

芋焼酎醪へのプロテアーゼ剤添加による揮発成分と官能評価への影響

白石洋平^{1,3}・安藤有加²・奥津果優²・吉崎由美子²・二神泰基²・玉置尚徳²・和久豊³・高峯和則^{2*}
(¹ 鹿児島大学大学院連合農学研究科,² 鹿児島大学農学部附属焼酎・発酵学教育研究センター,³ 株式会社ビオック)

平成 28 年 6 月 23 日受理

Effects of the addition of a protease agent to *imo-shochu moromi* on the volatile compounds and sensory characteristics of *imo-shochu*.

Yohei SHIRAISHI^{1,3}, Yuka ANDO², Kayu OKUTSU², Yumiko YOSHIZAKI², Taiki FUTAGAMI², Hisanori TAMAKI², Yutaka WAGU³ and Kazunori TAKAMINE²

(¹The United Graduate School of Agricultural Sciences, Kagoshima University, 1-21-24, Korimoto, Kagoshima, 890-0065

²Education and Research Center for Fermentation Studies, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24, Korimoto, Kagoshima, 890-0065

³Bio'c Co., LTD, 111-1, Murocho-Uchida, Toyohashi, Aichi, 441-8087)

Aiming to diversify the flavor of *imo-shochu*, we added protease to the *imo-shochu moromi* (*moromi*) and investigated the flavor of *imo-shochu*. First, we selected four enzyme agents by protease activities and prepared *imo-shochu* with these enzyme agents. The viscosity of *moromi* was decreased and alcohol contents of *moromi* were increased by the addition of the enzyme. GC-MS analysis revealed that higher alcohol concentrations in *imo-shochu* without an enzyme agent were 1.2-2.5 times higher than that in *imo-shochu* with an enzyme agent. Concurrently, aldehyde concentrations in *imo-shochu* with an enzyme agent were 1.5-4.5 times higher than that in *imo-shochu* without an enzyme. Results of sensory evaluations showed that *imo-shochu* with an enzyme agent was judged as fruity with a baked aroma. Since amino acid concentrations were higher in *moromi* with an enzyme agent, we investigated the effects of amino acid on aldehydes formation during distillation.

Key words : 芋焼酎, プロテアーゼ剤, アミノ酸, 高級アルコール, アルデヒド

緒言

我が国の酒造りにおいて酵素は必要不可欠なもので、デンプン質分解酵素をはじめとする多くの研究がなされ、その効果や作用機序について解明されてきた。また、醪への酵素の添加により香気成分や醪の物性の改

善効果が認められている。例えば、芋焼酎では、醪へのβ-グルコシダーゼ添加により芋焼酎の特徴香であるモノテルペンアルコールが増加¹⁾した。また、食物繊維分解酵素添加によって醪粘度が低下し、減圧蒸留が容易となり酒質の多様化が図られる。併せて汲み水歩合の低下が可能となることで焼酎粕の排出量の削減

本論文については、*印著者あて連絡ください。

効果が期待できることが報告されている²⁾。清酒製造では、酸性プロテアーゼが蒸米に作用して、蒸米のタンパク質を減少させ、 α -アミラーゼ吸着能を低下させる働きと蒸米を崩壊させる働きによって、 α -アミラーゼの作用を受けやすくして蒸米の溶解を促進することが明らかとなっている³⁾。しかし、プロテアーゼ剤添加によるアミノ酸の増加が揮発成分の生成に与える影響については報告されていない。一部のアミノ酸は発酵過程で酵母の代謝によりアルデヒドや高級アルコールとそのエステル生成に関与している⁴⁻⁶⁾。また、焼酎製造では、蒸留過程においてメイラード反応やストレッカー分解等の加熱による食品の香りを形成する反応⁷⁾が起きるが、当該反応にはアミノ酸が大きく関与している。

そこで、芋焼酎の酒質の多様化を目的としてプロテアーゼ剤を醪に添加することで香氣成分の生成に与える影響を検討した。

実験方法

1. 酵素剤

一次醪に添加したプロテアーゼ剤は市販の11種類を用いた。また、酵素剤の酸性プロテアーゼ活性及び酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、第四回改訂国税庁所定分析法注解に従って行った⁸⁾。

2. 使用原料、菌株及び製麹条件

サツマイモは500 g前後の大きさのコガネセンガンを用いた。また、使用酵母は焼酎用酵母である鹿児島5号酵母(H5)を用いた。米は、酒造メーカーが一般的に使用している国産の加工用米を用いた。種麹は市販の白麹を用いた。製麹は恒温恒湿機にて行い、仕舞仕事までの約28時間を庫内温度35℃、湿度95%とし、仕舞仕事以降から出麹までを庫内温度30℃、湿度90%で行った。麹の品温経過は、手入れ時の盛(製麹約20時間後)で38℃を目標にし、仕舞仕事まで維持させた。仕舞仕事(製麹約28時間後)以降は35℃付近まで品温を下げて出麹(製麹42時間)まで維持した。

3. 芋焼酎の小仕込み

一次仕込みは麹米140 g相当量の米麴に汲み水168 g(内、酵母培養液2 ml)を加えた。二次仕込みでは一次醪に汲み水392 gと蒸煮・粉碎したサツマイモ700 gを加えた。30℃の温浴槽で一次醪は5日間、二次醪は9日間発酵させた。酵素剤は主原料の合計重量

の1/200量とし、一次仕込み水に懸濁した。なお、対照として酵素剤を添加しない醪を製造した。

4. 蒸留

蒸留は醪900 gを2 L容のガラス製蒸留器にて、蒸気直接吹き込みによる常圧蒸留で行った。蒸留の終点は末垂れのアルコール度数が約10%に到達した時点とした。終点のアルコール度数の測定は携帯型密度計(アントンパール社, DMA-35)を用いた。焼酎のアルコール度数の測定は、酒類用振動式密度計(DA-155 京都電子工業(株), Kyoto, Japan)を用いた。原酒をアルコール度数25%になるように脱塩水で割水し1日後、孔径5 μm のメンブレンフィルターにてろ過をして得られたろ液を芋焼酎分析試料とした。

5. 二次醪及び焼酎の分析

二次醪及び得られた芋焼酎試料の一般分析(醪アルコール、純アルコール、原酒量、原酒アルコール、取得量、蒸留歩合、pH(醪、焼酎)、酸度(醪、試留液、焼酎)、全糖、直糖、UV275に関しては、第四回改訂国税庁所定分析法⁸⁾に従って行った。

二次醪のアミノ酸及び有機酸については、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)(SHIMADZU-LC(株)島津製作所, Kyoto, Japan)を用いて定量した。サンプルはガーゼろ過した二次醪をNo.2ろ紙でろ過し、その後孔径0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過して用いた。アミノ酸組成分析については、カラムはShim-pack AMINO-NA((株)島津製作所)を用い、移動相はMM-MA液、MM-MB液(島津製作所)を使用した。0~33分(B液0%→100%)のグラジェント溶出、オープン温度は60℃、流速は0.6 ml/minで測定を行った。検出器は蛍光検出器(RF-10AXL, (株)島津製作所)を用いた。有機酸分析は、カラムはShim-pack SCR-102H((株)島津製作所)を2本連結して用いた。カラムオープン温度は50℃で、移動相は4 mM *p*-トルエンスルホン酸溶液を使用し、流速は0.8 ml/minで送液した。カラムより溶出後、反応液(4 mM *p*-トルエンスルホン酸溶液, 16 mM Bis-Tris, 80 μM EDTA 溶液)0.8 ml/minと混合し、電気伝導度検出器にて検出した(CDD-10AVP, (株)島津製作所)。

6. 焼酎香氣成分のGC-MS解析

芋焼酎試料10 mlと内部標準物質である1-pentanol(10 mg/l)1 mlを200 ml容の専用ボトルに入れ、密

閉し 30℃の恒温水槽内で 30 分以上保温した。Entech Instrument inc. の自動濃縮装置を使用してボトル内のヘッドスペースガスを 100 ml 吸引し、GC-MS に自動注入した。焼酎の揮発成分の同定および定量分析はアジレント・テクノロジー（株）の GC-MS (GC, Agilent 6890 ; MS, Agilent 5979B) により行った。成分の一次同定は、Agilent ChemStation ソフトウェアと NIST05a マススペクトルライブラリーにより行った。GC-MS 分析条件は以下の Table 1 に示した。

7. 焼酎の官能評価

官能評価試験は、アルコール濃度を 25% に統一した焼酎にて実施した。パネル 15 名にブラインドテス

トを行い、それぞれの芋焼酎について自由コメント形式で行った。なお、パネルは鹿児島県工業技術センター食品・化学部職員 4 名（内、女性 1 名）、鹿児島大学農学部附属焼酎・発酵学教育研究センター教員 3 名（内、女性 2 名）と所属学生 8 名（内、女性 7 名）であった。

実験結果及び考察

1. プロテアーゼ剤の選抜

プロテアーゼの市販酵素剤 11 種について、酸性プロテアーゼ活性及び酸性カルボキシペプチダーゼ活性を測定した結果を Table 2 に示す。酸性プロテアーゼ

Table 1 GC/MS analysis condition of the samples

Themodesorption system	Entech 7100A
Injection volume	100 ml
GC	Agilent 6890N
Column	DB-WAX (60 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film)
Carrier	Helium, 1 ml/min., constant flow mode
Oven	40℃, 5 min. hold → 3℃ /min. to 240℃ → 240℃, 5 min. hold
Analysis time	57.2 min.
Injector temperature	220℃
Transfer line	250℃
Quadruple ion trap temperature	150℃
Ion source temperature	250℃
MS	Agilent 5975B
Mode	SCAN

Table 2 Enzyme activities of enzyme agents used in this study

Enzyme agent name	Origin	Enzyme activity (U/mg)		Maker	
		APase ^{*1}	ACPase ^{*2}		
Sumizyme	ACP-G	<i>Aspergillus oryzae</i>	877	8,237	Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.
	DPP-G	<i>Aspergillus oryzae</i>	55	1,651	
	FL-G	<i>Aspergillus oryzae</i>	142	1,075	
	LPL-G	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,727	345	
	FP-G	<i>Aspergillus oryzae</i>	1,330	3,926	
	AP-G	<i>Aspergillus niger</i>	5,578	68	
Orientase	20A	<i>Aspergillus niger</i>	19,361	1,045	HBI Enzyme Inc.
	AY	<i>Aspergillus</i> sp.	24,202	1,182	
Denazyme	AP	<i>Aspergillus</i> sp.	1,355	1,058	Nagase ChemteX Corporation
Denapsine	2P	<i>Aspergillus niger</i>	1,185	13	
Protease	YP-SS	<i>Aspergillus niger</i>	7,563	56	Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.

※ 1 : Acid Protease, ※ 2 : Acid Carboxypeptidase

及び酸性カルボキシペプチダーゼ共に活性の高かった酵素剤はオリエンターゼ 20A（以下、20A）及びオリエンターゼ AY（以下、AY）であった。酸性プロテアーゼ活性が高かった酵素剤はプロテアーゼ YP-SS（以下、YP-SS）であり、酸性カルボキシペプチダーゼ活性が高かったものはスミチーム ACP-G（以下、ACP-G）であった。そこで、両酵素活性が高い、またはいずれかの活性が高いこれら 4 種類の酵素剤を実験に供した。

2. プロテアーゼ剤を併用した小仕込み試験

選抜した 4 種類のプロテアーゼ剤を醪に添加して、芋焼酎の香気に及ぼす影響を検討した。なお、酒税法及び酒類行政関係法令等解釈通達第 86 条の 5「酒類の品目等の表示義務」によると主原料の重量の 1/1,000 以下に相当する酵素は原料として取り扱わないとの記載がある。しかし、本試験では香気に与える酵素剤の影響を明らかにする為、主原料に対して 1/200 量の添加条件で実験を行った。

その結果、一次及び二次醪の発酵経過は酵素剤を添加した醪を含め良好な経過となり、酵素剤による発酵阻害は認められなかった。発酵終了時の醪及び得られた焼酎の分析結果について Table 3 示す。

醪アルコール濃度は対照の 15.1% と比べて、酵素剤添加の醪はいずれも高く、AY を添加した醪では 15.7% と最も高い値であった。醪に添加した酵素剤の量は 4.2 g であり、これが全てグルコースとみなしこ

のグルコースが全てアルコールに代謝されたと仮定すると、醪アルコールの約 0.2% 分に相当すると算出できる。しかし、酵素剤添加の醪アルコールは対照と比べてこの値以上の増加を示した。本研究において、酵素剤を添加した醪は、粘性が低下し、流動性の向上が認められた。清酒では酸性プロテアーゼは蒸米のタンパク質を減少させ、 α -アミラーゼ吸着能の低下と蒸米崩壊作用により、 α -アミラーゼの作用を受けやすくして蒸米の溶解を促進する³⁾とされている。無蒸煮アルコール発酵でも、グルコアミラーゼに酸性プロテアーゼを加えることで糖化効率及びアルコールの取得率の向上⁹⁾が、そば種子類を液化及び糖化する工程ではプロテアーゼを作用させることによって、粘度上昇が抑制されアルコール取得が増加する¹⁰⁾ことが報告されている。本研究においても、原料であるサツマイモに対して、酸性プロテアーゼが同様の働きを示し、発酵初期では液化の促進、発酵中を通してサツマイモにデンプン分解酵素が作用しやすい状況となり、部分的な繊維質の分解により発酵が促進されたと考えられた。また、使用した酵素剤には酸性プロテアーゼ及び酸性カルボキシペプチダーゼの他にも、微量ではあるがセルラーゼ等の活性を有している可能性がある。実際、セルラーゼ活性を測定すると 50 U/mg 程度の活性を有しており、それらの酵素が繊維質を分解している可能性も考えられたが、全糖の値に差異が無いことから発酵性糖を生成しているとは言えない。以上の結

Table 3 General analysis of *moromi* and *shochu*

		20A ^{*1}	AY ^{*2}	YP-SS ^{*3}	ACP-G ^{*4}	Control
<i>moromi</i>	Alcohol (%)	15.6	15.7	15.3	15.5	15.1
	pH	4.1	4.1	4.2	4.2	4.2
	Acidity (ml)	9.0	9.4	8.4	8.5	8.2
	Volatile acidity (ml)	2.5	2.6	1.9	1.8	1.9
	Total sugar (%)	1.4	1.3	1.4	1.3	1.3
	Direct sugar (%)	0.7	0.6	0.4	0.3	0.3
Total amino acid (mmol/L)	40.0	41.3	26.6	28.7	16.5	
<i>shochu</i>	Distillation rate (%)	100.5	97.6	100.6	97.5	98.5
	Yield (ml/kg)	229.3	230.4	225.3	228.6	223.1
	pH	4.1	3.8	4.0	4.0	4.0
	Acidity (ml)	1.3	1.4	1.0	0.9	0.9
	UV275	0.43	0.34	0.25	0.24	0.14

*1 : Orientase 20A, *2 : Orientase AY, *3 : Protease YP-SS, *4 : Sumizyme ACP-G

果から、芋焼酎において醪へのプロテアーゼ剤添加は粘性の低下（流動性の向上）により、酵母のグルコースからアルコールへの変換効率が高まったと推察される。

醪酸度は麹菌の生産するクエン酸に起因する。Table 3 に示すように醪酸度は酵素剤を添加した醪で高くなった。総アミノ酸濃度が対照は 16.5 mmol/L であるのに対し、酵素剤添加醪の総アミノ酸濃度は高く、AY を添加した醪が 41.3 mmol/L と最も高かったことから、醪酸度の上昇は、アミノ酸量の増加によるものといえる。揮発酸度は、醪が乳酸菌等の雑菌汚染の可能性を推察できる指標である⁸⁾。揮発酸度が 20A 添加醪と AY 添加醪で対照の約 1.3 倍高く、また、それぞれの酢酸濃度も対照の 5.6 μ mol/L に対して約 1.3 倍高かった。一方、醪中の乳酸はいずれの条件でも 5.3 μ mol/L 程度となり同濃度であった。酵母は温度や濃糖、pH のストレスを受けたときにも数値が上昇する¹¹⁾ ことから、酵素剤添加醪で揮発酸度が上昇した理由として、醪の雑菌汚染ではなく、プロテアーゼによって糖化酵素が作用しやすくなり、醪中の糖濃度がやや高くなったことが酵母のストレスとなり揮発酸度が高くなったと推察される。

醪を蒸留して得られた焼酎は、蒸留歩合がいずれも 97.5% 以上であり、良好な蒸留ができた。収得量は対照が 223.1 ml/kg に対し、酵素剤添加の焼酎はいずれも高く、中でも AY 添加醪は 230.4 ml/kg と最も高く、醪への酵素剤添加は収得量を向上させることがわかった。焼酎酸度は醪の揮発酸度と同じ傾向であり、pH には大差がなかった。波長 275 nm における吸光度

(UV275) の値は焼酎に含まれるフルフラールによるものと考えられている⁸⁾。対照と比べ酵素剤を添加した焼酎では 1.7 倍以上の値であり、最も高い 20A を添加した焼酎では 3.0 倍近い値となったことから、酵素剤を添加した焼酎のフルフラール濃度の増加が示唆された。

3. 酵素剤添加の芋焼酎の香り分析

アミノ酸の一部は発酵過程で酵母の代謝によって高級アルコールに変換⁴⁻⁶⁾される。また、蒸留過程でメイラード反応やストレッカー分解といった加熱反応によってアルデヒドに変換⁷⁾される。

そこで、芋焼酎に含まれる高級アルコール類とアルデヒド類について GC-MS を用いて分析し、その結果を Table 4 に示す。高級アルコール類は、いずれの成分とも対照が最も高い値となり酵素剤添加焼酎の 1.2 ~ 2.5 倍の濃度となった。醪中のアミノ酸濃度の増加により高級アルコールの量が増加することが期待されたが、アミノ酸濃度の低い醪の方が高い結果となった。アルデヒド類は、酵素剤を添加して製造した芋焼酎が全て対照と比べて高濃度に含まれていた。アルデヒドは、発酵中に酵母の代謝によってアミノ酸から生成¹²⁾される他に、アセトアルデヒド、イソブチルアルデヒド、2-メチルブチルアルデヒドおよびイソバレールアルデヒドは、それぞれアラニン、バリン、イソロイシンおよびロイシンからストレッカー分解により生成する⁷⁾ことが知られている。発酵終了時の醪のアミノ酸量は対照と比べ酵素剤を添加した醪では 1.5 ~ 4.5 倍に増加していた。醪中に増加したアミノ酸が発酵中に酵母による代謝と蒸留中のストレッカー分解により増加し

Table 4 Fragrance ingredient analysis in GC/MS of higher alcohols and aldehydes in *shochu*

	Peak-RI	m/z	CAS No.	20A ^{※1}	AY ^{※2}	YP-SS ^{※3}	ACP-G ^{※4}	Control
n-Propyl alcohol	(mg/l)	1040	31 71-23-8	159	155	192	161	396
i-butyl alcohol	(mg/l)	1098	43 78-83-1	423	352	347	386	610
i-amyl alcohol	(mg/l)	1216	55 123-51-3	452	363	419	446	550
Acetaldehyde	(μ g/l)	745	44 75-07-0	2,611	2,825	2,282	2,261	1,929
Isobutyraldehyde	(μ g/l)	806	43 78-84-2	172	216	139	163	129
2-Methylbutylaldehyde	(μ g/l)	909	57 96-17-3	271	307	189	211	153
Isovaleraldehyde	(μ g/l)	912	44 590-86-3	283	271	151	157	94
Furfural	(μ g/l)	1460	96 98-01-1	2,243	1,677	1,298	1,181	814
Benzaldehyde	(μ g/l)	1523	105 100-52-7	10	12	7	6	7

※ 1 : Orientase 20A, ※ 2 : Orientase AY, ※ 3 : Protease YP-SS, ※ 4 : Sumizyme ACP-G

た可能性が示唆された。フルフラールは焼酎の末垂れの主成分として知られており、末垂れカットのタイミングや常圧蒸留酒と減圧蒸留酒を区別できる成分である。20A または AY を添加して製造した芋焼酎のフルフラール濃度は対照と比べ、各々 2.8 倍および 2.1 倍高い値であった。このことから、Table 3 に示した 20A または AY を添加して製造した芋焼酎の波長 275 nm における吸光度 (UV275) の値と GC-MS の分析結果に正の相関が認められた。

4. 酵素剤を用いて作製した芋焼酎の香気成分と官能評価

官能評価試験の結果、特徴的なコメントと多数の人が指摘したコメントを Table 5 に示す。対照と比較して酵素剤を添加した焼酎では、「まろやか」、「うまみ」、「えぐみ」等の味のコメントが特徴的であった。また、香りでは対照においても「ナッツ香」とのコメントがあるが、「果実」や「香ばしさ」、「醬様」等の食品を焼いた際に感じる香りのコメントが特徴的であった。フルフラールは高濃度含まれるとオフフレーバーである「焦げ臭」の原因となるが、低濃度では「香ばしさ」、「果実様」、「甘さ」と表現され、その他のアルデヒド類の香気に関しても同様に「果実」等の特徴を有していることから、糖、アミノ酸量や組成の違いによって焼酎中に含まれるアルデヒド類に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、香りの評価において 20A と AY 添加の焼酎では「酸臭」との指摘があった。これは焼酎酸度が高かったことと一致する。また、20A 及び AY では「渋味」の指摘が多くあり、これ

は試留酸度が対照と比較して高くなったことが原因と考えられた¹³⁾。

酵素剤の添加により芋焼酎に明らかな酒質の変化が認められたことから、酒質の多様化を図れることがわかった。

要 約

芋焼酎の酒質の多様化を目的にプロテアーゼ剤を添加し、芋焼酎の仕込みを行い香気成分の生成及び香味に与える影響を検討した。まず、市販のプロテアーゼ剤 11 種類から 4 種類の酵素剤を選抜し、芋焼酎の小仕込み試験に供した。酵素剤添加醗では醗のアルコール濃度が増加し、酸性プロテアーゼにより醗の流動性が向上し、アルコールへの変換効率が高まったと推察された。また、醗酸度及び揮発酸度も上昇した。

香気成分分析の結果、高級アルコール類はいずれの成分とも酵素剤を添加しない醗が最も高く、酵素剤添加焼酎の 1.2 ~ 2.5 倍の濃度となった。醗中のアミノ酸濃度の増加により、高級アルコール濃度の増加が期待されたが、アミノ酸濃度の低い醗の方が高い結果となった。アルデヒド類は、酵素剤添加焼酎が対照と比べて高濃度に含まれていた。発酵終了時の醗のアミノ酸量は、対照と比べ酵素剤を添加した醗では 1.5 ~ 4.5 倍に増加していた。醗中に増加したアミノ酸が酵母による代謝と蒸留中のストレッカー分解により増加した可能性が示唆された。官能評価の結果も対照と比較して酵素剤を添加した焼酎では、「果実」や食品を焼いた際に感じる香りのコメントが特徴的であった。

Table 5 Sensory comments of the enzyme-added *shochu*

	20A ^{*1}	AY ^{*2}	YP-SS ^{*3}	ACP-G ^{*4}	Control
Taste	Sweet	Sweet	Sweet	Sweet	Sweet
	Smooth	Dry	Smooth	Grainy	Balanced
	Umami	Grainy	Umami	Rich	Grainy
	Astringency	Bitter	Bitter	Bitter	Bitter
	Acidity	Acidic	Dry	Asitringent	Dry
Flavor	Sweet aroma	Sweet aroma	Sweet aroma	Sweet aroma	Sweet aroma
	Floral	Baked confectionery	Fruity	Nutty	Nutty
	Fruity	Smooth	Roasted	Grainy	Rich
	Grassy	Chemical	Rubbery	Soy sauce like	Oily
	Acetic smell	Acetic smell	Grassy	Grassy	

※ 1 : Orientase 20A, ※ 2 : Orientase AY, ※ 3 : Protease YP-SS, ※ 4 : Sumizyme ACP-G

以上のことから、芋焼酎製造においてプロテアーゼ剤を添加することで酒質は明らかに変化していることが認められ、芋焼酎の酒質の多様化を図ることができた。

謝 辞

本研究は日本酒造組合中央会の「単式蒸留焼酎に係る委託調査研究」の助成を受けたものです。また、官能評価に御協力頂きました、鹿児島県工業技術センター職員の方々に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 佐藤雄一郎：第 21 回焼酎講演会要旨集 (2006)
- 2) 高峯和則，安藤義則，亀澤浩幸，下野かおり，間世田春作：鹿児島県工業技術センター研究報告書，No.15 (2001)
- 3) 椎木敏：醗酵工学，**70** (4)，293-301 (1992)
- 4) K. OUCHI, Y. YAMAMOTO, M. TAKAGISHI and H. AKIYAMA : *J. Ferment. Technol.*, **58**, 301 (1980)
- 5) 大内弘造，高岸正邦，山本泰彦，秋山裕一：醗酵工学，**59** (1)，9-16 (1981)
- 6) 秋田修，蓮尾徹夫，大場俊輝：醸協，**81** (9)，626-632 (1986)
- 7) 奥村丞司：醸協，**88** (3)，178-187 (1993)
- 8) 注解編集委員会編，第四回改訂国税庁所定分析法注解 (財団法人日本醸造協会，東京) (1993)
- 9) 上田誠之助，木場洋次郎：特開 昭 59-179093
- 10) 境克弘，柳生淳二，垂水彰二，高橋康次郎：特開 2003-274922
- 11) 瀬戸口眞治，亀澤浩幸，高峯和則，安藤義則，間世田春作：鹿児島県工業技術センター平成 12 年度研究発表会予稿集 (2000)
- 12) Ylva Ardo : *Biotechnology Advances*, **24**, 238-242 (2006)
- 13) 高峯和則，亀澤浩幸，瀬戸口眞治，神渡巧，緒方新一郎，池田浩二，根上輝治，尾ノ上国昭，濱崎幸男：日本生物工学会九州支部大会講演要旨集 (1997)