

[生物工学会誌 第74巻 第1号 1-6, 1996]

麹菌によるビタミンCの生成と清酒への移行

永益 陽子*・尾関 健二・神田 晃敬・浜地 正昭
熊谷知栄子・布川彌太郎大関佛総合研究所
〒663 兵庫県西宮市今津出在家町4-9

(平成7年6月19日受付 平成7年8月11日受理)

Production of Vitamin C by *Aspergillus oryzae* and Its Extraction in SakeYOKO NAGAMASU,* KENJI OZEKI, AKIHIRO KANDA, MASAOKI HAMACHI, CHIEKO KUMAGAI, and YATARO NUNOKAWA (General Research Laboratory, Ozeki Corp., 4-9 Imazu Dezaike-cho, Nishinomiya, Hyogo 663) *Seibutsu-kogaku* 74: 1-6, 1996.

Vitamin C was detected in rice-*koji* containing *Aspergillus oryzae* transformants remarkably expressing *Escherichia coli* β -glucuronidase (GUS). It was found that transformants possessing GUS activity are able to biosynthesize vitamin C following cell growth. It is considered that glyco-saminoglycan, etc. derived from *A. oryzae* mycelium components are converted to D-glucuronic acid by endogenous GUS, and finally vitamin C is biosynthesized in the *koji*. We selected FAO 60 as a practical *A. oryzae* having GUS activity, and detected vitamin C in the *koji* (388 μ g vitamin C/g *koji*). Small-scale sake brewing was carried out using FAO 60 *koji*. As the vitamin C content was not increased, and decreased during fermentation, it is considered that vitamin C derived from the *koji* is extracted in the sake. Using this method, sake was made containing 40 μ g/ml vitamin C, at which level there was no effect on sensory evaluation.

[Key words: vitamin C, β -glucuronidase, *Aspergillus oryzae*, rice-*koji*, sake]

ビタミンCは、動物の結合組織、特にコラーゲンの生成と維持、生体異物の代謝、免疫増強作用などを促進する働きがある。ヒトおよび霊長類、モルモットでは、ビタミンC生合成の最終段階の酵素であるL-グルノ γ -ラクトンオキシダーゼが欠損しているため、食物から摂取しなければならず、ビタミンC欠乏症は壊血病として知られている。また喫煙、ストレスにより血中濃度が低下することから付加所要量の摂取も推奨されている。ビタミンCは食品の栄養強化剤としての用途の他、ビタミンCのもつ還元力を利用して食品成分の酸化による変色防止、ワインの酸化防止(酒税法上200 μ g/ml以下)、ビールの混濁防止など広範囲に利用されているが、現在、清酒の場合、添加は認められていない。清酒中のビタミンC含量については、検出限界に近い程度の0.5~0.8 μ g/mlという報

告¹⁾がある。

一方、Ozekiらの報告¹⁾では、遺伝子組換え技術により、大腸菌の β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子をレポーター遺伝子とし、*Aspergillus oryzae*あるいは*Aspergillus niger*の新規のプロモーター領域を組み込んだ、GUSを高生産する*A. oryzae*の形質転換麹菌を育種しており、このGUSがビタミンC生合成経路(Fig. 1)に存在することに注目した。

現行のビタミンCの工業的生産は、合成と発酵法を組合わせて行われているため、この工業的プロセスを広範囲に生物反応に置き換える研究がなされているが、微生物によるビタミンC生成の報告は少ない。麹菌は各種酵素系に富むが、ビタミンCの生合成については*A. niger*での報告³⁾があり、*A. oryzae*での報告はない。他の微生物では*Penicillium*,⁴⁾酵母,^{5,6)}キノコ⁷⁾での報告がある。

本研究は、麹菌が生産するビタミンCにより、抗

* 連絡先, Corresponding author.

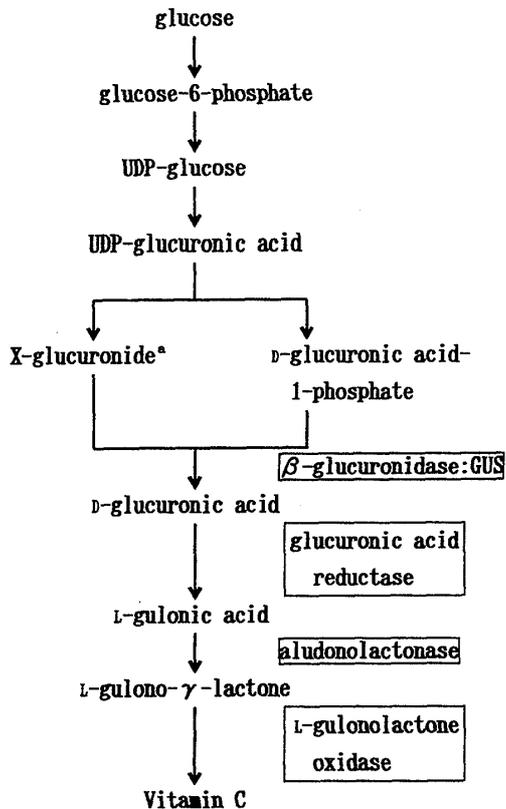


Fig. 1. Metabolic pathway of vitamin C. ^a X-glucuronide represents hemicellulose derived from the rice, and glycosaminoglycan, etc. derived from *A. oryzae* mycelium components.

酸化能や生理活性機能などの有用な機能性を付与された清酒の開発を目的として、先に述べた GUS 高生産組換え麹菌のビタミン C 生合成能を検討した。さらにビタミン C を生合成する実用麹菌のスクリーニングを行い、清酒への利用について検討した。

実験方法

供試菌株 *A. oryzae* 形質転換麹菌は、*A. niger* 由来のプロモーター領域が入った GUS 高生産麹菌 (No. 8 AN Pro-GUS) と、*A. oryzae* 由来のプロモーター領域が入った GUS 高生産麹菌 (No. 9 AO Pro-GUS) としてそれぞれ育種した菌株を用いた。また、実用麹菌は当社保存 (FAO 株, 166 株) の *A. oryzae* 麹菌を使用した。

麹の調製 α 米からの製麹は原らの方法⁹⁾に従い、3 ml の滅菌製麹水 (0.5% KH_2PO_4 と 1% NaNO_3 の 1:1 混液) に孢子を懸濁させ ($10^6/\text{ml}$)、これを α 米 10 g (95°C, 2 時間殺菌乾燥) に添加し、均一に吸収させて行った。30°C 一定で静置し 20 時間後に滅菌スパーテルで攪拌し、48 時間で出麹とした。蒸米からの

製麹は蒸米を放冷後種麹を散布し、恒温恒湿器 (TABAI ESPEC 株式会社 SH-220) 中に 32°C で引込み (RH95%, 24 時間)、以後 35°C (RH90%, 12 時間)、38°C (RH85%, 12 時間) と品温を上昇させ 48 時間培養して出麹とした。また、一部対照として当社工場で機械製麹した麹を用いた。

麹菌体量の測定 藤井らの報告⁹⁾に従って、市販の酵素剤 Yatalase (宝酒造)^{10,11)}を用いて測定した。

GUS 活性測定 麹を液体窒素存在下の乳鉢で粉碎後、10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% Sarkosyl, 10 mM β -mercaptoethanol を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁後、氷上で 30 分間静置し、菌体内酵素を抽出した。この粗酵素液について Jefferson らの方法¹²⁾に従い、p-nitrophenylglucuronide を基質として GUS 活性を測定した。ここで 1 分間に 1 nmol の p-nitrophenol を遊離する GUS 活性を 1 Unit とした。

GUS 活性を持つ麹菌のスクリーニング 0.005% の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide を含む Czapek-Dox プレート (3% Glucose, 0.3% NaNO_3 , 0.2% KCl, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002% $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.5% Agar) で培養し (30°C, 数日間)、生育に伴い菌体が青色に発色する麹菌をスクリーニングした。

ビタミン C 定量法 麹については、0.5% NaCl を含む 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を 2.5 倍量加えて室温で 3 時間抽出後ろ過し、10% メタリン酸溶液を等量加えたものを測定に用いた。測定法はヒドラジン法¹³⁾、酵素法 (ベーリンガー・マンハイム 株式会社, L-アスコルビン酸測定キット (F-Kit 409677))、インドフェノール法¹⁴⁾を検討した。ヒドラジン法では、還元型ビタミン C を酸化型ビタミン C に変換して総ビタミン C を定量し、酵素法では、酸化型を還元型に変換して総ビタミン C を定量した。単位は麹 1 g 中の総ビタミン C 量とした。清酒については、10% メタリン酸溶液を等量加えて同様に測定し、単位は清酒 1 ml 中の総ビタミン C 量とした。ヒドラジン法の検出限界は 50 $\mu\text{g/g}$ 麹, 20 $\mu\text{g/ml}$ 清酒である。

ビタミン C 代謝関連酵素の活性測定 Dextrin-Peptone 培地 (2% Dextrin, 1% Polypepton, 0.5% KH_2PO_4 , 0.1% NaNO_3 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) で 30°C, 3 日間液体培養した麹菌体、あるいは麹からの抽出は GUS 活性と同様にして行った。抽出液は 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で 1 晩透析し、分画分

Table 1. GUS activity in *koji* and vitamin C contents in sake and *koji*.

Rice- <i>koji</i>	Sake				<i>Koji</i>	
	Sake meter	Alcohol (%)	Solubility ^a (%)	Vitamin C ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Vitamin C ($\mu\text{g/g koji}$) ^b	GUS (U/mg protein) ^c
Control	4.5	18.2	76.5	0	0	0
No. 9 AO Pro-GUS-2	-1.1	17.8	77.3	N.D. ^d	N.D.	4700
No. 8 AN Pro-GUS-1	-3.3	17.6	77.4	47	330	23000
No. 8 AN Pro-GUS-2	-3.0	17.6	77.2	N.D.	N.D.	14000
No. 8 AN Pro-GUS-3	-0.1	18.0	77.8	26	183	14000

^a Nagatani *et al.*¹⁶⁾

^b Significant at levels of 20 $\mu\text{g/ml}$ sake or 50 $\mu\text{g/g koji}$.

^c U, n mol/min.

A sake mash composed of rice 32 g, *koji* 8 g (20%), and water 56 ml was fermented for 17 d at 15°C.

Rice-*koji*: Control, *A. oryzae* transformant (*argB* complementation); No. 9 AO Pro-GUS, *A. oryzae* transformant containing the promoter region derived from the *A. oryzae* genome; No. 8 AN Pro-GUS, *A. oryzae* transformant containing the promoter region derived from the *A. niger* genome.

^d N.D., Not detected (Sake, <20 $\mu\text{g/ml}$ sake; *Koji*, <50 $\mu\text{g/g koji}$).

子量1万の限外ろ過（クラボウ，セントリカットU-10）を行った濃縮液について，Chatterjeeの方法¹⁵⁾により，グルクロン酸およびL-グルクロノラクトンからビタミンCを生成する活性を測定した．ここで乾燥菌体1gが1分間に1ngのビタミンCを生成する活性を1Unitとした．

清酒成分分析 アルコール濃度はガスクロマトグラフィー（日立063型）により測定した．酸度，アミノ酸度および日本酒度は国税庁所定分析法¹⁶⁾に従った．米の溶解率は日本酒度とアルコール濃度，そして投入した米，麴および水の量から算出した．¹⁷⁾

実験結果および考察

GUS高生産形質転換麴菌 GUS高生産形質転換麴菌を用いて麴を調製して，総米40g，麴歩合20%，汲水歩合140%の清酒醸造を行った．GUSの基質と成り得るグルクロン酸の配糖体としては，ヒアルロン酸，ムコ多糖などの菌体内細胞質間成分が製麴中に，あるいは米成分由来のヘミセルロース画分が製麴中および発酵中に関与することが考えられる．そこで製麴後のGUS活性と，麴中および清酒中のビタミンC含量を測定し，合わせて発酵中に米のヘミセルロース分解が促進され，米の溶解率が上昇するかを調べ，結果をTable 1に示した．

GUS活性に対応して清酒中にビタミンCが認められ，高いもので50 $\mu\text{g/ml}$ 程度検出された．麴中のビタミンC含量は，生成酒のビタミンC含量が高いものほど高い数値を示した．このことからビタミンC

は麴由来であり，菌体内細胞質間成分あるいは米成分から生成されると考えられる．また，経験的にGUSは溶出しやすく，麴中のGUS活性があるものは発酵中に米のヘミセルロース分解を促進していると考えられるが，米の溶解率は，ほとんど上昇しなかった．

定量法の検討 ビタミンC以外の定量への影響物質を検討するために，定量法の違いによる比較を行った（Table 2）．麴については，アスコルビン酸オキシダーゼを用いる酵素法と，ヒドラジン法とで定量値がほぼ一致した．このことから，ビタミンC以外で同様に還元力を有する夾雑物による影響はなく，ビタミンCが定量されており，麴中にビタミンCが生成されていることが確認できた．インドフェノール法で

Table 2. Vitamin C contents in *koji* measured by various quantitative methods.

Rice- <i>koji</i>	Vitamin C ($\mu\text{g/g koji}$)		
	DNP ^a	AsA oxidase ^b	DCPI ^c
Control	0	0	0
No. 8 AN Pro-GUS-1	123	100	176
No. 8 AN Pro-GUS-3	115	116	214

^a DNP, Dinitrophenyl hydrazine method.

^b AsA oxidase, Ascorbic acid oxidase method (Boehringer Mannheim, F-Kit 409677).

^c DCPI, Dichlorophenolindophenol method.

Rice-*koji*: Control, *A. oryzae* transformant (*argB* complementation); No. 8 AN Pro-GUS, *A. oryzae* transformant containing the promoter region derived from the *A. niger* genome.

Table 3. Screening of practical *Aspergillus oryzae* for producible vitamin C.

Rice-koji	GUS (U/mg protein)	Vitamin C ($\mu\text{g/g}$ koji) ^a
FAO 44	0.11	129
FAO 51	0.08	196
FAO 60	0.07	388

^a Significant at a koji level of 50 $\mu\text{g/g}$ koji.

は滴定終点がはっきりしないうえ、夾雑物の影響で他の方法より高い値を示したと考えられる。清酒の場合も同様の結果であった。そこで以下、通常はヒドラジン法を用い、一部酵素法により測定した。

GUS 活性を持つ実用麹菌のスクリーニング これまで述べた麹菌は組換え体の規制があり、実用的ではない。GUS 活性のある実用麹菌でビタミンCが検出されれば組換え体の規制はなく、変異処理で活性を上げることが可能である。そこで実用麹菌 166 株について、青色を呈するプレートアッセイにより GUS 活性を持つ麹菌のスクリーニングを行い、17株を選択した。これらを用いて麹を調製後、GUS 活性とビタミンCを定量した。一例を Table 3 に示した。

FAO 60 のような麹菌体の生育も良く、ビタミンC生成量が高いものがスクリーニングできた。しかし、p-nitrophenylglucuronide を基質とする GUS 活性とビタミンC生成量との相関性は見られなかった。GUS はアグリコンに対する特異性は広いが、酵素起源によって相違がある。ビタミンCを生成する実用麹菌は

スクリーニングに用いた基質 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide に対して、菌体の生育に伴って青色を呈する GUS 活性を示した。しかし、活性測定に用いた基質 p-nitrophenylglucuronide に対して、形質転換麹菌の大腸菌由来の GUS は高い特異性を示すが、実用麹菌の GUS は特異性が低いことも考えられる。このことは、*Aspergillus* 属は基質特異性の異なる種々の GUS を生産するという工藤らの報告¹⁸⁾からも推察される。あるいは、組換え体の GUS が発現している場所は検討していないが不明であり、細胞質間成分などの基質が存在するビタミンC合成の場に、必要量の GUS 活性があればよいことも推察される。

ビタミンC生成経路の推察 ビタミンC生成経路を推察するため、グルクロン酸からのビタミンC生成量と、ヒトで欠損しているL-グルノラクトンオキシダーゼの基質であるL-グルノラクトンからのビタミンC生成量を測定した。Table 4 に麹中の菌体量あたりの、あるいは液体培養後の乾燥菌体量あたりのビタミンC生成量を示した。

調べた範囲内の麹および液体培養の菌体から抽出された粗酵素液では、グルクロン酸およびL-グルノラクトン両者からのビタミンC生成が認められた。したがって、麹菌は両基質からのビタミンC生合成能力を持ち、このことから GUS 活性を合わせ持つ麹菌は、ビタミンCを菌体内で生合成できることが推察される。また、麹培養による菌体量あたりのビタミンC生成量と、液体培養による乾燥菌体量あたりのビタミンC生成量を比較した。液体培養よりも、麹培養

Table 4. Vitamin C production from D-glucuronic acid and L-gulonono- γ -lactone substrates.

Strain	Substrate Culture	Vitamin C			
		D-Glucuronic acid		L-Gulonono- γ -lactone	
		Koji (U/g) ^a	Liquid (U/g) ^b	Koji (U/g) ^a	Liquid (U/g) ^b
Control		940	N.D. ^c	4100	230
No. 8 AN Pro-GUS-1		2340	26	5100	400
FAO 60		1830	13	3640	58

^a g, g mycelium.

Mycelial weight in koji was calculated at the rate of 10 mg mycelium/g koji.

^b g, g dry mycelium.

Cells were grown in Dextrin-Peptone medium for 3 d at 30°C with shaking at 100 rpm.

Mycelia were collected with a glass filter and used as samples.

Wet mycelia was dried at 100°C for 5 h.

^c N.D., Not detected (<1 U/g dry mycelium).

Strains: Control, *A. oryzae* (Higuchi moyashi); No. 8 AN Pro-GUS, *A. oryzae* transformant producing vitamin C; FAO 60, a practical *A. oryzae* producing vitamin C.

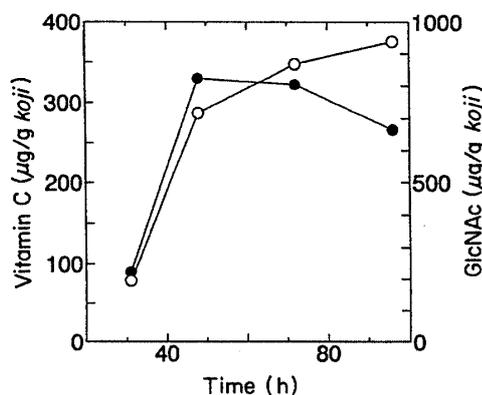


Fig. 2. Time course of vitamin C content in *koji*. Symbols: ●, vitamin C; ○, *N*-acetylglucosamine (GlcNAc). Strain: No. 8 AN Pro-GUS-1. Grown mycelial content in *koji* was measured by the Yata-lase method.⁹⁾ The GlcNAc content is an index of the mycelial content in *koji*.

中での生成量が両基質において高い値を示したことから、何が起因するかは不明だが、固体培養ではビタミンC生合成酵素系が誘導されることも推察される。

製麹期間中の麹の麹菌菌体量とビタミンC含量の経時変化 製麹期間中の麹の麹菌菌体量とビタミンC含量の経時変化をFig. 2に示した。この他の実用麹菌FAO株、形質転換麹菌も同じ傾向であり、菌体の増殖に伴ってビタミンCを生成し、48時間以降は増加せず、72時間以降はやや分解されていた。また、表示しないが、菌体外の基質が利用できるか検討するため、GUS活性を示さない*argB*を相補した形質転換麹菌と実用麹菌（樋口もやし）およびGUS活性を示すNo. 8 AN Pro-GUS-1とFAO 60の製麹の際、D-グルクロン酸を製麹水に添加した結果、GUS活性の有無に関係なくすべての麹菌で、ビタミンCの増加は認められなかった。しかし、粉碎した麹の抽出液では、GUS活性を示さない実用麹菌を含むすべての麹菌で、D-グルクロン酸からのビタミンC生成が認められたことを考え合わせると、製麹中のビタミンCの生合成は、米のヘミセルロース画分などの菌体外の基質が

Table 5. Time course of vitamin C content in *moromi* mash.

	Koji (µg/g koji)	Vitamin C ^a			
		Moromi (µg/ml)			
		Brewing time (d)			
Rice-koji		4	8	12	14
Control	0	0	0	0	0
FAO 60	306	41	40	40	41

A sake mash composed of rice 320 g, *koji* 80 g (20%), and water 560 ml was fermented for 17 d at 15°C.

^a Significant at levels of 50 µg/g *koji* or 20 µg/ml sake.

利用されるのではなく、麹菌の増殖中に菌体内の細胞質間成分を利用してGUSがグルクロン酸を生成し、最終的にビタミンCが合成されるものと推察される。したがって、菌体の増殖がほとんど終了する出麹時に、ビタミンCが最高に達するものと考えられる。

醗期間中のビタミンC含量の変化 醗期間中のビタミンC含量の経時変化をTable 5に示した。仕込み初期から麹のビタミンCが醗中に移行し、増加も分解もなかった。また麹1g中のビタミンC含量306 µgに仕込みに用いた量100gをかけ、生成酒の液量770 mlで割った、計算上算出される量40 µg/mlに近い値になった。このことから、醗期間中、米由来のヘミセルロースなどからのビタミンC合成はないと考えられる。また酵母によるビタミンCの取り込みや分解の可能性は低いと考えられる。したがって、FAO 60では、製造した麹を20%用いる清酒仕込の清酒中のビタミンC含量が40 µg/mlであることから、麹歩合を50%に増加させた場合、100 µg/mlの醸造が可能である。

仕込酒の一般分析と官能評価 ビタミンC生成麹菌、FAO 60の仕込酒の一般分析、官能評価をTable 6に示した。今回の仕込で得られた清酒は、対照、FAO 60とも酸度、アミノ酸度が高く、満足のできる生成酒とは言えない。またFAO 60の酸性カルボ

Table 6. Analysis of fermented sake.

Rice-koji	Sake meter	Alcohol (%)	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)	Vitamin C (µg/ml)	Sensory evaluation ^a 5-point method	
						Flavor	Quality
Control	-1.4	17.7	3.50	2.00	0	3.0	3.3
FAO 60	2.8	18.1	3.70	2.70	41	3.4	3.5

^a 1, good~5, poor.

Score points were expressed as mean value of 13 panellers' point.

キシペプチダーゼ (ACP) 活性は、対照として用いた機械製麹のもので 4334 U/g 麹に対して 8634 U/g 麹と高い。この高い ACP 活性に起因して、FAO 60 の生成酒のアミノ酸度は、対照に比べて高くなり、さらに官能評価に影響を及ぼしたことも考えられる。この点は今後の課題である。しかし、表示しないが市販酒に L-アスコルビン酸を添加して官能評価を行ったところ、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までは無添加と差は認められず、この程度の含量では、ビタミン C は官能評価を低下させる物質ではないと考えられる。

以上のように、スクリーニングして得られた麹菌が製麹中に生合成するビタミン C は、分解もなく醪中へ移行し、麹歩合 20% の仕込みで 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のビタミン C を含有する清酒が得られた。このことから、ビタミン C 生成麹菌は清酒への利用が可能で、付与されたビタミン C のもつ有用な機能性が期待される。今後は、抗酸化能などについての検討と、さらに安定した製麹、より官能評価の高い清酒仕込について検討する。

要 約

β -グルクロニダーゼ (GUS) 活性をもつ麹菌は菌体の増殖に伴ってビタミン C を生合成する能力を持つことが判った。これは、GUS によって、基質となり得るヒアルロン酸やムコ多糖などの菌体内細胞質間成分からグルクロン酸を生成し、最終的にビタミン C が合成されることが考えられる。実用麹菌で GUS 活性をもつ麹菌をスクリーニングし、ビタミン C の生成について検討した結果、FAO 60 がすぐれ、麹 1 g あたり 388 μg のビタミン C を生成した。FAO 60 を用いて麹を調製して清酒醸造を行った結果、醪期間中、増加することも分解されることもなく、麹由来のビタミン C が清酒中へ移行することが判った。この仕込で官能評

価に影響を及ぼさない範囲のビタミン C を 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む清酒が得られた。

文 献

- 1) Ozeki, K., Kanda, A., Hamachi, M., Nunokawa, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, in press.
- 2) 秋山裕一: 醸協, **58**, 638-640 (1963).
- 3) Sastry, K. S., Sarma, P. S.: *Nature*, **178**, 44-45 (1957).
- 4) Takahashi, T., Mitsumoto, M., Kayamori, H.: *Nature*, **188**, 411 (1960).
- 5) Bleeg, H.: *Enzymologia*, **31**, 105-112 (1966).
- 6) Petrescu, S., Hulea, S. A., Stan, R., Avram, D., Herlea, V.: *Biotechnol. Lett.*, **14**, 1-6 (1992).
- 7) Okamoto, M.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 81-94 (1994).
- 8) 原 昌道, 菅間誠之助: 醸協, **70**, 348-352 (1975).
- 9) 藤井史子, 尾関健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 布川弥太郎: 醸協, **87**, 757-759 (1992).
- 10) Ozeki, K., Kyoya (Fujii), F., Hizume, K., Kanda, A., Hamachi, M., Nunokawa, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2224-2227 (1994).
- 11) Ozeki, K., Hizume, K., Kanda, A., Hamachi, M., Nunokawa, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1133-1134 (1995).
- 12) Jefferson, R. A., Burgess, S. M., Hirsh, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8447-8451 (1986).
- 13) Roe, J. H., Mills, M. B., Oesterling, M. J., Dameron, C. M.: *J. Biol. Chem.*, **174**, 201 (1948).
- 14) Tillmans, J., Hirsch, P., Hirsch, W.: *Z. Unters. Lebensm.*, **63**, 1 (1932).
- 15) Chatterjee, I. B.: *Methods in Enzymology* (McComick, D. B., Wright, L. D.), vol. 18, p. 28, Academic Press, New York (1970).
- 16) 第 4 回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会 (1993).
- 17) 永谷正治, 水谷行夫, 難波康之祐: 醸酵工学, **51**, 35-40 (1973).
- 18) 工藤重光, 内田悌治, 大久保一良: 化学と生物, **30**, 419-421 (1992).