カゼインより生成される苦味と その酵素的消去に関する研究 (第1報)

膵臓アセトン抽出分画と乳酸菌菌体内抽出粗酵素液の苦味消去作用†

佐藤 泰, 関口義彰*, 千葉善根, 猪飼勝弘**

(名古屋大学農学部食品製造化学第2研究室)

昭和 43 年 8 月 23 日 受 理

Studies on Enzymatic Degradation of Bitter Compounds from Casein Part I. Degradation of Bitter Compounds by Enzymes Extracted from Pancreas and Various Dairy Lactic Acid Bacteria

By Yasushi SATO, Yoshiaki SEKIGUCHI, Yoshimoto CHIBA and Masahiro IKAI

Laboratory of Food Science (Animal Products), Faculty of Agriculture, Nagoya University

The purpose of this paper is to study the ability of enzymes to eliminate the bitterness produced by the action of protease on casein. Results are as follows:

1. Of 8 commercial proteases pancreatin and pronase P were found to weaken or eliminate the bitterness.
2. Both the crude enzyme extracts from pig pancreas and dairy lactic acid bacteria weaken or eliminate the bitterness.
3. The factors which eliminate the bitterness were concentrated by precipitation with 0.3~0.5 saturation of ammonium sulfate from the pancreas extracts and the precipitated fraction was partially purified by the column chromatography on DEAE-cellulose.
4. From the fact that the bitterness of the casein digests was eliminated by leucine aminopeptidase, but not by carboxypeptidase, it was suggested that the leucine aminopeptidase activity found in the partially purified enzyme preparation played an important role in eliminating the bitterness in the casein digests. (Received August 23, 1968)

緒 言

食品製造において蛋白質およびその分解物の味に関する問題の一つとして苦味がある。とくに乳製品製造においてチーズより生ずる苦味については、発生の原因^(1,2), その機構^(2,3), 化学的性質⁽⁴⁻⁸⁾が報告されている。この苦味はカゼインより生ずるペプチドと考えられており, その生成の有無はスターターとして用いられる乳酸菌の種類に関係があると考えられている⁽⁶⁾。そして乳酸菌の菌体内粗酵素液中にペプチダーゼ活性の存在が報告されているものは *L. casei*⁽⁹⁾ と *L. lactis*^(10,11) であるが, これと苦味の生成ないしは消失との関係は明らかでない。

また, このペプチドを蛋白分解酵素との関連において研究した報告は少なく, Raadsveld⁽⁴⁾ の報告や Carr ら⁽⁵⁾ のトリプシン, キモトリプシンによるカゼインの消化物からの苦味ペプチドの分離や性質の検討, 市川ら^(12,13)の種々の蛋白質と枯草菌中性プロテアーゼによる苦味生成の有無, および苦味ペプチドの分離と諸性質についての報告等がある。苦味物質の酵素的分解に関する研究については, 市川ら^(12,13)が苦味物質の研究の中に, パンクレアチンおよびプロナーゼによる苦味の消失を記載し, さらに枯草菌細胞内ペプチダーゼの性質⁽¹⁴⁾の一つとして苦味ペプチドの分解が述べられている。著者らは豚膵臓および乳酸菌の菌体内粗酵素液中に苦味消去作用のあることを見出し, 近年急速に発展した酵素の食品加工への応用上の基礎的問題の一つとして, まずカゼインより

† この報告は関口義彰の修士論文 (1966 年 3 月提出) の一部を含めて書かれたものである。

* 現在, 名古屋市水道局。 ** 現在, 五協産業株式会社。

生ずる苦味物質の酵素的分解に着手した。本報では蛋白質分解酵素によりカゼインから生じた苦味の消去に有効な 2, 3 の酵素, およびそれらの酵素の部分精製について報告する。

実験方法

1. 供試酵素 次の 11 種の酵素を用いた。文中においては括弧内の略称を使用した。

トリプシン: 持田製薬株式会社製 (TRP)

パンクレアチン: 岩城製薬株式会社製 (PA)

プロナーゼ P: 科研化学株式会社製 (PR)

ビオプレーゼ: 長瀬産業株式会社製 (B)

サーモアーゼ: 大和化成株式会社製 (T)

プロザイム 6: 天野製薬株式会社製 (A)

タカジアスターゼ SS: 三共株式会社製 (S)

パパイン: 和光純薬株式会社製 (P)

カルボキシペプチダーゼ: Sigma Chem. Comp. 製 (CPase)

キモトリプシン: Nutritional Biochem. Comp. 製 (Chy)

ロイシンアミノペプチダーゼ: プロナーゼ P より分離されたもの (茨城大学大内教授より恵譲されたもの) (LAP)

2. 供試カゼイン メルク製カゼインを水酸化ナトリウム溶液に溶解 (pH 8.0), 塩酸による等電点沈澱, 水洗, アルコールおよびエーテル洗浄を 2 回繰返して精製⁽¹⁵⁾し, 凍結乾燥したものをを用いた。

3. 種々プロテアーゼによるカゼインの消化 カゼインを M/15 リン酸緩衝液あるいは M/10 トリスクエン酸緩衝液 (pH 8.0) に濃度 3% になるように溶解し, その 10 ml あたり 1~5 mg の酵素を添加し 37°C に保持した。1~6 時間後, 反応液の一部をとり苦味度の官能試験を行ない, 残液に除蛋白試薬⁽¹⁶⁾を添加し, 37°C に 20 分間保持後, その濾液の 275 mμ の吸光度をもってカゼイン消化度を表示した。

4. 苦味粉末の調製 3% カゼイン溶液 (とくにことわらない限り, トリスクエン酸緩衝液 pH 8.0 に溶解) 100 ml あたり 5 mg の TRP を加え 6 時間, 37°C に保持した後, 沸とう水中で 10~15 分間加熱し, TRP を失活させ, 沈澱物を濾別した。濾液は苦味を呈し沈澱区分はほとんど苦味を呈さなかったので濾液を凍結乾燥し苦味粉末とした。この苦味粉末を 10% 水溶液 (pH 8.0) として以下の実験に使用することとした。沈澱区分の詳細な検討は後報にゆずる。

細な検討は後報にゆずる。

5. 苦味度の官能試験 カゼイン分解液を 3~5 人の研究室員で味覚試験し, 苦味度は口中に含んで苦味を明らかに感ずる場合を+, かなり苦いものを++, 著しく苦いものを++, 苦味が明らかに判定しがたいものを土, 全く感じられないものを-として表示した。また苦味粉末の溶液に酵素を作用させた場合の苦味の消失度の表示には, 調製した苦味粉末の 10% 水溶液と同程度の苦味を感ずるものを 9 とし, その 3 倍希釈の溶液と同程度の苦味を 6, さらにその 6 倍希釈の溶液と同程度の苦味を 3 として評点し, 平均値を算出した。以下の文中でこの方法を苦味採点法と記載する。

6. 粗酵素液の調製

a) 脾臓粗酵素液の調製: 屠殺場より購入した新鮮な豚の脾臓を 1 夜ディープフリーザー中で凍結し, ついで室温で解凍し脂肪塊を除いた後, 肉挽機で挽き, 4°C のアセトンを加えその温度を維持しつつ攪拌して脱脂および脱水を行ない, 吸引濾過した。残渣をさらにアセトンで洗浄した後, 減圧下にアセトンを除き乾燥した。

また, 必要に応じ凍結乾燥した。乾燥物を乳鉢で磨碎し, 篩別 (32 メッシュ) して得られた粉末をアセトン粉末とした。この粉末 1 g あたり 30 ml の 0.005 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) を加え, 4°C で 1 時間攪拌し遠心分離 (13,000 rpm, 30 min, 4°C) し, その上澄液を脾臓粗酵素液とした。

b) 乳酸菌の菌体内粗酵素液の調製: 乳酸菌は農林省畜産試験場 (千葉市) より分譲された *Str. cremoris* H-61, *Str. faecaris* s-f, *L. bulgaricus* B-1, *L. casei* L-7, *L. delbrückii* L-d, *L. acidophilus* Ack, *L. thermophilus* L-t, *L. caucacius* L-50, *Leuc. citrovorum* F-22, 東大応微研より分譲された *L. helveticus* IAM-1042 を使用した。

保存培養より Table I の培地に 2 代前培養後本培養

Table I. Composition of Medium

Medium I	%	Medium II	%
Peptone	2.0	Peptone	1.0
Yeast extract	0.2	Yeast extract	0.5
Liver fraction	0.2	Glucose	1.0
NaCl	1.0	Lactose	1.0
Glucose	2.0	Tween 80	0.1
Cystine	0.02(mg%)	Cysteine	0.01
Na-Succinate	1.0	Na-Succinate	2.0
pH 6.8		pH 6.8	

を 48 時間行ない、遠心分離 (6000 rpm, 20 min) して菌体を集め M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄し、凍結してヒューズプレスで加圧破壊し、同緩衝液で抽出し、同緩衝液に対し透析後、遠心分離で不溶物を除き上澄液を菌体内粗酵素液とした。各酵素液の蛋白濃度は 1 ml 中の N をキエルダール法により定量し 6.25 を乗じて表示した。必要に応じ酵素液はポリエチレングリコール 6000 により透析濃縮を行なった。

7. 脾臓粗酵素液の部分精製

a) 脾臓粗酵素液の硫酸塩析による分別：脾臓粗酵素液に所定量の硫酸アンモニウムを加え溶解後、4°C にて 1 時間攪拌し生じた沈澱を遠心分離 (0~4°C, 13,000 rpm, 30 min) した。沈澱を粗酵素液の 1/30 容の 0.005 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、同緩衝液に 4°C にて 10~20 時間透析した。

上澄液にさらに硫酸アンモニウムを加え、生ずる沈澱を同様に処理して硫酸濃度による分画酵素液を調製した。各硫酸分画酵素液は硫酸の飽和度によって 0~0.3 p (0.3 p), 0~0.4 p, 0~0.5 p, 0.3~0.5 p, 0.4~0.7 p, 0.5~1.0 p, 0.7~1.0 p とよぶこととする。ただし 0.5~1.0 p, 0.7~1.0 p は 0.5 飽和あるいは 0.7 飽和における上澄液をさす。

b) 硫酸分画酵素液の DEAE セルロースによる分画⁽¹⁷⁾：DEAE セルロース (0.86 meq/g, Brown 製) を 0.005 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で緩衝化し、円柱管 (4×90 cm) に充填した。充填後 4°C にて同緩衝液でカラムを十分緩衝化し、酵素を負荷した。溶出ははじめ 0.005 M リン酸緩衝液で行ない、つづいて同緩衝液に 0.4 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) を混合しつつ濃度勾配をつけ溶出した。溶出液は一定量ずつ分取し、280 mμ の吸光度を測定し蛋白の溶出曲線を作図した。濃度勾配は Allen 法⁽¹⁸⁾により確認した。得られた有効酵素を含む区分を脾臓の部分精製酵素と呼ぶ。

8. 部分精製酵素および乳酸菌の菌体内粗酵素の作用

a) 苦味の消去試験：苦味粉末 2 g に脾臓の部分精製酵素 (0.5~1.0 mg 蛋白) あるいは乳酸菌の菌体内粗酵素 (60 mg 蛋白) を加え水に溶解し 20 ml とし、37°C で前者は 6 時間、後者は 6~15 時間作用させた後、100°C で 15 分間加熱して酵素を失活させ苦味度を官能的に検した。なお苦味粉末を使用して苦味消去度の比較を行なう TRP, Chy, CPase, LAP, PR の使用量は部分精製酵素の場合に従った。

b) 部分精製酵素のペプチドに対する作用試験：カルボベンゾキシグリシルロイシン (Z-Gly-Leu) およびロイシルグリシン (Leu-Gly) (いずれも茨城大学大内教授より恵譲されたもの) を 0.1 M になるよう 0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、その 0.2 ml に酵素液 0.2 ml (0.4 mg 蛋白) を加え、37°C で 24 時間反応させ、その反応液について濾紙クロマトグラフィーを行なった。Leu-Gly は 0.1% ニンヒドリンエタノール溶液、Z-Gly-Leu は 0.1% ヨウ素メタノール溶液で発色した。

実験結果および考察

1. 苦味を消去する酵素の存在に関する予備的考察

市川ら^(12,13)は枯草菌中性プロテアーゼを種々の基質蛋白に作用させたり、牛乳カゼインを基質として、その酵素の濃度と生成する苦味の強さとの関係について検討した。しかしプロテアーゼの種類と苦味生成の有無に関する検討は少なく、*Rhiz. chinensis* の酸性プロテアーゼおよび市販パンクレアチンでは苦味の生成がみられず、また枯草菌の中性プロテアーゼによって生成した苦味は結晶プロナーゼまたは市販パンクレアチンによって弱められるか、なくなると述べているが、実験の詳細についてはふれられていない。パンクレアチンはトリプシンを含むはずであり、パンクレアチンが苦味を生成しにくいのは、トリプシンのほかに、生成した苦味物質を分解する酵素が共存するものと考え以下の実験を行なった。すなわちプロテアーゼの種類をさらに拡張し、カゼインを基質として苦味生成の有無を予備的に検討した。その結果、一度生成された苦味がいつまでも残るような分解を行なう酵素は TRP, B, T, A, S, P であり、生じた苦味がカゼインの分解の進行とともに消える傾向を示す酵素は PA, PR であることを確認した。そこで、TRP あるいは PA を作用させたカゼイン溶液に 2.5 時間経過後、逆に PA あるいは TRP を作用させたときの分解度と苦味の変化を測定し、その結果を示したのが Fig. 1 である。

曲線 A は TRP により急激に苦味を生じ、PA 添加後は苦味の増加は感じられず、減少の傾向にある。曲線 B は PA を添加して 2.5 時間の消化で苦味を感じないが、TRP 添加後は急激に苦味を増加する。

この結果は RA 中に TRP と苦味消去に有効な酵素との存在を示すと考えられるから前者と後者との量比により苦味消去あるいは生成に反応が傾くことを暗示して

Fig. 1. Successive Treatments of Casein Solution by TRP and PA.

TRP : trypsin 4mg, PA : pancreatin 60mg,
Substrate : 3% casein soln. 200 ml.

Fig. 2. Tryptic Degradation and Appearance of Bitterness by Extracted Various Enzymes.

Enzyme : 5 mg as protein, Substrate : 3% casein soln. 50 ml.

..... Extracted solution

—— 0.3 p — — — 0.3 p ~ 0.5 p

いる。なお PA とアセトン粉末をおきかえ、はじめに加えた酵素の反応後、加熱して失活させてからあとの酵素を加えた実験でも同様の結果が得られた。そこでアセトン粉末の膵臓粗酵素液と 0.3 p および 0.3~0.5 p (5mg 蛋白) の 3% カゼイン溶液 (50 ml) に対する作用を実験し、得られた結果が Fig. 2 である。この結果からトリプシンがかなり除かれた区分に苦味消去作用のあることがわかる。

2. 硫酸分画酵素液の苦味消去作用

膵臓粗酵素液の種々の硫酸飽和度による塩析区分の苦味粉末溶液に対する消去作用をまとめたのが Table II である。Table II の結果によれば、苦味消去作用のある区分は、硫酸 0.3, 0.4, 0.5 飽和で沈澱する部分であ

Table II. Disappearance of Bitterness by Various Fractions obtained at Various Grade of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Saturation

Fraction	Bitterness	Fraction	Bitterness
Blank	+++	0.3~0.5 p	—
0~0.3 p	—	0.4~0.7 p	+
0~0.4 p	—	0.5~1.0 p	+++
0~0.5 p	—	0.7~1.0 p	+++

Reaction mixture : bitter powder 2 g and enzyme 2 mg/20 ml. Incubate : 37°C, 6 hr.

ると考えられる。

J. Uriel, S. Avrameas^(19,20) によれば、0.4 飽和以下で沈澱する豚の膵臓酵素はトリプシン、キモトリプシン、エステラーゼ 1, 2, カルボキシペプチダーゼ A, B, パンクレアチックプロテアーゼ 1 である。また 0.4~0.75 飽和で沈澱する膵臓酵素は、トリプシン、キモトリプシン 1, 2, リボヌクレアーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼ、パンクレアチックプロテアーゼ 1, 2 である。この報告では水抽出であり、本報で用いた抽出剤と異なるが、これら既知の酵素群、とくにカルボキシペプチダーゼ A, B, パンクレアチックプロテアーゼ 1, 2, ロイシンアミノペプチダーゼに注意を払う必要がある。

3. 0.3 p および 0.3~0.5 p 区分の DEAE セルロースによる分画とその苦味消去作用

0.3 p 区分と 0.3~0.5 p 区分の 100 ml (700~900 mg 蛋白) についてそれぞれ DEAE-セルロースによるクロマトグラフィーを行なった結果は Fig. 3 および Fig. 4 に示すとおりである。得られた溶出パターンの峰はいずれの区分も 6 峰であって、パターンの形からのみの判断では 0.3 p と 0.3~0.5 p の各区分はほとんど同じものを含み、とくに両者を区別する必要がないと考えられる。

これら各峰の溶出液の主要部分 (0.5 mg 蛋白) につ

Fig. 3. Column Chromatographic Separation of 0.3 p by DEAE-Cellulose.

Fig. 4. Column Chromatographic Separation of 0.3 p~0.5 p by DEAE-Cellulose.

Fig. 5. Disappearance of Bitterness by Various Separated Enzyme Fractions in Column Chromatography.

4, 5, 6 : Peak No. in Fig. 5, ④, ⑤, ⑥ : Peak No. in Fig. 6, Enzyme : 0.5 mg as protein. B : 10% bitter powder soln.

いて苦味消去作用を検した結果は Fig. 5 に示すとおりである。この場合の結果は苦味採点法によって判定したもので、いずれも 1~3 番目の峰には苦味消去作用がなく、主なる苦味消去作用は 0.3 p では 4, 5 の峰であり、0.3~0.5 p でも ④, ⑤ の峰であり、いずれにおいても 6 番目の峰に弱い作用があることがわかった。この点についても苦味消去作用については、0.3 p と 0.3~0.5 p とに分別する必要はなく、0.005 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で DEAE セルロースに吸着し、リン酸緩衝液のイオン強度の上昇する初期に溶出する区分に苦味消去作用があると考えられる。4, 5 および ④, ⑤ の詳細については後報にゆずる。

4. 乳酸菌の菌体内粗酵素液の苦味消去作用

各種乳酸菌の菌体内粗酵素液の苦味消去作用を行なった結果、使用したどの乳酸菌の粗酵素液についても、反応時間の差、苦味度の強弱の差はあるが苦味消去の作用がみとめられた。この結果を Table III に示した。

Table III. Disappearance of Bitterness During Incubation by Intracellular Enzyme of Various Dairy Lactic Acid Bacteria

Name of bacteria	Incubation time (hr)			
	3	6	9	15
<i>Str. cremoris</i> H-61	++	+	—	—
<i>Str. faecaris</i> s-f	++	+	±	—
<i>L. thermophilus</i> L-t	+++	++	+	±
<i>L. helveticus</i> IAM-1042	+	+	±	—
<i>L. delbrückii</i> L-d	+++	+	+	—
<i>L. caucasicus</i> L-50	+	+	—	—
<i>L. bulgaricus</i> B-1	+	—	—	—
<i>L. acidophilus</i> Ack	++	+	—	—
<i>L. casei</i> L-7	++	+	±	—
<i>Leuc. citrovorum</i> F-22	++	++	+	—

Reaction mixture : bitter powder 2g and enzyme 60 mg/20 ml. Incubate : 37°C.

5. 苦味消去作用とペプチダーゼ作用

0.3~0.5 p 区分の DEAE セルロース分画 ④ 区分と、PR より分離された LAP, CPase および Chy について、苦味採点法によって苦味消去作用を検した結果を Fig. 6 に示した。

Fig. 6. Disappearance of Bitterness by Various Separated Enzyme Fractions and Peptidases.

B : 10% bitter powder soln. Enzyme : 1 mg as protein.

この結果によれば、CPase と Chy にはその作用がなく、LAP にはその作用が認められるが、LAP より ④ の方にその作用がより強く感じられた。また Z-Gly-Leu あるいは Leu-Gly の溶液に対して 0.3 p の 4, 5 区分、0.3~0.5 p の ④, ⑤ 区分をそれぞれ 37°C に 24 時間保持後、濾紙クロマトグラフィーを行ない、生成遊離アミノ酸を検した結果を Fig. 7 に示した。

これらの区分にはカルボキシペプチダーゼ様の作用とロイシンアミノペプチダーゼ様の作用が存在することが

Fig. 7. Peptidase Action of Various Separated Enzyme Fraction.

○ : Clear spot, ○ : Faint spot
S : Z-Gly-Leu, Leu-Gly
G : Glycine L : Leucine

わかった。Fig. 6 と Fig. 7 の結果を総合すると、DEAE セルロースで分画された区分には少なくともカルボキシペプチダーゼとロイシンアミノペプチダーゼが含まれ、そのうちロイシンアミノペプチダーゼが苦味消去に関係があると考えられた。また一度は苦味を生成するが、反応時間の経過とともに次第に消失していく PR の場合もすでに報告^(21,22)されているとおり、ロイシンアミノペプチダーゼほか数種のプロテアーゼが含まれている。PA についても同様のことが考えられるから、ロイシンアミノペプチダーゼが苦味消去に関与すると考えてもよさそうである。しかしながら、④区分のほうがロイシンアミノペプチダーゼより苦味消去作用の強く感ぜられる点につき、さらに今後の検討を要する。

要約

蛋白質分解酵素によりカゼインから生じた苦味の消去に有効な酵素の性質を明らかにするのが本研究の目的である。本報では次の4点を明らかにした:

- (1) 試験した8種の市販プロテアーゼのうち、カゼインからできた苦味物質の苦味を弱めたり、消すのは、パンクレアチンとプロナーゼPであった。

(2) 豚脾臓アセトン粉末より抽出した粗酵素および
乳酸菌の菌体内酵素には苦味を弱めたり消去したりする
作用がある。

(3) 苦味消去作用のある区分は膵臓粗酵素液の硫酸 0.3~0.5 飽和で沈澱する部分に存在することを明らかにし、この部分をさらに DEAE セルロースカラムによ

って濃縮し得た.

(4) カルボキシペプチダーゼには苦味消去の作用はなく、ロイシニアミノペプチダーゼと脾臓中の有効成分は、ロイシルグリシンの分解力ならびに苦味消去の作用をもつことから、少なくともロイシニアミノペプチダーゼが苦味消去に關与していることを推定した。

なお、本報告の大要は昭和42年12月2日、日本農芸化学会中部支部講演会において発表した。

- (1) D. J. Dawson and J. T. Feagan : *Aust. J. Dairy Tech.*, **15**, 65 (1960).
- (2) D. B. Emmons, W. A. Mcgugan and J. A. Elliot : *J. Dairy Sci.*, **45**, 332 (1962).
- (3) J. Czulak : *Aust. J. Dairy Tech.*, **14**, 177 (1959).
- (4) C. W. Raadsveld : *13th Intern. Dairy Congr.*, **2**, 676 (1953).
- (5) J. W. Carr, T. C. Louhheed and B. E. Baker : *J. Sci. Food Agr.*, **7**, 629 (1956).
- (6) D. F. Gordon J. R., and M. L. Speck : *Appl. Microbiol.*, **13**, 537 (1965).
- (7) D. H. Hettinga : *J. Dairy Sci.*, **48**, 784 (1965).
- (8) V. R. Harwalker and J. A. Elliot : *ibid.*, **48**, 784 (1965).
- (9) E. Brandsaeter and F. E. Nelson : *J. Bact.*, **72**, 73 (1956).
- (10) W. C. van der. Zant and F. E. Nelson : *J. Dairy Sci.*, **37**, 795 (1954).
- (11) R. A. Cowman, S. Yoshimura and H. E. Swaisgood : *J. Bact.*, **95**, 181 (1968).
- (12) 市川和宏, 山本武彦, 福本寿一郎 : 農化, **33**, 1044 (1959).
- (13) 市川和宏, 山本武彦, 西尾 晃, 福本寿一郎 : 農化, **34**, 448 (1960).
- (14) 南浦能至, 松村芳一, 山本武彦, 福本寿一郎 : 日本農化大会昭和 43 年度講演要旨集, p. 95.
- (15) 前野正久, 大条方義 : 牛乳加工法, 朝倉書店, 1954, p. 397.
- (16) 萩原文二 : 酵素研究法, 2 卷, 朝倉書店, 1956, p. 242.
- (17) P. J. Keller, E. Cohen and H. Neurath : *J. Biol. Chem.*, **233**, 344 (1958).
- (18) 名古屋大学農学部農芸化学教室 : 農芸化学基礎実験, 養賢堂, 1966, p. 105.
- (19) J. Uriel and S. Avrameas : *Biochem.*, **4**, 1740 (1965).
- (20) S. Avrameas and J. Uriel : *ibid.*, **4**, 1750 (1965).
- (21) A. Hiramatsu and T. Ouchi : *J. Biochem.*, **54**, 462 (1963).
- (22) Y. Narahashi and M. Yanagita : *Sci. Papers I. P. C. R.*, **59**, 44 (1965).