クロロフィルおよびクロロフィル誘導体による L-アスコルビン酸の光増感分解に関する研究

Photosensitizing Decomposition of L-Ascorbic Acid by Chlorophylls and Chlorophyll Derivatives

(昭和 45 年 4 月 7 日 受理)

守 康 則* 上田 マ リ 子*
(Yasunori Mori) (Mariko Ueda)

三 宅 璋 子* 三 輪 和 子*
(Akiko Miyake) (Kazuko Miwa)

The effects of chlorophyll a, pheophytin and chlorophyll metal derivatives on the photochemical decomposition of L-ascorbic acid(AAH₂) and also the photochemical decomposition of chlorophyll-AAH₂ system with co-existence of potassium ferri-cyanide, *p*-quinone and β -carotene as fluorescence quenching agents was studied.

1. The photochemical decomposition of AAH₂ was greatly accelerated by the existence of chlorophyll a and pheophytin, and the photodecomposition rate was also promoted with Cu-chlorophyllin-Na and Fe-chlorophyllin-Na, especially, by the former. Cu-chlorophyllin-Na itself oxidized AAH₂.

2. The photodecomposition of chlorophyll-AAH₂ system was protected with the co-existence of K₃Fe(CN)₆, *p*-quinone and β -carotene. However, the effect of *p*-quinone seems to be accelerated the photodecomposition of chlorophyll-AAH₂ system in higher concentration.

3. Chlorophyll and pheophytin have comparatively strong fluorescence intensity, whereas Cu-chlorophyllin-Na and Fe-chlorophyllin-Na have weak fluorescence intensity. The mutuality relationship was found between the fluorescence intensity of the reaction system and the photochemical decomposition of AAH₂.

緒 言

著者は先に L-アスコルビン酸の光分解について、とくにリボフラビンおよびエオシン、フルオレセインなどのエオシン系の光増感色素の共存下に L-アスコルビン酸の光分解がいちじるしく促進されることを報告した¹⁾。

光化学色素であるクロロフィルも光を吸収して励起されケイ光を発し、リボフラビン、エオシン系色素と同様に L-アスコルビン酸の光分解促進作用をもつことが推考される。クロロフィルによる L-アスコルビン酸の光増感分解反応の解明は、有色そ菜における貯蔵加工時の L-アスコルビン酸の光化学的分解機構を明らかにする上からも意義あるものと考ええる。なお、クロロフィルによる L-アスコルビン酸の光増感分解反応においては、とくに反応系のケイ光強度と L-アスコルビン酸の光増感分解との関係を重要視し、検討を加えた。すなわち有色そ菜にクロロフィルと共存し、比較的豊富な分布をみ

るカロチノイド、キノン類のクロロフィルケイ光消光剤としての機能に注目し²⁾³⁾、クロロフィルによる L-アスコルビン酸の光増感分解反応における β -カロチン、*o*-キノンの代りとして *p*-キノンをえらび、これらの影響をも併せ検討した。

実験材料および実験方法

1. カラムクロマトグラフィーによるクロロフィル a の調製：前報⁴⁾と同様にして調製した。

2. フェオフィチンの調製と定量：前報⁴⁾と同様に Pennington ら⁵⁾の方法に準拠して調製し、A. O. A. C.⁶⁾の式に従って定量した。

3. L-アスコルビン酸の定量：2,4-ジニトロフェニルヒドラジン溶液を用いる Roe 法⁷⁾の変法に準拠して定量を行なった。L-アスコルビン酸の光分解度は 530 m μ における L-アスコルビン酸の吸光度(オサゾン)より算出した。

4. 照射方法：L-アスコルビン酸とクロロフィル a の Meorl 混液 10 ml を内径(1.5×16.5 cm)の硬質無色試

* 広島大学教育学部

験管に入れ、小型定温水槽に保持し、光源として東芝製 100 V, 200 W のタングステンフィラメントランプを用い 30°C にて試験管表面までの距離約 10 cm にて直上より照射処理を行なった。なお対照として試験管をアルミニウム箔にて包み、定温水槽に保持し、これを暗所処理（無照射）のものとした。

実験結果および考察

1. L-アスコルビン酸の光分解に対するクロロフィルの影響

π 電子系をもつ色素は一般に光を吸収し、吸収された光エネルギーの一部はケイ光またはリン光として再び放出される。クロロフィルはケイ光を有し、光増感色素として注目され、とくにクロロフィルの光の吸収は不飽和結合をもつポルフィリン構造が関係をもつとされている。これらの見地よりクロロフィル a 5 ml を 20mg%-AAH₂ MeOH 溶液 (pH 5.0) 5 ml に加え、クロロフィル a の反応液中の濃度 2.5 mg%, 5 mg% にて光照射処理を行ない、AAH₂ の光分解に対するクロロフィルの影響をしらべた。結果は第 1 図に示されるごとく AAH₂ の光分解はクロロフィルによっていちじるしく促進される。これはクロロフィルが光照射により光エネルギーを吸収して励起され、この励起クロロフィル分子の光増感反応により AAH₂ の光分解が促進されるものとする。

Fig. 1. Effect of chlorophyll a upon the photochemical decomposition of L-ascorbic acid

- 1: AAH₂ 10 mg/100m/ MeOH, pH 5.0
- 2: AAH₂ 10 mg/100m/ MeOH, chl. a 2.5 mg/ 100m/ MeOH
- 3: AAH₂ 10 mg/100 m/ MeOH, chl. a 5.0 mg/ 100m/ MeOH

2. L-アスコルビン酸の光分解に対するクロロフィル誘導体の影響

- (1) フェオフィチンの効果：クロロフィルの Mg の水

Fig. 2-1. Effect of pheophytin a upon the photochemical decomposition of L-ascorbic acid

- 1: AAH₂ 10 mg/100 ml MeOH, pH 5.0
- 2: AAH₂ 10 mg/100 ml MeOH, pheophytin 2.5 mg/100 ml MeOH
- 3: AAH₂ 10 mg/100 ml MeOH, pheophytin 5.0 mg/100 ml MeOH

素置換体であるフェオフィチンもポルフィリン構造をもち、ケイ光を有し、クロロフィルと同じく光増感色素として AAH₂ を光増感分解せしめることが考えられるのでフェオフィチン共存下における AAH₂ の光分解性を検討した。結果は第 2-1 図に示されるごとくフェオフィチンは AAH₂ の光分解をいちじるしく促進する。

(2) 銅クロロフィルリンナトリウムおよび鉄クロロフィルリンナトリウムの効果：クロロフィルの金属誘導体である銅クロロフィルリンナトリウムおよび鉄クロロフィルリンナトリウムはいずれも法定天然食用着色料として広く使用されており、これらもケイ光を有しクロロフィルと同じく AAH₂ を光増感分解せしめることが考えられるので、銅クロロフィルリンナトリウム（片山化学製品特級）および鉄クロロフィルリンナトリウム（片山化学製品特級）共存下における AAH₂ の光分解性を検討した。結果は第 2-2 図に示されるごとく銅クロロフィルリンナトリウム、鉄クロロフィルリンナトリウムにより AAH₂ の光分解は促進される。なおクロロフィル金属塩はいずれも水溶液を用い、AAH₂ MeOH 溶液について光照射処理を行なった。さらに金属誘導体の金属イオンによる AAH₂ の分解が考えられるので対照として暗所処理のものを併せ行なった。暗所における鉄クロロフィルリンナトリウムの AAH₂ の分解に対する影響は比較的少ないが、銅クロロフィルリンナトリウムによる AAH₂ の酸化分解はいちじるしい。

3. クロロフィル-アスコルビン酸系の光分解に対す

Fig. 2-2. Effect of Fe-chlorophyllin-Na and Cu-chlorophyllin-Na upon the photochemical decomposition of L-ascorbic acid

AAH₂: 10 mg/100 ml MeOH, pH 5.0

- 1: Control (without Fe-chlorophyllin-Na, Cu-chlorophyllin-Na) under light
- 2: Fe-chlorophyllin-Na, Cu-chlorophyllin-Na 2.5 mg/100 ml added under light
- 3: Fe-chlorophyllin-Na, Cu-chlorophyllin-Na 5.0 mg/100 ml added under light
- 4: Fe-chlorophyllin-Na, Cu-chlorophyllin-Na 2.5 mg/100 ml added in dark
- 5: Fe-chlorophyllin-Na, Cu-chlorophyllin-Na 5.0 mg/100 ml added in dark

るフェリシアン化カリウム、*p*-キノンおよび β -カロチンの影響

緑葉にはクロロフィルに伴ってカロチノイドが豊富に分布し、カロチノイドは光により励起され、その励起エネルギーのクロロフィルへの移動性が指摘されており⁸⁾、また β -カロチンはクロロフィルの三重項状態(triplet state)のケイ光消光剤(電子受容体)としての機能をもつことが報告されている⁹⁾。また植物体にはクロロゲン酸、カテキン類、ロイコアントシアン類、タンニンなど多くのポリフェノール化合物が分布し、これらは酸化酵素により *o*-キノンを生じ、これが酸化重合して褐変物質を生ずることが知られており、とくに *o*-キノンは反応性に富み、当然クロロフィルケイ光消光剤としての機能をもつことも推考される²⁾。Murataら¹¹⁾ はホウレン草の光合成における光化学反応の実験においてフェリシアン化カリウムが葉緑体のクロロフィルのケイ光消光剤として働くことを報告している。これらの植物体における生化学的反応の見地より、とくにカロチノイド、キノン、フェリシアン化カリウムのクロロフィルケイ光消光剤としての機能を重要視して β -カロチン、*o*-キノン

の代りとして*p*-キノン、さらにフェリシアン化カリウムをえらび、クロロフィル-AAH₂系の光分解に対するそれぞれの挙動を検討した。

フェリシアン化カリウムの効果についてみると第 3-1 図に示されるごとくフェリシアン化カリウムによるクロロフィル-AAH₂系の光分解反応に対する抑制力がみとめられるが、これはフェリシアン化カリウムの添加にともなうクロロフィルのケイ光強度の消光(第 4-4 図参照)と守らが前報⁴⁾に報告したごとくフェリシアン化カリウムの鉄イオンによるクロロフィルの分解退色に原因するものと推考する。なお 10^{-4} M の高濃度においてはフェリシアン化カリウム自体による AAH₂の接触酸化の増大がみられる。

Fig. 3-1. Effect of potassium ferricyanate upon the photochemical decomposition of chlorophyll-L-ascorbic acid system

AAH₂: 10 mg/100 ml MeOH, pH 5.0
chl. a: 5 mg/100 ml MeOH

- 1: AAH₂ MeOH, under light
- 2: control (AAH₂ MeOH, chl. a MeOH without K₃Fe(CN)₆) under light
- 3: 10^{-5} M K₃Fe(CN)₆ added, under light
- 4: 10^{-4} M K₃Fe(CN)₆ added, under light
- 5: 10^{-5} M K₃Fe(CN)₆ added, in dark
- 6: 10^{-4} M K₃Fe(CN)₆ added, in dark

p-キノンの効果については第 3-2 図に示されるごとく 10^{-4} M 濃度においてはクロロフィル-AAH₂系の光分解反応を促進する。これは Patterson¹²⁾は*p*-キノンによってAAH₂は DHA に酸化され、自らはヒドロキノンに移行することを報告しており、またフェノール化合物とくに*o*-ジフェノールが酸化酵素により反応性に富んだ*o*-キノンを生じ、このキノンが AAH₂を酸化し、自らは*o*-ジフェノールに還元されることは既に知られており¹³⁾、これらの点より *p*-キノンは *o*-キノンより反応性は劣るが

0-キノンと同様にクロロフィルのケイ光を消光せしめるにかかわらず(第4-5図参照), 10^{-4} Mの高濃度においてはそれ自体のケイ光と併せAAH₂の接触酸化を増大する性質がクロロフィル-AAH₂系の光分解促進の原因をなすものと考えられる。 10^{-5} M濃度においてはクロロフィル-AAH₂系の光酸化を抑制する。

Fig. 3-2. Effect of *p*-quinone upon the photochemical decomposition of chlorophyll-L-ascorbic acid system

AAH₂: 10 mg/100 ml MeOH, pH 5.0
chl. a: 5 mg/100 ml MeOH

- 1: AAH₂ MeOH, under light
- 2: control(AAH₂ MeOH, chl. a MeOH without *p*-quinone) under light
- 3: 10^{-6} M *p*-quinone added, under light
- 4: 10^{-4} M *p*-quinone added, under light
- 5: 10^{-5} M *p*-quinone added, in dark
- 6: 10^{-5} M *p*-quinone added, in dark

β -カロチンの効果については第 3-3図に示されるごとくクロロフィル-AAH₂系の光分解反応の抑制がみられ、 10^{-5} Mにおいてその抑制能が大きい。これは β -カロチンによるクロロフィルのケイ光強度にいちじるしい変化がみとめられず、また β -カロチン自体もケイ光を有するが(第4-6図参照), β -カロチンの光エネルギー吸収にもとづく光増感作用よりも β -カロチン自体によるAAH₂酸化抑制作用の大なることが原因と考えられる。なお β -カロチンの AAH₂酸化抑制能についてはさらに検討を加えたい。 β -カロチン(メルク製)は 10^{-5} M以上の濃度ではメタノール溶液中でも溶解しがたく析出をみるために本実験においては 10^{-6} ~ 10^{-5} Mの濃度域にて β -カロチンの効果をしらべた。

4. 反応系のケイ光スペクトル

クロロフィルは紫外光や可視光を吸収して励起され、吸収された光エネルギーの一部はケイ光またはリン光として放出される。ケイ光は光化学反応で光化学反応においてどの位のエネルギーが与えられるかはケイ光強度を

Fig. 3-3. Effect of β -carotene upon the photochemical decomposition of chlorophyll-L-ascorbic acid system

AAH₂: 10 mg/100 ml MeOH, pH 5.0
chl. a: 5 mg/100 ml MeOH

- 1: AAH₂ MeOH, under light
- 2: control (AAH₂ MeOH, chl. a MeOH without β -carotene) under light
- 3: 10^{-6} M β -carotene added, under light
- 4: 10^{-5} M β -carotene added, under light
- 5: 10^{-6} M β -carotene added, in dark
- 6: 10^{-5} M β -carotene added, in dark

測定すれば一応のめやすとなるので、クロロフィルによる AAH₂の光増感反応追跡の手段として反応系のケイ光強度を測定し、反応系のケイ光強度とAAH₂の光分解度との関係を検討した。

(1) クロロフィルaのケイ光スペクトル: クロロフィルa MeOH溶液とクロロフィルa-AAH₂系の両者について、島津製ケイ光自記分光光度計 GSF-16型を用い、励起波長 550 m μ にてケイ光スペクトルを求めた。結果は第4-1図に示されるごとくケイ光波長 685 m μ (主ケイ光帯)と 550 m μ (副ケイ光帯)に λ maxがみとめられる。クロロフィル-AAH₂系においては AAH₂によるクロロフィルのケイ光強度の変化は全くみとめられない。クロロフィルの濃度の相違によるケイ光強度は 5.0 mg%クロロフィル a MeOH溶液を 2.5 mg%に希釈することにより主ケイ光(685 m μ)の強度は約3/4に減少する。

(2) フェオフィチンのケイ光スペクトル: フェオフィチンMeOH溶液およびフェオフィチン-AAH₂ MeOH溶液について励起波長 550 m μ にてそれぞれのケイ光スペクトルを求めた。結果は第4-2図に示されるごとくケイ光波長 685 m μ と 565 m μ さらに 645 m μ に λ maxがみとめられ、フェオフィチン-AAH₂系についても AAH₂によるフェオフィチンのケイ光強度の変化はクロロフィ

Fig. 4-1. Fluorescence spectra of chlorophyll and chlorophyll with L-ascorbic acid

Excitation wave length: 550 μ

- 1: chl. a 5 mg/100 ml MeOH
- 2: chl. a 5 mg/100 ml MeOH, AAH₂ 10 mg/100 ml MeOH
- 3: chl. a 2.5 mg/100 ml MeOH

Fig. 4-2. Fluorescence spectra of pheophytin a and pheophytin with L-ascorbic acid

Excitation wave length: 550 μ

- 1: chl. a 5 mg/100 ml MeOH
- 2: pheophytin a 5 mg/100 ml MeOH
- 3: pheophytin a 5 mg/100 ml MeOH, AAH₂ 10 mg/100 ml MeOH

ルのときと同様全くみとめられない。なお 5 mg% 濃度についてクロロフィルとフェオフィチンのケイ光強度を主ケイ光帯 685 μ について比較すると後者は前者の約 4/5 のケイ光強度を示す。

(3) 鉄クロロフィリンナトリウムおよび銅クロロフィリンナトリウムのケイ光スペクトル: 鉄クロロフィリンナトリウム水溶液および銅クロロフィリンナトリウム水溶液について励起波長 550 μ にてケイ光スペクトルを求めた。結果は第 4-3 図に示されるごとく両者ともにケイ光波長 550 μ (主ケイ光帯) に $\lambda_{\max}$ がみとめられ、とくにクロロフィルおよびフェオフィチンにみとめられた 685 μ の $\lambda_{\max}$ はほとんど消失することが注目される。また 550 μ におけるケイ光強度は銅クロロフィリンナトリウムはクロロフィル、鉄クロロフィリンナトリウムに比較していちじるしく小さい。なお両者の水溶液と MeOH 溶液について 550 μ におけるケイ光強度を比較したが、溶媒 (水と MeOH) によるケイ光強度の相違はみとめられない。

Fig. 4-3. Fluorescence spectra of Fe-chlorophyllin-Na and Cu-chlorophyllin-Na

Excitation wave length: 550 μ

- 1: chl. a 5 mg/100 ml MeOH
- 2: Fe-chlorophyllin-Na 5 mg/100 ml as aqueous solution
- 3: Cu-chlorophyllin-Na 5 mg/100 ml as aqueous solution

(4) フェリシアン化カリウム、 p -キノンおよび β -カロチン共存下のクロロフィルのケイ光スペクトル: クロロフィル a MeOH 溶液に反応液中の濃度 $10^{-5} \sim 10^{-4} M$ にフェリシアン化カリウム、 p -キノンおよび β -カロチンをそれぞれ添加し、励起波長 550 μ にてケイ光スペクトルを求めた。結果は第 4-4 図、第 4-5 図、第 4-6 図に

Fig. 4-4. Fluorescence spectra of chlorophyll a with potassium ferricyanide

Emission wave length (mμ)
Excitation wave length: 550 mμ
1: chl. a 5 mg/100 ml MeOH
2: chl. a 5 mg/100 ml MeOH, 10^{-4} M $K_3Fe(CN)_6$

Fig. 4-5. Fluorescence spectra of chlorophyll a with *p*-quinone

Excitation wave length: 550 mμ
1: chl. a 5 mg/100 ml MeOH
2: chl. a 5 mg/100 ml MeOH, 10^{-4} M *p*-quinone
3: 10^{-4} M *p*-quinone MeOH

示されるごとくクロロフィル a のケイ光波長 685 mμ および 550 mμ におけるケイ光強度はフェリシアン化カリウムおよび *p*-キノンにより若干のケイ光消光がみとめられるが、 β -カロチン(10^{-5} M)によるケイ光消光は 685 mμ においては全くみとめられない。なお β -カロチンの

Fig. 4-6. Fluorescence spectra of chlorophyll a with β -carotene

Excitation wave length: 550 mμ
1: chl. a 5 mg/100 ml MeOH
2: chl. a 5 mg/100 ml MeOH, 10^{-5} M β -carotene
3: 10^{-5} M β -carotene MeOH

場合にはケイ光波長 570 mμ と 670 mμ に β -カロチン自体によるケイ光帯がみとめられ、*p*-キノンの場合は 685 mμ に *p*-キノン自体のわずかなケイ光帯がみとめられる。

5. 反応系のケイ光強度と L-アスコルビン酸光分解との関係

ケイ光は光化学反応でクロロフィルおよびクロロフィル誘導体による AAH_2 の光増感分解反応は、反応系のそれぞれのケイ光強度の測定により一応のめやすがえられるものと考え、上記の第4-1～第4-6図の吸収スペクトルに示されるそれぞれの主ケイ光帯 685 mμ におけるケイ光強度と第1図～第3図に示されるそれぞれの照射処理1時間後の AAH_2 光分解度との関係を求めた。なお励起波長 550 mμ、ケイ光波長(主ケイ光帯) 685 mμ におけるクロロフィルのケイ光強度を 100 とし、それぞれの反応系のケイ光強度はクロロフィルのケイ光強度との相対比較値をもって示した。反応系の AAH_2 の光分解度もクロロフィル- AAH_2 系の AAH_2 の光分解度を 100 とし、それぞれの反応系の AAH_2 の光分解率はクロロフィル- AAH_2 系との相対比較値をもって示した。なお第5図に示される AAH_2 の光分解率は、暗所処理(反応時間1時間)における AAH_2 の自動酸化、鉄クロロフィリンナトリウム、銅クロロフィリンナトリウム、フェリシアン化カリウム、*p*-キノン自体による AAH_2 の酸化分解値を差引いたそれぞれの AAH_2 光増感分解率を示す。結果は第5図に示されるごとく、550 mμ の副ケイ光帯、さらに β -カロチン自体にもとづくケイ光を考慮していな

いため反応系におけるケイ光強度と AAH_2 光分解率との間には十分な相関関係を見出しえないが、クロロフィルの主ケイ光帯 $685 \text{ m}\mu$ におけるケイ光強度をもとにして考えるとフェオフィチンのケイ光強度はクロロフィルのそれに比較して小さく、フェオフィチン- AAH_2 系における AAH_2 の光分解率もクロロフィル- AAH_2 系に比較して小さい。鉄クロロフィリンナトリウム、銅クロロフィリンナトリウムは $550 \text{ m}\mu$ にケイ光帯をもつが $685 \text{ m}\mu$ におけるケイ光はいちじるしく小さく、これらの反応系における AAH_2 の光分解率をもっとも低い。クロロフィル- AAH_2 系にフェリシアン化カリウム、 p -キノンおよび β -カロチンを添加すると、ケイ光強度の消光と AAH_2 の光分解率の低下がみとめられる。なお p -キノン自体によるクロロフィルの酸化分解は、本実験条件下 (10^{-4} M , 反応 1 時間) においてはほとんどみとめられない。

Fig. 5. Relationship between the fluorescence intensity of reaction system and the photochemical decomposition of L-ascorbic acid

AAH_2 : 10 mg/100 ml MeOH

- 1: chl. a 5 mg/100 ml MeOH added
- 2: pheophytin a 5 mg/100 ml MeOH added
- 3: Fe-chlorophyllin-Na 5 mg/100 ml as aqueous soln added
- 4: Cu-chlorophyllin-Na 5 mg/100 ml as aqueous soln added
- 5: chl. a 5 mg/100 ml MeOH, $10^{-4} \text{ M K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ added
- 6: chl. a 5 mg/100 ml MeOH, $10^{-4} \text{ M } p$ -quinone added
- 7: chl. a 5 mg/100 ml MeOH, $10^{-5} \text{ M } \beta$ -carotene added

要 約

クロロフィル a, フェオフィチンおよびクロロフィル金属誘導体による L-アスコルビン酸の光増感分解さらにケイ光消光剤としてのフェリシアン化カリウム、 p -キノンおよび β -カロチン共存下におけるクロロフィル-アスコルビン酸系の光分解反応をしらべ次の結果を得た。

1. クロロフィル a およびフェオフィチンは L-アスコルビン酸の光分解をいちじるしく促進する。
2. 銅クロロフィリンナトリウムおよび鉄クロロフィリンナトリウムは L-アスコルビン酸の光分解を促進し、とくに前者による L-アスコルビン酸の光分解がいちじるしい。また銅クロロフィリンナトリウムは L-アスコルビン酸をいちじるしく接触酸化する。
3. クロロフィル-アスコルビン酸系の光分解反応に対し、フェリシアン化カリウム、 p -キノン、および β -カロチンは抑制作用を示す。
4. クロロフィル a, フェオフィチンのメタノール溶液は比較的強いケイ光強度を示し、銅クロロフィリンナトリウムおよび鉄クロロフィリンナトリウム水溶液のケイ光強度は比較的小さい。さらにクロロフィル a のケイ光強度はフェリシアン化カリウム、および p -キノンにより消光をうける。
5. 反応系のケイ光強度と L-アスコルビン酸光分解との間には相関関係をもつ。

文 献

- 1) 守 康則, 西山幹子, 諸富節子: 栄養と食糧, **22**, 12 (1969)
- 2) Fujimori, E. & Livingston, R.: *Nature*, **180**, 1036 (1957)
- 3) Claes, H.: *Z. Naturforsch.*, **166**, 445 (1961)
- 4) 守 康則, 池田由美子, 松本苗美, 細田尚子: 栄養と食糧, **22**, 115 (1969)
- 5) Pennington, F. C., Strain, H. H., Sree, W. A. & Katz, J. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1418 (1964)
- 6) A. O. A. C.: Official Method of Analysis, 9th ed (1960)
- 7) Roe, J. H. & Oesterling, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **152**, 511 (1954)
- 8) Dutton, H. J., Manning, W. M. & Duggan, B. M.: *J. Phys. Chem.*, **47**, 308 (1943)
- 9) Wassink, E. C. & Kersten, J. A. H.: *Enzymologia*, **10**, 285 (1946)
- 10) 村田紀夫: 蛋白質・核酸・酵素, **13**, 62 (1968)
- 11) Murata, N. & Takamiya, A.: *Plant & Cell. Physiol.*, **8**, 683 (1967)
- 12) Patterson, J. W.: *J. Biol. Chem.*, **183**, 81 (1950)
- 13) Ingraham, L. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5095 (1956)