

濁酒醱中の蛋白質分解酵素에 관한 研究

*洪 淳 佑·河 永 七·**閔 庚 喜

(서울大學校 文理科大學 *植物學科, **海洋生物研究所)

Studies on the proteinase in Takjoo(Korean wine)
mashes during the process of brewing.

*Soon Woo HONG, Yung Chil HAH, and **Kyung Hee MIN

(*Dept. of Botany, **The Institute of Marine Biology, Seoul National University)

ABSTRACT

The mash of Takjoo, Korean flour wine, is fermented through two brewing processes; the primary brewing process to saccharify and the main one to produce ethyl alcohol. The activities of acid proteinase (pH 3), weak acid proteinase (pH 6), and alkaline proteinase (pH 8) on the processes are determined with time by the Folin phenol method as a strength of casein digestion.

Hydrogen ion concentration, the content of total organic acids, crude protein, free amino acids and oligopeptides, which effect the activities of proteinase, are also measured. The results are briefly summarized as follows:

1. In general, the activities of acid proteinase and weak acid proteinase in the mash of primary brewing process are stronger than those in main brewing process.

2. The activities of acid proteinase are remarkably stronger than those of weak acid proteinase in both processes. It reveals that they decrease slowly through the fermentation. Activities of alkaline proteinase are weaker than others.

3. As the raw materials are mixtured, the total amount of organic acids is equivalent to 0.105 mg/ml acetic acid in the mash of primary brewing process and 0.02 mg/ml acetic acid in the main one. They increase gradually with time.

4. Hydrogen ion concentration shows 3.9 in the mash of main brewing process and 3.28 in the primary one. They increase to the maximum in 60—72 hrs., and decrease since 108 hrs.

5. The content of crude protein shows 66.90mg/ml in the mash of main brewing process, while shows 64.29 mg/ml in the mash of primary one. They decrease slowly with time. It seems that a small content of crude protein, as a substrate, converts into amino acids and soluble nitrogen compounds by proteinase.

6. The content of free amino acids and oligopeptides shows 0.36 mg/ml in the mash of primary brewing process and 0.24 mg/ml in the main brewing process. It is evident

that the reason they increase continuously through the fermentation is the effect of proteinase.

7. According to the results, the strong activities of proteinase in primary brewing process has been derived from the decrease of hydrogen ion concentration due to the production of organic acids.

結 論

微生物의 蛋白質分解酵素에 대하여는 Pechmann(1951)과 Crewther *et al.* (1950) 이 최초로 *Aspergillus* 屬에서 입증한 이래로 Fukumoto *et al.* (1958)이 *Bacillus subtilis*에서, Matsushima(1958)는 清酒 米麴중에 存在하는 *Aspergillus* 屬, *Penicillium* 屬, *Rhizopus* 屬 및 不完全菌等の 여러 微生物에서 確認報告한바 있다.

蛋白質分解酵素의 種類 및 生理 生化學的 特性에 關하여도 많은 學者들이 研究 報告하였다. (Crewther 1953, Kageyama 1955, Nunokawa 1962, etc.) 微生物이 生成하는 蛋白質分解酵素에 關하여는 Kageyama (1955)와 Nunokawa (1961)가 清酒의 米麴에서 酸性, 中性, 알카리性 蛋白質分解酵素를 同定한바 있다.

本 酵素의 性質에 關하여는 Kuriyama *et al.* (1956)이 清酒麴中の 酸性 蛋白質分解酵素의 力價가 알카리性 蛋白質分解酵素보다 強함을 報告하였고 Matsushima (1955)는 *Aspergillus oryzae* 가 내는 蛋白質分解酵素의 力價가 pH와 溫度에 크게 영향을 받는다고 하였다.

그런데 韓國產 濁酒는 그 製造過程中 主原料로서 米穀을 小麥粉으로 代置함에 따라 麴中の 蛋白質含量이 보다 많이 含有하게 되었다. 따라서 麴中の 蛋白質을 分解하는 酵素의 追移에 따라 술의 香味와 fusel oil의 生成으로 因한 衛生上 諸問題가 야기되는 것이다. 그러므로 濁酒製造에 있어 蛋白質分解酵素의 소장을 밝히는 것은 대단히 重要한 것이다.

最近에 金(1968)이 누룩 및 濁酒술덧중에서 酸性 및 알카리性 蛋白質分解酵素의 力

價를 Formol 法으로 調査한바 있다. 그러나 Formol 法은 工場에서 測定할수있는 簡易法에 불과하며 또한 濁酒의 酸性度 및 pH의 消長에 따른 蛋白質分解酵素의 力價와의 相互關聯性에 對한 檢討는 하지 못하였다.

本 研究는 이를 止揚하여 그보다 精度가 越等하며 信賴度가 높은 Folin 法을 擇하여 蛋白質分解酵素의 力價의 消長과 아울러 酸度 및 pH의 變化와 相互比較檢討하기 위하여 本 實驗을 試圖하였다.

材料 및 方法

本 研究에서 選定한 材料는 Hong *et al.* (1968)이 使用한것과 同一하였다.

酵素液은 醪 50 ml을 完全히 磨碎하여 三角 flask에 넣고 各各의 McIlvaine 緩衝液을 넣고 酸性(pH 3), 微酸性 (pH 6), 알카리性(pH 8) 蛋白質分解酵素로 나누어 抽出하였다.

蛋白質分解酵素의 力價의 測定은 Anson (1938)法을 참조하여 Kuriyama *et al.*(1956)의 實驗에 準하여 實施하였으며 基質로는 0.5% casein, 緩衝液은 McIlvaine 緩衝液을 使用하여 tyrosine의 消費量으로 表示하였다.

總有機酸含量의 定量은 $\frac{N}{10}$ -NaOH 法에 依하여 醋酸으로서 表示하였다.

pH는 Beckmann pH meter로 測定하였다.

總蛋白質의 定量은 micro-kjeldahl 法에 依하여 定量하였다.

遊離아미노酸은 醪를 遠心分離하여 얻은 上澄液에 trichloroacetic acid를 處理하여 可溶性 蛋白質을 完全 沈澱시킨후 Folin phenol 試藥으로 比色定量하였다.

結果 및 考察

濁酒醪의 醱酵過程中的 蛋白質分解酵素의 力價는 Fig.1, 2에서 볼 수 있는 바와같다.

豫備醱酵過程中的 酸性 蛋白質分解酵素는

Fig. 1에서 보는바와 같이 酸性 蛋白質分解 酵素의 力價가 平均 52.7 $\mu\text{g/ml}$ (tyrosine 平均 消費量)로서 微酸性 蛋白質分解酵素의 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 보다 높았다. 本醱酵過程에서는 酸性 蛋白質分解酵素의 力價는 50.6 $\mu\text{g/ml}$ 로서 微

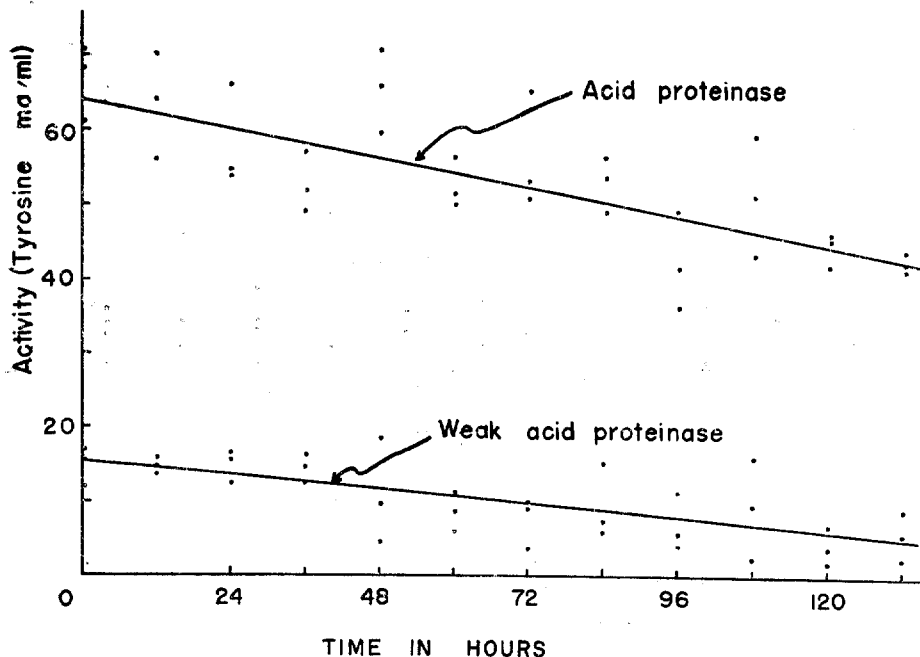


Fig. 1. The changes of the proteinase activities measured by Folin phenol method as a strength of casein digestion, during the primary brewing process. The activities of acid proteinase in pH 3 show to be stronger than the weak acid proteinase in pH 6. Their activities are equivalent to the content of tyrosine consumed.

酸性 蛋白質分解酵素 8.1 mg/ml 보다 5 배나 強하였다. 豫備와 本醱酵過程 모두 알카리 性 蛋白質分解酵素의 力價는 極히 微弱하였다. 以上으로 볼때 濁酒醪中的 蛋白質分解 酵素의 主役은 酸性 蛋白質分解酵素임이 確 實하다.

또한 酸性 및 微酸性 蛋白質分解酵素의 力 價는 모두 本醱酵過程에서 보다 豫備醱酵過 程에서 그 力價가 높음을 觀察할 수 있었다.

濁酒醪의 醱酵가 進行된에 따른 各 蛋白質 分解酵素의 力價의 變化는 다음과 같다. 즉 豫備醱酵中 酸性蛋白質分解酵素의 時間에 따 른 力價의 變化는 回歸直線 $y = -0.61x + 64,322$ 로서 每時間當 0.161 $\mu\text{g/ml}$ 만큼 減少

하며 이때의 相關係數는 $r = -0.816$ 이므로 時間과 力價間에는 統計學的으로 大端히 有 意하였다. 酸性蛋白質分解酵素의 力價는 回 歸直線이 $y = -0.078x + 15,678$ 이었고, 相關 係數가 $r = -0.838$ 으로 大端히 有意하였고 이 역시 每時間當 0.078 $\mu\text{g/ml}$ 로 減少함을 알 수 있었다.

本醱酵過程中的 酸性 蛋白質分解酵素의 力 價는 $y = -0.103x + 57,999$ 回歸直線을 이 루면서 減少하였으며 相關係數 $r = -0.652$ 로 有意하였다. 또한 微酸性 蛋白質分解酵 素의 力價는 相關係數 $r = -0.314$ 로 有意性 이 없었다.

두 醱酵過程中 酸性 蛋白質分解酵素의 力

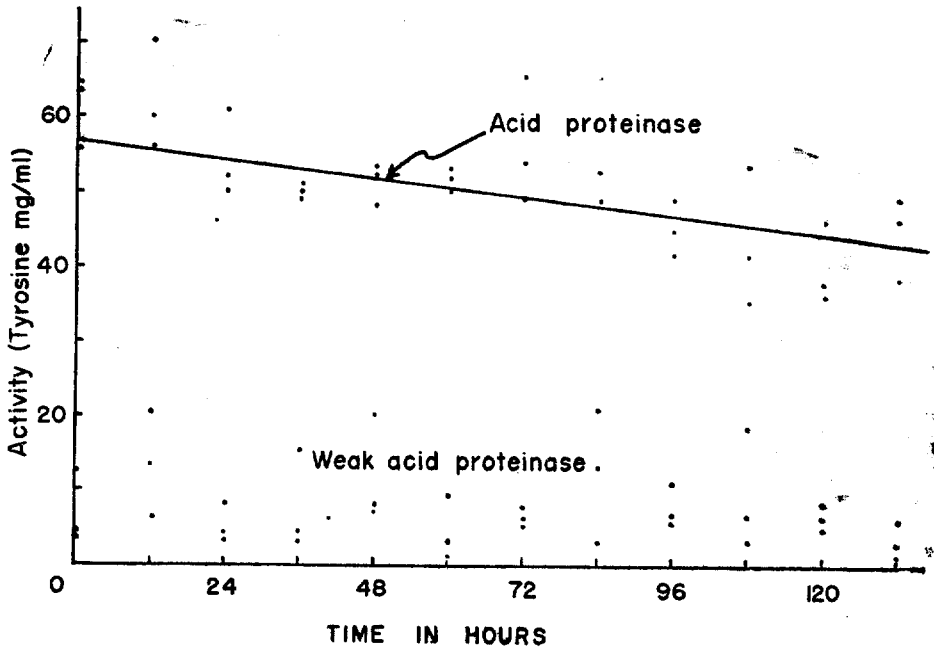


Fig. 2. The changes of the proteinase activities in the fermenting mash of the main brewing process. The activities of acid proteinase (pH 3) show higher value than those of weak acid proteinase (pH 6). Their activities decrease gradually through the long period, as seen in Fig. 1.

Table 1. The relationship between the activities of proteinase and time (aging)

Fermentation	Activities	Correlation coefficient	Regression coefficient	Regression equation
Primary brewing process	Acid proteinase	$r = -0.816^{**}$	-0.161	$y = -0.161x + 64,323$
	Weak acid proteinase	$r = 0.867^{**}$	-0.078	$y = -0.078x + 15,678$
Main brewing process	Acid proteinase	$r = -0.652^*$	-0.103	$y = -0.103x + 57,999$
	Weak acid proteinase	$r = -0.312$	—	—

* Significant at the 5% level.

** Significant at the 1% level.

價가 微酸性 蛋白質分解酵素의 力價보다 越等히 높은것은 醱酵劑에 그 原因이 있지 않나 생각된다.

Matsushima(1958)와 福本壽一郎(1960)은 清酒의 醱酵劑에서 蛋白質分解酵素를 生産하는 微生物을 分離同定한바 있다. 그 內容이 金(1968)과 李(1968)가 濁酒의 醱酵劑에서 分離한 菌株과 大同小異하였다. 따라서 濁酒醪中の 蛋白質分解酵素의 動態가 清酒醪와 비슷한것으로 보아(Kuriyama et al., 1956)

濁酒의 醱酵劑中에 包含된 菌種이 日本清酒의 것과 비슷한 것이 아닌가 한다.

그러므로 濁酒醪中에 多量의 酸性 蛋白質分解酵素를 生産하고 少量의 微酸性 蛋白質分解酵素를, 그리고 極少量의 알카리性 蛋白質分解酵素를 生成한다고 볼 수 있다.

蛋白質分解酵素의 力價의 消長을 考察하던 豫備 및 本醱酵過程에서 時間이 經過함에 따라 減少함을 볼 수 있는것은 醪中の pH나 基質인 蛋白質농도 有機酸醱酵等의 諸要

인에 의해 酵素가 活性을 잃게되거나 酵素가 變性됨으로 그 力價가 低下되는 것이 아닌가 思料된다.

一般으로 豫備醱酵中の 蛋白質分解酵素의 力價가 本醱酵의 것보다 높은 것은 酵素의 生産 및 作用條件으로서 pH, 溫度(Yamamoto et al., 1959) 原料의 水分含量 및 蒸米時間(Katakura et al., 1959)에도 關興하리라 推測되나 本 實驗의 경우에 있어서는 本醱酵보다 豫備醱酵過程에 보다많은 醱酵劑를 첨가함으로서 基因한것이 아닌가 思料된다.

以上과 같이 濁酒醪內的 強力한 酸性蛋白質分解酵素는 그 大部分이 exopeptidase 로 構成되어 있으므로 濁酒醪內에 여러 種類의 아미노酸을 生成할수 있다고 생각된다(Nunokawa, 1962).

總有機酸 :

Akiyama (1959)에 依하면 알콜발효에 있어서 乳酸을 첨가하면 雜菌번식을 억제하는 以外에 蛋白質分解酵素에 影響을 미쳐 約 2 배以上の 아미노酸을 生成케 한다고 하였다. 따라서 有機酸이 醪中の 아미노酸生成에 關係함은 알수있다.

本 實驗에서는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 總有機酸은 豫備醱酵 仕込直後 0.105 mg/ml 이었으며 本醱酵 仕込直後 0.020 mg/ml 으로서 豫備醱酵의 것이 本醱酵의 경우보다 約 5 배나 높았다. 이는 豫備醱酵時에 투입하는 粒麴에 有機酸의 含量이 높기 때문이라 추측된다.

두 醱酵過程中 有機酸은 醱酵가 經過됨에 따라 極히 完만한 增加를 보여 주는데 이것

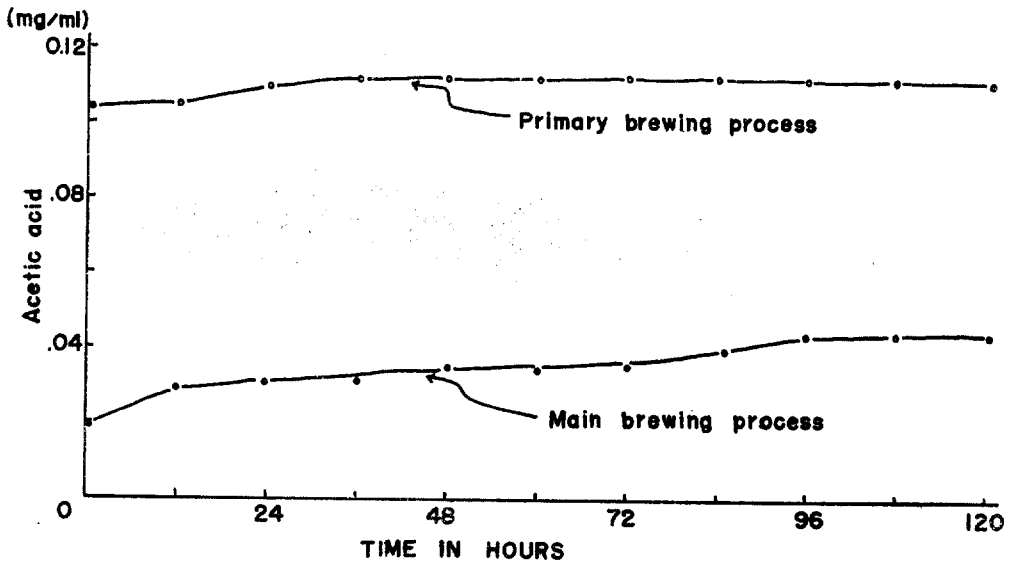


Fig. 3. The changes of the amount of organic acids in the mash of Takjoo. The amount of organic acids in the mash of primary brewing process shows higher than in main brewing process. The both increase gradually through the fermentation. The lines show an average value of A, B, and C breweries respectively.

은 有機酸을 生成하는 微生物醱酵와 酵母의 增殖에 依한 것으로 생각된다(蓼沼誠, 1967, Sasaki, 1957).

有機酸含量과 蛋白質分解酵素의 力價를 考察하면 有機酸含量이 적은 本醱酵過程에서의 蛋白質分解酵素의 力價는 낮았으며 反面

에 有機酸含量이 높은 豫備醱酵에서는 蛋白質分解酵素의 力價도 높았다. 이는 有機酸이 直接으로 蛋白質分解酵素의 生産 및 作用에 關係하거나 間接으로는 pH의 變化를 가져와 이것이 蛋白質分解酵素의 力價에 영향을 준것으로 생각되는데 이는 Akiyama (1959)의 實驗結果와 一致하였다.

水素 이온; 濃度

水素 ion 은 酵素의 作用條件으로서 大端히 重要的 것이다.

Kageyama et al. (1955)은 酸性 蛋白質分解酵素의 最適 pH가 2.8~3.0 이고 알칼리성 蛋白質分解酵素의 그것은 7.0~7.5임을 밝힌 바 있다.

本實驗에서 pH의 變化를 보면 豫備醱酵의 경우 原料 仕込直後는 pH가 3.28 이었다가 계속 增加하여 72 時間에는 pH 3.85 로 되고 96 시간 以後는 時間이 經過할수록 점점 낮아지는 現象을 볼 수 있었고 本醱酵에서는 仕込直後 pH 3.90 에서 時間이 지남에 따

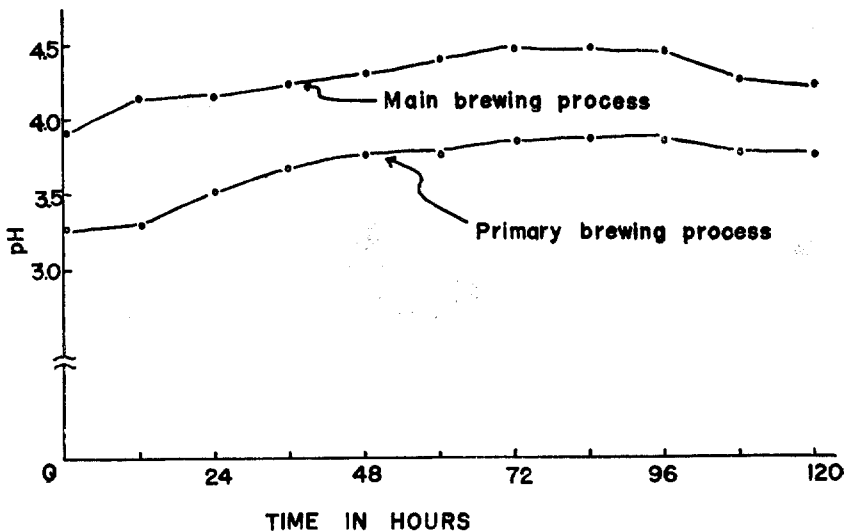


Fig. 4. The changes of hydrogen ion concentration, affecting the activities of enzyme, in the mash of Takjoo. Hydrogen ion concentration increase to the maximum in 60-72 hrs. and then decrease gradually until 120 hrs.

라 높아져서 72--84 時間에는 pH 4.42~4.43 으로 最大를 이루었다가 그 후는 차차 낮아지는 경향이 있다(Fig. 4).

以上の 結果로 볼때 豫備醱酵 過程中の pH는 酸性 蛋白質分解酵素의 最適 pH에 가깝고 本醱酵의 것은 이 酵素의 最適 pH보다 일등히 높다. 그러므로 豫備醱酵의 酸性 蛋白質分解酵素의 力價가 本醱酵의 力價보다 높은 것은 당연한 것이다.

蛋白質含量:

濁酒醪中에 含有된 蛋白質分解酵素의 基

質이 되는 蛋白質의 含量은 豫備醱酵보다 本醱酵에서 높은 數値를 나타내었다. 이는 本醱酵時에 二次的으로 多量의 小麥粉을 仕込한다는 點은 考慮하면 쉽게 首肯이 된다.

蛋白質含量의 消長을 觀察해보면 豫備醱酵 仕込直後는 64.29 mg/ml 이었고 本醱酵 仕込直後는 66.90 mg/ml 이었던 것이 時間이 經過함에 따라 二群 모두 減少함을 볼 수 있었다(Fig. 5).

이것은 蛋白質分解酵素에 依해 아미노酸과 다른 可溶性 窒素化合物로 分解되기 때

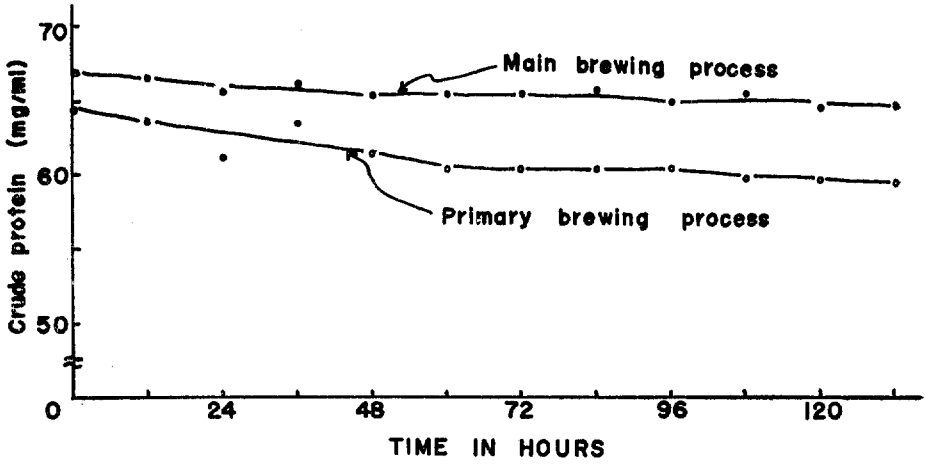


Fig. 5. The content of crude protein in the mash of Takjoo [derived from flour as a raw materials. The [content of crude protein, measured by micro-kjeldahl method, decrease slowly in the both. It seems that a small content of crude protein, as a substrate, converts into amino acids and soluble nitrogen compounds by proteinase.

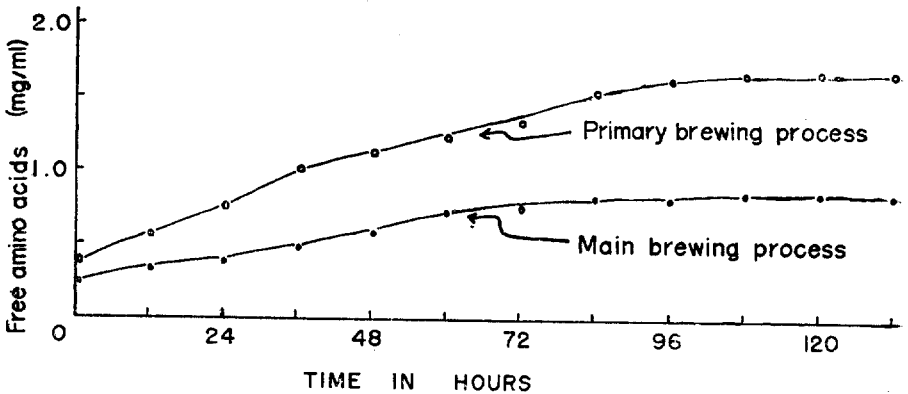


Fig. 6. The changes of the content of free amino acids and oligopeptides measured by Folin phenol reagent. The mash of primary brewing process shows higher content than that of the main brewing process. They increase gradually with brewing time.

문임을 알수 있다.

그러나 混入된 大部分의 蛋白質은 醱酵後 期까지 殘存하는 것으로 보아 醱內의 蛋白質分解酵素로서는 이들 蛋白質을 完全히 加水分解하기에는 不可能한 것으로 생각된다.

遊離 아미노酸 :

醱中에 生成된 遊離 아미노酸의 含量의 消長을 보면 仕込直後 豫備醱酵는 0.36mg/ml, 本醱酵에서는 0.24 mg/ml 이었던 것이 時間이 經過함에 따라 二群모두 계속적으로 增

加하는것을 觀察할수 있었다(Fig. 6). 이것은 蛋白質分解酵素에 의해 生成된 아미노酸이 계속 축적됨으로서 생기는 現象으로 생각된다.

本實驗의 對象인 濁酒醪中에서는 酸性, 微酸性 및 알카리性 蛋白質分解酵素의 順으로 그 力價를 나타낸 結果로 보아 濁酒醪中の 아미노酸 生成은 大部分 酸性 蛋白質分解酵素에 의해, 그리고 少量은 微酸性 蛋白質分解酵素에 의해서 이루어짐을 알 수 있다.

두 醱酵醪中の 遊離 아미노酸 含量을 比較하면 豫備醱酵가 本醱酵에서 보다 많았다. 이것은 豫備醱酵에서는 基質인 蛋白質含量이 本醱酵에서 보다 적지만 酸도가 높고 pH가 낮아서 酸性 蛋白質分解酵素의 作用 最適條件에 가깝기 때문이라 추측된다.

이와같이 蛋白質로부터 生成된 아미노酸은 주로 蛋白質分解酵素의 力價에 關係한다(Kuriyama *et al.*, 1956). 그런데 濁酒醪內的 아미노酸의 消失에 關해서는 아미노酸醱酵 및 他物質로의 轉移에 의해 消費되는 것도 考慮해야 할 것이다.

그 중에서도 fusel oil로의 轉移가 큰 問題點인 것이다.

本實驗에서 보면 豫備醱酵過程에서는 96~108時間에서 부터 아미노酸의 增加率이 減少하고 本醱酵에서는 72~84時間에서부터 그의 增加率이 減少하였다. 이와같은 事實은 形成되는 아미노酸이 有機酸이나 fusel oil 또는 자체의 동화물질등으로 轉移되거나 proteinase activity의 減少를 원인으로 들 수있다. 그러나 알콜발효에서 특히 주목해야 될 사실은 fusel oil의 生成이다. 따라서 알콜발효의 경우 fusel oil의 生成을 최대한도로 억제하는것은 대단히 중요한 문제로서, Fig. 6에서 보여주는 아미노酸 含量變化의 傾向성을 감안할때 本醱酵의 경우 48時間以內에 醱酵를 中止시키는것이 理想的인 方法이라고 생각된다.

아울러 小麥粉을 原料로 하면 아미노酸이 많이 生成되어 高級 alcohol인 fusel oil도 보다 많이 生成되므로 이에 對한 濁酒의 改良도 時急히 解決되어야 할 研究課題인 것이다.

摘 要

韓國產 濁酒醪는 糖化過程을 주로 하는 豫備醱酵過程과 알콜生産을 爲한 本醱酵過程으로 나눈다.

이들 두 醱酵過程에서 酸性(pH 3), 微酸性(pH 6), 알카리성(pH 8) 蛋白質分解酵素의 力價를 時間別로 測定하였다. 또한 이들 酵素의 活性에 關與하는 pH, 總有機酸含量, 基質인 蛋白質含量 및 生成物인 아미노酸의 含量등을 調査하였으며 그 結果는 다음과 같다.

1. 濁酒醪의 두 醱酵過程中 蛋白質分解酵素의 種類로는 酸性蛋白質分解酵素, 微酸性 蛋白質分解酵素, 알카리性 蛋白質分解酵素가 存在하였다.

2. 酸性 및 微酸性 蛋白質分解酵素의 力價는 豫備醱酵의 것이 本醱酵의 것보다 強하였다.

3. 두 醱酵過程中 酸性 및 微酸性 蛋白質分解酵素의 力價는 時間이 經過함에 따라 減少하였다.

4. 豫備醱酵過程中的 總有機酸含量은 仕込直後 0.105 mg/ml로서 本醱酵의 0.02 mg/ml보다 높았으며 이들은 時間이 經過함에 따라 완만하게 增加하였다.

5. 醪中の pH는 蛋白質分解酵素의 力價가 낮은 本醱酵過程이 3.90으로서 豫備醱酵過程 3.28보다 높았으며 이들 모두 60~72時間까지 높아졌다가 108時間以後에서 낮아지기 始作하였다.

6. 基質인 蛋白質含量은 本醱酵가 66.90 mg/ml로서 豫備醱酵 64.29 mg/ml보다 높았으며 이들 모두 時間이 경과함에 따라 減少하였다.

7. 遊離 아미노酸 含量은 蛋白質分解酵素의 力價가 높은 豫備醱酵에서 0.36 mg/ml로 本醱酵過程 0.24 mg/ml보다 많았으며 이들 모두 時間에 따라 增加하였다.

8. 豫備醱酵過程中的蛋白質分解酵素의 力價가 本醱酵의 것보다 높은 것은 醱中에 보다 많은 有機酸이 生成되어 pH가 낮아진데 그 原因이 있는 것으로 思料된다.
9. 本醱酵過程中 48時間以內에 製成하는 것은 아미노酸이 他物質로 보다 적게 轉移되므로 理想的이다.

REFERENCES

1. Akiyama, H., 1959. The formation of amino acids in Kimoto. *J. Agri. Chem. Soc., Japan*, 33, 1.
2. Anson, M. L., 1938. Estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22, 79.
3. Crewther, W.G., and F.G. Lennox, 1950. Preparation of crystals containing proteinase from *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 165, 680.
4. Crewther, W.G. 1953. The effect of pH and cations on the thermal denaturation of trypsin. *Aus. J. Biol. Sci.*, 6, 597.
5. Fukumoto, J., T., Yamamoto, and D. Tsuru, 1957. Studies on bacterial amylase. Report XXI. Formation of bacterial amylase and proteinase. *J. Agri. Chem. Soc., Japan*, 31, 506.
6. Fukumoto, J., T. Yamamoto, and K. Ickawa, 1958. Part VIII. Purification and some properties of a neutral proteinase of *Bacillus subtilis*. *J. Agri. Chem., Japan.*, 32, 230.
7. _____, 1959. Part XII. Purification and some properties of an alkaline properties of *Bacillus subtilis*. *J. Agri. Chem. Soc., Japan*, 33, 6.
8. Hong. S.W., Y.C. Hah, and K. S. Yoon, 1968. On the changes of amylase activity and saccharifying ability in Takjoo mashes during the process of brewing. *Kor. Jour. Microbiol.*, 6, 141.
9. Kageyama, K., 1955. Studies on *Aspergillus oryzae* strains for Sake brewing(VIII). On the proteolytic activities of rice Koji (2). Properties of proteinase in rice Koji. *J. Ferment. Technol.*, 33, 53.
10. Kim, C.J., 1968. Microbiological and enzymological studies on the Takjoo Brewing. *J. Kor. Agri. Chem. Soc.*, 10, 69.
11. Katakura, K. and C. Hatanaka, 1959. Studies on the production of enzymes by rice Koji. *J. Soc. Brew., Japan*, 54, 438.
12. Kuriyama, K., Imayasu, S, and Y. Kuchigauchi, 1956. On the determination of proteolytic activities of rice Koji. *J. Ferment. Technol., Japan*, 34, 473.
13. _____, 1956. The fluctuation of the activities of enzymes in fermenting mash of sake. Studies on enzymes in Sake (I). *J. Ferment. Technol., Japan*, 34, 133.
14. Lee. B.H., 1968. Study on isolation of microorganisms from Korean enzymatic sources and its physiological classification. Report Brew. Lab. National Office. 1, Dec. 39.
15. Matsushima, K., 1954. Proteolytic enzymes of molds. VII. A convenient method of representing proteolytic activity of rice Koji molds by Sorensen's formol titration method. *J. Agri. Chem. Soc., Japan*, 28, 711.
16. _____, 1955. Proteolytic enzymes of molds. VIII. Characteristics of the proteinase of *Aspergillus oryzae*. I. Effects of pH and temperature on the activity and stability of the enzymes. *J. Agri. Chem. Soc., Japan*, 29, 87.
17. _____, 1955. Proteolytic enzymes of molds. IX. Characteristics of the proteinase of *Aspergillus oryzae*. Influence of various inorganic ions and specific sulfhydryl reagents. *J. Agri Chem. Soc., Japan*, 29, 781.
18. _____, 1958. Studies on the proteolytic enzymes of molds. Part XIV. Classification of fungal proteinase systems by means of pH activity curves. *J. Agri. Chem. Soc., Japan*, 32, 215.
19. Nunokawa, Y. 1961. 麹菌プロテアーゼ研究の

- あゆみ.
J. Soc. Brew., Japan, 56,170, 271.
20. Nunokawa, Y., Namba, Y. and S. Watanabe, 1961. A study of the rice Koji proteinase. (Report 5) Pursuit of proteinase systems in the process of Sake brewing. *J. Soc. of Brew., Japan*, 56,930.
 21. Nunokawa, Y. and Kinuyama, 1962. Studies on the constitution of rice Koji proteinase. Part II. The general properties of the acid and alkaline proteinase. *J. Agri. Chem. Soc., Japan*, 36,879.
 22. Nunokawa, Y., 1962. Studies on the constitution of rice Koji proteinase. Part. III. The substrate specificities of the acid and alkaline proteinase. *J. Agri. Chem. Soc., Japan*, 56,884.
 23. Pechmann, E.V., 1951. *Aspergillus* proteinase. Influence of inhibitors of proteolytic enzymes and the decomposition of substituted proteins. *Biochem. Z.*, 321.
 24. Prescott, S.C., and C.G. Dunn, 1959. Industrial microbiology. McGraw-hill book Co., Inc., New York, U.S.A.
 25. Sasaki, Y. and S. Takao, 1958. Studies on the aerobic sugar metabolism of yeast. Part I: On the organic acid producing ability of various strains. *J. Agri. Chem. Soc., Japan*, 32,571.
 26. Shiota, H., Sakurai, Y. and S. Matsusa, 1964. Studies on the production of proteolytic enzymes of the rice Koji (VI). On the effect of the addition of acidic compounds. *J. Soc. Brew., Japan*, 59,443.
 27. Toyama, S., Sugimori, T. and H. Katagiri, 1960. Studies in the formation of *Aspergillus* proteinase. *J. Ferment. Technol., Japan*, 38, 355, 360.
 28. Wallenfels, K., 1950. Determination of proteolytic activity of enzyme preparations. Critical comments on the application of the Anson proteinase test. *Biochem. Z.*, 321,189.
 29. Yamada, M. and T. Furukawa, 1961. On the alcoholic fermentation of L-valine by yeast (IX). *J. Soc. Brew., Japan*, 56,925.
 30. Yamamoto, K., 1959. Koji. IV. Mold proteinase production by replacement culture and inactive form of proteinase in cell free extract. *J. Agri. Chem. Soc., Japan*, 23,110.
 31. 堀口貞次郎, 1966. 薬酒について. *J. Soc. Brew., Japan*, 61,989.
 32. 福本壽一郎, 1960. 酵素資源としての微生物. *J. Ferment. Technol., Japan*, 38,547.
 33. 蓼沼誠, 1967. 有機酸. *J. Soc. Brew., Japan*, 62,841.
 34. 越田孝吉, 六川功一, 杉山公雄, 望月務, 1967. Formol法によるプロテアーゼの測定法. *J. Soc. Brew., Japan*, 62,418.