

やまぐち山麩酵母の選抜と実用化に向けた研究

田中淳也*, 有富和生*2, 永山貴博*3, 仲間史彦*4

Research for the Selection and Practical Use of *Yamaguchi Yamahai* Yeast
Junya Tanaka, Kazuo Aritomi, Takahiro Nagayama, Fumihiko Nakama

1. 緒言

清酒の課税移出数量は、昭和50年代をピークに減少の一途をたどっている。清酒の消費低迷を打開するため、各酒造会社ではこれまでの「蔵の味」を維持・向上させるとともに、より個性を持たせた様々なタイプの商品開発に力を入れている。その一つとして伝統的製造方法である生酛造り、山麩造りの清酒製造に取り組む酒造会社が増加してきた。一方で、醸造に使用される酵母の多くは(公財)日本醸造協会が頒布する酵母であり、酒質が画一的になるため他社との差別化が難しいという課題があった。

そこで、当センターでは、腐造を防ぎ、協会酵母とは異なる酒質を醸す「やまぐち山麩酵母」の開発を実施した。

2. 試験方法

本試験に供した酵母は、平成23年度に実施した「山麩仕込優良酵母の分離」¹⁾においてアルコールの生成能力を指標としたスクリーニングで良好な性質を示した5株(NKYB4, NKYB6, HPB1, MT1PB9, B6)を分離酵母として使用した。生理特性を比較する対照として、協会酵母7号(以下、K-7)および協会酵母9号(以下、K-9)を使用した。

2.1 分離酵母の生理特性

2.1.1 麴エキスの調製方法

乾燥麴(精米歩合60%:徳島製麴(株))500gに3倍量の超純水を加え、50℃で5時間温浴して糖化させた糖化液を遠心分離し、得られた上清を0.45μmメンブレンフィルター(アドバンテック東洋(株))を用いてろ過し調製した。

2.1.2 酸耐性試験

麴エキスをL-乳酸を加えて、pH2.8(酸度9.4)、pH2.7(酸度13.7)、pH2.6(酸度15.9)の麴エキス培地を調製した。これらの培地を96穴マイクロプレートに270μl分注し、 1.0×10^5 個の酵母を添加し28℃で培養した。酵母の増殖の確認は、プレートリーダー(PowerWaveX340:バイオテック社)を用いて600nmにおける濁度を12時間ごとに測定した。

2.1.3 アルコール耐性試験

麴エキスをエタノールを加えて、エタノール濃度がそれぞれ16%、18%、20%の麴エキス培地を調製した。これらの培地を96穴マイクロプレートに270μl分注し、 1.0×10^5 個の酵母を添加し28℃で培養した。酵母の増殖の確認は、プレートリーダーを用いて600nmにおける濁度を12時間ごとに

測定した。

2.1.4 濃糖耐性試験

麴エキスをグルコースを加えて、グルコース濃度がそれぞれ15%、17%、20%、22%、25%の麴エキス培地を調製した。これらの培地を96穴マイクロプレートに270μl分注し、 1.0×10^5 個の酵母を添加し28℃で培養した。酵母の増殖の確認は、プレートリーダーを用いて600nmにおける濁度を12時間ごとに測定した。

2.2 TTC染色法による協会酵母との識別試験

麴エキスを各酵母を接種し、28℃で一昼夜振盪培養したものを10,000倍に希釈してTTC(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride)下層培地に数滴塗布し、28℃で2日間培養した。その後、TTC上層培地を重層し28℃で2時間放置し、コロニーの染色を確認した。

2.3 キラー性試験

メチレンブルーを0.003%含むYPD寒天培地上にK-7およびK-9と分離酵母が交差するように線状に塗抹し、28℃で48時間培養した。分離酵母とK-7、K-9が接触する部分のクリアゾーンの有無によりキラー性を判断した。

2.4 酵母の同定および協会酵母との相違の確認試験

株式会社テクノスルガ・ラボに委託し、光学顕微鏡(BX51:オリンパス(株))による形態観察および26S rRNA-D1/D2塩基配列解析による同定試験を行った。また、PFGE(pulsed-field gel electrophoresis)法を用いた染色体DNAの核型解析を行い、分離酵母とK-7およびK-9との相違について確認した。

2.5 小仕込み試験

三段仕込みによる総米1kgの小仕込み試験を行った。仕込み配合を表1に示す。原料米はα化米(精米歩合60%:徳島製麴(株))、麴は乾燥麴(精米歩合60%:徳島製麴(株))を使用した。仕込み時の品温は、初添13℃、仲添10℃、留添7℃とし、留添後は1℃/日で昇温させ、もろみ8日目に最高品温15℃に達するよう調整した。最高品温を5日間維持した後、徐々に温度を下げ、もろみのアルコール濃度が15%に達した時点で上槽した。上槽には遠心分離機(Avanti HP-

表1 仕込み配合

	初添	仲添	留添	計
総米(g)	180	350	470	1,000
蒸米(g)	120	280	390	790
麴米(g)	60	70	80	210
汲水(ml)	350	450	500	1,300

* 企業支援部食品技術グループ

*2 企業支援部技術相談室

*3 株式会社永山本家酒造場

*4 酒井酒造株式会社

25I: (株)ベックマンコールター)を使用した。製成酒の一般成分は国税庁所定分析法²⁾に則って測定し、香気成分はガスクロマトグラフ(バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド社製)を用いて測定した。

2・6 試験醸造

山麩仕込みにより総米 50kg の醸造試験を行った。仕込み配合を表 2 に示す。原料米は山田錦(精米歩合 60%)を使用した。酒母は蒸米、米麴、水を混ぜ合わせ、清酒用乳酸菌 *Lactobacillus sakei* を 1.0×10^3 個/麴米 kg となるように添加した。酒母の仕込み時の品温は 8℃とし、5 日目まで 8℃を維持した。その後、1℃/日で昇温させ、酸度が 3.0ml を超えた時点で 2 分割し、 5.0×10^8 個/酒母総米 kg となるように分離酵母と K-7 を添加した。4 日間かけて酒母温度を 20℃まで昇温させ、酒母のアルコール濃度が 10%を超える直前で 7℃まで冷却し、枯らし期間とした。酒母完成時の酵母の生菌率は、顕微鏡(BX51: オリンパス(株))を用いてメチレンブルー染色法により行った。もろみの仕込み時の品温は、初添 13℃、仲添 10℃、留添 7℃とし、留添後は 1℃/日で昇温させ、もろみ 8 日目に最高品温 15℃に達するよう調整した。最高品温を 5 日間維持した後、徐々に温度を下げ、もろみのアルコール濃度が 16%に達した時点で上槽した。

官能評価については、山口県新酒鑑評会審査員 8 名により酸味、甘味、苦味渋味、味のバランス、濃淡の 5 項目について 5 段階で評価を行った。味については弱い(1 点)ー強い(5 点)で評価し、味のバランスについては甘味が強い(1 点)ーバランス良い(3 点)ー酸味が強い(5 点)で評価をした。また、味の濃淡については、淡麗(1 点)ー濃醇(5 点)で評価を行った。

2・7 酒造会社における製造試験

県内の酒造会社 2 社の協力を得て、実製造規模における製造試験を実施した。

株式会社永山本家酒造場では酒造好適米である雄町(精米歩合 60%)を原料とし、酒母掛米 50kg、米麴 20kg、汲み水 85L の配合で山麩造りにより酒母を製造した。水麴の酸度が 3.0ml 以上になった時点で培養した分離酵母を添加し、酒母製造期間中の酵母の生菌率について調査した。生菌率はメチレンブルー染色法により測定した。

酒井酒造株式会社では日本晴(精米歩合 70%)を掛米、山田錦(精米歩合 70%)を麴米として、表 3 に示す仕込み配合により生酏造りで製造を行った。酒母中の酵母の生菌率はメチレンブルー染色法により測定し、製成酒の一般成分は国税庁所定分析法²⁾に則って測定した。

表 2 試験醸造の仕込み配合

	酒母	初添	仲添	留添	四段	合計
総米 (kg)	4	7	15	21	3	50
蒸米 (kg)	3	5	12	17	3	40
麴米 (kg)	1	2	3	4		10
汲水 (L)	5	7	19	35	4	70

表 3 酒井酒造における実地試験の仕込み配合

	酒母	初添	仲添	留添	追水	合計
総米 (kg)	30	60	115	195		400
蒸米 (kg)	20	40	90	160		310
麴米 (kg)	10	20	25	35		90
汲水 (L)	30	55	135	320	40	580

3 結果および考察

3・1 分離酵母の生理特性

3・1・1 酸耐性試験

現在、広く普及している速醸酒母では、酒母の仕込み時に乳酸を添加して pH を下げているが、生酏・山麩酒母では、酒母中で増殖した乳酸菌が生産した乳酸により pH を下げている。そのため、乳酸菌が生育している間は pH が下がり続け、速醸酒母に比べて pH の低い酒母となる³⁾。健全な生酏・山麩酒母を製造するためには、pH の低い環境下でも増殖可能な酵母であることが求められるため酸耐性試験を行った。pH2.8(酸度 9.4)の培地においては、B6 以外の分離酵母はいずれも OD600=1.4 程度まで上昇し、K-7 や K-9 と同程度の増殖が見られた(図 1A)。B6 については、緩慢な増殖となり、最終的な濁度も OD600=1.2 とやや低い値であった。pH2.7(酸度 13.7)の培地においては、NKYB4、NKYB6 および K-7 は OD600=1.2 程度まで堅調に増殖した。HPB1 と K-9 については、初期の増殖が緩慢であったものの、最終的には同程度の濁度まで増殖した。一方、MT1PB9 および B6 の増殖は低調であり、最終的な濁度も OD600=0.4 程度であった(図 1B)。pH2.6(酸度 15.6)の培地における各酵母の増殖は、pH2.7 の培地での増殖試験と同様の傾向がみられ、NKYB4、NKYB6 および K-7 は OD600=1.2 程度まで堅調に増殖した。HPB1 および K-9 については、緩慢な増殖を示し、最終的には OD600=1.0 程度であった。MT1PB9 および B6 については増殖が見られなかった(図 1C)。

以上の結果から、NKYB4 および NKYB6 は高酸度下においても増殖が旺盛であり、酸度の高くなる生酏・山麩酒母においても十分な発酵が可能であると考えられた。また、HPB1 については、増殖速度が緩慢になるものの最終的な増殖は K-7 や K-9 と同程度であり、生酏・山麩酒母の製造に耐えうると考えられた。一方で、MT1PB9 や B6 については、高酸度下で増殖が著しく低下しているため、酒母酸度が 10ml を超える生酏・山麩造りには不適であると考えられた。

3・1・2 アルコール耐性試験

アルコール耐性の弱い酵母は、もろみ末期においてアルコールの影響により弱体化し、発酵が停滞することがある。その結果、自己消化により細胞の内容物がもろみ中に漏出し、酒質を低下させることがあることからアルコール耐性試験を行った。

エタノール濃度 16%の培地においては、いずれの分離酵母も同程度の増殖を示し、最終的には OD600=1.2~1.4 程度であった。一方、K-7 および K-9 については、いずれの分

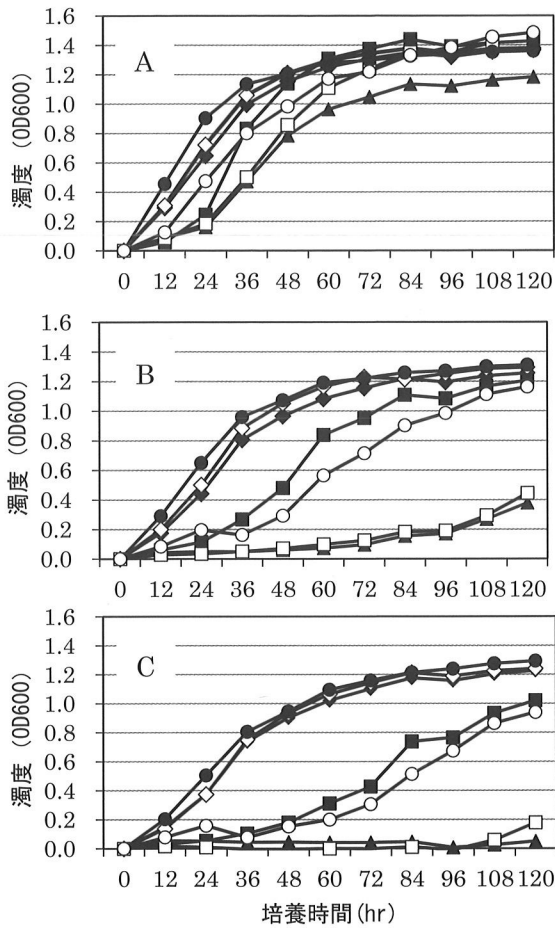


図1 pHの異なる培地における増殖曲線

A: pH2.8(酸度 9.4) B: pH2.7(酸度 13.7) C: pH2.6(酸度 15.6)

シンボル: K-7(●), K-9(○), NKYB4(◆), NKYB6(◇), HPB1(■), T1PB9(□), B6(▲)

離酵母より増殖は緩慢で、最終的な濁度は OD600=1.0 程度であった(図 2A)。エタノール濃度 18%の培地においては、B6 の増殖速度が最も早く、次いで NKYB4, NKYB6, HPB1 が緩慢な増殖を示した。一方、MT1PB9 の増殖は低調であり、最終的な濁度も他の分離酵母が OD600=0.9~1.0 であったのに対して OD600=0.5 と低く、K-7 および K-9 については、MT1PB9 よりもさらに低調な増殖を示した(図 2B)。エタノール濃度 20%の培地では、すべての酵母の増殖が低調となり、最終的な濁度も OD600=0.6~0.9 程度であった。

以上の結果から、アルコール耐性は B6 が最も強く、NKYB4, NKYB6, HPB1 が中庸、MT1PB9 が最も弱いことが分かった。これらの結果から、安定した発酵を行うためには、もろみ末期の高アルコール環境下においても生育が可能な B6, NKYB4, NKYB6, HPB1 が候補として考えられた。

3・1・3 濃糖耐性試験

生醗・山麩酒母では、酵母を添加するまでの期間は乳酸菌による乳酸発酵が行われているが、乳酸菌による糖消費よりも米の糖化が進むため、糖濃度は上昇し続ける⁴⁾。そのため、酵母を添加する時点では酒母の糖濃度が高くなっており、濃糖耐性の低い酵母は浸透圧による生育阻害を受ける

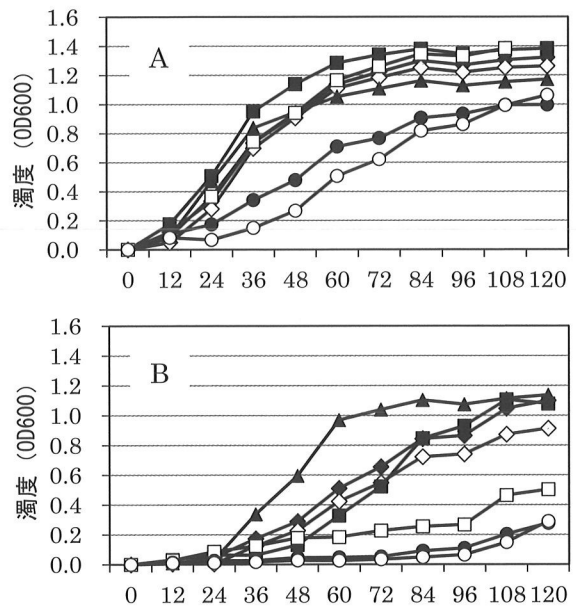


図2 エタノール含有培地における増殖曲線

A:エタノール濃度 16% B:エタノール濃度 18%

シンボル: K-7(●), K-9(○), NKYB4(◆), NKYB6(◇), HPB1(■), T1PB9(□), B6(▲)

ことが考えられた。そこで、グルコース濃度を 15~25%の間で 5 段階に調整した培地において濃糖耐性試験を行った。その結果、グルコース濃度が最も高い 25%濃度の培地においても、いずれの酵母も増殖速度に差は見られず、旺盛に増殖することが確認された(図 3)。このことから、いずれの分離酵母も濃糖状態となった酒母に添加しても、問題なく増殖できると考えられた。

3・1・4 生理的特性結果による分離酵母の選択

分離酵母の生理特性を調査した結果、酸やアルコール耐性を有する NKYB4 および NKYB6 が有力候補と考えられた。また、酸耐性は中庸であるが、アルコール耐性が強い HPB1 についても生醗・山麩造りに耐えうると考えられた。一方、B6, MT1PB9 については酸耐性が弱く、高酸度になると増殖力が著しく低下することから、生醗・山麩造りには不適と考えられた。以上の結果より、NKYB4, NKYB6 および HPB1 を「やまぐち山麩酵母」の候補株とした。

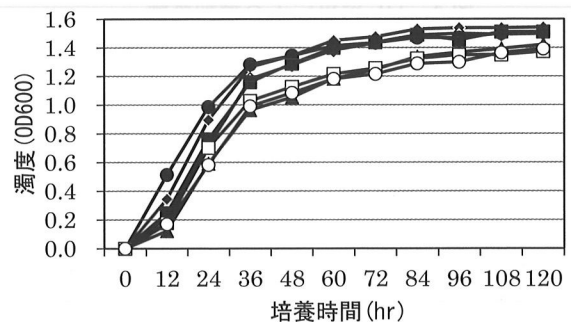


図3 グルコース 25%含有培地における増殖曲線

シンボル: K-7(●), K-9(○), NKYB4(◆), NKYB6(◇), HPB1(■), T1PB9(□), B6(▲)

3・2 TTC 染色法による協会酵母との識別試験

TTC 染色は協会酵母と野生酵母を識別する手法であり、協会酵母は赤色、その他の酵母は白～桃色に染色される。分離した酵母が協会酵母ではないことを確認するため、TTC 染色法による識別試験を行った。その結果、NKYB4 および NKYB6 が赤く染色され、HPB1, MT1PB9, B6 については白～桃色であった(図 4)。対照とした K-7 や K-9 も赤く染色されており、NKYB4 および NKYB6 については協会酵母である可能性が排除できないため候補から除外し、HPB1 を候補株とした。

3・3 キラー性試験

実際の製造現場においてキラー酵母が混入すると協会酵母の増殖を阻害し⁵⁾、発酵不良などの悪影響を及ぼすことからキラー性試験を行った。その結果、K-7 および K-9 と HPB1 との交差部分に生育阻害に伴うクリアゾーンは認められなかったため、HPB1 はキラー性を有していないと判断した(図 5)。本試験により、製造現場において問題なく使用できることが確認できた。

3・4 HPB1 の同定および協会酵母との相違の確認試験

微生物同定機関である(株)テクノスルガ・ラボにおいて、HPB1 の同定試験を行ったところ、光学顕微鏡を用いた形態観察により *Saccharomyces cerevisiae* の特徴的な性質である子嚢形成および出芽型増殖が確認された(図 6)。また、26S rRNA-D1/D2 塩基配列解析による同定の結果、*Saccharomyces cerevisiae* との相同率は 100%(国際塩基配列データベース)であった。これらの結果を踏まえ、HPB1 は *Saccharomyces cerevisiae* と同定され、一般的に清酒製造に用いられる協会酵母と同属種であることが確認された。前述のキラー性試験の結果と同様、製造現場において問題なく使用できることが確認できた。

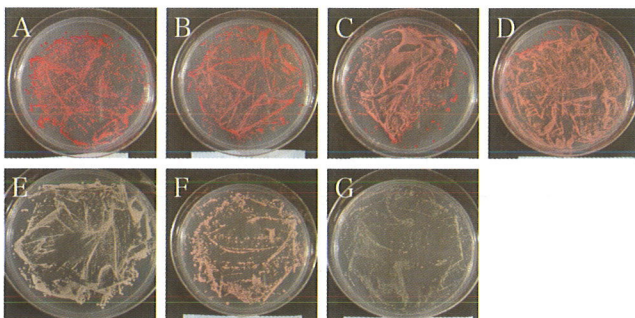


図 4 TTC 染色による識別試験

A : K-7 B:K-9 C : NKYB4 D: NKYB6 E : HPB1 F : MT1PB9 G : B6

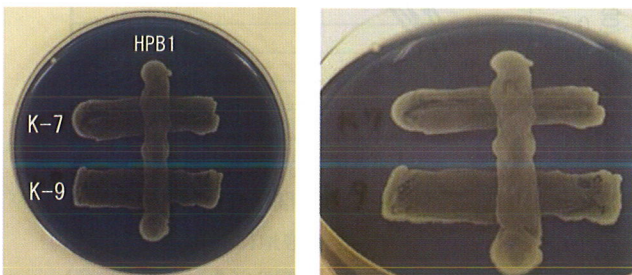


図 5 交差培養の様子

また、PFGE 法による染色体 DNA の核型解析を行った結果、HPB1 と K-7 のバンドパターンにいくつかの相違がみられた(図 7)。K-7 では 610 Kb 付近に見られるバンドが、HPB1 では 565Kb 付近で見られた。また、285Kb～365Kb 間で見られるバンドについても、検出位置に相違が見られた。一方で、K-7 と K-9 については類似したバンドパターンが得られた。K-7 と K-9 は遺伝子的に非常に近縁であるため⁶⁾、本解析においても類似のバンドパターンが得られたものと推察された。K-9 をはじめとする実用清酒酵母(協会酵母)の多くは、K-7 と遺伝的に近縁な菌株とその派生株であるため、HPB1 は協会酵母とは異なる菌株であると推察された。

3・5 小仕込み試験

HPB1 については K-7 よりも旺盛な発酵経過をたどり、もろみのアルコール濃度が 15%に達した 18 日目で上槽した。K-7 については 21 日目に上槽した(図 8)。平成 23 年度に実施した山廃仕込用優良酵母の選抜では、もろみの初期および後期におけるアルコール生成能力の高さを指標としていることから、今回の小仕込み試験においても、K-7 と比較して HPB1 の発酵経過が早かったものと推察された。製成酒の一般成分および香気成分の測定結果を表 4 に示す。アルコ

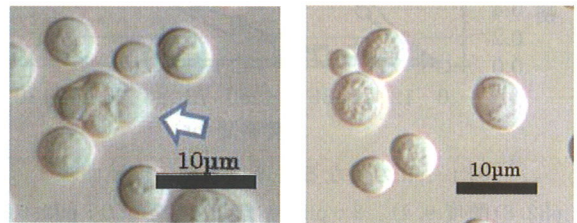


図 6 HPB1 の形態観察

左 : 子嚢胞子を形成している様子(矢印部分)
右 : 酵母から娘細胞が出芽している様子

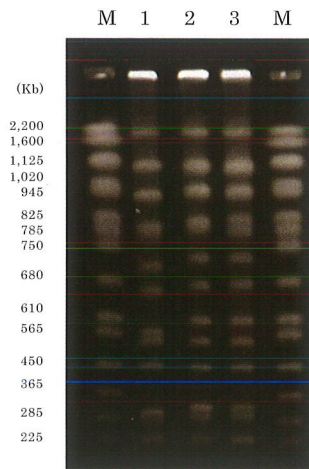


図 7 PFGE 法による電気泳動像(染色体電気泳動核型)

M : BioRad Size Standard(*Saccharomyces cerevisiae*)

1 : HPB1 2 : K-7 3 : K-9

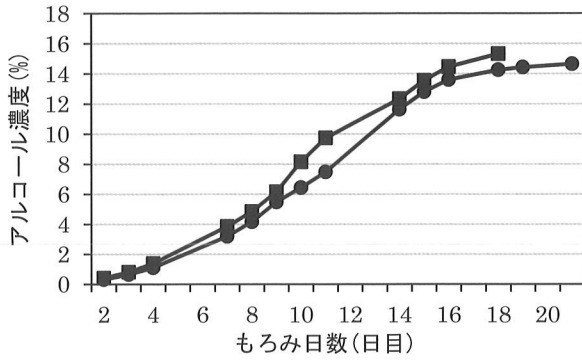


図8 もろみのアルコール濃度の推移(小仕込み試験)
K-7(●), HPB1(■)

表4 製成酒の一般成分および香り成分(小仕込み試験)

	HPB1	K-7
アルコール(%)	18.1	15.2
日本酒度	-2.9	-30.4
酸度(ml)	2.7	2.7
アミノ酸度(ml)	1.6	1.8
カプロン酸エチル(ppm)	0.8	1.2
酢酸イソアミル(ppm)	1.7	4.0
酢酸エチル(ppm)	65	71

アルコール濃度については、HPB1が18.1%、K-7が15.2%であった。酸度およびアミノ酸度については両者とも同程度であった。また、吟醸香であるカプロン酸エチルや酢酸イソアミルについては、それぞれ0.8ppm、1.7ppmと低いことから、HPB1は吟醸香と呼ばれる香り成分の生成能力が高くないことがわかった。

3・6 試験醸造

酒母完成時におけるメチレンブルー染色試験の結果から、HPB1の生菌数は 1.2×10^8 個/酒母1g(生菌率95%)であり、K-7(生菌数 1.1×10^8 個/酒母1g, 生菌率91%)と同程度で、完成までの製造日数や諸成分についても顕著な差は見られなかった。

HPB1の発酵経過はK-7に比べて1~2日早く進んだが、概ね同様の発酵経過であった。製成酒の一般成分を表5に示す。いずれの成分についても酵母間で顕著な差はみられなかった。

香り成分については、小仕込み試験の結果と同様、吟醸香であるカプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルの生成量はそれぞれ0.6ppm、1.7ppmと低かった。官能評価の結果、味やバランスについては同様の評価であった。味の濃淡については、HPB1の評価点が3.9点であったのに対し、K-7では2.6点でありHPB1のほうが濃醇と評価された(表6)。

3・7 酒造会社における製造試験

3・7・1 (株)永山本家酒造場における山麴酒母製造試験

酒母日数20日目(酵母添加後7日目)における酵母の生菌数は 7.9×10^7 個/酒母1gであり、初添の前日(酵母添加後14日目)の酵母の生菌数は、 1.1×10^8 個/酒母1g(生菌率93%)

表5 製成酒の一般成分および香り成分(試験醸造)

	HPB1	K-7
アルコール (%)	16.5	16.6
日本酒度	-12.4	-11.7
酸度 (ml)	2.8	2.8
アミノ酸度 (ml)	1.8	1.8
カプロン酸エチル(ppm)	0.6	1.0
酢酸イソアミル(ppm)	1.7	3.0
酢酸エチル(ppm)	60	68

表6 官能評価得点(平均値)

	HPB1	K-7
酸味	3.8	3.6
甘味	3.2	2.8
苦味渋味	2.8	2.8
バランス	3.2	3.6
濃淡	3.9	2.6

であった(図9)。当センターでの試験醸造における酒母の生菌数・生菌率と同程度であり、実製造規模においても生菌数および生菌率の確保が可能であることが確認された。初添使用までに要した酒母の製造期間は27日であり、ポーメ度が6.2、アルコール分が11.4%、酸度が10.1mlであった。他の酵母を用いた山麴造りと比較して、成分の変化に顕著な差はなく、また、酒母製造中の酸度の急な上昇や異臭、状態の異変等はみられなかったことから、安全な酒母製造ができたものと考えられた。

3・7・2 酒井酒造(株)における生醗造り醸造試験

初添の前日における酒母中の酵母の生菌数は、 2.1×10^8 個/酒母1g(生菌率99%)であり、酵母の量・生菌率ともに良好であった。初添使用までに要した酒母の製造期間は26日と通常の製造期間と同程度であり、状態や成分についても顕著な差はみられなかった。一方、HPB1を使用したもろみでは、9E酵母(山口県独自の泡あり酵母)に比べて粘稠な高泡を形成し(図10)、さらにその期間が長かった

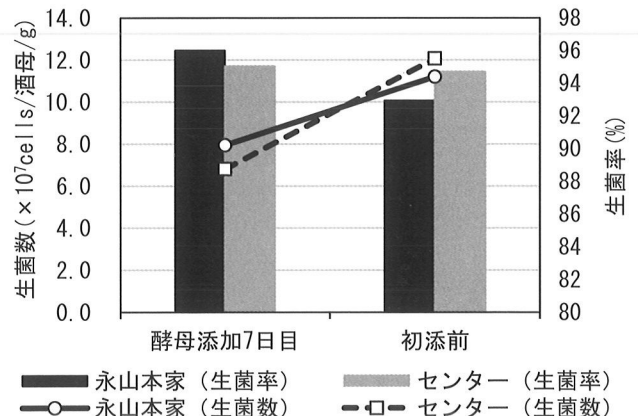


図9 酒母における酵母の生菌数および生菌率

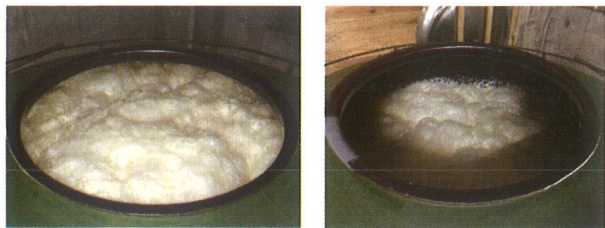


図 10 もろみの状態

左：HPB1 を用いたもろみ 右：9E 酵母を用いたもろみ

表 7 製成酒の一般成分

	HPB1	9E
アルコール(%)	17.5	17.1
日本酒度	2.5	0.5
酸度(ml)	2.6	1.6
アミノ酸度(ml)	2.1	1.9

め、もろみ中期におけるボーメ度の下降やアルコール濃度の上昇が緩慢であった。泡が消失した15日目以降はボーメ度の下降やアルコール濃度の上昇が進み、もろみ30日目で上槽した。製成酒の成分を比較すると、HPB1の酸度は2.6ml、アミノ酸度は2.1mlであったのに対し、9E酵母では1.6ml、アミノ酸度は1.9mlであった(表7)。高泡を形成している間、酵母は泡の表面に付着しており、好気条件下に置かれることとなる。結果として、酵母はアルコール発酵ではなく、好気呼吸によりエネルギーを獲得するようになるため、有機酸の生成が増加し、酸度やアミノ酸度が高くなるといわれている⁷⁾。HPB1を用いた製造では、9E酵母に比べて泡が高く、かつ長期間にわたったことから、酸度やアミノ酸度の高い濃醇タイプの酒質となったものと考えられた。

昨今の清酒製造現場においては、作業性や経済性などの理由から、泡なし協会酵母が広く利用されている。そのため、淡麗な酒質になりやすく、他商品との差別化も難しくなると考えられることから、HPB1を利用することにより特徴的な清酒の開発ができる。

4. 結 言

協会酵母とは異なる酒質の生酏・山廃清酒を製造しうる山口県オリジナルの酵母を取得するため、県内酒造会社の酒母およびもろみから酵母の分離を実施した。得られた酵母のうち、アルコール生成能力を指標として選抜し、K-7と比較して優れていた5株を候補とした。さらに、酸、濃糖やアルコールへの耐性を調査し、生酏・山廃造りでみられる過酷な環境に耐えうる株(HPB1)を選抜した。HPB1の遺伝子解析やキラー性を調べた結果、非キラー性の *Saccharomyces cerevisiae* であり、協会酵母とは異なる株であることが確認された。酒造会社にて本酵母を使用した実製造規模の仕込みを行った結果、酒母完成時における生菌数は $1.0 \sim 2.0 \times 10^8$ 個/酒母1g(生菌率90%)となり、生菌数・生菌率ともに良好であった。協会酵母などを用いた製造に比べて状態・成分ともに顕著な差はなかった。一方、HPB1を使用したもろみでは長期間にわたり粘稠な高泡を形成し、他の酵母では見られない特徴的な状態を呈した。それにより酸度、アミノ酸度が高い濃醇タイプの酒質となったと推察された。今後、県独自の酵母としてブランド化を図るとともに、酵母の特徴を活かした差別化された商品の開発に寄与したい。

本研究の遂行にあたり、実製造規模での醸造試験にご協力いただいた株式会社永山本家酒造場、酒井酒造株式会社の皆様に感謝いたします。また、官能評価へご協力いただきました酒造関係者の皆様に感謝いたします。

参考文献

- 1) 有富和生：山口県産業技術センター研究報告，24，p21-23(2012)
- 2) 第四回改正国税庁所定分析法注解，p7-33(1993)
- 3) 黒須猛行：日本醸造協会誌，93，p335-343(1998)
- 4) 伊藤一成，産本弘之，三宅剛史：岡山県工業技術センター報告，38，p5-8(2012)
- 5) 改訂 清酒酵母の研究，清酒酵母研究会 編(1980)
- 6) 赤尾健：化学と生物，52，p223-232(2014)
- 7) 北垣浩志：生物工学会誌，87，p66-71(2009)