膵臓 α -アミラーゼによる各種澱粉粒の分解に 及ぼす胆汁酸塩の効果

高尾文子*,**・杉本温美*・不破英次*

(昭和 52 年 10 月 1 日 受理)

Effect of Bile Salts on Degradation of Various Starch Granules by Pancreatic α -Amylase

Fumiko TAKAO*,** Yoshimi SUGIMOTO* and Hidetsugu FUWA*

* Department of Food and Nutrition, Osaka City University
(459 Sugimoto-cho, Sumiyoshi-ku, Osaka, Japan)

** Present address: Department of Hygien, Hyogo College of
Medicine (Mukogawa-cho 1-1, Nishinomiya, Hyogo, Japan)

It was revealed that bile salts had an effect on accelerating *in vitro* degradation of various starch granules by crude or crystalline pancreatic α -amylase. The effect increased with the concentration of bile salts. Sodium glycocholate (SGC) and sodium taurocholate (STC) which were the main components of bile salts increased the rate of degradation of starch granules only when they exist with both starch granules and pancreatic α -amylase. The rate of degradation of starch granules with pretreatment of SGC was not different from that of without pretreatment, also the effect of SGC was not recognized on digestion of gelatinized starch. Bile salts tended to show greater effect on the degradation of seed starch granules by pancreatic α -amylase than root starch granules. The degradation of starch granules of high amylose corn-7 (HAC-7) was accelerated about twice and that of potato was slightly accelerated by the addition of 1% SGC or STC. But there was no change in increment percentile of the rate of degradation by SGC even when HAC-7 and potato starches were heat-moisture treated, compared with respective native starch granules. Oligosaccharides produced by enzymatic reaction with SGC were not different from those without SGC. Starch granules separated from enzymatic reaction mixture with SGC showed similar shapes and surfaces to those without SGC under a scanning electron microscope.

澱粉は、その起源により物理的および化学的性質を異にするが、酵素による分解性については、一般に地上澱粉は地下澱粉より分解されやすいことが知られている。著者らは、酵素による分解性に関する諸因子を調べていくなかで^{1,2)}、*in vivo*での澱粉粒の消化に、唾液および膵液の α -アミラーゼのほか、胃酸、胆汁が関与してい

ると思われる結果を得た。

胆汁は界面活性作用を示すが、横沢ら³⁾は合成洗剤が澱粉粒の *in vitro*での消化速度増加に効果があると報告し、SANDSTEDT ら⁴⁾も澱粉粒と酵素吸着との関係で、モチトウモロコシ澱粉粒に全く吸着を示さない *Asp. oryzae* の α -アミラーゼが表面活性剤の Roccal を加えると吸着を示し、消化も増大すると報告している。また WALKER ら⁵⁾は、胆汁あるいはデオキシコール酸ナトリウムを添加することにより、澱粉粒の酵素分解性が増大することを認めている。

* 大阪市立大学生活科学部食物学科食品化学研究室
(558 大阪市住吉区杉本町 459)

** 現在、兵庫医科大学衛生学教室 (663 西宮市武庫川町 1-1)

本報では、胆汁を構成する胆汁酸塩のうち、主成分である sodium glycocholate*¹ と sodium taurocholate*² を合成し、各種澱粉粒についてブタ膵臓 α -アミラーゼによる分解の際の添加効果を調べた。さらに、効果を見わす諸条件の検討を行った。また、胃酸の影響については、澱粉粒を塩酸処理し、処理していない粒と分解性を比較した。

実験方法

1. 酵 素

市販の結晶膵臓 α -アミラーゼ (Type I-A from Hog Pancreas SIGMA), および粗酵素標品 パンクレアチン (Type VI-A from Hog Pancreas SIGMA) を用いた。両酵素ともフェノール・硫酸法⁶⁾ により呈色する夾雑物を含むので、0.002M 酢酸カルシウム液に対して、外液がフェノール・硫酸陰性になるまでセロファン膜で十分透析した。6,000 D.P.*³/1本ずつバイアルに分注し、凍結乾燥しておく。適宜水にとかし、600 D.P./ml あるいは3%粗酵素抽出液となるよう希釈して実験に供した。

2. 基質澱粉の調製

(1) ジャガイモ澱粉粒: 既報の方法²⁾ に従い調製した。

(2) ヤマノイモ澱粉粒: 既報の方法¹⁾ に従い調製した。

(3) サツマイモ澱粉粒: 市販サツマイモ (高系14号) の皮をむき、適当な大きさに切り、家庭用ミキサーで冷水を加えて摩砕する。懸濁し、80メッシュをとおして繊維を除く。沈殿を再度冷水に懸濁し、100メッシュをとおす。冷却遠心して澱粉粒を分離する。水・イソアミルアルコール混合物と振盪洗浄を数回くり返し、蛋白質を除く⁷⁾。風乾後、砕いて100メッシュをとおし試料とした。

(4) サトイモ澱粉粒: 市販サトイモ (杉本市場で購入) の皮をむき、約5mmの厚さに輪切りにする。これに2倍容の水を加え、1晩低温室に放置する。表面にできた粘質物を水洗してとり除き、スライスをミキサーで摩砕する。2~3℃, 10,000×g, 10分間冷却遠心分離し、沈殿を2~3回水洗する。まず80メッシュをとおし繊維を除き、再度145メッシュで澱粉のみをとす。これを

冷却遠心し、澱粉を分離する。サツマイモ澱粉調製の場合と同様に、水・イソアミルアルコールで振盪洗浄、風乾、100メッシュをとおし、これを試料とした。

(5) バナナ澱粉粒: 藤本らの方法⁸⁾ に準じ調製した。

(6) 高アミローストウモロコシ澱粉粒*⁴: 市販品 (敷島澱粉 (株) Amylomaize VII)

(7) トウモロコシ澱粉粒: 市販品 (日本食品化学工業 (株) 日食コーンスターチ)

(8) 小麦澱粉粒⁹⁾: 強力粉 (日清製粉 (株) カメリヤ) に0.5~0.8倍容の水を加えてよくこねる。捏粉を適当な時間放置してグルテンを十分水和膨潤させ、ナイロンクロスにとり、水中で澱粉粒をもみだす。小塊状となって流失するグルテンを除くため、16~20メッシュをとおす。得た区分を、水・イソアミルアルコールで洗浄、風乾、100メッシュをとおしてサンプルとした。

各澱粉粒は、減圧乾燥法で水分含量を測定した。

(9) アミロース: 市販 Amylose V (Avebe ジャガイモ) を用いた。0.2% 水溶液の調製には、アミロース100mg (乾物量) に水1.0mlを加え懸濁し、2N NaOH 1.0mlを加え、2~3時間放置し完全にアルカリ糊化した後、フェノールフタレインを指示薬として中和し、全量を50mlにした。

(10) 塩酸処理ジャガイモ澱粉粒: 澱粉2gに1N HCl 20mlを加え、37℃で1時間振盪、または0.01N HCl 20mlを加え、37℃で5時間振盪した。上記の処理を行った澱粉を中性となるまで十分水洗し、風乾後試料とした。

(11) SGC 前処理 HAC-7 澱粉粒: 後述 (実験方法4) の1% SGCを含む反応液と同じ組成の溶液 (ただし、酵素のかわりに水を加えたもの) で37℃、5時間強振した後、水洗をくり返して風乾した。

(12) 湿熱処理澱粉粒: 水分含量13.2%のHAC-7と水分含量15.0%のジャガイモ澱粉粒をそれぞれポリプロピレンチューブ (1.0cm×10cm) に固く詰め、空気を封じ込めないよう注意して栓をした。栓の上をアルミ箔でおおい、栓がとばないように針金をまきつけ、オートクレーブ中で120℃、30分間湿熱処理を行った。冷却してから澱粉をとり出し、100メッシュをとおした。

(13) 老化 HAC-7: HAC-7 20gを水に懸濁し攪拌しながら、終濃度1Nとなるよう3N NaOHを加えアルカリ糊化した (澱粉濃度は5%)。次に、5N HClを攪拌しながら加えていき、pH4まで下げた。1晩低温室 (5℃) に保ち、老化させた。10,000×g 10分間遠心し、沈殿を集め十分水洗して、最後にアセトンで洗浄乾燥し

*1 以下、SGC と表わす。

*2 以下、STC と表わす。

*3 dextrinizing power¹²⁾

*4 HAC-7 と表わす。

た。乳鉢で碎き、100 メッシュをとおして試料とした。

3. 胆汁酸塩の調製

市販品の SGC および STC のシリカゲル G (Wako-Gel B) 薄層クロマトグラフィーを行った。展開溶媒として *n*-ブタノール：酢酸：水=10：1：1 v/v, 発色試薬にアニスアルデヒド：濃硫酸：酢酸=0.5：1：50 v/v を用いた。この結果、市販品は粗製品であることが明らかとなり、そこからの単離精製は容易ではなかったので、LACK らの方法^{10,11)} により、胆汁酸塩の主成分である SGC と STC を合成した。融点の測定および上記の条件で薄層クロマトグラフィーを行い、合成物が純品であることを確認した。

4. 澱粉の酵素分解

澱粉 50mg, 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 0.5 ml, 0.03 M 酢酸カルシウム・0.03 M 塩化ナトリウム溶液 0.5 ml, 3% パンクレアチン 0.5 ml を含む反応液を 37°C で一定時間振盪した。胆汁酸塩を添加する反応の場合には、0.03 M 酢酸カルシウム・0.03 M 塩化ナトリウム溶液中に胆汁酸塩をとかし込んでおいた。

糊化アミロースに対する反応は、不破の blue-value 法¹²⁾ に準じて行った。

5. 反応生成物の測定

澱粉の分解性は、可溶化した炭水化物をグルコースを標準としてフェノール・硫酸法⁸⁾ で定量し、0.9 を乗じて分解率を求めた。

さらに生成グルコース量は、glucose oxidase-peroxidase を用いる比色法¹³⁾ に準じて測定した。

酵素反応により生じたオリゴ糖は、プロパノール：エタノール：水=6：1：3 の展開溶媒を用いて、下降法、多重ペーパークロマトグラフィーを行い、小林らの方

法¹⁴⁾ に準じグルコアミラーゼを作用させて、硝酸銀試薬による発色度を高めた。

反応後に残った澱粉は、既報の方法¹⁾ で走査電子顕微鏡下に観察した。

結果と考察

1. 澱粉粒の塩酸処理および胆汁酸塩添加の効果

Fig.1 に示すように、ジャガイモ澱粉粒を塩酸処理すると無処理の澱粉に比べて、いくぶん分解率は増大した。また、ラットの胃から分離したジャガイモ澱粉も、もとの粒に比べやや高い分解性を示した。BOOHER ら¹⁵⁾ や桜井ら¹⁶⁾ がボールミル処理澱粉で指摘しているように、胃から分離した澱粉粒や塩酸処理した澱粉粒の場合も、表面にできた傷が酵素による分解性を増したものと思われる。胆汁酸塩の主成分の1つである SGC をそれぞれの澱粉粒に添加すると、さらに分解率は上昇した。しかし、SGC 無添加のときの分解度を 100 としたとき、添加による分解の増加度はどの澱粉粒でも大差なく、酸処理と胆汁酸塩添加は、いずれも *in vivo* で分解をよくする方向に作用していることは考えられるが、われわれの *in vitro* の実験条件下では、効果は相加的なものであった。

2. 効果を現わす条件の検討

胆汁酸塩が澱粉粒分解を促進することがジャガイモ澱粉で確認されたので、次に種々の澱粉粒を用いて効果を現わす諸条件の検討を行った。

Fig.2 に示すように、0.1% の胆汁酸塩添加ではほとんど効果はみられない。0.1~0.5% の間で、急な分解促進効果を現わした。この結果から、添加実験は1% 濃度で行うことにした。

Fig.1. Effect of 1% SGC on degradation by crystalline pancreatic α -amylase (600 D.P.) of potato starch granules isolated from stomach of rats fed a diet containing potato starch granules and those pretreated with HCl.

Duration of enzymatic reaction: 24 hr.

* Figures in parentheses show relative susceptibility (susceptibility of respective SGC-control = 100).

Fig. 2. Effects of concentration of SGC on degradation of HAC-7 starch granules by pancreatin. Duration of enzymatic reaction: 5 hr.

Fig. 3. Effect of 1% SC, STC and SGC on degradation of heat-moisture treated HAC-7, native HAC-7, potato and corn starch granules by pancreatin.

* Duration of enzymatic reaction.

Fig. 4. Effect of bile salts on degradation of amylose solution by pancreatin.

1) 3/1,250% pancreatin, 2) 3/10,000% pancreatin.

Fig. 3 は、胆汁酸塩成分による分解促進効果を比較したものである。SC(sodium cholate), SGC, STC いずれも、胆汁酸塩を加えない場合に比べて分解は促進されるが、同濃度で添加すると、3成分とも粒に対する効果はほぼ同程度であった。

Fig. 5. *In vitro* digestion of HAS-7 starch granules with or without SGC pretreatment (by pancreatin).

Duration of enzymatic reaction: 5 hrs.

Fig. 4 は、*in vitro* での澱粉粒の酵素反応時における促進効果が、酵素タンパク質に対する胆汁酸塩の作用によるものであるかについて検討したものである。STC あるいは SGC を添加した場合の糊化アミロース分解速度は、酵素濃度に関係なく、いずれも無添加時と同じであり、界面活性作用を有する胆汁酸塩が、酵素タンパク質に作用した結果として分解促進をもたらせているのではないと考えられる。澱粉粒との反応でみられた胆汁酸塩添加による分解性の増大は、胆汁酸塩が粒と酵素との親和性を高めることにより反応を促進したものと推測される。

さらに、SGC が pH に変化をもたらすことによって分解を促進させているのではないとも考えられたので、SGC(+) と (-) の実際の酵素反応系 pH を調べた。SGC(-) で pH 7.0, SGC を添加すると pH 7.2 となった。パンクレアチンの澱粉粒分解の至適 pH が 6.0 前後である⁴⁾ ことから、胆汁酸塩添加により、むしろ至適 pH から遠ざかる方向にあり、胆汁酸塩が分解を促進させるのは、pH の変化によるものではないといえる。

Fig. 5 では、SGC が粒表面に対して不可逆的に変化を及ぼしていないかどうか確かめた。酵素を加えずに SGC(+) で前処理した澱粉粒の分解率は、(-) 処理に比べやや上昇の傾向があるが、酵素反応時に SGC を添加した効果の方がずっと大きいことから考えて、SGC の添加効果は粒と酵素が共存するときはじめて現われるものといえる。

以上、胆汁酸塩が効果を現わす諸条件を検討し、パンクレアチンによる澱粉粒の酵素分解時に分解促進をもたらすことを明らかにした。

3. 各種澱粉粒に対する SGC 添加効果

Table 1 は、澱粉粒の起源により SGC 添加効果が異なることを示したものである。上から 4 種が根茎澱粉で、下 4 種が種実澱粉である。概して、根茎澱粉より種実澱粉に対して効果が大きい傾向がみられた。しかし、根茎

Table 1. Effect of SGC on degradation of various starch granules by pancreatin.

Starch granules	Duration of enzymatic reaction	% Degradation		% Increase
		-	+	
Potato	{ 1 day	5.1	5.7	11.8
	{ 3	8.8	9.7	10.2
Yamanoimo	{ 5 hr	9.6	12.2	27.1
	{ 10	13.8	18.9	37.0
Sweet potato	{ 1 hr	14.0	16.1	15.0
	{ 2	21.1	25.6	21.3
Taro root	{ 20 min	24.3	25.4	4.5
	{ 40	31.7	32.9	3.8
Banana	{ 5 hr	7.1	8.3	16.9
	{ 10	10.8	13.5	25.0
HAC-7	{ 1 hr	8.0	15.8	97.5
	{ 5	13.9	26.6	91.4
Corn	{ 20 min	11.6	15.7	35.3
	{ 40	15.3	28.4	85.6
Wheat	{ 20 min	18.4	23.8	25.0
	{ 40	24.5	35.6	45.3

澱粉のうち分解されやすいサトイモと、逆に分解されにくいジャガイモ澱粉でいずれも効果は小さく、SGCの効果は必ずしも澱粉粒本来のもつ分解性の難易度とは関係ないようである。効果の顕著なものは、種実澱粉のHAC-7であり、SGCの添加で分解率は倍増した。

Fig. 6 に、結晶酵素と粗酵素をそれぞれ 600 D.P. (アミロース溶液を基質とした blue-value 法による) 作用させたときの澱粉粒分解率および SGC 添加効果を比較した。結晶 α -アミラーゼによる分解も、リパーゼ、プロテアーゼ、マルターゼなどを含む粗 α -アミラーゼ標品パンクレアチンによる分解も、差はほとんどなかった。また SGC を添加した場合も、結晶と粗酵素で効果に変化は認められなかった。

Fig. 6. Effects of SGC on degradation of several starch granules by crude and crystalline pancreatic α -amylase.

* Duration of enzymatic reaction.

4. 湿熱処理および老化澱粉に対する SGC の作用

SGC 添加効果の小さかったジャガイモと、逆にその効果の著しかった HAC-7 澱粉粒を湿熱し、SGC の作用を調べた (Fig. 7)。湿熱処理により、ジャガイモなどの根茎澱粉はその性質が種実澱粉に近づき、X線図はB型からA型に変わることが知られている^{17,18}。それに対し種実澱粉では、湿熱処理により、その性質に大きな変化がみられないことが知られている。また、ここでは示していないが、ジャガイモ澱粉粒は無処理の粒に比べ、湿熱処理すると酵素による分解性が急増するのに対し、HAC-7 澱粉粒は湿熱処理しても分解率はそれほど増加しないことがわかっている¹⁹。さらに前述したように、胆汁酸塩添加効果もジャガイモ澱粉粒と HAC-7 澱粉粒では大きく異なる。このような性質から澱粉粒構造の違いがうかがえるが、Fig. 7 に示すように、湿熱処理して分解されやすくなったジャガイモ澱粉粒に SGC を添加しても、未処理の澱粉粒の場合と同様、SGC の添加効果は依然小さく、HAC-7 澱粉粒も湿熱処理することによる SGC 添加効果の変動はみられなかった。

Fig. 8 は、HAC-7 老化澱粉について SGC の効果を示している。HAC-7 はもとの澱粉粒、湿熱澱粉粒ともに SGC 添加により分解率を倍増させるが、老化した澱粉では増加度は 30% 程度であった。このことから、SGC は HAC-7 の場合、粒状構造をしているものに大きな作用を示し、不溶性であるが、表面構造をなくしたのに対しては効果は小さいようである。このように SGC 添加効果は、澱粉粒の起源により異なり、粒の構造と関係あることが示唆される。

Fig. 7. Effect of SGC on digestion of heat-moisture treated potato and HAC-7 starch granules by pancreatin.

● potato SGC+, ○ potato SGC-, ▲ HAC-7 SGC+, △ HAC-7 SGC-.

Fig. 8. Effect of SGC on degradation of retrograded HAC-7 starch by pancreatin.

5. SGC 添加による分解産物の比較

糊化アミロース溶液に対する SGC 添加時の反応性を調べることによって、SGC が酵素タンパク質に作用して澱粉粒分解を促進しているのではないらしいという結果を上述したが、さらにブタパンクレアチンの作用様式に SGC が変化を与えるかどうか、反応生成物の側から検討した。Fig. 9 は HAC-7 澱粉粒を 2 時間酵素反応させたとき生成したグルコースと可溶性糖の量を示す。分解率が胆汁酸塩添加により倍増するにもかかわらず、グルコース生成に関しては無添加のものと大差なかった。Fig. 10 は、湿熱ジャガイモ澱粉粒を 20 分間酵素反応させ、上澄を分離し、その上澄のみをさらに 15 時間、24

Fig. 9. Solubilization and glucose formation from native and heat-moisture treated HAC-7 starch granules by pancreatin with or without SGC. Duration of enzymatic reaction: 2 hr.

□ soluble carbohydrate, ▨ glucose.

Fig. 10. Solubilization and glucose formation by pancreatin with or without SGC in the supernatant of heat-moisture treated potato starch granules hydrolyzate.

□ soluble carbohydrate, ▨ glucose.

時間反応させて生成物の変化を観察した結果を示す。グルコース生成は、SGC(+), (-) に関係なく、反応時間により一定であった。グルコース生成に関しては、マルトースを基質としてパンクレアチンを作用させた結果、経時的にグルコースが生成されることから、パンクレアチンに夾雑しているマルターゼ作用によると考えられた。

他の生成オリゴ糖については、ペーパークロマトグラフィーを行ったが、SGC 添加による生成オリゴ糖の変化はみられなかった。なお、ブタパンクレアチンによる分解生成オリゴ糖は G_1, G_2, G_3 が主で、時間の経過とともに G_3 の減少が著しく、 G_1 が生成されていった。

反応後に残った澱粉については、走査電顕により分解のようすを観察したが、SGC 添加と無添加できわだった違いはみられなかった。

要 旨

1) *in vitro* での粗および結晶ブタ膵臓 α -アミラーゼによる澱粉粒の分解に、胆汁酸塩が促進効果をもたらすことが明らかとなった。その効果は、胆汁酸塩の添加濃度 0.1~2.0% の範囲では、濃度が高いほど効果は大きであった。

2) 胆汁酸塩の主成分であるグリコール酸ナトリウム (SGC) あるいはタウロコール酸ナトリウム (STC) は、澱粉粒の酵素反応時に共存するときのみ分解率の増大をもたらす。澱粉粒を SGC(+) で前処理した後水洗した澱粉粒を SGC を加えず酵素分解した際には、その効果はほとんど認められず、また糊化アミロース溶液を基質とする反応系に SGC を添加しても効果はなかった。

3) 胆汁酸塩は、根茎澱粉より種実澱粉に対して効果が大きい傾向がみられた。

4) 胆汁酸塩添加効果の小さいジャガイモ澱粉粒と、その効果の大きい高アミロース VII トウモロコシ澱粉粒 (HAC-7) をそれぞれ湿熱処理しても、SGC のもたらす分解の増加度は、処理しない澱粉粒と変わらなかった。また HAC-7 澱粉を老化させると効果が変わることから、SGC の添加効果は粒の構造と関係することが示唆された。

5) 澱粉粒の分解反応生成オリゴ糖は、胆汁酸塩を添加した場合でも、無添加のときと変化が認められなかった。反応後残った澱粉粒の走査電顕による形態学的観察の結果も、胆汁酸塩添加と無添加で、分解のようすにきわだった違いはみられなかった。

終りに、本研究を行うにあたり、高アミローストウモロコシ澱粉粒あるいはジャガイモアミロースの入手にご援助いただいた河村隆介氏(敷島スターチ(株)鈴鹿工場研究所)と、法月郁郎氏(松谷化学工業(株))に深謝します。

文 献

- 1) 杉本温美, 高谷友久, 不破英次: 澱粉科学, **22**, 103 (1975).
- 2) 杉本温美, 高谷友久, 不破英次: 澱粉科学, **23**, 42 (1976).
- 3) 横沢一二, 桜井芳人: 農省林食研報告, **9**, 145 (1954).
- 4) R.M. SANDSTEDT and S. UEDA: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **17**, 215 (1969).
- 5) G.J. WALKER and P.M. HOPE: *Biochem. J.*, **86**, 452 (1963).
- 6) M. DUBOIS, K.A. GILLES, J.K. HAMILTON, P. A. REBERS and F. SMITH: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 7) T.J. SCHOCH: S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds.), "Methods in Enzymology," Vol.III, Academic Press Inc., p.6 (1957).
- 8) 藤本滋生, 最勝寺邦子, 永浜伴紀, 蟹江松雄: 澱粉科学, **24**, 31 (1977).
- 9) 河村百合雄: デンプンハンドブック, 二國二郎編, 朝倉書店, p.489 (1961).
- 10) L. LACK, F.O. DORRITY, Jr., T. WALKER and G.D. SINGLETARY: *J. Lipid Res.*, **14**, 367 (1973).
- 11) L.F. FIESER and M.FIESER: Reagents for Organic Synthesis, Vol.II, John Wiley and Sons, Inc., p.191 (1969).
- 12) H. FUWA: *J. Biochem.*, **41**, 583 (1954).
- 13) T.B. LLOYD and W.J. WHELAN: *Anal. Biochem.*, **30**, 467 (1969).
- 14) 小林昭一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: 澱粉科学, **19**, 178 (1972).
- 15) L.E. BOOHER, I. BEHAN and E. MCMEANS: *J. Nutr.*, **45**, 75 (1951).
- 16) 桜井芳人, 増原泰三, 渡辺至子, 早川清一: 農林省食研報告, **5**, 41 (1951).
- 17) 福井俊郎, 二國二郎: 農化, **38**, 226 (1964).
- 18) T. FUKUI and Z. NIKUNI: *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 460 (1969).
- 19) 高谷友久: 未発表データ.