ウレア非生産性清酒酵母による清酒実地醸造試験

北本勝ひこ・宮崎佳緒子*・山岡 洋**・五味勝也・熊谷知栄子

(国税庁醸造試験所, *(株)宮崎酒造店, **高松国税局鑑定官室)

平成4年2月20日受理

Sake Brewing Tests using Sake Yeasts Producing No Urea in Sake Factories

Katsuhiko KITAMOTO, Kaoko MIYAZAKI, Hiroshi YAMAOKA, Katsuya GOMI
and Chieko KUMAGAI

(National Research Institute of Brewing, 2-6-30, Takinogawa, Kita-ku,
Tokyo 114, Japan)

Sake yeast strains which produce no urea were obtained from Kyokai No.9 and No.10 strains by mutation technique, and sake brewing tests(840 kg-13,000 kg) were carried out by using these strains in 18 factories throughout Japan. The sake containing no urea could be brewed with these strains, and no ethyl carbamate was produced in the sake under the same condition in which about 100 ppb of ethyl carbamate was produced in the sake with their parent strains, Kyokai No.9 and No.10, used as control. There were no differences in fermentation profiles, general components and sensory test between the sake brewed with the mutants and their parent strains.

Key words: ウレア非生産性酵母・カルバミン酸エチル・清酒醸造試験

緒 言

1985年カナダ, オンタリオ州においてワインなどのアルコール飲料の中に, 発ガン性の疑いのある物質として知られるカルバミン酸エチル (ECA) を含むものがあると発表された。翌 1986 年, カナダにおける基準値以上の ECA を含む酒類として発表されたもののなかにワイン, ウイスキー, ブランデーなどとともに, 日本から輸出された清酒があった。それ以来, 各国で ECA の生成機構や低減化に関する研究が精力的になされ, 米国ではワイン¹⁻⁴⁾の, 英国ではウイスキー⁵⁻¹⁰⁾の, 我国では清酒¹¹⁻²⁰⁾に関する研究がなされた。ECA は主としてウレアとエタノールから生成することがワイン¹⁻²⁾や清酒^{12, 19, 20)}で明らかにされている。ウレアを減少させる方法としてウレアーゼの使用がワイン²¹⁻²³⁾や清酒^{24, 25)}で研究され, 実用化されている。また, 清酒酵母によるウレア生成を減少させる方法としては, カナバニン耐性株^{14, 15)}やメチルアミン耐性株¹⁷⁾からウレア生成の少ない変異株が取得されている。しかしながら, これらのいずれの方法によっても効率よくウレアを完全に清酒中からなくすることは不可能であった。水津ら²⁶⁾は, 実験室株酵母から

アルギナーゼ欠損株を遺伝子破壊により作成し, これを用いた発酵試験からウレアを生成しない清酒醸造の可能性を示した。筆者ら^{19, 20)}は, 清酒酵母協会 9 号から 2 段階の *CAR1* 遺伝子破壊によりアルギナーゼ欠損清酒酵母を造成し, それを用いた清酒の小仕込試験により, 発酵特性や一般成分, きき酒評価では親株とほとんど変わらず, 生成酒のウレアが検出されないことを明らかにした。さらに, 生成酒の火入れ・貯蔵後の ECA 含量を測定した結果, 対照酒が約 150 ppb 生成する条件下でも, この遺伝子破壊株による清酒では ECA の生成が認められなかった。

ECA を含まない清酒の製造が, このようなアルギナーゼ欠損した清酒酵母を使用することにより可能であることが示されたが, このとき造成された株は組換え DNA 技術を用いたものであったため, 現在のところ実際の清酒製造場での使用には制約がある。そこで, アルギナーゼ欠損変異株を通常の変異処理等で取得することを試み, 協会 9 号, 10 号から目的とする変異株を取得し, 小仕込試験により遺伝子破壊株で得られたものと同様の良好な結果が確認された^{27, 28)}。本報では, このようにして取得された変異株により, 全国の清酒製造場で実

地醸造試験を行った結果について報告する。

実験方法

1. 使用菌株

協会9号から Ethylmethane sulfonate (EMS) 変異処理により取得した ALM 91 (M 9-6)²⁷⁾、協会9号から変異処理をせずに取得した K 9-M 12²⁸⁾ および協会10号から EMS 変異処理により取得した ALM 101²⁷⁾ の3株を使用した。

2. 実施方法

醸造試験所より上記3菌株を各国税局鑑定官室に送付し、全国18場(延べ21場)において変異株とその親株(協会9号、10号)により、同一種類の仕込み(純米酒、本醸造酒またはアル添酒)を実施した。親株の協会9号、10号は各工場のものを使用した。酒母および醪の経過簿の写しとともに、生成酒を醸造試験所に送付してもらい、分析、きき酒等に使用した。

3. 変異株の醪中の酵母純度

醪末期の醪より、常法により TTC 下層培地等を用いて100~200個のコロニーを生育させ。このコロニーを殺菌した爪楊枝を用いて Arg 培地(イースト・ナイトロジェンベース(N源を含まないもの、Difco 社)0.85 g, アルギニン(塩酸塩)0.53 g, グルコース 10 g, 寒天 10 g, 水 500 ml) および Orn 培地(Arg 培地のアルギニンのかわりにオルニチン(塩酸塩)0.42 g を含むも

の)に植える。30℃ 2日間培養後、次の方法により酵母純度を測定した。

$$\text{酵母純度} = 100 \times (A - B) / A$$

ここで、A : Orn 培地で出現したコロニー数、B : Arg 培地で出現したコロニー数である。

4. 生成酒成分の分析

生成酒の一般分析は国税庁所定分析法²⁹⁾により、ウレア含量は酵素法(東洋醸造(株)測定試薬)により、カルバミン酸エチル(ECA)は70℃、12時間加温後(30℃で約4カ月貯蔵とほぼ同じ条件)、加藤ら³⁰⁾の方法により定量した。

5. きき酒方法

審査員21名(醸造試験所所長、室長および鑑定企画官、各局鑑定官室長)により、5点法(1:非常に良い、2:良い、3:普通、4:やや悪い、5:悪い)により蛇の目チョコを用いて行った。

実験結果

1. 実地醸造試験

Table 1~3 に示したように、ALM 91, K 9-M 12 では8場、ALM 101 では5場で仕込試験を実施した。純米酒が6場、本醸造酒が14場、アル添酒が1場であった。そのうち、10場は精米歩合60%以下のものであった。使用酒母は速醸酒母が13場、高温糖化が2場、酵母仕込みが6場であった。醪経過は各製造場で行って

Table 1 General Components, OD at 430, 260 and 280 nm of Sake Brewed with ALM 91 and Kyokai No. 9.

Factories	Strains	Sake meter	Alcohol (%)	Acidity	Amino acidity	OD 430	OD 260*	OD 280*
1 K-A	ALM 91	6.0	20.0	1.6	1.8	0.0337	1.147	0.815
	K-9	5.0	19.6	1.7	1.7	0.0600	1.070	0.838
2 K-B	ALM 91	3.0	20.5	1.9	1.6	0.0794	1.113	0.888
	K-9	5.0	20.6	2.1	1.4	0.0554	1.021	0.918
3 O-C	ALM 91	-4.0	19.4	1.8	2.0	0.0654	1.181	0.903
	K-9	2.0	19.1	1.7	1.7	0.0270	1.003	0.807
4 S-D	ALM 91	-3.5	18.5	2.2	2.2	0.0808	1.606	1.274
	K-9	1.0	19.0	2.2	2.2	0.0770	1.437	1.199
5 K-E	ALM 91	-4.7	19.2	1.8	1.8	0.0446	1.166	0.914
	K-9	-2.5	19.4	1.8	1.8	0.0348	1.197	0.977
6 T-F	ALM 91	10.0	17.5	1.8	1.3	0.0345	0.898	0.771
	K-9	8.0	17.5	1.7	1.2	0.0379	1.005	0.886
7 K-G	ALM 91	6.0	19.0	2.1	2.1	0.0654	1.218	0.933
	K-9	5.0	18.9	2.1	1.9	0.0399	1.037	0.880
8 K-H	ALM 91	-1.0	18.9	2.3	2.2	0.0652	1.316	1.126
	K-9	0.5	19.1	2.1	1.9	0.0358	1.091	0.978
Average	ALM 91	1.5	19.1	1.9	1.9	0.0586	1.205	0.953
	K-9	3.0	19.2	1.9	1.7	0.0460	1.108	0.935

* Diluted samples (10fold) were used for measuring OD 260 and OD 280.

Two samples of No.4 (S-D) and No.6 (T-F) are *Junmai-shu*, and the rest (No.1, 2, 3, 5, 7 and 8) are *Honjozo-shu*.

Table 2 General Components, OD at 430, 260 and 280 nm of Sake Brewed with K 9-M 12 and Kyokai No. 9.

Factories	Strains	Sake meter	Alcohol (%)	Acidity	Amino acidity	OD 430	OD 260*	OD 280*
1 O-I	K9-M12	0.0	19.2	1.8	1.4	0.0398	1.043	0.933
	K-9	0.0	19.1	1.7	1.3	0.0385	1.039	0.944
2 S-J	K9-M12	1.0	19.1	2.5	1.8	0.0203	1.302	1.096
	K-9	2.5	19.0	2.1	1.7	0.0207	1.151	0.987
3 S-K	K9-M12	3.5	20.6	1.7	2.1	0.0477	1.186	0.889
	K-9	5.5	20.4	1.7	1.8	0.0387	1.072	0.882
4 N-L	K9-M12	3.0	19.2	1.7	1.4	0.0193	1.188	0.922
	K-9	6.0	18.9	1.7	1.5	0.0329	1.009	0.804
5 K-M	K9-M12	3.0	18.0	2.1	1.6	0.0403	1.021	1.020
	K-9	2.0	18.3	2.2	1.8	0.0453	1.076	1.011
6 H-N	K9-M12	-0.8	19.1	2.1	1.7	0.0706	1.260	0.993
	K-9	1.8	19.4	2.1	1.7	0.0457	1.313	1.061
7 T-O	K9-M12	-0.5	18.4	1.6	1.6	0.0924	1.195	0.893
	K-9	-1.0	18.4	2.2	2.0	0.0400	0.858	0.767
8 F-P	K9-M12	-2.0	19.5	1.9	1.4	0.0527	1.132	1.059
	K-9	-2.0	19.3	1.8	1.3	0.0678	0.991	0.914
Average	K9-M12	0.9	19.1	1.9	1.6	0.0479	1.165	0.976
	K-9	1.9	19.1	1.9	1.6	0.0412	1.063	0.921

* Diluted samples (10 fold) were used for measuring OD 260 and OD 280.

Four samples of No.1, 2, 5 and 6 are *Junmai-shu*, and the rest (No.3, 4, 7, 8) are *Honjozo-shu*.**Table 3** General Components, OD at 430, 260 and 280 nm of Sake Brewed with ALM 101 and Kyokai No. 10.

Factories	Strains	Sake meter	Alcohol (%)	Acidity	Amino acidity	OD 430	OD 260*	OD 280*
1 K-A	ALM 101	-2.0	19.6	2.0	2.0	0.0792	1.526	1.199
	K-10	2.0	20.0	2.1	1.7	0.0698	1.349	1.148
2 O-B	ALM 101	1.5	19.2	1.7	1.5	0.0133	1.060	0.871
	K-10	2.5	19.4	1.6	1.6	0.0120	1.068	0.873
3 O-C	ALM 101	-11.5	19.1	1.6	2.2	0.0554	1.087	0.837
	ALM 101	-16.0	18.3	1.7	2.2	0.0499	1.266	0.967
	K-10	-12.0	19.0	1.8	2.2	0.0821	1.371	1.160
	ALM 101	8.0	20.8	1.5	1.8	0.0605	1.195	0.948
4 S-D	K-10	10.5	21.0	1.4	2.2	0.0381	1.604	1.122
	ALM 101	2.5	18.8	1.5	2.5	0.0603	1.673	1.237
5 T-E	K-10	2.5	20.3	1.4	1.7	0.0953	1.766	1.357
	ALM 101	-2.9	19.3	1.7	2.0	0.0531	1.301	1.009
Average	K-10	1.1	19.9	1.7	1.9	0.0595	1.431	1.132

* Diluted samples (10 fold) were used for measuring OD 260 and OD 280.

All samples are *Honjozo-shu*.

るようにしてもらったが、醪日数等 (Table 4~Table 6) の経過については経過簿から判断して、おおむね変異株と対照の協会酵母で大きな違いはないようであった。なお、粕歩合については、経過簿に記載のあった製造場 (16 場) についての集計では、変異株で大きな差はなかった。

2. 生成酒の一般成分

ALM 91, K 9-M 12, ALM 101 の 3 株での生成酒の

一般分析値をそれぞれ Table 1~3 に示した。ALM 91 ではアミノ酸度がやや高いこと以外は成分的に K-9 と同様なものであった。K 9-M 12, ALM 101 では親株と大きな差は認められなかった。

3. 生成酒のウレアおよび ECA 含量

Table 4~6 にこれら 3 株による生成酒のウレア、ECA 含量、官能評価および醪での酵母純度を示す。対照酒のウレア含量は 17~32 ppm, 平均で 23~28 ppm で

Table 4 Urea, ECA and Sensory Score of Sake Brewed with the Mutant (ALM 91) from Kyokai No.9, and Characteristics of Sake Brewing.

Factories	Strains	Polishing ratio (%)	Total rice (kg)	Seed mash	Purity of strain (%)	Fermentation period (day)	Urea (ppm)	ECA (ppb)	Sensory score
1 K-A	ALM 91	60	9,000	<i>Koon-toka</i>	100	21	ND	ND	2.0
	K-9					22	23.5	70.3	2.0
2 K-B	ALM 91	65	3,800	<i>Sokujo</i>	NT	22	ND	ND	2.3
	K-9					22	23.2	89.0	1.7
3 O-C	ALM 91	—	1,000	<i>Koboshikomi</i>	94	18	ND	ND	2.3
	K-9					19	31.7	104.0	1.9
4 S-D	ALM 91	70	2,820	<i>Sokujo</i>	100	20	ND	ND	3.1
	K-9					20	26.0	82.0	2.7
5 K-E	ALM 91	70	16,500	<i>Sokujo</i>	72	19	5.6	32.1	2.0
	K-9					19	17.6	80.5	2.0
6 T-F	ALM 91	—	2,400	<i>Sokujo</i>	70	24	4.2	19.8	2.2
	K-9					24	22.9	77.8	2.2
7 K-G	ALM 91	55	2,000	<i>Koon-toka</i>	93	20	5.0	19.1	2.1
	K-9					19	17.4	65.2	2.8
8 K-H	ALM 91	60	13,000	<i>Koboshikomi</i>	100	18	ND	ND	3.2
	K-9					16	34.3	137.3	2.2
Average	ALM 91				89.9	20.3	ND	8.9	2.4
	K-9					20.1	24.6	88.3	2.2

NT : Not tested, ND : Not detected.

Table 5 Urea, ECA and Sensory Score of Sake Brewed with the Mutant (K9-M12) from Kyokai No.9 and Characteristics of Sake Brewing.

Factories	Strains	Polishing ratio (%)	Total rice (kg)	Seed mash	Purity of strain (%)	Fermentation period (day)	Urea (ppm)	ECA (ppb)	Sensory score
1 O-I	K9-M12	65	8,700	<i>Sokujo</i>	95	22	ND	ND	2.2
	K-9					20	20.2	70.7	2.4
2 S-J	K9-M12	60	2,910	<i>Sokujo</i>	100	23	ND	ND	2.0
	K-9					21	30.7	142.5	2.0
3 S-K	K9-M12	60	1,500	<i>Sokujo</i>	100	24	ND	ND	3.4
	K-9					24	26.6	74.9	2.3
4 N-L	K9-M12	—	2,160	<i>Koboshikomi</i>	100	23	ND	ND	2.0
	K-9					20	28.3	134.6	1.5
5 K-M	K9-M12	60	3,130	<i>Sokujo</i>	NT	14	ND	ND	2.6
	K-9					20	19.2	76.6	2.0
6 H-N	K9-M12	60	2,800	<i>Sokujo</i>	81	22	4.3	ND	3.2
	K-9					22	22.6	95.6	2.8
7 T-O	K9-M12	50	1,250	<i>Koboshikomi</i>	100	21	ND	ND	3.1
	K-9					19	16.4	41.0	2.0
8 F-P	K9-M12	60	840	<i>Koboshikomi</i>	100	23	ND	ND	2.2
	K-9					21	18.3	57.0	2.4
Average	K9-M12				96.6	21.5	ND	ND	2.6
	K-9					20.9	22.8	86.6	2.2

NT : Not tested, ND : Not detected.

あったが、変異株による生成酒のほとんどがウレアは不検出もしくは、微量であった。ECA も対照酒で平均 90~100 ppb 検出されたのに対し、変異株を使用したものでは、ほとんどのものが不検出であった。しかし、ウレアが微量検出された 4 点の醪では使用した変異株の酵

母純度が 72, 70, 93, 81% とやや低く、親株等の混入が考えられた。これらの生成酒を加熱し生成する ECA を測定したところ、そのうち、3 点で 19~32 ppb 検出された。

Table 6 Urea, ECA and Sensory Score of Sake Brewed with the Mutant (ALM 101) from Kyokai No. 10 and Characteristics of Sake Brewing.

Factories	Strains	Polishing ratio (%)	Total rice (kg)	Seed mash	Purity of strain (%)	Fermentation period (day)	Urea (ppm)	ECA (ppb)	Sensory score
1 K-A	ALM 101	65	3,800	<i>Sokujo</i>	NT	27	ND	ND	2.5
	K-10					27	19.7	79.3	2.3
2 O-B	ALM 101	—	1,000	<i>Koboshikomi</i>	100	21	ND	ND	1.9
	K-10					20	32.7	129.8	2.1
3 O-C	ALM 101	—	1,650	<i>Sokujo</i>	99	19	ND	ND	2.1
	ALM 101				96	19	ND	ND	1.6
	K-10					19	30.0	96.6	2.7
4 S-D	ALM 101	60	1,500	<i>Sokujo</i>	98	24	ND	ND	2.8
	K-10					24	27.3	134.5	3.0
5 T-E	ALM 101	70	4,650	<i>Sokujo</i>	84	21	ND	ND	3.7
	K-10					21	30.2	76.2	3.3
Average	ALM 101				95.4	21.8	ND	ND	2.4
	K-10					22.2	28.0	103.3	2.7

NT: Not tested, ND: Not detected.

4. 官能評価

ALM 91, K 9-M 12, ALM 101 の5段階評価によるきき酒評点は各平均点で 2.4, 2.6, 2.4 と“普通”から“良い”というものであった。このときの対照酒の平均点は 2.2, 2.2, 2.7 であり、9号由来の2株では、やや対照酒の方が、10号由来の株では変異株による清酒の方が良好という結果であった (Table 4~6)。個々の製造場によるばらつきもあるので、品質に差があるかどうかを統計的に明らかにするために平均値の差の検定を行った。Table 7 に示すように3株のいずれも 1% および 5% の危険率で両者に差があるとはいえないという結果が得られた。すなわち、協会 10号由来の変異株による清酒が良いということもいえないが、協会 9号由来の変異株による清酒が悪いともいえないという結果であった。

考 察

協会 9号から2株の変異株、協会 10号から1株の変異株を用いて全国の清酒製造場、8場、8場、5場、合計 18 場 (延べ 21 場) で実地醸造試験を行った。これまで、総米 200 g の小仕込で得られている発酵特性、一般分析値、官能評価等は親株である協会酵母と同一で、ウレアと ECA を含まない清酒が製造可能という結果が、実地醸造でも確認された。

実施していただいた製造場での指摘事項を Table 8 にまとめた。一般的に清酒酵母から変異株を取得し、清酒醸造を行うと発酵が鈍くなる傾向がある。今回の試験でもこの点が重要なポイントと考えていたが、醪日数などでは、変異株で特に差はなく醪管理で十分対応できるものと判断された。発酵特性については、遺伝子破壊株の小仕込試験で親株と全く同一の経過を示したことからア

Table 7 Comparison of Sensory Scores between Sake with *car1* Mutants and their Parent Strains.

	Average scores	N	ϕ
ALM 91	2.4	8	0.9806
K-9	2.2	8	$\phi 14$ (0.05; 2.125 : 0.01; 2.977)
K9-M12	2.6	8	1.6864
K-9	2.2	8	$\phi 14$ (0.05; 2.145 : 0.01; 2.977)
ALM 101	2.4	6	-0.6270
K-10	2.7	5	$\phi 9$ (0.05; 2.262 : 0.01; 3.250)

The sakes brewed were estimated by a sensory test, and it was tested whether there is a difference of the quality by the testing of average difference or not. These results suggested that the sake with the mutants has good quality as the sake with its parent strain.

Table 8 Comments for *car1* Mutants by Sake Brewers.

Comment	Number of factories		
	ALM 91	K9-M12	ALM 101
A little weaker fermentability at the final stage	2	1	2
A little weaker fermentability	1	—	—
Weaker growth in seed mash	2	1	—
No difference or good fermentability	—	3	—
No comment	3	3	3

ルギナーゼ自身は清酒の発酵速度等には関与していないと考えていたことがほぼ確認された。EMS 変異処理により協会 9号から取得した ALM 91 では、酒母や醪での切れがやや悪いという指摘が5場でなされた。一方、

協会9号由来で変異処理をせずに取得した K 9-M 12 では、やや切れが悪いという指摘は2場であり、逆に切れが良いという指摘は3場あったことから ALM 91 は変異株の取得過程で発酵特性に関する遺伝子にも欠損がはいっていることが考えられた。

一方、清酒醸造における酵母細胞でのアルギナーゼの働きを考えた場合、酒母や醪末期でのN源利用として液胞内貯蔵アミノ酸³¹⁾の代表であるアルギニンの利用が考えられるので、酒母や醪末期でのアルギナーゼの働きは清酒醸造でも無視できないかもしれない。

現在清酒からのウレアの減少法としてウレアーゼが使用されているが、生成酒の酵素剤処理、それに付随したオリ下げ濾過が必要である。今回のウレア非生産性清酒酵母の使用によりこれまでとまったく同様な製造でウレアを含まない清酒の製造が可能であり、これにより火入れ後、長期に貯蔵しても ECA の生成のない清酒の製造が可能であることが確認された。

終わりに、実地醸造試験を行うにあたりご協力いただいた国税庁鑑定企画官室、全国国税局鑑定官室の皆様、仕込試験を行っていただいた製造場の皆様に感謝いたします。

要 約

1. 清酒酵母協会9号, 10号由来のアルギナーゼ欠損変異株 (*car1* 変異株) はウレアを生成しない。このウレア非生産性清酒酵母を用いた実地醸造試験を全国の延べ21場の製造場で実施した。

2. この変異株を使用することにより、ウレアを含まない清酒の製造が可能であった。対照酒が約 100 ppb の ECA を生成する加熱条件処理によってもウレアを含まない清酒からは ECA は検出されなかった。

3. ウレア非生産性清酒酵母による醪の発酵経過、生成酒の一般成分、きき酒結果等、親株と大きく変わった点は認められなかった。

4. 醪末期に切れが鈍るという指摘が3株ともあったことから、アルギナーゼ自身が醪末期では必要とされる場合があることが推定された。しかし、通常の仕込方法では、十分に良好な清酒が得られることが明らかとなった。

文 献

- 1) C. S. OUGH, E. A. CROWELL, B. R. GUTLOVR : *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, 239 (1988)
- 2) F. F. MONTEIRO, E. K. YROUSDALE, L. F. BISSON : *Am. J. Enol. Vitic.*, **40**, 1 (1989)
- 3) I. M. TEGMO-LARSSON, T. HENICK-KLING : *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 269 (1990)

- 4) F. F. MONTEIRO, L. F. BISSON : *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 199 (1991)
- 5) H. L. RIFFKIN, R. WILSON, T. A. BRIGHURST : *J. Inst. Brew.*, **95**, 121 (1989)
- 6) J. H. RIFFKIN, R. WILSON, D. HWOIE, S. B. MULLER : *J. Indt. Brew.*, **95**, 115 (1989)
- 7) R. I. AYLOTT, G. C. COCHRANE, M. JfLEONARD, L. S. MACDONALD, W. M. M. MACKENZIE, A. S. MCNEISH, D. A. WALKER : *J. Inst. Brew.*, **96**, 213 (1990)
- 8) W. M. MACKENZIE, A. H., CLYNE, L. S. MACDONALD : *J. Inst. Brew.*, **96**, 223 (1990)
- 9) R. COOK, N. MCCAIG, J. M. B. MCMILLAN and W. B. LUMSDEN : *J. Inst. Brew.*, **96**, 233 (1990)
- 10) D. J. MCGILL, A. S. MORLEY : *J. Inst. Brew.*, **96**, 245 (1990)
- 11) 原 昌道, 高橋康次郎, 吉沢 淑 : 醸協, **83**, (1) 64 (1988)
- 12) 原 昌道, 吉沢 淑, 中村欽一 : 醸協, **83**, (1) 57 (1988)
- 13) 吉沢 淑, 高橋康次郎 : 醸協, **83**, (1) 69 (1988)
- 14) 原 昌道, 飯村 稔, 五味勝也, 吉沢 淑, 中村欽一 : 醸協, **83**, (5) 351 (1988)
- 15) 原 昌道, 飯村 稔, 五味勝也, 吉沢 淑, 中村欽一 : 醸協, **83**, (5) 355 (1988)
- 16) 吉沢 淑, 高橋康次郎 : 醸協, **84**, (3) 192 (1989)
- 17) 田中準浩, 永井英雄, 中沢英五郎, 三島秀夫, 竹村成三 : 醸協, **84**, (6) 413 (1989)
- 18) H. OYASHIKI, M. UCHIDA, T. TAKAYAMA, A. OBAYASHI, S. OKA : *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 1126 (1991)
- 19) K. KITAMOTO, K. ODA, K. GOMI, K. TAKAHASHI : *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 301 (1991)
- 20) 小田佳緒子, 北本勝ひこ : 醸協, **86**, (2) 99 (1991)
- 21) C. S. OUGH, G. TRIOLI : *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, 303 (1988)
- 22) S. FUJINAWA, G. BURNS, P. D. L. TEJA : *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 350 (1990)
- 23) I. M. TEGMO-LARSSON, T. HENICK-KLING : *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 1898 (1990)
- 24) 吉沢 淑, 高橋康次郎 : 醸協, **83**, (2) 142 (1988)
- 25) 下飯 仁, 近藤洋大, 山崎厚夫, 家藤治幸, 佐藤俊一, 蓼沼 誠, 原 昌道, 吉沢 淑 : 醸協, **84**, (6) 418 (1989)
- 26) T. SUZU, Y. IIMURA, K. GOMI, K. TAKAHASHI, S. HARA, K. YOSHIZAWA, G. TAMURA : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 537 (1990)
- 27) K. KITAMOTO *et al.* : (*J. Ferment. Bioeng.*) 投稿中
- 28) 北本勝ひこ, 宮崎佳緒子, 山岡 洋, 五味勝也, 熊谷知栄子 : 醸協, **87**, (8) 598 (1992)
- 29) 注解編集委員会編 : 国税庁所定分析法注解, (財) 日本醸造協会
- 30) 加藤 泉, 下飯 仁, 蓼沼 誠, 原 昌道, 吉沢 淑, 田村學造 : 醸協, **84**, (5) 349 (1989)
- 31) 北本勝ひこ : 醸協, **84**, (6) 367 (1989)