麴汁培地を用いて花から分離した 酵母の清酒醸造試験

小室友香理・清水大介・加藤陽子
穂坂賢・中田久保
(東京農業大学短期大学部醸造学科)

平成 17 年 1 月 11 日受理

*Sake brewing test of yeasts isolated from flowers
by using koji extract medium*

Yukari KOMURO, Daisuke SHIMIZU, Yoko KATO,
Masaru HOSAKA and Hisayasu NAKATA

(Department of Brewing and Fermentation,
Junior College of Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku,
Tokyo 156-8562, JAPAN)

We used natural flowers to isolate yeast strains which have the characteristics of sake yeast, using a medium containing yeastcidin produced by *Aspergillus oryzae* No.G. Although a synthetic culture medium was employed in previous papers¹⁾, a *koji* extract culture medium was applied this time.

As a result, *Saccharomyces* species was isolated from the flower of 48 items among 241 samples collected in Japan. Furthermore, results of the examination of physiological character showed 16 strains were a non-forming *sake* yeast type. These strains were used in *sake* brewing tests on a small scale. Analysis of the aroma of these *sake* tested the strains. The AB-2 strain, which shows fresh organic functions with features to the flavor MR-4, and the KS-3 strains were obtained. In fragrance, the AB-2 strain produced a high concentration of ethyl caproate on a par with the ND-4 strain. The MR-4 strain produced isoamyl acetate higher than the BK-1 strain. The KS-3 strain contained ethyl caproate and isoamyl acetate at a sufficient balance like the NI-2 strain.

When the test brewing *sake* using these three strains of organic acid composition was analyzed, the rate of malic acid to succinic acid (MA/SA ratio) was high. However, the total acidity of the test brewing sake had low values. Moreover, these three strains had a strong fermentation ability in *sake* mash.

Key words : 麴汁培地, 集積培養, 分離酵母

緒言

前報¹⁾までに、花から有用清酒酵母の分離を目的として Yeastcidin 添加の合成培地を用いた集積培養法による分離を試み、ND-4 株 (分離源: ナデシコ), HNG-5 株 (分離源: ツルバラ), NI-2 株 (分離源: 日々草) および BK-1 株 (分離源: ペゴニア) の香気に特長を有する泡なしタイプの優良清酒酵母 4 株を得た。本報では、Yeastcidin を添加した麴汁培地を集積培養用培地として用い、231 点中 48 点の花より *Saccharomyces* 属酵母を分離し、さらにそのうち 16 点の花より泡なし清酒酵母タイプと判定される酵母 16 株が分離できた。前報¹⁾で報告した合成培地で分離した 4 株に、今回分離した 16 株の併せて計 20 株を用いて清酒小仕込み試験を行い、官能評価したところ、香味に特長ある爽やかな官能を示した AB-2 株 (分離源: アベリア), KS-3 株 (分離源: コスモス) および MR-4 株 (分離源: マリーゴールド) の 3 株を得た。

そこでこれら 3 株による製成酒の有機酸組成を分析した結果、いずれもコハク酸に対するリンゴ酸比 (以下 MA/SA 比) が 0.80 以上を占めた。

実験方法

1. 分離用培地

中田ら²⁾は Yeastcidin 生産性について検討し、合成培地や市販酵素剤を添加した蒸米糖化液では抗菌作用がなく、麴汁培地を用いたときにのみ抗菌力が認められたと報告していることから、清酒醪の環境を考慮して麴汁培地を使用した。すなわち Balling 10° 麴汁を Brix 20° となるようグルコースにて調整し、Yeastcidin 粗物質を 250 ppm となるよう添加し、綿栓殺菌した 300 ml 容三角フラスコに 200 ml 分注後、オートクレーブにて 120°C, 5 分間加圧殺菌した。さらに、あらかじめ 95% エタノールにて 30 分間アルコール殺菌し無菌的に乾燥させた乳製カゼインを 5% となるように添加し、乳酸にて pH 3.1 に調整したものを分離用集積培地とした。

2. 集積培養液からの有用清酒酵母分離

分離試料は 2000 年 4 月から 2004 年 6 月にかけて国内で採取した花 231 点を用いた。分離用培地に採取し

Table 1 Proportion of raw material for small scale *sake mash*

	<i>Moto</i>	1 st.	2 nd.	3 rd.	Total
Total rice (g)	200	670	1240	1890	4000
Koji rice (g)	70	170	270	370	880
Steamed rice (g)	130	500	970	1520	3120
Water (ml)	220	700	1600	3080	5600

The steamed rice and *koji* rice used 65% polished rice.

た花を入れ、27°C～30°Cにて培養し、発酵旺盛となった培養液を殺菌水にて適宜希釈後、TTC 下層培地に塗抹し、50～100 コロニーが出現した平板培地より任意に YM 液体培地に一白金耳釣菌後、30°C、3 日間培養し、皮膜を形成せずガスを多量に発生するものを *Saccharomyces* 属とした。さらに、これら *Saccharomyces* 属からの清酒酵母タイプの判別は前報¹⁾に従い、糖類の発酵性と資化性、硫安を窒素源としたクエン酸、クエン酸カリウムを除去したビタミン欠培地³⁾での増殖、KNO₃の資化性、TTC 染色性、Yeastcidin に対する抵抗性および清酒醪中での高泡形成能について検討し判別した。なお、高泡形成能は 13°C、25 日間の発酵試験とし、試験終了後、ろ液を採取し日本酒度と生成アルコール量を測定した。アルコールはアルコール濃度計 YSA-200 (YAZAKI 社製) を用いた。

3. 小仕込み試験

Table 1 に仕込み配合を示す。原料米は精米歩合 65% の一般米白米を用い、総米 4 kg の三段仕込み(麴歩合 22%、汲水歩合 140%)を行なった。酒母には汲水 1 ml 当たり 7 ml の乳酸を添加し、YM 液体培地にて前培養した各酵母を 2×10^5 cfu/ml となるように接種した。仕込み温度は初添 15°C、仲添 10°C、留添 8°C、醪最高温度 12～13°C とした。対照株である K-9 株の日本酒度が ±0 となるのを目安として上槽し、分析試料とした。なお、使用した麴は麴蓋法にて製麴した麴をあらかじめエタノールにて殺菌し用いた。

4. 一般成分分析

一般成分分析は国税庁所定分析法注解⁴⁾に従い行った。

5. 香気成分分析

各試料に内部標準物質として n-アミルアルコールを加え、ジエチルエーテル:n-ペンタン(2:1)混合溶媒で振盪抽出後、中性区分を得、ウィッドマーカラム

で濃縮し、ガスクロマトグラフィー (GC) にて低沸点香気成分を定量した。GC 分析条件は、キャピラリーカラム 0.25 mm×60 m, 充填材 TC-WAX を用い、N₂ ガス流速 30 ml/分、カラム温度 70°C, FID 検出器とした。

6. アミノ酸組成分析

アミノ酸の定量は島津製作所製高速液体クロマトグラフ (LC-6 A) で行った。カラムは Shim-pack Amino-Na 型とし、カラム温度 60°C で島津アミノ酸分析システムを用いた。

7. 有機酸分析

有機酸の定量は電気伝導度検出器を備えた島津製作所製高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた。HPLC 分析条件として Shim-pack SCR-102 H (2 連カラム) を用い、カラム温度 45°C、移動相は 5 mM *p*-トルエンスルホン酸、反応液は 20 mM Bis-Tris, 100 μM EDTA を含む 5 mM *p*-トルエンスルホン酸溶液を用い、流速 0.8 ml/分とした。

実験結果および考察

1. 集積培養液からの有用清酒酵母タイプの分離

48 点の花から *Saccharomyces* 属酵母を分離し、高泡形成試験を行ったところ、いずれの株も泡なし酵母であった。得られたろ液の日本酒度およびアルコール生成量を測定した結果、対照株 (K-9 株, ND-4 株) の日本酒度と同等あるいはアルコール生成力が高い菌株は 16 株であった。これら 16 株の結果を Table 2 に示す。対照株の清酒酵母協会 9 号 (K-9 株) の日本酒度は -3、生成アルコール 16.9%、Yeastcidin 添加合成培地にてナデシコの花から分離した ND-4 株の日本酒度は -2、生成アルコール 17.1% であった。日本酒度が対照の両株と同等以上を示した株は AG-4, SN-3, KS-3 以外の 13 株であり、特に AB-2, KK-1, IS-1, OS-2, CAR-1, SN-4, GE-1, KAF-2, HI-6, ST-4, SUNF-5 の 11 株はよく切れ、アルコールは 16.1%～18.8% と十分に生成した。AG-4, SN-3, KS-3 の 3 株の日本酒度は -5 から -4 であったがアルコール生成量は 17.8%～18.4% と他と比較しても遜色ない値であった。

以上の結果から本法によっても自然界から優良な清酒酵母が分離できることが示唆された。

2. 分離株による小仕込み試験

花から分離した酵母および対照株として協会酵母 9

Table 2 Number of yeast strains isolated from flowers by the enrichment culture method using *koji* extract medium containing yeastcidin

Strain No.	Sake meter	Alcohol (%)	Froth forming	The isolation samples	
				The scientific name	Japanese name
K-9	-3	16.9	+	Control (Kyokai No.9)	清酒酵母 K-9
ND-4	-2	17.1	-	<i>Dianthus superbus</i> var. <i>longicalycinus</i>	ナデシコ
MR-4	-1	18.6	-	<i>Tagetes patula</i>	マリーゴールド
HR-3	-3	16.1	-	<i>Erigeron philadelphicus</i>	ハルジオン
AB-2	+1	18.3	-	<i>Abelia grandiflora</i>	アベリア
KK-1	+3	17.3	-	<i>Callistephus</i> sp.	キク
AG-4	-5	18.4	-	<i>Hydrangea macrophylla</i>	アジサイ
IS-1	+1	16.7	-	<i>Isotoma axillaris</i> , (<i>Laurentia axillaris</i>)	イソトマ
OS-2	+2	17.1	-	<i>Merabilis jalapa</i>	オシロイバナ
CAR-1	±0	18.8	-	<i>Dianthus caryophyllus</i>	カーネーション
SN-3	-4	17.8	-	<i>Rhododendron metternichii</i>	シャクナゲ
SN-4	+4	16.8	-	<i>Rhododendron metternichii</i>	シャクナゲ
GE-1	+4	18.4	-	<i>Epiphyllum oxypetalum</i>	ゲッカビジン
KAF-2	±0	17.5	-	<i>Cattleya</i> Hybrids	カトレア
HI-6	+6	18.0	-	<i>Hibicus rose-sinensis</i>	ハイビスカス
KS-3	-5	18.3	-	<i>Cosmos bipinnatus</i>	コスモス
ST-4	+1	17.2	-	<i>Fragaria grandiflora</i>	イチゴの花
SUNF-5	+3	18.0	-	<i>Helianthus</i> sp.	チョコレートヒマワリ

The isolation medium used *koji* extract (Ballg 10°) adjusted to Brix 20 by glucose.

The *sake* mash (115g steamed rice, 35g sterilized rice *koji* and 200 ml water) was placed in a 500 ml Erlenmeyer flask with a sterilized cotton plug and inoculated with the cultivated cells of the isolated yeast strains.

The *moromi* fermented for 25 days at 13°C.

Froth forming ability in *sake* mash : + ; formation - ; not formation

K-9 and ND-4 were used as control strains.

号 (K-9 株) を用いた小仕込み試験による製成酒の一般成分分析値を Table 3 に、香気成分分析値を Table 4 に示す。花分離酵母は、Yeastcidin 添加した麹汁培地で分離した AB-2 株、KS-3 株、MR-4 株に加え、前報¹⁾ の Yeastcidin 添加した合成培地で分離した ND-4 株、NI-2 株、BK-1 株計 6 株を供試した。醪日数は対照である K-9 株の日本酒度が +1 となった 21 日目で全てを上槽した。一般成分値においては ND-4 株を除く AB-2 株、KS-3 株、MR-4 株、NI-2 株および BK-1 株の 5 株による製成酒中のアルコール生成量は 16.8%~17.5% と K-9 株と同等の発酵力を示した。アミノ酸度は ND-4 株による製成酒が高い傾向¹⁾にあったが、その他の 5 株については K-9 株より低い値を示した。総酸度は K-9 株 1.9 に対し、KS-3 株 2.2 と 0.3 ほど高かったものの、その他 5 株は 1.3~1.6 と

低い値であった。一方、香気成分については AB-2 株による製成酒がカブロン酸エチル 5.8 ppm と高い値を示したことから AB-2 株はカブロン酸エチル高生成株であると考えられる。熟練したパネリスト 5 名により官能評価を行ったところ、AB-2 株による製成酒は ND-4 株に匹敵する華やかな香りがあり、甘味の中に爽やかな酸味を感じキレのある酒質を示した。また、KS-3 株による製成酒は NI-2 株ほどではないものの、カブロン酸エチル 1.4 ppm、酢酸イソアミル 1.4 ppm と吟醸香である双方のエステルをバランスよく生成した。官能的にはやわらかく上品な香りであり、非常に爽やかな味わいを有した。さらに、MR-4 株による製成酒は酢酸イソアミルが 4.8 ppm と高い生成量であった。官能的には爽快なキレを感じさせながらもしっかりした味を有し、まとまりがあった。

Table 3 Analysis of small scale *sake* mash for making strains isolated from flowers

	Strains						
	AB-2	KS-3	MR-4	ND-4	NI-2	BK-1	K-9
<i>Sake</i> meter	-1	-1	±0	-9	-3	+2	+1
Alcohol (%)	17.1	17.5	16.8	16.4	17.1	17.2	17.0
Acidity (ml)	1.3	2.2	1.6	1.2	1.5	1.6	1.9
Amino acid (ml)	1.5	1.3	1.4	2.4	1.6	1.5	2.2

Table 4 Analysis of aroma components in small scale *sake* mash for making strains isolated from flowers

Aroma components (ppm)	Strains						
	AB-2	KS-3	MR-4	ND-4	NI-2	BK-1	K-9
<i>i</i> -butyl alcohol	23.8	57.4	76.6	75.3	50.0	58.3	55.6
<i>i</i> -amyl alcohol	115.1	217.6	236.7	253.0	196.6	217.2	184.4
<i>i</i> -amyl acetate	0.2	1.4	4.8	—	2.5	2.4	2.5
Ethyl caproate	5.8	1.4	—	7.1	2.7	0.8	—
A/B ratio	4.8	3.8	3.1	3.4	3.9	3.7	3.3
E/A×100	0.2	0.6	2.0	—	1.3	1.1	1.4

A/B ratio : *i*-amyl alcohol/*i*-butyl alcohol

E/A×100 : *i*-amyl acetate/*i*-amyl alcohol×100

以上の結果より、新規分離株である AB-2 株、KS-3 株および MR-4 株の 3 株は、官能評価において爽やかなキレのある酸を呈し、香りタイプ別によると、AB-2 株はカブロン酸エチルを生成するタイプ、KS-3 株はカブロン酸エチル、酢酸イソアミル双方をバランスよく生成するタイプ、MR-4 株は酢酸イソアミルを生成するタイプであった。

3. 製成酒のアミノ酸組成分析

AB-2 株、KS-3 株、MR-4 株および対照株とした協会酵母 9 号(K-9 株)による製成酒中のアミノ酸組成を Table 5 に示す。

アミノ酸は甘味、苦味、酸味、旨味など呈味性の異なることを二宮ら⁵⁾が報告しており、これに従い、甘味系アミノ酸(Gly, Ala, Thr, Ser, Pro, Lys)、苦味系アミノ酸(Phe, His, Arg, Ile, Leu, Val, Met)、酸味系アミノ酸(Asp, Glu)に分類した。さらに、総アミノ酸値に対する各系統別のトータル値、すなわち甘味系アミノ酸の比率(以下、甘味比)、苦味系アミノ酸の比率(以下、苦味比)、酸味系アミノ酸の比

率(以下、酸味比)を算出し比較した。その結果、ホルモール法で高い値を示すものほど甘味、苦味、酸味を呈するアミノ酸値が高い傾向にあり、花分離株は K-9 株と比較し、甘味系アミノ酸、苦味系アミノ酸、酸味系アミノ酸いずれも低い値を示した。一方、K-9 株の甘味比 0.44 に対して、分離株 3 株は 0.44~0.47、K-9 株の苦味比 0.30 に対して分離株 0.30~0.32、K-9 株の酸味比 0.15 に対して分離株は 0.15~0.17 であり、顕著な差は認められなかった。また、Cys は K-9 株の製成酒のみに検出されたが味を呈さないアミノ酸であることから、呈味性に関して影響はないと考えられた。

4. 製成酒の有機酸組成分析

AB-2 株、KS-3 株、MR-4 株および対照株とした協会酵母 9 号(K-9 株)による製成酒中の有機酸組成を Table 6 に示す。清酒中全有機酸の約 8 割はコハク酸、乳酸、リンゴ酸であり、コハク酸は「くどい」「重い」味を、リンゴ酸は「きれいな」「爽やかな」「後味の軽い」味を与えると評価されている⁶⁾。これらのことから、清酒中で最も多く含まれるコハク酸の値を 1 とし

Table 5 Analysis of amino acids in small *sake* mash for making strains isolated from flowers

Amino acids (ppm)	Strains			
	AB-2	KS-3	MR-4	K-9
Thr	70.8	75.2	59.8	86.0
Ser	61.6	54.3	44.4	63.6
Gly	146.6	131.0	145.2	159.0
Ala	251.4	179.9	214.2	273.0
Lys	75.4	95.2	93.4	83.4
Pro	146.6	139.6	145.0	172.8
Val	102.0	73.5	86.9	114.8
Ile	37.6	40.4	42.4	39.0
Leu	178.4	142.0	150.4	177.4
Arg	17.8	17.1	13.2	23.0
Met	23.6	23.4	24.8	18.4
Phe	76.7	73.0	68.6	85.6
His	101.8	72.0	61.2	103.8
Asp	70.8	56.8	49.4	62.4
Glu	204.4	195.4	183.2	222.6
Cys	—	—	—	57.8
Tyr	132.0	103.8	122.2	142.0
sweet (ppm)	752.4	675.2	702.0	837.8
bitter (ppm)	537.9	441.4	447.5	562.0
sour (ppm)	275.2	252.2	232.6	285.0
Total (ppm)	1697.5	1472.6	1504.3	1884.6
sweet/total ratio	0.44	0.46	0.47	0.44
bitter/total ratio	0.32	0.30	0.30	0.30
sour/total ratio	0.16	0.17	0.15	0.15

Sweet ; Thr, Ser, Gly, Ala, Lys, Pro

Bitter ; Val, Ile, Leu, Arg, Met, Phe, His

Sour ; Asp, Glu

たときのリンゴ酸の値を MA/SA 比 (Malic acid/Succinic acid) で表したところ, AB-2 株は 0.88, KS-3 株は 0.95, MR-4 株は 1.26, 対照である K-9 株は 0.65 であった。前項で分離株 3 株による製成酒は, 官能的にいずれも爽やかなキレのある酒質であることから, MA/SA 比が 0.8 以上である場合にリンゴ酸特有の爽やかさを感じやすいことが示唆された。また分離株 3 株に共通して製成酒の酢酸含量が非常に少ないという特長を有していた。

Yeastcidin 添加した麹汁培地を用いた分離株はいずれも発酵力が強く, 総酸度は KS-3 株が K-9 株に比べ 0.3 程度高い値であったものの AB-2 株, MR-4 株

Table 6 Analysis of organic acids in small *sake* mash for making strains isolated from flowers

Organic acids (ppm)	Strains			
	AB-2	KS-3	MR-4	K-9
Citric acid	87.0	88.8	124.3	128.3
Malic acid	339.5	497.0	412.5	304.7
Succinic acid	388.7	524.1	328.3	471.9
Lactic acid	283.8	481.8	368.4	411.4
Fumalic acid	—	—	13.3	—
Acetic acid	14.4	—	42.4	204.9
MA/SA ratio	0.88	0.95	1.26	0.65

は低い値を示した。いずれの分離株においても MA/SA 比が高いことが認められた。

5. 各分離酵母の生理学的性質

花から分離した AB-2 株, KS-3 株, MR-4 株および対照株である K-9 株の生理学的性質を Table 7 に示す。糖類の発酵性および資化性は全株 Lactose 以外の糖類を発酵, 資化した。清酒酵母の Key Character³⁾⁷⁾である Melezitose は全株資化せず, α -methyl-D-glucoside は K-9 株と KS-3 株は資化したが, AB-2 株と MR-4 株は資化しなかった。硝酸塩を資化せず, 硫酸を窒素源としたクエン酸, クエン酸カリウムを除いたビタミン欠培地で全株増殖した。いずれの株も Yeastcidin に対する抵抗性を有し, TTC 染色では Red を呈した。さらに清酒醪中での高泡形成能においては, 対照株である K-9 株は高泡を形成したが, 花から分離した酵母 3 株は形成しなかった。

以上の結果より, α -methyl-D-glucoside を資化する株としない株があるものの他の性質から判断し, 花分離酵母 3 株は, 泡なしタイプの清酒酵母であると判定した。また他の 13 株についての菌学的性質についても今後検討の予定である。

要 約

Aspergillus oryzae No.G の生産する抗生物質である Yeastcidin の特性を利用して, 花から有用清酒酵母の分離を目的とし, 麹汁培地による集積培養法を用いて酵母分離を行った。

1. 国内で採取した花 241 点を供試試料とし, 分離を

Table 7 Physiological characteristics of yeasts isolated from flowers by an enrichment culture method

	AB-2	KS-3	MR-4	K-9
Fermentation of carbon compounds				
Glucose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Lactose	—	—	—	—
Raffinose	+	+	+	+
Assimilation of carbon compounds				
Glucose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Lactose	—	—	—	—
Raffinose	+	+	+	+
Melezitose	—	—	—	—
α -Methyl-D-glucoside	—	+	—	+
Assimilation of nitrogen compounds KNO ₃	—	—	—	—
Growth in vitamine-free medium	+	+	+	+
Yeastcidin resistance	+	+	+	+
Staining by TTC	Red	Red	Red	Red
Froth forminig ability in <i>sake</i> mash	—	—	—	+

AB-2, KS-3 and MR-4 were yeast strains isolated from natural flowers by an enrichment culture method.

Vitamine-free medium used ammonium sulfate as the nitrogen source.

The medium containing 20 g glucose, 2.0 g (NH₄)₂SO₄, 0.55 g KH₂PO₄, 0.425 g KCl, 0.125 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0.125 g CaCl₂ · 2 H₂O, 2.5 mg FeCl₃ · 6 H₂O, 2.5 mg MnSO₄ · 4 H₂O in one liter of distilled water.

試みたところ 48 株の *Saccharomyces* 属酵母を分離した。そのうち清酒酵母と判定された酵母は 16 株で、全て泡なしタイプであった。

2. 花から分離した酵母による小仕込み試験を行ったところ、爽やかな官能を示す AB-2 株, KS-3 株, MR-4 株を得た。一般成分値については、対照株 (K-9 株) と同等の発酵力を示し、総酸度は KS-3 株が K-9 株に比べて 0.3 高かったものの、他の 2 株は低い値であった。香気については、AB-2 株は ND-4 株と同様にカブロン酸エチルを生成するタイプ、MR-4 株は BK-1 株と同様に酢酸イソアミルを生成するタイプ、KS-3 株は NI-2 株と同様にカブロン酸エチルと酢酸イソアミルをバランス良く生成するタイプであった。

3. 各分離株の製成酒中のアミノ酸度は、分離株によ

る製成酒のほうが K-9 株よりも 3~4 割少ない値を示した。アミノ酸組成を分析した結果、花分離株は K-9 株と比較し、甘味系アミノ酸、苦味系アミノ酸、酸味系アミノ酸いずれも低い値を示した。一方、総アミノ酸値に対する各系統別のトータル値（甘味比、苦味比、酸味比）を算出し比較したところ、顕著な差は認められなかった。

4. 各分離株の製成酒中の有機酸組成を分析した結果、分離株による製成酒のほうが K-9 株よりもコハク酸に対するリンゴ酸の割合（MA/SA 比）が高かった。官能において、リンゴ酸特有の軽快ですっきりとした後味を感じるの MA/SA 比が 0.80 以上の値であった。

以上の結果より、AB-2 株, KS-3 株, MR-4 株の 3

株は特長的な有機酸組成を持つことから、多様化する消費者嗜好に適した清酒醸造を可能にする株であると思われる。

文 献

- 1) 小室友香理, 穂坂賢, 中田久保: 醸協, 99, 10, 743 (2004)
 - 2) 中田久保, 坂井劭, 竹田正久, 塚原寅次: 醸協, 75, 9, 761 (1980)
 - 3) 中田久保, 穂坂賢, 坂井劭: 発酵工学, 63, 6, 509 (1985)
 - 4) 注解編集委員会編: 第四回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会 (1993)
 - 5) 二宮恒彦, 池田真吾, 山口静子, 吉川知子: 品質管理, 17, 12, 1475 (1966)
 - 6) 佐藤信, 大場俊輝, 高橋康次郎, 国分伸二, 小林幹男, 小林宏治: 醸協, 72, 11, 801 (1977)
 - 7) 竹田正久, 中里厚実, 塚原寅次: 発酵工学, 61, 1, 11 (1983)
-