リンゴ酸高生産清酒酵母のエチルアルコール生成能の改善

小金丸和義*・墨 利久¹・神田康三・加藤富民雄・田代康介²・久原 哲²

(佐賀大学農学部応用生物科学科, ¹佐賀県地域産業支援センター,

²九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門)

平成 15 年 11 月 1 日受理

Improvement of the ethyl alcohol production ability of high malic acid sake yeast

Kazuyoshi KOGANEMARU*, ¹Toshihisa SUMI, Kohzo KANDA, Fumio KATO,

²Kohsuke TASIRO and ²Satoru KUHARA

(Department of Applied Biological Sciences, Saga University. ¹Saga Prefecture Regional Industry Support Center. ²Department of Genetic Resources Technology, Kyusyu University.

1, Honjo, Saga City, Saga 849-8502. ¹114, Yaemizo, Nabesima-cho, Saga City, Saga 849-0932.

²10-1-6 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka City, Fukuoka 812-8581.)

A mutant (M 7-14), a high malic acid producer, was isolated from cycloheximide resistant mutants of Kyokai 7 yeast (K-7). The amount of ethyl alcohol which M 7-14 produced was decreased to 70% as compared with K-7. Therefore, a trichothecin resistant mutant was isolated from M 7-14 to improve the ethyl alcohol production ability of the mutant. A high ethyl alcohol producing mutant (M 7 T 65) was isolated from M 7-14. The activities of alcohol dehydrogenase increased, and the expression rates of genes encoding *ADH1*, *ADH2* and *ADH5* were obviously enhanced in the M 7 T 65 compared with M 7-14. Moreover, the amount of malic acid produced by M 7 T 65 was decreased to 90% of M 7-14, and the high malic acid production ability was also maintained in M 7 T 65 compared with K-7. Also the expression of mRNA from genes related to malic acid production was analyzed using micro-tips plates of *S. cerevisiae* genes. The amounts of the gene expression of *MDH1* and *MDH2* encoded malate dehydrogenase were obviously enhanced in the M 7 T 65 compared with K-7.

Key words : リンゴ酸, トリコセシン耐性株, DNA マイクロアレイ

緒 言

清酒中の有機酸は呈味成分として重要な因子であり、特にリンゴ酸は「さわやかな」「すっきりした」味を与えられている¹⁾。リンゴ酸高生産酵母に関しては、相川はジメチルコハク酸感受性株より分離し²⁾、水野らは2-デオキシグルコース耐性株より³⁾、Asanoらはマルトース低資化能株より分離している⁴⁾。また吉田らはシクロヘキシミド耐性株よりリンゴ酸高生産株を分離している⁵⁾。我々もさわやかな酸味を有する

清酒の開発を目的として、シクロヘキシミド耐性株の中からリンゴ酸高生産酵母の分離を行った。分離したシクロヘキシミド耐性株のリンゴ酸高生産酵母 (M 7-14) を用いて清酒の小仕込み試験を行ったところ、親株の醸造協会 7 号酵母 (K-7) に比べて 2.8 倍量のリンゴ酸の生成がみられた。しかし、清酒の小仕込み試験の結果、生成酒のエチルアルコール濃度に関して M 7-14 は K-7 に比べて 70% 程度に低下した⁶⁾。そこで、清酒のエチルアルコール濃度が K-7 と同程度で、しかもリンゴ酸生成能が高い酵母の分離を目的にトリ

コセシン耐性株の分離を行った。清酒の小仕込み試験の結果、親株である K-7 とほぼ同程度のエチルアルコール濃度を生成する酵母 (M 7 T 65) が得られた。この M 7 T 65 のエチルアルコール生成能の向上を明らかにするため、エチルアルコール生成に関する酵素活性や遺伝子の転写レベルでの発現量を調べた。

実験方法

1. 供試菌株と使用培地

酵母は前報⁶⁾で分離したリンゴ酸高生産酵母 (M 7-14) と醸造協会 7 号酵母 (K-7) を使用した。

酵母の培養には YPD 培地 (酵母エキス 1%, ポリペプトン 2%, グルコース 2%) または YM 5 培地 (酵母エキス 0.5%, ポリペプトン 0.5%, 麦芽エキス 0.3%, グルコース 5%), YM 10 培地 (YM 5 のグルコースが 10%) を使用した。またトリコセシン耐性株の分離には YNB 培地 (イーストニトロゲンベース 0.67%, グルコース 2%) を、耐性株の有機酸やエチルアルコール分析には YNB 15 培地 (YNB 培地のグルコースが 15%) を用いた。さらに酵母のエチルアルコール耐性試験には麴汁培地及びポテトデキストロース寒天培地を用いた。

2. トリコセシン耐性株の分離

Fukuda らの方法⁷⁾に準じてトリコセシン耐性株の分離を行った。つまり、リンゴ酸高生産酵母 (M 7-14) を YPD 培地で 30°C, 1 日間振とう培養後、遠心集菌し、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 10 ml に懸濁し、懸濁液に 40% グルコース 0.5 ml 加え、0.3 ml エチルメタンスルホネート (EMS) を加え、30°C, 60 分変異処理を行った。変異処理後、遠心集菌し、6% チオ硫酸ナトリウム 10 ml 加えて EMS を中和後、トリコセシンを 5 µg/ml 含有の YNB 寒天培地に塗布し、30°C で 7 日間培養し生育してきたコロニーを鈎菌した。さらに生育したコロニーをトリコセシン濃度を 2 倍にした YNB 寒天培地で培養し、再度生育したコロニーをトリコセシンを 20 µg/ml 含む YNB 寒天培地で培養して、生育したコロニーをトリコセシン耐性株として鈎菌した。生育したトリコセシン耐性株を YNB 15 培地で培養し、有機酸とエチルアルコールの分析を行いリンゴ酸とエチルアルコールの生成量の多い株を選別した。

3. 清酒の小仕込み試験

清酒の小仕込み試験は難波らの方法⁸⁾に準じ、総米 200 g, 麴歩合 20%, 汲水歩合 140% の三段仕込みで行った。原料米はレイホウの 70% 白米を使用し、添仕込み、踊りの温度は 15°C, 仲仕込みは 10°C, 留仕込みは 8°C で行った。その後徐々に品温を上げ、5 日目に 16°C とし 9 日目に 14°C とした。25 日目も品温は 14°C で上槽した。炭酸ガス発生量を測定して発酵経過とした。

4. 分 析 法

製成酒の一般分析は国税庁所定分析法⁹⁾に基づき測定した。有機酸は高速液体クロマトグラフ (島津有機酸分析システム) によった。エチルアルコールはガスクロマトグラフ (島津 GC-9 A) により分析した。

5. エチルアルコール耐性試験

酵母のエチルアルコール耐性試験は原らの¹⁰⁾アルコール耐性の強い変異株の分離法の一部を改変して行った。つまり、麴汁 10 ml に酵母を植菌し、30°C で 2 日間培養後、遠心集菌し、5 ml の無菌水に懸濁した。その懸濁液 1 ml に 18% エチルアルコールと 1% グルコースを含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.2) 9 ml を加えて 30°C で培養した。経時的にポテトデキストロース寒天培地に塗布し生育したコロニーをカウントして生存率を測定した。

6. 粗酵素液の調製と酵素活性

YM 5 培地で前培養した酵母を 1% 加え、30°C で 660 nm の吸光度が 1.0~1.2 まで新たな YM 5 培地で培養した。培養後、遠心集菌し、無菌水で 2 回洗浄し、1 mM EDTA, 20 mM 2-メルカプトエタノール及び 0.8 M ソルビトールを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、30°C で 20 分振とうした。振とう後、0.8 M ソルビトールを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0, 以後リン酸緩衝液と略す) で洗浄後、遠心集菌し、3 units/ml ザイモリエース 20 T を含むリン酸緩衝液に懸濁し、30°C で 1 時間、穏やかに振とうした。リン酸緩衝液で洗浄後、0.1 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 5 ml に懸濁し、超音波処理を行い、2,500 × g, 10 分間遠心分離し上澄液と沈殿部を得た。さらに沈殿部は 0.1 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 5 ml を加えて懸濁し、細胞質画分である上澄液及び細胞膜画分である沈殿部を粗酵素液とした。

アルコールデヒドロゲナーゼの活性測定は、酵素ハンドブックの測定方法¹¹⁾に準じて行い、1.5mM NAD⁺、3M エチルアルコールを含む、60mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) で行った。酵素活性1単位は、1分間当たり1 μ M のNADH を生成する酵素量とした。

ピルベートデカルボキシラーゼの活性測定は、20mM NADH、50mM 塩化マグネシウム、100mM ピルビン酸を含む50mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) で行い、生成したアセトアルデヒドをRoche社製のFキットを用いて測定した。酵素活性1単位は、1分間当たりの1 μ gのアセトアルデヒドを生成する酵素量とした。

タンパク質の測定は、牛血清アルブミンを標準物質とした、Bio-Rad社製のプロテインアッセイ法により測定した。

7. 遺伝子発現量の比較

親株と変異株をYPD培地で30°C、2日間静置培養し、Gentra社製のRNA単離キットを用いて全RNAを調製し、異なる蛍光色素 (Cy 3, Cy 5) で標識し、出芽酵母のDNAマイクロアレイを用いて競合的ハイブリダイゼーションを行い全遺伝子の転写レベ

ルでの発現量を比較検討した¹²⁾。

実験結果及び考察

1. トリコセシン耐性株の分離

Fukudaらはトリコセシン耐性株の中からエチルアルコール高生産株の分離を行っている⁷⁾。そこでリンゴ酸高生産酵母 (M 7-14) のエチルアルコール高生産株を得るため実験方法に従ってトリコセシン耐性株の分離を行った。M 7-14をEMS処理すると、処理後の生存率は 3×10^{-2} となった。その0.1mlをトリコセシン5 μ g/ml含有のYNB寒天培地に塗布し7日間培養した。その結果、出現した耐性株は779株で出現率は約 10^{-5} であった。得られた耐性株をトリコセシン10 μ g/ml含有のYNB寒天培地で培養し、さらにトリコセシン20 μ g/ml含有のYNB寒天培地で培養して87株のトリコセシン耐性株を得た。耐性株取得率は約 10^{-6} となった。

2. エチルアルコール生成能改善酵母の分離

トリコセシン耐性株87株をYNB15培地で30°C、2日間培養し培養液のエチルアルコールと有機酸組成を調べた。エチルアルコールの生成がM 7-14より多

Table 1 Production of ethyl alcohol and organic acids by trichothecin resistant mutants

	Ethyl alcohol (%)	Pyruvic acid (mg/l)	Malic acid (mg/l)	Succinic acid (mg/l)	Lactic acid (mg/l)	Acetic acid (mg/l)
K-7	3.75	140	40	42	95	443
M 7-14	2.70	121	104	42	62	304
M 7 T 5	3.19	128	108	112	86	394
M 7 T 7	3.31	125	108	112	86	485
M 7 T 14	3.28	117	115	89	108	472
M 7 T 15	2.80	156	85	38	79	314
M 7 T 16	3.10	149	102	44	77	336
M 7 T 33	3.05	144	108	73	77	576
M 7 T 35	2.99	185	126	93	133	496
M 7 T 37	3.11	129	108	90	85	444
M 7 T 47	3.04	205	145	61	94	279
M 7 T 57	3.13	126	176	71	117	412
M 7 T 65	3.11	129	130	48	66	459
M 7 T 80	2.78	173	94	64	101	400

Trichothecin resistant mutants were cultured for 2 days at 30°C using a YPD medium.

These 12 mutants showed high ethyl alcohol production in comparison with M 7-14.

Table 2 Components of small scale sake brewed by trichothecin resistant mutants

	Ethyl alcohol (%)	Sake meter	Acidity	Malic acid (mg/l)	Succinic acid (mg/l)	Citric acid (mg/l)	Acetic acid (mg/l)	Pyruvic acid (mg/l)	Lactic acid (mg/l)
K-7	16.8	-9	4.6	266	619	59	742	622	569
M 7-14	12.4	-36	5.5	806	1194	80	495	569	755
M 7 T 5	13.4	-22	6.2	877	1227	66	578	503	577
M 7 T 7	15.1	-6	5.8	879	985	53	471	576	651
M 7 T 14	14.7	-13	6.0	894	1138	60	547	531	611
M 7 T 16	14.2	-19	6.2	868	1218	58	612	547	537
M 7 T 37	15.9	-6	6.1	876	1014	59	561	577	647
M 7 T 57	15.8	-10	5.6	821	948	58	525	571	578
M 7 T 65	17.2	-2	5.3	730	1168	76	158	701	543

Small scale sake brewing with trichothecin resistant mutants was carried out for 25 days.

Total rice : 200 g, koji : 40 g, water : 280 ml.

Table 3 Ratio of gene expression of enzymes in malic acid and ethyl alcohol production

Enzyme	Gene	Ratio	
		M 7-14/K-7	M 7 T 65/K-7
malate dehydrogenase	<i>MDH1</i>	1.8	1.4
isocitrate lyase	<i>ICL1</i>	1.4	1.0
〃	<i>ICL2</i>	0.9	0.7
malate synthase	<i>MLS1</i>	0.7	1.7
pyruvate decarboxylase	<i>PDC1</i>	0.6	0.3
〃	<i>PDC2</i>	0.2	0.4
〃	<i>PDC5</i>	0.3	0.3
〃	<i>PDC6</i>	0.5	0.5
alcohol dehydrogenase	<i>ADH1</i>	0.2	0.4
〃	<i>ADH2</i>	0.4	0.8
〃	<i>ADH5</i>	1.0	1.2
aldehyde dehydrogenase	<i>ALD4</i>	0.9	0.4
〃	<i>ALD5</i>	1.0	1.3
〃	<i>ALD6</i>	1.1	0.8

かった耐性株を Table 1 に示す。その結果、耐性株 87 株より 12 株得られた。これらの耐性株の中から、エチルアルコールが 3.1%以上の生成があった 7 株を選択して清酒の小仕込み試験を行った。

3. 清酒の小仕込み試験

エチルアルコールの生成が多く及びリンゴ酸の生成が多い 7 株を用いて、総米 200 g の清酒の小仕込み試験を行い、炭酸ガス発生量を測定して発酵経過とした。

上槽した清酒の分析結果を Table 2 に示す。トリコセシン耐性の 7 株は M 7-14 よりエチルアルコールの濃度が増加していた。これらの耐性株の内、M 7 T 65 は K-7 と同程度のエチルアルコール濃度となり、リンゴ酸の生成は M 7-14 の約 90%となったが、K-7 と比べると 2.7 倍の生成量であった。このようにエチルアルコール生成能が改善されたリンゴ酸高生産酵母 M 7 T 65 を得ることができた。

Fig. 1 Survival rate in acetate buffer including 1% glucose and 18% ethyl alcohol (pH 4.2).
Symbols: ●, K-7; ■, M7-14; ▲, M7T65

4. エチルアルコール耐性試験

Fukuda らはトリコセシン耐性株が多剤薬剤耐性を示し、トリコセシン耐性株のエチルアルコール高生産能は多剤薬剤耐性とエチルアルコール耐性に関係していると報告している⁷⁾。M7T65も清酒の小仕込み試験の結果、生成酒のエチルアルコール濃度が高くなったことから、エチルアルコール耐性が付与されたと推定された。

そこで、エチルアルコール18%存在下でM7T65のエチルアルコール耐性を調べた。その結果をFig. 1に示す。24時間培養後の生存率は、K-7が12%であるのに対し、シクロヘキシミド耐性のM7-14は4.5%とエチルアルコール耐性能が低下していた。トリコセシン耐性のM7T65はM7-14よりエチルアルコ

ール耐性が向上していると予想されたが、逆にエチルアルコール耐性は低下し0.3%の生存率であった。よって、M7T65のエチルアルコール生成能の向上はFukuda らが報告している⁷⁾トリコセシン耐性株とは異なりエチルアルコール耐性の向上によるものではないと判断した。

5. M7T65のエチルアルコール生成要因の解析

M7T65はエチルアルコール耐性が低下しているにもかかわらず、エチルアルコールがM7-14に比べて高生産されることから、エチルアルコールの生成に関与する酵素活性が向上していると推察された。エチルアルコールの代謝経路、トリカルボン酸 (TCA) 回路及びグリオキシル酸回路におけるエチルアルコール及びリンゴ酸生成に関与する酵素と遺伝子をFig. 2

に示す。まず、エチルアルコールの生成に関与するアルコールデヒドロゲナーゼとピルベートデカルボキシラーゼの酵素活性を測定した。その結果を Fig. 3, Fig. 4 に示す。アルコールデヒドロゲナーゼ活性は細胞膜画分の方が高く、この酵素は膜に結合した酵素と考えられた。アルコールデヒドロゲナーゼ活性は M 7-14 の 12.6 units/mg - protein に比べ M 7 T 65 は 17.0 units/mg-protein と約 1.3 倍に活性が向上していた。M 7 T 65 の活性は M 7-14 と 1% の危険率で有意差があったが、K-7 とは有意差は無かった。また、ピルベートデカルボキシラーゼ活性（細胞膜画分）は、M 7 T 65 は 0.015 units/mg-protein で、M 7-14 より活性が 2.5 倍になりピルベートデカルボキシラーゼ活性も向上していた（M 7 T 65 の活性は、M 7-14 とは 1% の危険率で有意差があったが、K-7 とは有意差は無かった）。このように酵素活性の測定結果から、M 7 T 65 はエチルアルコールの生成に関与するアル

コールデヒドロゲナーゼやピルベートデカルボキシラーゼ活性が M 7-14 より向上し、K-7 と同程度までエチルアルコールの生成能が改善された変異株であることが分かった。

次に、エチルアルコールの生成と酵素活性との関連を明らかにするため、トリコセシン耐性株の M 7 T 65 と K-7、また M 7-14 と K-7 の遺伝子の発現量の比較を DNA マイクロアレイを用いて調べた¹²⁾。その結果を Table 3 に示す。M 7 T 65 はエチルアルコールの生成に関する酵素であるアルコールデヒドロゲナーゼをコードしている *ADH1*, *ADH2* は 2.0 倍、*ADH5* は 1.2 倍に M 7-14 より発現量が増加しており、エチルアルコールの生成能が改善されたことが証明された。しかし、K-7 と比較すると M 7 T 65 は *ADH5* が 1.2 倍に発現量が増加していたが、発現量の大きな増加は無かった。

なお、清酒の小仕込み試験の結果、Table 2 に示す

Fig. 2 Metabolic map of production of malic acid and ethyl alcohol.

Fig. 3 Alcohol dehydrogenase activities of K-7, M7-14 and M7T65. One unit of activity was defined as the amount of enzyme forming 1.0 μ mole of NADH per min. at pH 7.5 at 30°C. These results were the average of six experiments. The asterisk (*) indicates that the difference from the M7-14 is significant at $p < 0.01$.

ように M7T65 による生成酒の酢酸量が減少していたが、Table 3 に示すように M7T65 の場合アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードしている *ALD6* の発現量が低下したのが一つの要因と考えられた¹³⁾。

6. M7T65 のリンゴ酸生成要因の解析

一方、M7T65 はリンゴ酸高生産株でもあるので、リンゴ酸の生産に関して TCA 回路の電子伝達系阻害剤であるアジ化ナトリウムを 120 μ M 添加し⁶⁾ M7-14 と比較検討した。その結果、M7T65 は M7-14 とリンゴ酸の生成に関しアジ化ナトリウムの添加で同じように約半分量の生成となり、ミトコンドリアのリンゴ酸デヒドロゲナーゼとグリオキシル酸回路のイソク

エン酸リアーゼの酵素活性が K-7 よりも向上してリンゴ酸高生産を示し、さらにコハク酸の生成量も多くなっていると推察された。また、DNA マイクロアレイでリンゴ酸生成に関する遺伝子の発現量を比較した結果 (Table 3), M7T65 は K-7 より *MDH1*, *MDH2* で 1.4 倍の発現量となっていることから M7T65 が K-7 よりリンゴ酸高生産である一つの理由と推察された。

以上の結果より、M7T65 が M7-14 よりエチルアルコール生成能が向上したのは、アルコールデヒドロゲナーゼの遺伝子の発現量が向上し、それに伴い、酵素活性も増強されたためと結論した。また、リンゴ

Fig. 4 Pyruvate decarboxylase activities of K-7, M 7-14 and M 7 T 65 prepared cell membrane bound. One unit of activity was defined as the amount of enzyme forming 1.0 μ g of acetaldehyde per min. at pH 7.5 at 30°C. These results were the average of three experiments. The asterisk (*) indicates that the difference from the M 7-14 is significant at $p < 0.01$.

酸の高生産能は M 7-14 より若干減少したが、生成機構は同じと考えられた。

また、Fukuda らはトリコセシン耐性株が多剤薬剤耐性を示すことを報告⁷⁾しているの、M 7 T 65 の各種薬剤に対する耐性を調べた。その結果を Table 4 に示す。M 7 T 65 はトリコセシン以外の薬剤に対して M 7-14 と同じ傾向で、セルレニン及びクロトリマゾールに対して感受性を示し、多剤薬剤耐性は獲得しておらず、Fukuda らが分離したトリコセシン耐性株とは性質を異にしていた。

さらに、M 7 T 65 を用いた清酒の醸造を考えると、エチルアルコール耐性が弱いので仕込み温度を高くして酵母の増殖を図り、もろみの後半は品温を下げて酵母の死滅に気をつける必要がある。このようにエチルアルコール生成能が改善された酵母を得ることができ

たが、エチルアルコール耐性が弱くなっていたので、もろみ管理が容易になるようにエチルアルコール耐性能が向上した酵母の育種が必要である。

要 約

トリコセシン耐性株の中からリンゴ酸高生産酵母 (M 7-14) のエチルアルコール生成能が改善された株 (M 7 T 65) を取得し、清酒の小仕込み試験を行った。この M 7 T 65 のエチルアルコールの生成に関する酵素活性や遺伝子の発現量を調べ以下の結果を得た。

- 1) トリコセシン耐性株 87 株の中からエチルアルコール生成能が高くなった 7 株を得た。
- 2) 清酒の小仕込み試験の結果、リンゴ酸の生成は M 7-14 の約 90% で、エチルアルコールの生成が K-7 と同程度の株 M 7 T 65 を取得した。

Table 4 Multidrug resistance of K-7, M 7-14 and M 7 T 65

	K-7	M 7-14	M 7 T 65
Cycloheximide	—	+	++
Trichothecin	—	—	++
Cerulenin	—	—	—
Clotrimazole	—	—	—
Chloramphenicol	+++	+++	+++
Nikkomycin Z	+++	+++	+++
Canavanine	+++	+++	+++
Oligomycin	+++	+++	+++

Growth was scored on a scale from +++ > ++ > + > - after 3 days of culturing at 30°C using YPD agar plates include a drug. Concentration of each drug is as follows : cycloheximide, 10 mg/l ; trichothecin, 5 mg/l ; cerulenin, 5 mg/l ; clotrimazole, 20 mg/l ; chloramphenicol, 50 mg/l ; nikkomycin Z, 10 mg/l ; canavanine, 70 mg/l ; oligomycin, 10 mg/l.

- 3) エチルアルコール耐性は M 7-14 より低下し、エチルアルコール耐性は認められなかった。
- 4) アルコールデヒドロゲナーゼ活性やピルベートデカルボキシラーゼ活性は、K-7 と同程度までに増強されていた。
- 5) M 7 T 65 の *ADH1*, *ADH2* は 2.0 倍, *ADH5* は 1.2 倍に M 7-14 より発現量が増加していた。
- 6) M 7 T 65 の *MDH1*, *MDH2* の発現量は K-7 より多く、リンゴ酸高生産能は保持されていた。
- 7) M 7 T 65 のエチルアルコール生成能の改善は、アルコールデヒドロゲナーゼの遺伝子が高発現し、それに伴い、酵素活性も増強されたためと結論した。

文 献

- 1) 佐藤信, 大場俊輝, 高橋康次郎, 国分伸二, 小林幹男, 小林宏治 : 醸協, 72, 801-805 (1977)
- 2) 相川元庸 : 清酒酵母研究会, 清酒酵母の研究, 125 (1992)
- 3) 水野昭博, 岩淵正文, 木曾邦明, 佐藤和雄, 高橋利郎 : 醸協, 97, 228-233 (2002)
- 4) T. Asano, N. Kurose, and S. Tarumi : J. Biosci. Bioeng., 92, 429-433 (2001)
- 5) 吉田清, 稲葉正明, 中村欽一, 野白喜久雄 : 醸協, 88, 645-647 (1993)
- 6) 小金丸和義, 大浦有実, 神田康三, 村田晃, 加藤富民雄 : 醸協, 96, 275-281 (2001)
- 7) Hisashi Fukuda, Sang Bae Park, Yasuzo Kizaki and Kojiro Takahashi : World J. Microbiol. Biotechnol., 15, 629-630 (1999)
- 8) 難波康之祐, 小幡孝之, 萱島進, 山崎与四郎, 井上光産, 下田高久 : 醸協, 73, 295-300 (1978)
- 9) 注解編集委員会編 : 財団法人日本醸造協会発行, 第四回改正国税庁所定分析法注解, 7-33 (2000)
- 10) 原唱道, 佐々木雅晴, 小幡孝之, 野白喜久雄 : 醸協, 71, 301-304 (1976)
- 11) 赤堀四郎 : 朝倉書店出版, 酵素ハンドブック, 1-2 (1966)
- 12) 村松正明, 須波宏之 : 秀潤社出版, DNA マイクロアレイと最新 PCR 法, 67-75 (2000)
- 13) Fabienne R., Emilie A., and Sylvie D. : Appl. Environ. Microbiol., 66, 3151-3159 (2000)