

麴抽出液培養における清酒酵母の選択的アミノ酸取込み

岩野君夫・幡宮顕仁・中村拓郎・渡辺誠衛・伊藤俊彦・中沢伸重

日本醸造協会誌（醸協）第99巻第10号735～741頁別刷（2004）

日 本 醸 造 学 会

麴抽出液培養における清酒酵母の選択的アミノ酸取込み

岩野君夫・幡宮顕仁・中村拓郎・渡辺誠衛*・伊藤俊彦・中沢伸重
(秋田県立大学, *秋田県総合食品研究所)

平成 15 年 12 月 24 日受理

Selective Uptake of Amino Acid in Growth on Japanese Sake Yeast Using the Koji Extract Medium.

Kimio IWANO, Akihito HATAMIYA, Takuro NAKAMURA, Seiei WATANABE
Toshihiko ITO and Nobushige NAKAZAWA

(Akita Prefectural University, Nakano Shimo-Shinjyo, Akita 010-0195, *Akita Research Institute of Food & Brewing, Araya machi, Akita 010-1623)

We investigated the uptake of four amino acids — alanine, arginine, glutamic acid, and aspartic acid — which are involved in the taste of Japanese sake. Japanese sake yeasts copiously uptake arginine and aspartic acid, while glutamic acid shows a little uptake. Conversely, alanine was eliminated. On amino acids provided from koji, the amount of arginine and glutamic acid was much more than that of the uptake by sake yeasts.

Key words : 麴抽出液, 清酒酵母, アミノ酸取込み

結 論

前報¹⁾において清酒に存在するアミノ酸濃度で呈味に影響するアミノ酸を探索した結果, アラニン(甘味), アルギニン(苦味, 甘味), グルタミン酸(酸味, 渋味, 雑味), アスパラギン酸(酸味, 渋味)の4つのアミノ酸が抽出された。我々は清酒中のこれらアミノ酸の含有量がどのような醸造要因で決まるか興味を持ち, 今回は酵母の増殖で窒素源として利用されるアミノ酸の種類と量について調べた。清酒のアミノ酸組成に及ぼす酵母の関与については, 布川・岩野ら^{2,3)}が精製酵素を組み合わせた酵素系で蒸米の溶解によって生成するアミノ酸組成と更に酵母を加えて増殖・発酵させたアミノ酸組成を比較して, アミノ酸の種類によって酵母の関与が異なり4グループに大別できることを報告している。清酒酵母のアミノ酸取込み量については, 北本ら^{4,5,6)}は胚芽添加仕込みにより酵母の増

殖が促進されアミノ酸度が半分に減少すること, 胚芽から持ち込まれる Mg^{2+} , PO_4^{3-} , K^+ が酵母のアミノ酸取込みを促進し, Ca^{2+} , Mn^{2+} が阻害作用を示すことを明らかにした。特に Mg^{2+} の濃度は 5~1000 ppm の範囲で濃度の上昇とともにアミノ酸取込み能が高まることを報告^{7,8)}している。ビール醸造では, 井上ら⁹⁾ はビール酵母のアミノ酸取込み速度で3グループに大別している。合成培地を用いた酵母のアミノ酸取込みについては, 酵母細胞膜に存在する種々の透過酵素の遺伝子とその発現について多くの研究がなされている^{10,11)}。以上のように酵母の増殖におけるアミノ酸の取込みについては多くの報告があるが, 高橋^{12,13,14)}らの報告によれば酵母増殖におけるアミノ酸取込みは, 硫安などの無機態窒素の有無, ビタミンの有無, 実験室酵母か醸造酵母かの違い, 醸造酵母でも清酒酵母, エタノール酵母, ビール酵母の違い, など様々な要因によって大きく異なることが報告されて

いる。そこで実際の清酒醸造における酵母のアミノ酸取込みを調べるため麴中に含まれるアミノ酸、ビタミン、無機塩類やその他微量成分を抽出した麴抽出液を用いて酵母を培養した。その結果、清酒の呈味に影響すると推定したアラニン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸の取込み量について興味ある知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 麴抽出液培地

酒母の仕込配合は一般に汲水歩合 110%，麴歩合 33% であることから、白米重量に対する水の割合は汲水が 1.1，麴米や蒸米からの持込みの水が平均 0.25 となるので全体で約 1.35 となり、麴米に対する水の割合は $1.35/0.33=4$ となる。この計算から麴中のアミノ酸含有量 (mg/g-koji) は酒母仕込み直後では約 4 倍量の水に抽出された濃度 (ppm) と見なせる。また酒母仕込みでは汲水 100 リットル当たり約 700 ml の乳酸を使うため仕込み直後の pH は 3.0~3.2 である。そこで、麴からのアミノ酸の抽出は麴重量の 4 倍量の 0.1 M 乳酸緩衝液 (pH 3.0) を使用し、5°C 以下 (冷蔵庫中) で約 2 時間抽出し、ろ紙 (No. 5 A) で自然ろ過して麴抽出液とした。これにグルコースを 5% 補填し麴抽出液培地とした。酵素の失活と殺菌は、予備実験の結果、加圧殺菌 (120°C, 15 分) ではグルタミンが約 93%，グルタミン酸が約 13%，システインは 100% 分解されることを知ったので、酵素の失活は 80°C 5 分の加熱で、殺菌は 0.45 μ のミリポアーで無菌ろ過とした。

2. アミノ酸補填麴抽出液培地

麴抽出液中のアミノ酸量では酵母増殖に足りないアミノ酸を補填しアミノ酸補填麴抽出液培地とした。麴抽出液にグルコース 5% の他に、グルタミン、リジン (塩酸塩)、スレオニン、メチオニン、アスパラギン酸、アルギニン、ロイシン、アスパラギンをそれぞれ 100 ppm、セリン、トリプトファン、フェニルアラニン、グルタミン酸、イソロイシン、ヒスチジン (塩酸塩)、システイン、バリン、チロシンをそれぞれ 50 ppm 補填し、80°C 5 分の加温による酵素失活、0.45 μ のミリポアーで無菌ろ過した。アミノ酸は全て和光純薬 (株) の L 型アミノ酸を使用した。

3. 酵母の培養

酵母の前培養は麴エキスをを用いて 30°C で 2 日間静置培養した。麴抽出液培地及びアミノ酸補填麴抽出液培地 5 ml に前培養酵母を 20 μ l 加えて、培養温度 15°C で 2~6 日間の静置培養を行った。酵母は協会酵母 K-901 を用いた。酵母数は血球計を用いて計数した。初発酵母数は総米 100 kg 酒母にアンプル 2 本 (1 本に 2×10^{10} 個) 使用したとすると酒母 1 g 当たり約 2×10^5 と計算されることから約 2×10^5 /ml とした。

4. 成分分析

培養後は酵母数を測定した後で 0.45 μ のミリポアーでろ過して分析に供した。グルコース、アミノ酸は、前報¹⁵⁾と同様とした。エタノール分はアルコメイト (理研計器) を用いて測定した。

5. 清酒麴からの持込みアミノ酸量

清酒麴は美山錦 (秋田県産、精米歩合 60%) を原料白米とし、秋田今野商店の種麴菌 (糲用) を用いて、40 人の学生が製麴したものを用いた。アミノ酸分析は麴 2 g に 0.02 M 塩酸 5 ml を加えて冷蔵庫中で 2 時間抽出した後、0.45 μ のミリポアーでろ過した抽出液をアミノ酸分析の試料とした。酒母への持込みアミノ酸量 (mg/l) は清酒麴のアミノ酸含有量が 4 倍量の汲水で抽出されたものとして計算した。

実験結果

1. 酵母増殖におけるアミノ酸取込みの経過

麴抽出液培地を用い、協会 901 酵母を 15°C で静置培養して、培養液中のアミノ酸濃度の推移を 2 日目、4 日目と調べた結果を Table-1 に示した。酵母は初発酵母数 2×10^5 /ml が 4 日間の培養で 3.5×10^7 /ml に増殖した。アミノ酸全体でみると 452 ppm が 122 ppm, 67 ppm と減少し酵母増殖の窒素源として取込まれたと考えられるが、個々のアミノ酸についてみると 2 日目にメチオニン、スレオニン、アスパラギン、トリプトファン、システインがゼロになり、続いて 4 日目にアルギニン、グルタミン、リジン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン酸、ヒスチジン、セリンがゼロになった。残存するアミノ酸はチロシン、バリン、グルタミン酸、GABA、アラニン、フェニルアラニン、グリシン、プロリン、システインでこれらのアミノ酸は酵母の増殖には利用され難いアミノ酸と推論される。この結果から酵母は取込み易いアミノ酸から順次利用することが明らかであり、この酵母の選択

Table 1 Time Course of Amino Acid Concentration During Growth in Sake Yeast.

	Cultivation days		
	0	2	4
Arginine	82	27	0
Tyrosine	53	21	20
Glutamine	39	2	0
Valine	33	10	4
Lysine	33	2	0
Glutamic acid	30	11	4
GABA	28	14	11
Leucine	24	1	0
Alanine	24	15	6
Isoleucine	20	2	0
Phenylalanine	19	5	2
Histidine	13	2	0
Aspartic acid	13	1	0
Methionine	13	0	0
Glycine	6	3	4
Serine	5	1	0
Threonine	5	0	0
Asparagine	5	0	0
Proline	5	4	12
Tryptophan	4	0	0
Cysteine	0	0	4
Total (ppm)	452	122	67
Yeast ($\times 10^7$ /ml)	0.02	0.5	3.5

Yeast is K 901 ; Cultivation temperature is 15°C ;
Stand cultivation on koji extract medium.
GABA ; γ -Amino n-butyric acid

的アミノ酸取込みが製成酒のアミノ酸組成の形成に大きく影響していることが明らかとなった。次に清酒酵母はそれぞれのアミノ酸を最大でどのくらい取込むか検討した。

2. 酵母増殖における選択的アミノ酸の最大取込み量

アミノ酸補填麴抽出液培地を用いて清酒酵母の増殖に利用されるアミノ酸の最大取込み量を調べた。アミノ酸の補填は培養後も全てのアミノ酸が培地中でゼロにならない量を加えた。結果は Table-2 に酵母数、グルコース濃度、エタノール濃度、アミノ酸濃度を、Table 3 にアミノ酸取込み量を示した。酵母数は 9.0×10^7 /ml で液体培養の最大酵母密度に達したものと考えた。グルコース消費量は 6.4%，エタノール生成量は 3.8%，アミノ酸消費量は 815 ppm であった。個々のアミノ酸の取込み量は Table-3 から明らかのように、グルタミンが最も取込み量が多く 92 ppm であった。以下リジン 90 ppm，スレオニン 83 ppm，メチオニン 77 ppm，アスパラギン酸 77 ppm，アルギニン 67 ppm，ロイシン 57 ppm，アスパラギン 53 ppm の順であった。これら 8 個のアミノ酸は取込み量が 50 ppm 以上であり取込み速度も速く (Table-1)，酵母が好んで利用するアミノ酸のグループ A と分類した。次のセリン，トリプトファン，フェニルアラニン，グルタミン酸，イソロイシン，ヒスチジン，システイン，バリン，チロシンは取込み量が 19-32 ppm でグループ B に分類した。グループ B のアミノ酸は Table-1 から明らかのようにグループ A が消失した場合に補完的に利用されるアミノ酸と考えられる。 γ -アミノ酪酸 (GABA)，アラニン，プロリン，グリシンは酵母に利用され難く逆に酵母が放出するアミノ

Table 2 Change in the Number of Yeast Cells and Components in Amino Acid Supplementary Koji Extract Medium.

	Cultivation days		Change
	0 (A)	5 (B)	
Number of Yeast cells ($\times 10^7$ /ml)	0.02	9.00	
Glucose concentration (%)	9.7	3.3	-6.4
Ethanol concentration (%)	0.0	3.8	3.8
Amino acid (ppm)	1537	722	-815

15°C ; Stand cultivation for 5 days ; Yeast is K-901

Table 3 Uptake of Amino Acid on Yeast Growth in Amino Acid Supplementary Koji Extract Medium.

Group	Amino acid	Uptake of amino acids (ppm)
A	Glutamine	92
	Lysine	90
	Threonine	83
	Methionine	77
	Aspartic acid	77
	Arginine	67
	Leucine	57
	Asparagine	53
B	Serine	32
	Tryptophan	26
	Phenylalanine	26
	Glutamic acid	26
	Isoleucine	25
	Histidine	25
	Cystine	22
	Valine	19
C	Tyrosine	19
	γ -Amino n-butyric acid	6
	Alanine	-1
	Proline	-1
	Glycine	-4
	Total (ppm)	815

Yeast strain is K-901 ; Cultivation temperature is 15°C ; Stand cultivation for 5 days.

酸のグループCに分類した。清酒の旨味に影響していると推定したアミノ酸についてみると、アスパラギン酸、アルギニンを取込み量の多いグループAに分類され、グルタミン酸は取込み量の少ないグループBに分類された。グルタミン酸は清酒中の閾値が低いと推定されるアミノ酸であり清酒の旨味に深く関係しているが、酵母の取込み量が補完的であるという事実は興味深い。清酒中に最も多く含有し旨味を早するアラニンは酵母が放出するアミノ酸であり酵母の種類とアラニン生成量との関連が興味深い。

3. 酵母の増殖が終了した段階でのアミノ酸の取込み量

清酒酵母は、醪の前半において増殖と共にエタノールを生成し、エタノール分が約12%生成する頃に最

大酵母密度(約 2×10^8 /g)に達して増殖が完了し、醪後半は主として発酵のみが行なわれる。そこで増殖が終了した状態におけるアミノ酸取込み量を調べた。酵母の増殖を抑えるためエタノールを11.6%加えたアミノ酸補填麴抽出液培地に酵母を 7.4×10^7 /ml加えて、15°C、2日間の静置培養を行なった。結果はTable 4に酵母数、グルコース濃度、エタノール濃度、アミノ酸取込み量を示した。表から明らかであるが、エタノールを添加しない区分は酵母数が 0.74×10^8 /mlから 1.01×10^8 /mlに増殖が認められ、グルコース消費量が5%、エタノール生成量が3.3%、アミノ酸消費量が552 ppmであった。一方、エタノール添加区分は酵母の増殖が認められず、発酵によりグルコース1.6%が消費され、エタノールが1.0%生成し、こ

Table 4 Influence of Ethanol Concentration on Yeast Growth

	Cultivation days	Initial ethanol concentration in media (%)	
		0	11.6
Number of Yeast cells ($\times 10^8$ /ml)	0	0.74	0.74
	5	1.01	0.75
Glucose concentration (%)	0	6.6	6.6
	5	1.6	5.0
Ethanol concentratin (%)	0	0.0	11.6
	5	3.3	12.6
Amino acid uptake (ppm)	5	552	75

15°C ; Stand cultivation for two days.

Table 5 Influence of Ethanol on Uptake of Amino Acid at Fermentation Stage

Group	Amino acid	Initial ethanol concentration in media (%)	
		0	11.6
A	Glutamine	80	2
	Lysine	46	5
	Threonine	52	8
	Methionine	83	6
	Aspartic acid	52	6
	Arginine	55	9
	Leucine	17	3
	Asparagine	42	3
B	Serine	6	1
	Tryptophan	30	10
	Phenylalanine	10	-1
	Glutamic acid	12	-8
	Isoleucine	8	2
	Histidine	13	5
	Cysteine	17	26
	Valine	8	1
C	Tyrosine	15	1
	γ -Amino n-butyric acid	3	1
	Alanine	11	-3
	Proline	-6	-2
	Glycine	-2	-1

Yeast is K-901 ; Cutivation temperatureis 15°C ; Stand cultivation for two days on amino acid supplementary koji extract medium.

の時のアミノ酸消費量は75 ppmであった。なおエタノール11.6%添加培養における酵母の死滅の有無を麴エキス寒天培地を用いた平板培養法で調べたところ培養前後のコロニー数はほぼ同一であり酵母の死滅によるアミノ酸の漏出はなかったものと判断した。この結果は酵母のアミノ酸取込みは大部分が増殖の際に窒素源として利用されることを示すものである。個々のアミノ酸取込み量はTable-5に示した。エタノール無添加の区分は初期酵母数が 2×10^6 /mlと少ない状態からの増殖によるアミノ酸取込み量(Table-3)と比べて大きな差異は認められない。これに対してエタノール添加区分ではシステインの取込み量が増加したが他のアミノ酸の取込みは僅かであった。逆にグルタミン酸、アラニン、フェニルアラニン、グリシン、

プロリンの放出が認められた。グルタミン酸は清酒の酸味、渋味、雑味を示し好ましくないアミノ酸と推定されるが酵母の増殖が終了した段階では酵母が放出するアミノ酸であった。酵母の種類とグルタミン酸の取込みや放出との関連が興味深い。

4. 麴のアミノ酸組成の酵母増殖による変換

以上の結果から酵母増殖における選択的なアミノ酸取込みが製成酒のアミノ酸組成形成の大きな要因であることは明らかとなった。そこで個々のアミノ酸について麴からの持込み量と酵母の増殖による取込み量との比較を行った。製造ロットの異なる麴40個のアミノ酸組成について4倍量の乳酸緩衝液で抽出したアミノ酸濃度(ppm)として計算しTable-6にその平均値、最大値、最小値を示した。麴からの持込み量はアミノ

Table 6 Comparison of the Amount of Uptake of Amino Acid on Yeast Growth and That of Amino Acid from Koji.

Group	Amino acid	Amount from koji (ppm)			Amount of uptaking by yeast growth (ppm)
		Average	Maxmum	Minmum	
A	Glutamine	57	93	22	92
	Lysine	30	55	11	90
	Threonine	10	19	4	83
	Methionine	9	16	4	77
	Aspartic acid	19	34	6	77
	Arginine	62	112	20	67
	Leucine	32	58	11	57
	Asparagine	12	26	3	53
B	Serine	14	27	5	32
	Tryptophan	3	6	1	26
	Phenylalanine	17	31	6	26
	Glutamic acid	24	45	7	26
	Isoleucine	11	21	4	25
	Histidine	10	20	4	25
	Cysteine	8	13	1	22
	Valine	13	30	4	19
C	Tyrosine	31	52	10	19
	γ -Amino n-butyric acid	48	78	16	6
	Alanine	29	49	12	-1
	Proline	8	14	1	-1
Total	Glycine	9	20	3	-4
		454	820	154	815

Koji ; Variety of rice is Miyamanishiki ; Polishing rate is 70% ; Number of koji is 40. Yeast ; K-901

酸全体でみると最大値 820 ppm, 最小値 154 ppm, 平均値 454 ppm と大きなバラツキを示した。大部分のアミノ酸は酵母の最大取込み量よりも少ないが, アルギニン, フェニルアラニン, グルタミン酸, バリン, チロシンの 6 個のアミノ酸は酵母の最大取込み量を上回る麴が存在した。これらのアミノ酸は全て苦味アミノ酸, 酸味アミノ酸であるが特にアルギニンとグルタミン酸は清酒の含有量で呈味に影響していることを明らかにしたアミノ酸である。

麴中のアルギニンはバラツキが大きく酵母の最大消費量 (67 ppm) を上回る麴が半分以上であった。グルタミン酸は麴からの持込み量は平均で 24 ppm と少ないが酵母の最大消費量が 26 ppm と少ないためアルギニンと同様に麴からの持込み量が酵母の取込み量を上回る麴が半分以上であった。

考 察

筆者らはアミノ酸分析法として生体分析法 (分析時間 2 時間 30 分) を採用した結果, グルタミンや γ -アミノ酪酸 (GABA, γ -Amino n-butyrac acid) の測定が可能となり清酒麴中にはグルタミンが多量に存在すること (Table-6) を知った。さらに予備実験でグルタミンが pH 3.0 の条件では加圧殺菌 (120°C, 15 分) で分解することを知り, 80°C 加温での酵素失活, フィルターを用いた無菌ろ過により麴抽出液培地を調整して酵母培養を行った結果, 酵母が好んでグルタミンを取込む (Table-3) という新しい知見を得ることができた。清酒酵母は増殖の窒素源として麴由来のアミノ酸や蒸米タンパク質の酵素分解によって生成するアミノ酸を利用する。今回の結果から清酒酵母は好んで利用するアミノ酸のグループ A とこれらのアミノ酸が消失した場合に補完的に利用するアミノ酸のグループ B, ほとんど利用せずに逆に放出するアミノ酸のグループ C の 3 つに分類できることを知り, このような酵母の増殖における選択的アミノ酸取込みが清酒のアミノ酸組成の形成に大きく関わっていることが再確認できた。更に酵母のアミノ酸最大取込み量と麴からのアミノ酸持込み量を比べてみると大部分のアミノ酸は酵母の増殖で消費されるが, 清酒の呈味に関係が深いことを明らかにしたアルギニン, グルタミン酸, アスパラギン酸, アラニンの 4 つのアミノ酸のうちアルギニンとグルタミン酸が麴からの持込み量が酵母の

最大取込み量を上回る麴が認められたことは意味深い。すなわちこの 2 つのアミノ酸は麴からの持込みが多いと酵母増殖で消費されずに残り, 蒸米の酵素分解で生成する分と合わさって製成酒のアミノ酸含有量となり品質評価に大きく関わると考えられる。麴中のアミノ酸含有量に及ぼす製麴要因や蒸米タンパク質の酵素分解により生成するアミノ酸量に及ぼす酵素活性や原料米品種のタンパク質組成の影響など今後更に検討したいと考えている。

要 約

1. 酒母における酵母の増殖を想定して, 麴抽出液培地を用いて酵母の増殖におけるアミノ酸取込み量を調べたところ, 取込み量の多いグループ A にグルタミン, リジン, スレオニン, メチオニン, アスパラギン酸, アルギニン, ロイシン, アスパラギン酸, 取込み量が中程度のグループ B にセリン, トリプトファン, フェニルアラニン, グルタミン酸, イソロイシン, ヒスチジン, システイン, バリン, チロシンが, 取込みせずに逆に放出するグループ C には GABA, アラニン, プロリン, グリシンが分類された。
2. 清酒の早味に関係しているアラニン, アルギニン, グルタミン酸, アスパラギン酸についてみると, アルギニンとアスパラギン酸は酵母の取込み量が多いアミノ酸 (グループ A) で麴からの持込み量が多いアルギニンは酵母の最大取込み量を上回る場合があり得る。グルタミン酸は取込み量が少ないアミノ酸 (グループ B) のため麴からの持込み量が製成酒のグルタミン酸含有量に密接に関係している。アラニンは酵母が放出するアミノ酸 (グループ C) であり麴からの持込み量がそのまま製成酒の含有量に上乗せになるアミノ酸であった。
3. 酵母の増殖が終了した段階ではアミノ酸取込み量は僅かであり, 酵母のアミノ酸取込みは主に増殖の窒素源として利用される。

最後に本研究に当たり奨学寄附金を頂戴した秋田県酒造組合様, 貴重なアドバイスを頂きました山梨大学飯村穰教授, 日本醸造協会吉田清上席技師に厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 岩野君夫, 高橋和弘, 伊藤俊彦, 中沢伸重; 醸

- 協, **99** (9), 659-664 (2004)
- 2) 布川弥太郎, 飯塚尚彦, 岩野君夫, 斉藤和夫; 醸協, **76** (4), 267-271 (1981)
- 3) 岩野君夫, 飯塚尚彦, 斉藤和夫, 布川弥太郎; 醸協, **76** (4), 272-275 (1981)
- 4) 北本勝ひこ, 三宅優, 渡辺誠衛, 中村欽一; 醸協 **80** (1), 53-58 (1985)
- 5) 北本勝ひこ, 三宅優, 河野正義, 渡辺誠衛, 高橋康次郎, 戸塚昭, 中村欽一; 醸協 **80** (1), 59-63 (1985)
- 6) 北本勝ひこ, 高橋康次郎, 戸塚昭, 吉沢淑; 醸工, **63** (4), 289-295 (1985)
- 7) 吉沢淑, 高橋康次郎, 北本勝ひこ, 宮崎伸一; 醸協, **80** (9), 645-648 (1985)
- 8) 吉沢淑, 高橋康次郎, 北本勝ひこ, 永井英雄; 醸協, **80** (9), 649-653 (1985)
- 9) 井上喬著, やさしい醸造学, (株)工業調査会, 148頁
- 10) Jaroslav Hora'k. Yeast nutrient transport; Biochimica et Biophysica Acta 1331 (1997) 41-79
- 11) Boris Magasanik. Regulation of Nitrogen Utilization; The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Volume II. 283-317 (1992)
- 12) 高橋雅弘; 農化 **28** (5), 395-398 (1954)
- 13) 高橋雅弘; 農化 **28** (5), 398-404 (1954)
- 14) 高橋雅弘; 農化 **28** (6), 425-428 (1955)
- 15) 岩野君夫, 中沢伸重, 伊藤俊彦; 醸協 **97** (12), 865-871 (2002)