

〔醸酵工学 第55巻 第5号 294-300. 1977〕

総 説

醤油の歪に関する研究*

(昭和51年度 日本醸酵工学会学会賞受賞)

橋 本 彦 堯

キッコーマン醤油株式会社 中央研究所**

1. はじめに

醤油工業においてはビール、ワイン、味醂および清酒などの他の醸造工業¹⁾におけると同様、製造工程中で発生する歪の除去や二次歪の発生防止が重要な課題になっている。特に淡口醤油のように、色のうすい醤油では、製品の濁りは外観上の商品価値を著しく低下させるので、酒類と同じく高い清澄度が要求されている。これらの清澄な醸造食品では、濁り成分や清澄化法に関して古くから数多くの研究がなされてきた。

木下²⁾が醤油の火入れ歪の発生量と火入れ温度との関係について報告したのは1916年のことであるし、加藤³⁾による味醂の煮切の研究が始まったのは1925年ごろである。一方、清酒の白ぼけが品質上大きな問題になり出したのは1953年ごろであり、この年、井上・川崎⁴⁾はそれまで使用されていた柿渋と小麦粉などにかわる新しい歪下げ剤として市販のプロテアーゼ剤の有効性を報告した。以後、清酒業界では、精力的に白ぼけの成因とその対策について研究⁵⁾が行われたが、これはそれまで清酒の運搬、飲用に用いられていた樽や徳利にかわり、そのころ透明なガラスびんがもてはやされ出したことと無縁ではない。ビール業界では早くからびん詰め製品が多く、飲用にも透明なコップが使用されたためか、濁りに関しては古くから注意が払われていたようである。Wallerstein⁶⁾がシシパイン添加による寒冷混濁の除去法に関する特許を獲得したのは66年も前(1911年)のことである。

このようにして、現在では醤油でも、清酒、味醂、ビールなどと同じく、濁りや歪の問題は工業的には一応解決しているかに見える。しかし、濁りの除去機構やそれぞれの食品中での濁りの必然的な発生機構には、まだまだ不明な点が多い。

本研究は醸造醤油に普遍的でしかも量的にも多い火入れ歪の発生機構の解明を主眼としたものである。

2. 火入れ歪の成分

醤油に発生する歪には、醤油の種類や製造方法の違いにより、火入れ歪の他にもチロシンやフェニルアラニンなどの難溶性アミノ酸、しょう酸カルシウムやくえん酸カルシウム、有機態りん酸のカルシウムやマグネシウム塩、保存剤および混濁性微生物によるものなどが知られている。しかし、現在の醸造技術でなお問題となるのは火入れ歪のみであろう。

醸造醤油は生のままでは透明であるが、80°C付近で行われる火入れ工程を経ると、徐々に混濁が生じ、これは次第に凝集し、やがて火入れタンクの底に沈殿するに至る。この沈殿物(火入れ歪)量は容量比で約10%にも達する。Table 1に火入れ歪の成分組成を示す。Table 1から明らかなように、火入れ歪重量は水洗残渣重量にして、醤油 1 lあたり 250~500 mgであり、この89.1%がたんぱく質、炭水化物9.7%、灰分1.2%であった。この結果からすると、火入れ歪化する窒素量は、醤油の総窒素(TN)の約0.2~0.4%と計算される。火入れ歪は、清酒(白ぼけ)や味醂(煮切)などでも問題となるたんぱく混濁の一種であるといえる。ちなみに、白ぼけの生成量は30~250 mg/l⁷⁾、煮切は200~3,000 mg/l⁸⁾と報告されている。

* Studies on Sediment of Shoyu (Soy Sauce)—A Monograph—HASHIMOTO, H. (Central Research Laboratories, Kikkoman Shoyu Co., Ltd., Noda-shi, Chiba)

** 現在: Kikkoman Foods, Inc., P.O. Box 69, Walworth, Wisconsin 53184 U.S.A.

Table 1. Components of sediments of *shoyu* formed by heating.

	1st sediment ^{a)} during heating at 85°C for 30 min.		2nd sediment ^{b)}	
	Yield from 5l of <i>shoyu</i> mg	Relative value %	Yield from 5l of <i>shoyu</i> mg	Relative value %
Dry weight	11.00	100	1261.50	100
Protein (N×6.25)	8.98	81.55	1125.00	89.18
Carbohydrate (as glucose)	1.68	15.23	121.50	9.63
Ash	0.13	2.29	15.00	1.19
Phosphate	—		16.75	1.33

^{a)} Sediment deposited during heat treatment of *shoyu* at 85°C for 30 min.

^{b)} Sediment deposited by the further treatment of *shoyu* at 55°C for 4 days.

3. 火入れ漉たんぱく質の起源

火入れ漉の主成分は、生醤油中では可溶性で火入れによりはじめて不溶性化するたんぱく質であるといえるが、醤油はたんぱく質を主成分とする大豆とグルテ

ンを豊富に含む小麦を原料にしていることに加え、醸造に関与する微生物も、麹菌をはじめ、乳酸菌、酵母と多岐にわたることから、生醤油中のたんぱく質にも種々の起源が考えられる。

Table 2 に、火入れ漉のアミノ酸組成を酒類のたん

Table 2. Comparison of amino acid composition of protein turbidities appearing in *shoyu*, *mirin*, *saké* and beer.

Amino acid	Sediment ^{a)} by heating of protein from <i>shoyu</i> wt%	<i>Hiireori</i> ^{a)} of <i>shoyu</i> wt%	<i>Nikiri</i> ^{b)} of <i>mirin</i> wt%	<i>Shiroboke</i> ^{c)} of <i>saké</i> wt%	Chill haze ^{d)} of beer wt%
Lysine	5.72	5.48	2.32	2.87	6.1
Histidine	3.25	2.87	1.69	1.14	7.8
Arginine	3.21	3.84	5.38	2.30	16.3
Aspartic acid	13.06	13.40	10.47	10.80	6.1
Threonine	6.78	6.43	3.43	4.37	4.9
Serine	6.33	6.55	3.73	5.98	5.9
Glutamic acid	10.75	12.00	9.54	7.40	17.0
Proline	4.50	5.65	5.03	4.64	12.0
Glycine	5.92	5.96	6.93	4.56	12.3
Alanine	5.92	6.06	7.72	4.78	5.8
Cysteine	trace	0.80	—	0.82	3.8
Valine	5.92	4.58	7.78	5.65	5.3
Methionine	1.42	0.80	0.08	0.39	1.4
Isoleucine	4.79	4.36	4.93	3.22	2.9
Leucine	7.91	7.55	7.08	6.17	4.9
Tyrosine	6.90	6.26	1.87	4.38	2.1
Phenylalanine	5.96	5.90	4.46	4.02	3.5
Asp/Glu	1.21	1.12	1.10	1.46	0.36
Pro/Leu	0.57	0.75	0.71	0.71	2.45

^{a)} Amino acid analysis of the sediments was carried out with an automatic amino acid analyzer on the hydrolyzates with 6N HCl at 110°C for 24 hr.

^{b)} The data are taken from the report by Yamashita *et al.*, cited in ref. 9.

^{c)} The data are taken from the report by Akiyama cited in ref. 10.

^{d)} The data are taken from the report by Ljungdahl *et al.*, cited in ref. 11.

ばく混濁のそれと比較して示す。Table 2 よりすると、火入れ蛭のアミノ酸組成はビールは別として、味醂および清酒のたんぱく混濁のアミノ酸組成に近似している。Asp/Glu>1, Pro/Leu<1であるが、これは醤油原料の大豆たんぱく質や小麦グルテンの場合とは全く異なる。

また、家兎により調製した火入れ蛭の抗血清は、寒天ゲル内二重拡散反応の結果、醤油麹菌の粗酵素液と3本の沈降線を作った。さらに、醤油原料を含まない麩に、無菌的に醤油麹菌を生育させた麩麩を、醤油の仕込みに近い1.5倍量の食塩水で抽出、ろ過した酵素液(pH 5.0, NaCl 17.5%)からも、生醤油の場合同様約10% (v/v)の火入れ蛭が発生した。これらのことより、火入れ蛭主成分と醤油麹菌の生産したたんぱく質群との高い相関が推察された。

4. 生醤油中の火入れ蛭発生促進因子

原料たんぱくとは違い、麹菌の産生したたんぱく質は生たんぱく質であり、火入れにより熱凝固することは考えることである。しかし、種々の生醤油を実験室的に火入れしてみると、火入れ蛭の発生量や発生に要する時間が醤油間でかなり異なることが認められた。また、同じ生醤油でも80°Cの湯煎中で懸垂火入れする場合、火入れ量が100mlと1lでは火入れ蛭の発生状態にかなりの違いが観察された。さらに、Fig. 1に示したように、火入れ蛭発生に要する時間は火入れ温度に比例的でなく、70°C付近では60°Cや80°Cに比べて発生が著しくおくれるなど、火入れ蛭の発生をたんぱく質の単純な熱凝固としか説明しきれない現象が数多く認められた。

ここで、未だ火入れ蛭発生が起こっていない火入れ醤油に、生醤油を一部加えると、火入れ蛭の発生が著しく促進されることが見出された。¹²⁾ これらの結果より、生醤油中には火入れ蛭前駆体とともに、火入れ蛭発生促進物質も存在することが明らかになった。生醤油からアルコール沈殿、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過等の手段によりこの火入れ蛭発生促進物質を分離精製したところ、麹菌由来のプロテアーゼ群であることがわかった。¹²⁾ その後、生醤油中のプロテアーゼの種類や量が生醤油間でかなり異なることも認められ、一見複雑に思えた火入れ蛭発生にからむ特異現象の説明が可能になってきた。70~75°C火入れでは、特異的に火入れ蛭発生がおくれる現象も、生醤油中の火入れ蛭発生促進酵素のうち、耐

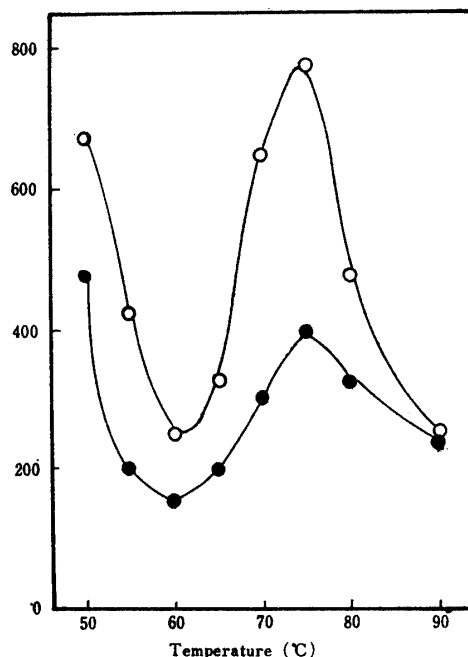


Fig. 1. Effect of heating temperature on the time required for forming sediment.

10 ml of each sample of raw *shoyu* were pipetted into duplicate 10 ml glass-stoppered test tubes, and heated to various temperatures, at which the times required for sediment formation were measured.

●— Raw *shoyu* made from soybeans
○— Raw *shoyu* made from defatted soybeans

熱性の乏しい酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ I およびアルカリプロテアーゼ等はもちろん、60°Cや80°Cでは比較的安定である耐熱性中性プロテアーゼ II も、70~75°Cでは特異的に自己消化により失活するためであると説明できる。

火入れ蛭発生機構をさらに明らかにするために、生醤油から分離した火入れ蛭前駆体を含むたんぱく質溶液(1.52%)を、醤油に近い条件下(pH 5.0, NaCl 17.5%)で火入れ(85°C, 30分加熱後60°C, 3日保持)し、火入れ蛭発生のモデル試験を行った。¹³⁾ 生の時には透明であった系は火入れ中に白濁し、多量の火入れ蛭が発生した。同時に上澄には、Fig. 2に示したように低分子ペプチド(MW<3,500)の生成が認められ、火入れ中のプロテアーゼ作用が実証された。

このモデル系でのたんぱく質の量的変化をみると、火入れ蛭化したものが25.0%, 火入れ後も可溶性を維持するたんぱく質27.1%, 低分子ペプチドまで分解、可溶化されたもの42.2%であった。また、生醤油から分離精製したプロテアーゼを添加すると、火入れ蛭発

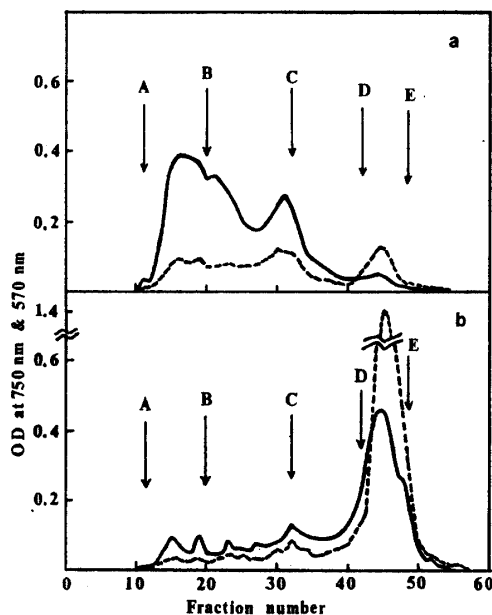


Fig. 2. Gel filtration of native protein (a), and soluble fraction (b) produced during heating of the native protein isolated from raw *shoyu* on Sephadex G-100.

Five ml of samples corresponding to 148.5 ml raw *shoyu* were applied to a Sephadex G-100 column (2.6×100 cm) equilibrated with 0.05 M acetate buffer (pH 5.0) containing 3 M NaCl. Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 20 ml/hr; 10 ml fractions were collected.

Protein concentrations were determined by the methods of Lowry *et al.*, and amino acids and peptides released were determined by the ninhydrin method of Cocking and Yemm. They were expressed by the absorbance at 750 nm (—) and 570 nm (···), respectively. Elution positions of marker substances used for estimating the molecular weights of proteins and peptides are shown by the downward arrows (A~E).

A: Blue dextran, B: Bovine serum albumin (MW 67,000), C: Cytochrome c (MW 12,270), D: Glucagon (MW 3,500), E: DNP-L-alanine.

生が著しく促進されるが、プロテアーゼ阻害剤を共存させると、この効果は消失した。¹⁴⁾ これらの結果から、本醸造醤油の火入れ歪発生は、麹菌由来のたんぱく質が熱凝固する単純なものではなく、60°C 付近の低温火入れでももちろん、通常の 80°C 付近での火入れの場合にも、生醤油中に残存する麹菌プロテアーゼがその発生を誘起する機構よりなることが明らかになった。

5. 疎水の相互作用による火入れ歪分子の会合

火入れ中に共存するプロテアーゼにより修飾された

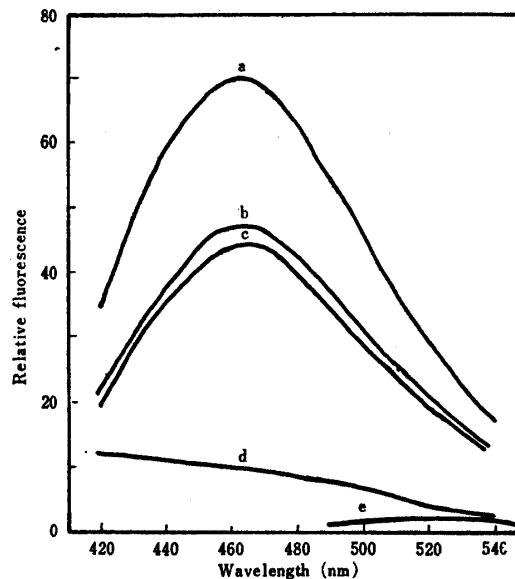


Fig. 3. Effect of NaCl on the fluorescence of the ANS-sediment complex.

The wavelength of excitation was 386 nm. 2×10^{-5} M ANS in sediment protein (0.6 mg/ml) with 3 M NaCl (Curve a), with 0.3 M NaCl (Curve b), or without NaCl (Curve c). Solution of the sediment protein in 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) with NaCl (0.0-3.0 M) (Curve d). 2×10^{-5} M ANS in 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) with NaCl (0.0-3.0) without sediment protein (Curve e).

熱変性たんぱく分子は、いかなる力により会合して火入れ歪にまで成長するのであろうか。水溶液中のたんぱく質分子の不溶性化に関与しうる側鎖間相互作用には、s/s 架橋、金属を介した結合、水素結合、静電的相互作用、疎水性アミノ酸側鎖相互間の疎水結合などが考えられる。実験では、火入れ歪の濁度は pH 4.8, 6.0, 7.0 のいずれでも、食塩濃度による大きな影響はうけなかった。しかし、高食塩濃度下では、歪溶液の凝集が促進された。s-s 結合切断試薬のメルカプトエタノール、亜硫酸ソーダ、システインおよび酸化的切断試薬の過酸化水素などは、いずれも歪の濁度に変化を与えなかった。また、これらの試薬は生醤油からの火入れ歪発生にも影響しなかった。

エチレンジアミンテトラアセテート (EDTA) は火入れ歪発生を阻止するものの、歪の可溶性には全く影響しない。一方、尿素は高濃度になると徐々に歪を可溶化した。ドデシル硫酸ソーダ (SDS) は分子内に疎水性の基と親水性の基の両方を有し、たんぱく分子間の疎水結合を切断する能力があるが、SDS は極めて低濃度で火入れ歪を可溶化した。

蛍光実験の結果を Fig. 3 に示す。Fig. 3 より明らかなように、蛍光色素、1-アニリノ-8-ナフタレンスルホネート (ANS) を火入れ釜と作用させたところ、465 nm 付近に極大を持つ強い蛍光が認められたことから、火入れ釜分子中に疎水性領域が多く存在することが確かめられた。

また、火入れ釜前駆体を含む生醤油中のたんぱくを用いて、醤油と同条件下で火入れし、その後経時的に ANS の結合量をしらべた (Fig. 4)。この結果、釜が発生するにつれて、系中の疎水性領域の量が増大することも認められた。¹⁵⁾ このモデル系における生たんぱく質、火入れ釜および火入れ中に遊離されたペプチドの3区分の構成アミノ酸を Table 3 に示した。Table 3 よりすると、火入れ釜は生たんぱく質および火入れ中に遊離されたペプチドに比較して疎水性アミノ酸に富んでいた。

これらの結果を総合すると、火入れ釜の発生は、プロテアーゼ作用と熱変性により露出した疎水性に富むコアが、疎水的相互作用により会合したものであると説明できる。

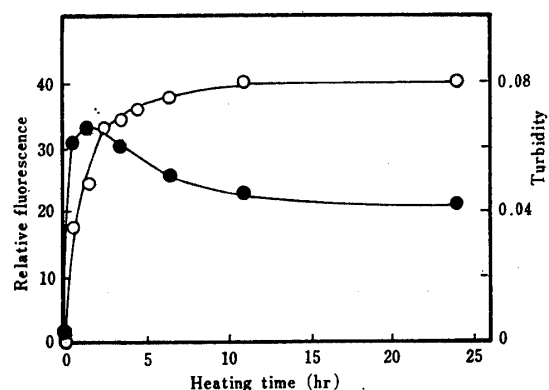


Fig. 4. Changes in ANS fluorescence bound to protein isolated from raw *shoyu* in the course of sediment formation during heating.

The initial protein concentrations in 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) containing 3 M NaCl were 0.94 mg/ml. After heating at 85°C for 30 min, the protein solution was further heated at 60°C for 24 hr. Turbidity of the protein solution during heating was measured as given in the text. Conditions for fluorescence measurement were identical with those in Fig. 8. Excitation was at 386 nm and emission at 465 nm.

—○— Turbidity.
—●— Fluorescence.

Table 3. Amino acid composition of sediment deposited and peptide released during heating of protein isolated from raw *shoyu*.

Amino acid	Hydrophobicity ^{a)} (kcal/mole)	Native protein ^{b)} Mole %	Sediment ^{b)} Mole %	Peptide released ^{b)} Mole %
Isoleucine	2.97	2.67	4.13	2.72
Tyrosine	2.87	2.92	4.32	3.36
Phenylalanine	2.65	2.60	4.10	2.49
Proline	2.60	3.09	4.43	3.09
Leucine	2.42	5.26	6.87	5.71
Valine	1.69	6.34	5.77	5.30
Methionine	1.30	0.25	1.09	0.83
Alanine	0.73	9.53	7.55	9.35
Threonine	0.44	8.41	6.48	6.86
Serine	0.04	9.44	6.87	6.91
Glycine	0	8.48	8.98	7.41
Lysine		4.24	4.45	3.87
Glutamic acid		10.41	8.30	9.30
Aspartic acid		10.48	11.17	13.72
Histidine		2.78	2.37	2.30
Arginine		2.22	2.08	2.67

Amino acid analysis was carried out with an automatic amino acid analyzer on the hydrolyzate with 6 N HCl at 110°C for 24 hr.

^{a)} The data are taken from the report by Tanford.

^{b)} Samples were prepared as described in Fig. 1 in ref. 13.

6. 清酒の白ぼけ発生機構との比較

醤油の火入れ塩と同じく、清酒の白ぼけは火入れに起因して発生する。白ぼけの発生機構に関しては、蔭山・杉田¹⁶⁾はサケ・キモシン説を提唱し、堀¹⁷⁾も白ぼけを合成する酵素の存在を想定した。しかし、実証されるに至らず、現在は酸性アルコール溶液中における糖化型アミラーゼ^{18~20)}の熱変性として説明されているのみで、詳細なことはわかっていない。そこで、白ぼけ発生機構を火入れ塩のそれと比較して2, 3検討した。

米麴と醤油麴では、同じ麴菌を使用しても酵素の生産量は全く異なる。酸性プロテアーゼ量は両者ほぼ同一であるが、中性プロテアーゼやアルカリプロテアーゼは、米麴では醤油麴の約1/10位しか生産されない。そのうえ、清酒は醤油に比べて麴歩合がはるかに少ないので、生酒中に残存するプロテアーゼ量は生醤油に比べて極端に少ない。¹³⁾ また、一般には20%近いエタノールを含む清酒の火入れでは、醤油中に比べプロテアーゼの失活も激しいと考えられる。これらのことからすると、白ぼけ発生における生酒中のプロテアーゼの影響は、火入れ塩の場合ほどには大きくないと思われる。仮にサケ・キモシン様酵素が存在するとすれば、白ぼけが火入れ後に発生することからして、それは火入れ中にも完全には失活せず、白ぼけ発生を誘起するような熱安定性に富むプロテアーゼであると考えるのが妥当である。清酒用の麴菌、*Aspergillus oryzae*の米麴中には、Fig. 5に示すように、通常の酵素とは異なり、15~20%のエタノールにより熱安定性が増大するプロテアーゼの存在が認められた。この耐熱性プロテアーゼは、微力ながら白ぼけ沈停作用も持っていた。清酒は醤油と異なり、火入れ後3~10ヶ月もの長期にわたり貯蔵、熟成されるので、米麴中のこのようなプロテアーゼは量的には少なくとも、この間の白ぼけ増加に何らかの影響をおよぼすのではなからうか。酒によって秋口になって白ぼけが増したり、タンク底に塩が沈殿していたりすることがある¹⁹⁾といわれているが、この現象も耐熱性プロテアーゼの存在を考えると比較的理解しやすい。米麴の作るこの耐熱性プロテアーゼは、酵素化学的および免疫学的検討の結果、醤油麴中の耐熱性プロテアーゼである中性プロテアーゼIIと近縁の酵素であることが明らかになった。

45~50°Cで最適に生育する高温性かび、*Penicillium duponti* K1014の生産する耐熱性酸性プロテアーゼ²¹⁾

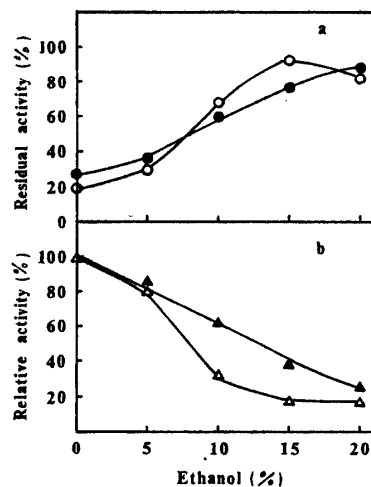


Fig. 5. Effect of ethanol concentration on thermostable protease from rice koji.

(a) Enzyme solutions containing various concentrations of ethanol buffered at pH 4.5 (—○—) and pH 5.0 (—●—) with 0.1 M acetate buffer were incubated at 70°C for 10 min. The activities remaining after the incubation were expressed as percentages of the initial activity.

(b) Hydrolysis of salmine was carried out at 30°C at pH 4.5 (—△—) and pH 7.3 (—▲—) in the presence of various concentrations of ethanol. Relative activities were expressed as percentages of the activity in the absence of ethanol.

は、清酒の火入れ温度域でも活性を示す。そこで、本酵素を予め生酒に強化して 55°C, 30分火入れし、その後 20°C で白ぼけ発生を観察したところ、添加量が増すにつれて白ぼけ発生が促進され、やがてフロックを形成し次第に塩として沈降し、清酒の清澄度が高まるのが認められた。^{13, 22)} しかし、添加量が少ない場合(粗酵素で 0.5 ppm)には長く白ぼけしたままであった。

以上の結果からすると、特に麴歩合の多い清酒などでは、生酒中のプロテアーゼは白ぼけ発生に何らかの影響をおよぼすものと推定される。17~18%の食塩が存在する醤油中と、ほぼ同濃度のエタノールの存在する清酒中とでは、塩発生の環境が非常にちがうので推論の域を出ないが、白ぼけ発生機構も基本的には火入れ塩のそれに類似しているのではなからうか。

7. おわりに

火入れ塩の問題は工業的には火入れ作業と一体のものであり、従来より火入れ塩が早く沈降するように火入れ方法がいろいろと工夫されてきた。しかし、上述したように、火入れ塩は単に火入れ工程だけの問題で

はなく、もとをただせば麴とも関係が深く、もろみ管理にはさらに大きく影響される。火入れ釜一つをとっても、醤油製造における“一麴、二糧入、三火入”は緊密に関係しあっていることがわかり興味深い。

従来、火入れ釜はもろみに戻すことで工業的に支障はなかったが、最近、業界の構造改善と近代化促進を願って各地で生揚製造までの協業化が進んでおり、もろみを持たない工場が増加している。このような工場では、火入れ釜をもろみに戻す処置もできず、火入れ釜処理に手をやくといった新たな問題も生じている。プロテアーゼによる火入れ釜の分解などが検討されてはいるが、まだ問題が完全に解決したとはいえない。テクノロジーアセスメントが叫ばれている折から、火入れ釜の少ない醤油の製造すなわち火入れ釜成分の完全な醤油化の技術の確立が待たれるところである。

終わりに、本研究の遂行にあたり、ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました東京大学農学部藤巻正生教授に心から感謝いたします。また、終始直接のご指導を賜りましたキッコーマン醤油(株)常務取締役、横塚 保博士、ならびに温かいご激励をいただきました社内外の多くの方々に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 二国, 秦編: 食品化学ハンドブック, p. 334, 朝倉書店 (1966).
- 2) 木下: 醸協, **12** (2), 21 (1916).
- 3) 加藤: 醸造学雑誌, **3**, 555 (1925).
- 4) 井上, 川崎: 醸協, **48**, 431 (1953).
- 5) 蛋白混濁研究会編: 清酒の白ぼけについて (1962).
- 6) Wallerstein, L.: U.S. Patents 995820, 995823 ~6 (1911).
- 7) 秋山: 醸協, **58**, 214 (1963).
- 8) 山下: 醸協, **65**, 1103 (1970).
- 9) 山下, 大倉, 河村: 愛食工試, **6**, 27 (1965).
- 10) 蛋白混濁研究会編: 清酒の白ぼけについて, p. 49 (1962).
- 11) Ljungdahl, L., Sandegren, E.: *Proc. Europ. Brewery Conv.*, Baden-Baden, p. 98 (1955).
- 12) 橋本, 横塚: 醸工, **50**, 257 (1972).
- 13) 橋本, 岩浅, 横塚: 醸工, **54**, 21 (1976).
- 14) 橋本, 横塚: 醸工, **52**, 328 (1974).
- 15) Hashimoto, H., Yokotsuka, T.: *J. Ferment. Technol.*, **52**, 747 (1974).
- 16) 蔭山, 杉田: 醸協, **51**, 116 (1956).
- 17) 堀: 醸工, **36**, 6 (1958).
- 18) 蔭山, 杉田: 醸協, **52**, 738 (1957).
- 19) 秋山: 農化, **36**, 825 (1962).
- 20) 佐藤, 大場, 高橋, 梅原: 醸工, **55**, 84 (1977).
- 21) Hashimoto, H., Iwaasa, T., Yokotsuka, T.: *Appl. Microbiol.*, **24**, 986 (1972), **25**, 578, 584 (1973).
- 22) 布川, 齊藤: 醸協, **71**, 286 (1976).

(昭52. 7. 20受付)