

愛玉與薜荔隱花果形態與其生化特性比較

林讚標 劉哲政 楊居源 黃瑞祥 李永生 張森永

摘 要

本文旨在探討愛玉與薜荔，二種在分類地位極為相近之植物，其果實之形態與其生化特性之異同。二者隱花果之大小及重量差異明顯，愛玉的果實長寬分別為 8.4×4.6 cm，而薜荔則為 4.6×3.4 cm。愛玉與薜荔果實內每克乾瘦果所含有之果膠量與果膠上所攜帶之甲氧基量大約相同。二者果膠可能絕大部份均呈甲氧基化，因為愛玉與薜荔之甲氧基/果膠比值分別為 13.1% 與 14.0%。分析瘦果外果皮之果膠酯酶活性發現二者均變化很大。一般而言，愛玉瘦果所含之果膠酯酶活性較薜荔要高出甚多，如本試驗所顯示的，每克乾瘦果可以抽取的果膠酯酶活性分別為 95.8 與 4.2 個酵素活性單位。二者果膠酯酶之生化性質亦加以研究比較，以免疫轉印方法獲知愛玉與薜荔之果膠酯酶具有相同之分子量，而且免疫上的反應並無不同，此即顯示二者可能為極相似或相同之蛋白質。有一點極為有趣的發現是愛玉含有二型的果膠酯酶，而薜荔則僅具單一的果膠酯酶。

關鍵字：愛玉，薜荔，隱花果，生化特性，果膠，甲氧基，果膠酯酶，電泳，免疫轉印。

林讚標 劉哲政 楊居源 黃瑞祥 李永生 張森永 1990，愛玉與薜荔隱花果形態與其生化特性比較。林業試驗所研究報告季刊 5(1)：37-43, 1990。

Morphological and Biochemical Comparison of Syconium of *Ficus awkeotsang* and *Ficus pumila*.

Tsan-Piao Lin, Chih-Chen Liu, Chu-Yuan Yang, Rucy-Shyang Huang
Yung-Sheng Lee and Sen-Yeang Chang

[Summary]

Ficus awkeotsang and *Ficus pumila*, both are related in taxonomical deposition, were compared in terms of morphological and biochemical characters. The sizes of syconium of both species are quite different in length and width with a measure of 8.4×4.6 cm and 4.6×3.4 cm, respectively. Therefore, the quantity of the fresh achenes in the syconium of both species differ significantly also. Both species have the same quantity of pectin and methoxy content in each gram of dried achenes. Majority of the galacturonic acid of both species are methoxylated, since the methoxy/pectin ratio of *Ficus awkeotsang* and *Ficus pumila* is 13.1% and 14.0% respectively.

Pectinmethylsterases in the pericarp of achenes are very different in activity in both species. In general, *Ficus awkeotsang* has much higher pectinmethylsterases activity than *Ficus pumila*, for example, they are 95.8 and 4.2 activity units in each gram of dried achene, respectively. Using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis, pectinmethylsterases of *Ficus*

1989年7月送審

1989年8月通過

awkeotsang and *Ficus pumila* showed the same molecular weight and were highly similar in immunoreactivity. This indicates that pectinmethylesterases may be very similar or even the same protein in both species. A new finding is there are two isoforms of pectinmethylesterase in *Ficus awkeotsang* and only one in *Ficus pumila*.

Key words: *Ficus awkeotsang*, *Ficus pumila*, Syconium, Biochemical Characters, Pectin, Methoxy, Pectinmethylesterase, Electrophoresis, Immunoblotting.

Tsan-Piao Lin, Chih-Chen Liu, Chu-Yuan Yang, Ruey-Shyang Huang, Yung-Sheng Lee, Sen-Yeong Chang, 1990. Morphological and Biochemical Comparison of Syconium of *Ficus awkeotsang* and *Ficus pumila*. Taiwan. For. Res. Inst. New Series. 5(1): 37-43, 1990.

一、緒 言

愛玉是本省野生的木質藤本植物，海拔分佈大部在 800-1800m 之間。傳說清朝道光初年嘉義山區一溪流水面上有人發現了愛玉之瘦果形成果凍（連雅堂，1921）而使得愛玉可以食用的傳聞漸次散佈，長久以來愛玉凍發展成爲極具鄉土風味的食品或飲料，如今它在本省的使用歷史也超過 120 年了。但是何以愛玉會結凍的事情卻一直無人知曉，一直到了 1980 年才由前臺大園藝系教授黃永傳與其研究生共同發現了它的謎底，原來由果膠酯酶所引發的生物化學反應是愛玉子結膠的機制（黃永傳等，1980）。這是件非常重要的發現，終於使得此一機制能深入的加以闡明（Lin et al., 1989）。愛玉學名爲牧野氏所定（牧野富太郎，1904），俟後由於發現它與薜荔形態極爲相近，故分類學者將之置於薜荔之下成爲變種者（廖日京，1989）。愛玉就目前所知除了本省外，尚分佈於中國大陸。至於薜荔在世界上則廣爲栽植，它原產中國，又稱木蓮，植物名實圖考（公元 1670）稱“俗以其實中子浸汁爲涼粉，以解暑。”顯見薜荔在中國大陸甚早即已知可利用其種子洗出膠體食用，其使用歷史較愛玉爲早。薜荔爲一種佳的綠籬或爬牆植物而聞名，其果絲細圓而粗硬的葉子與其糾纏不清的枝條爲房舍形成一道美好的綠障。在本省很可能是野生植物曾在恆春半島南仁山區被發現過（劉儒淵，1977）。如果它是野生者當亦屬低山區植物，因爲中高海拔從未發現過此一植物。愛玉與薜荔在營養器官上唯一易識的不同點是愛玉葉子大而尖，而薜荔則是略小而鈍。其葉部維管束方面似乎也略有微小差異（謝萬權，1973），而二者之果實則大小分明頗易辨識。我們不禁要懷疑愛玉是否薜荔的多

倍體植物？實際上薜荔與愛玉之染色體數目俱爲 $2n=26$ (Condit, 1933; Condit, 1964)。而對此二種形態上極爲類似，而經濟上有其重要性的作物；激起我們從生化的角度上來探討二者之異同。也希望這樣的探討方式能提供我們對愛玉與薜荔有深入一層的了解。

二、材料與方法

(一) 材料：愛玉的果實採自奮起湖（東經 120° ，北緯 23° ），海拔約 1400-1600m。瘦果經乾燥後儲於封口塑膠袋內並儲於 5°C 。而薜荔則分別採自數個不同單株，計有來自臺大動物系標本館，臺北植物園，臺北市龍山國小，新竹市，嘉義關仔嶺等共五個單株。將各單株之瘦果進行各項生化分析。

(二) 測定方法

1. 隱花果形態測量：隱花果果長，使用測微尺，單位爲公厘，隱花果鮮重與瘦果重量以精確天平秤之，單位克。

2. 果膠酯酶的萃取與活性測定：瘦果浸於 4% NaCl 液中於 30°C 恆溫下置 24 小時。最初每隔一小時攪盪一次，以防凝膠，振盪三次即可。此混合液以六層紗布過濾，得到含有果膠酯酶（以下簡稱 PME）之粗酵素液，用以測果膠酯酶活性。測定活性所用之基質液爲 10ml 1% 柑橘果膠液（果膠含有 75% 之 galacturonic acid 與 7.25% 之甲氧基），並含有 0.2M NaCl。基質液以循環水浴器保持 37°C ，於活性測驗前，基質液先以 NaOH 調爲 PH7.01，旋即加入粗酵素液，因 PME 作用而釋放之氫離子則以自動滴定儀 (Metrohm Herisan) 測定之，反應之 PH 值維持於 PH7.0，反應進行 10 分鐘。以所消耗之 0.01N NaOH 的體積計算其 PME 的活性。PME 活性之

一單位 (1 unit) 之定義乃是於 37°C 下每一分鐘釋放 1 個 μ mole 氫離子所需 PME 的量。

3. 果膠的抽取: 參考 Yamaoka & Chiba (1983) 之方法並略加修正, 取 0.2 gm 的瘦果置入 30 ml 50 mM HCl (PH 2.0) 煮沸 30 分鐘, 再以 Whatman No. 1 濾紙過濾, 濾液存之。瘦果則重新懸浮於 0.5% EDTA 30 ml, 再煮沸 30 分鐘後過濾, 二次過濾再合而為一 (體積約在 20-30 ml 之間)。取 10 ml 混合液與 40 ml 95% ethanol 相互混合, 以使果膠沈澱出來, 沈澱之果膠再以 95% ethanol 清洗二次以除去顏色, 得之果膠再溶於 10 ml 的蒸餾水, 此一澄清之果膠液即用於 galacturonic acid 與甲氧基 (methoxyl) 含量之決定。為校正煮沸瘦果及酒精沈澱果膠, 導致果膠物質之損耗誤差, 於煮瘦果同時準備下列三種溶液: (1) 柑橘果膠粉溶於 30 ml 蒸餾水, (2) 柑橘果膠粉溶於 30 ml 50 mM HCl, (3) 同(2)但溶液煮 30 分鐘後過濾, 一如前述。果膠的定量: 定量方法採用 Carbazole 試劑法 (McComb & McCready, 1952) 上述自愛玉瘦果及柑橘果膠粉抽取之果膠液, 分別取 1 ml 各與 4 ml 50 mM NaOH 混合並於室溫下靜置 30 min, (自化完全去脂)。與此同時另行準備 3 ml H_2SO_4 置於試管中, 放於水浴槽中冷卻至 3°C, 然後各加入 0.5 ml 各供試的去脂的果膠液及配製的 10-60 μ g 的 galacturonic acid (Sigma Chem Co.), 栓緊瓶蓋並充分混合, 將試管置回冰浴槽令其溫度降至 5°C 下。試管放於沸水中加熱 10 分鐘, 待試管冷卻到 20°C, 再加入 0.25 ml 之 0.15% Carbazole 試劑, 充分混合後靜置室溫下 25 min, 以光電比色計 (Spectrophotometer) 波長 520 nm 判讀各試管的讀數。而由配製的 galacturonic acid 讀數得到的標準曲線, 推算供試樣品中 galacturonic acid 的含量。1 mole 的 galacturonic acid 之重量為 212 gm, 而 1 mole 之 anhydrogalacturonic acid (此即 polygalacturonic acid) 重量為 176 gm, 因此在換算愛玉瘦果樣品中 polygalacturonic acid 求 pectin 量時, 必需先乘上一校正係數為 176/212=0.83。因此愛玉瘦果果膠含量的計算公式如下:

果膠含量 = (galacturonic acid (mg) \times 0.83 \div 校正係數¹) + (μ mole 甲氧基 \times (-OMe 分子量 - OH 分子量) \div 校正係數²)。扣除 OH 的分子量是因 polygalacturonic acid 中已經含有 OH 基, 如不予扣除將導致果膠量的高估。

附註: (1) 此一係數旨在補正果膠在二次煮沸過程中果膠損失之量。

上式計算公式所得之量即是 polygalacturonic acid, 又叫 pectinic acid, 亦即 galacturonic acid 第六個碳上帶有 COOH (羥基)。

4. 甲氧基的測定: 前述愛玉瘦果抽取之純果膠液, 除供測果膠量外, 尚可用於甲氧基量之測定。測定方法係採用自行設計之醇素法, 其方法如下: 分別取 0.25 ml 至 0.50 ml 的純愛玉或藤荔果膠液, 加入於 8 ml 0.2 M NaCl 液中, 先調至 PH 7.0, 再加入柑橘果膠酶 (Sigma Chemical Co.) 加入之果膠酶單位在 2-5 units 之間。因橘子的果膠酶穩定性不高, 最好是新鮮配製。當果膠酶加入後, 自動滴定器 (autotitrator) 即開始滴定中和基質液中果膠釋放之甲氧基, 滴定時間約需 15 分鐘。記錄用去的 0.01 N NaOH 的體積, 以之計算甲氧基的量。

甲氧基量 - 0.01 N NaOH 容積 \times 0.01 N \times (-OCH₃ 分子量) \div 校正係數。其中校正係數為甲氧基在果膠酶過程中所消耗之量之補正。

甲氧基量佔果膠量之比值 = 甲氧基之量 / 果膠含量

5. 抗體生產: PME 的抗體生產方法已如前述 (Lin et al., 1980)。基本上, 愛玉子的果膠酶先經純化, 再之以注射紐西蘭白兔, 並由白兔抽血取得愛玉果膠酶的抗體。

6. 電泳與免染轉印 (immunoblot experiment): SDS 膠體電泳的方法參考 Laemmli (1970)。完成電泳之後, 利用 Hoeffer 的儀器, 1 安培 40 min, 令蛋白質由 SDS 膠體上轉至硝化纖維濾膜上 (nitrocellulose membrane), 其方法詳如 Burnette (1983)。在轉印之後, 濾膜置於 6 M 尿素 + blocking buffer (50 mM Tris, PH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20 和 1% BSA) 中過夜, 以便恢復蛋白質的本性 (renature), 次日濾膜再置於 PME 之抗體溶液中 37°C 培養 1 小時, 培養後洗除多餘的抗體, 免皮上有反應的蛋白帶可藉由與次級抗體連結過氧化酵素 (goat anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate), 和呈色劑 (4-chloro-1-naphthol) 之反應而呈現色帶 (Deblas & Cherwinsky, 1983; Lin et al., 1989)。

三、結果與討論

(一) 眼花果及其瘦果形態特徵之比較: 圖一乃是

(2) 此一係數旨在補正果膠在二次煮沸過程中甲氧基損失之量。

表一、愛玉與薛荔隱花果之各種特徵的比較
Table I. Comparison of several characters of syconium
of *Ficus awkeotsang* and *F. pumila*

樹種	株數	鮮花果鮮重(g)	隱花果長(cm)	隱花果寬(cm)	隱花果長寬比
		fresh wt. of syconium 均值±標準差 mean±SD	length of syconium 均值±標準差 mean±SD	width of syconium 均值±標準差 mean±SD	ratio of length to width 均值±標準差 mean±SD
愛玉 <i>F. awkeotsang</i>	5	77.3±15.7 *	8.4±1.2 *	4.8±0.4 *	1.9±0.3 *
薛荔 <i>F. pumila</i>	5	23.1±0.9	4.6±0.1	3.4±0.1	1.4±0.1

樹種	株數	瘦果鮮重(g)	瘦果乾重(g)	乾瘦果含果膠酶活性
		fresh wt. of achenes 均值±標準差 mean±SD	dry wt. of achenes 均值±標準差 mean±SD	PME activity in dry achenes 均值±標準差(unit/g) mean±SD
愛玉 <i>F. awkeotsang</i>	5	29.9±8.4 *	12.1±3.4 *	95.8±43.9
薛荔 <i>F. pumila</i>	5	9.3±0.5	4.2±0.2	4.2±3.6

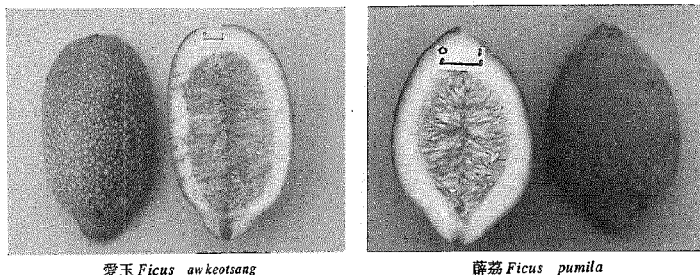
樹種	株數	乾瘦果含果膠量	乾瘦果含甲氧基量	甲氧基/果膠 methoxyl/pectin
		pectin content of dry achenes (mg/g) 均值±標準差 mean±SD	methoxyl content of dry achenes (mg/g) 均值±標準差 mean±SD	
愛玉 <i>F. awkeotsang</i>	5	51.0±0.3	6.7±0.4	13.1
薛荔 <i>F. pumila</i>	5	47.3±1.6	6.6±0.9	14.0

註：*資料引用自胡大維等(1986)愛玉雌株隱花果天然變異之研究

愛玉與薛荔縱斷面之圖譜，這是二者之間除了營養器官，即葉部形態略顯不同之外，生殖器官方面最易辨認的差異。愛玉隱花果表面全部散生白色斑點，長橢圓形或近球形，測量隱花果之果長在6.8-10.7公分間，果寬3.9-5.6公分間，果重55-117公克(胡氏等，1986)。薛荔隱花果僅先端有白色斑點，倒錘形或球形，果長3.8-5.8公分，果寬2.8-4.0公分，果重14-35公克(表一)。由上述愛玉隱花果之大小，重量均大於薛荔，果之長寬比值兩者則較接近，前者為1.2-2.5後者為1.1-1.8。由於愛玉與薛荔果實大小差異甚大，所含瘦果重量差異亦頗大，愛玉與薛荔之每個

果實內瘦果平均重分別是29.9克與9.3克。而其瘦果色澤均為黃色，無甚區別。

□瘦果之果膠與甲氧基含量之比較：果膠為愛玉與薛荔瘦果之最大產物，其量分別為每克瘦果含有果膠51.0mg與47.3mg(表1)，在統計上並無顯著差異，此一果膠量竟佔了整個瘦果重量之5%左右，大部份瘦果重量均由種子而來，種子吸水後可將外果皮(pericarp)與種子分離。而果膠僅儲於此極薄之外果皮上而已。推測種子重量至少是瘦果之90%以上，若此數字屬實，則果膠所佔之量當在外果皮重量之50%以上。愛玉與薛荔每克乾果之甲氧基分別為6.7mg與6.6mg，亦極



愛玉 *Ficus awkeotsang*

薜荔 *Ficus pumila*

圖一、愛玉與薜荔隱花果形態

Figure 1. The syconium of *Ficus awkeotsang* (left) and *Ficus pumila* (right). Scale represents 1 cm.

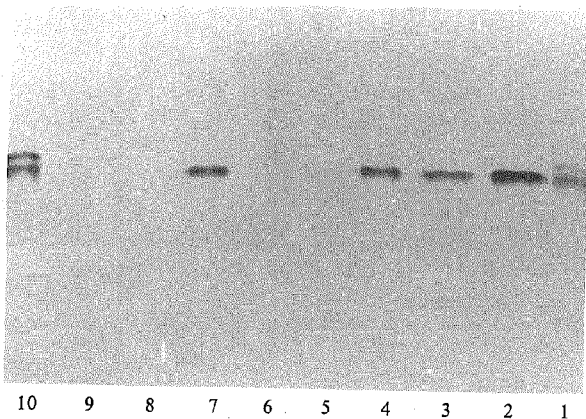
為接近，在統計上亦無顯著差異。所謂甲氧基(-OCH₃)即為單糖(galacturonic acid)第六個碳上所攜帶的基。甲氧基量之多少會影響到果膠之結膠能力，高甲氧基果膠結膠迅速，而低甲氧基果膠結膠緩慢(Fogarty & Ketty 1983)。當計算果膠中之甲氧基時，愛玉與薜荔之甲氧基百分比分別可達 13.1% 與 14.0% (表 1)。如果果膠所有單糖上之第六個碳上 100% 均攜帶甲氧基時，甲氧基量佔果膠之百分比為 16.32%。由此一數字可知愛玉與薜荔之果膠之單糖第六個碳上實則已 85% 或以上均已甲基化了。

甲氧基的測定方法以前多用化學方法，令其釋放 methanol，再將 methanol 氧化為 formaldehyde 再去估計甲醛之量(Wood & Siddiqui, 1971)，或在果膠去脂前後比較吸附銅離子之量之差異(Tibensky et al., 1963)，或是使用鹼鹼滴定法(Schultz, 1965)等。本試驗初期會利用甲醛定量法去測取 methanol 含量，結果發現：該黃色液體極不穩定，可重複性極差，而且使用之溫度與化學藥品均頗不易在一般實驗室內進行。由於不能得到可信賴之甲氧基定量方法而苦思解決之道，因此乃發展出一種新的酵素定量方法，既簡潔而且資料可信度高。歷經嘗試發現生物化學方法甚為理想，因而解決了——大問題。這一種在文獻上未出現過的定量方法具有極高的可重複性，而且操作簡便，我們將專文另外報導。

(三)果膠酶的活性比較：果膠酶為愛玉結膠之主要因素(黃永傳等, 1980)。果膠酶活性大小常隨不同單株而有差異(胡大維等, 1986)

。愛玉之果膠酶活性每克乾瘦果為 34.1-146.0unit，也高於薜荔之 0.3-10.0unit。除與單株有關外，果實採收與處理技術均會影響及酵素活性之高低。薜荔過去一般認為其瘦果揉洗不能結凍，實則其瘦果亦含果膠酶活性，如表一所示每克乾瘦果可達 4.2 單位，與愛玉之活性相差在 20 倍以上，而且其單株間差異亦甚大，許多單株的酵素活性非常低，甚至不能測出其活性。但亦有少數單株，如一株採自臺大植物系標本館之薜荔，其果膠酶的活性可高達 57.8 個單位，與愛玉子之含量比較並不遜色，亦可結出甚好之果凍來。薜荔與愛玉同樣地採收與採收後之處理技術對活性可能大有影響，值以後加以探討。

有了上面的觀察知道了果膠酶亦同時存在於薜荔之果實，但是下面一個問題是愛玉與薜荔之果膠酶是否是相同的蛋白質？是否具有相同的分子量？為了探討這樣一個問題，我們利用了我們已有的愛玉果膠酶抗體(Lin et al., 1989)與免疫轉印等技術來進行試驗。首先是利用 SDS-电泳技術，來分離愛玉與薜荔瘦果之粗蛋白質萃取液，蛋白質被分離之後，再轉印至硝化纖維薄膜上(nitrocellulose membrane)，然後利用抗體抗原的反應來偵測顆粒中果膠酶的存在，其結果顯示於圖二。愛玉之果膠酶抗體亦可以指認薜荔的果膠酶，此表示二種果膠酶可能是完全相同的蛋白質或是二者之間具有甚高的相似性。再從二者於电泳後均出現於膠膜之同一位置，亦即指出二種果膠酶具有相同的分子量。實際上，這已表示二者很可能沒有什麼區別。



圖二，以免疫方法偵測愛玉與薜荔瘦果粗蛋白萃取液中果膠酯酶的存在。瘦果浸漬於4% NaCl中24小時，過濾之後萃取液加入 $(NH_4)_2SO_4$ 至達95%的飽和沉澱出來的蛋白質經離心以後取得。蛋白質溶於水中，各取一定量分別置於膠體上。SDS-膠體電泳方法與後來的免疫轉印方法請參見“材料與方法”。

1與10，愛玉子瘦果之粗萃取物，5 μ g。可見有條帶狀出現，下面一條很可能也是果膠酯酶的同位酵素；2與3，薜荔瘦果之萃取物，分別為10與20 μ g，採自新生南路；4，薜荔採自關仔嶺，20 μ g；5，薜荔採自龍山國小，20 μ g；6與7，薜荔採自植物園，分別為10與20 μ g；8與9，薜荔，採自臺大動物系標本館附近，分別為10與20 μ g。其中2、3與5二單株不具果膠酯酶之活性。

Figure 2. Immunological detection of PME in the crude extract of achenes of jelly-fig (lane 1 and 10, 5 ug each) and several origins of *F. pumila* (2 to 9: 10 ug soluble protein used in 2, 6, and 8; 20 ug used in lane 3, 4, 5, 7, and 9). Samples were subjected to SDS-PAGE and blot-transferred to nitrocellulose as described under "Materials and Methods".

此外也意外地發現了愛玉與薜荔二者之間差異所在。那即是愛玉之粗蛋白萃取液中含有第二個蛋白質能與第一條具有強烈的免疫反應，此很可能即為愛玉果膠酯酶之同功異構酶 (iso-form)。此也即是說愛玉子之瘦果可能含有二種果膠酯酶，而在薜荔則僅含有一種果膠酯酶。這一結果說明愛玉與薜荔的確在細胞內之分化上已有所不同了。

引用文獻

連雅堂 1921 愛玉子 臺灣通史，農業誌，臺灣銀行經濟研究室編印。1962.Vol 4.P.670

- 廖日京 1989 臺灣桑科植物之學名訂正 二格屬 中華林業季刊 22 (1): 177-142
- 胡大維，劉哲政，何政坤 1986 愛玉雌株隱花果天然異之研究 臺灣省林業試驗所林試所研究報告季刊 1(2): 139-153
- 吳其濬 1670 植物名實圖考下冊 卷20 蔓草類 楊家駱主編，1960版，世界書局
- 劉儒淵 1977 恆春半島南仁山區植群生態與植物區系之研究 臺大森林系碩士論文
- 謝萬權 1973 臺灣產榕樹屬植物葉之解剖 森林學報 2:67-73
- Burnette W. W. 1981. Western blotting electrophoretic transfer of proteins from SDS-

- polyacrylamide gels to nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203.
- Condit I. J. 1933. Cytological and morphological studies in the genus *Ficus*. II. Chromosome number and morphology in thirty-one species. *Univ. California Publ. Bot* 17(4):61-74.
- Condit I. J. 1964. Cytological studies in the genus *Ficus*. III. Chromosome number in sixty-two species. *Madrono* 17(5):153-155.
- Deblas A. L. and H. M. Cherwinsky. 1983. Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal Biochem* 133:214-219.
- Fogarty W. M. and C. T. Kelly. 1983. Pectic Enzymes in "Microbial Enzymes and Biotechnology", ed. W. M. Fogarty, Applied Science Publishers.
- Huang Y. C., W. R. Chen and Y. P. Shao. 1980. A study on the mechanism of gelatinization of awkeojelly. *China Hort* 4:117-126.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 227:680-685.
- Lin T. P., C. C. Liu, S. W. Chen and W. Y. Wang. 1989. Purification and characterization of pectinmethyltransferase from *Ficus avkeotsang* Makino achenes. *Plant Physiol.* 91: 1445-1453.
- Makino. 1904. Observation on the flora of Japan. *Bot Mag* 18:151-152.
- Mccomb E. R. and R. M. McCready. 1952. Colorimetric determination of pectic substances. *Anal Chem* 24(10):1630-1932.
- Schultz T. H. 1965. In "Methods in Carbohydrate Chemistry", ed. R. L. Whistler, Vol. V. P189 Academic Press, London and New York.
- Tibensky V. J. and Rosik, V. Zitko. 1963. Zur Bestimmung des Veresterungsgrades von Pektin. *Nahrung* 7:321-325.
- Wood P. J. and I. R. Siddiqui. 1971. Determination of methanol and its methyl esterase activity. *Anal Biochem* 39:418-428.
- Yamaok T. and N. Chiba. 1983. Changed in the coagulating ability of pectin during the growth of soybean hypocotyls. *Plant Cell Physiol* 24(7):1281-1290.