破精の形成要因

須藤茂俊・小関卓也・木崎康造

(独立行政法人酒類総合研究所)

平成 13 年 10 月 27 日受理

Factors in the formation of haze

Shigetoshi SUDO, Takuya KOSEKI and Yasuzo KIZAKI

(National Research Institute of Brewing, 2-6-30 Takinogawa Kita-ku, Tokyo 114-0023 Japan)

Genellay haze forming on a koji-pellet is thought to be caused only by the diffused reflection of light by the mycelia of koji-mold. Our doubts regarding this assumption led us to carry out an examination using *Aspergillus oryzae* RIB 40 as koji-mold and the rice as a substrate. The formation of haze was strongly affected by the adsorbed water of rice after steaming (Ads. water ST). At 40% of Ads. water ST haze was well formed roughly in proportion to the mycelial growth. However at 70% of Ads. water ST haze hardly formed in spite of good mycelial growth. Through microscopic observations of koji having 40% of Ads. water ST we found numerous belt-shaped erosion marks in the surface haze and also many grains produced by collapse of the rice structure in the internal haze. Each of them possessed the ability for a diffused reflection of light. On the other hand, they were not observed at 70% of Ads. water ST. From these facts, we believed that they must be new factors in the formation of haze together with the mycelia of koji-mold. From further examinations it was recognized that haze could be a good indicator for the enzyme production of koji-mold in Japanese sake making.

Key words : 麴, 破精, 麴菌の増殖, 酵素生産

緒 言

破精はリアルタイムで肉眼視が可能な製麴現象であり、製麴現場では麴菌の増殖及び酵素生産の代替指標として利用されている。破精は蒸米に増殖した麴菌の菌糸が白く見える状態とされ、菌糸による光の乱反射がその原因と考えられている¹⁾。一方、麴菌を寒天培地で増殖させると、菌糸は光を乱反射して白く見えるものの破精の白さとはいくぶん異なって見え、破精の形成要因が菌糸による光の乱反射だけではないことが示唆される。

破精の形成に関しては、孢子接種量との関係が報告され²⁾、製麴現場においては米の品種や蒸米吸水率、製麴条件などによる影響が認識されている。また破精の形成に関する周辺的な知見としては、麴における麴

菌の増殖量分布^{3,4)}、走査電子顕微鏡による麴菌の胞子の発芽や菌糸の伸長の観察⁵⁻⁹⁾、心白などの米の構造と破精込みとの関係⁷⁻¹¹⁾、破精込みにおける α -アミラーゼの関与¹²⁾などが報告されている。しかしながら破精の形成要因については未だ不明な点があり、そこで破精の形成要因について検討するとともに、麴菌の増殖及び酵素生産の代替指標としての破精の妥当性について考察した。

実 験 方 法

1. 製 麴

麴菌は *Aspergillus oryzae* RIB 40 を使用した。岡崎らのシャーレ法¹³⁾ に準じて、 α 化米 (日本晴, 精米歩合 60%) 10 g に蒸米吸水率換算で 20~100% になるように滅菌水を吸水させ、 α 化米 1 g 当たり約

Fig. 1 Preparation of the samples for measuring the mycelial densities in three parts of a koji-pellet.

Steamed rice on which *Aspergillus oryzae* RIB 40 was growing (koji) was removed and divided into three parts (surface, middle and core) for analysis samples.

5×10⁴ 個の胞子を撒布し、直径 9cm のペトリ皿を用いてインキュベーター（東京理化学器械社製 LTI-1000 ED）内で 48 時間製麹した。製麹温度は、0～24 時間は 32℃、24～36 時間は 36℃、36～48 時間は 40℃とした。通気を確保するためペトリ皿はろ紙でフタをするとともに、20cm×14cm のチャック付ビニル袋の中に入れ、製麹 24 時間まではチャックを閉め、24 時間以降はチャックを徐々に開き、結露がわずかに見られる程度に湿度を維持しながら製麹した。また、製麹 6、24、30、36 及び 48 時間目に滅菌スパーテルを用いて軽く攪拌した。

2. 部位別麹菌増殖量

麹における麹菌の部位別増殖量の測定についてはテストミルを使用する方法が提案されている⁴⁾。本研究では少量の試料で測定できる方法を用いた。すなわち Fig. 1 に示したように鋭利なカッターを用いて麹を厚さ方向に角柱にカットし、それを表面部位、中間部位、中心部位の各 3 部位にほぼ等分割して、各部位中の N-acetylglucosamin 含量¹⁴⁾を測定した。任意に選んだ麹 30 粒を処理して分析に必要な量（約 30mg）を確保した。

3. 破精の定義

破精は麹菌の菌糸が白く見える状態とされ、破精は菌糸そのものと見なされている。しかしながら破精が菌糸そのものであるとの証明はなされておらず、そこで本研究では破精を現象面からとらえ、製麹の進行に

伴って形成される白濁領域を破精と定義した。また、麹表面に形成される白濁領域を表面破精²⁾、麹内部に形成される白濁領域を内部破精と区分した。

4. 破精の形成数

破精の計測には麹の透過光を利用する方法²⁾や画像解析による方法^{15,16)}が開発されている。本研究では計測を簡便に行うために、破精の有無を目視により判断する方法を用いた。すなわち表面破精は任意に選んだ麹 100 粒の表面を目視して、概ね 2 分以上の白濁領域が認められたものを表面破精ありとして、その個数をカウントした。また、内部破精は任意に選んだ麹 100 粒のカット断面をルーペで約 3 倍に拡大し、目視により概ね 0.5mm 以上の深さの白濁領域が認められたものを内部破精ありとして、その個数をカウントした。内部破精の 0.5mm は塗り破精麹でも麹表面から 0.3mm までは菌糸が増殖するとの吉井らの報告⁸⁾を考慮して設定した。カウントした個数はそれぞれ表面破精の形成数及び内部破精の形成数とした。

5. 酵素活性

酵素活性は国税庁所定分析法に従って測定した¹⁷⁾。

実験結果及び考察

1. 破精の形成と蒸米吸水率

蒸米吸水率 20～100% の範囲で 7 段階に調整した蒸米を用いて、表面破精及び内部破精の形成数に及ぼす蒸米吸水率の影響を調べた。

表面破精の形成数を Fig. 2-(A) に示した。製麹 24 時間目では表面破精は蒸米吸水率 30% でもっともよく形成され、蒸米吸水率 60% 以上で急減する分布となった。製麹 48 時間目になると蒸米吸水率 20～40% のほぼ全粒で表面破精が形成され、破精廻りは大半の麹で 8～10 分に達した。一方、蒸米吸水率 60% 以上では製麹 24 時間目以降、表面破精はほとんど増加せず、低調な形成となった。

内部破精の形成数を Fig. 2-(B) に示した。製麹 24 時間目ではいずれの蒸米吸水率でも内部破精は形成されなかった。製麹 48 時間目になると内部破精は蒸米吸水率 40% でもっともよく形成され、次いで 30%、50%、20% の順であった。一方、蒸米吸水率 60% 以上では内部破精は全く形成されなかった。

製麹の現場ではこしき肌のように水分が過剰な蒸米や水分が過度に少ない蒸米では、破精の形成が低調に

Fig. 2 Effects of the adsorbed water from the rice after steaming (Ads. water ST) on the forming of the surface haze (A) and the internal haze (B).

Aspergillus oryzae RIB 40 was cultured on steamed rice (koji) having Ads. water ST in a range of 20-100%. At 24 and 48 hr of culture time the number of koji having surface haze and internal haze were counted.

Ads.water ST is defined as follows.

Ads.water ST (%) = (the mass of steamed rice - the mass of raw rice) $\times$ 100 / (the mass of raw rice)

Fig. 3 Mycelial densities in three parts of a koji-pellet having 40% of Ads. water ST (A) and 70% (B).

Aspergillus oryzae RIB 40 was cultured on steamed rice (koji). At 24 and 48 hr of culture time the mycelial densities in the surface, middle and core parts of a koji-pellet were measured. The parts of a koji-pellet and Ads. water ST are referred to in Fig.1 and Fig. 2, respectively.

なることがわかっており、得られた結果はそれらを追認するものであった。

2. 麹菌の増殖と破精の形成

破精がよく形成された蒸米吸水率 40% と低調であった 70% について、製麹 24 及び 48 時間目の麹 1 粒中の麹菌の部位別増殖量を測定し、破精の形成との関係を調べた。

蒸米吸水率 40% における部位別増殖量を Fig. 3-(A) に示した。製麹 24 時間目では表面部位に適度な増殖が認められたが、中間及び中心部位にはまだほとんど増殖は認められなかった。その後、表面、中間、中心のすべての部位で旺盛な増殖が見られ、製麹 48 時間目では各部位ともかなりの増殖量に達した。Ito ら³⁾ 及び原田ら⁴⁾ は麹菌は麹中にはほぼ指数関数的に分

Table 1 Relationships between the mycelial densities (A) or enzyme productions (B) in three parts of a koji-pellet having 40% of Abs.water ST and the corresponding number of koji having surface haze or internal haze (C).

The parts of a koji-pellet and Ads.water ST are referred to in Fig.1 and Fig. 2, respectively.

item	surface haze		internal haze			
culture time (hr)	24	48	24		48	
parts of a koji-pellet	surface		middle	core	middle	core
(A) mycelial density (mg/g-koji)	1.5	4.7	0.1	0.1	2.8	2.5
(B) α -amylase (U/g-koji)	584	1257	199	76	930	585
glucoamylase (U/g-koji)	74	292	23	10	200	57
acid-protease (U/g-koji)	1490	2642	712	398	1693	855
(C) number of koji having haze (pellets/100 pellets of koji)	52	96	0		80

(A) Ads. water ST 40 %

(B) Ads. water ST 70 %

Fig. 4 Photomicrographs of the surface of a koji-pellet having 40% of Ads.water ST (A) and 70% (B). *Aspergillus oryzae* RIB 40 was cultured on steamed rice (koji). At 24 hr of culture time the surfaces of a koji-pellet were photographed. Here "1" indicates the belt-shaped erosion marks and "2" the line-shaped substances which undoubtedly comprise the mycelia of *Aspergillus oryzae* RIB 40. Ads. water ST is referred to in Fig. 2.

布し、特に麴表面に集中して存在すると報告しているが、蒸米吸水率 40% の結果もほぼ同様の傾向であった。

ここで表面部位の増殖量は表面破精の形成に関連し、また中間及び中心部位の増殖量は内部破精の形成に関連すると考えられる。そこで蒸米吸水率 40% における製麴 24 及び 48 時間目の部位別増殖量とそれに対応する表面及び内部破精の形成数 (Fig. 2 から引用) を Table 1 の項目(A)と(C)にそれぞれ示した (同 Table には後述する部位別酵素活性も示している)。

その結果、増殖量はそれぞれ対応する破精の形成数と概ね正の相関にあることが推察された。このことから蒸米吸水率 40% では破精は麴菌の増殖量の代替指標として適当であることを認めた。

一方、蒸米吸水率 70% における部位別増殖量を Fig. 3-(B) に示した。製麴 24 時間目の時点で表面部位にはすでに多量の麴菌が増殖し、また中間及び中心部位にもかなりの増殖が認められた。その後、増殖速度はやや鈍ったものの製麴 48 時間目にはいずれの部位でも蒸米吸水率 40% と同レベルの増殖量に達した。

Fig. 2 より蒸米吸水率 70% では表面及び内部破精はほとんど形成されないことが明らかになっており、このような良好な増殖は意外な結果であった。過軟な蒸米における麴菌の増殖量分布に関する知見は極めて少ないが、本結果から過軟な蒸米でも通常の水分を有する蒸米と同様に麴菌は指数関数的に分布し、また麴表面に集中して存在することがわかった。なお、増殖が破精の形成を伴わずに起こっていることから、蒸米吸水率 70% では破精が麴菌の増殖量の代替指標として適当ではないことを認めた。

3. 破精の形成要因

麴菌が旺盛に増殖しても破精が形成されない場合があるという事実は、破精の形成要因とともに、破精の形成を妨げる負の要因の存在を強く示唆する。そこで破精の形成に係わる要因について、表面破精と内部破精のそれぞれについて検討した。

(1) 表面破精の形成要因

蒸米吸水率 40% 及び 70% の蒸米に孢子を撒布して製麴し、それぞれの蒸米の表面状況を光学顕微鏡（ニコン社製 OPTIPHOTO-2）で観察した。

蒸米吸水率 40% における製麴 24 時間目の蒸米の表面状況を Fig. 4-(A) に示した。蒸米表面には製麴 10 時間目頃から幅 5~20 μm の不規則な形状の带状痕が多数形成され（矢印 1）、徐々に蒸米全表面に広がった。この带状痕には幅 0.5~2 μm の線状体が認められた（矢印 2）。線状体は製麴の進行とともに伸長し、その細長い形状と外観とから麴菌の菌糸であると考えられた。また、带状痕は菌糸が生産した酵素作用に起因して生じたものと思われた。吉井らは蒸米表面に増殖する菌糸とその周囲に生じた浸食痕の鮮明な走査電子顕微鏡写真を報告しており⁸⁾、Fig. 4-(A) も同じ現象をとらえているものと考えられた。

带状痕の表面は粗く、顕微鏡光源からの光を乱反射してその部分が暗く観察された。製麴約 20 時間目になると带状痕が集中して形成された箇所は、目視的に表面破精として確認できるようになった。この時期は麴菌の増殖はまだ少なく、表面破精は主に带状痕による光の乱反射によって生じたものと考えられた。製麴 48 時間目になると多数の带状痕が複雑に交錯して蒸米表面を覆い尽くし、それに伴い蒸米表面組織の崩壊が認められた。また菌糸の旺盛な増殖も見られ、蒸米の全表面が表面破精となった。これらのことから带状

痕は菌糸とともに表面破精の形成要因であり、製麴前半は主に带状痕による光の乱反射により、製麴後半は菌糸と带状痕の双方による光の乱反射によってそれぞれ表面破精が形成されるものと考えられた。

さらに詳細に顕微鏡観察を行ったところ、带状痕の実体は蒸米表面に形成された幅 5~20 μm 程度の溝と、蒸米内部の浅いところに形成された径 5~20 μm 程度の空洞であることが強く示唆された。なお、そのいずれにも径 0.5~2 μm 程度の麴菌の菌糸と思われる線状体が認められた。これらの溝及び空洞については吉井らもその存在を報告している⁸⁾。

一方、蒸米吸水率 70% における製麴 24 時間目の蒸米の表面状況を Fig. 4-(B) に示した。蒸米表面は麴菌の菌糸と思われる不規則な形状の線状体で覆われていた（矢印 2）。しかしながら、蒸米吸水率 40% で見られたような光を乱反射する带状痕は形成されなかった。また、菌糸と思われる線状体による光の乱反射もほとんど認められず、結果的に表面破精は形成されなかった。光を乱反射する带状痕が形成されなかったのは、蒸米が十分に膨潤しているために、菌糸が生産した酵素作用で蒸米表面が分解を受けても溝や空洞が形成され難く、また形成されてもそれらの表面状態が光を乱反射しない程度の平滑さに維持されるためと考えられた。また菌糸と思われる線状体が乱反射しなかったのは、蒸米が十分に膨潤しているために菌糸の多くが蒸米に埋没しているためと考えられた。なお、蒸米表面には毛状の気中菌糸が増殖したが、表面破精の形成にはほとんど関与しなかった。

これらのことから高い蒸米吸水率は表面破精形成の負の要因であると推察した。そこでこの負の要因による影響を調べるために、孢子を撒布した蒸米吸水率 70% の蒸米を製麴 6 時間目に約 1 時間かけて蒸米吸水率 40% まで自然乾燥させた。その結果、その後の製麴において光を乱反射する带状痕の形成と菌糸による光の乱反射が起り、一貫して蒸米吸水率 40% で製麴したものとほぼ同程度に表面破精が形成された。一方、乾燥を製麴 8 時間目以降に行った場合は、乾燥させる時期が遅くなるほど表面破精の形成は急速に低下した。このことから高い蒸米吸水率による負の影響は、製麴 8 時間目頃から生じ始め、その後蒸米吸水率を低下させてもその影響を除くことができないことがわかった。

Fig. 5 Enzyme activities in the three parts of a koji-pellet having 40% of Abs. water ST (A) and 70% (B). *Aspergillus oryzae* RIB 40 was cultured on the steamed rice (koji). At 24 and 48 hr of culture time the activities of α -amylase (1), glucoamylase (2) and acid-protease (3) in the surface, middle, and core parts of a koji-pellet were measured. The samples were prepared by the same method described in Fig. 1. The parts of a koji-pellet and Ads. water ST are referred to in Fig. 1 and Fig. 2, respectively.

製麴の現場では蒸米の水分が過剰な場合は、切り返し時期までに水分を蒸散させるようにしており、この操作との関連が示唆された。

(2) 内部破精の形成要因

蒸米吸水率 40% と 70% の製麴 48 時間目における麴を鋭利なカッターでカットし、それぞれの断面を顕微鏡で観察した。

蒸米吸水率 40% における内部破精の形成箇所には、菌糸の増殖とともに蒸米内部組織の崩壊が認められた。蒸米内部組織は 10~100 μm サイズの多数の不規則な形状の粒へと崩壊し、粒間には空隙が生じていた。粒

の表面は粗く顕微鏡光源からの光を乱反射する性質が認められた。このことから空隙を伴う蒸米組織の粒状化崩壊は、菌糸とともに内部破精の形成要因と考えられた。

吉井ら⁸⁾、松永ら⁹⁾、柳内ら¹⁰⁾ は、心白米の心白部分に空隙の存在を認めており、心白部分では空隙を伴う粒状化崩壊が生じやすいと考えられる。経験的に心白米では内部破精が形成されやすく、これらのことは空隙を伴う蒸米組織の粒状化崩壊が内部破精の形成要因であることを間接的に支持している。

一方、内部破精が形成されなかった蒸米吸水率 70

%の麴断面には多数の菌糸が認められたが、空隙を伴う蒸米組織の粒状化崩壊は認められなかった。おそらく菌糸が生産した酵素の作用で蒸米組織が部分的に分解されても蒸米組織が十分に膨潤しているために、空隙を伴う粒状化崩壊には至らなかったものと考えられた。これらのことから高い蒸米吸水率は内部破精形成の負の要因であると推察した。また菌体が増殖していたにもかかわらず内部破精が形成されなかったことから、菌糸単独による内部破精の形成能はさほど大きくないものと思われた。

吉井ら⁸⁾及びYamaneら¹⁸⁾は麴菌の菌糸の太さは麴などの水分の影響を受け、吉井らは麴表面の菌糸の太さが蒸米内部組織の崩壊や破精込みに影響すると報告している。そこでFig. 4から蒸米吸水率40%及び70%における菌糸径の推定を試みた。しかしながら蒸米吸水率70%における菌糸径の推定が困難であり、吉井ら及びYamaneらの報告を追認できなかった。

内部破精の形成における高い蒸米吸水率の負の影響を調べるために、表面破精の場合と同様に製麴6時間目に蒸米吸水率を70%から40%まで自然乾燥させた。その結果、その後の製麴において空隙を伴う粒状化崩壊が生じ、また菌糸による光の乱反射も起こり内部破精が形成された。一方、乾燥を製麴8時間目以降に行った場合は、乾燥時期が遅くなるほど内部破精の形成は急速に低下した。このことから高い蒸米吸水率による負の影響は、表面破精と同様に製麴8時間目頃から生じ始め、その後蒸米吸水率を低下させてもその影響を除くことができないことがわかった。

4. 破精の形成と酵素生産

破精は増殖の代替指標のみならず、酵素生産の代替指標としても用いられる。そこで破精の形成と酵素生産との関係について検討した。蒸米吸水率40%及び70%における製麴24及び48時間目の麴について、Fig. 1に示した方法により、麴を表面、中間、中心の各部位にほぼ等分割して、各部位における α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼ活性を測定した。

蒸米吸水率40%における酵素生産の結果をFig. 5-(A)に示した。各酵素活性は表面部位から中心部位に向かって減少する傾向を示した。また、いずれの部位でも製麴24時間目から各酵素生産が急速に増加し、製麴48時間目には良好な生産量となった。これらの

生産パターンは原田らの報告⁴⁾とほぼ同じ傾向であった。ここで表面部位の酵素生産は表面破精の形成に関連し、また中間及び中心部位の酵素生産は内部破精の形成に関連すると考えられた。そこで蒸米吸水率40%における各部位の各酵素活性と、対応する破精の形成数をTable 1の項目(B)と(C)にそれぞれ示した。その結果、各酵素活性はそれぞれ対応する破精の形成数と概ね正の相関にあることが推察された。このことから蒸米吸水率40%では、破精は酵素生産の代替指標として適当であることを認めた。

一方、蒸米吸水率70%における酵素生産の結果をFig. 5-(B)に示した。製麴24時間目までは各酵素はいずれの部位でも比較的良好に生産され、蒸米吸水率40%とほぼ同レベルの生産量となった。製麴24時間目以降になると、中層と中心部位における α -アミラーゼを除き酵素生産は全般に停滞し、蒸米吸水率40%に比べ製麴48時間目の酵素生産量はかなり少なくなった。蒸米吸水率が過剰な場合に酵素生産が低調になる現象は、Yamaneら¹⁸⁾及び岡崎ら¹⁹⁾の報告及び製麴の現場における経験則と一致するものであった。

蒸米吸水率70%では破精はほとんど形成されないが、その一方で停滞したとはいえ酵素生産は確実に起こっている。このことから蒸米吸水率70%では破精は酵素生産の代替指標として適当ではないことを認めた。

松永らは破精込みと α -アミラーゼとの関連を推察しているが¹²⁾、内部破精が形成されなかった蒸米吸水率70%においても α -アミラーゼは順調に生産されていた。

清酒醸造において醪の発酵を順調に進めるには、有用酵素が十分に存在しなければならない。Fig. 5から蒸米吸水率70%における α -アミラーゼと酸性プロテアーゼの生産量は、蒸米吸水率40%の場合の5~6割に達しているが、グルコアミラーゼは2割以下の生産量に過ぎず、醪の発酵停滞が予想される。破精がほとんど形成されない麴では醪の順調な発酵が期待できず、酒造の現場ではより多くの破精が形成された麴が望ましいことになる。単に酵素生産との観点では、高い蒸米吸水率において破精はその代替指標として適当ではなかった。しかしながら、醪の健全な発酵に必要な酵素生産との観点では、高い蒸米吸水率を含めてその代替指標として適当であると考えられた。

要 約

蒸米に形成される破精の形成要因と麹菌の増殖及び酵素生産との関係について検討し、次の結果を得た。

- (1) 表面破精と内部破精の形成は、蒸米吸水率に強く依存した。
- (2) 蒸米吸水率 40% では、破精は麹菌の増殖量の代替指標として適当であったが、蒸米吸水率 70% では適当ではなかった。
- (3) 表面破精の形成において、带状痕は菌糸とともに表面破精の形成要因であると考えられた。また、高い蒸米吸水率は表面破精の形成を妨げた。
- (4) 内部破精の形成において、空隙を伴う蒸米内部組織の粒状化崩壊は、菌糸とともに内部破精の形成要因であると考えられた。また、高い蒸米吸水率は内部破精の形成を妨げた。
- (5) 醪の順調な発酵に必要な酵素生産との観点では、破精は蒸米吸水率にかかわらず、酵素生産の代替指標として適当であると考えられた。

文 献

- 1) (財)日本醸造協会編：増補改訂清酒製造技術，p 161 (1998)
- 2) 岡崎直人，福田典雄，菅間誠之助：醸協，**74**，687-691 (1979)
- 3) K. ITO, A. KIMIZUKA, N. OKAZAKI, and S. KOBAYASHI: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 7-13 (1989)
- 4) 原田祥司，瀬頭一平，吉田肇，若林邦宏，伊藤清，蓮尾徹夫，宮野信之：醸協，**83**，485-490 (1988)
- 5) 吉井美華：生物工学，**77**，199 (1999)
- 6) 荒巻功，吉井美華，伊藤伸一，佐無田隆：醸協，**92**，673 (1997)
- 7) 吉井美華，豊澤孝彦，荒巻功，佐無田隆：醸協，**93**，753 (1998)
- 8) 吉井美華，荒巻功：醸協，**96**，806-813 (2001)
- 9) 松永恒司，古川恵司，家村芳次，渡辺和彦，和田正夫：醸協，**94**，331-337 (1998)
- 10) 柳内敏靖，山本拡美，宮崎紀子，長野知子，水間智哉，若井芳則：生物工学，**75**，169-176 (1997)
- 11) 家村芳次，藤田栄信：醸協，**77**，260-264 (1982)
- 12) 松永恒司，古川恵司，原昌道：醸協，**95**，688 (2000)
- 13) 岡崎直人，弘中吉雄，島崎順一，菅間誠之助：醸協，**73**，402-404 (1978)
- 14) 五味勝也，岡崎直人，田中利雄，熊谷知栄子，井上博，飯村穰，原昌道：醸協，**82**，130-133 (1987)
- 15) 本多裕之，大楠栄治，花井泰三，西田淑男，深谷伊和男，小林猛：生物工学，**73**，409-412 (1995)
- 16) 松永恒司，古川恵司，原昌道：醸協，**93**，753 (1998)
- 17) 注解編集委員会編：第四回改訂国税庁所定分析法注解，(財)日本醸造協会 (1993)
- 18) Y. YAMANE, M. YOSHII, S. MIKAMI, H. FUKUDA, and Y. KIZAKI: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**，33-39 (2000)
- 19) 岡崎直人，竹内啓修，菅間誠之助：醸協，**74**，683-686 (1979)