

## グルコン酸鉄(Ⅱ)の殺菌作用およびファージ不活化作用

村田 晃\*・酒見 博士・椎葉 和恵・加藤 富民雄・神田 康三  
( 応用微生物学研究室 )  
平成20年11月28日 受理

### Bactericidal and Phage-Inactivating Effects of Iron(II) Gluconate

Akira MURATA\*, Hirohito SAKEMI, Kazue SHIIBA, Fumio KATO and Kohzo KANDA  
(Laboratory of Applied Microbiology)  
Received November 28, 2008

#### Summary

Effect of iron(II) gluconate on bacteria was investigated using eight bacteria. It was bactericidal toward all bacteria examined. The bacteria were sensitive to iron(II) gluconate in this order from greatest to least; *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus flavus*. Also, effect of iron(II) gluconate on phages was investigated using eight phages. It inactivated all phages examined. The phages were sensitive to iron(II) gluconate in this order from greatest to least;  $\phi 6$ , J1, M2, MS2, T3,  $\phi X174$ , T5 and T4. Gluconic acid had no effects on bacteria and phages.

The mechanism of the bactericidal effect of iron(II) gluconate was investigated with *E. coli*. The results indicated that free radical mechanism is involved in the bactericidal effect and reactive oxygen species are responsible for the effect. Also, the mechanism of the phage-inactivating effect of iron(II) gluconate was investigated with phage J1. The results indicated that free radical mechanism is involved in the inactivating effect and reactive oxygen species are responsible for the effect.

**Key words:** iron(II) gluconate, gluconic acid, bactericidal effect, phage-inactivating effect,

#### 緒 言

著者らは、アスコルビン酸の細菌およびファージに対する作用に関して一連の研究を行ってきた。アスコルビン酸は、多種の細菌に対して殺菌作用を示した<sup>1,2)</sup>。また、広範な種類のファージに対して不活化作用を示した<sup>3,4,5,6)</sup>。しかし、アスコルビン酸の作用は、大きいものではなかった。そこで、殺菌作用およびファージ不活化作用に関する研究は、より大きい作用を有する化合物を探して、アスコルビン酸関連化合物に広がった。

検討した化合物のなかで、最も大きい作用を有するものは、アスコルビン酸と2価鉄の錯体、およびアスコルビン酸の立体異性体であるD アラボ アスコルビン酸と2価鉄の錯体であった。アスコルビン酸 2価鉄錯体は、アスコルビン酸の100~2000倍大きい殺菌作用を示し<sup>7,8)</sup>、ま

\* 現在：佐賀短期大学食物栄養学科 (〒840 0806 佐賀市神園3 - 18 - 15)

た1000~20,000倍という強大なファージ不活化作用を示した<sup>9, 10)</sup>。D アラボ アスコルビン酸 2価鉄錯体は、アスコルビン酸 2価鉄錯体とほぼ同程度の殺菌作用<sup>11)</sup>およびファージ不活化作用を有していた<sup>12)</sup>。この2種の錯体の作用における2価鉄の役割を追究する過程において、2価鉄自体、大きい殺菌作用を有することを見出した<sup>13)</sup>。

アスコルビン酸、アスコルビン酸 2価鉄錯体、D アラボ アスコルビン酸 2価鉄錯体、2価鉄の殺菌作用およびファージ不活化作用の機構については、活性酸素種が関与するフリーラジカル反応機構によることを明らかにしている<sup>2, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18)</sup>。

同じ有機酸であるグルコン酸およびその関連化合物の細菌およびファージに対する作用については研究されていない。そこで、グルコン酸とその2価鉄塩であるグルコン酸鉄(Ⅱ)について、細菌およびファージに対する作用を検討した。そして、グルコン酸鉄(Ⅱ)は、殺菌作用およびファージ不活化作用を有することを見出し、さらに殺菌作用およびファージ不活化作用の反応機構について研究したので報告する。

## 実験方法

### 1. 試薬

グルコン酸鉄(Ⅱ)は、藤沢薬品工業(現・アステラス製薬)特薬研究所において、グルコン酸液を鉄塩とする製法で調製された無水グルコン酸鉄(Ⅱ)[Fe(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>]を使用した。なお、市販試薬のグルコン酸鉄(Ⅱ)は、二水和物かn水和物である。

2 アミノエチルイソチウロニウム(AET)と2メルカプトエチルアミン(MEA)はナカライテスクの製品、1A ジアザピシクロ[2.2.2]オクタン(DABCO)はシグマアルドリッチジャパンの製品、カタラーゼとスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)はSigma Chemical社の製品、その他の試薬は和光純薬工業の製品を使用した。

### 2. 細菌

Table 1 に示す8属8種を使用した。培地は、通常のブイヨン培地を使用した。L. casei はMRT培地<sup>19)</sup>を使用した。培養は、37℃で振盪培養したが、L. casei は静置培養した。

Table 1. List of bacteria used.

Bacterial strain	Abbreviation
<i>Bacillus subtilis</i> YS11	BS
<i>Escherichia coli</i> B	EC
<i>Lactobacillus casei</i> S1	LC
<i>Micrococcus flavus</i> IFO 3242	MF
<i>Morganella morganii</i> IFO 3168	MM
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3988	PV
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	SA
<i>Salmonella typhimurium</i> LT-2	ST

### 3. 細菌の計数

通常のコロニーカウント法によった。L. casei は、改変重層法によるコロニーカウント法<sup>20)</sup>によった。

#### 4. 細菌に対する作用

0.02M トリス 塩酸緩衝液 (pH7.4) に菌 ( $1 \sim 4 \times 10^7$  CFU/ml) とグルコン酸鉄(Ⅱ)を混和し, 37°Cで60分間(実験によっては30分間)反応させ, 生存する菌を計数する方法によった.

#### 5. ファージ

Table 2 に示す核酸, 形態, 宿主菌などが相違する 8 種を使用した.

Table 2. List of phages used.

Phage	Nucleic acid <sup>a</sup>	Morphology <sup>b</sup>	Host bacteria
J1	ds DNA	A	<i>Lactobacillus casei</i> S1
T5	ds DNA	A	<i>Escherichia coli</i> B
T4	ds DNA	B	<i>Escherichia coli</i> B
M2	ds DNA	B	<i>Bacillus subtilis</i> YS11
T3	ds DNA	C	<i>Escherichia coli</i> B
φX174	ss DNA	D	<i>Escherichia coli</i> C
MS2	ss RNA	E	<i>Escherichia coli</i> K-12 W3110 F <sup>+</sup>
φ6	ds RNA	F	<i>Pseudomonas phaseolicola</i> HB10Y

<sup>a</sup> ds, double-stranded; ss, single-stranded

<sup>b</sup> A, long tail; B, contractile tail; C, short tail; D, tailless, large capsomere; E, tailless, small capsomere; F, saclike tail, head surrounded by envelope.

#### 6. ファージの計数

通常のブラークカウント法によった. J1 ファージは, 改変重層法によるブラークカウント法<sup>20)</sup>によった.

#### 7. ファージに対する作用

0.02M トリス 塩酸緩衝液 (pH7.4) にファージ ( $1 \sim 4 \times 10^7$  PFU/ml) とグルコン酸鉄(Ⅱ)を混和し, 37°Cで30分間反応させ, 生存するファージを計数する方法によった. φ6 ファージは, 37°Cで不安定なので, 25°Cで20分間反応させた.

#### 8. その他

その他の実験方法は, 通常の方法にしたがった.

### 結果および考察

#### 1. グルコン酸およびグルコン酸鉄(Ⅱ)の細菌に対する作用

グルコン酸およびグルコン酸鉄(Ⅱ)の細菌に対する作用について, 8種の菌を用いて検討した. 結果は Table 3 に示す.

グルコン酸は, 高濃度の $10^{-3}$ M でも全ての菌に殺菌作用を示さなかった.

グルコン酸鉄(Ⅱ)は, 菌種によって程度の違いはあるが, 全ての菌に対して殺菌作用を示した. グルコン酸鉄(Ⅱ)に対する菌の感受性は, 高いほうから *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus* の順であった. 感受性の最も高い *S. typhimurium* は, 低濃度の  $3 \times 10^{-5}$

Table 3. Effect of gluconic acid and iron(II) gluconate on a wide variety of bacteria.

Concn. (M)	Survival (%)							
	Bacteria							
	BS	EC	LC	MF	MM	PV	SA	ST
Gluconic acid								
$1 \times 10^{-3}$	90~100	90~100	90~100	90~100	90~100	90~100	90~100	90~100
Iron(II) gluconate								
$1 \times 10^{-3}$	0	0	0	30~40	0	0	0	0
$3 \times 10^{-4}$	0	0	0	50~60	1~2	0	10~20	0
$1 \times 10^{-4}$	0	1~2	1~2	60~80	5~10	0	30~50	0
$3 \times 10^{-5}$	5~10	10~20	40~60	90~100	30~50	5~10	90~100	0~1
$1 \times 10^{-5}$	20~40	40~60	90~100		90~100	15~30		5~10

Bacteria ( $1 \sim 4 \times 10^7$  CFU/ml) were incubated with gluconic acid or iron(II) gluconate in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 60 min. at 37°C.

M で生存率が 0 ~ 1 % であり, 最も低い *M. flavus* は, 高濃度の  $1 \times 10^{-3}$  M で 30 ~ 40% である.

## 2. グルコン酸およびグルコン酸鉄(II)のファージに対する作用

グルコン酸およびグルコン酸鉄(II)のファージに対する作用について, 8種のファージを用いて検討した. 結果は Table 4 に示す.

グルコン酸は, 高濃度の  $10^{-3}$  M でも全てのファージに不活化作用を示さなかった.

グルコン酸鉄(II)は, 種類によって程度の違いはあるが, 全てのファージを不活化した. 数種のファージには,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M オーダーの低濃度でも作用を示した. グルコン酸鉄(II)に対するファージの感受性は, 高いほうから J1, M2, MS2, T3,  $\phi$ X174, T5, T4 ファージの順であった.  $\phi$ 6 ファージは, 反応の温度と時間が違うので直接比較できないが, 低温(25°C), 短時間(20分)の反応で, 37°C, 30分間反応の J1 ファージとほぼ同程度の作用なので, J1 ファージより感受性は高いと推考される. すなわち, 検討したファージのなかで,  $\phi$ 6 ファージがグルコン酸鉄(II)に対する感受性は最も高いといえる.

グルコン酸は, 殺菌作用およびファージ不活化作用を示さないのに, 2価鉄は, 強い殺菌作用およびファージ不活化作用を有している<sup>12)</sup>. したがって, グルコン酸鉄(II)の作用は, 主として, その2価鉄に基因していると考えられる.

Table 4. Effect of gluconic acid and iron(II) gluconate on a wide variety of phages.

Concn. (M)	Survival (%)							
	Phage							
	J1	T5	T4	M2	T3	$\phi$ X174	MS2	$\phi$ 6
Gluconic acid								
$1 \times 10^{-3}$	90~100	90~100	90~100	90~100	90~100	90~100	90~100	90~100
Iron(II) gluconate								
$1 \times 10^{-3}$	0	30~50	40~60	0	0	0	0	0
$1 \times 10^{-4}$	0	60~80	70~90	0	0	0	0	0
$1 \times 10^{-5}$	0	90~100	90~100	0	1~2	3~5	0	0
$1 \times 10^{-6}$	3~5			10~20	30~60	50~80	15~30	5~10
$3 \times 10^{-7}$	20~40			40~60	90~100	90~100	50~70	40~60

Phages ( $1 \sim 4 \times 10^7$  PFU/ml) were incubated with gluconic acid or iron(II) gluconate in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 30 min. at 37°C. Phage  $\phi$ 6 was incubated for 20 min. at 25°C.

### 3. グルコン酸鉄(Ⅱ)の殺菌作用の機構

グルコン酸鉄(Ⅱ)の殺菌作用の機構を解明するために、グルコン酸鉄(Ⅱ)の殺菌作用に影響する因子について検討した。 $1 \times 10^{-4}$  Mのグルコン酸鉄(Ⅱ)と *E. coli* を37°Cで30分間インキュベートし、菌の生存率が10%のときを基準とした。そして、金属イオン、金属キレート剤、酸化剤、還元剤、ラジカル捕捉剤の影響について検討した。結果は Table 5 に示す。

遷移金属イオンの  $\text{Cu}^{2+}$  と  $\text{Fe}^{2+}$  は、殺菌作用を著しく促進した。金属キレート剤のクエン酸塩と EDTA は、作用を完全に阻害した。酸化剤の  $\text{H}_2\text{O}_2$  は、作用を著しく促進した。還元剤の 2-メルカプトエタノールは、作用を完全に阻害した。また、L-システイン、チオグリコレート、グルタチオン、ジチオスレイトールは、作用を阻害した。一般的なラジカル捕捉剤である AET と MEA は、作用を完全に阻害した。特異的なラジカル捕捉剤のうち、スーパーオキシドアニオンラジカル( $\text{O}_2^-$ )の特異的捕捉剤である 1,2-ジヒドロキシベンゼン 3,5-ジスルホン酸(Tiron)は、作用を完全に阻害した。ヒドロキシルラジカル( $\text{OH}\cdot$ )の特異的捕捉剤であるチオシアン酸カリウム、ギ酸ナトリウム、臭化カリウム、ヨウ化カリウムは、作用を阻害した。一重項酸素( $^1\text{O}_2$ )の失活剤である DABCO は、作用を完全に阻害した。

酵素のカタラーゼと SOD の影響について検討した結果は、Table 6 に示す。 $\text{H}_2\text{O}_2$  の分解反応を触媒するカタラーゼは、作用をわずかに阻害した。また、 $\text{O}_2^-$  の不均化反応を触媒する SOD は、作用をわずかに阻害した。

以上総合すると、グルコン酸鉄(Ⅱ)の殺菌作用にフリーラジカル反応機構が関与していて、

Table 5. Effect of selected substances on killing of *E. coli* by iron(II) gluconate.

Addition	Concn. (M)	Survival (%)
None	0	10
$\text{Cu}^{2+}$	$10^{-7}$	1~2
$\text{Fe}^{2+}$	$10^{-7}$	1~2
Citrate	$10^{-4}$	90~100
EDTA	$10^{-4}$	90~100
$\text{H}_2\text{O}_2$	$10^{-4}$	1~2
2-Mercaptoethanol	$10^{-2}$	90~100
L-Cysteine	$10^{-3}$	60~80
Thioglycollate	$10^{-2}$	60~80
Glutathione	$10^{-3}$	50~70
Dithiothreitol	$10^{-3}$	40~60
AET <sup>a</sup>	$10^{-3}$	90~100
MEA <sup>b</sup>	$10^{-3}$	90~100
Tiron <sup>c</sup>	$10^{-4}$	90~100
KSCN	$10^{-1}$	70~90
HCOONa	$10^{-1}$	70~90
KBr	$10^{-1}$	60~80
KI	$10^{-1}$	50~70
DABCO <sup>d</sup>	$10^{-1}$	90~100

*E. coli* ( $4 \times 10^7$  PFU/ml) was incubated with  $1 \times 10^{-4}$  M iron(II) gluconate and an additional substance in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 30 min. at 37°C.

<sup>a</sup> 2-Mercaptoethylamine

<sup>b</sup> 2-Aminoethylisothiuronium

<sup>c</sup> 1,2-Dihydroxybenzene-3,5-disulfonic acid

<sup>d</sup> 1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octane

Table 6. Effect of catalase and SOD on killing of *E. coli* by iron(II) gluconate.

Addition	Concn. (U/ml)	Survival (%)
None	0	10
Catalase	100	20 ~ 30
	30	15 ~ 25
	10	10 ~ 20
SOD <sup>a</sup>	100	20 ~ 30
	30	15 ~ 25
	10	10 ~ 20

See the legend to Table 5, but an enzyme was used instead of a substance.

<sup>a</sup> Superoxide dismutase

菌細胞の内外で生成する  $O_2$ ,  $OH\cdot$ ,  $^1O_2$  などの活性酸素種が直接的, 間接的に作用すると考えられる. 菌細胞内において細胞膜近くで生成する活性酸素種は, 細胞内膜に結合しているクロモソーム DNA ないし内膜近くに局在する DNA に損傷を与えるであろう. 菌細胞外で生成する活性酸素種は, 細胞表層 (外膜) に酸化的損傷を与えるであろう<sup>21)</sup>.

細菌のグルコン酸鉄 (II) に対する感受性は, 菌種によって相違する. これは, 菌の細胞膜透過性, 細胞内における活性酸素種の生成系・反応系・消去系, クロモソーム DNA の構造, 修復系などの違いによると考えられる<sup>21)</sup>.

なお,  $O_2$  の不均化反応を触媒する SOD は, 作用の阻害はわずかなのに,  $O_2$  の特異的捕捉剤である Tiron は, 作用を完全に阻害する. この矛盾は, Tiron の金属キレート作用<sup>22)</sup>によるものであって,  $O_2$  の直接的な関与を示すものではないと説明できる.

#### 4. グルコン酸鉄 (II) のファージ不活化作用の機構

グルコン酸鉄 (II) のファージ不活化作用の機構を解明するために, J1 ファージを用いて研究した. 反応混液に, 金属イオン, 金属キレート剤, 酸化剤, 還元剤, ラジカル捕捉剤, 酵素を添加して, グルコン酸鉄 (II) のファージ不活化作用に及ぼす影響について検討した (表省略).

遷移金属イオンの  $Cu^{2+}$  と  $Fe^{2+}$  は, 不活化作用を促進した. 金属キレート剤のクエン酸塩と EDTA は, 作用を阻害した. 酸化剤の  $H_2O_2$  は, 作用を促進した. 還元剤の 2-メルカプトエタノールと L-システインは, 作用を阻害した. 一般的なラジカル捕捉剤の AET と MEA は, 作用を阻害した. 特異的なラジカル捕捉剤のうち,  $O_2$  の特異的捕捉剤である Tiron は, 作用を阻害した.  $OH\cdot$  の特異的捕捉剤であるギ酸ナトリウムとチオシアン酸カリウムは, 作用を阻害した.  $^1O_2$  の失活剤である DABCO は, 作用を阻害した. 酵素のカタラーゼと SOD は, 作用を阻害した.

したがって, グルコン酸鉄 (II) のファージ不活化作用は, 殺菌作用と同様, 活性酸素種が関与するフリーラジカル反応機構によると考えられる.

#### 摘 要

1) グルコン酸およびグルコン酸鉄 (II) の細菌に対する作用について, 8 種の菌を用いて検討した. グルコン酸は, 全ての菌に殺菌作用を示さなかった. グルコン酸鉄 (II) は, 菌種によって程度の違いはあるが, 全ての菌に対して殺菌作用を示した. グルコン酸鉄 (II) に対

する菌の感受性は、高いほうから *S. typhimurium*, *P. vulgaris*, *B. subtilis*, *E. coli*, *L. casei*, *M. morganii*, *S. aureus*, *M. flavus* の順であった。

2) グルコン酸およびグルコン酸鉄(Ⅱ)のファージに対する作用について、8種のファージを用いて検討した。グルコン酸は、全てのファージに不活化作用を示さなかった。グルコン酸鉄(Ⅱ)は、種類によって程度の相違はあるが、全てのファージに対して不活化作用を示した。グルコン酸鉄(Ⅱ)に対するファージの感受性は、高いほうから  $\phi 6$ , J1, M2, MS2, T3,  $\phi X174$ , T5, T4 ファージの順であった。

3) グルコン酸鉄(Ⅱ)の殺菌作用の機構について検討した。その結果、活性酸素種が関与するフリーラジカル反応機構によると考えられた。

4) グルコン酸鉄(Ⅱ)のファージ不活化作用について検討した。その結果、殺菌作用と同様、活性酸素種が関与するフリーラジカル反応機構によると考えられた。

## 引用文献

1. 村田 晃・矢野信子(1990). 細菌及び酵母に対するアスコルビン酸の殺菌作用. ビタミン **64**, 709-713
2. 村田 晃・木下玲子・井上由美・加藤富民雄(1991). アスコルビン酸の *Escherichia coli* に対する殺菌作用. ビタミン **65**, 439-445
3. Murata, A., K. Kitagawa and R. Saruno (1971). Inactivation of phages by ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 294-296
4. Murata, A., K. Kitagawa, H. Inmaru and R. Saruno (1972). Inactivation of single-stranded DNA and RNA phages by ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2597-2599
5. 村田 晃・末永 光・井上美千代・田中良博・加藤富民雄(1983). 2本鎖 RNA ファージに対するアスコルビン酸の不活化作用. ビタミン **57**, 515-521
6. 村田 晃・森本和恵・加藤富民雄・神田康三(2008). アスコルビン酸の S 系ファージに対する作用. ビタミン **82**, 503-505
7. 盧 日煥・岸川茂樹・亀崎裕子・加藤富民雄・村田 晃(1991). 2価鉄 アスコルビン酸錯体の細菌に対する作用. 農化 **65**, 1761-1768
8. 盧 日煥・岸川茂樹・山田いずみ・日高敏勝・加藤富民雄・村田 晃(1992). 2価鉄 アスコルビン酸錯体の殺菌作用. ビタミン **66**, 109-116.
9. Lho I., K. Morita, H. Miyake, K. Sakamoto, T. Hidaka, K. Kanda, F. Kato and A. Murata (1992). Phage-inactivating effect of iron(II)-ascorbate complex. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 720-724
10. 盧 日煥・森多浩三・白川聡子・加藤富民雄・村田 晃(1992). 2価鉄 アスコルビン酸錯体の T5 ファージに対する不活化作用. ビタミン **66**, 315-321
11. 村田 晃・東保良典・山内真理子・小原 香・木戸君江・加藤富民雄・神田康三(2008). D アラボ アスコルビン酸 2価鉄錯体の殺菌作用. ビタミン **82**, 321-327
12. 村田 晃・佐藤円康・北村ミエ子・大澤由香・田口智美・福島千浪・神田康三・加藤富民雄(2007). D アラボ アスコルビン酸 2価鉄錯体のファージ不活化作用. ビタミン **81**, 531-540
13. 村田 晃・日高敏勝・神田康三・加藤富民雄(2008). 2価鉄の殺菌作用と作用機構. 佐賀大農彙 **93**, 141-155.
14. Murata A. and K. Kitagawa (1973). Mechanism of inactivation of phage J1 by ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1145-1151
15. Murata A., R. Oyadomari, T. Ohashi and K. Kitagawa (1975). Mechanism of inactivation of phage  $\delta A$  containing single-stranded DNA by ascorbic acid. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **21**, 261-269
16. Murata A. and M. Uike (1976). Mechanism of inactivation of phage MS2 containing single-stranded RNA by ascorbic acid. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **22**, 347-354
17. Murata, A., H. Suenaga, S. Hideshima, Y. Tanaka and F. Kato (1986). Hydroxyl radical as reactive species in inactiva-

- tion of phages by ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1481-1487.
- 18 . Murata, A., M. Harada and F. Kato (1987). The mechanism of inactivation of phage  $\phi$ X174 by ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 933-934.
- 19 . Murata, A. (1971). Temperature-sensitive growth of wild-type phage J1 of *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 667-673.
- 20 . 村田 晃・添田栄一・猿野琳次郎 (1969). 乳酸桿菌バクテリオファージのプラーク生成に影響する因子 . 農化 **43** , 311 316
- 21 . 村田 晃 (1992). ビタミン C の殺菌作用 . 防菌坊徴 **20** , 439 445 .
- 22 . Miller, R.M. and U. Rapp (1973). The oxidation of catechols by reduced flavins and dehydrogenases; an electron spin resonance study of the kinetics and initial products of oxidation. *J. Biol. Chem.*, **248**, 6084-6090