麹菌リアクター処理による米及び麦焼酎蒸留粕の γ -アミノ酪酸富化

土谷紀美・松田豊和*・西村賢了・岩原正宜*
(熊本県工業技術センター, 崇城大学工学部*)

平成 14 年 9 月 4 日受理

Enrichment of γ -amino butyric acid (GABA) in *shochu* post-distillation slurry using a continuous-flow type stirring reactor with *Aspergillus oryzae*.

Kimi TSUCHIYA, Toyokazu MATSUDA*, Kenryo NISHIMURA and Masayoshi IWAHARA*
(Kumamoto Industrial Research Institute, 3-11-38, Higashimachi, Kumamoto-City, Kumamoto 862-0901 *
Sojo University, 4-22-1, Ikeda, Kumamoto-City, Kumamoto 860-0082)

γ -amino butyric acid (GABA), a highlighted functional factor with anti-hypertensive effects, is made from glutamic acid through the effect of glutamate decarboxylase (GAD). We examined concentrations of GABA and glutamic acid in 13 samples of *Shochu* post-distillation slurry (*Shochu*-residue). The former ranged from 57 mg/L to 283 mg/L, the order arranged from the barley *Shochu*-residue made from Barley *Koji*, the barley *Shochu*-residue made from rice *Koji*, the *Awamori*-residue, the rice *Shochu*-residue, to the sweet potato *Shochu*-residue.

We attempted to enrich the GABA concentration in *Shochu*-residue, in which glutamic acid was richly included, employing a continuous-flow type stirring reactor using the GAD induced *Aspergillus oryzae* mycelia. We examined the effects of citric acid on the GAD activity, and the concentration of citric acid included in the rice *Shochu*-residue and barley *Shochu*-residue used in this study was found to have few effects on the GAD activity.

A pellet form mycelium of *A. oryzae* for Miso (dry weight 1.9 g) cultured in a YPD liquid medium was used in the reactor (200 ml). The supernatant separated from the rice *Shochu*-residue was modulated at pH 5.5, and 10 μ M of pyridoxal-5-phosphate (PLP) was added to it. When the supernatant was reacted through the reactor for 4 hours, the GABA concentration of the supernatant was increased from the baseline of 72 mg/L to 480 mg/L after the reaction, indicating that the GABA had increased seven times.

When *A. oryzae* was cultured in the supernatant, not only did *A. oryzae* show marked growth, but the GAD activity of the *A. oryzae* also increased six times more than that cultured in a YPD medium. When the *A. oryzae* (dry weight 2.0 g) was used in the reactor without activation of the enzyme under low temperature, the concentration of GABA in the barley *Shochu*-residue with a glutamic acid concentration of 1632 mg/ml increased from the baseline of 240 mg/L to 1100 mg/L after the reaction.

Key words : 麹菌, 焼酎蒸留粕, γ -アミノ酪酸, GABA, グルタミン酸脱炭酸酵素, GAD, リアクター——

緒 言

現在, 焼酎蒸留粕は南九州 4 県において年間

440,000 kL¹⁾に達している。焼酎粕の処理は, 海洋投棄から陸上処理への転換が進み, その中で, 有効利用されている事例としては, 濃縮乾燥加工後家畜飼料と

する事例やメタン発酵によりエネルギー変換する事例が稼働している。また、遠心分離後上澄み液を焼酎仕込み水にする再利用法²⁾についても膜処理を併用したシステムが稼働を始めている。一方、泡盛蒸留粕の8%量(2000 kL)については、糖などを添加あるいは無添加で、クエン酸やアミノ酸を豊富に含むことを特徴とした健康飲料として利用されている³⁾。また、横山等は焼酎粕を用いた減塩調味料の生産及びその機能性について報告している⁴⁾。今後、このように焼酎粕の機能性を生かした高度利用がさらに進むと考えられ、焼酎粕の有する有用成分について研究が進められており、麦焼酎粕の有する脂肪肝抑制効果⁵⁾や乳酸菌増殖促進効果⁶⁾、芋焼酎粕に含まれる成長促進因子⁷⁾や α -トコフェロールに関する報告⁸⁾等により、様々な機能が明らかになってきている。

γ -アミノ酪酸(γ -amino butyric acid, GABA)はグルタミン酸からグルタミン酸脱炭酸酵素(Glutamate decarboxylase, GAD) [EC.4.1.1.15]の作用により生成され、血圧上昇抑制作用⁹⁾を有することで注目されている機能性成分である。醸造品におけるGABAに関しては、味噌¹⁰⁾や清酒^{11,12)}の製造工程におけるGABAの由来や挙動について報告がなされている。焼酎製造におけるGABAの挙動についての報告は見られないが、もろみ中に含まれるGABAは、蒸留工程において、焼酎に移行せず蒸留粕に濃縮されていると考えられる。

我々はこれまでに、醸造業界で利用される麴菌、特に味噌麴菌や清酒麴菌の液体培養で得られた菌体が、高いGAD活性を有することを明らかにし¹³⁾、この麴菌の機能を利用して、ペレット状の味噌用麴菌体を担体とするリアクターにより、グルタミン酸からGABAを効率よく高生産できることを報告した¹⁴⁾。そこで、今回、各種原料の焼酎粕中のGABA含量を測定して、新たな機能性を探ると共に、焼酎粕に豊富に含まれている遊離グルタミン酸を、麴菌のGADを利用してGABAに変換し、焼酎粕の機能性を増強する方法について報告する。リアクターは前報¹⁴⁾と同じ攪拌槽型リアクターを用い、今回は連続処理法を検討した。

実験方法

1. 使用焼酎粕及び前処理

GABA含量を測定するために用いた焼酎粕は、米製焼酎粕3点、麦製焼酎粕4点(うち麦麴2点、米麴2点)、芋焼酎粕3点、泡盛焼酎粕3点、計13点で、全て焼酎乙類の製造により副生したものである。いずれも酒造メーカーから提供いただいた。0.45 μ m フィルターにより清澄化したものをGABA及び遊離グルタミン酸の定量に用いた。麴菌リアクター処理には、米焼酎粕及び麦焼酎粕を2500×g、10分間遠心分離後、上澄み液をペーパーろ過(No.1, ADVANTEC)したものに、10 μ MになるようにGADの補酵素であるピリドキサル5-リン酸(pyridoxal-5-phosphate, PLP)を添加し、GADの至適pHである5.5に調整した焼酎粕を用いた。

2. 使用菌株及び培地

麴菌は、前報¹³⁾と同様に、(株)菱六から購入した味噌用種麴SR108(*Aspergillus oryzae*)を単孢子分離したものをを用いた。保存用斜面培地には、PDA培地(栄研化学株式会社)を使用し、液体培養にはYPD培地(glucose 4%, polypeptone 1%, yeast extract 0.5%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, 和光純薬工業製, pH 4.8)及び焼酎粕培地(pH 4.8)を用いた。焼酎粕培地には、麦焼酎粕を2500×g、10分間遠心分離後、上澄み液をペーパーろ過(No.1, ADVANTEC)して使用した。

3. 麴菌の液体培養

前報¹³⁾に従って行った。すなわち、バツフル付三角フラスコに入れたYPD培地及び焼酎粕培地を121°C、15分間殺菌し、0.9% NaCl溶液に懸濁した麴菌胞子を 1×10^5 cells/mlとなるように植菌して、30°C、160 rpm (BR-3000 L, TAITEC)で3日間振とう培養した。

4. 麴菌体を利用した攪拌型反応槽による焼酎蒸留粕の連続処理

1) 米焼酎粕の連続処理

YPD培地により3日間の液体培養で得られたペレット状の麴菌体を前報¹³⁾に従って培養液中で4°C 1週間保存し、GADを活性化させた。菌体を0.9% NaCl溶液で洗浄し、米焼酎粕が入った200 ml容のリアクターに投入した。菌体の破碎処理は行っていない

い。焼酎粕は5ml/minの流速でペリスタポンプを用いて連続的にリアクターに供給し、処理液はオーバーフローにてリアクターから取り出した。リアクターにおける滞留時間は40分間、反応温度は37°Cに設定した¹⁴⁾。スターラーで緩やかに攪拌しながら麹菌体と焼酎粕を反応させ、240分間で焼酎粕1.2Lを通液した。反応槽の攪拌に伴い、麹菌体が反応液から浮き上がって流出するのを防ぐため、反応液上部にステンレスの金網を入れた。リアクター出口において20分毎にサンプリングを行い、GABA及びグルタミン酸を定量した。

2) 麦焼酎の連続処理

麦焼酎粕培地で得られた麹菌体を、4°Cにおける低温処理を行わずに培養直後にリアクターに用い、リアクターへの麦焼酎粕の流速が10ml/min、滞留時間が20分であることを除いては、米焼酎粕の連続処理と同様に行った。

5. グルタミン酸脱炭酸酵素活性の測定

前報¹³⁾と同様に、約0.5gの湿菌体を、100mM リン酸緩衝液 (pH 5.5) に添加した基質 L-グルタミン酸ナトリウム 1水和物 50mM 並びに補酵素 PLP 50 μ M と反応させ、生成する GABA 量を測定した。反応時間は30分とした。酵素活性は1分間に1 μ M の GABA を生成する酵素量を1Uとし、乾燥菌体 g 当

たりの酵素活性として示した。

6. GABA 及びグルタミン酸の定量

GABA 及びグルタミン酸の定量も前報¹³⁾と同様に AccQ・TagTM 法 (Waters) により行った。

実験結果

1. 各種焼酎粕に含まれる GABA 及び遊離グルタミン酸量

原料の異なる焼酎粕13点について、GABA 及びグルタミン酸含量を測定した結果を Table 1 に示す。いずれの焼酎粕にも GABA が含まれており、最大で 283mg/L、最少で 57mg/L だった。原料ごとに比較すると、含有量の多い順に、麦焼酎粕 (麦麴) > 麦焼酎粕 (米麴) > 泡盛粕 > 米焼酎粕 > 芋焼酎粕だった。グルタミン酸は、GABA と同様、麦焼酎粕 (麦麴) に多く、1600mg/L の高濃度で含まれていたのに対して、芋焼酎粕中の濃度は低かった。

なお、米焼酎 (アルコール25%)、麦焼酎 (同25%)、芋焼酎 (同25%)、泡盛 (同35%) 各市販品1点ずつについて、焼酎中の GABA を定量したが、いずれも検出限界 (0.3mg/L) 以下であった。

2. クエン酸濃度の GAD に対する影響

麹菌体 GAD 活性に対するクエン酸濃度の影響を見るために、クエン酸濃度を1mM から500mM まで

Table 1 Concentrations of GABA and glutamic acid in various *Shochu*-residue.

No. Type of residue	GABA (mg/L)	Glutamic acid (mg/L)
1 Rice <i>Shochu</i>	117	910
2 Rice <i>Shochu</i>	86	750
3 Rice <i>Shochu</i>	72	850
4 <i>Awamori</i>	134	408
5 <i>Awamori</i>	182	1048
6 <i>Awamori</i>	180	671
7 Barley <i>Shochu</i> (rice <i>Koji</i>)	223	1043
8 Barley <i>Shochu</i> (rice <i>Koji</i>)	178	689
9 Barley <i>Shochu</i> (barley <i>Koji</i>)	283	1583
10 Barley <i>Shochu</i> (barley <i>Koji</i>)	240	1632
11 Sweet potato <i>Shochu</i>	81	198
12 Sweet potato <i>Shochu</i>	69	230
13 Sweet potato <i>Shochu</i>	57	345

Fig. 1 Effects of citric acid concentration on GAD activity.

の範囲でそれぞれ pH 5.5 に調整したクエン酸緩衝液を用いて 37°C, 30 分間の酵素反応により GAD 活性を測定した。麹菌体は YPD 培地の振とう培養で得られた菌体を使用し、クエン酸濃度 1 mM の試験区の GAD 活性を 100 とした場合の相対活性を Fig. 1 に示した。10 mM, 30 mM では活性にほとんど影響は見られず、100 mM で約 20% の活性低下が見られた。500 mM では、GAD 活性は約 1/3 になっていた。今回、リアクター処理に用いた米焼酎粕及び麦焼酎粕のクエン酸濃度を酸度換算で測定したところ、それぞれ 20 mM, 33 mM であり、Fig. 1 から、GAD 活性に対して影響はほとんどないと考えられた。しかし、泡盛焼酎粕は全麹でクエン酸量が 67 mM と多く、GAD 活性を若干低下させると予想される。

3. 米及び麦焼酎粕の GABA 生産における補酵素 PLP の必要性

前報¹³⁾において、液体培養した麹菌の GAD はアポ酵素の状態で存在するため、GABA 生産時は PLP の添加が必要であることを報告した。今回、焼酎粕中の PLP 濃度は測定していないが、焼酎粕を用いた GABA 生産における PLP の必要性を検討するために、PLP 添加区と無添加区で GABA 生成量の比較を行った。実験方法 5 において、L-グルタミン酸ナトリウム 1 水和物 50 mM 並びに PLP 50 μ M を含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 5.5) を、PLP 10 μ M を添加した米焼酎粕 (pH 5.5)、及び PLP を添加しない米焼酎粕 (pH 5.5) に置き換えて、GABA 生成量を測定した。その結果、PLP 添加区は麹菌によって 270 mg/L の GABA を生成したが、PLP 無添加区の生成量は

Fig. 2 Production of GABA from glutamic acid in rice Shochu-residue by continuous reaction using *Aspergillus oryzae*.

10 mg/L に達しなかった。また、麦焼酎粕においても、PLP 添加区生成量 412 mg/L, 無添加区 13 mg/L と、同様の結果だった。米及び麦焼酎粕を原料として用いる場合、効率的な GABA 生産には補酵素 PLP が必要であることが分かった。

4. 麹菌リアクターによる米焼酎粕処理 (Fig. 2)

YPD 培地で培養し低温処理した麹菌体 (GAD 活性 92 U/g を有する dry weight 1.9 g 菌体) を投入したリアクターに、前処理した米焼酎粕を通液し、リアクター出口での焼酎粕 GABA 濃度を測定した結果を Fig. 2 に示す。リアクター処理前の米焼酎粕には、GABA 72 mg/L, グルタミン酸 850 mg/L が含まれていたが、反応時間 60 分以降に出てきた米焼酎粕中の GABA 濃度は平均して 480 mg/L 前後に増加しており、40 分滞留のリアクター処理によって GABA 濃度は約 7 倍に富化されていた。

5. 液体培地に焼酎粕を利用した麹菌体の GAD 活性

本研究では液体培養による麹菌をリアクター担体として用いているが、焼酎粕には窒素源、炭素源、その他ミネラルが豊富に含まれ、焼酎粕自体が麹菌の液体培地になり得ると考えられた。そこで、麦焼酎粕及び米焼酎粕を遠心分離して上澄み液をろ過し、pH を YPD 培地と同様 4.8 に調整し、麹菌を液体培養した。その結果、両焼酎粕培地において麹菌は良好に生育し、Table 2 に示すとおり、ペレット状の菌体収量は YPD 培地 6.5 g (dry weight)/L に対して米焼酎粕培

Table 2 Effects of medium types on GAD activity.

Type of medium	Mycerium yield (g/L)	GAD activity (U/g)
YPD medium	6.5	7.2
Rice <i>Shochu</i> residue	7.0	43.1
Barley <i>Shochu</i> residue	7.5	41.3

Fig. 3 Production of GABA from glutamic acid in barley *Shochu*-residue by continuous reaction using *Aspergillus oryzae*.

地 7.4 g (dry weight)/1 L, 麦焼酎粕培地 7.9 g (dry weight)/1 L だった。培養終了直後の菌体 GAD 活性は YPD 培地 7.2 U/g に対し、焼酎粕培地による菌体は米と麦各々 41.3 U/g, 43.1 U/g と約 6 倍の GAD を有していた。両焼酎粕培地に当初から含まれていた GABA 濃度は、培養を通して増加しておらず、YPD 培地¹²⁾と同様の結果だった。

6. 麦焼酎粕培地により培養した麹菌体を用いたリアクター反応 (Fig. 3)

焼酎粕培地で得られた菌体が高 GAD 活性を有していたことから、麦焼酎粕培地から得られた麹菌体を、低温 (4℃) による酵素の活性化 (7 days) を行わずに、リアクターに使用した。Table 1 より、各種焼酎粕の中で最もグルタミン酸含有量が多く、GABA の高富化が期待できる麦焼酎粕を通流した。

200 ml 容量のリアクターに対して、麹菌体 2.0 g (dry weight), 流速 10 ml/min, 240 分間の連続処理の結果, Fig. 3 に示すように、反応開始 40 分でリアクター出口での麦焼酎粕 GABA 濃度は 1000 mg/L 以

上に達し、以降、平均して 1100 mg/L の GABA が含まれて出てきた。初発の GABA 酸濃度は 240 mg/L だったが、20 分滞留のリアクター処理により GABA は約 5 倍に富化されていた。

考 察

本来、焼酎粕には原料由来の各種アミノ酸と、麹由来のクエン酸が豊富に含まれているが、今回、原料によって含有量に差はあるものの焼酎粕自体に相当量の GABA が含まれていることが分かった。特に麦焼酎粕に多いのは、原料のグルタミン酸含有量が米 1.15 g/100 g, いも 0.18 g/100 g 可食部であるのに対して、大麦は 2.26 g/100 g 可食部¹⁵⁾と高いことに起因すると思われる。また、泡盛と米焼酎は両者とも原料に米を用いているが、泡盛粕の GABA 含有量が多かった。高橋等¹²⁾は、清酒醸造においては製麹過程で麹菌により GABA が生産されると報告している。焼酎製造においても、GABA 生成が麹菌に由来するならば、泡盛が全麹で製造されるのに対して、米焼酎は平均 30%の麹歩合であることが、泡盛粕の GABA 含量が多い要因であると考えられる。

他の醸造品に含有される GABA 量は、味噌 47 mg/kg¹⁰⁾ 及び、醤油 53 mg/L (市販減塩タイプ 3 点平均)、清酒 12 mg/L (市販上撰タイプ 3 点平均) であり、また、GABA を富化したお茶で知られるギャバロン茶 (市販品 3 点) も通常飲用する状態で平均 16 mg/L の含有量であったことと比較して、焼酎粕中の GABA 濃度が高いことが示された。焼酎粕の健康飲料化や調味料化など、高度利用が進んでいる中で、焼酎粕が生理活性物質である GABA を多く含有していることは、機能性を有する飲料や食材への開発につながる可能性があると考えられる。

今回の報告では、さらに麹菌リアクターによって、焼酎粕中の遊離グルタミン酸を利用して米焼酎粕では

72mg/L から 480mg/L へ約 7 倍に、麦焼酎粕では 240mg/L から 1100mg/L へと約 5 倍に GABA を富化することができた。用いた麹菌体の GAD 活性からすると、リアクター内の滞留時間はさらに短縮できると考えられる。あるいは、焼酎粕にグルタミン酸を添加することで、さらに高濃度の GABA 富化焼酎粕を得ることも可能である。この結果は、麹菌リアクターが、焼酎粕の機能性をさらに高めるにとどまらず、各種飲料への GABA 富化に応用できることを示している。

GABA 生産に必要な麹菌体を得るために、焼酎粕を培地として利用できることも、有効利用の観点から意味が大きいと思われる。また、米及び麦焼酎粕を培地に用いて培養した麹菌体が、両者とも YPD 培地による菌体の約 6 倍の GAD 活性を有したことも、興味ある結果であった。その理由については明らかではないが、焼酎粕中に GAD 酵素生産を誘導する成分が存在することも考えられ、今後検討したい。

今回、米及び麦焼酎粕培地で高 GAD 活性を有する麹菌が得られたにもかかわらず、培地中の GABA 濃度は、培養を通して増加しなかった。一方、固体培養による固体麹では菌体の増殖に伴って、GABA が増加すると報告されており¹¹⁾、麹菌体の GAD 活性とその作用は培養法によって大きく影響を受けると推察された。そこで、常法にて製麹した固体麹（米麹）を粉碎し、GAD 活性を測定したところ、PLP (50 μ M) 添加区 0.63 U/g 米麹に対して、PLP 無添加区では 0.31 U/g 米麹だった。PLP 無添加区においても添加区の 50% の活性があったのは、米由来の補酵素による効果の可能性がある。その結果、固体麹ではある程度の GABA 生産が見られる反面、アポ酵素の GAD しか得られない液体培養¹⁴⁾では GABA が蓄積されなかったと推察される。

今回、焼酎粕中のグルタミン酸量から換算すると過剰量の GAD を反応させたので、4 時間のリアクター運転中に GABA が低下することはなかったが、さらに長時間のリアクター運転時あるいは高濃度の基質を反応させる場合には、熱や攪拌による酵素失活も考えられることから、検討が必要と思われる。

岡田等¹⁶⁾は GABA 富化脱脂米胚芽について、ヒト経口において更年期障害低減作用があったと報告しているが、その時の GABA 摂取量は 26 mg/day であり、

本報告での GABA 富化麦焼酎粕の約 24ml に相当する。また、乳酸菌由来の GABA 含有発酵粉末については、本態性高血圧自然発症ラット (SHR) への経口投与 (GABA 1mg/day/100g) で血圧上昇抑制効果が認められ¹⁷⁾、紅麹の血圧降下作用の報告の中では SHR に対して、1mg 純品 GABA/100g diet で顕著な効果が、0.1mg 純品 GABA/100g diet である程度の効果が得られている¹⁸⁾。GABA を富化した焼酎粕についても同様の効果が期待できるため、今後、*in vivo* における機能性の検証が必要と考えている。

要 約

- 1) 血圧上昇抑制作用を有することで注目されている機能性成分である GABA について、焼酎粕中に含まれる量を測定した結果、原料ごとに比較すると、麦焼酎粕（麦麹）> 麦焼酎粕（米麹）> 泡盛粕 > 米焼酎粕 > 芋焼酎粕の順に GABA を多く含んでおり、13 点中、最大 283mg/L、最少 57mg/L だった。
- 2) 焼酎粕に豊富に含まれるグルタミン酸を利用して、麹菌リアクターにより、さらに焼酎粕中 GABA を富化させることを試みた。液体培養で得られる麹菌体の菌体結合型グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) を利用した攪拌槽型連続リアクターについて検討した。
- 3) YPD 液体培地によって得られたペレット状の味噌用麹菌体（乾燥重量 1.9g）を低温処理してリアクター（200ml 容）に投入し、10 μ M ピリドキサル 5-リン酸を添加した米焼酎粕上澄液 (pH 5.5) を 4 時間通液して連続処理した結果、GABA 濃度 72mg/L だった米焼酎粕が、反応開始 60 分以降反応終了時まで、リアクター出口では平均 480mg/L に達し、約 7 倍に増加した。
- 4) 米及び麦焼酎粕を培地に用いて液体培養した結果、麹菌体が良好に生育したばかりでなく、菌体 GAD 活性は、YPD 培地による麹菌と比較して約 6 倍の活性を有していた。この麹菌体（乾燥重量 2.0g）を、低温による酵素の活性化を行わずにリアクターに使用したところ、GABA 240mg/ml を含む麦焼酎粕を、20 分のリアクター滞留時間で終濃度 1100mg/L へと富化することができた。

この研究の一部は、文部科学省の委託研究事業である地域先導研究事業の中で行われたものである。

参考文献

- 1) 熊本国税局：平成12酒造年度しょうちゅう調査書（2000）
- 2) 土谷紀美，西村賢了，園田頼和：醸協，**94**, 667-673（1999）
- 3) 沖縄国税事務所：平成13年度泡盛調査書（2001）
- 4) 横山定治，垂水彰二：生物工程，**79**, 211-217（2001）
- 5) 望月 望，宮本安紀子，萩原美和子，竹島直樹，大森俊郎：醸協，**96**, 559-563（2001）
- 6) Y. Furuta, H. Takahashi, T. Omori, K. Sonomoto, K. Ishizaki : Ann. N. Y. Acad. Sci., **864**, 276-279（1998）
- 7) L. D. Mahfuds, K. Hayashi, Y. Otsuji, A. Ohtsuka, Y. Tomita : Jpn. Poult. Sci., **33**, 1-5（1996）
- 8) 林 國興：生物と化学，**36**, 81-82（1998）
- 9) H. C. Stanton : Arch. Int. Pharmacodyn., **143**, 195-204（1963）
- 10) 宮間浩一，阿久津智美，渡辺恒夫，岡本竹己：味噌の科学と技術，**46**, 168（1998）
- 11) 片岡浩平，岩井洋子，家村芳次，原昌道：醸協，**91**, 658（1996）
- 12) 高橋俊成，岩井洋子，溝口晴彦，原昌道：平成12年度日本生物工学会大会要旨集，62（2000）
- 13) 土谷紀美，西村賢了：醸協，**97**, 382-386（2002）
- 14) 土谷紀美，西村賢了，岩原正宜：醸協，投稿中
- 15) 日本食品標準成分表（5訂）：科学技術庁資源調査会編（2001）
- 16) 岡田忠司，杉下朋子，村上太郎，村井弘道，三枝貴代，堀野俊郎，小野田明彦，梶本修身，高橋 励，高橋 丈夫：食科工誌，**47**, 596-603（2000）
- 17) 愛宕世高，戸田登志也，奥平武則：食品と開発，**36**, 12-14（2001）
- 18) 辻啓介，市川富夫，田辺伸和，阿部士朗，樽井庄一，中川靖枝：栄養学雑誌，**50**, 285-291（1992）.