

Enzim Lipoksigenase Dalam Produk Kedelai *Lipoxygenase in Soybean Products*

BAKRI ROSIDI

Balai Penelitian Makanan, Minuman dan Fitokimia,
Balai Besar Litbang Industri Hasil Pertanian (BBIHP),
Jalan Ir. H. Juanda 5—9, Bogor 16122.

Abstract — Lipoxygenase is an enzyme which limit the use of soybean as a protein source food. Research on this matter has been widely done. This paper discussed the property of lipoxygenase, off-flavor products resulted, its effect on soybean protein and its inactivation.

PENDAHULUAN

Kedelai merupakan salah satu sumber protein nabati yang bermutu tinggi. Kandungan protein kedelai sekitar 40% dan susunan asam aminonya mempunyai mutu mendekati mutu protein hewani, yaitu mempunyai asam amino essensial yang lengkap (WINARNO dan RAHMAN, 1974). Penggunaan kedelai untuk produk makanan kadang-kadang dibatasi oleh adanya flavor yang kurang disukai pada produk kedelai seperti pada tepung kedelai dan susu kedelai yang sukar dihilangkan (SMITH and CIRCLE, 1972).

Terjadinya off-flavor sering membatasi penggunaan produk kedelai terutama protein kedelai (HONIG *et al.* 1969). Penyebab utama off-flavor adalah senyawa-senyawa karbonil yang mudah menguap dan mempunyai rantai pendek yang berikatan dengan protein kedelai (SASAKI *et al.* 1982).

Senyawa off-flavor dalam protein kedelai (tepung, konsentrat), umumnya berasal dari degradasi lipida secara enzimatis (enzim lipoksigenase) maupun oksidasi kimia (ELDRIDGE, 1972). Enzim lipoksigenase akan mengkatalis oksidasi asam lemak tidak jenuh dan menyebabkan timbulnya senyawa off-flavor (BAKER and MUSTAKAS, 1973).

ENZIM LIPOKSIENASE DAN PEMBENTUKAN SENYAWA OFF-FLAVOR

Enzim lipoksigenase yang mempunyai nama sistematik Linoleat: oksigen oksidoreduktase EC 1. 13. 1. 13., dahulu dikenal dengan nama enzim lipoksidase. Perubahan ini mungkin berdasarkan pola klasifikasi dari WHITAKER (1972), yaitu enzim yang mengkatalis reaksi oksidasi menggunakan oksigen untuk melepaskan hidrogen atau elektron diklasifikasikan kedalam sub golongan enzim oksidase, sedangkan jika oksigen ditempelkan pada substratnya maka enzim itu diklasifikasikan dalam sub golongan oksigenase.

Sifat-sifat enzim lipoksigenase

Aktivitas enzim lipoksigenase berbeda-beda tergantung pada sumbernya. Enzim lipoksigenase yang menunjukkan aktivitas yang paling tinggi terdapat pada kedelai (WINARNO, 1983; RACKIS, 1972). Aktivitas enzim lipoksigenase dari berbagai macam tanaman dapat dilihat pada Tabel 1.

Kedelai mengandung sedikitnya 3 jenis lipoksigenase yang sifatnya berbeda. Menurut Bild *et al.* (HILDEBRAND and KITO, 1984). Lipoksigenase 1 bila dibandingkan dengan lipoksigenase 2 atau 3

Tabel 1. Aktivitas relatif enzim lipoksigenase dari beberapa tanaman¹⁾.

No.	Tanaman		% Aktivitas relatif dibandingkan kedelai
	Nama (Inggris)	Nama (Latin)	
1.	Soybean	<i>Glycine max</i>	100
2.	Lentils	<i>Lentilla lense</i>	78
3.	Chick pea	<i>Cicer arientum</i>	47
4.	Broad bean	<i>Vicia faba</i>	46
5.	Chicline Vetch	<i>Lathyrus sativus</i>	24
6.	Lima bean	<i>Phaseolus limensis</i>	21
7.	Mung bean	<i>Phaseolus aureus</i>	14
8.	Pea (fresh)	<i>Pisum sativum</i>	13
9.	Wheat	<i>Triticum vulgare</i>	3

1) AL-OBAIDY dan SIDDIQI (1981).

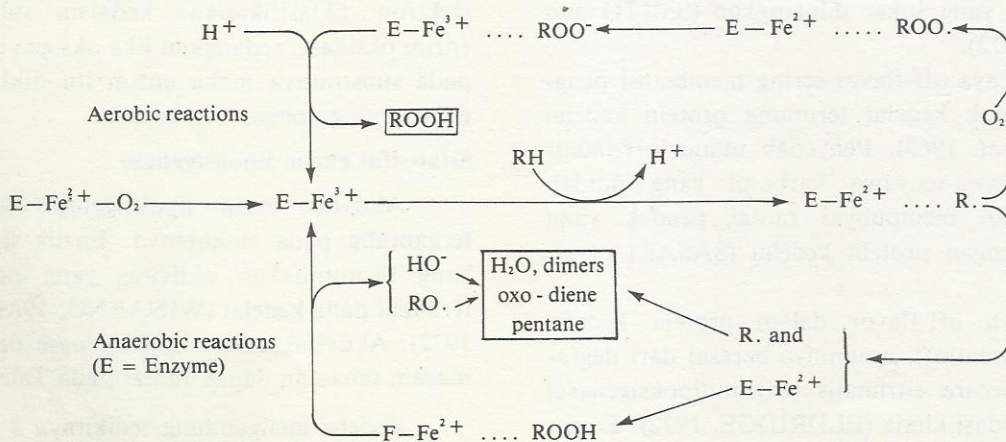
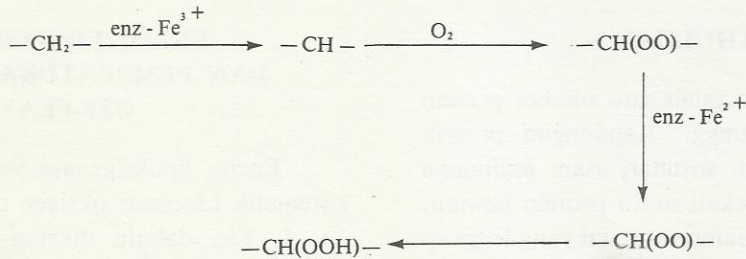
mempunyai pH optimum dan aktivitas yang lebih tinggi terhadap asam lemak bebas daripada esternya. Sedang lipoksigenase 2 dan 3 sukar dibedakan sehingga sering disebutkan dalam kedelai hanya ada 2 jenis lipoksigenase, yaitu lipoksigenase 1 dan 2, yang satu diaktifkan oleh ion kalsium sedangkan

yang lain dihambat (SCOTT, 1975). Christopher *et al.* (BORHAN and SNYDER, 1979) menyebutkan bahwa enzim lipoksigenase 1 dan 2 aktif pada pH 6,8 tetapi dalam ekstrak kedelai (pH 9,0) hanya lipoksigenase 1 yang aktif.

Mekanisme terbentuknya senyawa off-flavor oleh enzim lipoksigenase

Enzim lipoksigenase akan mengkatalisis oksidasi asam lemak tidak jenuh yang mengandung gugus cis-cis 1,4 pentadiena (RACKIS, 1972). Oleh sebab itu, asam linoleat (9, 12 okta dekadienoat), asam linolenat (9, 12, 15 okta dekatrienoat) dan asam arakhidonat (5, 8, 11, 14 eikosatetraenoat) dalam bentuk bebas, gliserida maupun ester metil merupakan substrat yang baik bagi enzim ini (WINARNO, 1983). Produk utama reaksi enzimatik tersebut adalah isomer 9- dan 13-hidroperoksida (RACKIS, 1972), yang mempunyai bentuk optis aktif konjugasi cis-trans (TAPPEL, 1962).

Mekanisme terbentuknya hidroperoksida oleh enzim lipoksigenase adalah sebagai berikut :



Gambar 1. Mekanisme katalisis reaksi oksidasi asam linoleat oleh enzim lipoksigenase dibawah kondisi aerob dan anaerob (GUNSTONE dan NORRIS, 1983).

Apabila digunakan sebagai substrat asam linoleat dan linolenat maka senyawa hidroperoksida yang timbul adalah 13-cis-trans hidroperoksida dan sedikit isomer 9-cis-trans hidroperoksida yang merupakan prekursor off-flavor pada kedelai (SESSA and RACKIS, 1977). Hidroperoksida yang terbentuk mempunyai sifat tidak stabil, yaitu mudah mengalami lebih lanjut (degradasi sekunder) sehingga timbul senyawa-senyawa yang menyebabkan kerusakan flavor makanan (KEENEY, 1962).

Senyawa-senyawa off-flavor yang dihasilkan

Pada produk protein kedelai ada 2 flavor yang umum terdapat, yaitu "bitter" dan "beany". Flavor "beany" (bau langu) merupakan flavor yang paling menonjol (COWAN, RACKIS and WOLF, 1973) dan merupakan produk enzim lipoksigenase.

Banyak ahli telah meneliti off-flavor pada kedelai atau fraksi kedelai akibat aktivitas enzim lipoksigenase. MATTICK dan HAND (1969) telah berhasil mengisolasi 80 senyawa mudah menguap, dan 40 jenis senyawa telah berhasil diidentifikasi. Komponen terbesar senyawa-senyawa tersebut adalah aldehida, keton dan alkohol. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian HSIEH *et al.* (1982) yang telah dilakukan terhadap tepung kedelai tanpa lemak.

Menurut KINSELLA (1979) senyawa pendukung flavor "beany" pada produk protein kedelai adalah :

- alkohol : isopentanol, heksanol, heptanol, oktenol
- aldehida : heksanal, heptenal, heksenal, dekadial
- keton : heksanon, etil-vinil keton
- phenol : 4-vinil guaiakol, 4-vinil phenol
- furan : 2-pentil furan.

Senyawa off-flavor penyebab utama tidak disenangi-nya produk-produk kedelai adalah heksanal, 2-heptenal, 2,4-dekadienal; iso pentanol, heksanol, heptanol, 1-okten-3-ol; etil-vinil keton (GOOSENS, 1974).

PENGARUH SENYAWA OFF-FLAVOR TERHADAP PROTEIN KEDELAI

Enzim lipoksigenase mempunyai peranan dalam kerusakan bahan makanan karena menyebabkan timbulnya off-flavor. Kerusakan oksidatif asam lemak tidak jenuh (asam lemak bebas atau esternya) akan menyebabkan terbentuknya senyawa off-flavor

pada produk kacang-kacangan (SESSA and RACKIS, 1977).

Problem utama dalam penggunaan produk-produk protein kedelai adalah off-flavor. Problem off-flavor ini terutama terdapat pada tepung kedelai, isolat, konsentrat (VAN DEN OUWELAND and SCHUTTE, 1978) dan susu kedelai (MATTICK and HAND, 1969).

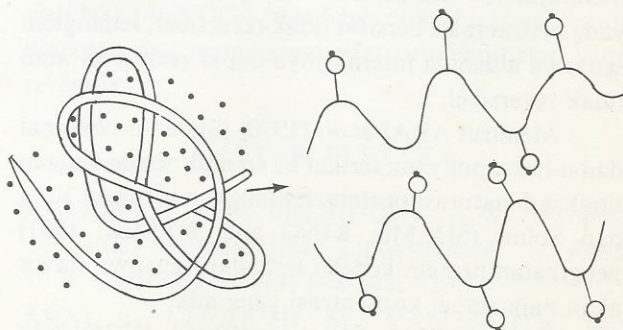
Terdapatnya senyawa komponen flavor pada tepung kedelai tanpa lemak dan protein kedelai olahan menunjukkan adanya interaksi antara senyawa komponen flavor dan protein kedelai (FUJIMAKI *et al.* 1968). Interaksi ini merupakan titik kritis dalam menentukan daya terima bahan makanan yang mengandung kedelai, dalam hal ini protein kedelai (KINSELLA, 1979).

Mekanisme pengikatan senyawa "off-flavor" oleh protein kedelai

Pengetahuan mengenai mekanisme pengikatan hasil degradasi minyak oleh protein akan membantu dalam pengembangan metoda pengolahan kedelai supaya komponen flavor yang tidak diinginkan dapat lebih efektif dihambat pembentukannya tanpa menyebabkan perubahan serius pada sifat fungsional makanan (SESSA and RACKIS, 1977).

Bagian internal hidrofobik protein mempunyai peranan penting dalam mengikat senyawa yang mempunyai berat molekul rendah, molekul nonpolar atau ligand. Proses pengikatan mengakibatkan terjadinya 2 hal yang penting yaitu :

1. Masuknya ligand dalam bagian hidrofobik molekul protein.
2. Interaksi antara ligand dan bagian hidrofobik molekul protein dengan suatu tenaga pengikat mengakibatkan terbukanya lipatan (OVENDEN, 1980).



Gambar 2. Ilustrasi model mekanisme pengikatan flavor oleh protein menurut Solms *et al.* (OVENDEN, 1980).

Ikatan senyawa pembentuk flavor dengan protein merupakan ikatan hidrofobik (SMITH and CIRCLE, 1972). Solms *et al.* (OVENDEN, 1980) menggambarkan model mekanisme pengikatan flavor oleh protein seperti dapat dilihat pada Gambar 2. Menurut ARAI *et al.* (1970) pengikatan flavor oleh protein kedelai akan meningkatkan konsentrasi dan sifat denaturasi proteinnya, oleh karena struktur tersier rantai protein akan terbuka.

Interaksi senyawa flavor dengan protein kedelai

Sifat pengikatan senyawa flavor oleh protein kedelai sangat selektif. Menurut Beyeler dan Solms (SESSA and RACKIS, 1977) protein kedelai menunjukkan afinitas tertentu terhadap senyawa flavor. Senyawa alkohol cenderung tidak terikat kuat (GREMLI, 1974; OVENDEN, 1980), kecuali heksanol, pentanol dan 1-okten-3-ol (GOOSSENS, 1974), sedangkan senyawa aldehida bereaksi sangat kuat khususnya aldehida tidak jenuh (GREMLI, 1974; OVENDEN, 1980).

GREMLI (1974) telah meneliti interaksi antara senyawa-senyawa flavor dengan larutan protein kedelai 5% menggunakan metoda analisis "head-space". Larutan protein kedelai akan menyerap senyawa aldehida dan keton. Kemampuan penyerapannya akan naik sesuai dengan kenaikan berat molekul (panjang rantai) dan jumlah senyawa flavor yang ada.

KINSELLA dan DAMODARAN (1980) menyebutkan bahwa afinitas pengikatan senyawa flavor oleh protein kedelai tidak hanya merupakan fungsi panjang rantai tetapi juga tergantung pada letak gugus fungsional, seperti gugus aldehida dan keton dalam rantai senyawa flavor. Pengikatan senyawa flavor ini ada yang bersifat reversibel dan tidak reversibel (KINSELLA, 1979). GREMLI (1974) menunjukkan bahwa tidak satupun senyawa keton yang berinteraksi bersifat tidak reversibel, sedangkan senyawa aldehida interaksinya dapat reversibel atau tidak reversibel.

Menurut ARAI *et al.* (1970) jumlah n-heksanal dan n-heksanol yang terikat akan naik sesuai dengan tingkat denaturasi protein. Sedangkan menurut King dan Solms (SOLMS, KING and WYLER, 1981) pengikatan protein kedelai terhadap senyawa flavor akan naik sesuai konsentrasi yang ada.

Selain hal-hal diatas, GREMLI (1974) juga menunjukkan bahwa senyawa flavor akan diserap oleh protein kedelai selama pengeringan.

INAKTIVASI ENZIM LIPOKSIENASE

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: suhu, pH, etanol dan antioksidan. Suhu dan pH merupakan faktor yang amat penting pada pengawasan reaksi enzimatik dalam pengolahan bahan makanan (REED, 1975). Etanol akan mendenaturasikan protein sehingga enzim menjadi inaktif (SESSA dan RACKIS, 1977). Menurut SCOTT (1975) anti oksidan yang ditambahkan pada makanan dimaksudkan untuk menghambat aktivitas enzim.

Suhu

Enzim sangat labil terhadap panas karena panas akan menyebabkan denaturasi protein enzim sehingga enzim akan kehilangan sifat katalitiknya (REED, 1975).

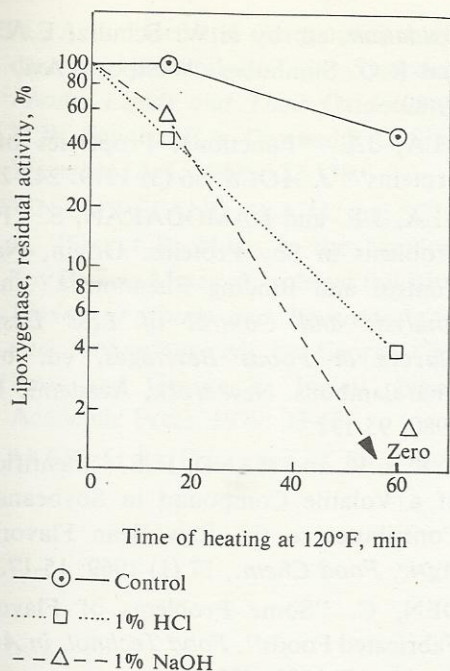
Menurut Christopher *et al.* (KINSELLA dan DAMODARAN, 1980) waktu paruh enzim lipoksigenase 1 dan 2 pada suhu 69°C masing-masing adalah 25 menit dan 0,7 menit, sedangkan menurut BORHAN dan SNYDER (1979) 15 menit dan 0,8 menit. HILDEBRAND dan KITO (1984) melakukan percobaan terhadap kedelai yang telah direndam dalam air selama 24 jam suhu 4°C. Pemanasan kedelai tersebut pada suhu 70°C selama 20 menit akan menginaktifkan lipoksigenase 2, sedang lipoksigenase 1 membutuhkan waktu 30 menit. Dengan demikian terlihat bahwa lipoksigenase 1 lebih tahan panas.

BAKER dan MUSTAKAS (1973) telah melakukan penelitian terhadap kedelai yang telah dihancurkan (partikelnya agak besar). Inaktivasi enzim lipoksigenase dapat dilakukan dengan merebus produk kedelai tersebut pada suhu 66°C selama 1 jam atau 82°C selama 15 menit, tetapi perebusan ini mengakibatkan indeks kelarutan nitrogen menurun.

Keasaman (pH)

Perubahan aktivitas enzim karena perubahan pH diakibatkan terjadinya perubahan ionisasi dari enzim, substrat atau kompleks enzim-substrat (REED, 1975).

BAKER dan MUSTAKAS (1973) telah mempelajari pengaruh penambahan 1% HCl dan 1% NaOH pada air rebusan (suhu 49°C) terhadap perubahan aktivitas enzim lipoksigenase pada perebusan kedelai yang telah dihancurkan (partikelnya agak besar) (Gambar 3).



Gambar 3. Perubahan aktivitas enzim lipoksigenase dalam kedelai yang telah dihancurkan setelah mengalami perebusan (BAKER and MUSTAKAS, 1973).

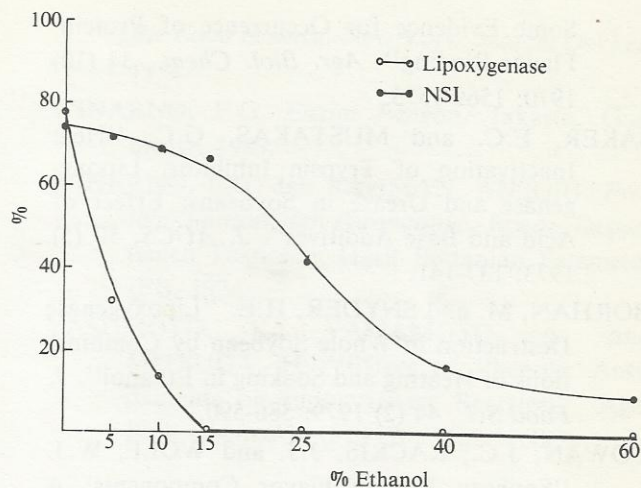
Hasil menunjukkan bahwa penambahan 1% HCl akan mempercepat terjadinya inaktivasi enzim lipoksigenase sehingga sisa aktivitas enzim 4% dicapai setelah perebusan 120°F (49°C) selama 60 menit. Sedangkan pada penambahan 1% NaOH, kecepatan inaktivasi enzim lipoksigenase lebih rendah dibanding penambahan 1% HCl tetapi setelah perebusan selama 20 menit, kecepatan inaktivasinya lebih besar yang mengakibatkan terjadinya total inaktivasi setelah perebusan selama 60 menit.

Etanol

Lebih dari 99% aktivitas enzim lipoksigenase yang ada dalam kacang-kacangan dipecahkan perlakuan etanol, karena etanol akan mendenaturasikan protein (SESSA dan RACKIS, 1977).

Penelitian mengenai perubahan aktivitas enzim lipoksigenase dalam kedelai yang sudah mengalami perendaman dengan etanol pada suhu 45°C selama 24 jam pada berbagai konsentrasi telah dilakukan oleh BORHAN dan SNYDER (1979). (Gambar 4).

Hasil menunjukkan bahwa aktivitas enzim lipoksigenase pada kedelai yang telah direndam air (konsentrasi etanol 0%) mempunyai aktivitas sekitar 78%. Kenaikan konsentrasi etanol menyebabkan aktivitas enzim lipoksigenase menurun tajam se-



Gambar 4. Perubahan aktivitas enzim lipoksigenase dan indeks kelarutan nitrogen dalam kedelai yang telah direndam dalam etanol (BORHAN and SNYDER, 1979).

hingga pada konsentrasi etanol 15% terjadi total inaktivasi. Kenaikan konsentrasi etanol juga menyebabkan menurunnya indeks kelarutan nitrogen. Setelah kenaikan konsentrasi etanol mencapai 15%, penurunan indeks kelarutan nitrogen akan semakin tajam. Pada waktu terjadi total inaktivasi enzim lipoksigenase yaitu konsentrasi etanol 15%, indeks kelarutan nitrogen kedelai yang direndam tersebut (suhu 45°C) adalah sekitar 70%.

Anti oksidan

Reaksi katalisis enzim terhadap oksidasi asam lemak tidak jenuh dapat dihambat oleh anti oksidan tertentu. Pengaruh anti oksidan seperti NDGA, Quercetin, Propil galat, α -Naphtol, α -Tokopherol, Homokatekol, Pirokatekol, BHA, BHT, Hidrokui-non, Phloroglusinol, Pirogalol dan Resorsinol telah diteliti YASUMOTO, YAMAMOTO dan MITSUDA (1970). Dari beberapa anti oksidan tersebut, pengaruh yang paling baik ditunjukkan oleh NDGA. NDGA juga lebih efektif sebagai donor hidrogen dan mempunyai sifat penghambatan yang reversibel.

DAFTAR PUSTAKA

- AL-OBAIDY, H.M. and SIDDIQI, A.M. "Properties of Broad Bean Lipoxigenase". *J. Food Sci.*, 46 (2) 1981: 622-625, 629.
- ARAI, S.; NOGUCHI, M.; YAMASHITA, M.; KATO, H. and FUJIMAKI, M. "Studies on Flavor Components in Soybean. Part VI

- Some Evidence for Occurrence of Protein-Flavor Binding". *Agr. Biol. Chem.*, 34 (10) 1970: 1569-1573.
- BAKER, E.C. and MUSTAKAS, G.C. "Heat Inactivation of Trypsin Inhibitor, Lipoxigenase and Urease in Soybeans: Effect of Acid and Base Additives". *J. AOCS*, 50 (5) 1973: 137-141.
- BORHAN, M. and SNYDER, H.E. "Lipoxygenase Destruction in Whole Soybean by Combinations of Heating and Soaking in Ethanol". *J. Food Sci.*, 44 (2) 1979: 586-590.
- COWAN, J.C.; RACKIS, J.J. and WOLF, W.J. "Soybean Protein Flavor Components: A Review". *J. AOCS*, 50 (10) 1973: 426A-435A, 444A.
- ELDRIDGE, A.C. "Organic Solvent Treatment of Soybean and Soybean Fractions" in *Soybeans: Chemistry and Technology. Vol. I, Proteins*, ed. by A.K. Smith and S.J. Circle. Westport, Avi, 1972: 144-157.
- FUJIMAKI, M.; KATO, H.; ARAI, S. and TAMAKI, E. "Applying Proteolytic Enzymes on Soybean. 1. Proteolytic Enzyme Treatment of Soybean Protein and Its Effect on the Flavor". *Food Technol.*, 22 (7) 1968: 889-893.
- GOOSSENS, A.E. "Protein Foods-Flavor and Off-Flavors". *Food Engineering*, 46 (10) 1974: 59-60.
- GREMLI, H.A. "Interaction of Flavor Compounds with Soy Proteins". *J. AOCS*, 51 (1) 1974: 95A-97A.
- GUNSTONE, F.D. and NORRIS, F.A. *Lipids in Foods: Chemistry, Biochemistry and Technology*. Oxford, Pergamon Press. 1983.
- HILDEBRAND, D.F. and KITO, M. "Role of Lipoxygenases in Soybean Seed Protein Quality". *J. Agric. Food Chem.*, 32 (4) 1984: 815-819.
- HONIG, D.H.; SESSA, D.J.; HOFFMAN, R.L. and RACKIS, J.J. "Lipids of Defatted Soybean Flakes: Extraction and Characterization". *Food Technol.*, 23 (6) 1969: 803-808.
- HSIEH, O.A.L.; HUANG, A.S. and CHANG, S.S. "Isolation and Identification of Objectionable Volatile Flavor Compounds in Defatted Soybean Flour". *J. Food Sci.*, 47 (1) 1982: 16-18, 23.
- KEENEY, M. "Secondary Degradation Products" in *Symposium on Foods: Lipids and Their Oxidation*, ed. by H.W. Schultz; E.A. Day and R.O. Sinnhuber. Westport, Avi, 1962: 79-89.
- KINSELLA, J.E. "Functional Properties of Soy Proteins". *J. AOCS*, 56 (3) 1979: 242-258.
- KINSELLA, J.E. and DAMODARAN, S. "Flavor Problems in Soy Proteins: Origin, Nature, Control and Binding Phenomena" in *The Analysis and Control of Less Desirable Flavors in Foods Beverages*, ed. by G. Charalambous. New York, Academic Press, 1980: 95-132.
- MATTICK, L.R. and HAND, D.B. "Identification of a Volatile Compound in Soybeans that Contributes to the Raw Bean Flavor". *J. Agric. Food Chem.*, 17 (1) 1969: 15-17.
- OVENDEN, C. "Some Problems of Flavouring Fabricated Foods". *Food Technol. in Australia*, 32 (11) 1980: 558-563.
- RACKIS, J.J. "Biologically Active Components" in *Soybeans: Chemistry and Technology. Vol. I, Proteins*, ed. by A.K. Smith and S.J. Circle. Westport, Avi, 1972: 158-202.
- REED, G. "Effect of Temperature and pH" in *Enzymes in Food Processing*, 2nd Edition, ed. by Gerald Reed. London, Academic Press, 1975: 31-41.
- SASAKI, R.; OKUMURA, K.; KITABATAKE, N.; KITABATAKE, N. and CHIBA, N. "Changes of Aldehyde Levels in Defatted Soybean Extract", *J. Food Sci.*, 47 (1) 1982: 31-35.
- SCOTT, D. "Oxidoreductase" in *Enzymes in Food Processing*, 2nd Edition, ed. by Gerald Reed. London, Academic Press, 1975: 219-252.
- SESSA, D.J. and RACKIS, J.J. "Lipid Derived Flavors of Legume Protein Products". *J. AOCS*, 54 (10) 1977: 468-473.
- SMITH, A.K. and CIRCLE, S.J. "Protein Products as Food Ingredients" in *Soybeans: Chemistry and Technology. Vol. I, Proteins*, ed. by A.K. Smith and S.J. Circle. Westport, Avi, 1972: 339-388.
- SOLMS, J.; KING, B.M. and WYLER, R. "Interaction of Flavor Compounds with Food Components" in *The Quality of Foods and Beverages. Vol. I, Chemistry and Technology*, ed. by G. Charalambous and G. Inglett. New York, Academic Press, 1981: 7-18.

- TAPPEL, A.L. "Hematin Compounds and Lipoxidase as Biocatalysts" in *Symposium on Foods: Lipids and Their Oxidation*, ed. by H.W. Schultz; E.A. Day and R.O. Sinnhuber. Westport, Avi, 1962: 122-138.
- VAN DEN OUWELAND, G.A.M. and SCHUTTE, L. "Flavor Problems in the Application of Soy Protein Materials as Meat Substitutes" in *Flavor of Foods and Beverages Chemistry and Technology*, ed. by George Charalambous and George E. Inglett. New York, Academic Press, 1979: 33-42.
- WHITAKER, H.R. *Principles of Enzymology for the Food Science*. New York, Marcel Dekker, 1972.
- WINARNO, F.G. *Enzim Pangan*. Jakarta, Gramedia, 1983.
- WINARNO, F.G. dan RAHMAN, ANSORI. *Protein: Sumber dan Peranannya*. Bogor, Departemen Teknologi Hasil Pertanian Fatemeta-IPB, 1974.
- YASUMOTO, K.; YAMAMOTO, A. and MITSUDA, H. "Effect of Phenolic Antioxidants on Lipoxygenase Reaction". *Agr. Biol. Chem.*, 34 (8; 1970: 1162-1168.