

アミノ酸透過能が変化した清酒酵母の特性と醸造への影響

小浜恵子・伊藤良仁・米倉裕一・山本 忠・櫻井 廣・大澤純也
(岩手県工業技術センター)

平成 14 年 11 月 20 日受理

Characterization of the sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* : Its increase of the activity of general amino acid permease (GAP) and the effect on sake brewing

Keiko KOHAMA, Yoshihito ITO, Yuichi YONEKURA,
Tadashi YAMAMOTO, Hiroshi SAKURAI and Junya OHSAWA
(Iwate Industrial Research Institute
3-35-2 Iiokashinden, Morioka, Iwate, Japan)

General amino acid permease (GAP), which is nitrogen-regulated, transports all naturally occurring amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. The activity of GAP is coordinately derepressed during growth on poor nitrogen sources such as proline, and it is inactivated in the presence of ammonia or glutamate. To analyze the effect of GAP activity on sake brewing, we examined a sake yeast with a high expression of the *GAP1* gene by constitutive promoter. In sake mash, intracellular amino acid contents of the yeast were higher than that of the parent strain except for proline during fermentation. With increasing GAP, changes in sake components were observed including high contents of isoamyl acetate and the composition of organic acids. Because of GAP inactivation, the parent strain was not able to grow on a methylamine medium including proline as a nitrogen source, while constitutive *GAP1* expression resulted in the utilization of proline on the same medium. Methylamine resistant mutants were obtained, almost all producing a high content of isoamyl acetate. In one of the mutants, E 136, intracellular amino acid contents increased during the sake fermentation test, and the *GAP1* gene was highly expressed under a rich nitrogen medium compared with the parent strain.

Key words : 清酒酵母, General amino acid permease-

緒 言

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) が細胞内へアミノ酸の取り込みを行う際に関与するアミノ酸透過酵素は、基質特異性の異なる 19 種類が推定されている^{1,2)}。清酒醸造におけるアミノ酸の取り込みは、外部のアミノ酸量と香気成分への影響³⁾、もろみ中の無機イオンによる取り込み変化と製成酒のアミノ酸濃度⁴⁾、各種の透過酵素破壊株による醸造過程と製成酒アミノ酸組成への影響⁵⁾ など、醸造過程や製品の品質に大きな影響を与えることが報告されている。中でも基質特異性

の低いアミノ酸透過酵素 (GAP : general amino acid permease) は、生育に必要な窒素源に関して、良好な増殖を保つための nitrogen regulation に大きな役割を果たしている^{1,2)}。GAP 遺伝子 (*GAP1*) は、アンモニアやグルタミン酸など良好な窒素源の存在下では抑制され、プロリンやウレアなどの窒素源下で脱抑制される等の調節を受けているが、調節が変化した場合の清酒醸造に対する影響についてはあまり検討されていない。本研究では、*GAP1* 遺伝子を構成的発現プロモーター下で発現させた清酒酵母を用いて清酒醸造への影響を検討した。また、アンモニアのアナログ

であるメチルアミンに対する耐性を利用して、GAP活性を増大させた突然変異株取得が可能であったので報告する。

実験方法

1. アミノ酸透過酵素遺伝子(*GAP1*)高発現株の作成

協会701号酵母(K701)をYPD培地(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)にて定常期まで培養し、酢酸カリウム法⁶⁾で鋳型となる染色体を調製した。Jauniauxら⁷⁾の報告による実験室株の*GAP1*塩基配列より構造遺伝子部分の5'および3'末端塩基それぞれ20塩基に相補し、制限酵素*SalI*サイトを含むプライマーDNA(5'-CTGTCGACATGAGTAATACTTCTTCGTA-3', 5'-CTGTCGACGTTGTTCGATTCATTAACAC-3')を合成し、PCRにより増幅させた。増幅させたDNA断片を発現ベクターpAUR123(宝酒造製)のアルコールデヒドロゲナーゼプロモーター下流の*SalI*サイトに連結したプラスミドを作成した。作成したプラスミド中に含まれるDNA断片のシーケンスを行い*GAP1*遺伝子断片であることを確認した後、酢酸リチウム処理を用いる常法によりK701へ導入した。選択培地としてpAUR123の選択マーカーであるオーレオバシジンAを0.5 μ g/ml含むYPD培地を用い形質転換体を取得した(pGAP1/K701)。

2. メチルアミン耐性及び突然変異株の取得

pGAP1/K701及びK701をYPD液体培地で30°C、1昼夜培養し、滅菌水で洗浄した後、メチルアミンを各種濃度で含みプロリンを窒素源としたYNB培地(0.16% yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonia sulfate, 2% glucose, 0.1% proline)に同量を塗布して30°Cで培養し、2日後の生育を観察した。突然変異によるメチルアミン耐性酵母の取得は次のように行った。10mlのYPD液体培地にK701を植菌し、30°C、1昼夜培養後、滅菌水で2回洗浄した菌体に、5%エチルメタンサルホン酸(EMS)を含むリン酸緩衝液(pH7)で30°C、45分間処理を行った。6%チオ硫酸ナトリウムでEMSを中和後、処理菌体を2回洗浄してYPD液体培地にて30°C、1昼夜培養した。次にメチルアミンを含む上記の選択培地で生育可能な株を取得した。

3. 清酒の小仕込み試験

小仕込み試験は難波らの方法⁸⁾に従った。総米1kg(精米歩合70%)の小仕込み試験をpGAP1/K701及びK701を用いて実施した。また、メチルアミン耐性変異株は総米100g及び1kgの小仕込み試験で評価した。仕込温度は水麴、初添、踊りを15°Cとして仲添12°C、留添は10°Cとなるように仕込を行い、留後2日目より品温を1日に1°Cずつ上げ、最高品温を15°Cとなるようにした。留後21日目に遠心分離とフィルターによる加圧濾過によって上槽した。製成酒の一般成分分析、エタノール生産量、香氣成分量は国税庁所定分析法注解⁹⁾に従って測定した。アミノ酸組成はアミノ酸自動分析計(JLC-3000, 日本電子製)を、有機酸組成はカルボン酸分析計(S-3000, 東京理化製)を用いて測定した。

4. 菌体内アミノ酸濃度の測定

留より7, 14, 21日後にサンプリングを実施し、酵母菌体内のアミノ酸量を測定した。測定法は北本ら⁴⁾の方法に従い、もろみより酵母を分離、10%トリクロロ酢酸(TCA)で抽出後、ジエチルエーテルでTCAを除去して沸騰水中でエーテルを除き、20mM塩酸で定容した試料をアミノ酸自動分析計により分析した。各アミノ酸量の総和を菌体内総アミノ酸量とした。

5. *GAP1*遺伝子転写量の測定

Total RNAはSchmittら¹⁰⁾の方法により、供試酵母をYPD培地にて培養し対数増殖期に回収したものから調製した。アガロースゲルによる電気泳動にて分離し、ナイロンメンブレンに転写した。ノーザンハイブリダイゼーションはDIG DNA labeling and detection kit(ロシユ・ダイアグノスティック社製)を用いて検出した。プローブは、PCRで*GAP1*遺伝子の構造遺伝子部分を増幅したDNA断片を用いた。

実験結果及び考察

1. もろみ中でのアミノ酸取り込み変化と醸造特性

Fig.1にpGAP1/K701とK701を用いて総米1kgの小仕込み試験を実施したときの発酵経過を示した。2株の醸造経過には顕著な差はみられなかった。また、留後7, 14, 21日目の酵母菌体内アミノ酸量をTable1に示す。K701と比較して、その総量は明らかにpGAP1/K701の方が多かった。最も菌体内ア

Table 1 Intracellular amino acid compositions of the yeasts in sake mash

	Amino acids ($\mu\text{mol}/10^8$ cells)					
	7 day		14 day		21 day	
	K 701	pGAP 1/K 701	K 701	pGAP 1/K 701	K 701	pGAP 1/K 701
Asp	24.6	36.1	88.5	107.8	7.5	14.7
Thr	37.8	41.9	67.8	90.5	16.5	16.1
Ser	62.5	79.5	124.0	224.6	26.2	38.2
Glu	648.2	655.6	1167.3	1471.9	197.3	324.0
Gly	190.4	262.3	257.0	482.3	45.1	115.5
Ala	1163.8	1389.4	2328.5	2999.4	555.2	980.4
Val	61.7	91.1	74.2	107.2	10.1	15.8
Cys	40.9	37.3	225.0	232.7	99.1	142.3
Met	trace	trace	trace	4.6	trace	trace
Ile	42.8	59.3	82.1	137.6	16.3	41.0
Leu	43.9	60.2	81.5	140.2	11.8	22.9
Phe	13.5	22.3	28.1	69.3	4.0	7.9
Tyr	20.4	48.3	28.4	49.0	6.1	8.5
His	125.9	158.9	293.0	393.3	92.3	137.6
Lys	132.3	219.8	263.1	494.6	49.2	121.5
Arg	334.3	299.9	368.8	517.5	51.2	113.5
Pro	58.7	23.5	281.1	77.5	12.2	2.4
Total	3001.7	3485.3	5758.2	7600.0	1200.2	2102.3

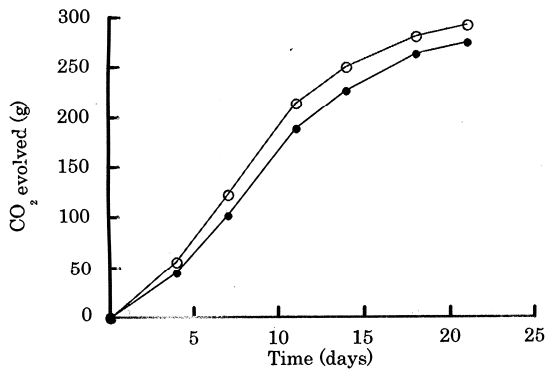


Fig. 1 Time course of carbon dioxide evolution from *moromi* during sake brewing.
Symbols: -○- K 701, -●- pGAP 1/K 701

ミノ酸総量が多い14日目と同様に、もろみ後期に至ってもアミノ酸総量はK 701に比べて2倍程度まで維持されていた。GAP1遺伝子を高発現させることにより、実際のもろみ中でも酵母のアミノ酸取り込み量が増加することが明らかであり、GAP1遺伝子の

構成的発現によるもろみ経過への顕著な影響はないことがわかった。小杉ら⁵⁾による各種アミノ酸透過酵素の破壊株を用いた報告でも、リジン透過酵素の破壊以外では特に醸酵経過への影響は認められていない。菌体内の各アミノ酸量についてはプロリンを除きpGAP 1/K 701の方が同等あるいは多かった。プロリン特異的な透過酵素遺伝子 (*PUT4*) は *GAP1* 遺伝子と同様に nitrogen regulation を受けており、アンモニアやグルタミン酸などの存在下では抑制され、窒素源がプロリンである場合には脱抑制されて、取り込みを行うとともにプロリン代謝関連酵素が誘導され速やかに窒素源として分解利用される¹⁾。したがって、GAP活性の増大により菌体内のグルタミン酸濃度も上昇することで、プロリン特異的透過酵素は抑制を受けて菌体内プロリン濃度が減少している可能性がある。また、もろみ中ではプロリンはアミノ酸取り込み順では下位にあるが^{4,11)}、pGAP 1/K 701においてはGAP活性の増大に伴いプロリンが菌体内に取り込まれ、酵素誘導により分解されて菌体内プロリン濃度がむしろ低くなるのかもしれない。

Table 2 Analysis of sake brewed with *GAPI* gene constitutive expressed yeast

Strain	K 701	pGAP 1/K 701
Alcohol(%)	19.8	18.2
Acidity(ml)	2.7	3.0
Amino acidity(ml)	2.4	2.3
Lactate(mg/l)	558.9	579.6
Acetate(mg/l)	62.4	50.1
Malate(mg/l)	535.7	723.5
Citrate(mg/l)	125.1	129.0
Succinate(mg/l)	720.1	799.1
Ethyl acetate(mg/l)	97.7	122.7
Isoamyl acetate(mg/l)	5.9	10.9
Isoamyl alcohol(mg/l)	180.5	189.7
Ethyl caproate(mg/l)	1.5	1.5

このときの製成酒の一般成分値及び有機酸組成を Table 2 に示した。一般分析値には大きな差が見られなかったが、有機酸組成においてリンゴ酸濃度が約 1.4 倍多くなり、酢酸濃度が低くなる傾向がみられた。1 kg の小仕込みを繰り返したが同様の結果が得られた。また香気成分については酢酸エステル量が増加する傾向がみられ、特に吟醸香である酢酸イソアミルが親株に比べて 2 倍程度増大していた。菌体内アミノ酸量が増大した場合には Ehrlich 経路による高級アルコールの合成への影響が考慮されるが、イソアミルアルコール量には変化がみられなかった。

2. メチルアミン耐性突然変異株の醸造特性

GAPI 遺伝子は、アンモニア存在下では抑制されることから、窒素源をプロリンとした YNB 培地にアンモニアのアナログであるメチルアミンを添加した場合、*GAPI* 遺伝子の発現の差によって生育に相違がみられることが予測された。pGAP 1/K 701 と K 701 とのプロリンを窒素源とした培地におけるメチルアミン耐性の相違を Table 3 に示した。メチルアミン 50 mM の濃度で K 701 の生育は阻害を受けたが、pGAP 1/K 701 には影響がなかった。一方、窒素源が豊富な YPD 培地においてはメチルアミンを 100 mM 添加した培地でも K 701 は生育阻害を受けなかった。これらの結果は、プロリンを窒素源とした場合、メチルアミンの存在下では GAP が抑制を受けて生育が阻

Table 3 Differences in methylamine resistance

Strain	Viable cells number			
	Methylamine concentration (mM)			
	0	50	100	200
pGAP 1/K 701	1.3×10^2	1.1×10^2	23	--
K 701	1.5×10^2	7	--	--

害されるが、*GAPI* 遺伝子を構成的に発現させることでプロリンが取り込まれて資化され、生育可能になることを示している。したがって、これを指標にすれば酒造現場で利用可能なアミノ酸透過性の変化した突然変異株を取得可能と考えた。そこで、EMS 処理を行った酵母からメチルアミン 100 mM を含む選択培地に生育可能な株を取得した後、液体培地に植菌し、30°C、3 日間静地培養して生育良好な株を選択した。更に麴エキス培地 (Brix 15) で 13 日間培養して、親株と同等の生育を示し、アルコール生成量の良好な 14 株を選抜した。選択した 14 株を総米 100 g の小仕込み試験に供した結果を Table 4 に示した。製成酒は、ほとんどの変異株において pGAP 1/K 701 による仕込みと類似した傾向が見られた。すなわち、酢酸イソアミル含量は 1 株を除き K 701 と同等以上であり、2 倍以上のものもみられた。一方、有機酸組成ではリンゴ酸含量は 3 株を除き K 701 より高い値を示し、酢酸濃度は低く、半分以下の濃度のものみみられた。パネラー 5 名による官能試験 (K 701 に比べて良い○、同等△、劣る×) の結果、酢酸イソアミル含量の高い E 136、E 208 の評価が高かった (Table 4)。このうち、酸組成に個性が感じられ、香りの華やかさがあることで最も評価の高かった E 136 について総米 1 kg の仕込みを実施した。

3. 変異株 E136 の醸造特性とアミノ酸透過性の変化

E 136 を用いて得られる製成酒の分析結果を Table 5 に示した。醸酵経過は K 701 に比べてほとんど変わらなかった。E 136 による製成酒の有機酸組成は、100g の仕込みと同様リンゴ酸濃度が約 1.4 倍高く、酢酸濃度が低くなり再現性がみられた。香気成分でも酢酸イソアミル濃度の増大がみられた。また、E 136 と K 701 のアミノ酸透過性の差を 1 kg 仕込み時のもろみ中で測定するため、留後 12 日目のもろみから酵

Table 4 Analysis of sake fermented with methylamine resistant mutants

Strain	Alcohol (%)	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)	Acetate (mg/l)	Malate (mg/l)	Isoamyl acetate (mg/l)	Isoamyl alcohol (mg/l)
K 701	16.1	3.5	2.9	141	824	3.1	155.4
E 005	15.8	3.7	2.7	131	846	4.3	167.3
E 031	15.1	3.3	3.0	112	798	5.2	166.0
E 061	15.6	3.7	2.5	64	1141	4.4	145.9
E 074	14.9	3.8	2.5	149	1394	3.3	207.3
E 103	13.8	3.2	2.3	30	967	4.7	167.9
E 117	14.5	3.8	2.5	69	1179	5.8	162.3
E 136	15.2	3.3	2.9	35	1120	7.7	172.5
E 139	16.3	3.3	2.8	69	1269	3.3	143.4
E 140	15.5	3.6	2.8	159	809	2.0	139.5
E 144	17.1	3.5	2.7	135	909	3.1	149.2
E 156	14.4	3.0	2.8	20	1021	3.3	159.1
E 162	15.2	3.2	2.9	48	944	5.7	152.3
E 183	15.5	3.3	2.9	41	808	3.9	148.8
E 208	15.7	3.3	3.0	70	998	7.5	179.4

母を分離し、菌体内のアミノ酸濃度を測定した。E 136 は明らかに菌体内のアミノ酸濃度が高い (Table 5) ことから、メチルアミン耐性を指標としてアミノ酸透過性の増大した変異株が取得可能であり、GAP1 遺伝子を構成的に発現させた場合 (pGAP 1/K 701) と同様に酢酸イソアミルの香りが華やかで酸の個性が感じられる酒質を得ることができた。田中ら¹²⁾ は、カルバミド低生産酵母を取得するため、メチルアミン耐性を指標にウレアミドリアーゼのアンモニア脱抑制株を取得している。このとき得られている酵母による製成酒特性も、カルバミドが減少するとともに、リンゴ酸、酢酸イソアミル濃度が高く、E/A 比が高いと報告されている。この場合もイソアミルアルコール生成量は親株とほとんど変わっていない。ウレアミドリアーゼも nitrogen regulation を受けており、調節の変化に伴い得られる共通の性質かもしれない。

酢酸イソアミルは、イソアミルアルコールとアセチル Co-A を基質としてアルコールアシルトランスフェラーゼによって生成される¹³⁾。酢酸イソアミルを高生産させるため、基質であるイソアミルアルコール量を増加させる方法が報告されている。Ashida ら¹⁴⁾ はロイシンアナログ耐性株により、秋田ら¹⁵⁾ は、カナ

Table 5 Analysis of sake fermented with mutant E 136

Strain	K 701	E 136
Alcohol (%)	19.8	19.9
Sake meter	-4.5	-7.0
Acidity (ml)	2.7	2.8
Amino acidity (ml)	2.2	2.3
Lactate (mg/l)	510.3	529.3
Acetate (mg/l)	30.0	10.1
Malate (mg/l)	685.2	931.2
Citrate (mg/l)	87.3	104.0
Succinate (mg/l)	538.9	585.7
Ethyl acetate (mg/l)	88.6	99.8
Isoamyl acetate (mg/l)	6.4	10.2
Isoamyl alcohol (mg/l)	196.9	194.9
Ethyl caproate (mg/l)	1.5	1.5
Intracellular amino acid concentration (μ mol/108 cells)	8.2	11.3

Intracellular amino acids analyzed with yeast cells isolated from sake fermentation on day 12.

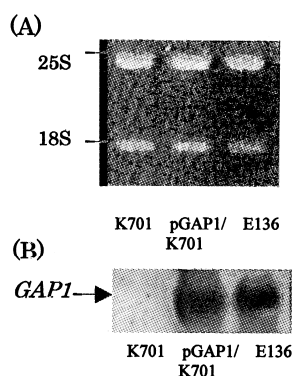


Fig. 2 Expression of the *GAPI* gene in a mutant strain.

(A) Electrophoresis of total RNA, (B) Northern blotting using DNA fragment carrying the *GAPI* gene.

Cells were grown in YPD medium and total RNA 20 μ g was used for each lane.

バニン耐性株を用いた糖化後醸酵法において取り込み順位下位のロイシンの取り込みを増すことにより、それぞれイソアミルアルコールの増加を報告している。本研究での GAP 活性の増大に伴う酢酸イソアミルの増加はこれらとは異なる理由によると考えられ、アルコールアシルトランスフェラーゼ活性の変化についても検討するべきと思われる。一方、酢酸はアセチル Co-A の基質となることから、もろみ中でのアセチル Co-A シンターゼ活性の増大が醸成酒中の酢酸を減少させる^{16,17)}と報告されており、GAP 変異酵母のアセチル Co-A 生成量についても興味深いところである。また、リンゴ酸濃度の上昇についても、生成に主要な酵素であるリンゴ酸デヒドロゲナーゼへの影響を含めた検討が必要である。

4. 変異株 E136 の *GAPI* 遺伝子転写の変化

E136 はもろみ中でも菌体内アミノ酸濃度が増大しており、アミノ酸透過性が増大しているものと思われた。しかし、*GAPI* 遺伝子は転写レベルで窒素源による調節を受けているとともに、翻訳後もリン酸化による修飾を受けており、アンモニアやグルタミン酸などの窒素源存在下では脱リン酸化を受けて不活性型となることが報告されている¹⁸⁾。強力なプロモーターである *ADHI* 遺伝子プロモーターによって発現させた pGAP 1/K 701 でも菌体内のアミノ酸濃度の上昇が総

量で 2 倍程度にとどまったのは、そのためと思われる。取得した E 136 の *GAPI* 遺伝子が転写レベルでの変化を伴っているのかを調べるためノーザンブロットィングにより解析を行った (Fig. 2)。窒素源豊富な YPD 培地で培養した場合、K 701 にみられるように *GAPI* 遺伝子の転写は抑制されているが、pGAP 1/K 701 および E 136 では顕著に上昇していることが判明した。*GAPI* 遺伝子の発現は nitrogen regulation に関与する転写活性化因子 Gln 3 p, Nil 1 p によって制御されており¹⁹⁾、変異遺伝子については更なる解析が必要である。

要 約

1. 清酒酵母のアミノ酸取り込みの増大と酒質との関係を明らかにするため、基質特異性が低く nitrogen regulation に重要な役割を果たしているアミノ酸透過酵素 (GAP) に着目して調節の変化が清酒醸造に与える影響を検討した。*GAPI* 遺伝子をアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*ADHI*) プロモーターで発現させた清酒酵母 (pGAP 1/K 701) は、実際のもろみ中でもアミノ酸の透過性は増大しており、醸酵経過への顕著な影響はみられなかった。菌体内アミノ酸濃度はもろみ初期から末期まで高く、アミノ酸組成別ではプロリンを除きすべての濃度が同等あるいは上昇していた。得られた醸成酒は協会 701 号酵母 (K 701) に比べて酢酸イソアミル濃度が高く、リンゴ酸量が多く酢酸濃度が低いものであり、香りの華やかさが特徴的な酒質となった。
2. アンモニアの存在下で *GAPI* 遺伝子は抑制されることから、アンモニアのアナログであるメチルアミンを含み、プロリンを窒素源とした培地上で、K 701 と pGAP 1/K 701 の生育に差異がみられた。この耐性を指標にして、K 701 を親株とし、突然変異株を選抜した。生育良好な 14 変異株を用いて総米 100 g の試験醸造を行ったところ、醸成酒の構成成分は pGAP 1/K 701 と同様の傾向が見られた。変異株のうち酢酸イソアミル含量が高く、官能評価の結果が最も高い E 136 について総米 1 kg の仕込みを繰り返した結果、構成成分及び酒質の再現性が得られ、もろみ中での菌体内アミノ酸濃度を測定したところ、明らかに K 701 に比べて上昇していた。ノーザンブロットィングによる解析から、窒素源豊富な条件下でも E 136 の

GAP1 遺伝子の転写量は K 701 に比べて増大していた。従って、プロリンを窒素源としてメチルアミン耐性を指標とした選抜により、GAP によるアミノ酸取り込み能の増大した清酒酵母の育種が可能であることが明らかとなった。

謝 辞

本報告の作成にあたりまして、貴重なご意見をいただきました秋田県立大学生物資源科学部、中沢伸重助教授に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) B. MAGASANIK : The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, vol. 2, 283-317, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1992)
- 2) B. MAGASANIK, C. A. KAISER : *Gene*, **290**, 1-18 (2002)
- 3) 秋田 修, 蓮尾徹夫, 大場俊輝, 宮野信之 : 発酵工学, **65**, 19-26 (1987)
- 4) 北本勝ひこ, 高橋康次郎, 戸塚 昭, 吉沢淑 : 発酵工学, **63**, 289-295 (1985)
- 5) 小杉昭彦, 小泉幸道, 柳田藤治, 鶴高重三 : 醸協, **94**, 141-149 (1999)
- 6) 大島泰治 編著 : 酵母分子遺伝学実験法, 学会出版センター, 東京, (1996)
- 7) J-C. JAUNIAUX, M. GRENSON : *Eur. J. Biochem.*, **190**, 39-44 (1990)
- 8) 難波康之祐, 小幡孝之, 萱島 進, 山崎与四良, 村上光彦, 下田高久 : 醸協, **73**, 295-300 (1978)
- 9) 注解編集委員会編 : 第 4 回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会, (1993)
- 10) M. E. SCHMITT, T. A. BROWN, B. L. TRUMPOW : *Nucleic. Acids. Res.*, **18**, 3091-3092 (1990)
- 11) 布川弥太郎 : 醸協, **76**, 705-708 (1981)
- 12) 田中準浩, 永井英雄, 中沢英五郎, 三島秀夫, 竹村成三 : 醸協, **84**, 413-417 (1989)
- 13) K. YOSHIOKA, N. HASHIMOTO : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2183-2190 (1981)
- 14) 秋田 修, 蓮尾徹夫, 原 昌道, 吉沢 淑 : 発酵工学, **67**, 7-14 (1989)
- 15) S. ASHIDA, E. ICHIKAWA, K. SUGINAMI, S. IMAYASU : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2061-2065 (1987)
- 16) 後藤 (山本) 奈美, 劉 宏芳, 石川雄章, 岡崎直人 : 醸協, **95**, 533-539 (2000)
- 17) S. AKAMATSU, H. KAMIYA, N. YAMASHITA, T. MOTOYOSHI, N-G. YAMAMOTO, T. ISHIKAWA, N. OKAZAKI, A. NISHIMURA : *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 555-560 (2000)
- 18) M. STANBROUGH, B. MAGASANIK : *J. Bacterol.*, **177**, 94-102 (1995)