

D-アミノ酸オキシダーゼに対する阻害性を用いた食品中の安息香酸のバイオセンシング

樋口元信, カンティ・アベスンダラ, 松本 清

九州大学大学院農学研究院食品バイオ工学講座: 812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

Biosensing of benzoate in food based on the inhibitory activity for D-amino acid oxidase

Motonobu HIGUCHI, Kanthi J. M. ABESUNDARA and Kiyoshi MATSUMOTO

Division of Food Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School Kyushu University,
6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

Benzoate, a food preservative, was quantitated using a D-amino acid oxidase (DAOD) immobilized reactor. The principle is based on the inhibitory activity of benzoate for D-amino acid oxidase. The measurement was performed by a flow injection analytical (FIA) technique equipped with a pump, a damper, an injector, an immobilized enzyme reactor, and an electrochemical detector. The carrier solution was 50 mM phosphate buffer (pH 8.3) containing 2 mM D-alanine and 10 μ M flavin adenine dinucleotide (FAD), and the constant level of hydrogen peroxide produced was measured as a base line. The decrease of hydrogen peroxide by the inhibitory activity of benzoate for D-amino acid oxidase was monitored as a response. The response was dependent on the benzoate concentration in the range between 5 μ M and 1 mM. The calibration curve produced linear line between responses and common logarithm of benzoate concentration, in the range of 5 μ M – 600 μ M. The relative standard deviation for nine successive injections was 1.3% for a 20 μ M benzoate level. The system was applied to the quantitation of benzoate in some beverages. The sample was prepared by only dilution, which consists of the same composition of the carrier solution. The results were in good agreement with those obtained by a conventional gas chromatographic (GC) method (with solvent extraction).

1 緒言

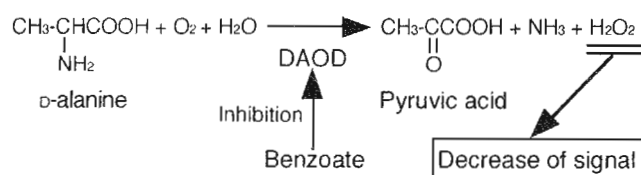
食品中には各種の保存料が添加され腐敗、変質などの原因となる菌の発育阻止に役立っている。各保存料の使用は食品衛生法などにより食品ごとに使用基準が定められており、例えばしょうゆ、清涼飲料水、果実酢、果実酒等の食品には有機酸及び有機酸エステル類などが使用されている。その中で安息香酸は安定で取り扱いやすい保存料として世界中で広く用いられているが、使用食品やその量について基準値を超えないよう適時分析する必要がある。安息香酸の

分析法としては、抽出、蒸留等の前処理の後、ガスクロマトグラフィー (GC, 質量分析検出法を含む)¹⁾⁻⁵⁾、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)⁶⁾⁻¹³⁾及びキャピラリー電気泳動法¹⁴⁾により定量する方法が用いられている。しかしながら、これら従来法は保存料の一斉分析には向いているものの、前処理操作に多くの時間を必要とし分析時間も比較的長いなど実用的でない点も多い。

近年、固定化生体触媒を用いたバイオセンシングの開発が進められており、その簡便性、経

済性、迅速性から注目を集めている¹⁵⁾。安息香酸に関連する酵素としては、Benzoate 4-monooxygenase(E.C.1.14.13.12, Benzoate 4-hydroxylase)¹⁶⁾及び Benzoate 1,2-dioxygenase(E.C.1.13.99.2, Benzoate hydroxylase)^{17),18)}があり、それぞれ、補酵素として NADPH および NADH を必要とし酸素消費を伴うので補酵素の減少量あるいは酸素消費量をモニターすることにより検出が可能と考えられる。しかしながら、これらの酵素は市販されておらず入手が困難なためセンサー化されたものは見当たらず、わずかに、Hamano ら¹⁹⁾が遊離の Benzoate 4-monooxygenase を用いた分光学的検出による酵素法を報告しているにすぎない。

一方、D-アミノ酸オキシダーゼ(E.C.1.4.3.3, DAOD)は安息香酸と安定な複合体を形成し、この複合体は基質である D-アラニンなどの過剰量により容易にホロ酵素となることが知られている²⁰⁾。すなわち、安息香酸は DAOD に対して拮抗的な阻害性を有することを意味している²¹⁾。したがって Scheme 1 に示すように、一定濃度の D-アラニンを基質とし酵素反応を連続的に行わせる系を設定しておき、安息香酸を含む試料を注入することにより安息香酸の濃度に応じた過酸化水素の減少量をモニターすることが可能である。そこで、本研究では安息香酸の DAOD に対する阻害性を利用した安息香酸測定用フロー型バイオセンサーの開発を試みた。



Scheme 1. Principle of the quantitation system.

2 実験

2.1 試薬

D-アミノ酸オキシダーゼ (DAOD, EC 1.4.3.3, ブタ腎臓抽出液, 15 U/mg) は Boehringer 社製のものを用いた。グルタルアルデヒド (GA, 25%水溶液, 電子顕微鏡用) 及び D-アラニンはナカライテスク社製を、またアミノプロピル多孔性ガラスビーズ (APCPG, 平均孔径 700 Å, 80~120 mesh) は Sigma 社製のものを用いた。安息香酸標準物質は (旧) 大阪工業試験所製 99.99%のものを用いた。アセトアニリドは和光純薬製を用いた。フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)は Boehringer 社製のものを用いた。ポリ-L-リシンヒドロブロミドは Sigma 社製、ポリ-(4-スチレンスルホン酸ナトリウム)は Aldrich 社製を用いた。その他の試薬はすべて市販の特級品をそのまま用いた。

2.2 リアクターの作製

APCPG への酵素の固定化は、既報^{22),23)}の方法に準じて次のように行った。APCPG (乾重量 100 mg) をガラスフィルター (G-3) 上脱イオン水で洗浄した後、50 mM 炭酸塩緩衝液 (pH 10.0) で調製した 5%GA 溶液 2 ml に移し、20℃で 2 時間反応させ APCPG にアルデヒド基を導入した (GA 活性化)。次に、GA 活性化された APCPG を 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 8.3, カップリング溶液) で洗浄し、DAOD を含む酵素溶液 (15 U/ml) 1 ml 中に移し、5℃で 16 時間反応させ固定化担体を得た。反応後、0.5 M 塩化ナトリウムを含むカップリング溶液及びカップリング溶液で洗浄し物理的に吸着している酵素を除去した。さらに、25 mg/ml の L-アラニン溶液 1 ml に移し、20℃で 2 時間反応させるこ

とにより未反応の活性基をブロックした。反応後、再び 0.5 M 塩化ナトリウムを含むカップリング溶液及びカップリング溶液で洗浄した。得られた固定化酵素担体は内径 3 mm, 長さ 6 cm のガラス管に充填しキャリアー溶液で置換してリアクターとした。なお、リアクターは 5℃ で保存した。

2.3 フローシステム

測定用フローシステムを Fig. 1 に示す。キャリアー溶液は HPLC 用マルチポンプ CCPM (トソー社製) によりダンパー (JASCO 社製 DU-4FN) を介して送液した。試料は六方バルブ (ジールサイエンス製 MPV-6) を回転させることによりライン中に注入され、酵素固定化リアクター内で反応しフローセルへと送液された。キャリアー溶液の流量は 1.0 ml/min とし、試料注入ループは 100 μ l を用いた。フローセルの白金電極には +0.65 V vs. Ag/AgCl を 3 電極方式で印加し、酵素反応によって増減する過酸化水素の酸化電流を研究室試作のポテンシヨスタット²²⁾によって電流・電圧変換した後、

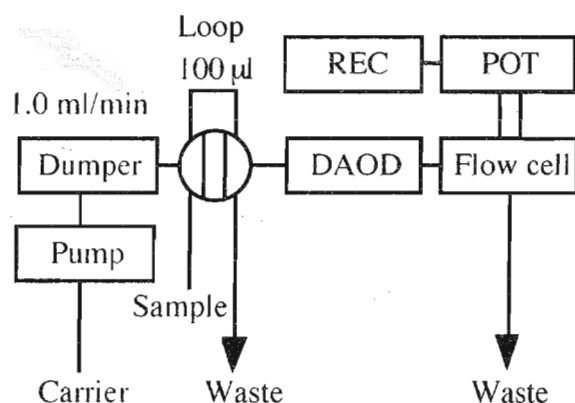


Fig. 1 Schematic representation of the FIA system for quantitation of benzoate
Carrier: 50 mM phosphate buffer (pH 8.3) containing 2 mM D-alanine;
DAOD: immobilized DAOD reactor;
POT: potentiostat; REC: recorder

TOA 製記録計 (FBR-252A 型) にて記録した。なお、フローセルは既報²²⁾と同タイプのものを用いたが、白金電極表面上を Mizutani ら²⁴⁾によって報告されたポリリシン/ポリスチレンスルホネート膜 (ポリイオンコンプレックス膜) で被覆した。すなわち、ポリ-L-リシン (モノマー単位で 20 mM) とポリ-4-スチレンスルホン酸塩 (モノマー単位で 25 mM) をそれぞれ 20 μ l ずつ電極上にスポットし風乾させることによりポリイオンコンプレックス膜を作製した。

2.4 GC 測定

GC 装置は島津製 GC-8A (FID 検出器), データ処理装置は島津製クロマトパック CR-6A を用いた。カラムは DB-WAX (0.32 mm ϕ ×30 m) を用い、カラム入口温度: 200℃, カラムオーブン温度: 200℃恒温, キャリヤー(He)流量: 30 ml/min の条件で, アセトアニリドを内標準物質として分析した。

2.5 実試料からの抽出及び前処理

試料は厚生省環境衛生局食品化学課²⁵⁾の推奨する操作に準じて液-液抽出によって調製した。但し、抽出はエーテル層への 1 回転溶とし簡略化した。希釈のみによる FIA 測定の試料調製は次のように行った。すなわち、4 mM D-アラニンを含む 100 mM リン酸塩緩衝液 (pH 8.3) で試料を等量混合した後、適切な希釈率 (50 ~ 100 倍) となるように 2 mM D-アラニンを含む 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 8.3) にて希釈した。

3 実験結果及び考察

3.1 キャリヤー溶液及び D-アラニン添加濃度

DAOD 反応の基質としては、 K_m 値の観点から、D-アラニン、D-プロリン、D-メチオニン、D-フェニルアラニン等が考えられるが、反応の pH 依存性、反応速度等は D-アラニンについて最も良く検討されている²⁶⁾⁻³⁰⁾。さらに DAOD 精製段階で、DAOD-安息香酸コンプレックスからのホロ酵素調製に D-アラニンが使用されることから²⁰⁾、安息香酸による阻害回復には最も都合が良いと考えた。したがって本研究では DAOD の反応基質として D-アラニンを選択した。

DAOD 反応の緩衝液としてリン酸塩緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、ピロリン酸塩緩衝液を適用し、本システムにおける D-アラニンの応答の変化を検討した。DAOD の至適 pH は 8.3 ~ 8.5 と報告^{20),26)}されていることから、本実験では特に pH の検討はせず各緩衝液における D-アラニンの応答の大きさのみを比較した。その結果 Fig. 2 に示すように、いずれの緩衝液についても D-アラニン 20 μ M ~ 1 mM の範囲で急激な応答の増加を示し、2 mM 付近で頭打ちとなりそれ以後はわずかに増加する程度であった。緩衝液の塩

の種類では、多くの DAOD 研究^{20),26)-30)}で用いられているピロリン酸塩緩衝液よりもリン酸塩緩衝液の方が若干高い値を示した。ホウ酸塩緩衝液ではリン酸塩緩衝液の応答の約 1/2 程度であった。リン酸塩緩衝液は pH 8.3 では緩衝能が劣るため、多くの研究でピロリン酸塩緩衝液を用いているものと推察されたが、本実験では応答の大きさを優先させてリン酸塩緩衝液を用いることとした。本システムにおいては一定濃度における D-アラニンの酵素反応進行状態で、試料中に存在する安息香酸により阻害される生成過酸化水素の減少量を信号として捉えるものであるため、わずかな安息香酸の変化により、より鋭敏に信号が変動する D-アラニン領域を求める必要がある。そこで、D-アラニン濃度 0.4, 2.0, 4.0 mM の 3 レベルで安息香酸の阻害に基づく応答の減少を検討した。Fig. 3 に示すように、0.4 mM では鋭敏度はあるものの、本来 D-アラニンの応答が小さいためダイナミックレンジが小さくなり、逆に 4.0 mM では D-アラニンの応答が十分プラトー領域にあるため鋭敏度が低く

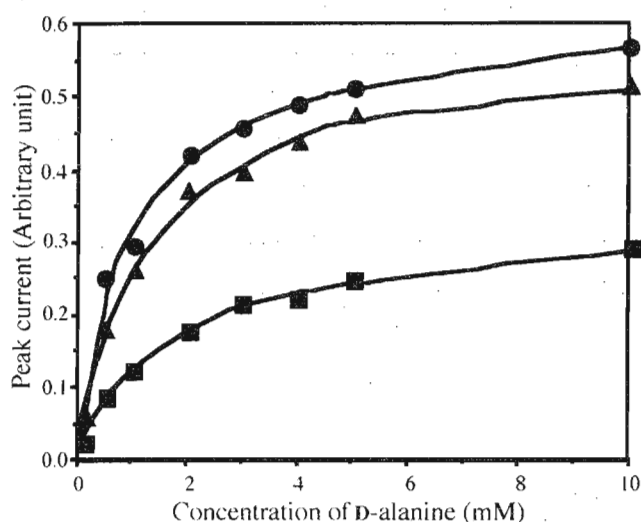


Fig. 2 Effect of the D-alanine concentration on the response.

- : 50 mM phosphate buffer (pH 8.3);
- ▲—▲: 50 mM pyrophosphate buffer (pH 8.3);
- : 50 mM borate buffer (pH 8.3)

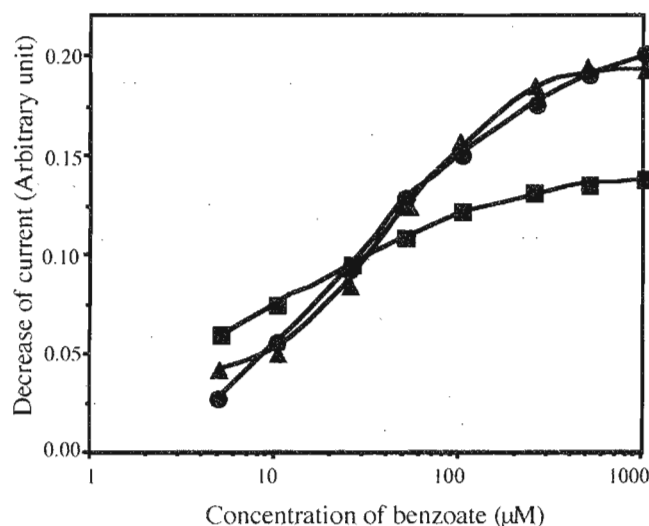


Fig. 3 Effect of the D-alanine concentration in the carrier solution on the response of benzoate.

- Concentration of D-alanine : 0.4 mM (■), 2 mM (●), 4 mM (▲)

なった。すなわち、ダイナミックレンジと鋭敏度を兼ね備えている D-アラニン濃度の領域は 2 mM 程度と判断され、以後キャリアー溶液として 2.0 mM D-アラニンを含む 50 mM リン酸塩緩衝液(pH8.3)を用いることとした。

3.2 FAD 濃度

DAOD 分子は補酵素として FAD を含みホロ酵素を形成しその活性を維持している²⁰⁾。したがって、FAD を外部から加えることによってその活性及び安定性に効果があるものと期待された。そこで、FAD 添加による D-アラニンの応答の変化を検討した。Fig. 4 に示すように、FAD 添加によって D-アラニンの応答は若干増大するが、もともと DAOD 分子内に FAD が存在するので外部から添加した FAD の効果はさほど大きなものではなかった。しかしながら、酵素リアクターの安定性には寄与することが期待できたので 10 μ M レベルの FAD をキャリアー溶液中に添加することとした。

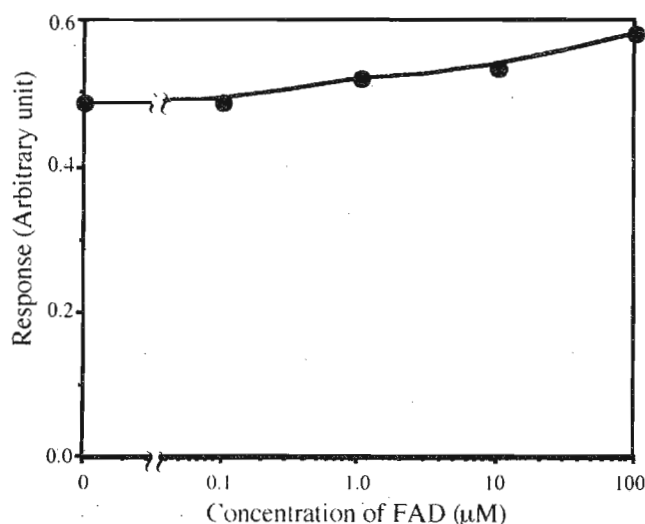


Fig. 4 Effect of FAD in the carrier solution on the response of benzoate.
Carrier solution : 50 mM phosphate buffer (pH 8.3) containing 2 mM D-alanine and various concentration of FAD.

3.3 流量

Fig. 5 にセンサー応答並びに応答ピークのベースラインへの復帰時間 (90%復帰) に及ぼす流量の影響を示す。流量を 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 ml/min で行ったところ、センサー応答とベースラインへの復帰時間は流量の増加に伴い減少傾向を示した。そこで応答の大きさと試料処理速度を勘案し流量として 1.0 ml/min を選択した。

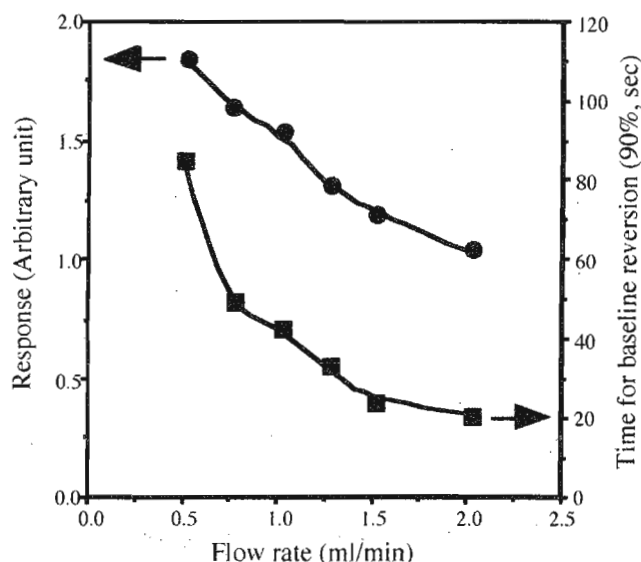


Fig. 5 Effect of flow rate on the response (●) and the time for baseline reversion (■).

3.4 共存物質による影響

本センサーシステムは、DAOD に対する安息香酸の阻害性を利用するバイオセンシングであるため、食品試料中に存在する共存物質が影響を及ぼすことが考えられた。そこで、まず食品中に存在することが一般に考えられる成分についてその妨害の程度を検討した。50 μ M レベルの安息香酸の応答を基準とした場合、スクロース、グルコース、フルクトース、ラクトース等の糖類は 10 mM レベルまで全く影響はなかった。無機塩類については、 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 等の

陽イオン, Cl^- , CO_3^{2-} , NO_3^- , SO_4^{2-} 等の陰イオンは共に 1 mM レベルでほとんど影響はなかった. Table 1 に有機酸及び他の保存料, エタノール等の妨害の程度について示す. クエン酸, リンゴ酸, 乳酸, ピルビン酸等の有機酸は 1 mM レベルで若干の影響が認められるものもあったが, ソルビトール, *p*-ヒドロキシ安息香酸エチル等の保存料は影響しなかった. エタノールについては 0.1%までほとんど妨害はなかった. アスコルビン酸は 10 μM レベルまで影響はなかったが, 100 μM でベースラインに対して正 (増加) の信号を与えた. アスコルビン酸はポリイオンコンプレックス膜をある程度通過し白金電極上で直接酸化を受けるためこの妨害は除去できないものと判断され, アスコルビン酸を含む試料については ASOD-spatula (アスコルビン酸オキシダーゼスパチュラ) による酵素分解により対処することことが望ましいと考えられた³¹⁾. また, 有機酸類の若干の妨害は希釈により対処できるレベルと判断された. 一方, DAOD に対する作用は, 阻害物質として安息香酸だけでなく

Table 1 Effect of organic acids, preservatives and other food constituents on the sensor responses.

Compounds	Concentration	Relative response (%)
Benzoate	50 μM	100
Citrate	1 mM	2.3
	5 mM	22.7
Malate	1 mM	N.D
	5 mM	2.3
Lactate	1 mM	10.5
	5 mM	52.3
Pyruvate	1 mM	N.D
	5 mM	9.0
Sorbitol	1 mM	N.D
Ethyl- <i>p</i> -hydroxy-benzoate	1 mM	N.D
Ethanol	0.01%	N.D
	0.10%	3.0
Ascorbate	10 μM	N.D
	100 μM	6.8*

N.D : not detected ; * : positive signal from the baseline.

脂肪酸類, 脂肪酸類縁化合物, 基質として一部のアミノ酸類 (グリシン, L-プロリン) が報告されている^{20),28)}. Table 2 から明らかなように, グリシン, L-プロリンによる基質としての正の影響は 10 mM レベルまでほとんど認められなかったが, 脂肪酸類, 脂肪酸類縁化合物は大きな阻害性を示し妨害となることが認められた. 脂肪酸類縁化合物は食品中にはほとんど存在しないので無視できるものと考えられたが, 脂肪酸を多量に含む食品の場合は希釈によって対処は困難であり, 液-液抽出による前処理が必要と考えられた.

Table 2 Effect of fatty acids, hydroxy (oxo) fatty acids and amino acids on the sensor responses.

Compounds	Concentration	Relative response (%)
Benzoate	50 μM	100
Acetate-Na	1 mM	N.D
	10 mM	N.D
Propionate-Na	1 mM	N.D
	10 mM	N.D
n-Caproate-Na	1 mM	47.9
Laurate-Na	1 mM	9.7
D,L-2-Hydroxy-n-butyric acid	1 mM	63.6
2-Hydroxy octanoic acid	1 mM	30.9
2-Oxobutyric acid	1 mM	10.2
Glycine	1 mM	N.D
	10 mM	N.D
L-Proline	1 mM	N.D
	10 mM	N.D

N.D : not detected

3.5 検量線, 再現性, 安定性及び回収実験

典型的な FIA-gram を Fig. 6 に示す. 安息香酸の応答は Fig. 2 のように阻害効果であるため検量線としては, 濃度の対数に対して応答ピークをプロットして作成した. その結果, 5 μM ~ 1 mM の範囲で濃度依存的な挙動を示し, 5 μM ~ 600 μM の範囲で直線回帰が可能であった. また, その検出限界は 2 μM (S/N=3) であった.

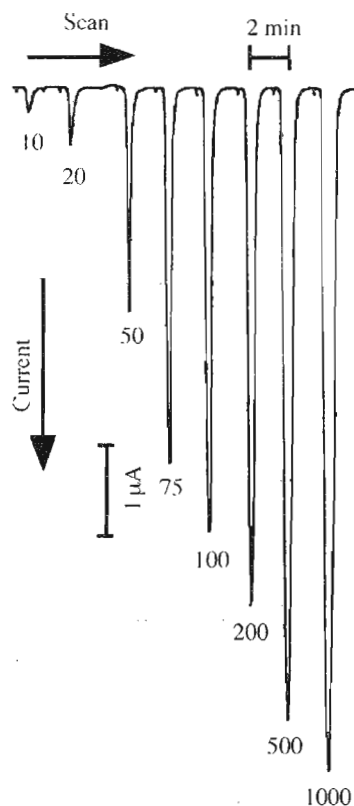


Fig. 6 Typical FIA responses for benzoate.
Flow rate: 1.0 ml/min; Carrier
solution: 50 mM phosphate buffer
(pH 8.3) containing 2 mM D-alanine;
Applied potential: +0.65 V vs. Ag/AgCl

なお、回帰式は $Y = 0.607X + 0.309$ (相関係数 $r=0.996, n=8$) ; Y : ピーク電流(μA), X : $\log$ [安息香酸濃度(μM)] であった。また、20 μM における9回の繰り返し測定の変動係数は1.3%であった。センサー応答はピーク立ち上がりからベースライン復帰(完全復帰)まで約2分であり、1時間に30検体の分析が可能であった。

キャリアー溶液に10 μM レベルのFADを添加することにより、8時間の測定ではベースラインの低下は認められなかった。しかしながら、毎日の測定では、漸次ダイナミックレンジの減少傾向が認められ、約3週間で酵素リアクターを更新する必要があった。

既知量の安息香酸を2段階の濃度で添加して、その回収率を希釈のみによるFIA (FIA1), 液-

液抽出/FIA (FIA2), 液-液抽出/GC で比較した。Table 3のように、FIA1 及び FIA2 は GC 法とほぼ同等の回収率を示した。

Table 3 Recovery test of benzoate.

GC Extraction			FIA1 Dilution			FIA2 Extraction		
A (mM)	F (mM)	R (%)	A (mM)	F (mM)	R (%)	A (mM)	F (mM)	R (%)
-	1.04	-	-	1.05	-	-	1.02	-
0.41	1.46	100.6	0.86	1.86	97.9	0.42	1.38	96.6
0.82	1.83	98.5	1.70	3.04	110.8	0.84	2.05	110.4

Cola drink was spiked with benzoate.
A: added; F: found; R: recovery

3.6 実試料への適用と GC 法との比較

数種の清涼飲料、健康飲料中の安息香酸量を本 FIA システムで定量し、GC 法による結果と比較した。Table 4 から明らかなように、本 FIA による結果は GC 法の結果と良好に一致し、対になったデータの t -検定 (paired t -test) では FIA1 と GC で $t = -0.516$ となり $p < 0.05$ の危険率 (t の臨界値 $t = 2.78$) でそれぞれの方法が与える平均濃度に有意な差はないと判定された。当然、FIA2 と GC についても $t = -0.334$ となり有意な差は認められなかった。したがって、高濃度の脂肪酸を含まない試料では、キャリアー溶液による希釈のみで本 FIA システムで安息香酸の定量が可能であることが確認された。

Table 4 Comparison of the FIA1, FIA2-methods with the GC method.

Sample	GC Extraction (mM)	FIA 1 Dilution (mM)	FIA 2 Extraction (mM)
Cola drink 1.	1.039	1.017	1.027
Cola drink 2	1.037	1.049	0.978
Carbonated drink	1.074	1.030	1.074
Syrup	2.310	2.493	2.582
Nutrient drink	4.035	4.012	3.941

文献

- 1) 豊田正武, 金森孝子, 伊藤誉志男, 慶田雅洋 :
衛生化学, **23**, 100 (1977).
- 2) K. Isshiki, S. Tsumura, T. Watanabe: *Agric.
Biol. Chem.*, **44**, 1601 (1980).
- 3) R. G. Coelho, D. L. Nelson: *J. Assoc. Off.
Anal. Chem.*, **66**, 209 (1983).
- 4) B. K. Larsson: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**,
775 (1983).
- 5) 落合伸夫, 山上 仰, 代島茂樹 : 分析化学
(*Bunseki Kagaku*), **45**, 545 (1996).
- 6) U. Leuenberger, R. Gauch. E. Baumgartner:
J. Chromatogr., **173**, 343 (1979).
- 7) M. L. Puttemans, C. Branders, L. Dryon, D. L.
Massart: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 80
(1985).
- 8) M. S. Ali: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 488
(1985).
- 9) L. V. Bui, C. Cooper: *J. Assoc. Off. Anal.
Chem.*, **70**, 892 (1987).
- 10) Y. Ikai, H. Oka, N. Kawamura, M. Yamada:
J. Chromatogr., **457**, 333 (1988).
- 11) F. J. E. M. Küppers, J. A. Jans: *J. Assoc. Off.
Anal. Chem.*, **71**, 1068 (1988).
- 12) H. S. Lee: *J. AOAC International*, **78**, 80
(1995).
- 13) A. Montano, A. H. Sánchez, L. Rejano:
Analyst, **120**, 2483 (1995).
- 14) M. Jimidar, T. P. Hamoir, A. Foriers, D. L.
Massart : *J. Chromatogr.*, **636**, 179 (1993).
- 15) 受田浩之 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*) , **48**,
183 (1999).
- 16) C. C. Reddy, C. S. Vaidyanathan: *Biochim.
Biophys. Acta*, **384**, 46 (1975).
- 17) M. Yamauchi, T. Yamaguchi, H. Fujisawa:
Biochem. Biophys. Res. Commun., **67**, 264
(1975).
- 18) M. Yamaguchi, H. Fujisawa: *J. Biol. Chem.*,
255, 5058 (1980).
- 19) T. Hamano, Y. Mitsunashi, N. Aoki, M.
Semma, Y. Ito: *Analyst*, **122**, 259 (1997).
- 20) K. Yagi: *Meth. Enzymol.*, **17B**, 608 (1971).
- 21) J. R. Klein, H. Kamin: *J. Biol. Chem.*, **138**,
507 (1941).
- 22) K. Matsumoto, H. Kamikado, H. Matsubara,
Y. Osajima: *Anal. Chem.*, **60**, 147 (1988).
- 23) K. Matsumoto, K. Sakoda, Y. Osajima: *Anal.
Chim. Acta*, **261**, 155 (1992).
- 24) F. Mizutani, S. Yabuki, Y. Hirata: *Denki
Kagaku*, **63**, 1100 (1995).
- 25) 厚生省環境衛生局食品課編 : “食品中の食品
添加物分析法” p.137, (1982) , (講談社).
- 26) K. Burton: *Meth. Enzymol.*, **2**, 199 (1955).
- 27) M. Dixon, K. Kleppe: *Biochim. Biophys. Acta*,
96, 357 (1965).
- 28) M. Dixon, K. Kleppe: *Biochim. Biophys. Acta*,
96, 368 (1965).
- 29) M. Dixon, K. Kleppe: *Biochim. Biophys. Acta*,
96, 383 (1965).
- 30) M. Miyano, K. Fukui, F. Watanabe, S.
Takahashi, M. Tada, M. Kanashiro, Y.
Miyake: *J. Biochem.*, **109**, 171 (1991).
- 31) 松本 清, 樋口元信, 高山聖史, 塚谷忠之 :
J. Flow Injection Anal., **17**, 43(2000).

(Received September 28, 2000)

(Accepted October 30, 2000)