灰干し処理による藻体軟化防止に関連した
ワカメアルギン酸リアーゼの酵素的研究渡辺 忠美^{*1}・西澤 一俊^{*2}

(1981 年 7 月 28 日受理)

Enzymatic Studies on Alginate Lyase from *Undaria pinnatifida* in Relation to
Texture-softening Prevention by Ash-treatment (Haiboshi)Tadaharu WATANABE^{*1} and Kazutosi NISIZAWA^{*2}

The enzymatic properties of alginate lyase from *Undaria pinnatifida* (HARVEY) SURINGAR (Wakame) were investigated to determine how ash treatment (haiboshi) prevented texture softening. The optimum pH of the lyase was found at 7.7 and the enzyme was extremely labile for the pH values above 8.6. In 48-hour incubation, the lyase activity was highest at 30°C, and completely lost by heating at 60°C for 5 min. The activity was enhanced by most bivalent metal ions, but inhibited slightly by EDTA and strongly by PCMB. The inactivation of lyase in ash-treated fronds therefore may not be due to metal ions incorporated into the fronds, but to pH values in the fronds enhanced by the ash treatment.

Kinetic examinations using the Michaelis-Menten theory for the polymannuronic acid fragment (SM) and for the alginate fragment of mixed uronic acid residues (SMG) suggested that a single lyase acts on both the substrates and that the enzyme may be a polymannuronic acid lyase. On the other hand, the fact that relative alginate lyase activity for polyguluronic acid fragment (SG) decrease in parallel with the algal growth suggested the existence of a polyguluronic acid lyase in this algal frond.

筆者らは先きの報告で,¹⁾ 灰干し処理によって藻体中アルギン酸リアーゼ活性は著しく低下されることをみ、その十分な阻止のためには処理灰抽出液の pH は少なくとも 12~13 程度である必要があることを確めた。これに反して、素干しの場合には、新鮮藻体の少くとも半分の酵素活性は残存していた。この酵素活性の低下は、灰干し処理による藻体 pH の上昇に起因するのか、それとも灰中の金属などが藻体に移行して酵素の働きを阻害する結果であるのか、などのことが一応考えられる。

しかるに、海産軟体動物²⁻⁸⁾ や微生物⁹⁻¹²⁾ のアルギン酸リアーゼに関する酵素的な研究は多く報告されているのに反して、藻体リアーゼについてはこの種の研究は余りない。ただ、MADGWIK ら¹³⁾ の *Laminaria* において、また白岩ら¹⁵⁾ の *Spatoglossum* はか二・三の褐藻において、この酵素の存在が報告されているが、その性質など詳しく研究されていない。そこで筆者らは、上記のようなワカメにおける灰干し処理によるアルギン酸リアーゼ活性の低下の原因を知るために、その酵素的性質を詳細に調べ、藻体の酵素活性の観点から灰干し処理効果について考察した。その結果をここに報告する。

実験方法

供試ワカメ 徳島県鳴門市大毛島地区において、1980 年 2 月から 3 月にかけて採取した養殖ワカメ新鮮藻体および -20°C で凍結貯蔵したワカメ藻体を、酵素の抽出試料とした。

アルギン酸リアーゼの調製 白岩ら¹⁵⁾の方法に準じて Fig. 1 のように行った。長期間 -20°C で貯蔵したワカメからも、十分に高いリアーゼ活性を示す酵素液が得られた。

基質 a) 基質の調製: アルギン酸は市販のアルギン酸ナトリウム (和光純薬工業(株)製で CA と略記する) を用いた。基質特異性を調べるために用いた短鎖ポリマノロン酸 (SM と略記する)、短鎖ポリグルロン酸 (SG と略記する) は HAUG ら¹⁶⁾の方法に準じて作った。すなわち、CA 150 g に 1.5 l の 1 M シュウ酸を加え、煮沸水湯中で加水分解し、加熱時間およびその後に行う pH 調整による溶解度の差で分別精製した。その結果、150 g の CA より、SM が 9.1 g、SG が 17.3 g 得られた。マノロン酸およびグルロン酸を含む混成短鎖ポリマー

^{*1} 徳島県食品加工試験場 (Tokushima Prefectural Food Research Institute, Akui, Tokushima 770, Japan).

^{*2} 日本大学農獣医学部水産学科 (Department of Fisheries, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Shimouma-3, Setagaya, Tokyo 154, Japan).

Fig. 1. Preparation procedure of enzyme solution from *Undaria pinnatifida*.

(SMG と略記する) も, HAUG ら¹⁰⁾ の方法に準じて作った。その結果, 100 g の CA から 5.8 g の SMG が得られた。b) 基質の同定: および SM, SMG の同定は, それらの示す異った赤外線吸収スペクトルと, それらの加水分解後に生じるマンヌロン酸 (M) およびグルロン酸 (G) の薄層クロマトグラフィーによる同定とによって行った。赤外線分光分析 (島津製作所 (株) 製 IR-27G, KBr-disc 法) では, SM は, $1,725\text{ cm}^{-1}$ に $-\text{COOH}$, 880 cm^{-1} に β 結合, 1290 cm^{-1} に特有の吸収を示し, SG は, $1,739\text{ cm}^{-1}$ に $-\text{COOH}$, 851 cm^{-1} に α 結合, 1320 cm^{-1} に特有の吸収を示し, SMG の $\text{A}_{1290}/\text{A}_{1320}$ は中間比を示した。また SM と SG との全体のパターンは FILLPOV ら¹⁷⁾ による遊離酸型のポリマンヌロン酸およびポリグルロン酸と酷似していた。基質の M と G のモル比 (M/G) は, FISCHER ら¹⁸⁾ の方法により硫酸で分解し, 炭酸カルシウムで中和後の濾液を, OVODOV ら¹⁹⁾ の方法に従い薄層クロマトグラフィーで分離定量した。SMG の M/G は 1.45 であったが, SM および SG からは, それぞれほとんど M および G のみ検出された。c) 基質の平均重合度: 次亜ヨウ素酸化による末端測定法で測定した。SM, SG および SMG の値は, それぞれ 12, 21 および 15 であった。

アルギン酸リアーゼ活性の測定 基準酵素反応混合液は, 10 mM MgCl_2 , 0.1 mM DTT (dithiothreitol), 50 mM Tris-HCl (pH 7.7), 0.25% の基質, 酵素および Toluene 1 滴からなっている。この反応混合液を 30°C で反応させ, 適時反応液の一部を分取して, 煮沸水浴中で 10 分間加熱して反応を止めた後, 直ちに, または -25°C で

凍結保存した後, WEISBACH-HURWITZ²¹⁾ のチオバルビツール酸法 (TBA 法) で発色させ, 548 nm における吸光値 (TBA 値) を測定した。酵素活性は, 基質を含まない対照反応液の値を差し引いた吸光値で表した。

酵素液中蛋白質量の測定 牛血清アルブミン (SIGMA 社製 100%, 4X Cryst.) を標準物質として, LOWRY-FOLIN 法²²⁾で行った。

実験結果

酵素量と反応速度 SM を基質とし, 基準反応条件下で反応液中の蛋白質濃度をかえて, 各時間における酵素活性を測定したところ, Fig. 2 に見られるように, それらの間には比例関係が見られ, 明らかに, アルギン酸リアーゼ, 特に SM リアーゼ活性の存在が確認された。

Fig. 2. Alginate lyase activities for SM at various enzyme concentrations.

△—△: Incubate for 12 h, ●—●: Incubate for 24 h, ○—○: Incubate for 48 h.

pH 安定性 SM を基質とし, 4.0~9.0 の各 pH において, 20°C で 6 時間放置した各酵素液を含む基準酵素反応混合液において, 48 時間後各反応液の酵素活性を測定した。Fig. 3 に見られるように, pH 8 近辺では比較的安定であったが, pH 5.0 以下および pH 8.0 をすぎると著しく不安定となった。しかるに, 柏原ら⁹⁾は *Pseudomonas* sp. のアルギン酸リアーゼについて, また STEVENS ら⁹⁾は *Algino-vibrio aquatilis* のリアーゼについて, 共に CA を基質とし, また, FLYAKOV ら⁹⁾は *Littorina* sp. のアルギン酸リアーゼについて SM を基質として, 西澤ら⁹⁾は タツナミガイ *Dollabella auricula* のリアーゼに

Fig. 3. pH stability for alginate lyase. Substrate: SM

ついて同様に SM を基質として、測定した pH 安定性は、いずれも pH 9~10 の高い pH 域でもまだかなり高い残存活性があった。したがって、細菌や軟体動物のものに比べて、ワカメのリアーゼは pH に対してはかなり不安定性が高い。

至適 pH pH 7.0 から 9.0 の間の 6 種類の Tris-HCl 緩衝液により pH を調整した酵素反応液を作り、基準条件下で 48 時間反応させて生じたそれぞれの反応生成物を測定した。Fig. 4 に見られるように、酵素活性は SM または SMG に対して共に pH 7.7 近辺で最高活性を示し、これより酸性側でもアルカリ性側でも急激に低下がみられ、特に、pH 8.3 では pH 7.7 の 12.1% にしか達しなかった。

Fig. 4. Activity-pH curves for alginate lyase. ○—○: SM, ●—●: SMG

温度安定性 30°C~60°C のそれぞれ異った温度で、5 分間放置した各種酵素液の残存活性を、基準条件下で反応させ測定した。Fig. 5 に見られるように、SM または SMG に対して共に、50°C でかなりの失活を示し、60°C ではほとんど完全に失活した。この結果は、MIN ら¹⁰⁾が *Pseudomonas* sp. のアルギン酸リアーゼ I' および II について、SG および SMG を基質として得た結果と類似していた。しかし、STEAVENS ら⁹⁾は、*Alginobrio aquatilis* から調製した粗アルギン酸リアーゼをさらに精製すると、耐熱性が著しく向上する結果を得ているので、ワカメのアルギン酸リアーゼについても、この点今後確める必要がある。

Fig. 5. Thermal stability for alginate lyase. ○—○: SM, ●—●: SMG

温度依存性 基準酵素反応混合液を、10~40°C の異なる温度で 48 時間反応させた時の酵素活性を測定した。Fig. 6 に示すように、SM, SMG いずれに対しても、30°C で最高活性を示した。これは、MIN ら¹⁰⁾が、*Pseudomonas* sp. のアルギン酸リアーゼについて、SG または SMG を基質として得た 50°C よりは著しく低かった。

しかし、今回の実験における作用時間は、48 時間という長い時間であり、その間に失活もあるはずであるから、本当の至適温度はもう少し高いかも知れない。

酵素活性におよぼす諸物質の影響 MgCl₂ を含んでいない基準酵素反応混合液に、Table 1 に示すような諸物質を各濃度に添加し、48 時間反応させてから、酵素活

Fig. 6. Activity-temperature curves for alginate lyase.

○—○: SM, ●—●: SMG

Table 1. Effect of various substances on alginate lyase

Substance	Concentration	Relative activity of alginate lyase (%)	
		SM	SMG
Control	10 mM	100	100
CaCl ₂	10 mM	204	182
MgCl ₂	10 mM	141	154
KCl	10 mM	132	108
CuCl ₂	1 mM	129	114
MnCl ₂	1 mM	122	360
NaCl	10 mM	112	97
Na ₂ S ₂ O ₈	1 mM	105	97
AgNO ₃	1 mM	103	84
HgCl ₂	1 mM	100	87
EDTA	1 mM	75	92
SG	1 mM	75	92
SG	0.5%	75	97
SG	0.25%	74	106
PCMB	1 mM	24	16
PCMB	0.1 mM	72	68
PCMB	0.01 mM	88	—

性を測定した。Table 1 に結果を示す。SM または SMG のいずれに対する酵素活性も、Hg²⁺ を除いては 2 価カチオンによって一般によく賦活された。他方 SM に対する酵素活性には、1 価カチオンはほとんど無影響であったが、SMG に対する酵素活性にはかなりの阻害を示

し、EDTA は SMG よりも SM に対する酵素活性をむしろ強く阻害し、PCMB によっては SM, SMG の両基質に対する活性が共に阻害を受けた。また添加した SG は、SMG リアーゼ活性にはほとんど無影響であるのに反して、SM リアーゼ活性に対してはかなりの阻害を示した。

アルギン酸リアーゼの基質特異性 比較的若いワカメから調製した酵素液を用い、SM, SMG, SG および CA を基質として酵素活性を測定した結果を Fig. 7 に示す。各基質に対して、酵素活性は反応時間 120 時間まではほぼ直線的に増加し、特に SM での増加が大きく、したがってワカメのリアーゼは SM に対して強い活性を示した。

次に、採取時期の異なるワカメから調製した各酵素液の、SM, SMG および SG の各基質に対する酵素活性を比較測定した。Table 2 に見られるように酵素試料は、その採集期の違いによって SG に対してのみ異なった比率の酵素活性を示し、特に採集時期が遅くなり、成

Fig. 7. Activities of alginate lyase for several substrates.

○—○: SM, ●—●: SMG, △—△: SG, ▲—▲: CA

Table 2. Relative activities of alginate lyase for several substrates (%)*

Sample No.	Harvest time	Substrate			
		SM	SMG	SG	CA
1	Feb. 12, 1980	100	50.9	31.3	28.7
2	Feb. 18, 1980	100	—	16.5	19.5
3	Feb. 25, 1980	100	48.8	4.5	—
4	Mar. 5, 1980	100	45.8	1.8	—

* The values for SM are taken as 100%.

長したワカメからの酵素液は著しく低い比率の活性を示した。

このように、ワカメのアルギン酸リアーゼは、SM、SMG および SG に対してそれぞれ異なった活性を示すが、ワカメの採集時期により、SM と SMG に対する活性比率にはほとんど変化はなかったが、SM と SG に対する活性比率は著しく違っていた。これは SM と SMG に対するリアーゼと SG に対するものとは違う酵素である可能性を暗示するものとして注目値する。

NAKADA ら³⁾は、カルフォルニア産のアワビ (abalone) の肝臓リアーゼで、西澤ら⁴⁾はタツナミガイ *Dolla-bella auricula* の肝臓リアーゼで、また、DAVIDSON ら¹³⁾は、*Azotobactor vinelandii* のリアーゼが SM に対して SG に対するよりもはるかに高い活性を示すことをみている。これに反して、柏原ら⁸⁾の *Pseudomonas* sp. の、また、BOYD ら¹³⁾の *Klebsiella aerogenes* のアルギン酸リアーゼは、いずれも SG に対する活性の方が SM に対するものよりもはるかに高かった。これらの結果 SM も、リアーゼ活性と SG リアーゼ活性とは別の酵素によることを暗示している。

SM リアーゼ活性と SMG リアーゼ活性の同一性 上記のように、SM に対するリアーゼ活性と SG に対するものとは違った酵素に起因しているようにみえたが、SM と SMG とに対する活性は同一酵素によるようにみえた (Table 2)。そこで、SM と SMG を分解する酵素の異同について吟味するため、Michaelis-Menten 理論に従い実験を試みた。

まず、SM および SMG について、0.052% から 0.250% の間で、両者の和が常に 0.275% となるような、それぞれ異なった濃度の基質を含み、その他の条件は同じである数種の酵素反応液を調製し、それぞれの酵素活性を測定した。その結果を Table 3 (observed values) に示す。

一方において、このリアーゼの SM と SMG とに対する K_m 値を Lineweaver-Burk 法で求めた (Fig. 8)。その結果、SM に対する K_m 値は 7.04×10^{-2} (%) であり、 V_{max} は 21.3×10^{-3} (548 nm O.D./h/ml 酵素反応液)、また SMG に対するそれぞれの値は 4.95×10^{-2} および 9.3×10^{-3} であった。次に、これらの動力学的定数を次のような Michaelis-Menten の基質拮抗阻害式にあてはめて、理論通算速度 (V_1 , V_2) を計算し、同様に Table 3 (theroretical values) に示した。

$$V_1 = V_{SM} + V_{SMG}$$

$$= \frac{\frac{V_m \cdot SM}{K_m \cdot SM} \cdot SM + \frac{V_m \cdot SMG}{K_m \cdot SMG} \cdot SMG}{1 + \frac{SM}{K_m \cdot SM} + \frac{SMG}{K_m \cdot SMG}} \quad (1)$$

Table 3. Overall reaction velocities of alginate lyase for SG & SMG

No.	Concentrations of substrates in the reaction mixture (% $\times 10^2$)		Total velocity of lysis (Abs. at 548 nm $\times 10^3$ /hr)		
	SM	SMG	Observed values	Theoretical values calculated for	
				Same active center	Diffrent active center or em-zymes
1	25.0	2.5	17.1	15.9	19.6
2	22.5	5.0	16.2	14.9	20.8
3	20.0	7.5	15.3	13.9	21.3
4	15.0	12.5	15.1	12.1	21.1
5	10.0	17.5	13.3	11.3	20.5
6	5.0	22.5	11.2	9.1	18.1
7	2.5	25.0	10.3	8.5	14.8

Fig. 8. Lineweaver-Burk plots for the degradation of SM and SMG by alginate lyase. ○—○: SM, ●—●: SMG

$$V_2 = V_{SM} + V_{SMG}$$

$$= \frac{\frac{V_m \cdot SM}{K_m \cdot SM} \cdot SM}{1 + \frac{SM}{K_m \cdot SM}} + \frac{\frac{V_m \cdot SMG}{K_m \cdot SMG} \cdot SMG}{1 + \frac{SMG}{K_m \cdot SMG}} \quad (2)$$

(1) 式は同一酵素が同一活性中心で SM と SMG に反応する場合で、(2) 式は異なる酵素または異なる活性中心が、それぞれの基質に作用する場合である。

Table 3 に見られるように、実測値の通算速度は、式 (1) で得られた値と比較的よく一致した。したがって、SM と SMG とは、同一酵素の同一活性中心で分解されるという推論が得られた。

ゲル透過による分子量の測定 1980 年 2 月 18 日に

Fig. 9. Estimation of molecular weight of alginate lyase by Sephadex G-100 column (2.0×90 cm) gel-filtration.

○: Standard protein, ●: Alginate lyase.

採集したワカメから調製した酵素液を、Sephadex G-100 (2.0×90 cm) のカラムにかけ、0.05 M Tris-HCl で溶出し、溶出液の各 5 ml につき、280 nm における紫外線吸収を測定すると共に、基準条件下で、SM および SMG に対する酵素活性を測定した。その結果、両基質に対する酵素活性の溶出曲線は、いずれも No. 30 画分付近にピークを持つほぼ同一のパターンを示した。

一方、別の実験として、上記のカラムに分子量既知の標準蛋白質 (Boehringer Mannheim 社製) をかけ、その溶出パターンから、分子量の検量線を作って、Fig. 9 に示した。この検量線と上記のゲル濾過で得られた SM および SMG に対するリアーゼ活性の溶出ピークの容積とからワカメアルギン酸リアーゼの分子量を求めると、Fig. 9 で示すように、74,000 であった。少し前に、STEAVENS ら⁶⁾は、*Alginovibrio* から得た部分精製リアーゼが 110,000 であると報告しているが、ワカメの酵素はこれよりはるかに小さいものであった。

考 察

本研究で明らかになったように、ワカメのアルギン酸リアーゼは、至適酸度は弱アルカリ側に存在するにもかかわらず、pH 安定曲線は 8.6 を過ぎると急激に下向した。したがって、曲線は酸性側では比較的緩やかな下向を示すのに反して、アルカリ側は急勾配で下向する。

筆者の一人は前報²³⁾で藻体中の pH をそのまま測定することは困難のため、細断藻体を 5 倍量の水と共に振とうし、浸出されて来る液の pH を測って藻体 pH を推定する方法をとった。

これによると、灰干し藻体では、良質の製品であれば一般に pH 8.0~9.5 の値が得られた。また良質灰を 5 倍

量の水で抽出したときの pH は 11~13²³⁾ であるから、灰干し処理後の藻体 pH は、藻体水分の減少のため、上記の方法で測定したものよりは高くなることが考えられる。したがって、灰干し処理による藻体の pH 上昇のため藻体中のリアーゼ活性は十分に失活させられていると推定される。それ故に、藻体アルギン酸の自己分解は妨げられることになろう。一方、灰干しによっては灰中のカルシウムが藻体に移行し、アルギン酸と結合して不溶性のゲルが形成される際に、アルギン酸分子がリアーゼのために少しでも分解すれば、カルシウム塩となった時でも、ゲル化度は低くなるものと考えられる。したがって、藻体内のアルギン酸リアーゼ活性が阻止されることは、カルシウムと結合してゲル化強度を高めるアルギン酸が藻体内に保存されることを助ける結果になる。素干し藻体にはリアーゼ活性がかなり多く残存していることから、素干し藻体の軟化はこの酵素による自己分解が主因と考えられる。筆者の一人の実験では、²³⁾ 素干し藻体からは可溶性アルギン酸が著しく多量に得られたが、この事実も上記の推論を支持している。

一方、アルギン酸リアーゼ活性は、*in vitro* では、 Hg^{2+} を除く外の 2 価金属イオン、例えば Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , などによりそれぞれ程度は違うが活性化されるし、また K^{+} や Na^{+} , Ag^{+} などの 1 価金属イオンでは、特に SM 活性はほとんど影響されないことが本研究の結果わかった。したがって、もし灰中に存在するこれらの金属が藻体に灰干し処理の際に取り込まれたとしても、リアーゼ活性を失活させるとは考え難い。このように考察すると、灰干し処理による藻体アルギン酸リアーゼの失活は、藻体 pH の上昇に主因があると考えるのが妥当である。

要 約

灰干しの藻体組織軟化防止機構に関連して、ワカメのアルギン酸リアーゼについて、その酵素学的性質を調べた。

1. 新鮮ワカメおよび -20°C で長期間凍結貯蔵したワカメから、0.5 M Tris-HCl (pH 7.7) を抽出液として、自動乳鉢で磨砕抽出した後、硫酸で塩析 (30~80%)、ついで透析、濃縮する方法により、十分に高いアルギン酸リアーゼ活性をもつ酵素液を得た。

2. WEISSBACH-HURWITZ による TBA 法で酵素活性を測定し、酵素の性質を調べた。このリアーゼの至適酸度は pH 7.7 付近であり、pH 8 付近では安定であるが、pH 5.0 以下および pH 8.6 以上では著しく不安定であった。またこのリアーゼは、 50°C 、5 分間加熱ではかなり失活し、 60°C 、5 分間加熱ではほとんど完全に失活した。48 時間反応の場合は、 30°C 付近が至適温度であった。

3. アルギン酸リアーゼに対する金属などの影響を調べた結果, Ca^{2+} や Mg^{2+} の 10 mM 濃度および Mn^{2+} の 1 mM 濃度でもよく賦活されたが, EDTA の 1 mM 濃度でも SMG を基質とするときにはかなり阻害され, PCMB は SM および SMG に対する活性が共に強く阻害された。

4. 本酵素は, SM, SMG および SG に対する酵素活性が異っており, それは $\text{SM} \gg \text{SMG} \gg \text{SG}$ の順であり, Michaelis 定数は SM に対して, 7.04×10^{-2} (%), SMG に対しては 4.95×10^{-2} (%), 最大反応速度は SM に対しては 21.3×10^{-8} (548 nm 吸光度/h/ml 酵素反応液), SG に対しては 9.25×10^{-8} (548 nm 吸光度/h/ml 酵素反応液) であった。Michaelis-Menten 理論による動力学的解析から, SM と SMG とには同一酵素が働いており, また異なった時期の試料における酵素活性からは, SG には別種のリアーゼが作用しているらしいことがわかった。ゲル濾過法によって測定した本酵素の分子量は 74,000 であった。

文 献

- 1) 渡辺忠美・西澤一俊: 日水誌, **48**, 237-241 (1982).
- 2) I. TSUJINO and T. SAITO: *Nature*, **192**, 970-971 (1961).
- 3) H. I. NAKADA and P. C. SWEENEY: *J. Biol. Chem.*, **242**, 845-851 (1967).
- 4) K. NISIZAWA, S. FUJIBAYASHI, and Y. KASHIWABARA: *J. Biochem.*, **64**, 25-37 (1968).
- 5) L. A. ELYAKOVA and V. V. FAVOROV: *Biochim. Biophys. Acta*, **358**, 341-354 (1974).
- 6) 吉川三吉: 生化学, **33**, 30-34 (1961).
- 7) J. PREISS and G. ASHWELL: *J. Biol. Chem.*, **237**, 309-316 (1962).
- 8) Y. KASHIWABARA, H. SUZUKI, and K. NISIZAWA: *J. Biochem.*, **66**, 503-512 (1969).
- 9) R. A. STEAVENS and R. E. LEVIN: *Appl. Environ. Microbiol.*, **3**, 1156-1161 (1977).
- 10) K. H. MIN, S. F. SASAKI, Y. KASHIWABARA, H. H. SUZUKI, and K. NISIZAWA: *J. Biochem.*, **81**, 539-546 ((1977)).
- 11) K. H. MIN, S. F. SASAKI, Y. KASHIWABARA, H. SUZUKI, and K. NISIZAWA: *J. Biochem.*, **81**, 547-553 (1977).
- 12) I. W. DAVIDSON, C. J. LAWSON, and I. W. SUTHERLAND: *J. Gen. Microbiol.*, **98**, 223-229 (1977).
- 13) J. BOYD and J. R. TURUEY: *Carbohydr. Res.*, **57**, 163-171 (1977).
- 14) J. MADGWICK, A. HAUG, and S. LARSEN: *Acta Chem. Scand.*, **27**, 711-712 (1973).
- 15) Y. SIRAIWA, K. ABE, S. F. SASAKI, T. IKAWA, and K. NISIZAWA: *Botanica Marina*, **18**, 97-104 (1975).
- 16) A. HAUG, B. LARSEN, and O. SMIDSRØD: *Acta Chem. Scand.*, **20**, 183-190 (1966).
- 17) M. P. FILLPOV and R. KOHN: *Chem. Zvesti.*, **28**, 817-819 (1974).
- 18) F. G. FISCHER and H. DÖRFEL: *Z. Physiol. Chem.*, **302**, 186 (1955).
- 19) Y. S. OVODOV, E. V. EVTUSHENKO, V. E. VASKOVSKY, R. G. OVODOVA, and T. F. SOLOV'eva: *J. Chromatog.*, **26**, 11-115 (1967).
- 20) 西澤一俊・前田昌徹: 生化学研究法—I. (安藤錠郎・寺山 宏・西澤一俊・山川民夫編), 第9版, 朝倉書店, 東京, 974, p. 296.
- 21) A. WEISSBACH and J. HURWITZ: *J. Biol. Chem.*, **234**, 705-709 (1959).
- 22) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 23) 渡辺忠美・米沢邦夫: 徳島食品試報告, No. 23, 32-41 (1975).