米の α -グルコシダーゼ粗標品による イノシン α -グルコシドの生成

鈴木 幸雄, 内田 綱

(岡山大学農業生物研究所)

昭和 54 年 2 月 5 日 受理

Formation of Inosine α -Glucoside by the Crude Preparation of α -Glucosidase from Rice

Yukio SUZUKI and Kei UCHIDA

Institute for Agricultural and Biological Sciences,
Okayama University, Kurashiki, Okayama 710

Two inosine derivatives were found to be formed when soluble starch and inosine were incubated with the crude preparation of α -glucosidase from rice seeds. One of the derivatives was purified from the incubation mixture by paper chromatography and Sephadex G-15 gel filtration, and obtained in a crystalline form as its hexaacetate. The derivative was identified as 5'-(α -glucosyl) inosine, on the basis of the various experimental results, viz., elemental analyses, UV and NMR absorption spectra, electrophoretic mobilities on paper, and products by hydrolysis with acid and *Aspergillus niger* α -glucosidase, and oxidation with sodium metaperiodate.

(Received February 5, 1979)

ヌクレオシドの誘導体は今までに数多く知られているが、糖誘導体については報告がなかった。著者らは *Aspergillus niger* の α -グルコシダーゼをマルトースとアデノシンの混液に作用させると、5'-(α -グルコシル) アデノシン [アデノシン 5'-(α -グルコシド)] が生成されることを見出し、ヌクレオシドの糖誘導体の生成をはじめて報告した^(1,2)。ついで宗像ら⁽³⁾は *Brevibacterium ammoniagenes* のアデニン要求変異株の発酵液から 5'-(β -D-ガラクトシル) イノシンの単離を、野上ら⁽⁴⁾は *Bacillus* 属細菌のアデニン要求変異株の発酵液から 5'-(α -D-グルコシル) イノシン、5'-(α -D-マルトシル) イノシン、5'-(α -D-グルコシル) グアノシン、および 5'-(α -D-マルトシル) グアノシンの単離をそれぞれ報告した。また著者らは *Escherichia coli* の β -ガラクトシダーゼに、*o*-ニトロフェニル- β -ガラクトシドとアデノシンから 2'(3')-(β -ガラクトシル) アデノシンおよび 5'-(β -ガラクトシル) アデノシンを⁽⁵⁾、*o*-ニトロフェニル- β -ガラクトシドとイノシンから 2'(3')-(β -ガラクトシル) イノシンを⁽⁶⁾、*o*-ニトロフェニル- β -ガラクトシド

とウリジンから 2'(3')-(β -ガラクトシル) ウリジンおよび 5'-(β -ガラクトシル) ウリジンを⁽⁷⁾、それぞれ生成する作用があることをこれら 5 物質をいずれも単離、結晶化して明らかにした。本報では米から調製した硫酸アンモニウム塩析沈殿物に、澱粉とイノシンから 2 つのイノシン糖誘導体類似物質を生成する作用を認め、2 つのうち 1 つを単離、結晶化してその化学構造を検討したので報告する。

実験方法

1. 酵素 米の α -グルコシダーゼ粗酵素液：岡山大学農業生物研究所実験圃場で昭和 50 年秋収穫した水稻の玄米（粳米，品種アケボノ）を精米所で 15% 減歩まで精米をしたのち、製粉機で粉末にし、 -20°C に保存した。米粉 5 kg を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.7) 15 l に懸濁して室温で 8 時間攪拌し、一夜 4°C に放置後晒布袋を用いて脱水機で脱水し、抽出液を得た。抽出液に固形硫酸アンモニウムを飽和度 0.80 まで加えて (pH を 6.8 に補正) 攪拌し、一夜 4°C に放置後セライト No.

535 を加え吸引濾過して塩析沈殿物を集めた。沈殿物を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1 l に懸濁し、一夜 4°C で攪拌後吸引濾過して濾液を得た。濾液を 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に対して 3 日間 4°C で透析後、透析袋にポリエチレングリコール 6000 を振りかけて透析内液を濃縮し、ついで濃縮液を遠心分離して上澄液 453 ml (50.5 units/ml) を得た。この上澄液を米の α -グルコシダーゼ粗酵素液とした。

Asp. niger の α -グルコシダーゼは既報⁽⁸⁾のディスク電気泳動的に単一な精製標品を用いた。 β -グルコシダーゼは Boehringer Mannheim 社の製品 (アーモンドより調製して 3.2 M 硫酸アンモニウム溶液に懸濁した標品, 40 U/mg) を用いた。スクレオシドホスホリラーゼは Sigma 社の製品 (子牛の脾臓より調製して 3.2 M 硫酸アンモニウム溶液に懸濁した結晶標品, 20 U/mg) を用いた。

2. 試薬 イノシンは與人, 可溶性澱粉は Merck 社, その他の試薬は市販の特級あるいはそれに準ずる試薬をそれぞれ使用した。5'-(α -D-グルコシル)イノシンは武田薬品工業株式会社野上昱雄博士より分与を受けた。

3. 分析方法 スクレオシド糖誘導体量: 既報⁽⁹⁾の方法により測定した。

α -グルコシダーゼ活性: 1% マルトース水溶液 0.1 ml, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 0.25 ml, 酵素液および純水からなる反応液 (全量 0.5 ml) を 37°C で 30 分間保持したのち, 反応液を沸騰水浴中に 5 分間浸漬して反応停止を行い, 生成グルコース量をグルコースオキシダーゼ・パーオキシダーゼ・*o*-ジアニシジン法⁽¹⁰⁾により測定した。1 分間にマルトースから 1 μ mole のグルコースを生成する酵素量を 1 unit とした。

濾紙電気泳動法: イノシンおよびその糖誘導体の各 0.5% 水溶液 5 μ l を東洋濾紙 No. 51 (幅 12 cm×長さ 26 cm) の陽極側の端から 8 cm の線上に点状につけ, 0.05 M 酢酸水溶液を電解液として 400 V で 4.5 時間室温で通電を行った (電極槽: 5% KCl; 5% KCl を含む 2% 寒天橋を使用)。

酸による加水分解: 0.5% スクレオシド糖誘導体水溶液 0.1 ml を 2 本の試験管にとり, 0.4 N 硫酸 0.1 ml を加えて沸騰水浴中に 0 時間および 4 時間保ったのち, 炭酸カルシウム約 10 mg ずつを加えて中和し, 遠心分離して上澄液を得た。各上澄液 0.1 ml を東洋濾紙 No.

50 (40×40 cm) に 2 cm 幅にスポットした。0.3% イノシン水溶液 0.1 ml を試験管にとり 0.4 N 硫酸 0.1 ml を加えて同様に加熱後中和し, 遠心分離して得た上澄液を同時にスポットした。この濾紙を *n*-ブタノール・ピリジン・水 (6:4:3, v/v) (溶媒 A) を用いて上昇法で 2 回展開後, 紫外線灯下で吸収物質を, 硝酸銀浸漬法⁽¹¹⁾により糖をそれぞれ検討した。また 0.5% スクレオシド糖誘導体水溶液 0.17 ml および 0.5% イノシン水溶液 0.1 ml にそれぞれ純水 10 ml を加えて希釈後, 2 ml にオルシン-Fe³⁺-塩酸法⁽¹²⁾により, 鉄試薬 2 ml 各希釈液およびオルシン試薬 2 ml を加えて沸騰水浴中に 20 分間保持し, 水冷後 660 nm における吸光度を測定してペントース (リボース) 量を測定した。

酵素による加水分解: (i) α -グルコシダーゼによる加水分解 0.5% スクレオシド糖誘導体水溶液 0.24 ml に, 純水 2.96 ml, 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.8 ml, および同緩衝液で *Asp. niger* の α -グルコシダーゼ精製酵素液を 10 倍希釈した液 0.4 ml を加えて (全量 4.4 ml), 37°C で 24 時間反応した。対照として 0.5% イノシン水溶液 0.14 ml に, 純水, 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5), および希釈酵素液を加えた反応液 (全量 4.4 ml) を同様に温置した。反応後各反応液 0.2 ml を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 3 ml を含む試験管にとり, 遊離イノシン量を 248.5 nm における吸光度から測定した。また各反応液 1 ml について遊離グルコース量を Somogyi-Nelson 法⁽¹³⁾およびグルコースオキシダーゼ・パーオキシダーゼ・*o*-ジアニシジン法⁽¹⁰⁾により測定した。(ii) β -グルコシダーゼによる加水分解 イノシンおよびスクレオシド糖誘導体の各 0.5% 水溶液 60 μ l に, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) 0.15 ml, アーモンドの β -グルコシダーゼ 0.01 ml, および純水を加えた反応液 (全量 0.3 ml) を 37°C で 3 時間保持した。反応後反応液 0.1 ml を東洋濾紙 No. 50 に 2 cm 幅にスポットした。この濾紙を溶媒 A を用いて上昇法で 2 回展開後, 濾紙上の吸収物質および糖をそれぞれ検討した。(iii) スクレオシドホスホリラーゼによる分解 スクレオシド糖誘導体, イノシン, およびウリジンの各 0.5% 水溶液 0.06 ml に, 純水 0.02 ml, 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) 0.1 ml, およびスクレオシドホスホリラーゼ 0.02 ml を加えた反応液 (全量 0.2 ml) を 25°C で 4 時間保持した。対照として基質無添加の反応液, および酵素無添加の反応液を同時に温置した。反応後各反応液 0.08 ml を東

洋濾紙 No. 50 に 2 cm 幅にスポットした。水飽和 *n*-ブタノールで 2 回展開後、反応生成物を紫外線灯下で検討した。

過ヨウ素酸化：0.0015 M マクレオシド糖誘導体 3.5 ml に、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 1 ml, 0.08 M 過ヨウ素酸ナトリウム 1 ml, および純水を氷冷下に加えて全量を 8 ml とし、低温室 (4°C) 中で 48 および 72 時間反応させた。反応後飽和重炭酸ナトリウム水溶液 20 ml, 0.02 M 亜硫酸ナトリウム (重炭酸ナトリウム飽和) 4 ml を氷冷下に加えた。30 分間氷冷のもとで放置後、1% 可溶性澱粉水溶液 1 ml を加えて 0.01 M ヨウ素液で滴定した。

実験結果および考察

1. イノシン糖誘導体の生成

可溶性澱粉 125 g, イノシン 27 g, 1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 250 ml, および純水約 1.9 l からなる混液を 40°C の温浴中に 30 分間温置したのち、米の α -グルコシダーゼ粗酵素液 225 ml を加え (全量 2.5 l) 40°C で 2 時間保持した。反応液を沸騰水浴中に 20 分間浸漬して反応を停止した。水冷後反応液 0.4 ml を東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm) に帯状 (9 cm 幅) にスポットした。この濾紙を溶媒 A を用いて上昇法で 2 回展開後、紫外線検出器 (スーパーライト, 大澤紫外線工業所) を用いて検索したところ、濾紙上に *R_f* 値がイノシンのそれより小さい 1 つの新紫外線吸収帯 I が見出された。あらかじめ沸騰水浴中に 5 分間浸漬して加熱失活させた粗酵素液を、可溶性澱粉とイノシンの混液に作用させた反応液、粗酵素液をイノシン無添加の可溶性澱粉溶液に作用させた反応液、および粗酵素液を可溶性澱粉無添加のイノシン溶液に作用させた反応液のいずれの反応液から、I に相当する吸収帯は検出されなかった。吸収帯 I の部分を切り取り、温水で抽出し、抽出液の吸光度 ($OD_{248.5}$) から求めた I 量は反応液 2.5 l 当りイノシン

として 2.54 g であった。

2. イノシン糖誘導体の単離

水冷した反応液に等量のエタノールを加えて一夜 4°C で放置し、遠心分離して上澄液を得た。pH 6.8 に補正後約 0.5 l まで減圧濃縮して東洋濾紙 No. 2 (30×60 cm) に 1 枚につき 1 ml の割で帯状 (54 cm 幅) にスポットした。この濾紙を溶媒 A を用いて上昇法で 2 回展開後、紫外線灯下で濾紙上に分別された吸収帯 I の部位を確かめ、これを切り取り、水で 3 回抽出した。水抽出液を減圧濃縮後、濃縮液 (約 150 ml) を東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm) 上に再び溶媒 A で 3 回展開した。濾紙上の I 部位を切り取り、水抽出、濃縮したのち濃縮液 (約 30 ml) を Sephadex G-15 カラム (56 ϕ ×750 mm) にのせ、純水を流して第 1 回目のゲル濾過を行い、I を含む溶出区分を集めて減圧濃縮した。濃縮液 (約 60 ml) を東洋濾紙 No. 50 に 1 枚につき 0.3 ml の割で帯状 (34 cm 幅) にスポットした。この濾紙を *n*-ブタノール・酢酸・水 (4:1:5, v/v, 上層) (溶媒 B) を用いて上昇法で 4 回展開したところ、濾紙上に 2 つの吸収帯 *I_a* および *I_b* が検出され (*R_f* 値の大きい順に *I_a* および *I_b* と呼称した), I は少なくとも 2 つの物質の混合物であることを知った。この際対照として同濾紙上にスポットし、展開した 5'-(α -D-グルコシル) イノシンの *R_f* 値は *I_b* のそれとよく一致したが、*I_a* のそれとは明らかに相違した。濾紙上に分別された 2 物質をそれぞれ水抽出、濃縮した。*I_a* および *I_b* の量比は約 1:20 であったので、*I_b* のみをさらに精製した。*I_b* の濃縮液 (約 10 ml) を Sephadex G-15 (56 ϕ ×750 mm) にのせ、純水を流して第 2 回ゲル濾過を行い、*I_b* を含む溶出区分を集めて減圧濃縮、乾固し、熱メタノールで精製を 3 回くり返して白色粉末標品 (*PI_b*) 1.33 g を得た。

3. *PI_b* の諸性質

ここに得た精製標品 *PI_b* を減圧硫酸デンケター中で 1 週間室温で乾燥後、諸性質を検討した。

Table I. *R_I* Values of Inosine α -Glucoside *PI_b* on Paper Chromatography.

Solvent	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Hypoxanthine	1.06	2.21	1.29	0.92	1.61	1.19	0.85
Inosine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>PI_b</i>	0.59	0.14	0.63	0.97	0.43	0.58	1.05

Solvents: (1) *n*-butanol-pyridine-water (6:4:3, v/v), (2) *n*-butanol saturated with water, (3) *n*-butanol-ethanol-water (50:15:35, upper layer, v/v), (4) 95% ethanol-1 M ammonium acetate (2:1, v/v), (5) *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:5, upper layer, v/v), (6) *n*-butanol-acetic acid-water (2:1:1, v/v), (7) water saturated with isoamylalcohol.

Fig. 1. Ultraviolet Absorption Spectra of Inosine α -Glucoside PI_b and Inosine in 0.1 N HCl (A), 0.01 N HCl (B), Deionized Water (C), and 0.01 N NaOH (D). Absorption spectra were recorded on a Hitachi Perkin-Elmer model 200 recording spectrophotometer. (1): PI_b (2): Inosine.

a) ペーパークロマトグラフィー PI_b の R_f 値を Table I に示した。Table I に示す各種の溶媒を用いて濾紙上に数回展開を行っても単一のスポットを与えた。

b) 濾紙電気泳動 PI_b , 5'-(α -D-グルコシル) イノシンおよびイノシンの濾紙電気泳動を行ったところ、三者いずれも陰極方向に移動し、原点からの移動距離は三者ともよく一致した。

c) 吸収スペクトル PI_b およびイノシンの紫外吸収スペクトルを 0.1 N 塩酸, 0.01 N 塩酸, 純水, および 0.01 N 水酸化ナトリウムをそれぞれ溶媒として求めた。Fig. 1 に示すように、各溶媒における PI_b およびイノシンの吸収極大および極小の波長位置はイノシンのそれらとよく一致した。また PI_b の核磁気共鳴吸収スペクトルを重水を溶媒として求めたところ、ヒポキサンチンの 2 および 8 位ならびにリボースの 1' 位のプロトンのいずれもが PI_b に存在することを示した (Fig. 2)。

d) 元素分析 PI_b を室温で 24 時間, 10^{-3} mmHg のもとで乾燥後元素分析を行った。元素分析値 PI_b : C, 43.61; H, 5.01; N, 12.85% (計算値: $C_{16}H_{22}O_{10}N_4$ として C, 44.65; H, 5.15; N, 13.02%)。

e) 酸による加水分解 PI_b はアニリン水素フタルによる呈色が陰性であった。そこで PI_b の硫酸 (終末濃度 0.2 N) による加水分解を行い、水解生成物をペーパークロマトグラフィーにより調べた。 PI_b はヒポキサンチン, リボース, およびグルコースに加水分解された。

Fig. 2. NMR Spectrum of Inosine α -Glucoside PI_b . NMR spectrum was recorded on a Varian model EM 390 spectrometer at 90 MHz in D_2O .

PI_b およびイノシンの各水解液中のヒポキサンチンの同定は、Table I に示す溶媒 (3) および (4) を用いたペーパークロマトグラフィーにおける R_f 値, および各水解液の残液を 1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈した液の吸光比 (250 nm/260 nm および 280 nm/260 nm) が市販のヒポキサンチンのそれらとよく一致したことによる。

また PI_b およびイノシンの 248.5 nm における分子吸光係数が等しいと仮定して、両者のリボース量をオルシン- Fe^{3+} -塩酸法⁽¹²⁾により求めたところ, PI_b およびイノシンの各 1 モル中にリボースがそれぞれ 0.96 および 1.01 モル存在した。

f) グルコシダーゼによる加水分解 PI_b に *Asp*.

niger の α -グルコシダーゼを作用させると、イノシンとグルコースに分解された。遊離イノシン量を 248.5nm における吸光度から、遊離グルコース量を Somogyi-Nelson 法⁽¹³⁾およびグルコースオキシダーゼ・パーオキシダーゼ・*o*-ジアニジン法⁽¹⁰⁾によりそれぞれ求めたところ、PI_b 中のイノシンとグルコースのモル比はほぼ 1:1 であった。また PI_b はアーモンドの β -グルコシダーゼによっては分解されなかった。

g) ヌクレオシドホスホリラーゼによる分解 PI_b, イノシン, およびウリジンにヌクレオシドホスホリラーゼを作用させて、分解生成物をペーパークロマトグラフィーにより調べた。イノシンからはヒポキサンチンの生成が認められたが、PI_b およびウリジンからは他の紫外部吸収物質の生成が見受けられなかった。すなわち PI_b はヌクレオシドホスホリラーゼによって分解されなかった。

h) アセチル化 PI_b 1g にアセチル化のため活性硫酸カルシウムで脱水乾燥したピリジン 10 ml および無水酢酸 10 ml を加え、45°C まで加温してほとんど溶解し 4 日間室温で放置した。この反応混液に活性硫酸カルシウムで脱水乾燥したメタノール 60 ml を氷冷しながら加えて 1 夜室温で放置した。ついで吸引濾過後濾液を減圧濃縮、乾固し、乾固物を無水メタノールに溶解して減圧濃縮、乾固することを 5 回くり返し、さらに乾固物をクロロホルムに溶解し、少量のクロロホルム不溶物は吸引濾過して除去した後、濾液を減圧濃縮、乾固することを 5 回くり返してピリジンを除去した。乾固物を減圧硫酸デシケーター中で乾燥後、メタノール溶液から再結晶して白色針状結晶標品 (CAI_b) 1.05g [mp 195~198°C (分解, 未補正)] を得た。CAI_b はクロロホルム・アセトン (9:1, v/v), およびクロロホルム・ピリジン (85:15, v/v) を用いて薄層クロマトグラフ用シリカゲルシート上に展開を行ったところ単一のスポットを与えた。CAI_b を室温で 24 時間、10⁻³mgHg のもとで乾燥後元素分析を行った。元素分析値 CAI_b: C, 47.56; H, 5.09; N, 8.25% (計算値: C₂₈H₃₄D₁₆N₄ とし C, 49.27; H, 5.02; N, 8.21%)。また CAI_b の核磁気共鳴スペクトルを重クロロホルムを溶媒として求めた (Fig. 3)。ヒポキサンチンの 2 および 8 位のプロトン, 6 位の水酸基ならびに 6 個のアセチル基が認められた。

i) 過ヨウ素酸酸化 PI_b の分子量を 430.37 とし、PI_b を過ヨウ素酸ナトリウムにより低温で酸化させ

Fig. 3. NMR Spectrum of Crystalline Hexaacetate of Inosine α -Glucoside (CAI_b). NMR spectrum was recorded on a Varian model EM 390 spectrometer at 90 MHz in CDCl₃.

Fig. 4. Structure of Inosine α -Glucoside PI_b: 5'-(α -glucosyl)inosine.

た。同時に対照としてメチル α -グルコシドおよびイノシンを酸化させた。その結果、メチル α -グルコシド、イノシン, および PI_b はそれぞれ 1 モル当り過ヨウ素酸 2 モル, 1 モル, および 3 モルを消費した。

以上の諸性質 a)~i) から、PI_b は 5'-(α -グルコシル) イノシン [イノシン 5'- α -グルコシド] の構造を有すると推定した (Fig. 4)。

前述の実験結果から、精白米には澱粉のグルコシル基をイノシンの構成員であるリボースの CH₂OH 基へ転移して 5'-(α -グルコシル) イノシンを生成する作用があることが明らかになった。この作用は精白米中の α -グルコシダーゼが触媒する糖転移反応によると思われる。したがってヌクレオシドのリボース基を受容体とするグリコシダーゼによる糖転移反応が *Asp. niger*^(1,2), *Escherichia coli*⁽⁵⁻⁷⁾, 豚の肝臓⁽¹⁴⁾, および精白米に存在し、この反応が生物に広く分布していることが示唆された。*Brevibacterium ammoniagenes* のアデニン要求変異株, および *Bacillus* 属細菌のアデニン要求変異株

によるイノシンおよびグアノシン糖誘導体の生成がグリコンダーゼの作用によるのか,あるいは糖ヌクレオチドが関与する反応を触媒する酵素の作用によるのか明らかにされてない^(3,4)。また水稻種実の乳熟期,成熟期,および発芽期のいずれの時期にも α -グルコンダーゼが認められること^(15,16);米種子からディスク電気泳動のおよび超遠心的に単一なまでに精製された α -グルコンダーゼが澱粉にも作用すること⁽¹⁷⁾;種実の発芽期には α -アミラーゼ活性の生成増加とともに α -グルコンダーゼ活性も増加すること⁽¹⁸⁾;発芽期の種実内は α -アミラーゼの作用により澱粉からマルトオリゴ糖が生成され,糖供与体である澱粉およびマルトオリゴ糖が過剰に存在し,糖受容体が微量存在する状態に,また乳熟期の種実内も澱粉(糖供与体)が過剰に存在し,澱粉合成に関与する核酸関連物質(糖受容体)が微量存在する状態にそれぞれあり——すなわち, α -グルコンダーゼによる合成反応(糖転移反応)が行われやすい条件下にあると考えられることなどから,ヌクレオシド糖誘導体は天然,とくに植物種実に微量存在しているかもしれない。

終りに,5'-(α -D-グルコシル)イノシンを分与していただいた武田薬品工業株式会社野上昱雄博士に深甚なる感謝の意を表する。また本研究の費用の一部は,昭和53年度文部省科学研究費補助金によったことを記して厚くお礼申し上げる。

- (1) 鈴木幸雄, 内田 綱, 味野愛子: 日本農芸化学会関西支部・中部支部合同大会(昭和45年10月17日, 京都)発表; 農化, **44**, N 124 (1970).
- (2) 鈴木幸雄, 内田 綱: ビタミン, **44**, 196 (1971).
- (3) 宗像豊尙, 白幡公勝, 林 忠寿: 特開, 昭 47-23599.
- (4) 野上昱雄, 荒井義章, 米田雅彦: 特開, 昭 49-117689.
- (5) 鈴木幸雄, 内田 綱, 藤森茂樹: 農化, **48**, 605 (1974).
- (6) 鈴木幸雄, 内田 綱: 農化, **50**, 231 (1976).
- (7) 鈴木幸雄, 内田 綱: 農化, **50**, 237 (1976).
- (8) 鈴木幸雄, 三宅俊雄, 内田 綱, 味野愛子: ビタミン, **47**, 259 (1973).
- (9) 鈴木幸雄, 内田 綱: ビタミン, **47**, 111 (1973).
- (10) 福井作蔵: 生物化学実験法 A-1, 還元糖の定量法, 東大出版会, 1969, p. 143.
- (11) N. E. Welker and L. K. Campbell: *J. Bacteriol.*, **86**, 681 (1963).
- (12) 福井作蔵: 生物化学実験法 A-1, 還元糖の定量法, 東大出版会, 1969, p. 83.
- (13) 関根隆光ら編: 生化学領域における光電比色法, 第2巻, 南江堂, 1958, p. 27.
- (14) K. Uchida and Y. Suzuki: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 195 (1974).
- (15) 伊賀上郁夫, 東 普, 倉沢文夫: 農化, **34**, 258 (1960).
- (16) N. Takahashi and T. Shimomura: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 67 (1973).
- (17) N. Takahashi, T. Shimomura and S. Chiba: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 2015 (1971).
- (18) 桐淵滋雄, 中村道徳: 農化, **47**, 333 (1973).