

プロトプラスト融合による正暦寺酵母の改良

Breeding of the sake yeast isolated from Bodai-Moto by protoplast fusion.

山中信介¹⁾、松澤一幸¹⁾、山下浩一¹⁾、大森千寿代²⁾

Shinsuke YAMANAKA, Kazuyuki MATUZAWA, Hirokazu YAMASHITA and Chizuyo OMORI

古代の製法による「菩提もと」から採取し選抜された野生酵母（正暦寺酵母 *Saccharomyces cerevisiae*）の、プロトプラスト融合による発酵性や香気成分生産性の改良について検討した。

正暦寺酵母および協会酵母から EMS (ethyl methanesulfonate) 処理法により、リジン要求性変異株、およびウラシル要求性変異株の取得を試みた。得られた変異株の性質を検討し、融合用変異株を選定した。次に融合促進剤として polyethylene glycol と Ca イオンを用いたプロトプラスト融合を行い、得られた融合株およびこれらの胞子分離株の性質などについて検討した。これらの中から優れた性質を有する株を用いて、当センターが新たに開発した菩提もと清酒製造法により、総米 2 kg の小仕込み試験を行い、改良され実用性があると思われる酵母を選抜した。

1. 緒言

奈良は清酒発祥の地の一つである。特に奈良市の郊外正暦寺において室町時代に開発された清酒用酵母の原型である「菩提もと」は、当時の近代的清酒醸造法の始まりと言われている¹⁻³⁾。この「菩提もと」をはじめ中世に寺院で造られた清酒、奈良酒、天野酒、百濟寺酒、豊原酒などは「僧坊酒」と呼ばれ、酒母育成法、諸白造り、段掛け法、上槽法、火入れ法などの新しい酒造技術が開発され⁴⁾、清酒製造法の基本が創生された。さらに江戸時代にほぼ現在の清酒の醸造技術が完成されたといわれている。

この室町時代の「菩提もと」を復活させ、地域特性を有する大和酒を開発する事を目的に以下の研究に取り組んできた⁵⁻⁷⁾。

古代の「菩提もと」醸造法の科学的解明

「菩提もと」醸造に適した正暦寺を起源とする乳酸菌のスクリーニング

正暦寺を起源とする酵母のスクリーニング

接合法や細胞融合法による正暦寺酵母の育種改良

乳酸菌や酵母を巧みに利用した、良質で再現性も良い

「菩提もと」製造方法の確立

「菩提もと」を酒母とする大和酒「菩提もと清酒」の開発

ここでは「菩提もと清酒」開発の一環として、正暦寺および古代の製法による「菩提もと」から採取選抜された野生酵母（正暦寺酵母 *Saccharomyces cerevisiae*）のプロトプラスト融合法による育種改良について検討した。

正暦寺から採取選抜された野生酵母は、通常の清酒酵母に比べ、酸やアミノ酸を多く生成し、「菩提もと清酒」に

濃厚さとボディを付与し、また泡の生成が少ない（泡無し酵母）事の特徴とするが、一方で発酵性がやや劣り、また香に難点があるなどの欠点を持つ。この正暦寺酵母の特徴を残しながら、プロトプラスト融合による発酵性の改良と香気成分生産性の向上を図る事を目的とした。

細胞融合などの方法による醸造用酵母の育種の研究の為には、醸造用酵母の特性を損なうことなく、何らかのマーカーを導入することが重要である。よく利用される変異株として、栄養要求性変異株、薬剤耐性変異株、呼吸欠損変異株などがある。

ここでは栄養要求性変異株の取得法の中でも、効率の良いポジティブセレクション法であるリジン要求性変異株^{8, 9)}、およびウラシル要求性変異株¹⁰⁾の取得を試みた。

一方、プロトプラスト融合の特徴は、生物独自の持つ性的能力によることなく、人為的、物理的に細胞を融合させ、新種細胞を得るところにある。この研究は、1974年 Kao & Michayluk¹¹⁾ が植物プロトプラストにおいて、polyethylene glycol (以下 PEG と略) と Ca イオンが融合促進剤として働くことを発見して以来、植物ばかりでなく各種の微生物のプロトプラスト融合に広く用いられてきた¹²⁾。

本報では、正暦寺酵母と協会系優良酵母とのプロトプラスト融合により融合株を取得し、得られた融合株や胞子分離株の性質などについて検討し、胞子分離株の中から発酵性と香気成分生産性の改善された改良酵母を取得したので報告する。

2. 実験

2.1 使用菌株

協会 9 号酵母（以降 No 2 と略号）および古代の製法に

1) 奈良県工業技術センター

2) 近畿大学農学部

よる「菩提もと」から採取選抜された正暦寺酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のなかで、プロトプラスト再生率や胞子形成能の高い V27-7 (以降 No8 と略号) を用いた。

2.2 培地

Y¹ 培地：酵母エキス 1%、ポリペプトン 2%、グルコース 2% (寒天 2%)

酢酸カリウム培地：酢酸カリウム 1%、酵母エキス 0.1%、グルコース 0.05%、寒天 2%

最小培地：Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (Difco) 0.67%

グルコース 2%、寒天 2%

Kcl 添加最小培地：最小培地に 0.6MKcl 添加

ΛΛ プレート：L-アミノアジピン酸 0.2%、L-リジン 3 mg/100ml、Yeast Nitrogen Base (アミノ酸と硫酸アンモニウムを含まない) 0.16%、グルコース 2%、寒天 2%

リジン添加最小培地：最小培地にリジン 3 mg/100ml 添加
Yeast Nitrogen Base (アミノ酸を含まない)

Λ○Λ プレート：

Λ液：5-フルオロオロチン酸 0.2% (pH5~7) 50ml

○液：Yeast Nitrogen Base w/o amino acid 0.67%、ウラシル 5mg/100ml

グルコース 2%、寒天 2%

○液をオートクレーブした後、45℃でΛ液を混合

ウラシル添加最小培地：最小培地にウラシル 5 mg/100ml 添加

2.3 成分分析

アルコール濃度の測定は理研機器製アルコメイトを使用した。またその他の清酒成分は国税庁所定分析法によった。

2.4 香気成分の分析

検出器に mass selective detector 5973 を搭載した Hewlett Packard 社製ガスクロマトグラフ HP6890 を用いた。また試料導入はヘッドスペースガスサンプラー HP7694 を用いた。カラムは、Capillary Column HP19091X-236 (bonded poly ethylene glycol) を用い、40℃ から 230℃ まで昇温した。

2.5 変異株の取得

北本らの方法⁸⁻¹⁰⁾により、リジン要求性変異株およびウラシル要求性変異株の取得を試みた。対数増殖期の酵母を洗浄集菌後、0.1M-リン酸 buffer (pH7.0) 中で E.M.S (ethyl methane sulfonate) により変異処理を行った。集菌、5%チオ硫酸ナトリウムによる中和、洗浄後、ΛΛプレートまたは Λ○Λプレートに塗布し 30℃ で約 1 週間培養した。出現したコロニーを釣菌し、最小培地に生育せず、リジン又はウラシル添加最小培地に生育するものをそれぞれリジン要求性変異株又はウラシル要求性変異株とした。

2.6 プロトプラスト融合

有馬¹²⁾、蟻川^{13, 14)}の方法に準じた。酵母を Y¹ 液体

培地で培養し、対数増殖期の細胞を使用した。0.1Mリン酸緩衝液 - 0.2%メルキャプトエタノール - 60mMEDTA で処理した後、Zymolyase-20T (1mg/ml) - 0.6MKCl - 0.2%メルキャプトエタノール 10ml でプロトプラスト化した。各々の細胞を 5 × 10⁷ 個程度になるよう懸濁し 5ml ずつ、1:1 で混合し、15分静置した。遠心分離後、30%PEG 6000 - 10mM CaCl₂ - 0.1M トリス緩衝液 (pH7.5) 5ml に懸濁し、30℃ - 15分ゆっくり攪拌した。さらに 0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.5) - 0.6MKCl 6ml で洗浄、懸濁後、選択培地 (0.6MKCl 含有最小培地) に混釈し、同培地を重層して、30℃ で約一週間培養した。

2.7 DNA 含量

Herbartらの方法により核酸を抽出し、Salmon-testes DNA-Na (Sigma 社) を DNA 標品として用い、Buruton の方法で定量した¹³⁾。

2.8 ランダム胞子分離

酢酸カリウム培地で胞子形成させた後、形成した胞子を 0.2%2-メルカプトエタノール - Zymolyase-20T (1mg/ml) でプロトプラスト化処理 (2ml) し、30℃ で 1 時間静置した。無菌水で希釈後 Y¹ 寒天培地に塗布し、生じたコロニーの栄養要求性を調べた。

2.9 発酵試験

培地は、乾燥麹の糖化液 (蔗糖度：25.4) を 105℃ にて 15分殺菌したもの 15ml を用いた。発酵温度は 15℃ 一定とし、炭酸ガス減量を経日的に測定した。

2.10 菩提もと清酒の小仕込み試験

新しく開発した菩提もとの製法¹⁵⁾により、酒母を製造した。乳酸菌は正暦寺から分離した菩提もと製造に適した正暦寺乳酸菌を使用し、酵母は親株、これらの融合株、およびその胞子分離株を用いた。総米 2kg の菩提もと清酒の仕込み配合を Table.1 に示した。酒母歩合 7%、麹歩合 22%、くみ水歩合は 128% とした。

Table.1 Proportions of raw materials for brewing sake using bodai-moto. (g)

	酒母		もろみ				合計
	もやし	二匹	米	餅	麹	水	
総米	0.091	0.140	0.303	0.526	0.869	0.162	2.00
生米	0.091						
蒸米		0.094	0.214	0.400	0.700	0.162	1.57
炊米		0.045	0.089	0.125	0.170		0.43
くみ水	0.168		0.272	0.469	0.300	0.170	2.57

3. 結果および考察

3.1 変異株の取得

E.M.S 濃度を変えて変異処理した時の酵母の生存率、お

よび確認培地での変異株の取得状況の一例をTable. 2 に示した。EMS濃度が3%の場合は、酵母の生存率が低く選択培地で小さな多くのコロニーの発生が観察されたが、確認培地での変異株の取得数は低かった。変異株を得るために適したEMS濃度は、1.0~1.5%程度と思われた。

また、リジン要求性株は比較的多数の変異株を取得する事ができたのに対して、ウラシル要求性変異株の取得確率は低かった。最終的に3回の実験の結果、協会酵母からリジン要求性変異株134株、ウラシル要求性変異株24株、また正暦寺酵母からリジン要求性変異株86株、ウラシル要求性変異株32株を得た。

Table. 2 Isolation of lysine or uracil auxotrophic mutants.

Yeast strain	Concentration of EMS (%)	Survival rate after treatment (%)	Isolation number of	
			Lys- mutants	Ura- mutants
No2	1.0	3.5	2.7	1.3
	1.5	2.0	4.8	3
	3.0	1	1.2	0
No8	1.0	3.5	2.7	1.3
	1.5	2.9	3.3	1.5
	3.0	2	0	4

3.2 変異株の性質

YPD培地で10回継体培養を繰り返した後の、変異の復帰率について調査した。協会酵母のリジン要求性変異株は試験した菌株の約1/3が復帰した。また正暦寺酵母のリジン要求性変異株では約半分が復帰した。一方ウラシル要求性変異株の安定性は悪く、一部を除いてほとんどの株の変異が復帰した。リジン要求性株は比較的安定しているものが多かったのに対して、ウラシル要求性株は変異復帰率が非常に高かった。

親株およびこれらの変異株、合計100株を用いた麹汁培地による発酵試験を行った結果をFig. 1およびTable 3に示した。なお、協会酵母のリジン要求性変異株(2Lと略記)は23株の平均値、正暦寺酵母のリジン要求性変異株(8Lと略記)は23株の平均値、協会酵母のウラシル要求性変異株(2Uと略記)は24株の平均値、また正暦寺酵母のウラシル要求性変異株(8Uと略記)は26株の平均値で示した。2Lは、親株と同様な発酵経過を示し、最終のアルコール濃度および酸度も親株と同様な値であり、また香気成分生産性も親株とほぼ同様な傾向を示し、全体的に親株の持つ発酵特性の損傷は認められなかった。8Lは、親株と同様な発酵性と最終アルコール濃度を示したが、酸度は親株よりも少し低い傾向が見られ、香気成分はやや多い傾向を示した。2Uは、親株と同様な発酵経過と最終アル

コール濃度を示したが、酸度は親株よりも少し低い傾向が見られ、香気成分はやや多い傾向を示した。また8Uは、親株に比べ発酵性が劣り、最終アルコール濃度もかなり低い値を示した。酸度はやや低い傾向が見られたが、香気成分生産性は親株よりも良好と思われた。

細胞融合用変異株として、変異復帰率が低く、アルコール発酵性、酸生産性などが親株と酷似し、比較的香りの良好なものを選定した。最終的に協会9号酵母からウラシル要求性変異株2U3、正暦寺酵母からリジン要求性変異株8L10を選定した。

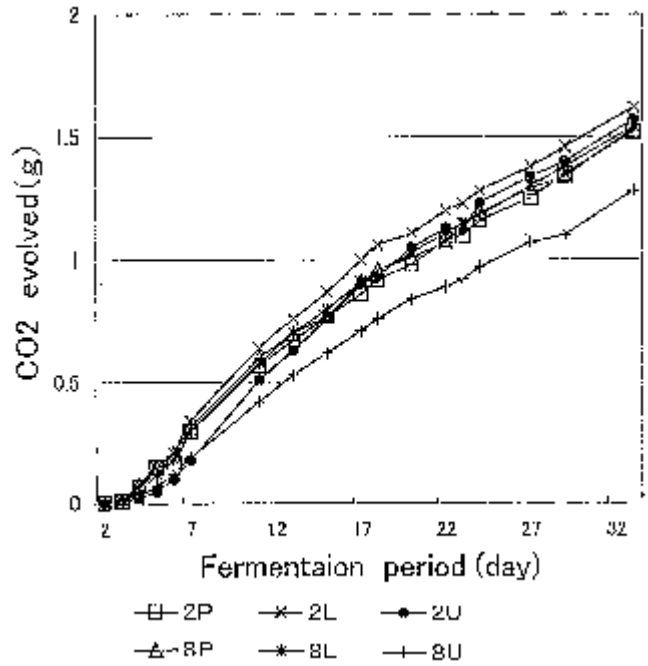


Fig. 1 Fermentation curves of parent strains and auxotrophic mutants.

Table. 3 Results of fermentation of parental strains and auxotrophic mutants in koji extract.

Strain	CO2 evolved (g)	Acidity (ml)	Ethanol (%)	Acetyl acetate (ppm)	Isopentyl alcohol (ppm)	Ethyl caproate (ppm)	Ethyl caprylate (ppm)
2P	1.52	5.0	11.2	0.02	44.3	0.10	0.05
8P	1.53	6.2	11.2	0.02	51.2	0.07	0.03
2L	1.62	5.1	11.7	0.02	45.9	0.11	0.06
8L	1.54	5.3	11.1	0.04	46.9	0.14	0.06
2U	1.57	4.9	11.5	0.04	41.8	0.14	0.08
8U	1.30	5.0	8.8	0.05	40.4	0.19	0.06

3.3 プロトプラスト融合

2U3と8L10間の融合条件、プロトプラスト化率、再生率をTable 4に示した。30、60分間のzymolyase処理で、ほぼ100%プロトプラスト化したが、これらの再生率は極めて低く、0.01~0.43%程度であった。合計3回の融合実験により、最小培地に生育する株を30株分離した。

これらの中から、顕微鏡によるcell sizeの観察の結果、有意に大きいと思われる19株を選定した。DNA含量の定量は再現性が悪く、倍数体を特定するには至らなかった。

次に孢子形成率を求めた結果、11株に6~21%の孢子形

成能を認めた。胞子形成能の確認された11株について、ランダム胞子分離を行い、胞子の栄養要求性を調べた結果をTable.5に示した。11株の内、その胞子にリジン又はウラシル両方の栄養要求性を示す株が1株、またそのいずれかの要求性を示す株が4株認められた。両方の栄養要求性を示す株は4は、2U3と8L10間の融合株であるものと推察された。また片方だけの栄養特性を示す4株は、片方の親同士が融合したか、変異が復帰したなどの理由が考えられた。

Table.4 Protoplast fusion between 8L10 and 2U3.

strain	osmotic stabilizer	concentration of zymolyse	ratio of protoplast formation (%)	regeneration frequency (%)
8L10	0.6M-ksl	1mg/ml	99.9%	0.43%
2U3	1.6M-ksl	1mg/ml	100%	0.01%

Table.5 Random spore segregation of fusants.

fusant	Rate of spore formation (%)	Number of segregant		
		tested	lysine-	uracile-
F 1	1.2	200	0	0
F 4	1.2	200	3	5
F 13	0	200	1	0
F 17	2.1	200	0	1
F 18	1.5	200	0	0
F 19	1.7	200	0	0
F 22	0	200	2	0
F 23	1.0	200	0	0
F 24	1.1	200	0	0
F 26	7	200	0	0
F 27	1.1	200	3	0

3.4 融合株及び胞子分離株の発酵試験

親株、融合株F4およびF4から得られた胞子分離株について、麹汁培地による発酵試験を行った結果の一部をTable 6に示した。融合株F4は、酸生産性は高いが発酵性が劣り、また香り成分の生産性は親株の正暦寺酵母程度で

Table.6 Result of fermentation Of fusant and segregants in koji extract

Strain	segregants in koji extract							
	CO ₂ evolved (ml)	acidity (pH)	Ethanol (g/100g)	acetone (g/100g)	alcohol (g/100g)	caproate (g/100g)	caprylate (g/100g)	ethyl (g/100g)
2P	1.72	4.1	12.1	0.47	22.1	2.55	0.27	
3P	1.85	4.1	12.8	0.65	20.4	2.55	0.23	
F4	1.73	4.2	12.4	0.52	20.3	2.57	0.20	
SP4-1	1.84	4.1	11.7	0.67	20.4	2.53	0.2	
SP4-2	1.67	4.1	11.8	0.57	20.1	2.42	0.20	
SP4-3	1.75	4.2	12.2	0.67	20.4	2.45	0.27	
SP4-9	2.09	4.1	12.3	0.36	22.3	2.47	0.10	
SP4-10	1.74	4.4	11.8	0.63	21.2	2.55	0.22	
SP4-11	1.85	4.1	11.1	0.45	24.7	2.47	0.20	
SP4-11	1.36	5.1	9.3	0.45	21.2	2.27	0.14	
SP4-16	1.23	5.2	10.4	0.72	21.2	2.28	0.21	
SP4-17	1.40	4.4	10.7	0.49	24.2	2.13	0.2	
SP4-19	1.48	4.2	10.1	0.30	20.5	2.27	0.41	
SP4-20	1.27	5.7	12.3	0.22	22.2	2.23	0.19	
SP4-21	1.47	4.6	12.2	0.43	23.7	2.11	0.4	
Ave.	1.56	4.2	11.4	0.53	21.2	2.47	0.21	
Max.	2.09	5.0	12.3	0.22	24.1	2.57	0.27	
Min.	1.18	5.1	9.66	0.16	22	2.17	0.16	

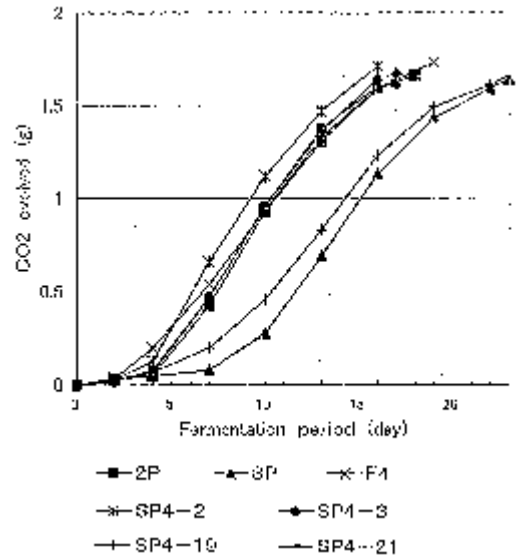


Fig.2 Fermentation curves of fusant and segregants

あった。胞子分離株25株は、発酵性の良好な株から劣る株までさまざまな発酵特性を示した。その中で発酵性の良好な分離株SP4-2、4-3、4-19、4-21の発酵経過をFig. 2に示した。SP4-2、4-3、4-19は、親株とほぼ同様な発酵経過を示したが、SP4-21は融合株と共に発酵性が劣った。SP4-2、4-3、4-19の酸生産性は高く、香り成分に関してはSP4-2、及びSP4-3が両親株の中間の生産性を示した。

3.5 菩提もと清酒の小仕込み

親株、融合株F4、および麹汁培地を用いた発酵試験で成績の良好であった、胞子分離株SP4-2、4-3、4-19、4-21を酵母として用いた菩提もと清酒の小仕込みを行った。

酒母工程は、初期に各酵母を正暦寺乳酸菌と共に10⁸/ml程度添加した後、そやし工程を30で3日間、酒母もろみ工程を15で7日間経過させた。この菩提もとと製造工程中の各成分の変化をFig.3～5に示した。

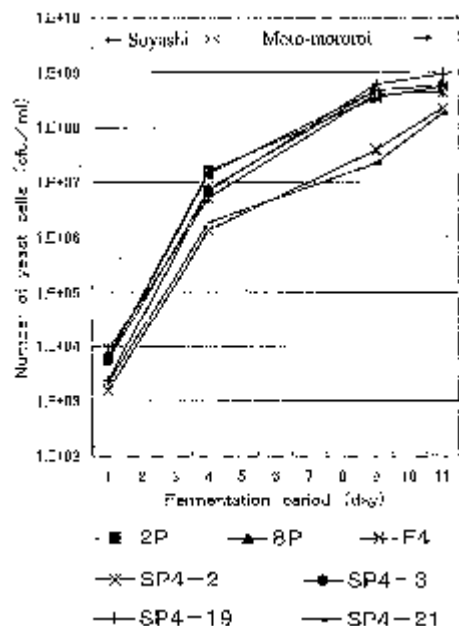


Fig.3 Changes of yeast cells in the Bodai-moto mash.

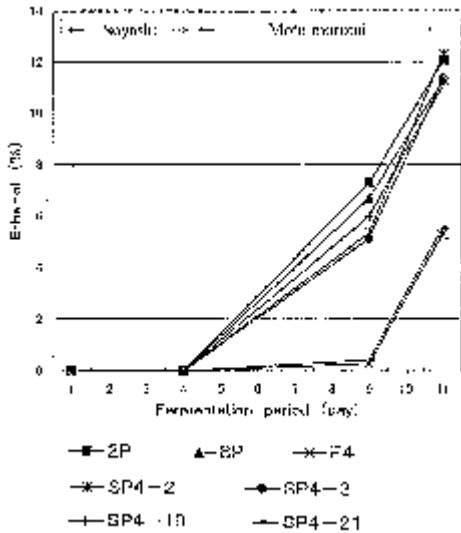


Fig.4 Changes of ethanol in the Bodai-moto mash.

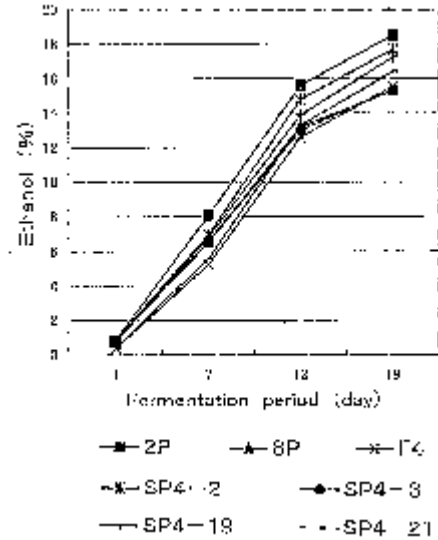


Fig.6 Changes of ethanol in the SAKE mash.

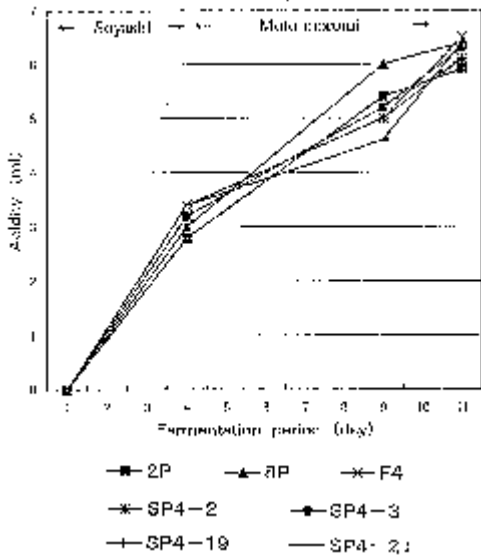


Fig.5 Changes of acidity in the Bodai-moto mash.

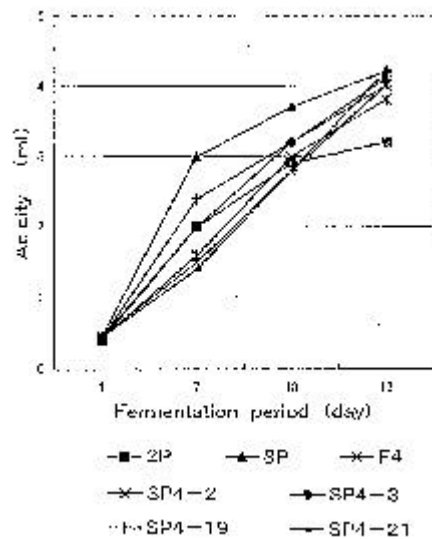


Fig.7 Changes of acidity in the SAKE mash.

そやし工程では、酸度は順調に増加し3日目にどのロットもほぼ3前後に達した。その間に酵母数は $10^6 \sim 10^7 / \text{ml}$ に達し、やや増殖が早いようにも思われたが、早湧き現象は見られなかった。いずれのロットも再現性良く、そやし水が製造されたように思われた。

酒母もろみ工程では、酸度はいずれも経日的に増加し、酒母としてはやや少ないものの、もろみ7日後には6前後に達した。この間、酵母数も順調に増加し、アルコールも生成したが、融合株1⁴、および胞子分離株SP4-21は発酵が遅れる傾向が見られた。他の5ロットは、もろみ7日目において酸度、酵母数、アルコール濃度などから判断して、健全な酒母に仕上がっているものと考えられた。

これらを酒母とした菩提もと清酒のもろみ経過中の成分変化をFig. 6 ~ 7に、また製成した清酒の一般成分及び香氣成分分析結果をTable. 7に示した。

Table. 7 Composition of the Bodai-moto sake.

Strain	Days of mash	Fermentability, Fibrous matter	Alcohol content (%)	Acidity (ml)	Acid value	Alcohol content (%)	Acid value	Alcohol content (%)	Acid value	Alcohol content (%)	Acid value
2P	19	high	18.4	2.2	2.8	2.1	4.4	133	0.36	0.48	0.48
8P	20	ov	17.4	3.1	2.7	3.2	173	0.3	0.33	0.33	
F4	20	ov	18.2	3.3	2.8	2.6	145	0.36	0.33	0.33	
SP4-2	20	ov	10.5	2.9	2.5	6.7	155	0.34	0.14	0.14	
SP4-3	20	middle	17.2	1.8	2.9	3.5	133	0.3	0.37	0.37	
SP4-19	20	high	10.1	3.2	2.5	2.2	153	0.3	0.37	0.37	
SP4-21	20	middle	10.2	3.1	2.0	3.1	152	0.32	0.26	0.26	

親株の正暦寺酵母(8P)は、すでに報告しているとおり、酸度が協会9号(2P)に比べ1程度多く、アルコール発酵性が劣り、泡無し酵母であるが、香氣成分生産性に劣っていた。これらの間の融合株1⁴は、酸生産性は正暦寺酵母に近く、泡も低い、発酵性も正暦寺酵母同様緩慢であった。高級脂肪酸エステル系の香氣成分生産性では、少し改善が認められた。

融合株1⁴から得られた胞子分離株4株の内、SP4-2は、泡無しであり、酸の生産も比較的多く、またアルコール発

酵性も遜色ないように思われた。香氣成分では酢酸イソアミルの生成量が多く、また高級脂肪酸エステル系香氣成分の生産性も多少改善されたように考えられた。従って、正暦寺酵母の改良酵母として、実用性があるものと思われた。

一方SP4-3は、その性質が正暦寺酵母に酷似していた。またSP4-19は、アルコール発酵性が改善されたものの、香氣成分生産性は劣っていた。胞子分離株は、それぞれ性質が異なるため、融合株からさらに多くの目的とする改良酵母を取得できる可能性があり、本方法の特徴の一つであるものと考えられた。

4.まとめ

「菩提もと清酒」開発の一環として、正暦寺および古代の製法による「菩提もと」から採取し選抜された野生酵母（正暦寺酵母*Saccharomyces cerevisiae*）の、プロトプラスト融合による発酵性や香氣成分生産性の改良について検討した。

まず、正暦寺酵母および協会酵母からEMS処理により、リジン要求性変異株、およびウラシル要求性変異株を取得し、得られた変異株の中から、変異復帰率が低く、また麹汁による発酵試験の結果、発酵性、酸生産性が親株と類似し、かつ香りが良好なものを融合用変異株として選定した。

次に融合促進剤としてpolyethylene glycolとCaイオンを用いたプロトプラスト融合を行い、得られた融合株およびこれらの胞子分離株の性質などについて検討した。

これらの中から優れた性質を有する数株を用いて、新たに開発した菩提もと清酒製造法により、総米2kgの小仕込み試験を行った。その結果、正暦寺酵母の酸生産性と泡なしの性質を残しながら、発酵性や香氣成分生産性の改良された菩提もと清酒製造に適した改良酵母を取得することができた。

5.参考文献

- 1) 加藤百一：日本の酒の歴史，加藤弁三郎編（昭和51）。
- 2) 鎌谷親善，加藤百一：「御酒之日記 - その解説と翻刻」『酒史研究』13，日本酒造史学会（1995）。
- 3) 加藤百一：『酒は諸白』，平凡社（1989）。
- 4) 加藤百一：日本の酒5000年，145 - 149，技法堂出版，東京（1987）。
- 5) 加藤百一：醸協，94，(7) 535 ~ 541（1999）。
- 6) 松澤一幸：奈良県工業技術センター技術だより，94，(7) 6（1999）。
- 7) 朝日新聞 1999.1.7 他
- 8) 北本勝ひこ：醸協，84，(1) 34 ~ 37（1989）。
- 9) 小田，北本，高橋，吉沢：醸協，83，(9) 614 ~ 617（1988）。
- 10) 北本勝ひこ：醸協，84，(12) 849 ~ 853（1989）。
- 11) Kao,K.N., Michayluk,M.R. : Planta , 115 , 355 (19

74)。

- 12) 有馬賢治，高野勇：醸酵工学，57，(5) 380 ~ 395（1979）。
- 13) 蟻川幸彦，馬場茂，近藤君夫，桑原秀明，宮崎忠雄：醸協，83，(9) 605（1988）。
- 14) 星野徹也，飯島直人，後藤邦康，：醸協，93，(4) 312（1998）。
- 15) 松澤一幸：特願平11 - 269088「酒母の製造方法」