

〔醸酵工学 第63巻 第2号 161-173. 1985〕

---

総合論文

---

## 清酒醸造における脂質の動向と香気エステル生成への影響

吉沢 淑・石川 雄章

国税庁醸造試験所

Changes of lipids during *saké* brewing and their contribution to ester formation by yeast.—Monograph— KIKYOSHI YOSHIKAWA and TAKEAKI ISHIKAWA (*National Research Institute of Brewing, 2-6-30 Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114, Japan*) *Hakko-kogaku* 63: 161-173. 1985.

Rice is the principal raw material of *saké*, and its quality largely affects *saké* manufacturing; peripheral layers of brown rice grain contain large amounts of lipids which are considered to be undesirable for *saké* quality, but the details are not clearly elucidated.

In *saké* brewing, rice is polished before use, one of the main purposes of the process is to remove the undesirable lipids. Although content of ether extractable lipid (I), mainly triglyceride (TG), decreases most rapidly with decrease of polishing ratio, content of fat by hydrolysis (II), main component of polished rice lipids, remains nearly constant, 0.6%. Palmitic (C16:0), oleic (C18:1) and linoleic acid (C18:2) are the main fatty acids components of I, and the ratio of the total amounts of saturated fatty acids (SFA) to those of unsaturated ones (S/U) shows a tendency to increase with decrease of the polishing ratio; the tendency is especially remarkable in TG fraction. In II, C16:0 is predominant and a little change is observed on the composition of fatty acids with the polishing ratio.

During steaming process, TG of I decreases to 30-50% of the original amount. The free fatty acids (FFA) produced by hydrolysis of glycerides evaporate successively with steam during the process, particularly a large amounts of unsaturated fatty acids (UFA) are removed, and consequently the value of S/U increases. It is also proved that stimulative hydrolysis of glycerides by steeping of rice in lipase solution causes removal of more greater amounts of UFA. Rice-*koji* for *saké* brewing contains 0.31 to 0.56% of I and 0.53 to 0.67% of II. TG, FFA and monoglycerides (MG) are the main components of I, and fatty acids of these lipids are rich in UFA such as C18:2 and C18:1. The ratio of UFA in I changes with the rice-*koji* making conditions such as aeration and temperature progress. Aeration has the greater effect. Rice-*koji* preparation under limited aeration causes a marked decrease in the production of C18:2 with a corresponding increase of C18:1.

As the fermentation of *saké* mash proceed, steamed rice and rice-*koji* are digested and solid fraction in mash decreased, and about 58% of II in raw materials becomes extractable with ether. Because of low solubility of lipid in water, a large proportion of lipids remains in the decreasing solid fraction. A small amount of lipid is liberated in liquid fraction (liberated lipid: III), which increases according to the increase of alcohol concentration in mash and reaches about 500 ppm of the liquid fraction at the final stage of fermentation. Main components of III and I of the solid fraction are FFA, TG and ethyl esters of fatty acids (EtOR).

II of solid fraction is mostly consisted of FFA.

Since EtOR is not found in raw materials, it seems to be formed by yeast during

fermentation. Each fraction of FFA, TG and EtOR is shown to have characteristically different fatty acid composition, respectively. The value of  $S/U$  increases during fermentation. Since it is shown that the yeast cultured under the alcoholic fermentation condition synthesizes a large quantity of stearic acid ( $C_{18:0}$ ), most of this acid found in III is considered to be formed by yeast during the fermentation.

The formation of esters such as ethyl acetate (EtOAc) and isoamyl acetate (*i*AmOAc) found in a medium are highly dependent on the fatty acid composition; SFA and their derivatives added to the medium promote the formation of the esters by various yeast strains, while UFA and their derivatives strongly suppress their formation. These effects of fatty acid on the formation of esters have been proved by many pilot plants and full scale *saké* brewings. These esters largely contribute the excellent flavor of *saké* and a *saké* rich in these esters is usually preferred as a good *saké* in many sensory contests.

The fatty acid added to the medium is intactly incorporated into yeast cellular lipids such as TG and phosphatidylcholine (PC), even though some of them does not originally exist in *saké* yeast Kyokai no. 7 cells. It is, therefore, considered that fatty acid composition of the yeast cellular lipids remarkably differs with the kind of fatty acid added to the medium, but presumably within the physiological tolerance of the cells. As well known, PC is one of the major components of biomembrane lipids.

Physical and chemical properties of diacyl groups or fatty acid composition of the lipids play a crucial role in the function of biomembrane. The synthesis of acetic-esters in yeast cell occurs *via* alcoholysis of acetyl-CoA catalyzed with Acetyl-CoA: alcohol acetyltransferase (AATFase).

The maximum activity of AATFase appears at the late stage of exponential growth phase. The enzyme preparation having high specific activity is predominantly associated with a microsomal fraction, and the activity is maximum at pH 6.6 and 30°C. Of alcohol tested, the enzyme exhibits the highest activity to  $C_6$  alcohol, and 16% and 30% of the activity to isoamyl alcohol are found in ethanol and isobutanol respectively. Treatment of microsomes with ether, phospholipase  $A_2$ , or lipase causes decrease in AATFase activity. The deactivated preparations are partially restored their acetic-ester synthesizing activity by addition of lecithin or  $C_{16:0}$ , while  $C_{18:2}$  is not effective or strongly inhibits the activity.

From the facts described above, it may be presumed that the formation of esters by *saké* yeast is affected by the inhibition of AATFase bound to cell membranes with UFA and the changes of permeability of the esters through cell membranes which depends largely on the kind of fatty acyl chains or fatty acid composition of membrane lipids.

## 1. はじめに

清酒、とりわけ吟醸酒の特徴は、きめこまかい、なめらかな味とフルーティで軽快な芳香にあり、特に上立ち香 (top notes) は官能評価に大きな影響を与えている。このような淡麗で香りの高い清酒を醸造するためには、従来から原料として高度精白米、つまり精米歩合\* の低い白米を使う。この理由の一つとして、米粒外層部に多い脂質をとう精によって可能な限り除去するためであると説明されており、清酒醸造において脂質、特に原料米の脂質は醸造上の不良成分と考えら

れてきた。ところで、次に述べるように、とう精を進めても白米粒中には、なおかつ多量の脂質が残存し、永い経験に基づく米の脂質忌避の真意は量のみならず質にもあるものと推察される。脂質は、従来から多くの研究者の関心を引き、酒造米の脂質についての研究<sup>1,2)</sup> は多いにもかかわらず、直接酒質と結びつけた報告は見あたらない。一方、脂質は生体必須成分の一つであり、芳香生成と麹菌や酵母とのかかわり合いに興味もたれる。

本論文では、われわれによってこれまでに明らかにされた清酒醸造工程における白米脂質の動向と、酵母の生理機能に及ぼす脂質の影響、特に香気エステル生成への影響について述べ、さらに、実験によって得ら

\* 精米歩合(%) =  $\frac{\text{精米後の白米重量(kg)}}{\text{精米前の玄米重量(kg)}} \times 100$

れた知見を実際の酒造りに応用した例などもふまえ、清酒醸造における脂質の意義について考察する。

## 2. 原料米の脂質

**脂質の米粒内分布と存在部位** 脂質は米粒外層部は多く含まれており、玄米最外層の果、種皮や外胚乳部に約14% (胚芽部は24.3%)、糊粉層4~6%, 内胚乳部には1~0.1%含まれ、米粒中心に向かって少なくなる。外層部では triglyceride (TG) などの中性脂質が多く、内胚乳部では phospholipid (Phl) など複合脂質の相対比が高くなるものの、TLC で検討した限りでは米粒内外層部で脂質の種類に大差はみられない。<sup>3)</sup>

玄米粒の断面構造を Fig. 1 に示すが、玄米粒を sudan IV で染色して細胞組織学的に調べた結果、<sup>4)</sup> 種果皮部から内胚乳細胞層の第3~4層までが赤色に染色され、特に外胚乳や糊粉層では脂肪球としても多く存在していると推察される所見を得た。内胚乳細胞層の第3~4層より中心部に近い内層部では、胚乳細胞壁に沿って染色されることから、脂質は細胞壁に密着している原形質膜に存在しているものと考えられる。これらの脂質の多くは diethylether やそれに ethanol を加えた溶剤で容易に抽出される<sup>4)</sup> いわゆる粗脂肪であり、本論文では、これをエーテル可溶脂質 (ether extractable lipid) あるいは単に、可溶脂質と呼ぶことにする。この外に、米粒には通常の溶剤抽出も細胞組織学的検出も、native な状態ではほぼ不可能な脂質が約0.6%含まれている。これは主として、amylose の

$\alpha$ -helix 構造にとりこまれている fatty acid (FA) であり、amylose を加水分解するか 85% 熱 methanol で抽出される、いわゆる結合脂質 (fat by hydrolysis) である。結合脂質は Fig. 2 に示すように、その含量は玄米から米粒中心部 (精米歩合50%白米) までほぼ一定である。

TG や Phl といった数多い種類の脂質中からあるものに着目し、酵母に対する影響を調べることは有効な方法であり、Hayashida ら<sup>5)</sup> は清酒もろみで高濃度アルコールを生成する理由が麹菌のつくる proteolipid であることを明らかにしているが、われわれは酒造工程が米粒を酵素消化させていく工程でもあることに着目し、先述した抽出性の差異と、脂質の物理的、生化学的性質を特徴づけているもう一つの要素、構成脂肪酸の面から脂質をとらえることにした。

**精米歩合による脂肪酸組成の変化<sup>6)</sup>** エーテル可溶脂質と結合脂質の構成脂肪酸はリノール酸 (C18:2)、パルミチン酸 (C16:0) およびオレイン酸 (C18:1) が主体である。エーテル可溶脂質の脂肪酸組成の精米歩合による変化を Fig. 3 に示すが、精米歩合の低下とともに C18:1 が減少し、C16:0 の比率が増大する。したがって、構成脂肪酸組成における飽和脂肪酸 (SFA) と不飽和脂肪酸 (UFA) の比率 (飽和度,  $S/U$ ) は精米歩合の低い白米ほど高くなる。この特徴は結合脂質でもみられるが、結合脂質では C16:0 の組成比が43.7~46.5%, C18:1 は12.4~13.1%, C18:2 は36.0~38.4%と可溶脂質に比べ  $S/U$  は高い。いずれにせよ、精米は脂肪酸、

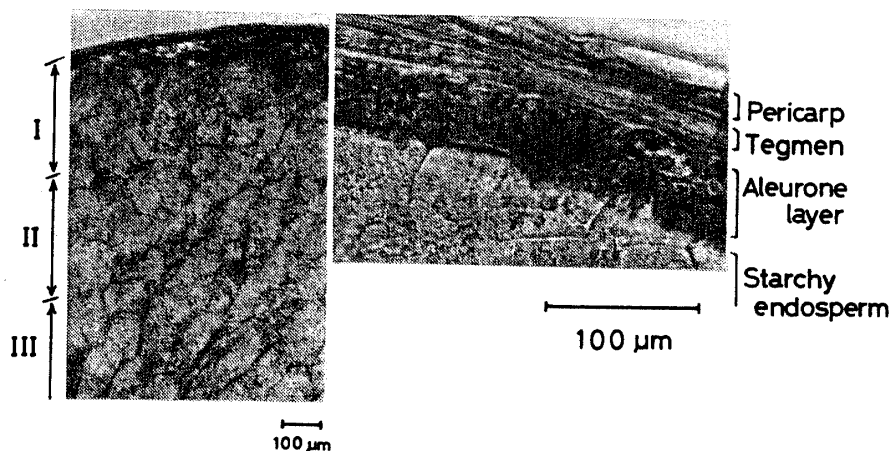


Fig. 1. Cross-sectional view of rice grain.

The layer removed by polishing—The layer I is removed at 75% polishing ratio; I and II are at 60~50%.

Polishing ratio (%) is defined as the weight percent of polished rice obtained from a lot of brown rice.

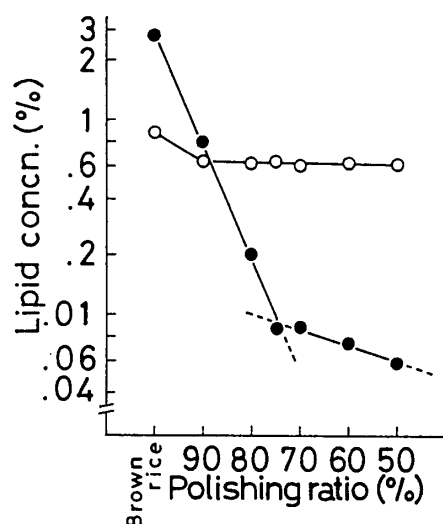


Fig. 2. Changes of lipid concn. of rice by polishing. ●, ether extractable lipid; ○, fat by hydrolysis.

特に UFA を効果的に減少させる工程である。

### 3. 洗米, 浸漬および蒸きょうによる脂質の変化<sup>7)</sup>

洗米, 浸漬工程において白米の脂質はデンプンを主体とする懸濁物質とともに米粒表面から除去されるが, その量は可溶脂質の約5.5%, 結合脂質の0.4%に過ぎず, 脂肪酸組成にも大きな変化はみられない。一方, 40~50分間の蒸きょう工程においては結合脂質の十数%, 可溶脂質の30~50%が減少する。蒸きょうは米粒の水蒸気蒸留と見なすこともでき, 蒸きょう中にエステル型脂質の一部が加水分解され, 生成した脂肪酸と

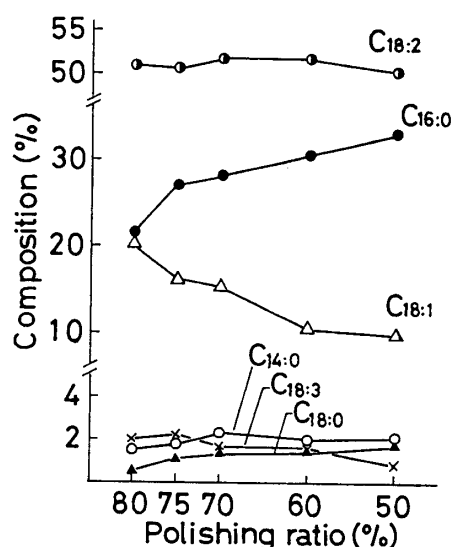


Fig. 3. Changes of fatty acid composition in ether extractable lipid of polished rice.

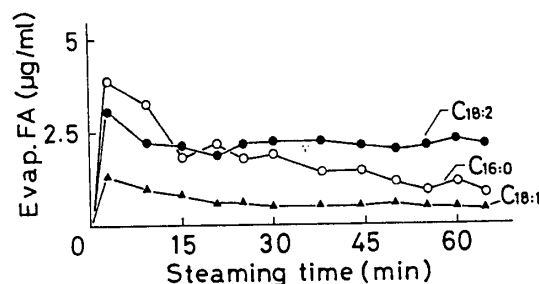


Fig. 4. Evaporation of fatty acid by steaming of rice.

従来から存在していた遊離脂肪酸 (FFA) が白米層を上に進み, 水蒸気とともに揮発する。脂肪酸の揮発は, Fig. 4 に示すように蒸気吹きぬけ後数分間が最大で, 以後漸減するが C18:2 はほぼ一定の比率で蒸きょう中揮発し続ける。<sup>8)</sup> 減少する UFA のうちの6~12%は分解によるものであるが, いずれにしても, SFA に比べて UFA の減少率が大きく, 結果として S/U は白米の0.4が0.6~0.7に上昇する。

以上のように, 精米から蒸きょうに至る一連の原料処理工程は脂肪酸, 特に UFA の除去工程とみなすことができる。

### 4. 米麴の脂質と製麴条件による変化<sup>9)</sup>

**米麴の脂質** 蒸し米を麴にすることによって, エーテル可溶脂質は8~10倍に増加し, 一方, 結合脂質は10~20%減少する。結合脂質の減少は, 次の米粒の消化崩壊と脂質の動向でも述べるが, 米麴中に約20%の還元糖の蓄積がみられること, エーテル可溶脂質が増加すること, この可溶脂質量と麴菌菌体量とは高い相関関係を示すことから, 麴菌の増殖によって生産されるアミラーゼにより, 米粒デンプンの一部が加水分解され, amylose にとりこまれていた脂肪酸が解放され, 可溶脂質になるためと考えられる。

米麴脂質の脂肪酸組成は蒸し米とは異なり, 麴菌によるとりこみや新たな生成もあって, 結果として Table 1 に示すように UFA が多く, エーテル可溶脂質の S/U は0.36~0.52, 結合脂質では0.88になる。また, 米麴を UFA の組成比から C18:1 が比較的少なく, C18:2 やリノレン酸 (C18:3) といった polyene 酸の多い type I と C18:1 含有比の高い type II とに分類することができる。これは原料白米の品種や種麴よりも, 次に述べるように製麴時の品温経過と酸素濃度, 特に後者の影響が大きい。

Table 1. Fatty acid composition of rice-*koji* for *saké* brewing.

Type of rice- <i>koji</i> *	Sample no.	Fatty acid composition (%)							
		C14:0**	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	S/U***
I	1	1.3	27.1	1.2	17.7	51.0	1.6	0.2	0.42
	2	1.5	27.7	0.5	16.5	52.1	1.5	0.2	0.43
	3	1.4	28.8	0.9	14.5	52.7	1.4	0.2	0.46
	4	1.7	28.1	0.6	17.4	50.9	1.1	0.2	0.44
	5	1.5	29.6	0.4	18.3	49.4	0.7	0.1	0.46
II	6	1.2	22.6	2.4	26.8	45.7	1.2	0.1	0.36
	7	1.8	29.7	2.7	35.2	28.9	1.7	0.1	0.52
	8	0.9	25.1	0.3	30.5	42.2	0.9	0.1	0.36

\* Type I: Rice-*koji* with less than 20% oleic acid in total fatty acids. Type II: Rice-*koji* with more than 20% oleic acid in total fatty acids.

\*\* C14:0: myristic, C16:0: palmitic, C18:0: stearic, C18:1: oleic, C18:2: linoleic, C18:3: linolenic, and C20:0: arachidic acid.

\*\*\* S/U=(amount of saturated fatty acids)/(amount of unsaturated fatty acids).

Table 2. Properties of rice-*koji* prepared under various controlled temperature.

Max. temp. (°C)	Mycelial wt. (mg/g)	$\alpha$ -Amylase $D_{30}^{40^\circ}$	Acid protease [PU] <sub>cas. FR</sub> <sub>7. tyr.</sub>	Lipid concn. (%)	Fatty acid (%)				S/U
					C16:0	C18:1	C18:2	C18:3	
25	17.4	90	0.74	0.21	20.2	18.3	52.8	4.4	0.32
30	19.7	122	0.68	0.25	21.5	13.1	59.5	2.0	0.34
35	18.1	139	0.46	0.24	26.0	13.4	57.8	+	0.40
40	17.7	141	0.46	0.26	30.1	20.9	45.9	±	0.49

#### 製麹条件と脂肪酸組成の変動

1) 品温経過 製麹中の最高温度を 25~40°C とし、製麹した米麹の諸性質と主な脂肪酸組成を Table 2 に示すが、最高温度を高くしたもののほど C16:0 の比率が高く、一方 C18:3 は大きく減少し、結果として S/U は最高温度の高いもののほど高い値になる。

2) 酸素濃度 製麹中の酸素濃度を 15~21%, 製

麹30時間まで18%以上 (Aerobic) と種切り後6時間まで制限なし、以後の酸素濃度を 5%以下 (semi aerobic) に制御して得た米麹の諸性質と主な脂肪酸組成を Table 3 に示すが、C18:1 は semi aerobic な条件下で 26~29.7%と aerobic な条件下のものに比べて組成的にかなり高くなる。一方、C18:2 および C18:3 の polyene 酸は aerobic な条件下で高くなる。麹菌の UFA 生成条

Table 3. Properties of rice-*koji* prepared under aerated and aeration-limited conditions.

Aeration condition*	Mycelial wt. (mg/g)	$\alpha$ -Amylase $D_{30}^{40^{\circ}}$	Acid protease [PU] <sub>r.tyr.</sub> <sup>cas. FR</sup>	Lipid concn. (%)	Fatty acid (%)				<i>S/U</i>	
					C16:0	C18:1	C18:2	C18:3		
a {	1	8.0	47	0.42	0.10	31.3	26.0	39.9	0.4	0.51
	2	18.2	85	0.66	0.16	28.3	29.7	39.1	0.4	0.44
b {	1	11.9	71	0.52	0.15	30.7	15.2	51.1	0.8	0.49
	2	19.2	122	0.67	0.21	31.1	16.4	49.4	1.1	0.49

\* a: Aeration limited condition; after the first 6 h of aerated cultivation, the oxygen concn. in the cultivation vessel was controlled below 5% by mixing nitrogen gas with air.

b: Aeration condition; culture was aerated with about 200 ml/min of humidified air throughout the rice-*koji* making.

件は液体培養によっても同様の傾向を示すことが確かめられ、さらに麹菌の生成する UFA は高等植物と同じ *cis*  $\Delta^9$ -C18:1, *cis*  $\Delta^{9,12}$ -C18:2 および *cis*  $\Delta^{9,12,15}$ -C18:3 であることが確かめられた。<sup>10)</sup>

##### 5. 米粒の酵素消化による崩壊と脂質の動向<sup>11)</sup>

米粒(蒸し米粒)が酵素消化される様子を走査電顕で観察すると、デンプン単粒が分解、崩壊されていくに従って、デンプン単粒さらにはその集合体である複粒を包んでいる胚乳細胞が収縮し、最後に胚乳細胞壁が残存するという過程が認められる<sup>12,13)</sup>。この間の蒸し米脂質の動向を調べると、Fig. 5 に示すように、結合脂質は製麹の場合と同様、デンプン粒の分解に伴ってその担体を失い、抽出されやすい状態、いわゆる可溶脂質として未消化部分や胚乳細胞壁に移行する。糖化液中への移行は、環境が水溶系であるため少なく、タンパク質やペプチドなどに吸着して移行すると思われ、その量は 0.1 g/100 ml 程度である。

結合脂質の中で、可溶脂質への移行率の高いのは C18:2 であり、C16:0 は  $\alpha$ -helix 構造にとりこまれやすいこと<sup>14)</sup>と、デンプン分子の中で脂肪酸の結合した部位はアミラーゼの分解を受け難い<sup>15)</sup>こともあって結合脂質に占める C16:0 の比率は60~70%になる。

蒸し米粒の未消化部分に存在する可溶脂質を遊離脂質 (liberated lipid) として糖化液中へ遊離、溶解させるのはアルコールの作用であり、糖化液中のアルコール濃度に対して遊離脂質は指数関数的に増加する。

ところで、実際の清酒もろみにおける白米の分解率は粕歩合や原エキス量から計算できるが、粕歩合は吟醸仕込みでおおよそ50%、通常の仕込みでは20~35%の範囲にあり、粕の水分を60%として計算すると、白米分解率は前者の仕込みで76.9%、後者では86.1~90.8%になる。これは、もろみ中の原料白米の分解率によって消化残さ、つまりもろみ固形物中の可溶脂質と結合脂質の量比、ひいては脂肪酸組成が異なることを示しており、蒸し米がよく消化されて発酵が旺盛になり、アルコール含量が高くなれば、もろみ液中の遊離脂質や UFA もさらに増加することになる。このような動向を示す原料白米と、酵母との興味あるかわり合いについては、以下の項で述べていくことにする。

##### 6. 清酒もろみにおける脂質の動向<sup>16)</sup>

清酒もろみには、通常、 $3.5\sim4.5\times10^8$ /ml の酵母が存在し、これら酵母による脂質のとりこみや新たに

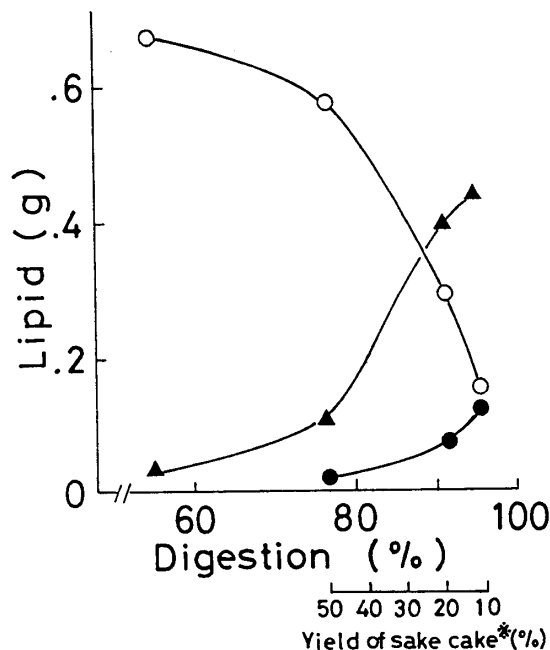


Fig. 5. Changes of lipids during enzymatic digestion of steamed rice.  
○, fat by hydrolysis; ▲, ether ext. lipid; ●, liberated lipid.

\* The solid, obtained by filtration of *saké* mash.

合成される量を考慮する必要があるが、仕込み時に蒸し米と米麹から持ち込まれた脂質量と、発酵終了時(24日目)における各脂質の量的収支は、Table 4 に示すとおりであり、もろみ固形部のエーテル可溶脂質は仕込み総米 100 g あたりに換算して 121 mg から 396 mg に増加し、一方、結合脂質は 637 mg から 268 mg に減少する。液部に移行した、いわゆる遊離脂質は発酵によるアルコールの生成に伴って増加し、最終的に仕込み総米 100 g、すなわち、もろみ 230 ml 当たり 115 mg、濃度にして 500 ppm になる。このように、もろみ液部および固形部における各脂質の量的変化は、5の項で述べた蒸し米粒の消化崩壊による脂質の動向と同様のパターンを示すが、一方、次に述べるように、酵母が関与することによる質的变化がみられる。

仕込み時に持ち込まれる脂質の約80%が蒸し米の結合脂質に由来し、その主体が FFA であるのに、蒸し米がほぼ消化崩壊された22日目のもろみでも TG や高級脂肪酸エチルエステル (EtOR) などのエステル型脂質が53~55%を占める。特に、原料米や米麹には検出されない EtOR は、もろみの日時経過とともに増加し、アルコール発酵に伴って酵母によりエステル化されるものである。

脂肪酸の組成変化についてみると、もろみの日時経過とともに各脂質の *S/U* が増加する。すなわち UFA

Table 4. Amount of lipids in the raw materials and the liquid and solid fractions at the last stage (24th day) of the mash.

Fraction lipid*	Solid		Liquid III (mg)	Total (mg)
	I (mg)	II (mg)		
Raw materials { Steamed rice	52	511	—	563
Rice- <i>koji</i> **	69	126	—	195
Total	121	637	—	758
Mash on the 24th day	396	268	115	779

\* Lipid I: ether ext. lipid II: fat-by-hydrolysis, III: liberated lipid.

\*\* The ratio of rice-*koji* to total raw rice was 23%.

Amount of raw rice was converted to 100 g total, then total volume of mash was 230 ml. Solid fraction in the last stage (the 24th day) of the mash was 9.9 g and the ratio of liquid fraction to total mash volume was 71.7%.

の絶対量が減少し、C16:0 とステアリン酸 (C18:0) が増加する。Andreasen と Stier<sup>17)</sup> は嫌氣的条件下で *S. cerevisiae* が増殖するためには、C18:1 や C18:2 を必須的に要求すると報告しており、もろみにおいて酵母がこれらを選択的にとりこむためと推察されるが、後にも述べるように発酵終了時の酵母菌体には C18:1 およ

び C18:2 が少なく、清酒もろみのような長期発酵における菌体内 UFA の代謝運命には未だ不明な点が残されている。一方、C18:0 の増加は酵母による生成と考えられる。C18:0 は蒸し米や米麴では脂肪酸組成の約 1% と少ないが、清酒酵母 協会 7 号 (K-7) を脂質を含まない液体培地で 30°C、7 日間、発酵型生

Table 5. Fatty acid composition of *saké* yeast (*S. cerevisiae*, Kyokai 7) cell.

Lipid*	Fatty acid					
	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
I	1.2	27.9	21.2	49.7	—	—
II	0.6	28.8	18.3	52.3	—	—

\* Lipid I: ether extractable lipid, II: chloroform-methanol (2:1) mixture extracted lipid after removal of I.

Yeast cell: Grown under the alcoholic fermentation condition on lipid free synthetic liquid medium at 30°C, for 7 days. C8:0, C10:0, C12:0 and C16:1 acids were also detected.

Table 6. The composition (%) and amount (mg)\* of the fatty acid in the lipids of solid fraction (the 22nd day).

Lipid		Fatty acid												S/U	Total mg
		14:0		16:0		18:0		18:1		18:2		18:3			
		%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg		
Ether ext- ractable lipids	TG	2.9	3.8	25.6	33.3	3.6	4.7	11.5	14.9	55.7	72.4	0.7	0.9	0.47	130.0
	EtOR	3.1	2.6	42.5	35.3	4.7	3.6	11.0	9.1	38.7	32.1	—	tr**	1.01	83.0
	FFA	3.0	5.0	74.2	124.7	4.2	7.1	4.5	7.6	14.1	23.7	—	tr	4.38	168.1
Fat-by- hydrolysis	FFA	3.5	8.3	45.6	108.1	6.6	15.6	15.3	36.3	29.1	68.9	—	tr	1.25	237.2
	Total		19.7		301.4		31.3		67.9		197.1		0.9		618.3

\* Amount of fatty acid in solid fraction of mash made of 100 g rice. \*\* tr: trace.

Table 7. The composition (%) and amount (mg)\* of fatty acid of the liberated lipid (the 24th day).

Lipid	Fatty acid												Total mg	S/U
	14:0		16:0		18:0		18:1		18:2		18:3			
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg		
TG	1.7	0.6	25.9	9.9	6.7	2.6	25.8	9.8	37.5	14.3	2.5	1.0	38.2	0.52
EtOR	2.7	0.5	50.5	9.3	32.6	6.0	4.9	0.9	9.2	1.7	0.1	0.02	18.42	6.04
FFA	1.0	0.6	75.6	45.2	22.6	13.5	0.9	0.5	—	0.0	—	0.0	59.8	112.64
Total		1.7		64.4		22.1		11.2		16.0		1.02	116.7	

\* Amount of fatty acid in liquid fraction of mash made of 100 g rice. C8:0, C10:0, C12:0 and C16:1 acids were also detected.

育を行ったときの菌体脂肪酸組成は Table 5 に示すように C18:0 が約20%と高く、白米脂質に多い C18:2 は全く検出されない。もろみにおける TG, EtOR および FFA の脂肪酸組成は Table 6 と 7 に示すように、それぞれ特異的である。

また、遊離脂質の EtOR および FFA における C18:0 の比率は固形部の脂質に比較してはるかに高い。もろみで酵母により新たに合成される EtOR の脂肪酸がもろみにおける脂肪酸全体の存在比を反映しないことは、酵母による高級脂肪酸のエチルエステル化反応が脂肪酸種により選択性を有しているものと推察される。

#### 7. 酵母による培地の脂肪酸のとりこみと利用

前項で酵母による脂肪酸の選択的とりこみに触れたが、清酒もろみのように半嫌氣的発酵型生育条件下では UFA をより多くとりこむ。ヘプタデカン酸 (C17:0) と C18:2 は、K-7 の菌体から全く検出されない FA であるが、Table 8 に示すように K-7 は培地から C17:0 や C18:2 をとりこみ、TG や酵母の主要 phl であるホスファチジルコリン (PC) の diacyl 基を構成する脂肪酸として利用し、<sup>18)</sup> その量は C17:0 が菌体乾物 1 g 当たり約 6 mg, C18:2 は分散剤として albumin を用いた場合 8.3 mg, Triton X-100 では 15.8 mg になり

FA の菌体への全とりこみ量の40~45%が PC にとりこまれることになる。<sup>14</sup>C でラベルした C16:0, C18:1 を用いる同様の実験も行ったが、結果は Table 9 に示すように C17:0 および C18:2 の場合と同様であり、菌体内の <sup>14</sup>C 分布から、exogenous FA の酵母菌体内でのβ酸化などによる他物質への代謝は 25 °C, 20時間の培養に限り全くみられない。また、<sup>14</sup>C-FA の比放射能変化がほとんど無いことから、PC にとりこまれる FA として、exogenous FA の利用率はほぼ100%であり、菌体にとりこんだ FA の *de novo* 合成は完全に抑制されていると考えられる。Meyer と Schweizer<sup>19)</sup> は、酵母が exogenous FA によって CH<sub>2</sub> 鎖の elongation を、また UFA の場合、その desaturation を抑制することによって *de novo* 合成を制御し、exogenous FA を菌体脂質に利用することを報告している。また、Kamiryo と Numa<sup>20)</sup> は、CH<sub>2</sub> 鎖の elongation は acyl-CoA による acetyl-CoA carboxylase への negative feed back によるとしている。K-7 の場合も、これらの報告と同様、exogenous C18:2 による C14:1, C16:1 および C18:1 の *de novo* 合成が著しく阻害され、同時に中鎖酸である C12:0 の *de novo* 合成もかなり抑制されることが注目される。

以上のように、exogenous FA によって、酵母菌体脂質の脂肪酸組成、特に生体膜の主要脂質である PC

Table 8. Fatty acid composition of phosphatidylcholine.

FA added	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	S/U
C17:0	2.1	9.8	28.1	14.6	22.4	7.7	13.4	0	2.50
C18:2	11.3	7.5	27.8	8.3	0	8.9	6.8	29.4	1.25

A little amount of C12:2, C17:1, C20:0 was also detected.



Table 9. Distribution of radioactivity (I) and cellular fatty acid composition (II) of K-7 grown on a medium to which palmitic acid- $^{14}\text{C}$  or oleic acid- $^{14}\text{C}$  was added.

FA added		C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	S/U
C16:0	I	0.8		94.5	0.1	—	4.6	—	—	
	II	17.8	7.2	35.6	23.4	0	10.2	5.9	0	2.42
C18:1	I	0.6		0.1	0.3	—	0	99.1	—	
	II	11.0	8.5	22.7	7.1	0	4.1	46.1	0	0.86

Distribution and composition are shown in %. The amounts of cellular fatty acids were 18.4 mg (C16:0) and 22.8 mg (C18:1) per gram of dry yeast cells, respectively.

の diacyl 基の組成が、菌体にとって決定的な damage を受けない範囲で変化することによって、酵母菌体の生理機能も変化するものと思われる。

#### 8. 酵母の香気エステル生成に及ぼす脂肪酸の影響

培地に添加した脂肪酸の影響<sup>21)</sup> Glucose と cas-amino 酸をそれぞれ C, N 源とする最少培地に Triton X-100 または脱脂 albumin を分散剤として種々の脂肪酸を添加, K-7 によって発酵させると、菌体量( $1.8 \sim 2.0 \times 10^8$ /ml) やエタノール (EtOH), イソアミルアルコール (*i*AmOH) の生成には大差がないにもかかわらず、酢酸エチル (EtOAc) や酢酸イソアミル (*i*AmOAc) の生成は Fig 6 に示すように C16:0 添加培地では

促進され、一方 C18:1 培地では著しく抑制される。この影響は FA, 0.1 mM でも現れ, Fig. 7 に示すように、0.5 mM まで添加濃度に従って生成量は少なくなる。また、エチルカプロン酸 (EtOCap) の生成にも同様の影響を与えるが、C18:0 0.5 mM 添加培地に、さらに C18:1 を加えた場合は、C18:1 単独添加培地とほぼ同じ値となり、C18:1 の抑制効果は C18:0 の促進効果より勝っている。SFA による促進効果と UFA による抑制効果は FFA のみならず TG, モノグリセライド (MG) および Tween (ソルビタンモノエステル) でも見られる。また、種々の醸造酵母についても、Table 10 に示すように、程度の差はあれ、一般に見られる現象であり、Äyräpää と Lindström<sup>22)</sup> の報告とも一致する。

UFA による香気エステル生成に及ぼす抑制効果は、培地に脂肪酸が存在することにより発現するのではな

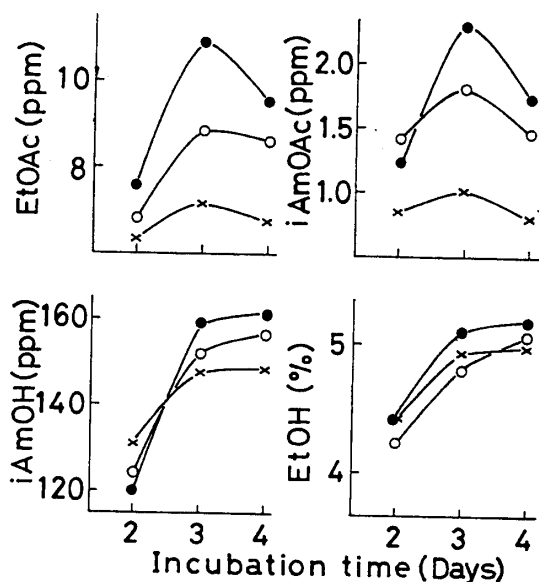


Fig. 6. Changes of the amounts of the formed esters and alcohols in the fatty acid added medium during fermentation.

○, basal medium containing 0.12% albumin; ●, 0.5 mM C18:0; ×, 0.5 mM C18:1. K-7 (inoculum size  $1.2 \times 10^8$ /ml) was incubated at 25°C.

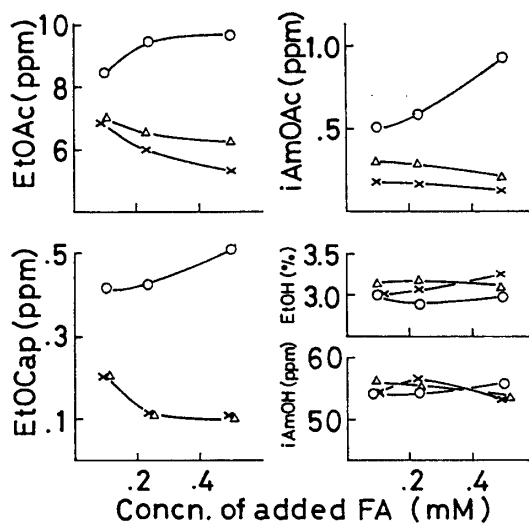


Fig. 7. Effect of the added fatty acid concentration on formation of esters and alcohols.

○, C18:0; ×, C18:1; △, C18:0 0.5 mM and C18:1. K-7 was incubated at 15°C for 4 days. NPP (1 mM) as an emulsifier and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as a nitrogen source were used.

Table 10. Ester formation by various yeasts in the fatty acids added medium.

Yeast	Fatty acid 0.5 mM	Cell 10 <sup>8</sup> /ml	EtOH %	<i>i</i> -AmOH ppm	EtOAc ppm	<i>i</i> -AmOAc ppm
<i>Saké</i> yeast Kyokai 7	blank	1.4	4.0	141	9.8	1.7
	C18:0	1.1	4.5	145	11.6	2.1
	C18:1	1.1	3.9	125	6.4	0.8
Kyokai 6	blank	1.1	4.2	139	10.2	1.9
	C18:0	1.0	4.5	139	10.4	1.9
	C18:1	1.6	4.3	144	6.6	1.0
Kyokai 9	blank	1.3	3.8	144	7.6	1.6
	C18:0	1.2	4.6	145	9.0	1.8
	C18:1	1.5	4.2	147	6.5	0.7
Brewery yeast	blank	1.2	4.3	84	7.2	0.9
	C18:0	0.8	4.4	103	7.6	0.9
	C18:1	0.8	4.2	84	5.3	0.4
Wine yeast OC 2	blank	1.3	4.1	154	7.0	1.5
	C18:0	1.6	4.3	141	8.6	1.8
	C18:1	1.2	3.8	129	4.8	0.8

Albumin (0.12%) added medium was used as a blank. Inoculum size ( $\times 10^6$ /ml): Kyokai 7 3.2, Kyokai 6 3.2, Kyokai 9 4.0, brewery yeast 0.8, OC 2 2.7. Incubation period and temperature were 3 days and 25°C.

く、培地の脂肪酸が菌体にとりこまれ、菌体脂質として利用されることにより発現する。培地の C18:2 濃度を変えることにより、菌体にとりこまれた C18:2 量の異なる菌体の *i*AmOAc 生成は、Fig. 8 に示すように菌体の C18:2 含量が高まるにつれて抑制される。<sup>18)</sup> ところで、酵母が脂肪酸を積極的にとりこむのは対数増殖期であり、清酒もろみでは仕込み後数日間である。したがってこの期間に培地に存在する脂肪酸が大きな影響を与えることになり、C16:0 存在下で十分増殖させた菌体を C18:2 培地に移して発酵させてもエステル生成はあまり抑制されない。

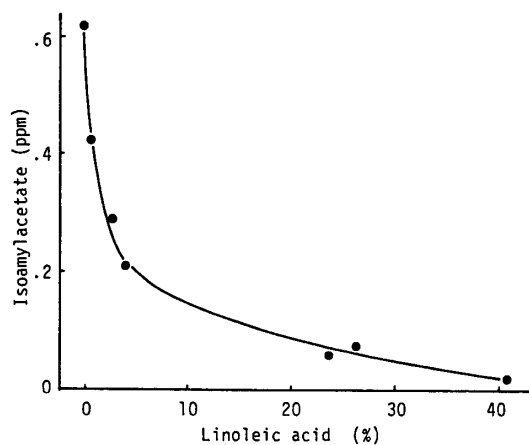


Fig. 8. Relation between percentage of C18:2 contained in K-7 cellular fatty acid and formation of isoamyl acetate.

K-7 was incubated at 25°C for 2 days.

脂肪酸の物理的性質との関係<sup>18)</sup> 酵母による香気エステル生成に対する SFA と UFA との効果の著しい差異が何故生ずるかに興味をもたれる。

UFA の抑制効果は *cis* 型のもので不飽和二重結合の数が多いものほど強く、その位置効果は  $\Delta^6$  や  $\Delta^{11}$  より  $\Delta^9$  のものが大きい。Vandenheuvel<sup>23)</sup> によると、FA の C 原子はすべて同一平面上にあり、 $-\text{CH}_2-$  は相互に *trans* 結合によりジグザグした直線構造となり、*cis*-UFA では *cis* C=C 部位で C 鎖が屈曲することになる。一方、*trans*-UFA は SFA と同様直線構造をとるためか、香気エステル生成における抑制効果は非常に小さい。分子形態の差異は脂肪酸の融点にも現れ、生体膜脂質の構成脂肪酸組成が生体膜脂質の相遷移温度を決定し、その違いが物質の透過性や酵素作用など生体膜の構造と機能発現に大きな影響を与えていることは既に多く指摘されているとおりである。<sup>24-26)</sup> *i*AmOAc 生成量は、菌体にとりこまれる脂肪酸の融点に対して Fig. 9 に示すように、 $-20 \sim 40^\circ\text{C}$  の範囲ではほぼ直線関係が認められる。

Suomalainen と Nurminen<sup>27)</sup> は、それぞれ好気培養および嫌気培養することにより膜の脂質組成を変えたビール酵母とパン酵母を用い、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$  脂肪酸および  $\alpha$ -keto acid とそのエチルエステルの膜透過性を検討し、膜脂質の UFA 比率が低い状態では、比率の高い状態に比べ、より極性の低い物質の透過性が高まる結果を得た。また、酵母菌体には培地より多量のエス

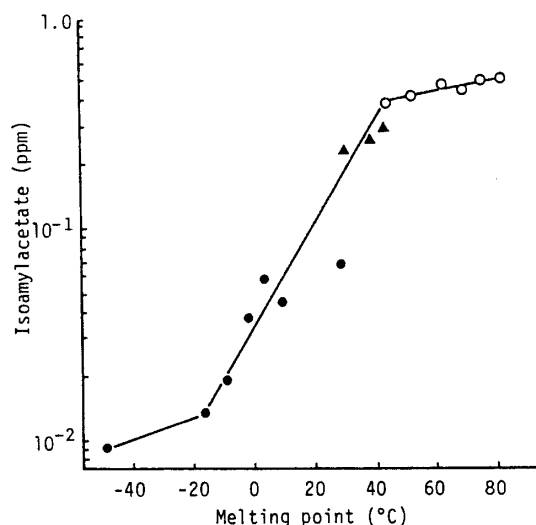


Fig. 9. Relation between isoamyl acetate formation and melting point of fatty acid incorporated in K-7 cells.

○, saturated fatty acids; ●, *cis*-unsaturated fatty acids, and ▲, *trans*-unsaturated fatty acids. K-7 was grown at 20°C for 2 days in a medium with 0.5 mM fatty acid added.

テルが存在する<sup>28)</sup> という結果は興味深い。

以上の結果を総合すると、香気エステル生成に及ぼす培地脂肪酸、特に UFA の抑制効果の機作の一つとして、UFA を多量にとりこんだ酵母細胞膜の香気エステルに対する透過性の変化が推察される。

### 9. Acetyl-CoA : Alcohol Acetyltransferase (AATFase) の性質と脂質<sup>29)</sup>

**酵素の性質** Acetyl-CoA の acetyl 基を種々の alcohol へ転移することによって香気エステルを生成する酵母の AATFase は K-7<sup>29)</sup>、ビール酵母<sup>30)</sup> について検討されており、Yoshioka と Hashimoto<sup>30)</sup> はビール酵母の細胞膜から AATFase を可溶化させ、部分精製した。

K-7 の AATFase は、0.25 M sucrose 中 105,000 ×g 40 分沈降画分 (microsome) に全活性の約 70% が見出される膜結合酵素であり、intact cell では exogenous acetyl-CoA や *i*AmOH を直接エステル化できないことから、endoplasmic reticulum などの細胞内膜構造体や peripheral cell membrane に活性部位を細胞質側に向けて存在すると推察される。AATFase の最適反応温度と pH はそれぞれ 30°C, 6.5~7.0, 種々の alcohol を acetic-ester 化するが C<sub>6</sub> の 1-hexanol に対して最も活性が高い。

酵母細胞あたりの AATFase 活性は Fig. 10 に示す

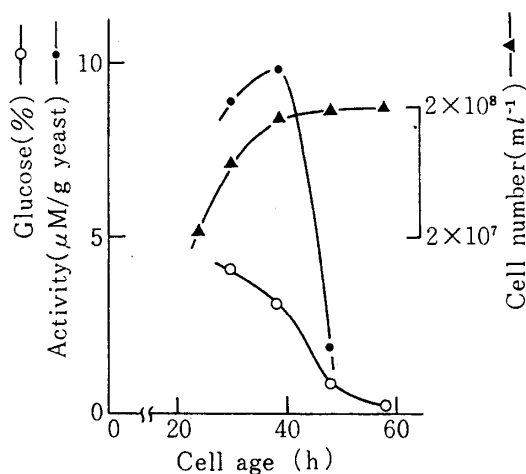


Fig. 10. Relationship between AATFase activity in microsomal fraction and the cell age.

○, residual glucose in medium; ▲, cell number; ●, AATFase activity, which was assayed under the standard conditions: 1 mg microsomal protein was incubated at 30°C and at pH 6.6 in 0.2 M citrate-phosphate buffer containing 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.11 mM (0.4 μCi) [acetyl-1-<sup>14</sup>C]-CoA and 1.84 mM isoamyl alcohol.

ように、対数増殖末期に最大となり、glucose が消費されて 1% 以下になり、発酵の鈍化や停止とともに活性は急激に低下するが、glucose 濃度が 1~2% 以上に維持される培養条件では活性が持続する。<sup>31)</sup> 布川と合瀬<sup>32)</sup> は、清酒もろみの糖化と発酵のバランスはもろみ中の glucoamylase 活性に依存し、一般に発酵が勝る傾向にあって、glucose 濃度は低く推移する場合も多いことを述べている。この状態は AATFase 活性の維持にとっては逆の条件である。もろみで長期間、酵母の AATFase 活性を高く維持するためには、もろみの glucose 濃度をある程度高く維持できるような glucoamylase 活性の強い麴が必要になる。これは吟醸仕込み用の製麴を考える上で大きな示唆を与えるものである。

**活性に及ぼす脂質の影響<sup>18)</sup>** K-7 の microsomal fraction には 432 μg/mg protein の脂質が含まれており、これを phospholipase A<sub>2</sub> または lipase 処理によって除去すると、活性は無処理 (対照) の 23~40% に低下する。それに egg yolk lecithin または C<sub>16:0</sub> を 0.4 mM 相当添加することにより、活性は対照の 50~75.8% にまで回復する。一方、C<sub>18:2</sub> には活性を回復させる効果は全くなく、0.45 mM の添加でさらに活性は 11~12% にまで低下する。

AATFase は、水溶性の比較的高い基質から疎水性

のエステルを合成するものであり、活性発現への脂質の関与は興味深い。特に、C18:2による強力な活性阻害は、UFA による香気エステル生成抑制現象と直接結び付けたいところであるが、強い阻害作用を現すものは膜脂質に多く存在するとは考え難い。FFA や MG および oleoyl-CoA であり、注目される dioleoyl phosphatidyl choline の阻害力は比較的弱い。<sup>30)</sup> AATFase の膜に結合した状態での脂質との相互作用については未だ不明な点も多く、さらに詳細に検討した後に結論づけたい。この点は前述したエステルの膜透過性に及ぼす脂質の影響についての推論も同様であり、この現象を唯一つの機作で説明づけること自体が無理であるかも知れず、将来の研究の発展に期待するところである。いずれにせよ、8 および 9 の項で述べた酵母の香気エステル生成に及ぼす FA の影響は明白な事実であり、これまでの知見を総合して、より香気の高い清酒醸造への応用を以下で述べることにする。

#### 10. もろみへ持ち込む脂肪酸量を変えた醸造試験

これまでに述べてきた知見によると、仕込み初期に酵母と UFA との接触をできる限り避けること、AAT Fase 活性維持の点からは、もろみの glucose 濃度を 1~2%以上に維持することによって、もろみにおける香気エステル生成量や香りの官能評価と相関の高い *iAm* OAc (ppm)/*iAm*OH (ppm), (E/A 比) を高くできる可能性がある。

以下にそのいくつかの例をあげ、この説をうらづけ

ることにする。

デンプンを担体とするもろみへの脂肪酸の添加<sup>33)</sup> 脱脂蒸し米 ( $\alpha$ -米) と、それに各脂肪酸を結合脂質として導入したデンプンを用いて仕込みを行った結果は、Table 11 に示すとおりであり、no. 1~7 の試料について比較すると、*iAm*OAc 生成量、E/A 比共に SFA 導入デンプンを用いたものが高く、UFA 導入のものでは低くなる。

米麴の脂肪酸の影響 製麴法によって脂肪酸組成を変えた米麴を用いた場合も、先の Table 11 に示す no. 8 と 9 とを比較すると、同様の結果になっている。

すなわち、米麴の type I, II は 4 の項で述べたとおり type I は UFA の組成中、エステル生成に対する抑制力のより強い polyene 酸の組成比が高いもの、type II は polyene 酸が I より少ない代わり C 8:1 比の高いものであり、かつ no. 8, 9 で用いた米麴の *S/U* はそれぞれ 0.44, 0.50 である。ただ、no. 9 で用いた type II の米麴でも C18:1 が脂肪酸組成中 27.7% を占め、UFA が比較的多量に含まれているにもかかわらず、*iAm*OAc 生成量が全酵素剤仕込みの no. 6, 7 などに比べてかなり高いことは、米麴を用いたものと全酵素剤仕込みとでアルコール含量やホルモル窒素量の違いなどにも現れているように、発酵状態がやや異なり、単純に両者どおしを比較することはできない。また、米麴中には *S/U* 以外にも、製成酒の E/A 比に影響を与える因子が存在することも考えられる。

原料米のリパーゼ浸漬による UFA 除去<sup>34)</sup> 先に、

Table 11. Components of *saké* brewed with raw materials varied fatty acid composition.

No.	Raw materials	Alcohol (%)	Acidity (meq/100 ml)	Formol-N (mg/10 ml)	<i>iAm</i> OH (ppm)	<i>iAm</i> OAc (ppm)	E/A $\times 10^2$
1	$\alpha$ -Rice*	17.7	3.0	2.5	204	3.76	1.84
2	1+Starch**	17.3	2.7	2.1	214	4.04	1.87
3	$\alpha$ -Rice**	16.6	2.9	2.1	223	4.84	2.20
4	2+C16:0	17.5	2.7	2.1	248	5.63	2.22
5	2+C18:0	17.3	2.7	2.0	270	5.89	2.18
6	2+C18:1	17.4	2.8	2.0	259	3.82	1.47
7	2+C18:2	17.4	2.6	2.1	272	3.15	1.37
8	2+Rice- <i>koji</i> (I)	20.6	2.7	2.9	197	3.17	1.61
9	2+Rice- <i>koji</i> (II)	20.3	2.6	3.4	218	5.19	2.38
10	Steamed rice (Control)	18.8	3.0	2.5	240	3.98	1.66

\*, Defatted with water saturated *n*-butanol; \*\*, with hot methanol.

*Saké*, no. 1-7 and 10 were brewed using saccharifying enzyme preparation instead of rice-*koji*. Rice-*koji* having fatty acid composition: (I), C18:1, 13%, C18:2, 56%; (II), C18:1, 27.7%, and C18:2, 39%.

一連の原料処理工程は UFA 除去工程でもあることを述べたが、さらにこれを促進する方法として、3の項で述べた FFA が蒸きょう中に揮発することに着目し、白米の浸漬時に、白米 1t 当たり  $1.5 \times 10^5$  unit の lipase を用い、12時間以上浸漬、グリセライドを分解後蒸きょうする方法を考案した。この方法により、C18:2 と C18:1 が無処理のものに対してそれぞれ40および60%に減少し、精米歩合にして3~5%の低下と同じ効果になる。このような蒸し米を用いて醸造した清酒は iAmOAc 含量、E/A 比共に対照酒より高くなり、香りの官能評価も高くなることが示された。なお、この方法は現在、全国数百場の酒造場で実用化されており、lipase の使用量は年間 500 kg に及んでいる。

## 11. おわりに

清酒の高級多様化志向の強い現在、吟醸酒の醸造は今後ますます増加するものと考えられる。本研究は、白米脂質の研究が緒となったが、米の不良成分としての脂質はその UFA にあることを明らかにし、さらに香気エステル生成と結びつけられ、香気エステルを合成する酵母の AATFase 研究にまで到達し得たのも、時代の要請である。しかし、これまで述べてきたとおり、未解決の問題も多い。幸い、その後多くの方々が AATFase を研究対象にしており、今後の研究の発展を期待したい。また、もろみ中には香気エステルの外に種々の高級脂肪酸エチルエステルが生成され、これらの中で ethyl palmitate のように香気エステルの保留作用を有するものもあり、<sup>35)</sup> さらに味、特になめらかさへの寄与も推察されるが、ろ過および製成工程で大部分が除去され、清酒にはほとんど残すことができない。高級脂肪酸誘導体の香気エステル保留効果や味については、将来に残された興味ある研究課題である。

本研究は、主として昭和46~54年にわたり、国税庁醸造試験所第六研究室において行われたものである。ご指導とご助言を賜った東京大学農学部糞田泰治教授、元醸造試験所長野白喜久雄博士、大塚謙一博士、そして多くの有益な実験結果を出して下さった研究室諸兄に深く感謝する。

## 文 献

- 森 太郎, 渡邊和夫: 醸工, 31, 213 (1953).
- 小幡孝之, 難波康之祐, 小武山温之: 日本醸酵工学会大会要旨集, p. 4 (1968).
- 野白喜久雄, 中村欽一, 石川雄章, 佐野英二, 有根元文雄, 藤本修志: 日本醸酵工学会大会要旨集, p. 18 (1971).
- 吉沢 淑, 蓮尾徹夫, 石川雄章: 醸協, 75, 432 (1980).
- Hayashida, S., Der Feng, D., Hongo, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 40, 73 (1976).
- 吉沢 淑, 石川雄章, 野白喜久雄: 農化, 47, 713 (1973).
- 石川雄章, 吉沢 淑: 農化, 48, 337 (1974).
- 吉沢 淑, 石川雄章, 家村芳次, 斎藤久一: 醸協, 74, 194 (1979).
- 石川雄章, 吉沢 淑: 醸酵工学, 56, 24 (1978).
- 石川雄章, 吉沢 淑: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 6 (1975).
- 石川雄章, 吉沢 淑: 農化, 48, 657 (1974).
- 吉沢 淑, 池見元宏, 石川雄章, 宝玉俊信, 池田哲郎: 醸酵工学, 56, 122 (1978).
- 吉沢 淑, 百瀬洋夫, 石川雄章, 有賀義裕: 醸協, 73, 729 (1978).
- 藤井徹也, 大場健吉: 醸工, 40, 595 (1962).
- 藤本滋生, 永浜伴紀, 蟹江松雄: 澱粉学会要旨集, p. 7 (1972).
- 石川雄章, 吉沢 淑: 農化, 50, 131 (1976).
- Andreasen, A. A., Stier, T. J. B.: *J. Cellular Comp. Physiol.*, 43, 271 (1954).
- Ishikawa, T., Yoshizawa, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 45 (1979).
- Meyer, K. H., Schweizer, E.: *Eur. J. Biochem.*, 65, 317 (1976).
- Kamiryo, T., Numa, S.: *FEBS letters*, 38, 29 (1973).
- 吉沢 淑: 農化, 50, 115 (1976).
- Äyräpää, T., Lindström, I.: *Proc. of the 14th Cong. of Eur. Brew. Conv.*, Salzburg, p. 271 (1973).
- Vandenhoevel, F. A.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, 40, 1299 (1962).
- 野沢義則: 生化学, 47, 52 (1975).
- 鬼頭 誠, 相原茂夫: 化学と生物, 10, 819 (1972).
- Bonting, S. L., de Pont, J. J. H. M.: *Membrane Transport*, p. 24, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam (1981).
- Suomalainen, H., Nurminen, T.: *J. Inst. Brew.*, 82, 218 (1976).
- Suomalainen, H., Nykäen, L.: *J. Inst. Brew.*, 72, 469 (1966).
- 石川雄章, 百瀬洋夫, 吉沢 淑: 醸協, 79, 62 (1984).
- Yoshioka, K., Hashimoto, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2183 (1981).
- Yoshioka, K., Hashimoto, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 48, 207, 333 (1984).
- 布川弥太郎, 合瀬健一: 醸協, 71, 982 (1976).
- 石川雄章, 吉沢 淑: 醸協, 73, 971 (1978).
- 吉沢 淑, 池見元宏, 石川雄章: 醸協, 71, 975 (1976).
- 吉沢 淑, 小柴美津枝, 大塚謙一: 醸協, 61, 824 (1966).

(昭60. 1. 22受付)