

テラピア腸管リパーゼの精製ならびに性状

—テラピアの消化酵素に関する研究-VI—

谷口(山田)亜樹子,^{1a*} 高野 克己,¹ 鴨居 郁三¹

(1999年11月9日受付, 2000年7月24日受理)

¹東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

Purification and Properties of Lipase from *Tilapia* Intestine

—Digestive Enzyme of *Tilapia*-VI—

Akiko (Yamada) Taniguchi,^{1a*} Katsumi Takano,¹ Ikuzo Kamo¹

¹Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, 156-8502, Japan

Lipase of the intestine of *Tilapia nilotica* was purified by ammonium sulfate precipitation, followed by ion-exchange chromatography (DEAE-cellulose), chromatofocusing (Polyexchanger PBE 94), and gel filtration (Sephadex G-100).

The lipase was found to be a single band when examined by electrophoresis.

The specific activity of the purified enzyme was 177 times higher than that of the crude extract.

The lipase had a molecular weight of 46,000, showed the highest activity at pH 7.5 and 35°C, and was stable at pH 6.5-8.5 and below 40°C. The K_m of the enzyme for olive oil was calculated to be 0.7 mM. Its activity was inhibited by Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , PCMB, and CH_3COOH .

This enzyme specifically digested Tributyrin and Tricaproin, whereas it digested 1,2-diolein and 1-monoolein more than 1,3-diolein and 2-monoolein. The enzyme well decomposed soybean oil and coconut oil.

キーワード：テラピア, 腸管, 消化酵素, リパーゼ, 酵素の精製・性状

脂質は魚類の重要なエネルギー源であり, 養魚飼料における脂質の添加効果は古くから認められ, タンパク質の節約効果が期待されている。

養魚飼料には魚種に適した脂質の添加量があり, また, 添加する脂質の種類によって魚の成長や飼料効率に及ぼす影響が異なるといわれている。¹⁾ この要因として消化管中における脂質分解酵素の分解能が関与していると考えられる。しかし, 魚類の脂質成分の分解挙動の詳細は不明な点が多く, その分解に関与する消化管中の脂質分解酵素に関する研究は他の消化酵素に比べ, 著しく遅れており, わずかにニジマス,²⁾ スルメイカ,³⁾ コイ⁴⁾についての報告がみられるに過ぎない。

著者らは, 合理的な養魚飼料の開発に必要な基礎的知見を得るため, 現在, 養殖されているテラピア *Tilapia nilotica* を用いて, 主要な消化器官より各種消化酵素の特性について検討を行っており, すでにテラピアの胃よりアミラーゼ⁵⁾およびプロテアーゼ⁶⁾を各1種, 腸管よりアミラーゼ2種,⁷⁾ α -グルコシダーゼ2種,⁸⁾ プロテアーゼ2種⁹⁾を単離し, それらの詳細な性状について報告した。

今回は, テラピアの腸管リパーゼを分離, 精製し, その性状について検討したので報告する。

実験方法

試料 前報⁹⁾と同様に体長約 35 cm, 体重約 1 kg

* Tel : 81-3-5477-2392, Fax : 81-3-5477-2623, E-mail : akiko@nodai.ac.jp

^a 現所属：東京農業大学短期大学部醸造学科 (Department of Brewing and Fermentation, Junior College of Tokyo University of Agriculture, Tokyo, 156-8502, Japan)

のテラピアから腸管を採取し、腸管の内容物を蒸留水にて十分に除去した後、 -80°C に凍結保存し適宜実験に供した。

粗酵素の調製 試料に冷アセトン (-20°C) を加え、ホモジナイズ (ワーリングブレンダー, 5,000 r.p.m., 5 分間) し、ろ紙にて吸引ろ過し脱脂処理を行った。これにプロテアーゼによる作用を防ぐため、1 mM になるようにイソプロピルフロロリン酸を添加した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を加えホモジナイズ (ヒスコトロン, 5,000 r.p.m., 5 分間) し、 4°C , 3 時間攪拌抽出後、遠心分離 ($10,000\times g$, 15 分間, 4°C) し、上澄液を抽出液とした。この抽出液を硫酸塩析 (65%) して沈殿画分を分取し、前述の緩衝液に溶解して透析し粗酵素液とし、以下の精製に供した。

酵素活性の測定 オリーブ油 10 g を 0.2% 胆汁酸 (タウロコール酸ナトリウム) を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 40 mL に添加し、超音波処理して乳化し調製した基質 0.5 mL に酵素液 0.5 mL を加え、 35°C で 30 分間の反応を行った。反応後、生成した遊離脂肪酸量を Lowry-Tinsley 法¹⁰⁾ で測定した。すなわち、反応液 1 mL に酢酸銅-ピリジン溶液 1 mL を加え混合し、ベンゼン 3 mL を加え振盪機 (大洋科学工業株: RECIPROSHAKER SR-II) を用いて 10 分間振盪攪拌 (300 回/分) 後、遠心分離 ($3,000\times g$, 15 分間) を行い、ベンゼン層の 715 nm における吸光度を測定した。なお、リパーゼ活性は 35°C , 1 分間に遊離脂肪酸 $1\mu\text{mol}$ を生成する酵素力価を 1 単位とした。

タンパク質の定量 タンパク質の定量は、Lowry 法の改良法¹¹⁾ により行った。

DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) で緩衝化した DEAE-セルロースカラム ($1.5\times 18\text{ cm}$, 和光純薬工業株) に粗酵素液を添加し、前述の緩衝液 100 mL を流下した後、同緩衝液 150 mL と 0.6 M 塩化ナトリウム溶液 150 mL の直線的濃度勾配によるグラジェント溶出を行った。

クロマトフォーカシング ポリバッファー交換体 (PBE94, フェルマシア社製) を 25 mM ヒスチジン-塩酸緩衝液 (pH 6.2) で緩衝化した後、カラム ($1.2\times 20\text{ cm}$) に充填した。溶出はポリバッファー 74-塩酸溶液 (pH 3.0) 200 mL で行った。

ゲルクロマトグラフィー セファデックス G-100 カラム ($1.5\times 85\text{ cm}$) を 20 mM リン酸緩衝液

(pH 7.5) で平衡化し用いた。溶出は前述の緩衝液 200 mL で行った。

純度検定 ディスク電気泳動法により純度検定を行った。すなわち、永井の方法¹²⁾ に準じて分離用ゲル (10% ポリアクリルアミド, pH 8.3) を調製し、これに試料タンパク質 (0.2 mg protein/tube) を添加し、泳動 (2 mA/tube) を行った。

分子量の測定 前報⁹⁾ と同様ゲルろ過法¹³⁾ および SDS-PAGE¹⁴⁾ により測定した。

等電点の測定 前報⁹⁾ と同様に電気泳動装置 (ロトフォア, 日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社製) を用い、泳動 (4°C , 300 V, 4 時間) を行った。

結果および考察

酵素の精製 粗酵素液を DEAE-セルロースカラムにより分離した結果、Fig. 1 に示すように、リパーゼは DEAE-セルロースカラムに吸着し、塩化ナトリウム濃度 0.3 M 付近に溶出された。次にこの活性画分をクロマトフォーカシングで精製を行った結果 (Fig. 2), リパーゼ活性は pH 4.6 付近に溶出され、この活性画分についてセファデックス G-100 カラムによるゲルろ過を行ったところ、単一の活性ピークを得た (Fig. 3)。本活性画分についてディスク電気泳動による純度検定を行った結果、単

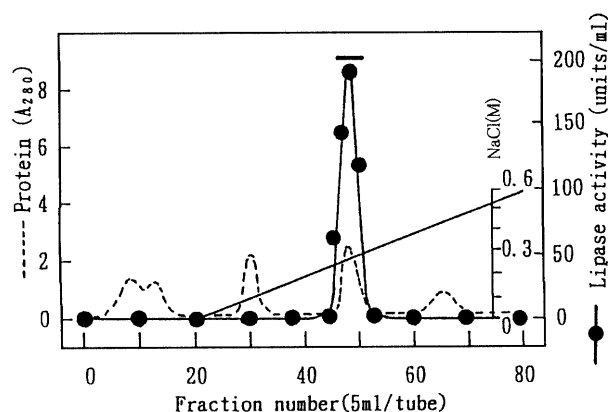


Fig. 1. Ion-exchange chromatography of intestine lipase from *Tilapia* on DEAE-cellulose. Crude enzyme, after $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, was applied on a DEAE-cellulose column ($1.5\times 18\text{ cm}$) previously equilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 7.5). The enzyme was eluted by the linear gradient with 20 mM phosphate buffer (pH 7.5) and 0.6 M NaCl solution (300 mL). ---, protein (absorbance at 280 nm); ●, lipase activity; —, lipase fraction.

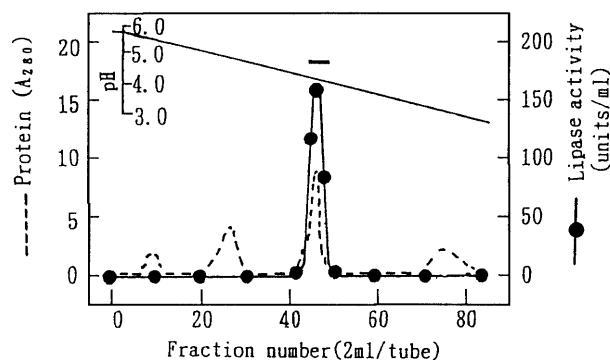


Fig. 2. Chromatofocusing of intestine lipase from *Tilapia*. The enzyme was applied on a polyexchanger column (PBE94, 1.2×20 cm) previously equilibrated with 25 mM histidine-HCl buffer (pH 6.2), and then the enzyme was eluted with polybuffer 74-HCl (pH 3.0). ---, protein (absorbance at 280 nm); ●, lipase activity; —, pH; —, lipase fraction.

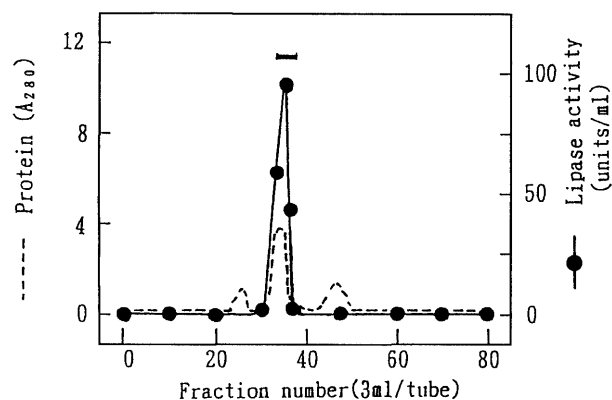


Fig. 3. Gel filtration of intestine lipase from *Tilapia* on Sephadex G-100. The enzyme, after chromatofocusing, was applied on a Sephadex G-100 column (1.5×85 cm) previously equilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 7.5), and then the enzyme was eluted with the same buffer. ---, protein (absorbance at 280 nm); ●, lipase activity; —, lipase fraction.

一なタンパク質バンドを示し、高度に精製されていることが確認された (Fig. 4)。

以上、リパーゼの精製過程の結果を Table 1 に示した。本精製酵素の比活性は抽出液に比べ、177 倍に上昇し、活性回収率は約 20% であった。

精製酵素の性状

1. 胆汁酸の影響 オリーブ油 20 g に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 80 mL を加え、これに胆汁酸 (タウロコール酸ナトリウム) を反応時に 0.05~2.0% となるようにそれぞれ添加し乳化した。これを基質溶液とし、これに酵素を加えて反応させ、その生成遊離脂肪酸量を Lowry-Tinsley 法¹⁰⁾ により測定し、酵素の活性に対する胆汁酸濃度の影響を調べた。その結果 (Fig. 5), 反応時における胆汁酸濃度が 0.1% において最も高い活性を示し、最適濃度は 0.1% と推察された。魚類の腸管中の胆汁酸濃

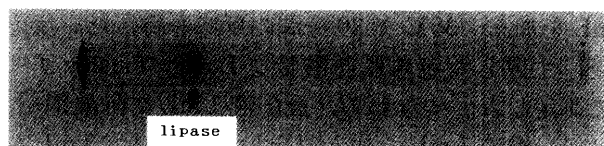


Fig. 4. Disc-polyacrylamide gel electrophoresis of purified intestine lipase from *Tilapia*.

The purified enzyme (0.1 mg) was applied to 10% polyacrylamide gel (pH 8.3).

The gel was stained for protein with Brom-phenol blue.

度の報告はみられないが、この濃度はサバ *Scomber japonicus* 肝臓の胆汁酸濃度¹⁵⁾ とほぼ同様な値であった。

2. pH および温度の影響 酢酸緩衝液 (pH 4.5~

Table 1. Summary of purification process of intestine lipase of *Tilapia*

Stages	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Extract*	8905	2166.8	0.2	1.0	100
Crude enzyme	4210	1411.5	0.3	1.5	65
DEAE-cellulose chromatography	93	881.5	9.5	47.5	41
Chromatofocusing	32	620.8	19.4	97.0	29
Gel-filtration on Sephadex-G100	12	425.1	35.4	177.0	20

* Acetone-defatted tilapia intestine (30 g) was used.

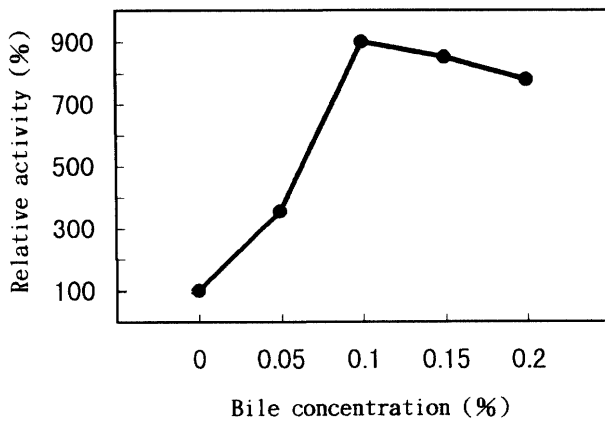


Fig. 5. Effects of bile concentration on the activity of intestine lipase from *Tilapia*.

The activity was determined at 35°C for 20 min in various bile concentrations and expressed as a percentage of the activity under non-addition.

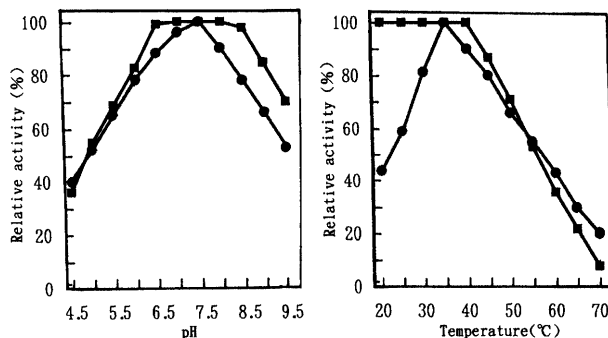


Fig. 6. Effects of pH and temperature on the activity and stability of intestine lipase from *Tilapia*.

Buffers used were 0.1 M citrate (pH 4.5–5.5), 0.1 M phosphate (pH 5.5–8.0) and Tris-HCl (pH 8.0–9.5).

Optimum activity: the reaction was carried out for 20 min with pH alteration (at 35°C) or with temperature alteration (at pH 7.5), and the activity was expressed as a percentage of the maximum activity. —●—, lipase activity.

Stabilities against pH and temperature: the enzyme was preincubated at various pH at 35°C for 30 min or at various temperatures at pH 7.5 for 30 min and the remaining activity was determined at 35°C for 30 min and expressed as a percentage of the initial activity. —■—, lipase stability.

5.5), リン酸緩衝液 (pH 5.5–8.0) およびトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0–9.5) を用い, 最適 pH および pH 安定性を測定した結果 (Fig. 6), テラピア腸管リパーゼの最適 pH は 7.5 で, この値は, 空腹

時の腸管の pH 7.5 と同じであった。また, 本腸管リパーゼの最適 pH はニジマス *Salmo gairdneri* の腸管リパーゼ (pH は 6.8–7.6),²⁾ スルメイカ *Omastrephes sloani* の腸管リパーゼ (pH 7.4)³⁾ とほぼ同様の値であった。なお, 本活性は pH 6.5–8.5 (35°C, 30 分間) の範囲で安定であった。

各温度における活性 (pH 7.5) および各温度で 30 分間処理した後の残存活性を測定 (pH 7.5, 35°C) し, 最適温度および温度安定性を求めた (Fig. 6)。その結果, 精製酵素は 35°C で最大活性を示し, その活性は 40°C 以下で安定であった。最適温度は, ニジマス (25°C)²⁾ およびスルメイカ (30°C)³⁾ 腸管リパーゼに比べやや高いが, テラピアと同じく雑食魚で生息温度がほぼ同じであるコイ *Cyprinus carpio* の腸管リパーゼ (35–40°C)⁴⁾ とほぼ同様な最適温度であった。魚類の脂肪酸代謝は, 環境温度の影響を受けることが知られている¹⁶⁾ が, この結果から, リパーゼの最適温度も生育環境温度と何らかの関係があるものと考えられた。

3. 分子量, 等電点および K_m 本酵素の分子量はゲルろ過法および SDS-PAGE による測定の結果, 約 46,000 と推定され, ブタ膵臓リパーゼ (分子量 45,000–50,000)¹⁷⁾ と同様の分子量であった (Table 2)。また, 両法で同様の値を示したことから本酵素は 1 本鎖ポリペプチドであることが示唆された。

等電点は pH 4.9 を示し, この値はテラピア腸管 α -グルコシダーゼ⁸⁾ と同じ値であった。本リパーゼのオリーブ油に対する K_m を Lineweaver-Burk の方法に従い検討したところ, K_m は 0.7 (mM) であった。

4. 各種試薬の影響 酵素液に各種試薬を 1 mM になるように加え, 35°C で 30 分間処理した後, 残存酵素活性を測定 (pH 7.5) した。活性は試薬無添加の活性値を 100% とし, 相対活性で示した (Table

Table 2. Properties of intestine lipase of *Tilapia*

Properties	Intestine lipase
Molecular weight	
Gel filtration	46,000
SDS-PAGE	46,000
Isoelectric point	4.9
K_m (mM)*	0.7

* substrate: Olive oil

Table 3. Effect of various reagents on the activity of intestine lipase of *Tilapia* (%)

Reagents		Reagents	
None	100	HgCl ₂	45
KCl	110	CdCl ₂	38
CaCl ₂	102	CuCl ₂	19
MgCl ₂	98	EDTA* ¹	99
AlCl ₃	95	DFP* ²	98
PbCl ₂	95	CH ₂ ICOOH	25
ZnCl ₂	70	PCMB* ³	20
NiCl ₂	45		

The enzyme was preincubated with 1 mM of various reagents at 35°C for 30 min, and the remaining activity was determined and expressed as a percentage of the activity under non-addition.

*¹ EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

*² DFP: diisopropyl fluorophosphate.

*³ PCMB: *p*-chloromercuribenzoic acid.

3). 精製酵素は Cu²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺ によって阻害され, PCMB と CH₂ICOOH によっても活性が低下した。1 mM PCMB および CH₂ICOOH によって 20~25% と著しく活性が低下したことから, 活性発現に SH 基が関与していることが推察された。ラット肝臓リパーゼでも, Hg²⁺, PCMB, CH₂ICOOH によって活性が阻害されることが報告¹⁸⁾されており, 阻害剤に対する影響は本酵素と同様であった。

5. 基質特異性 酵素液 0.5 mL (5 units) に最終濃度が 10 mM となるように各種基質溶液 0.5 mL を加え, 35°C で 20 分間反応させ, Lowry-Tinsley 法¹⁰⁾ で生成遊離脂肪酸量を測定した。基質には SIGMA 社製のトリオレイン (製品番号: T7752), トリリノレイン (T9517), 1,2-ジオレイン (D8394), 1,3-ジオレイン (D3627), 1-モノオレイン (M1890), 2-モノオレイン (M2787), 東京化成工業社製のブチルオレイン, トリアセチン, トリブチリン, トリカプロイン, トリカプリリン, トリカブリンを用いた。

精製酵素の各種トリアシルグリセロールに対する分解作用について検討した (Table 4)。本酵素はトリブチリンに最もよく作用し, この活性値を 100% とし相対活性で示したところ, トリカプロインでは 82%, トリオレイン, トリリノレインに対する活性は各々 6% および 5% を示し, スルメイカ³⁾やラット¹⁸⁾の腸管リパーゼと同様に, 短鎖から長鎖

Table 4. Effect of triacylglycerols on intestine lipase activity of *Tilapia*

Substrates (10 mM)	Relative hydrolysis (%)
Triacetin	4
Tributyrin	100
Tricaproin	82
Tricaprylin	11
Tricaprin	8
Triolein	6
Trilinolein	5

The reaction was carried out at 35°C for 20 min with various substrates and the activity was determined and expressed as a percentage of the activity with tributyrin as substrate.

Table 5. The K_m values of intestine lipase of *Tilapia*

Substrates	K_m (mM)
Triolein	0.8
1-Monoolein	0.7
2-Monoolein	1.0
1,3-Diolein	1.3
1,2-Diolein	0.6

The reaction was carried out at 35°C for 20 min with various substrates and the activity was determined and expressed as a percentage of the activity with tributyrin as substrate.

脂肪酸のトリアシルグリセロールに作用した。なお, リパーゼは基質界面に吸着し作用するため, 乳化性に優れている低級脂肪酸のトリアシルグリセロールに対する分解作用が大きかったものと推察した。

各種アシルグリセロールに対する K_m を検討した結果 (Table 5), トリオレイン 0.8 mM, 1,2-ジオレイン 0.6 mM, 1,3-ジオレイン 1.3 mM, 1-モノオレイン 0.7 mM および 2-モノオレイン 1.0 mM であった。このように本酵素は 1,3-ジアシルグリセロールに比べ 1,2-ジアシルグリセロールに, 2-モノアシルグリセロールに比べ 1-モノアシルグリセロールに親和性が大きく, トリアシルグリセロール, 1,2-ジアシルグリセロールおよび 1-モノアシルグリセロールに対し同様の高い親和性を示した。

次に各アシルグリセロールに対する精製酵素の分解作用について検討を行った (Table 6)。トリオレインに対する活性値を 100% とし相対活性で示した結果, 本酵素は 1,2-ジオレインでは 141%, 1-モ

Table 6. Effect of substrates on intestine lipase activity of *Tilapia*

Substrates (10 mM)	Relative hydrolysis (%)
Triolein	100
Butyl oleate	48
1-Monoolein	122
2-Monoolein	85
1,3-Diolein	62
1,2-Diolein	141

The reaction was carried out at 35°C for 20 min with various substrates and the activity was determined.

ノオレインでは 122% の活性を示し、1,2-ジオレイン、1-モノオレインに対し高い分解作用が認められた。これに対し、1,3-ジオレインおよび 2-モノオレインに対する活性はトリオレインに比べ 62% および 85% を示し、ブチルオレイトでは 48% とトリオレインの約 1/2 の活性であった。

この結果から、本酵素はアシルグリセロールの 1 (3) 位および 2 位のいずれにも作用するが 1 (3) 位を優先的に切断し、トリアシルグリセロール、1,2-ジアシルグリセロールおよび 1-モノアシルグリセロールに対する作用が大きかった。

以上、各アシルグリセロールに対する基質親和性ならびに分解作用の結果から、本酵素によるトリアシルグリセロールの分解は 1,2-ジアシルグリセロール、1-モノアシルグリセロールを経て脂肪酸とグリセロールに速やかに進行するものと推察された。

6. 各種油脂に対する分解性 養魚飼料に添加する油脂に関する知見を得るため、本酵素の各種油脂に対する分解作用について検討し、その結果を Table 7 に示した。オリーブ油に対する分解率を 100% とし、相対値で示したところ、コーン油はオリーブ油とはほぼ同様な分解率を示したのに対し、ココナッツ油は 174% とやや高く、大豆油は 200% とオリーブ油の 2 倍と本試験において最も高い分解率を示した。本酵素は短鎖脂肪酸トリアシルグリセロールのトリカプロイン、トリブチリンをよく分解したことから、他の油脂に比べ低級脂肪酸からなるココナッツ油の分解率が高かったものと推察された。また、本酵素は大豆油に対し高い分解性を示し、テラピアの養魚飼料へ添加する油脂として大豆油の優位性が示唆された。なお、大豆油とコーン油は同じく半乾性油であるにもかかわらず、大豆油の分解率が

Table 7. Effect of oil on intestine lipase activity of *Tilapia*

Fat and oil	Relative hydrolysis (%)
Olive oil	100
Soybean oil	200
Corn oil	104
Coconut oil	174

The reaction was carried out at 35°C for 20 min with various substrates and the activity was determined and expressed as a percentage of the activity with olive oil as substrate.

大きかった要因については脂肪酸組成、トリアシルグリセロール組成および各脂肪酸の位置特異性などの相違が関係しているものと推察されるが、詳細については今後検討する予定である。

以上、テラピア腸管からリパーゼを抽出し、DEAE-セファロースクロマトグラフィー、クロマトフォーカシングおよびゲルクロマトグラフィーを用いて精製を行い、得られた精製酵素の性状について検討した。精製酵素は分子量 46,000、等電点 4.9 で、pH 7.5、35°C で最大活性を示し、その活性は pH 6.5~8.5 および 40°C で 30 分間まで安定であった。Cu²⁺、Cd²⁺、Ni²⁺、Hg²⁺、PCMB および CH₂ICOOH で活性が阻害された。精製酵素はトリアシルグリセロール、1,2-ジアシルグリセロールおよび 1-モノアシルグリセロールに対し高い親和性を示し、長鎖トリアシルグリセロールに比べ、トリブチリン、トリカプロインなどの短鎖トリアシルグリセロールに対する分解作用が大きかったが、一般的な油脂中では大豆油、ココナッツ油に対し高い分解率を示した。

本研究を行うにあたり、試料の採取に御便宜を賜った東京コイクニ株式会社に謝意を表します。

文 献

- 1) 手島新一. 脂質.「養魚飼料—基礎と応用—」水産学シリーズ 54.」(米康夫編) 恒星社厚生閣, 東京, 1985; 20-30.
- 2) 北御門学, 立野新光. ニジマス消化酵素の研究-III. 日本誌 1960; **26**: 691-694.
- 3) 高橋 喬. イカ内蔵の生化学的研究-V. 澱粉分解酵素およびエステル分解酵素について 日本誌, 1960; **26**: 1006-1009.
- 4) Santa N, Bottesch A: Lipases in cultured carp. Acad. Rep. Populare Romine, Studii Bil., Ser. Biol. Animala, **13**: 143-153, 1961.
- 5) 山田亜樹子, 高野克己, 鴨居郁三. テラピア胃アミラーゼの精製ならびに性状. 日本誌 1996; **62**: 269-274.
- 6) 山田亜樹子, 高野克己, 鴨居郁三. テラピア胃プロテアー

- ゼの精製ならびに性状. 日本誌 1993; **59**: 1903-1908.
- 7) 山田亜樹子, 高野克己, 鴨居郁三. テラピア腸管アミラーゼの精製ならびに性状について. 日本誌 1991; **57**: 1903-1909.
- 8) 山田亜樹子, 高野克己, 鴨居郁三. テラピア腸管 α -グルコシダーゼの精製ならびに性状. 日本誌 1992; **58**: 2189-2195.
- 9) 山田亜樹子, 高野克己, 鴨居郁三. テラピア腸管プロテアーゼの精製ならびに性状について. 日本誌 1991; **57**: 1551-1557.
- 10) Lowry PR, Tinsley IJ. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Am. Chem. Soc.* 1976; **53**: 470-472.
- 11) Hatree EF. Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 1972; **48**: 422-427.
- 12) 永井 裕. ディスク電気泳動法. 蛋白質 核酸 酵素, 1966; **11**: 744-749.
- 13) Fischer L. 「ゲルクロマトグラフィー. 第1版」東京化学同人, 東京, 1974; 59-147.
- 14) 林 健志, 大場義樹. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法. 蛋白質 核酸 酵素, 1972; **17**: 304-311.
- 15) 尾崎久雄. 魚類生理学講座 3 化の生理 (上). 第1版, 緑書房, 東京, 1971; 203-218.
- 16) 渡辺 武. 脂肪. 「魚類の栄養と飼料」(萩野珍吉編), 恒星社厚生閣, 東京, 1985; 149-186.
- 17) Desnuelle P. Lipases. In: Boyer PD (ed) *The Enzymes* Vol. 7, Academic Press, New York and London, 1972; 575-616.
- 18) Hayase K, Tappel AL. Specificity and other properties of lysosomal lipase of rat liver. *J. Biol. Chem.* 1970; **245**: 169-175.