[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol.59, No.9, pp.901~907, 1985]

抗酸化作用を有する微生物の検索[†]

加藤富民雄, 中里一郎, 白石 剛,

林 浩司, 村田 晃, 米 康夫*

(佐賀大学農学部農芸化学科, *九州大学農学部水産実験所)

昭和 60 年 4 月 5 日 受 理

Screening for Antioxidative Activity in Microorganisms (Utilization of Waste Fish Treated with Microorganisms. Part I)

Fumio KATO, Ichiro NAKAZATO, Takeshi SHIRAISHI, Koji HAYASHI,

Akira MURATA and Yasuo YONE*

Department of Agricultural Chemistry, Saga University, 1, Honjo-machi, Saga 840

**Fishery Research Laboratory, Kyushu University, Tsuyasaki, Munakata-gun, Fukuoka 811-33*

A large amount of byproduct of fish from marine product industries is used to make meal for fish. The fish meal made of waste fish usually contains peroxide lipid which is harmful to living things. This report describes a fish meal preparation with low peroxide lipid content. The antioxidative activity of various microorganisms was examined by measuring oxidation in fish oil. Nine mold strains and 17 yeast strains showed antioxidative activity, but no bacterial strain exhibited such activity. *Aspergillus sojae* K had the strongest antioxidative activity among mold strains used and *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2114 had the strongest antioxidative activity among yeast strains used.

Conditions for treating waste fish with microorganisms were determined with *A. sojae* K. The fish was autoclaved and pelleted in a laboratory mill to 1 cm diameter by 3 cm length. The optimal water content of the fish was approximately 50%, and no pellet was made when the water content was over 70%. Wheat bran was added at 5% (w/w) to the fish as a carbon source. It was necessary to inoculate *A. sojae* K at more than 10^6 spore per 1 g of waste fish to repress oxidation. Cultures were performed at 30°C for 16 hr. *A. sojae* K and *S. cerevisiae* IFO 2114 showed marked antioxidative activity on waste fish oxidation. The most effective method was treating the fish with a combination of *A. sojae* K, *A. oryzae* and *S. cerevisiae*.

(Received April 5, 1985)

緒 言

魚残滓は、魚の加工時や都市残滓として毎日大量に出しており、魚かすの製造⁽¹⁾や肥料に用いられている。魚粉と魚かすはわが国で消費されている動物性飼料の原料として大半をなすもので、年間約 80 万トン使用されている⁽²⁾。現在、製造されている魚粉や魚かすはその製造工程で高温乾燥を行うため、過酸化脂質含量が高く⁽³⁾、また、病原微生物に汚染されたものもあり⁽⁴⁾、飼料として

用いた場合、種々の疾病の原因⁽⁵⁻⁷⁾となる可能性がある。しかし、魚残滓は魚かすの主要な原料であり、これを有効利用することは資源の乏しいわが国にとって不可欠のことと考えられる。そこで、魚残滓を原料とし、過酸化脂質含量の低い優良な魚粉を製造することを目的として研究を開始した。

酸化したサナギを麹菌で処理して飼料にしたという報告⁽⁸⁾に基づき、魚油の酸化を微生物による処理で抑制しようと考え、抗酸化作用を有する微生物の検索を行った。本報では、魚油と魚残滓の酸化を抑制する微生物のスクリーニングの結果について述べる。

[†] 魚残滓の飼料化に関する研究 (第 1 報)

実験材料および方法

1. 魚残滓 佐世保市の缶詰工場が出たイワシ、サバの残滓や魚市場で出る雑魚などをオートクレーブで殺菌し、油圧式圧搾機で水分含量を約 50% に調製後、直径 1 cm、長さ 3 cm のペレット状にして用いた。

2. 魚油 上記の圧力処理の際に得られた魚油を分離し、加熱酸化させ、過酸化価 (POV) を約 50 に調整したものを用いた。

3. 使用菌株 当研究室保存の糸状菌 10 株、酵母 17 株、細菌 19 株の計 46 株を使用した。Table I, II および III に菌名を示す。

4. 培地と培養方法 糸状菌と酵母の保存培地としてはポテトデキストロース寒天培地“栄研”(栄研化学社製)を使用した。液体培地としては MY 培地; 酵母エキス 3 g, 麦芽エキス 3 g, ポリペプトン 5 g, ブドウ糖 10 g, 蒸留水 1 l を用いた。細菌の培養にはブイヨン培地; 肉エキス 10 g, ポリペプトン 10 g, 酵母エキス 3 g, NaCl 5 g, 水道水 1 l, pH 7.0 を用い、保存用斜面培地には寒天 1.7% を加えて使用した。糸状菌と酵母は 10 ml の MY 培地を含む大型試験管 (2.2×20 cm) に、保存斜面培養から 1 白金鉤ないし 1 白金耳接種し、試験管振とう培養機 (いわしや科学製, RTR 1-P) を用い、30°C で 300rpm の速度で振とう培養した。細菌は 10 ml のブイヨン培地を含むモノー L 字管に保存斜面培養から 1 白金耳接種し、30°C でモノー振とう培養した。

5. POV 測定法 魚油の過酸化価 (POV) の測定は衛生試験法注解⁹⁾によった。魚残滓の POV 測定は, Folch の方法¹⁰⁾により脂質を抽出後行った。

6. TBAV 測定法 試料のチオバルビツール酸価 (TBAV) は松下の方法¹¹⁾に準じて行った。

7. 抗酸化作用を有する微生物の検索法 1) 魚油による検索: 培地 7 ml を含む大型試験管に供試微生物をおよそ 1×10^5 /ml になるように接種し、30°C で 6 時間振とう培養した。これに魚油 3 ml を加え、さらに 30°C で 16 時間振とう培養した後、培養液を 1500×g で 15 分間遠心分離し、油層を得た。この油層の POV と TBAV を測定した。対照としては、微生物を接種せず培地と魚油を同様に振とうしたものを用い、この油層の POV と TBAV を測定した。2) 魚残滓による検索: ペレット状の魚残滓 200 g を直径 25 cm、深さ 6 cm の円型ブリキカンに入れ、1 kg/cm² で 15 分間殺菌した。これに MY 培地で別に培養した糸状菌や酵母を殺菌した小麦フスマに混ぜたもの 10 g を菌数が魚残滓 1 g 当り 10^6 になるように加え、よく混合した後 30°C で 20 時間静置培養した。対照には微生物を加えずに同様の処理を行った魚残滓を用い、POV と TBAV を測定した。3) 抗酸化活性の表示法: 微生物の抗酸化活性は、培養後の対照の POV あるいは TBAV から試料の POV あるいは TBAV を引き、これを対照の POV あるいは TBAV で除して 100 倍した値 (%) で表わした。

実験結果

1. 魚油を用いた抗酸化活性の検索

(1) 糸状菌 新しい斜面培養から胞子を取り、7 ml の MY 培地を含む大型試験管に接種し、30°C で 6 時間振とう培養した。これに魚油 3 ml を加え、さらに 16 時間振とう培養を行い油層の POV と TBAV を測定し

Table I. Effect of Molds on Oxidation of Fish Oil

Mold	POV ^a (meq/kg)	Activity ^c (%)	TBAV ^b (mg/kg)	Activity ^c (%)
None ^d	310	0	880	0
<i>Aspergillus sojae</i> K	94	70	285	68
<i>Aspergillus oryzae</i>	102	67	300	66
<i>Mucor javanicus</i>	110	65	315	64
<i>Aspergillus sojae</i> IFO 30112	135	57	380	57
<i>Rhizopus javanicus</i>	135	57	380	57
<i>Aspergillus sojae</i> IFO 4200	140	55	395	55
<i>Aspergillus niger</i>	140	55	420	52
<i>Penicillium chrysogenum</i>	260	16	735	17
<i>Monascus anka</i>	275	11	790	10
<i>Monascus purpureus</i>	310	0	880	0

^a Peroxide value; ^b thiobarbituric acid value; ^c antioxidative activity; ^d initial POV and TBAV were 50 and 150, respectively.

Table II. Effect of Yeasts on Oxidation of Fish Oil

Yeast	POV (meq/kg)	Activity (%)	TBAV (mg/kg)	Activity (%)
None	295	0	870	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2114	94	68	300	66
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 234	94	68	313	64
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2346	100	66	313	64
<i>Pichia membranaefaciens</i>	100	66	313	64
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KYOKAI No. 7	100	66	313	64
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2373	102	65	319	63
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 1661	107	64	327	62
<i>Saccharomyces rouxii</i>	107	64	340	61
<i>Hansenula anomala</i>	112	62	340	61
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>sake</i>	125	58	340	61
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 251	125	58	370	58
<i>Shizosaccharomyces octosporus</i>	133	55	380	56
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	137	54	380	56
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2376	140	53	420	52
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 282	150	49	435	50
<i>Rhodotorula</i> sp.	167	43	475	45
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	187	37	545	37

See the legend to Table I.

Table III. Effect of Bacteria on Oxidation of Fish Oil

Bacteria	POV (meq/kg)	Activity (%)	TBAV (mg/kg)	Activity (%)
None	260	0	710	0
<i>Bacillus subtilis</i>	260	0	710	0
<i>Brevibacterium divericatum</i> NRRL B-2311	260	0	710	0
<i>Brevibacterium aminogenes</i> KY 3805	260	0	710	0
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> ATCC 6871	260	0	710	0
<i>Brevibacterium stationis</i> ATCC 14403	260	0	710	0
<i>Micrococcus glutamicus</i> ATCC 13286	260	0	710	0
<i>Brevibacterium helvolum</i> ATCC 11822	260	0	715	0
<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	260	0	715	0
<i>Escherichia coli</i> B	270	0	725	0
<i>Brevibacterium acetylicum</i>	275	0	725	0
<i>Brevibacterium maris</i> AHU 1402	275	0	735	0
<i>Brevibacterium flaoum</i>	280	0	735	0
<i>Brevibacterium linens</i>	280	0	735	0
<i>Brevibacterium protophomiae</i> ATCC 19271	280	0	735	0
<i>Arthrobacter tumescens</i>	290	0	795	0
<i>Corynebacterium acetophilum</i> NRRL B-3421	340	0	820	0
<i>Corynebacterium herculis</i>	340	0	820	0
<i>Arthrobacter citreus</i> ATCC 11624	340	0	820	0

See the legend to Table I.

た。この培養条件下での糸状菌の生育は、6時間の前培養で packed cell volume (PCV) が 0.02~0.05 ml、培養終了時では 0.4~0.8 ml であった。Table I に示すように、用いた 10 株の糸状菌のうち 9 株が抗酸化活性を有していた。そのなかでも、*Aspergillus sojae* K, A.

oryzae, *Mucor javanicus* が強い活性を示した。

(2) 酵母 用いた 17 株の酵母すべてが抗酸化活性を示した。Table II に示すように、*Saccharomyces cerevisiae* IFO 2114 や *S. cerevisiae* IFO 234 などが強い活性を持つことが明らかとなった。生育は *S. cerevisiae*

IFO 2376 がやや劣っていたが他の株は良好であった。

(3) 細菌 細菌ではすべての菌株が対照より POV や TBAV が大きく、抗酸化活性を有するものはなかった (Table III)。

2. POV と TBAV の経時変化

1. の検索の結果活性の強かった糸状菌と酵母5株に

Fig. 1. Time Course of the Oxidation of Fish Oil Treated with Mold. Molds were cultivated by shaking in a 250 ml flask containing 70 ml of MY medium for 6 hr at 30°C. Then 30 ml of fish oil was added to the culture. A ten ml aliquot of the culture was taken out at 4 hr intervals, and the peroxide value (POV) and thiobarbituric acid value (TBAV) of oil phase were measured. ○, control; ●, *Aspergillus sojae* K; □, *A. oryzae*; △, *Mucor javanicus*; —, POV; ·····, TBAV.

Fig. 2. Time Course of the Oxidation of Fish Oil Treated with Yeast. Experimental conditions are the same as described in Fig. 1. ○, control; ●, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2114; □, *Pichia membranaefaciens*; —, POV; ·····, TBAV.

について POV と TBAV の経時変化を測定した。10 ml の種培養を 70 ml の MY 培地を含む 250 ml 三角フラスコに植え、30°C で 6 時間振とう培養した。魚油 30 ml を加え、以後 4 時間ごとに培養液 10 ml を取り油層の POV と TBAV を測定した。Fig. 1 に示すように、微生物を接種しない対照では時間の経過とともに POV と TBAV は直線的に上昇していき、16 時間後には POV は約 6 倍、TBAV は約 5 倍の数値に達した。一方、*A. sojae* K, *A. oryzae* では POV と TBAV の上昇は対照の約 1/3 であり、*M. javanicus* でも 2/5 弱に抑制された。また、Fig. 2 に示すように、*S. cerevisiae* IFO 2114 でも POV と TBAV の上昇はかなり抑制され、対照の約 1/3 であった。*P. membranaefaciens* では POV と TBAV の上昇は対照の約 1/3 と約 2/5 であった。いずれの場合も POV と TBAV の上昇の様子はよく相関していた。

3. 魚残滓の微生物処理条件の検討

(1) フスマの添加量 魚残滓を微生物処理する際、炭素源として炭水化物を添加する必要がある、その種類と量について検討した。炭水化物として、米ヌカ、小麦粉、小麦フスマなどを用いたが、好気性微生物の培養には粉末状のヌカや小麦粉より粒状のフスマが適していた。フスマの添加量は Fig. 3 に示すように、魚油に対する抗酸化活性の最も強かった *A. sojae* K を用いて調べたところ、魚残滓に対して 5% 以上で POV と

Fig. 3. Effect of Wheat Bran Addition on Decrease in POV and TBAV of Waste Fish Treated with *Aspergillus sojae* K. *A. sojae* K was inoculated at 1×10^6 per g of waste fish. Cultivation was performed in a can containing 200 g of waste fish and various volumes of wheat bran for 20 hr at 30°C. ○, POV; ●, TBAV.

Fig. 4. Effect of Water Content of Waste Fish on Decrease of POV and TBAV by Treating with *A. sojae* K. Except for water content, experimental conditions are the same described in Fig. 3 at 5% of wheat bran. ○, POV; ●, TBAV.

Fig. 5. Effect of Initial Cell Number on Decrease in POV and TBAV of Waste Fish Treated with *A. sojae* K. Except for initial cell number, experimental conditions are the same as described in Fig. 3 at 5% of wheat bran. ○, POV; ●, TBAV.

TBAV はほぼ一定値まで低下した。この結果からフスマの添加量は魚残滓に対して 5% でよいと考えられた。

(2) 魚残滓の水分含量 魚残滓の水分含量の影響を明らかにするために水分含量をかえた魚残滓に *A. sojae* K を接種し、POV と TBAV を測定した。Fig. 4 に示すように、水分含量 10% ではほとんど菌が生育しなかったため POV と TBAV は高い値を示した。20% 以上 60% までは菌の生育にはほとんど差はみられなかったが、POV と TBAV の低下は 40% から 60% が最大であった。なお、70% 以上の水分含量では魚残滓がや

Fig. 6. Time Course of POV and TBAV of Waste Fish Treated with *A. sojae* K. ○, POV; ●, TBAV.

わらかすぎてペレット状態を保つことができず、実験データは得られなかった。

(3) 菌接種量 初発の菌接種量の POV と TBAV に対する影響を *A. sojae* K の胞子を用いて検討した。*A. sojae* K をフスマ培地で胞子を形成するまで十分生育させた。胞子数を平板上にコロニーを形成させて計数した。胞子を魚残滓 1g 当り 10^5 , 10^6 , 10^7 となるように添加して 20 時間培養後 POV と TBAV を測定した。魚残滓 1g 当り 10^6 以上胞子を添加しても POV と TBAV は対照の約 1/3 でそれ以下にはならなかった (Fig. 5)。

(4) 魚残滓の POV と TBAV の経時的変化 水分含量 50% の魚残滓に対し、重量でその 5% に当るフスマを加え殺菌後、*A. sojae* K の胞子を原料 1g 当り 10^6 になるように加え、30°C で 20 時間静置培養を行った。4 時間ごとにサンプリングを行い POV と TBAV の経時変化を調べた。Fig. 6 に示すように、POV と TBAV は最初の 4 時間の培養で急激に低下し、その後 12 時間まで徐々に低下し以後一定となった。

4. 各種微生物の魚残滓に対する抗酸化活性

上述のように魚残滓の処理条件を決めたので、これに従い各種微生物の抗酸化活性を魚残滓を用いて調べた。用いた微生物は魚油の酸化を強く抑制した糸状菌と酵母計 9 株である。この結果 Table IV に示すように、糸状菌では、*A. sojae* K と *A. oryzae* が抗酸化活性が高く 70% 以上であった。酵母は用いた 5 株の活性の強さにそれほど差異はなく 50% 前後であった。これらの結果は魚油を用いた検索の結果とよく一致した。

Table IV. Decrease in Peroxide Value and Thiobarbituric Acid Value of Waste Fish Treated with Mold or Yeast

Microorganism	POV (meq/kg)	Activity (%)	TBAV (mg/kg)	Activity (%)
None ^a	105	0	180	0
<i>Aspergillus sojae</i> K	25	76	45	75
<i>Aspergillus oryzae</i>	30	71	50	72
<i>Mucor javanicus</i>	55	48	95	47
<i>Rhizopus javanicus</i>	100	6	170	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2114	50	52	90	50
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 234	55	48	95	47
<i>Pichia membranaefaciens</i>	55	48	95	47
<i>Hansenula anomala</i>	60	43	105	42
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2346	60	43	105	42

^a Initial POV and TBAV were 100 and 180, respectively.

Table V. Decrease in Peroxide Value and Thiobarbituric Acid Value of Waste Fish Treated with a Combination of Microorganisms

Microorganism	POV (meq/kg)	Activity (%)	TBAV (mg/kg)	Activity (%)
None ^a	127	0	205	0
<i>Aspergillus oryzae</i>				
<i>Aspergillus sojae</i> K	31	76	51	75
<i>Aspergillus sojae</i> K				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2114	32	75	55	73
<i>Aspergillus oryzae</i>				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2114	33	74	55	73
<i>Aspergillus sojae</i> K				
<i>Pichia membranaefaciens</i>	34	73	60	70
<i>Aspergillus sojae</i> K				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 234	41	68	65	68
<i>Aspergillus oryzae</i>				
<i>Aspergillus sojae</i> K	23	82	40	80
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2114				
<i>Aspergillus oryzae</i>				
<i>Aspergillus sojae</i> K	31	76	50	76
<i>Pichia membranaefaciens</i>				

^a Initial POV and TBAV were 120 and 200, respectively.

5. 微生物の組合せによる抗酸化活性の増大

抗酸化活性の高い微生物を組み合わせて使用することによりさらに抗酸化作用の増大がはかれるのではないかと考え、*A. sojae* K と *A. oryzae* の糸状菌 2 種と *S. cerevisiae* IFO 2114, *S. cerevisiae* IFO 234 と *P. membranaefaciens* の酵母 3 種をそれぞれ組み合わせて魚残滓を処理した。結果は Table V に示す。微生物を組み合わせて使用することにより、1 種類の微生物で処理するより若干 POV と TBAV の低下が大きくなった。とくに、*A. oryzae* と *A. sojae* K に *S. cerevisiae* IFO 2114 の 3 種の微生物を組み合わせた場合、POV と TBAV の低下が最も大きく対照の 1/5 以下となった。表には示していないが、4 種類以上の組合せで処理したところ、上記の 3 種類の

組合せに優る効果はなかった。なお、3 種類の微生物の組合せのなかに酵母を加えて処理したものは発酵過程や製品の魚臭を消す効果もあったことを付記しておく。

考 察

魚残滓を微生物処理するための前段階として魚油を用いて抗酸化作用を示す微生物をスクリーニングした。その結果、糸状菌や酵母のなかにはかなり多数の抗酸化作用を示す菌株が存在することが明らかとなった。今回検索に用いた微生物は魚残滓を処理した後、飼料として使用することを考慮して、病原性のない食品工業などで利用されている安全性の高い微生物に限定した。その点、抗酸化作用を有する微生物はこの他にも存在すると考えら

れるし、もっと強力な作用を持つ微生物が存在する可能性がある。

使用した微生物の生育度と抗酸化活性はかならずしも比例しておらず、その抗酸化活性は菌株固有のものと考えられた。細菌のなかには抗酸化作用を示すものが見出されなかったが、魚油と培養液がエマルジョンになっており、細菌の生育が抑制されたためかもしれない。また、この系では魚油と培地を 30°C で長時間振とうするという強制的な酸化を行っているため、抗酸化作用の弱い微生物は検出できない可能性も考えられる。

魚油の酸化を最も強く抑制した *A. sojae* K を用いて、魚残滓の酸化抑制のための培養条件を検討した。魚残滓はオートクレーブで殺菌し、培養中の通気性をよくするためペレットを用いて径 1 cm、長さ 3 cm のペレットにして用いた。このペレットの水分含量は 40~50% のものが、強度や菌の生育の点で適していた。また、微生物が生育するための炭素源として、小麦粉、米ヌカ、小麦フスマを用いて検討したが、通気性や価格の点でフスマが最適であった。フスマは魚残滓に対して 5% 以上添加すれば POV と TBAV は対照の約 1/3 まで低下した。フスマの添加だけで微生物の生育は旺盛であったので他の栄養源をさらに加える必要はないと考えられた。*A. sojae* K の初発の添加量を、胞子を用いて調べたところ、魚残滓 1 g 当り 10^6 以上であれば POV と TBAV の値は一定値まで低下した。

魚油の酸化を強く抑制した微生物で魚残滓を処理した結果、その抗酸化作用の強弱は同様の傾向を示した。このことは、魚残滓の酸化を抑制する微生物をスクリーニングするのに魚油を用いて簡単に行えることを示唆している。魚残滓の処理を 3 種類の微生物 (*A. oryzae*, *A. sojae* K と *S. cerevisiae*) を組み合わせて行くと最も抗酸化作用が強く、POV と TBAV は対照の約 1/5 まで低下した。また、酵母を用いることにより製品の魚粉の臭いが芳香にかわるという効果も得られた。このことは魚残滓を大量に処理する場合、公害の基となる悪臭を出さずにするというメリットが得られるのではないかと考える。

なお、大量処理の結果と製品の魚粉による飼育試験の成績については別に報告する予定である。

要 約

魚残滓を良質な動物性飼料にするため、抗酸化作用を

有する微生物による処理を行った。

(1) 魚油を用いてその酸化を抑制する微生物のスクリーニングを行った結果、用いた微生物のうち糸状菌では 10 株中 9 株に、酵母では 17 株すべてに抗酸化作用を認めたが、細菌にはその作用は見られなかった。

(2) 糸状菌のなかでは *Aspergillus sojae* K、酵母では *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2114 が最も強い抗酸化作用を示した。

(3) 魚残滓をオートクレーブ後ペレット状にし、微生物処理する条件を *A. sojae* K を用いて検討した。その条件は、魚残滓の水分含量約 50%、フスマの添加量 5%、接種する菌数は魚残滓 1 g 当り 10^6 、培養温度 30°C、培養時間約 16 時間であった。

(4) この条件で魚残滓を種々の微生物で処理した結果、魚油の場合と同様に、糸状菌では *A. sojae* K、酵母では *S. cerevisiae* IFO 2114 が最も強い抗酸化作用を示した。

(5) *A. oryzae*, *A. sojae* K と *S. cerevisiae* IFO 2114 を組み合わせて用いることにより、POV と TBAV はさらに低下し対照の約 1/5 となった。

終わりに、魚残滓を提供していただいた有限会社一産業(佐世保市)に深謝いたします。

- (1) 星合和夫：食品工業，21，58 (1978)。
- (2) 農林水産省統計情報部編：「農林水産統計一昭和 59 年版一」，農林統計協会，1984，p. 275。
- (3) 荻野珍吉編：「魚類の栄養と飼料」，恒社厚生閣，1980，p. 257。
- (4) 伊藤 均，Anwara Begum，久米民和，武久正昭：農化，57，9 (1983)。
- (5) 金田尚志：日水誌，20，658 (1954)。
- (6) 木村正雄：日水誌，29，905 (1963)。
- (7) 坂口宏海，浜口 章：日水誌，35，1207 (1969)。
- (8) 富山哲夫：「酵素化学工業全集」，17，厚生閣，1940，p. 53。
- (9) 日本薬学会編：「衛生試験法注解」，金原出版，1973，p. 116。
- (10) J. Folch, M. Lees and G. H. Sloane-Stanley: *J. Biol. Chem.*, 226, 497 (1957)。
- (11) 松下雪郎：栄養と食糧，34，523 (1981)。