デキストランシュクララーゼに関する研究 (第 1 報)

Leuconostoc mesenteroides IAM 1046 の生産する酵素の精製と性質, および酵素合成デキストランの構造について

新延 道夫*, 小林 恒夫
(東京農工大学農学部農芸化学科)

昭和 46 年 7 月 16 日 受 理

Studies on Dextranase

Part I. Purification and Properties of the Enzyme Produced by *Leuconostoc mesenteroides* IAM 1046, and the Structure of Enzymatically Synthesized Dextran

By Michio NIINOBE* and Tsuneo KOBAYASHI

Department of Agricultural Chemistry, Tokyo Noko University, Fuchu, Tokyo

Dextranase produced by *L. mesenteroides* IAM 1046 was partially purified, its properties examined, and the structure of dextran formed from sucrose by the enzyme was studied. The enzyme was purified 24- to 56-times by salting-out with ammonium sulfate and column chromatography on DEAE-cellulose. The purified enzyme showed an optimum pH at pH 5.0, and an optimum temperature at 30°C, and was stable at pH 4.0~7.5 at 5°C, but inactivated at temperatures above 40°C. Michaelis constant was estimated to be 1.57×10^{-2} (M) at pH 5.0 and 30°C. The ratio of α -1,6-, α -1,4- (or α -1,2-) and α -1,3-glucosidic linkages in dextran produced by growing culture, culture broth, or partially purified enzyme preparations were estimated with periodate oxidation method. The content of α -1,6-linkage in dextran produced by growing cells and culture broth was about 60%, while the value was above 80% for dextran produced by purified enzyme. The mechanism of dextran synthesis was discussed, and it was suggested that the dextran synthesis would be carried out by two or more enzymes, i. e., polymerizing enzyme which catalyzes the formation of α -1,6-glucosidic linkages, and branching enzyme which catalyzes the formation of other types of linkage. (Received July 16, 1971)

* Present address: Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

緒 言

デキストランシュクララーゼ (EC 2.4.1.5, α -1,6-glucan : D-fructose 2-glucosyltransferase) は *Leuconostoc mesenteroides*, *L. dextranicum* などによって生産され, ショ糖から glucosyl 転移反応によって, 多糖類デキストランを作る酵素である。

デキストランの構造は, 生産する菌株によってかなり異なっているが, 多くは D-グルコースの α -1,6-結合か

らなる主鎖に, α -1,3 または α -1,4 (α -1,2) 結合による分枝構造を有するものと考えられる⁽¹⁾。 α -1,6 以外の結合の一部が, 主鎖の中に含まれている例も知られているが^(2,3), 簡略のため本報文では, これらを分枝結合と呼ぶことにする。 α -1,6-結合とそれ以外の結合との割合は, 菌株により異なっていることから, 合成酵素であるデキストランシュクララーゼは単一なものでなく, α -1,6-結合の生成を触媒する酵素 (polymerizing enzyme) と, α -1,3-, α -1,4-, または α -1,2-結合の生成を触媒する酵素 (branching enzyme) の 2 種以上の酵素の共同作

* 現在, 大塚製薬株式会社。

用によって、デキストランが合成されることが予想される。一方 Ebert ら^(4,6)は、この枝分れの生成がただ1種の酵素の作用によっても説明できるとしているが、酵素の精製が完全でなく、実験的根拠は十分とはいえない。

著者らは、デキストラン合成酵素の精製と性質について研究を行ない、さらに各種精製段階の酵素によって合成されたデキストランの構造を、過ヨウ素酸化法によって研究した結果、デキストラン合成が2種以上の酵素の共同作用によって行なわれるのではないかと考えられる結果を得たので、ここにその概要を報告する。

実 験 方 法

I. デキストランシュクララーゼの生産と精製

1. 使用菌株 : *Leuconostoc mesenteroides* IAM 1046 を使用した。この菌株は小林らの前報⁽⁶⁾で *L. mesenteroides* B と記載したものである。この株を用いた理由は、この菌株の生産するデキストランは、代用血漿製造用の代表的株とされる *L. mesenteroides* NRRL-B 512 株などのデキストランと異なり、かなり多量の非 1,6-結合を含んでいるので、 α -1,6-結合とそれ以外の結合の比が、デキストラン生成時の条件によって変化するかどうかを研究するのに、適していると考えられるからである。

2. 培地組成および培養法 : 前報⁽⁶⁾ならびに Jeanes⁽⁷⁾の培地を基本にして培養条件を検討し、Table I のような組成の培地を定めた。

菌株保存には、表の A 培地に 25°C で斜面培養または穿刺培養を行なった。デキストランシュクララーゼの酵素

生産を行なわせるためには、表の B 培地を 500 ml 容瓶ロフラスコに 100 ml ずつ分注し、オートクレーブで滅菌後、保存培地から2白金耳を植菌し、24~48時間 25°C で振とう培養した。

3. 酵素活性の測定 : Hehre の方法⁽⁸⁾を多少改変して、次のように行なった。0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 5 ml, 0.1 M 酢酸緩衝液を含む 60% ショ糖溶液 2 ml を 30°C に保ち、酵素液 5 ml を加えて 30°C で 1 時間反応させる。反応液から 1 または 2 ml をとり、0.04 N NaOH 5 ml を含む 50 または 100 ml 容メスフラスコに加えて反応を止めた後、水を加えて定容にする。この希釈液から 2 ml をとり、Somogyi-Nelson 比色法^(9,10)で生成したフラクトースを定量した。同時に、酵素液を沸とう水中で 5 分加熱したものを同様に処理して、ブランクとした。なおこの酵素反応において、グルコースは全く増加しないことを確かめているので、インペルターゼによるショ糖分解はなく、生成する果糖は、すべてデキストランシュクララーゼ反応によって生成するものである。

酵素力価は、上の条件で 1 時間に 1 mg のショ糖をデキストランに変化させる酵素量、すなわち 0.52 mg の果糖を生成する酵素量を 1 単位 (dextranase unit, DSU と略す⁽⁶⁾) としてあらわす。

4. 菌体生育量と蛋白量 : 培養液を 10,000 rpm, 20 分間遠心分離すると菌体が沈殿するが、培地中の炭酸カルシウムも含まれるので、これを少量の 1 N HCl で溶解したのち濾過して菌体を集め、真空デシケーターで充分乾燥したのち、秤量して菌体量を求めた。

蛋白量は、280 m μ における吸光度を分光光度計で 1 cm のセルを用いて測定した値であらわした。

II. デキストランの調製と過ヨウ素酸化法によるデキストランの構造研究

1. 生菌によるデキストランの調製 : Table I の酵素生産用培地 (B 培地) のショ糖濃度を 10% にした培地に菌を接種し、25°C で 24 時間振とう培養したのち、25°C で 3 日間静置培養してデキストランを生産させた。培養液にエタノールを 20 vol.% になるように加え、攪拌したのち 10,000 rpm, 20 分遠心分離して菌体を除く。上澄に再びエタノールを 50 vol.% になるまで攪拌しながら加えると、デキストランがガム状に沈殿する。沈殿に水を加えて約 5% 濃度に溶解し、1 夜流水透析したのち、再びエタノール 50 vol.% にて再沈殿させる。再沈殿を 4 回行なったのち、乳鉢中でエタノールと磨砕、脱

Table I. Composition of Culture Media

	Medium A Agar slant medium for stock culture	Medium B Medium for enzyme production
Sucrose	2.0 g	5.0 g
Yeast extract	0.5	0.5
Polypeptone	0.25	0.25
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.02	0.02
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.001	0.001
MnSO ₄ ·7 H ₂ O	0.001	0.001
NaCl	0.001	0.001
Corn steep liquor	—	2.0
CaCO ₃	2.0	5.0
Agar	2.0	—
Distilled water	100	100
pH	7.2	7.2

水して粉末化し, 乾燥する.

2. 酵素液によるデキストランの調製: 80~150 DSU のデキストランシュクラゼを含む酵素標品を 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.2) 50 ml に溶かし, ショ糖 5 g を加え, トルエンを添加して 25°C に約 15 時間静置して, デキストランを生成させる. 反応液にエタノールを 50 vol.% に加えてデキストランを沈殿させ, 前項と同様に精製, 脱水した.

3. デキストランの過ヨウ素酸酸化: 前報⁽¹¹⁾に準じて, 次のように行なった.

デキストラン 30 mg を約 30 ml の蒸留水に溶解したのち, 0.12 M メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液 5 ml を加え, 25 ml に希釈する. 反応液を 25°C にて, ときどき振とうしながら反応させる. 別に, 0.12 M メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液 10 ml を水で 50 ml に希釈したものをブランクとして, 同様に処理する. 一定時間ごとに試料の一部をとって, 過ヨウ素酸消費量, およびギ酸生成量を測定した.

過ヨウ素酸の定量は Fleury-Lange 法⁽¹²⁾と紫外外部吸収法⁽¹³⁾を併用し, ギ酸の定量は前報⁽¹¹⁾のとおり, 滴定法によって行なった.

実験結果

1. 酵素生産にもちいる培地組成の検討

本研究にもちいた *L. mesenteroides* IAM 1046 は, NRRL B-512 株などと異なり, Jeanes の培地⁽⁷⁾ではきわめて生育が悪く, 酵素生産も行なわれないので, 培地の検討を行なった. 本菌株は無機窒素源のみでは全く生育せず, 有機窒素源が必要であった. ショ糖濃度を 2% とし, 酵母エキス, およびポリペプトンを単独または併用した場合, 併用の方が酵素力価が高く, 両者の総量を一定とすると, 酵母エキス, ポリペプトンの重量比 2:1 のとき最高の酵素力価が得られた. この割合で総量を増加させると, 酵素活性も増加するが, 酵素精製の際に不純蛋白が多くなるのは好ましくない. 酵母エキス 0.5%, ポリペプトン 0.25% を用いることとした. また corn steep liquor (CSL) は単独に用いるとき, 菌体の生育は良好であるが, 酵素生産性はよくない. しかし酵母エキス, ポリペプトンと併用す

ると, 酵素活性がかなり上昇した. CSL は窒素源としてのほか, 微量栄養物質の給源としての影響も大きいと思われたので, 培地中にはこれを 2% 加えることとした. 無機塩類としては $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ を加え, さらに中和剤として $CaCO_3$ を加えた.

ショ糖濃度については, これを 1~12% に変化させて 24 時間, 25°C で振とう培養した液の遠沈上澄について酵素活性を測定したところ, 活性はショ糖濃度に比例して増加したが, ショ糖濃度 8% 以上では, 生成デキストランのため粘稠となり, 菌体分離が困難となるので, ショ糖濃度は 5% とした.

2. 培養時間と酵素生産

Table I の B 培地にて 25°C で振とう培養した結果は, Fig. 1 のようになり, 24 時間で菌体生育は最高となり, 酵素生産も終了する.

Fig. 1. Time Course of Dextranucrase Production by *Leuconostoc mesenteroides* IAM 1046.

Symbols: —○— dextranucrase activity, —●— bacterial growth, —△— pH.

Fig. 2. Yield of Dextran from Growing Culture of *Leuconostoc mesenteroides* IAM 1046.

Table II. Typical Data in the Purification of Dextranucrase

	Volume (ml)	Enzyme activity (units/ml)	Protein (O. D. ₂₈₀ /ml)	Total activity (units)	Specific activity	Yield (%)
A. Ammonium sulfate fractionation						
Culture broth	1000	3.4	5.4*	3400	0.63	100
Fraction salted-out by 0.5-saturation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100	5.4	1.15	540	4.7	15.9
B. DEAE-Cellulose chromatography						
(1) Gradient elution						
Starting solution	10	48	10.3	480	4.64	100
Fraction Nos. 26~29 combined	36	4.7	0.302	169.2	15.55	35.2
(2) Step-wise elution						
Starting solution	10	21	4.95	210	4.24	100
Fraction Nos. 23~26 combined	40	4.9	0.139	196.0	35.30	93.3

* Measured after dialysis against distilled water for 24 hr at 5°C in order to remove non-protein impurities showing absorption at 280 m μ .
See text for experimental details.

3. 培養時間とデキストラン収率

実験方法の部, II. 1の方法で培養した液からのデキストラン収量は, Fig. 2のごとく, 大体4日後に最高に達し, 対糖収率は26~27%であった。

4. 硫酸塩析による酵素の部分精製

培養液から酵素を精製するのに, アセトン沈殿ではデキストランが酵素蛋白とともに沈殿するため, 精製しにくいので, 硫酸による塩析を行なった。酵素生産用培地に菌を24~48時間培養したのち, 10,000rpm, 20分間冷却遠心分離して菌体を除く。この上澄に, 5°Cの低温室で硫酸を加える。硫酸濃度を0.1飽和ずつ段階的に増加させて, それぞれ沈殿する区分をとると, 0.4~0.5飽和で沈殿する区分が最も比活性が高く, それ以上の濃度で沈殿するものは, 比活性が低下した。したがって実際の精製では, 収量は悪いが0.5飽和までの沈殿を集め, 透析したのち凍結乾燥して粉末とした。このようにして, 培養液1l当り約100mgの酵素粉末が得られ, その活性は乾燥物1mg当り約6単位であった。塩析における比活性の上昇は, Table II. Aに示すように約7倍であった。培養液中に存在するデキストランは, 少なくとも硫酸0.5飽和までではあまり沈殿せず, 乾燥酵素標品の全炭水化物含量は, フェノール硫酸法で測定して0.15%程度であり, これは以下の精製操作でほとんど除去される。

5. デキストランシュクララーゼの酵素化学的性質

本研究に用いた菌株の生産するデキストランシュクラ

ラーゼについては, pH安定性, 熱安定性などが充分研究されていないので, 前項のようにして調製した部分精製酵素について, 各種の酵素化学的性質を調べた。

(1) 最適作用pH: 凍結乾燥した塩析酵素粉末を, 1mg当り1mlの水に溶かし, この酵素液を0.1Mクエン酸緩衝液(pH 2.0~9.0)で種々のpHに調整したショ糖溶液に30°C, 1時間反応させて, 酵素活性を測定した。結果はFig. 3のとおり, 最適pHは5.0付近にあることがわかった。

(2) 最適作用温度: 5~50°Cの種々の温度で酵素活性を測定して, Fig. 4の結果を得た。したがって最適温度は30°C付近にあることがわかった。

(3) 熱安定性: 酵素液をpH 5.0で30°, 35°, 40°および50°Cの恒温槽に保ち, 一定時間ごとに一部ずつとり出して急冷したのち, 酵素活性を測定した。結果はFig. 5のとおり, 40°C以上では酵素は, 速やかに失活

Fig. 3. pH-Activity Curve of Dextranucrase.

Fig. 4. Effect of Temperature on the Dextransucrase Activity.

Fig. 5. Heat Stability of Dextransucrase.

Enzyme solutions at pH 5.0 were kept, respectively, at 30°, 35°, 40°, and 50°C. Aliquots of the solutions were withdrawn at appropriate time intervals, cooled, and dextransucrase activity was measured at 30°C.

することがわかった。

(4) pH による熱安定性の変化: 酵素液を 3~9 の各 pH に調節し, 5°C および 30°C に 24 時間放置したのち, 酵素活性を測定した。結果は Fig. 6 のとおり, pH 5.0~5.2 付近で, 熱に対して最も安定であることがわかった。

(5) Michaelis 恒数: 基質濃度を 0.2% から 4% まで変化させて, 酵素反応速度を測定し, Fig. 7 のように Lineweaver-Burk の方法によって Michaelis 恒数を求めた。その結果, $K_m = 1.57 \times 10^{-2}$ (M) の値を得た。

6. DEAE-セルロースによる酵素の精製

DEAE-セルロース 1.6g を 0.005M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で緩衝化してカラムに充填し, 塩析酵素粉末 80mg を同じ緩衝液少量に溶かして加え, 0.005M リン

Fig. 6. Effect of pH on the Heat Stability of Dextransucrase.

Enzyme solutions adjusted to various pH values were stored at 5° and 30°C for 24 hrs, and variation in dextransucrase activity was estimated at pH 5.0.

Fig. 7. Lineweaver-Burk Plot for Dextransucrase Reaction.

pH 5.0, temperature 30°C.

酸緩衝液中 0~0.5M までの食塩濃度で gradient elution を行なった。結果は Fig. 8 および Table II. B のごとく, 酵素蛋白は食塩濃度 0.15~0.25M の間で溶出し, ピークにおける比活性は約 4 倍上昇した。しかし, この場合, 活性の回収率は 50% 以下で, あまりよくなかった。

これと同様にして, 食塩濃度 0.15, 0.25 および 0.35M とかえて step-wise elution を行なった結果は, Fig. 9 および Table II. B のごとく, フラクシオン 23~26 を集めると比活性は約 8 倍に上昇し, 活性回収率も 93.3% と良好であった。

したがって, 硫酸塩析と DEAE-セルロースクロマトグラフィーの両操作によって, はじめの培養上澄に比して, 24~56 倍の酵素精製が行なわれたことになる。

Fig. 8. Elution Pattern of Dextranucrase in DEAE-Cellulose Chromatography with Gradient Elution.

Amount of DEAE-cellulose 1.6 g; total enzyme activity 480 DSU; total protein 103.3 mg; elution solvent 0.005 M phosphate buffer (pH 6.0) containing 0 to 0.5 M NaCl; elution velocity 10 ml/hr; volume of a fraction 9 ml.

— protein, enzyme activity, ---- NaCl concentration.

Fig. 9. Elution Pattern of Dextranucrase in DEAE-Cellulose Chromatography with Step-wise Elution.

Amount of DEAE-cellulose 700 mg; total enzyme activity 210 DSU; total protein 49.50 mg; elution velocity 10 ml/hr; volume of a fraction 10 ml.

— protein, enzyme activity, NaCl concentration.

Table III. Ratio of α -1,6-, α -1,4- (or -1,2-), and α -1,3-Glucosidic Linkages in Dextrans Produced by Growing Cell, Culture Broth, and Partially Purified Dextranucrase from *L. mesenteroides* IAM 1046

	Ratio in per cent of		
	α -1,6-Glucosidic linkage	α -1,4-Glucosidic linkage	α -1,3-Glucosidic linkage
Dextrans produced by			
Growing cell	63	19	18
Culture broth	61	18	21
(NH ₄) ₂ SO ₄ -salted-out enzyme	86	10	4
Enzyme purified by DEAE-cellulose	81	12	7

7. 生育菌体および各精製段階の酵素標品によって合成されたデキストランの過ヨウ素酸化法による構造研究

この実験では生育菌体, 培養上澄, 塩析, 透析を行なった凍結乾燥酵素, および DEAE-セルロースで精製した酵素によってデキストランを生成させ, その構造を過ヨウ素酸化法によって検討し, α -1,6-, α -1,4- (または α -1,2-), および α -1,3-結合の比が変化するかどうかを研究した. 試料デキストランの調製, 過ヨウ素酸化の条件, 過ヨウ素酸消費量, およびギ酸の定量は, 実験方法の部に記載したとおりで, 各結合の比率の算出は Lohmer の方法⁽¹⁴⁾ によった.

結果は Table III のとおりで, 生育菌体や, 培養上澄によって生成したデキストランは, α -1,6-結合の含量が 60% 程度で, α -1,3 その他の結合の割合が比較的高いものであるのに対し, 精製した酵素によって合成されたデキストランは, α -1,6-結合の割合が明らかに増加していた.

考 察

従来, デキストラン合成に関与する酵素が 1 種であるか, 2 種以上であるかについては十分明らかではなく, Barker ら⁽¹⁵⁾, Bailey ら⁽¹⁶⁾ は 2 種の酵素を推定しているのに対して, Ebert ら^(4,5) はただ 1 種の酵素であるとしている. この不一致は, 酵素の高度の精製が困難であり, また生成物デキストランが高分子であるために構造解析が簡単でない, などの理由による.

著者らの研究においても, デキストラン合成酵素の高度の精製を目標にしたが, 現在までの結果では十分な精製が行なわれたとはいえない. しかし上の結果から, *L. mesenteroides* IAM 1046 の生育菌体, または培養上澄によって合成されたデキストランは, α -1,6-結合の含量が少なく, α -1,3-結合が比較的多いものであるが, 精製酵素によって合成させると, α -1,6-結合の含量が増加し, α -1,3-結合が減少することが明らかになった.

このことは、デキストラン合成が 2 種(またはそれ以上)の酵素によって行なわれていることを強く支持するものである。すなわち上の結果は、酵素の精製過程において branching enzyme が失活したか、または除去されたかによるものと考えることができる。

Barker ら⁽¹⁵⁾ は、*Betacoccus arabinosaceus* (Birmingham 株) の生産するデキストランについて、マグネシウム欠乏培地では、マグネシウムを加えた培地より、分枝結合の少ないデキストランを生じることから、マグネシウムイオンを必要とする branching enzyme の存在を示唆した。そこで著者らの用いた菌株についても、マグネシウムイオンの存否が、生産されるデキストランに影響するかどうかを検討するため、前項の各精製段階の酵素によってデキストラン合成を行なわせるとき、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を添加したもの と 添加しないものについて、生成するデキストランの構造を過ヨウ素酸酸化法を用いて比較検討した。その結果、マグネシウム欠乏の影響は、生菌体および培養上澄について見られ、マグネシウム無添加の場合は、硫酸マグネシウムを 0.02% 加えたものに比して、生成されるデキストランの α -1,6-結合の含量が高くなる傾向が見られた。これに対して精製酵素については、マグネシウム添加の影響は明瞭ではなかった。この差異が有意のものであるかどうかについては、なお検討する必要があるが、上の結果はマグネシウムイオンが polymerizing enzyme を阻害するか、または branching enzyme の activator となるためと考えられる。なお精製酵素に対して、マグネシウムの影響が見られなかったことから、後者の可能性が大きいと思われる。

Ebert ら^(4,5) によると、デキストランは合成酵素に結合したまま重合がすすむが、種々の acceptor があるとデキストラン鎖の末端は、これと結合して酵素からはなれるという。そして、すでに生成したデキストランも acceptor となり得るので、これによって分枝が生成されるという。しかし、もしこのような機作で分枝ができるとすれば、acceptor となり得る物質の濃度によって、分枝結合の含量は変化するはずである。すなわち高濃度のシロ糖が存在すると、低分子デキストランを多く生成するため、これが acceptor となって、分枝結合が増加することが考えられる。また、合成反応の初期と終期においては、acceptor となり得る物質の濃度に差があると考えられるので、合成反応の時期によって、生成され

るデキストランの構造に相違がみられる可能性が考えられる。

そこで、シロ糖濃度を変化させたとき、また合成反応の時間を追って、各時期に生成したデキストランの構造を過ヨウ素酸法で検討した。その結果は、いずれも生成するデキストランの構造には、認め得べきほどの差はなかった。

以上の諸結果は、いずれもデキストラン合成が polymerizing enzyme と branching enzyme の両酵素の作用によって行なわれると推定させるものである。もちろんこの推論を実証するためには、さらに酵素の高度の精製と、両酵素の分離が必要であろう。

要 約

(1) *Leuconostoc mesenteroides* IAM 1046 により、デキストランシュクララーゼを生産させるための培地、および培養条件を検討した。

(2) 上記菌株のデキストランシュクララーゼの部分的精製を行ない、硫酸塩析および DEAE-セルロースによるクロマトグラフィーを用いて、比活性が培養液の 24~56 倍の精製酵素を得た。

(3) 部分精製したデキストランシュクララーゼの酵素化学的性質を検討した。その結果、この酵素は作用最適 pH 5.0、最適温度 30°C、pH 4.0~7.5 において安定であるが、40°C 以上に速やかに失活するなどのことがわかった。また Michaelis 恒数は 30°C、pH 5.0 で 1.57×10^{-2} (M) であった。

(4) 生菌および各精製段階の酵素によってデキストランを生成させ、その構造を過ヨウ素酸酸化法によって検討した結果、精製酵素によって調製したデキストランは、生菌または培養上澄によって調製したものに比較して、 α -1,6-グルコシド結合の含量が増加していることを認めた。

(5) 以上の結果および他の 2, 3 の知見から、デキストラン合成酵素は単一なものではなく、 α -1,6-結合の合成を接触する酵素のほかに、 α -1,6-結合以外のグルコシド結合の合成を行なう酵素の存在を推定した。

終りに本報の研究に協力された田口良、猪飼誉夫、鈴木大助の諸君に感謝する。なお研究費の一部は、文部省科学研究費より支出した。

- (1) A. Jeanes, W. C. Haynes, C. A. Wilham, J. C. Rankin, E. H. Melvin, M. J. Clusky, B. E. Fischer, H. M. Tsuchiya and C. E. Rist : *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 5041 (1954).
- (2) A. Misaki and S. Kanamaru : *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 432 (1968).
- (3) F. Yamauchi and K. Matsuda : *ibid.*, **33**, 103 (1969).
- (4) K. H. Ebert und F. Patat : *Z. Naturforsch.*, **17 b**, 738 (1962).
- (5) K. H. Ebert und G. Schenk : *ibid.*, **23 b**, 788 (1968).
- (6) 小林恒夫, 塚野 豊 : 農化, **25**, 421 (1951).
- (7) A. Jeanes : "Methods in Carbohydrate Chemistry," Vol. V, ed. by R. L. Whister, Academic Press, 1965, p. 118.
- (8) E. J. Hehre : "Methods in Enzymology," Vol. I, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press, 1955, p. 178.
- (9) N. Nelson : *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
- (10) M. Somogyi : *ibid.*, **195**, 19 (1952).
- (11) 小林恒夫, 塚野 豊 : 農化, **27**, 33 (1953).
- (12) P. F. Fleury et J. Lange : *J. Pharm. Chim.*, **17**, 107, 196 (1933).
- (13) G. O. Aspinall and R. J. Ferrier : *Chem. & Ind.*, **1956**, 1216.
- (14) R. Lohmer : *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 4974 (1952).
- (15) S. A. Barker, E. J. Bourne, A. E. James, W. B. Neely and M. Stacey : *J. Chem. Soc.*, **1955**, 2096.
- (16) R. W. Bailey, S. A. Barker, E. J. Bourne and M. Stacey : *ibid.*, **1957**, 3530.
-