Rhizopus oryzae のグリセリン高生産および カルバミド低生成変異株の取得と そのみりん醸造への応用

高山卓美・大屋敷春夫・内田正裕・坂井拓夫*

(宝酒造<株>酒類研究所, * 大阪府立大学農学部農芸化学科)

平成5年5月19日受理

Mutation of *Rhizopus oryzae* IFO 4716 to Give High Glycerol and Low Carbamide in *Mirin*-Making

Takumi TAKAYAMA, Haruo OYASHIKI, Masahiro UCHIDA and Takuo SAKAI*
(Alcoholic Beverages Research Laboratories, Takara Shuzo Co., Ltd., Seta
3-4-1, Otsu-shi, Shiga 520-21 and *College of Agriculture, University
of Osaka Prefecture, 1-1, Gakuen-cho, Sakai, Osaka 593, Japan)

In order to improve the quality of *mirin* made with *Rhizopus oryzae* IFO 4716, a mutant, having high glycerol and low carbamide productivities, was induced by using the ultraviolet irradiation. In the first step of mutation, the screening was made for mutants from *Rhizopus oryzae* IFO 4716 (parental strain) with high glycerol accumulation, and a mutant (strain HG-1) that accumulated about 1.9 times (>11% of *koji* wet weight) the glycerol contained in the parental strain was obtained. In a second step, the mutation was induced to the mutant (HG-1) to have low carbamide productivity. Finally, a mutant (strain LC) was obtained that accumulated carbamide less than 4% carbamide comparing with the parental strain in *koji*. The *mirin* prepared with *R. oryzae* LC contained more than 1.0% glycerol and 1.2 ppm carbamide.

Key words: 高グリセリン・低カルバミド生成・変異株・みりん醸造

緒 言

我が国で製造される醸造食品には、一般に *Aspergillus oryzae* を用いた麴が用いられる。しかし、近年、醸造食品の品質の多様化を図る目的で、中国の醸造に用いられる *Rhizopus* 属株の利用が検討されている。*Rhizopus* 属株の醸造への利用として、清酒では蒸し米¹⁾ および無蒸煮米²⁾ を用いた麴の利用が検討されているが、こうした *Rhizopus* を用いて醸造した清酒は、*A. oryzae* の麴を用いた清酒と比較して、アミノ酸含量が少なく、リンゴ酸やフマル酸が多く、有機酸に富んでいる。また醤油^{3,4)} や味噌醸造⁵⁾ でも、品質の多様化を目的として *Rhizopus* 属を用いて調製した麴の使用が検討されている。

著者らは先に、グリセリンを含む新規な品質のみりんを醸造するためグリセリン生産性の優れた菌株を、醸造

食品の製造に用いられている *Rhizopus* 属および *Mucor* 属の菌株から検索し、*R. oryzae* IFO 4716 を選抜した⁶⁾。この菌株のグリセリン蓄積は、培養温度 33℃~35℃、相対湿度 90%~95% で、酸素の供給を制限して7日間培養することが最適であることを見いだした。この条件で調製した麴をみりん原料として評価したところ、グリセリンの蓄積性をさらに向上させ、またカルバミドの蓄積を減少させることが必要であるとの結論に達した。そこで、*R. oryzae* IFO 4716 に多重変異を誘導しグリセリン生産能が向上し、カルバミド生成能が低下した変異株を育種することを検討し、次いでこの変異株のみりん醸造への利用を試みた。

実 験 方 法

1. 供 試 菌 株

R. oryzae IFO 4716 を親株として用い、対照として、

市販のみりん用種もやし (*A. oryzae* TM, 樋口松之助商店, 大阪) を用いた。

2. 使用酵素剤

α -アミラーゼは、枯草菌起源の市販酵素剤 Spitase CP-20 (長瀬産業, 大阪) を用いた⁷⁾。

3. 培地と培養方法

変異誘導に用いる培地は、Czapek 培地を改変して用いた。すなわち、蔗糖 30 g, NaNO_3 2.0 g, K_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, Triton X-100 0.24 g を 1,000 ml の蒸留水に溶解し、pH 6.0 に調整したものを培地とした。Triton X-100 は、寒天プレート上でコロニーの形成を容易にさせる目的で用いた⁹⁾。

グリセリン生産用培地は、デンプン 20 g, NH_4NO_3 2.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, および蒸留水 1,000 ml よりなる培地 (pH 6.0) を用い、寒天培地の場合、それぞれの培地へ寒天 15 g (Difco Laboratories, Detroit) を添加した。

4. 蒸し米と麴の調製

精白米 (*R. oryzae* 麴の培養は、90% 精白、それ以外は 85% 精白) を洗米し、室温で 12~24 時間浸漬した。ステンレス網で水切りした後、浸漬梗米およびもち米を、オートクレープで、それぞれ 100°C または 124°C で 20 分間蒸きょうした。

R. oryzae IFO 4716 の胞子をグリセリン生産用寒天培地に接種し、30°C で 7 日間培養して、胞子を着生させ種胞子として用いた。

R. oryzae の麴は、次のような方法で調製した。すなわち、蒸し梗米 150 g を、両面それぞれ 40 箇所の通気孔 (1.15 mm ϕ) を設けナイロン袋-L (120 $\times$ 170 $\times$ 10 mm) に入れ、胞子 150 mg を接種した。変異株の活性測定の場合は、蒸し梗米 20 g を両側にそれぞれ 7 箇所の通気

孔を設けたナイロン袋-S (50 $\times$ 70 $\times$ 10 mm) に入れ、胞子 20 mg を接種したものを用いた。培養は、33°C、相対湿度 90%~95% で 3 日間行った。

また、*A. oryzae* TM の場合は、蒸し梗米 150 g を 500 ml 容三角フラスコに入れ、種もやし 150 mg を接種し、30°C で 2 日間培養した。

5. 麴から粗酵素の調製

粗酵素の調製は、国税庁所定分析法注解⁹⁾ によって麴より抽出した。

Glycerophosphatase (GPase) は、麴 10 g を 0.1 M 燐酸緩衝液 (pH 5.0) に懸濁し、ホモゲナイザー (広沢鉄工所, 東京) を用いて、5°C で 10,000 rpm, 5 分間処理した。これを、2,000 ml の蒸留水に対して 5°C で 24 時間透析し、蒸留水で 35 ml としたものを酵素として用いた。

6. 変異誘導の条件

変異は、紫外線照射により誘導した。すなわち、田中ら¹⁰⁾の方法に従って、紫外線ランプ (15 W) を用い、30 cm の距離から、0.01% Tween 80 溶液中に懸濁した *R. oryzae* IFO 4716 の胞子へ紫外線照射し、変異誘導した。この条件で、紫外線を 20 分間照射した場合、胞子の生存率は、0.001% であった。グリセリン高生産・カルバミド低生成変異株の取得手順を Fig. 1 および Fig. 2 に示す。

7. 酵素活性の測定

α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの活性は、アルカリで糊化した馬鈴薯デンプンを用いて内田ら⁷⁾の方法により測定した。プロテアーゼ活性は、0.1 M 乳酸あるいはアルカリで溶解したミルクカゼインを基質として内田ら⁷⁾の方法により分析した。

酸性カルボキシペプチダーゼ (ACPase) 活性は、carbobenzoxy-glutamyl-tyrosine (Cbz-Glu-Try) を基質として中台ら¹¹⁾の方法で測定し、pH 5.0, 30°C, 60 分間

Fig. 1 Procedure for the isolation of mutants of *R. oryzae* IFO 4716 with high glycerol production.

Fig. 2 Procedure for the isolation of low carbamide formation mutants from a high glycerol production mutant.

に $1\text{ }\mu\text{g}$ のチロシンを生成する酵素量を 1 単位とした。
Transglucosidase (TGase) 活性は、国税庁所定分析法
注解¹²⁾に準拠して測定し、pH 5.0, 40°C, 60 分間に、基
質とした α -methyl-D-glucoside から $1\text{ }\mu\text{g}$ のグルコース
を生成する酵素量を 1 単位とした。

GPase 活性は、宮川の方法¹³⁾を改変して測定した。す
なわち、450 mM 磷酸緩衝液 (pH 5.0), 2% 可溶性デン
ブリン, 2% sodium glycerophosphate (GP) および
1.75 ml の酵素液を含む反応液 5.5 ml に防腐のために
トルエン 0.2 ml を添加して、24 時間反応させ、生じる
グリセリンを F-Kit (ペーリンガー・マンハイム 山之内、東京) を用い酵素法により定量することにより測定
した。

8. もろみの調整

特に断らない限り、麴 930 g, 蒸しもち米 6,280 g を
35% アルコール 2,790 g とを混合し、30°C で 30 日間
反応させた。

9. 分析法

全糖、窒素およびアルコールは既報の分析法により測
定した¹⁴⁾。グリセリンおよびカルバミドは、食品用 F-
Kit (ペーリンガー・マンハイム 山之内、東京) を用いて
分析した。

糖組成は、ペーパークロマトグラフィーにより¹⁵⁾, ア
ミノ酸は、アミノ酸自動分析装置 (JLC-300, 日本電子,
東京) を用いて分析した¹⁶⁾。

結果および考察

1. *R. oryzae* IFO 4716 のグリセリン高生産変異株 の取得

R. oryzae IFO 4716 (親株) の胞子を用い、Fig. 1 に
示す変異誘導の処理手順に従って、紫外線照射して得た
900 個の胞子をグリセリン生産用の液体培地 6 ml に接
種し、30°C で 2 日間振とう培養を行った。これらの中か
ら、親株のグリセリン生産能 (4.3% w/v) の約 1.5 倍
に相当する 7% (w/v) 以上のグリセリンを蓄積した 22
菌株を選んだ。次に、これらを用いて米麴を調製し、グ
リセリン生成能を評価した。すなわち、それぞれの胞子
を通気孔をあけた検索用ナイロン袋-S 中の蒸し米に接
種し、33°C で 7 日間培養した。培養後、麴中のグリセリ
ン含量を測定し、グリセリン 12% (w/w) を蓄積するグ
リセリン高生産変異株を 1 株 (HG-1 株) を得た。

2. *R. oryzae* HG-1 株よりカルバミド低生成変異 株の誘導

HG-1 株を親株としてカルバミド低生成変異株の誘導
について検討した。カルバミドは、主としてアルギニン
からアルギナーゼによって生成すると考えられるので、
カルバミド低生成の変異株は、アルギニンを要求する変
異株中に多く存在すると考えられた。一方、アルギニン
を要求する菌株は蒸し米上では、生育が悪いと考えられ
るので、良好に生育するためには、蒸し米中のタンパク
質からアミノ酸を生成する ACPase 活性の強いことが必
要であろう。そこで、グリセリン高生産株 (HG-1) を、
Fig. 2 に示す手順で変異させ、アルギニンを不完全に要

求する leaky mutant 34 株を分離した。それらの胞子を活性測定用のナイロン袋-S に入れた蒸し米に接種し 33℃で7日間培養して麴を調製し、この麴中のグリセリン、カルバミドおよび ACPase 活性を測定した。その結果、12%(w/w) のグリセリンを蓄積し、カルバミド含量が顕著に減少し、かつ ACPase 生産性の高まった生育良好な変異株 (*R. oryzae* LC) を得た。

3. *R. oryzae* LC, HG-1 株および親株で調製した麴のグリセリンおよびカルバミド蓄積量の比較

変異株および親株で調製した麴のグリセリンおよびカルバミドの蓄積を比較した。Table 1 に示すように、LC 株の場合、グリセリンの蓄積量は親株の 6.2% から 11.8% と約 1.9 倍に増加し、カルバミドの蓄積は親株の 254 ppm から 17 ppm と顕著に減少した。また、Table 2 に示すように LC 株および親株の麴中に蓄積したグリセリンの消費グルコースの収率は、それぞれ 29.2% および 14.4% で、LC 株麴のグリセリン収率は、親株の約 2 倍であった。

4. LC 株および親株の粗酵素による GP からグリセリン生成の比較

グリセリン生産においては、GP から脱磷酸してグリセリンを生成する反応が鍵反応と考えられる。そこで、LC 株と親株の GP からのグリセリン生成活性を比較した (Fig. 3)。LC 株を用いた場合、0.49 mg/min/g 麴 (dry wt) のグリセリン生成活性を示し、親株の 0.31 mg/min/g 麴 (dry wt) の約 1.3 倍に向上していた。このことから、*R. oryzae* では、GP からグリセリンへの脱磷酸反応の活性が、グリセリンの蓄積と密接に関係していることが強く示唆される。

5. LC 株、親株および *A. oryzae* TM で調製した麴の主要酵素の活性の比較

麴中の主要酵素、 α -アミラーゼおよびプロテアーゼ

Table 1 Glycerol and carbamide concentrations in *kōji* prepared with *R. oryzae* IFO 4716 and its mutants.

Component	<i>R. oryzae</i> IFO 4716	Mutant HG-1 (high glycerol production)	Mutant LC
Glycerol (g/100 g <i>kōji</i>)	6.2	12.1	11.8
Carbamide (mg/kg <i>kōji</i>)	254.0	226.3	17.2

Fig. 3 Changes with time in glycerol formation from glycerophosphate by crude enzymes of *kōji* with *R. oryzae* IFO 4716 (○) and its mutant LC (●).

glycerol forming activity; IFO 4716 : 0.31 mg/min/g *kōji* (dry wt), mutant LC : 0.49 mg/min/g *kōji* (dry wt).

は、米粒中のデンプンやタンパク質を消化・溶解するので、みりんの生産性と密接に関係する重要な酵素である。グルコアミラーゼ、TGase および ACPase は、みりんの糖やアミノ酸の組成に関係する酵素で、品質に与える影響が大きい。そこで、LC 株、親株および *A. oryzae* TM で麴を調製し、それら主要酵素の活性を測定した。その結果を Table 3 に示すが、これらの酵素活

Table 2 Yield of glycerol from starch in rice with *kōji* prepared with *R. oryzae* IFO 4716 and its mutants.

	<i>Kōji</i> prepared with		
	<i>R. oryzae</i> IFO 4716	Mutant HG-1 (high glycerol production)	Mutant LC (<i>R. oryzae</i> LC)
<i>Kōji</i> obtained ^{a)} (g)	106.7	108.5	109.2
Sugar as glucose (g)	35.0	36.1	38.0
Glycerol (g)	6.8	13.2	12.9
Consumption of glucose (g)	46.2	45.1	43.2
Yield of glycerol ^{b)} (%)	14.4	28.6	29.2

a) *Kōji* was prepared with steamed rice (150 g) containing 54.9% sugar as glucose.

b) Yield of glycerol is shown as a percentage corresponding to the theoretical yield of glycerol (184 g) from the consumed glucose (180 g).

Table 3 Activities of some enzymes in *koji* prepared with *R. oryzae* IFO 4716, its mutant, and *A. oryzae* TM.

Enzymes	Enzyme activities in <i>koji</i> prepared with		
	<i>A. oryzae</i> TM	<i>R. oryzae</i> IFO 4716	Mutant LC
α -Amylase (DU·g ⁻¹ <i>koji</i>)	224	72	81
Glucoamylase (GU·g ⁻¹ <i>koji</i>)	102	45	52
Protease (PU·g ⁻¹ <i>koji</i>)			
at pH 3.0	131	120	142
at pH 6.0	74	72	94
Transglucosidase (units·g ⁻¹ <i>koji</i>)	55	0	0
Acid carboxypeptidase (units·g ⁻¹ <i>koji</i>)	6,470	346	675

1. DU : Dextrogenic unit, GU : glucose forming unit, PU : proteolytic unit.
2. Transglucosidase : 1 unit was defined as enzyme activity (pH 5.0) forming 1 μ g glucose from α -methyl-D-glucoside at 40°C for 60 min.
3. Acid carboxypeptidase : 1 unit was defined as enzyme activity (pH 5.0) forming 1 μ g tyrosine from Cbz-Glu-Tyr at 30°C for 60 min.

性を, LC 株と親株と比較すると, ACPase 活性のみが, LC 株では親株の約 2 倍に高まっている。

次に, *R. oryzae* LC 株あるいは *A. oryzae* TM を用いた麴の主要酵素活性を比較した。LC 株を用いた麴の α -アミラーゼ活性は, *A. oryzae* TM 麴の場合と比べて低く, 従って LC 株を用いて *A. oryzae* TM 麴を用いた場合と同等のみりんの収率を保つには, みりんもろみ中に α -アミラーゼ活性の補強が必要と考えられる。原料中のタンパク質の分解・溶解は, プロテアーゼの関与するところが大いだが, pH 6.0 と 3.0 で測定したプロテアーゼ活性は, LC 株を用いた麴と, *A. oryzae* TM を用いた麴とでは大きな差が認められなかった。

麴に蓄積される有機酸は, みりんもろみ中の pH に影響を与え, みりんの味覚に影響する。そこで, 麴消化液の pH および麴中の有機酸を分析した (Table 4)。すなわち, *R. oryzae* LC および *A. oryzae* TM で調製した

Table 4 Organic acids in *koji* prepared with *R. oryzae* LC and *A. oryzae* TM.

Organic acid	Organic acid (mg/100 g <i>koji</i>)	
	<i>A. oryzae</i> TM	<i>R. oryzae</i> LC
Acetic acid	21	4
Lactic acid	51	11
Citric acid	9	67
Malic acid	10	85
Succinic acid	9	15
Fumaric acid	0	2
Total	100	184

麴 20 g を 100 ml の蒸留水に混合し, 55°C, 24 時間反応させた。反応濾液の分析から, LC 株を用いて調製した麴の場合, 全有機酸量は 184 mg/100 g 麴で, *A. oryzae* TM を用いて調製した麴の約 1.8 倍であった。この

Table 5 Chemical composition of *mirin* made with *koji* prepared with *A. oryzae* TM, *R. oryzae* IFO 4716, and its mutant (*R. oryzae* LC).

Component	<i>A. oryzae</i> TM	<i>R. oryzae</i> IFO 4716	Mutant (<i>R. oryzae</i> LC)
Total sugar as glucose (%)	40.1	40.2	40.2
Reducing sugar as glucose (%)	36.7	32.9	33.1
Glycerol (%)	0.0	0.6	1.1
Nitrogen (%)	0.076	0.051	0.063
Amino-nitrogen (%)	0.026	0.016	0.021
Carbamide (mg/kg <i>mirin</i>)	0.0	21.5	1.2
Ethanol (%)	10.2	10.2	10.2
Acidity (ml 0.1N NaOH/10ml)	0.45	1.13	1.10
pH	5.56	5.01	5.03
Specific gravity at 15°C	1.161	1.162	1.162
Yield of <i>mirin</i> (g) (<i>mirin</i> g/ <i>mirin</i> mash g)	6.670 (0.667)	6.540 (0.654)	6.550 (0.655)

Table 6 Sugar composition in *mirin* prepared with *R.oryzae* LC and *A.oryzae* TM.

Sugar	<i>A.oryzae</i> TM		<i>R.oryzae</i> LC	
	Content (g/100g)	Composition (%)	Content (g/100g)	Composition (%)
Glucose	34.5	86.1	31.5	78.4
Maltose	1.3	3.2	1.0	2.5
Isomaltose	0.8	2.1	0.5	1.2
Panose	0.7	1.7	0.4	1.0
Isomaltotriose	0.5	1.3	0.3	0.7
Tetraose and other				
Oligosaccharide	2.3	5.6	6.5	16.2
Total	40.1	100.0	40.2	100.0

反応液の pH が 5.1 であり、みりんもろみの pH も 5.6 付近であるのでプロテアーゼの反応最適 pH とほぼ一致しており、*R.oryzae* LC で調製した麴を用いても、もろみへのプロテアーゼの補足は必要ないものと考えられた。

6. *R.oryzae* LC および親株で調製した麴を用いたみりんの小仕込試験

R.oryzae LC および親株で調製した麴を用いて、みりんの小仕込試験 (10 kg) を行った。ここで、 α -アミラーゼは、*A.oryzae* TM を用いた場合と同水準になるように *R.oryzae* LC 麴および親株麴のもろみへ補足した。このもろみを 30°C で 30 日間反応させた。反応後、みりんともろみ粕に分離し、みりん収率を求め、成分分析を行った (Table 5)。その結果、これらの麴を用いたみりんの収率および全糖含量はほぼ同じであり、全窒素およびアミノ態窒素もほぼ同じであることが見いだされた。また、*R.oryzae* LC の麴を用いるみりんは、1.1% のグリセリンを含有し、カルバミドは 1.5 ppm 以下であった。また、糖、有機酸およびアミノ酸組成を分析した。Table 6 に示すように、*R.oryzae* LC の麴で調製したみりんは、全糖量では *A.oryzae* TM 麴のみりと略同じであったが、グルコース、マルトースおよびイソマルトース、パノースやイソマルトトリオース等のイソマルトオリゴ糖が少なく、テトラオース等のオリゴ糖が多く含まれていた。この理由として、*R.oryzae* LC 麴では、 α -アミラーゼを添加しているが、グルコアミラーゼ活性は *A.oryzae* TM 麴の略 1/2 で、そのためオリゴ糖が分解されず多く残存し、また TGase が生産されないでイソマルトオリゴ糖の生成が少ない。これに対して、*A.oryzae* TM 麴ではグルコアミラーゼ活性が LC 麴の約 2 倍と高く、そのためデンプンはグルコースまで分解される。また、TGase 活性が高い (55 u/g 麴) ので、イソマルトオリゴ糖が多く生成されることが考えられ

Table 7 Organic acids in *mirin* prepared with *R.oryzae* LC and *A.oryzae* TM.

Organic acid	<i>A.oryzae</i> TM		<i>R.oryzae</i> LC	
	Content (mg/100g)	Composition (%)	Content (mg/100g)	Composition (%)
Acetic acid	1.7	20.0	0.5	2.8
Lactic acid	4.5	53.0	1.0	5.5
Citric acid	0.8	9.4	5.9	32.8
Malic acid	0.7	8.2	7.5	41.7
Succinic acid	0.8	9.4	1.3	7.2
Fumaric acid	0.0	0.0	1.8	10.0
Total	8.5	100.0	18.0	100.0

る。このように、両者のイソマルトオリゴ糖の生成機作に違いがあると推定される。また、Table 7 から *R.oryzae* LC を用いた麴のみりんは、*A.oryzae* 麴のみりんの 2 倍以上の有機酸を含み、後者では酢酸 (20.0%) と乳酸 (53.0%) が主であるのに対し、前者ではリンゴ酸 (41.7%) とクエン酸 (32.8%) が主で、風味の点でも優れた有機酸組成であると考えられた。

みりんのアミノ酸組成を Table 8 に示す。*R.oryzae* LC の麴を用いたみりんのアミノ酸量は、*A.oryzae* TM の場合の約 60% 程度であるが、アミノ酸の含量比はほぼ同じであった。

このように、*R.oryzae* LC を用いて醸造したみりんは、1% 以上のグリセリンを含み、カルバミド含量は 1.5 ppm 以下となっており、その上クエン酸やリンゴ酸に富んでおり、従来のみりんの異った品質であった。こうしたことからこの菌株は品質の多様化の面から実用に供し得ることが明らかとなった。

要 約

1. *R.oryzae* IFO 4716 で調製した麴のみりんへの適性を評価したところ、グリセリン生産能の向上とカルバ

Table 8 Free amino acids in *mirin* prepared with *R. oryzae* LC and *A. oryzae* TM.

Amino acid	Amino acid (ppm) in <i>mirin</i> prepared with	
	<i>A. oryzae</i> TM	<i>R. oryzae</i> LC
Asp	335	172
The	133	94
Ser	257	127
Glu	591	280
Pro	160	112
Gly	162	94
Ala	324	253
Val	212	118
Cys	10	1
Met	105	63
Ile	143	82
Leu	371	301
Tyr	240	154
Phe	247	137
His	88	56
Lys	262	142
Arg	534	310
Total	4,174	2,496

ミド生成能を低下させることが必要であると考えられた。

2. そこで、まずグリセリン生産能の高い変異株を誘導し親株の約 1.9 倍のグリセリン (約 12% w/w) を蓄積する菌株を得た。

3. 次にこの変異株の変異誘導によって、グリセリン生産能が約 11% (w/w) と高く、カルバミドの生成が親株の約 7% に低下 (17.2 ppm) し、ACPase 活性が、親株の 2 倍に向上した多重変異株 (*R. oryzae* LC) を取得した。

4. この *R. oryzae* LC 麹を用いたみりんの収率は、 α -アミラーゼ酵素を添加することによって、*A. oryzae* 麹を用いる場合とほぼ同じにすることができた。

5. このみりん中には、1% 以上のグリセリンが含まれ、リンゴ酸とクエン酸に富んだ品質の優れたものであった。

6. *R. oryzae* LC 麹を用いたみりん中のカルバミド含量は、親株麹のみりんに比べて顕著に減少し、1.5 ppm 以下になった。

終わりに臨み、ご指導ご鞭撻を賜りました当社酒類事業部門常務取締役矢野忠徳副本部長に感謝致します。

文 献

- 1) 中村武司, 来間建次, 嶋崎孝行, 斉藤国弘, 島田豊明, 小武山温之: 醸協, 68, (3) 191 (1973)
- 2) 菅野信男, 藤井 均, 梅田修治, 福田 整, 佐藤信: 醸協, 77, (5) 333 (1982)
- 3) 海老根英雄, 木村 晴雄, 和高 等: 調味科学, 15, (3) 10 (1968)
- 4) 海老根英雄, 松浦 護: 調味科学, 16, (4) 15 (1969)
- 5) 原山文徳, 安平仁美: 醸協, 80, (4) 281 (1985)
- 6) 高山卓美, 大屋敷春男, 内田正裕, 坂井拓夫: 醸協, 88, (11) 895 (1993)
- 7) M. UCHIDA, H. OYASHIKI, G. NAGAHAMA, and S. OKA: *J. Ferment. Technol.*, 61, 127 (1983)
- 8) 石川辰夫: 遺伝子実験法講座, 3, 156 (1982)
- 9) 注解編集委員会編: 第3回改正国税庁所定分析法注解, p. 213, 日本醸造協会 (1984)
- 10) 田中利雄, 岡崎直人, 五味勝也, 今野 宏, 井出光彦: 醸協, 79, (4) 274 (1984)
- 11) 中台忠信, 那須野精一, 井口 信義: 調味科学, 18, (10) 41 (1971)
- 12) 注解編集委員会編: 第3回改正国税庁所定分析法注解, p. 463, 日本醸造協会 (1984)
- 13) 宮川浩平: 農化, 12, 74 (1936)
- 14) M. UCHIDA and S. OKA: *J. Ferment. Technol.*, 61, 13 (1983)
- 15) N. E. WELKER and L. L. CAMPBELL: *J. Bacteriol.*, 86, 687 (1963)
- 16) H. OYASHIKI, M. UCHIDA, A. OBAYASHI and S. OKA: *J. Ferment. Bioeng.*, 67, 1 (1989)