

魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究IX.

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	川島, 孝省 新井, 健一 斎藤, 恒行
巻/号	39巻2号
掲載ページ	p. 207-214
発行年月	1973年2月

魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究—IX.

スケトウタラ冷凍すり身中のアクトミオシン定量条件の検討*

川島孝省・新井健一・斎藤恒行

(1972年10月9日受理)

Studies on Muscular Proteins of Fish—IX.

An Attempt on Quantitative Determination of Actomyosin in Frozen 'surimi' from Alaska-Pollack

Takayoshi KAWASHIMA**, Ken-ichi ARAI, and Tsuneyuki SAITO***

A fundamental study on quantitative extraction of actomyosin from frozen 'surimi' (fish paste) was made. A determination was achieved by measuring Ca^{2+} -ATPase specific activity and protein content after exhaustively extracting actomyosin from frozen surimi.

The quantitative method finally used was as follows: 10 g of mined frozen surimi was washed twice with cold 0.05μ phosphate buffer, pH 7.5. The residue was then homogenized for 3 min in 30 ml of cold 0.8 M KCl, pH 7.0 at about 6,000 rpm by homogenizer (Nihon Seiki K. K. type HB). Extraction was carried out for 2 hr after washing out homogenate by adding another 20 ml of cold 0.8 M KCl, pH 7.0. Extracted protein was collected by centrifugation at $7,000 \times g$ for 20 min and diluted by the addition of 10 volumes of cold water. The precipitated protein was collected, dissolved into 0.6 M KCl, pH 6.8, and dialyzed against the same solution. The precipitated protein which separated by centrifugation at $15,000 \times g$ for 60 min, was redissolved into 0.6 M KCl, pH 6.8 by grinding up with a magnetic stirrer ('precipitated protein' fraction). The content of protein and Ca^{2+} -ATPase specific activity in the supernatant and precipitated protein fractions were measured and the amount of actomyosin in frozen surimi could be determined as the sum of Ca^{2+} -ATPase total activity (μ moles Pi liberated/min/10 g of surimi) in both fractions.

It was suggested that the precipitated protein fraction could contain denatured forms (modified molecules) of actomyosin, since the properties of ATPase activity in the fraction were very similar to those of native actomyosin.

冷凍すり身を製造するとき、スケトウタラ筋肉中のアクトミオシンがどのような挙動を示すのかという問題は、従来加工業者を含め多くの研究者の間で興味を中心であつたように思われる。しかし、冷凍すり身を含め一般に魚肉中のアクトミオシンを定量するため、幾人かの研究者によつて採用された方法およびそれによつて得た結果は必ずしも一致していないようである。すなわち、DYER¹⁾は荒びぎした魚肉を10倍容量の0.45 M KCl-0.05 μ 磷酸緩衝液 pH 7 中で磨砕し抽出をくりかえし、水で稀釈沈澱したものをアクトミオシン量とし、また、IRONSIDE²⁾は15倍容量の氷冷5% NaCl pH 7.0-7.5で磨砕する操作をくりかえしてアクトミオシン量を測定している。これらの方法は原理的には同一ではあるが、筋肉たんぱく質を完

* 本研究は昭和46年10月、日本水産学会秋季大会において講演発表した。

** 北海道立稚内水産試験場 (On leave of Hokkaido Wakkanai Fisheries Experimental Station, Wakkanai, Horai, 4 cho-me, 5-4.

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

全に抽出するための抽出溶媒の組成, 抽出時間, 分離方法および筋肉を磨碎する方法などについては³⁾, まだ十分な検討がされているとはいえない状態で, まだ不明の点が残されているように思われる。さらに, これらの方法で得られるアクトミオシンの定量値は漠然とたんばく量をあらわすにとどまっております, アクトミオシンの質的な面を加味していないことも残されている研究課題の一つであるといえる。

そこで本研究は冷凍すり身中のアクトミオシンを, 質的な面をも考慮に入れて定量するため, 先ずその Ca^{2+} -ATPase 活性を指標に, すり身から完全抽出のための諸条件を検討し, 次いでその結果に基づいて定めた条件下で冷凍すり身の抽出液をつくり, その中のアクトミオシン量を Ca^{2+} -ATPase の全活性で表わすことを提唱するにいたつたものである。

実験方法

アクトミオシンを定量する対象試料としては, 稚内市にある冷凍すり身工場で製造された製品をドライ

Table 1. Procedure of quantitative determination of actomyosin as total Ca^{2+} -ATPase activity in frozen 'surimi' (fish paste).

10 g of minced frozen 'surimi'

- wash twice with 50 ml of phosphate buffer ($\mu=0.05$, pH 7.5)
- centrifuge at $5,000 \times g$ for 15 min

Residue

- homogenize with 30 ml of 0.8 M KCl (phosphate buffer, pH 7.0) for 3 min at about 6,000 rpm by homogenizer (Nihon Seiki K. K.)
- wash out homogenate with 20 ml of 0.8 M KCl, pH 7.0
- keep stand for 2 hr
- centrifuge at $5,000 \times g$ for 20 min

Extract

- add into 10 volumes of cold H_2O and stir
- keep stand to make precipitate down
- centrifuge at $5,000 \times g$ for 15 min

Precipitate

- dissolve into 0.6 M KCl, pH 6.8
- dialyze against 0.6 M KCl, pH 6.8
- centrifuge at $15,000 \times g$ for 60 min

Supernatant and Precipitate*

Precipitate*

- redissolve with adequate volumes (50–60 ml) of 0.6 M KCl, pH 6.8 by stirring
- filter through a layer of gauze

Filtrate ('Precipitated protein')

All operations are made in cold room.

Protein content and specific Ca^{2+} -ATPase activity in supernatant and precipitated protein fractions are measured separately and the sum of total Ca^{2+} -ATPase activities of both fractions are calculated. The amount of actomyosin in frozen surimi can be determined as total ATPase activity (μ moles Pi liberated/min/10 g of surimi).

ATPase assay; 0.060 M KCl, 0.025 M Tris-maleate, pH 7.0, 0.005 M CaCl_2 , 0.001 M ATP, and 0.2–0.5 mg/ml of protein at 25°C.

イスで冷凍したまま函館まで運搬し、 -20°C の冷凍庫に保存した。

肉質の磨砕は日本精機 K. K. 製ユニバーサルホモジナイザー HB 型により約半速 (回転目盛 2.5, 約 6000 rpm) で特に指示するとき以外 3 分間行なつた。抽出したアクトミオン溶液のたんぱく質は biuret 法により、標準たんぱく質としては bovine serum albumin fraction V を使用した。特に biuret 試薬の添加により呈色液が濁つたときは deoxycholic acid (和光純薬 K. K. 製) を少量 (5-6 mg) 添加して透明化した。この試薬は biuret 反応による発色には全く無影響であることを確かめた。

Ca^{2+} -ATPase 活性の測定は前報においても述べたが、0.060 M KCl, 0.005 M CaCl_2 , 0.025 M Tris-maleate pH 7.0, たんぱく質 0.2-0.5 mg/ml の反応液に 0.001 M ATP (最終濃度) を添加し 25°C における無機燐酸の生成量を測定し、一次反応式による反応速度から比活性を求めた。

実験結果

冷凍すり身中のアクトミオンを Ca^{2+} -ATPase の全活性として測定する標準的方法を Table 1 に示す。この方法は定量的に確立された結果であるが、この Table の中にあげられている抽出液の組成 (塩濃度)、磨砕 (ホモジナイズ) 時間、抽出液の容量、抽出時間、その他について、著者らの検討した結果を次にあげる。まず、ユニバーサルホモジナイザーによる筋肉の磨砕時間と抽出される Ca^{2+} -ATPase 全活性との関係を Fig. 1 に示す。磨砕時間は、0 から 5 分まで変えたが、これ以外は Table 1 に示されているとおりの方法によつてアクトミオンを測定した。この結果によると、磨砕時間はこのホモジナイザーの半速 (目盛 2.5) で少なくとも 3 分以上行なう必要があることがわかつた。しかし、3 分以上はいくら長時間磨砕しても抽出アクトミオン量はこれ以上に増加しなかつた。磨砕の際の過熱を防止するため、ホモジナイザー用カップ (ステンレス製) は氷冷しておき、1.5 分ずつ 2 回、その間に 0.5 分の休止時間をおいた。

次に、磨砕時間は 3 分間一定とし、このとき使用する抽出液の至適容量を検討した (Fig. 2)。すなわち、抽出液量を筋肉質重量の 5 (A), 10 (B), 20 (C), 倍容量として比較した。このとき使用する液容量の 60% を

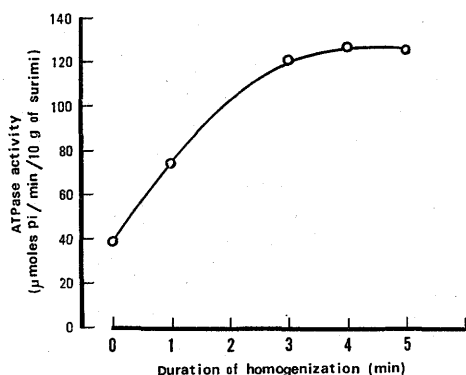


Fig. 1. Effect of duration of homogenization on extraction of Ca^{2+} -ATPase activity from frozen surimi.

Ten gram-portions of washed surimi were homogenized with 3 volumes of 0.8 M KCl, pH 7.0 for different durations.

Other experimental conditions were the same as in Table 1, except ATPase activity in 'precipitated protein' fraction was omitted.

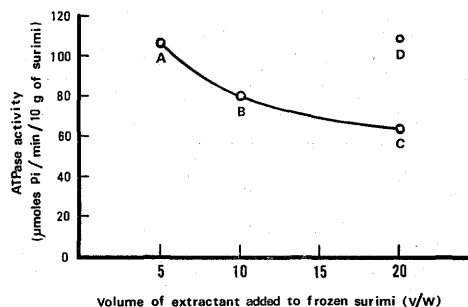


Fig. 2. Effect of volumes of extractant on extraction of Ca^{2+} -ATPase activity from frozen surimi.

Ten gram-portions of washed surimi were homogenized with 30 (A), 60 (B), 120 (C), and 30 (D) ml of 0.8 M KCl, pH 7.0 and the homogenates were washed out by adding other 20 (A), 40 (B), 80 (C), 170 (D) ml of the same solution, respectively.

Other experimental conditions were the same as in Table 1, except ATPase activity in 'precipitated protein' fraction was omitted.

ホモジナイザーカップに入れることにし、残りの 40% は磨砕した肉質を洗い出すために使用した。

この結果によれば、抽出液量が 20 倍量 (200 ml/10 g すり身) のときにかえつてアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の抽出効率が悪いという結果になつているが、これはカップの中に入れた 120 ml の抽出液量が多すぎるために、肉質の磨砕が完全によかなかつたためである。それはこのとき抽出されるたんぱく質量が少ないという結果から確かめられる。すなわち、10 g 位の冷凍すり身を完全に磨砕するには、このカップ (平均直径 5 cm, 高さ 10 cm 位) の大きさには 30 ml が最適であることが示されているのである。事実、200 ml の抽出液を使用する場合でも磨砕をまず 30 ml によつて行ない、次に残りの 170 ml で肉質を洗い出すようにすれば、アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の抽出量は正常のレベルまで増加する (D)。なお、全抽出液量が 50 ml 以下では磨砕が終つた後肉質を洗い出す際にロスを生じやすく、抽出液量が 100 ml 以上になると、この後で行なう稀釈沈澱のおり大量の蒸留水を必要とし、その上、沈澱が終るまで時間が非常にかかる。

次に、使用する抽出液の KCl 濃度と抽出されるアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase 量の関係について検討した

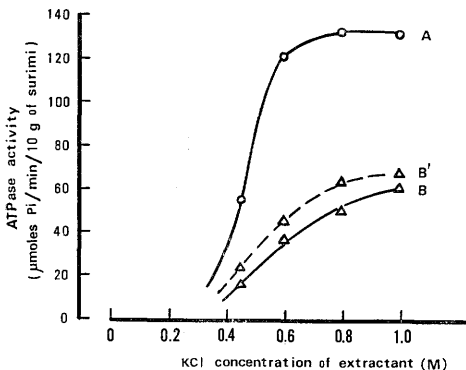


Fig. 3. Effect of KCl concentration of extractant on extraction of Ca^{2+} -ATPase activity from frozen surimi.

Ten gram-portion of washed surimi were extracted 2 hr after homogenization for 1 min (B) and 3 min (A) respectively with 3 volumes of different KCl concentration of extractant, pH 7.0. Dotted line (B') represents the sum of Ca-ATPase activities obtained by repeated extraction twice with the same manner.

Other experimental conditions were the same as in Table 1, except ATPase activity in 'precipitated protein' fraction was omitted.

アクトミオシン以外の基質たんぱく質の一部が磨砕されアクトミオシン溶液中に混つて、見かけ上は可溶化してくるようになる。したがつて肉質の磨砕の程度とアクトミオシンの可溶化との相関性は、一元的には解釈できない内容のものであるように思われる。アクトミオシンの肉質からの抽出性を論ずるには量的にだけでなく、質的にも観察することが必須であることがここにも示されているといえる。

次に、抽出時間と Ca^{2+} -ATPase の抽出量との関係を Fig. 4 に示す。この結果によると、肉質中のアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase 量の 90% は、3 分間の磨砕によつてほとんど抽出状態にあり、残りは低温 (5°C) で 2 時間放置すると完全に抽出されていることがわかる。なお、抽出を長時間続けると、抽出される Ca^{2+} -

した結果を Fig. 3 に示した。この結果によると、抽出液量が 5 倍量 (50 ml/10 g 冷凍すり身) で磨砕時間が 3 分間の場合、抽出液の KCl 濃度、pH 7.0 は 0.8 M が適当であることがわかつた。0.45 M KCl が低い値を示すのは、抽出されるたんぱく質量が少ないためで、 Ca^{2+} -ATPase 比活性はむしろ高い値であつた。この Fig. 中には対照のため磨砕時間が 1 分間の結果も示してある (B)。この場合も 0.8 M-1.0 M KCl が適当であることは同じであるが、抽出されるアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase は 3 分間磨砕の場合の約 1/2 量に過ぎなかつた。そしてその抽出残査を同条件で再抽出 (磨砕は改めて行つていない) した量を加えてもその加算量はほとんど改善されておらず (B'), アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase, 活性の抽出を完全に行うためには肉質の磨砕が重要な条件であることが Fig. 1 の結果と併せて確認された。なお、Fig. 1 に示した肉質の磨砕時間と抽出される Ca^{2+} -ATPase 量との関係を、さらに抽出されるたんぱく質量と ATPase 比活性に分けてあらわしてみると Table 2 のようになる。すなわち、抽出されるたんぱく質量は磨砕時間が 3 分間でほとんど一定値に達し、4, 5 分間はやや増加していた。一方、ATPase 比活性は磨砕時間が短い方が高く、長くなると漸減していることがわかつた。すなわち比活性は減少しているのであるから、筋肉中の

Table 2. Effect of duration of homogenization on extraction of salt soluble protein and Ca^{2+} -ATPase specific activity from frozen surimi.

Duration of homogenization (min)	Protein (mg)	Specific ATPase activity (μ moles Pi/min/mg)	Total ATPase activity (μ moles Pi/min/10 g of surimi)
0	184	0.209	38.5
1	423	0.180	76.1
3	736	0.166	122.2
4	774	0.165	127.6
5	802	0.158	126.7

From the experimental data in this table, Fig. 1 is drawn.

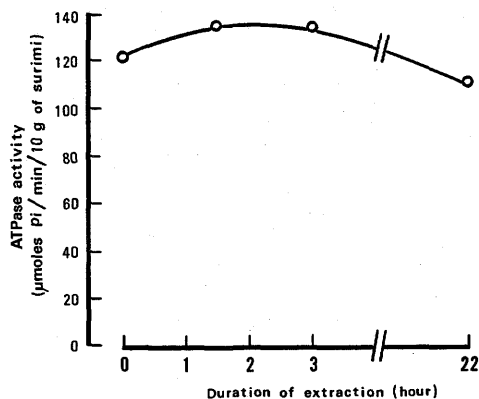


Fig. 4. Effect of duration after homogenization on extraction of Ca^{2+} -ATPase activity from frozen surimi.

Ten gram-portion of washed surimi were extracted for different durations in cold room with 5 volumes of 0.8 M KCl, pH 7.0.

Other experimental conditions were the same as in Table 1, except ATPase activity in 'precipitated protein' was omitted.

Table 3. Distribution of Ca^{2+} -ATPase activity in the supernatant and precipitated protein fractions from frozen surimi.

Fraction	Supernatant			Precipitated			Sum
	Protein	ATPase Specific activity	Total activity	Protein	ATPase Specific activity	Total activity	
Prepn.							
1	612	0.168	102.8	277	0.121	33.5	136.4
2	622	0.197	122.6	264	0.138	36.4	159.0
3	512	0.208	106.6	320	0.119	38.0	144.7

The specific and total activity of Ca^{2+} -ATPase are shown as μ moles Pi liberated/min/mg of protein and μ moles Pi liberated/min/10 g of frozen surimi, respectively. The content of protein is shown as mg/10 g of frozen surimi.

Frozen surimi was prepared by grinding with 5% of sorbitol (1), 5% of sorbitol plus 0.2% of Na-polyphosphate (2), and 5% of sucrose plus 0.2% of Na-polyphosphate (3).

ATPase 量がやや減少する傾向があるので良くない。これは抽出されるたんぱく質量は変化しないままで ATPase 比活性が減少している事実を認めたので、おそらく、ATPase そのものの変性失活のためと考えられる。事実、スケウタラ筋肉から抽出したアクトミオシン ATPase は各種の魚類アクトミオシン中でも最も不安定で、たとえ氷蔵しても一日に 10-20% 失活することを著者らは経験している。なお、Table 1 の方法によつてアクトミオシンを調製するとき、最後に得られるアクトミオシンは 15,000×g で 60 分間、遠心分離して清澄化されている。この上澄液は、当然未変性アクトミオシンとしてとりあつかわれているのであるが、このとき生ずる沈澱区たんぱく質を再度、0.6 M KCl, pH 6.8 液に攪拌溶解して(沈澱たんぱく質区分とよぶ) Ca^{2+} -ATPase 活性を測定してみると、これは上澄液の場合とほぼ同じかやや低い活性レベルを示していることがわかった。その一例を Table 3 に示した。この再溶解液を低速 3000×g, 10 分間遠心分離するとその約 90% は沈澱しない性質のものであつた。そこで、この Ca^{2+} -ATPase 活性の熱に対する安定性を検討してみると Fig. 5 のよになつて

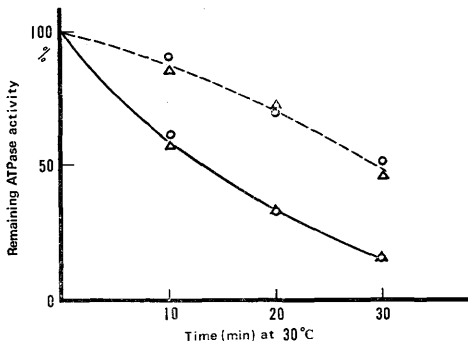


Fig. 5. Thermal inactivation of Ca^{2+} -ATPase activity in the supernatant and precipitated protein fractions.

Each 2 ml of supernatant (○) and precipitated (△) protein fractions were separately incubated at 30°C with (dotted line) and without (full line) sorbitol added. After incubation for definite duration specimen was immediately cooled by putting in ice and used for measuring Ca^{2+} -ATPase activity. Protein concentration is approximately 5-6 mg/ml in 0.6 M KCl containing 5 mM Tris-maleate buffer, pH 6.8. Weight ratio of sorbitol added to actomyosin present was 20:1.

が肉眼的に極少量であつたことと、冷凍すり身 A 級品中のこの沈澱区分における Ca^{2+} -ATPase の分布量は全量の約 20-25% 以内で、一定しており冷凍貯蔵期間などによつてそれほど大きく左右されないことが認められているので抽出条件の検討のためには一応無視して良いと考えたからである。

考 察

先に述べたように魚肉からアクトミオシンを抽出するために従来採用された方法は、原理的には高塩濃度溶液中における肉質の磨砕と稀釈沈澱による精製という基本において同一であるが、これらの方法による結果は実に千差万別である。しかし、いずれにしてもそれらの条件下でアクトミオシンが完全に溶出された証拠はないのである。

すなわち、上澄と沈澱両区分の保持している ATPase 活性は 30°C の一定温度において全く類似の安定性を示していた。一般に魚肉アクトミオシンの熱に対する安定性はその魚種毎にきわめて特徴的な性質となつていることはすでに知られているが⁴⁾、その観点からもこの沈澱区分の Ca^{2+} -ATPase はアクトミオシン由来のものと考えられる。その他両区分の ATPase は KCl 濃度に対する依存性や Ca^{2+} , Mg^{2+} などの影響なども非常に酷似していた。したがつて、肉質中のアクトミオシンを Ca^{2+} -ATPase 全活性として定量する場合には、このアクトミオシン溶液の遠心分離後の上澄と沈澱を再溶解した両区分について定量を行ない、その加算値をもつてあらわすことが必要なのであつて、事実、その表現法によつて、無塩すり身や加塩すり身中のアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の定量を行なうと、その定量値は非常に再現性も高く冷凍すり身の製造過程における筋肉たんぱく質の挙動を良く説明できるものであつた⁴⁾。

なお、本報告の中の Fig. 1 から Fig. 4 までの実験結果には、この沈澱区分 (15,000×g, 60 分の遠心分離で) 中に含まれるアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase を含んでいないのであるが、これはその量

本研究の結果によると、このとき最も重要な条件でありながら、研究者の間で意見の合致が得られなかつた点は肉質の磨砕の方法にあることがわかつたが、この至適条件はホモジナイザーの型や性能によつて異なる可能性が非常に強いから、他の研究条件をそのまま使用することは意味がないといわねばならない。抽出液の組成についても DYER らは 0.45 M KCl を使用しており¹⁾、著者らの 0.8 M KCl が最適塩濃度であるという結果と異なつているのであるが、これは DYER らが筋肉の 10 倍容量を使つたのに対し著者らは 5 倍量で行なつている事実を考えに入れれば理解されることである。採用する抽出液の塩濃度は筋肉重量の何倍容量を使用するかということを考えておくべきであろう。

肉質から高塩濃度溶液で可溶化してくるたんぱく質を従来アクトミオンと見なしていたのであるが、この定義はそれ程厳密な意味では使用できないことは良く知られている。したがつて、アクトミオンの特質を反映させることができる定量法を考えていくべきである。本方法では Ca^{2+} -ATPase を採用しているが⁵⁾、肉質の磨砕を完全に行なつて調製したアクトミオンは不透明で不純物が混入しているようである。なかでも、 Ca^{2+} -ATPase 活性に影響を与える可能性が強いものとしては筋小胞体が考えられる。筋小胞体がアクトミオン中に混在する可能性についてはすでに報じられているが^{6,7)}、これに由来する ATPase は本来 Mg^{2+} 依存性のものである。したがつて、調製したアクトミオン中に必然的に含まれている Mg^{2+} の存在を考慮したとしても、筋小胞体による本方法への妨害は非常に小さいものと考えて良いと思われる。

最後に、調製したアクトミオンの 0.6 M KCl, pH 6.8 溶液の中で、高速度 (15,000×g, 60 分) では沈澱するが低速度 (3,000×g, 10 分) では沈澱しない Ca^{2+} -ATPase について述べる。これは ATPase としての性質が未変性アクトミオンと非常に良く類似しているにもかかわらず、沈澱し易い状態にあることから、先に CONNELL⁸⁾ によつて示唆された ATPase 活性に影響を与えないままの分子会合、つまり side by side に会合したアクトミオンと考えると良いと思う。兎のミオンなどについては JOHNSON ら⁹⁾ によつて分子修飾をうけたミオンの存在が立証されているのであるが、魚肉のアクトミオンもおそらく類似の中間体を通つて変性をひきおこしていきたくらうと推定される。この沈澱し易い状態のアクトミオン区分は、特に加塩すり身中に多く定量されること⁴⁾ などこの事実を支持していると考えられる。魚肉の変性の進行中には、これらの区分が生成してくる可能性は比較的早く大きいことを予想させる報告もいくつか見られ^{10,11)}、この区分の研究を発展させることは魚肉たんぱく質の変性に関する基礎的な知見を与えるだろうと思われる。

本方法によるアクトミオンの定量の試みは、スケトウタラ冷凍すり身だけでなく、他の魚肉およびその加工品についても応用できると考えている。

要 約

冷凍すり身中に含まれるアクトミオンを定量するための基礎的条件の検討を行なつた。その結果、次の抽出方法により、アクトミオンの Ca^{2+} -ATPase 全活性を測定する方法を一つの試みとして提唱することにした。すなわち、冷凍すり身 10 g を細切し、0.05 μ 磷酸緩衝液 pH 7.5, 50 ml で 2 回洗滌した後、0.8 M KCl 磷酸緩衝液 pH 7.0, 30 ml とともにユニバーサルホモジナイザー (日本精機 K. K. 製) で約 6,000 rpm, 3 分間磨砕し、同液 20 ml で肉質を洗い出した後、冷室 (5°C) において 2 時間抽出し、7,000 ×g で 20 分間遠心分離して得た抽出液を 10 倍容量の冷蒸溜水中に静かに投入し攪拌して静置する。沈澱たんぱく質を集めて 0.6 M KCl, pH 6.8 になるように溶解し、同液に対して透析して 15,000×g で 60 分間遠心分離する。ここで得られる沈澱たんぱく質は 0.6 M KCl, pH 6.8 に溶解し (沈澱たんぱく質区とよぶ) 上澄液と同様にたんぱく質量と Ca^{2+} -ATPase 比活性を測定し、アクトミオンを Ca^{2+} -ATPase 全活性として表現する方法を提唱した。

なお、上記の沈澱たんぱく質区分はその ATPase 活性の性状が未変性のアクトミオンの場合と非常に良く類似していることから、変性したアクトミオン (分子修飾をうけたアクトミオン) と考えられる。

おわりに、すり身の製造に当つては、稚内市宗谷機船漁業協同組合総合食品工場島田静雄氏の御協力をい

ただいた。ここに記して感謝する。

文 献

- 1) W. J. DYER: in "Fish as Food" (G. BORGSTROM, ed.) Vol. 1, p. 275, Academic Press, New York (1961).
- 2) J. I. M. IRNSIDE and R. M. LOVE: *J. Sci. Food Agric.*, **9**, 597-604 (1962).
- 3) 志水 寛: *New Food Industry*, **12**, 4-8 (1970).
- 4) 新井健一: 同誌, **13**, 48-55 (1971).
- 5) I. F. PENNY: *J. Sci. Food Agric.*, **19**, 518-524 (1968).
- 6) K. MARUYAMA: *Comp. Biochem. Physiol.*, **18**, 481-487 (1966).
- 7) G. W. de VILLAFRANCA and L. K. CAMPBELL: *ibid.*, **29**, 775-783 (1969).
- 8) J. J. CONNELL: *J. Sci. Food Agric.*, **11**, 245-249 (1960).
- 9) P. JOHNSON and A. J. ROWE: *Biochim. Biophys. Acta*, **53**, 343-360 (1961).
- 10) 梅本 滋・神名孝一: 東海水研報, **65**, 81-89 (1971).
- 11) 梅本 滋・神名孝一: 同報告, **38**, 239-245 (1972).