

焼酎醪から分離した乳酸菌のジアセチル生産性とクエン酸資化性

高山清子・竹下淳子・水谷政美・山本英樹・越智 洋・工藤哲三
(宮崎県食品開発センター)

平成19年10月15日受理

Diacetyl productivity and citric acid assimilation of lactic acid bacteria isolated from *Shochu* mash

Kiyoko TAKAYAMA, Junko TAKESHITA, Masami MIZUTANI, Hideki YAMAMOTO,
Hiroshi OCHI and Tetsuzo KUDO

(Miyazaki Prefectural Food Research and Development Center, 16500-2
Higashi-kaminaka, Sadowara-cho, Miyazaki city, Miyazaki 880-0303)

Diacetyl and acetic acid influence *Shochu* flavor. As a result of analysis, these substances were found to be more included in the sweet potato *Shochu* than in the grains. Distribution of the acid producing bacteria was investigated in 24 samples from 13 distilleries in Miyazaki Prefecture, after which 63 strains of lactic acid bacteria were isolated and identified. Thirty strains out of 63 were *Lactobacillus paracasei* and had high diacetyl productivity and assimilation of citric acid. More diacetyl was produced in the medium with citric acid added. When citric acid was assimilated by lactic acid bacteria, acetic acid was mainly produced. These results suggest that lactic acid bacteria in *Shochu* mash produce diacetyl and assimilate citric acid. They influence the concentration of diacetyl and acetic acid in *Shochu*.

Key words : 焼酎醪, 乳酸菌, クエン酸, 酢酸, ジアセチル

緒 言

焼酎の一次醪は白麹菌, 黒麹菌が生産するクエン酸により pH が低く保たれているため, 乳酸菌は生育し難い。しかしながら, 二次醪においては, 主原料と水の投入によりクエン酸の濃度が低下するため, 乳酸菌が比較的生育し易い環境になり, しばしば酸度が非常に高くなるような異常発酵現象が見られる。この原因は乳酸菌の汚染によるものと考えられ, これまで研究がなされてきた¹⁻⁶⁾。高宮は南九州の焼酎工場の生酸菌の分布状況を調査し, 417 点の試料から高頻度で生酸菌を検出したと報告している⁵⁾。また, ジアセチルはつわり香の原因物質であり, 弁別閾値は低く⁷⁾, 沸点が 88°C であることから蒸留過程で焼酎に移行し,

焼酎の香りに影響を与えている。岩田らは鑑評会の出品酒及び焼酎醪中のジアセチル量から, 焼酎中のジアセチルは生酸菌等の汚染菌に起因すると推察している⁸⁾。田辺らも焼酎醪から分離した乳酸菌によるジアセチル生成を確認している¹⁻³⁾。そこで我々は焼酎醪について乳酸菌等の生酸菌の分布状況を把握し, 分離した乳酸菌の分類を試みた。また, 焼酎醪中の乳酸菌の特性を明らかにするため, 分離菌のジアセチル生産性及びクエン酸資化性について検討したので報告する。

実験方法

1. 本格焼酎中のジアセチル及び酢酸

平成19年宮崎県本格焼酎鑑評会に出品された芋焼酎(19点)及び麦, 米, 蕎麦の穀類焼酎(21点)に

ついて、ジアセチル及び酢酸の分析をおこなった。本格焼酎中のジアセチルは Hayasaka らの方法⁹⁾を参考に、ヘッドスペース中の揮発成分を SPME ファイバーに吸着させる固相抽出法にて分析をおこなった。4 ml バイアルに試料 500 μ l, 塩化ナトリウム 0.3 g を入れ、40°C の恒温槽に 40 分間バイアルを浸した。SPME ファイバーをヘッドスペース中に 3 分間露出させて揮発性成分をファイバーに吸着させた後、ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP 5050 A (島津製作所製) に導入した。分析条件は以下のとおりとした。

(1) SPME ファイバー

65 μ m Carbowax-divinylbenzene (SUPERUCO 製)

(2) GCMS

装置：GCMS-QP 5050 A (島津製作所製)

- ① 分析カラム：ZB-WAX (0.25 mm×60 m, 島津製作所製)
- ② 気化室温度：200°C
- ③ インタフェース温度：200°C
- ④ カラム温度：Initial Temp 40°C Initial time 10.0 min. 3°C/min 200°C 0 min.
- ⑤ キャリアガス：ヘリウム (90 kPa)
- ⑥ イオン化電圧：70 eV
- ⑦ 測定モード：SIM (m/z=86)

ジアセチル (Wako 製, 純度 98.0%) は再留して標準液を調製し、検量線を作成した。

酢酸は、高速液体クロマトグラフ LC-10 A (島津製作所製, 有機酸分析システム) により測定した。

2. 焼酎醪中の生酸菌の分布及び乳酸菌の分離

宮崎県内 13 社の焼酎製造場より一次醪を 6 点 (うち米 5 点, 麦 1 点), 二次醪を 18 点 (うち芋 11 点, 麦 5 点, 米 2 点) の焼酎醪を採取した。また, 二次醪は発酵後期のものを中心に採取した。乳酸菌の分離及び生酸菌の計測には, 炭酸カルシウムを 0.5%, シクロヘキシミドとアジ化ナトリウムを 10 ppm となるように添加した MRS 培地 (Difco 社製), GYP 培地¹⁰⁾ 及び日本酒製造において生酸菌検出に用いる YAS 培地 (日本醸造協会製), BCG 培地 (日本醸造協会製)¹¹⁾, を使用した¹²⁾。

3. 分離した乳酸菌の分類

分離した菌株についてグラム反応試験, カタラーゼ

試験を実施し, 16 S rDNA 解析による分類を試みた。相同性検索, 系統樹作成には, MicroSeq™ Microbial Identification System Software v 1. 4. 3 を用い, 照合検索には MicroSeq™ Bacterial 500 Library v. 0023 (Applied Biosystems, U. S.) を用いた¹³⁾。同時に, 糖類発酵性による分類を Api キット (BIOMERIEUX) にておこなった。すなわち, 30°C で 48 時間培養後の培地の色の変化を確認し, Api web にて分類をおこなった¹³⁾。また, 分離した乳酸菌のうち約半数が *Lactobacillus paracasei* (以下 *L. paracasei* と表記) と相同性が高いことが認められたため, 16 S rRNA 遺伝子の V 1 領域において *L. paracasei* に特異的なプライマー (Y 2 : 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT -3', *para* : 5'-CACC-GAGATTCAACATGG-3') を用いた PCR 反応¹⁴⁾ による再確認をおこなった。

4. ジアセチル生産性試験及びクエン酸資化性試験に使用した培地

ジアセチル生産性試験及びクエン酸資化性試験には, 以下に示す 3 種の培地を用いた。

(1) GYP 培地¹⁰⁾

グルコース 1%, 酵母エキス 0.5%, ペプトン 0.5%, 酢酸ナトリウム 0.2%, salts solution 0.5%, Tween 80 solution 1%

(2) CYP 培地 (炭素源としてクエン酸を含む)

クエン酸 0.2%, クエン酸三ナトリウム 0.8%, 酵母エキス以下 GYP 培地と同様

(3) CGYP 培地 (炭素源としてグルコースとクエン酸を含む)

グルコース 0.5%, クエン酸 0.1%, クエン酸三ナトリウム 0.4% 酵母エキス以下 GYP 培地と同様

5. ジアセチル生産性試験

滅菌した培地に十分に生育した前培養液を接種後, 30°C で 3 日間静置培養した。培養液 6 ml に酢酸メチル 3 ml 及び塩化ナトリウム 1 g を加えて抽出し, 遠心分離後の酢酸メチル層を試料とした。また, 分析条件は以下のとおりとした。

装置：HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II ガスクロマトグラフ

- ① 分析カラム：DB-WAX (0.53 mm×60 m, アジレント製)
- ② 検出器：FID

- ③ 注入口温度：150°C
- ④ 検出器温度：250°C
- ⑤ カラム温度：Initial Temp 45°C, Initial time 7.0 min. 5°C/min 220°C 5 min.

6. クエン酸資化性試験

滅菌した培地に十分に生育した前培養液を接種後、30°Cで3日間静置培養した。CYP培地で培養後、660 nmの吸光度を測定し、各乳酸菌の増殖度を求めた。また、有機酸は、培養液を20倍に希釈し、0.45 μmのメンブランフィルターでろ過後、高速液体クロマトグラフ LC-10 A (島津製作所製、有機酸分析システム)により測定した。次に、CYP培地で最も増殖した *L. paracasei* について経時的に増殖度を測定し、増殖曲線を作成した。培養、測定条件は以下のとおりとした。

装置：BIO - PHOTORECORDER TN - 2612 (ADVANTEC 製)

培養条件：GYP 及び CYP 培地に、十分に生育した前培養液を10倍希釈し、その1滴をL字型試験管の培養液に接種した。直ちにL字型試験管を装置に取り付け、30°Cで静置培養した。途中、2時間間隔で培養液の吸

光度 (660 nm) を測定し増殖曲線を作成した。

実験結果

1. 本格焼酎中のジアセチル及び酢酸

芋焼酎及びその他穀類焼酎中のジアセチル及び酢酸濃度を Fig. 1 に示す。芋焼酎中のジアセチル及び酢酸濃度は、その他穀類焼酎に比べ高い傾向にあった。

2. 焼酎醪中の生酸菌の分布及び乳酸菌の分離

乳酸菌の分離には MRS, GYP 培地を用いた¹²⁾。Table 1 に、採取した焼酎醪中の生酸菌数を示す。一次醪からは生酸菌はほとんど検出されなかった。二次醪においては、1~10⁸ CFU/ml の生酸菌が検出され、63株の乳酸菌を分離した。また、酵母によるアルコール発酵がほぼ終了した蒸留前の醪において乳酸菌が検出された。

3. 焼酎醪から分離した乳酸菌の分類

焼酎醪から分離した全ての菌株は、グラム陽性、カタラーゼ陰性であった。16S rDNA 解析及び Api を利用した糖類発酵試験による分類結果を Table 2 に示す。63株中59株が *Lactobacillus* 属、4株が *Pediococcus* 属であった。また、63株中30株が *L.*

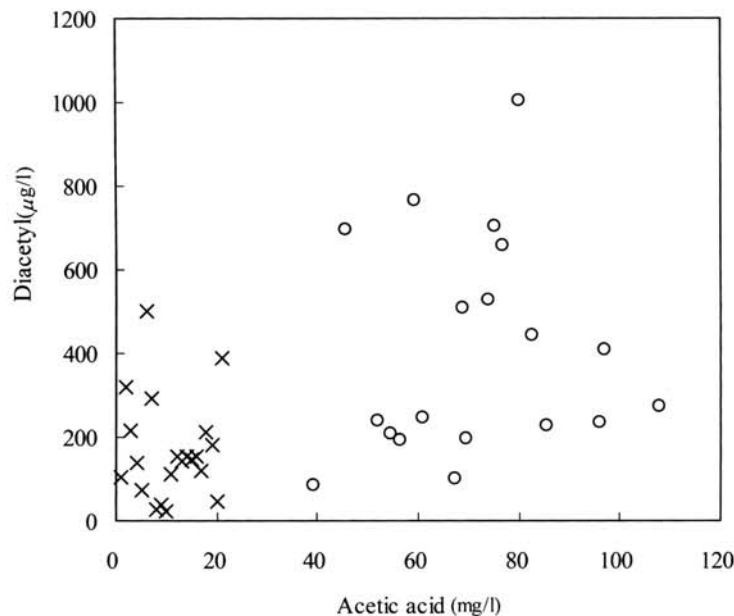


Fig. 1 Concentration of diacetyl and acetic acid in *Shochu* made from sweet potato and grain (barley, rice, buckwheat).
○ ; Sweet potato × ; Grain (barley, rice, buckwheat)

Table 1 Distribution of acid producing bacteria in *Shochu* mash.

Shochu distilleries	Material	Days of <i>Shochu</i> mash		The number of acid producing bacteria (CFU/ml)
		Primary of secondary mash	Days	
A	sweet potato	second	3	nd
B	sweet potato	second	8	5.4×10 ³
B	sweet potato	second	9	1.3×10 ³
C	sweet potato	second	9	5.6×10 ³
C	sweet potato	second	9	1.1×10 ³
D	sweet potato	second	9	nd
D	sweet potato	second	9	1.0×10 ²
E	sweet potato	second	9	1.7×10 ⁷
E	sweet potato	second	10	1.8×10 ⁸
F	sweet potato	second	11	nd
F	sweet potato	second	12	nd
G	barley	second	1	1
G	barley	second	3	5
H	barley	second	9	4.0×10 ³
I	barley	second	10	8
J	barley	second	before distillation	8.6×10 ⁴
H	rice	second	10	8
K	rice	second	before distillation	nd

A	rice	primary	4	nd
A	rice	primary	5	2
L	rice	primary	5	nd
L	rice	primary	6	nd
M	rice	primary	4	nd
G	barley	primary	4	nd

Table 2 Lactic acid bacteria isolated from *Shochu* mash.

Genus	Species	Number of strains
	<i>L. paracasei</i>	30
	<i>L. plantarum/pentosus</i>	6
	<i>L. brevis</i>	7
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. hilgardii</i>	6
genus	<i>L. buchneri</i>	4
	<i>L. parabuchneri</i>	3
	<i>L. fermentum</i>	3
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>	3
genus	<i>P. pentosaceus</i>	1

paracasei と相同性が高いことが認められた。

そこで *L. paracasei* に特異的なプライマーを用いた PCR 反応をおこなった。その結果を Fig. 2 に示す。

焼酎醪から分離した菌株 (lanes 1, 2, 3), 及び標準株 *L. paracasei* subsp. *paracasei* (JCM 8130, lane 4), *L. paracasei* subsp. *tolerans* (JCM 1171, lane 5) では特異的なバンドが確認された。しかしながら, その他焼酎醪から検出された乳酸菌の標準株 *L. plantarum* JCM 1149 (lane 6), *L. pentosus* JCM 1558 (lane 7), *L. fermentum* JCM 1173 (lane 8), *L. buchneri* JCM 1115 (lane 9), *L. parabuchneri* JCM 1162 (lane 10), *L. hilgardii* JCM 1155 (lane 11), *L. brevis* JCM 1059 (lane 12), *P. pentosaceus* JCM 5890 (lane 13) *P. acidilactici* JCM 8797 (lane 14) において, 特異的なバンドは確認されなかった。したがって, 焼酎醪から最も多く分離された菌株は *L. paracasei* と相同性が高いことを確認できた。

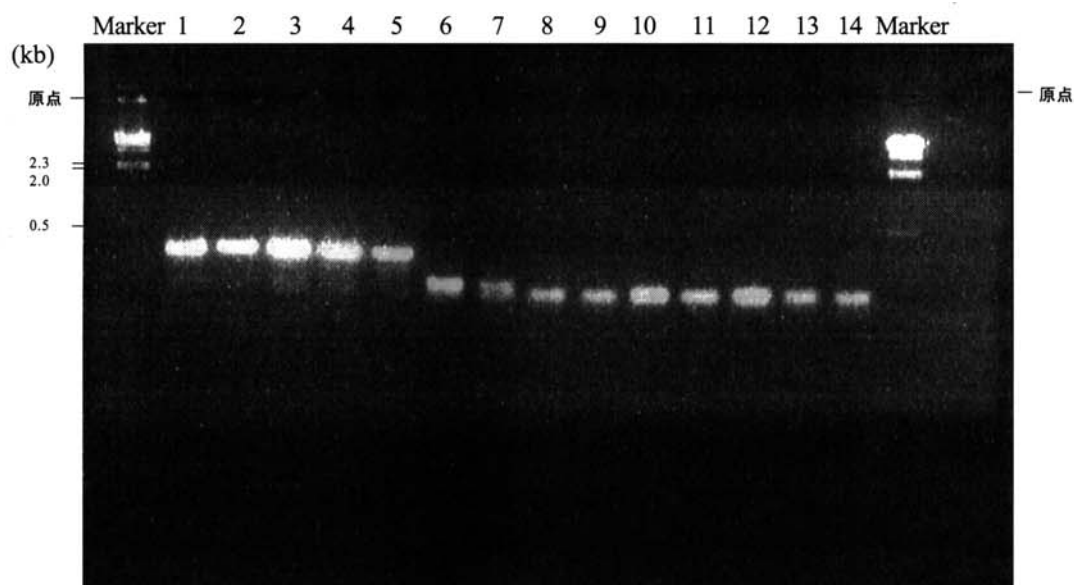


Fig. 2 PCR amplification products obtained using *L. paracasei*-specific primers Y 2 and *para*. Lactic acid bacteria isolated from *Shochu* mash (lanes 1~3) *L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130 (lane 4) *L. paracasei* subsp. *tolerans* JCM 1171 (lane 5) *L. plantarum* JCM 1149 (lane 6) *L. pentosus* JCM 1558 (lane 7) *L. fermentum* JCM 1173 (lane 8) *L. buchneri* JCM 1115 (lane 9) *L. parabuchneri* JCM 1162 (lane 10) *L. hilgardii* JCM 1155 (lane 11) *L. brevis* JCM 1059 (lane 12) *P. pentosaceus* JCM 5890 (lane 13) *P. acidilactici* JCM 8797 (lane 14)

Table 3 Diacetyl concentration in GYP, CYP, CGYP media after cultivation and assimilation of citric acid.

Medium	Diacetyl concentration (mg/l)						<i>L. hilgardii</i> <i>L. buchineri</i> <i>L. parabuchineri</i> <i>L. fermentum</i>
	Strains						
	<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum</i> / <i>L. pentosus</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. brevis</i>		
GYP	1.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CYP	1.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CGYP	9.8	4.0	5.0	trace	nd	nd	nd
Assimilation of citric acid	+	+	+	-	+	-	-

Cultivation was carried out at 30°C for 72 hours. + : assimilated, - : not assimilated

4. 焼酎醪から分離した乳酸菌のジアセチル生産性
 ジアセチルの生成量は、菌株、培地の種類によって異なっていた。焼酎醪から最も多く分離された *L. paracasei* はジアセチル生産性が高く、その他、*L. plantarum*/*pentosus*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* においてもジアセチルの生成が確認された (Table 3)。また、ブドウ糖のみを炭素源とした GYP 培地に

比べ、ブドウ糖にクエン酸を添加した CGYP 培地においてより多くジアセチルが生成した。

5. 焼酎醪から分離した乳酸菌のクエン酸資化性
 クエン酸を唯一の炭素源とした CYP 培地において 30°C で 3 日間静置培養後の濁度を測定し、乳酸菌の増殖を確認した (Fig. 3)。その結果、焼酎醪から最も多く分離された *L. paracasei* は CYP 培地でよく増殖

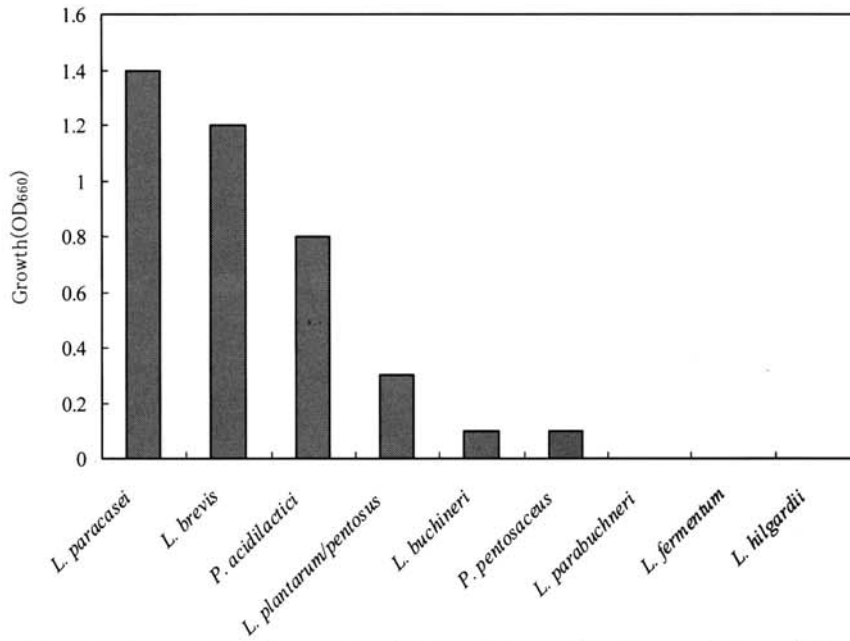


Fig. 3 Growth of the strains isolated from *Shochu* mash in a CYP medium Cultivation was carried out at 30°C for 72 hours.

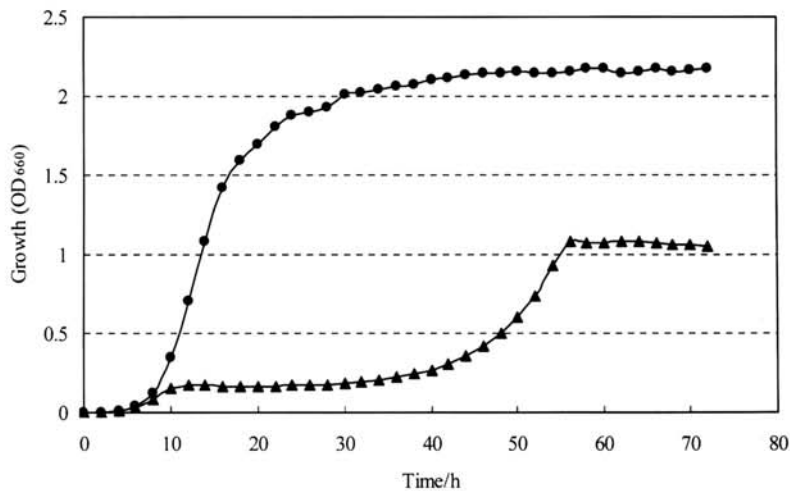


Fig. 4 Growth curve of *L. paracasei* in the medium of GYP and CYP. Instrument : BIO - PHOTORECORDER TN -2612, ADVANTEC Cultivation by *L. paracasei* was carried out at 30°C for 72 hours. The absorbance (660 nm) was recorded at 2 hour intervals.

● ; GYP medium, ▲ ; CYP medium

した。その他 *L. brevis*, *L. plantarum/pentosus*, *P. acidilactici* においても増殖が確認されたが, *L. buchneri*, *L. parabuchneri*, *L. fermentum*, *L. hilgardii*, *P. pentosaceus* では確認されなかった。

次に, CYP 培地で最も増殖した *L. paracasei* について, GYP 培地及び CYP 培地における培養前後のブドウ糖, 有機酸濃度の変化を確認した。ブドウ糖

10000 mg/l を炭素源とした GYP 培地においては, 主に乳酸 8800 mg/l を生成した。一方, 炭素源をクエン酸 7600 mg/l に置き換えた CYP 地の場合, 生成した乳酸は 800 mg/l と少なく, クエン酸が資化され主に酢酸 4400 mg/l を生成した。また, その他の菌株についても発酵前後の有機酸を比較したところ, クエン酸資化性菌において同様の結果が得られた。

最後に、GYP 及び CYP 培地における *L. paracasei* の増殖を濁度 (OD₆₆₀) で求め、その増殖曲線を Fig. 4 に示す。CYP 培地において高い増殖を示した *L. paracasei* は、約 40 時間後から徐々に菌の増殖が確認された。以上の結果より、これらの乳酸菌ではクエン酸を炭素源として増殖可能であることが確認された。

考 察

芋焼酎の二次醪では、二次原料に用いる甘藷の割合が多い。そのため芋焼酎醪では、一次醪のクエン酸の希釈率が大きくなり、他の穀類焼酎醪に比べ酸度が低くなる。その結果、芋焼酎醪では乳酸菌が生育し易くなると考えられる。高宮らの報告にも、33%の甘藷製醪から乳酸菌が検出され、二次醪で検出率が高かったと報告されている⁵⁾。実際に、芋焼酎醪において乳酸菌が多く検出されたことから¹²⁾、本格焼酎中のジアセチル、酢酸の生成に乳酸菌が関与していると推察された。

分離した乳酸菌のジアセチル生産性とクエン酸資化性について比較した (Table 3)。今回焼酎醪から最も多く検出された *L. paracasei* は、クエン酸資化性、ジアセチル生産性ともに高かった。また、これらの乳酸菌では、ブドウ糖のみを炭素源とした培地に比べ、クエン酸を添加した培地においてジアセチルを多く生産した。これは、クエン酸を代謝する過程において、クエン酸がオキサロ酢酸、ピルビン酸、活性アルデヒドとなり、活性アルデヒドとピルビン酸が縮合して α -アセト乳酸が生成され、酸化、脱炭酸を経てジアセチルが生成したと考えられる¹⁵⁾。更にこれらの乳酸菌では、クエン酸のみを炭素源とした CYP 培地における発酵試験後、クエン酸濃度が低下し、酢酸濃度が上昇した。クエン酸代謝経路を有する乳酸菌ではクエン酸を資化し、その代謝過程で酢酸を生成する¹⁵⁾。実際に、ブドウ糖がほとんど無い蒸留前の醪においても乳酸菌が検出され、その大部分がクエン酸を資化した。したがって、これらのクエン酸資化性乳酸菌が増殖した場合、揮発性酸が上昇すると考えられる。

一次醪においては、焼酎醪が高酸度、高アルコール濃度に保たれているため乳酸菌は生育し難いが、二次醪においては醪が希釈され酸度が低下するため、乳酸菌が比較的生育できると考えられる。糖がほとんど残っていない発酵後期においては、主にクエン酸資化性

乳酸菌が生育し、焼酎中のジアセチル、酢酸に影響を及ぼしていると推察された。

本格焼酎中のジアセチルについて岩田らは、熊本国税局における鑑評会の出品酒中のジアセチル分析値と官能評点を比較し、米製においてはジアセチルが官能評点と強い相関があること、大麦製では逆に負の相関があること、甘藷製焼酎においては官能評点と相関があったが、有意なほどではなかったことを報告している⁸⁾。本研究において、平成 19 年宮崎県本格焼酎鑑評会出品酒中のジアセチル分析値と官能評点を比較したところ、米製焼酎においては相関があることが確認された。主に乳酸菌により生成すると考えられるジアセチルについては、今後その影響についてさらに検討する必要がある。また、遠藤らが PCR-DGGE 法により焼酎醪中に多様な乳酸菌叢があると報告しているように¹⁶⁾、今回の醪のデータから、腐造に至るような増殖は示していないが、焼酎醪中に 1~10⁸ CFU/ml の乳酸菌が存在していることが明らかになった。一方、ウイスキーの製造においては従来汚染菌とされていた乳酸菌が見直されており¹⁷⁾、鰯川は他の微生物と協調して甘い微量香気成分を生成し、酒質の個性を形成していると報告している¹⁸⁾。焼酎製造においても乳酸菌の存在は、酒質を左右する大きな要因になっていると考えられるため、今後さらに研究を進めていきたい。

要 約

1. 芋焼酎中のジアセチル及び酢酸濃度は、その他穀類焼酎に比べ高い傾向にあり、醪中の乳酸菌が関与していると推察された。
2. 焼酎醪中には腐造に至らないまでも乳酸菌が存在しており、特に芋焼酎醪で多く検出された。
3. 焼酎醪より 63 株の乳酸菌を分離した。そのうち 59 株が *Lactobacillus* 属、4 株が *Pediococcus* 属であった。また、30 株が *L. paracasei* と相同性が高いことが認められた。
4. 焼酎醪から最も多く分離された *L. paracasei* はジアセチル生産性が高く、その他、*L. plantarum/pentosus*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* においてジアセチルが確認された。ジアセチルの生成量は、ブドウ糖のみを炭素源とした培地よりもクエン酸を添加した培地で多かった。
5. 焼酎醪から最も多く分離された *L. paracasei* はク

エン酸資化性が高く、その他 *L. brevis*, *L. plantarum/pentosus*, *P. acidilactici* においても資化性が確認された。乳酸発酵前後の有機酸濃度から、クエン酸が資化されると主に酢酸が生成した。

6. クエン酸が豊富な焼酎醪ではジアセチル生産性、クエン酸資化性乳酸菌が多く存在しており、焼酎中のジアセチル及び酢酸濃度に影響していることが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、宮崎県本格焼酎鑑評会出品酒の分析にご協力頂いた宮崎県酒造組合、ならびに醪の採取にご協力頂いた宮崎県内の焼酎製造場の皆様に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 田邊幾之助, 音地龍夫, 二石真智子, 迫間敬子, 志々目義紀: 鹿大農学術報告, **32**, 69-77 (1982)
- 2) 田邊幾之助, 二石真智子, 迫間敬子, 有川順子: 鹿大農学術報告, **33**, 47-52 (1983)
- 3) 田邊幾之助, 二石大介, 金丸 芳: 鹿大農学術報告, **34**, 45-57 (1984)
- 4) 百瀬洋夫, 内山奈々, 藤倉寛子: 醸協, **92**, 452-457 (1997)
- 5) 高宮義治: 醸協, **77**, 907-910 (1982)
- 6) 玉城 武, 高宮義治, 高江州朝清, 下地睦子: 醸協, **81**, 130-132 (1986)
- 7) 宇都宮仁: 醸協, **101**, 730-739 (2006)
- 8) 岩田 博, 中嶋則行, 水野昭博, 高原康生, 黒須猛行, 里見弘司, 石井徹, 伊藤康, 菅間誠之助: 醸協, **79**, 51-55 (1984)
- 9) Yoji Hayasaka, Eveline J. Bartowsky: *J. Agric. Food Chem.* **47**, 612-617 (1999)
- 10) 小崎道雄: 乳酸菌実験マニュアル, (朝倉書店, 東京), (1992)
- 11) 酒造実習, (日本醸造協会, 東京), (1999)
- 12) 竹下淳子, 工藤哲三, 山本英樹, 水谷政美, 柏田雅徳: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **49**, 127-131 (2004)
- 13) 竹下淳子, 工藤哲三, 山本英樹, 水谷政美, 柏田雅徳: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **49**, 119-125 (2004)
- 14) L. J. H. Ward, M. J. Timmins: *Letters in Applied Microbiology*, **29**, 90-92 (1999)
- 15) 乳酸菌研究集談会編: 乳酸菌の科学と技術, (学会出版センター, 東京), (2003)
- 16) Akihito Endo, Sanae Okada: *J. BIOSCI. BIOENG*, **99**, 216-221 (2005)
- 17) Edited by J. H. Bryce and G. G. Stewart: *DISTILLED SPIRITS: Tradition and innovation*, (NOTTINGHAM University Press), (2004)
- 18) 鱈川 彰: 醸協, **98**, 241-250 (2003)