

有機酸を導入した Phenylalanine の誘導体の合成と その呈味、および血糖値抑制効果

茅原 紘, 川上 晃, 黒川紀子, 只左弘治
内山孝一, 池辺裕行

信州大学農学部 生物資源科学科 生物制御化学講座

Evaluation of Taste and Hypoglycemic Activities of Phenylalanine Derivatives by Introducing Various Organic Compounds

Hiroshi KAYAHARA, Akira KAWAKAMI, Noriko KUROKAWA

Koji TADASA, Kouichi UCHIYAMA and Hiroyuki IKEBE

Division of Bio-organic Chemistry, Department of Bioscience and
Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University

Alcohols and amines were introduced into the carboxyl terminal of L-or D-phenylalanine. Further various organic acids were introduced into amino terminal. The taste and hypoglycemic activity of the products were evaluated. Perilloyl-Phe-OH, perilloyl-D-Phe-OH and cumminoyl-D-Phe-OH had strong bitterness. Perilloyl-Phe-OMe, Z-Val-Gly-OH and Boc-Phe-D-glucosamine slightly elevated the glucose level in the rat blood.

(Jour. Fac. Agric. Shinshu Univ. 28 : 23-33, 1991)

要 約

L体およびD体のフェニルアラニンのN端に種々有機酸を導入した誘導体、およびC端にアルコールおよびアミンを導入した誘導体を合成した。合成した全サンプルについて、中間生成物を含めて呈味試験を行なったが、目的とする甘味あるいは塩から味は得られず、苦味あるいは酸味のものがあった。

さらにその一部について、ラットを用いた経口投与での血糖値抑制効果を測定したが、Perilloyl-Phe-OMe, Z-Val-Gly-OH 及び Boc-Phe-D-Glucosamine のいずれからも、むしろ、血糖値を増加させる結果が得られた。

Key ward : Phenylalanine, Perillic acid, Hypoglycemic Activity

緒 言

機能性食品とは、食品として摂取しながら生体機能をより効率良く発揮できるように設計、加工された食品であり、機能性食品の認可を念頭において素材を探求する研究が各方面でなされており、その報告例も急増している¹⁾。当研究室においても、「低カロリー、低う蝕性人工甘味料の開発」、「アンジオテンシン変換酵素活性阻害による高血圧防止など様々な角度から、機能性食品素材を探求する研究を行なっており、中でもアミノ酸の短鎖ペプチド誘導体、ならびにテルペン、特にシソ油の主成分である Perilla aldehyde の誘導体を化学的に合成し、生理活性の発現を探る研究を行なってきた²⁾³⁾⁴⁾。

最近、味の素中央研究所の Shinkai らが、D体の Phenylalanine (: D-Phe と略記) のN

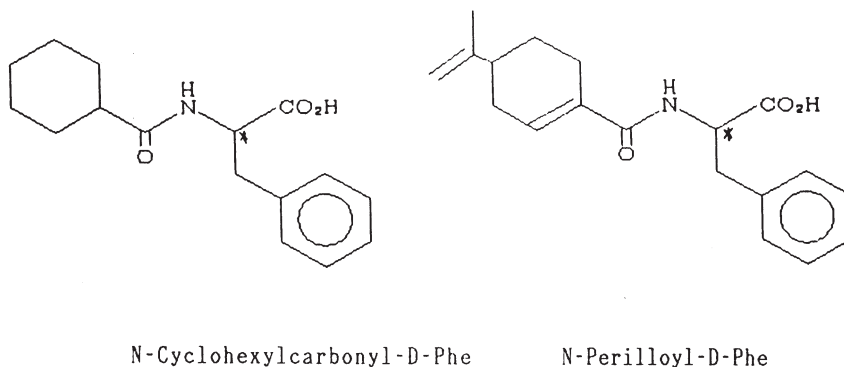


図1 Shinkai により強い血糖値抑制効果があると報告された
N-Cyclohexylcarbonyl-D-Phe と Perillic acid を導入した
N-Perilloyl-D-Phe

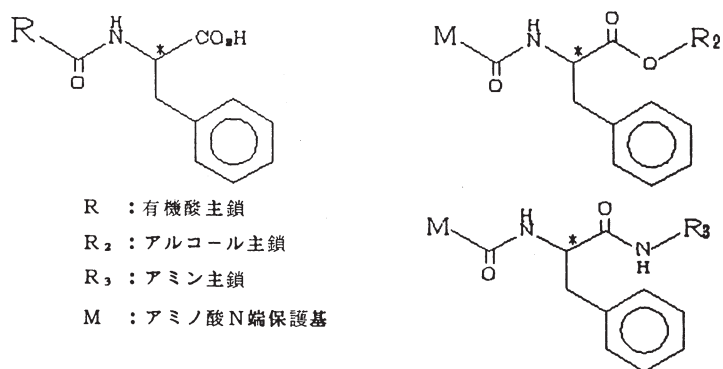


図2 今回合成した Phenylalanine の誘導体
Phenylalanine のN端に有機酸を導入 (左)
Phenylalanine のC端にアルコール, アミンを導入 (右)

端に，Cyclohexylcarbonyl 基を導入した化合物，N-(Cyclohexylcarbonyl-D-Phe-OH が in vivo でかなり強い血糖値抑制効果を示すと報告した⁵⁾⁶⁾。この研究報告中で注目したいのは，比較実験の合成サンプルの中に，シソ油成分である Perilla aldehyde の酸化物である Perillic acid を導入した誘導体，N-(Perilloyl)-D-Phe-OH [N-(4-isopropenyl-1-cyclohexenylcarbonyl)-D-Phe-OH] が含まれており，この化合物も比較的強い血糖値抑制効果を有すると報告されている点である。(図1)

そこで我々は，かねてからの研究⁷⁾をふまえて，この血糖値抑制生理活性を有する化合物の追試験を行なうとともに，D体，L体の Phe のC端にアルコールおよびアミンを，エステルおよびペプチド結合で導入したアナログ(2)を合成し，それらの中間生成物を含めて呈味試験及び in vivo での生理活成試験を行ない，活性の比較検討を行なう事にした。(図2)

すでに一部の化合物には，経口投与でラットの血糖値を抑制する活性を見出しており，この研究でさらに強い活性を有する類似化合物を合成し，なおかつ，それらの呈味試験を行ない，強い甘味を有する物質であれば，機能性食品素材としてかなり有益なものとなると考えられる。

材料および方法

(1) **Phe のN端への有機酸の導入** Perillic acid は，Nippon Terpene Chemical 製 Perilla aldehyde を AgNO_3 酸化して調製した。図3に Perilloyl-D-Phe-OH の合成経路を示す。基本的な合成は，文献⁹⁾にしたがって N-Hydroxysuccinimide [HOSu] を Dicyclohexyl carbodiimide [DCC] で有機酸に導入し，この活性エステルにアルカリ性条件下にてフェニルアラニンメチルエステルを作用させて縮合後，メチルエステルをケン化して目的物を得た。

アナログとして，Perillic acid の骨格を Cumminic acid, Phenylacetic acid, Vanillic acid [4-Hydroxy-3-methoxy-benzoic acid], trans Cinnamic acid, Ferulic acid [4-Hydroxy-3-methoxy-trans cinnamic acid] などに置き換えたものを合成した。基本的な合成経路を，図4に示す。アナログの合成には，操作の簡易化のために，HOSu のかわりに Hydroxybenzotriazol [HOBt] を用いた。これらの有機酸は全て市販の試薬を用いた。

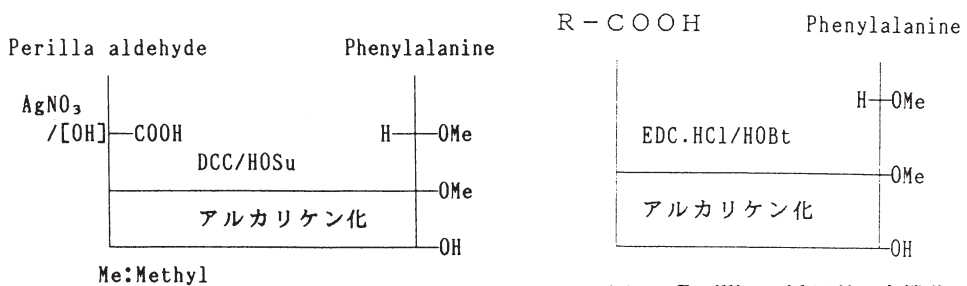


図3 Perilloyl- Phenylalanine の合成経路

図4 Perillic acid 以外の有機酸アナログの合成経路

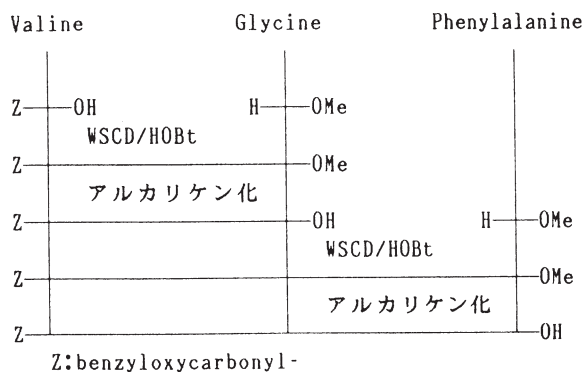


図5 Benzyloxycarbonyl- Val-Gly- Phe-OH の合成経路

さらに、有機酸の代わりに、ジペプチド Valinyl-Glycine [Val-Gly] を導入した。合成経路を図5に示す。Val-Glyの導入には、精製方法の簡便化のために、DCCのかわりに1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimide 塩酸塩 [WSCD. HCl] を用いた。

以上の実験で、D体あるいはL体のPheを部分構造にもつ33種類のサンプルを得た。合成サンプルの物性値を表1にまとめる。Thin Layer Chromatography [TLC]の確認には、Merck製TLC aluminum sheets slicagel 60上で、2種類の展開溶媒(下記CMAとCME)を用いて展開し、ヨウ素発色にてRf値を求めた。



生成物の同定には、 ^1H , ^{13}C NMR, IRスペクトルを用いた。

(2) **PheのC端へのアミンの導入** アミン成分として、D-Glucosamineを導入したアナログを合成した。合成は文献⁸⁾に従ってIsobutylchloroformate [IBCF]を用いた混酸無水物法 [MA法]を用いた。D-Glucosamineは、東京化成工業製の塩酸塩を購入して用いた。なお、PheのN端は、t-Butoxycarbonyl基 [Boc]で保護し、D-Glucosamineと縮合後、保護基を残したまま活性試験を行なった。

(3) **PheのC端へのアルコールの導入** アルコール成分として、Cumminolを用い、エステル導入のモデル反応とした。縮合には、Carbodiimidazol [CDI]を用いた。なお、合成例として、(a) Cumminoyl-D-Phe-OH (b) Benzyloxycarbonyl-D-Phe-O-Cumminate [Z-D-Phe-O-Cumminate]の合成を以下に示す。

実験の部

(a) Cumminoyl-D-Phe-OH

① Methanol 100mlに、氷浴上で攪拌しながら SOCl_2 26.0ml (100mmol)を滴下した後、 0°C で10分攪拌し、D-Phe 16.50g (100mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮して透明オイル状産物を得た。これをMethanol/ether系で再結晶させて、白色粉末

表1 合成サンプルの物性値

サンプル No.	物質名	分子量	融点(°C)	Rf ₁ /Rf ₂	収率(%)	状態
1	Perilloyl- Phe-OH	313.39	—	0.60/0.40	40.5	淡黄白粘体
2	Perilloyl- _D Phe-OH	313.39	108-110	0.60/0.40	80.2	白色粉末
3	Cumminoyl- Phe-OBzl	401.49	83-85	0.99/0.95	54.8	白色粉末
4	Cumminoyl-Phe-OMe	325.39	92-94	0.95/0.94	59.0	白色粉末
5	Cumminoyl-Phe-OH	311.37	126-128	0.68/0.54	62.0	白色結晶
6	Cumminoyl- _D Phe-OBzl	401.49	91-93	0.98/0.87	54.1	白色粉末
7	Cumminoyl- _D Phe-OMe	325.39	106-108	0.96/0.84	55.0	白色粉末
8	Cumminyl- _D Phe-OH	311.37	126-128	0.70/0.44	88.0	白色結晶
9	Phenylacetyl- Phe-OMe	297.34	93-94	0.78/0.76	65.0	白色粉末
10	Phenylacetyl- Phe-OH	283.32	137-138	0.54/0.33	82.3	白色粉末
11	Phenylacetyl- _D Phe-OMe	297.34	87-88	0.79/0.76	67.2	白色粉末
12	Phenylacetyl- _D Phe-OH	283.32	118-119	0.54/0.33	62.9	白色粉末
13	Vanilloyl- Phe-OBzl	405.44	99-102	0.90/0.72	63.8	茶白色粉末
14	Vanilloyl- Hhe-OMe	329.34	136-138	0.74/0.55	47.3	茶色粉末
15	Vanilloyl- Phe-OH	315.32	114-116	0.35/0.15	55.5	茶色粉末
16	Vanilloyl- _D Phe-OBzl	405.44	118-120	0.90/0.72	75.9	茶色粉末
17	Vanilloyl- _D Phe-OMe	329.34	134-137	0.74/0.55	80.9	茶色粉末
18	Vanilloyl- _D Phe-OH	315.32	58-60	0.35/0.15	58.6	茶色粉末
19	t-Cinnamoyl- Phe-OMe	309.35	97-98	0.91/0.86	74.0	白色粉末
19	t-Cinnamoyl- Phe-OH	290.33	165-166	0.50/0.30	77.4	白色粉末
21	t-Cinnamoyl- _D Phe-OHe	309.35	93-94	0.91/0.86	72.0	白色粉末
22	t-Cinnamoyl- _D Phe-OH	295.33	157-158	0.50/0.30	70.6	白色粉末
23	Feruloyl- Phe-OMe	355.37	160-161	0.74/0.45	52.3	白桃色粉末
24	Feruloyl- Phe-OH	341.35	74-77	0.43/0.15	37.1	淡黄白色粉末
25	Feruloyl- _D Phe-OMe	355.37	78-79	0.74/0.45	79.4	白棧色粉末
26	Feruloyl- _D Phe-OH	341.35	80-82	0.43/0.15	37.7	淡黄白色粉末
27	Z- Val-Gly- Phe-OMe	469.52	124-125	0.79/0.26	70.7	白色粉末
28	Z- Val-Gly- Phe-OH	455.50	165-167	0.49/0.04	57.8	白色粉末
29	Z- Val-Gly- _D Phe-OMe	469.52	165-166	0.79/0.26	70.7	茶色粉末
30	Z- Val-Gly- _D Phe-OH	455.50	93-99	0.45/0.44	63.7	白色粉末
31	Boc- Phe- _D Glucosamise	426.50	—	0.80/0.75	91.8	肌色粉末
32	Z- Phe-O-Cumminate	431.52	54-56	0.90/0.83	65.3	白色粉末
33	Z- _D Phe-O-Cumminate	431.52	45-47	0.90/0.83	67.4	白色粉末

Me: Methyl Bzl: Benzyl Z: Benzyloxycarbonyl

状の D-Phe メチルエステル塩酸塩を得た。 収率96.0%

② Cumminic acid 1.64g (10mmol) を Tetrahydrofuran 50ml に溶解し，氷浴上で攪拌しながら HOBt 1.35g (10mmol)，DCC 2.06g (10mmol) を加え0°C で1時間攪拌後，D-Phe メチルエステル2.16g (10mmol)，Triethylamine 1.40ml (10mmol) を加えて，0°C で2時間，室温で一晩攪拌した。反応液を口過し口液を減圧濃縮して透明オイル状の残液を

得た。これを Ethyl acetate に溶解し、飽和 NaHCO_3 水溶液、2N HCl、飽和食塩水で洗浄後、無水 Na_2SO_4 を加えて乾燥し、口液を減圧濃縮して透明オイル状残液を得た。これを Ethyl acetate/n-hexane 系で再結晶して、白色粉末状の Cumminoyl-D-Phe Methyl ester を得た。収率55.0%

③ ②の産物1.63g (5mmol) を Methanol 50ml に溶解し、氷浴上で冷却しながら、1N NaOH 5.5ml (1.2eq.) を加えて、 0°C で1時間、室温で一攪拌した。反応液を減圧濃縮して Methanol を除去した後、蒸留水50ml を加えて、ether で洗浄した。水溶液に55% Citric acid 水溶液を加えて、pH2に調節し、Ethyl acetate で抽出後、10% Citric acid、飽和食塩水で洗浄した。無水 Na_2SO_4 を加えて乾燥後、口液を減圧濃縮して透明オイル状の残液を得た。これを Ethyl acetate/n-hexane 系で再結晶して、白色粉末を得た。

収量：1.37 g 収率：88.0% 融点：126–128°C

R f : (Rf₁/Rf₂) 0.70/0.44

I R : -COOH 1740, 3300-3000 cm^{-1} , -CONH- 1640 cm^{-1} , \odot - 700, 750 cm^{-1}

NMR : CDCl_3

^1H : δ 1.25 [6H,d, (C*H₃)₂CH-], δ 2.98 [1H,7, (CH₃)₂C*H-], δ 3.30 [2H,m,>CH-C*H₂- \odot], δ 5.09 [1H,q,-CONHC*H<], δ 6.71 [1H,d,-CO-N*H-], δ 9.22 [1H,s,-C*OOH], δ 7.60-7.28 [9H,m, \odot -, - \odot -]

^{13}C : δ 23.74 [(C*H₃)₂CH-], δ 34.15 [(CH₃)₂C*H-], δ 37.33 [\odot -C*H₂-CH<], δ 53.70 [-CONH-C*H<], δ 130.90 [\odot - 1], δ 135.76 [- \odot -CONH- 1], δ 126.61-129.50 5本 [\odot -2,3,4,5,6 (3本) - \odot -2,3,5,6 (2本)], δ 135.76 [- \odot -CONH- 4], δ 153.46 [- \odot -CONH-], δ 167.86 [-C*ONH-], δ 175.00 [-C*OOH]

(b) Z-D-Phe-O-Cumminate

① D-Phe 16.52g (100mmol) を、4N NaOH 25.0ml (100mmol) に氷浴上で冷却しながら溶解し、これに、Benzoyloxycarbonylchloride [Z-Cl] と4N NaOH 30.0ml (120mmol) を交互に滴下した。溶液を 0°C で1時間、室温で一晩攪拌し、Ether で洗浄後、6N HCl でpH2に調製した。この溶液を Ethyl acetate で抽出し、2N HCl、飽和 NaCl 水溶液で洗浄後、無水 Na_2SO_4 で乾燥し、口液を減圧濃縮して透明オイル状残液を得た。これを Ethyl acetate/n-Hexane 系で再結晶させて白色粉末の Z-D-Phe-OH を得た。収率80.8%

② Z-D-Phe-OH 2.99g (10mmol) を無水 Tetrahydrofuran 20ml に溶解し、氷浴上で冷却しながら CDI 1.62g (10mmol) を加え、 0°C で1時間攪拌した。この溶液に、Cumminol 1.50g (10mmol) を無水 Tetrahydrofuran 20ml に溶解させて加え、 0°C で8時間、室温で48時間攪拌した。反応混合液を減圧濃縮後、残液に Ethyl acetate を加えて溶解し、10% Citric acid 水溶液、飽和 NaHCO_3 水溶液、飽和食塩水にて洗浄した。これを無水 Na_2SO_4 にて乾燥後、口液を減圧濃縮して白色粉体を得た。これを Ethyl acetate/n-Hexane で再結晶し、減圧乾燥して白色粉体を得た。

収量：2.91 g 収率：67.4% 融点45-47°C

R f : (Rf₁/Rf₂) 0.90/0.83

I R : -CONH- 3300, 1680 cm^{-1} , -COOCH₂- 1750 cm^{-1} , -CH(CH₃)₂ 1385 cm^{-1} , \odot - 700, 750 cm^{-1}

NMR : CDCl₃

¹H : δ1.25 [6H,d, (C*H₃)₂CH -], δ2.91 [1H,7, (CH₃)₂C*H -], δ3.09 [2H,d,>CH - C*H₂-⊙], δ4.68 [1H,q,-CONHC*H<], δ5.00 [4H,m,-O-C*H₂-⊙-, ⊙-C*H₂-OCO -], δ5.20 [1H,d,-OCON*H-], δ6.98-7.50 [14H,m,Aromatic ⊙-CH₂-CH<(5H), ⊙-CH₂OCO- (5H), -CH₂-⊙-CH<(4H)]

¹²C : δ23.90 [(C*H₃)₂CH -], δ33.92 [(CH₃)₂C*H -], δ38.15 [⊙-C*H₂-CH<], δ54.80 [-CONH-C*H<], δ66.95 [⊙-C*H₂OCO-], δ67.23 [-O-C*H₂-⊙-], δ126.67-129.34 8本 [⊙-CH₂-O- 2/6,3/5,4 (3本) ⊙-CH< 2/6,3/5,4 (3本) -⊙-CH< 2/6,3/5 (2本)], δ130.63 [⊙-CH₂-CH<], δ132.41 [⊙-CH₂-O-], δ135.54 [-⊙*-CH<], δ149.40 [-*⊙-CH<], δ15.59 [-OC*ONH-], δ171.33 [-C*OO-]

呈味試験

今回合成した全サンプルについて，Ishibashi らの方法⁹⁾に従った呈味試験を行なった。すなわち，試験者を3人用意し，それぞれが口中を蒸留水で濯いだ後，被試験サンプル10mg（耳かき1杯程度）を採り，口に含んで，酸味，苦味，甘味，刺激味，旨み，辛味あるいは無味かの味質と，強，中，弱の味強度についてサンプルの味を評価した。呈味試験後サンプルを吐き出し，口中再度濯ぐという操作を繰り返した後で，全員の結果を評価した。

血糖値抑制効果の生理活性試験

表2 合成サンプルの呈味試験の結果

サンプル No.	味 質	味強度*	サンプル No.	味 質	味強度
1	bitter	3	18	no taste	
2	bitter	3	19	bitter	2
3	bitter	2	20	bitter	2
4	bitter	1	21	bitter	1
5	bitter	2	22	bitter	2
6	sour >> bitter	2	23	no taste	
7	bitter	3	24	no taste	
8	no taste		25	bitter	1
9	no taste		26	no taste	
10	bitter	2	27	no taste	
11	bitter	1	28	sour	3
12	bitter	2	29	no taste	
13	bitter	1	30	sour > bitter	3
14	bitter	1	31	bitter	1
15	bitter	2	32	no taste	
16	no taste		33	no taste	
17	no taste				

*: 味強度 1弱 ... 3強

合成サンプルの一部について、SD系ラット（雄、体重360～540g）を用いて経口投与による正常血糖値の変化を検討した。測定は、文献^{3),4)}に従い測定を行なった。サンプルの調製は、0.5% CMC 生理食塩水に20mg/mlとなるようにサンプルを懸濁させて調製した。ブランクとして、0.5% CMC 生理食塩水を用いた。

ラットを一群6匹の4群に分け、溶媒対照群（ブランク）、試薬投与群1、2、3とした。それぞれのラットを20時間絶食させた後、試料濃度100mg/kg（体重ラット）にて、強制経口投与した、試料投与直前、および投与60分、90分経過後のラットの血液を頸静脈より約0.3mlを採血し、ヘパリン処理後、遠心分離（3000rpm/10min）して、血漿を得た。それぞれの血漿中の血糖値を、血糖測定試薬（Glucose-B test Wako：和光純薬製 Lot No. DR 150）を用いて、GOD法により測定した。

結果および考察

(1) 呈味

表1にまとめた全サンプルについて、呈味試験を行なった結果を表2に示す。今回合成したサンプルは、苦味あるいは酸味を伴う苦味、または無味のいずれかであり、期待された甘味、塩から味は得られなかった。

これは、まず Phenylalanine 側鎖の Phenyl 基と、そのN端に導入した芳香族カルボン酸のカサ高さ疎水性に加えて、C端をエステルなどで保護してあるため、口中でサンプルが溶けず、呈味が発生しにくい点が考えられる。次に、甘味の発現には、プロトン供与性基（AH）、プロトン受容性基（B）、および疎水性部位（X）が、分子上でそれぞれ適切な位置にあることが必要であるとされ¹⁰⁾、今回の合成サンプルに当てはめてみると、AH基が存在せず酸味となる場合、（AH、B基）が存在せず、苦味あるいは無味となる場合が考えられる。

Phenylalanine 誘導体において有用な呈味を得るために、親水性を増す成分の導入、AH、B基となりうる官能基の導入とその位置の検討等、人工甘味料の開発研究を進めている。

表3 サンプル経口投与後の血糖値の測定

	被検体数 n =	血糖値 (平均, mg/dl)		
		経口投与直前	60分後	90分後
control	6	119.9 ±28.0	112.0 ±26.3	114.7 ±17.6
サンプル1	6	89.7	90.0	97.3
Perilloyl- Phe-OMe		±11.8	±14.4	± 7.1
サンプル2	6	87.7	132.2	125.5*
Boc-L-Phe-D-Glucosamine		±8.9	±51.6	±27.4
サンプル3	6	75.2	69.5*	88.7**
Z- Val-Gly-OH		±4.6	±4.2	± 6.6

*: P<0.05, **: P<0.01で有意, Boc: t-Butoxycarbonyl-

(2) 血糖値抑制効果

現在，表1のサンプルのうち，以下のサンプルについて評価が終了したので，結果を表3および図6，図7，図8に示す。

- ① サンプル No 4 Perilloyl-Phe-OMe
- ② サンプル No31 t-Butoxycarbonyl-Phe-D-Glucosamine
- ③ サンプル Z-Val-Gly-OH

溶媒対照群，試料① (Perilloyl-Phe-OMe) については，投与前後の血糖値を比較した場

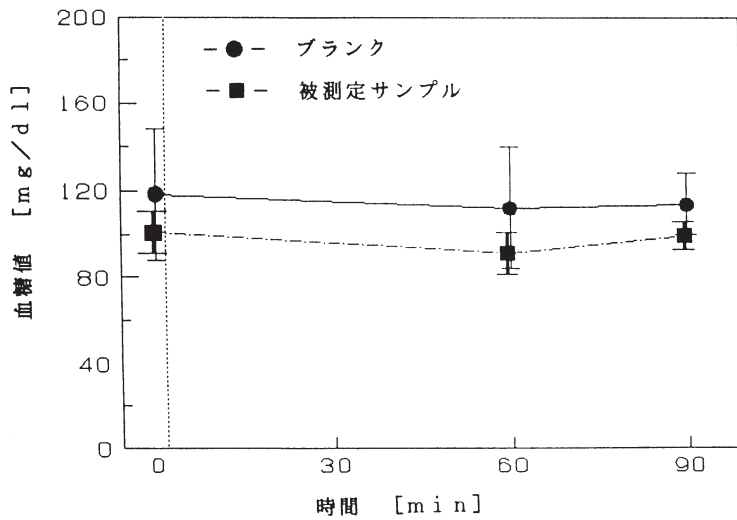


図6 Perilloyl- Phe-OMe を投与した時のラットの血糖値の変化

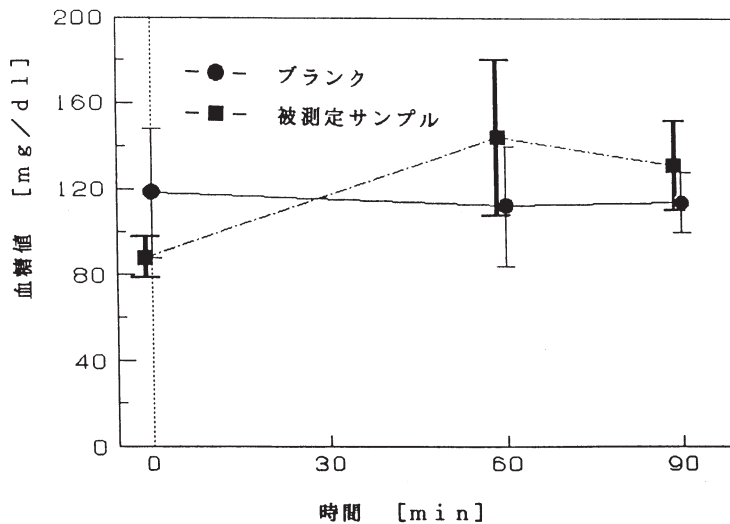


図7 Boc- Phe-D-Glucosamine を投与した時のラットの血糖値の変化

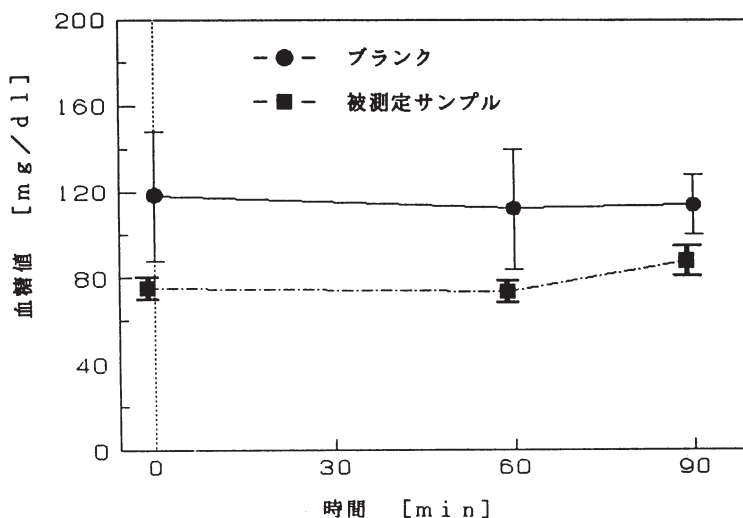


図8 Z-Val-Gly-OHを投与した時のラットの血糖値の変化

合に、有意な変動は見られなかった。(図6) この試料は、血糖値抑制効果が報告されている Perilloyl-D-Phe-OH の光学異性体のエステルであるが、効果がないことがわかった。これが、光学活性によるものか、エステルによりB端を保護したことによるものかは不明である。

つぎに、試料② (t-Butoxycarbonyl-Phe-D-Glucosamine) では、投与前に比べ血糖値の上昇という結果が得られた。(p<0.05で有意)(図7参照) D-Glucosamine は、キチン、キトサンの完全加水分解物で、応用研究の盛んな¹¹⁾生体材料であるが、今回それにアミノ酸を導入したサンプルについて一部試験を行なった。今回の活性は、比較的弱いもので、正常血糖値に顕著な影響を及ぼすものではなかったが、今後血糖値を上げる生理活性も有用なものとなるであろうし、キチン、キトサンの有効利用の点でも、興味深い材料といえる。今後、種々アミノ酸およびペプチドを導入した D-Glucosamine 誘導体について、順次合成し生理活性試験を行なっていく予定である。

試料③ (Z-Val-Gly-OH) については、今回合成した No27~No30のペプチドの原料について、活性試験を行なった結果であるが(図8)、60分後の有意な (p<0.01) 血糖値の低下、および90分後の上昇 (p<0.05) が観測されたが、顕著な活性とは判断できなかった。

参 考 文 献

- 1) 日経BP社, 日経バイオ年間89/90, 1990, p 396
- 2) Hiroshi Kayahara et al., *Peptide Chemistry* 1986, 257 (1987)
- 3) Hiroshi Kayahara et al., *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 289 (1988)
- 4) Hiroshi Kayahara et al., *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1325 (1990)
- 5) Hisashi Shinkai et al., *J. Med. Chem.*, **31**, 2092 (1988)

- 6) Hisashi Shinkai et al., *J. Med. Chem.*, **32**, 1436 (1989)
- 7) 大橋昭王，修士論文（1990年信大農学部）
- 8) R. Rochi et al., *Int. Peptide Res.*, **29**, 250 (1987)
- 9) N. Ishibashi et al., *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2389 (1987)
- 10) Masahiro Tamura et al., *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 737 (1989)
- 11) キチン，キトサン研究会編：キチン，キトサンの応用，技報堂出版，1988