

〔生物工学会誌 第72巻 第3号 167-173, 1994〕

生酛で育成された酵母のリン脂質脂肪酸組成に及ぼす 乳酸菌の影響[†]

溝口 晴彦*・原 昌道

菊正宗酒造(株)総合研究所
〒658 神戸市東灘区魚崎西町1-8-6

(平成5年10月12日受付 平成6年1月9日受理)

Effect of lactic acid bacteria on fatty acid composition of phospholipids of yeast grown in *kimoto*.[†] HARUHIKO MIZOGUCHI* and SHODO HARA (*General Research Institute of Kiku-Masamune Sake Brewing Co. Ltd., 1-8-6 Uozaki-nishimachi, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo 658*) *Seibutsu-kogaku* 72: 167-173, 1994.

The representative starters (yeast-making rice mash) for *sake* brewing, that is to say *moto*, are *sokujo-moto* and *kimoto*. For *moto* making, *koji* (rice overgrown with *Aspergillus oryzae*), steamed rice and well water are mixed in suitable proportions. For *sokujo-moto*, lactic acid is added simultaneously to avoid the growth of contaminant bacteria, and *sake* yeast cultures are seeded and cultivated under acid pH conditions. In the case of *kimoto*, spontaneous fermentation by lactic acid bacteria is utilized for the formation of acid pH conditions according to the traditional method, followed by inoculation and cultivation of the *sake* yeast. These two *moto* were compared with respect to the fatty acid composition of the phospholipids (PLs) of *sake* yeast. The linoleic acid content of cellular PL was 30-50% in *sokujo-moto*, whereas it was below 6% in *kimoto* and the palmitic and/or stearic acid content of cellular PL was increased. Factors causing the difference between the fatty acid composition of cellular PL in *kimoto* and *sokujo-moto* were investigated. Linoleic acid was a major component in free fatty acids extractable with petroleum ether : dimethyl ether from *moto* mash. However, the multiplication of lactic acid bacteria isolated from *kimoto* significantly reduced the ratio of linoleic acid, and increased that of palmitic acid in free fatty acids. No striking differences were seen in the composition of the total free fatty acids extracted with chloroform : methanol. Linoleic acid was found to promote the growth of lactic acid bacteria isolated from *kimoto* to a great extent, while palmitic acid was found to be growth inhibitory. *Lactobacillus sake* L5 could utilize linoleic acid as a predominant component of cellular fatty acids, and take up more at a lower incubation temperature. *Saccharomyces sake* K-7 could utilize fatty acids in the medium, and added long-chain fatty acids were found to be a major component of PL, regardless of whether the acid was saturated or unsaturated.

生酛は、乳酸菌などの微生物遷移を伴う伝統的な酒母の製法である。生酛で育成された酵母は温み取りと呼ばれる加温操作に強く、枯らしと呼ばれる長期保存

での生存率が高いことが知られている。¹⁾また、生酛を用いた仕込は、もろみ初期の発酵は穏やかだが、後半もよく発酵するといわれている。²⁾こうした事象の要因については、佐藤らの報告²⁾の他にはほとんど検討されていない。他方、培地中の脂肪酸組成が発酵能や、³⁾高温での生育に影響を及ぼすことが知られており、⁴⁾膜脂質の脂肪酸組成に及ぼす影響の結果と考えられている。

[†] 生酛中の乳酸菌の清酒醸造に及ぼす影響 (第3報)。

Effect of lactic acid bacteria in *kimoto* on sake brewing (III).

* 連絡先, Corresponding author.

清酒醸造においては、蒸米や麴が脂肪酸の供給源となっており、主要な脂肪酸は飽和酸であるパルミチン酸 ($C_{16:0}$) と、二価不飽和酸であるリノール酸 ($C_{18:2}$) である。^{5,6)} また、原料米処理や、製麴法によって原料由来の脂肪酸組成を操作することにより、酒質を改変することが試みられている。^{6,7)}

著者らは、生醗と速醸醗の違いによって酵母リン脂質の脂肪酸組成が異なることを見いだした。本報では、その要因について検討した結果を報告する。

実験方法

使用菌株 乳酸菌として、自社生醗より分離した *Lactobacillus sake* L5 株および *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* L74 株を用いた。清酒酵母として、協会 7 号株 (K-7) を用いた。

培地 GPY 培地 (グルコース 2%, 酵母エキス 0.7%, ポリペプトン 0.7%, KH_2PO_4 0.5%, K_2HPO_4 0.7%) を基礎培地とした。脂肪酸の添加効果をみる際には、各脂肪酸を 0.5 mM になるように、0.1% ポリオキシエチレン (20) セチルエーテルを含む培地に加えた。また、乳酸菌の培養においては、1% ポリペプトンを加えた Brix 5 麴汁 (麴汁ペプトン培地) も用い、麴汁は煮沸後ニトロセルロース・メンブランフィルター (ポア・サイズ 0.45 μ) で循環ろ過し、可及的に脂質を除去したものをを用いた。脂肪酸添加効果をみる際には、Chen の方法⁸⁾ により脱脂した牛血清アルブミンを含む培地に、0.5 mM になるように脂肪酸を加えた。

培養条件 酵母は、植菌量 1/100 とし、20°C に 4 日静置培養した。乳酸菌は、植菌量 1/1000 とし、15°C、7 日間、または 30°C、2 日間静置培養した。

糖化もろみにおける乳酸菌培養 蒸米 6 g、米麴 14 g、水道水 29 ml を 57°C に 14 時間糖化後、乳酸菌 L74 株、または L5 株の培養液 50 μ l を植菌し、15°C に 7 日間培養した。

酒母中の酵母の分画 古坂らの方法⁹⁾ に従い、遠心分画により酒母 3 l より酵母を取得し、検鏡的に純粹になるまで洗浄を反復した。

脂質の抽出と分画 酵母および乳酸菌菌体は、0.85% NaCl で 2 回洗浄後、石油エーテル・エーテル (2:1) で洗浄し付着する脂肪酸を除去した。凍結乾燥後、クロロホルム・メタノール (1:1) を用いて Bligh, Dyer の方法¹⁰⁾ に従って脂質を抽出した。抽出溶媒は 35°C 以下で減圧下に留去し、クロロホルム・

メタノール (1:1) に再溶解後、シリカゲル 60A (500 μ m 厚, ワットマン) を用いた薄層クロマトグラフィーを行った。リン脂質の展開には、展開溶媒としてクロロホルム・メタノール・酢酸・水 (85:15:10:4) を用い、遊離脂肪酸の分画のために石油エーテル・エーテル・酢酸 (85:15:1) を用いた。各画分の検出はヨード蒸気により、またリン脂質には Dittmer-Zinade 試薬¹¹⁾ を併用し、標準物質の Rf 値との比較により同定した。各画分はシリカゲルをかきとり、クロロホルム・メタノール (1:1) で溶出後、窒素ガス気流中で溶媒を留去し、脂肪酸組成分析に供した。

糖化もろみおよび酒母からの脂質の抽出に際しては、もろみ全量、または酒母 30 g を凍結乾燥後、菌体からの抽出に準じて行った。すなわち、クロロホルム・メタノール (1:1) 60 ml を用いて 2 回、または石油エーテル・エーテル (2:1) 60 ml を用いて 2 回振とう抽出を行った後、溶媒を 0.9% NaCl で洗浄した。

脂肪酸の分析 植田の方法¹²⁾ に準じて 3% HCl-メタノールにより、分画脂質または凍結乾燥菌体から脂肪酸メチルエステルを調製し、分析試料とした。GLC 分析は、石川、吉沢の方法⁹⁾ に従い、10% EGSS-X (2 m $\times$ 3 mm, 175°C) カラムを用いて行った。

実験結果

酒母の酵母リン脂質の脂肪酸組成 自社酒造場において速醸醗および生醗で育成された酵母を分画し、そのリン脂質組成を調べた結果を Table 1 に示す。速醸醗で育成された酵母のリン脂質は、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI) のいずれにおいても、リノール酸の比率はおおよそ 30~50% と高い値を示した。他方、生醗で育成された酵母の場合は、数% のリノール酸含量を示し、パルミチン酸、またはステアリン酸が増大している傾向が認められた。また、単純脂質であるトリグリセリド (TG) においても、その傾向は同様であった。

培地中の脂肪酸の酵母による利用 酒母中の酵母脂質の脂肪酸組成の違いの要因を検討するために、培地中の脂肪酸の影響をみた。すなわち、0.5 mM 脂肪酸を含む GPY 培地で 20°C において酵母を培養し、定常期菌体中のリン脂質脂肪酸組成を測定したところ、Table 2 に示す結果が得られた。リン脂質の種類による違いは認められるものの、PC, PE, PI のいずれ

Table 1. Fatty acid composition of lipids extracted from yeast grown in *sokujo-moto* and *kimoto*.

Moto	Lipid	Fatty acid composition (%)					
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
<i>Sokujo-moto</i>	PE	ND ^a	29.1	5.9	14.9	19.5	30.6
	PC	ND	23.4	tr.	17.6	20.1	48.4
	PI	ND	32.9	4.0	18.2	17.0	27.9
	TG	3.6	35.0	1.0	6.5	14.7	39.2
<i>Kimoto</i>	PE	7.3	35.2	23.8	15.1	15.1	tr. ^b
	PC	ND	29.5	12.3	32.7	19.9	5.5
	PI	ND	47.5	13.2	18.7	11.6	5.7
	TG	ND	55.5	2.2	11.8	21.0	5.8

Fatty acids are denoted by the number of carbon atoms : number of unsaturated linkages. Abbreviations: PE, phosphatidyl ethanolamine; PC, phosphatidyl choline; PI, phosphatidyl inositol; TG, triglyceride.

^a Not detected.

^b Trace.

においても、脂質中に占める添加脂肪酸の比率はいちじるしく増大していた。また、単純脂質である TG においても、同様の傾向が認められた。これらのことから、Ishikawa, Yoshizawa がすでに報告しているように、¹³⁾ 菌体脂質の脂肪酸組成は培地中に存在する脂肪

酸に大きな影響を受けるものと考えられる。

酒母中の遊離脂肪酸組成 生醗および速醗において、酒母中の遊離脂肪酸組成を比較するために、それぞれフクレ前の試料を用いて脂肪酸分析を行った。結果を Table 3 に示す。速醗は、抽出溶媒に石油エー

Table 2. Fatty acid composition of phospholipids extracted from yeast grown on different fatty acid supplements.

Fatty acid added	PL	Fatty acid composition (%)							
		12:0	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
None	PE	3.4	10.6	2.5	28.8	38.9	4.5	11.4	ND
	PC	4.0	8.6	0.5	35.0	27.3	11.6	13.0	ND
	PI	7.3	7.2	1.8	45.1	16.6	19.5	7.0	ND
16:0	PE	0.9	1.3	0.2	46.0	43.5	2.3	5.7	ND
	PC	1.3	1.6	0.3	53.7	32.8	4.7	5.5	ND
	PI	3.5	0.9	0.3	60.8	22.0	8.5	3.9	ND
	TG	5.1	2.2	ND	64.0	16.5	7.7	4.5	ND
18:1	PE	1.2	3.8	ND	9.6	3.9	3.0	76.8	ND
	PC	1.5	2.8	tr.	6.6	1.9	2.7	84.4	ND
	PI	3.2	4.3	tr.	21.7	2.4	7.1	61.3	ND
	TG	5.2	3.9	ND	8.7	2.1	6.3	73.8	ND
18:2	PE	1.4	5.3	ND	21.1	2.5	3.1	1.1	65.4
	PC	7.8	9.4	0.1	19.1	1.6	9.2	1.9	72.0
	PI	7.6	6.0	tr.	30.5	1.3	10.3	1.2	43.0
	TG	4.9	5.4	tr.	11.4	3.9	8.2	3.0	63.2

Cultures were incubated in GPY medium supplemented with 0.1% polyoxyethylene (20) cetyl ether, and 0.5 mM fatty acid until they reached the early stationary phase. Refer to Table 1 for abbreviations.

Table 3. Composition of free fatty acids extracted from *moto*.

Solvent for extraction	<i>Moto</i>		Fatty acid composition						Total
			14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	
Petroleum ether : Ether (2 : 1)	<i>Kimoto</i>	(mg)	0.11	2.06	0.06	0.05	0.09	ND	2.47
		(%)	4.3	87.4	2.6	2.1	3.5	—	
	<i>Sokujo-moto</i>	(mg)	0.06	0.33	0.03	0.14	0.54	0.02	1.12
		(%)	5.4	30.1	2.5	12.9	47.8	1.4	
	<i>Kimoto</i>	(mg)	0.23	3.45	0.27	1.16	2.25	0.07	7.43
		(%)	3.1	46.6	3.6	16.1	29.8	0.8	
Chloroform : Methanol (1 : 1)	<i>Sokujo-moto</i>	(mg)	0.17	3.12	0.17	0.81	3.1	0.10	6.47
		(%)	2.6	33.1	2.6	13.0	47.3	1.5	

Thirty grams of *moto* were lyophilized, and lipids were extracted with 60 ml of solvent for 2 min twice. Fatty acid fractions on a silica gel plate by TLC were extracted with chloroform : methanol (1 : 1).

テル・エーテルを用いた場合と、クロロホルム・メタノールを用いた場合のいずれにおいても遊離脂肪酸組成は異ならず、リノール酸が主要脂肪酸であった。他方、生醗では、石油エーテル・エーテルを抽出溶媒に用いると、遊離脂肪酸中のリノール酸の比率はいちじるしく低下し、パルミチン酸が大きな比率を占めた。クロロホルム・メタノールによる米粒組織内部の脂肪酸も含めた抽出に比べ、石油エーテル・エーテルを用いた抽出では、酒母液層や固層の表面に存在する遊離脂肪酸が溶解されていると考えられる。このことから、酒母中で酵母が取り込み、利用することのできる遊離脂肪酸組成は、生醗と速醗では大きく異なるものと考えられる。

遊離脂肪酸組成に及ぼす乳酸菌の影響 生醗と速醗の遊離脂肪酸組成の違いの要因を検討するために、乳酸菌増殖の影響をみた。すなわち、蒸し米、米麴から調製した糖化もろみに乳酸菌 L5 株、または L74 株を 15°C において 7 日間培養し、培養前後の糖化もろみ中の遊離脂肪酸組成を測定した。遊離脂肪酸の分画のために行った薄層クロマトグラムの結果を Fig. 1 に、脂肪酸組成の測定結果を Table 4 に示す。クロロホルム・メタノールで抽出される遊離脂肪酸の組成は、培養前後でほぼ同じ値を示し、リノール酸は約 32~38% を占めた。他方、石油エーテル・エーテルで抽出した際には、乳酸菌を培養した糖化もろみ中では、リノール酸の占める比率が 2~3% に低下し、パルミチン酸が大部分を占めた。このことから、乳酸菌の増殖が、生醗と速醗の遊離脂肪酸組成の違いの要因になっていると考えられる。

乳酸菌によるリノール酸の取り込み リノール酸

が乳酸菌に取り込まれ、利用されることを確認するために、0.5 mM リノール酸を含む麴汁ペプトン培地で生育した乳酸菌 L5 株の菌体脂肪酸組成を測定した。結果を Table 5 に示す。脂肪酸を含まない培地で生育した乳酸菌においては、菌体脂肪酸中に占める主要な

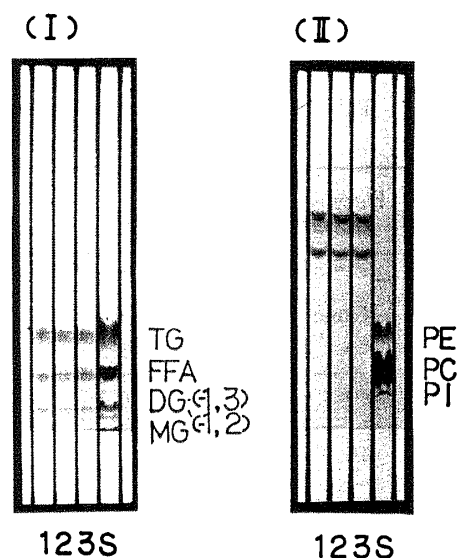


Fig. 1. Thin-layer chromatograms of lipids obtained from *moromi* mash. *Moromi* mash with no cultivation (1), and with the cultivation of *Leuconostoc mesenteroides* L74 (2) or *Lactobacillus sake* L5 (3) were used for the extraction of lipids. Lipids were extracted with petroleum ether : ether (2 : 1) from lyophilized *moromi* mash. Abbreviations: FFA, free fatty acid; DG, diglyceride; MG, monoglyceride. Other abbreviations are the same as in Table 1. Solvent systems: (I), Petroleum ether : Ether : Acetic acid (85 : 15 : 1); (II), Chloroform : Methanol : Acetic acid : H₂O (85 : 15 : 10 : 4).

Table 4. Composition of free fatty acids in *moromi* mash.

Solvent for extraction	Inoculum	Fatty acid composition						
		12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	Total
Petroleum ether : Ether (2 : 1)	no (mg)	ND	0.039	0.594	0.049	0.206	0.345	1.233
	(%)	—	3.2	48.2	4.0	16.6	28.0	
	L74 (mg)	ND	0.067	2.145	0.485	0.074	0.065	2.848
	(%)	—	2.4	75.3	17.0	2.6	2.3	
	L5 (mg)	ND	0.082	2.511	0.418	0.086	0.069	3.171
	(%)	—	2.6	79.2	13.2	2.7	2.2	
Chloroform : Methanol (1 : 1)	no (mg)	0.217	0.064	5.681	0.477	1.515	5.272	13.767
	(%)	1.6	4.4	41.3	3.5	11.0	38.3	
	L74 (mg)	0.195	0.659	7.285	0.721	1.870	5.034	15.768
	(%)	1.2	4.2	46.2	4.6	11.9	32.0	
	L5 (mg)	0.205	0.704	8.348	0.817	2.155	5.948	17.177
	(%)	1.1	3.9	45.9	4.5	12.0	32.7	

Each *moromi* mash was prepared by saccharizing a mixture composed of steamed rice (14 g), rice *koji* (6 g), and tap water (29 ml) at 57°C for 14 h, and inoculated with one loopful of *Lactobacillus sake* L5, or *Leuconostoc mesenteroides* L74. Cultures were incubated at 15°C for 1 week.

不飽和脂肪酸は C_{18:1} 酸であった。なお, Uchida, Mogi は *Lactobacillus* 属の菌体脂肪酸に見いだされる C_{18:1} 酸の大部分が, シス-バクセン酸であることを報告している。¹⁴⁾ 他方, リノール酸を添加した培地で生育した乳酸菌菌体においては, リノール酸が主要な不飽和脂肪酸になっていた。また, 培養温度 15°C では, 30°C の場合に比べて, リノール酸の菌体脂肪酸中に占める比率がさらに増大し, 約70%となった。この時の乾燥菌体中の脂肪酸総量は, リノール酸を含まない培地で生育した菌体では 2.1 mg/100 mg であるの

に対し, リノール酸を添加した培地で増殖した菌体では 2.3 mg/100 mg となり, ほぼ同様の値を示した。これらの結果から, 乳酸菌はリノール酸を取り込み, 菌体脂肪酸として利用しているものと考えられた。

乳酸菌の生育に及ぼすリノール酸の効果 不飽和脂肪酸には, オレイン酸のように乳酸菌の生育に促進的に働くものと, 阻害的に働くものがあることが知られている。¹⁵⁾ 0.5 mM 脂肪酸を含む GPY 培地における, 15°C での乳酸菌の増殖経過を Fig. 2 に示す。生醗から分離された乳酸菌 L5 株, L74 株のいずれにおいて

Table 5. Effect of linoleic acid on cellular fatty acid composition of *Lactobacillus sake* L5.

Temp. (°C)	Addition of 18:2	Fatty acid composition (%)							
		14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	19-cy ^a
30	—	0.6	ND	45.0	3.4	6.2	34.3	ND	10.5
	+	1.4	0.4	24.2	3.1	1.0	22.4	41.6	5.8
15	—	0.7	ND ^b	31.6	6.6	2.8	54.7	ND	3.5
		(16.8) ^c		(720.6)	(15.1)	(66.2)	(1214.6)		
	+	1.5	0.5	12.0	3.2	1.2	12.4	69.2	ND
		(35.9)	(12.1)	(276.3)	(73.3)	(27.6)	(277.9)	(1636.1)	

Strain L5 was inoculated 1 : 1000 from fresh cultures of growth medium into 500 ml of *koji* extract (Brix 5) supplemented with 0.5 mM linoleic acid and/or 1% peptone plus 0.1% defatted albumin. When the stationary phase of growth was attained, cultures were harvested by centrifugation at 18,000 g for 20 m, followed by washing twice in 500 ml of 0.85% NaCl aq. and once in petroleum ether-diethylether (1 : 1).

^a cy denotes cyclopropane acid.

^b Not detected.

^c The values in parentheses indicate the content of each fatty acid (μg/100 mg dry weight).

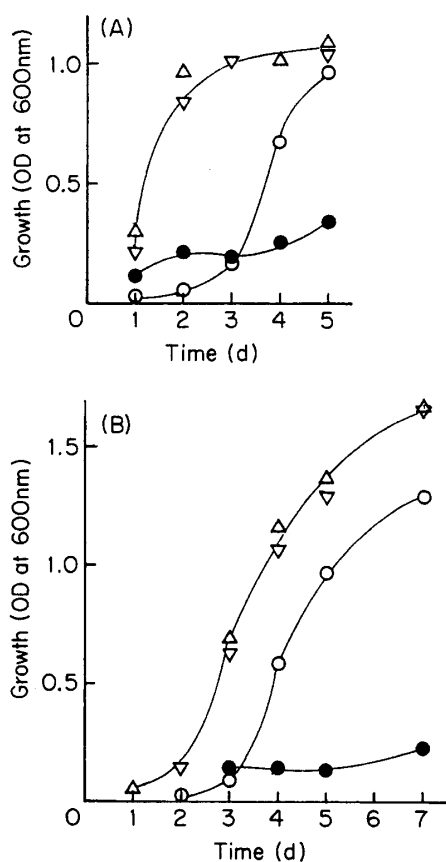


Fig. 2. Effects of various fatty acids on the growth of lactic acid bacteria isolated from kimoto. *Leuconostoc mesenteroides* L74 (A), or *Lactobacillus sake* L5 (B) was inoculated in a dilution of 1:1000 from fresh cultures of growth medium into 50 ml of GYP medium supplemented with 0.1% polyoxyethylene (20) cetyl ether, and 0.5 mM fatty acid (palmitic acid (●), oleic acid (Δ), linoleic acid (▽), or no addition (○)), followed by incubation at 15°C for as long as 1 week.

も、オレイン酸と同様にリノール酸によってもいちじるしい増殖促進効果が認められた。

考 察

生醃中の乳酸菌および清酒酵母の菌体中には一般にリノール酸は見いだされないが、^{16,17)} 培地中に存在するリノール酸を取り込み菌体合成に利用しているものと考えられ、脂質の脂肪酸組成はかなり柔軟に変化すると考えられる (Table 2, 5)。さらに、生醃中の乳酸菌においては、低温培養でリノール酸の取り込み量が増大するとともに、リノール酸による増殖促進効果が認められた (Fig. 2)。このことは、他の多くの乳酸菌が生育できない低温で増殖していく要因の一つになっていると考えられ、今後さらに検討を行いたい。また、

硝酸還元菌 *Pseudomonas* をはじめ、多くの微生物において、低温環境では脂肪酸に不飽和型の増えることが知られている。¹⁸⁾ このことから、生醃中に存在するいわゆる幕下菌についても、リノール酸取り込みの影響を考える必要があると考えられる。

蒸し米の溶解と脂質の動きについて石川、吉沢によって詳しい検討が報告されているが、¹⁹⁾ 同様に、糖化もろみから石油エーテル・エーテルで抽出される脂質の大部分はトリグリセリドと遊離脂肪酸であった (Fig. 1)。このことから、遊離脂肪酸は、蒸し米の溶解にともない液層中、または固層の表面に付着した形でわずかに存在しているものと考えられ、微生物によって利用し得る脂質の主要成分であると考えられる。糖化もろみ中に乳酸菌が増殖することにより、リノール酸は取り込まれると考えられ、リノール酸の量はいちじるしく低減した (Table 4)。同様の結果は生醃のフクレ前試料についても認められ、リノール酸含量の多い速醸醃と大きな脂肪酸組成の差異が認められた (Table 3)。このことから、酒母液層や固層表面に存在する 0.5 mM 程度の遊離脂肪酸の組成は、乳酸菌の低温増殖にともなうリノール酸の取り込みの増大によって、大きな影響を受けると考えられる。さらに、ひき続いて酵母がこれらの遊離脂肪酸を利用することにより、速醸醃酵母のリン脂質はリノール酸を多く含むのに対し、生醃酵母ではほとんど含まれない結果になったと考えられる。

生醃酵母は温み取り操作や長期間の枯らしに強いことが経験的に知られているが、酒母酵母のリン脂質脂肪酸組成の違いが、これらの操作にどのような影響を及ぼすか今後検討の予定である。

要 約

1. 速醸醃酵母のリン脂質中の主要脂肪酸は、リノール酸で30~50%の含量を示したのに対し、生醃酵母における含量は数%であり、パルミチン酸、ステアリン酸の比率が増大していた。
2. 培地中に添加された脂肪酸は、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸のいずれにおいても酵母リン脂質中での含量が増大した。
3. 速醸醃では、石油エーテル・エーテルで抽出される遊離脂肪酸中にリノール酸が多く含まれていたが、生醃の場合には、リノール酸はほとんど含まれていなかった。
4. 糖化もろみに乳酸菌を生育させることにより、

石油エーテル・エーテルで抽出される遊離脂肪酸組成は大きく変わり、リノール酸は減少し、パルミチン酸、ステアリン酸の比率が増大した。

5. リノール酸を含む培地で増殖した乳酸菌は、リノール酸を主要な菌体脂肪酸とし、低温で培養することによりリノール酸の取り込み量はさらに増大した。

6. 生醗から分離された乳酸菌は、リノール酸によって増殖が促進され、パルミチン酸は増殖阻害的であった。

文 献

- 1) 秋山裕一：改訂清酒酵母の研究（清酒酵母研究会編），p. 283-288, 清酒酵母研究会 (1980).
- 2) 佐藤俊一：醸協，85, 148-154 (1990).
- 3) Hayashida, S., Feng, D. D., Ohta, K., Chaitium-vong, S., Hongo, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 40, 73-78 (1976).
- 4) 上原悌次郎，山本みどり：醸協，87, 773-779 (1992).
- 5) 吉沢 淑，石川雄章，野白喜久雄：農化，47, 713-717 (1973).
- 6) 石川雄章，吉沢 淑：醸酵工学，56, 24-30 (1978).
- 7) 吉沢 淑，石川雄章：醸協，74, 148-152 (1979).
- 8) Chen, R. F.: *J. Biol. Chem.*, 242, 173-181 (1967).
- 9) 古坂澄石，須藤恒二，植村定治郎，藤井義昭：醸酵工学，29, 158-161 (1951).
- 10) Bligh, E. G., Dyer, W. J.: *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-919 (1967).
- 11) 藤井安彦：脂質分析法入門，p. 93, 学会出版センター (1978).
- 12) 植田伸夫：化学と生物，17, 744-752 (1979).
- 13) Ishikawa, T., Yoshizawa, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 45-53 (1979).
- 14) Uchida, K., Mogi, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 18, 109-129 (1972).
- 15) 児玉礼次郎：乳酸菌の研究（北原覚雄編），p. 263-264, 東京大学出版会 (1966).
- 16) 小崎道雄，内村 泰，岡田早苗：乳酸菌実験マニュアル，p. 92-94, 朝倉書店 (1992).
- 17) Hayashida, S., Fing, D. D., Hongo, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 38, 2001-2006 (1974).
- 18) 堀 太郎：生体物質の化学構造と機能（日本化学会編），p. 169-194, 学会出版センター (1974).
- 19) 石川雄章，吉沢 淑：農化，48, 657-662 (1974).
- 20) 大林 晃，北原覚雄：農化，33, 839-843 (1959).
- 21) 溝口晴彦，鶴本真人，古川彰久，川崎 恒：醸酵工学，69, 211-217 (1991).