

〔醸酵工学 第55巻 第2号 68-74. 1977〕

硝酸還元菌および清酒乳酸菌によるアミン類の生成*

梅津 雅裕・柴田 彩・前田 正敏**

鳥取大学工学部

Production of amines by nitrate reducing-bacteria and lactobacilli for saké-brewing.*

UMEZU, M., A. SHIBATA, and M. MAEDA** (Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Tottori University, Koyama 1-1, Tottori) Hakkokogaku 55: 68-74. 1977.

The production of amines from amino acids by nitrate-reducing bacteria and lactobacilli, which is concerned in saké-brewing, was investigated using 16 strains of nitrate-reducing bacteria and 6 strains of lactobacilli.

The activities of amino acid decarboxylases of these bacteria were measured with Warburg manometer and expressed as Q_{CO_2} , and the amines produced by decarboxylation were confirmed by thin layer chromatography.

Two strains of *Aerobacter aerogenes* showed decarboxylase activity towards arginine, lysine, ornithine, and serine. *Lactobacillus saké* showed decarboxylase activity towards arginine and ornithine. Two strains of *Pseudomonas* sp. showed decarboxylase activity towards ornithine and 5 showed the activity towards lysine. *Leuconostoc mesenteroides* var. *saké* showed strong decarboxylase activity of tyrosine. It was confirmed that the amines putrescine, cadaverine, ethanolamine, agmatine and tyramine were produced from the corresponding amino acids.

It is considered that the production of these amines in the initial step of making of Kimoto and Yamahaimoto (seed mash) is mainly due to the action of nitrate reducing bacteria and lactobacilli. In particular, the production of tyramine from tyrosine occurred by the action of lactobacilli.

The optimum activity of the amino acid decarboxylases of these bacteria was seen between pH 4.5 and pH 6.0 and between 35°C and 45°C.

著者らは今までに清酒中に10数種類のアミン類とそれらの近縁物質の存在を認め、¹⁾それらの成分の清酒醸造過程における消長を追求して、成分変化の実態を明らかにした。^{2,3)}さらに清酒醸造に關与する主要微生物であるこうじ菌、清酒酵母菌についてアミン類の生成および消費の状態を調べ、⁴⁻⁶⁾これらの微生物の清酒醸造におけるアミン類生成の役割を明らかにした。腐敗細菌によるアミン生成については古くから多数の報告がある⁷⁻¹¹⁾が、醸造細菌についてはまとまった報告はない。

本報告においては、生酛系酒母初期に出現し酒母の健全な育成に重要な役割を果している硝酸還元菌およ

び清酒乳酸菌について、アミノ酸脱炭酸作用によるアミン生成の状況を調べ、5種のアミノ酸を脱炭酸し、対応するアミンを生成することを認めたので、その詳細を報告する。

実験方法

供試菌および培養条件 使用した菌株は硝酸還元菌16株および清酒乳酸菌6株である。これらの菌株は、国税庁醸造試験所百瀬洋夫氏から分与された *Pseudomonas* sp. A, E, *Aerobacter aerogenes* B, C, *Achromobacter guttatus*, 福島県醸造試験所芦沢長氏†から分与された *Pseudomonas* sp. P-1, P-2, P-4, P-5, Suehiro 1 および Suehiro 2, 新泉酒造株式会社小西康夫氏から分与された *Pseudomonas* sp. E-1, E'-1, E-8, 愛知県食品工業試験

* 清酒醸造中におけるアミノ酸類およびアミン類の消長について (第9報)

** 現住所 香川県坂出市

† 福島県立会津短期大学教授

Table 1. Composition of medium for lactobacilli.

Meat extract	0.3%
Polypeptone	0.5
Glucose	2.0
Yeast extract	0.5
Water	

Table 2. Composition of medium for nitrate-reducing bacteria.

Meat extract	1.0%
Polypeptone	1.0
Glucose	1.0
NaCl	0.5
Water	

所山下勝氏から分与された *Micrococcus varians* および *Bacillus subtilis*, 発酵研究所から入手した *Lactobacillus casei* 3425, *Lactobacillus batatas* 12455, *Lactobacillus plantarum* 3070 および *Leuconostoc mesenteroides* var. *saké* 3835, 東京農大農芸化学教室から分与された *Lactobacillus saké* および *Leuconostoc mesenteroides* var. *saké* であり, いずれも清酒こうじまたは酒母より分離されたものである。

培地として, こうじ 1kg を殺菌水 3l 中に浸漬して 5°C で 24 時間静置後, ザイツろ過器でろ過, 分注して加圧滅菌したこうじ汁¹²⁾ をすべての菌株に用いた。

その他, 乳酸菌のみの培養に用いた合成培地組成を Table 1 に, その他の菌株の培養に用いた合成培地組成を Table 2 に示した。これらの培地をそれぞれ 10 ml 用いて 24 時間 30°C で前培養を行ったのち, 培地 100 ml で前培養と同じ培養条件で本培養を行った。

基質 本実験に使用したアミノ酸を Table 3 に示す。

アミノ酸脱炭酸能の測定

1. 菌体試料の調製 本培養終了後遠心分離して得られた菌体を生理的食塩水を用いてくりかえし 3 回洗浄したのち, 殺菌蒸留水 3~5 ml に懸濁して試料とした。

2. 炭酸ガス発生量の測定 ワールブルグ検圧計を用いて測定した。容器内容を Table 4 に示す。30°C における炭酸ガスの発生量を 10 分毎に 1~2 時間測定した。酵素活性 Q_{CO_2} は乾燥菌体重量 1 mg あたりの 1 時間における炭酸ガス発生量 μl であらわした。

Table 3. Substrate.

L-Arginine monohydrochloride
L-Ornithine
L-Lysine monohydrochloride
L-Histidine monohydrochloride
L-Tyrosine
L-Phenylalanine
L-Alanine
L-Glutamic acid
L-Valine
L-Leucine
L-Serine
L-Tryptophan
L-Threonine

Table 4. Reaction system in Warburg manometer.

	Additions	Volume
Main cup	Cell suspension	1.0 ml
	M/10 Phthalate buffer	0.7 ml
Side bulb	M/50 Amino acid in M/10 Phthalate buffer	0.3 ml
incubation temperature: 30°C		
gas phase : N ₂		

薄層クロマトグラフィーによる生成アミンの確認
炭酸ガス発生量の測定を終了したのち容器内容物を取り出し, 遠心沈殿して得た上澄液を試料として薄層クロマトグラフィーを行い, 生成したアミンを確認した。吸着剤はアビセル SF を 60°C で 10 分間活性化して用いた。展開溶媒はクロロホルム:メタノール:アンモニア=2:2:1 の混合溶液を用い, 0.2% ニンヒドリン-*n*-ブタノール溶液で発色させた。

アミノ酸脱炭酸作用の特性

1. 至適 pH アミノ酸脱炭酸能を比較的強く示した菌株について, 至適 pH を調べるために 1/10 M フタル酸緩衝液の pH を 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 に調整し, それぞれの pH におけるアミノ酸脱炭酸能を測定した。

2. 至適温度 至適 pH の測定と同様にアミノ酸脱炭酸能を比較的強く有する菌株を pH 5.0 の 1/10 M フタル酸緩衝液に懸濁し, 反応温度を 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, と変え, それぞれの温度におけるアミノ酸脱炭酸能を測定した。

実験結果および考察

アミノ酸脱炭酸能 各菌株のアミノ酸脱炭酸能を Table 5, 6 に示す. 硝酸還元菌のうち, *Pseudomonas* sp.

の菌株に ornithine, lysine の脱炭酸能を有するものがあることが認められた. また, *Aerobacter aerogenes* の 2 菌株のうち1菌株に arginine 脱炭酸能および ornithine 脱炭酸能が認められ, 他の 1 菌株に lysine 脱炭酸能が

Table 5. Decarboxylase activities of nitrate-reducing bacteria and lactobacilli (Q_{CO_2}).

(No. 1)

Strain	Medium	Amino acid					
		L-Arg.	L-Orn.	L-Lys.	L-His.	L-Tyr.	L-Phe.
<i>Pseudomonas</i> sp. A	A*	—	—	—	—	—	—
	B**	—	14	—	—	—	—
// E	A	—	20	—	—	—	—
	B	—	21	11	—	—	—
// P-1	A	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—
// P-2	A	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	4	—	—	—
// P-4	A	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	4	—	—	—
// P-5	A	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—
// E-1	A	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—
// E'-1	A	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—
// E-8	A	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—
Suehiro 1	A	—	—	3	—	—	—
	B	—	—	7	—	—	—
Suehiro 2	A	—	—	22	—	—	—
	B	—	—	16	—	—	—
<i>Aerobacter aerogenes</i> B	A	21	6	—	—	—	—
	B	22	23	—	—	—	—
// C	A	—	—	4	—	—	—
	B	—	—	40	—	—	—
<i>Achromobacter guttatus</i>	A	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—
<i>Micrococcus varians</i>	A	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i>	A	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus casei</i> 3425	A	—	—	—	—	—	—
	C***	—	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus batatas</i> 12455	A	—	—	—	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3070	A	—	—	—	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus saké</i>	A	—	—	—	—	—	—
	C	7	15	—	—	—	—
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> var. <i>saké</i> 3832	A	—	—	—	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> var. <i>saké</i>	A	—	—	—	—	46	—
	C	—	—	—	—	32	—

* koji-ext.

** synthetic medium for nitrate-reducing bacteria.

*** synthetic medium for lactobacilli.

Conventional Warburg manometric technique was used for the measurement of carbon dioxide produced. The reaction system was shown in Table 4. Decarboxylase activities were expressed as Q_{CO_2} (μ l CO_2 evolved/hr/mg dry weight bacteria). Bacterial cells for measurement were grown at 30°C for 24 hr in the medium, centrifuged, washed three times with physiological salt solution and suspended in distilled water.

認められた。また、微弱ではあるが2菌株ともに serine 脱炭酸能が認められた。乳酸菌では *Lactobacillus saké* に arginine 脱炭酸能および ornithine 脱炭酸能が認められ、*Leuconostoc mesenteroides* var *saké* の1菌株にかな

り強い tyrosine 脱炭酸能が認められた。

薄層クロマトグラフィによる生成アミンの確認

アミノ酸脱炭酸作用によって生成されたアミンを確認するために行った薄層クロマトグラフィーの結果を

Table 6. Decarboxylase activities of nitrate-reducing bacteria and lactobacilli (Q_{CO_2}).
(No. 2)

Strain	Medium	Amino acid						
		L-Ala.	L-Glu.	L-Val.	L-Ser.	L-Leu.	L-Try.	L-Thr.
<i>Pseudomonas</i> sp. A	A*	—	—	—	—	—	—	—
	B**	—	—	—	—	—	—	—
// E	A	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
// P-1	A	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
// P-2	A	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
// P-4	A	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
// P-5	A	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
// E-1	A	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
// E'-1	A	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
// E-8	A	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
Suehiro 1	A	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
Suehiro 2	A	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
<i>Aerobacter aerogenes</i> B	A	—	—	—	2	—	—	—
	B	—	—	—	4	—	—	—
// C	A	—	—	—	4	—	—	—
	B	—	—	—	6	—	—	—
<i>Achromobacter guttatus</i>	A	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
<i>Micrococcus varians</i>	A	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i>	A	—	—	—	—	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus casei</i> 3425	A	—	—	—	—	—	—	—
	C***	—	—	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus batatas</i> 12455	A	—	—	—	—	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3070	A	—	—	—	—	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus saké</i>	A	—	—	—	—	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—	—
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> var. <i>saké</i> 3832	A	—	—	—	—	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—	—
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> var. <i>saké</i>	A	—	—	—	—	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—	—

* koji-ext.

** synthetic medium for nitrate-reducing bacteria.

*** synthetic medium for lactobacilli.

Conventional Warburg manometric technique was used for the measurement of carbon dioxide produced. The reaction system was shown in Table 4. Decarboxylase activities were expressed as Q_{CO_2} (μ l CO_2 evolved/hr/mg dry weight bacteria). Bacterial cells for measurement were grown at 30°C for 24 hr in the medium, centrifuged, washed three times with physiological salt solution and suspended in distilled water.

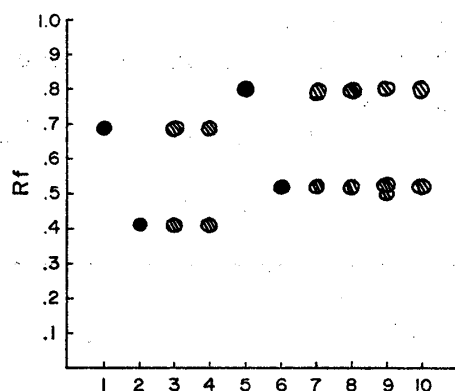


Fig. 1. Thin layer chromatogram of decarboxylation products of amino acids.

1. agmatine
2. control (M/50 arginine in M/10 phthalate buffer)
3. reaction mixture decarboxylated by *Aerobacter aerogenes* B.
4. reaction mixture decarboxylated by *Lactobacillus saké*.
5. putrescine
6. control (M/50 ornithine in M/10 phthalate buffer)
7. reaction mixture decarboxylated by *Pseudomonas* sp. A.
8. reaction mixture decarboxylated by *Pseudomonas* sp. E.
9. reaction mixture decarboxylated by *Lactobacillus saké*.
10. reaction mixture decarboxylated by *Aerobacter aerogenes* B.

adsorbent, Avisel SF; solvent, chloroform-methanol-ammonia (2 : 2 : 1); detection, ninhydrin reagent.

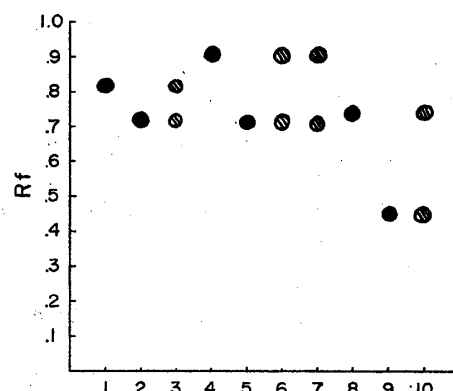


Fig. 2. Thin layer chromatogram of decarboxylation products of amino acid.

1. tyramine
2. control (M/50 tyrosine in M/10 phthalate buffer)
3. reaction mixture decarboxylated by *Leuconostoc mesenteroides* var. *saké*.
4. cadaverine
5. control (M/50 lysine in M/10 phthalate buffer)
6. reaction mixture decarboxylated by *Aerobacter aerogenes* C.
7. reaction mixture decarboxylated by *Pseudomonas* sp. Suehiro 2.
8. ethanolamine
9. control (M/50 serine in M/10 phthalate buffer)
10. reaction mixture decarboxylated by *Aerobacter aerogenes* B.

adsorbent, Avisel SF; solvent, chloroform-methanol-ammonia (2 : 2 : 1); detection, ninhydrin reagent.

Fig. 1, 2 に示す。

これらの結果から、炭酸ガス発生のみられた菌株ではあきらかな基質アミノ酸の減少、消滅がみられ、同時に、対応するアミンの生成が確認された。すなわち、*Aerobacter aerogenes* B および *Lactobacillus saké* は agmatine を *Pseudomonas* sp. A, E, *Aerobacter aerogenes* B および *Lactobacillus saké* は putrescine を、*Pseudomonas* sp. E, P-2, P-4, Suehiro 1, Suehiro 2 および *Aerobacter aerogenes* C は cadaverine を、*Leuconostoc mesenteroides* var. *saké* は tyramine を、*Aerobacter aerogenes* B および C は ethanolamine を生成することがわかった。

これらのことから、清酒酒母において生醗系酒母が速醗系酒母に比べて酒母育成初期よりアミン量が著しく多い¹⁾原因の一つとして、硝酸還元菌および乳酸菌によるアミンの生成ということが考えられる。また、著者はさきに速醗系酒母には tyramine が存在してい

ないが、生醗系酒母には著量の tyramine が存在していることを認めている²⁾が、このことは *Leuconostoc mesenteroides* がきわめて強い tyrosine 脱炭酸能を有することから乳酸菌によるアミノ酸脱炭酸作用に基づくものと推定される。

アミノ酸脱炭酸作用の特性

1. 至適 pH 異なった pH における各菌株のアミノ酸脱炭酸能を Q_{CO_2} であらわし、Fig. 3, 4 に示した。これらの図から明らかなように *Pseudomonas* sp. Suehiro 2 の lysine 脱炭酸酵素作用の至適 pH は 6.0 であるのに対し、*Aerobacter aerogenes* C の lysine 脱炭酸酵素作用の至適 pH は 4.5 であり、serine 脱炭酸酵素作用の至適 pH は、*Aerobacter aerogenes* B では 5.5 であり、*Aerobacter aerogenes* C では 6.0 であった。

これらの結果を intact cell で得られた文献値と比較すると、tyrosine 脱炭酸酵素作用では 5.0 (*Strep. faecalis*),¹³⁾ arginine 脱炭酸酵素作用では 4.0 (*E. coli*),¹⁰⁾

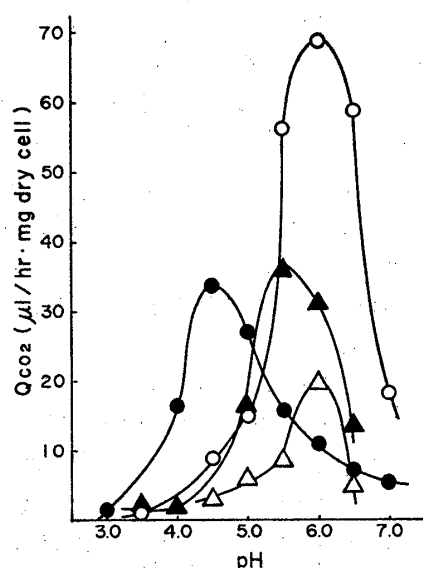


Fig. 3. Effect of pH on decarboxylase activity of cell suspension. (No. 1)

- lysine decarboxylase activity of *Aerobacter aerogenes* C.
- lysine decarboxylase activity of *Pseudomonas* sp. Suehiro 2.
- ▲— serine decarboxylase activity of *Aerobacter aerogenes* B.
- △— serine decarboxylase activity of *Aerobacter aerogenes* C.

Decarboxylation of amino acids was followed in a Warburg manometer. Experimental conditions were as shown in table 4, except that pH of the buffer was varied.

Bacterial cells for measurement were grown at 30°C for 24 hr in synthetic medium.

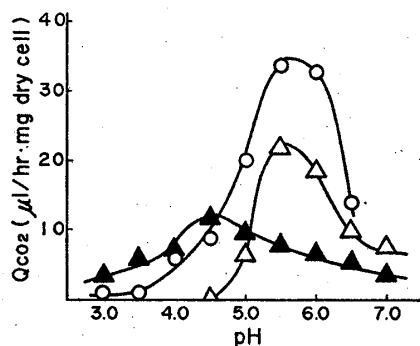


Fig. 4. Effect of pH on decarboxylase activity of cell suspension. (No. 2)

- tyrosine decarboxylase activity of *Leuconostoc mesenteroides* var. *saké*.
- ▲— arginine decarboxylase activity of *Aerobacter aerogenes* B.
- △— ornithine decarboxylase activity of *Aerobacter aerogenes* B.

Decarboxylation of amino acids was followed in a Warburg manometer. Experimental conditions were as shown in table 4, except that pH of the buffer was varied.

Bacterial cells for measurement were grown at 30°C for 24 hr in synthetic medium.

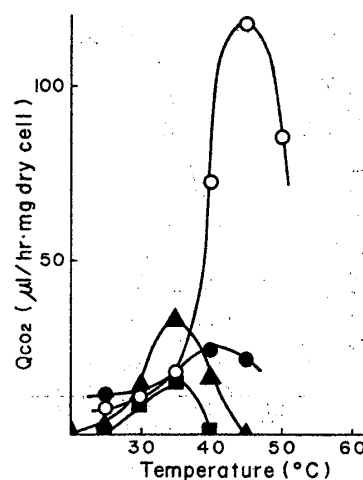


Fig. 5. Effect of temperature on decarboxylase activity of cell suspension. (No. 1)

- tyrosine decarboxylase activity of *Leuconostoc mesenteroides* var. *saké*.
- ornithine decarboxylase activity of *Aerobacter aerogenes* B.
- ▲— ornithine decarboxylase activity of *Pseudomonas* sp. A.
- ornithine decarboxylase activity of *Lactobacillus saké*.

Decarboxylation of amino acids was followed in a Warburg manometer. The experimental conditions were as shown in table 4, except that incubation temperature was varied.

Bacterial cells for measurement were grown at 30°C for 24 hr in synthetic medium.

lysine 脱炭酸酵素作用では 4.5 (*E. coli*),¹⁰⁾ ornithine 脱炭酸酵素作用では 5.0 (*E. coli*),¹⁰⁾ 5.5 (*Strep. faecalis*)¹⁴⁾ であり, 本実験で得られた結果とはほぼ一致し, 全般的に pH 4.0~5.5 の範囲にあるが, *Pseudomonas* sp. Suehiro 2 の lysine 脱炭酸酵素作用の至適 pH は 6.0 であり, やや高い値を示した。

2. 至適温度 異なった反応温度におけるアミノ酸脱炭酸能を Q_{CO_2} であらわし Fig. 5, 6 に示した。図から明らかなようにこれらのアミノ酸脱炭酸酵素作用の至適温度は 35°C~45°C の間に存在する。これを intact cell で測定された文献値と比較すると, glutamic acid 脱炭酸酵素作用では 32°C 付近 (*E. coli*),¹⁰⁾ arginine 脱炭酸酵素作用 (*E. coli*)¹⁰⁾ (*Bact. cadaveris*)¹³⁾ および histidine 脱炭酸酵素作用 (*E. coli*)¹⁰⁾ では 40°C 以上となっており, 本実験で得られた結果とはほぼ一致している。

要 約

清酒醸造に関与する硝酸還元菌, 乳酸菌について,

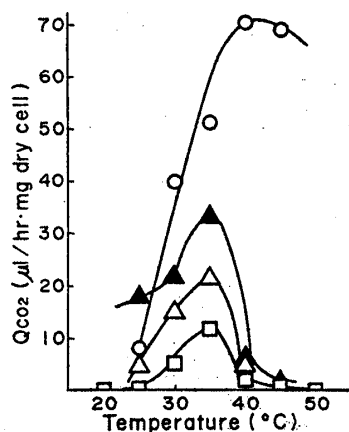


Fig. 6. Effect of temperature on decarboxylase activity of cell suspension. (No. 2)

- lysine decarboxylase activity of *Aerobacter aerogenes* C.
- ▲— serine decarboxylase activity of *Aerobacter aerogenes* B.
- △— serine decarboxylase activity of *Aerobacter aerogenes* C.
- arginine decarboxylase activity of *Lactobacillus saké*.

Decarboxylation of amino acids was followed in a Warburg manometer. The experimental conditions were as shown in Table 4, except that incubation temperature was varied.

Bacterial cells for measurement were grown at 30°C for 24 hr in synthetic medium.

それらのアミノ酸脱炭酸作用によるアミン生成の状況を調べた。

硝酸還元菌16株および乳酸菌6株を用いて、各種のアミノ酸に対する脱炭酸能をワールブルグ検圧計を用いて測定し、さらに、薄層クロマトグラフィーにより生成されたアミンを確認した。その結果、*Aerobacter aerogenes* および *Lactobacillus saké* が arginine 脱炭酸能を、*Pseudomonas* sp. の2菌株、*Aerobacter aerogenes* および *Lactobacillus saké* が ornithine 脱炭酸能を、*Pseudomonas* sp. の5菌株および *Aerobacter aerogenes* が lysine 脱炭酸能を、*Leuconostoc mesenteroides* var. *saké* が tyrosine 脱炭酸能を、*Aerobacter aerogenes* が serine 脱炭酸

能を有することを示し、それぞれ、基質アミノ酸に対応するアミンを生成することを認めた。

すなわち、硝酸還元菌および乳酸菌により agmatine, putrescine, cadaverine, tyramine, ethanolamine が生成されることが認められた。このことから、生醗系酒母の育成初期におけるアミン生成に硝酸還元菌および乳酸菌が関与していることが考えられる。殊に生醗系酒母中の tyramine の生成は主として乳酸菌によるものと推定される。

また、これらの硝酸還元菌および乳酸菌の脱炭酸酵素作用の至適 pH, 至適温度は、菌株、基質、培地の違いによって多少の差異が見られるが、至適 pH は 4.5～6.0 の間にあり、至適温度は 35°C～45°C の間であった。

終わりにのぞみ菌株を分与していただいた国税庁醸造試験所百瀬洋夫氏、福島県立会津短期大学芦沢長氏、愛知県食品工業試験所山下勝氏、新泉酒造株式会社小西康夫氏、東京農大北原覚雄教授に感謝いたします。

本研究は昭和49年度日本醸酵学会大会で発表した。

文 献

- 1) 梅津：醸工，**39**，233 (1961).
- 2) 梅津：醸工，**39**，241 (1961).
- 3) 梅津：醸工，**39**，247 (1961).
- 4) 梅津，析尾：醸工，**40**，354 (1962).
- 5) 梅津：醸工，**48**，103 (1970).
- 6) 梅津：鳥取大学工学部研究報告，**1**，34 (1970).
- 7) 佐竹：腐研報，**5**，73 (1952).
- 8) 佐竹，安藤，藤田：腐研報，**5**，76 (1952).
- 9) 宮本，安藤：腐研報，**8**，64 (1955).
- 10) Gale, E. F.: *Biochem. J.*, **34**, 392 (1940).
- 11) Brooker, D. C., Lund M. E., Blazevic, D. J.: *Appl. Microbiol.*, **26**, 62 (1973).
- 12) 小西，析倉，緒方：醸工，**45**，795 (1967).
- 13) Epps, H. M. R.: *Biochem. J.*, **38**, 242 (1944).
- 14) Gale, E. F.: *Biochem. J.*, **34**, 853 (1940).

(昭51.11.16受付)