Euglena gracilis Z におけるプロビタミン A の 高速液体クロマトグラフによる 定量および培養条件による変動

細 谷 圭 助*, 北 岡 正三郎**

* 和歌山大学教育学部家政教室

** 大阪府立大学農学部農芸化学科

Determination of Provitamin A in *Euglena gracilis* Z by High Performance Liquid Chromatography and Changes of the Contents under Various Culture Conditions

Keisuke HOSOTANI* and Shozaburo KITAOKA**

* Department of Home Economics, Faculty of Education, Wakayama
University, Wakayama, 640

** Department of Agricultural Chemistry, University of Osaka
Prefecture, Sakai, 591

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.) 37, 519~524 (1984)

A method for determining provitamin A in *Euglena gracilis* Z was proposed by using high performance liquid chromatography (HPLC) and the culture conditions of *E. gracilis* for high yield of provitamin A were studied.

1) Direct saponification of *Euglena* cells with 3.2 M KOH in methanol at 60°C for 20 min gave a satisfactory recovery of provitamin A.

2) Saponified extract of *Euglena* cells was loaded onto a column packed with silicagel and eluted with different solvents. From the absorption maximum and retention time in HPLC the *Euglena* provitamin A was found to be consisted of β -carotene, echinenone and euglenanone.

3) The content of β -carotene in the wild strain of *E. gracilis* grown with illumination was 577.8 $\mu\text{g}/10^9$ cells. The wild strain grown in the dark and the bleached strain (a mutant derived from the wild strain) grown with or without illumination did not give higher contents.

4) Among several carbon sources examined, glucose or malic acid gave high yield of β -carotene in culturing *E. gracilis*. The highest content of β -carotene was obtained by culturing *Euglena* in the Koren-Hutner medium containing glucose and malic acid as the major carbon sources.

(Received January 17, 1984)

ユーグレナは葉緑体をもつ原生動物であるが、そのタンパク質の栄養価は非常に高く、新しいタンパク質給源としての可能性を有することをすでに報告¹⁾²⁾している。これはユーグレナタンパク質のアミノ酸組成が良好であり、さらにその細胞膜がタンパク質を主成分とするペリクルでおおわれている³⁾ために消化性も良好となっていることを明らかにした。この細胞膜の消化性が高い性質は、ユーグレナ細胞の利用性を著しく高める有利な特徴であると考えられる。近年このユーグレナ細胞がビタミ

ンCやビタミンEを豊富に含むことが報告されてきている⁴⁾⁵⁾。著者らはユーグレナに β -カロチンが含まれていることに着目し、本報においてはプロビタミンAとしてのカロチノイドの種類とその含有量、さらにはプロビタミンAを多く得るための培養条件の検討を行なった。

ユーグレナのカロチノイドについては、Krinsky と Goldsmith⁶⁾, Batra と Tollin⁷⁾ および横田ら⁸⁾が報告しているが、これらは全カロチノイドの組成を調べた定量を試みたものであり、プロビタミンAという観点からは検討されていない。さらにこれらの報告では、定量方法も薄層クロマトグラフ (TLC) による方法である。

* 〒640 和歌山市吹上 1-4-1

** 〒591 堺市百舌鳥梅町 4-804

われわれは栄養学的観点からプロビタミンAに焦点をあて、これを迅速であり操作中の損失が少なく、かつ高精度な分析が可能な高速液体クロマトグラフ (HPLC) により定量を行なった。

実験材料および実験方法

1. 生物と培養条件

実験に用いたユーグレナは、*Euglena gracilis* Z の野生株 (以後 Green 株と略称する)、およびストレプトマイシン処理により葉緑体を欠損させた変異株⁹⁾ (以後 Bleached 株と略称する) である。これらを炭素源や窒素源を豊富に含む Koren-Hutner 培地¹⁰⁾ (以後 KH-培地と略称する) および無機塩培地である Cramer-Myers 培地¹¹⁾ (以後 CM-培地と略称する) に糖質、アミノ酸類、アルコール類および脂肪酸類を 20 mM 濃度となるように添加した培地を使用し、照射または暗黒下で培養した。照射の強度は 3,000 lx、培養温度は 27°C で振とう培養した。なお、光源には蛍光灯 (ナショナル・ホルムックス, 20 W) を使用した。暗黒中のものは培養フラスコに黒布をかぶせ同様の条件下で培養した。Green 株および Bleached 株をそれぞれ照射または暗黒下で生育させた細胞を Green-light (GL), Green-dark (GD), および Bleached-light (BL), Bleached-dark (BD) と以後称する。この4種の従属栄養培養および Green 株を CM-培地中で照射下において光独立栄養培養も行なった。

2. けん化および抽出方法

プロビタミンAの抽出およびけん化は基本的には、A.O.A.C.¹²⁾の温けん化操作に準じたが、下記のように行なった。各種の培養条件下で培養したユーグレナの培地 1 ml 中の細胞数をヘマトメータで測定し、この培地の一定容量を遠心分離し、その細胞を生理食塩水で2回洗浄した後、けん化フラスコに移し、約 1.5×10^9 個の細胞をけん化した。けん化温度や時間は、検討の結果、従来の方法のとおり 60°C、20 分間ユーグレナを 3.2 M 水酸化カリウム・メタノール溶液でけん化後、石油エーテルでカロチノイドを抽出した。抽出液は窒素ガス気流下で溶媒を留去し、これに *n*-ヘキサンを加え溶解後一定容とし、これを分画用および定量用試料とした。

3. TLC

シリカゲルを吸着剤とする TLC プレート (Merck 製 Kieselgel 60 F₂₅₄) および Kieselgur-Aluminum oxide (1:1, Merck 製) を常法により 10×20 cm のガラス板上に厚さ 0.25 mm に塗布したプレートを使用した。これらのプレートを 130°C、2 時間活性化した後、試料を塗布し展開した。展開溶媒は、Kieselgel 60 F₂₅₄ のプレートには酢酸エチル-エチレンクロライド (2:8)

を用い、Kieselgur-Aluminum oxide のプレートは石油エーテル-メタノール (110:2) を使用した。

4. HPLC

使用した HPLC は、日本分光製 TRIOTAR-II であり、定量用には Finepak SIL (内径 4.6 mm×長さ 250 mm) および Finepak SIL C₁₈ (4.6×250), 分取用には Fine SIL-5 を内径 7.2 mm、長さ 250 mm のカラムに充てんしたものを用いた。移動相は Finepak SIL および Fine SIL-5 を充てんしたカラムでは、アセトン-ヘキサン (3:7) を用い、Fine SIL C₁₈ では、クロロホルム-アセトニトリル (0.5:95.5) を用いた。検出器は日本分光製 UVIDEC 100-III を用い、451 nm の吸光度を測定した。

5. 吸収スペクトルの測定

ユーグレナのけん化・抽出液を分取用のカラム (Fine SIL-5 を充てんしたもの) を使用し、アセトン-ヘキサン (3:7) を移動相として、2 ml/min の流速でカロチノイドを分離し、各ピークを分取した。このカラムでの分析パターンと Finepak SIL での分析パターンはほぼ一致していた。分取した各ピークの留出溶媒を窒素ガスにより留去し、*n*-ヘキサン、クロロホルム、石油エーテルおよびエタノールにそれぞれ溶解し、自記分光光度計 (島津製 UV-200 S) により吸収スペクトルを測定した。

以上、全実験に使用した標準 β -カロチンおよび α -カロチンは Sigma 製、他の試薬は市販試薬特級品を使用した。

実験結果

1. ユーグレナプロビタミンAの抽出およびけん化条件の検討

けん化後の抽出溶剤として石油エーテルを用いた場合とエチルエーテルを使用した場合の抽出効果を比較すると、 β -カロチンおよびエチネノンは石油エーテルにより抽出したほうが、抽出量がいずれも約 10% 高くなった。プロビタミンA全体としても、石油エーテル抽出のほうが約 10% 高い値となった。

ユーグレナ細胞の水酸化カリウム・メタノール溶液でのけん化時間を検討するために、加熱温度を 60°C とし、けん化時間を 20 分、40 分および 80 分として試みた。20 分間けん化したときに測定されたユーグレナ細胞 1 個当たりの β -カロチン量を 100 とすると 40 分および 80 分ではそれぞれ 95.0 および 100.3 となりほとんど差はなく、以後けん化時間は 20 分間とした。

ユーグレナ細胞を直接水酸化カリウム・メタノール溶液で 60°C、20 分間けん化した場合と、ユーグレナ細胞のアセトン抽出物を水酸化カリウム・メタノール溶液で

Fig. 1. TLC pattern of carotenoid in *E. gracilis*. Adsorbant: silicagel, solvent: ethyl acetate-methylene chloride (2:8); authentic carotenoids. A, β -carotene; B, cryptoxanthin; C, lutein; GL, Green light; BL, Bleached light.

室温において一夜けん化した場合の β -カロチン量を細胞1個当たりで比較すると、前者を100とした場合後者は46.0であった。以後直接細胞をけん化した。

2. ユーグレナのプロビタミンAの分離

1) TLC による分離 Fig. 1 に示すとおりユーグレナのカロチノイドは、GL の場合は7本以上、BL の場合は5本以上のバンドに分離した。GL および BL のバンドのうち R_f 値の大きい三つのバンドは、それぞれ一致しこれらを F-1, F-2 および F-3 とすると、F-1 は標準 β -カロチンの R_f 値と一致した。これらの F-1, F-2 および F-3 のバンドをスパチュラで削り取り、エチルエーテルで溶出後、これらを濃縮し Kieselgel-アルミニウムオキシサイド (1:1) を吸着剤としたプレートで展開した。その結果、それぞれのバンドは単一バンドとなり、この場合も F-1 は標準 β -カロチンの R_f 値と一致した。

2) HPLC による分離 Fig. 2 に示すように GL および BL のカロチノイドのクロマトグラムにおいて、保持時間が2.95分、3.65分および4.95分に共通のピークが見られた。これらのピークをそれぞれ P-1, P-2 および P-3 とする。Fig. 1 に示した F-1, F-2 および F-3 のバンドをプレートより削り取りエチルエーテルで溶出後 HPLC により分析したところ、F-1 は P-1, F-2 は P-2 および F-3 は P-3 の保持時間と一致した。標準 β -カロチンの保持時間は2.95分であり P-1 と一致した。トウモロコシから得たクリプトキサンチン、および卵黄から得たルテインの保持時間はそれぞれ4.64分と9.33分であり、Fig. 2 に A, B および C で示した。

Finepak SIL カラムを用いアセトン-ヘキサン (3:

Fig. 2. HPLC pattern of carotenoids in *E. gracilis*.

GL, Green light; BL, Bleached light.

Arrows of A, B and C show the retention time of β -carotene, cryptoxanthin and lutein, respectively.

7) を移動相としたとき α -カロチンと β -カロチンの分離が困難である。そこでこれらを分離させるために、Zakaria ら¹³⁾ の分離条件を参考にし Finepak SIL C₁₈ を用いクロロホルム-アセトニトリル (0.5:99.5) を移動相として標準 α -および β -カロチンの保持時間を調べたところ、それぞれ14.4分と15.9分となり分離した。しかし、ユーグレナ試料では α -カロチンは検出されなかった。

Fine SIL-5 を充てんしたカラムにより GL のカロチノイドを分離し、各ピークを分取して溶媒を留去後各種溶媒中での極大吸収波長を測定した。その結果を Table 1 に示した。エタノール中では P-1 は479と450 nm に、P-2 は459~460 nm に、P-3 は473 nm に特徴的な極大吸収が認められた。

3. ユーグレナのプロビタミンAの定量

プロビタミンAの定量は HPLC により β -カロチンの標準液を用いて作成した検量線をもとに、それぞれのピーク面積から絶対検量線法により行なった¹⁴⁾。

1) 回収率 β -カロチンの定量における回収率を求めるために、通常の測定と同様に採取したユーグレナをけん化フラスコに移し、これに既知量の標準 β -カロチンのヘキサン溶液を添加し、本法に従って定量を行なった。回収率は Table 2 に示すように350 μ g の β -カロチン添加に対し、回収された β -カロチンの平均値は、ユーグレナに含まれる β -カロチン量を差し引くと340.5

Table 1. Absorption maxima of provitamin A after elution of saponified extract of *E. gracilis* with different solvents.

HPLC and TLC fraction	Caratenoid	Solvents			
		Hexane	Chroloform	Petroleum ether	Ethanol
P-1, F-1	β -Carotene	477 447 424	492-496 464-465	475-479 446 424	479 450
P-2, F-2	Echinenone	454	470-472	451-454	459-460
P-3, F-3	Euglenanone	460-462	477-481	459	473

Table 2. Recovery of added β -carotene.*

Sample	β -Carotene recovered	
	μg	%
1	335.4	95.4
2	348.5	99.6
3	337.7	96.5
Average of recovery	340.5**	97.2

* β -Carotene (350.0 μg) was added to the *Euglena* cells and analyzed by the present method.

** Recovered amounts shown in this table do not include the native β -carotene in the cells.

μg となり平均回収率は 97.2% であった。

2) 各種培養条件下のプロビタミンA含有量 Table 3 に示すように、7日間培養したユーグレナ細胞 10^9 個中の β -カロチン含有量の最も多いのは光独立栄養培養した場合の 1,508.1 μg であり、次に多いのは GL の 577.8 μg であった。Green 株、Bleached 株ともに暗黒下より照射下のほうが含有量が多く、Green 株のほうが Bleached 株より高い値となった。エチネノンおよびユーグレナノンは、Green 株および Bleached 株ともに光照射のほうが暗黒下より多い傾向であった。これらのユーグレナ細胞の培地中濃度は、培地 1 ml 中の細胞数 ($\times 10^6$ 個) で示すと光独立栄養培養では 0.70, GL は 28.7, BL は 17.9, GD は 14.0 および BD は 17.5₄ であり、したがって培地 100 ml 中のユーグレナの β -カロチン含有量はそれぞれ 0.11 mg, 1.66 mg, 0.30 mg, 0.07 mg および 0.10 mg であった。

3) 培養日数による β -カロチン含有量の変化 Fig. 3 に示すように KH-培地における光照射下での細胞数は、5日目においてほぼ最高に達し、以後漸減している。しかし β -カロチンおよびエチネノンでは、7日目に最大となった。

4) 照射強度のプロビタミンA含有量に及ぼす影響 ユーグレナの培養期間を7日間としたとき β -カロチン

Fig. 3. Variation of provitamin A contents of *E. gracilis* during growth.

● Cell number, ○ β -carotene, △ echinenone, □ euglenanone.

Fig. 4. Effect of illumination on the content of carotenoids in *E. gracilis*.

○ β -Carotene, △ echinenone, □ euglenanone.

含有量は、1,000 lx において最も高くなり、このとき細胞 10^9 個当たり 577.9 μg となった。3,000 lx においてもほとんど増加しなかった (Fig. 4)。またエチネノンおよびユーグレナノンにおいてもほぼ同様の傾向となった。

5) 培地成分の相違による β -カロチン含有量への影響 CM-培地に糖類、アミノ酸類、アルコール類および

Fig. 5. The contents of β -carotene in *E. gracilis* grown with various carbon and nitrogen sources.

1, glucose; 2, ethyl alcohol; 3, myristyl alcohol; 4, malic acid; 5, alanine; 6, aspartic acid; 7, glutamic acid; 8, autotrophic.

脂肪酸を添加し培養した結果, Fig. 5 に示すように細胞 10^9 個当たりの β -カロチン含有量が最も多いのは, 光独立栄養培養した場合であり $1,056.3 \mu\text{g}$ となり, 次に多いのはミリスチルアルコールを添加した場合の $726.3 \mu\text{g}$ となった。また培地成分によるユーグレナ β -カロチンの生産量の違いを比較すると, 培養期間 0 日目に培地 100 ml 中に $1 \mu\text{g}$ の β -カロチンを含む細胞を植え 7 日間培養した場合, その培地 100 ml 中の細胞に含まれる β -カロチン量は, Fig. 5 に示すように光独立栄養培養では $8.8 \mu\text{g}$ と最も低く, またブドウ糖やリンゴ酸を添加した場合最も多くなりそれぞれ 27.2 および $26.4 \mu\text{g}$ となった。なお, 光独立栄養培養, ブドウ糖を添加した培地およびリンゴ酸を添加した培地での 7 日目の細胞濃度は, それぞれ 0.70 , 5.93 および 3.43×10^6 cells/ml であった。

考 察

すでに報告されたユーグレナカロチノイドのプロビタミン A は, β -カロチン, エチネノンおよびクリプトキサンチンであり, このほかにビタミン A 活性をもつであろうとされるユーグレナノンがある^{6)-8),15),16)}。本実験結果からも β -カロチン, エチネノンおよびユーグレナノンが確認されたが, 含有量が最も多くビタミン A 効力が高いことから β -カロチンを中心にしたプロビタミン A のけん化・抽出方法を検討した。ユーグレナ細胞に水酸化カリウム・メタノール溶液を直接加え, 20 分間, 60°C で加熱けん化し, その後石油エーテルで抽出した場合にプロビタミン A の最も高い測定値が得られたのでこの条件で行なった。

ユーグレナのカロチノイドを Davies¹⁵⁾ の方法により TLC にて展開して得た Fig. 1 の F-3 よりも R_f 値の

小さいバンドは, C のルテインの R_f 値以下である。Davies のシリカゲルプレートによるカロチノイドの分離動向¹⁵⁾から考えると, これらは水酸基を 2 個あるいは水酸基とエポキシ基の両方をもつようなカロチノイドであると考えられ, ビタミン A 効果をもたないものと判断した。Fig. 2 の P-1 は, 標準 β -カロチンの保持時間と一致し, また Table 1 に示す極大吸収波長が標準品や文献値^{6),16)}と一致することから β -カロチンであると判断した。P-1 は Table 1 に示すとおり各種の溶媒中において 2 または 3 の極大吸収をもつのに対し, P-2 と P-3 はそれぞれ特有の単一ピークであり P-2 と P-3 は異なっている。これらの極大吸収波長を文献値^{6),16)}と比較したところ, P-2 はエチネノン, P-3 はユーグレナノンとほぼ一致した。以上のことから P-1 は β -カロチン, P-2 はエチネノン, P-3 はユーグレナノンと判断した。

ユーグレナの β -カロチンの定量における回収率は, Table 2 のごとく 97.2% とほぼ満足しうる結果を得た。

本実験におけるユーグレナの GL の β -カロチン含有量は, KH-培地で培養したとき $577.8 \mu\text{g}/10^9$ cells となったが横田ら⁹⁾は $39 \mu\text{g}/10^9$ cells と報告している。また, BL の β -カロチン含有量は, Table 3 に示すように $169.9 \mu\text{g}/10^9$ cells となったが横田ら⁹⁾の値は $98 \mu\text{g}/10^9$ cells である。横田らはユーグレナのカロチノイドの全組成を明らかにすることを目的としており抽出方法, けん化方法, さらに分析手法が異なっている。Dolphin¹⁷⁾は Bleached 株を CM-培地にブドウ糖を添加した培地で生育させたとき, カラムクロマトグラフ法で測定した結果 β -カロチンは対数後期で $200 \mu\text{g}/10^9$ cells であると報告している。Green 株および Bleached 株の各種の培養条件下で培地 100 ml から得られる β -カロチン量は, Table 3 の β -カロチン含有量および実験結果 2) に示した細胞濃度から計算すると GL 細胞が最も多く, 以下 GL 細胞について実験した。KH-培地中での生育時期とプロビタミン A 含有量の変化を見ると Fig. 3 に示すように, β -カロチン含有量の最大になる時期は, 細胞濃度が最大の時期より 2 日遅れ 7 日目となった。光強度と細胞当たりのプロビタミン A 含有量との関係は, Fig. 4 に示すようにきわめて大きい。しかし, $1,000 \text{ lx}$ から $3,000 \text{ lx}$ ではほとんど影響はなかった。 $1,000 \text{ lx}$ での β -カロチン含有量は暗黒下培養の 11.5 倍に増加した。葉緑体をもつユーグレナの β -カロチンは補助色素としての機能を果たしていると考えられている¹⁸⁾, 光照射により光合成が活発になるためクロロフィルが増加し¹⁹⁾, その際 β -カロチンが増加すると考えられる。 β -カロチンの収量を多く得るための十分な光照射強度として以後 $3,000 \text{ lx}$ とした。

ユーグレナの細胞当たりの β -カロチン含有量が多く,

Table 3. Provitamin A contents of *E. gracilis* grown under different conditions.

	Contents ($\mu\text{g}/10^9$ cells)				
	Wild strain			Bleached strain	
	Light grown	Dark grown	Autotrophic	Light grown	Dark grown
β -Carotene	577.8	47.3	1,508.1	169.9	58.4
Echinenone	38.5	12.4	76.8	17.9	16.0
Euglenanone	11.3	4.2	63.0	3.4	0.3

しかも細胞濃度も高くなる有機炭素源は、Fig. 5 に示すとおりブドウ糖とリンゴ酸であった。そしてこれらを有機炭素源として豊富に含む KH-培地において最も β -カロチン含有量が多く、 $577.8 \mu\text{g}/10^9$ cells ($706.2 \mu\text{g/g}$ [湿重量]) であった。またすでに報告したグルタミン酸ナトリウムとブドウ糖を同時に含む培地¹⁾からは β -カロチンが $483.3 \mu\text{g}/10^9$ cells ($424.7 \mu\text{g/g}$ [湿重量]) 含まれる細胞を得た。GL の場合 KH-培地において培養開始時に培地 100 ml 中に 24.3×10^6 個 ($14.04 \mu\text{g}$ の β -カロチンを含む) の細胞を植えたとき、培養 7 日目においては 28.7×10^8 個 (β -カロチンとして $1,658 \mu\text{g}$ が含まれる) に増殖し、培地 100 ml 中での β -カロチン増加率は約 118 倍となった。このようにユーグレナは、新しいタンパク質源としてのみでなく、プロビタミン A 源としても利用しうる可能性のあることが明らかとなった。

要 約

Euglena gracilis Z のプロビタミン A を TLC および HPLC を用いて分画し、吸収スペクトルおよび HPLC により検索・同定した。さらに HPLC による定量法を検討しプロビタミン A を多く得るための培養条件についても検討した。

1) ユーグレナのプロビタミン A は、細胞を直接メタノール性 KOH で 60°C 、20 分間けん化し石油エーテル抽出したときに高い測定値が得られた。

2) 抽出されたカロチノイドを TLC と HPLC で分離し、極大吸収波長および HPLC の保持時間を測定し、標準カロチノイドのそれらと比較したところプロビタミン A としては β -カロチン、エチネノンおよびユーグレナノンが検出された。

3) 本実験で用いた β -カロチンの定量法の回収率は平均 97.2% であった。KH-培地中で培養した GL, GD, BL および BD 細胞中の β -カロチン含有量は、それぞれ 577.8 , 47.3 , 169.9 および $58.4 \mu\text{g}/10^9$ cell であり、GL 細胞が最も多かった。

4) KH-培地における GL 細胞の β -カロチン含有量は、培養開始後 7 日目で最大となり、照度は $1,000 \text{ lx}$

以上が適当であった。

5) ユーグレナが利用しうる糖類、アミノ酸類、アルコール類および脂肪酸類中、ブドウ糖とリンゴ酸を有機炭素源として使用したとき、 β -カロチンの生成量が多くなりこれらを組成にもつ KH-培地において多量の β -カロチン生成を見ることができ、その含有量は $577.8 \mu\text{g}/10^9$ cells ($706.2 \mu\text{g/g}$ [湿重量]) であった。

文 献

- 1) 北岡正三郎, 細谷圭助: 農化, 51, 477 (1977)
- 2) 細谷圭助, 北岡正三郎: 農化, 51, 483 (1977)
- 3) Barras, D.R. and Stone, B.A.: *Biochem. J.*, 97, 14 (1965)
- 4) 重岡 成, 横田明穂, 中野長久, 北岡正三郎: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 2053 (1979)
- 5) 重岡 成, 布施 晃, 堀 仁美, 滝野弘美, 大西俊夫, 中野長久, 北岡正三郎: ビタミン, 55, 330 (1981)
- 6) Krinsky, N.I. and Goldsmith, T.H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 91, 271 (1960)
- 7) Batra, P.P. and Tollin, G.: *Biochem. Biophys. Acta*, 79, 371 (1964)
- 8) 横田明穂, 岡本京子, 北岡正三郎: 農化, 52, 97 (1978)
- 9) MaCalla, D.R.: *J. Protozool.*, 10, 491 (1963)
- 10) Koren, L.E. and Hutner, S.H.: *J. Protozool.*, 14, 17 (1967)
- 11) Cramer, M. and Myers, J.: *Arch. Mikrobiol.*, 17, 384 (1952)
- 12) A.O.A.C.: Official Methods, 13th Ed., 738 (1980)
- 13) Zakaria, M., Simpson, K., Brown, P. and Krstulovic, A.: *J. Chromatogr.*, 176, 109 (1979)
- 14) 兼松 弘, 丸山武紀, 新谷 助, 神谷典清: 栄養と食糧, 34, 379 (1981)
- 15) Davies, B.H.: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments (Goodwin, T.W., ed.), 514 (1965), Academic Press (New York)
- 16) Bauernfeind, J.C., Adams, C.R. and Marusich, W.L.: Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors (Bauernfeind, J.C., ed.), 570 (1981), Academic Press (New York)
- 17) Dolphin, W.P.: *Plant Physiol.*, 46, 685 (1970)
- 18) 柴田和夫: 光合成の生化学, 21 (1966), 共立出版 (東京)
- 19) Schiff, J.A.: *Adv. Morphog.*, 10, 265 (1973)

(昭和 59 年 1 月 17 日 受理)