

## Bioassay によるアミノ酸の定量

加 来 ト ミ 子\*

中 村 幸 子\*

中 山 啓 子\*

### 緒 言

生命のあるところには、必ず蛋白質が存在する。蛋白質は、炭水化物及び脂肪と共に三大栄養素の一つとして、我々の生活に不可欠の物質であるだけでなく、動物の筋肉、臓器、皮膚、毛髪、爪等を構成し、又生物体の原形質の主成分として、直接生活現象に関与する極めて重要な物質である。この蛋白質を構成しているものがアミノ酸であり、このアミノ酸には、必須アミノ酸と、必須でないアミノ酸がある。19世紀に入った頃より、アミノ酸化学が発展し始め、次々と新しいアミノ酸の発見、それに対するいろいろの疑問、改訂など多くの学者によつて研究がなされ今日に至つたのであるが、発見されたアミノ酸の数も、現在では20数種にわたつている。そして、蛋白質中のアミノ酸分析もいろいろと研究されてきたが、最近の10年間には著しくその正確度が上昇してきたといわれる。これはいろいろの新法が発達してきた為であるが、殊に Bioassay 即ち微生物定量法により、アミノ酸の割合が明らかになつた。微生物といつても種々あるが、定量用菌株としては、乳酸菌類、酵母類、原虫類、変異株等があり、アミノ酸定量には主として乳酸菌を使う場合が多い。

微生物定量法の研究は、1943年 Kuiken氏等により始められ、数種食品のアミノ酸の定量が行なわれ、以来、純蛋白、食品、血液、尿、汗、脊髄液、ホルモン酵素、ウイルス、細菌、細菌毒素、黴、植物代謝生産物、その他生物に関する物質中のアミノ酸の定量が報告された。このようにして、生物学、医学の分野におけるアミノ酸と蛋白質の知見に大いなる進歩を与えた。我が国でも、学者や研究生等からなる Microbioassay の会があり、活発に研究が進められているので、今後も益々発展する事と思われるが、まだ新しい研究部門に属するもので、十分検討する必要があると思われる。

微生物定量法の特徴のうち、長所としては、試料が

少量でよいという事、L-アミノ酸の定量にとどまらず D-アミノ酸の定量あるいは、アミノ酸の metabolism の研究へと進み、更に Chromatography を併用した Bioautography によるペプチドその他の研究も行なわれつつある。又、化学的比色法では、一般に特有の radical をもつ物質すべてが呈色するが、微生物定量法は更に特殊性が高いから、目的物だけが定量できると同時に、比色法等の併用によつて、同族体との分別定量ができ、又更に、未知同族体の存在が予想できる。精密度も、注意して行なえば、多くの場合、化学的方法のうちの精度の高いものと比べて遜色ない。微生物定量法は、どの種類のアミノ酸にも適用できるから、特有な呈色反応のない Valine, Leucine, Isoleucine 等にあつては、特にその特徴が発揮される。

反面、微生物を使うのであるから、微生物自身の調子のよい時でなければよい結果を得る事ができない為条件をよくして、常に気を配らなければならない。又培地の成分試薬が多種類で、操作も手落ちのないようにし、特に大切な事は、使用菌株以外の菌株その他の雑菌が入らないように注意を要するなど欠点もある。

微生物によるアミノ酸の定量のねらいは、微生物の栄養要求を基として、アミノ酸を定量する方法で、定量しようとするアミノ酸を特異的に要求する乳酸菌を選ぶのであり、その原理は、「微生物の増殖に必要なすべての栄養素を含む培地から、定量しようとするアミノ酸を除くと、それを合成し得ない微生物即ち特異的に要求する菌株は増殖しない。この培地に、除いたアミノ酸をいろいろの濃度に加えた時、一定濃度範囲での増殖度が、加えたアミノ酸の濃度に比例し、又他のビタミンやアミノ酸が、必要以上にあつても増殖が影響されない時は、増殖度をはかつてアミノ酸の定量ができる。

以上のような事を考慮した上で、我々はこの微生物定量法により 2, 3蛋白質中の L-Lysine, L-Leucine, L-Valine の定量を試みた。

\*昭和35年度本学卒業生(平教授指導)

## 実験の部

〔微生物定量法の準備及び操作〕

### 1. 使用菌株について

定量用菌株は、その菌株が定量しようとするアミノ酸を厳密に要求し、培地中の物質から、このアミノ酸を合成する能力がなく、又試料中の未知因子によつて増殖が促進或いは抑制されない事が重要である。

本実験において、Lysine 定量には *Leuconostoc mesenteroides* P-60、Leucine Valine の定量には *Lactobacillus arabinosus* 17-5 を使用した。これらの菌は、合成培地によく生育し、他の生育促進物質による影響が少なく、生育量多く、培養に便利である。尚、菌は日産研究所より分与をうけた。

### 2. 保存培養基の調製と菌株の保存

使用菌株の保存を行なう為、日産研究所のアミノ酸保存用培地に炭酸カルシウムを入れたものを保存寒天培養基とした。炭酸カルシウムを入れるのは、乳酸菌自らが出す酸にて菌が死滅するのを防ぐ為である。培地組成は第1表の如くである。

第1表 一般乳酸菌保存用培地「ニッサン」成分表  
60g (1l分) 中

成 分	分量	成 分	分量
酵母エキス	5.0g	酢酸ソーダ	10.0g
ペプトン	10.0g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1g
ブドウ糖	10.0g	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5mg
KHPO <sub>4</sub>	0.25g	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25g	粉末寒天	20.0g

pH6.8±0.1

上記培地に所定の割合の蒸溜水を加え、湯浴中でよく溶かし試験管に10cc宛分注し、Koch蒸気殺菌釜にて、5分宛3日間、間歇滅菌した後、冷却固化させ保存しておく。菌を無菌箱<sup>\*\*\*</sup>の中で白金耳<sup>\*\*\*</sup>接種し、綿栓をして32°C 24時間培養を行なつた。試験管に菌株名、植えつぎの月日を記入したラベルをはつておき、綿栓部分は硫酸紙で蔽つてゴム輪でとめ、冷蔵庫中で保存。菌株の植えつぎは1週間毎に行なつた。

(注) \*よく洗滌乾燥した試験管に綿栓をして、120°C 1時間乾熱滅菌したものを使用した。

\*\*無菌箱は、0.1%の昇汞水を使用の都度噴霧した。

\*\*\*白金線は、火焰滅菌して使用した。

### 3. 前培養培地及び接種菌液の調製

定量操作の場合は、保存菌を直接接種するわけにはいかないので、保存菌を一度液状培地に植えついで増殖させる必要があり、それを前培養という。

Lysine 並びに Leucine 定量用の前培養培地としては、日産の一般乳酸菌接種用培地を使つた。その組成は保存用培地から粉末寒天のみを除いたものである。しかし培地にする時40g/1lの割合で溶解するので保存用培地より栄養量が少ない。この培地を5cc宛試験管に分注し、3日間、間歇滅菌後保存した。

Valine定量用の前培養培地は、後述の基礎培地と同一の栄養源の合成培地を使用した。

これら前培養培地に前培養して接種菌液を作るのであるが、定量用分注の3日前、保存菌を無菌箱中で、上記の前培養培地に移植し恒温器にて32°C 24時間培養、これをくり返し菌を栄養源の少ない液状培地に慣らした。ついで、菌体の増殖した液状培地1ccをピペットで遠沈管<sup>\*\*\*</sup>にとり遠心分離に3000回転5分かけ、上澄液をすて、0.9%NaCl 水で菌体を洗い、この操作を2、3回くり返し行なつた後、Lysine 定量には *Leuconostoc mesenteroides* P-60を1:50の割で生理食塩水に懸濁せしめたものを接種菌液とし、Leucine 定量には、*Lactobacillus arabinosus* 17-5を1:10にし、Valine定量には、*Lactobacillus arabinosus* 17-5を1:10にしてそれぞれ接種菌液とした。尚、この接種菌液作成は、全操作を通じて無菌的に行つた。

註>共に1時間以上乾熱滅菌したものを使用した。

### 4. 定量用試料の調製

試料には、Casein, Gelatin, Albumin (from Eggs) の3蛋白質を用いた。いずれも半井化学薬品株式会社のものを使用した。

蛋白質のアミノ酸量を定量する場合は、加水分解して遊離のアミノ酸液とするが、その条件としては、加水分解が十分に進み且つアミノ酸の破壊が起らない事が重要である。

加水分解の方法には、酸分解、アルカリ分解、酵素分解等があるが、本定量には、3蛋白質共酸分解を行なつた。各試料0.1gを正確に秤り、10%HCl 2ccを加え硝子ボンベに封入し120°C 10時間 Oil bath 中で分解した。後開管し分解液をとり出し、活性炭少量を加え濾過し、熱水で濾紙附着物をよく洗い濾液と合する。活性炭を加え濾過するのは、分解液の着毛及びフミン質を除く為である。検液の塩類濃度が高くなるのを防ぐため減圧にてHClを除した。

定量に際して、Standard Curve に挿入してそれぞれの含有率を求める時に定量範囲(直線部分)に当てはめられるように大体の見当をつける為、既に化学的方法により定量されている値、即ち第2表を参

考に各試料の稀釈を行なつた。

第2表 各種蛋白質のアミノ酸組成

蛋白質名	Lysine 含有率(%)	Leucine 含有率(%)	Valine 含有率(%)
Casein	5.9	14.8	5.2
Gelatin	4.6	3.3	2.3
Albumin	5.0	13.6	4.5

第3表 三試料稀釈濃度

蛋白質名	Lysine 定量用	Leucine 定量用	Valine 定量用
Casein	700倍	2000倍	500倍
Gelatin	550倍	500倍	200倍
Albumin	600倍	2000倍	400倍

試料はその都度調製し、Lysine 定量用には pH6.4 に、Leucine 定量用には pH6 に、Valine 定量用には pH5.9 にしたものを使用した。

### 5. 基礎培地の作成

基礎培地としては、定量すべきアミノ酸を除いて、使用菌の栄養要求を完全に充し、定量アミノ酸以外の栄養素の影響を消却し且つ該アミノ酸を含まず、試料中の定量アミノ酸量に対応して、特異的に一定の生育を増す必要がある。この為に、各種アミノ酸、ビタミン類、プリン塩基、無機塩類及び糖より成る Henderson-Snell のアミノ酸定量用基礎培地を合成して使用した。この培地は、比較的新しく工夫されたものであり、培地組成は第4表の如くである。

第4表 Henderson-Snell のアミノ酸定量用培地 (double strength)

試薬	分量	使用メーカー名
ブドウ糖	4g	半井化学薬品
クエン酸ナトリウム	4g	〃
無水酢酸ナトリウム	0.2g	〃
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0g	〃
塩類溶液 C*	4cc	〃
アデニン硫酸塩	2mg	半井化学薬品
グアニン塩酸塩	2mg	東京化成
Uracil	2mg	林純薬
Thiamine	200γ	半井化学薬品
Riboflavin	200γ	〃
Pantothenic acid Ca	200γ	〃
Nicotinic acid	200γ	〃
ピリドキザール	40γ	〃
パラアミノ安息香酸	40γ	〃
Biotin	2γ	〃
Folic acid	2γ	〃

L-Tyrosine	20mg	味の素
L-Cystine	20mg	ミノファーゲン
HCl-Histidine	20mg	半井化学薬品
DL-Isoleucine	40mg	〃
DL-Leucine	40mg	東京化成
L-methionine	20mg	ミノファーゲン
L-Phenylalanine	20mg	味の素
L-Proline	20mg	〃
DL-Threonine	20mg	半井化学薬品
L-Lysine	40mg	ミノファーゲン
L-Tryptophan	20mg	半井化学薬品
L-Serine	20mg	味の素
Glycocoll	20mg	半井化学薬品
DL-Alanine	200mg	〃
DL-Aspartic acid	200mg	〃
L-Glutamic acid	200mg	ミノファーゲン
L-Arginine HCl	40mg	〃
L-Valine	20mg	半井化学薬品

### ※塩類溶液 C

MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	10g	富田製薬
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.5g	半井化学
NaCl	0.5g	
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	2g	

以上4種を250ccの水に溶かしたもの。

以上蒸溜水で100ccとする。

Henderson-Snell の培地から Lysine のみを除けば Lysine 定量用培地に、Leucine のみを除けば Leucine 定量用培地に、又 Valine のみを除けば Valine 定量用培地となる。培地は必ず用時調整とし、いつも新鮮なものを使用した。

各試薬を正確に秤り取り、まずアミノ酸の中で難溶である Cystine と Tyrosine をマイヤー中でとかし conc HCl 1 滴を加え、全アミノ酸を溶かし終え、ブドウ糖、クエン酸Na、無水酢酸Na、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、Vitamin、プリン類の順に加え、最後に塩類溶液を加えた後、沸騰湯浴中で攪拌しよくとかし、濾過した後 5% HCl で Lysine 定量用基礎培地は pH6.4 に、Leucine 定量用基礎培地は pH6 に、Valine 定量用基礎培地は pH5.9 に調製し分注にそなえた。なお培地の色は透明淡黄色であつた。

### 6. 標準溶液の作成

標準曲線を作る為に標準溶液が必要である。Lysine の標準溶液作成は、まず十分乾燥させたリジンモノ塩酸塩 12.5mg をはかり、水10cc に溶かしこれを原液とした。この液の遊離の Lysine 濃度は、1000γ/cc でこれを冷蔵庫に保存した。ついで、この原液を12.5倍

に稀めた液と、50倍に稀めた液と2種作り分注に備えた。Leucine, Valine の標準溶液作成は、L-Leucine, L-Valine を10mgずつ秤り、それぞれ水10ccにとかし原液とした。これをそれぞれ20倍、50倍、100倍に稀釈して、同様に分注に備えた。

7. 分注操作

本実験においては、すべて2cc培養を実施した。分注はまず内径15mm, 外径17mmの試験管に番号を書いたラベルをはり、番号順に並べる。先に調製した標準溶液を用いて分注を行なうが、この際増殖度の平均値をとつて測定誤差を少なくする為に同番号のものをそれぞれ3本ずつ用意し、その他に濁度濃度のコントロールとして、0番と同様のものを2本用意したが、この2本には菌は接種しない。

第5表 標準系列

試験管番号	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
各アミノ酸濃度(γ)	0 1 2 4 8 12 16 20 40 80
10r/cc溶液(cc)	0.1 0.2 0.4 0.8
20γ/cc	0.6 0.8 1.0
100γ/cc	4.0 8.0
蒸溜水(cc)	1 0.9 0.8 0.6 0.2 0.4 0.2 0 0.6 0.2
培地(2倍濃度cc)	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
計 (cc)	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2

以上のように分注が終わったらアルミキャップをかぶせておく。

次に検液系列の分注を行なう。標準曲線の直線部分に挿入できるように、LysineとLeucineは0.25, 0.5 1ccの3段階に、Valineは0.2, 0.4, 0.8ccの3段階に分注した。標準系列と同様に各試験管番号に対し3本ずつ用意した。

第6表 検液系列

試験管番号	10 11 12 13 14 15 16 17 18
casein (cc)	0.25 0.5 1.0
gelatin (cc)	0.25 0.5 1.0
albumin (cc)	0.25 0.5 1.0
蒸溜水 (cc)	0.75 0.5 0.75 0.5 0.75 0.5
培地(2倍濃度cc)	1 1 1 1 1 1 1 1 1
計 (cc)	2 2 2 2 2 2 2 2 2

更に、試料の測定値が他の要素、例えば他の物質に

よる生酸の促進又は阻害などによつて影響されていないかを確かめる意味で、又 Bioassay の精度を知る上においても、各試料に添加したそれぞれのアミノ酸の回収率を測定する為に、2段階について3本ずつ分注した。

第7表 回収用系列

試験管番号	19 20 21 22 23 24
casein (cc)	0.25 0.5
gelatin (cc)	0.25 0.5
albumin (cc)	0.25 0.5
アミノ酸添加濃度(γ)	4 4 4 4 4 4
蒸溜水(cc)	0.35 0.1 0.35 0.1 0.35 0.1
培地(2倍濃度cc)	1 1 1 1 1 1
計 (cc)	2 2 2 2 2 2

以上のように、すべて分注が終わったら、アルミキャップをかぶせて滅菌を行なう。

8. 滅菌操作

Koch 蒸気釜にて、Lysine は100°C7分間、Valine Leucine は5分間滅菌し、急冷した。滅菌の際長時間加熱すると、培地中の糖がカラミル化するおそれがある。

9. 定量用菌株の接種及び培養

前述の接種菌液を、煮沸消毒済みの注射器で、無菌箱中で1滴ずつ接種した。但しコントロール用の2本には接種しない。

接種が終わったら、35±1°C の恒温器中で、菌が十分増殖したとみられる時間、即ち Lysine は45時間、Leucine は20時間、Valine は39時間培養した。

10. 測定

以上のようにして培養したものを測定する方法としては、濁度法、酸滴定、重量法等による場合があるが、本定量に際しては濁度法で行ない、コタキ製 AKA 光電比色計を使用した。基礎培地の色は500~700mμの可視部の波長を最もよく透過するので、波長570mμで測定した。

まず接種していない constant の液に100%光を透過させ、試料及び標準溶液の比濁を行なつた結果、第8, 9, 10表のような値を得た。

第8表 標準系列測定結果

試験管番号	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
各アミノ酸濃度 (r)	0	1	2	4	8	12	16	20	40	80	
3本の平均透過率 (%)	Lysine	94.2	89.0	83.6	72.0	58.5	48.0	40.5	35.5	24.5	21.2
	Leucine	92	81	70	59	45	37	32	27	14	4
	Valine	100	89	79	63	42	27	20	14	6	3

第9表 検液系列測定結果

試験管番号	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
試料名	Casein			gelatin			albumin			
分注 (cc) 数	0.25	0.5	1.0	0.25	0.5	1.0	0.25	0.5	1.0	
平均透過率 (%)	Lysine	82.0	69.0	55.5	85.0	72.0	58.0	84.0	71.5	60.0
	Leucine	69.0	61.0	52.0	63.0	55.0	41.0	68.0	59.0	50.0
分注 (cc) 数	0.2	0.4	0.8	0.2	0.4	0.8	0.2	0.4	0.8	
Valine 平均透過率 (%)	76.0	59.0	36.5	71.0	54.7	33.3	71.5	54.0	32.0	

第10表 回収用系列測定結果

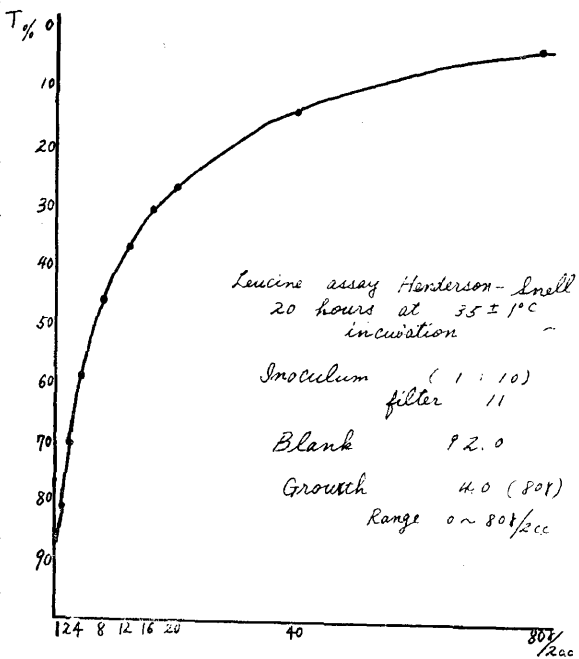
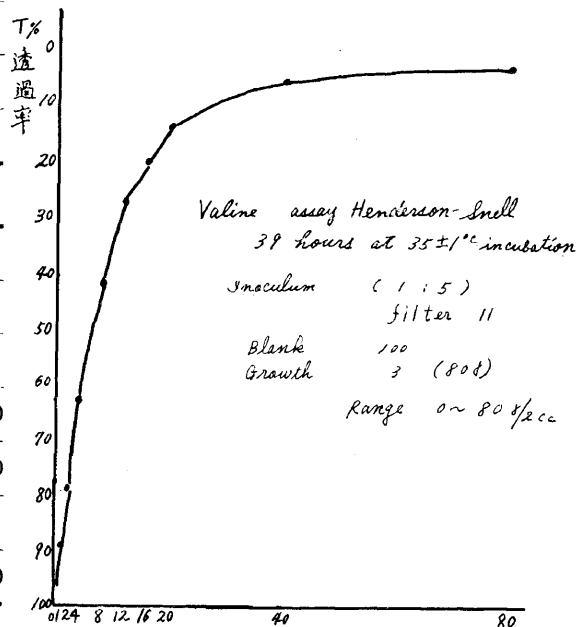
試験管番号	19	20	21	22	23	24	
試料名	casein		gelatin		albumin		
各アミノ酸添加濃度 (r)	4	4	4	4	4	4	
分注 (cc) 数	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	
平均透過率 (%)	Lysine	72.0	56.5	70.0	59.5	66.5	56.5
	Leucine	49.0	45.0	45.0	36.0	50.0	48.0
分注 (cc) 数	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.4	
Valine 平均透過率 (%)	46.3	33.7	47.3	34.7	44.2	34.8	

11. 標準曲線作成及び試料の分析

上述の方法によつて得た透過率の値を縦軸に、標準アミノ酸溶液の r 数を横軸にとつて標準曲線をかき、検体について得た透過率を挿入して、検体中の定量しようとするアミノ酸の含有 r 数を求めると第11表の如くであつた。

第11表 分析 r 数

試料名	casein			gelatin			albumin		
分注 (cc) 数	0.25	0.5	1.0	0.25	0.5	1.0	0.25	0.5	1.0
Lysine	2.2r	4.8r	9.0r	1.7r	4.0r	8.2r	1.9r	4.1r	7.5r
Leucine	2.2	3.6	6.0	3.0	4.8	9.6	2.2	4.0	6.4
分注 (cc) 数	0.2	0.4	0.8	0.2	0.4	0.8	0.2	0.4	0.8
Valine	5.875	5.875	5.75	2.9	2.725	2.512	5.7	5.55	5.2



12. 含有量算出

例として casein 中の Lysine の算出法をあげる。  
Lysine の平均 $\gamma$ 数は 9.13 $\gamma$  となる。これは 100mg の casein を 700倍したものであるから、casein 100mg 中の Lysine の  $\gamma$ 数は 9.13 $\gamma$  × 700 = 6391 $\gamma$  となる。Lysine はモノ塩酸塩として含まれているとして、1.25mg の中に 1000 $\gamma$  含まれている。従つて 6391 $\gamma$  は何 mg かを計算すると、

$$\begin{aligned} 1.25\text{mg} : x\text{mg} &= 1000\gamma : 6391\gamma \\ x\text{mg} &= 7.98875\text{mg} \\ &\approx 7.99\text{mg} \end{aligned}$$

試料として用いた casein 100mg 中には 7.99mg 含まれていた事になり、百分率で表わすと 7.99% となる。同様にして gelatin, albumin 中の各アミノ酸を算出した結果、第12表の如くである。但し計算の際 Leucine と Valine においては、1mg 中に 100 $\gamma$  含有されているものとして計算した。

第12表 試料100mg中の各アミノ酸含有量

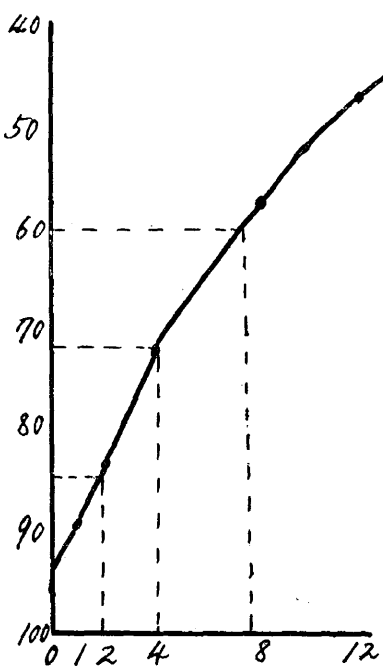
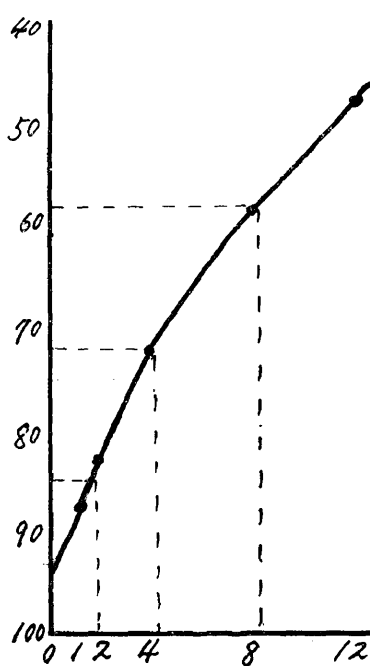
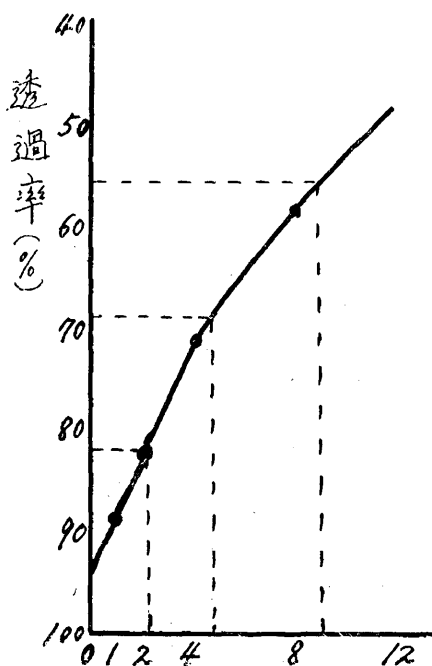
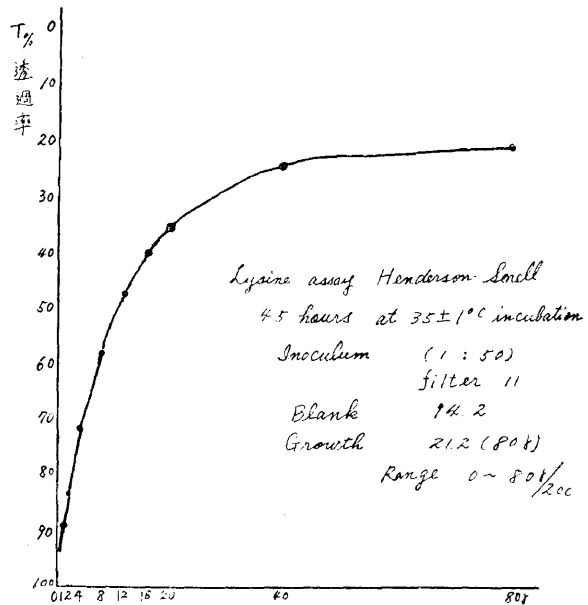
アミノ酸名 試料名	Lysine (mg)	Leucine (mg)	Valine (mg)
casein	7.99	12.0	5.83
gelatin	5.27	5.0	2.71
albumin	5.83	12.0	5.48

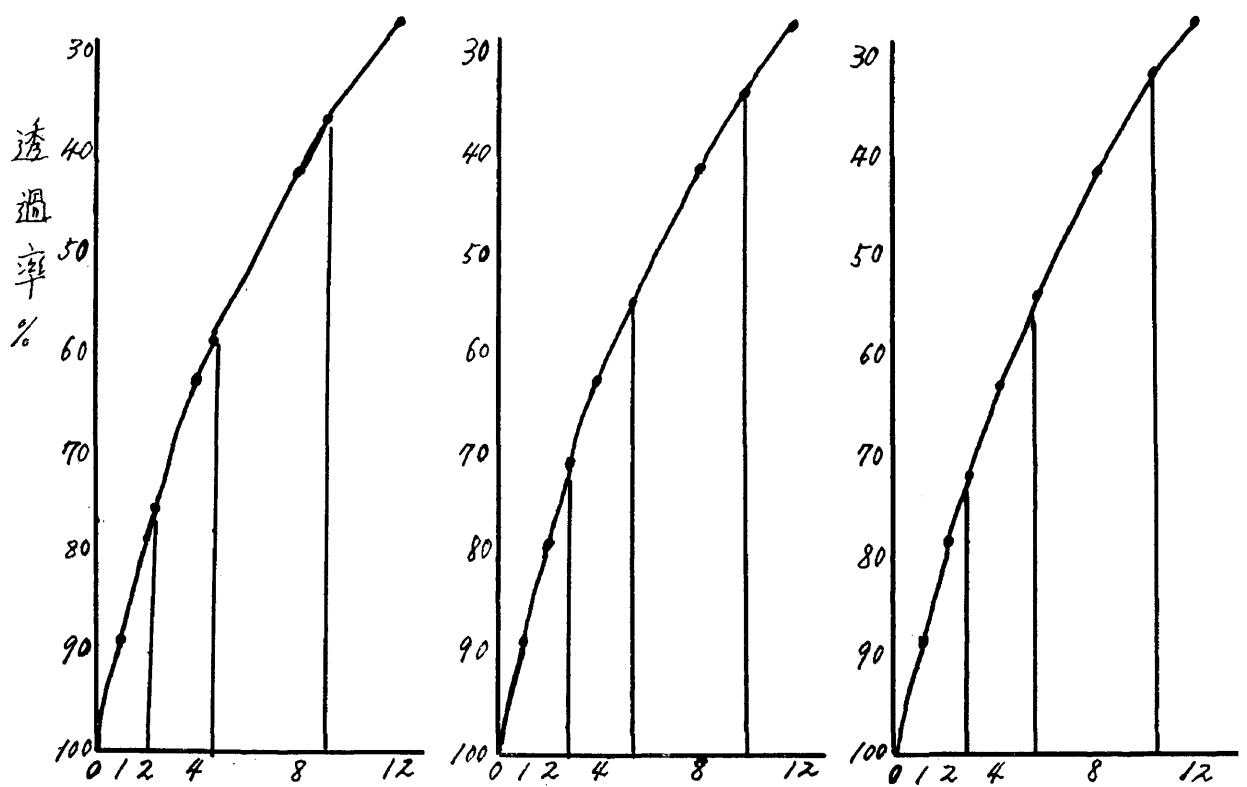
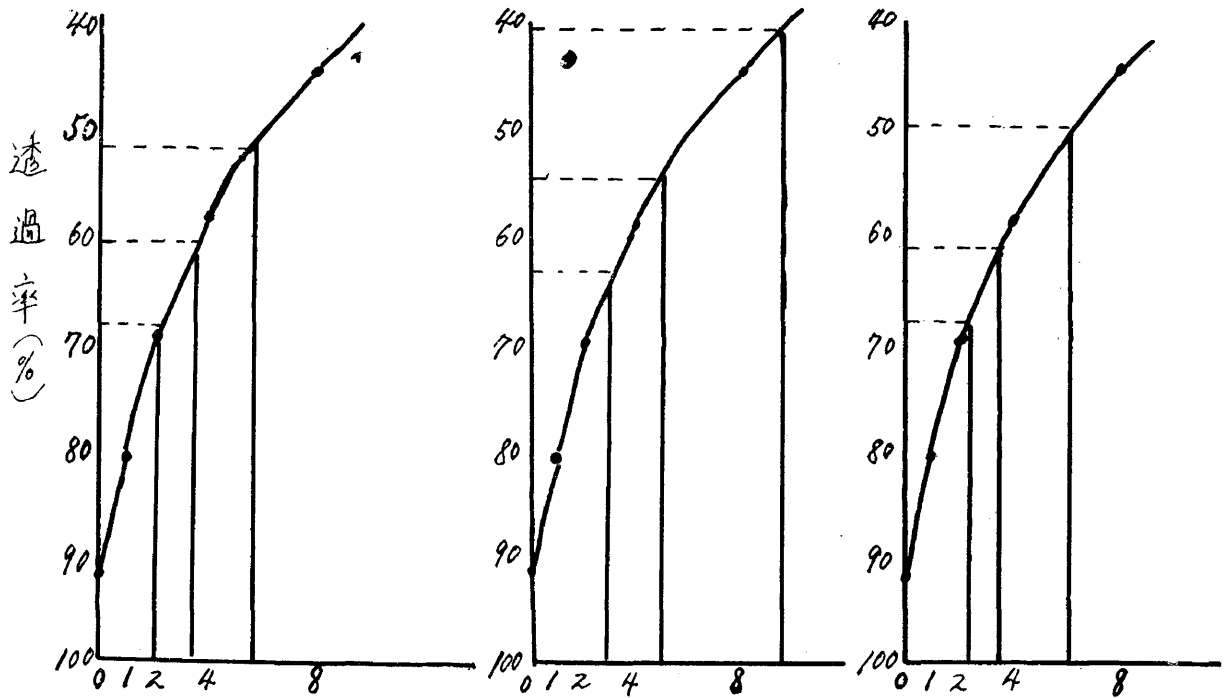
同様にして回収用系列の分析並びに回収率の算出を

行なつた結果、第13表のよになつた。回収率の算出は、理論値を 100% として実測値が何%であるかを計算した。

第13表 平均回収率

アミノ酸名 試料名	Lysine	Leucine	Valine
casein	85.16%	109%	100.7%
gelatin	86.35	101.5	104.8
albumin	99.70	98.0	100.5





考 察

微生物定量法においては、定量条件を一定にする事が困難な為、1つの検量曲線を他日の定量の時に使用する事はできない。従つて定量のたびごとに必ず同一の条件下で標準系列を調製し standard curve を作成した後、挿入しなければならない。条件としては、例えば使用菌株自身の調子の如何（繁殖が盛んである

かどうか等）、恒温器の温度、培地のpH、その他目に見えぬ微妙なる変化に対してである。pHの問題に関しては、培地を酸性に傾ければ、*Lactobacillus arabinosus* 17-5, *Leuconostoc mesenteroides* P-60 共に増殖がはやく、中性やアルカリ性にした場合は遅かつた。しかし増殖がはやいからといって著しく酸性に傾いた時は、測定の結果その値は必ずしも理想的

なものではなく、アミノ酸の低濃度に比べて高濃度の部分の繁殖が伸びていなかった。培地がアルカリ性に傾くと、ビタミン類を破壊するおそれがあるので、結局 pH6.0 前後で行なつたのがよいという結果であつた。又、Valine定量においては、前培養の際に使用菌株を何回も植えついで、培地によく慣らしたものでなければ、良い結果が得られなかつた。

定量範囲としては、20 $\gamma$ 以下とか30 $\gamma$ 以下などとその説はいろいろあるが、本定量に際してはそれぞれ10 $\gamma$ 以下をその範囲とした。

定量結果としては化学的方法による定量値に比して Lysine, Leucine は幾分高く、Valine は幾分低い値を得た。又回収率については、Leucine, Valine は Casein, Gelatin, Albumin に対してそれぞれ(100 $\pm$ 10)%程度のものが得られたが、Lysine にあつては Albumin はよかつたが、Casein と Gelatin の分注濃度の低いもの即ち 0.25cc のものが悪く、0.5cc のものは良かつた。

Bioassay は、慣れれば非常に簡単でしかも精度も高く定量できるが、不慣れの為にいろいろ困難も生じ最後になつていろいろ検討したい事も多かつたが、十分に満足せずして終つた事を残念に思う。

終りに臨んで、今後の Bioassay に関する研究の発展を祈りながら、終始御懇切なる御指導を賜りました平教授を始め、諸先生並びに先輩諸姉に深く感謝致します。

### 参 考 文 献

1. 鈴木友二・村岡三郎著：ビタミン，アミノ酸の微生物定量法
2. 平友恒著：食用微生物
3. 日産研究所編：微生物学的定量法
4. 赤堀四郎・水島三一郎編集：蛋白質化学 I
5. フェリックス・ハウロウイツ著・広田猛夫訳：生物物理化学の領域における蛋白
6. 有山恒・志村憲助共著：蛋白質化学
7. 東京大学農学部農芸化学教室：実験農芸化学上巻
8. 京都大学農学部農芸化学教室編：農芸化学実験書
9. Amino Acid Handbook (Methods and Results of Protein Analysis)
10. Micro Bioassay No. 2, No. 3
11. ビオアッセイ 第1～5 1954～1956年