

フェルラ酸脱炭酸能を有する新規な焼酎用酵母に関する研究

照屋 亮、比嘉 賢一、渡嘉敷 唯章¹、池端 真美¹、花城 薫¹

古酒の特徴的な香り成分の一つにバニリンが挙げられている。バニリンは原料米中のフェルラ酸が、黒麹菌のフェルラ酸エステラーゼによって遊離し、蒸留工程でその一部分が4-ビニルグアヤコール（以下4-VG）に脱炭酸されて泡盛中に留出し、熟成の過程を経てバニリンに変化すると考えられている。しかし、もろみ中の遊離フェルラ酸が蒸留工程において4-VGに変化し、泡盛中に留出する歩合は全体の1割程度である。本研究では、泡盛もろみのように酸度の高い環境で速やかに発酵を行いつつ、アルコール生産能が高く、フェルラ酸脱炭酸能を有する酵母の選抜を行った。また選抜した酵母について、遺伝子工学的手法で種の同定及び系統解析を行った。

1 はじめに

近年の研究において小関らは¹⁾、古酒の特徴的な香り成分であるバニリンの生成メカニズムを提唱した。バニリンは、原料のタイ米に含まれるフェルラ酸が黒麹菌のフェルラ酸エステラーゼによって遊離し、蒸留工程でその一部分が4-VGに脱炭酸されて泡盛中に留出し、熟成の工程を経て生成するものと考えられている（図1）。また、既報では²⁾もろみ中の遊離フェルラ酸が蒸留工程において4-VGに変化し、泡盛中に留出する歩合は、全体の1割程度であることを明らかにした。このことから、バニリン濃度の高い特徴のある古酒を製造するためには、もろみ中に含まれる遊離フェルラ酸を効率良く4-VGに変化させながら発酵を行う必要がある。

現在、酒類醸造に使用されている酵母の中で、ワイン酵母やビール酵母の中にはフェルラ酸脱炭酸能を有する株が存在することが知られている³⁾。これらの酵母は泡盛もろみのような酸度の高い環境下での生育は困難である。また泡盛に用いられている101号酵母や他の焼酎用酵母では、フェルラ酸脱炭酸能が欠けている⁴⁾。本研究では、泡盛もろみのように酸度の高い環境で速やかに発酵を行いつつ、アルコール生産能が高く、フェルラ酸脱炭酸能を有する酵母を開発することによって、バニリンの前駆物質である4-VGを、より多く泡盛中に蓄積させることを目的とする。

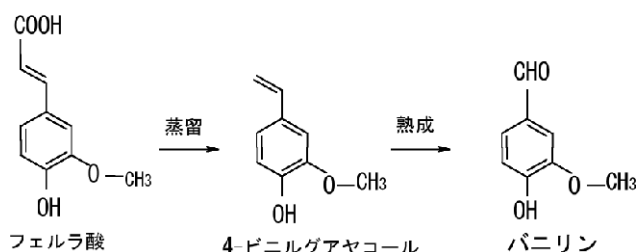


図1 推定される原料由来香り成分の生成メカニズム

2 実験方法

2-1 供試酵母

当センター保有の酵母約120株¹⁵⁾の中で、アルコールを著量生産する16株について試験を行った。

2-2 発酵試験

2-2-1 小仕込試験

小仕込試験は県内酒造所で製麹された麹を用いた。発酵試験は、麹仕込量120g、汲み水歩合170%、発酵温度25℃、発酵期間14日間の条件で行った。

2-2-2 2kg仕込試験

県内酒造所製麹を用い、2kg仕込試験を行った。麹仕込量は原料換算で2kg、汲み水歩合160%、発酵期間14日間、発酵温度25℃で発酵試験を行った。発酵後の熟成もろみは簡易小型蒸留機を用いて蒸留した。蒸留条件は初留後約2時間半かけて行い、後留画分がアルコール度数約10度になるまで蒸留を行った。

1 (株)トロピカルテクノセンター

2-2-3 20 kg仕込試験

20 kg仕込試験には、種麹（ビオック株式会社）を用い、河内式自動製麹機（50 kg型）で製麹した麹を使用した。汲水歩合は170%、発酵温度25℃で14日間発酵試験を行った。酵母の添加法は、種もろみの工程を考慮し、あらかじめ麹汁培地で30℃、2日間培養した酵母をもろみ1 mlあたり 2.0×10^5 cellsの歩合になるように添加した。

また、20 kg仕込試験で得た熟成もろみは、実験室用常圧型単式蒸留装置（60 L容量、フジワラテクノアート社製）を用いて常圧蒸留を行った。蒸留条件は、初めの留出まで30分かけて間接加熱を行い、後留画分がアルコール度数15度になるまで蒸留を行った。

2-3 もろみ及び泡盛の分析法

もろみ中の生菌数には、 $10^2 \sim 10^6$ 倍に希釈したもろみ0.1 mlをYPD平板培地に塗布し、30℃で24~48時間培養して、形成したコロニーをカウントした。

もろみは3000 rpmで15分間遠心分離後、上清画分のアルコール度数、pH、日本酒度¹³及び全糖量¹⁴を測定した。グルコース濃度は、グルコーステストCII Wako（和光純薬）を用いて測定した。泡盛についてはTBA価、紫外部吸収、酸度¹³を測定した。有機酸類は44%に調整した泡盛を0.45 μmのメンブレンフィルターで濾過し、ダイオネクス社製イオンクロマトグラフィーDX-120を使用し、使用カラムIon Pack ICE-AS1、溶離液2mmol/Lオクタンスルホン酸、流速0.5ml/minの条件で測定した。

もろみ中及び蒸留酒中のバニリン、バニリン酸、4-VG及びフェルラ酸の測定は、もろみ10 mlを3000 rpmで遠心分離し、得られた上清を0.45 μmのメンブレンフィルターで濾過後、小関らの方法¹)に従い高速液体クロマトグラフィーで測定した。

HPLC測定条件

システム：島津 LC-10A

検出器：SPD-M10A_{vp}（島津社製）

カラム：Wakosil-II 5C18（4.6×250 mm）

移動相：A液 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.0）

B液 メタノール

B液 10%→60%（45分）リニアグラジエント

検出波長：フェルラ酸（320nm）、バニリン酸及び4-VG（258nm）、バニリン（280nm）、

2-4 糖類発酵性試験

酵母エキス0.5%、ポリペプトン0.5%からなる培地に、BTBを少量添加し、発酵管を入れた試験管に2 mlずつ

分注して、121℃、10分間滅菌後、更に6%に調整した糖溶液を1 ml添加して105℃で15分間滅菌した。これにYPD培地で一晚培養した酵母培養液の10倍希釈懸濁液30 μlを添加し、30℃で30日間培養して炭酸ガスの有無を確認した。

2-5 DNA塩基配列解析

2-5-1 ゲノムDNAの調製

酵母をYPD培地で培養し、対数増殖後期の菌体を集菌後、細胞壁溶解酵素Lyticaseを用い酵母の細胞壁を溶解した。得られたスフェロプラストについてDNeasy kit（QIAGEN社）を用いて抽出し、精製DNAとした。

2-5-2 リボゾームRNA遺伝子の塩基配列解析

精製DNAを鋳型に、25SrDNA(D1/D2)、ITS1及びITS2領域をそれぞれ表1のプライマーを用いてPCRにより増幅した⁵⁾。得られたPCR産物はMICROCON Centrifugal Filter Devices（QIAGEN社）を用いて過剰なプライマーを除去し、精製PCR産物とした。得られた精製PCR産物を鋳型とし、前述のプライマーを使用して、ABI PRISM Cycle Sequencing kit（Applied BioSystem社）を使用したサイクルシーケンシング法によりシーケンス反応を行った。シーケンス反応物はDye-Ex Spin kit（Applied Biosystem社）を用いて過剰なダイターミネーターを除去した。精製したシーケンス反応物について、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer（Applied BioSystem社）を用いて電気泳動を行い、得られたクロマトグラムについて、SDC社ソフトウェアGENET-IXを用い塩基配列を決定した。

表1 使用したプライマーの塩基配列

primer name	25Sr (D1/D2) region	primer name	ITS region
LR0R	5'-ACCCGCTGAACCTAAGG-3'	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
LR3	5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3'	ITS2	5'-GCTCGTTCCTCATCGATGC-3'
		ITS3	5'-GCATCGATGAAGAAGCAGC-3'
		ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

2-5-3 種レベルの同定及び株間の系統解析

決定した塩基配列の相同性検索は、BLASTプログラム（日本DNAデータバンク）⁶⁾、RDP-II（Ribosomal Database Project-II）⁷⁾で行い、種の同定を行った。また、株間の判別及び系統解析での塩基配列の多重アライメント、系統樹作成は、CRUSTAL Wを用いて解析した⁸⁾。

3 実験結果及び考察

3-1 発酵試験

3-1-1 小仕込試験

小仕込発酵試験における熟成もろみの分析結果を表2に示した。アルコール及び4-VGを高濃度生産した株は

7146及び7150株であり、101号酵母と同程度にアルコールを生産し、4-VGを101号酵母の約10倍蓄積した。この結果から、アルコールを高濃度生産し、4-VGをもろみ中に高濃度蓄積する酵母として、7146株と7150株を選抜した。

表2 小仕込発酵試験による優良菌株の選抜結果

No	由来	発酵減量 (g)	アルコール濃度 (%)	4-VG量 (μg/ml)	pH	酸度	還元糖量 (mg/ml)	香り
泡盛10号		43.4	17.5	1.3	3.95	9.9	0.13	+
7021	泡盛もろみ6 (南部)	44.9	17.5	1.3	3.94	10.8	0.12	+
7150	東南アジア酒類3	44.4	18.0	12.9	3.99	9.5	0.16	+
7024		43.8	17.9	1.4	3.91	10.6	0.21	+
7053	東南アジア発酵食品3	43.5	17.3	8.7	3.92	11.0	0.64	
7065	東南アジア酒類1	43.3	17.5	13.5	4.01	9.6	0.28	
7146	東南アジア酒類2	43.1	18.3	13.5	3.99	9.8	0.32	
7110	泡盛もろみ1 2 (与那国)	42.7	17.4	1.5	3.92	10.8	0.23	
7082	泡盛もろみ8 (八重山)	42.5	18.6	1.6	3.91	10.9	0.17	+
7025	メキシコ酒類	41.9	17.2	8.8	3.94	10.7	1.03	
7098	泡盛もろみ1 0 (八重山)	41.1	18.5	2.1	3.93	10.5	0.28	
7052	東南アジア発酵食品2	40.5	17.1	7.3	3.94	10.8	1.35	
7057	東南アジア発酵食品2	31.8	13.1	7.0	4.09	9.7	5.32	
7125	泡盛もろみ1 4 (八重山)	27.6	11.4	5.4	4.05	9.9	6.60	-
7092	泡盛もろみ9 (八重山)	25.7	10.8	8.3	4.00	10.6	6.59	
7054		22.5	9.7	7.1	4.00	10.6	7.78	-
7055	東南アジア発酵食品2	22.0	7.3	3.8	3.91	14.3	8.54	-

+は芳香、-は異臭を示す。

3-1-2 2kg仕込での発酵試験

もろみ中における酵母数の推移では、7146、7150とも発酵初期の増殖速度が高く、101号酵母と同程度に増殖した。泡盛酵母には、泡盛もろみのような酸度の高い環境下でも速やかに増殖する耐酸性が求められる。この試験の結果から、7150および7146株は、泡盛もろみ中で速やかに増殖し、耐酸性があるということが確認された(図2)。

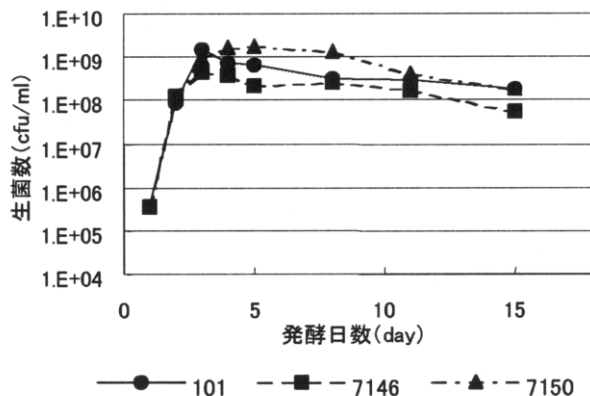


図2 2kg仕込での発酵試験における生菌数の経時変化

アルコール濃度は、7146及び7150株とも発酵初期の立ち上がりは101号酵母と同程度であり、発酵日数15日目におけるアルコール濃度もそれぞれ19%以上に達した(図3)。

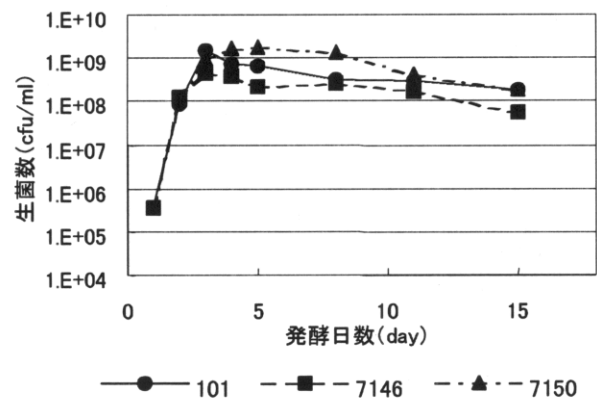


図3 2kg仕込での発酵試験におけるアルコール濃度の経時変化

7146株と7150株のもろみ中における4-VG量は、発酵が進むにつれて蓄積し、最終的に10 mg/Lを越えた。これに対し、101号酵母ではこのような変化は認められず、最終4-VG産生量は2 mg/Lに留まった(図4)。7146株と7150株のもろみ中におけるフェルラ酸量は、発酵の経過に伴い減少した。特に酵母の対数増殖期から定常期に入った5日目以降の減少は著しかった(図5)。これに対して101号酵母では、発酵の経過と共にもろみ中のフェルラ酸が減少しないことから、7146株と7150株がフェルラ酸脱炭酸酵素を有し、101号酵母と比較してもろみ中の4-VG産生が高いということが判明した。

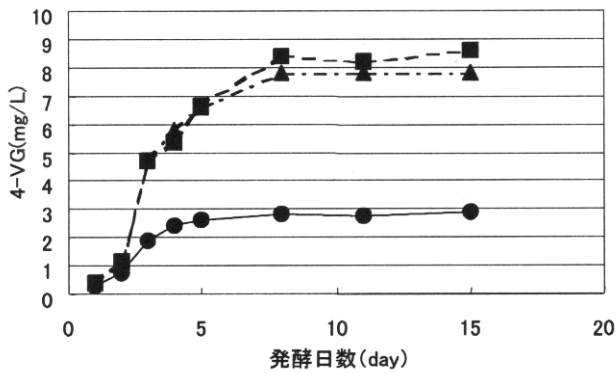


図4 2 kg仕込での発酵試験における4-VG量の経時変化

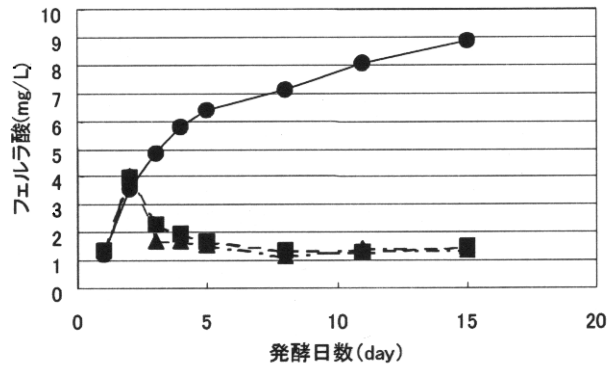


図5 2 kg仕込での発酵試験におけるフェルラ酸量の経時変化

熟成もろみについて、日本酒度、アルコール濃度、全糖量、グルコース濃度及びpHにおける測定値は101号酵母とほぼ同じ値を示した(表3)。

表3 熟成もろみの分析結果

	pH	酸度	日本酒度	グルコース濃度(%)	全糖濃度(%)	アルコール濃度(%)
101	3.67	14.2	15	0.04	0.66	19.30
7146	3.74	13.9	15	0.07	0.41	19.40
7150	3.75	13.4	15	0.04	0.28	19.66

表4 試醸泡盛の分析結果

	TBA価	紫外部吸収	製品酸度	pH	4-VG(ppm)
101	0.87	2.51	0.53	4.71	2.905
7146	0.49	1.85	1.92	4.37	7.89
7150	0.54	1.80	1.82	4.54	7.16

また、試醸泡盛の分析結果を表4に示した。紫外部吸収及びTBA価は101号酵母において高い傾向を示した。香気成分に関しては、4-VG以外にフェルラ酸、バニリン、及びバニリン酸について測定したが、検出されなかった。また、4-VG量には明確な差があり、7146株と7150株で試醸した泡盛は、101号酵母の約4倍の4-VG量であった。これまで当センターでは泡盛中の4-VG量を高めるために製麹条件の検討および蒸留条件の検討を行ってきたが、さらにこの7146株と7150株を用いることによって、4-VGをより多く泡盛に蓄積させることが可能となった。また7146株と7150株を用いて蒸留した泡盛では、101号酵母と比較して酸度が高かった。泡盛中の有機酸類を測定した結果、7146株と7150株を用いて製造した泡盛では101号酵母に比べ、特に酢酸が多く含まれていた(表5)。

表5 試醸泡盛の有機酸分析結果 単位 (mg/L)

	クエン酸	乳酸	ギ酸	酢酸
101	0	0	1.43	18.05
7146	0	0.5	2.61	94.98
7150	0	0.96	5.24	86.88

泡盛の酸度が高くなる要因としては、嫌気性生酸菌によるもろみの汚染、蒸留時の飛沫同伴が考えられるが、もろみ中の7146株と7150株は101号酵母と同様に速やかに増殖していることから、嫌気性生酸菌による汚染は考えられない。またクエン酸も検出されないことから、飛沫同伴の可能性も否定された。従って、7146株と7150株は101号酵母と比べ、酢酸産生能の高い酵母であるということが示された。

3-1-3 20 kg仕込での発酵試験

発酵試験をスケールアップさせて、パイロット規模での発酵試験を行った。7146株と7150株は101号酵母と同様にアルコール生産するということが明らかとなった(図6)。また、もろみ中の4-VG量の経時変化についても2 kg仕込での発酵試験と同様に、7146株と7150株において、4-VG量は発酵の経過と共に増加し、最終的に101号酵母の約5倍蓄積された(図7)。

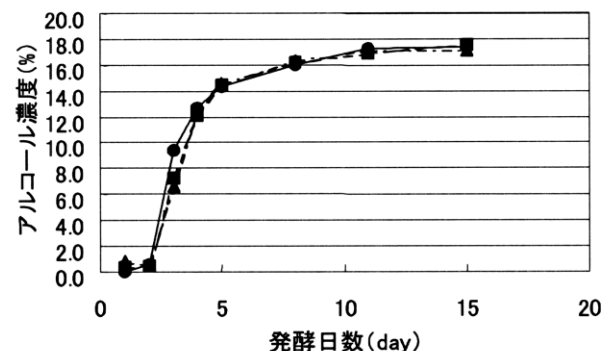


図6 20 kg仕込での発酵試験におけるアルコール濃度の経時変化

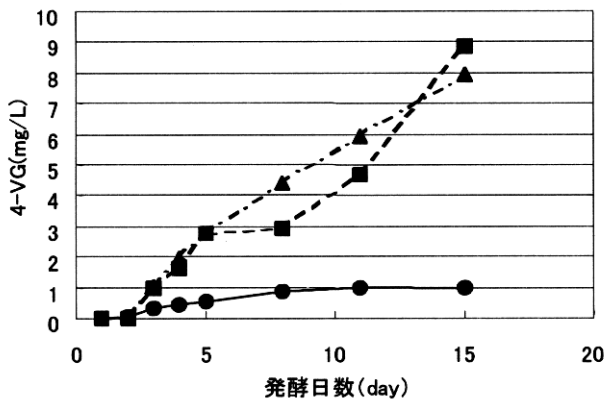


図7 20 kg仕込での発酵試験における4-VG量の経時変化

また、熟成もろみ及び試醸泡盛の各種成分分析においても2 kg仕込での発酵試験と同様となった。熟成もろみの各種成分において、7146株と7150株は101号酵母とほとんど同じ値を示した(表6)。

表6 20 kg仕込での発酵試験における熟成もろみの分析結果

	pH	酸度	日本酒度	グルコース濃度(%)	全糖濃度(%)	アルコール濃度(%)
101	3.63	18.2	7	0.041	0.68	17.34
7146	3.66	17.0	8	0.042	0.29	17.13
7150	3.65	17.1	7	0.046	0.30	17.58

次に、試醸泡盛の分析結果を表7に示した。7150株において、4-VG量は101号酵母の約5倍となり、酸度も101号酵母の約2倍となった。また、7146株における4-VG量は0.29 mg/Lとかなり低い値であった。またデータは示さないが有機酸分析の結果、7146株と7150株で試醸した泡盛には101号酵母と比較して約4倍酢酸が蓄積されていた。

表7 20 kg仕込での発酵試験における試醸泡盛の分析結果

	TBA値	UV	製品酸度	4-VG (ppm)
101	695.6	7.02	0.88	0.98
7146	990.0	8.27	2.04	0.29
7150	719.2	6.84	2.68	5.06

パイロット規模での発酵試験において、7146株と7150株は101号酵母と同様に増殖し、アルコールを生産した。加えて7150株は、4-VGを高濃度蓄積することが明らかになり、少なくとも7150株は実用に耐えうる酵母であることが示唆された。今後は、試醸泡盛を熟成させて官能評価や香気成分分析等、官能面での研究を行い、7146株と

7150株で試醸した泡盛が古酒製造に適した酵母であるかを評価し、製造規模での発酵試験を行う予定である。

3-2 糖類発酵性試験

酵母の生理学的性質を調べるために糖類発酵試験を行った。試験を行った全ての菌株にラフィノースとガラクトースの発酵性が確認された。これに加え、検鏡において両菌株が楕円形であること、乳糖を発酵しないこと、高いアルコール生産性を示すこと等から選抜菌株が*Saccharomyces*に属することが推測された。試験を行った全ての菌株にラフィノースとガラクトースの発酵性が確認された。またα-メチルグルコシドでは、7150株は培養7日目に、7146株は培養20日目に炭酸ガスの発生を認めた。

表8 糖類発酵性試験結果

	7146	7150	101	Wine
Glucose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	-
Melezitose	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-
α-Methyl glucoside	+	+	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-
DL-Arabinose	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-

3-3 塩基配列解析

3-3-1 25SrDNA(D1/D2)領域の塩基配列解析による種の同定

近年の遺伝子工学の発展は、微生物分類学に大きな貢献を果たした。真菌類の酵母では既に*Saccharomyces cerevisiae*の全ゲノムが解読されており⁹⁾、他の酵母類についても様々な遺伝子が解読されている。酵母の12番染色体上に位置するリボゾームDNAを用いた塩基配列解析は、分類学において必須の手法となっており¹⁰⁾、7146株と7150株の分類にも同手法による解析が必要である(図8)。

25SrDNAは、リボゾームDNAのラージサブユニットの部分である。またこの中のD1/D2領域は種レベルで変異が起りやすい領域であり¹¹⁾、酵母に関しては代表種

23種の塩基配列が遺伝子データバンクに登録されている。今回の同定は25SrDNA(D1/D2)領域の塩基配列を解析して行った。

7146及び7150株について25SrDNA(D1/D2)領域の塩基配列585bpは全く同じであった。この配列を日本遺伝子デー

タバンク (DDBJ) でホモロジー解析を行った。結果、相同性が最も高い上位4種は、いずれも*S.cerevisiae*であり、7146株と7150株は*S.cerevisiae*である可能性が高いという結果を得た(表6)。

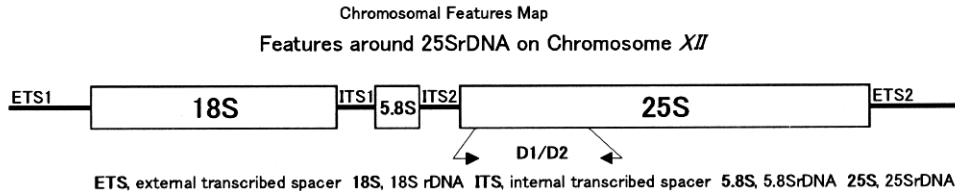


図8 酵母12番染色体上におけるITS及び25SrDNA領域の概略図

表8 25Sr(D1/D2)領域の塩基配列解析による種レベルの同定結果

Short name	Homology(%)	Length	Full name
AA417452	100.0	350	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> cDNA Genomic sequences upstream of lacZ fusion similar to rRNA, mRNA sequence.
YSCRR25AA	98.5	260	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 25S ribosomal RNA sequence.
YSCRR25S	94.1	307	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NRRL Y-12632) 25S ribosomal RNA fragment.
YSCRRM	87.6	355	Yeast (<i>S.cerevisiae</i>)28S large subunit rRNA, 5' end.
SCRN10n2	75.4	179	Yeast (<i>S. carlsbergensis</i>) genes for 5.8S rRNA and 26S rRNA with
YSCRR25AC	68.3	249	<i>Saccharomyces paradoxus</i> 25S ribosomal RNA sequence.
CPSRRNAV3	63.5	452	<i>C.pseudotropicalis</i> gene for large subunit of ribosomal RNA (V3
YSCRR25AH	61.9	244	<i>Saccharomyces bayanus</i> 25S ribosomal RNA sequence.
YSCRR25AB	60.9	243	<i>Saccharomyces pastorianus</i> 25S ribosomal RNA sequence.
YSCRR25BB	58.2	251	<i>Saccharomyces unisporus</i> 25S ribosomal RNA sequence.
CGRRNAV3	56.8	491	<i>C.glabrata</i> gene for large subunit of ribosomal RNA (V3 region).
SCMRRM1	56.8	118	<i>S.mansoni</i> 28S-like ribosomal RNA, 5' end.
YSCRR25AD	51.6	246	<i>Saccharomyces castellii</i> 25S ribosomal RNA sequence.

3-3-2 ITS領域の塩基配列解析による株間の判別及び系統解析

ITS領域は直接タンパク質に翻訳されない領域であり、株間レベルで変異が起こりやすい領域である¹²⁾。本研究において7146株及び7150株のITS領域の塩基配列703bpを決定したところ、両株の塩基配列は同じ配列を示し、株間の違いは認められなかった。

また7146株と7150株の他にビール、ワイン、蒸留酒及

び泡盛酵母9株のITS領域の塩基配列と共に、多重アライメントを作成し、系統解析を行った(図11)。系統解析においては、清酒、泡盛及び蒸留酒酵母のグループとワイン及びビール酵母のグループに大別された。また泡盛酵母の一つである酒造協同組合5-15株は、どのグループにも属さなかった。この中で7146株と7150株は泡盛酵母や清酒酵母のグループよりも、ビールやワイン酵母のグループに近いということが明らかとなった。

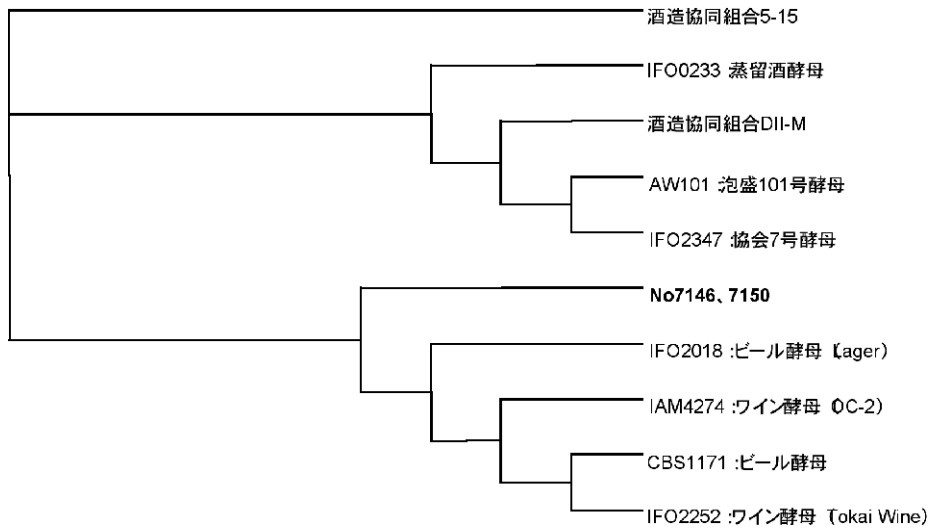


図11 ITS領域の塩基配列による系統解析

4 まとめ

古酒製造に適した新規醸造用酵母を開発し、以下の知見を得た。

- 1) 当センターに保存されている約120種の酵母から、アルコールを著量生産し、さらにフェルラ酸脱炭酸能を有する酵母、7146株と7150株を選抜した。
- 2) 2 kg仕込での発酵試験において、7146、7150株は101号酵母と同様に速やかに増殖し、アルコールを著量生産し、かつもろみ中のフェルラ酸を効率よく4-VGに変換していた。
- 3) 7146株と7150株の25SrDNA(D1/D2)領域の塩基配列を解析して種の同定を行ったところ、両株は *S.cerevisiae*である可能性が極めて高いという結果を得た。
- 4) 7146株と7150株の他にビール、ワイン、蒸留酒及び泡盛酵母9株における、ITS領域の塩基配列を決定し、系統解析を行った7146株と7150株は泡盛酵母や清酒酵母よりも、ビールやワイン酵母に近いグループに属するということが明らかとなった。

謝辞

本研究において、麴を提供して頂きました(株)忠孝酒造の皆さまに紙面を借りて感謝の意を表します。

本研究は(株)トロピカルテクノセンターと共同研究で行いました。

参考文献

- 1) 小関卓也、伊藤清、伊藤康郎、岩野君夫 醸協 89 p.408-441 (1994)

- 2) 福地香、比嘉賢一 平成12年度沖縄県工業技術センター研究報告 p25-32
- 3) 篠原隆 醸協 96 p182-188 (2001)
- 4) 大森俊郎 特願平8-78151
- 5) Vigalys lab, Duke University
<http://www.biology.duke.edu/fungi/micolab/primers.htm>
- 6) 日本DNAデータバンク (DDBJ)
<http://www.ddbj.nig.ac.jp/intro-j.html>
- 7) RDP-II (Ribosomal Database Project-II)
<http://rdp.cme.msu.edu/html/>
- 8) Thompson JD, Higgins DG, Nucl.Acids.Res. 22, 4673-4680
- 9) Saccharomyces Genome Database
<http://www.yeastgenome.org/>
- 10) 鈴木健一郎、平石明、横田明 微生物の分類・同定実験法 Springer社 p229-248
- 11) Teun Boekhout, Cleus P.Kurtzman, et al National Journal of Systematic Bacteriology, 44. p781-786, (1994).
- 12) Robert Montrocher, Marie-Christine Verner, et al National Journal of Systematic Bacteriology, 48. p295-303, (1998).
- 13) 注解編集委員会編 国税庁所定分析法注解 (1993)
- 14) 福井作蔵 還元糖の定量法 学会出版センター (1978)
- 15) 照屋比呂子、仲地芳子、田村博三 沖縄県工業技術試験場業務報告第13号 p147-164

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。