

研究報文

アスパラギン酸分解能を有する *Tetragenococcus halophilus* を利用した溜醤油のアミン低減化

間野博信

(あいち産業科学技術総合センター 食品工業技術センター)

(平成31年1月11日受理)

Reduction of amines in tamari soy sauce by inoculating starter cultures of aspartate degrading strain of *Tetragenococcus halophilus*.

Hironobu Mano

(Food Research Center, Aichi Center for Industry and Science Technology)

溜醤油のアミン低減化を目的として、アスパラギン酸分解能を有する *T. halophilus* の利用を試みた。まず、醤油諸味から、ヒスチジン、チロシンならびにアルギニンを分解せず、アスパラギン酸分解能を有する *T. halophilus* No. 1 株を得た。このNo. 1 株を乳酸菌スターターとして用いて溜醤油を醸造したところ、窒素分や風味への影響を抑制しつつ、アミンを低減化できる可能性が明らかになった。

緒言

醤油を含む発酵食品では熟成中に不揮発性アミンであるヒスタミンやチラミンが蓄積することがある^{1,2)}。これらのアミンは大量に摂取すると頭痛や嘔吐などの症状を引き起こす¹⁾。醤油の場合、一度の喫食量が少ないため、仮に蓄積していても影響はないと考えられている。しかし、同時に喫食する他の食材由来のアミン類の影響や、モノアミンオキシダーゼ阻害薬(抗うつ剤)の服用などによっては、発症の可能性が指摘されており^{1,3)}、アミンの低減化が望まれている。

醤油の製造環境には耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* が生存しており、仕込みの際に諸味へ混入して増殖し、醤油の風味形成に影響を及ぼしている。この製造環境に由来する乳酸菌は野生乳酸菌と呼ばれ、性質が異なる多様な菌株で構成されている。その一部はアミン生成能を有し、醤油におけるアミン蓄積の原

因となっている³⁾。近年、醤油業界では、製造環境の洗浄・殺菌により野生乳酸菌の初発菌数を低減し、優れた醸造特性を有する *T. halophilus* をスターターとして添加することで、アミンの生成を抑制する試みが盛んに行われている^{3,4,5)}。

T. halophilus の中にはヒスチジン(His)やチロシン(Tyr)、アルギニン(Arg)、アスパラギン酸(Asp)などのアミノ酸を分解する株が存在しており、スターター株を選定する際は留意が必要である。HisおよびTyr分解性株は脱炭酸によりヒスタミンやチラミンを生成する³⁾。また、Arg分解性株はスターターとして用いた場合、発がん性が疑われているカルバミン酸エチルの生成を助長する可能性が指摘されている⁶⁾。そのため、著者はこれらのアミノ酸分解能を有さない菌株(以下、従来株)をスターターとして用い、欧州における貿易上のヒスタミン濃度の推奨値である200ppm

以下^{3,7)}を目標とし、溜醬油におけるアミン低減化対策の確立に取り組んできた^{8,9)}。これまでに、野生乳酸菌の初発菌数を 10^3 cfu/g未満にし、スターターを 10^5 cfu/gオーダー添加することで、品質への影響を抑制しつつ、安定したアミンの低減化が可能であることを報告した⁸⁾。一方、本法による溜醬油醸造では、スターター無添加ロットとの風味の差は許容範囲内であったものの、やや酸味が増し、すっきりとした味わいとなる(味わいが薄くなる)傾向にあった。また、ホルモル窒素の減少が確認された。そこで、風味や窒素分への影響が少ない*T. halophilus*スターターを利用する手法の確立が望まれた。

Asp分解能を有する*T. halophilus*は酸性アミノ酸であるAspを脱炭酸し、中性アミノ酸であるアラニン(Ala)に変換する。そのため、スターターとして用いた場合、諸味pHが低下しにくく、麴菌由来酵素の活性が維持されるため、窒素分の減少を抑制できると考えられた⁷⁾。そこで、本研究ではHis, TyrならびにArgを分解せず、Asp分解能を有する*T. halophilus*を新たにスクリーニングした。得られた菌株を用いて溜醬油を醸造し、アミン低減化手法の確立を試みた。

試験方法

1. アスパラギン酸分解性乳酸菌スターターの分離

(1) 培地の調製

本研究で使用した基礎培地の組成を表1に示した。この培地はBover-Cidら¹⁰⁾が報告した乳酸菌用培地に基に、食塩濃度を上げるなど、一部改良したものである。この基礎培地へ目的に応じて必要な成分を加え、以下の3種類の培地を調製した。

L-チロシンを0.8%、寒天を1.5%添加し、Tyr分解性株検出用培地を調製した。この培地は水に難溶性Tyrによって白濁しているが、Tyr分解性株が増殖した場合、コロニー周辺のTyrがチラミンに分解され、クリアゾーンが形成される¹¹⁾。また、L-アスパラギン酸を1%、プロモクレゾールパープルを0.006%添加してAsp分解性株検出用培地を、L-ヒスチジン塩酸塩一水和物とL-アルギニン一塩酸塩をそれぞれ0.5%、プロモクレゾールパープルを0.006%添加してHisおよびArg分解性株検出用培地を調製した。前者でAsp

分解性株が生育した場合、AspからAlaが生成され、培地pHが上昇する。また、後者でHisならびにArg分解性株が生育した場合、ヒスタミンやアンモニアが生成され、同じく培地pHが上昇する。培地pHの上昇は黄色から紫色への色調の変化として観察できる。なお、Asp分解性株検出用培地は殺菌後、40%水酸化ナトリウム溶液を用いて無菌的にpHを5.5に調整して用いた。(2)スクリーニング

以下の手順でHis, Tyr, Argを分解せず、Asp分解能を有する菌株(以下、スターター候補株)をスクリーニングした。はじめに、愛知県内の企業より入手した諸味を段階希釈し、Tyr分解性株検出用培地に塗抹して30℃で7日間、嫌気培養した。生じたコロニーのうち、クリアゾーンを形成しなかったものをピックアップし、96穴プレートに分注したAsp分解性株検出用培地に懸濁した。これを30℃で7日間培養した後、培地の色調が紫色に変化した株を選抜し、0.5 mL容エッペンドルフチューブに分注したHisおよびArg分解性株検出用培地に植菌した。30℃で7日間培養した後、培地の色調が黄色のままであった株を選抜し、single colony isolationを行った後、グリセロールストックを作成して-80℃で保存した。

(3) アスパラギン酸分解能の安定性評価

*T. halophilus*のAsp分解能に関与する遺伝子はプラスミド上にコードされており、継代培養によって

表1 基礎培地の組成

トリプトン	0.5%
酵母エキス	0.5%
肉エキス	0.5%
グルコース	0.05%
NaCl	15%
Tween80 [®]	0.1%
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.02%
MnSO ₄ ・4~5H ₂ O	0.005%
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.004%
クエン酸アンモニウム (第二)	0.2%
チアミン	0.001%
K ₂ HPO ₄	0.2%
CaCO ₃	0.01%
ピリドキシン塩酸塩	0.005%

欠落する可能性があることが知られている¹²⁾。そこで、以下の手順でスターター候補株のAsp分解能の安定性を評価した。はじめに、醤油培地（グルコース2%、食塩12%、生揚げ醤油25%、pH 8.0）³⁾を用いて5回、継代培養を行った。次に、表1の基礎培地に寒天を1.5%添加した培地（以下、耐塩性乳酸菌用培地）を調製した。これに最後の継代培養液を塗抹し、30℃で7日間、嫌気培養した。生じたコロニーのうち、96個をピックアップし、96穴プレートに分注したAsp分解性株検出用培地に懸濁した。30℃で7日間培養した後、培地の色調が紫色に変化した割合を算出した。

(4) 小仕込み試験によるアミン低減効果ならびに窒素分への影響の評価

はじめに、醤油培地を用いてスターター候補株を培養した。次に、愛知県内の企業から入手した溜醤油用の麴を用い、10水溜の諸味200gを調製した。これに野生乳酸菌の初発菌数が 10^2 cfu/gオーダーとなるように製造現場から採取した諸味液汁を接種した。続いて、 10^3 cfu/gオーダーとなるようにスターター候補株の培養液を接種し、よく混合した後、30℃で醸造した。また、スターター候補株を接種しない区分も調製し、これをコントロールとして同様に醸造した。4週間後、諸味を一部採取し、ダンシルクロライド蛍光誘導体法により諸味のヒスタミンおよびチラミン濃度を分析した^{8, 13)}。さらに12週間後、諸味を遠心分離(7000rpm, 室温, 1.5時間)し、上澄みをろ紙(ADVANTEC製, No.2)でろ過し、清澄な諸味液汁を得た。この液汁について、しょうゆ試験法¹⁴⁾に準じてpHとホルモール窒素を、マクロ改良ケルダール法¹⁵⁾により全窒素を分析した。

(5) 同定試験

Asp分解能の安定性評価および小仕込み試験において、結果が良好であった菌株について、以下の方法¹⁶⁾に従い16S rDNAの塩基配列に基づく同定試験を行い、*T. halophilus*であることを確認した。菌体の懸濁液を直接鋳型DNAとし、プライマー8F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')および1510R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')（終濃度各0.3 μM）と、PCR酵素KOD FX (TOYOBO製)を用いてPCRを行った。PCRの温度条件は、94℃ 2分、40サイ

クルの98℃10秒；55℃30秒；68℃ 1分30秒とした。536Rプライマー(5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3')を用いて約500 bpの塩基配列を決定し、NCBIから利用できるBLASTプログラムによりホモロジー検索を行った。

2. 乳酸菌スターターの調製と溜醤油製造試験

愛知県内の企業A社およびB社において、実生産規模での溜醤油製造試験を行った。

(1) 乳酸菌スターターの調製

醤油培地15Lを調製し、選抜したAsp分解性株の前培養液100mLを添加した。培養液pHが6.0以下に低下するまで、30℃で40~48時間培養した。培養液pHを7.0~8.0に調整して冷蔵保存し、1週間以内に使用した。また、本研究ではAsp分解性乳酸菌スターターの検討に先行して、従来株をスターターとして用いた製造試験を実施した。A社ではA1b株とA2株を、B社ではF2-2D5株を使用した。いずれも既報⁸⁾の方法に従い、各社の諸味から分離した菌株である。F2-2D5株はAsp分解性株と同様に調製した。A1b株とA2株はそれぞれ前培養液100mLを用意し、醤油培地15Lに添加し、混合した。以降は同様に調製した。

(2) 溜醤油製造試験

通常通り仕込みを行った後、野生乳酸菌の初発菌数を調査するために諸味を採取した。その後、速やかにスターターの培養液を添加し、よく攪拌した。培養液は諸味30kLに対し、10~15L添加した。その後の製造工程は通常通りに行った。採取した諸味を耐塩性乳酸菌用培地に塗抹し、30℃で7日間、嫌気培養した。生じたコロニーを計数し、野生乳酸菌の初発菌数とした。また、同様に培養液の菌数を測定し、諸味1gあたりの乳酸菌スターターの添加量を算出した。野生乳酸菌の初発菌数が 10^3 cfu/g未満であること、乳酸菌スターターの添加量が 10^5 cfu/gオーダーであることを確認した。

3. 生揚げの品質評価

上記と同様に、生揚げのpHとホルモール窒素、全窒素を分析した。また、HPLC有機酸分析システム(島津製作所製)を用いて乳酸量を、超高速液体クロマトグラフ Nexera X 2 (島津製作所製)を用いてアミノ酸

量を、上記と同様にヒスタミンおよびチラミン濃度を分析した。また、味認識装置TS-5000Z（インテリジェントセンサーテクノロジー製）を用いて味への影響を評価した。さらに、スターター添加ロットと無添加ロットを識別できるか調査するため、一般消費者22名をパネリストとし、1対2比較法¹⁷⁾による官能評価を行った。

結果および考察

1. アスパラギン酸分解性乳酸菌スターターの分離

愛知県内の企業6社(C~H社)から1~7ロットの

諸味を入手し、スクリーニングを行った。その結果を表2に示した。Tyr分解性株の割合は最大で2.2%であった。ほとんどの菌株が非分解性株であったため、その一部を次の試験に用いた。例えば、G社のロットNo. 3の諸味ではTyr非分解性株96株をAsp分解性株検出用培地で培養し、57株で色調変化が確認された。このうち19株をHisおよびArg分解性株検出用培地で培養し、色調変化が見られなかった18株をスターター候補株として保存した。Asp分解性株はG社やH社のように高頻度に分離できる企業と、C社のように低頻

表2 スターター候補株のスクリーニング結果

企業	ロット No.	Asp分解性株 検出用培地		HisおよびArg分解性株 検出用培地	
		検査株数	陽性株数	検査株数	陰性株数
C	1	27	7	7	6
	2	34	1	1	1
	3	96	0	0	0
	4	96	0	0	0
	5	96	0	0	0
	6	80	0	0	0
	7	96	0	0	0
	計	525	8	8	7
D	1	192	0	0	0
	2	96	0	0	0
	3	96	0	0	0
	4	70	0	0	0
	計	454	0	0	0
E	1	192	0	0	0
F	1	8	0	0	0
	2	16	0	0	0
	3	10	0	0	0
	4	43	0	0	0
	5	19	0	0	0
	計	96	0	0	0
G	1	92	9	9	8
	2	40	2	2	2
	3	96	57	19	18
	計	228	68	30	28
H	1	96	0	0	0
	2	117	3	3	0
	3	75	3	3	3
	4	96	13	13	12
	5	60	2	2	0
	計	444	21	21	15

度で分離できる企業，D，E，F社のように分離できない企業があり，企業により取得の難易度が異なることが示唆された。

本研究ではスクリーニング方法を検討する過程においてもスターター候補株を22株分離することができ，表2に示した50株と合わせて合計72株の候補株を取得することができた。迅速なアミン低減化対策の構築を望む企業の要請に応えるため，はじめて取得できたNo. 1株について，スクリーニングと並行して以下の試験を先行して行った。はじめに，Asp分解能の安定性を評価し，5回継代培養後も分解能が100%維持されることを確認した。次に，小仕込み試験を行った。その結果を表3に示した。コントロールではヒスタミンが670ppm，チラミンが988ppm検出されたのに対し，No. 1株接種区分ではいずれも50ppm未満であった。また，No. 1株接種区分の全窒素とホルモー

ル窒素はともにコントロールと同等であった。同定試験では，決定した塩基配列が*T. halophilus*の配列と100%一致し，No. 1株が*T. halophilus*であることが確認された。以上の結果から，製造試験にはNo. 1株を用いることとした。

本研究で取得したスターター候補株72株は，実用化に向けて課題となるファージ対策の構築に活用できると考えられる。工場内でファージの発生を防ぐには，ファージ感受性が異なる株をローテーションで使用することが有効であると考えられる¹⁸⁾。また，*T. halophilus*に感染するファージは株に特異的であると言われている¹⁹⁾。スターター候補株を分離源や糖類の発酵性パターン²⁰⁾，RAPD法²¹⁾などによりグルーピングした後，No. 1株と同様にスターターとして利用できる菌株を選抜し，ローテーションで使用することでファージの発生を抑制できると考えられる。

表3 小仕込み試験の結果

試験区	アミン濃度 (ppm) *		pH	全窒素 (w/v%)	ホルモール窒素 (w/v%)
	ヒスタミン	チラミン			
No. 1株接種区分	<18	34	4.87	2.92	1.39
コントロール	670	988	4.65	2.95	1.39

*定量限界：ヒスタミン=18 ppm、チラミン=22 ppm

2. アスパラギン酸分解性乳酸菌スターターの窒素分の減少抑制効果

(1) A社における製造試験

A社における乳酸菌スターター無添加ロットと従来株添加ロット⁸⁾，No. 1株添加ロットの生揚げのpHおよび窒素分の分析結果を図1に示した。従来株およびNo. 1株添加ロットのアミン濃度はすべて200 ppm以下であった。無添加ロットと比較し，従来株添加ロットではpHが0.25低下した。全窒素は減少しなかったが，ホルモール窒素は0.16%減少した。一方，No. 1株添加ロットではpHの低下は0.10に抑制され，全窒素は0.08%増加し，ホルモール窒素は同等であった。無添加ロットでは野生乳酸菌が増殖した結果，HisならびにTyr分解性株によるアミンの生成やArg分解性株によるアンモニアの生成⁶⁾により，諸味pHの低下が抑制されたと考えられた。従来株添加ロットでは*T. halophilus*の初発菌数が多いことに加え，これらのア

ルカリ性物質の生成が抑制されたため，諸味pHの低下が促進された。その結果，ホルモール窒素が減少したと考えられた。No. 1株添加ロットではアミンやアンモニアの生成が抑制されたが，Aspの分解により，pHの低下が抑制され，窒素分が維持されたと考えられた。

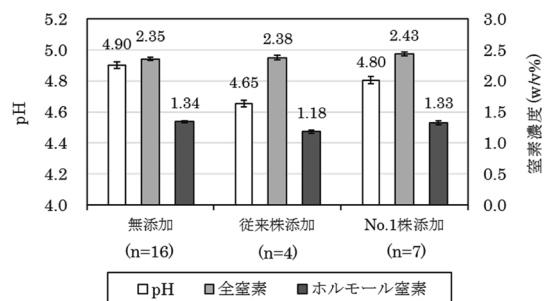


図1 乳酸菌スターターの添加による生揚げのpHおよび窒素濃度への影響(A社)

(図中の数値は平均値，エラーバーは標準誤差を表す)

(2) B社における製造試験

B社における乳酸菌スターター無添加ロットと従来株添加ロット、No. 1株添加ロットの生揚げのpHおよび窒素分の分析結果を図2に示した。従来株およびNo. 1株添加ロットのアミン濃度はすべて200ppm以下であった。無添加ロットと比較し、従来株添加ロットではpHが0.19低下した。また、全窒素は0.15%、ホルモール窒素は0.20%減少した。一方、No. 1株添加ロットではpHは同等であり、全窒素は0.03%、ホルモール窒素は0.15%減少した。No. 1株添加ロットは従来株添加ロットに比べてpHの低下が抑制され、窒素分は維持された。しかし、B社におけるNo. 1株利用の効果はA社の場合と比べて限定的であった。

3. 乳酸菌スターターの添加による品質への影響と諸味の初期pHの関係

生揚げの乳酸、Asp, Alaの分析結果を図3にまと

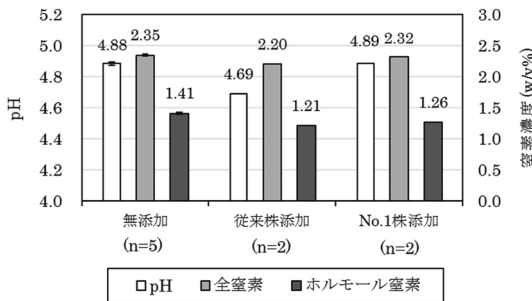


図2 乳酸菌スターターの添加による生揚げのpHおよび窒素濃度への影響(B社)
(図中の数値は平均値, エラーバーは標準誤差を表す)

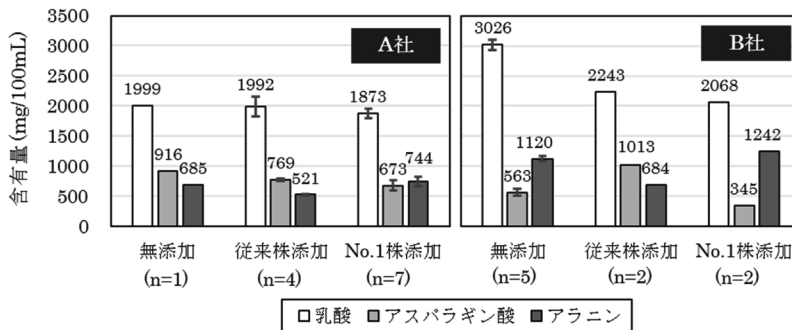


図3 乳酸菌スターターの添加による生揚げの乳酸、アスパラギン酸、アラニン含有量への影響
(図中の数値は平均値, エラーバーは標準誤差を表す)

めた。なお、A社の無添加ロットは検体の保管に不備があり、1ロット分しか分析できなかった。A社とB社の生揚げの乳酸量を比較すると、いずれの試験区もB社の方が多かった。これは諸味の初期pHが影響していると考えられる。両社は麩の形状が異なり、初期pHの平均値はA社が6.1、B社が6.6であった。*T. halophilus*の生育は中性付近が好適であり、pH 5.0以下では生育できないと言われている²²⁾。初期pHが高かったB社では*T. halophilus*が旺盛に活動したと考えられる。特に、無添加ロットは野生乳酸菌がアルカリ性物質を生成することで、諸味pHが高く推移し、*T. halophilus*が活動を継続したため、より多くの乳酸が蓄積したと考えられる。また、諸味pHの高い推移は窒素分の増加に大きく作用したと考えられる。そのため、諸味pHが速やかに低下した従来株添加ロットでは無添加ロットと比較してホルモール窒素だけでなく、全窒素まで減少し、その影響はA社よりも大きかった(図1, 2)。諸味pHの低下が緩やかなNo. 1株添加ロットにおいても、全窒素は概ね維持されたものの、ホルモール窒素が減少し、A社ほどの窒素分の維持効果は得られなかった(図1, 2)。

No. 1株添加ロットでは無添加ロットと比較してAspの減少とAlaの増加が確認された。Aspの分解によりpHの低下が抑制されたと考えられるが、乳酸量はA社、B社とも3試験区の中で最も少なかった。乳酸量が少ないのはNo. 1株の特徴であり、諸味pHを緩やかに低下させる一因になっていると考えられる。A社に比べ、B社の方がAspの減少とAlaの増加が大き

かった。初期pHの影響でNo. 1 株が旺盛に活動したためと考えられる。甘みのあるAlaは醬油をまろやかにするといわれており⁷⁾、過剰な生成は風味への影響が懸念される。

以上の結果から、乳酸菌スターターを添加した場合、諸味の初期pHが高いほど窒素分の減少や風味への影響が生じやすいことが示唆された。著者はA社とB社を含め7社の協力を得て、アミン対策に取り組んできた。B社を除く溜醬油メーカーの諸味の初期pHはA社と同等以下であった。多くの溜醬油メーカーはNo. 1株を使用することでA社と同様に窒素分の維持が可能であり、風味への影響を軽減できると考えられる。

4. 乳酸菌スターターの添加による風味への影響

A社における製造と比べて、窒素分や乳酸量への影響が大きかったB社の生揚げについて、味認識装置による味の評価を行い、結果を図4に示した。無添加ロットと比較して従来株添加ロットとNo. 1株添加ロットはともに「旨味コク」が弱くなった。これはホルモール窒素の減少が影響していると考えられる。また、No. 1株添加ロットは「酸味」が弱くなった。これは甘味を呈するAlaが生成した影響であると考えられる。

次に、1対2比較法により官能評価を行ったところ、無添加ロットと従来株添加ロット、無添加ロットとNo. 1株添加ロットの間に有意な差は認められなかった。味認識装置で検出された味の違いは一般消費者には認識できないレベルであった。

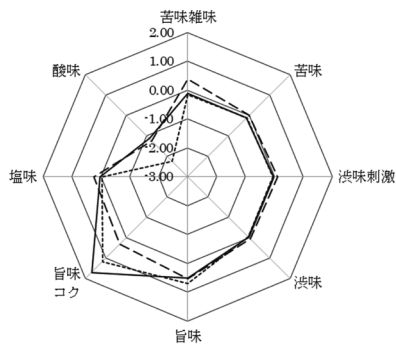


図4 味覚認識装置を用いた乳酸菌スターターの添加によるB社生揚げの味への影響評価

まとめ

溜醬油のアミン低減化を目的として、His, Tyr ならびにArgを分解せず、Asp分解能を有する*T. halophilus*をスクリーニングした。得られたNo. 1株について利用を検討し、以下の結果を得た。

- His, Tyr, Argを分解せず、Asp分解能を有する*T. halophilus*を72株取得することができた。Asp分解性株の分離頻度は企業により異なることが示唆された。
- No. 1株は従来株よりも生揚げ中の窒素分の維持が可能であった。
- 諸味の初期pHが高いほど、窒素分の減少や風味への影響が生じやすいことが示唆された。しかし、初期pHが6.0程度か、それ以下である多くの溜醬油メーカーでは、No. 1株の使用により窒素分の維持が可能であり、風味への影響を軽減できることが示された。
- No. 1株の添加により生じる風味への影響は一般消費者が認識できないレベルであった。

本報は2017年6月に東京で行われた第84回醬油研究発表会で報告したものである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を頂きました愛知県味噌溜醬油工業協同組合ならびにその組合員企業の皆様に深謝致します。また、実験に協力頂いた、辻村香留氏に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 井部明広：東京都健康安全研究センター年報，55，13 (2004)
- 2) 農林水産省発行「有害化学物質含有実態調査結果データ集」平成23～24年度，134-135 (2014)
- 3) 田上秀男，野田義治，日高修，松岡清司，小林真志，紅林孝幸：本誌，41，327 (2015)
- 4) 袴田雅俊，上村慎子，遠藤衛作，大坪倫子，杉山直人，鈴木邦明：本誌，42，61 (2016)
- 5) 植木達朗，片岡由希子，脇山元気，案浦謙二，大場和徳，野田義治：本誌，42，155 (2016)
- 6) 松戸隆直，青木光達，阿部敬悦，福田菜美，樋口猛，佐々木正興，内田金治：特開平5-227914 (1993) (出願日：1992.2.25)

- 7) 中台忠信：本誌, 38, 144 (2012)
- 8) 間野博信, 長谷川摂：本誌, 43, 119 (2017)
- 9) 間野博信：本誌, 44, 173 (2018)
- 10) Bover-Cid, S., W. H. Holzapfel : *Int. J. Food Microbiol.*, 53, 33 (1999)
- 11) 内田金治：特開昭 59-21397 (1984) (出願日：1982.7.28)
- 12) 樋口猛, 内田金治, 阿部敬悦:日本乳酸菌学会誌, 12, 14 (2001)
- 13) 厚生労働省：食品衛生検査指針 理化学編, 社団法人日本食品衛生協会, 621 (2005)
- 14) 財団法人日本醤油研究所編：しょうゆ試験法, 19-20 (1985)
- 15) 財団法人日本食品分析センター編：五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説, 中央法規出版株式会社, 29-34 (2001)
- 16) 公益社団法人日本生物工学会編：生物学実験書改訂版, 株式会社培風館, 113 (2002)
- 17) Poste, L. M., D. A. Mackie, G. Butler and E. Larmond, 相島鐵郎(訳)：日本食品科学工学会誌, 48, 378 (2001)
- 18) 乳酸菌研究集談会編：乳酸菌の科学と技術, 株式会社学会出版センター, 364 (2003)
- 19) Uchida, K., C. Kanbe : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 39, 429 (1993)
- 20) 内田金治：本誌, 9, 29 (1983)
- 21) 脇山元気, 植木達朗, 大場和徳, 野田義治:本誌, 43, 395 (2017)
- 22) 水沼武二：日本醸造協会雑誌, 80, 29 (1985)