

エタノール耐性酵母の育種

河村大造

Breeding of Higher Ethanol-Tolerant Sake Yeasts

Daizo KAWAMURA

Low and high ethanol-tolerant strains were selected from the laboratory yeasts maintained in our laboratory. Hybrids of the low ethanol-tolerant strains and the high ethanol-tolerant ones were constructed, and the hybrids were subjected to tetrad analysis. The results showed that two or more genes were involved in the ethanol tolerance of yeasts. Hybrids between the high ethanol-tolerant strains were inferior to the original haploids in ethanol tolerance; the hybrids were more ethanol tolerant than the parent diploids. High ethanol-tolerant strains of sake yeasts were also constructed by crossing. Among the strains tested, the H 2 h 6 / H 2 - 5 - 62 hybrid strain originated from sake yeast Hiroshima No. 2 (H 2) had the highest ethanol tolerance and fermenting ability; the hybrid behaved like the parent sake yeast H 2 with regard to ethanol production and specific gravity in the sake mash.

清酒もろみの醸酵後期にもろみ中のエタノール濃度が18~20%に達すると、酵母は急速に死滅し、死滅酵母の自己消化によるアミノ酸の増加や着色が著しくなり、清酒の品質が劣化することが知られている。エタノール醸酵もろみでも同様に、生成エタノール濃度の上昇に伴って醸酵の停止・酵母の死滅という現象が認められる。そこで、これに対処するために、エタノール耐性株の取得が様々な方法^{1)~6)}で行われ、エタノール耐性の機構についてもこれまでにさまざまな角度から検討されてきている。その結果、エタノール耐性は複数遺伝子による支配であり、そのメカニズムが複雑で不明な点が多いこ

と^{7)~10)}、交雑によってエタノール耐性の強い株が得られる可能性があること¹⁰⁾が明らかにされている。

そこで、筆者は、交雑によりエタノール耐性の向上した清酒酵母の造成を試みた。本報では、その結果と育種する過程で得られた二、三の知見について報告する。

実験方法

1. 菌株

実用の清酒酵母では孢子形成能が低いため、子のう解剖による四分分子の取得が困難であった。そこで、表1に

表1 菌株

菌 株	遺 伝 子 型	由 来
AH22	a <i>leu2 his4</i> <i>can1</i>	研究室保存株
NA87-11A	a <i>leu2 his3 trp1</i>	研究室保存株
SA13	a <i>leu2</i>	研究室保存株
YNN140	a <i>his3 trp1 ura3 ade2</i>	研究室保存株
K12-2A	a <i>leu2 ura3</i>	研究室保存株
RAY3A	a <i>leu2 his3 trp1 ura3</i>	研究室保存株
YPH500	a <i>leu2 his3 trp1 ura3 ade2 lys2</i>	研究室保存株
8A-1B	a <i>leu2 his3</i>	研究室保存株
8A-2A	a <i>leu2 his3</i>	研究室保存株
K7	a/a	清酒酵母協会7号(日本醸造協会)
H2	a/a	清酒酵母広島2号(広島県)
H2-5-62	a	H2由来の一倍体変異株 ¹²⁾

示す遺伝研究株を用いてエタノール耐性の遺伝的性質を検討した。また、比較のために、対照として清酒酵母である日本醸造協会7号(K7)酵母と広島2号(H2)酵母を用いた。接合型は基準株としてAH22株(a型)とNA87-11A株(α型)を用い、基準株と試験株とを混合し、接合子形成の有無を観察して判定した。

交雑によってエタノール耐性酵母を育種するためにH2酵母からRandom-spore-plating法¹¹⁾によって一倍体株を取得した。そのうちのH2-5-62株は既に一倍体低温清酒酵母として選択・育種していた菌株である¹²⁾。

2. 交雑法

交雑は集団接合法¹³⁾により行い、子のう解剖はmicromanipulatorを用いて行った。胞子形成は酢酸カリウム1%、酵母エキス(オリエンタル酵母)0.1%、グルコース0.05%、寒天2%の組成の培地で行った。栄養要求性の検定は次に示す組成の合成培地を用いて行った。最小培地[イーストナイトロジェンベース(Yeast Nitrogen Base w/o amino acid; DIFCO)0.67%、グルコース2%、寒天2%]にアミノ酸等のオMISSION混液(最終濃度がロイシン30ppm、イソロイシン30ppm、リジン30ppm、バリン150ppm、フェニルアラニン60ppm、メチオニン20ppm、トリプトファン20ppm、ヒスチジン20ppm、アルギニン20ppm、チロシン30ppm、ウラシル20ppm、アデニン400ppmでこのうちの一成分をぬいて調製した混合液)を加えて調製した。

3. エタノール耐性試験

後藤らの方法¹⁴⁾に準じて行った。すなわち、麴汁培地(Bllg.6°)で20℃、5日間培養して、得られた菌体を洗浄後、1%グルコースとエタノール(5%、10%、15%、20%)を含む0.1M酢酸緩衝液(pH4.2)中で、15℃、7日間静置し、生存率をメチレンブルー染色法¹⁵⁾により測定した。

4. 醸酵試験

醸酵通気管を付けた1l容エルレンマイヤーフラスコに480mlのYPD[酵母エキス(オリエンタル酵母)1%、ペプトン(日本製薬)2%、グルコース10%]液体培地を入れた。この培地に15℃で静置培養した前培養液を本培養液中の接種時菌濃度が約 1.2×10^6 /mlになるように植菌した。これを15℃で静置培養して炭酸ガス発生による減少重量を測定し¹⁶⁾、醸酵力の指標とした。

5. 小仕込試験

仕込みは麴汁培地で28℃、一晚振とう培養した酵母培養液を用いた二段仕込みで行った。その仕込配合を表2に示した。醸酵温度は水麴から試験終了まで15℃とした。

表2 仕込配合

	初 添	留 添	総 量
総米(g)	74	126	200
α米(g)	54	100	154
乾燥麴(g)	20	26	46
水(ml)	150	165	315
酵母*(ml)	2		2
乳酸**(g)	0.31		0.31

* 麴汁培地において28℃で1晩、振とう培養(120rpm)した。
** 75%溶液

また、仕込容器に醸酵通気管を取り付け、醸酵経過に伴うもろみ重量の減少を測定してエタノール生成量を推定した¹⁷⁾。もろみ重量がほとんど変化しなくなった時点で試験を終了した。

6. 製成酒の分析

製成酒の一般成分(日本酒度、エタノール分、酸度およびアミノ酸度)の分析は国税庁所定分析法¹⁸⁾に準じて行った。

実験結果および考察

1. 酵母のエタノール耐性

酵母のエタノール耐性の遺伝的性質を検討するために、まず、遺伝解析可能な遺伝研究株のエタノール耐性を検討した。その結果を図1に示した。比較対照のために、実用の清酒酵母であるK7酵母とH2酵母についても調べた。SA13株はエタノール濃度5、10、15、20%のいずれにおいても生存率の低いことが認められた。YPH500株、NA87-11A株、K12-2A株、AH22株、YNN140株および8A-2A株がエタノール濃度5、10%においてはK7酵母とH2酵母と同等かそれ以上の生存率を示した。エタノール濃度15%においてもNA87-11A株はK7酵母、H2酵母より高い生存率を示し、YPH500株、YNN140株、AH22株およびK12-2A株はK7酵母、H2酵母とほぼ同等の生存率を示した。これらをまとめると、①清酒酵母は清酒もろみ中の高濃度エタノールに耐えるために強いエタノール耐性を示すであろうという予想に反し、エタノール高濃度において多くの遺伝研究株とほぼ同等のエタノール耐性を示すこと。②逆に、清酒酵母より強いエタノール耐性を示す遺伝研究株が存在することが明らかになった。

次に、これらの株の中でエタノール耐性の強い株(NA87-11A株、K12-2A株)と弱い株(SA13株)を選んで、交雑・子のう解剖を行って、交雑株とそれから得た四分子のエタノール耐性(エタノール濃度15%での生存率)を調べた。また、併せて、接合型と栄養要求性についても調べ、その結果を表3に示した。SA13/NA87-11A株のエタノール耐性は交雑に用いた元の一倍体株の中間的な値を示し、SA13/K12-2A株の場合は、交

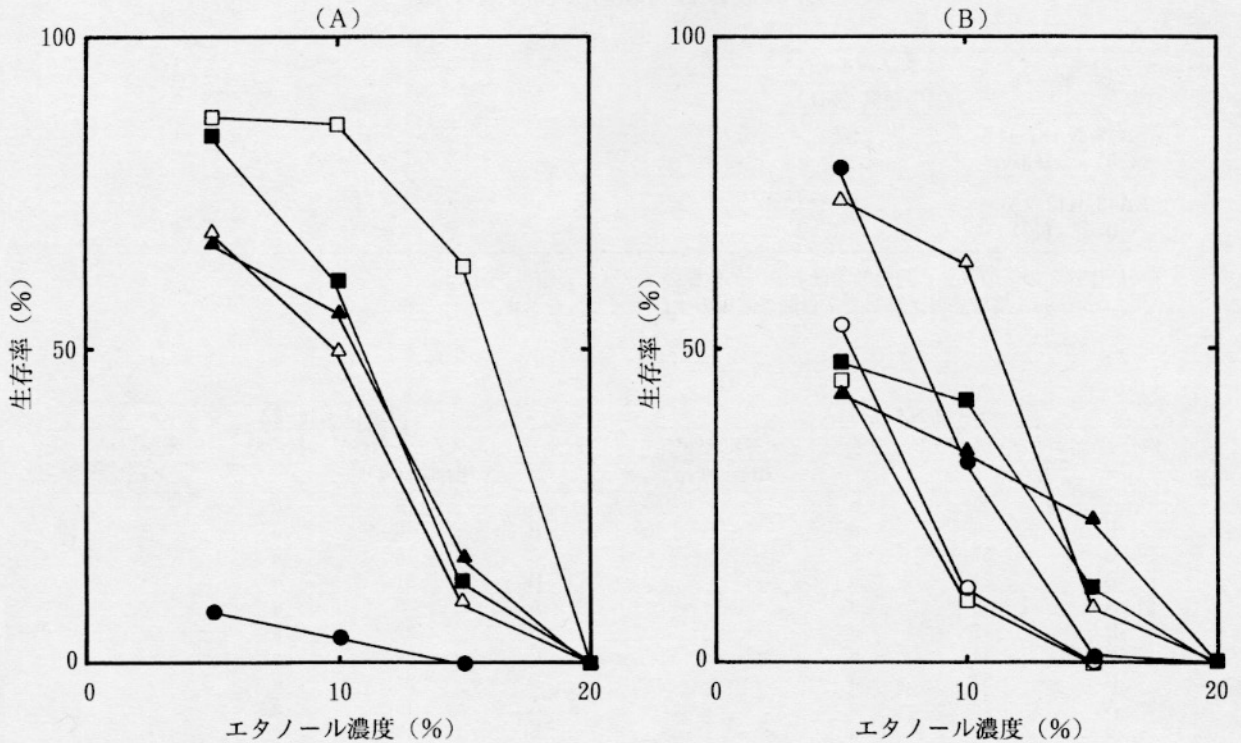


図1 酵母のエタノール耐性

(A) △, AH22; □, NA87-11A; ●, SA13; ▲, YNN140; ■, K12-2A
 (B) ○, RAY-3A; △, YPH500; □, 8A-1B; ●, 8A-2A; ▲, K7; ■, H2

雑に用いた一倍体株のうちのエタノール耐性の強い方の株であるK12-2A株に近い値を示した。SA13/NA87-11A株, SA13/K12-2A株共に、接合型・栄養要求性の分離はほぼ2:2を示しており、正常な分離が行われたと考えられた。エタノール耐性の分離については、値が連続的で判断しにくい、例えば、エタノール耐性の強い株と弱い株の境界は40%、30%、20%の3種類に仮定して考えてみた。その場合の分離を表4に示した。生存率40%あるいは30%を境界とした場合にはSA13/NA87-11A株, SA13/K12-2A株のどちらにおいても2つの遺伝子の相補によってエタノール耐性が発現していると考えれば、整合性が認められる。また、生存率20%を境界とした場合は両株において共に、さらに多くの遺伝子がエタノール耐性の発現に関与していると推察される。いずれにしても、エタノール耐性の発現に関係する遺伝子が複数存在すると考えられた。Jiménezらが酵母のエタノール耐性についてはその遺伝背景が複雑で多数の遺伝子が関与していると推定している¹⁰⁾が、今回の結果もこれを支持していると考えられた。

次に、これらの一倍体の中でエタノール耐性（エタノール濃度15%での生存率）が強かった株を選んで、交雑を行い、二倍体にすることによってエタノール耐性がさらに強化されるかどうかを検討した。その結果を表5に示した。エタノール濃度が15%と20%の場合の生存率

の値を示した。ここで交雑に用いた一倍体株はその元の二倍体株（SA13/NA87-11A株とSA13/K12-2A株）よりエタノール耐性（エタノール濃度15%での生存率）が強くなっている株ばかりであった。交雑株のエタノール耐性はエタノール濃度15%、20%のどちらの場合でも交雑に用いた二つの一倍体株の中間の値を示すものが多く、交雑に用いた一倍体株より低い値を示すものもあった。いずれの交雑株も元の二倍体株〔交雑に用いた一倍体の親株（具体的にはSA13/NA87-11A株とSA13/K12-2A株）〕よりはエタノール耐性が向上していた。しかし、交雑に用いた一倍体2株のエタノール耐性値より高い値を示す交雑株は得られなかった。これらのことから、今回試験に用いた株のエタノール耐性は元の二倍体株（SA13/NA87-11A株とSA13/K12-2A株）より得た四分子の中でエタノール耐性の強い株を選択し、それらを組み合わせて交雑して二倍体にすると元の二倍体株（SA13/NA87-11A株とSA13/K12-2A株）よりは強いが、交雑に用いた一倍体株よりは弱くなる傾向が認められた。造成した二倍体株のエタノール耐性がその交雑に用いた一倍体株のそれより弱かったという結果は、多くの遺伝子がエタノール存在下で生育を制限しているので交雑により相補作用が起こりエタノール耐性の強い株が得られる可能性があるというJiménezら¹⁰⁾の報告と一致しない。Jiménezらはワイン酵母についてエタ

表3 交雑株とその四分子の諸形質の分離

(A)

交 雑 株	エタノール耐性* 生存率 (%)
SA13/NA87-11A (0) (63)	24
SA13/K12-2A (0) (13)	14

一倍体株名の下()内の数字はその一倍体株のエタノール耐性*を示す。

* エタノール濃度15%, 15°Cで7日間静置後の生存率(%)を示す。

(B)

SA13/NA87-11A				SA13/K12-2A			
四分子	エタノール耐性* 生存率 (%)	接合型	栄養要求性** His Trp	四分子	エタノール耐性* 生存率 (%)	接合型	栄養要求性** Ura
1 A	0	a	- -	1 A	9	a	+
B	0	a	+ +	B	0	a	-
C	57	a	- -	C	16	a	+
D	21	a	- -	D	81	a	-
2 A	0	a	+ +	2 A	5	a	+
B	1	a	+ +	B	22	a	-
C	24	a	- -	C	69	a	-
D	37	a	- -	D	24	a	+
3 A	29	a	- -	3 A	76	a	-
B	41	a	- -	B	13	a	+
C	26	a	+ +	C	2	a	+
D	0	a	+ +	D	1	a	-
4 A	8	a	- -	4 A	4	a	-
B	12	a	- -	B	98	a	+
C	0	a	+ +	C	14	a	-
D	23	a	+ +	D	0	a	+
5 A	23	a	+ +	5 A	1	a	+
B	29	a	- +	B	0	a	-
C	74	a	- -	C	51	a	-
D	0	a	- -	D	25	a	+
6 A	74	a	- -	6 A	17	a	-
B	13	a	- -	B	0	a	+
C	0	a	+ +	C	1	a	+
D	5	a	+ +	D	3	a	-
7 A	13	a	+ +	7 A	60	a	+
B	5	a	+ +	B	5	a	-
C	26	a	- -	C	22	a	-
D	28	a	- -	D	0	a	+
8 A	1	a	+ +	8 A	4	a	+
B	17	a	- -	B	0	a	-
C	18	a	- +	C	47	a	+
D	14	a	+ -	D	90	a	-
9 A	1	a	+ +	9 A	4	a	+
B	59	a	- -	B	0	a	+
C	36	a	+ +	C	4	a	-
D	3	a	- -	D	83	a	-
10 A	16	a	+ +	10 A	4	a	+
B	46	a	+ +	B	3	a	-
C	5	a	- -	C	16	a	+
D	0	a	- -	D	48	a	-
11 A	27	a	- -	11 A	10	a	-
B	12	a	+ +	B	23	a	-
C	13	a	+ +	C	0	a	+
D	1	a	- -	D	21	a	+
12 A	21	a	- -	12 A	1	a	+
B	0	a	+ +	B	74	a	+
C	23	a	+ +	C	28	a	-
D	58	a	- -	D	2	a	-

* エタノール濃度15%, 15°Cで7日間静置後の生存率(%)を示す。

** His: ヒスチジン, Trp: トリプトファン, Ura: ウラシルの非要求性(+), 要求性(-)を示す。

ノールの存在する培地中における世代時間でエタノール耐性を表しており、本報とは酵母の種類もエタノール耐性の試験法も異なっている。従って、本報での結果が Jiménez¹⁰⁾らの報告と一致しなかった理由として、酵

母菌株の遺伝的背景の違いとエタノール耐性の測定法の違いが考えられる。今後の検討課題としたい。

以上の結果に基づき、実用株において醸酵力が強く、エタノール耐性の強い株の造成の可能性を探った。まず、H2酵母から分離した一倍体酵母のエタノール耐性（エタノール濃度15%での生存率）を調べた（表6）。その中でエタノール耐性の強かった一倍体株についてはエタノール濃度20%でのエタノール耐性も調べた（表6）。そして、これらのエタノール耐性の強い一倍体株を交雑して、二倍体株を造成し、そのエタノール耐性も調べた（表6）。エタノール濃度15%の場合に、H2酵母から分離した一倍体の多くがH2酵母より強いエタノール耐性を示した。表5の遺伝研究株の結果と同様、実用株においても、それから一倍体株を分離し、エタノール耐性の強い株を選択してそれらを交雑して造成した二倍体株は、その交雑に用いた一倍体株よりもエタノール耐性が弱い株が多いこと、元の二倍体株（H2酵母）よりエタノール耐性が強いことが明らかとなった。

2. 醸酵試験

これらの造成した二倍体株とその交雑に用いた一倍体株について醸酵試験を行い、減少重量を測定してエタノール生成量を推定した。その結果を図2に示した。一倍体株間では大きな差は認められなかったが、H2-5-62株が他の株より醸酵力が少し優れていた。また、二倍体株の中ではH2h6/H2-5-62株が他の二倍体株より優れた醸酵力を示した。

表4 エタノール耐性の分離

(A) 境界を生存率40%と仮定した場合

菌 株	エタノール耐性*が下記の分離を示した四分子数				
	エタノール耐性の強い株：弱い株				
	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
SA13/NA87-11A	0	0	0	7	5
SA13/K12-2A	0	0	1	9	2

(B) 境界を生存率40%と仮定した場合

菌 株	エタノール耐性*が下記の分離を示した四分子数				
	エタノール耐性の強い株：弱い株				
	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
SA13/NA87-11A	0	0	1	7	4
SA13/K12-2A	0	0	1	9	2

(C) 境界を生存率20%と仮定した場合

菌 株	エタノール耐性*が下記の分離を示した四分子数				
	エタノール耐性の強い株：弱い株				
	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
SA13/NA87-11A	0	3	4	3	2
SA13/K12-2A	0	1	5	5	1

* エタノール濃度15%，15℃で7日間静置後の生存率（%）

表5 交雑株のエタノール耐性

(A) エタノール濃度15%

$\alpha \setminus a$		二倍体のエタノール耐性* [生存率（%）]			
		SA13/NA87-11A から得た一倍体株		SA13/K12-2A から得た一倍体株	
		9B (52)	12D (61)	3A (76)	12B (80)
SA13/NA87-11A から 得た一倍体株	5C (67)	50	33	49	80
	6A (78)	46	61	58	80
SA13/K12-2A から 得た一倍体株	4B (90)	74	77	88	88
	8D (83)	46	63	70	54
	9D (88)	51	51	74	66

(B) エタノール濃度20%

$\alpha \setminus a$		二倍体のエタノール耐性* [生存率（%）]			
		SA13/NA87-11A から得た一倍体株		SA13/K12-2A から得た一倍体株	
		9B (2)	12D (8)	3A (20)	12B (15)
SA13/NA87-11A から 得た一倍体株	5C (22)	12	8	11	8
	6A (65)	8	16	6	49
SA13/K12-2A から 得た一倍体株	4B (92)	49	47	65	68
	8D (66)	13	10	22	15
	9D (47)	11	16	25	33

* エタノール濃度15%，15℃で7日間静置後の生存率（%）を示す。

** エタノール濃度20%，15℃で7日間静置後の生存率（%）を示す。

一倍体株名の後の（ ）内の数字はその一倍体株のエタノール耐性を示す。

表6 広島2号酵母由来の一俵体株とそれらから
造成した交雑株のエタノール耐性

菌 株	接合型	エタノール耐性* [生存率 (%)]	
		エタノール15%	エタノール20%
H2h1	a	88	35
H2h2	a	52	—
H2h3	a	80	5
H2h4	a	26	—
H2h5	a	47	—
H2h6	a	75	18
H2h7	a	89	47
H2h8	a	40	—
H2h9	a	52	—
H2h10	a	25	—
H2h11	a	90	25
H2h12	a	91	21
H2h13	a	36	—
H2h14	a	28	—
H2h15	a	14	—
H2h16	a	37	—
H2h17	a	59	—
H2h18	a	60	—
H2h19	a	48	—
H2-5-62	a	39	4

H2	a/a	25	0
H2h6/H2h1	a/a	69	8
H2h6/H2h3	a/a	53	1
H2h6/H2h7	a/a	59	7
H2h6/H2h11	a/a	53	3
H2h6/H2h12	a/a	60	5
H2h6/H2-5-62	a/a	46	9

* エタノール濃度15%あるいは20%、15°Cで7日間静置後の生存率 (%) を示す。

3. 小仕込試験

このH2h6/H2-5-62株について小仕込試験を行って、向上したと考えられるエタノール耐性および醗酵力が清酒もろみ中でのエタノール生成にどのような効果をもたらすかを検討した。対照として、元の一俵体H2-5-62株、H2h6株とH2酵母を用いた。その時のもろみの重量変化と製成酒の一般成分を図3と表7に示した。H2h6株はもろみ全期間を通じて、他の3株よりエタノール生成が遅いことが認められた。H2h6/H2-5-62株、H2酵母、H2-5-62株はもろみ全期間を通じて同じようなエタノール生成を示した。表7の結果も同様のことを示した。すなわち、この4株による製成酒においては日本酒度の切れ、エタノール生成量にほとんど差が認められなかった。原ら^{4) 19)}の取得したエタノール耐性変異株は、親株のもろみが醗酵後期にエタノール生成が停止したのに反して、その後も醗酵を続け生成エタノール量が多くなっている。その原らの取得したエタノール耐性変異株のエタノール耐性(エタノール濃度20%での生存率)が約10%、今回造成した株のそれは9%でほぼ同程度と考えられる。それにもかかわらず、今回造成した醗酵力とエタノール耐性を向上させた株は清酒もろみ中においてほとんどその効果を示さなかった。

以上のことから、次のことが明らかになった。①二俵体株から一俵体株を分離するとその一俵体株の中に元の

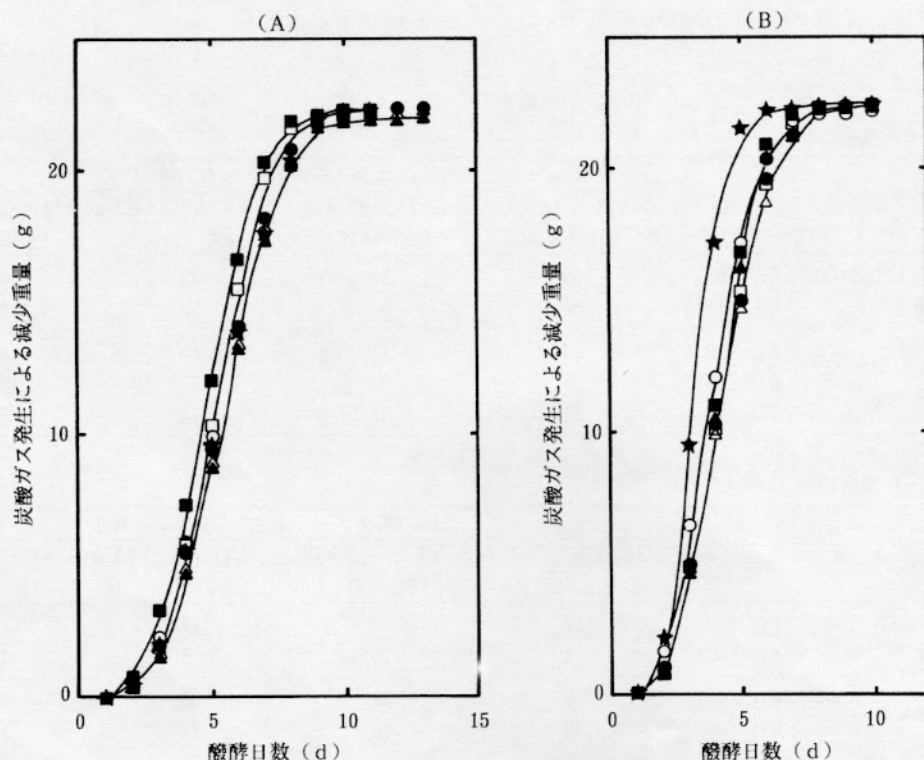


図2 選択および造成酵母の醗酵力

(A) 選択一俵体株 ○, H2h1; ●, H2h3; △, H2h7; ▲, H2h11; □, H2h12; ■, H2-5-62; ★, H2h6
(B) 造成二俵体株 ○, H2; ●, H2h6/H2h3; △, H2h6/H2h11; ▲, H2h6/H2h12; □, H2h6/H2h1;
■, H2h6/H2h7; ★, H2h6/H2-5-62

表7 製成酒の一般成分

	H2h6/H2-5-62	h6	H2-5-62	H2
日本酒度	+4	+1	+2	+1
アルコール(容量%)	20.4	19.7	20.0	19.8
酸度* (ml)	2.5	3.5	3.4	3.0
アミノ酸度* (ml)	3.8	3.9	3.7	3.6

* 0.1N-NaOH/10ml

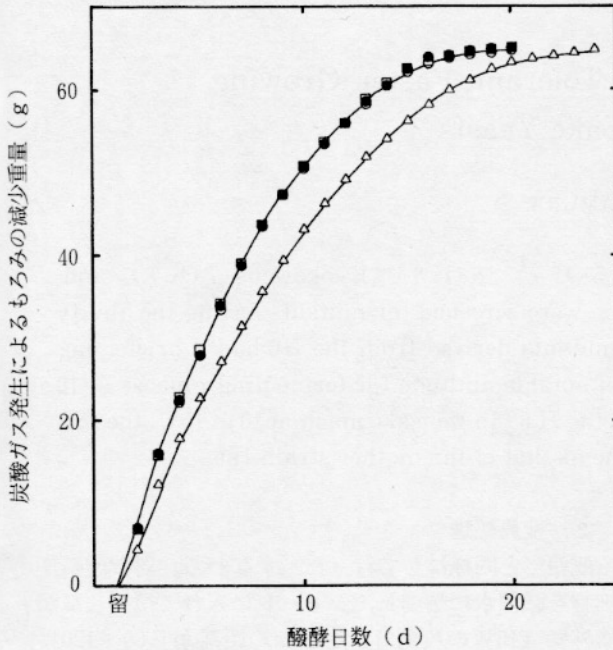


図3 造成酵母による清酒小仕込試験におけるもろみの重量変化

○, H2; △, H2h6; □, H2-5-62
●, H2h6/H2-5-62

二倍体株よりエタノール耐性の強い株が多数存在する。

②実用酵母二倍体株から一倍体株を分離し、その中でエタノール耐性および醗酵力の強い株を選んで交雑することにより、元の二倍体株よりエタノール耐性および醗酵力の強い二倍体酵母を得た。③造成酵母を用いた清酒小仕込試験では従来の酵母とほとんど差は認められなかった。

要 約

遺伝研究株のエタノール耐性を検討し、その中から耐性の強い株と弱い株を選んで交雑し四分子解析を行った。その結果、エタノール耐性の発現には複数の遺伝子が関与していると考えられた。これらの四分子の一倍体の中でエタノール耐性の強い株を選んで交雑してそのエタノール耐性を調べた。交雑株のエタノール耐性は交雑に用いた一倍体よりは劣っていたが、元の二倍体のそれより高い値を示した。

実用株においても、H2酵母由来のエタノール耐性および醗酵力の強いH2h6/H2-5-62株を造成した。しかし、清酒もろみ中では従来の酵母とほとんど差は認められなかった。

文 献

- 1) JIMÉNEZ, J., and BENITEZ, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 917 (1988).
- 2) SCHENBERG, A. C., and COSTA, S. O. P.: *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, **6**, 323 (1987).
- 3) BROW, S. W., and OLIVER, S. G.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 116 (1983).
- 4) 原 昌道・佐々木雅晴・小幡孝之・野白喜久雄: 醸協, **71**, 301 (1976).
- 5) 原 昌道・溝口晴彦・小幡孝之・飯村 稔・戸塚 昭・野白喜久雄: 醸協, **73**, 408 (1978).
- 6) KENNETH, W., and RICK, C.: *Biotechnol. Lett.*, **6**, 587 (1984).
- 7) ISMAIL, A. A., and ALI, A. M. M.: *Folia Microbiol.*, **16**, 346 (1971).
- 8) ISMAIL, A. A., and ALI, A. M. M.: *Folia Microbiol.*, **16**, 350 (1971).
- 9) AGUILERA, A., and BENITEZ, T.: *Arch. Microbiol.*, **143**, 337 (1986).
- 10) JIMÉNEZ, J., and BENITEZ, T.: *Curr. Genet.*, **12**, 421 (1987).
- 11) FINK, G. R.: *Methods in Enzymology*, Vol. XV II A, TABOR, H. and TABOR, C. W. ed. (Academic Press, New York and London), p.69 (1970).
- 12) 河村大造・土屋義信・末成和夫・手島義春・門 隆興・五反田晃・東江昭夫: 醸酵工学, **67**, 77(1989).
- 13) 大嶋泰治: 微生物遺伝学実験法, 初版, 石川辰男編 (共立出版, 東京), p.197 (1982).
- 14) 後藤邦康・上田護国・中村武司・原 昌道・吉沢 淑: 醸協, **81**, 189 (1986).
- 15) 橋谷義孝: 酵母学, 初版, (岩波書店, 東京), p.311 (1936).
- 16) 飯塚 廣・後藤昭二: 酵母の分類同定法, 第2版, (東京大学出版会, 東京), p.40 (1973).
- 17) 布川弥太郎・佐藤 勝・合瀬健一: 醸協, **71**, 982, (1976).
- 18) 注解編集委員会: 第3回改正国税庁所定分析法注解, 3版, 注解編集委員会編 (日本醸造協会, 東京), p.12 (1984).
- 19) 原 昌道・深田雄一・野崎英雄・小幡孝之・野白喜久雄: 醸協, **71**, 569 (1976).