



Title	沖縄産廃糖蜜のアルコール発酵に伴うアミノ酸よりフェーゼルの生成(農芸化学科)
Author(s)	外間, 宏一; 仲宗根, 洋子; 大城, 清勝; 渡久地, 政武
Citation	琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(22): 225-238
Issue Date	1975-12-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/4334">http://hdl.handle.net/20.500.12000/4334</a>
Rights	

# 沖縄産廃糖蜜のアルコール発酵に伴う アミノ酸よりフーゼルの生成

外間 宏一\* 仲宗根 洋子\* 大城 清勝\* 渡久地 政武\*

---

Koichi HOKAMA, Yoko NAKASONE, Seisho OSHIRO and Masatake TOGUCHI: On the production of the fusel oil from amino acids during the alcoholic fermentation of the final molasses produced in Okinawa

---

## I 緒 言

砂糖をサトウキビから製造する製糖工業において、バガスと共に、重要な副産物に廃糖蜜がある。廃糖蜜を定義すれば、工場技術上、経済収支上、最早砂糖を結晶として、回収することができない糖蜜をいう。

廃糖蜜成分は、サトウキビの品種、製糖方法等の相違により、また地域的条件等により、成分組成において、若干の違いが見られるが、何れも主な成分が糖分であることに変わりはない。それ故、廃糖蜜利用の目的は糖分が主なもので、第1位にアルコール工業（60%）、第2位に飼料工業（20%）で、その他グルタミン酸ソーダ製造、酵母製造等への利用があるように、微生物的利用が中心である。

蛋白質は微生物によって次第に分解され、最後にアミノ酸となる。酵母は糖のアルコール発酵中にアミノ酸を分解し、その窒素をアンモニアとして摂取して自己の繁殖の糧とし、炭素1個原子少い高級アルコールに変化させる。これは Ehrlich によって発見されたフーゼル油生成の原因であって、アミノ酸のアルコール発酵と呼ばれている。我国においても、鈴木は、合成清酒に関する初期の研究において、香気とアミノ酸との関連性を追求し(2)、吉川(10)、友田(6)、吉沢(11)らは、フーゼル油の生成機構及び組成等に関する研究を報告した。

今日では、アルコール工業においては、フーゼルの生成は蒸留技術、機械の進歩改良により、あまり問題とされることはなく、むしろ香気成分の面から注目を集めている。

特に、本報においては、廃糖蜜のアルコール発酵において、廃糖蜜中のアミノ酸を酵母が窒素源として利用した場合、生成するフーゼル油、発酵液中に活性炭及び硫酸を添加した場合の影響及び発酵前後の廃糖蜜中のアミノ酸の定性的変化等について基礎的知見を得たので報告する。

## II 実 験 方 法

### 1. 試 料

1971～72年期の甘蔗廃糖蜜(N:CO 310)を中部製糖株式会社より分譲し、次の実験の試料に供した。

1) 水分、灰分：常法による。

---

\* 琉球大学農学部農芸化学科

琉球大学農学部学術報告 22: 225～238 (1975)

2) 直接還元糖：試料50gを100ml容メスフラスコにとり、25%中性酢酸鉛溶液2~3ml, 蒸留水を加えて、画線までみだし、よく振とうして濾過した。濾液に少量の粉末磷酸水素二ナトリウムを加えてよく混合し、再び濾過した。濾液をビュレットにとり、メチレンブルー法によって、還元糖を定量した。

3) 総糖分：試料50gを蒸留水100mlに溶解し、0.1N硫酸15mlを加え、加熱転化した。水冷後、0.1N水酸化ナトリウムで中和し、活性炭で脱色後、200ml容メスフラスコに定容した。定量法は、メチレンブルー法に準じた。

4) 粗蛋白質：試料1~2gを採取し、キェダール法による。

5) アミノ態窒素：試料5~6gを採取し、100mlに定容して、活性炭で脱色し、濾過した。濾液20mlをホルモル法により定量した。

6) アンモニア態窒素：キェダールフラスコに試料を採取し、蒸留水を加えて約150mlにした後、酸化マグネシウム1gを加え、直ちに装置し、加熱蒸留した。受器には0.1N硫酸20mlを入れ、蒸留終了後、0.1N水酸化ナトリウムで滴定した。

## 2. pH, Bx, 菌体重量の経時的变化

酵母は沖縄オーシャン株式会社より分譲した *Saecharomyces formosensis* (396号) (3) を使用した。保存寒天斜面培地より396号酵母をとり、殺菌蒸留水に懸濁し、一白金耳相当量を、廃糖蜜50gを水道水で希釈して200mlとなした7個の培地のそれぞれに接種の目的で分注し、朝夕2回の振とうを繰返しながら、32°Cで孵卵器中で培養し、8時間毎に、次のとおり測定を行った。

1) pH：東洋濾紙 pH 試験紙を使用した。

2) Bx：試料を5倍に希釈し、完全に溶解した後、気泡を取り去り、携帯用屈折計で測定し、測定値を5倍とした。

3) 菌体重量：3000 rpm の速度で遠沈し、過剰の水分を除くために風乾し、デシケータ中で減圧乾燥してから測定した。

## 3. 廃糖蜜の発酵試験 (8)

200mlの廃糖蜜液 (Bx 15°, 20°, 25°) を常法により殺菌して、396号酵母菌を接種した。発酵管を取りつけ、32°C孵卵器中で静置培養し、4時間毎に、炭酸ガスの減量を秤量し、発酵曲線を作成した。また常法により、酒精計でアルコール量を求め、下記の式により、発酵率を求めた。

$$\text{発酵率} = \frac{\text{発酵液 } 100 \text{ ml 中のアルコール (g)}}{\text{培養液 } 100 \text{ ml 中の糖分 (g)} \times \frac{92.14}{180.16}} \times 100$$

(ブドウ糖として)

## 4. 培養時間とフーゼル生成との関係

Bx 20°の廃糖蜜 200 mlをそれぞれ6個の綿栓した500ml三角フラスコにとり、常法により殺菌して396号酵母を接種し、32°Cで孵卵器中で培養した。培養液を10時間おきにとり、バニリン硫酸法によって、フーゼル油を求めた。

すなわち、各おのの発酵液から、それぞれ、50mlを採取して、水酸化ナトリウムで中和後蒸留し、約30~35mlの留液をとり、蒸留水を加えて50mlに定容した。そのものから、0.1mlを採取し、蒸留水を加えて1mlとし、これにバニリン硫酸液 (バニリン0.5gを濃硫酸100mlに溶解したもの) 2mlを加えて、振とうし、沸騰湯煎器中に3分間浸したのち、取り出して、蒸留水1mlを加えて振とうした。30分間静置した後、分光光度計 (日立139) で、検量線により、520nmの波長で、フーゼル油を比色定量した。

### 5. 活性炭添加効果とフーゼル油生成との関係 (6)

Bx 20°の廃糖蜜 200 ml にあらかじめ、活性炭を添加し、常法により殺菌して、396 酵母を接種したものを、32°C の孵卵器中で、42 時間発酵させ、フーゼル油をバニリン硫酸法により、定量した。

### 6. 硫酸添加効果とフーゼル油生成との関係 (6)

廃糖蜜中に含まれるアンモニアを除去するために、過剰の消石灰を加えてアルカリ性となし、これを湯浴上で加熱した。アンモニアが去った後、硫酸と炭酸カルシウムとで中和した。このようにして調製された培地 200 ml を Bx 20°, pH 4.4 に調整し、硫酸を添加して活性炭と同様な条件下で、発酵させ、フーゼル油をバニリン硫酸法により、定量した。

### 7. 発酵液中のアミノ態窒素の定量

培地の調製、酵母の接種方法、発酵条件は 2 項に準じ、24 時間毎に、試料を採取して、ホルモル法により、アミノ態窒素を定量した。

### 8. 発酵液中のプロテアーゼ活性測定

廃糖蜜 50 g を水道水に希釈して、200 ml にしたものを培地とし、常法により、殺菌したのち、396 号酵母を 1 白金耳接種し、32°C の孵卵器中で、朝夕 2 回振とうしながら 42 時間発酵したのち、発酵液を採取して、菌体及びコロイド様物質を除去し、濾液を粗酵素液とした。

基質として、3% Lactalbumin 溶液 25 ml を三角フラスコに入れ、酢酸ソーダ緩衝液 (pH = 4.4) 5 ml を加え、30°C の恒温槽に浸し、約 10 分後、粗酵素液 10 ml を加え、30°C で反応を開始させた。1 時間後、10% トリクロル酢酸 5 ml を加え、沸騰湯浴中に、5 分間入れ、反応を停止させたのち、ホルモル法により、アミノ態窒素を定量して、酵素活性を測定した。対照として、反応開始前にトリクロル酢酸を加えたのち、加熱処理を行ない、失活させた粗酵素液を用いた。

### 9. Bx の相違によるアミノ態窒素の消費率

廃糖蜜を希釈して、Bx 15°, 20°, 25° の培地それぞれ 200 ml を調製し、2 項に準じて、酵母を接種し、32°C の孵卵器中で、朝夕 2 回振とうしながら、培養発酵させ、発酵前後のアミノ態窒素を定量し、上記それぞれの Bx における発酵前に対する発酵後のアミノ態窒素の消費率を求めた。

### 10. 発酵前におけるアミノ酸の分離、同定 (5, 7)

1) 除蛋白：廃糖蜜 10 g (アミノ態窒素約 19 mg 含有する) に、80% エタノールを加えて、全容を 300 ml にし、マグネチックスターで 10 分間攪拌した。20 分間放置してのち、沈澱したコロイド状物質、主として蛋白質を除去するため、濾過した。濾紙上の残渣は、更に 80% エタノールで洗浄し、濾液と合した。除蛋白された濾液は、次の脱塩操作を行なった。

2) 脱塩：強酸性イオン交換樹脂 Amberlite IR-120, 40 ml を 10% 塩酸で H 型にしたのち、十分水洗し、カラム (12 × 400 mm) へ充てんし、除蛋白された濾液を、毎分 2 ml の速度で通過させると、殆んどすべてのアミノ酸、陽イオンが吸着された。更に 500 ml の蒸留水で洗浄して、有機酸イオン、無機陰イオン、糖類等を除去した。

次に 2 N 水酸化アンモニウム 150 ml で、毎分 2 ml の速度でカラムを流出させると、吸着されていたアミノ酸と陽イオンが溶出した。そして、過剰のアンモニアを除去するために、このようにして得た溶出液を、減圧下で 150 ml 容位まで濃縮した。

次に陽イオンを除く目的で、強塩基性イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400, 40 ml を 1.5 N NaOH で OH 型にしたのち、十分水洗し、カラムへ充てんし、濃縮液を毎分 2 ml の速度で通過させると、濃縮液中の殆んどすべてのアミノ酸は吸着され、無機陽イオンは、吸着されずに溶出した。更に 500 ml の蒸留水で水洗し、無機陽イオンを完全に除いた。吸着されたアミノ酸は 1 N 塩酸 300 ml で溶出し、之をア

ミノ酸分画の試料とした。

3) 芳香族アミノ酸の分画：活性化の目的で、20%酢酸中で、2時間煮沸した活性炭約2gを水洗したのち、約半量のケイソウ土と混合し、カラムへ充てんし、十分水洗した。以上で活性炭カラムができ、次に上記試料溶液を毎分2mlの速度で通過させた。通過速度が遅い場合は吸引した。更に5%酢酸20ml、蒸留水50mlの順で、カラムを洗浄し、芳香族アミノ酸以外の不純物を除去した。

活性炭吸着区分は、フェノール2.5gを含有する20%酢酸100mlで溶出した。溶出液中のフェノールは、エチルエーテルとふって除去した。以上の過程で得られた芳香族アミノ酸を含む溶液は、約0.5mlの容量となるまで、減圧下で濃縮され、ペーパークロマトグラフィーのための試料とした。

4) 塩基性アミノ酸の分画：弱酸性イオン交換樹脂 Amberlite IRC-50を使用することにより、活性炭カラム溶離区分から、塩基性アミノ酸を分画した。

すなわち、Amberlite IRC-50、 $\phi$ を5%塩酸でH型としたのち、十分水洗した。次に酢酸ソーダ(pH = 4.7)で数回処理して緩衝塩となし、十分水洗して過剰の緩衝塩を除き、カラムへ充てんした。次に3)でえた活性炭カラム溶離区分を試料とし、10%水酸化ナトリウム溶液でpH = 7にしてから、カラムを毎分1mlの速度で通過させたのち、蒸留水150mlを加え水洗した。

吸着区分は、2N水酸化アンモニウム150mlで溶出したのち、蒸留水150mlで水洗した。次に減圧下で濃縮して、ペーパークロマトグラフィーの試料とした。

5) 酸性アミノ酸と中性アミノ酸の分画：活性炭カラムと Amberlite IRC-50 カラムにより、芳香族アミノ酸と塩基性アミノ酸が除去された試料溶液は、約300mlに減圧濃縮したのち、pHを4.8~5.0に調整した。

Amberlite IR-4Bの15mlを5%塩酸でCI型にしたのち、十分水洗し、カラムへ充てんした。次に試料溶液を毎分1mlの速度で流出させ、更に300mlの蒸留水で洗浄した。吸着されずに溶離した中性アミノ酸区分は、減圧下で濃縮して、ペーパークロマトグラフィーの試料とした。一方吸着された酸性アミノ酸区分は、1N塩酸300mlで溶出し、次に150mlの蒸留水で洗浄したのち、減圧濃縮して、ペーパークロマトグラフィーの試料とした。

#### 11. 発酵後におけるアミノ酸の分離、同定

廃糖蜜50gを水道水150mlで希釈してえたBx 20°の溶液に、約0.5gの活性炭を添加し、濾過した。濾液は殺菌後、396号酵母を1白耳接種して、32°Cの孵卵器中で培養し、朝夕2回振とうして、42時間醗酵させた。次に発酵液を90ml(アミノ態窒素約25mg含有する)採取して、80%エタノール処理を行ない除蛋白した。アミノ酸の分離、同定方法は発酵前と同様の方法で行なった。分離工程図を第1図に示す。

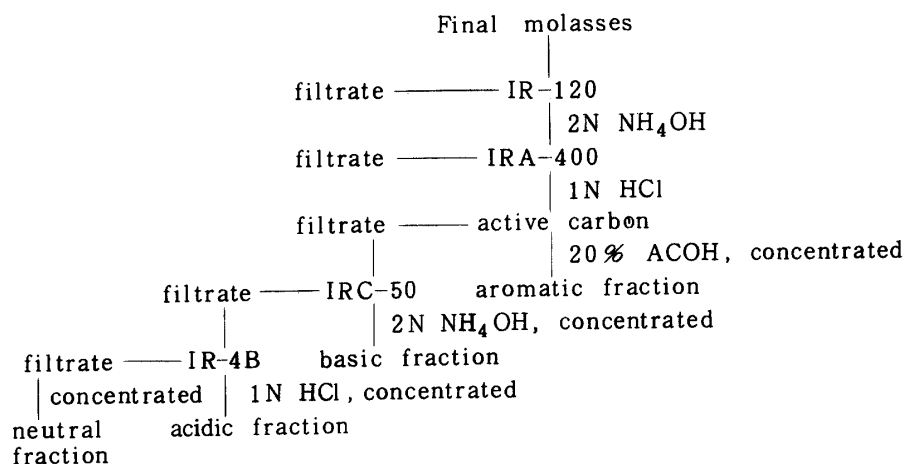


Fig. 1. Scheme of extraction of various amino acids from final molasses

### Ⅲ 実験結果及び考察

1. 廃糖蜜の一般組成分析を第1表に示す。

Table 1. General components of the final molasses produced in Okinawa

Moisture	Direct Ashe	reducing sugar	Sucrose	Total sugar	Crude protein	Amino acid nitrogen	Ammonium nitrogen	Bx	PH
18.18	14.60	24.42	22.19	45.76	1091	0.19	0.04	81.2°	4.6

#### 2. pH, Bx, 菌体重量の経時的变化

結果を第2図に示す。pH低下の原因は、酵母による糖類のアルコール発酵によって生じたアルコールが酢酸発酵を受けて、酢酸を生ずることと糖類の一部が細菌類によって、有機酸発酵を受けて（4）、クエン酸等の有機酸を生ずることが考えられるが、主として酢酸によるものと思われた。

発酵が進行するにつれて、Bxは減少し、酵母は増殖することは当然であるが、24時間目頃におけるBxの急激な低下、酵母の急激な増殖は、24時間目頃に発酵最盛期が始ったことを意味し、それは約16時間続いた。

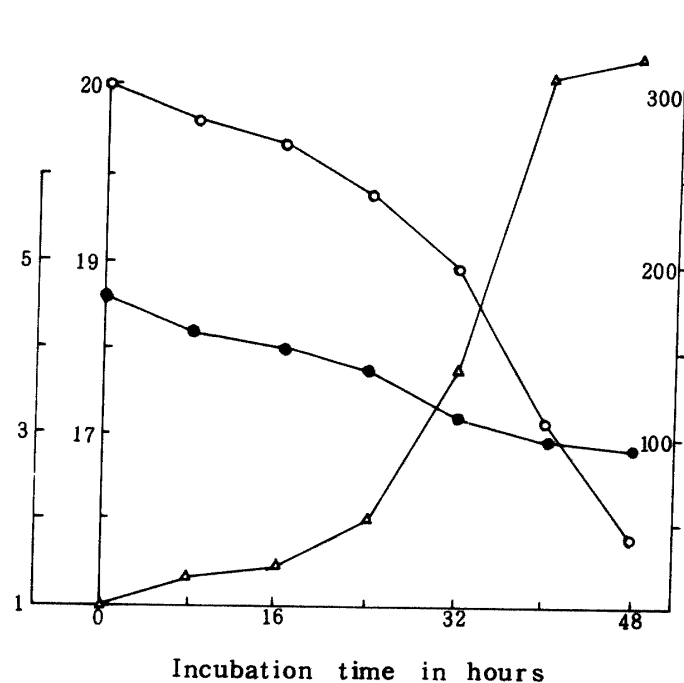


Fig. 2. Changes in pH, Bx and weight of yeasts with time in the fermentation of final molasses

●—● pH    ○—○ Bx    △—△ weight of yeasts

### 3. 蔗糖蜜の発酵試験

Bx 15°, 20°, 25° における発酵曲線を第3図に示す。Bx 25° の場合は、炭酸ガス減量は多かったが、第2表に示すように、発酵率が悪かった。Bx 20° の場合は、発酵率、アルコール収量とも良好であったので、以後の実験では、培養液は、Bx 20° のものを用いた。

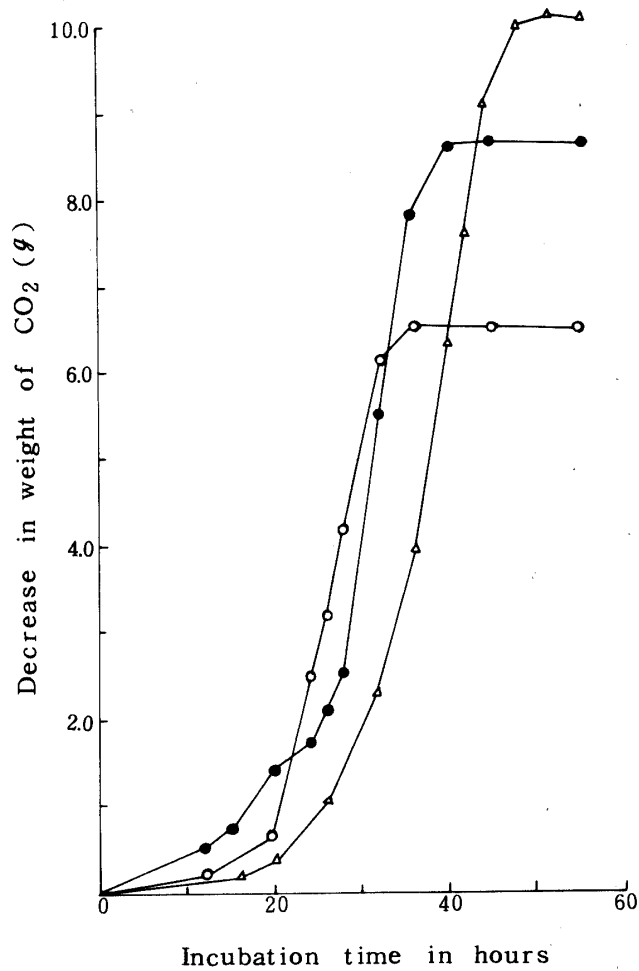


Fig. 3. Fermentation curves of the final molasses fermented in various concentrations

Table 2. Alcoholic fermentation rates and alcoholic concentrations of the final molasses fermented in various concentrations

Final molasses concentrations (Bx)	Alcoholic fermentation rates	Alcoholic concentrations (vol %)
15°	97.7	6.5
20°	95.5	7.8
25°	58.3	6.7

#### 4. 培養時間とフーゼル油生成量との関係

結果を第4図に示す。この図が第3図の発酵曲線と同様な曲線を示していることは、発酵が進むにつれて、フーゼル油も増加することを意味する。

第3図と第4図から、培養時間が42時間目に達したとき、発酵曲線及びフーゼル油生成量が最高に達しているのを、以後の実験では、培養時間を42時間と設定した。またこのことは、第1図において、発酵最盛期の終りが、42時間目頃であることと矛盾しない。

試料をバニリン硫酸法によって、発色させ、吸収スペクトル曲線(第5図)を求めたところ、最大吸収は520 nmであった。この波長は吉沢(9)が求めた最大吸収500 nmとほぼ一致した。検量曲線も、同氏の方法に準じて作成したが、波長は520 nmを用いた(第6図)。

Bx 20°の培地200 mlを42時間発酵させたもの(0.337 g/l)とBx 20°の発酵前廃糖蜜(0.032 g/l)とでは、フーゼル含量において、発酵後が発酵前に較べて、10倍も増加していることが認められた。

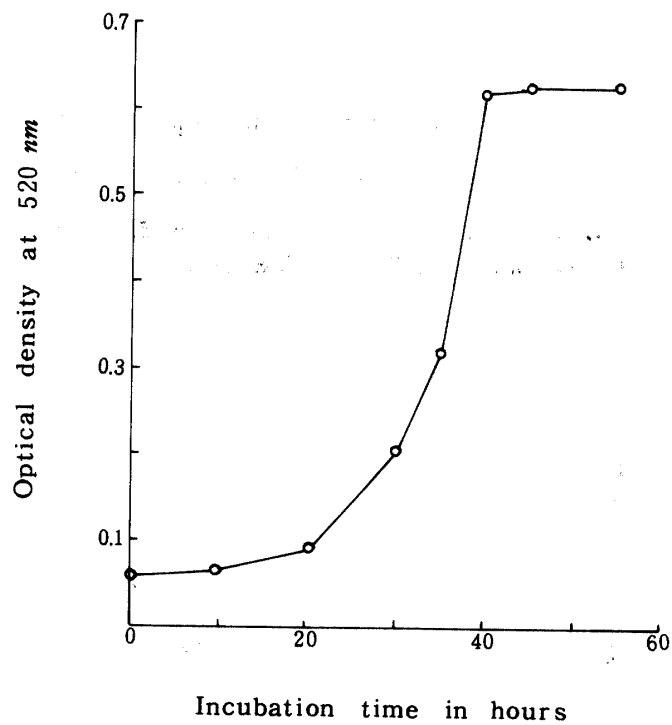


Fig. 4. Relationship between the incubation time and the fusel oil produced in the alcoholic fermentation of final molasses



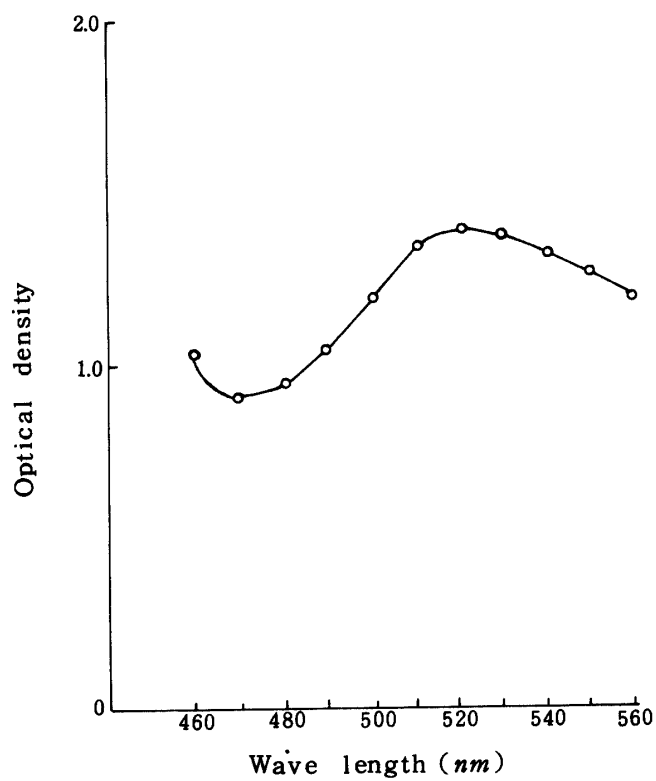


Fig. 5. Visible absorption spectrum of the final molasses solution treated with vanillin sulfuric acid reagent

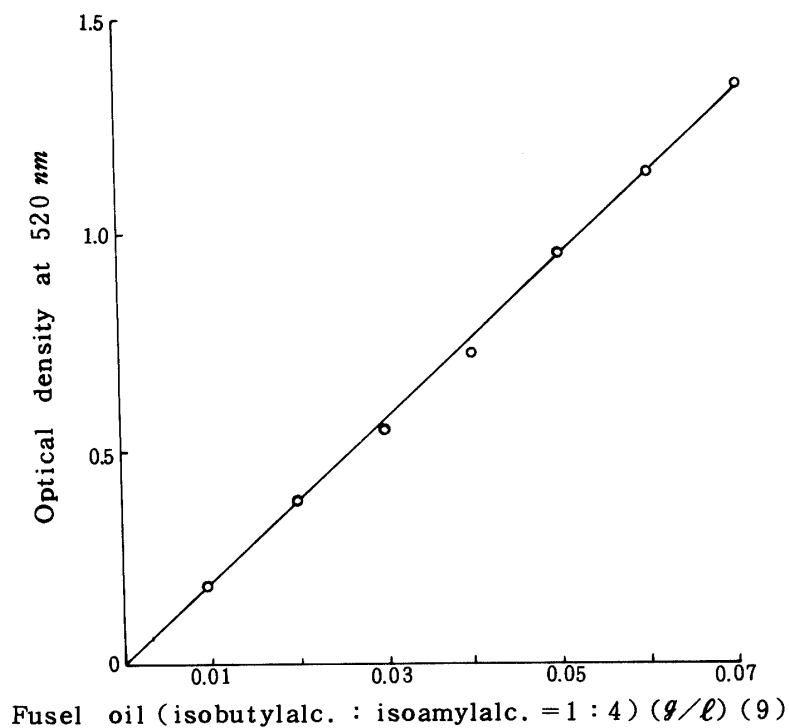


Fig. 6. Calibration curve of fusel oil

### 5. 活性炭添加とフーゼル油生成量との関係

活性炭を培地に添加し、発酵させると第7図に示すように、活性炭の添加量が $0.2\text{ g}/100\text{ ml}$ において、フーゼル生成量は最大となり、無添加の場合よりも、約2倍量も増加していることが認められた。友田はその原因は、活性炭がフーゼル油を吸着するためであろうと報告している。

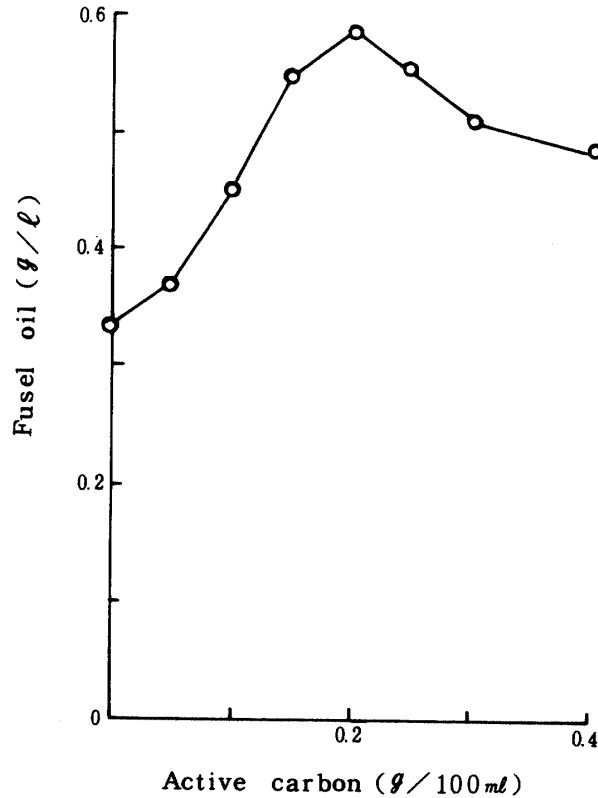


Fig. 7. Relationship between the active carbon added and the fusel oil produced in the alcoholic fermentation of final molasses

### 6. 硫安添加とフーゼル油生成量との関係

友田は培地に硫安を添加すると、酵母は、アミノ酸を窒素源としてとる必要がなくなり、フーゼル油生成量は、減少することを、アンモニア態窒素を除去したものとそうでないものとは、前者の方が、フーゼル油生成量が増加することを明らかにすることにより、証明したが、本実験でも、このことを確認するために、同様の実験を行なったが、第8図に示すように、硫安添加量 $0.06\text{ g}/200\text{ ml}$ までは、フーゼル油の生成を促進しているが、それ以上では急激な減少を来たすなど、友田の実験結果とはかなり相違していた。

### 7. 発酵液中のアミノ態窒素の経時的変化

本実験では、生活酵母による廃糖蜜中のアミノ態窒素の資化を促進し、フーゼル油の生成量を増大ならしめ、発酵前後におけるアミノ態窒素の質的、量的変化を大きくする必要があったので、工業的にも実験的にも、窒素源として用いられる硫安の使用は避けた。その理由は、硫安を添加した場合、生活酵母が窒素源として硫安中の窒素を摂取するために、培地中の発酵によるアミノ酸の分解が阻害され、フ

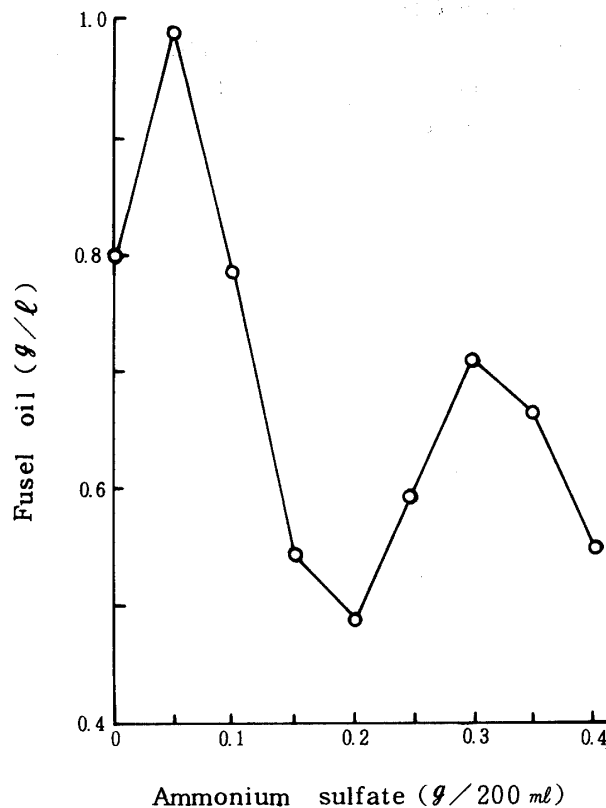


Fig. 8. Relationship between the ammonium sulfate added and the fusel oil produced in the alcoholic fermentation of final molasses

ーゼル油の生成量が減少することが考えられたからである。

発酵が進行するに伴ない、アミノ態窒素の減少、フーゼル油の増加（第9、4図）を来たすことは、当然のことであるが、第9図に示すように、アミノ態窒素は、仕込後42時間目頃に最も減少し、その後は次第に増加し始め、72～120時間目の間はほとんど一定の値を示しながら、144時間目頃に、再び減少のきざしをみせた。おそらく、42時間目からのアミノ態窒素の増加は、生活酵母の自己消化の結果生じた菌体内プロテアーゼによって、酵母蛋白質が加水分解を受けたためであろう。

#### 8. 発酵液中のプロテアーゼ

酵素反応液20ml及び対照液20ml中には、それぞれ、アミノ態窒素10.735mg、10.192mgを含有していた。すなわち、前者は後者に対し、5.3%のアミノ態窒素増加を示していることから、発酵液中にはプロテアーゼが存在していることが推察された。

酵母は菌体外プロテアーゼは生産しない(8)といわれているので、本プロテアーゼは菌体内プロテアーゼとみるのが妥当であろう。そのことは酵母の自己消化が既に進行していることを意味する。

#### 9. Bxの相違によるアミノ態窒素の消費率

発酵は第3図において、CO<sub>2</sub>減量が最高値に達した時間、すなわち、Bx15°の場合は36時間、Bx20°の場合は42時間、Bx25°の場合は52時間、それぞれ行ない、アミノ態窒素の消費率を求めた。結果は第3表に示す通り、Bx20°の場合が他に較べて最も高い消費率を示した。

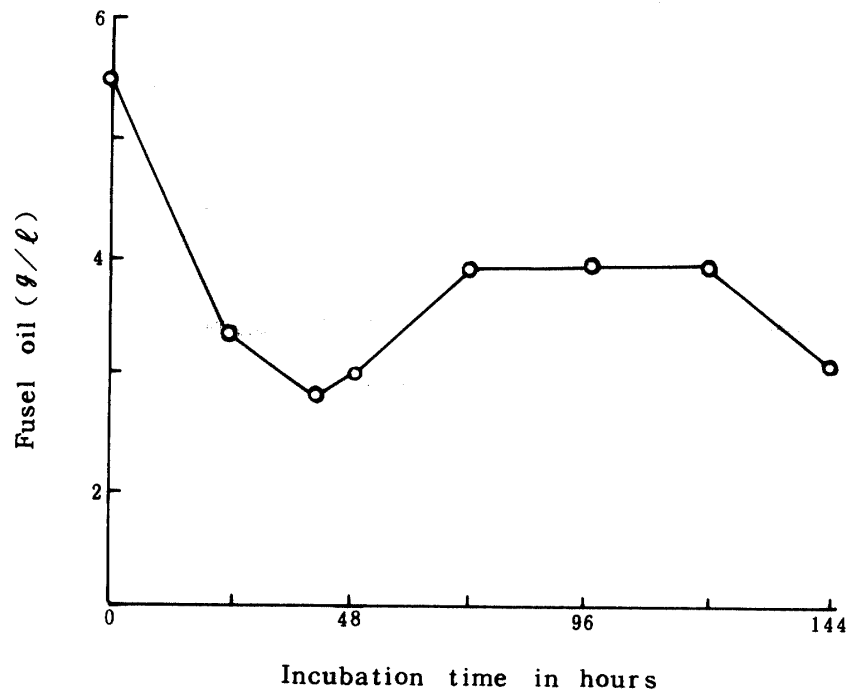


Fig. 9. Changes in amino acid nitrogen with time in the alcoholic fermentation of final molasses

Table 3. Amino acid nitrogen consumption rates in the final molasses fermented in various concentrations

FMC	ANB	ANA	ANC
15°	2.93	2.14	26.61
20°	4.74	2.76	42.46
25°	5.94	3.56	39.64

FMC: Final molasses concentrations (Bx)

ANB: Amino acid nitrogen before fermentation (mg/10 ml)

ANA: Amino acid nitrogen after fermentation (mg/10 ml)

ANC: Amino acid nitrogen consumption rates (%)

#### 10. フーゼル油生成に関与するアミノ酸

芳香族アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸及び中性アミノ酸の発酵前後における1次元ペーパークロマトグラムを第10図に示す。発色剤はニンヒドリン試薬、濾紙は東洋濾紙No.50を用い、使用した展開溶媒はそれぞれ、*n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:2)、左同、pH 9.3 ホウ酸緩衝液-*m*-クレゾール-フェノール (1:1:1) 下層、*n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:5) であった。試料は、第3表において、最も高いアミノ態窒素消費率を示した Bx 20° のものを、発酵時間は 3, 4 図から 42 時間を、それぞれ採用した。

芳香族アミノ酸として、チロシン (Rf 0.40) とフェニールアラニン (Rf 0.61) に相当する2スポット、酸性アミノ酸として、アスパラギン酸 (Rf 0.13) とグルタミン酸 (Rf 0.21) に相当する2スポットがそれぞれ検出されたが、発酵前後において、何らの変化も見られなかった。塩基性アミノ酸は検出できなかった。

中性アミノ酸として、バリン (Rf 0.41) とロイシン又はイソロイシン (Rf 0.58) に相当する2スポットを検出したが、之等はいずれも発酵後に消失した。したがって、廃糖蜜のアルコール発酵中に、之等の3アミノ酸は酵母によって、窒素源として資化を受けながら、Ehrlich の分解式(1)によって、炭素数が1個少い高級アルコールに分解するとすれば、廃糖蜜のアルコール発酵によって生じたフーゼル油は、イソブチルアルコール、イソアミルアルコール及び活性(d)アミルアルコール等の混合物であろうと推察された。

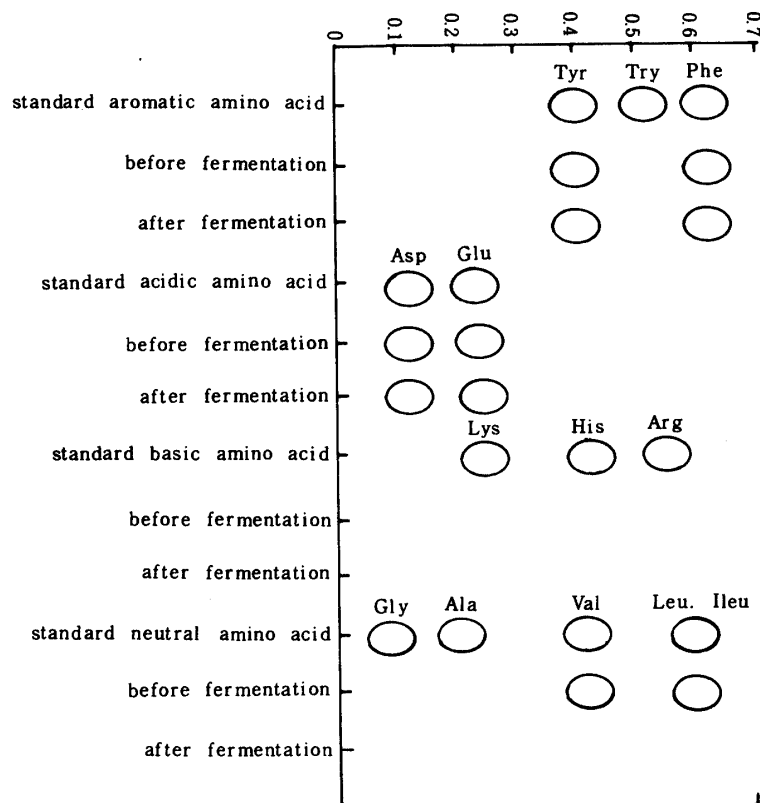


Fig. 10. Paper chromatograms of amino acids before and after the alcoholic fermentation of final molasses

Solvent system

aromatic amino acid : n-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4:1:2 vol %)

acidic amino acid : same as above

basic amino acid : pH 9.3 borate buffer-phenol-*m*-cresol  
(1:1:1 vol %)

neutral amino acid : n-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4:1:5 vol %)

Visualized by ninhydrin reagent

#### IV 要 約

1. 発酵率，アミノ態窒素消費率ともに，Bx20°の廃糖蜜において，最も高い値を示したので，発酵に関するすべての実験は，該条件下で行なった。
2. 第9図において，アミノ態窒素が42時間目から増加し始めているのは，酵母蛋白がその自己消化の結果生じたプロテアーゼによって加水分解を受けたためであろうと思われた。
3. 発酵後のフーゼルは，発酵前のそれに較べて，10倍以上も増加していることが認められた。
4. ペーパークロマトグラフィーによって，発酵前に検出されたアミノ酸のうち，中性アミノ酸（バリン，ロイシン又はイソロイシン）だけが，発酵後に消失したので，生じたフーゼル油は，イソブチルアルコール，イソアミルアルコール，活性(d)アミルアルコール等の混合物であろうと思われた。

#### 参 考 文 献

1. 編集委員（代表赤堀四郎）1961 生化学講座，10：125～129，東京，共立出版社
2. 小幡弥太郎 1963 醸造物の香気について，醸協，58：494～499
3. 中沢亮治 1932 糖蜜発酵酵母，農化，12：196～203
4. 尾崎準一 1950 農産加工法，86，東京，朝倉書店
5. 菅原潔，志村憲助 1963 アミノ酸のクロマトグラフィーによる分析法，醸協，54：973～977
6. 友田宜考 1939 アルコール発酵におけるフーゼルの生成量，工化，42：806～809
7. Tsukamoto, T., Komori, T and Kinoshita, N. 1957 Microanalysis of amino acid by yeast, *Agr. Biol. Chem.*, 25: 326～332
8. 東大農化 1972 実験農芸化学 上巻，256～281，東京，朝倉書店
9. 吉沢淑，岩附守 1959 バニリン硫酸法によるフーゼル油定量における標準液の調整について，醸協，54：691～688
10. 吉川敏郎，吉沢淑，山田正一 1961 アミノ酸のアルコール発酵，醸協，56：1274～1271
11. Yoshizawa, K., Furukawa, T., Tadenuma, M. and Yamada, M. 1961 The formation of higher alcohols in the fermentation of amino acid by yeast, *Agr. Biol. Chem.*, 25: 326～332

#### Summary

1. Since both of fermentation rate and amino acid nitrogen consumption rate showed the highest value in case of final molasses of Bx20°, all the experiments involving fermentation were performed under this condition.
2. It was supposed that an increase in amino acid nitrogen after a lapse of 42 hours in the fig. 8 occurred as the result of hydrolysis of the yeast protein by the protease produced through the autolysis.
3. It was conformed that the amount of the fusel oil measured after the fermentation reached to more than ten times that of the fusel oil existed before the fermentation.

---

4. From the fact that only the neutral amino acids (valine, leucine, isoleucine) of those detected by paperchromatography before the fermentation disappeared after the fermentation, the fusel oil produced was supposed to be composed of isobutyl alcohol, isoamyl alcohol and active (d) amyl alcohol according to the Ehrlich's scheme.