

[ J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 17 37~46 1982 ]

## シンナム酸ソーダによるワイン産膜性酵母の 増殖阻害

天野 義文・中村 和夫・加賀美元男・後藤 昭二

### Inhibitory Effect of Sodium Cinnamate on the Growth of Film-forming Yeasts on the Surface of Wine.

YOSHIFUMI AMANO, KAZUO NAKAMURA, MOTOO KAGAMI, and SHOJI GOTO

*Depart. of Fermentation Technology, Faculty of Engineering,  
Yamanashi University, Kofu 400*

The antimicrobial activity of sodium cinnamate against the growth of film-forming yeasts on wine was investigated. The film-forming yeasts used were *Candida krusei* K407, *Candida valida* K504, *Hansenula anomala* K426, *Pichia membranaefaciens* WF124 and *Saccharomyces bayanus* J5. It was found that sodium cinnamate suppressed the growth of all the film-forming yeasts at 1.0 mM on the medium adjusted to less than pH 5.0. The degree of inhibition influenced by sodium cinnamate varied with the yeasts used, pHs and concentrations of ethanol in the media. When the medium contained more than 8% ethanol, the growth of the yeasts were inhibited by sodium cinnamate concentration which was 0.2 mM. Sodium cinnamate had a noticeable effect on the decrease in the oxidative activities of these film-forming yeasts such as to act on ethanol, acetic acid, citric acid, glucose and alanine.

The wine, which had remarkable resisting force to the growth of the yeasts, was produced by the addition of sodium cinnamate to fermenting must. This antifilm-forming activity remained even in the wine which had been in storage for one year.

シンナム酸(cinnamic acid, 桂皮酸, 分子量148)<sup>1,2)</sup> およびその類縁化合物は微生物の増殖に阻害的な作用を及ぼすことが知られている。<sup>3,4,5)Baranowskiら<sup>6)</sup></sup> はp-coumaric acid (4-hydroxycinnamic acid), ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) 等の hydroxy cinnamate が酵母の増殖を阻害することを示した。我々は先にシンナム酸のブドウマストへの添加が発酵の遅れや停止をもたらす事実を報告し,<sup>7)</sup>

この現象を貯蔵熟成させるワインの酒質管理に応用する研究を進めてきた。すなわち、貯蔵中のワイン表面に皮膜を形成し酒質を低下させるワイン産膜性酵母の増殖を阻止し、難産膜性のワインを醸造する方法について検討を加えてきた。ブドウ果汁、ワイン中ではシンナム酸類の大部分は酒石酸エステルのかたちで存在することが知られ<sup>8,9,10,11)</sup> 遊離型はほとんど認められないと報告されている。<sup>9,11,12,13)</sup> シ

Table 1. Composition of basal medium.

Ethanol	Variable
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.7
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1
Wine (Muscat Bailey A)	100 ml
Vitamin	
Biotin	2 μg
Ca-pantothenate	400
Folic acid	2
Inositol	2,000
Niacin	400
p-Aminobenzoic acid	200
Pyridoxine-HCl	400
Riboflavin	200
Thiamine-HCl	400
Total volume	1,000 ml

pH 3.8

シナム酸はシキミ酸経路においてフェニルアラニンの脱アンモニア反応により生成し、p-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid の前駆体である<sup>14)</sup>。このように原料果の生合成反応系に含まれているものの中から産膜防止に有効な化合物が見い出されるならば、その意義はきわめて大きい。

本研究では予備試験の結果より、シナム酸類の中で産膜防止効果の高かったシナム酸を選択し、その作用条件について検討を加えた後、実際のワイン醸造に応用し、難産膜性ワインが醸造可能であることを確認したので報告する。

#### 供試料および実験方法

**供試菌株** *Candida krusei* K407, *Candida valida* K504, *Hansenula anomala* K426, *Pichia membranaefaciens* WF124, および *Saccharomyces bayanus* J5<sup>15)</sup> の5菌株を供試した。以下、菌株名は番号で略称した。

**培地組成** Table 1 に示す培地を使用した。予備試験により、培地へワインを培地量の20%加えておくと酵母菌体収量が約2倍に増加する結果を得た。この結果ならびに大塚ら<sup>16)</sup>の報告を参考にし、ワイ

ン10%を培地に添加した。使用したワインはMuscat Bailey A種から常法通り醸造した赤ワインである(エタノール分13.4%, 総酸度0.765 g/100 ml, 残糖量3.5 g/l, 全ポリフェノール量760 ppm, pH 3.71, 遊離SO<sub>2</sub> 27.1 ppm)。上記成分をもつ赤ワインをナイロン粉末処理してポリフェノール含量を360 ppmまで低下させ<sup>16)</sup>、このナイロン粉末処理ワインと原ワインとを使用した培地で酵母増殖の比較試験を行なったが、増殖に差は認められず、ワイン中のポリフェノールは増殖に影響していなかった。遊離SO<sub>2</sub>は0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えて除去した。培地中のエタノール濃度を一定にする場合は、ワインを40℃で減圧濃縮し、エタノールを含む揮発成分を97%除去した後、蒸留水にて原体積に復し、このものをエタノールを含まないワイン画分として使用した。培地中のエタノール濃度は通常の場合、静置培養では5,10%, 振盪培養では1,5%で実験を行なった。培地の殺菌は70℃, 5分間加熱する条件で行なった。この操作においてエタノール濃度10%以下の場合、殺菌操作前後の培地中エタノール濃度に大きな変化はなかった。

**培養方法** 培養温度は静置培養のとき20-25℃,

Table 2. Effect of various compounds on film-forming growth of *H. anomala* K426.

Compounds (0.5mM)	Cultivation time (day)				Final pH
	2	6	17	25	
Sodium cinnamate	—	—	—	—	4.0
Ethyl cinnamate	—	+	##	##	2.2
Cinnamyl alcohol	—	—	##	##	2.2
Benzoic acid	—	—	+	##	3.0
None (Control)	—	+	##	##	2.2

The yeast was cultivated at 20°C in the medium containing 10 % ethanol.

Table 3. Effect of various compounds on growth of *H. anomala* K426.

Compounds (1 mM)	Growth (OD <sub>660</sub> )	Final pH
Sodium cinnamate	0.	3.9
Methyl cinnamate	0.02	3.9
Ethyl cinnamate	0.03	3.9
Benzoic acid	0.06	3.8
Methyl benzoate	1.82	2.2
Ethyl benzoate	1.56	2.2
Butyl- <i>p</i> -hydroxybenzoate	0.03	3.9
None (Control)	1.94	2.2

The yeast was grown by shaking culture at 30°C for 48 hr in the medium containing 5% ethanol.

振盪培養では30°Cとした。静置培養は内径15mmφの試験管に培地10mlを入れ、培地の液深を5.66(ml/cm<sup>2</sup>)とした。種菌は振盪培養したものを10<sup>6</sup>(cell/ml)前後となるように接種した。菌の生育は皮膜の形成状態の観察および濁度(OD<sub>660</sub>)で測定した。

**試薬** シンナム酸は水に対する溶解性が低いので、主にナトリウム塩(sodium cinnamate, 和光純薬 K. K.)を使用した。その他の試薬は東京化成工業 K. K. のものを使用した。

**測定方法** 生死菌の判定において菌体の染色はローダミンB染色法<sup>18)</sup>を使用した。酸化活性の測定はワールブルグ検圧法で行った。

#### 実験結果および考察

#### 産膜性酵母の増殖に対する各種化合物の影響

シンナム酸ソーダおよびその誘導体が K426, J5 の産膜増殖におよぼす影響を検討し、K426の結果をTable 2に示した。化合物無添加のコントロール培地では順調な産膜増殖がみられたのに対し、シナミルアルコールを添加した培地では増殖に遅延が生じた。シンナム酸ソーダの場合は25日を経過しても産膜および液内増殖した沈殿酵母は認められず、培地 pH の変化もなかった。比較のため使用した安息香酸は酸性側 pH で殺菌作用を示すことが知られているが<sup>19)</sup>10日目頃より産膜を生じ17日目には豊富な繁殖が認められた。J5の結果もほぼ同様であった。振盪培養した場合はシンナム酸エステルについても増殖阻害効果が認められた (Table 3)。また、

Table 4. Effects of pH and sodium cinnamate on film-formation of *H. anomala* K407.

Sodium cinnamate	Initial pH	Culture time (day)				Final pH
		2	7	10	14	
None (Control)	2	—	—	—	—	2.0
	3	+	+	++	+++	2.2
	4	+	++	+++	+++	2.4
	5	+	++	+++	+++	2.6
	6	+	++	+++	+++	3.6
	7	+	++	+++	+++	3.8
	8	+	++	+++	+++	4.0
0.5 mM	2	—	—	—	—	2.0
	3	—	—	—	—	3.0
	4	—	—	—	—	4.0
	5	+	+	+	+	3.2
	6	+	++	++	+++	4.0
	7	+	++	+++	+++	4.0
	8	+	++	+++	+++	4.0
5.0 mM	2	—	—	—	—	2.0
	3	—	—	—	—	3.0
	4	—	—	—	—	4.0
	5	—	—	—	—	5.0
	6	+	+	+	+	4.6
	7	+	+	++	++	4.6
	8	+	+	++	++	4.6

The yeast was cultivated at 25°C in the medium containing 5% ethanol.

比較に用いた安息香酸類の中で p-オキシ安息香酸ブチルは pH の影響をうけにくい抗・殺菌剤として知られているが<sup>19)</sup>, pH 3.8の培地 (Table 1) でシンナム酸ソーダはこれと同程度の抗菌力を示した。

**pH の影響** シンナム酸ソーダによる増殖阻害効果において培地 pH の及ぼす影響を検討した。静置培養ではシンナム酸ソーダ無添加のとき, pH 2 を除く全ての pH 範囲で活発な産膜増殖がみられた (Table 4)。シンナム酸ソーダを 0.5, 5.0 mM 添加した培地ではそれぞれ pH 4, pH 5 以下のとき産膜増殖は阻害され, また培養による培地 pH の変化は認められなかった。振盪培養においてもシンナム酸ソーダの濃度が 0.5 mM のとき pH 4 以下の域で増殖は阻害された (Fig. 1)。酸性域におけるシンナム酸ソーダ

の増殖阻害パターンは安息香酸と類似していた。以上の静置ならびに振盪培養において得られた結果は K 407, K 426, J 5 の各菌株に共通していた。

#### シンナム酸ソーダによる増殖阻害と菌の生死

増殖阻害を起こさせるのに必要なシンナム酸ソーダの濃度は培地中に共存するエタノール濃度や菌種によっても異なるが, 供試菌株の中で最も抵抗性の強い K 407 では 1.0 mM, 次いで K 426 では 0.5 mM の濃度に培地へ添加すれば増殖を停止させることができた。Fig. 2 は K 407 の振盪培養において増殖活性の最も高い時期に矢印の点でシンナム酸ソーダを添加した例を示している。0.5 mM の場合は添加直後に誘導期がみられたものの再び増殖した。しかし定常期の菌体濃度はコントロールと比較し低い値となった。

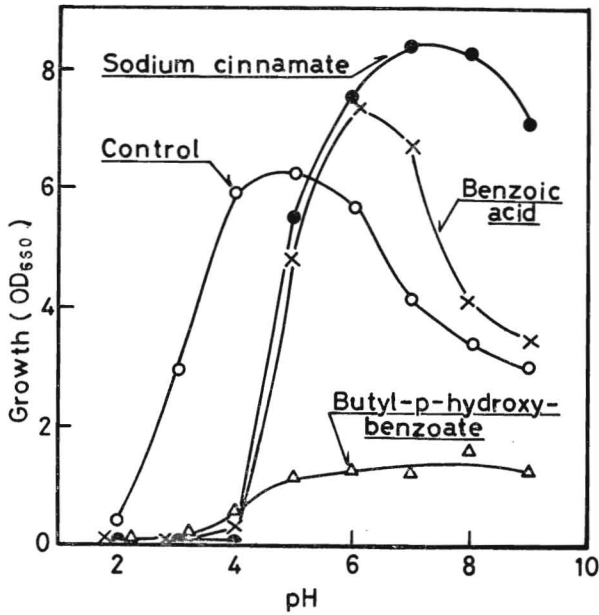


Fig. 1. Effects of pH and growth inhibitory compounds on growth of *H. anomala* K426. The yeast was grown by shaking culture at 30°C for 48 hr in the medium containing 0.5 mM of each compound and 5% ethanol.

Table 5. Effect of the addition of sodium cinnamate on viable cell number.

Film-yeasts	Amounts of sodium cinnamate added (mM)	Viable cell number (cell/ml) × 10 <sup>7</sup>	Percentage of viable cell (%)
<i>C. krusei</i> K407	0	12	95.7
	0.5	5.0	83.8
	1.0	2.6	79.4
<i>H. anomala</i> K426	0	9.7	98.9
	0.5	1.5	82.5
	1.0	0.7	61.2

Cell numbers were counted eleven hours after the addition of sodium cinnamate in the culture shown in Fig. 2.

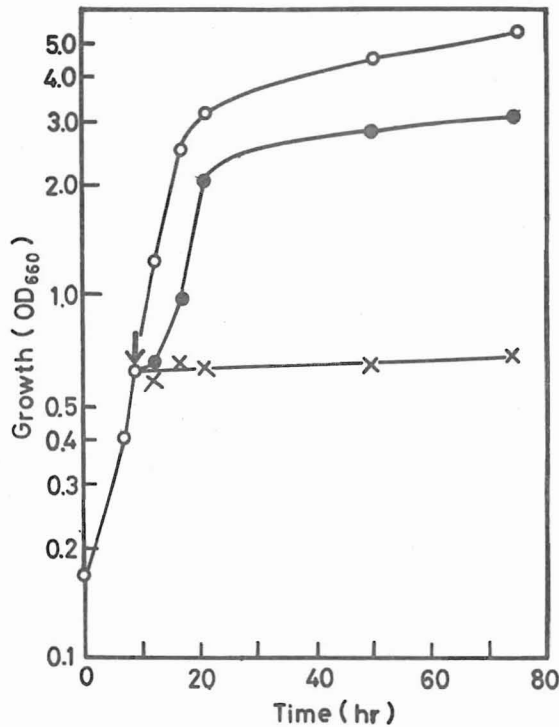


Fig. 2. Growth inhibition of *C. krusei* K407 by addition of sodium cinnamate.

The yeast was cultivated at 30°C in the medium containing 5% ethanol.

The arrow indicates the addition of sodium cinnamate. Sodium cinnamate added: ×, 1.0mM; ●, 0.5 mM; and ○, no supply.

また、1mMのシナナム酸ソーダを添加すると増殖は完全に停止した。シナナム酸ソーダを添加してから11時間経過した時点で培養液中の生死菌数を測定したところ、コントロールの生菌数が $10^8$ (cell/ml)まで増加し、生菌率も高いのに比較し、シナナム酸ソーダを1.0mM添加した培養液では添加前後の菌濃度に変化は認められず増殖は停止していた(Fig. 2, Table 5)。しかし、生菌率はK407が79%、K426も61%を示していた。従って、シナナム酸ソーダは1.0mM以下の濃度のとき菌を短時間で致死させる程強力な殺菌剤ではない。さらに長い培養時間が経過し、その間にシナナム酸ソーダ、エタノール濃度、pH等培地中で抗菌力を形成している因子のバランスに変化が生じた場合、酵母は再び増殖を開始する可能性も考えられる。

**シナナム酸ソーダによる酸化活性の低下** 産膜性酵母菌体による各種炭素化合物の酸化活性がシナナム酸ソーダによりどのような影響を受けるか検討した。酸化活性の測定には振盪培養菌の洗浄菌体を使用した。エタノールおよびその酸化経路上にあるアセトアルデヒド、酢酸の酸化活性はシナナム酸ソーダにより低下した(Table 6)。これらの化合物以外にもクエン酸、グルコース、アラニン等広い範囲の化合物の酸化活性が抑制された。このことはシナナム酸ソーダによる増殖の阻害が、単にエタノール酸化と直接関係している酵素反応の阻害だけにより引き起こされているものではないことを示唆している。シナナム酸による酸化活性の阻害<sup>20)</sup>、呼吸系酵素<sup>21)</sup>ならびに電子伝達に参与する酵素<sup>22)</sup>の阻害あるいはフェニルアラニンアンモニアラーゼ<sup>23)</sup>の阻害

Table 6. Effect of sodium cinnamate on oxidative activity.<sup>1)</sup>

Strains	Concentration of sodium cinnamate (mM)	Oxidation substrates <sup>2)</sup>					
		Ethanol	Acetaldehyde	Acetate	Citrate	Glucose	Alanine
<i>C. krusei</i> K407	0	42.3	62.1	7.4	11.3	28.2	5.9
	0.5	12.5	3.8	1.2	9.4	1.3	6.1
	5.0	0	0	0	0	0	0
<i>H. anomala</i> K406	0	86.0	78.1	12.0	8.1	35.7	6.1
	0.5	23.3	0.6	0	0	16.1	0
	5.0	0	0	0	0	0	0
<i>S. bayanus</i> J5	0	97.9	90.5	10.7	16.0	43.1	12.7
	0.5	28.2	2.1	0	6.0	20.6	3.7
	5.0	0	0	0	0	0	0

1)  $\mu\text{l O}_2/\text{mg cell/hr}$ .

2) The concentrations of substrates were 0.5%, except acetaldehyde (0.1 %, v/v).  
The yeast cells used were cultivated by shaking flasks for 15 hr in the medium containing 1% ethanol.  
The oxidative activities were measured at 30°C using washed cell suspensions.

Table 7. Effects of sodium cinnamate and ethanol on film-formation of *H. anomala* K426.

Sodium cinnamate (mM)	Ethanol (%)						
	0	2	4	6	8	12	14
0							
0.01							
0.05							
0.1							
0.2							
0.3							
0.5							
0.75							
1.0							

Film-forming growth was found in the areas enclosed with lines.  
The lines show the time elapsed, ..... , 2 days; - · - · - · , 10 days; and, ———— , 20 days.

Table 8. The suppression of film-forming growth of *H. anomala* on the surface of wine which was produced from sodium cinnamate-added must.

Concentration of sodium cinnamate added to must (mM)	Concentration of ethanol in wine (%)								
	0	5	6	7	8	9	10	11	13
0									
0.5									
1.0									

Excess ethanol in the wine was removed by rotary evaporation *in vacuo* at 40°C. Film-forming growth was found in the areas enclosed with lines. The lines show the time elapsed, ·····, 3 days; - - - - -, 7 days; ———, 14 days, and ———, 20 days.

等が酵母や細菌についてこれまでに報告されてきた。本研究で使用した産膜性酵母がどのような機構でシンナム酸ソーダにより増殖阻害を受けるのか今のところ明らかではない。

**増殖阻害に対するシンナム酸ソーダとエタノールの相補作用** シンナム酸ソーダとエタノールを種類の濃度に組合せて使用した場合に、産膜増殖が生じた範囲を Table 7 に示した。シンナム酸ソーダ無添加のとき培養 2 日目でエタノール濃度 6% 以下の範囲に産膜が生じた。また、エタノールを含まない培地ではシンナム酸ソーダが 1.0 mM 存在しても培養 20 日目には産膜増殖が見られたが、エタノールを加えておくと、その濃度増加に伴い、より低濃度のシンナム酸ソーダで産膜増殖を阻止することが可能であった。このようにシンナム酸ソーダとエタノールは産膜増殖を相補的に阻害することが明らかとなった。産膜増殖が可能なシンナム酸ソーダとエタノールの濃度範囲は培養日数と共に拡大していった。しかし、10 日目から 20 日目にかけて新たに産膜を生じた区域は 10 日以前と比較し小さく、拡大の速度が低下傾向にあることを示した。すなわち、実線で示した区域外の条件にある試料はきわめて難産膜性であることを示している。エタノール濃度 10%、シンナム酸ソーダ濃度 1, 10 mM の場合、供試した 5 菌株のすべてが 22 日間培養してもまったく産膜増殖することができなかった。通常のワインはエタノール濃

度が 12% 前後であることを考えれば 1 mM 以下のシンナム酸ソーダ濃度でワインの難産膜性は十分維持されよう。

**マストにシンナム酸ソーダを添加した醸造試験** 発酵途中のマストにシンナム酸ソーダを添加し、難産膜性のワインを製造するための醸造試験を行った。Muscat Bailey A 種のブドウ果汁にメタ重亜硫酸カリウム（遊離 SO<sub>2</sub> として 50 ppm）を加えた後、補糖して温度 30°C で発酵させた。発酵開始後 7 日目にシンナム酸ソーダを 0.5, 1.0 mM 濃度に添加した。ひきつづき後発酵を行わせた後、16 日目にオリを除き得られたワインはびん詰めし気相を窒素ガス置換して 10°C で保存した。このワインはエタノール濃度 13.3%、残糖量 3.5 (g/l) であった。保存して 1 年後に再度オリ引きした後、得られたワインに対する産膜性を試験した。コントロール（シンナム酸ソーダ無添加）を含むそれぞれのワインに対し、K 426, K 407, J 5 酵母を 10<sup>6</sup> (cell/ml) の濃度に接種したが、エタノール濃度が高いためか 1 ヶ月を経過しても産膜増殖はみられなかった。そこで、ワイン中のエタノール濃度を下げて試験するためにそれぞれのワインを 40°C で減圧濃縮し、エタノール、水分を含む揮発成分を除去した後、蒸留水で原体積に復すと共にエタノールも加えて 0–13% の濃度に調製した。これらのワインを試料として K 426 の産膜増殖試験を行った結果を Table 8 に示した。シンナム酸ソーダ無



添加のコントロールは培養14日でエタノール濃度10%の試料まで産膜増殖がみられた。これに対し、シンナム酸ソーダ0.5 mMの試料はエタノール濃度が8%以下の試料には産膜増殖が生じたが、9%以上では産膜せずしかも14日以降も産膜は認められなかった。またシンナム酸ソーダを1 mMとした試料ではエタノール濃度が6%以下でないと産膜しなかった。このようにシンナム酸ソーダを添加して醸造したワインではコントロールのワインより低いエタノール濃度の範囲でしか産膜増殖できなかった。また、シンナム酸ソーダを添加(0, 0.5, 1.0 mM)して醸造したワインのエタノール濃度を5%に統一して、K 426, K 407, J 5の産膜増殖試験を行ったところ、シンナム酸ソーダの濃度の増加に従って産膜増殖に遅延がみられた。

このように貯蔵1ヶ年を経過してもシンナム酸ソーダによるワインの難産膜性は十分維持されることから、醸造途中でシンナム酸ソーダを添加利用する方法はワインの長期に渡る貯蔵熟成期間に産膜を防止するためのきわめて有効な方法であることが示された。

シンナム酸はシナモンやココアにも含まれる芳香成分の一つであるが、<sup>2)</sup>ワインに添加する場合使用量によってはその特有な香りがワインの香味に影響を及ぼす。従って、高濃度を使用することは適当でない。本研究の産膜形成試験においては遊離亜硫酸を全く含まないワインないしはワイン培地に多量の産膜性酵母を接種し、産膜形成がきわめて促進されやすい条件のもとで試験を行っている。従って、ワインが良好な管理状態におかれるならばさらに低濃度のシンナム酸ソーダでワインの難産膜性は促進保持されると考えられる。

## 要 旨

ワイン産膜性酵母の増殖に対するシンナム酸ソーダの抗菌活性を研究した。研究に使用した産膜性酵母は *Candida krusei* K 407, *Candida valida* K 504, *Hansenula anomala* K 426, *Pichia membranaefaciens* WF 124および *Saccharomyces bayanus* J 5である。pH 5以下の酸性側 pH をもつ培地において、シンナム酸ソーダは1.0 mMで供試酵母の増殖を停止させることが明らかとなった。シンナム酸ソーダによる増殖阻害の程度は使用した酵母、培地の pH およびエタノール濃度に依存していた。培地中のエタノール

濃度が8%以上のとき、供試酵母は0.2 mMのシンナム酸ソーダで増殖阻害をうけた。供試酵母による、エタノール、酢酸、クエン酸、グルコースおよびアラニンの酸化活性はシンナム酸ソーダにより低下した。

供試酵母の産膜増殖に対し、きわめて抵抗力をもつワインが発酵中のマストへシンナム酸ソーダを添加する方法で製造された。このワインの産膜増殖に対する抵抗性は1年間貯蔵した後にもなお保持されていた。

本研究を行なうに当り実験の一部を担当された那須信男君、篠原雅弘君に感謝します。

## 文 献

- 1) 薬学大辞典編纂所：薬学大辞典，第三巻，P 405，非凡閣（1936）。
- 2) Opdyke, D. L. J. : *Food and Cosmetics Toxicology*, 16, 687 (1978).
- 3) Morozumi, S. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 36 (4), 577 (1978).
- 4) Koike, S., Iizuka, T., Mizutani, J. : *Agric. Biol. Chem.*, 43 (8), 1727 (1979).
- 5) Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R., Takahara, Y., Ichimura, K. : *Agric. Biol. Chem.*, 43(11), 2365 (1979).
- 6) Baranowski, J. D., Davidson, P. M., Nagel, C. W., Branen, A. L. : *J. Food Sci.*, 45, 592 (1980).
- 7) 天野, 久保田, 加賀美 : 昭和53年度日本農芸化学会大会講演要旨集, P 249 (1978).
- 8) 岡村, 渡辺 : 醸協, 71 (11), 869 (1976).
- 9) Singleton, V. L., Timberlake, C. F., Lea, A. G. H. : *J. Sci. Fd. Agric.*, 29, 403 (1978).
- 10) 岡村, 渡辺 : 農化, 53 (5), 165 (1979).
- 11) Nagel, C. W., Baranowski, J. D., Wulf, L. W., Powers, J. R. : *Am. J. Enol. Vitic.*, 30 (3), 198 (1979).
- 12) Singleton, V. L., Esau, P. : *Advances in Food Research, Supple. 1*, Academic Press, New York (1969).
- 13) Drawert, F., Leupold, G., Lessing, V. : *Wein-Wissenschaft*, 33 (1), 54 (1978).
- 14) Clifford, M. N., Hole, M. : *Process Biochem.*, 12, 5 (1977).

- 15) 山崎, 後藤, 駒形: 山梨大発研報告, 17, 11 (1982).
- 16) 大塚, 飯村, 戸塚, 木崎, 袖山: 醸酵工学, 56 (4), 265 (1978).
- 17) 大塚, 原, 高橋, 井上, 脇田: 醸協, 62 (2), 178 (1967)
- 18) 天野, 加賀美: 醸酵工学, 55 (6), 330 (1977).
- 19) 藤井, 細貝: 総合食料工業 (桜井, 斉藤, 東, 鈴木編), P 1077, 恒星社厚生閣 (1975).
- 20) Weinbach, E.C., Diamond, L.S.: *Expl. Parasit.*, 35, 232 (1974).
- 21) Hicks, J. M., Wootton, I. D. P., Young, D. S.: *Biochem. J.*, 82, 29p (1962).
- 22) Fuad, K. M., Yagzhinskii, L. S.: *Biol. Nauki.*, 14, 44 (1971).
- 23) Parkhurst, J. R., Hodgins, D. S.: *Archs. Biochem. Biophys.*, 152, 597 (1972).

(昭57. 8. 31受付)