[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 68, No. 2, pp. 233~239, 1994]

ウスターソース製造に適した耐浸透圧性酵母の選抜

深谷哲也, 坂本秀樹*, 村岡明高*

高見澤一裕, 堀津浩章

(岐阜大学大学院連合農学研究科, *カゴメ(株)総合研究所)

平成5年8月12日受理

Selection of an Osmotolerant Yeast for Worcestershire Sauce Production

Tetsuya FUKAYA, Hideki SAKAMOTO*, Akitaka MURAOKA*, Kazuhiro TAKAMIZAWA,
and Hiroyuki HORITSU

The United Graduate School of Agricultural Sciences, Gifu University, 1-1
Yanagido, Gifu, Gifu 501-11

* Research Institute, Kagome Co., Ltd., 17 Nishitomiya, Nishinasuno-machi,
Nasu, Tochigi 329-27

Worcestershire sauce production might include a fermentation step. The raw materials have high osmotic pressure, so we set out to select an osmotolerant yeast strain suitable for Worcestershire sauce production. Three commonly used yeasts were evaluated: *Saccharomyces cerevisiae* OC-2, a wine yeast; *Kluyveromyces fragilis* IFO 0288, widely used for fermentation of kefir grains; and *Zygosaccharomyces rouxii* IFO 0493, a soy sauce yeast. In the range of total sugar concentrations of 28.1-47.8% (the mixture contained sucrose, glucose, and fructose), cell numbers and ethanol production decreased as the sugar concentration rose, especially with *K. fragilis*. The relationship between the total sugar concentration and ethanol production by each yeast was expressed as follows:

S. cerevisiae OC-2 ($n=8$, $r=0.999$)

$$P = -1.54 \times 10^{-4} \times S^3 + 1.72 \times 10^{-2} \times S^2 - 0.649 \times S + 8.91$$

K. fragilis IFO 0288 ($n=8$, $r=0.995$)

$$P = (-3.57 \times 10^{-2} \times S) + 1.74$$

Z. rouxii IFO 0493 ($n=8$, $r=0.987$)

$$P = -1.15 \times 10^{-3} \times S^2 + 9.38 \times 10^{-2} \times S - 1.36$$

where P is the ethanol production and S is the total sugar concentration. Under the usual conditions for Worcestershire sauce production, with 39% total sugars, *S. cerevisiae* OC-2 had the greatest osmotolerance of the three yeasts, with higher ethanol productivity and satisfactory production of aromatic components than the other yeasts. We selected *S. cerevisiae* OC-2 for trial in the proposed new step in Worcestershire sauce production. (Received August 12, 1993)

緒 言

発酵調味料に関する研究は、醤油^(1,2)、魚醤^(3,4)および食酢^(5,6)など、数多くの報告があるが、発酵を利用したウスターソースの製造に関する研究は、これまでほとんど報告されていない⁽⁷⁾。

著者らは、ウスターソース製造に発酵工程を導入する新しい研究を進めており、前報⁽⁷⁾にて、野菜・果実の発

酵液を加えた新しい型のウスターソース製造法を報告した。このなかで、*Saccharomyces cerevisiae* を用いたトマト、ミカンおよびリンゴ搾汁液のアルコール発酵液や、*Lactobacillus delbrueckii* を用いた野菜搾汁混合液(レタス、キャベツ、セロリ、タマネギおよびニンジン)の乳酸発酵を用いた発酵ウスターソースは、官能的に優れた香味を有していたことを報告した。

ところで大量生産用アルコール発酵において、その

発酵基質である糖蜜の糖濃度は一般的に 18~24% である⁽⁸⁾。これに対し、ウスターソースの新製造プロセスにおいては、発酵基質の糖濃度は約 40%、浸透圧では約 2600 mOsm/kg であり、発酵基質としてはきわめて高い値を示す。これは使用する酵母の増殖や発酵を阻害し、発酵液の生産性に悪影響を与えると考えられる。そこで本報告においては、代表的な酵母 3 菌株の耐浸透圧性評価を行い、発酵ウスターソースの製造に適する菌株を選抜した。また野菜・果実以外で一般にウスターソースに用いられている素材（糖類、調味素材）を加えた発酵基質（以下ソース発酵用原液と称す）を設定し、その発酵液を利用した新しい発酵ソースの調製も試みた。

実験方法

1. 酵母の前培養条件 酵母の前培養には、YM 培地[ペプトン 0.5% (W/V), 酵母エキス 0.3% (W/V), 麦芽エキス 0.3% (W/V), グルコース 1.0% (W/V)]を用い、培養温度 28±1°C で、24 時間培養 (500 ml 三角フラスコ, 培養液 200 ml, 振盪速度 190 rpm) した。

2. 使用菌株 使用菌株としては、代表的な酵母, *Saccharomyces cerevisiae* OC-2 (ワイン酵母), *Kluyveromyces fragilis* IFO 0288 (ケフィア中に広く分布している乳糖資化性酵母⁽⁹⁾), *Zygosaccharomyces rouxii* IFO 0493 (醤油酵母) の 3 株を用いた。

3. 発酵基質 使用菌株の耐浸透圧性評価には糖組成として、シュクロース、グルコースおよびフラクトースが混在している糖液（以下ソース用糖液と称す）を所定の糖濃度に蒸留水で希釈（8 段階）し、500 ml の三角フラスコに 200 ml ずつ分注後、121°C, 15 min のオートクレーブで殺菌したものを用いた。この際のソース用糖液の糖濃度、浸透圧の値を Table I に示した。なお分析には加熱殺菌による糖組成の変化を考慮し、全てオートクレーブ処理後のものを供した。ここで全糖濃度（シュクロース、グルコースおよびフラクトース濃度の合算値）が 39% (W/V) の場合、ソース用糖液由来の全窒素濃度は 0.10% (W/W), アミノ態窒素濃度は、0.019% (W/V) であった。

またソース発酵用原液は、パルプを除去した野菜・果実の搾汁液 11% (W/W) [内訳：トマト 2% (W/W), タマネギ 2% (W/W), ニンジン 2% (W/W), セロリ 1% (W/W), レタス 1% (W/W), キャベツ 1% (W/W), リンゴ 1% (W/W) および ミカン 1% (W/W)],

Table I. Characteristics of Syrup for Worcestershire Sauce

No.	Total sugar (%)	Sucrose (%)	Glucose (%)	Fructose (%)	Osmosis (mOsm/kg)
1	28.1	20.2	4.3	3.6	1705
2	29.9	21.5	4.6	3.8	1883
3	32.4	23.1	5.1	4.2	2067
4	34.3	24.4	5.5	4.4	2258
5	36.5	25.9	5.8	4.8	2399
6	39.4	27.9	6.3	5.2	—
7	40.2	28.1	6.7	5.4	—
8	47.8	33.4	7.9	6.5	—

—, It was impossible to measure the value of osmosis, because these conditions (total sugar, 39.4, 40.2, and 47.8%) were out of range for the measuring apparatus.

調味素材（調味アミノ酸液）5% (W/W), ソース用糖液 50% (W/W) に蒸留水を 34% (W/W) 加えて調製した。これを 500 ml の三角フラスコに 200 ml ずつ分注後、121°C, 15 min のオートクレーブで殺菌したものを用いた。ソース発酵用原液由来の全窒素濃度は 0.23% (W/W), アミノ態窒素濃度は、0.12% (W/V) であった。

4. 発酵条件 前培養で得られた酵母懸濁液を発酵基質に対し 1% (V/V) 添加した。培養条件は、既に著者がエタノール生産性を高める条件として確認している方法（500 ml 三角フラスコ, 培養液 200 ml, 発酵温度 28±1°C, 振盪速度 190 rpm）を用いて行った。

5. 発酵ウスターソースの調製方法 発酵液 70.0% (W/W), 醸造酢 [酢酸含量 15% (W/V)] 12.0% (W/W), 食塩 9.0% (W/W) および混合香辛料 [内訳：シナモン：ナツメグ：セージ：タイム：ブラックペッパー：クロブ：フェンネル：チリペッパー：セロリシード=12:6:6:6:5:4:4:2.5:2.5] 0.3% (W/W) に蒸留水を加え 100% (W/W) とした。

6. 分析方法 糖濃度は HPLC (カラム, 旭化成工業製 NH 2 P-50; 検出器, 島津製作所製 RID-6 A; インテグレーター, 島津製作所製 C-R 6 A CHROMATOPAC) で、エタノール濃度は HPLC (カラム, 信和化工製 ULTRON RS-80 N; ディテクター, 島津製作所製 RID-6 A; インテグレーター, 島津製作所製 C-R 6 A CHROMATOPAC) で測定した。食塩濃度はモール法⁽¹⁰⁾, 酸濃度（酢酸換算）は中和滴定法⁽¹¹⁾にて測定した。浸透圧は氷点法（Fiske 製オズモ ONE-TEN OSMOMETER）にて測定した。また、全窒素量はケル

ダール法, アミノ態窒素はアミノ態窒素測定装置 (住化分析センター製 SUMIGRAPH MODEL N-300) にて測定した. 細胞数としてメチレンブルーにて染色後, トーマの血球計算盤にて菌数を測定した.

発酵フレーバーとして代表的な香気成分である, イソアミルアルコール, フェネチルアルコールおよびアセトインを選定し, GC-MS を用い内部標準法 [抽出溶媒: (ペンタン: ジクロロメタン=2:1), 内部標準物質: オジクロロベンゼン] にて定量した. GC 部は, HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II, MS 部は, HEWLETT PACKARD 5971 SERIES MASS SELECTIVE DETECTOR, データ処理は, HEWLETT PACKARD MS Chemstation を用いた. 検出条件は, カラム, GL Sciences Inc. 製 TC-WAX (0.25 mm I. D. ×30 m); イオン化電圧, 70 eV; イオン源温度, 230 °Cとした.

実験結果および考察

1. 各浸透圧下における細胞数, エタノール濃度の経時変化

おのおのの菌株のアルコール発酵における細胞数, エタノール濃度の経時変化を, Fig. 1 (*S. cerevisiae* OC-2), Fig. 2 (*K. fragilis* IFO 0288), Fig. 3 (*Z. rouxii* IFO 0493) に示した.

S. cerevisiae OC-2 の場合 (Fig. 1), 全糖濃度が高いほど菌の増殖およびエタノール生成に阻害がみられた. そして全糖濃度が 47.8% (W/V) の場合を除いて, 菌の増殖は培養開始後 42 時間目ではほぼ一定に達したが, エタ

ノール濃度は 108 時間後でも初発の全糖濃度の影響が認められた. また全糖濃度が 47.8% (W/V) の場合では 108 時間目に他の条件とほぼ同様な細胞数が得られたが, エタノール生成は他よりも著しく低いレベルにとどまった.

K. fragilis (Fig. 2) では, *S. cerevisiae* OC-2 の場合と同様な結果が得られたが, 培養開始後 42 時間から 108 時間にかけて細胞数が減少し, 最終エタノール濃度が *S. cerevisiae* OC-2 の場合よりも低い値を示す傾向が認められた.

Z. rouxii の場合 (Fig. 3) は, ほかの 2 種の酵母と比較すると全糖濃度の菌増殖およびエタノール生成への影響は少なかったが, 最終エタノール濃度は最高でも約 6% (W/V) と低いレベルであった. ここで市販ソースの一般的な可溶性固形分である 39% を基準にして, 全糖濃度が 39% (W/V) の場合における発酵 108 時間目のエタノール生産性を比較すると, *S. cerevisiae* OC-2 の場合 0.66 g/l/h で, *K. fragilis* IFO 0288 (Fig. 2) に比べて約 1.8 倍, また *Z. rouxii* IFO 0493 に比べても約 1.2 倍と高く, *S. cerevisiae* OC-2 においてエタノール生成への阻害は最も低い結果となった.

発酵期間中の最高エタノール濃度およびエタノール生産性を Table II, 全糖濃度とエタノール生産性の相関およびそのときの近似式を Fig. 4 に示す. 各使用菌株における全糖濃度とエタノール生産性の相関は顕著に現れた. すなわち各菌株によりエタノール生産性の全糖濃度に対する依存性は異なり, *S. cerevisiae* OC-2 は全糖濃度 37.4% (W/V) に変曲点を示す三次式, *K. fragilis* IFO

Fig. 1. Fermentation Profile by *S. cerevisiae* OC-2 Using Syrup for Worcestershire Sauce. Total sugar, ●, 28.1%; ○, 29.9%; ■, 32.4%; □, 34.3%; ▲, 36.5%; △, 39.4%; ◆, 40.2%; ◇, 47.8%.

Fig. 2. Fermentation Profile by *K. fragilis* IFO 0288 Using Syrup for Worcestershire Sauce. Total sugar, ●, 28.1%; ○, 29.9%; ■, 32.4%; □, 34.3%; ▲, 36.5%; △, 39.4%; ◆, 40.2%; ◇, 47.8%.

Fig. 3. Fermentation Profile by *Z. rouxii* IFO 0493 Using Syrup for Worcestershire Sauce. Total sugar, ●, 28.1%; ○, 29.9%; ■, 32.4%; □, 34.3%; ▲, 36.5%; △, 39.4%; ◆, 40.2%; ◇, 47.8%.

0288 は負の一次式、さらに *Z. rouxii* IFO 0493 は二次式でそれぞれ高い相関性が得られた。一般的に、酵母は本実験で用いた高い糖濃度範囲において、全糖濃度の上昇につれてそのエタノール生産性は低下すると考えられるが⁽¹²⁾、耐塩性酵母である *Z. rouxii* の場合は異なる傾向を示し、最終エタノール濃度(発酵 108 時間目, Table II)は、全糖濃度 28~30% (W/V) で、平均 4.3% (W/V) であるのに対し、全糖濃度 32~40% (W/V) で、平均 5.8% (W/V) [標準偏差, 0.28% (W/V)]であった。これは、前者の場合の約 1.3 倍に相当した。しかし全糖濃度 48% (W/V) の場合においては、発酵 12~42 時間でエタノール生成への阻害が認められた (Fig. 3)。得られた近似式により *Z. rouxii* の場合、全糖濃度 41.0% (W/V) に最高値 (0.55 g/l/h) を示すこと

がわかった。

S. cerevisiae OC-2 と *Z. rouxii* IFO 0493 でエタノール生産性を求めた近似式を比較すると、全糖濃度が 44% (W/V) 以下では、*S. cerevisiae* OC-2 のほうがエタノール生産性が高く [たとえば全糖濃度 40% (W/V) の場合 *Z. rouxii* IFO 0493 に対して約 1.1 倍]、それ以上の範囲では *Z. rouxii* IFO 0493 が勝っていた [たとえば全糖濃度 45% (W/V) の場合 *Z. rouxii* IFO 0493 に対して約 0.97 倍]。全糖濃度が 39% (W/V) の場合、*S. cerevisiae* OC-2 は他の菌株と比較してエタノール生産性が高く、このことから使用した菌株の中では耐浸透圧性が最も高かった。

2. 全糖濃度 39% (W/V) における各糖組成変化

ウスターソースの日本農林規格⁽¹³⁾によると、ウスタ

Table II. Effect of Yeast Strains of Maximum Ethanol Concentration and Ethanol Productivity during Fermentation Period Using Syrup for Worcestershire Sauce

Total sugar (%)	Strain	Maximum ethanol concentration (%)	Ethanol productivity (g/l/h)
28.1	I	9.3	0.86
	II	7.9	0.73
	III	4.0	0.37
29.9	I	8.4	0.78
	II	7.0	0.65
	III	4.5	0.42
32.4	I	7.9	0.73
	II	6.3	0.58
	III	5.4	0.50
34.3	I	7.5	0.69
	II	5.5	0.51
	III	5.7	0.53
36.5	I	7.2	0.67
	II	5.0	0.46
	III	5.7	0.53
39.4	I	7.1	0.66
	II	4.0	0.37
	III	6.0	0.56
40.2	I	6.9	0.64
	II	3.5	0.32
	III	6.1	0.56
47.8	I	4.3	0.40
	II	0.0	0.00
	III	5.5	0.52

I, *S. cerevisiae* OC-2; II, *K. fragilis* IFO 0288; III, *Z. rouxii* IFO 0493.

ーソースの特級規格における無塩可溶性固形分は「25% (容重) 以上」, 食塩分は「12% (容重) 以下」と規定されている。また, 一般に市場に流通しているウスターソースの可溶性固形分は, 14~45% と幅があるものの⁽¹⁴⁾, 約 37~39% のものが大部分である。ウスターソースを発酵させるためには, 全糖濃度が約 37~39% のような高い浸透圧下における使用菌株の発酵性が重要な問題となる。そこで, 全糖濃度が 39% (W/V) に調製されたソース用糖液における各糖濃度の経時変化 (シュクロース, グルコースおよびフラクトース濃度) を検討した。その結果を Fig. 5 に示す。エタノール生産性は *S. cerevisiae* OC-2 のほうが, *Z. rouxii* IFO 0493 と比較して高い結果であった (Fig. 4) が, 糖濃度の経時変化

Fig. 4. Relationship between Initial Concentration of Total Sugar and Ethanol Productivity. ●, *S. cerevisiae* OC-2; ○, *K. fragilis* IFO 0288; ■, *Z. rouxii* IFO 0493; —, simulation by the approximate equations.

The approximate equations are as follows:

S. cerevisiae OC-2 ($n=8, r=0.999$)

$$P = -1.54 \times 10^{-4} \times S^3 + 1.72 \times 10^{-2} \times S^2 - 0.649 \times S + 8.91$$

K. fragilis IFO 0288 ($n=8, r=0.995$)

$$P = (-3.57 \times 10^{-2} \times S) + 1.74$$

Z. rouxii IFO 0493 ($n=8, r=0.987$)

$$P = -1.15 \times 10^{-3} \times S^2 + 9.38 \times 10^{-2} \times S - 1.36$$

P , ethanol productivity (g/l/h); S , total sugar concentration (%).

についてはシュクロース, グルコースおよびフラクトースいずれも時間の経過とともに減少し, *S. cerevisiae* OC-2 と, *Z. rouxii* IFO 0493 の間に大きな差異は認められなかった (Fig. 5). これに対し, *K. fragilis* IFO 0288 の場合はシュクロースの加水分解が顕著に認められ (Fig. 5), 他の菌株と傾向が大きく異なった。

Pira ら⁽¹⁵⁾は, 固定化された酵母における, インペルターゼ活性について報告している。その中で, *K. fragilis* DMS 70343 は, *S. cerevisiae* 4 菌株を含めた 10 種の菌株と比較し, インペルターゼ活性が最も高いことを示した。本研究においても使用菌株 3 種の中で, *K. fragilis* IFO 0288 の場合にシュクロースの加水分解が顕著に認められたのは, 本研究に供した *K. fragilis* IFO 0288 のインペルターゼ活性が高いことに起因していると推測された。

また全糖濃度が 39% (W/V) に調製されたソース用

Fig. 5. The Difference of Sugar Consumption Pattern Using Syrup for Worcestershire Sauce among Three Yeasts. Initial sugar concentration in substrate was 39.4%. ●, *S. cerevisiae* OC-2; ○, *K. fragilis* IFO 0288; ■, *Z. rouxii* IFO 0493.

Table III. Production of Typical Aromatic Components Using Syrup for Worcestershire Sauce by Each Yeasts

Strain	I	II	III
<i>S. cerevisiae</i> OC-2	2.04	0.72	3.58
<i>K. fragilis</i> IFO 0288	1.07	0.77	trace
<i>Z. rouxii</i> IFO 0493	0.64	0.13	trace

I, Isoamyl alcohol (mg/100ml); II, Phenethyl alcohol (mg/100ml); III, Acetoin (mg/100ml). Initial sugar concentration of substrate was 39.4%. Fermentation was performed for 24h at 28°C by each yeasts with shaking.

糖液を用いた3種の菌株における発酵フレーバー（イソアミルアルコール、フェネチルアルコールおよびアセトイン）の生成量（28°C, 24hの振盪発酵）をGC-MSにより定量した。その結果をTable IIIに示した。ワイン酵母である *S. cerevisiae* OC-2により得られた発酵終了液は、醤油酵母である *Z. rouxii* IFO 0493や *K. fragilis* IFO 0288によって得られた発酵終了液に比べて代表的なフレーバーであるイソアミルアルコールやアセトインの生成量が多く、またフェネチルアルコールの生成量も *K. fragilis* IFO 0288の場合とほとんど同様であり、以上の結果からウスターソース製造に適した酵母として *S. cerevisiae* OC-2を選抜した。

3. ソース発酵用原液のアルコール発酵

選抜された酵母 (*S. cerevisiae* OC-2) における、ソース発酵用原液〔シュクロース濃度, 27.2% (W/V); グルコース濃度, 3.8% (W/V); フラクトース濃度, 4.7% (W/V); 酸濃度 (酢酸換算), 0.2% (W/W); 塩分濃度, 0.3% (W/W); pH, 4.8〕のアルコール発酵におけ

Fig. 6. Time Course Changes in Cell Number, Ethanol Concentration, and Sugar Concentrations Using the Model Raw Juice for Worcestershire Sauce by *S. cerevisiae* OC-2

る経時変化をFig. 6に示した。

細胞数は、 5.8×10^8 cells/ml (発酵48時間目)まで増加した後減少傾向を示し、発酵168hには全く確認されなかった。シュクロースは細胞数の増加に伴い減少傾向を示したが、フラクトースとグルコースはインベルターゼによるシュクロースの加水分解の影響で発酵42時間目以降増加した。エタノールは、発酵24時間目以降急激に増加し、最終エタノール濃度は15.5% (W/V) (発酵120時間目)となり、ソース素材を基質 (ソース発酵用原液) とした *S. cerevisiae* OC-2の発酵性が確認された。24時間発酵液は高級アルコールやエステル系の発酵フレーバーが付与され、未発酵の場合と比較して官能的に識別が可能であった。そこでこの24時間発酵液を

用い、実験方法に記述した配合に基づいて各種素材を混合することにより、発酵ウスターソースの調製を試みた[可溶性固形分, 40.6% (W/W); 酸濃度 (酢酸換算), 2.3% (W/W); 塩分濃度, 10.8% (W/W); エタノール濃度, 0.7% (W/V); pH, 3.7]. このウスターソースを用いて1, 2点識別法による官能検査を実施した結果, 24時間発酵液を利用したウスターソースは未発酵のウスターソースと比較し, 発酵フレーバーの付与により, パネラー20名全員が識別可能であった(危険率1%で識別可能). また官能的にも発酵フレーバーが付与された新しいウスターソースであることがわかった.

要 約

発酵工程を導入した, ウスターソースの新製造プロセスの構築を目的とした実験で次の知見が得られた.

(1) 最終エタノール濃度およびエタノール生産性を比較すると, *S. cerevisiae* OC-2 (ワイン酵母) は, 高浸透圧になるにつれて阻害が認められたものの, 阻害の程度は, *K. fragilis* IFO 0288 に比べて低いものであった.

(2) 全糖濃度とエタノール生産性の相関は顕著に現れた. すなわち, 3種の菌株での本実験に用いた全糖濃度(浸透圧)範囲におけるエタノール生産性の全糖濃度依存性は異なり, *S. cerevisiae* OC-2 は全糖濃度 37.4% (W/V) 付近に変曲点を示す三次式, *K. fragilis* IFO 0288 は負の一次式, さらに *Z. rouxii* IFO 0493 は, 全糖濃度 41% (W/V) に最高値 (0.55 g/l/h) を示す二次式で, それぞれ全糖濃度とエタノール生産性の間に高い相関が得られた.

(3) 全糖濃度が 39% (W/V) におけるソース用糖液を用いた場合の糖組成の経時変化を比較すると, *S. cerevisiae* OC-2 と *Z. rouxii* IFO 0493 の間にはそれほど大きな差異は認められなかった. これに対し, *K. fragilis* IFO 0288 はインペルターゼによるシュクロースの加水分解が顕著に認められた.

(4) GC-MS による発酵フレーバー (イソアミルアルコール, フェネチルアルコールおよびアセトイン) を定量した結果, *S. cerevisiae* OC-2 は, *Z. rouxii* IFO 0493 や *K. fragilis* IFO 0288 と比較してフレーバー生成量が多く, また官能的にも良好な風味を呈していた.

(5) *S. cerevisiae* OC-2 はソース発酵用原液を用いたアルコール発酵で良好な発酵性が確認された.

(6) ソース発酵用原液の24時間発酵液を用いた発酵ウスターソースを1, 2点識別法による官能検査にて評価した結果, 24時間発酵液を利用したソースは未発酵のソースと比較し, パネラー20名全員が発酵フレーバーを識別することができた. また官能的にも発酵フレーバーが付与された新しいウスターソースであることがわかった.

本研究の一部は, 平成4年度日本生物工学会大会(1992, 大阪)において発表した.

- (1) 野白喜久雄, 小崎道雄, 好井久雄, 小泉武夫: 「改訂醸造学」, 講談社, 東京, 1993, pp. 182—202.
- (2) 横山要範: 「醬油の醸造と合成法」, 開名堂, 東京, 1962, pp. 27—71.
- (3) H. Ito, R. S. Hadioetomo, S. Nikkuni, and N. Okada: *Rep. Natl. Food Res. Inst.*, **47**, 23—30 (1985).
- (4) H. Ito, R. S. Hadioetomo, S. Nikkuni, and N. Okada: *Rep. Natl. Food Res. Inst.*, **47**, 31—40 (1985).
- (5) A. Nanba, K. Kimura, and S. Nagai: *J. Ferment. Technol.*, **63**, 175—179 (1985).
- (6) A. Mori: *Process Biochem.*, **20**, 67—74 (1985).
- (7) 深谷哲也, 坂本秀樹, 高見澤一裕, 堀津浩章: 日食低温誌, **19**, 68—73 (1993).
- (8) 七字三郎: 「微生物工学の応用, 第2版」, 共立出版, 東京, 1981, p. 101.
- (9) 小泉武雄: 乳技協資料, **37**, 23—46 (1987).
- (10) 日本分析化学会編: 「分析化学便覧, 改訂二版」, 丸善, 東京, 1971, p. 235.
- (11) 日本分析化学会編: 「分析化学便覧, 改訂二版」, 丸善, 東京, 1971, p. 1440.
- (12) 井川房欣, 加藤 充: 愛知県食品工業技術センター年報, **31**, 121—133 (1990).
- (13) 日本農林規格協会編: 「日本農林規格 ウスターソース類」, 農林水産省監修, 日本出版制作センター, 東京, 1991, p. 2.
- (14) 古口久美子, 菊地恭二, 高橋順子: 栃木県食品工業指導研究報告, **5**, 60—66 (1991).
- (15) L. Pira, C. Pinto, and C. Rolz: *J. Ind. Microbiol.*, **8**, 247—252 (1991).