

# 寒天多糖組成の抽出条件による差異\*

田川昭治・小島良夫

Compositional Differences of Agar Polysaccharide of *Gelidium amansii*  
through Various Extracting Conditions

By

Shōji TAGAWA and Yoshio KOJIMA

Agar is a complex mixture of polysaccharide extracted from the agarophytes of red seaweed. It is thought to consist of chains having alternating  $\alpha$  - (1  $\rightarrow$  3) and  $\beta$  - (1  $\rightarrow$  4) linkages and to have the following three structural extremes of polysaccharide: agarose, pyruvated agarose and galactan sulfate.

It is well-known among agar manufacturers that a low yield of agar forming a elastic gel is obtained under mild conditions of extraction, whereas a high yield of agar forming a rigid and brittle gel is obtainable under severe conditions of extraction, even if the agarophyte collected from the same place and/or in the same season is used as raw material.

The above-mentioned fact known through experience suggests to us that the polysaccharide composition should differ among agars depending on not only the harvest place and/or the harvest season of the agarophyte but also on the conditions of extraction of agar from the agarophyte.

In this paper, the polysaccharide composition of agar from *Gelidium amansii* collected at the coast of Yoshimi, Shimonoseki, in June 1969 was studied by anion-exchange chromatography in connection with the extracting conditions of agar.

The results obtained are summarized as follows:

1. The polysaccharide composition varies among agars according to the extracting conditions (Fig. 2). Agar A(extracted at 100°C for 1 hour) was rich with highly sulfated polysaccharide, and Agar C(extracted at 120°C for 3 hours) was rich with neutral or lowly sulfated ones. Agar B(extracted at 110°C for 3 hours) was intermediate between the two in polysaccharide composition.
2. There are two possible explanations of the above fact. One is that the hydrolysis of

---

\*水産大学校研究業績 第704号, 1973年11月16日 受理.

Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 704.

Received Nov. 16, 1973.

glycosidic linkages may be predominant in highly sulfated polysaccharide, and the other is that the predominant desulfation from them may take place, under severe extraction conditions. However, the following conclusion is drawn from the combined results given in Figs. 2 and 3, and in Table 3.

Highly sulfated polysaccharide is easily extracted even under mild conditions. Under severe extraction conditions, degradation takes place predominantly rather than desulfation in highly sulfated polysaccharide. The resulting fragments are removed out of the frozen gel during the thawing process in agar preparation. On the other hand, the complete extraction of neutral polysaccharide requires considerably severe conditions.

Consequently, the polysaccharide composition varies with the extracting conditions of agar; agar extracted under mild conditions becomes rich with highly sulfated polysaccharide, while agar under severe conditions becomes rich with neutral or lowly sulfated polysaccharides.

3. The sulfate content was highest in Agar A, followed by Agar B, Agar C, in order of decreasing content. The sulfate content of polysaccharide eluted from the ion-exchanger increased in order of elution through each agar. On the other hand, the molar ratio of 3,6-anhydrogalactose to galactose was approximately unity through each of the eluted fractions, with some exceptions (Table 2).

4. The sugar content of Fraction 4 was exceptionally low in all the agars, and a considerable amount of ash consisting of mainly the salts of Ca and Mg was found in Fraction 4 of Agar A (Table 2).

## 1. 緒 言

寒天は、(a) (1→3) 結合  $\beta$ -D-ガラクトース残基と (1→4) 結合 3,6-アンヒドロ- $\alpha$ -L-ガラクトース残基とが交互に連なっている中性多糖であるアガロース<sup>1-4)</sup>, (b) アガロースの 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトース残基の一部がガラクトース硫酸残基<sup>5)</sup>で、D-ガラクトース残基の一部が 4,6-O-(1-カルボキシエチリデン)-D-ガラクトース残基<sup>6)</sup>でそれぞれ置換された酸性多糖であるアガロースピルピン酸<sup>7)</sup>, (c) 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースおよび 4,6-O-(1-カルボキシエチリデン)-D-ガラクトースの両残基をほとんどあるいは全く含まないガラクトン硫酸<sup>7)</sup>の三者で代表される多糖をいろいろの割合に含む複雑な多糖であるといわれている。そして、寒天の特性の一つであるゲル化力においてはアガロースが最もすぐれ<sup>8,9)</sup>, ガラクトン硫酸は全くあるいはほとんどゲル化しない。寒天におけるこれらの多糖の存在比は、原藻の種類、採取時期あるいは産地などによって異なると考えられるので、寒天ゲルの性状にも当然差異を生じる。

一方、古くから寒天製造業者の間では、原藻をおだやかな条件で煮熟して得られるトコロテンはしなやかで、曲げても折れにくい、寒天の収率は低く、逆にきびしい煮熟条件で得られるトコロテンはかたいがもろくて、寒天の収率は高いといわれている。このことは同一原藻から製造された寒天であっても、原藻からの抽出条件によってその多糖組成が異なることを示唆する。

田川<sup>9)</sup>はさきに、マクサを数種の条件で煮熟し、アガロースの抽出量は煮熟条件がきびしくなるにつれて増加するが、アガロペクチン\*では分解が顕著におこることを報告し、抽出条件による寒天のゼリー強度の

\*寒天の中のアガロース以外の多糖を総称してアガロペクチンともよぶ。

差異を考察した。

今回はイオン交換クロマトグラフィーによって寒天を分画し、抽出条件による多糖組成の差異を検討した。その結果を報告する。

## 2. 実験方法

2・1 試料：マクサ *Gelidium amansii* (下関市吉見産) を用いた。

2・2 寒天の調製：3種の条件で寒天多糖を抽出した。すなわち、マクサを 101~103℃ で 1時間、110℃ で 3時間および 120℃ で 3時間それぞれ加圧煮熟した。抽出液の濾過、ゲル化、細断、凍結・融解脱水および乾燥を常法<sup>9)</sup> にしたがって行ない、寒天を調製した。

2・3 寒天多糖の分画<sup>10, 11)</sup>：アニオン交換樹脂 Dowex 1×2 (200~400メッシュ、ギ酸型) により 80℃ で行なった。0.1% 寒天水溶液 (400 ml) をジャケット付カラム (3×45cm) に添加し、下記の溶離液で順次溶離し、それぞれの溶出液を Fr. 1, Fr. 2, Fr. 3および Fr. 4とした。溶出速度は 100~150 ml/hr であった。

- |                       |        |
|-----------------------|--------|
| a) 蒸留水                | 800 ml |
| b) 0.1 M ギ酸アンモニウム水溶液  | 500 ml |
| c) 1 M ギ酸アンモニウム水溶液    | 500 ml |
| d) 2 M サリチル酸アンモニウム水溶液 | 500 ml |

Fr. 1~3の溶出液を 50℃ 以下でそれぞれ減圧濃縮し、水道水ついで蒸留水に対して透析し、内液を 4倍量のアセトンに添加した。生じた沈殿をアセトンで 5回洗浄したのち乾燥して各画分を得た。しかし、d) の溶出液からは上記の操作で沈殿が生成しなかったため、透析後、真空凍結乾燥して Fr. 4を得た。

なお、溶出状態の検討には、0.1% 寒天水溶液 (20 ml) を上記のカラムに添加し、前述の溶離液、a) 300 ml, b) 300 ml, c) 300 ml, d) 500 ml で溶離した溶出液を 10 ml ずつ分取し、フェノール硫酸法<sup>12)</sup> によって全ヘキソースを定量して、溶出パターンを求めた。

2・4 分析方法：3, 6-アンヒドロガラクトースの定量はレゾルシノール法<sup>13)</sup> によった。ガラクトースはフェノール-硫酸法<sup>12)</sup> によって定量された全ヘキソース含量から、3, 6-アンヒドロガラクトース含量を差引いて求めた。硫酸基の定量は、封管中 1 N 塩酸で 100℃, 5時間加水分解したのち、クロラニル酸バリウム法<sup>14)</sup> によった。

ゼリー強度は 1%ゲルについてカードメーター M301A (飯尾電機製) によって測定した<sup>15)</sup>。ゲルの荷重変形の測定は林らの方法<sup>16)</sup> に準拠した。すなわち、1%ゲル (直径 4.3cm, 高さ 2.0cm) に 100 g/7mm<sup>2</sup> の荷重を加え、そのときの変形量 (ゲルのくぼみの深さ) をカードメーターの記録紙から読みとった。なお、上記の荷重以下でゲルが破壊したときには、外挿法によって荷重 100 g/7mm<sup>2</sup> の点を求めた。

## 3. 結果および考察

3・1 寒天の収率およびゲルの性質：マクサからの寒天の収率およびゲルの 2, 3の性質を第 1表に示す。収率では 120℃, 3時間の抽出で得た寒天 (以下寒天 C という) が最も高く、ついで 110℃, 3時間の抽出で得た寒天 (以下寒天 B という), 101~103℃, 1時間の抽出で得た寒天 (以下寒天 A という) の順であった。なお、120℃, 4時間の抽出では収率が 37.3% に低下した。一方、ゼリー強度は寒天 B で大きかった。このように、抽出条件によっては、収率が最高となる反面ゼリー強度が低下する現象は、寒天の製造におい

てしばしば見られることである<sup>9, 17, 18)</sup>。また、ゲルの荷重変形は抽出条件がきびしくなるにしたがって減少し、寒天Aで最も折れにくく、しなやかなゲルが得られた。

Table 1. Yield and gel properties of agars extracted from *Gelidium amansii*.

| Agar No. | Extracting conditions | Yield (%) | Jelly strength* (1%, g/7mm <sup>2</sup> ) | Deformation** (mm) |
|----------|-----------------------|-----------|---|--------------------|
| A        | 101~103°C, 1 hr       | 31.5      | 99  | 8.0                |
| B        | 110°C, 3 hr           | 37.8      | 113                                       | 5.5                |
| C        | 120°C, 3 hr           | 39.5      | 98  | 5.0                |

\* measured on Curd meter M 301-A (Iio Electric Co.).

\*\* depth of hollow on gel surface loaded with 100 g/7 mm<sup>2</sup>.

3・2 寒天多糖の分画：アニオン交換樹脂 Dowex 1×2による80°Cにおける分画パターンの一例を第1図に示す。本実験ではこのように4個の画分(Fr. 1~Fr. 4)に分画されたが、多糖の13~27%はカラムに吸着されたまま、2Mサリチル酸アンモニウム水溶液によっても溶出されなかった。

これらの各画分の糖成分および硫酸基の含量は第2表に示すとおりである。寒天の硫酸基含量は抽出条件がきびしくなるのともなって減少した。これは抽出条件がきびしくなれば硫酸基含量の低い多糖(以下低硫酸多糖と略記する)が増加し、逆に硫酸基含量の高い多糖(以下高硫酸多糖と略記する)が減少するためである(第2図)。また、どの寒天においても、溶出のおそい画分ほど硫酸基含量が高く、逆にゲル化力が小さかった。カラムに吸着されたまま溶出されなかった多糖(Fr. 5)では、おそらくFr. 4より硫酸基含量が高く、ゲル化力が小さいと考えられる。

ガラクトースに対する3,6-アノヒドロガラクトースのモル比には、2, 3の例外はあるが、各画分を通じ大きな差異が見られない。このことは、各画分の多糖にこれらの中性糖残基からなるある程度均一な骨格

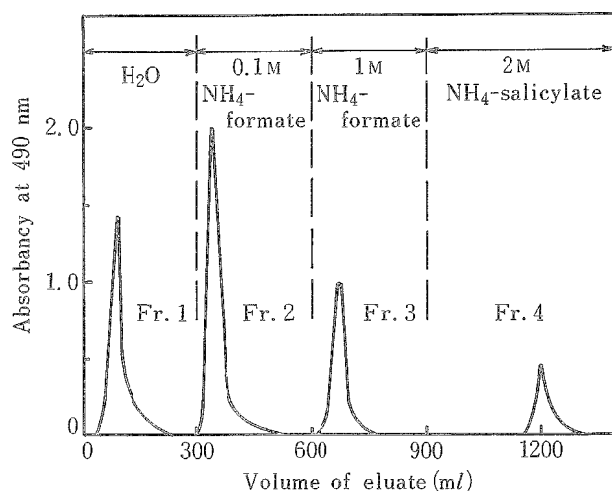


Fig. 1. Stepwise elution chromatogram of Agar C on Dowex 1×2 column (200~400 mesh, formate form, 3×45 cm, 80°C).

Assay by phenol-sulfuric acid.

構造が存在することを示唆している。しかしながら、IZUMI<sup>11)</sup>はマクサ寒天の Fraction 2 および Fraction 3 (それぞれ本実験の Fr. 2 および Fr. 3 に対応する) を、さらに Dowex 1×2 からグラジエント溶離法により分画し、3, 6-アンヒドロガラクトース濃度レベルについて明らかに不均一なパターンを得ている。このことから、寒天多糖のうち、従来アガロペクチンとよばれてきた画分が、糖および酸性基の両濃度レベルに関して著しく不均一な多糖の混合物であると考えられる。

Table 2. Composition of the eluted fractions of *Gelidium agar*.

| Fraction | Galactose* (%) | 3, 6-Anhydrogalactose (%) | Sulfate (%) | Gel formation** |
|----------|----------------|---------------------------|-------------|-----------------|
| Agar A   | 34.1           | 60.1                      | 2.26        |                 |
| Fr. 1    | 37.3           | 57.2                      | 0.09        |                 |
| Fr. 2    | 44.6           | 55.3                      | 0.79        |                 |
| Fr. 3    | 39.1           | 53.7                      | 1.40        |                 |
| Fr. 4*** | 21.2           | 30.4                      | 2.09        |                 |
| Agar B   | 38.2           | 59.2                      | 1.71        |                 |
| Fr. 1    | 30.1           | 56.9                      | 0.06        |                 |
| Fr. 2    | 37.4           | 56.6                      | 0.75        |                 |
| Fr. 3    | 32.0           | 56.0                      | 0.84        |                 |
| Fr. 4    | 41.1           | 20.8                      | 2.62        |                 |
| Agar C   | 39.5           | 58.1                      | 1.69        |                 |
| Fr. 1    | 35.4           | 57.0                      | 0.07        | +++             |
| Fr. 2    | 38.4           | 54.6                      | 0.84        | ++              |
| Fr. 3    | 37.9           | 51.7                      | 0.89        | +               |
| Fr. 4    | 23.9           | 35.3                      | 2.14        | -               |

\* calculated by subtracting the anhydrogalactose content from the total hexose content determined by phenol-sulfuric acid method.

\*\* +: the degree of jelly strength of a 1% gel, -: no gel at a concentration of 1%.

\*\*\* contained 22.1% crude ash.

また、Fr. 4では、他の画分と異なり全ヘキソース含量が50~60%と低かった。Fr. 4は塩化鉄(III)との反応が陰性であったので、溶離に使用したサリチル酸塩の混入は考えられない。したがって、元来多糖に含まれるが分析対象とされなかった成分が、低含量の原因と考えられる。事実、寒天AのFr. 4に約22%の粗灰分(定性試験の結果、 $Mg^{2+}$ および $Ca^{2+}$ が多量に検出された)が検出された。これを考慮に入れても、Fr. 4における全ヘキソースの低含量を完全に説明することはできない。しかし、硫酸基含量の高いFr. 4に無機成分がかなり多量に含まれていることは、寒天中の硫酸基が金属塩として存在するという古くからの考え<sup>19)</sup>、あるいは灰分はアガロペクチンに含まれる<sup>8)</sup>という事実によく一致する。

寒天の多糖組成は、第2図に見られるように抽出条件によってかなり異なっている。低硫酸多糖は寒天A、寒天Bより寒天Cに多く、これとは逆に硫酸基含量が高いと推定されるFr. 5は寒天Aに著しく多かった。多糖組成から見ると、寒天Bは寒天Aおよび寒天Cの中間である。

第2図には寒天の収率が考慮されていない。しかしながら、寒天収率(第1表)を考慮に入れても、そのパターンは第2図のそれとほとんど変わらない。したがって、Frs. 3および4の含量パーセントが寒天Bで最も大きく寒天Cでかえって小さくなっていること、ならびにFr. 5の含量パーセントが寒天Aで最も大きく、次いで寒天B、寒天Cの順であることは、Frs. 1および2の含量パーセントが寒天Bおよび寒天Cで増大し

たために生じた相対的な結果ではなく、これらの画分の絶対的な存在量の低下を示している。この低下の原因はつぎのように考えることができる。もしも、寒天の抽出条件がきびしいときに、高硫酸多糖においてエステル結合の加水分解による硫酸基の脱離がグリコシド結合の加水分解に優先しておこれば、その結果として高硫酸多糖の減少および低硫酸多糖の増加がほぼ同程度に現われるであろう。また、これと逆に、グリコシド結合の加水分解による解重合が顕著におこれば、低分子化した部分が寒天製造工程で除去され、その結果高硫酸多糖の減少が顕著に現われ、低硫酸多糖の増加はわずかであろう。

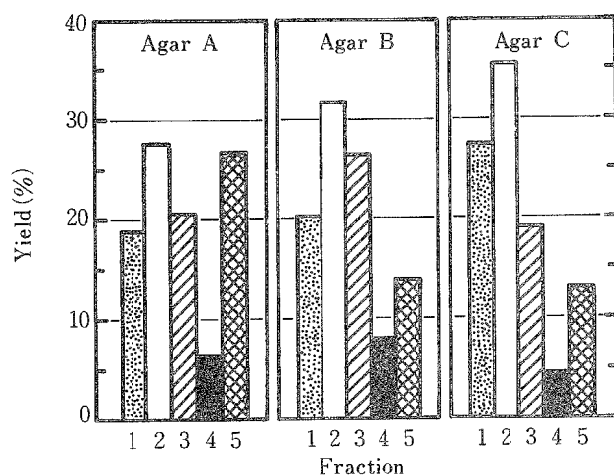


Fig. 2. Bar diagram showing the fractionation of agars on Dowex 1 x 2.

The polysaccharide was eluted from the ion-exchanger with water (Fr. 1) and 0.1 M (Fr. 2), 1 M (Fr. 3) ammonium formate and 2 M ammonium salicylate (Fr. 4). Fr. 5 shows the polysaccharide irreversibly bound to the column, which was calculated by subtracting the total yield of the polysaccharides eluted from 100%.

このことを確かめるために、つぎの実験を行なった。すなわち、別に 100℃、1時間の抽出で調製したマクサ寒天を、ジメチルスルホキシド法<sup>9)</sup>によって高硫酸多糖(収量, 65%:硫酸基含量, 5.17%)と低硫酸多糖(収量, 31%:硫酸基含量, 0.51%)とに分別した。これらの多糖の0.5%水溶液を加圧下120℃に加熱したのち、50℃における粘度、硫酸基(コロイド滴定法<sup>20)</sup>、3, 6-アンヒドロガラクトース(レゾルシノール法<sup>13)</sup>)および還元糖(SOMOGYI-NELSON法<sup>22, 23)</sup>)の変化を調べた。

高硫酸多糖における結果を第3図に、低硫酸多糖におけるそれを第3表に示す。これによると高硫酸多糖では、120℃、5時間後も3, 6-アンヒドロガラクトースの変化が全く見られない。これに対し、グリコシド結合および硫酸エステル結合の加水分解が顕著である。しかし、3時間の加熱では、比粘度の低下が約70%であるのに対し、硫酸基に対するグリコールキトサン(滴定値)の減少は約24%である。さらに、同様の実験を100℃で行なったところ、3時間後に比粘度が加熱前の約57%に低下したのに対し、硫酸基の量には全く変化が見られなかった。したがって、実際の抽出の際に、解重合をとまなわないう硫酸基の脱離のみが選択的におこることは考えられない。このことから、寒天Cを抽出した条件の下で、高硫酸多糖では硫酸基脱離よりもグリコシド結合の加水分解が顕著におこり、寒天Cで高硫酸多糖の存在量が減少したものと考えられる。

また、低硫酸多糖では、3, 6-アノヒドロガラクトースおよび還元糖の変化は高硫酸多糖の場合とほとんど同じ傾向であった。しかし、比粘度の低下は第3表に示すように、高硫酸多糖の場合よりかなり小さく、低硫酸多糖が高硫酸多糖よりグリコシド結合の加水分解をおこしにくいことを示している。したがって、寒天Cに低硫酸多糖が多いのは、寒天Cを抽出した条件でその抽出量が増大したためと解釈される。

以上のことから、抽出条件によって多糖組成に差異が生じる原因をつぎのようにまとめることができる。すなわち、高硫酸多糖は比較的温和な条件（たとえば 100℃、1時間）の下でも容易に抽出される。抽出条

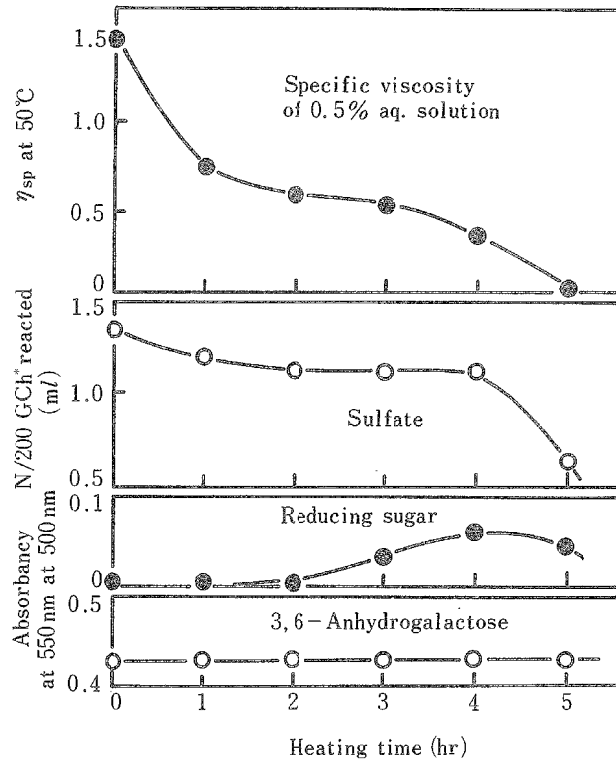


Fig. 3. Degradation of highly sulfated polysaccharide (SO<sub>4</sub>, 5.17%) on heating at 120°C. The polysaccharide was fractionated with dimethylsulfoxide from the agar extracted at 100°C for 1 hr. \*glycol chitosan

Table 3. Degradation of lowly sulfated polysaccharide\* (SO<sub>4</sub>, 0.51%) on heating at 120°C.

| Heating time at 120°C | N/200 GCh** reacted with sulfate |          | Specific viscosity at 50°C |          |
|-----------------------|----------------------------------|----------|----------------------------|----------|
|                       | Amount                           | Decrease | η <sub>sp</sub>            | Decrease |
| 0hr                   | 0.39 ml                          | 0%       | 1.04                       | 0%       |
| 1                     | 0.36                             | 8        | 0.81                       | 22       |
| 2                     | 0.35                             | 10       | 0.64                       | 38       |
| 3                     | 0.27                             | 31       | 0.55                       | 47       |
| 4                     | 0.27                             | 31       | 0.43                       | 59       |
| 5                     | 0.23                             | 41       | 0.43                       | 59       |

\* fractionated with dimethylsulfoxide from the agar extracted at 100°C for 1 hr.

\*\* glycol chitosan

件がきびしくなれば、高硫酸多糖では自己触媒作用あるいはその他の原因によりグリコシド結合の加水分解がおこり、それにより生じた低分子部分が寒天製造工程における凍結ゲルの融解の際に流出除去される。したがって、高硫酸多糖は温和な条件で抽出して製造された寒天に多く、きびしい条件で抽出して製造された寒天に少ない。これに対し、低硫酸多糖はその抽出にかなりきびしい条件を必要とし、また高硫酸多糖に比べて解重合をおこしにくい。したがって、この多糖は温和な条件で抽出して製造された寒天に少なく、きびしい条件で抽出して製造された寒天に多い。

以上の結果から、寒天の多糖組成が原藻の種類<sup>23)</sup>、採取時期あるいは産地によって変化するのみならず、たとえ前記の諸因子が同一であっても、原藻からの抽出条件によって変わることが明らかとなった。このような多糖組成の差異が、分子量その他の要因と複雑にからみ合って、寒天の収率およびゲルの性状に反映するものと思われる。

#### 4. 要 約

マクサから 100℃、1時間(寒天A)、110℃、3時間(寒天B)および 120℃、3時間(寒天C)の抽出により得られた寒天を、イオン交換クロマトグラフィーにより分画して、つぎのような結果を得た。

1. 寒天の多糖組成はその抽出条件により異なる。高硫酸多糖は寒天Aに多くて寒天Cに少なく、低硫酸多糖はその逆であった。多糖組成から見ると、寒天Bは寒天Aおよび寒天Cの間であった。

2. 高硫酸多糖は温和な条件でも低硫酸多糖より抽出されやすく、またグリコシド結合の加水分解をおこしやすい。これらのことがおもな原因となって、温和な条件で抽出された寒天に高硫酸多糖が多く、きびしい条件で抽出された寒天に低硫酸多糖が多いと推定される。

3. どの寒天においても、硫酸基は溶出のおそい画分ほど多かった。しかし、ガラクトースに対する3,6-アンヒドロガラクトースのモル比には、各画分を通じ大きな差異は見られなかった。

4. 硫酸基の多い Fr. 4では全ヘキソース含量が例外的に低く、かなり多量の粗灰分が含まれていた。

終りに、本実験に協力された本校卒論学生、高木幸雄、依田 修の両君に感謝の意を表する。

#### 文 献

- 1) ARAKI, C., and S. HIRASE, 1960: *Bull. Chem. Soc. Japan*, 33, 291~295.
- 2) ARAKI, C., and K. ARAI, 1956: *ibid.*, 29, 339~345.
- 3) ARAKI, C., 1956: *ibid.*, 29, 543~544.
- 4) ARAKI, C., and K. ARAI, 1957: *ibid.*, 30, 287~293.
- 5) ARAKI, C., 1966: *Proc. 5th Intern. Seaweed Symp.* (E. G. YOUNG and J. L. MCLACHLAN ed.), 3~17; Pergamon Press, Oxford.
- 6) HIRASE, S., 1957: *Bull. Chem. Soc. Japan*, 30, 68~70.
- 7) DUCKWORTH, M., and W. YAPHE, 1971: *Carbohydr. Res.*, 16, 189~197.
- 8) 荒木長次, 1958: 蛋・核・酵, 3, 447~453.
- 9) 田川昭治, 1968: 本報告, 17, 1~52.
- 10) IZUMI, K., 1970: *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1739~1740.
- 11) IZUMI, K., 1971: *Carbohydr. Res.*, 17, 227~230.
- 12) 阿武喜美子・瀬野信子, 1968: 糖質実験法(蛋白質・核酸・酵素編集部編), 15, 共立出版, 東京.
- 13) YAPHE, W., 1960: *Anal. Chem.*, 32, 1327~1330.



- 14) WAINER, A., and A. L. KOCH, 1962 : *Anal. Biochem.*, 3, 457~461.
- 15) TAGAWA, S., and Y. KOJIMA, 1972 : *Proc. 7th Intern. Seaweed Symp.* (K. NISIZAWA ed.), 447~450, University of Tokyo Press, Tokyo.
- 16) 林 金雄・平光 武, 1969 : 食工誌, 16, 160~162.
- 17) 林 金雄・原田典宜, 1959 : 岐阜大農報, 11, 112~115.
- 18) 田川昭治・小島良夫, 1966 : 本報告, 14, 157~164.
- 19) たとえば高橋栄治・白浜 潔, 1932 : 農化, 8, 659~665.
- 20) 千手諒一, 1969 : コロイド滴定法, 104 pp., 南江堂, 東京.
- 21) 阿武喜美子・瀬野信子, 1968 : 糖質実験法 (蛋白質・核酸・酵素編集部編), 13, 共立出版, 東京.
- 22) 福井作蔵, 1969 : 還元糖の定量法, 10~12, 東京大学出版会, 東京.
- 23) DUCKWORTH, M., K. C. HONG, and W. YAPHE, 1971 : *Carbohydr. Res.*, 18, 1~9.