



莢付き未熟豆の冷却貯蔵にともなうビタミンC量の変化

森山 三千江, 大羽 和子*

(愛知学泉短期大学, *名古屋女子大学家政学部)

原稿受付平成12年5月2日; 原稿受理平成13年4月7日

Changes in the Vitamin C Contents of Immature Legume Pods during Cold Storage

Michie MORIYAMA and Kazuko ÔBA*

Aichi Gakusen College, Okazaki 444-8520

* *Faculty of Domestic Science, Nagoya Women's University, Nagoya 467-8610*

The vitamin C (VC) content of garden pea pods was higher than that of kidney bean or yard bean pods. The activity of L-galactonolactone dehydrogenase (EC 1.3.2.3, GLDH), which catalyzes the last step of ascorbic acid (AsA) biosynthesis, of garden pea pods was also higher than that of kidney bean pods, while the ascorbate oxidase (EC 1.10.3.3, AAO) activity of garden pea pods was lower than that of kidney bean pods. Young pods of improved varieties of kidney bean (Morocco) and yard bean (Kegon) are generally preferred, the VC contents of these pods being higher than those of the original varieties even after storing for 7 days. Storing kidney beans at 4°C was better than at 15°C to maintain a high level of VC. The smaller pods of kidney bean had a higher level of VC and retained more VC during storage than the larger pods. The VC content and GLDH activity of small kidney bean pods increased during the first 2 or 3 days of 4°C storage and then decreased. It is suggested that the VC content in the stored pods of immature legumes was positively correlated with the GLDH activity and negatively correlated with the AAO activity.

(Received May 2, 2000; Accepted in revised form April 7, 2001)

Keywords: immature legume 未熟豆, vitamin C ビタミンC, storage 貯蔵, ascorbic acid アスコルビン酸, L-galactonolactone dehydrogenase ガラクトノラクトンデヒドロゲナーゼ, ascorbate oxidase アスコルビン酸オキシダーゼ.

1. 緒言

未熟豆類は比較的ビタミンC (以下VCと略す) 量の多い野菜であり, 葉菜・軟弱野菜に比べて貯蔵性に富むが, 収穫されてから消費者が食するまでに, その含有量が減少すると考えられる. 未熟豆類の中には主に莢を食べるものと豆を食べるものがあるが, 主に豆を食べるそら豆, グリンピース, 枝豆, 落花生の冷却貯蔵にともなうVC量の変化に及ぼす莢の影響については, すでに報告した¹⁾. 豆は貯蔵組織であるのに対し, 莢はそれを保護する組織である. したがって, 莢ごと食べる品種と豆のみを食べる品種では可食部分の含有成分や代謝活性が異なると考えられる. 本研究では, 主に莢を食べるさやえんどう, さやいんげん, 十

六ささげの冷却貯蔵にともなうVC量の変化について検討した. さやいんげんには従来種と, 改良品種のもろっこいんげんがある. もろっこいんげんは従来種よりも平たく, くびれのある形をしており, 色・艶は従来種とあまり変わらないが, 柔らかくて食べやすく好まれている. 十六ささげにも, 緑色が濃く艶もあり, 歯触りが柔らかい改良品種の華巖が最近店頭でよく見られ, 従来種よりも改良品種を好む人が増えている. さやいんげん, 十六ささげについては従来種とその改良品種の収穫直後のVC量, および冷却貯蔵にともなうVC量の変化を比較した. また, 市販されているさやいんげんにはサイズの異なるものがあるので, サイズ大小の違い, あるいは貯蔵温度が異なるとVC残存

量が異なることが予想されるので、VC量をより多く含有するサイズ、貯蔵温度を見いだすことも目的とした。

グリーンピースの貯蔵にともなうVC量の変化に、アスコルビン酸（以下AsAと略す）合成酵素であるL-ガラクトノラクトンデヒドロゲナーゼ（EC 1.3.2.3, 以下GLDHと略す）^{2)~6)}やAsAの分解の初発段階を触媒する酸化酵素、アスコルビン酸オキシダーゼ（EC 1.10.3.3, 以下AAOと略す）^{7)~10)}が関与する可能性を報告した¹⁾。主に莢を食べる未熟豆についても両酵素活性の変化を追跡した結果、GLDHやAAOが貯蔵中のVC量の変化に関与していることを強く示唆するデータを得たので報告する。

2. 実験方法

(1) 実験材料

愛知県内の農家で栽培された、5月収穫のさやえんどう (garden peas, *Pisum sativum*), 6月収穫のさやいんげん (kidney beans, *Phaseolus vulgaris*), 7月収穫の十六ささげ (yard bean, *Vigna sequipedalis*) を、実験当日の朝入手し材料とした。

(2) 貯蔵方法

収穫直後のさやえんどう（従来種）、十六ささげ（従来種・華巖）、さやいんげん（従来種・もろっこ、どちらも後述のサイズ大に相当し、一般に市販されているサイズ）、さやいんげんのサイズ大（平均6.4g/本、長さ13~14cm、直径約9~10mm）、サイズ小（平均3.4g/本、長さ10~11cm、直径約6mm）をそれぞれ新聞紙でくるみ、さらにポリエチレン製の袋に入れたのち、袋の口を縛って湿度95%とし、4℃又は15℃の冷蔵庫に貯蔵した。

(3) ビタミンCの定量方法

1) 試料の調製

以下の操作はすべて0~4℃で行った。個体差をなくするために数個の試料を細かく刻み、そこから3.0gを取り、4%メタリン酸9.0mlとともに磨砕し、ナイロンガーゼで濾過した後、遠心分離（21,000×g, 10分）し、上清をVC定量用試料とした。

2) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法（DNP法）

田村らの方法¹¹⁾に従い、総VC量、デヒドロアスコルビン酸（以下DHAと略す）量をDNP比色法で定量し、総VC量からDHA量を差し引いてAsA量を求め、mg/100g新鮮重に換算した。

(4) GLDH活性の測定

1) 粗酵素液の調製

以下の操作はすべて低温（0~4℃）で行った。数個の試料を細かく刻み、そこから20.0gを取り30mmメルカプトエタノール、0.4Mスクロースを含む0.1M K-リン酸緩衝液（pH 7.4）20mlとともにホモブレンドで磨砕（20,000 rpm, 1分間）後、ナイロンガーゼで濾過した液を遠心分離（500×g, 5分）し、澱粉および細胞破壊物を除去した。上清液をさらに遠心分離（37,000×g, 20分）し、沈殿画分と上清に分け、上清をAAO活性の測定に用いた。沈殿画分は0.4Mスクロースを含む0.1M K-リン酸緩衝液（pH 7.4）2.5mlに懸濁し、再び遠心分離（38,000×g, 20分）の後、沈殿を10%グリセリン、5mM グルタチオンを含む0.1M K-リン酸緩衝液（pH 7.4）にガラスホモジナイザーを用いてよく懸濁し（ミトコンドリア画分以下Mt.と略す）、2.0mlにメスアップしてGLDH活性測定用の酵素液とした。

2) 酵素活性の測定

Oba *et al.*⁵⁾の方法に従い測定した。反応液は10mM K-リン酸緩衝液（pH 7.8）、シトクロームc（1.5mg/ml）、基質（L-ガラクトノラクトン1mg/ml）、酵素液からなり全量1.0mlとした。素早く混和後、分光光度計で蒸留水を対照として、550nmの吸光度の増加を追跡した。1分間に2nmolのシトクロームcを還元する、すなわちAsAを1nmol生成する酵素量を1ユニットとした。GLDHはミトコンドリア膜に存在する酵素であるので、Mt.タンパク質mg当たりのユニットで示した。

(5) AAO活性の測定

1) 粗酵素液の調製

(4)-1)で得られた上清（37,000×g, 20分）のうち2.5mlを10mM K-リン酸緩衝液（pH 7.4）で平衡化したセファデックスG-25カラム（1.6×5.2cm）に通し、タンパク質画分を集め粗酵素液とした。

2) 酵素活性の測定

東野らの方法⁸⁾に従い50mM酢酸緩衝液（pH 4.8）、0.25mM AsA溶液、0.5ml粗酵素液を加え全量1.5mlとし、30℃の恒温槽で5分間反応させた後、4%メタリン酸1.0mlを加えて反応を止めた。変性タンパク質の沈殿を遠心分離（10,000×g, 10分）で除去し、上清の243nmにおける吸光度を測定した。反応時間0分と5分の吸光度の差から活性を求め、1分間にAsAを1μmol酸化する酵素量を1ユニットとした。

莢付き未熟豆の冷却貯蔵にともなうビタミンC量の変化

Table 1. VC contents and GLDH and AAO activities of immature legume pods before cold storage

Legume	Total VC (mg/100 g fr. wt.)	Enzyme activity	
		GLDH unit/g fr. wt. (unit/mg of Mt. protein)	AAO unit/g fr. wt. (unit/mg of protein)
Garden peas	45.8±1.86	43.7±5.66 (2.56±0.33)	84.3±4.0 (6.27±0.30)
Kidney beans			
Common	13.3±0.20	6.57±3.29 (15.45±7.75)	108.3±14.1 (9.61±1.25)
Morocco	20.3±0.87	7.46±1.62 (17.52±4.0)	170.3±9.1 (10.3±0.55)
Yard bean			
Common	26.4±0.2	not detected	not detected
Kegon	33.3±1.29	not detected	not detected

Each value is the mean±SD ($n=4$). Mt. protein: mitochondria protein.

AAOは可溶性タンパク質であるので、可溶性タンパク質 mg 当たりの活性で示した。

(6) タンパク質の定量

タンパク質の定量はBradford¹²⁾法に基づいて行い、Protein Assay キット (日本バイオラッドラボラトリー(株))を使用した。標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いた。

3. 結果および考察

(1) 収穫直後の未熟豆の VC 量および GLDH, AAO 活性

さやえんどう、さやいんげん (従来種・もろっこ)、十六ささげ (従来種・華巖) の収穫直後の VC 量および GLDH, AAO 活性を Table 1 に示した。Table 1 では、豆の種類によりタンパク含量が異なるため、酵素活性を新鮮重 g 当たりとタンパク質 mg 当たりで示した。さやえんどうの VC 量は、さやいんげんや十六ささげに比べて多かった。新鮮重 g 当たりの GLDH 活性はさやえんどうの方がさやいんげんよりも高かったが、AAO 活性はさやえんどうがさやいんげんよりも低かった。この結果は、さやえんどうの 100 g 当たりの VC 量が他の未熟豆より多いことと矛盾しない。タンパク質 mg 当たりの酵素活性では、さやいんげんの GLDH および AAO 活性の方が、さやえんどうの活性より高くなったが、これは、さやえんどうのタンパク質量がさやいんげんの 20~30 倍と多かったためである。

さやいんげんの従来種ともろっこいんげんについてみると、もろっこいんげんの VC 量が従来種よりも多く、新鮮重 g 当たりの GLDH 活性も AAO 活性も、もろっこいんげんの方が従来種よりも高い傾向が見られた。しかし、タンパク質 mg 当たりの活性を比較すると両品種間の活性にほとんど差は見られなかった。

十六ささげの VC 量は、華巖の方が従来種よりも多く、さやいんげんの場合と同様に改良品種の方が総 VC 量が多い結果となった。しかし、GLDH および AAO 活性は測定が不可能であった。緑色の濃い野菜類については粗抽出液の GLDH 活性の測定方法が確立されておらず、また、莢中のタンパク質含量が少なく、粘性物質が多いため AAO 活性も測定できなかったため、今後の課題として残った。

(2) さやえんどうの冷却貯蔵にともなう VC 含量および GLDH, AAO 活性の変化

さやえんどうを7日間4℃で貯蔵したときの総 VC, AsA, DHA 含量および GLDH, AAO 活性の変化を Fig. 1 に示した。さやえんどうの総 VC 量は貯蔵3, 7 日後ともに、収穫直後の約 125% と増加していた。総 VC 量に占める AsA 量の割合は貯蔵中変化せず、約 93% と高い値であった。したがってさやえんどうでは、1 週間以内の冷蔵なら収穫直後よりも総 VC 量が多いといえる。

GLDH 活性は、貯蔵3日後に収穫直後の活性の 112%, 7 日後 106% と高くなったので、貯蔵中に VC が盛んに合成されることが示唆された。一方、AAO 活

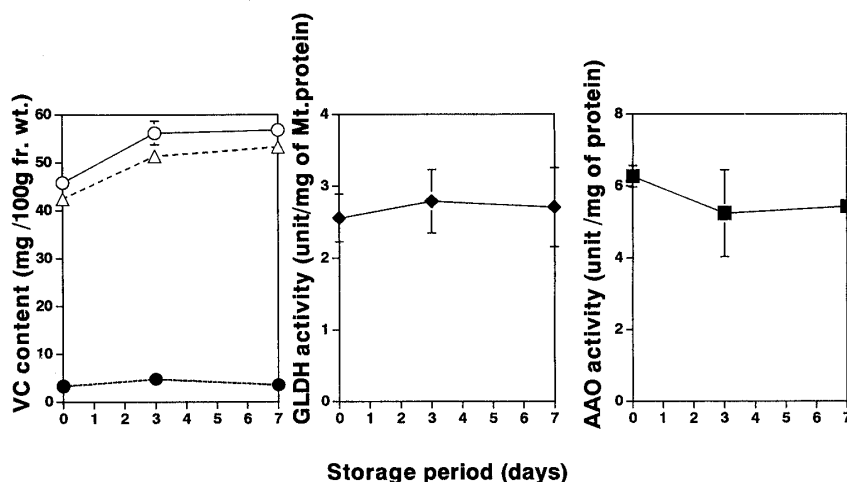


Fig. 1. Changes in the VC content and GLDH and AAO activities of garden pea pods during storage for 7 days at 4°C

○, Total VC; ●, DHA; △, AsA. ◆ and ■: GLDH and AAO activities, respectively. Each value is the mean ± SD (n=4).

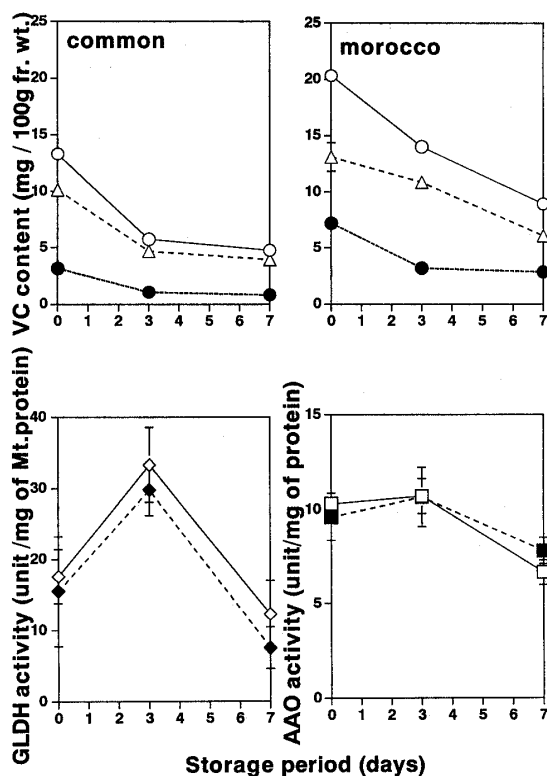


Fig. 2. Changes in the VC content and GLDH and AAO activities of kidney bean pods during storage for 7 days at 4°C

○, Total VC; ●, DHA; △, AsA. ◇ and □: GLDH and AAO activities of the morocco variety, respectively. ◆ and ■: GLDH and AAO activities of the common variety, respectively. Each value is the mean ± SD (n=4).

性は貯蔵3日, 7日後ともに収穫直後の約85%まで減少した。以上の結果は, さやえんどうのVC量が貯蔵中に多くなったことと矛盾しない。

(3) さやいんげんの冷却貯蔵にともなうVC量およびGLDH, AAO活性の変化

さやいんげんの従来種ともろっこいんげんを7日間4°C貯蔵したときの総VC, AsA, DHA量およびGLDH, AAO活性の変化をFig. 2に示した。従来種の総VC量は収穫直後の値に比べ貯蔵3日後43%, 7日後には36%まで減少した。又, 総VC中に占めるAsA量の割合は貯蔵期間中約80%であった。一方, もろっこいんげんの総VC量は貯蔵3日後に収穫直後の値の69%, 7日後44%まで減少し, 総VC中に占めるAsA量の割合は貯蔵期間中70~80%であった。もろっこいんげんの収穫直後の総VC, AsA量は従来種より高く, 貯蔵後の残存率も高かった。したがって, 味もおいしく歯触りも柔らかいといわれている, もろっこいんげんの方がVC量においても, 従来種よりも優れているといえる。

GLDH活性の変化を従来種ともろっこいんげんで比較してみると, 従来種の活性は貯蔵3日後に収穫直後の192%, 7日後49%であったが, もろっこいんげんの活性は, 貯蔵3日後189%, 7日後70%となり, 7日後ではもろっこいんげんの活性の方が従来種より高かった。AAO活性は, 従来種で貯蔵3日後に収穫直後の111%, 7日後82%, もろっこいんげんでは, 貯蔵3日後104%, 7日後65%であった。従来種, もろ

莢付き未熟豆の冷却貯蔵にともなうビタミンC量の変化

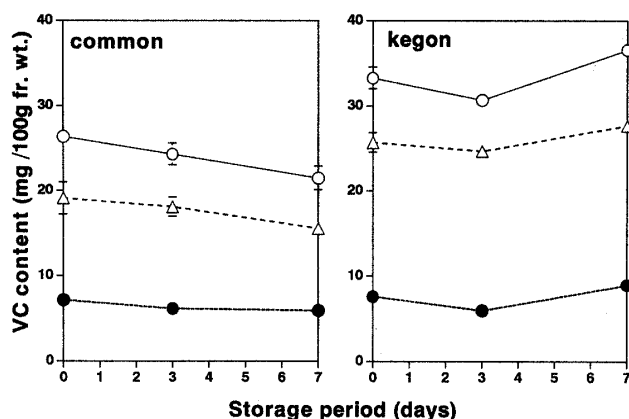


Fig. 3. Changes in the VC content of yard bean pods during storage for 7 days at 4°C

○, Total VC; ●, DHA; △, AsA. Each value is the mean ± SD (n=4).

っこいんげんともに AAO 活性が貯蔵期間中、大幅に増加せず、GLDH 活性は貯蔵3日後に増加したにもかかわらず、総 VC 量が減少し続けたのは、AAO 以外のアスコルビン酸代謝系がアクティブに働いたためと考察されるが、今後の課題としたい。

(4) 十六ささげの冷却貯蔵にともなう VC 量の変化

十六ささげの従来種と華巖を7日間4°C貯蔵したときの総 VC, AsA, DHA 量の変化を Fig. 3 に示した。従来種の総 VC 量は貯蔵3日後に収穫直後の92%, 7日後82%と減少し、総 VC 中に占める AsA 量の割合は、貯蔵期間中約70%となった。華巖は、従来種と比較して収穫直後の総 VC 量が高く、貯蔵3日後に収穫直後の92%とわずかに減少するものの、7日後には110%まで増加したので、7日後の総 VC 量は従来種の1.7倍になった。又、総 VC 中に占める AsA 量の割合は貯蔵期間を通して約80%と高かった。華巖は、従来種より嗜好的に好まれるが、VC 量が収穫直後、冷却貯蔵中の残存率ともに高いため、VC を摂取するという点でも優れているといえる。十六ささげにおいても、さやいんげんと同様に総 VC 中の DHA の割合が比較的高いことから AAO 活性が高いことが予測されたが、緑色が濃く、粗酵素液中の酵素活性が測定できなかったため、今後検討したい。

(5) さやいんげんの VC 量および GLDH, AAO 活性におよぼす貯蔵温度の影響

1) 総 VC 量の変化

さやいんげんの大・小のサイズ(方法の項参照)のものを4°Cと15°Cで7日間冷却貯蔵したときの総 VC 量の変化を Fig. 4 に示した。サイズの小さいものを4

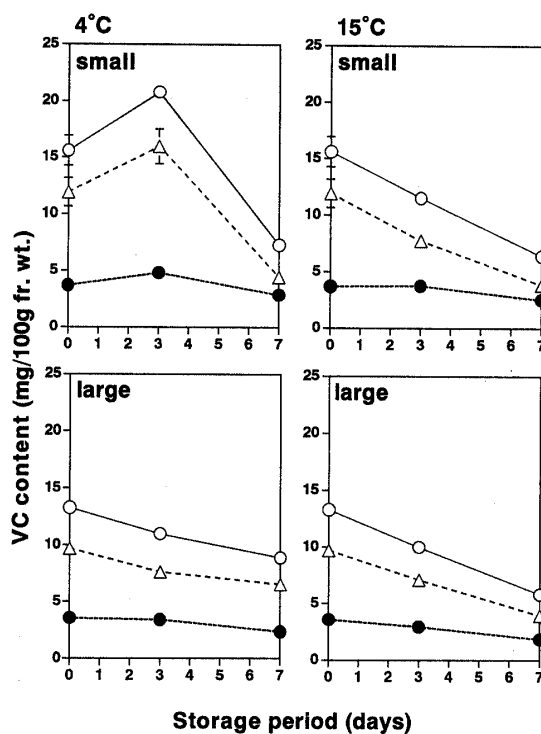


Fig. 4. Changes in the VC content of kidney bean pods during storage for 7 days at 4°C and 15°C

○, Total VC; ●, DHA; △, AsA. Each value is the mean ± SD (n=4). Small: the average weight and diameter were 3.4 g and 6 mm, respectively; the length was 10-11 cm. Large: the average weight and diameter were 6.4 g and 9.5 mm, respectively; the length was 13-14 cm.

°Cに貯蔵すると、総 VC 量は貯蔵3日後に収穫直後の133%に増加した後、7日後には47%まで減少した。また、総 VC 中に占める AsA 量の割合は収穫直後、貯蔵3日後は80%であったが7日後には約60%に減少した。流通時の温度に近い15°Cで貯蔵すると総 VC 量は、貯蔵3日後に収穫直後の74%, 7日後には41%に減少し、総 VC 中に占める AsA 量の割合も貯蔵3日後に67%, 7日後には60%と減少した。サイズの大きいものを4°Cに貯蔵すると、総 VC 量は貯蔵3日後に収穫直後の83%, 7日後67%に減少した。貯蔵期間中の総 VC 中に占める AsA 量の割合は約70%であった。15°Cで貯蔵すると総 VC 量は、貯蔵3日後に収穫直後の75%, 7日後44%となり、4°C貯蔵のものより VC 量の残存率が低くなった。総 VC 中に占める AsA 量の割合は貯蔵期間中約70%で、4°C貯蔵のものとの差はなかった。以上の結果から同一の畑で生育したもので、4°C貯蔵の方が15°C貯蔵より VC 量の残存率が高かったため、より低温で貯蔵した方がよ

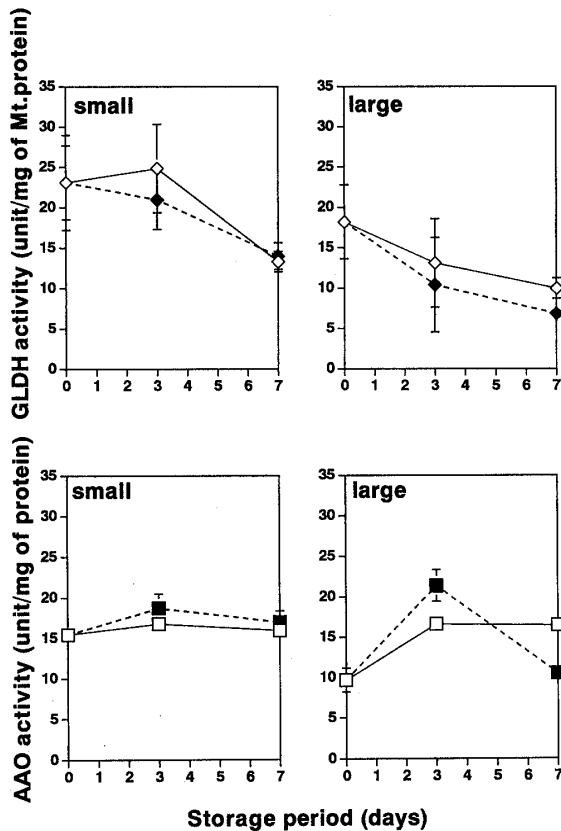


Fig. 5. Changes in the GLDH and AAO activities of kidney bean pods during storage for 7 days at 4°C and 15°C

◇ and □: GLDH and AAO activities at 4°C, respectively. ◆ and ■: GLDH and AAO activities at 15°C, respectively. Each value is the mean±SD ($n=4$). The definitions of small and large are as described in the legend to Fig. 4.

いと見える。

2) GLDH および AAO 活性の変化

大・小のサイズのものを4°Cと15°Cで7日間冷却貯蔵したときのGLDHおよびAAO活性の変化をFig. 5に示した。GLDH活性はサイズ小のもので、4°Cに貯蔵すると3日後に収穫直後の108%に増加した後、7日後は58%に減少した。15°Cに貯蔵すると3日後に91%、7日後には66%に減少した。サイズの大きいもののGLDH活性は、収穫直後に対して4°C貯蔵では3日後72%、7日後には55%に減少した。15°C貯蔵では、3日後には57%、7日後38%に減少したので、同一サイズのものでは4°C貯蔵の方が15°C貯蔵より、貯蔵期間中GLDH活性が高く保たれた。一方、AAO活性は、サイズ小の4°C貯蔵では、3日後に収穫直後の108%、7日後103%とあまり変化しなかった。15°C貯蔵のものは、3日後121%、7日後109%とやや高くな

った。サイズ大の4°C貯蔵では3日、7日後とも収穫直後の活性の170%まで増加した。15°C貯蔵では3日後220%、7日後で108%に、活性が上昇した。どちらのサイズでも4°C貯蔵の方が15°C貯蔵よりもGLDH活性が高く、AAO活性が低いことと合わせるとVC残存率が4°C貯蔵の方が高かったことと矛盾しない。

種類やサイズの異なる未熟豆によるVC量を比較すると、さやえんどうや、小さいサイズのさやいんげんでは4°C貯蔵3日後に総VC量が増加した。また、さやいんげんのサイズ小のGLDH活性(12.5 unit/g fr. wt.)はサイズ大の活性(8.8 unit/g fr. wt.)よりも高いため総VC量が高くなったと考察される。しかし、いんげんのサイズ小のように収穫直後の総VC量が高く、貯蔵中にGLDH活性が高くなるにもかかわらず、総VC量が減少し続けるものもあった(Fig. 2)。測定した酵素活性はGLDHとAAOのみであるので、デヒドロアスコルビン酸レダクターゼやアスコルビン酸ペルオキシダーゼなどの、アスコルビン酸の代謝に関与すると考えられる他の酵素がVC量の調節に寄与している可能性が残される。

我々が一般に市販の未熟豆を購入する場合、収穫後2~3日は経過していると思われる。購入日か翌日まではVC量が多いと考えられるので、その期間に食するのが適するといえる。十六ささげの改良品種、華巖では、収穫後一週間でもVC残存量が多かったので、購入日から3~4日後までに食するのが好ましいであろう。しかし、十六ささげの従来種やさやいんげんの大きなサイズにおいては、収穫直後から総VC量は減少し続けるため、できるだけ鮮度の良いものを選び、かつ、購入後は早く食した方がよいといえる。

4. 要 約

(1) 収穫直後のさやえんどうのVC量は、さやいんげん、十六ささげより多かった。VC合成酵素のGLDH活性は他の2種よりさやえんどうで高く、VC酸化酵素のAAO活性はさやえんどうで低かった。

(2) 品種改良されたさやいんげん(もろっこ)や十六ささげ(華巖)は嗜好的に好まれるばかりでなくVC量が収穫直後、冷却貯蔵中も従来品種より多かった。

(3) さやいんげんを貯蔵する場合、4°C貯蔵の方が15°C貯蔵よりもVC残存率が高かった。また、サイズの小さいものの方がVC量が多いうえに、4°C貯蔵し

莢付き未熟豆の冷却貯蔵にともなうビタミンC量の変化

て2~3日後まではVC量が増大し、その後減少した。

(4) 莢を主に食する未熟豆類の冷却貯蔵中のVC残存率はGLDH活性と正の、AAO活性とは負の相関性があることが強く示唆された。

引用文献

- 1) 森山三千江, 大羽和子: 未熟豆の冷却貯蔵にともなうビタミンC量の変化に及ぼす莢の影響, 家政誌, **51**, 15-21 (2000)
- 2) Mapson, L. W., and Breslow, E.: Biological Synthesis of Ascorbic Acid: L-Galactono- γ -lactone Dehydrogenase, *Biochem. J.*, **68**, 395-406 (1958)
- 3) Isherwood, F. A., and Mapson, L. W.: Biosynthesis of L-Ascorbic Acid in Animals and Plants, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **92**, 6-20 (1960)
- 4) Ôba, K., Fukui, M., Imai, Y., Iriyama, S., and Nogami, K.: L-Galactono- γ -lactone Dehydrogenase: Partial Characterization, Induction of Activity and Role in the Synthesis of Ascorbic Acid in Wounded White Potato Tuber Tissue, *Plant Cell Physiol.*, **35**, 473-478 (1994)
- 5) Ôba, K., Ishikawa, S., Nishikawa, M., Mizuno, H., and Yamamoto, T.: Purification and Properties of L-Galactono- γ -lactone Dehydrogenase, a Key Enzyme for Ascorbic Acid Biosynthesis, from Sweet Potato Roots, *J. Biochem.*, **117**, 120-124 (1995)
- 6) 大羽和子, 山本敦子, 小原明子, 石井現相, 梅村芳樹: ジャガイモ塊茎のビタミンC含量およびその合成酵素活性に及ぼす貯蔵温度の影響, 日食工誌, **45**, 510-513 (1998)
- 7) Inagaki, C., Fukuba, H., and Matsushita, A.: Distribution of the Natural Inhibitors against Cucumber Ascorbic Acid Oxidase, *Natural Science Report*, **5**, 323-331 (1955)
- 8) 東野哲三, 藤田修二: 差スペクトル法による温州ミカンのアスコルビン酸酸化酵素活性の測定, 日食工誌, **31**, 248-253 (1984)
- 9) 桐淵壽子, 川島かほる: 甘藷の加熱調理に関する研究(第4報), 家政誌, **41**, 715-721 (1990)
- 10) 大羽和子: 新鮮野菜のアスコルビン酸オキシダーゼ, 日調科誌, **29**, 120-124 (1996)
- 11) 田村太郎, 鈴木繁男: 2,4-Dinitrophenyl-hydrazineによる植物組織及び加工食品中のL-Ascorbic Acid, Dehydro-L-ascorbic Acid, 2,3-Diketo-L-gulonic Acidの分別定量法, 農化, **29**, 492-497 (1955)
- 12) Bradford, M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976)