Corticium rolfii の endo-polygalacturonase

酵素の耐酸性および低 pH 活性

梶 明, 大崎 武久*

(香川大学農学部農芸化学科)

昭和 46 年 5 月 15 日 受理

Endo-polygalacturonase from *Corticium rolfii* Stability and Activity of the Enzyme at Low pH Values

By Akira KAJI and Takehisa OHSAKI

Department of Agricultural Chemistry, Kagawa University, Miki-cho, Kagawa-ken

A comparative study of eight strains of *Corticium rolfii* was performed concerning production and properties of endo-polygalacturonase which was active at low pH values. The organisms tested in the present work included *C. rolfii* IFO 4476, 4878, 5253, 5926, 6142, 6146 and AHU 9404. All of them produced the enzyme when they were grown in a medium containing pectin as carbon source. The enzymatic activity was assayed at pH 2.5 using acid soluble pectic acid as substrate. Two strains, IFO 6146 and K 2, were the best for production of the enzyme with low-pH activity. The enzyme produced by all strains showed its activity at pH 1.5 to 3.0. The identification of enzymatic products revealed that the enzyme was a typical endo-polygalacturonase. In addition, the enzyme had macerating activity on Ganpi bark and potato disc. The enzyme was also demonstrated to be stable over a wide range of pH value, 1.5 to 11.0.

The enzyme might be called acid glycosidase or acid glycanase.

(Received May 15, 1971)

Corticium rolfii K 2 が耐酸性を有し、しかも低 pH 活性の endo-polygalacturonase を生産することは、精製酵素と酸可溶性ペクチン酸（低分子のペクチン酸）とを使用することによって、梶、岡田によって証明された (1969)⁽¹⁾。すでに、1961 年に永田、林は *Corticium centrifugum* を使用して endo-polygalacturonase の生産を指摘し⁽²⁾、1966 年に梶、田川は *C. rolfii* K 2 の endo-polygalacturonase が耐酸性を有し、広い pH 範囲において安定性を有することを発見した⁽³⁾。しかし、永田、林および梶、田川の研究では、基質にペクチン酸（高分子のペクチン酸）を使用したゆえに、低 pH 活性を証明することはできなかった。また、酵素の精製も行なわれなかった。梶、岡田は上記の報告において、endo-polygalacturonase を超遠心分析で均一なタンパク質に

まで精製して、この酵素の本質的性質として、高度の耐酸性および低 pH 活性を証明することができた。

引き続き *C. rolfii* に属するとみなされる各種の strain が、同様な性質を有する endo-polygalacturonase を生産することが確認されたので、本報においてはそれらの耐酸性および低 pH (pH 1.1~3.0) における酵素活性について述べ、これらの特性が K 2 菌について観察されるのみならず、*C. rolfii* の共通の性質であることを記し、あわせて培養中の酵素の生産状況についても報告する。

実験方法

菌 次の 8 strain が使用された。*C. rolfii* K 2 は既報⁽¹⁾の研究に使用された菌であり、京都大学植物病学研究室において分離され、本学部の内藤を通じて分譲された。*C. rolfii* IFO 4476 (*Hypochnus centrifugus*

* 旧姓 岡田武久。現在、丸金醤油株式会社技術研究所（香川県小豆郡内海町）。

(Lév.) Tulasne), IFO 4878 (*Sclerotium rolfii* Sacc.), IFO 5253 (*C. centrifugum* (Lév.) Bresadola), IFO 6142 (*C. centrifugum* (Lév.) Bresadola), IFO 6146 (*C. centrifugum* (Lév.) Bresadola) および *C. rolfii* IFO 5926 の 6 菌は発酵研究所 (大阪) から分譲された。 *C. rolfii* AHU 9404 は、北海道大学農学部から送付を受けた。

培養方法 ペクチン (Sunkist Growers, citrus pectin) 10g, ペプトン 10g, NH_4NO_3 0.5g, KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 2% FeCl_3 0.3ml を水 1l に溶解し, pH を 5.4 に調節して培養基とした。500ml 容の振とうフラスコに 50ml の培養基を入れ, 菌を接種して, 往復振とう機上で 25°C において培養を行なった。各菌はジャガイモ抽出液寒天ショ糖添加斜面培養基に新しく生育させた後, その菌糸を種菌として使用した。

粗酵素液の調製法 培養液より菌体を除去するために, まず布で濾過し次に遠心沈殿して, 透明液を得た。この液をセロファンチューブ (Visking) に入れて, 5°C で脱イオン水を外液として 24 時間, 続いて pH 4.0 の 0.005M McIlvaine buffer を外液として 24 時間透析した。透析内液を粗酵素液とし, これを適当に希釈して実験に使用した。

酵素活性の測定法

(1) 低 pH における endo-polygalacturonase 活性の測定法: 本報の研究目的は, 低 pH における酵素活性測定にあるゆえに, 酸可溶性のペクチン酸を基質とする活性測定に重点をおいた。周知のように, endo-polygalacturonase の真の基質は高分子のペクチン酸であるが, この水溶液は, 溶液の pH が 3.0 以下に降下するとき粘度が次第に高くなり, pH 2.0 以下では溶液状態からゲル状態に変化する。一方, 本研究の目的は, pH 1.1~3.0 における endo-polygalacturonase の活性を観察することであるゆえに, 高分子のペクチン酸を基質とすることは不可能である。従って, 酸にも可溶性の低分子のペクチン酸 (平均重合度 10, 中性糖を含まない) を McCready, Seegmiller の方法⁽⁴⁾で, ペクチン NF より調製して, これを基質として, 還元力増加を次亜ヨウ素酸法改良法⁽⁵⁾を使用して測定し, 酵素活性を測定した。

作用液の基本配合割合は, 1% 酸可溶性ペクチン酸溶液 2.5ml, 酵素液 0.5ml, McIlvaine buffer (pH 2.5) 1ml, 脱イオン水 1ml とし, 30°C において 40 分間酵素

反応を進めた後, 還元力増加を測定した。上記の条件下で, 1 分間に 1 μmole のアルデヒド基を遊離させる酵素量を 1 単位と決定した。

(2) Endo-polygalacturonase の活性測定法: ペクチン酸を基質として, 粘度低下法によって pH 4.0 における活性を測定した。ペクチン酸はペクチン (Sunkist Growers, pectin NF) を材料として, Norris, Resch の方法⁽⁶⁾によって調製した。すなわち, 0.2% NaOH 溶液中で 2°C で 2 時間加水分解を進めた後, 酸性に転じてペクチン酸を得た。酵素活性測定の配合割合は, 1% ペクチン酸溶液 (pH 4.0) 3.5ml, 酵素液 1ml, McIlvaine buffer (pH 4.0) 1ml とし, 30°C で 1 時間酵素作用を進めた後, 粘度低下度 (A%) を Weber Deuel の方法^(7,8)によって求め, さらに既報⁽³⁾の校量線によって endo-polygalacturonase の単位数に換算した。

(3) Exo-polygalacturonase の活性測定法: 1% ペクチン酸溶液 (pH 4.0) 2.5ml, 酵素液 0.5ml, McIlvaine buffer (pH 4.0) 1ml, 脱イオン水 1ml を配合し, 30°C で 1 時間酵素作用を進めた後, 還元力増加を上記同様の方法によって測定した。単位の決定も, 上記と同様に行なった。

(1)(2)(3) の測定においては, 各菌の酵素について作用時間と酵素活性との間に直線関係が成立することを確かめた。

(4) Macerating activity の測定法: 雁皮 (1×1cm) およびジャガイモ (径 1cm, 厚さ 1mm) の 1 片を試験管にとり, 酵素液 1ml, buffer 1ml, 脱イオン水 1ml, トルオール 0.2ml を加えて, 37°C で 16 時間放置後, maceration の状態を既報⁽³⁾に準じて判定した。

ペーパークロマトグラフィー 酵素作用による生産物の検定は, ペーパークロマトグラフィーによった。展開剤はブタノール, 酢酸, 水 (4:2:3) とし, 下降法で展開した。呈色剤には, アルカリ性 AgNO_3 溶液を用いた。なお, 詳細は既報⁽¹⁾のべた。

ペクチンの定量法 培養液中のペクチンの定量には, carbazole 法^(9,10)を用いた。

菌体量の定量法 培養液 100ml をとり, 遠心沈殿により菌体を集め, 熱水で洗浄した後, 秤量皿に移して乾燥後重量を測定した。

pH の測定法 日立-堀場 M-4 型 pH メーターを使用して測定した。

実験結果

1. 培養経過と酵素の生産状況

実験結果を Fig. 1 に菌別に示す。菌糸の生育は、移植した後2日経過すると肉眼的に観察され、同時に培養液中の酵素量も増加し始める。始発 pH を 5.4 とするとき、培養が進むに従って、液の pH はシュウ酸の生産のために次第に低下し、4~7 日経過後最低値 2.2~2.5

を示すが、培養を長くすると、やや高くなることがある。菌糸の量は 5~6 日で最高値に達し、以後は減少する。ペクチン関係物質の消費は、7 日間にわたって行なわれる。以上が、8 strain すべてについて認められた。strain AHU 9404 は、菌糸の量は他の菌より大きい値を示したが、酵素生産は最低値を示した。

pH 4.0 で測定した endo-polygalacturonase の分泌量は 1500~3050 unit/ml であり、菌により生産量の

Fig. 1. Production of Polygalacturonases by Eight Strains of *C. rolfssii*.

The fungi were grown in 50 ml of medium in a 500-ml shake-flask at 25°C on a reciprocal shaker.

IFO 4476: *Hypochnus centrifugus*, IFO 4878: *Sclerotium rolfssii*, IFO 5253, 6142 and 6146: *Corticium centrifugum*, IFO 5926, AHU 9404 and K2: *Corticium rolfssii*.

●—● endo-PG activity on acid-soluble pectic acid at pH 2.5, ○—○ endo-PG activity on pectic acid at pH 4.0, ●—● exo-PG activity on pectic acid at pH 4.0, △—△ pH, ▲—▲ mycelia, □—□ pectin.

差が著しく現われた。pH 4.0 で測定した exo-polygalacturonase 活性は 1.2~2.2 unit/ml にわたり、さらに IFO 5926 は, endo-PG/exo-PG が著しく小さい値を示した。

pH 2.5 で測定した酸可溶性ペクチン酸を基質とする endo-polygalacturonase 活性は, 0.5~1.1 unit/ml にわたった。

この酵素活性は本実験の目的とするものであり、あとで述べるように、endo-polygalacturonase 活性を主体とするものと判断される。この低 pH 活性の酵素は、すでに K2 菌において確認されたものであるが⁽¹⁾、他の 7 strain についても、すべて生産が認められた。

酵素の培養液中への分泌は、いずれの菌においても 6~7 日で最高値に達した。

2. 酵素の性質

以下、すべて酸可溶性ペクチン酸を基質として酵素活性を測定した。

(1) 酵素活性に対する pH 値の影響 :

pH 1.1~6.0 において各菌の酵素活性を測定し、その結果を Fig. 2 に示す。各菌の酵素は、いずれも比較的広い pH 範囲 (pH 1.5~5.5) にわたって活性が高く、とくに pH 2.5~4.5 において高い値を示した。pH 3.0~6.0 における活性は、主として exo-polygalacturonase によるものと考えられる。

本実験の目的とする低 pH 活性 (pH 3.0 以下) は、いずれの菌についても確認された。pH 1.1 においてすでに若干の活性が現われ、pH 1.5 において相当高く、明らかに低 pH 活性の endo-polygalacturonase の生産が認められた。なお、緩衝液中の Cl^- の影響については、別個に McIlvaine buffer (pH 3.0) を使用して、KCl, NaCl を単独に作用液に種々の濃度に添加して実験を行なった。その結果、上記の濃度の Cl^- では全く酵素作用に影響がないことが確認された。

(2) 酵素の安定性に対する pH 値の影響 :

3.0 unit (酸可溶性ペクチン酸に対する酵素活性) を含む粗酵素液 10 ml をとり、0.1 N HCl または 0.1 N NaOH で所定の pH

Fig. 2. Effect of pH on Activity of Polygalacturonases Produced by Eight Strains of *C. rolfisii*.

Reaction mixture contained 2.5 ml of 1% acid-soluble pectic acid, 0.5 ml of buffer, 1 ml of deionized water and 0.5 ml of enzyme solution (10-fold diluted solution, see text). Temp., 30°C. Time, 40 min. For pH 1.1 to 2.5, 0.1 M Na-acetate-HCl buffer was added. For pH 2.5 to 6.0, 0.1 M Na-citrate-0.2 M Na_2HPO_4 buffer was used.

Fig. 3. Effect of pH on Stability of Polygalacturonases.

Reaction mixture contained 10ml of enzyme solution, 10ml of each buffer and 0.5ml of toluene. Temp., 5°C. Time, 72 h. After incubation, the pH of each mixture was adjusted to 2.5 and residual activity was determined at pH 2.5 using acid-soluble pectic acid as substrate. Residual activity is represented as per cent of untreated enzyme activity.

Sodium acetate-HCl buffer was used for pH 1.1 to 2.5, sodium citrate- Na_2HPO_4 buffer for pH 2.5 to 8.0, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - KH_2PO_4 buffer for pH 8.0 to 9.0 and $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - Na_2CO_3 buffer for 10.0 to 11.0.

に調節した後、各 pH の buffer 10ml を加えて、脱イオン水で全量を 30ml とし、トルエン 0.5ml を加えて、5°C、72 時間放置後、pH を 2.5、液量を 50ml に調節した。各酵素液を使用して、残存活性を求めた結果を Fig. 3 に示す。対照には無処理の酵素液を使用して、残存率 (%) で表示した。図に示すように、低 pH において酵素は安定であるのみならず、非常に広い pH 範囲 (pH 1.5~11.0) にわたって安定であることが証明された。上記の条件下、pH 1.5 において処理した残存活性は 50~80% であり、pH 2.0 以上 9.0 まで各菌の酵素とも高い安定性を示した。pH 11.0 においても、なお残存活性は 60~90% であり、いずれの酵素も耐酸性を有するのみならず、アルカリ側でも安定であることが証明された。

(3) 植物組織の崩壊：各菌の培養から得られた粗酵素液を雁皮の場合は 10 倍希釈、ジャガイモの場合は 100 倍希釈として作用液を配合し、前記の条件下において植物組織の崩壊作用を観察した。すべての菌について、pH 1.5~3.5 において、なかでも pH 1.5~2.5 において崩壊作用が強く認められた。ジャガイモ切片の場合は、失活酵素を加えた対照試験についても、pH 1.5~2.0 においては崩壊が認められるゆえに、各菌の生産する酵素による作用は、pH 2.5 付近に最適値が存在するものと考えられる。

(4) 酵素作用による生産物：酸可溶性ペクチン酸に対して、各菌の酵素を pH 2.5 において作用させ、経時的に試料を採取して生産物を判定した。基質の 1% 溶液 25ml, McIlvaine buffer (pH 2.5) 10ml, 脱イオン水 10ml, 酵素液 5ml (2.5 unit 含む), トルエン 0.5ml を配合し、5, 20, 40, 60 分経過後それぞれ 5ml ずつを採取し、エタノールを加えて生成する沈殿を除き、エタノールを追い出した後、イオン交換樹脂によって無機塩を除去し、液を減圧濃縮後、1ml 溶液として、上記の方法でペーパークロマトグラフィーを行なった。いずれの菌についても、生産

物は mono-, oligo-galacturonic acid であり, 酵素反応開始後 5 分後に galacturonic acid および oligo-galacturonic acid の淡いスポットが現われ, 20 分後には mono-, di-, tri-galacturonic acid が認められ, 40 分, 60 分後にも同様なスポットが認められた。24 時間以上酵素作用を継続するときは, galacturonic acid のみとなった。これらの結果から, pH 2.5 において活性を示す主体は, 典型的な endo-polygalacturonase であることが断定できるが, 小さいながらも exo-polygalacturonase 活性も含まれているものと判断される。なお, pH 2.0 において 5°C, 72 時間処理した酵素液を使用して, 上記と同様に酵素生産物を検討したときも, 同様な結果が確認できた。

考 察

1. 低 pH における endo-polygalacturonase 活性の確認

酸可溶性ペクチン酸を基質とし, 還元力の増加のみの測定によって酵素活性を測定したゆえに, それが endo- または exo-polygalacturonase のいずれの作用によるものか判定しがたい。しかし, 本実験結果によれば, ① pH 2.5 における酵素作用の生産物が, 作用時間 60 分までの判定では mono- および oligo-galacturonic acid であること, ② 植物組織の崩壊作用が, pH 2.5 において最高であることが確認された。①②の性質は前報⁽¹⁾において, すでに strain K2 の高度に精製された低 pH 活性 endo-polygalacturonase について明確にされている。これらの結果から総合的に判断すれば, 本実験に使用されたすべての菌が, 低 pH 活性の endo-polygalacturonase を生産するものと考えられる。

2. *C. rolf sii* の endo-polygalacturonase の低 pH 活性

かびの endo-polygalacturonase については多数の研究発表がみられ, いずれも最適 pH 値が 4~5 に存在すると報告されている。実験結果によれば, *C. rolf sii* に属する 8 strain が生産する endo-polygalacturonase は pH 3.0 以下において活性を有し, なかでも K2 および IFO 6146 の同酵素は, 低 pH 活性の大きいことが認められた。これらの菌の endo-polygalacturonase は, pH 1.5 においてなお高い活性を示し, pH 1.1 においても明らかに酵素は活性であった。

なお, 酵素活性は比較的広い pH 範囲に認められ, 上

記 2 strain 以外の菌においては, pH 4~5 においても活性が高い。しかし, この酵素活性には exo-polygalacturonase も含まれていて, とくに前記のように IFO 5926 においては, exo-polygalacturonase の影響が大きいと判断される。なお, K2 菌の exo-polygalacturonase の最適 pH は 4.0 である⁽³⁾。

3. *C. rolf sii* の endo-polygalacturonase の安定性とくに耐酸性

Fig. 3 に示すように各菌の酵素は, いずれも耐酸性を保持することが証明された。しかも, 酸処理後の酵素液を使用して酵素生産物を検討した結果も, oligo-galacturonic acids の生成が, 未処理の酵素液と同様に確認された。これは, *C. rolf sii* の endo-polygalacturonase の酸安定性を証明する。同時に, アルカリ側においても高い安定性を示した。この酵素は常温においても耐酸性は大きく, また K2 菌の生産する endo-polygalacturonase は, 精製状態でも長期間 (pH 4, 2°C, 2 年) 活性を減少しないことも分かっている。*C. rolf sii* の endo-polygalacturonase の広い pH 範囲における安定性は, この酵素の応用面ばかりでなく, 酵素の安定性と立体構造との関係を明らかにする研究にも役だつものと考えられる。

4. 酸性酵素群の存在

pH 1.5~3.0 に高い活性を示し, 最適 pH 値が 2.5 に存在する endo-polygalacturonase が, *C. rolf sii* によって生産されることが明らかになった。このかびはすでに報告したように, 低 pH 活性, 耐酸性をあわせて有する次の酵素を生産する。 α -L-arabinofuranosidase については, 粗酵素^(11,12) および精製酵素⁽¹³⁾ の性質が究明され, 最適 pH 値は 2.5 に存在し, β -D-galactosidase については, 粗酵素⁽¹⁴⁾ および精製酵素⁽¹⁵⁾ について, pH 1.8~2.5 に最高の活性が存在することが明らかにされ, α -D-galactosidase については, 粗酵素⁽¹⁴⁾ を使用して pH 2.0~4.5 に活性が高く, pH 1.5 においてもなお相当の活性が存在することが明らかにされた。なお, *C. rolf sii* は, 最適 pH 2.5 の酸性プロテイナーゼも生産する⁽³⁾。これらの酵素は, いずれも耐酸性に富むことも証明された。*C. rolf sii* が生産する酵素群のうち, 最適 pH 値がやや高い酵素としては, β -D-1,3-glucanase⁽¹⁶⁾ (精製酵素, 最適 pH 4.5), xylanase⁽¹⁷⁾ (粗酵素, 最適 pH 3.5) の存在が認められ, これらも耐酸性を有する。

耐酸性, 低 pH 活性の酵素の代表例は, ペプシン⁽¹⁸⁾

(最適 pH 1.5~2.0) であり, これほど低 pH 活性ではないが, 微生物の酸性プロテイナーゼが同様の性質を有することは, 周知の事実である. たとえば吉田⁽¹⁹⁾によれば, *Aspergillus saitoi* の同酵素は pH 2.5~3.0 に最適値があり, その他にも種々の微生物が, 最適 pH 2.0~3.0 の酸性プロテイナーゼを生産することが報告された. プロテイナーゼ以外の耐酸性酵素としては, *Aspergillus niger* の酵素群があり, なかでも α -amylase は養田, 山田⁽²⁰⁾によって結晶化され, α -L-arabinofuranosidase も梶, 田川⁽²¹⁾によって結晶状態に精製された. しかし, *A. niger* の同酵素は, 最適 pH 値がいずれも *C. rolfsii* の酵素よりやや高く, たとえば α -L-arabinofuranosidase では最適 pH 値は 3.8~4.0⁽²²⁾ に認められ, pH 2.0 以下では活性が極めて小さくなる. しかし同酵素は, *C. rolfsii* のものと同程度の耐酸性を有することが分かっている(未発表). Bahl, Agrawal の報告⁽²³⁾によれば, *A. niger* のグリコシダーゼの最適 pH 値は α -D-galactosidase : pH 4.0, β -D-galactosidase : pH 3.8, β -N-acetylglucosaminidase : pH 4.2 付近で, pH 3.6~4.6 の間に活性が高いようであるが, α -galactosidase は pH 2.0 においても, かなり活性を有するようである. 3 種類のグリコシダーゼのうち, β -N-acetylglucosaminidase のみ耐酸性に乏しいことが述べられている. 池田, 船津の最近の報告⁽²⁴⁾によれば, *A. niger* は pH 2.0~2.5 に最高の活性を有するセルラーゼを生産する. なお, Patel および Phaff⁽²⁵⁾によれば, トマトの endo-polygalacturonase には基質による最適 pH 値の shift がみられた. すなわち, tri- および tetra-galacturonic acid のときは pH 4.5 および 3.5, di-galacturonic acid のときは pH 4.4, 酸可溶性ペクチン酸のときは pH 4.5 および 2.5 に活性のピークが, それぞれ観察された. しかし, 2 成分の分離は達成されていないので, 単一の酵素によるものか複数の酵素によるものかは不明であった.

以上のように梶らの一連の報告によれば, *C. rolfsii* のグリコシド分解酵素はいずれも耐酸性を有し, とくに endo-polygalacturonase, α -L-arabinofuranosidase, β -D-galactosidase は, 低 pH 活性の傾向が強い. このかびの酵素群の研究によって, 酸性プロテイナーゼ以外にも酸性酵素群が存在することが明らかになり, それらの性質は耐酸性を有するとともに, 低 pH (pH 1.5~3.0) 活性の高いことが特徴である. すなわち, 酸性グリコシ

ダーゼまたは酸性グリカナーゼと称すべき酵素群の存在が, 明らかに指摘される.

要 約

(1) *C. rolfsii* の 8 strain が, 培養液中に低 pH 活性の endo-polygalacturonase を生産することが確認された. 酵素活性の測定には, 主として酸可溶性ペクチン酸が基質として使用された.

(2) *C. rolfsii* IFO 6146 (*C. centrifugum* (Lév.) Bresadola) および *C. rolfsii* K2 の endo-polygalacturonase は低 pH 活性の傾向が著しく, pH 2.5 において活性が最高を示し, pH 1.5 においてもかなりの活性を示し, pH 1.1 においてすら明らかに活性を示した.

(3) 8 strain の生産する endo-polygalacturonase はいずれも耐酸性を有し, しかもアルカリ側においても安定であった.

(4) *C. rolfsii* の酵素に関する既報の研究成果も参考にして, 酸性プロテイナーゼ, 動物のペプシン以外にも耐酸性, 低 pH (pH 1.5~3.0) 活性を有する酸性グリコシダーゼ, またはグリカナーゼと称すべき酵素群が存在することを指摘した.

実験の一部に助力を与えられた宮坂ひろみ嬢に感謝します.

- (1) A. Kaji and T. Okada : *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 203 (1969).
- (2) 永田幸雄, 林 金雄 : 岐阜大学農学部研究報告, No. 14, p. 109 (1961).
- (3) 梶 明, 田川 清 : 農化, **40**, 325 (1966).
- (4) R. M. McCready and C. G. Seegmiller : *Arch. Biochem. Biophys.*, **50**, 440 (1954).
- (5) E. F. Jansen and L. R. MacDonnell : *Arch. Biochem.*, **8**, 97 (1945).
- (6) F. W. Norris and C. F. Resch : *Biochem. J.*, **31**, 1945 (1937).
- (7) F. Weber and H. Deuel : *Mitt. Lebensm. Hyg.*, **36**, 368 (1945).
- (8) 梶 明, 穴吹吉夫 : 農化, **29**, 775 (1955).
- (9) S. M. Stark : *Anal. Chem.*, **22**, 1158 (1950).
- (10) E. A. McComb and R. M. McCready : *Anal. Chem.*, **24**, 1630 (1952).
- (11) A. Kaji and O. Yoshihara : *Appl. Microbiol.*, **17**, 910 (1969).
- (12) *idem* : *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1249 (1970).
- (13) *idem* : *Biochim. Biophys. Acta*, **252**, 367 (1971).
- (14) A. Kaji and T. Ichimi : *Appl. Microbiol.*, **18**, 1036 (1969).

- (15) 梶 明, 佐藤優行, 新明 昇, 宮坂ひろみ: 農化大会講演要旨集, p. 246 (1971).
- (16) 梶 明, 大崎武久, 吉原 収: 農化, **45**, 278 (1971).
- (17) 梶 明, 吉原 収, 植田美紀子: 農化大会講演集, p. 50 (1969).
- (18) J. S. Fruton and M. Mergmann: *J. Biol. Chem.*, **127**, 627 (1939).
- (19) F. Yoshida: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 252, 257 (1956).
- (20) Y. Minoda and K. Yamada: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 806 (1963).
- (21) A. Kaji and K. Tagawa: *Biochim. Biophys. Acta*, **207**, 456 (1970).
- (22) A. Kaji, K. Tagawa and T. Ichimi: *Biochim. Biophys. Acta*, **171**, 186 (1969).
- (23) O. P. Bahl and K. M. L. Agrawal: *J. Biol. Chem.*, **244**, 2970 (1969).
- (24) 池田稜子, 船津 勝: 農化大会講演要旨集, p. 138 (1970).
- (25) D. S. Patel and H. J. Phaff: *Food Res.*, **25**, 47 (1960).
-