Euglena gracilis タンパク質の人工消化実験および ネズミ飼育試験による栄養価の決定

細谷 圭 助, 北岡正三郎
(大阪府立大学農学部農芸化学科)

昭和 52 年 1 月 14 日 受 理

Determination of the Nutritive Value of *Euglena gracilis* Protein by *In Vitro* Digestion Experiments and Rat Feeding Tests

Keisuke HOSOTANI and Shozaburo KITAOKA
Department of Agricultural Chemistry, University of Osaka
Prefecture, Sakai, Osaka 591

The *in vitro* digestibility of *Euglena gracilis* z protein was studied by incubating 4 types of heterotrophically grown cells and autotrophically grown cells of the protozoon with pepsin and trypsin. *E. gracilis*, particularly the green cells grown heterotrophically with illumination (GL cells), showed good digestibilities by the two proteases. Rat feeding test was performed with the untreated and some processed GL cells of *E. gracilis* to find that the protein of the protozoon has an excellent nutritive value in terms of the *in vivo* digestibility, biological value, protein efficiency ratio and net protein utilization, being short only slightly to that of casein.

(Received January 14, 1977)

緒 言

前報⁽¹⁾においてわれわれは原生動物 *Euglena gracilis* z の望ましい培養条件を求め, *E. gracilis* 細胞の一般化学組成とタンパク質のアミノ酸組成を示し, その分析値からユーグレナのタンパク質が高いアミノ酸価を持つすぐれたタンパク質であることを明らかにした. 本報では人工消化実験とネズミ飼育試験を行ない, *E. gracilis* タンパク質の栄養価を決定した.

実験材料および方法

1. 培養 前報⁽¹⁾に記載した改変 Hutner 培地での 4 種の従属栄養培養 (GL, GD, BL, BD)* および独立栄養培養によって 5 種類の *E. gracilis* z 細胞を得た. 培養は人工消化実験の試料を得るためには 5 liter ガラスビン中通気しながらスターラーで攪拌して 27°C で行ない, 動物飼育試験の試料調製のためには 100 liter ジャー・

ファーメンターを用いて 27°C, 通気量 20 liter/min, 攪拌 100 rpm で大量培養を行なった. 動物飼育試験は主として GL 細胞を用い, 培養中の光照射はジャー内の上部および中腹部に散光ランプ合計 600W を用いて行なった.

培養後収集した細胞はすべて凍結乾燥品として貯蔵した. 消化実験にはこれらの試料をそのまま用い, 動物飼育試験では一部後記するような処理をした細胞も用いた.

2. 試薬 消化実験に用いたペプシンは半井化学製 (1:10,000), トリプシンは Merck 製 (2000 E/g) で, 比較のため使用したカゼインは Merck 製 (Hammersten) である. 動物飼育試験に用いたカゼインは和光純薬製化学用で, 無機塩混合物およびビタミン混合物は田辺製薬の製品で, 組成は Harper⁽²⁾ による.

3. 人工消化実験 タンパク質消化酵素としてペプシンとトリプシンを用いた. まず *E. gracilis* の代表試料として GL 細胞をえらび, これとカゼインを用いて消化実験の最適反応時間と使用酵素量の検討を行なった.

* GL: Green-light; GD: Green-dark; BL: Bleached-light; BD: Bleached-dark.

試料 1.5 g を 300 ml 容の共栓付三角フラスコに入れ、ペプシンの場合は pH 1.2 のクエン酸-塩酸緩衝液、トリプシンの場合は pH 7.8 のリン酸緩衝液をそれぞれ 150 ml 加え、ときどき攪拌しながら氷室で一夜放置した。これを 30 ml ずつ 100 ml 容の共栓付三角フラスコに分注し、各濃度の酵素溶液 3 ml ずつと数滴のトルエンを加えた後、37°C で 24 時間振盪して消化を行なわせた。検討した酵素量は対基質比 1/20, 1/50, 1/100, 1/200 で、反応開始後数回の一定時間後に各反応混液より 4 ml ずつを試験管にとり、これに 50% トリクロル酢酸 0.34 ml ずつ（最終濃度 5%）を加えた。これを一夜冷蔵庫に放置した後 15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄液について 280 nm の吸収⁽³⁾および Lowry らの方法⁽⁴⁾によ

Fig. 1. *In vitro* Digestion of Lyophilized *E. gracilis* Cells and Casein by Different Doses of Pepsin.

Each reaction mixture (33 ml) contained 300 mg of *Euglena* cells or casein and 15.0 mg (○), 6.0 mg (△), 3.0 mg (□) or 1.5 mg (●) of pepsin.

Fig. 2. *In vitro* Digestion of Lyophilized *E. gracilis* Cells and Casein by Different Doses of Trypsin.

Each reaction mixture (33 ml) contained 300 mg of *Euglena* cells or casein and 15.0 mg (○), 6.0 mg (△), 3.0 mg (□) or 1.5 mg (●) of trypsin.

てタンパク質含量の変化を調べた。Fig. 1 および Fig. 2 に、紫外吸収法で測定した *E. gracilis* の GL 細胞とカゼインのペプシンおよびトリプシンによる消化の経時変化を示す。この結果からユーグレナ・タンパク質、カゼインとも概ね 24 時間位で両酵素による消化がほぼ終るようであり、消化反応時間は 24 時間と設定した。酵素量の影響では、カゼインの場合は酵素量の増加に伴い、消化率の上昇に明確な差が見られたが、ユーグレナ細胞では 12 時間以上の反応では酵素量が対基質比 1/100 以上では差がほとんどなかったため、充分量として対基質比 1/50（添加量 2 mg/ml, 反応液 33 ml 中 6 mg）を両酵素とも採用することとした。

実際の人工消化実験では GL, GD, BL, BD の従属栄養培養により得た 4 種の細胞および独立栄養培養による細胞とカゼインの 6 種の試料について、前記反応条件でペプシンおよびトリプシンによる消化を行なった。1 実験について 1 試料 1 g を用い、これを (a) 250 mg, (b) 500 mg, (c) 250 mg に 3 分し、(a) は 100 ml 容共栓付三角フラスコ、(b) と (c) は 100 ml 容ビーカーにとり、緩衝液をそれぞれ 25, 50 および 25 ml 加えた。(a) は試料を一夜緩衝液で浸漬後酵素液 (2 mg/ml) 2.5 ml を加えて反応させ、50% トリクロル酢酸 2.2 ml を加え、一夜冷蔵庫に放置後濾過し、沈殿を 5% トリクロル酢酸でよく洗った後、濾液および洗液を合して Kjeldahl 法により窒素を定量して a mg とする。(b) は試料を緩衝液で浸漬した後、50% トリクロル酢酸 4.4 ml を加えてよく混和する。これに酵素液 5 ml を加えて混和した後、一夜冷蔵庫に放置し、濾過、濾液中の窒素を定量して b mg とする。(c) は試料を緩衝液で浸漬後 50% トリクロル酢酸 2.2 ml を加えてよく混和し、一夜冷蔵庫に放置後濾過し、抽出残渣を風乾し窒素を定量して c mg とした。反応混液には必要に応じ、防腐のためトルエン数滴を加えた。人工消化率は次式より計算した。(b) だけを倍量用いて分析したのは、値が小さいので再現性を高めるためである。

$$\text{人工消化率(\%)} = \frac{2a - b}{2c} \times 100$$

各試料は各酵素ごとに 2 回ずつ実験を行ない、その平均値を求めた。

4. 動物飼育試験 飼育試験は 4 週令の S D 系白ネズミの雄で、体重 70~90 g のものを静岡県実験動物農業協同組合より購入して行なった。ネズミは 1 匹ずつ代

Table I. Composition of Diets

Constituents (%)	Rat groups					Protein-free diet
	A	B	C	D	E	
Casein	11.8					
Lyophilized GL cells		24.0				
Ethanol-extracted GL cells			18.3			
Paramylon-removed GL cells				19.9		
Lyophilized BL cells					16.3	
Sucrose	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
α -Corn starch	35.1	22.9	28.6	27.0	30.6	46.9
Salt mixture ^{a)}	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Vitamin mixture ^{a)}	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Cellulose powder	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Soybean oil ^{b)}	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Choline chloride	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

^{a)} Products of Tanabe Amino Acid Research Foundation.

^{b)} Contained 20% of cod liver oil.

謝ケージに入れ、2日間環境に慣れさせるために標準食で飼育した後飼育試験に入った。試験は20~23°Cで21日間行ない、最初の7日間は共通の無タンパク質飼料を与え、最終日の体重を基にして、各区の体重合計が平均化するように1区5匹ずつの5区に分けた。各区にTable Iに示すような、異なったタンパク質試料を粗タンパク質量として、それぞれ約10%含む飼料を与え、14日間飼育した。試験中水と飼料は自由に与えた。

A区はカゼインを含み、その粗タンパク質量84.4%⁽⁶⁾より配合量を計算した。B区は*E. gracilis*のGL培養細胞を凍結乾燥したものをタンパク質源とし、その粗タンパク質量は41.75% (パラミロン含量36.85%)であった。この値は前報⁽¹⁾の小規模培養で得たGL細胞の粗タンパク質量54.81%に比べてかなり低い。これはジャー・ファーマンター中での培養時の光照射量の不足により、GL細胞とGD細胞(小規模培養で31.75%)の中間の値になったものと思われる。しかしGL, GD両細胞ともタンパク質は同じアミノ酸価83を示す⁽¹⁾ので、このまま用いた。

C区はB区に用いたGL細胞の凍結乾燥細胞を10倍量の99%エタノールで60°Cに3時間抽出処理した脱色ユーグレナを含み、この試料細胞の粗タンパク質は54.75%であった。D区はB区のGL細胞の新鮮品を超音波破碎(10 Kc, 2時間)し、3000 rpmで10分間遠心分離してパラミロンを主とする沈殿を除いた後凍結乾

燥したものをタンパク質源とし、このものの粗タンパク質量は61.57% (パラミロン含量6.63%)であった。E区はGL細胞と比較の目的でBL細胞を凍結乾燥したものをを用い、このものの粗タンパク質量は50.19%であった。

各区の試験飼料は配合完了後粗タンパク質量をあらためて測定した。A~E区の各飼料の粗タンパク質量はそれぞれ9.65, 9.55, 9.67, 9.47, 9.57%であった。

5. 生物価, 消化率, タンパク質効率(PER)の測定 無タンパク質飼料での飼育期間および試料タンパク質飼料での飼育期間のそれぞれ最後の3日間の糞と尿を集め、その窒素含量をKjeldahl法で定量した。また両方の3日間の摂取飼料重量とその窒素含量を求め、生物価および真の消化率を計算した。一方試料タンパク質飼料の投与を開始してから最初の4日間はネズ

ミが試料飼料に慣れる期間として除き、5日目からの10日間の体重増加量とタンパク質摂取量を求め、タンパク質効率⁽⁶⁾を計算した。また生物価と真の消化率から正味タンパク質利用率(NPU)⁽⁷⁾を計算した。

結 果

1. *E. gracilis* 細胞の人工消化率

4種類の従属栄養および独立栄養条件下で培養したユーグレナのトリプシンとペプシンによる人工消化率をTable IIに示す。比較のためカゼインのデータも併記する。

カゼインではペプシンによる消化率よりもトリプシンによる消化率の方が高いが、ユーグレナではいずれもむしろペプシンによる消化率の方が高かった。ユーグレナの株間の比較では、Green株の方がBleached株よりも高い消化率を示す。培養時の光照射の有無による細胞消化率への影響では、トリプシンでは光照射下に生育した細胞の方が高い消化率を示すが、ペプシンでは差がない。また独立栄養培養の細胞はいずれの酵素によっても低い消化率を示した。

両酵素による消化率の総合的判断では*E. gracilis*のGL培養細胞が最も望ましい結果を与えたので、前報⁽¹⁾の組成分析の結果とも併せて、これを主として次の動物飼育試験のタンパク質試料に用いることとした。

Table II. *In Vitro* Digestibilities of *E. gracilis* Cells Grown under Different Conditions by Trypsin and Pepsin

Sample (500 mg)	Enzyme	Apparent digestible nitrogenous substance (A) mg	TCA soluble nitrogenous substance (B) mg	TCA insoluble nitrogenous substance (C) mg	Digestibility $(A-B) \times 100/C$
GL	Trypsin	30.51	5.38	29.05	86.49
GD	Trypsin	20.04	4.87	19.61	77.35
BL	Trypsin	30.01	6.89	32.80	70.50
BD	Trypsin	11.83	4.48	12.07	60.90
Autotrophic	Trypsin	27.06	5.21	36.89	59.22
Casein	Trypsin	67.62	0.55	66.84	100.33
GL	Pepsin	35.07	6.87	32.08	87.92
GD	Pepsin	24.84	6.36	20.25	91.23
BL	Pepsin	36.95	10.23	33.04	80.87
BD	Pepsin	15.76	6.06	12.15	79.82
Autotrophic	Pepsin	30.08	7.02	36.78	62.70
Casein	Pepsin	62.33	2.25	68.14	88.18

Fig. 3. Weight Gain of Rats in Feeding Test. Mean weights of 5 rats a group are given.

○ : group A ; □ : group B ; △ : group C ;
 ■ : group D ; ▲ : group E.

2. 動物飼育試験

ネズミは2日間の標準食飼育の後、1週間無タンパク質飼料で飼育し、この間平均1匹当たり13gの体重減少が見られた。この後5区に分けて試験タンパク質試料を含む飼料を与えたところ、各区の体重増加はFig. 3に示すようで、カゼイン区(A区)と、ユーグレナ区のうちではC区以外のB, D, E区ではほとんど差がなく、いずれも10日間で40~60g増加した。

ネズミはいずれの区においても、すべて不自然な挙動を示すことなく正常に生育し、飼育試験後の解剖の所見からは肝臓などに外観上の異常

はなかった。各区のネズミの平均肝臓重量はA区7.2g, B区7.0g, C区5.9g, D区6.5g, E区6.6gで、C区でやや小さかった。C区のネズミの尿がやや着色していたが、理由はわからない。

飼育試験の結果から *E. gracilis* タンパク質の栄養価の諸指標をまとめると Table III のようになる。この結果から *E. gracilis* の GL 細胞の凍結乾燥品は消化率がやや劣る以外、生物価、タンパク質効率(PER), および正味タンパク質利用率(NPU)においてカゼインに匹敵する値を示した。GL 細胞からパラミロンを除いたD区では未処理のGL細胞と同じ栄養価を示したが、アルコール抽出によって脱色したGL細胞(C区)は、消化率はあまり変わらなかったが、生物価とNPUは大きく低下した。GL細胞との比較に用いたBL細胞の消化率はGL細胞より僅かに高かったが、生物価は低かった。

Table III. Quality Assessment of *E. gracilis* Protein by Rat Feeding Test

Rat group with sample protein	Body weight gain (g) ^{a)}	PER ^{b)}	Digestibility(%) ^{c)}	Biological value ^{d)}	NPU ^{e)}
A : Casein	60 ± 5	4.44 ± 0.16	96.9 ± 0.6 ⁺	83.5 ± 1.9	80.9 ± 1.8
B : Lyophilized GL cells	58 ± 2	4.44 ± 0.08	93.1 ± 0.6	85.8 ± 1.1	79.9 ± 1.4
C : Ethanol-extracted GL cells	41 ± 2 ⁺	3.06 ± 0.07 ⁺	91.7 ± 0.3	71.5 ± 1.5 ⁺	69.5 ± 4.2 ⁺⁺
D : Paramylon-removed GL cells	55 ± 2	4.06 ± 0.16	93.3 ± 0.6	86.0 ± 0.5	80.2 ± 0.4
E : Lyophilized BL cells	57 ± 5	4.09 ± 0.14	95.1 ± 0.4 ⁺⁺	80.2 ± 1.1 ⁺	76.2 ± 1.2

The values are the means for 5 rats a group with standard errors.

^{a)} During 10 days of sample protein feeding ; ^{b)} Protein efficiency ratio : weight gain (g)/protein intake (g) ; ^{c)} True digestibility : (true absorbed N/N intake) × 100 ; ^{d)} Biological value : (retained N/true absorbed N) × 100 ; ^{e)} Net protein utilization : True digestibility × biological value/100.

Significantly different from the values of group B (lyophilized GL cells), ⁺ at $P < 0.01$; ⁺⁺ at $P < 0.05$.

考 察

ユーグレナの栄養価の研究は六所ら⁽⁸⁾によって初めて行なわれ、*E. viridis* の一般組成とアミノ酸およびビタミン含有量が報告され、全般的に見て動物性食品に近い栄養組成を有するものと結論された。ついでイスラエルの Kott, Wachs⁽⁹⁾ が不純な野生ユーグレナのアミノ酸含量を報告した。このようにユーグレナ・タンパク質の栄養価の研究はこれまできわめて少ない上、組成研究に留っていた。本研究では初めてユーグレナの代表株である *E. gracilis* z について人工消化実験とネズミ飼育試験を行ない、前報⁽¹⁾の組成研究の結果と併せて、そのタンパク質の栄養価を確立することができた。

人工消化実験ではトリプシンとペプシンの両酵素を用いた。トリプシンによる消化率は 5 種類のユーグレナ細胞のうちでは GL 細胞が最も高く 86.49% を示し、ペプシンによる消化率は GD 細胞が 91.23%, GL 細胞が 87.92% であった。両酵素の消化率を総合すると GL 細胞が最も望ましい結果となる。独立栄養培養の細胞は従属栄養培養の細胞よりかなり低い消化率を示し、Bleached 株は Green 株より低い値を示した。これらの差は培養条件による細胞外壁（ペリクル）の組成、構造の差によるものと考えられる。

ユーグレナの人工消化率を、比較的報告例の多いクロレラの値と比較すると、トリプシンによる消化率は、満田ら⁽¹⁰⁾は凍結乾燥試料で 58.4%, 熱風乾燥試料で 27.5% (いずれも 2 測定値の平均) と報告し、石井ら⁽¹¹⁾は凍結乾燥試料について 69.3% を報告している。また熱風乾燥クロレラについて田村ら⁽¹²⁾は 62.5~65.5% を得ている。われわれもヤクルト本社研究所より分与された凍結乾燥クロレラについて、ユーグレナと同一条件で消化率を求めたところ、トリプシンによる値として 66.78% が得られ、従来の報告値と近い値であった。ペプシンによるクロレラの人工消化率は神立ら⁽¹³⁾の報告値だけしかないが、43.9~46.8% を得ている。*Spirulina platensis* (噴霧乾燥試料) のペプシンによる消化率は小林⁽¹⁴⁾によると約 80% でクロレラの約 2 倍であり、また光合成細菌は約 60 数% であるという。*E. gracilis* のペプシン消化率は GL 細胞で 87.92%, GD 細胞で 91.23% とこれらよりずっと高い値であった。われわれが測定した凍結乾燥クロレラのペプシン消化率は 18.92% と大変低かったが、これはクロレラに適切な条件での測定でな

かった故かもしれない。

ネズミ飼育試験の結果の一部である真の消化率を、人工消化率と関連させてまず取り上げると、Table III に示すように、凍結乾燥した *E. gracilis* の GL 細胞と BL 細胞はカゼインに僅かに劣る程度の消化率を示した。報告されたいくつかの微生物の真の消化率をまとめると、凍結乾燥クロレラについて石井ら⁽¹¹⁾は 74.7±0.8%, 熱風乾燥（原色）クロレラについて満田ら⁽¹⁰⁾は 47.8~65.5%, 田村ら⁽¹²⁾は 49.1~58.4%, 神立ら⁽¹⁵⁾は 67.0~72.0% を得ている。Mitsuda ら⁽¹⁶⁾はまた乾燥 *Torula* 酵母について 64.6%, Clément ら⁽¹⁷⁾は raw *Spirulina maxima* について 75.5~76.7% の消化率を得ている。これらの値と比較すると、ユーグレナの消化率は非常に高いことがわかる。その理由はおそらく、ここに比較のために挙げた微生物の細胞膜がホ乳動物にとって消化し難い多糖類を多く含むのに対して、ユーグレナではタンパク質を主成分とするペリクルでおおわれている⁽¹⁸⁾ことによるものであろう。人工消化実験でのユーグレナ細胞の高い消化率も同様の解釈によって理解しうる。これらの消化実験の結果からユーグレナ細胞は細胞膜破壊またはタンパク質抽出などの前処理を必要とせず、そのままホ乳動物に利用されることを示している。

E. gracilis タンパク質の栄養価はネズミ飼育試験により、生物価、PER、NPU として表わした。B 区の凍結乾燥 *E. gracilis* GL 細胞について見ると、前述のように消化率が僅かに低い以外は、これらの指標でカゼインとほぼ等しい栄養価を示し (Table III)、このタンパク質がきわめて良質のものであることがわかる。ちなみに若干の他の微生物タンパク質の栄養価として生物価を挙げると、*Chlorella ellipsoidea* 79.1 (石井ら⁽¹¹⁾)、*Spirulina maxima* 60~65 (Clément ら⁽¹⁷⁾)、*Hydrogenomonas eutropha* 77.6 (Calloway ら⁽¹⁹⁾)、*Candida lipolytica* 54 (Shacklady ら⁽¹⁹⁾) である。ユーグレナは生物価でこれらの値よりも高い上、消化率もこれら微生物タンパク質よりも高いので、NPU の比較ではさらに著しい差を示す。

ユーグレナの C 区のタンパク質試料は、B 区の GL 細胞を熱アルコール抽出することにより脱色と脱臭を行ない、ネズミの摂食を促進する意図であったが、ネズミは乾燥 GL 細胞をそのまま含む飼料を何ら忌避することなく摂食したので、このような処理の効果はなく、むしろ C 区ではすべての指標で B 区の値より低い値が得られ

た。これはおそらく熱アルコール抽出によって粗タンパク質のアミノ酸組成が変わり、栄養的に質が低下したことによるものと思われる。飼料摂取量はC区でもB区と差はなかった。D区はB区のGL細胞より貯蔵多糖の β -1,3-グルカンであるパラミロンを相当量(36.38%→6.63%)除去した試料を含む飼料を与えたが、無処理のB区の結果とはほぼ同じ結果が得られ、このことからパラミロンの存在はタンパク質の利用に害作用を示すものでないことがわかる。E区はGL細胞との比較の目的で、*E. gracilis*のBL細胞をタンパク質試料として用いたものである。その消化率はGL細胞より有意に高いが、生物価でやや低い値が得られている。この差が前報⁽¹⁾に示したようにGL細胞のアミノ酸価が83であるのに対し、BL細胞のそれが78であるという、タンパク質のアミノ酸組成上の差異に由来するのか、BL細胞が葉緑体とそれに随伴する何らかの生長因子を欠損することによるものか、現段階ではわからない。

要 約

4種の従属栄養培養および独立栄養培養によって得た*E. gracilis*細胞の凍結乾燥品をペプシンとトリプシンによる人工消化実験に用いた。*E. gracilis*細胞はすべて高い人工消化率を示し、特に光照射下に従属栄養で培養したGreen株(GL細胞)は両酵素による高い消化率を示した。GL細胞を主とし、ネズミ飼育試験でユーグレナ・タンパク質の栄養価を求めたところ、真の消化率で僅かに劣ったが、PER, 生物価, NPUにおいてGL細胞はカゼインに比肩する値を示し、すぐれた栄養価を持つタンパク質であることがわかった。熱エタノール処理したGL細胞は栄養価低く、貯蔵多糖をあらかじめ除去したGL細胞は無処理のGL細胞と変らない栄養価を示した。光照射下培養したBleached株細胞はGL細胞よりやや低い生物価を示した。

ネズミ飼育試験は大阪市立環境科学研究所神戸 保氏の、またユーグレナ大量培養は当研究室中野長久博士の協力と助言を得た。厚く感謝する。本研究の費用の一部は文部省科学研究費に依った。記して謝意を表する。

- (1) 北岡正三郎, 細谷圭助: 農化, **51**, 477 (1977).
- (2) A. E. Harper: *J. Nutr.*, **68**, 405 (1959).
- (3) M. Kunitz: *J. Gen. Physiol.*, **3**, 291 (1947).
- (4) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (5) 科学技術庁資源調査会編: 「三訂日本食品標準成分表」, 1963, p.66.
- (6) 満田久輝, 宮崎基嘉編: 「栄養化学」, 朝倉書店, 1973, p.83.
- (7) 田村盈之輔: 「新栄養学」, 中川一郎, 二国二郎, 吉川春寿編, 朝倉書店, 1963, p.137.
- (8) 六所文三, 神谷真太郎, 中山大樹, 酒井幸子, 多田靖次: 農化, **33**, 293 (1959).
- (9) Y. Kott and A. M. Wachs: *Appl. Microbiol.*, **12**, 292 (1964).
- (10) 満田久輝, 河合文雄, 村上和雄, 鹿内健彦: 栄養と食糧, **12**, 155 (1959).
- (11) 石井孝彦, 神立 誠, 亀高正夫: 栄養と食糧, **27**, 103 (1974).
- (12) 文献(10)に引用.
- (13) 神立 誠, 保井忠彦: 栄養と食糧, **16**, 318 (1963).
- (14) 小林達治: 「たんぱく質資源の開発とその食飼料化シンポジウム」講演要旨集, 1974, p.30.
- (15) 文献(10)に引用.
- (16) H. Mitsuda, K. Yasumoto and H. Nakamura: *Mem. Coll. Agr., Kyoto Univ.*, No.92, 27 (1967).
- (17) G. Clément, C. Giddey and R. Menzi: *J. Sci. Food Agr.*, **18**, 497 (1967).
- (18) D. R. Barras and B. A. Stone: *Biochem. J.*, **97**, 14 p (1965).
- (19) E. S. Lipinsky and J. H. Litchfield: *Food Technol.*, **28**, No. 5, 16 (1974)に引用.