大豆煮汁の機能性食品への転換

味噌や納豆などの製造時に副生する大豆煮汁はその高い BOD のために、処理は困難を伴っている。そこで、著者らは大豆煮汁に味噌麹（米）と協会酵母 77 号を用いてエタノール発酵を行った後、酢酸発酵を行うことにより、香味が良好で、発泡性が低下し、機能性を有した醸造酢を製造した。得られた醸造酢の機能性として、抗ラジカル、ACE 阻害、AGE 生成抑制、抗腫瘍、アポトーシス誘導などの活性を有することを明らかにした。さらに、アポトーシス誘導物質としての Compound-6 は、トリプトファンから酵母により生成されるトリプトフォルまたはその誘導体と推定している。本稿ではこれらについて詳しく解説頂いた。

森村 茂・稲垣秀一郎・木田 建次

1. はじめに

味噌や納豆など大豆の蒸煮を伴う食品加工業から排出される大豆煮汁は、高濃度の有機物を含有しているためその処理が困難である。一方で、大豆煮汁には水溶性タンパク質などの有用成分が多く含まれており、有用成分の分離・回収に関する研究¹⁾や乳酸発酵を利用した有効利用法について検討を行った研究²⁾等が報告されている。われわれはこれまでに、焼酎製造工程から排出される蒸留残渣（以後、焼酎粕とする）の有効利用法として、焼酎粕にエタノールと酢酸菌を添加し、好気培養を行うことにより醸造酢を製造する方法を報告した³⁾。また、焼酎粕が有用成分を多く含む種々の生理活性が期待できることから、焼酎粕醸造酢の生理活性について、*in vitro*⁴⁾および*in vivo*⁵⁻⁷⁾の系で評価した結果も報告してきた。

大豆煮汁も焼酎粕と同様に有用成分を多く含んでいることから、大豆煮汁から機能性を有する醸造酢を製造し、製造した醸造酢の生理活性評価を行った。生理活性評価では、より優れた生理活性を有すると期待された黒大豆煮汁を用いて製造した醸造酢を中心に評価を行った。

2. 大豆煮汁からの醸造酢の製造⁸⁾

2.1 麹および酵母の選択

三角フラスコを用いた振とう培養により醸造酢製造を行った結果、大豆煮汁にエタノールと酢酸菌を添加し酢酸発酵を行っても、大豆煮汁に焼酎麹と焼酎酵母を添加しエタノール発酵した後に酢酸発酵しても、生成する酢酸濃度は 48.2 g/l および 48.1 g/l であり約 93% の高い収率で酢酸発酵を行うことができた。しかし、製造した醸造酢の官能試験において、麹と酵母によるエタノール発酵を行わずに食品添加用エタノールを用いて製造した醸造酢は、焼酎麹と焼酎酵母を使用してエタノール発酵させた大豆煮汁上澄液を用いて製造した醸造酢と比較して香味の点で劣っていたので、より香味に優れた醸造酢を製造するために、エタノール発酵に用いる麹と酵母の選択を行った。

最初に、酵母は焼酎酵母で一定とし、麹には清酒麹、焼酎麹、味噌麹（米）、味噌麹（麦）の 4 種類を用いて麹の検討を行った。味噌麹（米）を用いて製造した醸造酢は香りが良く味にも丸みがあって香味の調和が良いと最も高い評価を得た。次に、使用する酵母の選択を行った。麹は味噌麹（米）を用い、酵母は焼酎酵母 1 株と清酒酵母 7 株を使用した。製造した醸造酢の官能試験を行った結果、焼酎酵母よりも清酒酵母の方が香りが華やかで味の丸みも増すとの評価を得た。清

Conversion of Soybean Boiled Extract to Functional Food

Shigeru MORIMURA, Shyuichiro INAGAKI, Kenji KIDA (Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University)

第1表 各工程における ACE 阻害活性 (IC₅₀) および抗ラジカル活性 (IPOX₅₀) の変化

	大豆煮汁→	エタノール発酵	→酢酸発酵
IC ₅₀ (mI/ml)	N. D. ^a	0.05	0.04
IPOX ₅₀ (μI/ml)	0.59	0.61	0.56

^a, N. D., not detected.

酒酵母の中でも協会酵母 77 号の香りは特に華やかであり、香味の調和が良いとの高い評価を得た。協会酵母 77 号はリンゴ酸を主成分とする芳香の高い多酸酒の製造に用いられていることから、芳香の高さと種類が醸造酢の香味に良いバランスを与えたと考えられた。したがって、大豆煮汁から醸造酢を製造する場合、味噌麹（米）と協会酵母 77 号を用いてエタノール発酵を行った後、酢酸発酵を行うのが最適であると判断した。

2.2 発酵槽を用いた回分培養による醸造酢の製造

総容積 3 l の発酵槽を用い、撹拌速度 600 rpm、通気量 0.5 vvm の条件で通気撹拌培養を行いスケールアップの検討を行った。発酵槽を用いて通気撹拌培養を行うと、培養後半に発泡が起こった。麹歩合 4.5% および 9% でエタノール発酵させた大豆煮汁と、使用した元の大豆煮汁の計 3 サンプルの pH を 4.0 に調整し発泡試験を行った結果、麹の添加量に関係なく、エタノール発酵を行うことで発泡が抑制できることがわかった。そこで、エタノール発酵を行った大豆煮汁を用いて再度通気撹拌培養を行った結果、発泡は抑制され、生成酢酸濃度も 44.0 g/l とフラスコ振とう培養よりは若干低いものの 85% の酢酸生成収率が得られた。したがって、麹と酵母を用いたエタノール発酵を行うことにより、醸造酢の香味が向上することに加えて、酢酸発酵において発泡を大幅に軽減できることが明らかとなった。

なお、大豆煮汁に含まれる発泡原因物質として界面活性を持つことが知られているサポニンが考えられたので⁹⁾、次に、エタノール発酵前後でサポニン濃度がどのように変化するか HPLC 分析を行った。図には示さなかったが、大豆煮汁では soyaaponin I および soyaaponin II が検出されたが、エタノール発酵後のサンプルでは検出されなかった。発泡原因物質がサポニンであると断定はできないが、麹と酵母によるエタノール発酵の間に、発泡に関与する可能性のある

soyaaponin I および soyaaponin II が何らかの分解を受けることがわかった。

3. 製造した醸造酢の機能性評価

3.1 *In vitro* 生理活性評価

大豆煮汁から製造した醸造酢は、タンパク質あるいはペプチドを約 2400 mg/l、ポリフェノールを約 200 mg/l 含んでいることから、焼酎粕醸造酢と同様に、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性、抗ラジカル活性、および AGE (advanced glycation end-products) 生成抑制活性などの機能性を有することが期待できた。

そこで、各工程で得られた発酵醪上澄液の生理活性を測定した。第1表に ACE 阻害活性および抗ラジカル活性の測定結果を示した。原料の大豆煮汁には ACE 阻害活性が見られなかったが、エタノール発酵により活性を有するようになった。これは、エタノール発酵において麹や酵母のプロテアーゼにより大豆煮汁中のタンパク質が ACE 阻害活性を有するペプチドに分解されたためと考えた。大豆由来タンパク質の ACE 阻害活性に関する報告はいずれも発酵食品や加水分解物であることから¹⁰⁻¹²⁾、大豆煮汁においても ACE 阻害活性を示すためにはタンパク質の低分子化が必要であると考えられた。

一方、抗ラジカル活性については原料の大豆煮汁、エタノール発酵後、および酢酸発酵後で値がほとんど変化せず、先に報告した⁴⁾ 焼酎粕醸造酢と同等の優れた抗ラジカル活性を示した。したがって、抗ラジカル活性物質は大豆煮汁中に存在し、エタノール発酵あるいは酢酸発酵において主要な構造は変化しないと考えられた。

次に、大豆煮汁および大豆煮汁から製造した醸造酢の AGE 生成抑制活性を測定した。代表的な AGE であるカルボキシメチルリジン (CML) 生成量を測定した結果、大豆煮汁はポジティブコントロールとほぼ

同等の生成量を示し、AGE 生成抑制作用はなかった。しかし、大豆煮汁から製造した醸造酢は焼酎粕醸造酢よりは活性が低い³が、明らかに AGE 生成抑制作用を示した。

3.2 In vivo 抗腫瘍活性評価

焼酎粕醸造酢と同様に、ddY マウスの背部に形成

させた固形腫瘍の増殖抑制作用を調べる *in vivo* 抗腫瘍活性評価⁵⁾を行った。第 1 図に示したように、大豆煮汁醸造酢および大豆煮汁の凍結乾燥物を 0.5% (w/w) 添加した飼料を自由摂取させた群の腫瘍体積増加は、標準飼料のみを自由摂取させたコントロール群と比較して有意に抑制された。また、図には示して

第 1 図 黒大豆煮汁および黄大豆煮汁の *in vivo* 抗腫瘍活性評価

A

B

Abbreviations

第 2 図 大豆煮汁の各画分を用いた U 937 細胞に対する細胞毒性試験

A, ■, WBV; ●, WYV; □, EBV; ○, EYV. B, 各サンプルの Abbreviations の説明

第3図 大豆煮汁醸造酢の各画分の DNA 断片化試験

(A) EBV 画分の濃度の影響 (24h 培養)。M, λ DNA digested with *Hind*III; lane 1, 無添加; lane 2, 1 mg/ml; lane 3, 5 mg/ml; lane 4, 10 mg/ml. (B) EBV 画分 (10 mg/ml) の経時変化。M, λ DNA digested with *Hind*III; lane 1, 無添加; lane 2, 4 h; lane 3, 12 h; lane 4, 24 h.

いないが延命率もコントロール群と比較して有意に増加した。また、黒大豆煮汁醸造酢群は黄大豆煮汁醸造酢と比較して、腫瘍摂取後 18 日以降において、有意に強い抑制効果を示した。

3.3 アポトーシス誘導活性¹³⁻¹⁵⁾

黒大豆煮汁醸造酢の酢酸エチル抽出画分 (EBV 画分) と水層画分の U 937 細胞に対する細胞毒性を調べた。第 2 図に示したように、U 937 細胞の生存率は酢酸エチル画分の培養液への添加によって濃度依存的に減少した。一方、水層画分では影響は見られなかった。したがって、黒大豆煮汁醸造酢中に含まれ、U 937 細胞に対して細胞毒性を示した成分は酢酸エチル層に移行したと考えられた。そこで、EBV 画分を用いて、アポトーシスが誘導されたときに検出される DNA の断片化を調べた。その結果、第 3 図に示したように、U 937 細胞に対して濃度依存的および時間依

存的に DNA の断片化が見られ、アポトーシスが起きていると考えられた。顕微鏡観察においても、10 mg/ml の濃度でアポトーシスが起きていることを示すアポトーシス小体が観察された。さらに、フローサイトメトリー解析において、10 mg/ml の EBV 画分で 12 h 処理した U 937 では、アポトーシス誘導による細胞質膜の転移で起こる Annexin-V 蛍光の増加が見られた。以上の結果から、EBV 画分に含まれる成分は U 937 細胞に対してアポトーシスを誘導することがわかった。

黒大豆煮汁醸造酢・酢酸エチル抽出層の HPLC クロマトグラムを第 4 図に示した。全 10 画分のうち画分 No. 6 (以後、Compound-6 とする) のみがアポトーシスの特徴である DNA 断片化を誘導し、ELISA 法によるアポトーシス誘導の検出法においても電気泳動法による DNA の断片化試験と相関する結果が得ら

第4図 黒大豆煮汁酢酸エチル抽出物の HPLC クロマトグラム。
A, 酢酸エチル抽出物。B, 分画・精製した Compound-6。

れた。また、顕微鏡観察においてもアポトーシス小体の形成が見られた。そこで、Compound-6 の構造解析を行った。

HPLC で Compound-6 を繰り返し分取し、1 l の黒大豆煮汁醸造酢から 6 mg の Compound-6 を回収した。HPLC, NMR および MS の解析結果から、Compound-6 はトリプトフォールもしくはその誘導体と推察された。

アポトーシス誘導は、主にカスパーゼ 8 が活性化される経路とカスパーゼ 9 が活性化される経路があり、いずれも最終的にはカスパーゼ 3 が活性化されて実行因子として作用することでアポトーシスが起る。Compound-6 はカスパーゼ 8 と 9 のどちらを主として活性化することによりアポトーシスを誘導するのかを調べるために、カスパーゼ 3, 8 および 9 の酵素活性を測定した。その結果、第 5 図 A に示したようにカスパーゼ 3 およびカスパーゼ 8 の活性化は見られたが、カスパーゼ 9 の活性化は見られなかった。また、ウェスタンブロット解析を用いて各カスパーゼタンパク質が活性化したときに起る断片化を調べたところ、カスパーゼ 3 およびカスパーゼ 8 の断片化は見られたが、カスパーゼ 9 の断片化は見られなかった。コント

ロールとして、カスパーゼ 3 により切断を受けるポリ (ADP リボース) ポリメラーゼ (PARP) の断片化は確認できた (第 5 図 B)。さらに、Compound-6 による U 937 細胞のアポトーシスに対する各種特異的阻害剤の効果を ELISA 法によるアポトーシスの検定法を用いて調べた。その結果、カスパーゼ 3 阻害剤 (Z-DEVD-FMK) およびカスパーゼ 8 阻害剤 (Z-IETD-FMK) によって抑制されたが、カスパーゼ 9 阻害剤 (Z-LEHD-FMK) によっては抑制されなかった (第 5 図 C, a)。また、Compound-6 による U 937 細胞のカスパーゼ 3 活性はカスパーゼ 8 阻害剤 (Z-IETD-FMK) によって抑制されたが、カスパーゼ 9 阻害剤 (Z-LEHD-FMK) によっては抑制されなかった (第 5 図 C, b)。これらの結果から、Compound-6 はカスパーゼ 8 を経由してカスパーゼ 3 を活性化し、アポトーシスを誘導していると推察された。

カスパーゼ 8 を経由してアポトーシスが誘導される経路をさらに詳細に検討するため、100 μ M の Compound-6 で 1, 2 および 3 h 処理した U 937 細胞の細胞抽出液を用いて免疫沈降 (IP) - ウェスタンブロット (WB) 解析を行った。4 種類のデスレセプター (Fas, DR 4, DR 5 および TNF-R 1) のうち、DR 5

第5図 Compound-6 (tryptophol) によるカスパーゼ活性の誘導。

A, ○, caspase-3; △, caspase-8; □, caspase-9。B, イムノプロット解析。C, 各カスパーゼ阻害剤を用いた解析。ELISA assay (a); カスパーゼ3活性 (b)。** $p < 0.01$ 。

抗体をIP用抗体に用いてカスパーゼ8抗体をWB用抗体に用いた場合にのみ、時間依存的に活性型カスパーゼ8のバンド(42kDa)が強く検出された。したがってCompound-6は、カスパーゼ8を活性化するデスレセプターのうちで、DR5を含むDISC形成を誘導することによってカスパーゼ8を活性化していることが示唆された。

次に、正常な細胞に対するCompound-6の影響を調べるため、ヒト血液から単離した白血球細胞を用いて、WST-8を用いた細胞毒性試験およびDNA断片化試験を行った。正常白血球細胞とU937細胞に対する毒性を比較したところ、Compound-6は正常白

血球細胞に対してよりもU937細胞に対する方が有意に強い毒性を示した(第6図A)。また、Compound-6は正常白血球細胞に対してはDNA断片化を誘導しなかった(第6図B)。さらに、U937細胞においてはカスパーゼ3の活性化が確認されたのに対し、正常白血球細胞では活性化が起らなかった(第6図C)。このように、Compound-6のU937細胞に対する細胞毒性はアポトーシスが誘導されることによって発揮されるのに対して、正常細胞ではアポトーシスが誘導されないために、細胞毒性もU937細胞に対するよりも弱いことが示唆された。

U937細胞と正常白血球細胞に対するCompound-6

第6図 Compound-6のU937と正常白血球に対する作用の比較。

(A) 細胞毒性試験：○，U937；□，正常白血球。(B) DNA断片化試験。U937 (a)；正常白血球 (b)。M，λDNA digested with *Hind* III。(C) Caspase-3活性。無処理 (a)；U937 (b)；正常白血球 (c)。** $p < 0.01$ 。

の作用の違いが何に起因するのかを検討するため、DR5のデコイレセプター（受容体としてリガンドと結合はするがシグナルを伝達しない受容体）であるDcR1，DcR2に着目し検討を行った。U937細胞および正常白血球細胞におけるDcR1とDcR2の発現解析をRT-PCRを用いて行った。第7図Aに示したように、DcR2の発現量は両細胞で変わなかったが、DcR1はU937細胞に比べて正常白血球細胞の方が有意に発現量が高かった。次に、U937細胞にDcR1/pTriEX^{TM}-4 Neoをトランスフェクションした。DcR1の発現量をノーマルなU937細胞と比較したところ有意にDcR1の発現は増強されており、DcR1が導入されたことを確認した（第7図B）。

そこで、U937へのDcR1-トランスフェクタントに対するCompound-6の細胞毒性およびアポトーシス誘導活性を調べた。WST-8を用いた細胞毒性試験では、Compound-6がU937細胞に対してアポトーシスを誘導する濃度範囲（100-200 μM）において、ノーマルと比較してトランスフェクタントの方に細胞毒性の緩和が見られた（第7図C）。また、ELISA法によるアポトーシス誘導活性試験では、ノーマルと比べ

てトランスフェクタントに対してはCompound-6により誘導されるアポトーシスが有意に抑制された（第7図D）。以上のようにU937細胞にDcR1を導入・発現させるとアポトーシス誘導が抑制されたことから、正常白血球細胞においてCompound-6によるアポトーシス誘導が起こらなかったのは、DcR1の発現量が高かったことが一つの要因であると考えられた。

4. Compound-6の生成機構と醸造食品中の含量

4.1 Compound-6の生成機構¹⁶⁾

トリプトファールは、酵母によるトリプトファン代謝産物であることが知られている^{17),18)}。そこで、Compound-6がトリプトファンに由来していることを確かめるために発酵試験を行った。トリプトファンおよび最少培地のみを混合した発酵液中にCompound-6は検出されなかったが（第8図A，B），それらに協会酵母77号を添加した液からはCompound-6が検出された（第8図C）。この結果から、Compound-6は協会酵母77号によってトリプトファンから合成された二次代謝産物であることが確認された。

第7図 U937のDcR1-トランスフェクタントに対するCompound-6のアポトーシス誘導。

A, RT-PCR。B, ノーザンブロット解析。C, 細胞毒性試験 Symbols: ■, mock (U937); ▲, untransfected (U937); ◆, DcR1 transfectant (U937); ●, PBL。D, Untransfected, mock, and DcR1-transfected U937 cells (a), and PBL (b) were incubated in presence (+) and absence (-) of tryptophol (80 μg/ml) for 12 h. ** $P < 0.01$ (U937 vs. DcR1-トランスフェクタント)。

さらに、醸造酢の製造に用いた味噌麹（米）および酵母（協会酵母77号）がCompound-6の産生に関与していることを確認するため、麹抽出液に協会酵母77号を添加して培養し、Compound-6産生の有無を調べた。その結果、麹抽出液の酢酸エチル抽出物中には検出されなかったが、酵母を添加して2日間培養した培養液の酢酸エチル抽出物中にはCompound-6が検出されることが明らかとなった。

4.2 酒類および酒粕類中のCompound-6含量

Compound-6は米麹と酵母を用いてエタノール発酵させたときに生成する副産物である。したがって、焼酎粕中にも含まれることが推測されたため、米焼酎

粕中のCompound-6の有無を、酢酸エチル抽出後、HPLC分析およびMS解析により調べた。その結果、米焼酎粕中にも多くのCompound-6が含まれていることがわかった。これまでの結果から、トリプトファンを含む原料を用いている酒類およびその副産物である酒粕類であればCompound-6が含まれることが予想されたため、無作為に購入した市販の酒類や清酒粕およびビールやワイン中のCompound-6含有の有無を調べた。その結果、A社清酒およびB社酒粕のどちらにもCompound-6が含まれていたが、酒粕中には9.2mg/kg含まれていたのに対し、清酒中の含量は0.7mg/kgと微量であった。また、A社米焼酎、

第2表 各醸造品に含まれる Compound-6 含量の比較

	清酒		焼酎			ビール	ワイン	醸造酢	
	清酒	酒粕	米	芋	麦			米焼酎粕	大豆煮汁
含量 ^a (mg/kg)	0.7	9.2	N. D. ^b	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	11.1	5.6

^a 含量の単位, mg-tryptophol/kg-each product.^b N. D., not detected.

第8図 協会酵母 77 号によるトリプトファンからの Compound-6 生成試験

(A) トリプトファン, (B) 0.04 mg/ml トリプトファン添加最小培地, (C) 発酵液。矢印は Compound-6 を示す。

B 社芋焼酎, C 社麦焼酎や D 社ビールおよび E 社ワインには検出されなかった (第2表)。したがって, エタノール発酵に続いて酢酸発酵を行う醸造酢の製造法は, 先に記載した香味の向上や発泡性の低減に加え, 機能性物質も生成する優れたプロセスであることが明らかとなった。

5. おわりに

大豆煮汁に麴と酵母を添加しエタノール発酵を行った後, 酢酸菌を添加して好気培養を行うことにより醸造酢を製造できた。麴と酵母によるエタノール発酵の過程は, 香味の向上, 発泡性の低減, 機能性物質の生成に寄与することがわかった。

製造した醸造酢の生理活性評価を行った結果, *in vitro* 活性 (抗ラジカル活性, ACE 阻害活性, AGE 生成抑制活性) や *in vivo* 抗腫瘍活性の他に, アポトーシス誘導活性も有することがわかった。単離されたアポトーシス誘導物質 Compound-6 は, その生成機構として, アルコール発酵過程における酵母の二次代謝産物であることを明らかにした。さらに, Compound-6 はエタノール発酵過程を有する醸造食品に共通して含まれることがわかった。疫学的な観点から, 発酵食品はさまざまな機能性を有し, 長い歴史を通じて人々の健康に大きく貢献してきたと考えられており, 近年の分子生物学的技術の進歩により, その機能性が科学的に証明されてきている。Compound-6 も発酵食品の機能性に寄与している可能性が見出されて大変興味深く, 今後も発酵食品特有の機能性を明らかにしていきたいと考えている。

文 献

- 1) 木村 功, 松原保仁, 柴崎博行: 醸協, **92** (7), 478-485 (1997).
- 2) 松田茂樹, 上田誠之助: 醸協, **90** (8), 592-596 (1995).
- 3) 森村 茂, 叶 秀娟, 重松 亨, 木田建次: 生物工学, **80** (9), 417-423 (2002).
- 4) X. J. Ye, S. Morimura, L. S. Han, T. Shigematsu and K. Kida: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68** (3), 551-556 (2004).
- 5) T. Seki, S. Morimura, T. Shigematsu, H. Maeda and K. Kida: *BioFactors*, **22**, 103-105 (2004).
- 6) 森村 茂, 河野邦晃, 韓 蓮淑, 関 孝弘, 重松 亨, 木田建次: 生物工学, **82** (12), 573-578 (2004).
- 7) T. Seki, S. Morimura, S. Tabata, Y. Q. Tang, T. Shigematsu and K. Kida: *J. Agric. Food*

- Chem.*, **56**(10), 3785-3790 (2008).
- 8) 森村 茂, 稲垣秀一郎, 梅崎宗規, 重松 亨, 木田建次: *食科工*, **52**(12), 578-583 (2005).
  - 9) 合谷祥一: *食科工*, **48**(1), 8-13 (2001).
  - 10) H. Y. Yang, S. C. Yang, J. R. Chen, Y. H. Tzeng and B. C. Han: *Br. J. Nutr.*, **92**(3), 507-512 (2004).
  - 11) M. Kuba, K. Tanaka, S. Tawata, Y. Takeda and M. Yasuda: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**(6), 1278-1283 (2003).
  - 12) A. Okamoto, H. Hanagata, Y. Kawamura and F. Yanagida: *Plant Foods Hum. Nutr.*, **47**(1), 39-47 (1995).
  - 13) S. Inagaki, S. Morimura, T. Shigematsu, K. Kida and H. Akutagawa: *Food Sci. Technol. Res.*, **11**(3), 311-317 (2005).
  - 14) S. Inagaki, S. Morimura, K. Gondo, Y. Q. Tang, H. Akutagawa and K. Kida: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**(2), 371-379 (2007).
  - 15) S. Inagaki, S. Morimura, Y. Q. Tang, H. Akutagawa and K. Kida: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**(8), 2065-2068 (2007).
  - 16) 稲垣秀一郎, 森村 茂, 榎藤和修, 湯 岳琴, 芥川浩志, 木田建次: *醸協*, **102**(3), 222-224 (2007).
  - 17) 秋田 修, 井田哲朗, 小幡孝之, 原 昌道: *醸協*, **85**(7), 501-505 (1990).
  - 18) 岡村成通, 渡辺正澄: *醸協*, **76**(9), 629-634 (1981).
-