

# 麦汁で発酵可能な清酒酵母の開発\*

玉川 英幸\*\*

吟醸香を多分に含むビールを製造するため、セルレニン耐性を有する岩手県の吟醸酵母「ジョバンニの調べ」F2株からマルトース資化性が向上し、麦汁を十分発酵可能となった変異株を分離することを試みた。定法にしたがい2-デオキシグルコース耐性となった変異株を分離し、その中から10%マルトースを含む合成培地で比較的发酵力の高い1株を選抜した。得られた変異株は親株と比較するとドライモルト培地での発酵力が大幅に改善しており、吟醸香の成分であるカプロン酸エチルを3.29 ppm、酢酸イソアミルを2.48 ppm生成した。発酵条件がエステル生成に与える影響を評価したところ、カプロン酸エチル生成は20°C前後で発酵を行ったときが最も高く、それより低く、あるいは高くなるにつれて大きく低下した。また、いずれの温度帯においても初期菌数が多くなるほどカプロン酸エチルの生成量は低下した。一方酢酸イソアミルは初期菌数が高いほど、発酵温度が低いほど生成量が増加する傾向が確認された。また、初期比重の高いドライモルト培地を使用すると酢酸イソアミルは生成量が増加する一方で、カプロン酸エチルでは変化がなかった。岩手県内の3つのブルワリーで合計7回の試験醸造を行ったところ、カプロン酸エチル(0.77-4.89 ppm)、酢酸イソアミル(2.24-5.42 ppm)を含むビールが製造された。

キーワード：酒イーストビール、吟醸香、カプロン酸エチル、酢酸イソアミル

## Beer Brewed by Mutated-Sake Yeast Strains Enable Maltose Utilization

TAMAKAWA Hideyuki

Key words: sake yeast beer, ginjo-aroma, ethyl caproate, isoamyl acetate

### 1 緒言

ビアスタイルガイドライン 2204 (日本地ビール協会)によれば「酒イーストビール」は清酒酵母を用いて製造したすべてのビールが該当し、「清酒酵母がもたらす複雑なキャラクターが、ベースにしたビアスタイル固有のキャラクターと調和をとりながらローからミディアム・レベルで感じられるスタイル」と定義されている<sup>1)</sup>。清酒は原料由来の香りに乏しいことから、使用される清酒酵母は香气成分生成能の高い株の開発が行われてきた経緯があり<sup>2)</sup>、他の醸造用酵母に比べるとエステル生成能が高いと言われている。したがって清酒酵母を用いることで吟醸香を中心としたエステル濃度の高いビールを製造できることが期待される。しかし、多くの清酒酵母は麦汁に含まれる主要な糖質であるマルトースの資化性に乏しく、単菌でビールを製造することが難しい<sup>3)4)</sup>。そこで多くの酒イーストビールの製造には、酵素処理することでグルコース比率の高い麦汁を用いる方法<sup>4)5)</sup>、麦汁に清酒酵母が利用可能な糖類を添加する方法<sup>6)</sup>、ビール酵母と併用する方法<sup>6)7)</sup>などが用いられている。しかし、麦汁の糖組成を加工する方法ではビールの残糖が大きく

変化し、ボディ感が極端に低い、あるいは高いビールになってしまう。また、ビール酵母との併用では期待していたほどのエステルが生成しないなどの欠点がある。そこで本研究では、清酒酵母由来の吟醸香を多分に含むビールを製造するために麦汁で発酵可能な清酒酵母を育種・開発することを目的とした。

*Saccharomyces cerevisiae* がマルトースを資化するためには、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、マルトーストランスポーターおよびこれらを誘導する転写因子が機能している必要がある。マルトース資化性のない株の多くは、このうちマルトーストランスポーターが十分に機能していないと報告されている<sup>8)</sup>。マルトーストランスポーターの機能が強化された変異株を選抜する方法として、2-デオキシグルコース(2DG)耐性<sup>8)</sup>、アンチマイシン耐性<sup>9)</sup>およびマルトース培地での集積培養<sup>10)</sup>などの方法が報告されている。今回報告者はセルレニン耐性を有する吟醸用酵母「ジョバンニの調べ」F2株から0.2 g/L 2DGと20 g/L マルトースを含む最小培地で耐性変異株を選抜し、ラボスケールでの発酵条件の検討および20L~2kLスケールでの試験醸造を実施した。

\* 令和5年度技術シーズ創生・発展研究事業(可能性調査研究)

\*\* 醸造技術部

## 2 実験方法

### 2-1 菌株

育種の親株としてセルレニン耐性を有する岩手県の吟醸酵母「ジョバンニの調べ」F2株<sup>11)</sup>を使用した。対照としてマルトトリオース資化性のないエール酵母 ALE514 (AB Mauri Food Inc, St. Louis, MO, USA) を用いた。

### 2-2 培地

酵母の培養には YPD2 培地 (10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン、20 g/L グルコース)、2DG-マルトース培地 (6.7 g/L Yeast Nitrogen base、20 g/L マルトース、0.2 g/L 2DG)、YPM10 培地 (10 g/L 酵母エキス、20 g/L ペプトン、100 g/L マルトース) を用いた。適宜 20 g/L の寒天を添加して使用した。

### 2-3 2DG 耐性株の選抜方法

酵母菌株は YPD2 培地に接種し、30°C、100 rpm で 24 時間、培養した。遠心分離で培養液から菌体を回収、滅菌水で 2 回洗浄した後、 $10^7$  cells/plate もしくは  $10^8$  cells/plate で 2DG-マルトース培地各 8 枚に塗布した。30°C で 7 日間培養を行い、生育してきたコロニーを再度同じ培地上にストリークし、十分な培養が確認できたクローンを YPD2 培地にストリークし、マスタープレートとした。

### 2-4 マルトース資化性株の選抜

2DG 耐性株は YPD2 培地に接種し、30°C で 2 日間静置前培養した。30 ml YPM10 を分注した 50 ml 容コニカルチューブに前培養した培養液 0.3 ml 接種し、30°C で 2 日間静置培養し、遠心上清の各種成分分析を行い、マルトース資化性の高い株を選抜した。

### 2-5 発酵能力の確認および条件の検討

発酵条件の検討にはドライモルト エクストラライト (Muntons Plc, Stowmarket, England) を用いて調製したドライモルト培地を用いた。初期比重 1.05~1.07 (t/t) となるように蒸留水に溶解し、オートクレーブで 105°C、60 分間加熱処理した。加熱によって生成した凝集物を無菌的に遠心して除去し、発酵試験用の培地とした。発酵容器には 180 ml の培地を入れた 225 ml 容ビオラモビグコニカル (Asone, Osaka, Japan) を用いた。

酵母は 10 ml YPD2 に接種し、30°C で 2 日間静置した。前培養液は 1 L の YPD2 に植え継ぎ、30°C で 2 日間静置培養した。培養液から遠心で菌体を回収し、初期 OD<sub>600</sub> = 0.04-5.0 となるように培地に接種し、13-28°C の条件で静置培養を行った。経時的にサンプリングして遠心上清の比重を測定した。各サンプルは比重低下が停止して 24 時間経過してから 4°C に移し、7 日間静置した後、上清の香気成分を分析した。

### 2-6 分析方法

発酵液の Brix 測定はポケット糖度計 PAL-J (Atago, Tokyo, Japan) を用いた。アルコールの測定にはアルコメイト AL-3 (Riken Keiki, Tokyo, Japan) を用いた。グルコース、マルトース、エタノール分析は Shi らの高速液体クロマトグラフィーによる方法を一部改変して行った<sup>12)</sup>。60°C で保持した IC Sep-ION-300 カラム (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) を用い、溶媒として 0.01 N 硫酸 (流速 0.4 mL/min) を使用した。検出には示差屈折率検出器を用いた。比重は密度比重計 DA-505 (Kyoto Electronics Manufacturing Co. Ltd., Kyoto, Japan) を用いて測定した。香気成分はエタノール 5% (v/v) を含む標準物質を用いて清酒用の国税庁所定分析法を用いて行った。

### 2-7 試験醸造

試験醸造用の酵母は YPD2 で培養を行った。培養菌体は滅菌水で 2 回遠心洗浄した後、滅菌水に懸濁して各メーカーに払い出した。必要に応じて麦汁を用いて各社で拡大培養を行い、20 L~2 kL スケールでビール醸造を行った。製造するビールのスタイルや仕込条件は各メーカーに一任した。

## 3 結果

### 3-1 2DG 耐性株およびマルトース資化性向上株の選抜

変異体選抜のために 2DG-マルトース培地に  $10^7$  cells/plate で菌体を塗布した場合、全くコロニー形成が認められなかった。ジョバンニの調べ F2 株から自然変異株を選抜する場合、塗布菌体量を増やすと取得率が飛躍的に向上した経験があったことから<sup>11)</sup>、塗布菌体量を  $10^8$  cells/plate とした条件で選抜を行ったところ 8 枚のシャーレから複数個のコロニーを検出した。得られたコロニーを同じ培地に再度ストリークし、十分な増殖を確認した 8 個のコロニー (DG21-28) についてマルトース資化性の評価を行った。

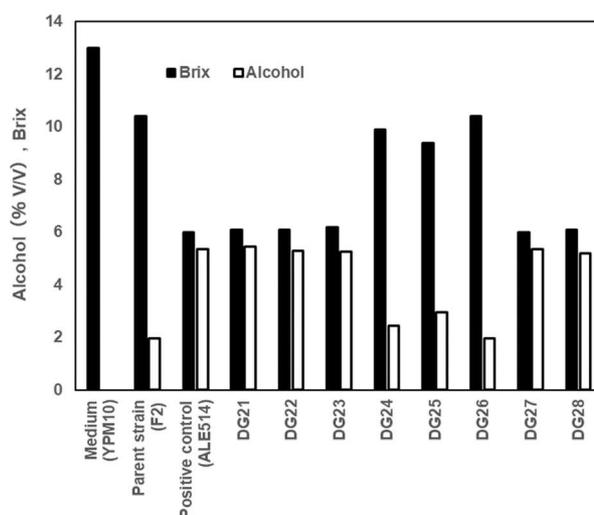


Figure 1 Production of alcohol by 2DG-resultant sake yeast strains in YPM10 medium.

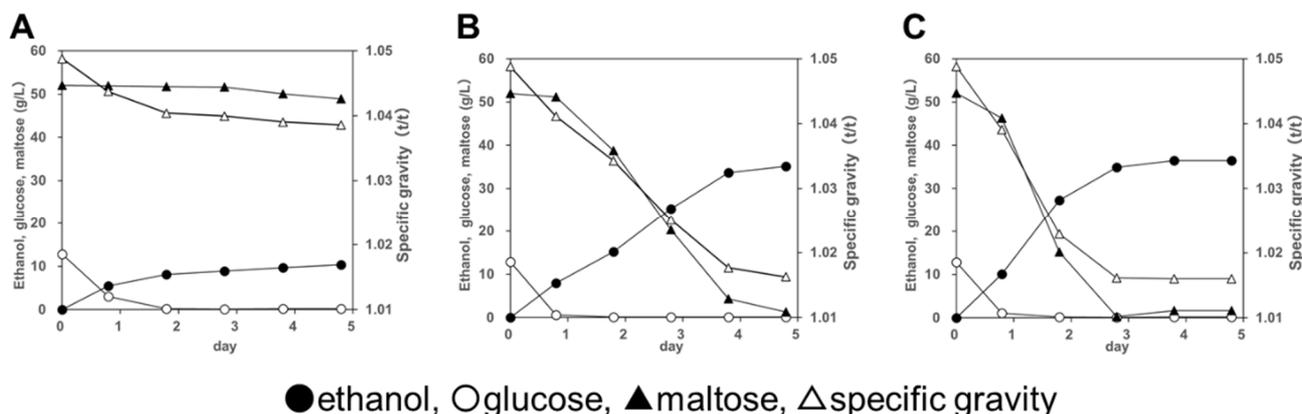


Figure 2 Time-dependent fermentation profiles of DG23 in dry malt medium adjusted to an initial specific gravity of 1.05. Panels A, B and C show the results for F2, DG23 and ALE514, respectively. Fermentation was carried out at 23°C. The initial cell density in the fermentation medium was adjusted to OD600 = 0.15.

コニカルチューブを用いて 10%マルトースを含む合成培地で発酵試験を行った結果を Figure 1 に示した。親株であるジョバンニの調べ F2 株は 1.95% (v/v) しかアルコールを生成せず、Brix も 10.4 までしか低下していなかったのに対して、2DG 耐性株は 8 株中 5 株がエール酵母である ALE514 と同等となる 5.20-5.45% (v/v) のアルコールを生成した。また、培地の Brix も 6.0-6.2 まで低下していた。これらの発酵試験を複数回実施し、マルトースを最も安定的に資化した株として DG23 株を選抜した。

Table 1 Concentration of ethyl caproate and isoamyl acetate in culture medium after a fermentation test.

Strain	Ethyl caproate (ppm)	Isoamyl acetate (ppm)
F2	0.40	0.50
DG23	3.29	2.48
ALE514	0.45	0.88

### 3-2 ドライモルト培地での発酵力の評価

DG23 株のマルトース資化性とエステル生成能を麦汁に近い条件で評価することを目的としてドライモルト培地での発酵試験を実施した (Figure 2, Table 1)。

ジョバンニの調べ F2 株は発酵開始からグルコースは速やかに消費されたもののマルトースの消費はほとんど行われず、それに伴って比重の低下も停止した。最終的に生成したエタノールは 10.5 g/L だった。一方、DG23 株ではグルコース消費後からマルトースの消費がはじまり、約 5 日間でマルトースを完全に消費した。生成したエタノールは 35.1 g/L だった。ALE514 ではマルトース消費が速く約 3 日間でマルトースを完全に消費し、36.1 g/L のエタノールを生成した。

培養液のエステルを分析したところ、マルトース資化性に乏しく早い段階で発酵が停止したジョバンニの調べ F2 株ではカプロン酸エチル 0.40 ppm、酢酸イソアミル 0.50 ppm しか生成しなかったのに対して、マルトースを完全消費した DG23 株ではそれぞれ 3.29 ppm、2.48 ppm の生成が認められた。一方、エール酵母である ALE514 はマルトースを完全消費したのにも関わらず各エステルの生成はそれぞれ 0.45 ppm、0.88 ppm だった。このようにマルトース資化性を獲得した清酒酵母変異株は麦汁を模した培地においても高い吟醸香生成能を示すことが確認された。

### 3-3 発酵条件が吟醸香生成に与える影響

初期菌数、発酵温度が酵母の発酵経過に与える影響を評価した。Figure 3 に示したように、初期菌数が多いほど、発酵温度が高いほどの比重の低下が速くなったことから、発酵速度が初期菌体数と温度に依存することが確認された。また、いずれの温度帯においても初期 OD600 が低いところから発酵を開始したサンプルほど最終 OD600 が低くなる傾向が認められ、OD600 = 0.04 とした場合の最終 OD600 が 7.7-9.3 だったのに対して、初期 OD600 = 5.0 とした場合では最終 OD600 は 13.4-17.9 で最大 2.32 倍の差があった。

各条件で生成した吟醸香を分析したところ、いずれの発酵温度帯においても初期菌体数が多いほどカプロン酸エチル生成量が低い傾向が認められた (Table 2)。特に 23°C で実施した場合は、初期 OD600 = 0.04 とした場合は 3.35 ppm のカプロン酸エチルが生成したのに対して、初期 OD600 = 5.0 では 1.04 ppm と 3 分の 1 以下の生成量に留まった。また、同じ初期菌数の場合は発酵温度が 18°C、23°C のときが高く、13°C、28°C では低い生成量であった。

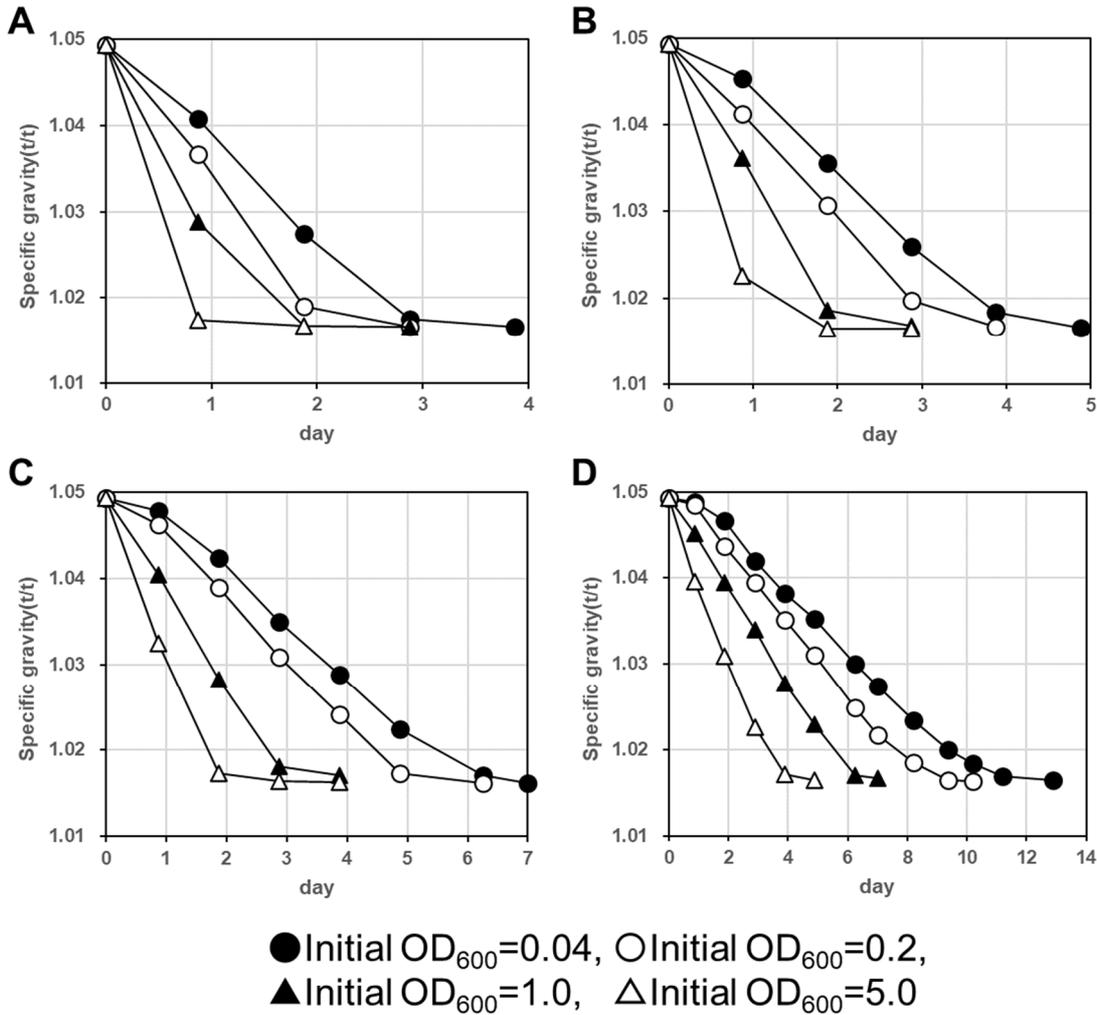


Figure 3 Time-dependent fermentation profiles of DG23 in dry malt medium adjusted to an initial specific gravity of 1.05. Panels A, B, C and D show the results for 28°C, 23°C, 18°C and 13°C, respectively.

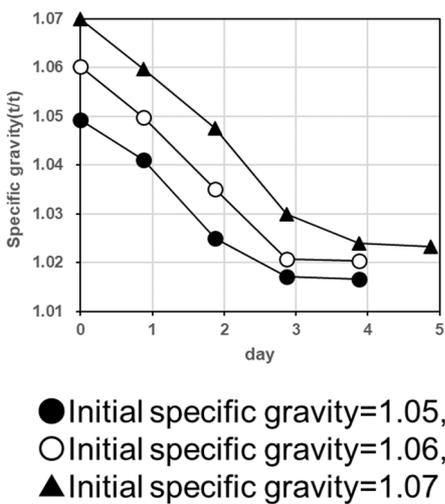


Figure 4 Time-dependent fermentation profiles of DG23 in dry malt medium adjusted to an initial specific gravity of 1.05-1.07. Fermentation was carried out at 23°C. The initial cell density in the fermentation medium was adjusted to OD<sub>600</sub> = 0.50.

酢酸イソアミルはいずれの温度帯においても初期菌数が多いほど、発酵温度が低くなるほど多量に生成される傾向が認められた。特に発酵温度が 13°C、初期 OD<sub>600</sub> = 5.0 のときに最大値で 2.99 ppm の酢酸イソアミルが生成された。酢酸イソアミルの生成量は前駆体であるイソアミルアルコールと相関すると言われている。そこでイソアミルアルコール生成量を確認したところ、酢酸イソアミルと同様に初期菌数が多いほど多量に生成する傾向が認められたが、発酵温度が低くても必ずしも多量に生成しなかった。

次にドライモルト培地の初期比重がエステル生成に与える影響を評価した。初期比重 1.05、1.06 とした場合においては比重の低下が停止するまでに 3 日間、1.07 では 4 日間を要した。最終比重はそれぞれ 1.01669、1.02036、1.02334 であり、初期比重に依存して高い値となった。最終 OD<sub>600</sub>、酢酸イソアミル、イソアミルアルコールは培地の初期比重が高くなるにつれわずかに生成量が増える傾向が認められた一方で、カプロン酸エチルは大きな変化は確認されなかった。

Table2 Analysis of culture fermented with DG23.

Initial specific gravity (t/t)	Temperature (°C)	Initial OD <sub>600</sub>	Final OD <sub>600</sub>	Ethyl caproate (ppm)	Isoamyl acetate (ppm)	Isoamyl alcohol (ppm)
1.05	28	0.04	8.8	1.38	1.15	59.8
		0.2	9.6	1.46	1.47	62.7
		1.0	13.0	1.15	1.99	94.8
		5.0	17.9	0.84	1.97	116.9
	23	0.04	9.3	3.35	2.30	62.4
		0.2	9.4	3.29	2.30	64.8
		1.0	11.2	2.27	2.72	88.3
		5.0	16.7	1.04	2.77	113.5
	18	0.04	8.4	3.03	2.77	69.2
		0.2	8.8	3.61	2.91	73.5
		1.0	11.0	2.45	2.94	86.2
		5.0	16.2	1.67	2.99	109.1
	13	0.04	7.7	1.40	2.01	88.8
		0.2	8.5	1.88	2.81	94.4
		1.0	9.7	2.24	2.93	96.5
		5.0	13.4	1.93	2.99	105.1
1.05	23	0.5	9.6	3.26	2.25	72.2
1.06			10.7	3.16	2.94	75.2
1.07			11.7	3.13	3.36	88.4

### 3-4 県内ブルワリーでの試験醸造

岩手県内ビールメーカーでビール試験醸造されたビールに含まれる吟醸香を分析した結果を Table 3 に示した。各ブルワリーでの仕込条件、酵母添加量、レシピは異なるものの含まれるカプロン酸エチルは 0.77-4.89 ppm、酢酸イソアミルは 2.24-5.42 ppm と通常のビールと比較しても多量に吟醸香が含まれるビールが製造できることが確認された。

## 4 考察

本研究では、ビールを製造可能な清酒酵母を開発することを目的として特に清酒の吟醸香の成分であるカプロン酸エチルと酢酸イソアミルを指標に酵母の評価を行った。酢酸イソアミルについてはビール酵母でも高生産するものが知られており、ビール製造における生成機構についても多数の報告がなされている<sup>13) 14)</sup>。そこで本章においては、清酒酵母を使った特異性を十分に示すためのカプロン酸エチルの生成について考察を行う。

酒類に含まれるカプロン酸エチルは酵母が有する中鎖アシル CoA/エタノール転移酵素によってヘキサノイル CoA とエタノールのエステル化によって生成される。酵母で上記の酵素遺伝子を過剰発現してもカプロン酸エチルの生成量は増加しないこと、培地中へ前駆体脂肪酸を添加することでカプロン酸エチル生成量は増加することから、この酵母がカプロン酸エチルを生成する酵素反応は基質供給量が律速になっていると考えられている<sup>15)</sup>。セルレニンなどの薬剤耐性となり中鎖脂肪酸が高蓄積するような変異を獲得した酵母はカプロン酸エチル生成量が大幅に増加することから、香りを多く出したい清酒を製造しようとしたとき、多くの場合はこの変異を有する吟醸用酵母が用いられるのが一般的である<sup>16)</sup>。今回育種に使用した親株であるジョバンニの調べ F2 株も同様の変異を有しており、親株のもつ高い中鎖脂肪酸の生産能がビール醸造においてもカプロン酸エチルの高生産につながったものと考えられる。

Table 3 Concentration of ethyl caproate and isoamyl acetate in beer after a brewing test.

Brewer	Trial	Manufacturing scale (L)	Yeast starter culture volume (L)	Ethyl caproate (ppm)	Isoamyl acetate (ppm)
A	1	20	0.5	1.24	5.42
A	2	20	20 <sup>a</sup>	1.97	2.87
A	3	2000	20	4.34	3.27
A	4	2000	20	2.17	2.42
B	1	100	3	4.88	4.01
B	2	1000	100	0.77	2.24
C	1	20	2	1.56	4.05

<sup>a</sup>Resuse yeast of brewing test trial 1 in brewer A.

麦汁にはリノール酸などの不飽和脂肪酸は含まれているが、カプロン酸などの中鎖脂肪酸は含まれていない。麦汁に含まれる不飽和脂肪酸が酵母による発酵の過程で消費される一方で、酵母からの漏出によってビール中に中鎖脂肪酸が残存すると報告されている<sup>17)</sup>。ビールに含まれる中鎖脂肪酸のフレーバーは "Beer Flavour Terminology"において"Caprylic"と分類され、"Soapy, fatty, goaty, tallowy"などの好ましからざる特徴を有する成分と記載されている<sup>18)</sup>。また、Zurcher と Krauss によるビールへの添加実験からはビールの泡持ちを低下させることが報告されており<sup>19)</sup>、中鎖脂肪酸それ自体はビールに高含有していることが望ましいものでない。今回、前駆体である中鎖脂肪酸とカプロン酸エチルの関係性を評価する目的として、栗林らが開発した清酒中の脂肪酸簡易分析法<sup>20)</sup>を用いて発酵液中のカプロン酸濃度を測定しようと試みたが、モルト由来のポリフェノールが反応障害をするよう十分な比色検出ができなかった。セルレニン耐性のある清酒酵母が麦汁様の培地でカプロン酸エチル高生産する機構については前駆体分析などより詳細な解析が必要であると思われる。

今回の結果から発酵に使用する初期菌体量が多くなるとカプロン酸エチルの生産性が大きく低下することが明らかとなった (Table 2)。この現象について、発酵終了後に回収酵母を再度ビールの醸造に使用するいわゆる「連用酵母」を用いて種々の発酵試験を実施したところ、生成されるカプロン酸エチル濃度は酵母の前使用履歴に関わらず発酵初期の菌体量のみに依存した (data not shown)。カプロン酸エチルの前駆体であるヘキサノイル CoA は脂肪酸合成系から供給されるが、酵母の脂肪酸生合成は分子状酸素が必要であり、酵母の増殖ステージに合わせて厳密な制御を受けていることが報告されている<sup>21)</sup>。したがって清酒酵母でのビール醸造においてカプロン酸エチルは、ある程度酸素が得られ、酵母が十分に増殖でき

る環境の方が多量に生成されるのかもしれない。

## 5 結言

本研究では、吟醸香を含むビールを製造するために岩手県の吟醸酵母「ジョバンニの調べ」F2株から2DG耐性株を取得した。得られた変異株の1つはマルトース資化性が飛躍的に向上しており、麦汁を模した培地で吟醸香の成分であるカプロン酸エチルと酢酸イソアミルを高生産した。また、岩手県内で試験醸造においても高い吟醸香を含むビールが製造された。今回開発した酵母を用いることで特徴的な香気を有する酒イーストビールが製造できることが期待された。

## 謝辞

現場での試験醸造を快諾いただいた株式会社太極舎 暁ブルワリー 中林悠 博士、世嬉の一酒造株式会社 佐藤航氏、後藤孝紀氏、株式会社遠野醸造 太田睦 博士に深く感謝いたします。

## 文献

- 1) クラフトビア・アソシエーション (日本地ビール協会) : ビアスタイル・ガイドライン 2204 (2022)
- 2) 堤浩子: 清酒酵母の香气生成の研究, 生物工学会誌, 89, p.717-719 (2011)
- 3) 馬場茂, 小栗勇, 福沢幹雄, 森山敬子, 飯田俊彦, 小林巖, 今井謹也: 清酒酵母のマルトースへの作用 (その1) 清酒酵母のマルトース利用性について, 日本醸造協会雑誌, 69, p.453-455 (1974)
- 4) 向井伸彦: 各種醸造用酵母によるビール醸造の可能性, 日本醸造協会誌 97, p.99-105 (2002)
- 5) 水野昭博, 天野仁, 向井伸彦, 佐藤和夫, 高橋利郎:  $\alpha$ -グルコシダーゼを利用したビールの高濃度醸造 (第2報) 清酒酵母・ワイン酵母のビールの高濃度醸造への

- 利用, 日本醸造協会誌, 98, p.639-648 (2003)
- 6) 日本ビアジャーナリスト協会, “麦で日本酒? 否、ビールなのに日本酒?”, 日本ビアジャーナリスト協会ウェブサイト, <https://www.jbja.jp/archives/31795> (2020-11-13)
  - 7) 中島奈津子, 齋藤高典: 福島県オリジナル清酒酵母を用いたビール醸造方法の最適化, 福島県ハイテクプラザ試験研究報告書 (2022)
  - 8) Orikasa Y, Mikumo D and Ohwada T: A 2-Deoxyglucose-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows enhanced maltose fermentative ability by the activation of MAL genes, *Foods*, 7, p.52 (2018)
  - 9) Maruyama H, Yamamiya T, Ozawa A, Yamazaki E and Suzuki N: Beer Brewed with Sake Yeast Strain Has Unique Sake-like Flavors, *J Am Soc Brew Chem*, 82, p.150-159 (2023)
  - 10) Brouwers N, Gorter de Vries AR, van den Broek M, Weening SM, Elink Schuurman TD, Kuijpers NG, Pronk JT and Daran, J. M. G.: In vivo recombination of *Saccharomyces eubayanus* maltose-transporter genes yields a chimeric transporter that enables maltotriose fermentation, *PLoS genetics*, 15, e1007853 (2019)
  - 11) 玉川英幸, 米倉裕一: セルレニン耐性を有する清酒酵母から尿素非生産性株の取得, 岩手県工業技術センター研究報告, 22, p.57-63 (2021)
  - 12) Shi NQ, Cruz J, Sherman F, Jeffries TW: SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*, *Yeast*, 19, p.1203-1220 (2002)
  - 13) Fujii T, Nagasawa N, Iwamatsu A, Bogaki T, Tamai Y and Hamachi M: Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene, *Appl Environ Microbiol*, 60, p.2786-2792 (1994)
  - 14) Steyer D, Erny C, Claudel P, Riveill G, Karst F and Legras J. L: Genetic analysis of geraniol metabolism during fermentation. *Food microbiology*, 33, 228-234 (2013)
  - 15) Saerens, SM, Verstrepen KJ, Van Laere SD, Voet AR, Van Dijck P, Delvaux FR, and Thevelein JM: The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity, *J Biol Chem*, 281, p.4446-4456 (2006)
  - 16) Ichikawa E, Hosokawa N, Hata Y, Abe Y, Suginami K, and Imayasu S: Breeding of a sake yeast with improved ethyl caproate productivity, *Agric biol chem*, 55, p.2153-2154 (1991)
  - 17) 藪内精三: ビールの脂質成分と品質, 日本醸造協会誌, 75, p.273-276 (1980)
  - 18) Meilgaard MC, Dalglish CE and Clapperton JF: *J Inst Brewing*, 85, p.38 (1979)
  - 19) Zorcher CH and Krauss G: *Mschr Brauerei*, 24, p.230 (1971)
  - 20) 栗林喬, 金桶光起, 渡邊健一: 酵素法による清酒の遊離脂肪酸の定量, 日本醸造協会誌, 107, p.624-631 (2012)
  - 21) Tehlivets O, Scheuringer K and Kohlwein SD: Fatty acid synthesis and elongation in yeast, *Biochim Biophys Acta*, 1771, p.255-270 (2007)