酒類醸造およびパン製造のための有用酵母の育種

泡なし清酒酵母は、現在では清酒製造の主流を占め、冷蔵生地製パン法を可能とする酵母はパンの製造工程に画期的な方法である。このように筆者らが行ってきた酵母の基礎的な研究が、酵母による発酵食品の発展につながっている。本稿では筆者らが行ってきた研究の成果について、有用酵母の育種を中心に解説していただいた。

大 内 弘 造

今年の4月13日に、筆者は第41回科学技術功労者表彰（科学技術庁長官賞）を受けた。対象となった業績は「酒類及びパンの製造における有用酵母の育種と利用技術の開発」で、具体的には次の5つの項目を含んでいる。即ち、①酒類醸造における野生酵母の汚染防除技術、②清酒製造の生産性向上技術、③清酒の多様化技術、④パン製造の作業性改善技術、及び、⑤アルコール発酵能等の遺伝解析技術である。この度、本誌に発表の機会をいただいたので、各項目の内容について簡単に紹介する。ほとんどは報告済みなもので、詳しくは原報を参照していただきたい。

1. 酒類醸造における野生酵母の汚染防除技術

筆者が酒造業界に入った昭和35年頃は、野生酵母による酒母やもろみの汚染が重大な問題であった。当時は、協会1号酵母が発売されて以来、既に50年余が過ぎ、協会6号、7号酵母等の酒母への接種が習慣化していたにもかかわらず、多くの酒造場で野生酵母による汚染が起こっていた。このことがはっきりしたのは、古川・秋山のTTC染色法¹⁾および菅間らの β -アラニン法²⁾によって、協会酵母と野生酵母とが容易に識別できるようになったからである。これらの方法を用いて野生酵母による汚染状況の全国調査が行われた結果、汚染度100%、つまり、せっかく協会酵母を使用しながら野生酵母だけで酒を造っている酒造場も珍しくないという、驚くべき事実が明らかになったのである³⁻⁵⁾。

野生酵母は何処から入り込むのだろうか。その最大

の汚染源として、当然ながら麴が考えられた。麴中には野生酵母が1g当たり平均して 6.3×10^5 もあり、TTCでピンクに染まる酵母が33%を占めるという研究が発表され⁶⁾、それを裏付けるかにみえた。しかし、それでは麴から持ち込まれる野生酵母は余りにも多く、普通速醸酒母の場合、協会酵母のアンプルを1,2本接種したらくらいでは、純粋培養は全く望めなくなる。本当にそうだろうか。

筆者は、このような疑問から「麴中の酵母の生態」を研究することになった⁷⁾。一連の研究によって分かったことは、麴中には多数の酵母がいるが、それは酒母やもろみのように酸素の乏しい環境では、繁殖できない“雑酵母”であった。では、酒母やもろみで繁殖できる野生酵母（以下、野生清酒酵母という）は、麴中にどれくらいいるのだろうか。調査したところ、麴1g当たり最大でも 10^3 であり、平均すれば 10^1 程度であった⁸⁾。これだけ少なければ、普通速醸酒母の場合でも、協会酵母をアンプル1,2本分接種するだけで、純度100%を確保できるはずである。こうして、協会酵母を接種することの有効性が示唆された。

しかし、現実には野生清酒酵母による汚染が頻繁に起こっていた。それは何故だろうか。それは、協会酵母の接種時期を遅らせているためと考えられた。当時は酒母の“早湧き”を恐れる風習があり、仕込みと同時に協会酵母を接種しないメーカーが多かった。そのために、協会酵母を接種する頃には、すでに酒母中で野生清酒酵母が増殖していたのである。

なお、麴中の酵母数を測定するのは簡単ではない。

麹カビが邪魔になるし、圧倒的多数の雑酵母（酒母やもろみでは繁殖できない種類の酵母）と少数の野生清酒酵母を区別しなければならない。筆者らは、アルカリ性ピロガロールを脱酸素剤とする嫌気培養法を開発して、その問題を克服した。現在のように脱酸素剤が市販されていなかった頃である。また、詳細は省略するが、製麹過程の麹カビ、雑酵母、清酒酵母の増殖を定量的に調べ、雑酵母に比べて野生清酒酵母が数オーダーも少ない理由を知ることができた⁹⁾。

さて、野生酵母による汚染を防ぐため、その啓蒙運動が展開され、“協会酵母の接種を酒母仕込みと同時に行うべし”という思想が浸透していった。その結果、野生酵母の汚染度は急速に低下した。それに伴って、もろみの滴定酸度も減少し、芳香も高くなり、ソフトな酒質に変化していった。以前は、もろみの滴定酸度が3 ml を越える酒造場も珍しくなく、重い酒質が多かったのである。

ところが、酒母の仕込み時にきちんと協会酵母を接種していたにもかかわらず、野生清酒酵母の汚染が一向に減らない酒造場があり、それは、キラー酵母が棲みついているためというショッキングな研究が発表された¹⁰⁾。キラー酵母は、ある種のタンパク質を生産して清酒酵母などの *Saccharomyces cerevisiae* を殺す。それは、協会酵母 100 個の中に 1 個が侵入しただけでも全滅させるほど強烈である。しかし、雑酵母や麹カビなどは全く殺さない。もちろん、人畜にも無害である。

調査してみると、このようなキラー酵母は全国の酒造場に、かなり広く分布していることが分かった¹¹⁾。そこで、野生キラー酵母の攻撃を防ぐために、協会酵母自体をキラー酵母に変えることを考えた。かりに、協会 7 号酵母と野生キラー酵母 No. 88 との間で交配を行ったとしよう。この交配株はキラー酵母となる。しかし、交配株には No. 88 株からの核遺伝子が半分混じるので、よい酒の醸造は望めなくなる。そこで、交配株に協会 7 号を何回も戻し交配して、No. 88 株由来の核遺伝子を希釈した。こうして造成された戻し交配株は、野生キラー酵母の攻撃を受けることなく、協会 7 号と同様に良酒を醸造した¹²⁾。次いで、核融合欠損変異 (*kar1* 変異) という、交配又は細胞融合を行っても雑種化しない変異酵母を利用して「細胞質導入」を行い¹³⁾、またその他の方法によって、協会 7 号の核

遺伝子を変えずにキラー化した。これらの優良キラー酵母は、一部の酒造場で使用された。しかし、広く利用されることはなかった。そうしなくても、いつのまにか野生キラー酵母は駆逐されてしまったのである。酒造メーカーの微生物管理は、それだけレベルが高かった証拠であろう。その後、上記のキラー化技術はワイン酵母、ビール酵母、アルコール酵母などで優良キラー酵母の育種に応用されている。

今では、野生酵母の汚染に苦しむ清酒メーカーは皆無であろう。そのような時代があったということも、すでに昔話になっているのかもしれない。

2. 清酒製造の生産性向上技術

大正 5 年 (1906 年) に、当時、広島税務監督局の高橋源次郎¹⁴⁾ 及び醸造試験所技師の善田猶蔵¹⁵⁾ は、広島県又は広島県と埼玉県との酒造場で高泡の掛からないもろみに遭遇し、そこから珍しい酵母を分離した。彼らは、それが清酒もろみで高泡を形成しないことを証明し、また、それを使えば同一容器を以って多量の仕込みが可能であるとして、有用性を指摘した。しかしながら、彼らの酵母は保存さえされずに、見捨てられてしまった。当時は、“泡なし”であるメリットが少なく、むしろ、異常現象は酒が腐る前兆として恐れられたからだろう。泡の発生は、清酒醸造にかぎらず大変厄介な問題である。彼らの発見は、発酵工業での極めて大きな業績のはずであったが、学界からも注目されることなく忘れ去られたのである。

1963 年になって、秋山¹⁶⁾ は、島根県の一酒造場から泡なし A 酵母を発見した。当時は、清酒の生産が需要に追いつかない時代であり、酒造工場の新設や仕込み規模の大型化が図られていた。そのため、増産に結びつく泡なし酵母は一躍脚光を浴び、大規模な試験醸造が行われた。しかし、その清酒は協会 7 号酵母のものに比べて酒質が劣ることなどから、実用化には至らなかった。ただし、この泡なし A 酵母は、この後で述べる協会 701 号、901 号等の開発に大きな役割を果たすことになった。

1968 年に大内と秋山¹⁷⁾ は、協会 7 号を親株として泡なし変異株の分離に成功した。次いで、協会 6 号、9 号からも泡なし変異株を分離した¹⁸⁾。これらの変異株は、親株の協会酵母と同様に良質の清酒を醸造したので、速やかに現場に受け入れられた。それが現在の

協会 701 号, 901 号等である。協会 701 号の育種は、実用酵母の分野で人為的な変異株が広く製造現場に採用された、世界最初の成功例である。

さて、協会 701 号等の育種に際して、泡なし A 酵母に関する次の 2 つの研究がヒントになった。その一つは、泡なし A 酵母は、普通の清酒酵母とは細胞表層の帯電状態が違うため、乳酸菌と混合しても静電的な細胞凝集が起これないという百瀬らの研究¹⁹⁾、もう一つは、泡なし A 酵母は、気泡の周りに吸着しないという熊谷らの発見である。これらの特異的な物理化学的性質の違いに着目して、泡なし変異株を選択的に分離する 2 つの方法、すなわち細胞凝集 (Cell agglutination) を利用する方法と泡立て (Froth flotation)

tion) を利用する方法を開発した (第 1 図)。これらの方法を用いて、最初に協会 7 号から泡なし変異株を分離した。その変異株は、協会 7 号と同じく β -アラニン培地で温度感受性 (25°C では増殖可, 35°C では増殖不可) という特異的な遺伝マーカーを保持しており、確かに協会 7 号を親株とすることが証明された。その後、他の研究者によっても協会 1001 号はじめ、種々の泡なし変異株が分離されており、現在、清酒の約 8 割は、これら泡なし酵母によって製造されているものと推定される。

泡なし変異株は、なぜ高泡をつくらないのだろうか。その原因は細胞表層構造の変化にあるはずである。そこで、変異株の細胞表層構造がどう変わったの

第 1 図 2 つの泡なし変異株分離法

凝集法 (Cell agglutination method) では「乳酸菌と親型細胞の凝集沈殿と上部の懸濁細胞の培養」を凝集性に変化が見えるまで繰り返す。泡立て方 (Froth flotation method) では、「泡立てによる親型細胞の棚上げと下部残存細胞の培養」を泡立ちに変化が現れるまで繰り返す。

か、その解析を行った。しかし、細胞壁の成分分析や血清学的な解析では親株との間に差が見出せず²⁰⁾、当時の技術レベルでは解明できなかった。ただ、各種酵素処理による細胞表層の物理化学的变化などから、次のことは推察できた。すなわち、親株では疎水領域をもつタンパク質が細胞表層に露出しているが、泡なし変異株ではそれが露出していないことである²¹⁾。しかし、そのタンパクを特定することはできなかった。また、遺伝学的には、泡なし性は泡あり性に対して劣性であり、高泡形成に関与する *FRO1* 遺伝子の存在を想定することができたが²²⁾、その遺伝子の詳細な解析はできなかった。また、遺伝子工学の手法がなかった時代である。

最近、国税庁醸造研究所の下飯²³⁾は、協会7号から高泡形成に働く *AWAI* 遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定した。その ORF から推定されるタンパクは細胞壁に局在するタンパク質の特徴をもっている。一方、泡なし変異株では、そのタンパクは細胞壁にアンカーされない(下飯、私信)。泡なし性の機構が分子レベルで解明される時代が漸くやってきたのである。

3. 清酒の多様化技術

清酒の多様化は、味覚、嗅覚、視覚、触覚の面から対応が考えられる。なかでも、嗅覚や視覚に訴えるやり方は分かりやすいだろう。

酢酸イソアミル等のエステル類は、清酒中に僅か数 ppm 存在しただけでもフルーツのような好ましい芳香を放つ。イソアミルアルコール等の高級アルコール類は、清酒中に 100 ppm 程度存在し、酒の基調香をなしている。それだけでなく、エステル類合成のための素材となる点で重要であり、一般的にそれが多いほどエステル類の生産も多くなる。酵母による香氣成分の生産量は、醸造条件によって変動するが、基本的には酵母の遺伝的な性能によって左右される。そのため、香氣生成の高い酵母が育種改良の目標になってきた。

酵母による高級アルコール類の生産は、2つの機構で行われる。その一つは、グルコースを出発材料とする長い生合成過程を経てつくられる機構(生合成経路)、もう一つは、ロイシン、バリン、トレオニン等のアミノ酸を直接の素材としてつくられる機構(Ehr-

lich 経路)。筆者らは、アミノ酸生合成系の各種突然変異株を用いて、高級アルコール類の生成を制御する機構を検討した²⁴⁾。その一連の研究の中で、例えばロイシン生合成欠損変異株等を用いることにより、イソアミルアルコールとイソブチルアルコールの生成量と比率を大胆に変更できること、Ehrlich 経路による高級アルコール類の生産がアンモニアとアミノ酸類の濃度によって大きく変化することなどを示した²⁵⁾。

さらに、生合成経路によるイソアミルアルコールの生産を高める目的で、酵母のノルバリン、ノルロイシン耐性変異株を分離した²⁶⁾。バリンロイシンのアナログに耐性を付与することでフィードバック阻害を開放し、イソアミルアルコールの合成に向かう流れを太くしようとしたのである。しかし、結果的には、フィードバック阻害の開放された変異株は得られず、目的は果たせなかった。後年、このような目的は芦田らの 5,5,5-トリフルオロ-DL-ロイシン耐性変異株の分離によって達成された²⁷⁾。現在、その流れに沿って、または他のアイデアで高香氣生産性変異をもつ吟醸酵母が多数育種され、実用化されている。

その後、筆者らは視覚的な清酒の多様化を図るために、協会酵母にアデニン要求性変異(*ade2*)を付与し²⁸⁾、その赤い色素生産性を利用して「桃色にがり酒」を開発した。この *ade2* 変異株は、酒母やもろみでの増殖が悪く、簡単に野生酵母の汚染を許したので、その変異株をキラー化することにより汚染に対処した。さらに、にがり酒中の赤色酵母の細胞の分散をよくし、色むらをなくすために泡なし性も併せて付与した²⁹⁾。これらの色素生産性酵母は、一部の清酒メーカーによって多様化清酒の製造に利用された。

4. パン製造の作業性改善技術

パンの製造工程は、原料(小麦粉、水、食塩、イースト等)の配合から焼成まで6,7時間はかかり、いったん生地を捏捏が始まると、通常の方法では途中で止めることはできない。それを中断できるようにしたのが「冷凍生地製パン法」であり、わが国でも1980年代から実施されている。この製パン法によれば、「冷凍耐性酵母」を用いて生地を捏ね、発酵させた後、分割した玉生地の状態で、またはそれを成型した後で-20°C程度に冷凍・保存し、生地のつくり溜めができる。そして、その凍結生地を必要な時に解凍し、短い工程

第2図 冷凍生地製パン法と冷蔵生地製パン法

第3図 生地を5°Cで7日間保存後に焼いたパン
通常の酵母（左）では膨らみが悪く焼き色もうすいパンとなるが、発酵能低温感受性酵母（右）では正常なパンができる。

でパンが焼けるので、焼き立てパンをより早く消費者に提供できる（第2図）。

一方、生地を冷凍保存する代わりに、5°C程度の冷蔵庫で保存する、「冷蔵生地製パン法」が潜在的に求められていた。冷凍生地製パン法に比べてエネルギーコストが軽減でき、大型冷凍庫の設備もいらないからである。さらに大きなメリットとして、解凍のためのロ

スタイムがないため、焼成までの時間が一層短縮される（第3図）。しかしながら、冷凍耐性酵母を含め従来の酵母では、膨らみの悪い、焼き色のうすい、触感と風味の劣るパンしかできず、冷蔵生地製パン法は実現していなかった。

筆者らは、なぜ従来の酵母では駄目なのか、その原因を検討した。その結果、従来の酵母は5°Cの低温でも弱いながら発酵が持続し、長期保存中に糖切れや過剰発酵を起こすためとわかった。従って、冷蔵生地製パン法を可能とする酵母は、5°C付近では発酵を完全に停止し、25~40°Cでは発酵力を正常に回復する性質（発酵能の低温感受性）がなければならない。筆者らは、市販パン酵母を親株として発酵能低温感受性変異株（*csf1* 変異株）の育種に成功した³⁰⁾。その方法の概略は、次の通りである。すなわち、低温で培養しながら細胞の呼吸能を Antimycin で止め、発酵のエネルギーでしか増殖できないようにしておく。そこに Nystatin を添加し、発酵によって増殖する親型細胞を優先的に殺し、低温で発酵できない変異型細胞を濃縮する。次に、残存細胞を常温で培養し、発酵で増殖してくる細胞を集めれば、その中には発酵が低温で停止し、常温で回復する変異株が含まれるだろう。

この方法で得られた *csf1* 変異株のパン生地での発

酵力は、25～40℃では親株と同じであるが、15℃ではその1/3以下、そして5℃では実質的にゼロであった。この酵母の実用性を試験した結果、生地を冷蔵庫に保存した後も商品価値のある食パン、バターロール、デニッシュペストリ等が焼けることが確認され、速やかに製パン工場に受け入れられた。この育種によって、冷蔵生地製パン法が初めて実現されることになった。

なお、*csf1* 変異を相補する遺伝子 *CSF1* をクローニングし、その塩基配列を決定した。*CSF1* は8874 bp (2958 a.a.) の巨大な ORF を含んでおり、4箇所膜貫通モチーフが認められた。各種データベースを用いたホモロジー検索によっても機能を推定できるような情報は得られなかったため、*CSF1* 破壊株を造成してその性質を調べたところ、変異株と同様に発酵能低温感受性を示した。従って、*CSF1* は低温での発酵にのみ必要な遺伝子と考えられた。では、発酵プロセスのどこが低温感受性になっているのだろうか？この答えはグルコースの取り込みの解析で明らかになった。*CSF1* 破壊株はグルコースの取り込みが、低親和系も高親和系も共に低温感受性になっていたのである。そして、その活性低下は発酵力の低下とよく相関していたことから、発酵能低温感受性の原因はグルコースの取り込みでほぼ完全に説明できた³¹⁾。また、ロイシンとマルトースの取込みも同時に低温感受性になっていたことから、酵母には低温適応に働く新たな機

構のあることが明らかになった。

5. アルコール発酵能等の遺伝解析技術

酵母の実用形質には、泡なし性や発酵能低温感受性のように1個の遺伝子できまるものもあるが、複数個の遺伝子が働いてきまるものも多い。糖蜜培地における酵母のアルコール生産力もその一例である。

第4図は、全糖度25%の廃糖蜜培地で30℃に培養した時のアルコール生産力を示したものである。アルコール酵母 YOY 655 D 株は40時間で約14%を生産したが、実験室酵母 X 2180 D 株はその半分しか生産できず、両者の交配株 XYD は中間的な生産性を示した。このことは、アルコール生産力をきめる遺伝子があって、それが YOY 655 D 株と X 2180 D 株とで違うことを示唆している。それでは、どんな遺伝子が関係するのだろうか。遺伝子の解析手法としては古典的な四分子解析法があるが、この例のように遺伝子組成が全く異なる両親間の、しかも多数の遺伝子が関係する形質の解析には適用できない。イネの収穫量かとヒトの能力などもそうであるが、現在、このような量的形質の遺伝子を解析をする有効な手段はない。

そこで、筆者らはこの問題に挑戦し、染色体置換法と名付けた解析方法を開発した。交配株 XYD を例にして、その原理を述べてみよう。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は16種類の染色体をもっているため、XYD 株は X 2180 D 株と YOY 655 D 株とから、それぞれ16本ずつ、全部で16対、32本の染色体を受取っている。その任意の1対のみを2本とも X 2180 D 株由来のものに、または、2本とも YOY 655 D 株由来のものに置換する。その結果、任意の1対だけは XX 型または YY 型で、残りの15対は XY 型をもつ“染色体置換株”となる(第5図)。これを各染色体対について行くと、全部で XX 型シリーズ16株、YY 型シリーズ16株の、合計32株の染色体置換株ができて上がる。次に、元の XYD 株とこれら各染色体置換株との間でアルコール生産力を精密に比較したときに、両者間に有意差がみられたとすれば、それは置換した染色体に起因することになり、その染色体上にはアルコール生産力に関与する遺伝子があるはずである。また、その差が+か-か、およそその程度から遺伝子の性格を推定することもできよう。

実際に XYD 株と各染色体置換株との間でアルコー

第4図 糖蜜培地における酵母のアルコール生産力の比較

YOY 655 D はアルコール酵母, X 2180 D は実験室酵母, XYD は両者の交配株 (YOY 655 a × X 2180-1 B), 培地の全糖度は25%, 発酵温度は30℃

第5図 染色体置換の手順

染色体の置換は、①交配株の任意の染色体対から片方の染色体を脱落させ、1本にする過程と、②残った1本の染色体を2本に倍化させる過程を経て行われる。染色体の脱落は、特殊なプラスミドを利用して行う。

ル生産力を比較してみると、第IV染色体と第XIII染色体のみは、危険率1%レベルで有意差は認められなかったが、他の14種類の染色体については、いずれかへの置換によって、あるいは両方とも一側へ、または+側へ変化した(第6図)。したがって、少なくとも14個の遺伝子が関与するだろうことが推定された。これは、予想を遙かに越えた数である。また、第XV染色体上には、X 2180 D株の方にアルコール生産力を上げ、逆に、YOY 655 D株の方には下げる遺伝子があるらしいこともわかった。

これまでは、これほど多くの遺伝子が関与する量的形質を解析する手段はなかったが、この染色体置換法の開発によって、アルコール生産力に關与する多数の遺伝子をひとまず染色体単位に落とし込むことができ

第6図 染色体置換によるアルコール生産力の変化
交配株 XYD 株とその第 I から第 XVI 染色体までの、各 X X 型置換株または Y Y 型置換株について、アルコール生産力を比較した。(一) 側への変化は置換により低下したことを、(+) 側へ変化は上昇したことを、また、バーの長さはその程度を示す。* * 印は XYD 株との間に危険率 1 % で有意差があったことを示す。実験は、それぞれ 10 回繰り返した。

るようになった。次は、各遺伝子が染色体の何処にあるかを絞り込み、その遺伝子を特定する作業が待っている。筆者らは1本の染色体を任意の箇所で分断する方法を構築しており³²⁾、それは遺伝子の絞り込みに役立つであろう。DNAチップの開発も、遺伝子の探索を一層容易にすると考えられる。

なお、染色体置換法は、①任意の染色体対から1本のみを脱落させる操作と、②残った1本の染色体を自立的に2本に倍化させるステップを含む。①の操作は、染色体脱落用 DNA カセット (基本プラスミドは pHK 61)³³⁾ を任意の染色体に導入し、ガラクトース培地に培養するだけでよく、染色体脱落株は小コロニーとなる。②の操作は、小コロニーの細胞をグルコース培地に培養するだけでよく、染色体脱落株は増殖中に自立的に染色体を倍化し、正常コロニーに戻る。こ

のように、コロニーの大きさを指標とするだけで染色体置換株を分離することができる³³⁾。この染色体置換法は、原理的には、他の形質の遺伝子解析にも適用でき、他の生物でも応用のきく技術と考えられる。

筆者は、国税庁醸造試験所で18年間、協和発酵工業(株)東京研究所で8年間、研究業務に従事した。この間、醸造試験所では野白喜久雄先生、秋山裕一先生、布川弥太郎先生、西谷尚道先生ほか多くの先生方に、また、協和発酵では小田有二博士、川崎秀紀博士、竹重一彦博士、京極泰久氏、菊池泰弘博士、渡海雅也氏ほか、多くの方々にご指導、ご協力をいただいた。今回の栄誉も皆様のお蔭であり、心からお礼を申し上げる。

＜協和発酵工業(株)＞

文 献

- 1) 古川敏郎, 秋山裕一: 農化, **37**, 398 (1963)
- 2) 菅間誠之助, 山川浩一郎, 寫岡巖一, 山村紘司, 野白喜久雄: 醸協, **60**, 453 (1965)
- 3) 名古屋国税局鑑定官室: 醸協, **59**, 519 (1964)
- 4) 高松国税局鑑定官室: 醸協, **60**, 815 (1965)
- 5) 仙台国税局鑑定官室: 醸協, **60**, 822 (1965)
- 6) 村上英也, 大脇京子, 橋本行弘: 醸協, **57**, 1046 (1962)
- 7) 大内弘造: 醸協, **61**, 161 (1966)
- 8) 大内弘造, 長井利之, 菅間誠之助, 野白喜久雄: 醸協, **61**, 646 (1966)
- 9) 大内弘造ら: 醸協, **61**, 633 (1966); 醸協, **62**, 1029 (1967); 発工, **45**: 889 (1967) 醸協, **63**, 186 (1968); 醸協, **63**, 1300 (1968)
- 10) 今村武司, 川本雅之, 高岡祥夫: 発工, **52**, 293 (1974)
- 11) 大内弘造, 川島 宏: 醸協, **69**, 629 (1974); 秋山裕一, 大内弘造, 植田浩行: 醸試報, **148**, 1 (1976)
- 12) 大内弘造, 秋山裕一: 発工, **54**, 615 (1976)
- 13) K. Ouchi, R. B. Wickner, A. Toh-e and H. Akiyama: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 483 (1979)
- 14) 高橋源次郎: 醸協, **11**, 15 (1916)
- 15) 善田猶蔵: 醸試報, **65**, 1 (1916)
- 16) 秋山裕一, 岩田知栄子, 長縄真琴: 発工, **43**, 629 (1965)
- 17) K. Ouchi and H. Akiyama: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1024 (1971)
- 18) 大内弘造, 布川弥太郎: 醸協, **67**, 54 (1972)
- 19) H. Momose, K. Iwano and R. Tonoike: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **15**, 19 (1969)
- 20) K. Ouchi, K. Takahashi, S. Suzuki and Y. Nunokawa: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 429 (1973)
- 21) 大内弘造, 菊池 東, 布川弥太郎: 発工, **52**, 811 (1974)
- 22) 笠原秀夫, 大内弘造, 倉田京子, 石戸輝夫, 布川弥太郎: 発工, **52**, 348 (1974)
- 23) 下飯 仁: 生物工学, **77**, 67 (1999)
- 24) K. Ouchi, Y. Yamamoto, M. Takagishi, H. Akiyama: *J. Ferment. Technol.*, **58**, 301 (1980)
- 25) 大内弘造, 高岸正邦, 山本泰彦: 発工, **59**, 9 (1981)
- 26) 大内弘造, 佐藤和幸, 宮島紀芳, 荒木敏明, 秋山裕一: 醸協, **76**, 843 (1981)
- 27) S. Ashida, E. Ichikawa, K. Suginami and S. Imayasu: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2061 (1987)
- 28) 大内弘造, 下田雅彦, 中村行善, 小嶋弥之祐, 西谷尚道: 発工, **61**, 349 (1983)
- 29) 中野成美, 佐藤和幸, 千田 茂, 脇田征也, 斎藤至正, 須田安彦, 長縄真琴, 大内弘造: 醸協, **79**, 695 (1984)
- 30) Y. Kyogoku and K. Ouchi: *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 639 (1995)
- 31) 渡海雅也ら: 日本生物工学会大会講演要旨集, p 27 (1997)
- 32) H. Kawasaki and K. Ouchi: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1694 (1995)
- 33) H. Kawasaki and K. Ouchi: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 125 (1994)