

# 自然界から分離した黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) と 醸造用黄麹菌の比較解析

阿部真紀・小針清子・秋田修

食生活科学科 食品加工学研究室

The Characteristic Variations Between the Commercial *Aspergillus oryzae*  
Strains and Wild Strains Isolated from the Field.

Maki ABE, Sayako KOBARI and Osamu AKITA

Department of Food and Health Sciences, Jissen Women's University

*Aspergillus oryzae* is widely used to produce fermented food such as sake, soy sauce and miso in Japan. Since these fungi have been used for food fermentation for a long time, these economic strains for food fermentation are thought as “domesticated strains.” The origin of these strains is thought to be a contaminant from natural environment. We isolated many *A. oryzae* like strains from field using the autoclaved rice as medium. Isolated strains were confirmed as *A. oryzae* by the genomic structure of aflatoxin homologous gene cluster. The amount of mycelium in rice koji prepared by isolated strains did not show the significant differences compared with those of commercial strains. The activities of enzymes such as  $\alpha$ -amylase, glucoamylase, acid carboxypeptidase, acid protease and neutral protease in rice koji prepared by isolated eight strains and commercial strains were analyzed. Some of the isolated strains showed the similar enzyme activities to those of the commercial strains. From these results, it is suggested that the present commercial *A. oryzae* strains originate from *A. oryzae* living in the natural environment.

Key words : *Aspergillus oryzae* (黄麹菌), fermented food (発酵食品), rice koji (米麹),  
enzyme activity (酵素活性)

## 1. 緒言

清酒、醤油、みそなどの醸造に使用されている黄麹菌は、長年の使用過程で、それぞれの醸造に適した菌株が選抜されてきたものであり、その起源は自然界からの混入菌であると推定される。黄麹菌の分類研究は形態学的手法によるものであったが<sup>1)</sup>、2005年に *Aspergillus oryzae* RIB40 株の全ゲノム解析<sup>2)</sup> が終了して以降、RIB 株<sup>3)</sup> などの醸造用保存株を中心にゲノムレベルでの研究が進んでいる<sup>4)</sup>。一方、自然界に存在する黄麹菌については、これまでに形態学的研究<sup>5), 6)</sup> やカビ毒生産性を中心に調査されている<sup>7)</sup> が、遺伝的形質を含めた諸性質の研究はほとんどなされていない。そこで、自然界で生育する黄麹菌の多様性を調査し、醸造用黄麹菌の起源を考証することを目的に本研

究を行った。はじめに、自然界からの効率的な黄麹菌の分離方法の検討を行った。次に、分離した *A. oryzae* と思われる株のアフラトキシン (AFL) 生合成遺伝子クラスター構造等を解析し、*A. oryzae* であるか否かの確認を行った。分離黄麹株と醸造用株等を用いて米麹を製造し、それらの株の酵素生産性を比較した結果、現在の醸造用黄麹菌が自然界由来の黄麹菌を起源とする可能性が示唆されたので報告する。

## 2. 実験方法

### 1) 野生黄麹菌の分離法

#### (1) 培地調製法

分離用培地には各種のカビ培養用寒天培地、 $\alpha$  米培地、大豆小麦培地を使用した。

#### a) 寒天培地の調製法

ポテトデキストロース寒天培地は Difco Potato Dextrose Agar を用いた。YM 寒天培地、麦芽エキス寒天培地、酵母用完全培地、*Aspergillus* 用最少培地 (Czapek-Dox 培地) は、実験書<sup>8)</sup>の方法に従って調製した。

#### b) $\alpha$ 米培地の調製法

$\alpha$  米は 70% 精米  $\alpha$  吟醸米 (AUA-70 徳島製麴 (株) 製) を使用した。殺菌方法については、ガラスシャーレ (直径 9 cm 蓋つき) に  $\alpha$  米 15 g を入れ、アルミホイルで包んだものを乾熱滅菌 (95°C、60 分) とオートクレーブ (121°C、10 分) したものを比較した。殺菌処理後、無処理のものも含め、クリーンベンチ内で滅菌水 7.5 ml を添加し、滅菌葉匙で攪拌したものを 30°C で 7 日間培養して菌の生育を観察した。

$\alpha$  米蒸米培地と  $\alpha$  米飯米培地は、滅菌水の添加量を変えることで調製した。 $\alpha$  米各 15 g を直径 9 cm ガラスシャーレに入れアルミホイルで包んだものをオートクレーブ (121°C、10 分) 処理し、試料添加時に滅菌水をそれぞれ 6 ml、15 ml を添加した。

#### c) 大豆小麦培地の調製法

醤油麴製造法に準じた方法で調製した。直径 9 cm ガラスシャーレに粉末脱脂大豆 9 g、割砕炒小麦 9 g を入れ、滅菌水 12.6 ml 添加し、テトロン布をかぶせて蓋をし、アルミホイルで包み 120°C、30 分オートクレーブ処理した。冷めないうちに、無菌条件下で滅菌葉匙でよくほぐしたものを使用した。

#### (2) 分離用試料と添加方法

野外から採取した稲穂を主な分離用試料として用いた。その他、花なども分離源とした。採取試料は殺菌したアルミホイルで包み保存は 5°C で行った。培地への試料の添加はクリーンベンチ内で無菌的に行い、室温 (20°C 前後) で 7 日間培養した。

#### (3) 菌株の分離方法

実体顕微鏡 (Nikon 製 SMZ-U) で観察し、分生子の色調や形態から *A. oryzae* と推定される菌株を滅菌済みガラス針で釣菌分離した。

#### 2) 菌株の同定

分離株について、*A. oryzae* アフラトキシン (AFL) 生合成遺伝子ホモログクラスタ構造等を解析し、*A.*

*oryzae* であるか否かを確認した。なお、この解析は、独立行政法人酒類総合研究所に依頼し、Tomimaga らの方法<sup>9)</sup> 及び Kiyota らの結果<sup>10)</sup> を参考に行った。

#### 3) 米麴の製造方法および酵素活性の測定方法

##### (1) 使用菌株

野外からの分離株 8 株と対照株として市販の醸造用菌株で清酒用の KBN1010、米味噌用の KBN919、醤油用の KBN616、およびゲノムが解析されている RIB40 の計 4 株を使用した。

##### (2) 米麴の製造方法

米麴は  $\alpha$  米を用いた岡崎らのシャーレ法<sup>11)</sup> により製造した。各菌株による米麴の製造は独立に 3 回行った。

##### (3) 米麴中の菌体量及び酵素活性の測定方法

麴菌菌体量の測定は yatalase を用いる藤井らの方法<sup>12)</sup> で行った。 $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼの活性測定は、キッコーマンの醸造分析キットを用い、キット付属の測定方法に従って行った。酸性、中性プロテアーゼの測定は、醸造・食品学実験書に記載の方法<sup>13)</sup> で行った。

### 3. 実験結果および考察

#### 1) 野生黄麴菌の分離方法の検討

野外から採取した試料には多種多様な微生物が混在している。そこでこれらの微生物集団から *A. oryzae* を効率的に分離する方法の検討を行った。まず分離用培地を検討した。 $\alpha$  米培地については  $\alpha$  米の殺菌条件の検討を行った結果、乾熱滅菌 95°C、1 時間処理では完全殺菌ができなかったが、オートクレーブ 121°C 10 分間では完全に殺菌されていた。以後の実験では後者の条件で  $\alpha$  米の殺菌を行った。検討した分離培地の中では、 $\alpha$  米蒸米培地において *Aspergillus* 属タイプの菌の分離が容易であった。しかし  $\alpha$  米飯米培地を含めたそれ以外の培地では、クモノスカビ (*Rhizopus* sp.) やケカビ (*Mucor* sp.) などが優位となって表面を覆ってしまい *Aspergillus* 属タイプの菌の分離は困難であった。加熱した穀物では、*A. oryzae* がケカビなどと比べて生育しやすいことが報告されている<sup>14)</sup>。 $\alpha$  米蒸米培地でケカビ、クモノスカビの増殖が低下し、*Aspergillus* 属タイプの菌の分離が容易であった今回の

結果は、これらの知見と一致している。なお、 $\alpha$  米飯米培地では雑多なカビやバクテリアの繁殖が旺盛となり、*Aspergillus* 属タイプの菌の分離が困難であったのは、飯米は水分が多いので多様な微生物が増殖可能であったためと推定される。

## 2) 分離株の分離源

$\alpha$  米蒸米培地を分離用培地として用い、表 1 に示した分離源から 24 株の黄麹菌と思われる株が分離できた。稲穂以外にも花や緑茶（長期放置し表面に生育したカビから分離）からも分離された。*A. oryzae* の名は稲の学名に由来し、その存在は稲（米）との関連が深いことが言われているが、それ以外にも普通に自然界に存在している可能性が示唆された。初期に分離した No. 1 から No. 8 の株を以後の実験に使用した。

## 3) 分離株の AFL 遺伝子ホモログクラスタ構造の解析

Lee ら<sup>4)</sup> は、*A. oryzae* の AFL 遺伝子ホモログクラスタ構造について RIB 株約 200 株を調査し、AFL クラスタ遺伝子の全てをもつ group 1（以下 G 1）、クラスタの一部が欠損している group 2（以下 G 2）、クラスタのほとんどが欠損している group 3（以下 G 3）が存在することを報告している（図 1 a）。さらに Kiyota ら<sup>10)</sup> は、G 1 に属する *A. oryzae* の *afIR*、*afIJ* の構造遺伝子および両遺伝子間に存在するプロモーター領域の塩基配列を解析し、*A. flavus* と比較したところ、*afIR* では 2 箇所の、*afIJ* では 4 箇所のアミノ酸置換が存在し、プロモーター領域では 6 箇所の 1 塩基置換がある（図 1 b）こと、これらの置換部位と置換型は RIB 保存株の G 1 で高度に保存されていることを報告している。従って G 1 グループについては、*afIR*、*afIJ* の構造遺伝子および両遺伝子間のプロモーター領域の塩基配列を解析することで、*A. oryzae* であるか否かを判別できる。そこで、野外から分離した 24 株の AFL 遺伝子ホモログクラスタ構造の解析を行ったところ 12 株が G 1、12 株が G 2 で、G 3 はいなかった（表 1）。さらに G 1 の 12 株すべてが *A. oryzae* タイプであることが確認できた。実験に用いた 8 株では、6 株が G 1、2 株が G 2 であった。

Kiyota ら<sup>10)</sup> は、*A. oryzae* では AFL 遺伝子群の転写活性化因子遺伝子である *afIR* の発現は極めて低く、たとえ発現したとしても相互作用する *afIJ* 遺伝子が

表 1. 分離株の分離源

No.	試料名	分離源	品種	AFLクラスタ
1	J1	緑茶(表面に生育したカビ)		G1
2	J2	埼玉県さいたま市近郊の稲穂	コシヒカリ	G1
3	J3	埼玉県さいたま市近郊の稲穂	コシヒカリ	G1
4	Fl-01	埼玉県さいたま市大宮区の花	不明	G1
5	Ko-01	埼玉県さいたま市大宮区の稲穂	コシヒカリ	G1
6	Ko-02	埼玉県さいたま市大宮区の稲穂	コシヒカリ	G2
7	Gul-01	福島県三春町の稲穂	もち米	G1
8	Gul-02	福島県三春町の稲穂	もち米	G2
9	ツツジ	東京都日野市の花	ツツジ	G2
10	赤い花	東京都日野市の花	チェリーセージ	G1
11	No.1	埼玉県さいたま市大宮区の稲穂	コシヒカリ	G1
12	No.2-1	埼玉県さいたま市大宮区の稲穂	コシヒカリ	G2
13	No.3	埼玉県さいたま市大宮区の稲穂	コシヒカリ	G1
14	No.5	埼玉県さいたま市見沼区の稲穂	コシヒカリ	G2
15	No.7	埼玉県さいたま市緑区の稲穂	コシヒカリ	G2
16	No.12	東京都日野市の稲穂	不明	G2
17	No.13	東京都日野市の稲穂	不明	G2
18	No.21-1	福島県三春町の稲穂	不明	G2
19	No.21-2	福島県三春町の稲穂	不明	G2
20	No.31	福島県三春町の稲穂	コシヒカリ	G2
21	No.32	福島県三春町の稲穂	不明	G1
22	No.41	山梨県富士吉田市の稲穂	ひとめぼれ	G1
23	No.43	山梨県富士吉田市の稲穂	ひとめぼれ	G1
24	No.44	山梨県富士吉田市の稲穂	ひとめぼれ	G2

AFL クラスタによる分類の G1 は group1、G2 は group2 を示す（図 1 a 参照）。

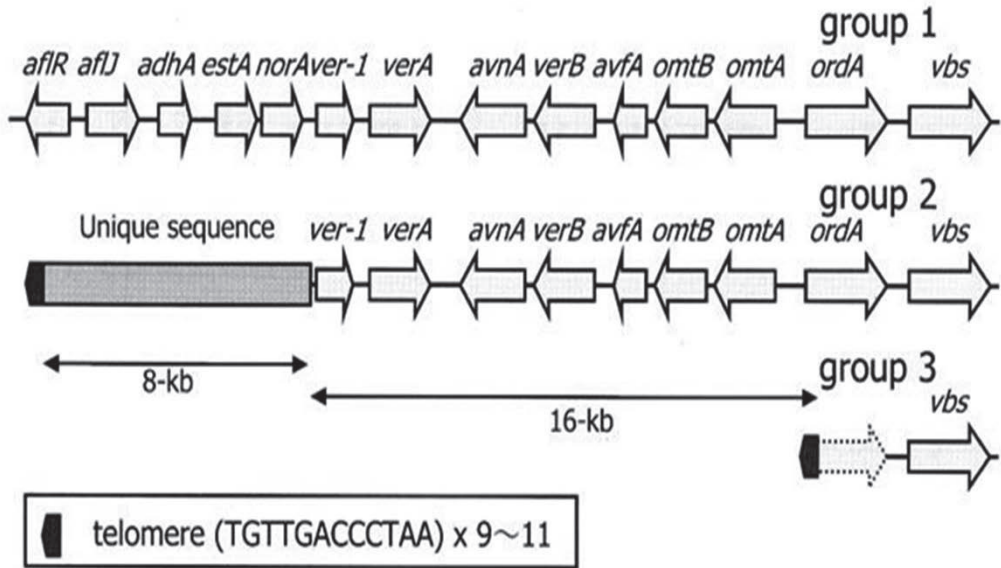
変異により機能しないため転写活性化能がないことを明らかにしている。このように *A. oryzae* の AFL 非生産性はゲノムレベルで証明されているが、日本の自然界にいる *Aspergillus* 属菌の AFL 遺伝子ホモログクラスタ構造について解析された例はほとんどない。今回分離した 24 株はすべて *A. oryzae* タイプのゲノム構造を持つ菌株であり AFL 生産性がないことを明らかにした。

G 2、G 3 の起源について山田は、テロメア近傍にある AFL クラスタは染色体切断等により脱落しやすく、その切断と修復過程において異なるメカニズムが働いた結果、異なる欠落構造を有する G 2、G 3 が生じたのではないかと推察している<sup>15)</sup>。醸造用に使用され続けてきた株と自然界にいる野生株とでは生育環境が大きく異なる。それにもかかわらず、野外からの分離株の AFL クラスタがすべて醸造株の G 1、G 2 のいずれかと同じゲノム構造であったということは、醸造用黄麹菌の起源が野生黄麹菌であるという可能性を強く示唆するものである。野生黄麹菌については、G 3 の存在の有無も含め、今後さらにデータの蓄積をしていく必要がある。

## 4) 米麹中の菌体量および酵素活性の測定結果

各菌株による米麹の製造を 3 回行い、測定値は 3 回

a



b

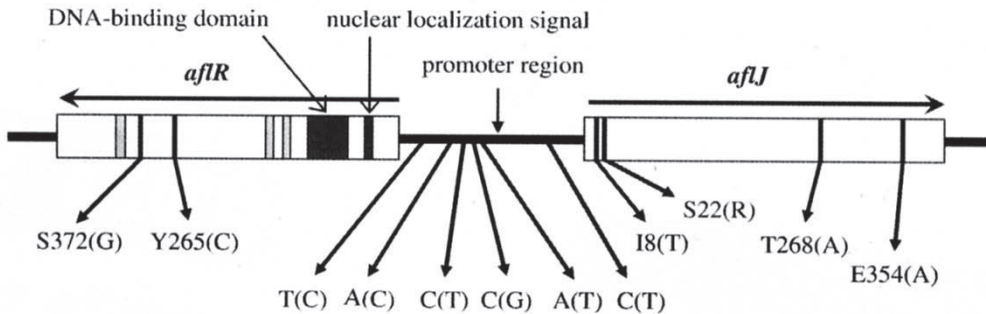


図1 黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の AFL 生合成遺伝子ホモログクラスタ構造

a は黄麹菌 RIB 株の AFL 生合成遺伝子ホモログクラスタ構造<sup>15)</sup>、b は黄麹菌 group1 の aflR-aflJ 遺伝子構造<sup>10)</sup>。  
b 図中の ( ) 内は *A. flavus* のアミノ酸および塩基配列を示す。

の平均値で示した。図2に米麹中の菌体量の測定結果を示す。醸造用株を含む対照株が7.35～9.70 mg/g 麹、分離株が8.32～9.42 mg/g 麹であり、分離株と醸造用株に顕著な差は認められなかった。このことから、野生黄麹菌分離株はいずれも蒸米上での生育性が対照株と比べて劣らないことが確認された。

各種酵素活性測定の結果を図3から図7に示す。

$\alpha$ -アミラーゼでは、分離株 J 2、J 3、Gul-01 の

活性が対照株に比べて著しく低かったが、他の5株の活性は対照株とほぼ同等であった(図3)。J 2、J 3、Gul-01 の各株の $\alpha$ -アミラーゼ活性が低いにもかかわらず、蒸米での生育は対照株と変わらなかった(図2)。黒麹菌を用いる焼酎麹の $\alpha$ -アミラーゼ活性は黄麹菌を用いる清酒麹の1/10以下である<sup>16)</sup>が、菌の増殖には影響がない。また、米に旺盛に生育するクモノスカビの $\alpha$ -アミラーゼ活性も黄麹菌の1/10以下で

ある<sup>17)</sup>。これらのことから、米粒上での生育に必要な $\alpha$ -アミラーゼ活性は醸造用黄麹菌の1/10以下でも十分であり、J2、J3、Gul-01も対照株と変わらない増殖を示したものと考えられる。清酒醸造では、原料米の溶解が製成酒量の増加に直結することから、米粒の溶解に最も影響する $\alpha$ -アミラーゼ活性の高い菌株が利用されるようになったと推定される。今回野生株でも対照株と同等の $\alpha$ -アミラーゼ活性を有する株が得られていることから、積極的な育種の結果ではなく、活性の高い野生株から醸造用株が選抜されてきたのではないかと推定される。

グルコアミラーゼ活性(図4)では、Gul-01株の活性が最も低く、 $\alpha$ -アミラーゼ活性も低かったがタンパク質分解系の酵素活性は他の菌株との差はないことから、Gul-01株は糖化系の酵素活性が低い株であると言える。Gul-01株と分離源が同じであるGul-02株は糖化系、タンパク質分解系の酵素とも活性が高いことから、自然界では多様な特性を持つ黄麹菌が共存していることがうかがえて興味深い。

酸性カルボキシペプチダーゼ活性(図5)、酸性プロテアーゼ活性(図6)では、株間で活性にバラつきがあるものの、対照株と比べて極端に違いのある株はなかった。中性プロテアーゼ活性(図7)では、醤油醸造用株であるKBN616が最も高い活性を示した。醤油醸造におけるタンパク質の分解には中性プロテアーゼ、アルカリ性プロテアーゼの寄与が高いとされており<sup>18)</sup>、中性プロテアーゼ活性の高い菌株が醤油醸造用として利用されている。今回の分離株8株中に醤油用株と同等の活性を示した株が2株(Ko-02、Gul-02)存在した。このことから、醤油などの大豆を原料とする醸造食品製造用の麹菌はこのような菌を起源とするのではないかと推定できる。

今回は自然界からの分離株で米麴を製造した。そこで米麴の製造に用いられる清酒醸造用株KBN1010と分離株の酵素活性を比較した。その結果を図8に示す。5種類の酵素すべてで、KBN1010株と同等または上回る活性を有する株は、Fl-01、Ko-01、Ko-02、Gul-02の4株であった。Ko-01株はタンパク質分解系酵素がやや低いもののデンプン分解系酵素活性はKBN1010株と同等の活性を示した。Ko-02株とGul-02株は、 $\alpha$ -アミラーゼ活性が低いがいずれ以外の酵素活性は上回り、特に中性プロテアーゼ活性が大きく上

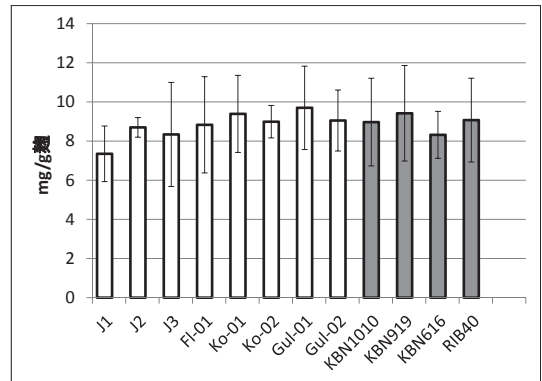


図2 米麴の麴菌体量

棒グラフの白抜きは野生分離株、グレーは対照株の結果を示す。図3から図7についても同様。

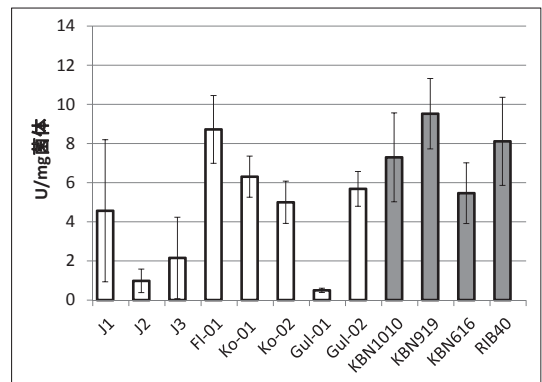


図3  $\alpha$ -アミラーゼ活性

1分間にN3-G5- $\beta$ -CNP(2-クロロ-4-ニトロフェニル6<sup>5</sup>-アジド-6<sup>5</sup>-デオキシ- $\beta$ -マルトペンタオシド)から1 $\mu$ molのCNP(2-クロロ4-ニトロフェノール)を遊離する力価を1Uとし、菌体1mgあたりの酵素活性値として表す。

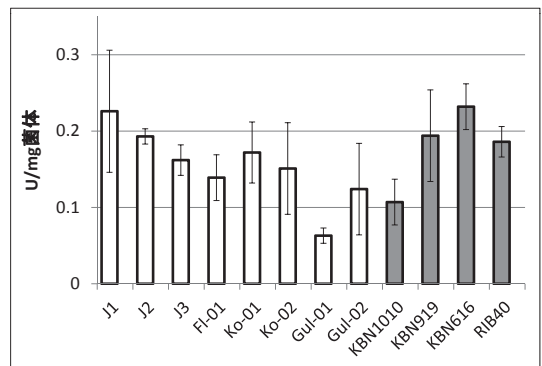


図4 グルコアミラーゼ活性

1分間にG2- $\beta$ -PNP(4-ニトロフェニル- $\beta$ -マルトシド)から1 $\mu$ molのPNP(p-ニトロフェノール)を遊離する力価を1Uとし、菌体1mgあたりの酵素活性値として表す。



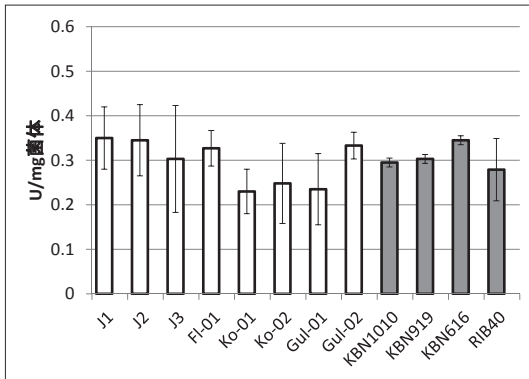


図5 酸性カルボキシペプチダーゼ活性

1分間に Cbz-Tyr-Ala (カルボベンゾキシ-L-チロシル-L-アラニン) から  $1 \mu\text{mol}$  の L-Ala (L-アラニン) を遊離する力価を 1U とし、菌体 1mg あたりの酵素活性値として表す。

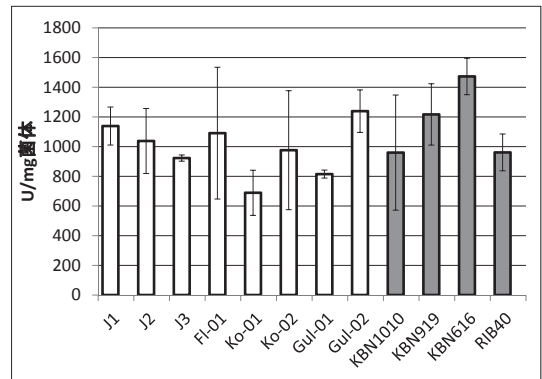


図6 酸性プロテアーゼ活性

pH3.0 の McIlvaine 緩衝液を用いた 1% カゼイン溶液を基質として使用した。1分間にカゼインから  $1 \mu\text{g}$  のチロシンを生ずる力価を 1U とし、菌体 1mg あたりの酵素活性値として表す。

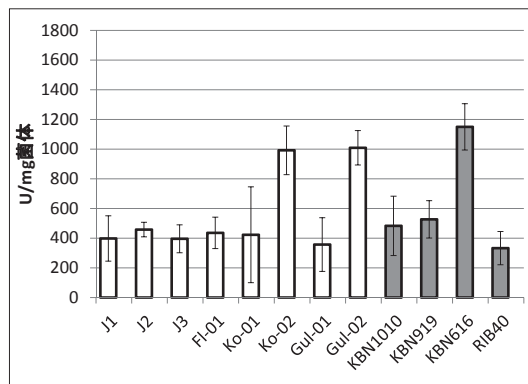


図7 中性プロテアーゼ活性

pH6.0 の McIlvaine 緩衝液を用いた 1% カゼイン溶液を基質として使用した。1分間にカゼインから  $1 \mu\text{g}$  のチロシンを生ずる力価を 1U とし、菌体 1mg あたりの酵素活性値として表す。

回った。FI-01 株は、測定した酵素すべてにおいて KBN1010 と同程度の酵素活性であった。5種類だけの酵素活性の比較ではあるが、全酵素の活性バランスが実用醸造株と極めて類似した株が自然界から分離されたことは、現在用いられている実用醸造黄麹菌が自然界から由来しその後大きな変異をすることなく用いられてきた可能性を示唆するものである。

#### 4. 要約

(1) オートクレーブ殺菌した  $\alpha$  米蒸米培地を用いることで、野外採取した試料から *Aspergillus* 属の菌を効率的に分離することができた。

(2) 緑茶、花、稲穂から分離した 8 株は AFL ホモログクラスタ塩基配列解析からすべて黄麹菌 (*A. oryzae*) であることが確認できた。6 株が G 1 タイプ、2 株が G 2 タイプであった。

(3) 分離株と醸造用を含む対照株で米麴を製造した。麴中の菌体量に顕著な差がなかったことから、野生分離株の  $\alpha$  米上での生育が特に劣るものではないことが確認された。

(4)  $\alpha$ -アミラーゼ活性は、分離株で対照株より低い傾向にあったが醸造用株と同等の活性をもつ株も存在した。中性プロテアーゼ活性では分離株 8 株中 2 株 (Ko-02、Gul-02) において醤油醸造用株と同程度の

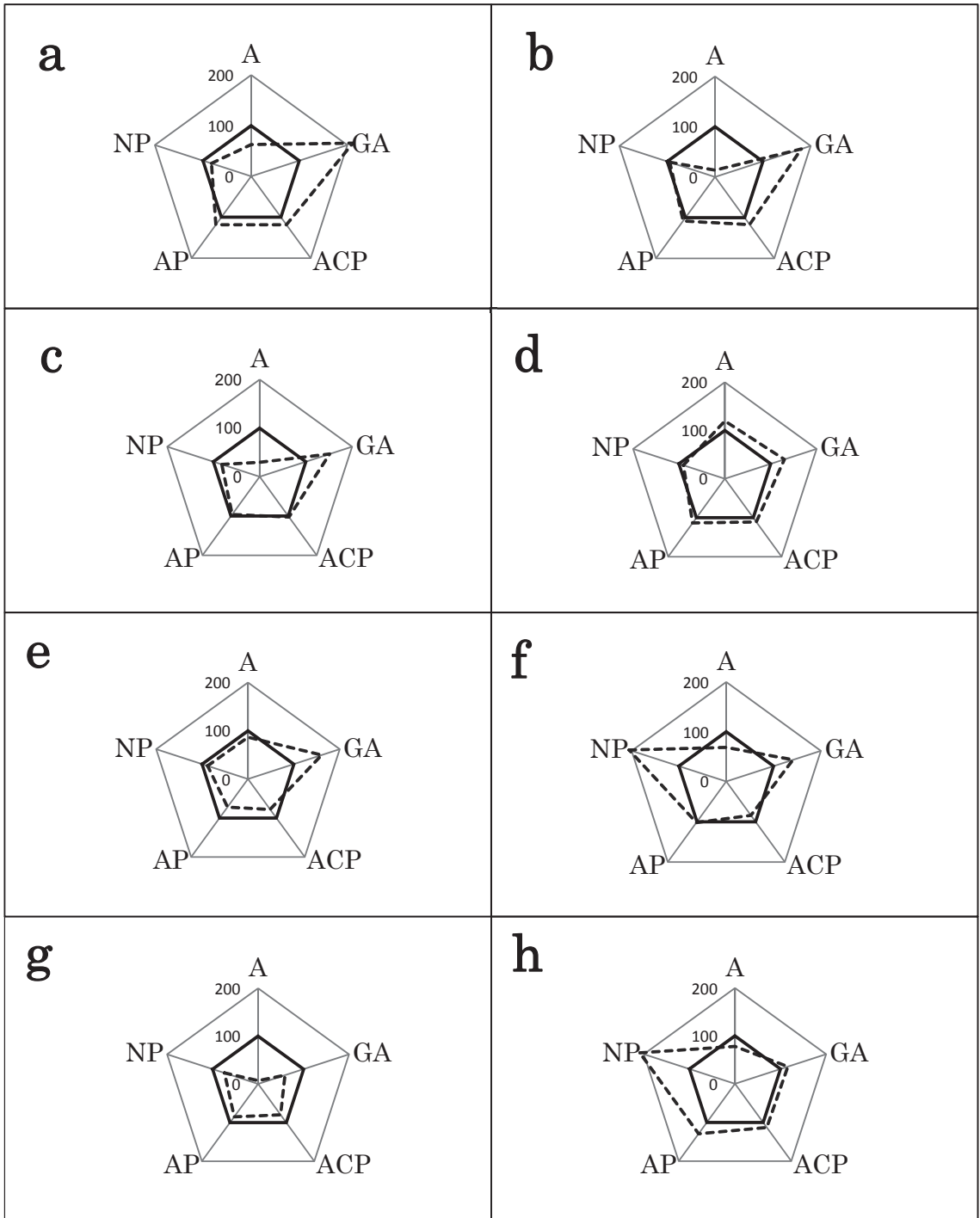


図 8 清酒醸造用菌株と分離株の酵素活性比較

清酒醸造用 KBN1010 の菌体 1 mg あたりの酵素活性値を 100 としたときの分離株との比較。実線が KBN1010、点線が分離株の活性値を表す。それぞれ a:J1、b:J2、c:J3、d:F1-01、e:Ko-01、f:Ko-02、g:Gul-01、h:Gul-02 の結果。酵素の略称は A:  $\alpha$ -アミラーゼ、GA: グルコアミラーゼ、ACP: 酸性カルボキシペプチダーゼ、AP: 酸性プロテアーゼ、NP: 中性プロテアーゼ。

高い活性を示した。 $\alpha$ -アミラーゼと中性プロテアーゼ以外の酵素活性ではバラつきがあるものの対照株と極端に差のある株はなかった。

(5) 測定した5種類の酵素活性すべてにおいて清酒醸造用麹菌 KBN1010 と同等の活性を有する野生分離株 (F1-01) が存在した。

以上示したように、自然界由来の黄麹菌 (*A. oryzae*) にも醸造用の菌株に近い酵素活性を持つものが存在したことから、現在の醸造用黄麹菌が自然界由来の黄麹菌を起源とする可能性が示唆された。

## 5. 謝辞

分離株のゲノム解析をして頂きました独立行政法人酒類総合研究所の山田修博士ならびに PCR 分析のご指導を頂いた林梨咲さんに深く感謝致します。また、醸造用菌株に関するご助言と菌株を分譲して頂きました株式会社ビオックの和久豊博士に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 村上英也編著：麹学、58-71、日本醸造協会 (1986)
- 2) M. Machida, K. Asai, M. Sano, O. Akita et al. : *Nature*, 438, 1157-1161 (2005)
- 3) 独立行政法人酒類総合研究所：保有糸状菌株リスト  
<http://www.nrib.go.jp/ken/asp/strain.html>
- 4) Y. H. Lee, M. Tominaga, R. Hayashi, K. Sakamoto, O. Yamada, O. Akita : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 339-345 (2006)
- 5) 椿 啓介、徳増征二、安藤勝彦、中桐 昭、岡田 元編著：不完全菌類図説、アイピーシー (1998)
- 6) 山下 勝、吉松 孝：生工誌、72 (6)、443-451 (1994)
- 7) H. Takahashi, H. Kamimura, M. Ichinoe : *Mycotoxins*, 49, 39-43 (1999)
- 8) 杉山純多、渡辺 信、大和田紘一ら編：新版微生物学実験法、306-309、講談社 (2002)
- 9) M. Tominaga, Y. H. Lee, R. Hayashi, Y. Suzuki, O. Yamada, K. Sakamoto, K. Gotoh, O. Akita : *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 484-490 (2006)
- 10) T. Kiyota, R. Hamada, K. Sakamoto, K. Iwashita, O. Yamada, S. Mikami : *J. Biosci. Bioeng.*, 111 (5), 512-517 (2011)
- 11) 岡崎直人、引中吉雄、嶋崎順一、菅間誠之助：醸協、73、402-404 (1978)
- 12) 藤井史子、尾関健二、神田晃敬、浜地正昭、布川弥太郎：醸協、87、757-759 (1992)
- 13) 柳田藤治編：醸造・食品学実験書、71-73、食品研究社 (1984)
- 14) 田中利雄、岡崎直人：醱酵工学、60、11-17 (1982)
- 15) 山田 修：醸協、103、665-669 (2008)
- 16) 注釈編集委員会編：第四改正国税庁所定分析法注解、215、財団法人日本醸造協会 (1993)
- 17) 田中利雄、岡崎直人、木谷光伸 : *J. Ferment. Technol.*, 60 (6)、100-104 (1982)
- 18) 大塚謙一編著：醸造学、208、養賢堂 (1981)