

## 魚介類筋肉のイノシン分解酵素の特性

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	中野, 俊樹 伊藤, 恵真 中川, 孝之
巻/号	56巻4号
掲載ページ	p. 633-639
発行年月	1990年4月

魚介類筋肉のイノシン分解酵素の特性<sup>\*1</sup>

中野俊樹, 伊藤恵真, 中川孝之, 永山文男

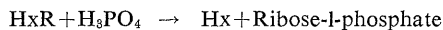
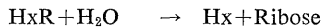
(1989年10月11日受付)

## Properties of Inosine-Decomposing Enzymes from Aquatic Animal Muscle

Toshiki Nakano,<sup>\*2,4</sup> Ema Ito,<sup>\*2</sup> Takayuki Nakagawa,<sup>\*3</sup> and Fumio Nagayama<sup>\*2</sup>

Activities of inosine (HxR)-decomposing enzymes (purine nucleoside phosphohylase and HxR nucleosidase) in the muscle of twenty four species of aquatic animals were compared. The enzyme activities in HxR accumulating species were very low. On the other hand, the activities in hypoxanthine (Hx) accumulating species were generally higher in the absence than in the presence of phosphate. Some species of plaice, squid and octopus showed relatively higher activity. The activity of common squid enzyme was the highest of the species examined. In the absence of phosphate, the pH optima of the activity of sand dab and common squid enzymes were found to be around 8.5 and 6.5, respectively. The  $K_m$  values for HxR of sand dab and common squid enzymes were  $5.72 \times 10^{-4}$  and  $1.59 \times 10^{-4}$  M, respectively. Although the sand dab enzyme was remarkably depressed by phosphate, the common squid enzyme was not affected. HxR nucleosidase of fishes was activated three times as high as the ordinary level by 0.5 mM  $Ca^{2+}$ , while the molluscan enzyme was not affected by  $Ca^{2+}$ .

魚介類筋肉では死後 ATP が分解されるが、その分解生成物は魚種により異なることが報告されている。<sup>1)</sup> つまり魚介類には ATP がイノシン (HxR) まで分解される魚種 (HxR 蓄積性魚) とヒポキサンチン (Hx) まで分解される魚種 (Hx 蓄積性魚) の 2 つのタイプが存在するのである。さらに HxR から Hx への分解は下記のごとく、加水分解かまたは加リン酸分解反応による 2 つの経路が考えられている。<sup>2)</sup>



これらの反応を触媒する酵素は、それぞれイノシンヌクレオシダーゼ (EC 3.2.2.2) とヌクレオシドホスホリラーゼ (EC 2.4.2.1) であり、すなわち HxR 蓄積性魚と Hx 蓄積性魚との違いは、筋肉中のこれらの酵素活性の相違に由来するものと思われる。しかし、HxR の分解反応に関する既往の研究の多くは分解生成物の分析値によって論じられており、分解に関与する酵素の性状について直接検討した例は、わずかに lingcod の酵素について Tarr ら<sup>3,4)</sup> の報告がみられるだけである。本研究では筋肉中の HxR 分解酵素の活性を 26 魚種の間で比較

し、さらに二、三の酵素化学的特性について検討した。

## 実験方法

**試料** 東京都中央卸売市場築地市場から購入した生鮮魚介類それぞれ 3~5 個体を購入後直ちに使用した。また一部の実験には本学養殖学研究室から提供された活魚も用いた。

**酵素の調製** 摘出した普通筋肉に 4 倍容の 50 mm グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) を加え、ワーリングブレンダーで 2 分間ホモジナイズした。次いでホモジネートを 48,000×g で 30 分間遠心分離して、得られた上清をガラスワールで濾過し、その濾液を 10 倍容の同緩衝液に対して 4°C で 4 時間、1 時間おきに換水しながら透析したものを酵素液とした。

**酵素活性の測定** Mora<sup>5)</sup>ならびに Kalckar<sup>6)</sup>の方法を一部改変して HxR 分解酵素活性を測定した。すなわち、リン酸を加えた反応系では 90 mm リン酸緩衝液 (pH 6.0, 8.0) を、リン酸を加えない反応系では 90 mm グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 6.0, 8.0) をそれぞれ用いて、その緩衝液 2.0 ml, 12 mm HxR 0.5 ml に酵素

\*1 本論文の要約は平成元年度日本水産学会春季大会において報告した。

\*2 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato, Tokyo 108, Japan).

\*3 近畿大学農学部 (Faculty of Agriculture, Kinki University, Nakamachi, Nara 631, Japan).

\*4 東北大学農学部水産利用学研究室 (Laboratory of Marine Biochemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Aoba, Sendai 981, Japan).

液0.5 mlを混合して, 37°Cで所定時間(0, 10, 20分間)反応させた後, 70%過塩素酸を最終濃度が5%になるように加えて反応を停止させた。次に, その混合液を1,900×gで10分間遠心分離し, その上清を5N水酸化カリウムで中和した。その0.5 mlに0.2 Mリン酸緩衝液1.25 mlと0.08 unit/ml キサンチンオキシダーゼ(ペーリンガー・マンハイム社製, cow milk由来)0.25 mlを混合し37°Cで30分間反応させ, 生成した尿酸量を293 nmの吸光値から求めた。活性値は, 1時間あたりの生成Hx量(μmol)を組織1gあたりに換算して示した。

薄層クロマトグラフィー(TLC) アビセル薄層プレート(フナコン薬品)を用い, 主としてブタノール・酢酸・水(2:2:1)(v/v)で室温展開した。

検出剤 糖の検出はAniline hydrogen phthalate 試薬(アニリン 930 mgとフタル酸 1.60 gを水飽和ブタノール 100 mlに溶解したもの)によった。<sup>7,8)</sup> この試薬を噴霧したプレートを乾燥後, 105°Cで5分間加熱することによりリボースは紅色のスポットを与えた。

低温の設定 300 ml容のジュワビンを用い, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KClなどの寒剤によって低温を得て, 0°C以下での実験を行なった。

## 結 果

魚種別のHxR分解酵素活性 26種の魚介類普通筋肉から調製した酵素液についてHxR分解酵素活性をリン酸の存在する反応系および存在しない反応系でそれぞれpH 6.0および8.0にて測定し, その測定値のうち活性の高い方をTable 1に載せた。尚, Table 1は魚類と軟体類についてそれぞれ活性の高い順に一括してある。カレイ類やアイナメ, ヒラメなどではリン酸が存在しない場合の活性が高く, さらにリン酸の存在下でも明らかに活性が検出された。一方, カツオ, カマスなどの魚種ではリン酸の有無によらず活性が極めて低いかあるいは全く検出されなかった。また, イカ類やマダコではリン酸の有無によらず高い活性が認められ, とくに, スルメイカ筋肉における活性が著しく高いことが特徴的であった。

HxR分解酵素反応生成物の同定 測定した26種の魚介類の中で高い活性が認められたマガレイとスルメイカの酵素について反応生成物の糖成分をセルロース-TLCにより分析し, Fig. 1に示した。マガレイではリン酸の存在しない場合には明らかにリボースが検出されたが, リン酸の存在する場合は酵素の活性が極めて低く, 反応生成物が微量のため, TLC法によっては確実な同定ができなかった。一方, スルメイカではリン酸の存在しない場合はリボースのみが, またリン酸の存在する

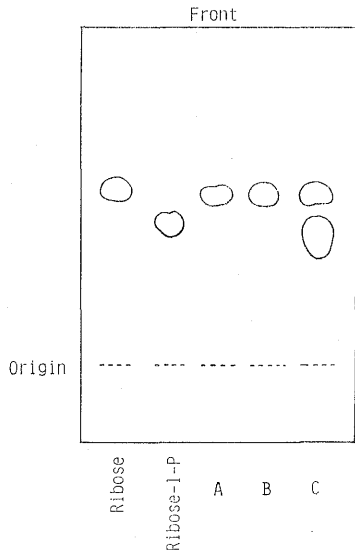
Table 1. HxR-decomposing enzyme activity of muscle from various fish and marine invertebrate species

Species	Activity (μmol/h·g muscle)	
	-Pi	+Pi
sand dab <i>Limanda herzensteini</i> (magarei)	12.2	2.4
Japanese greenling <i>Hexagrammos otakii</i> (ainame)	12.2	8.5
plaice <i>Paralichthys olivaceus</i> (hirame)	9.3	5.4
three-line grunt <i>Parapristipoma trilineatum</i> (isaki)	7.9	8.2
hairtail <i>Trichiurus lepturus</i> (tachiuo)	5.7	0.7
mud dab <i>Limanda yokohamae</i> (makogarei)	5.4	2.4
Japanese stingfish <i>Sebastes inemis</i> (mebaru)	3.9	4.3
sole <i>Lepidopsetta mochigarei</i> (asabagarei)	3.6	2.4
Tilapia <i>Tilapia niloticus</i> (terapia)	2.3	1.5
eel <i>Anguilla japonica</i> (unagi)	2.1	2.5
flyingsh <i>Prognichthys agoo</i> (tobiuo)	0.5	3.2
Pacific saury <i>Cololabis saira</i> (sanma)	0.4	4.0
Pacific herring <i>Clupea pallasii</i> (ninin)	ND	1.3
yellow tail <i>Seriola quinqueradiata</i> (buri)	ND	0.8
skipjack <i>Katsuwonus pelamis</i> (katsuo)	ND	0.6
wahoo <i>Acanthocybium solandri</i> (kamasu)	ND	0.6
chub mackerel <i>Scomber japonicus</i> (masaba)	ND	0.5
horse mackerel <i>Trachurus japonicus</i> (maazi)	ND	0.4
atka mackerel <i>Pleurogrammus azonus</i> (hokke)	ND	0.4
grass carp <i>Ctenopharyngodon idella</i> (sougyo)	ND	0.3
rainbow trout <i>Salmo gairdneri</i> (nizimasu)	ND	ND
common squid <i>Todarodes pacificus</i> (surumeika)	123	162
arrow squid <i>Loligo bleekeri</i> (yariika)	17.2	18.9
common octopus <i>Octopus vulgaris</i> (madako)	17.0	24.8
kumura prawn <i>Penaeus japonicus</i> (kurumaebi)	0.6	2.9
scallop <i>Patinopecten yessoensis</i> (hotategai)	0.3	0.4

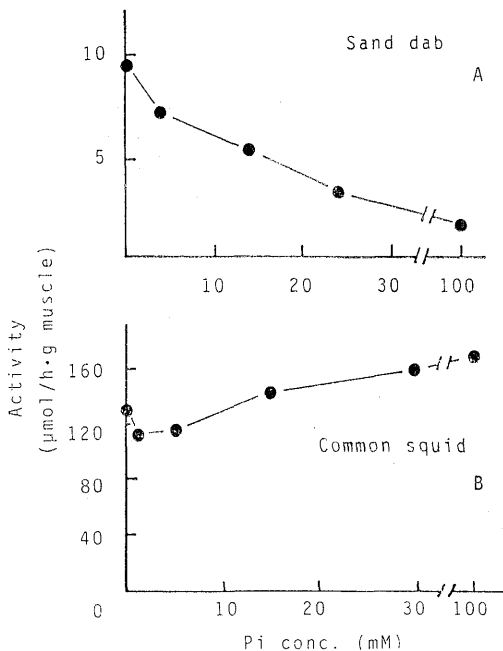
The enzyme was reacted at 37°C in the presence of phosphate (+Pi: 60 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0 or 8.0) or in the absence of phosphate (-Pi: 60 mM glycine-NaOH buffer, pH 6.0 or 8.0). Other conditions of the assay have been described in Materials and Methods.

場合はリボースとともにリボース-1-リン酸が検出された。

リン酸濃度の影響 マガレイとスルメイカの酵素について活性に及ぼすリン酸濃度の影響を検討した。マガレ



**Fig. 1.** Thin layer chromatograms of reaction mixture. Each thin layer was developed at room temperature for 2.5 h with a solvent system of butanol-acetic acid-water (2:2:1, v/v).  
 A: Reaction product of the enzyme from sand dab muscle. The enzyme reacted at 37°C in 60 mM gly-NaOH buffer, pH 8.5.  
 B, C: Reaction product of the enzyme from common squid muscle. The enzyme reacted at 37°C in 60 mM gly-NaOH buffer, pH 6.5 (B) and 60 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5 (C).

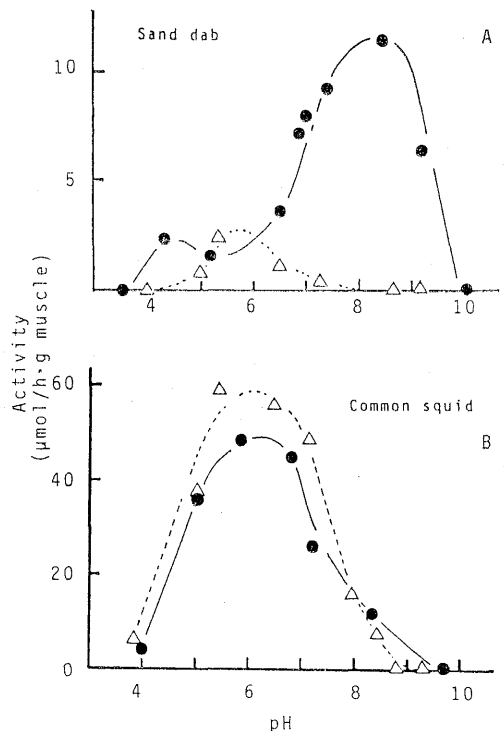


**Fig. 2.** Effect of phosphate concentration on the activity of HxR-decomposing enzyme. Assay was performed by buffer solution [0 mM phosphate: gly-NaOH, other phosphate concentrations: sodium phosphate. The enzymes of sand dab muscle and common squid muscle were reacted at pH 8.5 and 6.5, respectively.].

イではリン酸濃度の増加に伴って次第に活性が低下した (Fig. 2A) が、スルメイカの場合にはリン酸濃度の増加に伴って酵素活性も徐々に増大する傾向が認められた (Fig. 2B)。

**pH の影響** マガレイとスルメイカの酵素について活性に及ぼす pH の影響を検討した。まず、各 pH 域で使用する緩衝液を選択するため緩衝液の影響を調べたところ、種々の緩衝液成分による本酵素活性の阻害が認められた。よって、リン酸不在下の活性測定には活性の阻害が認められなかったグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液を全ての pH 域で用いた。その結果リン酸の存在しない場合、酵素の至適 pH には魚種によってかなり違いのあることがわかった。中でも Fig. 3A に示したマガレイの場合には pH 8.5 付近に最大活性がみられたほかに pH 4.0 付近にも小さなピークが現われ、二峰性を示した。一方、点線で示したリン酸存在下における活性は、pH 5.5 付近にピークがみられたもののその高さはかなり低く、また pH 8.5 付近にみられた活性のピークは著しく低下した。しかし、スルメイカの場合にはリン酸の有無によらず pH 6.5 付近にピークが認められた (Fig. 3B)。

**基質濃度の影響** リン酸のない場合の酵素活性に及ぼ



**Fig. 3.** Effect of pH on the activity of HxR-decomposing enzyme. ●: Activity in the absence of phosphate (60 mM gly-NaOH buffer), △: Activity in the presence of phosphate (60 mM sodium phosphate buffer).

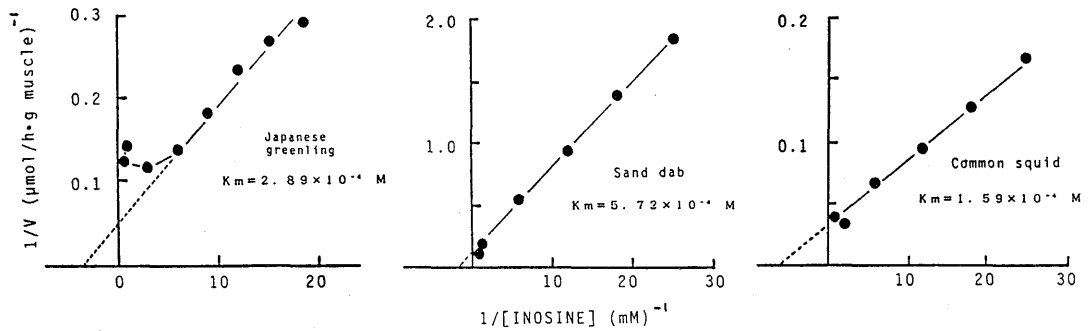


Fig. 4. Double reciprocal plot for HxR-decomposing enzyme activity. The enzymes of sand dab muscle, Japanese greenling muscle and common squid muscle were reacted at 37°C in 60 mM gly-NaOH buffer, pH 8.5, pH 8.0, and pH 6.5, respectively.

Table 2. Effect of various metal ions on the activity of HxR-decomposing enzyme

Metal ion	Final conc. (mM)	Relative activity (%)*	
		Common squid	Sand dab
None	—	100	100
K <sup>+</sup>	10	105	67
Ca <sup>2+</sup>	5	92	280
Mn <sup>2+</sup>	5	68	24
Mg <sup>2+</sup>	5	108	33
Zn <sup>2+</sup>	2.5	7	5
Cu <sup>2+</sup>	5	6	14
Hg <sup>2+</sup>	5	1	19

\* Activity in the system containing no additive was taken as 100%.

The enzymes of common squid muscle and sand dab muscle were reacted at 37°C in 60 mM gly-NaOH buffer pH 6.5 and 8.5, respectively.

す基質濃度の影響をマガレイ, アイナメおよびスルメイカの酵素について検討した結果を Fig. 4 に示す。Line-weaver-Burk プロットから基質イノシンに対する  $K_m$  (M) 値はマガレイで  $5.72 \times 10^{-4}$ , アイナメで  $2.89 \times 10^{-4}$ , スルメイカで  $1.59 \times 10^{-4}$  と算出され, いずれも  $10^{-4}$  のオーダーにあり, 比較的類似していた。なお, アイナメでは 0.2 mM 以上の基質濃度において阻害が認められた。

**金属イオンの影響** マガレイとスルメイカの酵素のリン酸不在下の活性に及ぼす各種金属イオンの影響度合いは Table 2 に示すように両者で違いがみられた。マガレイ酵素の活性は  $\text{Ca}^{2+}$  により著しく賦活され,  $\text{Mg}^{2+}$  で阻害されたが, スルメイカのそれは  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  の影響を受けなかった。マガレイの酵素活性測定反応系に EDTA を加えたところ 1 mM EDTA 存在下でその活性のほとんどが抑制され, 過剰の  $\text{Ca}^{2+}$  の添加により活性が回復することが認められた。次いで  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が酵素活性に及ぼす影響を数魚種について検討した。その結果

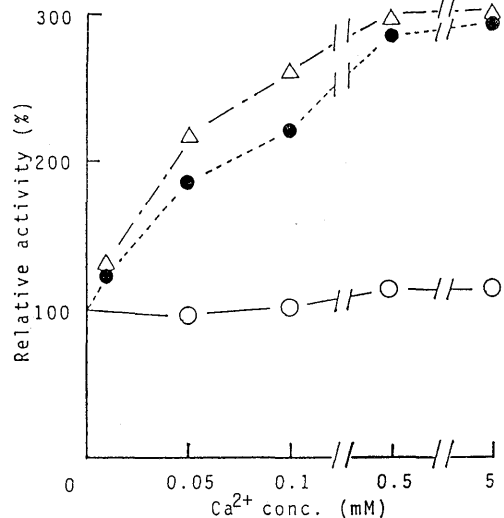


Fig. 5. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on the activity of HxR-decomposing enzyme. The enzymes of Japanese greenling muscle, sand dab muscle and common squid muscle were reacted at 37°C in 60 mM gly-NaOH buffer, pH 8.0, pH 8.5, and pH 6.5, respectively. Japanese greenling ( $\Delta$ ), sand dab ( $\bullet$ ), common squid ( $\circ$ ).

を Fig. 5 に示す。マガレイやアイナメの酵素は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加に伴いその活性も増大し, 0.5 mM 以上ではほぼ一定の値を示したが, スルメイカの酵素は  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度に関係なくほとんど影響を受けなかった。

**温度の影響** 魚肉の HxR 分解と貯蔵温度の関係を酵素的側面から把握するために抽出した酵素のリン酸不在下の活性に対する温度, とくに低温の影響を検討した。供試酵素としては他の魚種に比べ抽出後の安定性が最も高かったアイナメの酵素を用いた。活性は 40°C 付近で最大となる一方, 0°C 以下の低温域でも 20°C の 10~

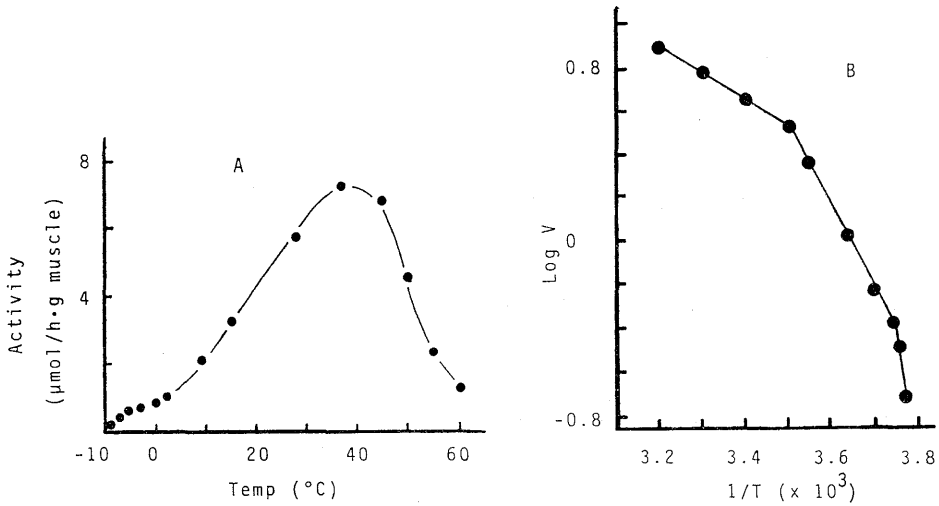


Fig. 6. Effect of temperature on the reaction rates of HxR-decomposing enzyme from Japanese greenling muscle. The enzyme was reacted in 60 mM gly-NaOH buffer (pH 8.0).

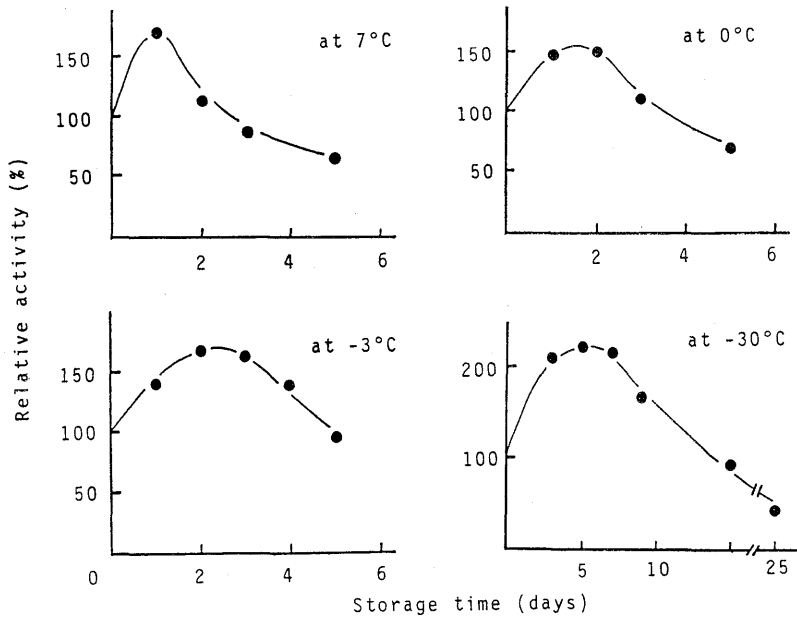


Fig. 7. Change in the activity of HxR-decomposing enzyme from sand dab muscle during storage. The enzyme was reacted at  $37^{\circ}\text{C}$  in 60 mM gly-NaOH buffer (pH 8.5).

20% 程度の活性を示した (Fig. 6A)。この結果に基づきアレウスプロットを作成したところ、 $15^{\circ}\text{C}$  および  $-6^{\circ}\text{C}$  で直線の傾きが変化した (Fig. 6B)。各温度域における活性化エネルギー (kcal/mol) は、 $15^{\circ}\text{C}$  以下で 5.41,  $-6\sim 15^{\circ}\text{C}$  で 16.3,  $-6^{\circ}\text{C}$  以下では 36.2 と算出された。

**貯蔵中の酵素の動態** マガレイフィレーを各々異なる温度で貯蔵した際のリン酸不在下の酵素活性の経時的変化を調べた。その結果を Fig. 7 に示した。 $7^{\circ}\text{C}$ 、 $0^{\circ}\text{C}$ 、

$-3^{\circ}\text{C}$ 、 $-30^{\circ}\text{C}$  のいずれの温度で貯蔵した場合でも酵素活性は保存初期にいったん上昇した後、徐々に減少する傾向を示した。さらに保存初期における活性上昇の割合は貯蔵温度が低いほど大きくなる傾向にあった。

#### 考 察

江平ら<sup>1)</sup>が区分けした HxR 蓄積性魚と Hx 蓄積性魚の普通筋肉について HxR 分解酵素活性を比較すると、HxR 蓄積性とされた魚種ではリン酸の有無によらず活

性はほとんど認められず, Hx 蓄積性とされた魚種ではリン酸のない場合の活性が高い傾向にあった。すなわち魚類筋肉の HxR 分解には加水分解酵素であるイノシンクレオシダーゼが主に関与しており, さらに HxR または Hx の蓄積性の相違は HxR 分解酵素活性の強弱によるものと推察される。この結果は, 氷蔵したヒラメ筋肉中で生成されるリボース量が Hx 量と等量であったとする江平<sup>9)</sup>の報告, および魚類筋肉中では R-1-P より遊離のリボース量が多く検出されたとする池田<sup>2)</sup>の記載とも一致している。次に, マガレイから抽出した酵素の活性のリン酸濃度の増大に伴う著しい減少は, 上述の結果を考慮すればイノシンクレオシダーゼ活性がリン酸によって抑制されたと考えられ, またスルメイカから抽出した酵素の活性の増加はリン酸により抑制されたイノシンクレオシダーゼ活性を共存するスクレオシドホスホリラーゼ活性が補っていたものと思われる (Fig. 2)。以上のことは, マガレイの酵素ではリン酸不在下で pH 8.5 付近に認められた活性のピークがリン酸存在下ではほとんど認められなくなったこと, またスルメイカの酵素ではリン酸の有無によらず pH 6.5 付近にピークが認められた pH-活性曲線からも推察できる (Fig. 3)。また結果の項には載せなかったがマガレイの酵素の活性はヒ酸によってもかなり抑制された。Lampen ら<sup>10)</sup>は *Lactobacillus pentosus* のイノシンクレオシダーゼで, Heppel ら<sup>11)</sup>はパン酵母のそれでリン酸による活性の阻害を認めている。

以上のように魚類や微生物のイノシンクレオシダーゼはリン酸やヒ酸などの 2 価陰イオンにより抑制されると推察されるが, そのメカニズムについては不明である。

HxR 分解酵素の至適 pH については, Tarr<sup>3)</sup>が lingcod 筋肉のイノシンクレオシダーゼが pH 5.5 付近に低い活性, pH 8.5 付近に高い活性を示すことを認めており, 本研究におけるマガレイ筋肉の当該酵素についての結果と似ている。しかし, *Penicillium oxalicum*,<sup>12)</sup> *Lactobacillus delbrueckii*<sup>13)</sup> および *Pseudomonas fluorescens*<sup>14)</sup> など微生物のイノシンクレオシダーゼの至適 pH はいずれも pH 5.0~6.0 で, 多くの加水分解酵素の至適 pH と同様弱酸性域にあることが報告されている。一方, 魚類筋肉のイノシンクレオシダーゼは pH 8.5 に最大活性を示したことから魚類筋肉の酵素は微生物のそれとはかなり異なるものと考えられる。

lingcod<sup>3)</sup>や *P. fluorescens* のイノシンクレオシダーゼ<sup>14)</sup>では金属イオンによる影響はとくに認められていないが, 本研究の結果では  $Ca^{2+}$  によりアイナメやマガレイの酵素で活性が著しく増大しており, 同酵素の十分な活性発現には 0.5 mM 以上の  $Ca^{2+}$  が必要とであること

が示唆された。またスルメイカのイノシンクレオシダーゼ活性に  $Ca^{2+}$  は影響を与えなかったため,  $Ca^{2+}$  は軟体類のイノシンクレオシダーゼに対しては影響もたず, 魚類のイノシンクレオシダーゼには顕著な賦活効果をもたらすものと考えられる。

マガレイ筋肉を未凍結または凍結状態で低温貯蔵するとイノシンクレオシダーゼ活性の著しい増大が認められた (Fig. 7)。Gould<sup>15)</sup>はタラ筋肉のリンゴ酸脱水素酵素が膜と結合しており凍結により著しく活性が増大すると報告している。ところで, 本研究結果よりマガレイ筋肉のイノシンクレオシダーゼはほぼ水溶性であり, Triton X-100 を使用して抽出しても酵素活性の上昇は認められなかった。つまり, マガレイ筋肉のイノシンクレオシダーゼが先に述べたタラ筋肉のリンゴ酸脱水素酵素のように膜と結合しているとは考えにくく, イノシンクレオシダーゼ活性が貯蔵によって変化する原因が少なくとも酵素タンパク質の結合状態によるものではないと考えられた。

以上筋肉抽出液について HxR 分解酵素のいくつかの酵素的性状を明らかにした。しかし実際の死後の筋肉中では pH の低下や, 無機リン酸が本酵素活性に影響を及ぼすことが考えられる。さらに同じ Hx 蓄積性魚であるヒラメの場合, 氷蔵するとその筋肉中の Hx 量は貯蔵日数に伴ってほぼ直線的に増加することが江平<sup>9)</sup>によって認められており, 魚種は異なるものの本酵素活性の貯蔵中の消長とは一致していない。またスルメイカの筋肉ではイノシンクレオシダーゼ活性が他の魚種に比べ特異的に高いことを認めたがこの生理的意義などを探るためにも, 今後, 粗酵素に含まれる HxR 分解酵素を精製単離し, それらの性質をさらに検討する必要がある。

## 文 献

- 1) 江平重男, 内山 均: 東海区水産研究所業績報, **75**, 63-73 (1973).
- 2) 池田静徳: 魚介類の微量成分 (池田静徳編), 恒星社厚生閣, 東京, 1981, pp. 32-50.
- 3) H. L. A. Tarr: *Biochem. J.*, **59**, 386-391 (1955).
- 4) H. L. A. Tarr and J. E. Roy: *Can. J. Biochem.*, **45**, 409-419 (1967).
- 5) M. Mora and J. Bozal: *Comp. Biochem. Physiol.*, **82B**, 805-813 (1985).
- 6) H. M. Kalckar: *J. Biol. Chem.*, **167**, 429-443 (1947).
- 7) 永山文男: 日水誌, **27**, 28-33 (1961).
- 8) S. M. Partridge: *Nature*, **164**, 443 (1949).
- 9) 江平重男: 東海区水産研究所業績報, **88**, 44-45 (1976).
- 10) J. O. Lampen and T. P. Wang: *J. Biol. Chem.*, **198**, 385-395 (1952).

- 11) L. A. Heppel and R. J. Hilmoe: *J. Biol. Chem.*, **198**, 683-694 (1952).
- 12) M. M. Hassan, T. A. Ghanem, T. A. Elziny, and A. M. Allam: *Ann. Microbiol.*, **33**, 83-91 (1983).
- 13) Y. Takagi and B. L. Horecker: *J. Biol. Chem.*, **225**, 77-86 (1957).
- 14) M. Terada, M. Tachibana, and O. Hayashi: *J. Biol. Chem.*, **242**, 5578-5585 (1967).
- 15) E. Gould: in "The technology of fish utilization" (ed. by R. Kreuzer), Fishing News Books Ltd., London, 1965, pp. 126-128.