

麴汁培地を用いた集積培養液から分離した酵母の性質

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者	数岡, 孝幸 武田, 洸平 中田, 久保
巻/号	107巻4号
掲載ページ	p. 271-278
発行年月	2012年4月

麴汁培地を用いた集積培養液から分離した酵母の性質

数岡孝幸・武田洸平・中田久保
(東京農業大学短期大学部醸造学科)

平成 23 年 9 月 8 日受理

Characteristics of Yeast Isolated from an Enriched Culture Made from Koji Extract.

Takayuki KAZUOKA, Kohei TAKEDA and Hisayasu NAKATA

(Junior College of Tokyo University of Agriculture
Department of Brewing and Fermentation)

Five isolates, NY2-1 ~ 5, were obtained from an enriched culture made from koji extract. The results of tests on the physiological characteristics of NY2-1 ~ 5 showed that NY2-1 ~ 4 were *sake* yeast types and NY2-5 was an *awamori* yeast type. The fermentative ability of the NY2-1 in *sake mash* was similar to that of *kyokai* No. 9, and *sake* produced by NY2-1 revealed distinguishing compositions of aroma compounds and organic acids. In particular, the ethyl caproate concentration, isoamyl alcohol/ isobutyl alcohol ratio, and malic acid/ succinic acid ratio of the *sake* brewed by NY2-1 were high. On the basis of DNA sequences of the 26S rDNA-D1/D2 region and ITS region, NY2-1 was identified as *Saccharomyces cerevisiae*. Furthermore, it was suggested that NY2-1 was closely related to the *sake* yeast *kyokai* No. 9.

Key words : 清酒, 酵母, カプロン酸エチル, A/B 比, MA/SA 比

緒言

米, 米麴, 水を原料とし, 総米に対する汲水量 135%前後で仕込む清酒は, 並行複発酵, 高濃度仕込み, 低温発酵, 低カリウム濃度, 乳酸酸性およびもろみ中での固形物の溶解といった, 他の酒類とは異なる清酒製造特有の発酵環境を形成している。清酒酵母は, そのような清酒製造条件下の酒母およびもろみで良く生育し良質の清酒を造る適性を持つ一群の酵母であるが¹⁾, 清酒の原料である水や麴中の清酒酵母は他の酵母に比較し少ないため^{2,3)}, 近代的な清酒醸造では良質な製品を安定して生産することを目的に, 酒母製造工程において純粋培養した清酒酵母が添加される。

一方, 清酒の酒質は原料や製造工程における様々な要因によって変化する。その中で清酒製造に使用する清酒酵母の種類は, 清酒の酒質形成において重要な要

素の一つである。現在清酒酵母として, 主に日本醸造協会にて純粋培養して配布される種々のきょうかい酵母が使用されているが¹⁾, 酒質のさらなる多様化を目的に, 薬剤耐性株取得による酵母の育種⁴⁻⁷⁾や清酒もろみからの変異株の分離^{8,9)}, 自然界からの清酒酵母の分離¹⁰⁾が試みられている。

著者らは清酒もろみで十分な発酵力を示し, 新たな特性を有する酵母の自然界からの分離に取り組んできた¹⁰⁻¹⁴⁾。本報では, 麴から調製した麴汁培地に乳酸および固形成分としてカゼインを添加した集積培地を用いて酵母の集積を行う事により, 優良清酒酵母の分離が可能ではないかと考え, 分離を行った結果, 香気成分組成および有機酸組成において特徴的な性質を有する酵母が取得されたので報告する。

実験方法

集積培養用培地の調製

精米歩合 65%の一般精白米を用い蓋麴法により調製した麴 1 kg に対し水 4 l を加え、55℃、15 時間糖化を行った。濾過して得られた濾液に水を加え brix 12% に調整した麴汁培地を得た。オートクレーブ滅菌した 300 ml の麴汁培地に 4 ml/l となるように乳酸を添加し、エタノール滅菌したカゼインを 15 g 加えた培地を集積培養用培地とした。

酵母の分離

集積培養用培地を 500 ml ビーカーに調製後、一重のガーゼで蓋をし、それを実験室の冷蔵庫の上に設置し、25℃で 18 日間集積培養した。集積培養中は一日に一回攪拌した。混濁し気泡を有する培養液を滅菌水で適宜希釈後、TTC 下層培地に塗抹して、30℃で 7 日間培養し、生じたコロニーから釣菌することで分離酵母を得た。

分離酵母の生理学的性質

(1) 発酵性および資化性試験

“The Yeasts”¹⁵⁾ に準じて行った。Yeast Nitrogen Base (Difco) を基本培地とし、糖類発酵性はガラハム管を入れた小試験管に各種糖を終濃度 2% (ラフィノースは 4%) となるように添加した。糖類資化性は、Yeast Nitrogen Base に各炭素源を 0.5%、寒天 2% となるように添加した培地を用いた。生育の判定は炭素源無添加培地を対照とし、培養温度は 25℃とした。硝酸カリウムの資化性試験は、Yeast Carbon Base (Difco) に硝酸カリウムと寒天をそれぞれ 0.078%、2% となるように添加した培地を用いた。対照として Yeast Carbon Base に 0.5% 硫酸アンモニウムを添加した培地と窒素源無添加培地を用いた。YM 液体培地で前培養した分離菌株を滅菌生理食塩水で 2 回洗浄後に接種し、25℃での増殖の有無を観察した。

(2) ビタミン要求性試験

ビタミン要求性試験は、中田ら¹⁶⁾の方法に従った。硫酸アンモニウムを窒素源とし、クエン酸、クエン酸カリウムを除去したビタミン欠如培地 (1 l あたりグルコース 20 g, 硫酸アンモニウム 2.0 g, リン酸 2 水素カリウム 0.55 g, 塩化カリウム 0.425 g, 硫酸マグネシウム・7 水和物 0.125 g, 塩化カルシウム・2 水和物 0.125 g, 塩化鉄・6 水和物 2.5 mg, 硫酸マン

ガン・4 水和物 2.5 mg) に、YM 液体培地で前培養した分離菌株を滅菌生理食塩水で 2 回洗浄後、 8.0×10^3 cfu/ml となるように接種し、25℃での増殖の有無を観察した。ビタミン要求性は、上記培地に 5 種のビタミン (1 l あたりパントテン酸 2.5 mg, イノシトール 25 mg, ピリドキシン 0.5 mg, チアミン 0.5 mg, ビオチン 0.025 mg) のそれぞれ 1 種のビタミンを除いたオミット法で生育の有無を観察した。

(3) TTC 染色性試験

TTC 染色性試験は、国税庁所定分析法注解¹⁷⁾に従った。

(4) Yeastcidin 耐性試験

イーストサイジン耐性試験は、中田ら¹⁸⁾の方法に従い調製した粗イーストサイジンを麴汁培地 (Balling 10°) に 200 ppm となるように添加し、オートクレーブで 121℃、5 分間加熱殺菌し試験培地とした。試験培地に分離酵母を 8×10^3 cfu/ml となるように摂取し、30℃で 72 時間培養し、増殖の有無によって耐性を判定した。

(5) 高泡形成能

500 ml 容三角フラスコに米麴 35 g, 蒸米 115 g, 水 200 ml, 乳酸 0.8 ml を入れ、10 ml 麴汁培地 (Balling 10°) で前培養した分離酵母を全量添加し、13℃で発酵を行い経時的に高泡形成を観察した。対象として協会 9 号株 (K-9 株) を用い比較することで高泡形成能を判定した。また 13℃で 25 日間培養後のもろみの濾液を用い、日本酒度とアルコール濃度の測定を行った。

清酒の小仕込み試験

原料米として精米歩合 65%の一般精白米を用い、総米 4 kg の三段仕込み (麴歩合 22%, 汲水歩合 140%) を行った。酒母には汲水 1 l あたり 7 ml の乳酸を添加し、YM 液体培地にて前培養した分離酵母あるいは K-9 株を 2×10^5 cfu/ml となるように接種した。仕込み温度は、初添 15℃、仲添および留添 10℃とし、醪最高温度 13℃で醪日数 21 日目に上槽し、分析試料とした。

分析

高泡形成能試験におけるアルコール濃度の測定は ALCOHOL CHECKER YSA-200 (YAZAKI) を用いて行った。もろみおよび清酒の一般成分分析は国税庁所定分析法注解¹⁷⁾に従った。有機酸 (クエン酸、

リンゴ酸, コハク酸, 乳酸, フマル酸, 酢酸) の分析は, 小室ら¹³⁾の方法に従い, 電気伝導度検出器を備えた高速液体クロマトグラフィーを用いて行った。ピルビン酸の定量は, F-キット ピルビン酸 (Roche) を用いて行った。香氣成分分析は, 小室ら¹²⁾の方法に従って試料を調製し, ガスクロマトグラフィーで低沸点香氣成分の定量を行った。分析条件は, キャピラリーカラム (0.25 mm × 60 m), 充填剤 TC-WAX を用い, 窒素ガス流速 30 ml/分, カラム温度 70℃, 検出器 FID で行った。

26S rDNA-D1/D2 領域および ITS 領域の塩基配列解析

前培養した分離酵母菌体からガラスビーズを用いて細胞を破碎し, DNA を抽出後, フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25:24:1) 処理およびエタノール沈殿を行い, DNA を精製した。精製した DNA を鋳型に, KOD plus-Neo と 26S rDNA-D1/D2 領域増幅用プライマー

(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
および 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')

あるいは ITS 領域増幅用プライマー

(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
および 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

を用いてそれぞれの領域を PCR により増幅した。得られた PCR 産物を High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) を用いて精製した。DNA 配列決定は, Macrogen Japan に委託した。

結果および考察

酵母の分離

麴から調製した麴汁培地に乳酸および固形成分としてカゼインを添加した集積培地を用い 25℃ で酵母の

集積を試みた結果, 12 日目から brix の低下が見られ, 気泡も見られるようになった。18 日目には brix が 3.5% に達し, 菌数も 1.7×10^8 cfu/ml に達した (Table 1)。培養液を TTC 下層培地に塗抹して生じたコロニーを 5 つ無作為に鈎菌し, 糖 10% YM 液体培地に植菌した結果, いずれもガスを多量に発生し産膜を形成しなかった。この 5 株を NY2-1 ~ 5 株とし以降の実験に供した。

分離酵母の生理学的性質

分離酵母 NY2-1 ~ 5 の糖類の発酵性と資化性および硝酸カリウムの資化性試験の結果, NY2-1 ~ 4 株はいずれも同じ性質を示し, マルトースおよびラクトースの発酵性が見られず, マルトース, ラクトース, メレジットース, α -メチル-D-グルコシド, 硝酸カリウ

Table 1 Changes in brix value and cell density during enriched cultivation.

Day	Brix (%)	Cell density (cfu/ml)
1	12.0	
2		
3		
4		
5		
6		
7	12.0	
8	11.3	
9	12.0	
10	11.8	7.0×10^7
11		
12	7.4	1.0×10^8
13		
14		
15	4.0	1.2×10^8
16		
17		
18	3.5	1.7×10^8

Table 2 Fermentation and assimilation tests of the strains.

Strain	Fermentation						Assimilation								
	Glu	Gal	Suc	Mal	Lac	Raf	Glu	Gal	Suc	Mal	Lac	Raf	Mel	α -MG	NO_3^-
NY2-1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
NY2-2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
NY2-3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
NY2-4	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
NY2-5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
K-9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-

Glu: glucose, Gal: galactose, Suc: sucrose, Mal: maltose, Lac: lactose, Raf: raffinose, Mel: melezitose, α -MG: α -methyl-D-glucoside

ムの資化性が見られなかった。それに対し NY2-5 株は、マルトースの発酵性、資化性が見られた (Table 2)。対照として用いた K-9 株と比較すると、K-9 株が α -メチル-D-グルコシドを資化するのに対して、NY2-1 ~ 5 株はいずれも資化しなかった。ビタミン欠如培地での生育、Yeastcidin に対する耐性、TTC 染色において、NY2-1 ~ 4 株は K-9 株と同じ性質を示したが、NY2-5 株はビタミン欠如培地での生育が見られなかった (Table 3)。一方、清酒もろみでの高泡形成では NY2-5 株は K-9 株同様に高泡を形成したのに対し、NY2-1 ~ 4 株は高泡を形成しなかった (Table 5)。また、高泡形成試験のもろみの濾液を用いた日本酒度およびアルコール濃度の測定では、対照とした K-9 株が +8, 17.65% であった。それに対し、NY2-1 ~ 4 株は日本酒度が +7 ~ +9, アルコール濃度が 17.75 ~ 18.05% となり、K-9 株と同等の強い発酵力を示した。以上の結果から、糖のマルトース発酵性、資化性および α -メチル-D-グルコシドの資化性において違いがあ

るものの、NY2-1 ~ 4 株は高泡を形成しない清酒酵母タイプであると判断された。NY2-5 株については、ビタミン欠如培地での生育が確認されなかったのでビタミン要求性を調べたところ、パントテン酸およびチアミンの要求性を示した (Table 4)。生育にパントテン酸およびチアミンを要求する性質、高泡を形成する性質は、泡盛 1 号株と 1980 年以降に分離された泡盛酵母の性質と同じであり¹⁶⁾、また K-9 株に比べて清酒もろみでのアルコール生成能が低いことから、Yeastcidin 耐性の性質に違いがあるものの NY2-5 株は泡盛酵母タイプと判断された。

清酒の小仕込み試験

分離酵母 NY2-1 株と対照として K-9 株を用いた小仕込み試験をそれぞれ 3 回行い、製成酒の一般成分分析、有機酸成分分析、香氣成分分析の結果を Table 6, 7, 8 にそれぞれ示した。

NY2-1 株と対照とした K-9 株を用いた製成酒の一般成分分析の日本酒度とアルコールの測定値から、NY2-1 株が K-9 株と同等の発酵力を有することが明らかとなった。また、アミノ酸度は両株でほぼ同じ値を示したが、酸度は K-9 株が 2.2 ± 0.1 に対して NY2-1 株は 1.6 ± 0.1 となり、NY2-1 株の酸度が低い値となる傾向を示した。

NY2-1 株と K-9 株の有機酸組成を比較すると、NY2-1 株を用いた製成酒のコハク酸、酢酸含有量が K-9 株の製成酒より低かったことから、NY2-1 株が特徴的な有機酸組成生成能を有する事が明らかとなった。清酒中の有機酸は、リンゴ酸、コハク酸、乳酸で約 80% が占められる¹⁹⁾。その中でリンゴ酸は清酒に爽やかな酸味を付与し、コハク酸はコクを付与する^{20,21)}。さらに、リンゴ酸とコハク酸の存在比によりリンゴ酸の爽やかな酸味の感じやすさが変化し、特にコハク酸含量に対するリンゴ酸含量比 (MA/SA 比) の値が 0.8 以上の場合にリンゴ酸の特徴が感じられやすいこ

Table 3 Physiological characteristics of the strains.

Strain	Growth in vitamin free medium	Resistance against Yeastcidin	TTC staining
NY2-1	+	+	Red
NY2-2	+	+	Red
NY2-3	+	+	Red
NY2-4	+	+	Red
NY2-5	-	+	Red
K-9	+	+	Red

Table 4 Vitamin requirement test of NY2-5.

Omitted vitamin	Growth		
	24 h	48 h	72 h
Pantothenic acid	-	-	-
Inositol	±	+	+
Pyridoxine	±	+	+
Thiamine	-	-	-
Biotin	±	+	+

Table 5 Froth forming ability of the strains in sake mash and components of the filtrate.

Strain	Froth forming	Sake meter	Alcohol (%)
NY2-1	-	+ 7	18.05
NY2-2	-	+ 8	17.70
NY2-3	-	+ 9	17.80
NY2-4	-	+ 8	17.85
NY2-5	+	- 1	16.00
K-9	+	+ 8	17.65

Table 6 Comparison of the components of the produced sake.

Strain	Sake meter	Alcohol (%)	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)
K-9	$- 3.0 \pm 4.5$	17.5 ± 0.4	2.2 ± 0.1	1.5 ± 0.3
NY2-1	$+ 1.3 \pm 1.7$	16.7 ± 0.5	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1

The results are the mean value \pm standard deviations of triple independent brewing experiments.

Table 7 Organic acids of the produced sake.

Strain	Citric acid (ppm)	Malic acid (ppm)	Succinic acid (ppm)	Lactic acid (ppm)	Fumalic acid (ppm)	Acetic acid (ppm)	Pyruvic Acid (ppm)	MA/SA ratio
K-9	127.2 ± 14.3	380.5 ± 62.1	544.8 ± 75.1	400.6 ± 33.2	12.4 ± 5.3	192.5 ± 87.1	16.4 ± 11.2	0.70 ± 0.10
NY2-1	121.1 ± 12.1	405.3 ± 33.9	358.8 ± 9.7	385.5 ± 27.8	6.5 ± 3.1	54.6 ± 24.4	13.0 ± 12.5	1.13 ± 0.11

The results are the mean value ± standard deviations of triple independent brewing experiments. MA/SA represent malic acid/succinic acid.

Table 8 Aroma components of the produced sake.

Strain	Ethyl caproate (ppm)	Isoamyl acetate (ppm)	Isoamyl alcohol (ppm)	Isobutyl alcohol (ppm)	E/A × 100	A/B ratio
K-9	UD	1.5 ± 0.3	205.3 ± 16.6	51.7 ± 4.3	0.75 ± 0.10	3.97 ± 0.40
NY2-1	3.8 ± 1.3	0.4 ± 0.6	303.0 ± 18.3	18.2 ± 2.4	0.14 ± 0.21	16.7 ± 1.28

The results are the mean value ± standard deviations of triple independent brewing experiments. E/A and A/B represent isoamyl acetate/ isoamyl alcohol and isoamyl alcohol/ isobutyl alcohol, respectively. UD represents the limit under detection.

とが示唆されており、リンゴ酸およびコハク酸の含量が重要なだけでなく MA/SA 比も重要である¹³⁾。NY2-1 株の MA/SA 比については 1.13 ± 0.11 であり、K-9 株の 0.7 ± 0.10 に比べて約 60% も高い値であった。これは NY2-1 株のリンゴ酸含有量については K-9 株と比べ差がないが、コハク含有量が約 30% 低いことによる。このように NY2-1 株は有機酸生成において、コハク酸生成量が少なく、それにより高 MA/SA 比を示す特徴を有する株であることが明らかとなった。

製成酒の香り成分分析において、K-9 株のカプロン酸エチル生成量は検出限界下に対し、NY2-1 株は 3.8 ± 1.3 ppm であり、NY2-1 株は K-9 に比べて高いカプロン酸エチル生成能を示した。一方、K-9 株と NY2-1 株の酢酸イソアミル生成量は、それぞれ 1.5 ± 0.3 ppm, 0.4 ± 0.6 ppm であったことから、NY2-1 株はカプロン酸エチル高生成株であることが明らかとなった。さらに、NY2-1 株はイソアミルアルコールとイソブチルアルコールの生成能においても特徴を示した。イソブチルアルコールの含有量と香りの軽さには負の相関があり、イソアミルアルコールとイソブチルアルコールの含量比 (A/B 比) と香りの軽さには正の相関がある²²⁾。K-9 株および NY2-1 株のイソアミルアルコールとイソブチルアルコール生成量については、NY2-1 株のイソアミルアルコールが K-9 株よりも約 50% 多く、イソブチルアルコールが約 60% 少なかった。そのため A/B 比は K-9 株と NY2-1 株でそれぞれ 3.97 ± 0.40 と 16.7 ± 1.28 となり、NY2-1 の A/

B 比が他に類をみない非常に高い値となった。このように NY2-1 株は香り成分生成において、高カプロン酸エチル生成能を有し、高 A/B 比を示す株であることが明らかとなった。

菌株の同定

発酵性、資化性などの結果をもとに The Yeast¹⁵⁾ を参照すると、NY2-1 株は、*S. cerevisiae* ではなく *Torulaspora delbrueckii* となる。そこで、酵母の属の同定を行うために、NY2-1 株の 26S rDNA-D1/D2 領域の塩基配列決定を試みたところ 572 塩基の配列を決定できた (Accession number, AB678454)。この配列を用いて国際塩基配列データベースに対する BLAST 検索を行い、上位 20 種の塩基配列から ClustalX 2.1 を用いて系統樹を作成した (Fig. 1)。得られた系統樹において、NY2-1 株は *T. delbrueckii* とは異なる系統群に位置することに加え、*Saccharomyces* 属からなる系統群に含まれること、*S. cerevisiae* の基準株である NRRL Y-12632 株と同じ系統枝を形成することが明らかとなり、それらのブーストラップ値は 99% 以上であった。しかし 26S rDNA-D1/D2 領域の塩基配列解析では種の同定に限界がある。そこで種の同定を行うために、さらに NY2-1 株の ITS 領域の塩基配列決定を試み、753 塩基の配列を決定した (Accession number, AB666165)。ITS 領域の塩基配列の相同性は、同一種内の変種の間では 99% 以上であり、別種はそれ未満であることが報告されている²³⁾。そこで NY2-1 株の ITS 領域の配列を比較したところ *S. cere-*

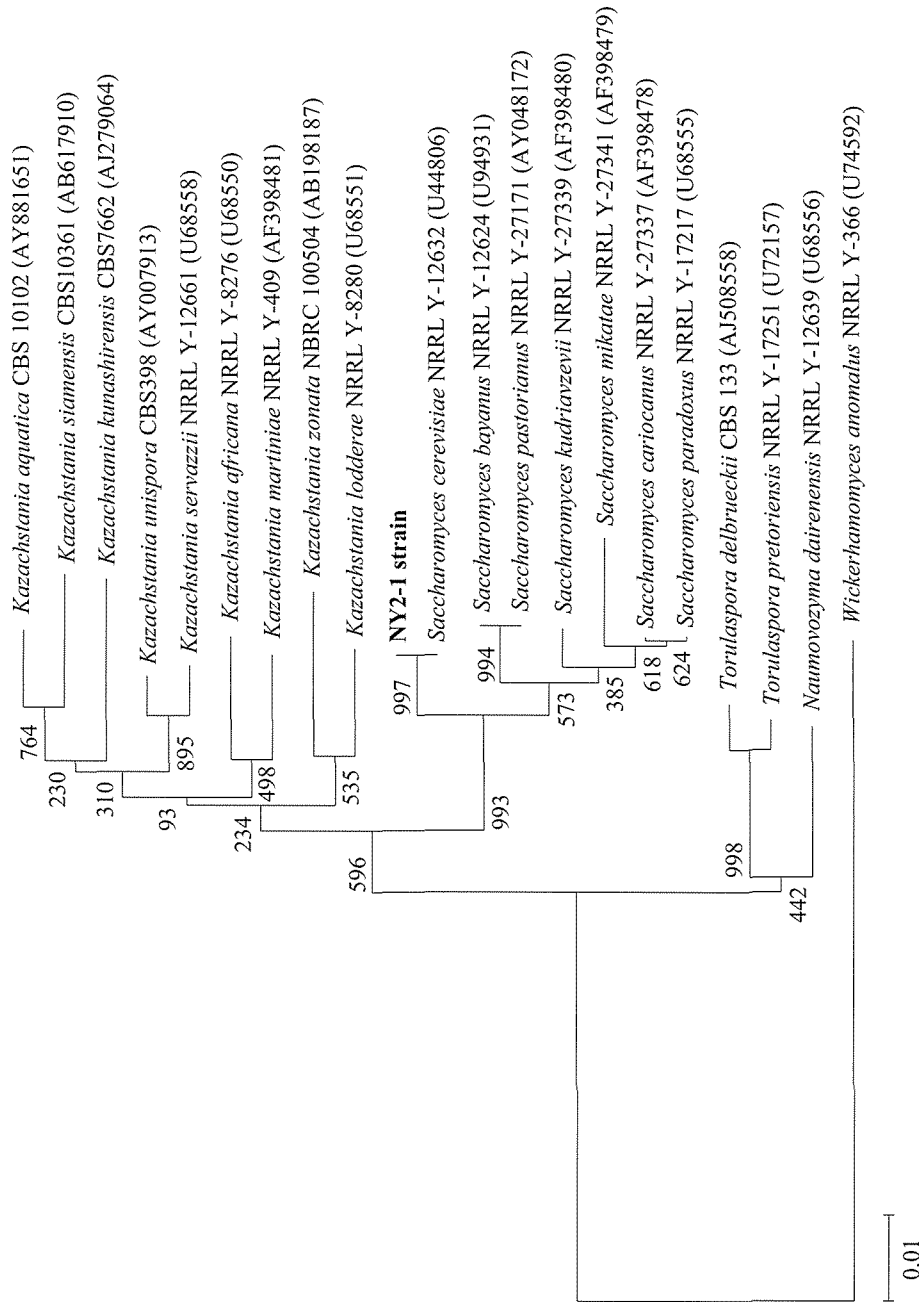


Fig. 1 Neighbor-joining tree based on a comparison of the 572 bps in the D1/D2 region of 26S rDNA. The number in parentheses is the accession number of the DNA Data Bank.

visiae NRRL Y-12632 株と K-9 株に対し、それぞれ 99.7%、100%の相同性を示した。さらに、NY2-1 株と *Saccharomyces* 属酵母 7 種および K-9 株の ITS 領域の塩基配列を用いて系統樹を作成したところ、NY2-1 株は基準株 NRRL Y-12632 株および K-9 株を含む *S.*

cerevisiae からなる系統枝を形成し、ブストラップ値は 98.7%であった (Fig. 2)。26S rDNA-D1/D2 領域および ITS 領域の塩基配列を用いた解析により、NY2-1 株は *T. delbrueckii* ではなく、マルトースの発酵性および資化性がない *S. cerevisiae* であると判断で

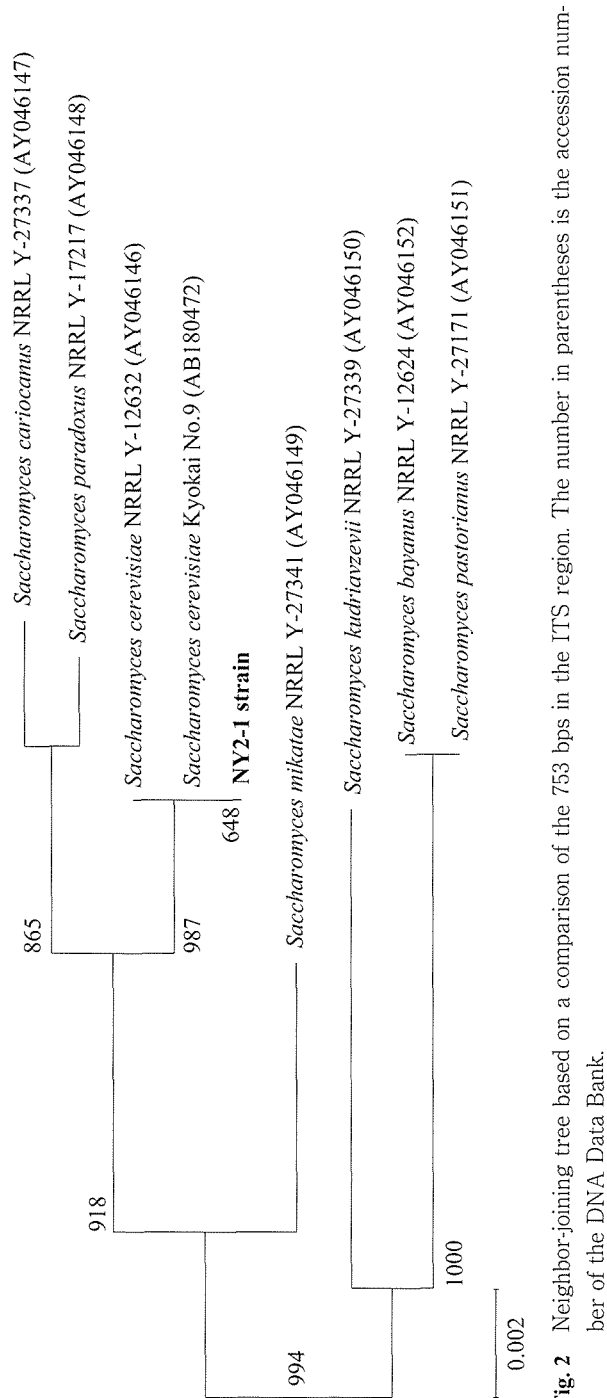


Fig. 2 Neighbor-joining tree based on a comparison of the 753 bps in the ITS region. The number in parentheses is the accession number of the DNA Data Bank.

きた。さらに、ITS領域の塩基配列の相同性からNY2-1株は*S. cerevisiae*のなかでも清酒酵母K-9株とより近縁であることが示唆された。

要約

麴から調製した麴汁培地に乳酸および固形成分としてカゼインを添加した集積培地を用いて集積培養を行った結果、分離株NY2-1～5株が得られた。分離酵母の生理学的性質からNY2-1～4株は清酒酵母タイプ、NY2-5株は泡盛酵母タイプと判断された。

清酒の小仕込み試験において、NY2-1株は清酒酵母K-9株と同等の発酵力を示した。また製成酒の香気成分組成および有機酸成分組成において、NY2-1株は高カプロン酸濃度、高A/B比、高MA/SA比を示す酵母であることが明らかとなった。26S rDNA-D1/D2領域およびITS領域の塩基配列を基にした同定の結果、NY2-1株は*S. cerevisiae*であり、K-9株と近縁であることが示唆された。NY2-1株は、清酒製造用酵母として利用可能であると思われる。

参考文献

- 1) 増補改訂 清酒製造技術 (財団法人日本醸造協会, 東京) (1998)
- 2) 津川光昭, 菅間誠之助, 山村絃司, 初谷亘慶, 野白喜久雄: 醸協, **61**, (1), 71-74 (1966)
- 3) 竹田正久, 塚原寅次: 醸工, **43**, (7), 447-456 (1965)
- 4) 市川英治: 醸協, **88**, (2), 101-105 (1993)
- 5) 福田和郎: 醸協, **88**, (1), 22-28 (1993)
- 6) 相川元庸, 水津哲義, 市川英治, 川戸章嗣, 安部康久, 今安 聡: 醸酵工学, **70**, (6), 473-477 (1992)
- 7) 吉田 清, 稲橋正明, 中村欽一, 野白喜久雄: 醸協, **88**, (8), 645-647 (1993)
- 8) 宮岡俊輔, 新谷智吉, 森本 聡: 醸協, **96**, (2), 115-120 (2001)
- 9) 大場孝宏, 末永 光, 一松時生, 羽田野雄大, 満生慎二, 鈴木正柯: 醸協, **103**, (12), 949-953 (2008)
- 10) 穂坂 賢, 中田久保, 坂井 劭: 醸協, **95**, (11), 837-842 (2000)
- 11) 穂坂 賢, 小室友香理, 中田久保: 醸協, **99**, (5), 381-387 (2004)
- 12) 小室友香理, 穂坂 賢, 中田久保: 醸協,

- 99, (10), 743-749 (2004)
- 13) 小室友香理, 清水大介, 加藤陽子, 穂坂 賢, 中田久保: 醸協, **100**, (6), 454-460 (2005)
- 14) 木下(小室)友香理, 門倉利守, 数岡孝幸, 穂坂 賢, 中田久保: 東京農大農学集報, **53**, (2), 100-106 (2008)
- 15) C.P. KURTZMAN, J.W. FELL, and T. BOEKHOUT: The Yeasts, a Taxonomic Study, 5th edition, 87-110 (2011)
- 16) 中田久保, 穂坂 賢, 坂井 劭: 発酵工学, **63**, (6), 509-515 (1985)
- 17) 注解編集委員会編: 第四回改正国税庁所定分析法注解 (財団法人日本醸造協会, 東京) (1993)
- 18) 中田久保, 坂井 劭, 竹田正久, 塚原寅次: 醸協, **75**, (9), 761-764 (1980)
- 19) 林田正典, 上田隆蔵, 寺本四郎: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 85-91 (1968)
- 20) 大場孝宏: 醸協, **106**, (5), 262-270 (2011)
- 21) 佐藤 信, 大場俊輝, 高橋康次郎, 国分伸二, 小林幹男, 小林宏治: 醸協, **72**, (11), 801-805 (1977)
- 22) 吉沢 淑, 高橋康次郎: 醸協, **81**, (10), 680-684 (1986)
- 23) 杉田 隆, 西川主實: *Jpn. J. Med. Mycol.*, **45**, 55-58 (2004)