The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

〔生物工学会誌　第91巻　第2号　73–79. 2013〕

2012年度　技術賞　受賞

新規液体麹の開発と発酵飲食品への展開

小路　博志[1]*・杉本　利和[2]・舛田　晋[1]・上野　貴生[3]

Development of a novel submerged culture of *koji* mold and its application

Hiroshi Shoji[1]*, Toshikazu Sugimoto[2], Susumu Masuda[1], and Takao Ueno[3] ([1]*Research & Development Laboratories for Brewing, Asahi Breweries, Ltd., 1-21 Midori, 1-chome, Moriya 302-0106*; [2]*Production Process Developement Department, The Nikka Whisky Distilling Co. Ltd., 2-1 Dairimotomachi, Moji, Kitakyusyu 800-8585*; [3]*Food Specialty Headquarters, Seasoning Development Department, Asahi Food & Healthcare Co. Ltd., 1-23-1 Azumabashi, Sumida 130-8602*) Seibutsu-kogaku **91**: 73–79, 2013.

はじめに

麹菌は日本の伝統的な醸造産業において古くから用いられており，安全な微生物として広く認められている．麹菌の培養方法には，蒸煮処理後の原料表面に麹菌の分生子を接種して培養する方法（固体培養法）と，水に原料およびその他栄養分を添加して液体培地を調製し，殺菌のための加熱・冷却後，麹菌の分生子などを接種し培養する方法（液体培養法）がある．それぞれの培養物を固体麹または液体麹と呼ぶ．固体麹は一般的に，装置：専用，原料：蒸すことが必要，麹菌：分生子が着生しやすい株，という制限があるが，醸造に必要な多種類の酵素などを大量生産できる大変すぐれた方法である．一方，液体麹は無菌培養ができることに加え，装置：汎用ジャーファーメンター，原料：固体・液体何でもかまわず，麹菌：菌糸植菌もできるので低分生子形成株でも可能，他に培養パラメーターの管理をしやすいという面でも優れた点が多い．しかしながら，従来の液体麹は，アミラーゼ，セルラーゼなどの酵素生産挙動が固体培養時と大きく異なり，全般的に生産性が低下することが知られていた[1)]．そのため，醸造産業分野では固体麹を用いる方が一般的であり，液体麹を利用することはきわめて稀であった．筆者らは液体麹でも多種類の酵素を高生産できることが可能となれば，従来はできなかった商品の開発が可能となるであろうと期待し，新規液体麹の製造法について研究を行った．

新規液体麹

筆者らが携わる事業に直結することから，まずは焼酎に応用できる液体麹の開発に取組むこととした．焼酎の醸造工程では，並行複発酵によりアルコールが生成されるため，酵母へのグルコース供給に影響を与える糖質分解関連酵素が非常に重要となる．また，清酒と比較して暖かい地域で製造することが多いため，腐造防止を目的として，低いpH環境下にて醸造する．そこで，筆者らは焼酎醸造工程にて非常に重要となる，低pH環境下でも活性を有するグルコアミラーゼ（GA）活性と耐酸性α-アミラーゼ（ASAA）活性を指標に培養法を検討した．さらに，焼酎製造技術として現場利用できるようにと，さまざまな要望（食品原料を用いる・遺伝子組換え麹菌は使用しない・固体麹と同等の培養時間内・回分培養法）に応えることとした．

麹菌　焼酎用白麹菌（*Aspergillus kawachii* NBRC4308）は，固体培養にてGAとASAAを高生産できるので，まずはこの株を用いて，培地検討を進めた．酵素活性測定法は別報を参照していただきたい[2)]．

培地・培養方法　麹菌を液体培地中で培養する際，原料由来の糖質が可溶化しやすいため，酵素が少量生産された時点でグルコース濃度が高くなる．環境中にグルコースが高濃度で存在すると，糖質分解酵素の生産が抑制されてしまう[3)]．ただし，グルコースが必要量存在しないと，麹菌の生育が遅れ，培養時間が長くなってしまう反面もある．一般的な焼酎原料を用い麹菌の液体培養

*著者紹介　アサヒビール株式会社　E-mail: hiroshi.shoji@asahibeer.co.jp
[2]ニッカウヰスキー株式会社，[3]アサヒフードアンドヘルスケア株式会社

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

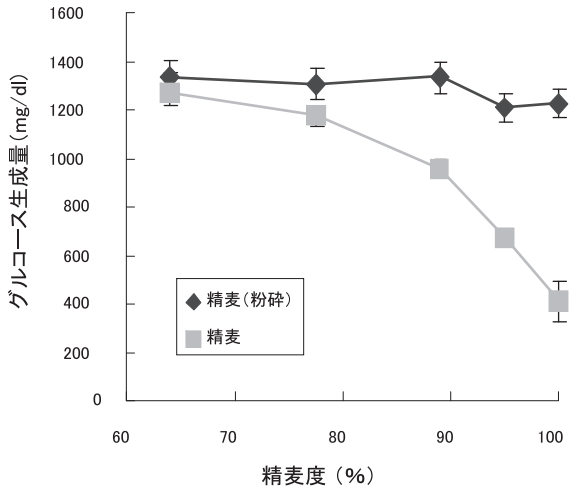

図1. 大麦原料の精麦度の違いによるグルコース生成量の比較

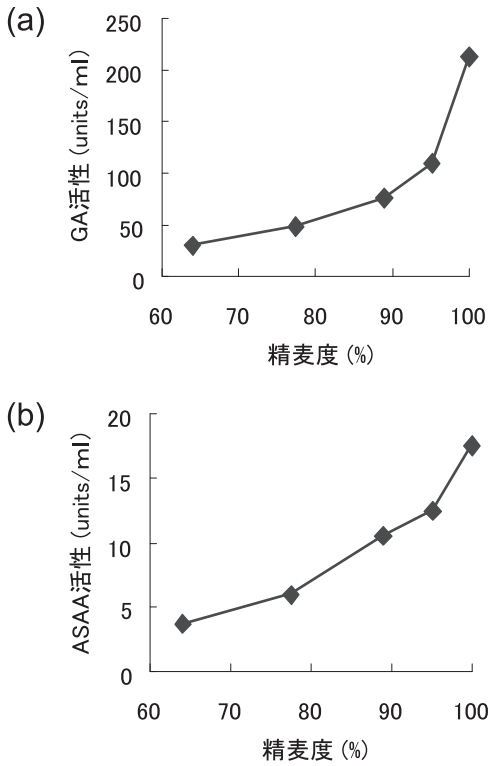

図2. 精麦度の異なる大麦原料を用いた場合の液体麹に含まれるGA活性（a）とASAA活性（b）比較

を試みたが，予想通り高い酵素活性を得ることができなかった．筆者らに有利だったのは，基礎データとして，難分解性糖質を液体麹の炭素源として利用すると，その分解のしにくさから，グルコース濃度が低く維持され，酵素生産性が高まることを見いだしていたことである[4]．そこで何らかの方法により，麹原料からのデンプン溶出速度をコントロールできないか考えた．着目したのは穀皮である．通常焼酎原料となる大麦などは，利用しやすいように穀皮を搗精（とうせい）工程で除去してある．しかしながら，穀皮にある程度覆われた原料は，穀皮のない原料より分解しにくいのでないかと予想した．ラボ搗精機を用いて精麦度の異なる大麦を調製し，無菌液中で糖質分解酵素と反応させた場合のグルコース生成量を比較した（図1）．なお，精麦度100%は玄麦を示す．精麦度が小さくなる（外側がより削られる状態）に従い，グルコース生成量が高くなった．すなわち分解しやすくなることが判明した．一方，これらの原料を粉砕してしまうと，グルコース生成量に差が認められないことから，穀皮の存在が糖質溶出を物理的に抑制するものと考えられた．

これらの精麦を用いて液体麹を製造した．丸麦（精麦度65%に相当）8 gと水100 mlを500 mlバッフル付三角フラスコに張り込み，121°C，15分間オートクレーブ滅菌を行った．これに白麹菌分生子を1白金耳植菌し，37°C，24時間，100 rpmで振とう培養することにより，前培養液を得た．次に，各精麦2 gとミネラル水100 mlを500 mlバッフル付三角フラスコに張り込み，121°C，15分間オートクレーブ滅菌を行った．これに上記の前培養液を1 ml添加した．37°C，48時間，100 rpmで振とう培養することにより，本培養液を得た．グルコース生成量が低い精麦（100%精麦，95%精麦）を用いた液体麹に含まれるGA活性やASAA活性は，当時目標としていたスペックを優に越えていた（図2）．特に液体培養でのASAAの生産については，長時間培養で生産された報告しかなく[5]，このような簡便な方法を用いることにより，短時間でGAとASAA両方の同時高生産を達成できたのは，初めてである．次に各種原料を用いて培養した際のグルコース量の変化を調べた[2]．穀皮を有さない丸麦，粉砕玄麦，デンプンを用いたサンプルでは培養初期に急激にグルコース濃度が上昇し，培養12時間で0.5%以上となった．一方，穀皮を有する玄麦を用いたサンプルは，培養中常に0.1%以下になっていた（図3）．これらの液体麹のGA活性を比較すると，穀皮を有する玄麦を用いたサンプルでのみ高生産されていることが判明した．一方，粉砕した玄麦・デンプン・丸麦を用いた場合は同等のGA活性を示した（図4）．玄麦でのみ高い酵素活性が得られたことより，低いグルコース濃度を保持し続けることで，グルコースリプレッションを回避した可能性が高いと思われる．

また，*Aspergillus oryzae*を用いた場合ではあるが，液体麹製造時のメタボローム解析およびマイクロアレイ解析を行った[6]．玄麦を用いた液体麹では，培養後半まで硝酸イオンが緩やかに代謝され，アンモニウムイオンの生成も抑制されていた．一方，原料を粉砕した液体麹では，硝酸イオンが急激に代謝され，培養中期からアンモニウムイオンが急上昇した（図5）．玄麦を用いた液体麹では，酵素生産におけるアンモニアリプレッションも回

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

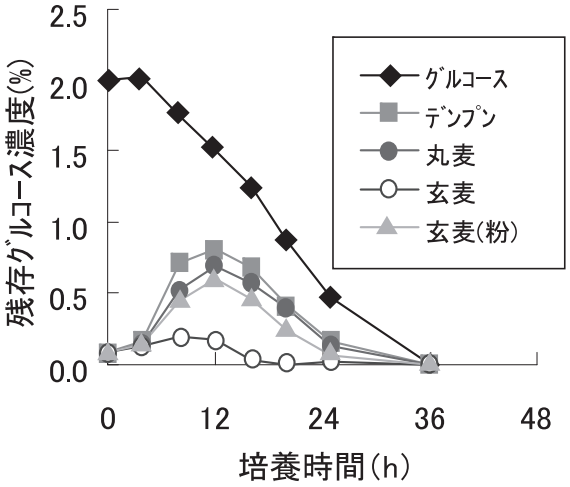

図3. 液体麹培養中のグルコース濃度

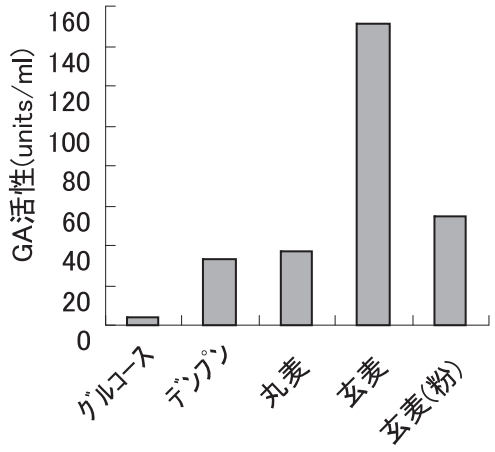

図4. 炭素源を変更した場合の液体麹に含まれるGA活性比較

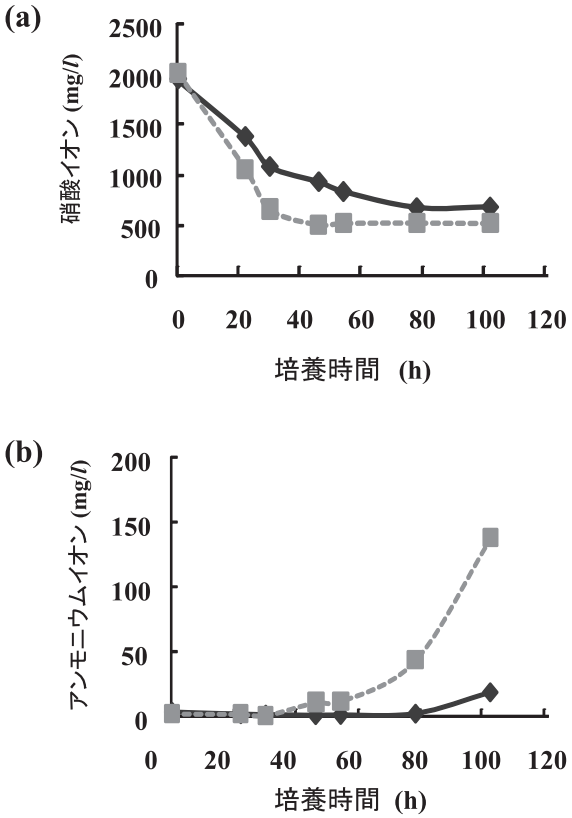

図5. 液体麹培養中の硝酸イオン（A），およびアンモニウムイオン（B）の変遷．実線が玄麦，点線が粉砕玄麦．

表1. 液体麹培地の検討

玄麦（%）	廃酵母（%）	大麦糖（%）	酵素活性（units/ml）	
			GA	ASAA
2.0	2.0	—	74.9	9.2
2.0	—	2.0	92.3	9.5

避している可能性もあるのでないかと推測している．さらに，玄麦を用いた場合，培養中期～後期において，窒素代謝関連酵素の遺伝子発現が上昇していた．これらより，培養期間を通じて窒素代謝が維持されることで，酵素生産フェーズが長く続き，結果として酵素が高生産となることが考察された．

培地追加検討　先の試験では，本培養の培地成分として，ミネラルを添加した．それらの代わりに，より安価な天然物由来の素材を用いることができないか検討した．発酵終了後の廃酵母または大麦糖を本培養培地に添加した際の酵素生産性への効果を確認した．なお，使用した大麦糖は，玄麦の搗精工程から得られる副産物であり，大麦穀皮および糠を含むものである．表1に示すように，水に各原料を添加し，121°C，15分間オートクレーブ滅菌後，白麹菌の液体培養を行った[7]．得られた液体麹のGA活性とASAA活性を同様に測定した．酵母菌体を添加した場合も，大麦糖を添加した場合も，ミネラルを添加しなくても，GAおよびASAAは有為に高生産された．また，液体麹自体の香気も変わり，天然物を用いると香気に厚みが出るようであった．

液体麹を用いた焼酎製造

発酵試験　筆者らが開発した麦液体麹と，対照として，一般的な麦固体麹を用いた焼酎小仕込み試験を実施した（表2および表3）．両試験区とも良好に発酵した．また，当時の配合では，両方のもろみに含まれる主要酵素力価バランスがよく似ていたこともあり，発酵もろみの重量減少積算量は近似したものとなった（図6）．また，発酵終了もろみのアルコール度数，主要な高級アルコールおよびエステル類の含有量に大差はなかった．

官能評価および機器分析　官能評価で差が生じないか，もう少し大きなスケール（発酵もろみ40 *l*）にて各

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

表2. 液体麹を用いた場合の配合表

	1次	2次	3次	合計
掛麦（g）	301	508	508	1319
汲水（ml）	321	766	273	1360
液体麹（ml）	500	—	—	500

表3. 固体麹を用いた場合の配合表

	1次	2次	3次	合計
麹麦（g）	313	—	—	313
掛麦（g）	—	508	508	1016
汲水（ml）	500	766	594	1860

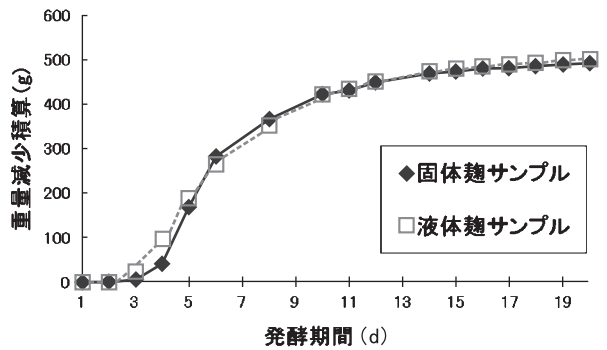

図6. 固体麹および液体麹を用いた焼酎もろみの重量減少量比較

焼酎を製造し，当社酒類専門パネルを用いて，定量的記述分析法による調査を行った．サンプルは減圧蒸留を行い，冷却ろ過した原酒とした．用語は硫黄臭，油臭，酸臭，こげ臭，エステル，原料香，スッキリ感とした．9段階評価を行ったが，有意差が得られた項目はなかった（表4）．すなわち，質の面で差は認められない似通ったタイプであることが判明した．また，液体麹麦焼酎と固体麹麦焼酎に含まれる揮発成分量をSPME-GC/MS解析した．主要香気成分に有意差は認められなかったが，閾値に達しない微量5成分に違いが見いだされた．66試料について5成分の分析を行い，定量値を用いた主成分分析により，液体麹・固体麹麦焼酎をグループ化できることが判明した[8]．

醸造特性向上　洗浄殺菌・培地調製時間を考慮すると，現場で2日に1回の出麹を達成するためには，培養時間は42時間程度に制限される．GAやASAAは，培養12時間くらいから活性が検出される．一方，セルラーゼ系の酵素の中には，培養終期（36時間程度）から酵素活性が検出されるものがある．玄麦の使用量を減らすことにより，デンプンが早く消費され，培養後期に生産される酵素群の生産時間が増大し，結果として安定生産

表4. 液体麹焼酎と固体麹焼酎の比較

	平均点		
	液体麹	固体麹	有意差
硫黄臭	0.38	0.44	無
油臭	0.81	0.88	無
酸臭	0.56	0.44	無
こげ臭	0.19	0.31	無
エステル	1.44	1.63	無
原料臭	1.19	1.50	無
すっきり感	2.19	2.06	無

表5. 玄麦使用量を変更した液体麹に含まれる酵素活性比較

玄麦使用量（%）	酵素活性（units/ml）		
	GA	ASAA	セルロース分解活性
2.0	212	12.3	0.07
1.9	224	11.4	0.08
1.8	225	10.6	0.15
1.7	213	10.2	0.20
1.6	205	9.5	0.17
1.5	195	8.5	0.16
1.4	187	7.4	0.14

に寄与しないか検討した．玄麦量を2.0～1.4%の範囲で調製し，42時間培養した（表5）．玄麦使用量を制限しても，GA活性の大幅な低下は認められなかった．ASAA活性は大麦添加量の多い方が高かったが，極端に低下しなかった．セルロース分解活性は，中間となる1.7%玄麦使用量の場合が一番高かった．

玄麦使用量2.0%，1.7%，1.4%の液体麹を用いて，ラボスケールで発酵試験を試みた．1.7%の液体麹を用いた場合，発酵速度が一番速かった（図7）．また，もろみアルコール度数は一番高く，もろみ粘度は一番低いということも判明した（表6）．これら3つのメリットの中で，もろみアルコール度数はコスト削減に，粘度低下は減圧蒸留時の突沸抑制に貢献する．培地・培養条件を工夫することにより，さらなる酵素バランスの向上が図れるものと期待している．

筆者らは，新規な液体麹焼酎の製造法と伝統的な固体麹焼酎の製造法およびブレンド技術を組み合わせることにより，新しいタイプの焼酎「本格麦焼酎　かのか」を上市した．ほどよくふくらみのある飲み口と雑味のないすっきりとした後味が特長となっている．

麹原料多様性について

先に述べたように，穀皮が存在する玄麦を用いると，液体麹の酵素の生産性が高まることが判明した．そこで，それ以外の原料でも穀皮を保持した状態の穀類を麹原料に用いたならば，酵素の生産性が高まる可能性があるの

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

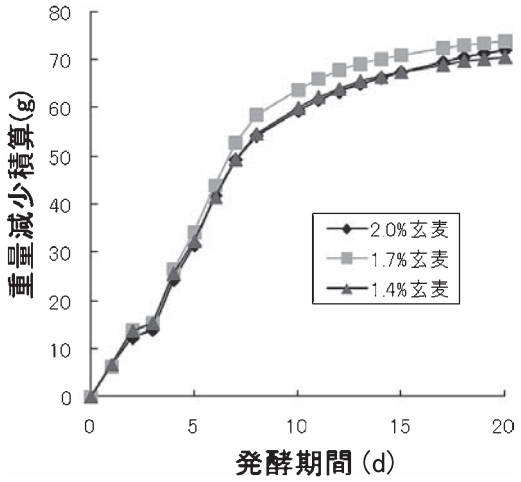

図7. 玄麦使用量を変更した液体麹を用いた焼酎もろみの重量減少量比較

表6. 玄麦使用量を変更した液体麹を用いた焼酎もろみ比較

	アルコール度数（%）	粘度（CP）
玄麦2.0%液体麹	18.0	194
玄麦1.7%液体麹	19.2	65
玄麦1.4%液体麹	18.6	69

でないかと予想した．各種穀類にて実験を行ってみたところ[9]，多くの未加工の穀類を用いた液体培養により，GAおよびASAAを高生産することができた（表7）．驚いたことに，大麦より両酵素活性を高くする穀類もかなり存在した．穀類により好適な原料濃度が異なったのは，デンプンなどの含有量や原料の壊れにくさが関与しているものと思われる．これら液体培養物は用いる穀類により，液体麹自体の香気が異なることも判明した．また，通常の固体麹と同様に焼酎もろみの発酵に用いることが可能であった．また，できあがった焼酎の品質は，麹原料由来の風味が表れることが判明した．また，2つの酵素活性以外の酵素バランスが異なる可能性もあり，目的に応じて原料を選択すれば，従来とは一線を画した商品ができる可能性があると予想された．

黒麹菌を用いた液体麹について

黒麹菌は，古くから泡盛の製造に使用されている．また，明治以降，九州の焼酎製造にも使われ始めた[10]．白麹菌で成功したことから，黒麹菌（*Aspergillus awamori* NBRC4388）でもうまく行くのでないかと考え，同様の手法により液体麹の製造を検討した．液体培地として炭素源2%，各種ミネラルを添加した．なお炭素源としては，各種精麦，および粉砕玄麦を用いた．48時間培養終了後のGA活性およびASAA活性を測定した（図8）．

表7. 液体麹の麹原料と酵素活性

本培養原料	濃度%（w/v）	GA活性（units/ml）	ASAA活性（units/ml）
98%精麦	2	101.4	8.0
玄そば	8	112.4	10.4
アワ	8	101.3	11.0
ヒエ	8	113.0	10.2
キビ	8	90.3	8.5
コウリャン	8	111.2	10.5
トウモロコシ	8	114.2	4.2
籾殻付米	4	140.4	11.5
玄米	8	112.7	15.6
大豆	8	110.8	11.3
小豆	2	138.2	12.9
さつまいも	2	108.6	5.5
アマランサス	2	125.7	11.0
キヌア	2	126.8	10.6

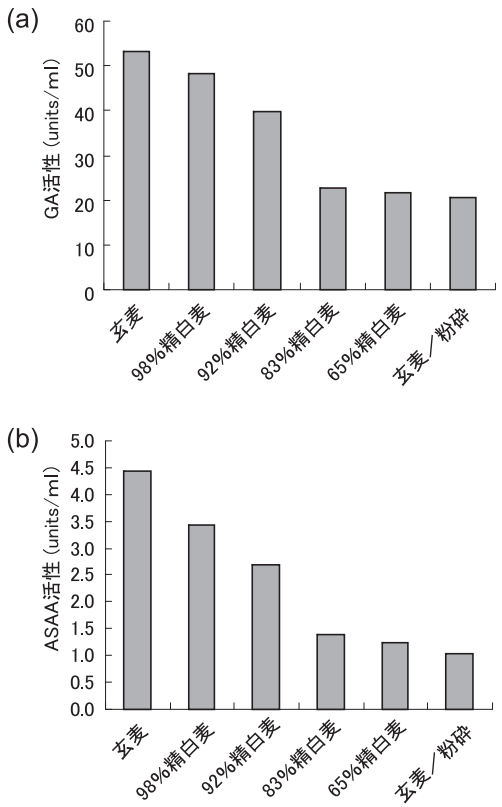

図8. 精麦度の異なる大麦および粉砕玄麦を用いた場合の黒麹菌液体麹に含まれるGA活性（a）とASAA活性（b）比較

白麹菌と同様に，精麦度の高い状態の大麦を用いた液体麹がGAおよびASAA共に高生産された．菌株が異なるせいもあるが，今回作製した黒麹菌の液体麹は，白麹菌のものとは香気に差が認められた．また，酵素バランスも異なると予想されることから，目的により使い分けることが可能となろう．

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

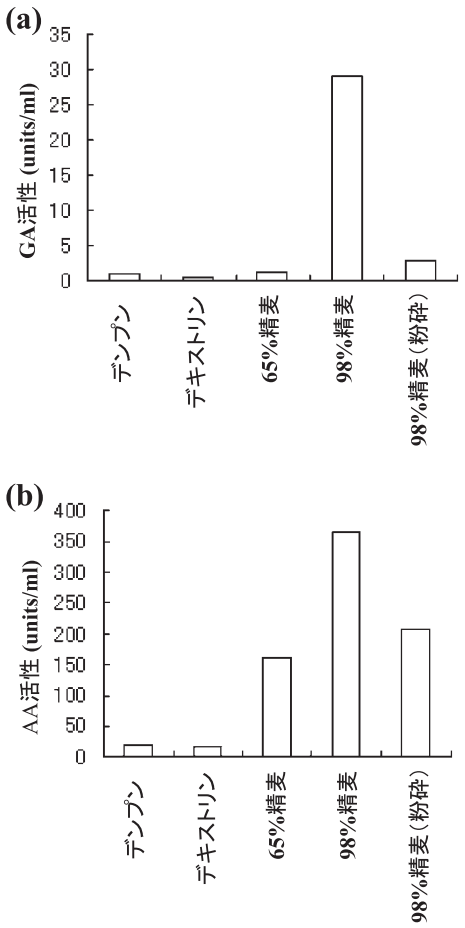

図9．各種炭素源を用いた場合の黄麹菌液体麹に含まれるGA活性（a）とAA活性（b）比較

黄麹菌を用いた液体麹について

黄麹菌を用いた固体麹は，清酒・みりん・甘酒・味噌・醤油・食酢などの製造に用いられる．代表的な黄麹株である*A. oryzae*においてもまた，その液体培養物におけるGA活性が著しく低いことが報告されている[11]．筆者らは先に述べた方法により，白麹菌又は黒麹菌を用いた液体培養法による酵素高生産を実現した．そこで，黄麹菌でもこの方法を応用し，清酒などの発酵飲食品製造の鍵酵素となるGAおよびα-アミラーゼ（AA）の活性が高い液体麹を製造できるか検討した．まずは液体麹製造における酵素生産性に対する炭素源の影響を調べるため，以下のような方法で液体麹を製造し，酵素活性を測定した[12]．液体培地として炭素源2%，各種ミネラルを添加した．なお炭素源としては，可溶性デンプン，デキストリン，65%精麦，98%精麦，98%精麦をミルで粉砕処理したものを用いた．このように調製した培地に，黄麹菌（*A. oryzae* RIB40）の分生子を植菌し，30°C，72時間，100 rpmで振とう培養した．培養終了後，それぞれの培養上清中のGA活性とAA活性を測定した（図9）．GAは98%精麦試験区のみで顕著に生産され，一方，これを粉砕した原料や穀皮を有さない原料を用いた試験区では酵素生産性が著しく抑制された（図9(a)）．AAは生産挙動がGAとは若干異なるものの，やはり98%精麦試験区で多量の酵素を生産した（図9(b)）．このように黄麹菌であっても，98%精麦のような表面が穀皮で覆われた穀類を用いることで，GAやAAといった発酵飲食品の製造に必要な酵素群を同時高生産できることが判明した．

紅麹菌を用いた液体麹について

紅麹菌を用いた固体麹（紅麹）は，古くから中国，台湾などにおいて，紅酒，老酒などの酒類の製造に用いられている．ただし紅麹の生産はきわめて煩雑なため，日本ではあまり普及していない[10]．紅麹を用いた液体麹が，各種酵素を生産し，かつ簡便に製造できるのならば，新しい切り口の提案になろうと考え，検討を進めた．白米8 gと水100 mlを500 mlバッフル付三角フラスコに張り込み，121°C，15分間オートクレーブ滅菌を行って，前培養培地とした．この前培養培地に紅麹菌（*Monascus purpureus* NBRC4484）菌糸を1白金耳植菌し，37°C，24時間，100 rpmで振とう培養することにより，前培養液を得た．この培養時間で菌体は十分に増殖していた．本培養の培地は，玄米4.0%，各種ミネラルとした．液体培地3000 mlを調製し，容量5000 mlのジャーファーメンターに張り込み，121°C，15分間オートクレーブ滅菌した．この本培養培地へ上記の前培養液を30 ml添加した．その後，温度37°C，攪拌速度300 rpm，通気量0.5 vvmにて48時間培養を行い，液体麹を得た．GA活性は71.7 units/ml，AA活性は32.0 units/mlであった．これらを用いて焼酎の製造が可能であることも判明している[13]．

液体麹を用いた無蒸煮発酵

原料を蒸煮せずに糖化させると，糖化工程中の粘度上昇を回避できるため，高濃度仕込みが可能となる．焼酎用麹菌を用いて製造した固体麹のGAとASAAには生デンプン吸着部位が存在するため，生デンプンを糊化せずに直接分解できることが知られている．今回筆者らが製造した液体麹を用いても，生デンプンを直接分解できることが判明した[14]．この特性をさらに強化した液体麹を開発し，効率的無蒸煮発酵を検討した．キャッサバはデンプン粒子が大きく，かつ複雑な構造を持つため，分解しにくく，無蒸煮発酵の原料として大きなスケールで成功した例はなかった．パイロットプラントを用いて，1.6 kl発酵スケールのキャッサバ無蒸煮発酵を試みた[14]．雑菌数は10の5乗オーダー以下をキープし，アルコール度数は10.3%にまで到達した．発酵歩合は92.7%と

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

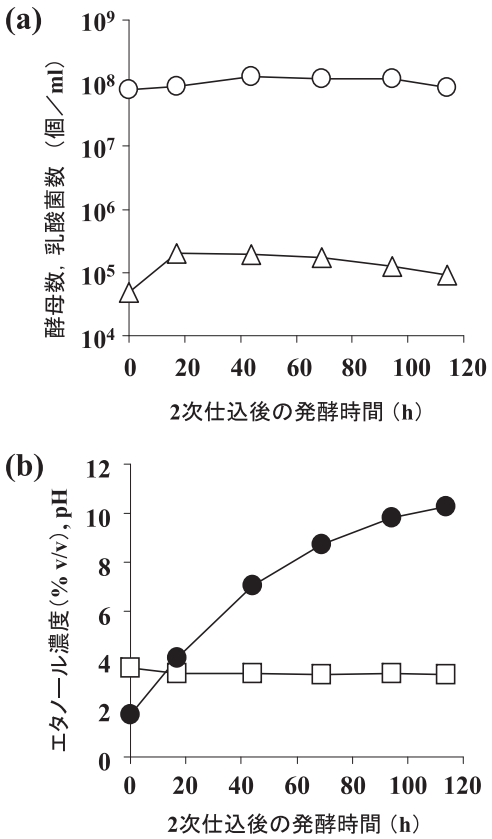

図10. 液体麹を用いたキャッサバ無蒸煮発酵経過．A：酵母数（○）および雑菌数（△），B：もろみアルコール度数（●）およびpH（□）．

なり，キャッサバ無蒸煮発酵としては，非常に高い数値を得ることができた（図10）．さらに実証設備を用いて，30 kl発酵スケールの米粉，20 kl発酵スケール大麦糖の無蒸煮発酵を試みた（表8）．米粉の場合，雑菌数は10の2乗オーダー付近をキープし，アルコール度数は13.3%にまで到達した．発酵歩合は93.5%と高かった．大麦糖の場合，デンプン含量が少ないため，もろみ中のアルコール濃度を高めるために，固形分40%以上の高濃度仕込みとした．この高濃度仕込みでももろみ粘度が大きく上がらず，雑菌数は10の4乗オーダー以下をキープし，アルコール度数は12.1%にまで到達した．発酵歩合は95.1%と，低デンプン含量原料を用いたにも関わらず，かなり高いものとなった．いずれの場合でも，段仕込みで酵母の優位性を保つ製造法を採用しており，それが功を奏したものと考えている．

おわりに

穀皮で覆われた原料を用いるというコンセプトにより，白麹菌・黒麹菌・黄麹菌・紅麹菌を用いた液体培養による酵素高生産を実現した．酵素バランスや香りなど，目的に応じて麹菌や培地を選択できるというメリットも得られた．白麹菌および黄麹菌液体麹を用いると，清酒・みりん・甘酒・醤油・みそなどを問題なく製造できることも判明している．今回開発した新規液体培養法は，麹菌の物質生産能力を最大限に引き出すのに適した培養技術であると考えており，麹菌の更なる高度利用に貢献できるのでないかと期待している．

表8. 液体麹を用いた米および大麦糖無蒸煮発酵試験結果

	原料		発酵条件		結果	
	デンプン含量（%）	使用量（kg）	もろみ量（l）	固形分（%）	アルコール（%）	発酵歩合（%）
米粉	74.4	8000	30,025	26.6	13.3	93.5
大麦糖	39.0	8000	19,800	40.4	12.1	95.1

本技術に関する研究開発は，アサヒビール株式会社の皆様をはじめ，関係会社の多くの方々にご支援いただき，実用化にこぎつけることができました．心より御礼申し上げます．

文　献

1) Iwashita, K., Todoroki, K., Kimura, H., Shimoi H., and Ito K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1938–1946 (1998).
2) Shoji, H., Sugimoto, T., Hosoi, K., Shibata, K., Tanabe M., and Kawatsura K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 203–205 (2007).
3) Ruiter, G. J., and Visser, J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **151**, 103–114 (1997).
4) Sugimoto, T., Horaguchi, K., and Shoji, H.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 1985–1991 (2011).
5) 赤尾　健，須藤茂俊，佐藤和夫，大場俊輝：醸協，**89**, 913–914 (1994).
6) Masuda, S., Kikuchi, K., Mstsumoto, Y., Sugimoto, T., Shoji, H., and Tanabe, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2190–2195 (2009).
7) 杉本利和，小路博志：特許第4083194号.
8) Masuda, S., Ozaki, K., Kuriyama, H., Sugimoto, T., Shoji, H., Tanabe, M., Kitagawa, Y., and Yamashita, H.: *J. Inst. Brew.*, **116**, 170–176 (2010).
9) 小路博志，田邉正行：バイオサイエンスとインダストリー, **64**, 633–634 (2006).
10) 村上英也：麹学，日本醸造協会 (1987).
11) Ishida, H., Hata, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., and Imayasu, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 301–307 (1998).
12) 杉本利和，小路博志：特許第4068649号.
13) 杉本利和，小路博志：特許第4908815号.
14) Sugimoto, T., Makita, T., Watanabe, K., and Shoji, H.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 605–612 (2012).

NII-Electronic Library Service