イソチオシアナート化合物の抗菌活性

岸本憲明*・田野達男*・原田靖裕**・増田秀樹**

Antimicrobial Activities of Isothiocyanate Compounds

KISHIMOTO Noriaki*, TANO Tatsuo*, HARADA Yasuhiro**
and MASUDA Hideki**

*Department of Food and Lifestyle, Faculty of Food Culture, Kurashiki Sakuyo University,
3515 Nagao Tamashima, Kurashiki-city, Okayama 710-0251

**Material R & D Laboratories, Ogawa & Co., Ltd.,
1-2, Taiheidai, Shoo-cho, Katsuta-gun, Okayama 709-4321

The nineteen isothiocyanate compounds with five kinds of functional groups, alkyl, ω -alkenyl, aryl, ω -methylthioalkyl, and ω -methylsulfanylalkyl, were tested for minimum inhibitory concentration against growth of four species of bacteria and two species of fungi. In general, the isothiocyanate (ITC) analogues showed antimicrobial activities according to the following order: aryl ITC > ω -methylthioalkyl ITC > ω -alkenyl ITC > ω -methylsulfanylalkyl ITC > alkyl ITC. They also had different antimicrobial spectra. The aryl and ω -methylthioalkyl ITCs indicated higher antimicrobial activity against gram-positive bacteria and fungi than gram-negative bacteria, whereas ω -alkenyl ITCs were more effective against gram-negative bacteria and fungi than gram-positive bacteria. Gram-positive bacteria and *A. niger* were more sensitive to the ω -methylsulfanylalkyl ITCs than gram-negative bacteria and *C. albicans*. The antimicrobial activity was increased by a combination of ITCs having different antimicrobial spectra. The ITCs other than alkyl ITC inhibited the growth of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin sensitive *S. aureus* at the same concentration. The antimicrobial activity of ITC analogues other than alkyl ITC is about 5 to 10 times those of preservatives generally used in foods.

(Received Sep. 28, 1998)

食の外食化や調理済み、半調理済み食品の消費が急増する一方で、消費者の健康と安全に対する関心が高まってきた。水分活性値の高い調理済み食品をチルド流通や常温流通経路にのせるためには、食品産業における微生物制御がますます重要な課題となっている。無菌包装や無菌化工場で生産された食品はいまだ少なく、有用

な殺菌剤や保存料の開発が求められているなかで、食経験のある食用植物の成分を食品の保存に利用する試みが進められている^{1)~3)}。

ワサビやカラシの精油に抗菌作用があることは古くから知られている。アリルイソチオシアナート (AIT) は精油の主要な成分で、揮発しやすく刺激的な辛味を呈

*くらしき作陽大学食文化学部 (〒710-0251 岡山県倉敷市玉島長尾3515)

**小川香料株式会社素材研究所 (〒709-4321 岡山県勝田郡勝央太平台1-2)

するとともに抗菌力をもつことが報告されている⁴⁾。ワサビ抽出物や AIT は培地への添加よりも、蒸気接触させた方が抗菌スペクトルも広く、生育阻止濃度も低くなることが明らかにされ^{5)~8)}、食品表面での微生物増殖抑制に応用されている。

AIT 以外に、量は少ないものの、種々の側鎖構造をもつイソチオシアナート (ITC) 類が食用植物や果実から単離同定されている。伊奈ら^{9),10)} は、沢ワサビの特徴的な香氣成分として ω -Methylthioalkyl ITC (ω -MeS-NCS) 類と ω -Methylsulfinylalkyl ITC (ω -MeSO-NCS) 類を単離、TANG¹¹⁾ はパノパイアから Benzyl ITC を検出し、ホースラディッシュからは Phenethyl ITC が、クレソンからは 7-Methylthioheptyl ITC (7-Mes-NCS) が同定されている¹²⁾。また、MASUDA ら¹³⁾ は沢ワサビとホースラディッシュから、側鎖構造の異なる 4 種類 14 の ITC 類を報告している。

AIT の抗菌作用は詳細に研究されている^{6)~8)} が、AIT 以外の ITC 類については断片的な抗菌活性が報告されているだけで、ITC の側鎖構造と抗菌活性を系統的に研究した報告はまだ見あたらない。

本研究では、沢ワサビや、ホースラディッシュに存在が報告されている 5 種類の側鎖をもつ 19 の ITC 類を調製し、それらの抗菌活性を測定して、側鎖構造と抗菌活性の関係を系統的に調べた。

実験材料および方法

1. 試 料

Isopropyl ITC は May Bridge Co. Ltd. (UK) から、Isopropyl ITC 以外の Alkyl ITC 類と Aryl ITC 類、AIT は東京化成工業㈱から購入した。AIT 以外の ω -Alkenyl ITC 類はアルケニルハライドをチオシアン塩酸と反応させ、 ω -MeS-NCS と ω -MeSO-NCS 類は ω -Alkenyl ITC とアルキルメルカプタンから有機合成した^{14),15)}。食味保存料はナカライテスク㈱から購入した。

2. 微生物と培地

次の供試株を検定菌として用いた。グラム陽性菌として *Bacillus subtilis* IFO 3134 と methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* IFO 12732 (MSSA), methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), グラム陰性菌として *Escherichia coli* IFO 3301 と *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3080, 真菌として *Candida albicans* IFO 1385 と *Aspergillus niger* IFO 4414 を使用した。MRSA は広島県環境保健協会・村上和保博士から分譲

された菌株で、オキサシリン KB disk で生育阻止域を全く形成しない薬剤耐性株である。

細菌の培養には、ペプトン 5.0 g, 酵母エキス 1.5 g, 肉エキス 1.5 g, NaCl 3.5 g, グルコース 1.0 g, Na₂HPO₄ 3.0 g, KH₂PO₄ 1.32 g (蒸留水 1,000 ml に溶解, pH 7.0~7.1) 培地¹⁶⁾ を、真菌の培養にはサブロー培地 (ペプトン 10.0 g, グルコース 40.0 g, 蒸留水 1,000 ml に溶解, pH 5.5~6.0 に調整) を使用した。

3. 抗菌活性の測定方法

試料は 80% メタノール溶液に 10,000 ppm となるように溶解した。*B. subtilis* と *A. niger* は孢子懸濁液を調製し、 $1 \times 10^4 \sim 10^5$ cells/ml となるように、残りの微生物は前培養した栄養細胞を $1 \times 10^4 \sim 10^5$ cells/ml となるように培地に接種後、96 穴マイクロプレート (第 1 列に 324 μ l, 第 2 列以降には 180 μ l ずつ分注した。マイクロプレートの第 1 列に試料溶液 36 μ l (終濃度 1,000 ppm) 添加した後、第 2 列以降へ連続 2 倍希釈した。細菌は 35°C で 6 時間静置培養後、培養液の濁度 (630 nm) をマイクロプレートリーダーで測定した。真菌は 25°C で 22 時間培養後、*C. albicans* は培養液の濁度と菌糸形への変化を顕微鏡で、*A. niger* は孢子の発芽を顕微鏡で観察した。濁度が 0.05 以下の培養液は透明で、菌の生育が認められなかったため、0.05 以下の数値を示した希釈列の試料濃度を生育阻止最小濃度 (MIC) とした。実験は 3 回おこない、平均値を求めた。

試料を添加しない 80% メタノール溶液希釈列をコントロールとした。コントロールの列にはいずれの微生物も生育することを確認した。

結 果

1. グラム陽性細菌に対する抗菌活性

Alkyl ITC 類はいずれも抗菌力が弱く、反対に Aryl, ω -MeS-NCS, ω -MeSO-NCS 類は、100 ppm 以下で細菌の生育を阻止し、強い抗菌力を示した (Fig. 1)。とくに Benzyl ITC と 2-Phenethyl ITC, 3-MeS-NCS, 5-MeS-NCS, 6-MeS-NCS は、ワサビに最も多く含まれている AIT の 5~10 倍強い抗菌活性を示した。Alkyl ITC 以外の ITC 類は、MRSA に対しても MSSA と同程度の抗菌力を示した。

2. グラム陰性細菌に対する抗菌活性

ω -Alkenyl ITC 類と Benzyl ITC, 3-MeS-NCS はグラム陰性菌に高い抗菌活性を示した (Fig. 2)。 ω -Alkenyl ITC と ω -MeS-NCS 類の多くは、*E. coli* より *P. aeruginosa* の生育を強く阻止し、反対に Aryl ITC と ω -MeSO-NCS 類は、*P. aeruginosa* より *E.*

Fig. 1 Antimicrobial activity of ITCs against gram-positive bacteria.

Antimicrobial activity was assayed using a 96 holes microplate by the continuous 2 fold dilution method. After incubation at 35°C for 6 h (bacteria) and at 25°C for 22 h (fungi), their turbidity were measured by a microplate reader at 630 nm. Growth inhibition against *A. niger* and *C. albicans* was determined on the result of germination of spores or cells observed under a microscope. Minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the concentration of the sample which completely inhibited the growth of microorganism.

Symbols: □ *B. subtilis*. ■ MSSA ▒ MRSA

coli の生育をよく阻害した。Aryl ITC と ω -MeS-NCS, ω -MeSO-NCS 類では、側鎖の炭素鎖が短いほど一般に抗菌活性が高くなった。

3. 真菌に対する抗菌活性

ω -Alkenyl ITCと Aryl ITC, ω -MeS-NCS 類は40 ppm 以下で *A. niger* と *C. albicans* の生育を阻止した。一方、 ω -MeSO-NCS 類は、カビと酵母で抗菌力が異なり、*A. niger* の生育は60ppm 以下で阻止したが、*C. albicans* に対する抗菌力は弱く、生育阻止に500ppm 必要とする ITC もあった (Fig. 3)。 ω -MeSO-NCS 類では側鎖の炭素鎖が長くなるほど、*C. albicans* に対して強い抗菌力を示す傾向が認められた。

4. 側鎖構造が異なる3種類の ITC 類の組み合わせが抗菌活性に与える効果

ω -Alkenyl ITC 類と Aryl ITC, ω -MeS-NCS 類の中から、抗菌活性の高い ITC を3つ (6-Heptenyl ITC, Benzyl ITC, 3-MeS-NCS) 選出し、単独、2

Fig. 2 Antimicrobial activity of ITCs against gram-negative bacteria.

The assay conditions are described in Fig. 1. Symbols:

▒ *E. coli*, ■ *P. aeruginosa*

つあるいは3つ組み合わせたときの抗菌力を測定した (Fig. 4)。試料は、いずれも終濃度10,000ppm とするように調整した。

6-Heptenyl ITC は *B. subtilis* と *E. coli* に対する抗菌力が弱いのにに対して、3-MeS-NCS と Benzyl ITC は、*P. aeruginosa* に対する抗菌力が弱いという特徴をもっている。6-Heptenyl ITC に 3-MeS-NCS あるいは Benzyl ITC を組み合わせると、6-Heptenyl ITC 単独より *B. subtilis* に対する抗菌力が4倍、*E. coli* に対する抗菌力が2～9倍増強された。一方、3-MeS-NCS あるいは Benzyl ITC 単独添加に比べると、*P. aeruginosa* に対する抗菌力は、6-Heptenyl ITC が共存することにより2倍上昇した。単独添加あるいは2種類の ITC を組み合わせても50ppm で供試株全ての生育を阻止できなかったが、3種類の ITC を組み合わせると、生育阻止が可能となった。

5. 食品保存料とITC類の抗菌活性の比較

ITC 類と同一条件で、代表的な食品保存料7つの抗

Fig. 3 Antimicrobial activity of ITCs against fungi. The assay conditions are described in Fig. 1. Symbols: *A. niger*, *C. albicans*

Fig. 4 Effect of combination of ω -alkenyl ITC, aryl ITC, and ω -MeS-NCS on their antimicrobial activity.

The assay conditions are described in Fig. 1. Symbols: *B. subtilis*, *MSSA*, *MRSA*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. niger*, *C. albicans*.

菌活性を測定し MIC 値を比較した (Fig. 5)。最も抗菌力が強かったのは、*p*-Hydroxybenzoic acid butylester, ついで Propionic acid と *p*-Hydroxybenzoic acid propylester であった。真菌に抗菌活性をもつデヒドロ酢酸Naは、*C. albicans* と *A. niger* の生育を30~60ppm で阻害したが、細菌には抗菌活性が認められなかった。安息香酸 Na とソルビン酸Kは1,000ppm でも抗菌活性が認められなかった。Alkyl ITCを除いた ITC 類は、今回検討した食品保存料に比べて5~10倍高い抗菌活性を示した。

考 察

今回検討した7株について、ITC の側鎖構造と抗菌活性の間に密接な関係が認められた。5種類の側鎖をもつ ITC の中では Aryl ITC 類の抗菌力が強く、反対に Alkyl ITC 類の抗菌力は弱かった。芳香族 ITC 類が脂肪族 ITC 類より高い抗カビ活性を示すことは CARTER ら¹⁷⁾ や DROBNICA ら¹⁸⁾ によってすでに報告されている。今回、カビだけでなく細菌に対しても芳香族 ITC 類が脂肪族 ITC 類より高い抗菌活性を示すことを明らかにすることができた。

ITC 類の側鎖構造が抗菌活性の高さに与える効果は、

Fig. 5 Antimicrobial activity of food preservatives. The assay conditions are described in Fig. 1.

Symbols: *B. subtilis*, *MSSA*, *MRSA*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. niger*, *C. albicans*.

イソチオシアネート基 ($-N=C=S$) の活性化と細胞表面層の構造 (菌体表面構造あるいは細胞内への透過性) の違いによって考えられる。イソチオシアネート基が ITC 類の抗菌活性の発現に重要であり、側鎖に二重結合や芳香環、メチルチオ基、スルフィニル基が存在すると、イソチオシアネート基がより活性化され、抗菌力が増大すると考えられる。しかも、イソチオシアネート基と側鎖の二重結合やメチルチオ基、スルフィニル基との距離が近いほど、言い換えると、側鎖の炭素鎖が短いほどイソチオシアネート基が活性化され、抗菌力が増大すると推測される。側鎖の炭素鎖が短いほど、グラム陰性菌に対する抗菌活性が高かった今回の結果は、この推測を支持している。しかし、グラム陽性、陰性細菌と真菌ではそれぞれ細胞表面層の構造や構成成分が異なるため、側鎖構造の違いだけで、抗菌力の強さを説明することは難しい。ITC 類の細胞内への透過性や菌体たんぱく質との結合に側鎖構造が影響を与えている可能性も考慮する必要がある。

ISSHIKI ら⁶⁾ は、グラム陰性菌より陽性菌の方が AIT 蒸気に強い抵抗性をもつと報告している。今回得られた AIT の結果も、グラム陰性菌より陽性菌が強い抵抗性を示し、ISSHIKI ら⁶⁾ の結果を確認することができた。AIT 以外の ω -Alkenyl ITC 類も AIT と同様の結果を示した。

しかし、Aryl ITC, ω -MeS-NCS, ω -MeSO-NCS 類は、 ω -Alkenyl 類とは反対にグラム陰性菌よりグラム陽性菌に高い抗菌活性を示した。これは今回初めて明らかになったことで、ITC 類の側鎖構造によって抗菌スペクトルが変わることを見出すことができた。

グラム陰性菌に高い抗菌活性をもつ ω -Alkenyl ITC 類と、グラム陽性菌の生育をよく阻止する Aryl あるいは ω -MeS-NCS 類を組み合わせると、抗菌スペクトルが拡大した。また、Alkyl ITC 以外の ITC 類は、薬剤耐性で問題となっている MRSA に対しても MSSA と同程度の抗菌力を示した。これらの結果は、抗菌スペクトルの異なる ITC 類を組み合わせると、広範囲の微生物制御が可能となることを示している。

ITC 類の抗菌力を食品保存に応用するときの要因として、ITC 類の閾値と MIC、香りの種類があげられる。ア ril カラシ油と AIT 蒸気の臭いの閾値は約 3 ~ 10 ppm と報告されている^{7), 9)}。一方、MASUDA ら¹³⁾ は Alkyl ITC, ω -Alkenyl ITC, Aryl ITC, ω -MeS-NCS 類の臭いの閾値と性状を検討し、 ω -Alkenyl ITC 類と Benzyl ITC の閾値は 17 ~ 75 ppb ときわめて小さいのに対して、2-Phenethyl ITC の臭気閾値は

240 ppb, ω -MeS-NCS 類は 280 ~ 800 ppb で ω -Alkenyl ITC 類や Benzyl ITC に比べると 1 桁高い値であると報告している。

また、AIT を除いた ω -Alkenyl ITC 類は、沢ワサビの特徴的な香気 (green note) とともに、やや弱い刺激性的な匂いもあわせもつものに対して、Aryl ITC 類は化学的あるいは強い大根様匂い、 ω -MeS-NCS 類は大根あるいはピクルス様匂いと表現され¹³⁾、側鎖構造の違いによって、匂いが異なることは注目される。また、INA ら⁹⁾ は、AIT 含量の低い沢ワサビの葉と茎から、沢ワサビに特徴的な香気成分として ω -MeS-NCS 類と ω -MeSO-NCS 類を検出している。

AIT と Aryl ITC 類は強い抗菌力を有しているが、臭いの閾値が小さく、しかも刺激性的な匂いをあわせもつことから応用範囲が狭められる。一方、 ω -MeS-NCS 類は真菌とグラム陽性菌に対する抗菌力が強く、しかも臭いの閾値は ω -Alkenyl ITC 類や Aryl ITC 類より 1 桁高く、刺激性的な匂いも小さいことから応用範囲が広いと期待できる。また、AIT 以外の ω -Alkenyl 類はグラム陰性菌や真菌に対する抗菌力が強く、臭いの閾値は小さいものの green note とやや弱い刺激性的な匂いをあわせもつため、 ω -MeS-NCS 類と組み合わせると抗菌スペクトルも広がり応用面で期待される。

Alkyl ITC を除く ITC 類は、代表的な食品保存料に比べると 5 ~ 10 倍抗菌活性が高く、抗菌スペクトルも広がった。食品保存料のうち安息香酸 Na, ソルビン酸 K, プロピオン酸, デヒドロ安息香酸 Na は、酸型保存料として知られていて、培地の pH によって抗菌力が左右される¹⁹⁾。酸性域 (pH 5) で ITC 類の抗菌活性を測定した予備実験では、抗菌力に変動が認められなかったことから、ITC 類は中性から酸性域で活性を示すと推測される。今後、pH や食塩濃度、温度などが ITC の抗菌力に与える効果をさらに検討していきたい。

ITC 類は一般に非特異的な阻害剤であると考えられている²⁰⁾。ITC 類の主要な抗菌作用機構として、ジスルフィド結合の開裂による非特異的な酵素の不活性化と微生物呼吸系の作用阻害が提案されている。

ZSOKNAI²¹⁾ は ITC 類がジスルフィド結合を酸化的に開裂させ、これが菌体内酵素の不活性化を引き起こし抗菌活性を示すと述べている。KAWAKISHI と KANEKO²²⁾ も ITC 化合物の生物活性はイソチオシアネート基に由来し、この基が細胞質や細胞膜にあるペプチドやたんぱく質の官能基 (たとえばスルフヒドリル基や ϵ -アミノ基、末端 α -アミノ基など) と結合して、様々なたんぱく質の改変を引き起こし、これが微生物の生育阻害の原

因になっていると推測している。TANG¹¹⁾ は Benzyl ITC によるパンプインの活性阻害機構を、パンプインの酵素作用に係わるスルフヒドリル基を Benzyl ITC が求核攻撃し結合することによって失活させると述べている。

一方、AIT は終濃度 1 mM で酵母の酸素呼吸を 50% 以上阻害した²³⁾。シトクローム c オキシダーゼ活性を 50% 阻害するのに必要な AIT 濃度は、Cyanide やアンチマイシン A の 1/100, 1/5000 であったことから、AIT は酸化のリン酸化の脱共役剤として機能していると推測されている²³⁾。

また、ITC の重要な分解物で抗菌活性を有することが知られているチオシアネートラジカル (SCN⁻) による代謝酵素の阻害によって抗菌活性を示すという BANKS ら²⁴⁾ の報告もある。

今後、ITC 類による微生物の生育阻害機構の解明と、 ω -MeS-NCS 類を中心に食品保存への応用に向けて具体的な使用方法を検討していきたい。

要 約

5 種類の側鎖構造をもつ 19 の ITC 類の抗菌活性を検討し、以下の点を明らかにした。

1. Aryl ITC 類の抗菌活性が高く、次いで ω -MeS-NCS 類、 ω -Alkenyl ITC 類、 ω -MeSO-NCS 類の順で、最も活性が低かったのは Alkyl ITC 類であった。

2. 側鎖構造の違いによって、抗菌スペクトルが異なる傾向が認められた。Aryl ITC と ω -MeS-NCS 類は真菌とグラム陽性菌の生育をよく阻害したが、グラム陰性菌に対する抗菌活性は低かった。一方、 ω -Alkenyl ITC 類は真菌とグラム陰性菌の生育をよく阻止したが、グラム陽性菌に対する抗菌活性が低かった。 ω -MeSO-NCS 類はグラム陽性菌と *A. niger* の生育を阻止したが、グラム陰性菌と *C. albicans* に対する抗菌活性は低かった。

3. Alkyl ITC 以外の 4 種の ITC 類は、MRSA に対しても高い抗菌活性を示し、MSSA と同濃度で生育を阻止した。

4. 抗菌スペクトルの異なる ITC 類を組み合わせることにより、抗菌スペクトルの拡大と抗菌力の増強をはかることができた。

5. Alkyl ITC を除く ITC 類は、代表的な食品保存料の抗菌力に比べると 5 ~ 10 倍高い抗菌活性を示した。

MRSA を分譲いただいた財団法人広島県環境保健協会 村上和保博士に感謝いたします。

文 献

- 1) NAKATANI, N.: In "Spices, herbs and edible fungi" (CHARALAMBOUS, G. ed.) p.251~p.271, Elsevier Science B. V., Amsterdam (1994).
- 2) 一色健司・西宮 隆・野坂宣嘉・徳岡敬子: 日食工誌, **40**, 525 (1993).
- 3) 一色健司・徳岡敬子: 食品工業, **8**, 18 (1993).
- 4) INOUE, S., GOI, H., MIYAUCHI, S., OGIHARA, M., and IWANAMI, Y.: *J. Antibact. Antifung. Agents*, **11**, 609 (1983).
- 5) 徳岡敬子・森理三郎・一色健司: 日食工誌, **39**, 68 (1992).
- 6) ISSHIKI, K., TOKUOKA, K., MORI, R., and CHIBA, S.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1476 (1992).
- 7) 徳岡敬子・一色健司: 日食工誌, **41**, 595 (1994).
- 8) DELAQUIS, P. J., and SHOLBERG, P. L.: *J. Food Protec.*, **60**, 943 (1997).
- 9) 伊奈和夫・高澤令子・八木昭仁・伊奈郊二・木島 勲: 日食工誌, **37**, 256 (1990).
- 10) 伊奈和夫・呉 建生・衛藤英男・八木昭仁・木島 勲: 日食工誌, **40**, 859 (1993).
- 11) TANG, C. S.: *J. Food Sci.*, **39**, 94 (1974).
- 12) 亀岡 弘: 農化, **56**, 441 (1982).
- 13) MASUDA, H.: HARADA, Y., TANAKA, K., NAKAJIMA, M., and TATEBA, H.: *Biotechnology for Improved Foods and Flavors*, **637**, 67 (1996).
- 14) 増田秀樹・津田 徹・立場秀樹・三原 智: 特許公報, 90-221255, (1990).
- 15) 原田靖裕・増田秀樹・亀田 弥: 公開特許公報, 95-215931, (1995).
- 16) 瀬戸治男: 新生化学実験講座17 微生物実験法 (東京化学同人, 東京), p. 150, (1992).
- 17) CARTER, G. A., GARRAWAY, J. L., SPENCER, D. M., and WAIN, R. L.: *Appl. Biol.*, **51**, 135 (1963).
- 18) DROBNICA, L., ZEMANOVA, M., NEMEC, P., KRISTIAN, P., ANTOS, and HULKA, A.: *Appl. Microbiol.*, **15**, 710 (1967).
- 19) 野坂宣嘉・友杉 藩: 抗菌抗カビ技術と応用 (株式会社シーエムシー, 東京) p.164 (1996).
- 20) DELAQUIS, P. J. and MAZZA, G.: *Food Technology*, **11**, 73 (1995).

-
- 21) ZSOLNAI, T.: *Arzneim., Forschung.*, **16**, 870 (1966).
- 22) KAWAKISHI, S., and KANEKO, T.: *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 85 (1987).
- 23) KOJIMA, M., and OGAWA, K.: *J. Ferment. Technol.*, **49**, 740 (1971).
- 24) BANKS, J. G., BOARD, R. G., and SPARKS, N. H. C.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **8**, 103 (1986).
- (平成10年9月28日受付, 平成10年11月18日受理)
(Received Sep.28,1998; Accepted Nov.18,1998)
-