

〔醸酵工学会誌 第67巻 第3号 159-165. 1989〕

酢酸イソアミル蓄積能の高い清酒酵母の分離†

柳内 敏靖*・清川 良文・若井 芳則

黄桜酒造(株)

(昭和63年7月11日受付 平成元年2月28日受理)

Isolation of *sake*-yeast strains accumulating large amounts of isoamyl acetate.† TOSHIYASU YANAGIUCHI*, YOSHIFUMI KIYOKAWA, and YOSHINORI WAKAI (*Kizakura Sake Brewing Co., Ltd., 223, Shioya-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612*) *Hakkokogaku* **67**: 159-165. 1989.

Isoamyl acetate is one of the most important component of aroma and flavour of *sake*. To increase the content of isoamyl acetate in fresh *sake*, we have selected mutants having low activity of the esterase which hydrolyzes isoamyl acetate, by diazo staining of colonies. One of the mutants, K-9Ha-3, had weak color by the diazo staining due to low esterase activity; it had low isoamyl acetate hydrolysis activity and accumulated a high content of isoamyl acetate in the mash. Thus, accumulation of isoamyl acetate depends on the ratio of alcohol acetyl transferase activity/isoamyl acetate hydrolysis activity.

We constructed diploids by hybridization between K-9Ha-3 and haploid clones isolated from an authentic brewing yeast, strain *Kyokai* no. 10. The ability of fermentation of the diploids in *sake moromi* was superior to that of K-9Ha-3 and amino acid production by the diploids in *sake moromi* was lower than in the parental haploid yeasts. The mashes brewed by these diploids contain large amounts of isoamyl acetate.

清酒中に含まれるエステルは、清酒の香りを構成する重要な成分の一つであり、とりわけ酢酸イソアミルは、カプロン酸エチルとともに特に重視される香気成分である。^{1,2)} 酢酸イソアミルの生成には、酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼ（以下 AATFase と略す）が関与しており、これについては、石川ら、³⁾ Yoshioka と Hashimoto、⁴⁾ 栗山ら⁵⁾ の報告がある。一方生成された酢酸イソアミルはエステラーゼにより分解されると考えられ、Parkkinen と Suomalainen、⁶⁾ Schermers ら⁷⁾ がその報告の中で酢酸イソアミルの分解について他のエステルと比較して言及している。

清酒中の酢酸イソアミル含量を向上させることは、清酒の香気を高めるうえで重要であり、生成に関与す

る AATFase 活性の増大、維持を検討した報告のほか、^{3,5)} 秋田ら⁸⁾ はアミノ酸量が酢酸イソアミル生成に影響を及ぼすことを明らかにし、酢酸イソアミル生成を最大にするアミノ酸量を検討している。伊藤⁹⁾ は醸造工程中の揮散を少なくすることが、清酒中の酢酸イソアミル含量を高める上で重要としている。また Ashida ら¹⁰⁾ は、酢酸イソアミル生成の律速因子はイソアミルアルコールであり、イソアミルアルコールの生成に関与するロイシンのアナログ、5,5,5-トリフルオロロイシンに対する耐性酵母を分離し、酢酸イソアミル高生産株を取得している。

本報告では、清酒中の酢酸イソアミル含量を向上させることを目的として、生成された酢酸イソアミルの酵母エステラーゼによる分解に着目し、エステラーゼ活性の低い株を選択することを試みた。選択法として、寒天平板上のコロニーに、エステラーゼの活性染色法を適用し、得られたエステラーゼ活性の低い菌株につ

† 清酒酵母における酢酸イソアミル生成機構(第1報)
The mechanism of isoamyl acetate production by *sake*-yeast

* 連絡先, Corresponding author

いて、香気の蓄積に関連する酵素活性などについて検討するとともに、清酒醸造試験に供した。その結果、酵母無細胞抽出液中の酢酸イソアミル分解活性が低く、清酒醪中での酢酸イソアミル蓄積能が高い株が得られた。そして、酵母による酢酸イソアミルの蓄積には、AATFase による生成系とともに、エステラーゼによる分解系が関与していることが認められたので報告する。

実験方法

使用菌株および栄養要求性株の分離 親株には協会酵母7号, 9号, 10号, 11号, 12号, 13号, 701号, および901号を用いた。栄養要求性株は, 協会10号の単相株 ME-H-4¹¹⁾ を, 紫外線 (UV) 照射あるいは ethyl-methanesulfonate (EMS)¹²⁾ で変異処理し, nystatin 濃縮法により単離した。¹²⁾

醪からの酵母の分画 醪 500 ml を遠心分離(6,000 ×g 20分) し, 得られた沈澱部分を滅菌水に懸濁後, ガーゼで濾過した。濾液を遠心分離し, 上澄を捨て, 沈澱上層の乳白色のデンプン層を取り除いた。残った沈澱下層の黄白色の酵母部分を滅菌水に懸濁して, 同様に遠心分離し, デンプン層を再び除去した。この操作を2回繰り返して酵母画分を得た。

酵母無細胞抽出液の調製 洗浄酵母菌体 10 g を等量のアルミナと共に, 氷冷下, 0.5 mM ジチオスレイトールを含む 0.02M リン酸緩衝液 (KH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 7.0) 中で45分間乳鉢で磨砕した。得られたホモジネートを 11,000 ×g 30分の遠心分離により分画し, 上澄画分を酵母無細胞抽出液とした。

分析方法

1. エステラーゼ活性 Parkkinen ら¹³⁾ の方法を改変して用いた。反応組成は 0.05M リン酸緩衝液

(pH 7.0) 3 ml, 1 mM *p*-ニトロフェニル酢酸 (*p*-NPA) 0.5 ml, 酵母無細胞抽出液 0.5 ml とし, 30°C で30分反応後トリクロロ酢酸で反応を停止し, 330 nm の吸光度を測定した。活性は生成する *p*-ニトロフェノールの反応液中の濃度 (μM) で示した。

2. AATFase 活性 Yoshioka と Hashimoto⁴⁾ の方法に従った。acetyl-CoA 2.4 mM, isoamyl alcohol 135 mM を含む 150 mM リン酸緩衝液(pH 7.5) 0.5 ml に, 酵母無細胞抽出液 1 ml を加えて 25°C で1時間反応後, 1 g の塩化ナトリウムを加えて反応を停止し, 生成した酢酸イソアミルをヘッドスペースガスクロマトグラフィーにより定量した。活性は 25°C で1時間に生成する酢酸イソアミルの反応液中の濃度 (ppm) で示した。

3. 酢酸イソアミル分解活性 酢酸イソアミル 300 ppm, MgCl₂ 21 mM を含む 150 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.5 ml に, 酵母無細胞抽出液 1 ml を加えて 25°C で1時間反応後, 100°C 5分間加熱して反応を停止し, 生成した酢酸を酵素法により定量した。¹⁴⁾ 活性は 25°C で1時間に分解する酢酸イソアミルの反応液中の濃度 (ppm) で示した。

4. タンパク質含量 Lowry ら¹⁵⁾ の方法に従った。

5. 酵母菌体の脂肪酸組成の分析 塩酸-メタノール法により分析した¹⁶⁾。すなわち, 凍結乾燥酵母菌体 20 mg に5%無水塩酸-メタノール 0.5 ml を加え, 100°C で5時間加熱した後, 生成したメチルエステルをヘキサンにより抽出し, ガスクロマトグラフ (DEGS 10%, 3.1 m ガラスカラム, 温度 190°C) により定量した。

小仕込み試験 仕込み配合を Table 1 に示した。大量仕込みにおいては, この配合割合に準じた。仕

Table 1. Feeding ratio of the mash for sake brewing.

		Addition			Total
		1st	2nd	3rd	
Total rice*	(g)	30	56	84	170
Steamed rice	(g)	22	47	67	136
<i>Koji</i> (as rice)	(g)	8	9	17	34
Water	(ml)	45	66	98	209
Mash temperature (°C)		12	9	7	

* The rice grains used were polished to reduce their weight to 70%.

込みには精米歩合70%の白米を使用し、酵母仕込みで3段に分けて仕込みを行い、醗品温は最高 13°C で維持した。

実験結果

寒天平板上でのエステラーゼ活性の検出 エステラーゼの活性染色法（ジアゾ染色法）を寒天平板上のコロニーに適用する方法を、協会7号酵母（K-7）を用いて検討した。寒天平板上のコロニーに、染色剤（ α -ナフチル酢酸（ α -NA）、ファーストブルーB塩）を含む軟寒天を重層して染色する方法と、下層培地へ染色剤を直接添加し、生育させながら染色する2通りの方法を検討したが、生育させながら染色する方法では、染色剤により菌の生育が阻害され、菌株の選択には適さないことが明らかとなった。重層法では、上層寒天のpHを低くすることで発色がゆるやかとなり、酵母の有するエステラーゼ活性の識別が可能であった。これよりジアゾ染色法を次のように設定した。すなわち、TTC 下層培地¹⁷⁾に 30°C、2日間でコロニーを形成させた後、0.025% α -NA、0.25%ファーストブルーB塩、0.05 M 酢酸緩衝液（pH 4.0）から成る軟寒天を重層し、約20分後に目視による判定を行った。

この方法により酵母コロニーを染色した場合の、発色の強さと、各酵母株のエステラーゼ活性を Table 2 に示した。一般にエステラーゼ活性の強い *Hansenula* 属が他より強い発色を示した。また協会酵母間でも差がみられ、本法により酵母のエステラーゼ活性が判定できることが認められた。

エステラーゼ活性の低い単相株の分離 香気生成に優れる協会9号酵母（K-9）より、エステラーゼ活性の低い株を取得することを目的として、まず random spore-plating 法¹⁸⁾に従って単相株を取得した。K-9の孢子形成率は約10%であった。さらに得られた単相株について、寒天平板上のコロニーにジアゾ染色法を適用した。その結果得られた単相株25株に、明らかな色調の違いが観察された。

小仕込み試験 得られた単相株を用いて、総米170gの仕込み試験を行い、得られた上槽酒の香気成分をヘッドスペースガスクロマトグラフィー法で分析した。その結果を Table 3 に示したが、ジアゾ染色時の色調が薄い K-9、および K-9 より得られた単相株である K-9Ha-3、K-9Ha-8、K-9Ha-10、K-9Ha-15 を用いると、酢酸イソアミル濃度のやや高い上槽酒が得られ、特に K-9Ha-3 では高く、K-9 の場合の2.5倍となった。またこの株を用いると酢酸イソブチル濃度も高かった。

酢酸イソアミル蓄積に関する酵素活性の酵母間の比較 酢酸イソアミル蓄積に関与すると考えられる酵素活性、および小仕込み試験上槽酒の酢酸イソアミル含量について、K-9Ha-3 と協会酵母7株、K-7 の変異株1株との比較を行った結果を Table 4 に示した。なお、酵素活性の測定には麴汁培地で、20°C、3日間静置培養した菌体の無細胞抽出液を用いた。K-9Ha-3 は、AATase 活性はさほど高くないが、エステラーゼ活性、酢酸イソアミル分解活性が他の株に比べて低くなっており、その酢酸イソアミル含量は、小仕込み

Table 2. Diazo staining of colonies and esterase activity of various yeast strains.

Strain	Esterase*	
	<i>p</i> -NPA hydrolysis (μ M/mg protein)	Colony color**
K-7	4.6	+++
K-9	4.0	+
K-10	1.9	±
K-11	7.9	+++
K-12	5.8	+++
K-13	4.8	+
<i>Saccharomyces uvarum</i>	5.3	++++
<i>Hansenula anomala</i>	20.2	++++

* Esterase activity was measured using cell extracts.

** Color intensities are as follows: +++++ (Intense dark red)
>++++>+++>++>+>± (Weak red)

Table 3. Diazo staining of colonies and flavor components in fresh *sake* brewed using isolated haploid yeast strains.

Strain	Colony color	iBuOH* (ppm)	iBuOAc* (ppm)	iAmOH* (ppm)	iAmOAc* (ppm)	EtOCapr* (ppm)
K-9	+	190	0.41	216	5.60	0.97
K-9Ha- 2	++	145	0.07	113	1.82	0.81
K-9Ha- 3	±	268	1.69	282	14.82	0.62
K-9Ha- 4	++	85	0.05	106	0.62	0.32
K-9Ha- 8	±	207	0.15	279	4.18	0.91
K-9Ha-10	+	177	0.19	288	3.81	0.83
K-9Ha-13	++	174	0.17	256	4.75	0.61
K-9Ha-15	±	175	0.07	243	4.73	1.37
K-9Ha-20	++	119	0.05	95	0.55	0.38
K-9Ha-21	++	150	0.07	102	0.65	0.46

K-9Ha-2~21 were haploid strains isolated from K-9.

Symbols for colony color are the same as in Table 2.

* Abbreviations: iBuOH, isobutyl alcohol; iBuOAc, isobutyl acetate; iAmOH, isoamyl alcohol; iAmOAc, isoamyl acetate; and EtOCapr, ethyl caproate.

Table 4. Enzyme activities of various yeast strains and isoamyl acetate content in the fresh *sake*.

Strain	Esterase		AATFase (ppm/mg protein)	AATFase/iAmOAc hydrolysis	iAmOAc (ppm)
	<i>p</i> -NPA hydrolysis (μ M/mg protein)	iAmOAc hydrolysis (ppm/mg protein)			
K-7	4.6	0.644	1.357	2.107	3.16
K-9	4.0	0.622	2.363	3.799	3.41
K-10	1.9	0.496	2.315	4.667	3.03
K-11	7.9	0.752	4.162	5.533	1.96
K-12	5.8	0.882	3.857	4.373	3.96
K-13	4.8	0.616	2.946	4.782	3.55
K-701	4.9	0.774	5.458	7.052	5.62
K-901	5.0	0.969	4.883	5.039	5.06
Mu7-3Bu	3.0	0.633	3.897	6.156	7.44
K-9Ha-3	2.2	0.362	3.226	8.912	11.75

Mu7-3Bu is a mutant of K-7. Enzyme activities were measured using cell extracts.

Table 5. Correlation analysis for various factors in isoamyl acetate accumulation.

(n=10)					
	<i>p</i> -NPA hydrolysis	iAmOAc hydrolysis	AATFase	T/H	iAmOAc
<i>p</i> -NPA hydrolysis		0.696	0.373	-0.256	-0.555
iAmOAc hydrolysis	*		0.582	-0.311	-0.436
AATFase				0.565	0.218
T/H					0.799
iAmOAc				**	

** , significant at 1% level; * , significant at 5% level.

上槽酒でも高い値となった。また Table 4 の各測定項目間で相関分析を行った結果を Table 5 に示したが、上槽酒中の酢酸イソアミル含量と AATFase 活性には有意な相関は認められず、AATFase 活性/酢酸イソアミル分解活性 (Transferase/Hydrolyase; 以下 T/H と略す) との間に強い正の相関が認められ、酢酸イソアミルの醪中濃度には AATFase によるその生成系とともに、エステラーゼによる分解系が関与していることが判る。また *p*-NPA を基質としたエステラーゼ活性と酢酸イソアミル分解活性の間にも有意な正の相関が認められた。

醪における酵母の香気蓄積関連酵素活性の変化

K-7, K-9 および酢酸イソアミル高蓄積株の K-9Ha-3 を用いて、総米 2.5 kg の小仕込み試験を行い、経時的に醪から酵母を分離した後、酵母の有する AATFase 活性、酢酸イソアミル分解活性を追跡した結果を Fig. 1 に示した。K-9Ha-3 は K-7, K-9 より AATFase 活性が高く、酢酸イソアミル分解活性は低いレベルで推移した。Fig. 2 には、この醪の T/H 値と酢酸イソアミル含量の経時変化を示した。K-7, K-9 では、T/H 値が 0.3~0.4 で推移し、酢酸イソアミル含量も 2~4 ppm とほぼ一定であった。これに対して、K-9Ha-3 では T/H 値は醪経過とともに減少する傾向にあるが、K-7, K-9 より終始 2~4 倍の高い値で推移した。また酢酸イソアミル含量は醪前半の T/H 値の高い時期に急激に増加し、その後 T/H 値の低下とともにその増加は鈍くなったが、最終的には K-7, K-9 の約 3 倍高い値となった。このように醪の経時的な酵

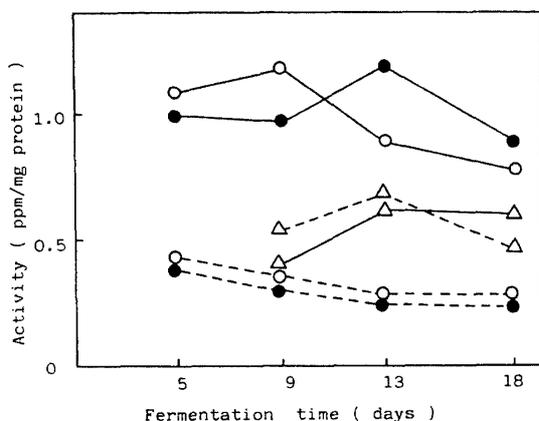


Fig. 1. Changes in AATFase and isoamyl acetate hydrolysis activities of yeast cells in sake brewing. (---), AATFase; (—), Isoamyl acetate hydrolysis activity; (O), K-7; (●), K-9; (Δ), K-9Ha-3.

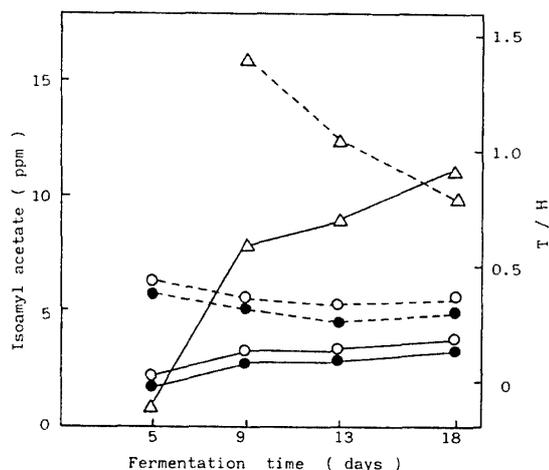


Fig. 2. Changes in isoamyl acetate content in sake moromi and activity ratio of AATFase/hydrolysis activity (T/H) of yeast cells.

(—), Isoamyl acetate; (---), T/H; (O), K-7; (●), K-9; (Δ), K-9Ha-3.

素活性等を測定し、検討することで、T/H 値が酢酸イソアミル含量に影響を及ぼすことがより明白になった。

醪中の酵母の脂肪酸組成 酵母細胞膜に存在する不飽和脂肪酸は、AATFase 活性を抑制するとともに、生成したエステル膜透過も抑制し、菌体外にエステルが放出されにくいことが報告されている¹⁹⁾。そこで酢酸イソアミル高蓄積株 K-9Ha-3 の菌体脂肪酸組成を K-7, K-9 と比較した。測定値は示さないが、いずれの酵母も醪経過とともに飽和度は増加する傾向にあったが、酵母間に脂肪酸組成の極端な違いは認められず、K-9Ha-3 の酢酸イソアミル高蓄積性が脂肪酸組成に依存しているのではないことが推察された。

交雑株による小仕込み試験 醸造用酵母は二倍体あるいは高次倍数体が多く、また単相株より二倍体のほうが増殖能や発酵能に優れ、アルコール耐性も強いと予想される。このため、開放発酵を主とする清酒醸造において、野生酵母の汚染を受けにくいことや、アルコール濃度の高くなった醪末期での、酵母の死滅によるアミノ酸の増加²⁰⁾が少ないなどの利点が考えられる。そこで、酢酸イソアミル高蓄積株 K-9Ha-3 を用いて、交雑により酢酸イソアミルの蓄積能が高く、増殖能、発酵能のより優れた二倍体株の取得を試みた。K-9Ha-3 (α 接合型) はリジン、メチオニンの栄養要求性があり、これと協会10号の単相株 ME-H-4 (a 接合型)¹¹⁾ の、アルギニンあるいはロイシンの栄養要求性変異株を集団交雑法で交雑させた。得られた交雑株

Table 6. General components and content of isoamyl acetate in fresh sake brewed using parental haploid strains and their diploid hybrids.

Strain	Sake meter	Acidity (ml)	Formol N (ml)	iAmOAc (ppm)
K-9	+14.5	2.6	1.8	8.91
K-9Ha-3	+4.5	2.5	2.3	19.8
ME-H-4 UV*	+12.5	2.1	2.1	10.46
ME-H-4 E1**	+13.0	2.3	2.1	9.3
ME-H-4 E2**	+13.0	2.1	1.9	8.07
K-9Ha-3×ME-H-4 UV				
KZ-03-1	+4.0	2.6	2.05	15.79
KZ-03-2	+5.0	2.65	2.1	13.8
K-9Ha-3×ME-H-4 E1				
KZ-03-3	+10.5	2.55	1.95	14.44
KZ-03-4	+8.0	2.6	2.0	14.28
KZ-03-5	+8.0	2.6	2.05	13.69
KZ-03-6	0.0	2.6	2.2	24.51
K-9Ha-3×ME-H-4 E2				
KZ-03-7	+9.5	2.5	2.0	22.32

* ME-H-4 UV is a mutant induced by UV irradiation.

** ME-H-4 E1 and ME-H-4 E2 are mutants induced by ethyl methane sulfonate.

は親株の栄養要求性を相補し、胞子の形成も良好であった。

つぎに、交雑株7株と親株である単相株を用いて小仕込み試験を行い、その醸造特性を検討した。Table 6に、その上槽酒の一般成分および酢酸イソアミル含量を示した。K-9Ha-3は単相株であるため発酵経過が遅れる傾向がみられた。このため日本酒度もK-9に比べ低い値となっており、アミノ酸度も高かった。これに対し、もう一方の親株であるME-H-4のグループは、単相株であるにもかかわらずK-9と同程度の発酵能を示した。これら単相株に対し交雑株では両親株の中間型の発酵能を有するものが多く、アミノ酸度は両親株より少ない株も得られた。酢酸イソアミル含量は両親株の中間型が多かったが、親株を越えるものも見いだされた。特にKZ-03-7は発酵能も比較的強く、アミノ酸生成もK-9Ha-3より少なく、酢酸イソアミル蓄積能は非常に高い性質をもっていた。このように両親株の長所を併せ持つ実用化可能な株を選択することができた。

考 察

酵母のエステラーゼ活性については、*p*-ニトロフェ

ニル酢酸、 α -ナフチル酢酸を基質として研究が進められ、Wheeler と Rose²¹⁾ は細胞質に局在するとしている。Parkkinen と Suomalainen は酵母のエステラーゼ活性が外部のpHに影響されず、²²⁾ 基質として用いた α -ナフチル酢酸は細胞膜を透過するため、細胞を破碎することなく、細胞質中のエステラーゼ活性の測定が可能であることを報告している。²³⁾ このことから、今回寒天平板上のコロニーにおけるジアゾ染色法を検討し、設定したジアゾ染色法によって、Table 2に示したように、細胞質中のエステラーゼ活性を色調の差として判定することができた。一方エステラーゼによる醸造物中の香気成分の分解についても、種々検討が加えられ、酵母菌株による違いや、脂肪酸エチルエステルと酢酸エステルに対する基質特異性の違いが報告されている。^{7,23)} また栗山ら²⁴⁾ は、カプロン酸エチルがエステラーゼにより分解されるとともに、合成も行われていることを報告している。

酢酸イソアミルに関して、今回の染色法でエステラーゼ活性の低い、酢酸イソアミル高蓄積性の株を取得できた。得られた菌株と協会酵母を用いた、香気蓄積関連酵素活性を比較した結果 (Table 4, 5) や、醪における酵母の酵素活性を検討した結果 (Fig. 1, 2) から、

醪中の酢酸イソアミル含量は AATFase 活性/酢酸イソアミル分解活性 (T/H 値) と強く関連することが明らかとなった。AATFase は、主に酵母細胞膜および細胞内膜構造体に結合した状態で存在することが報告されており、³⁾ 酢酸イソアミル分解活性は、細胞質内に存在することが認められている。²⁵⁾ AATFase により菌体内で生成された酢酸イソアミルは、細胞質内の酢酸イソアミル分解酵素により分解を受けていると考えられ、これら酵素の局在性も、酢酸イソアミルの蓄積に影響を及ぼしていると推察される。またエステラーゼ活性と酢酸イソアミル分解活性には有意な正の相関が認められており (Table 5)、清酒酵母による酢酸イソアミルの蓄積には、AATFase による合成系だけでなく、エステラーゼによる分解系も深く関与しており、両酵素活性の量比 (T/H 値) は、清酒酵母の酢酸イソアミル蓄積能の指標として重要な意味を持つと考えられた。

要 約

1. 清酒中に含まれる重要な香り成分の一つである酢酸イソアミルは、エステラーゼにより分解が行われていると考えられる。清酒酵母より酢酸イソアミル高蓄積株の取得を目的とし、協会7号酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を使って寒天平板上でのエステラーゼ活性の識別方法を検討し、ジアゾ染色法を設定した。
2. 設定したジアゾ染色法を、協会9号酵母より得られた単相株の選択に適用し、色調の薄い株の中から酢酸イソアミル高蓄積性株 K-9Ha-3 を得た。
3. K-9Ha-3 の香り蓄積に関わる酵素活性を検討したところ、エステラーゼ活性、酢酸イソアミル分解活性が低く、アルコールアセチルトランスフェラーゼ活性/酢酸イソアミル分解活性値が、酢酸イソアミル蓄積能に強く関連することが示唆された。
4. 醪においても K-9Ha-3 は酢酸イソアミル分解活性が低く、かつアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性が高く推移し、アルコールアセチルトランスフェラーゼ活性/酢酸イソアミル分解活性値が香り蓄積に大きな影響を与えていた。
5. K-9Ha-3 の菌体脂肪酸組成は協会7号、あるいは9号酵母と大差なく、脂肪酸による影響は考えにくかった。
6. 二倍体化による実用酵母の取得を試み、発酵能が優れ、アミノ酸度の低く、香り蓄積能の高い株を得ることができた。

文 献

- 1) 吉沢 淑：醸協, 61, 481-485 (1966).
- 2) 菰田 快, 山田正一：農化, 40, 173-175 (1966).
- 3) 石川雄章, 百瀬洋夫, 吉沢 淑：醸協, 79, 62-66 (1984).
- 4) Yoshioka, K., Hashimoto, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2183-2190 (1981).
- 5) 栗山一秀, 芦田晋三, 斎藤義幸, 杉並孝二, 今安聡：醸酵工学, 64, 169-173 (1986).
- 6) Parkkinen, E., Suomalainen, H.: *J. Inst. Brew.*, 88, 98-101 (1982).
- 7) Schermers, F. H., Duffus, J. H., Macleod, A.M.: *J. Inst. Brew.*, 82, 170-174 (1976).
- 8) 秋田 修, 蓮尾徹夫, 大場俊輝, 宮野信之：醸酵工学, 65, 19-26 (1987).
- 9) 伊藤 清：醸協, 82, 144-148 (1987).
- 10) Ashida, S., Ichikawa, E., Suginami, K., Imayasu, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2061-2065 (1987).
- 11) 原 昌道, 嶋崎孝行, 北野一好, 飯村 稔：醸協, 78, 390-393 (1983).
- 12) 微生物研究法懇談会編：微生物学実験法, 291-295 講談社サイエンティフィック, 東京 (1975).
- 13) Parkkinen, E., Oura, E., Suomalainen, H.: *J. Inst. Brew.*, 84, 5-8 (1978).
- 14) 嶋崎孝行：醸協, 78, 690-694 (1983).
- 15) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 16) 須藤恒二, 藤村葉子, 倉石 衍：微生物の化学分類実験法 (駒形和男編), 157-159, 学会出版センター, 東京 (1982).
- 17) 第三回改正国税庁所定分析法注解, 306-307, 日本醸造協会, 東京 (1974).
- 18) Fink, G. R.: *Method in Enzymology*, XVII, part A, p. 59, Academic Press, New York (1970).
- 19) Ishikawa, T., Yoshizawa, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 45-53 (1979).
- 20) 原 昌道, 小幡孝之, 下田高久：醸協, 72, 526-529 (1977).
- 21) Wheeler, G. E., Rose, A. H.: *J. Gen. Microbiol.*, 74, 189-192 (1973).
- 22) Parkkinen, E., Suomalainen, H.: *J. Inst. Brew.*, 88, 34-38 (1982).
- 23) Suomalainen, H.: *J. Inst. Brew.*, 87, 296-300 (1981).
- 24) 栗山一秀, 芦田晋三, 斎藤義幸, 秦 洋二, 杉並孝二, 今安聡：醸酵工学, 64, 175-180 (1986).
- 25) 柳内敏靖, 清川良文, 若井芳則：日本醸酵工学会大会要旨集, p. 105 (1988).