11	0.09
3'-AMP	2.15	0.07	0.94	0.02	0.45	0.08
5'-UMP	1.20	0.02	0.71	0.02	0.53	0.40
5'-GMP	1.83	0.17	0.33	trace	1.29	0.25
2'-GMP	2.19	0.59	0.60	0.04	1.91	0.59
3'-GMP	1.66	0.15	1.40	0.07	0.96	0.19
ADP	0.05	0.54	0.24	0.14	0.29	0.25
ATP	0.87	0.20	0.40	0.29	0.31	0.15
Total	16.26	2.41	10.40	3.92	10.49	3.48

画分L：アカⅡのペーパークロマトの R_f 値はATPと一致した。また、紫外外部吸収曲線から構成塩基はアデニンであることが判明した。また、バフンⅠでは、この画分は他の画分から完全に分画されて溶出し、そのペーパークロマトの R_f 値はATPと、その塩酸分解後の R_f 値はアデニンと一致した。これらの結果から、この画分の成分はATPであると同定した。

以上の同定に基づいて、各ヌクレオチド類の含量を求めた。その結果を第1表に示す。

この表から明らかなように、ウニ生殖巣のおもなヌクレオチド類はCMP, AMPおよびGMPであり,UMP, ADPおよびATPも少量または微量存在した。しかし、イノシン酸(IMP)はいずれの試料にも存在しなかった。すなわち、水産動物肉⁷⁾での分布がほとんど知られていない5'-CMPがかなり多量に存在し、また甲殻類および貝類⁷⁾に分布することが知られている5'-UMPが少量または微量存在した。呈味性ヌクレオチドである5'-GMPはバフンIおよびアカIにそれぞれ1.83および1.29 μ moles/gとかなり多量に存在した。この量は小俣ら¹¹⁾の報告のほぼ10倍量にも達し、キノコ類⁷⁾の含量に匹敵するほどであった。しかしながら、ウニのうちで最も美味であるといわれているムラサキウニでは、むしろその含量が少なかったことから、小俣²¹⁾が述べているように5'-GMPはウニ様の呈味の発現に本質的には関与していないものと考えられる。そのほかの5'-ヌクレオチド含量は小俣ら¹¹⁾の報告とほぼ等しかった。

中尾ら²²⁾²³⁾、毛利ら²⁴⁾²⁵⁾および関²⁶⁾はそれぞれ細菌と酵母、農産物およびスルメイカ肝臓について、2'-または3'-ヌクレオチドの存在を報告しており、また、藤井²⁷⁾は乾ノリのヌクレオチド類を調べ、その90%以上は2'-および3'-ヌクレオチド類であると報告している。しかし、中島¹⁴⁾は天然物中に2'-および3'-ヌクレオチドが多量に存在することはほとんど考えられないと述べており、一般に動物肉については、その存在はほとんど報告されていない。しかしながら、ウニ生殖巣には2'-および3'-ヌクレオチドがかなり多量に存在しており、その含量は5'-ヌクレオチドよりも多かった。生殖巣という特殊な機能をもつ器官であるためかも知れないが、ウニ生殖巣は動物体のうちで2'-および3'-ヌクレオチドを比較的多量に含有する特異な例であるように考えられる。

西田ら²³⁾は海藻を常食とするアワビ筋肉に紅藻類中に広く分布しているUDP誘導体の存在を確認している。ウニ生殖巣中に存在する2'-および3'-ヌクレオチドの来源については詳細は明らかでないが、UMPでは2'-および3'-異性体の存在を確認できなかったことなどを考え合わせると、ATPならびにリボ核酸以外に、食餌となる海藻類に由来するものがかなり存在するのではないかと推測される。

以上のように、ウニ生殖巣はCMPおよびGMPを多量に含有するとともにADPおよびATPをも含有し、IMPを含有しない、しかも、2'-および3'-ヌクレオチドをかなり多量に含有するなど、かなり特異なヌクレオチド組成を有していた。しかし、全般的にその組成は魚肉⁷⁾と著しく異なり、むしろキノコ類⁷⁾²⁹⁾³⁰⁾やノリなどの海藻類²⁷⁾³¹⁾³²⁾に類似していた。

ヌクレオチド類の総含量は12月中旬採捕した試料ではいずれも比較的多かったが、1月中旬のものではいずれも少なかった。このように、同一種類のウニでも試料によってヌクレオチド類含量に著しい差異が認められ、特にバフンウニで著しかった。下関地方におけるバフンウニの産卵期は12月中旬から3月上旬であることが知られているが、このようなウニ生殖巣の成熟過程に関連した生理がこの差異のおもな原因となっているのか、生息環境条件の変化または試料中の精巣または卵巣の比率の相違などが原因となっているのかは明らかでない。

4. 摘 要

新鮮なバフンウニ、ムラサキウニおよびアカウニ生殖巣中の酸可溶性ヌクレオチド類をイオン交換カラムクロマトグラフィーによって分析し、つぎの結果を得た。

1. おもなヌクレオチド類はシチジル酸、アデニル酸およびグアニル酸であり、ウリジル酸、アデノシン三リン酸およびアデノシン三リン酸も少量または微量確認された。
2. 呈味性ヌクレオチドとしては、5'-グアニル酸が比較的多量に存在したが、5'-イノシン酸はいずれの試料にも存在しなかった。
3. シチジル酸、アデニル酸およびグアニル酸では5'-ヌクレオチドのみでなく、2'-および3'-異性体が存在した。

4. 同一種類のウニでも、試料によってヌクレオチド類含量に著しい差異が認められた。

文 献

- 1) 河内正通, 1968: 本報告, 17, 9.
- 2) 斉藤恒行, 1961: 日水誌, 27, 461.
- 3) 富山哲夫・小林邦男・北原慶子・小橋昌裕, 1966: 日水誌, 32, 600.
- 4) 藤井 豊・内山 均・江平重男・野口栄三郎, 1966: 日水誌, 32, 410.
- 5) 江平重男・姉川昌彦, 1966: 日水誌, 32, 716.
- 6) 毛利威徳・橋田 度・志賀岩雄・寺本四郎, 1965: 醸酵工学, 43, 35.
- 7) 武田薬品工業(株)食品事業部編, 1968: “リボタイド文献集”, p.91.
- 8) 小林邦男, 1966: 日水誌, 32, 166.
- 9) 新井健一, 1966: 日水誌, 32, 174.
- 10) 藤田孝夫・橋本芳郎, 1960: 日水誌, 26, 907.
- 11) 小俣 靖・江口 祝, 1962: 日水誌, 28, 630.
- 12) 中島宣郎・市川恒平・鎌田政喜・藤田栄一郎, 1961: 農化, 35, 803.
- 13) BERGKVIST, R. and A. DEUTCH, 1954: *Acta Chem. Scand.*, 8, 1877.
- 14) 中島宣郎・市川恒平・鎌田政喜・藤田栄一郎, 1961: 農化, 35, 797.
- 15) 浮田忠之進, 1965: “核酸, ヌクレオシド, ヌクレオチド”, 朝倉書店(東京).
- 16) 中島宣郎・市川恒平・吉村育子・栗山千枝子・鎌田政喜・藤田栄一郎, 1963: 農化, 37, 558.
- 17) 中尾義雄, 1963: 栄養, 食糧, 発酵外国文献会誌, 14, 324.
- 18) HEPPLER, L. A. and R. J. HILMOE, 1951: *J. Biol. Chem.*, 188, 665.
- 19) 渡辺 格・三浦謹一郎, 1966: “実験化学講座”, 23, p.317, 丸善(東京).
- 20) SMITH, J. D. and R. MAKHAM, 1950: *Biochem. J.*, 46, 509.
- 21) 小俣 靖, 1964: 日水誌, 30, 749.
- 22) NAKAO, Y. and K. OGATA, 1963: *Bull. Agr. Biol. Chem. Soc. (Japan)*, 27, 116.
- 23) NAKAO, Y. and K. OGATA, 1963: *Bull. Agr. Biol. Chem. Soc. (Japan)*, 27, 499.
- 24) 毛利威徳・橋田 度・志賀岩雄・寺本四郎, 1965: 醸酵工学, 43, 344.
- 25) 毛利威徳・橋田 度・志賀岩雄, 1966: 醸酵工学, 44, 237.
- 26) 関 伸夫, 1970: 日水誌, 36, 241.
- 27) 藤井 豊, 1967: 日水誌, 33, 453.
- 28) 西田清義・新井健一・斉藤恒行, 1965: 日本水産学会 昭和40年度秋季大会講演要旨, p.58.
- 29) 橋田 度・毛利威徳・志賀岩雄・寺本四郎, 1964: 醸酵工学, 42, 434.
- 30) 毛利威徳・橋田 度・志賀岩雄・寺本四郎, 1965: 醸酵工学, 43, 335.
- 31) LIN, T. and W. Z. HASSID, 1966: *J. Biol. Chem.*, 241, 3283.
- 32) 大山重信・小林邦男・富山哲夫, 1968: 日水誌, 34, 59.