

カボス (*Citrus sphaerocarpa*) 花から高確率で *Saccharomyces cerevisiae* を獲得するための 最適分離初期条件

岡 本 啓 湖・平 井 龍 一・日 野 美 香
浅 田 貴美子・藤 原 秀 彦

【要 旨】

カボス (*Citrus sphaerocarpa*) の花から *S. cerevisiae* 分離を可能にする最適初期条件を探索した。その方法として、発泡性または濁りを有する培地の選抜、コロニーによる *S. cerevisiae* 様菌株の純粋分離、高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌株の選抜、細胞形態が *S. cerevisiae* 類似の菌株選抜、マルチプレックス PCR (4 種類の遺伝子確認) を用いた *S. cerevisiae* 菌株¹⁾ の選抜、高エチルアルコール生成 *S. cerevisiae* 菌株の選抜を行った。 *S. cerevisiae* 菌株総数の 93.5% を獲得した「YMP⁺ 培地, 15°C での試験管培養」が最適分離初期条件となった。

【Key words】

Saccharomyces cerevisiae, *Citrus sphaerocarpa*, YMP⁺ 培地, 15°C 培養

緒 言

清酒用酵母として広く使用されているものは日本醸造協会や地方自治体開発の酵母である。協会酵母として一般的な清酒製造に利用される 7 号酵母や、過去には吟醸酒製造には必須といわれた 9 号酵母、酸生成が少ないことから純米酒製造向きといわれる 10 号酵母、香気の生成に優れ、吟醸酒製造に適した 14 号²⁾、地方自治体酵母では秋田酵母等が多数知られている。吟醸香などの香气成分の多くは清酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) によって生成される³⁾。更に清酒酵母には清酒製造過程の麴の糖化酵素により得られる高い糖濃度に耐性で、且つ高濃度のエチルアルコールを生産する酵母でなければならない。近年各地で清酒用酵母の探索が行われるようになった⁴⁻⁸⁾。清酒用酵母を求める理由として、自然界から上記清酒酵母が獲得されれば、協会酵母には無い個性豊かで特徴ある香气成分を生成することが期待される。そこで本研究では大分県特産品であるカボス (*Citrus sphaerocarpa*) の花からの *S. cerevisiae* 分離を目的とし、自然界からの *S. cerevisiae* 分離に適した初期分離条件の確立を目指した。

実験方法

培地・培養温度・培養容器の初期条件設定

S. cerevisiae を探索する初期培養条件には、カボス (*C. sphaerocarpa*) の品種を 2 種類

(大分1号, 豊のみどり), 培養温度を2種類 (15°C, 30°C), 採取用容器を2種類 (三角フラスコ, 試験管), 全条件数を10種類とした。但し, 培地の2種類 (YMP: 酵母エキス0.3%, 麦芽エキス0.3%, ペプトン0.5%, D-グルコース (液体では10%, 寒天では1%), YPD: ポリペプトン2%, 酵母エキス1%, D-グルコース (液体では10%, 寒天では1%)) は抗生物質 (0.1% クロラムフェニコール) 及び防カビ剤 (0.25% プロピオン酸ナトリウム) の有無により4種類とした。各液体培地の量は三角フラスコには50ml, 試験管には10mlとし, これらの条件設定によりカボスの花の採取用培地の合計本数を290本準備し, 採取したカボスの花を各培地に浸漬した (表1)。三角フラスコには培地を覆い隠す量の花を入れ, 試験管には花を一輪入れ, 各培養温度条件 (30°C, 15°C) で培養を開始し, 培養温度30°C条件では7日間で培養を終了し, 15°C条件では培養期間を20日以上とした。培養終了後に目視による発泡性・濁りの観察を行い, 発泡性が認められた培養液または濁りが生じた培養液を選抜した。

表-1 カボス (*C. sphaerocarpa*) からの *S. cerevisiae* を純粋分離するための初期条件設定

培養温度	培養容器	液体培地	培地容量	サンプル数 (本)		
				大分1号	豊のみどり	合計
30°C	三角フラスコ	YMP ⁺	50ml	8	7	15
		YPD ⁺		8	7	15
	試験管	YMP ⁺	10ml	25	25	50
		YPD ⁺		25	25	50
15°C	三角フラスコ	YMP ⁺	50ml	7	8	15
		YMP ⁻		8	7	15
		YPD ⁺		7	8	15
	試験管	YPD ⁻	10ml	8	7	15
		YMP ⁺		25	25	50
		YPD ⁺		25	25	50
合計				146	144	290

※抗生物質,防カビ剤を添加している場合YMP⁺ (YPD⁺), 無添加を YMP⁻ (YPD⁻) または YMP (YPD) と表記

発泡性または濁りを有する初期条件培地からの *S. cerevisiae* 様菌株の純粋分離

発泡性または濁りを有する初期条件培養液を滅菌蒸留水で10⁵~10¹⁰倍に希釈し (培養希釈液), 得られた各培養希釈液200μlをYMP⁺寒天培地に植菌した後, 30°Cで3日間培養し, 出現した *S. cerevisiae* 様コロニーを1シャーレにつき4個または8個選び出し, 選抜コロニーとした。各選抜コロニーをYMP⁻寒天培地に植菌し, 30°Cで3日間培養し, この工程を2回続けて単一菌株 (*S. cerevisiae* 様菌株) とした。

ダーラム管発泡試験による発泡性の確認及び顕微鏡観察での形態比較による *S. cerevisiae* の判別

得られた各 *S. cerevisiae* 様菌株を白金耳でワンループ掻き取り, ダーラム管入り10ml YPD液体培地に懸濁し, 培養温度30°Cで72時間培養した後, CO₂発生の確認は目視により行い, ダーラム管に半分以上気泡が入っているものを「+」とし, 半分未満のものを「-」とした。また「+」評価が得られた菌株を高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌株として選抜し, 更に顕微鏡観察により菌体の大きさが5μm付近で, 形態が *S. cerevisiae* に類似する菌株を *S. cerevisiae* 形態類似菌株として選抜した。

S. cerevisiae 形態類似菌株のマルチプレックス PCR による S. cerevisiae の簡易同定¹⁾

各 S. cerevisiae 形態類似菌株を 5 ml の YPD 液体培地で 30°C、一晩培養した後、15,000 rpm で 1 分間遠心分離し集菌した。上清を除いたペレットに 100 μl の Sol.1 (1 M ソルビトール, 20mM EDTA, 50mM DTT) を加え良く懸濁し、室温で 30 分インキュベートした後、15,000rpm で 1 分間遠心分離し上清を除いた。得られた沈殿に 100 μl の Sol.2 (1 M ソルビトール 20mM EDTA, 1 mg/ml Zymolyase 6000) を加え、37°C で一晩インキュベートした後、278 μl の蒸留水 20 μl の 10% SDS を加えよく懸濁し、2 μl の Proteinase K (20 mg/ml) (メルク (株)) を加え、穏やかに混合し、更に 37°C で 1 時間インキュベートした。フェノール・クロロホルム抽出し、4 μl の RNaseA (10mg/ml) (シグマアルドリッチジャパン (株)) を加え、37°C で 1 時間インキュベートし、再度フェノール・クロロホルム抽出を 2 回行った。水層に 40 μl の 3 M 酢酸ナトリウムを加えてよく混合し、400 μl のイソプロパノールを加えて、穏やかに十分混合し冷凍庫で 1 時間放置した。15,000rpm で 15 分間遠心し、上清を除き、沈殿を 500 μl の冷 70% エタノールで洗浄、真空乾燥の後 100 μl の滅菌水に溶解させゲノム DNA 溶液とした。このゲノム DNA 溶液 0.1 μg をマルチプレックス PCR (Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ (株))) に供した。

S. cerevisiae 菌株のエチルアルコール生成能測定

YPD 液体培地 5 ml に各 S. cerevisiae 菌株及び対照である清酒用協会酵母 7 号, 9 号を 1 白金耳接種し、培養温度 30°C で一晩、振とう (120rpm) 培養後 OD₆₀₀ で菌体量を計測した (前培養実験)。前培養実験で得られた OD₆₀₀ から、最高濃度を与える菌株の添加量を 100 μl とし、他の菌株の添加菌量は下記式に基づきを算出した。

他の菌株の添加菌量 = 最高値を与えた菌株前培養液の OD₆₀₀ × 100 μl / 他の菌株の前培養液の OD₆₀₀

算出した各添加量を YPD 液体培地 (10ml) に添加した後、培養温度 30°C で 48 時間静地培養を行った。エチルアルコール測定には各培養液を遠心分離 (15,000rpm × 10min) し、菌体を除去した上清をガスクロマトグラフィーにより測定した (ガスクロマトグラフ (株式会社島津製作所 GC-2014), 水素炎イオン化検出器, 3 mm, 長さ 2 m 分離管, ポリエチレングリコール 1000 (10%, 60~80 メッシュ) 固定相, 200°C 試料導入部温度, 100°C 分離管温度, N₂ キャリヤーガス 40ml/min 流速, 2 μL 分析試料量)。

表-2 より、発泡性又は濁りを有し、且つコロニーの出現が確認できた培地 (陽性培地) 数は

表-2 発泡性又は濁りを有し、かつ S. cerevisiae 様コロニー形成が確認された培地の初期条件に基づく個数比較

培養温度	培養容器	液体培地	培地容量	コロニー出現が確認された培地数		
				大分 1 号	豊のミドリ	合計
30°C	三角フラスコ	YMP ⁺	50ml	6	5	11
		YPD ⁺		5	5	10
	試験管	YMP ⁺	10ml	13	12	25
		YPD ⁺		11	12	23
15°C	三角フラスコ	YMP ⁺	50ml	4	7	11
		YMP ⁻		6	5	11
		YPD ⁺		6	6	12
	試験管	YPD ⁻	10ml	5	5	10
		YMP ⁺		20	11	31
		YPD ⁺		15	13	28
合計				91	81	172

172本であった。大分1号と豊のミドリのカボス (*C. sphaerocarpa*) の種類の相違による陽性培地数の差は「YMP⁺, 15°Cでの試験管培養」において見られ、大分1号は豊のミドリの1.82倍であったが、「YMP⁺, 15°Cでの三角フラスコ培養」では、豊のミドリが大分1号の1.75倍となった。この二点を除き、各カボス種の各培養温度条件下、同培養容器での培地の相違による陽性培地数の差は見られなかった。大分1号と豊のミドリのカボス (*C. sphaerocarpa*) の両種類合計での陽性培地数の差が大きく見られたのは、同培養温度の培養容器の相違によるもので、三角フラスコに対して、試験管は2倍以上（最高5倍）の陽性培地数となった。

発泡性又は濁りを有する培地からの *S. cerevisiae* 様菌株

純粋分離で得られた *S. cerevisiae* 様菌株数は812株であった（表-3）。大分1号由来の *S. cerevisiae* 様菌株数は豊のミドリの1.23倍と高い値が得られた。この理由として両者の *S. cerevisiae* 様菌株数の相違が「YMP⁺, 15°Cでの試験管培養」条件下での最高で1.81倍、最低でも同数となり、1条件（YMP⁺, 15°Cでの三角フラスコ培養）を除く全ての条件で大分1号が高い菌株数を与えた。大分1号と豊のミドリのカボス (*C. sphaerocarpa*) の両種類合計での *S. cerevisiae* 様菌株数の差が大きく見られたのは、同培養温度の培養容器の相違によるもので、三角フラスコに対して、試験管は1.04倍以上（最高2.82倍）の *S. cerevisiae* 様菌株数となった。

表-3 発泡性又は濁りを有する *S. cerevisiae* 様菌株の初期条件に基づく菌株数比較

培養温度	培養容器	液体培地	培地容量	発泡性又は濁りを有する <i>S. cerevisiae</i> 様菌株		
				大分1号	豊のミドリ	合計
30°C	三角フラスコ	YMP ⁺	50ml	48	32	80
		YPD ⁺		32	24	56
	試験管	YMP ⁺	10ml	76	64	140
		YPD ⁺		60	52	112
15°C	三角フラスコ	YMP ⁺		16	28	44
		YMP ⁻	50ml	24	24	48
		YPD ⁺		24	24	48
	試験管	YPD ⁻		24	20	44
		YMP ⁺	10ml	80	44	124
		YPD ⁺		64	52	116
合計			448	364	812	

ダーラム管発泡試験による発泡性の確認

純粋分離で得られた *S. cerevisiae* 様菌株総数は812株であったが、この中でダーラム管発酵試験により高発泡性を示した高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌株数は335株であった（表-4）。またこの菌株の *S. cerevisiae* 様菌株総数に対する比率は42.0%と高い値が示された。品種の相違に於いて、大分1号由来高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌株数は豊のミドリの1.46倍と高く、品種による差が見られた。大分1号由来高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌株数の *S. cerevisiae* 様菌株総数に対する比率が最も高い初期条件は、「YMP⁺培地, 15°Cでの試験管培養」の18.5%、次いで「YMP⁺培地, 30°Cでの三角フラスコ培養」の9.9%であった。同様に豊のミドリの場合も、「YMP⁺培地, 30°Cでの三角フラスコ培養」の条件が最も高い6.0%であるが、大分1号と比較して高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌株数は低い値であった。

表-4 ダーラム管発泡試験により選抜された高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌の初期条件に基づく菌株数比較

培養温度	培養容器	液体培地	培地容量	ダーラム管発泡試験により選抜された高発泡性 <i>S. cerevisiae</i> 様菌株数		
				大分1号	豊のミドリ	合計
30°C	三角フラスコ	YMP ⁺	50ml	33	20	53
		YPD ⁺		18	19	37
	試験管	YMP ⁺	10ml	21	19	40
		YPD ⁺		9	6	15
15°C	三角フラスコ	YMP ⁺	50ml	9	19	28
		YMP ⁻		7	5	12
		YPD ⁺		12	11	23
	試験管	YPD ⁻	10ml	11	3	14
		YMP ⁺		62	15	77
		YPD ⁺		17	19	36
合計			199	136	335	

高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌株の顕微鏡観察での形態比較による *S. cerevisiae* の判別

高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌株の総数は335株であったが、更に顕微鏡観察での形態比較により *S. cerevisiae* 形態類似菌株を選抜すると、その総数は62株となった(表-5)。高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌株の総数に対する比率は18.5%と低い値を示した。また獲得 *S. cerevisiae* 様菌株総数(812株)に対する *S. cerevisiae* 形態類似菌株総数の比率は7.6%と更に低い割合であった。品種の相違に於いて、大分1号由来 *S. cerevisiae* 形態類似菌株数は豊のミドリの4.2倍と高く、品種による大差が見られたが、大分1号及び豊のミドリの両種共に、高い *S. cerevisiae* 形態類似菌株数の獲得が可能な初期条件は「YMP⁺培地、15°Cでの試験管培養」であった。この条件下で *S. cerevisiae* 形態類似菌株総数の88.7%が獲得され、大分1号由来 *S. cerevisiae* 形態類似菌株数は69.4%、豊のミドリ由来 *S. cerevisiae* 形態類似菌株数は19.4%であった。これらの結果からカボス (*C. sphaerocarpa*) の大分1号及び豊のミドリの花から *S. cerevisiae* 形態類似菌株数を高い比率で獲得する初期条件は「YMP⁺培地、15°Cでの試験管培養」が提示された。

表-5 顕微鏡観察により選抜された *S. cerevisiae* 形態類似菌の初期条件に基づく菌株数比較

培養温度	培養容器	液体培地	培地容量	顕微鏡観察により選抜された <i>S. cerevisiae</i> 形態類似菌株数		
				大分1号	豊のミドリ	合計
30°C	三角フラスコ	YMP ⁺	50ml	0	0	0
		YPD ⁺		3	0	3
	試験管	YMP ⁺	10ml	0	0	0
		YPD ⁺		0	0	0
15°C	三角フラスコ	YMP ⁺	50ml	0	0	0
		YMP ⁻		0	0	0
		YPD ⁺		0	0	0
	試験管	YPD ⁻	10ml	3	0	3
		YMP ⁺		43	12	55
		YPD ⁺		1	0	1
合計			50	12	62	

*S. cerevisiae*形態類似菌株のマルチプレックスPCRによる *S. cerevisiae*の簡易同定

カボス (*C. sphaerocarpa*) 花由来 *S. cerevisiae*形態類似菌株総数 62 株の中で、清酒用協会酵母 7, 9 号に見られる SSU1, AWA1, BIO6, FLO1 の 4 遺伝子が確認された菌株数は 31 株であった (表- 6, 図- 1)。これら菌株は清酒製造工程に於いて、清酒様協会酵母 7 号, 9 号と同様な生理学的特性を示す可能性が期待されることが判明した。またこの 4 遺伝子を保有する *S. cerevisiae* 菌株数の *S. cerevisiae* 形態類似菌株総数に対する比率は 50.0% と高い割合であることも明らかになった。品種の相違に於いて、大分 1 号由来 *S. cerevisiae* 菌株数は豊のミドリの 3.83 倍と高く、品種による大差が見られた。しかし大分 1 号及び豊のミドリの両種共に、高い *S. cerevisiae* 菌株数の獲得が可能な初期条件は「YMP⁺培地, 15°Cでの試験管培養」であった。その結果, 31 株の *S. cerevisiae* 菌株数の中で最も多い菌株数を与えた初期条件も「YMP⁺培地, 15°Cでの試験管培養」で 29 菌株, これは *S. cerevisiae* 菌株総数 (31 株) の 93.5% を占め, 更にこの内訳として, 大分 1 号由来 *S. cerevisiae* 菌株数は 74.2%, 豊のミドリ由来 *S. cerevisiae* 菌株数は

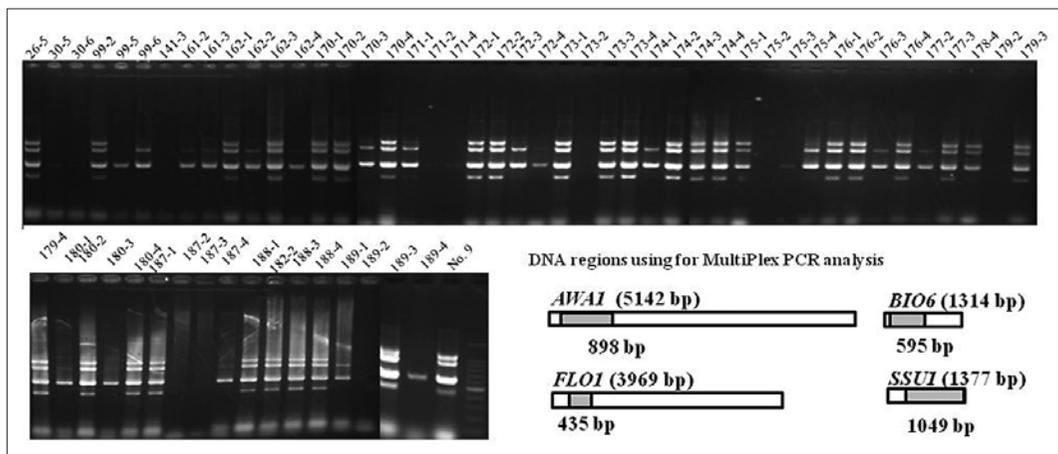


図- 1 *S. cerevisiae*形態類似菌のDNAを用いた醸造用 *S. cerevisiae*特有の4 遺伝子 (SSU1, AWA1, BIO6, FLO1) のMultiPlex PCR法による増幅
 ※ゲル上の数値, 189-3は菌株名 koy189-3を表記するものである。

表- 6 マルチプレートPCRアッセイ法により同定された *S.cerevisiae*の初期条件に基づく菌株数比較

培養温度	培養容器	液体培地	培地容量	マルチプレートPCRアッセイ法により同定された <i>S.cerevisiae</i> 菌株数		
				大分 1 号	豊のミドリ	合計
30°C	三角フラスコ	YMP ⁺	50ml	0	0	0
		YPD ⁺	50ml	1	0	1
	試験管	YMP ⁺	10ml	0	0	0
		YPD ⁺	10ml	0	0	0
15°C	三角フラスコ	YMP ⁺	50ml	0	0	0
		YMP ⁻		0	0	0
		YPD ⁺		0	0	0
	試験管	YPD ⁻	10ml	1	0	1
		YMP ⁺		23	6	29
		YPD ⁺		0	0	0
合計				25	6	31

19.4%であった (表-6)。これらの結果からカボス (*C. sphaerocarpa*) の大分1号及び豊のミドリの花から *S. cerevisiae* 菌株を獲得する初期条件は共に「YMP⁺培地, 15°Cでの試験管培養」が再確認された。

31株の *S. cerevisiae* 菌株総数の中で, 高エチルアルコール生成能を有する高エチルアルコール生成 *S. cerevisiae* 菌株は15菌株となった (表-7)。この高エチルアルコール生成 *S. cerevisiae* 菌株数の *S. cerevisiae* 菌株総数に対する比率は48.4%と高い割合であることも明らかになった。最大数の高エチルアルコール生成 *S. cerevisiae* 菌株数を与えた初期条件は「YMP⁺培地, 15°Cでの試験管培養」で14菌株, 高エチルアルコール生成 *S. cerevisiae* 菌株の93.3%を占め, その内訳は大分1号由来高エチルアルコール生成 *S. cerevisiae* 菌株数は73.3%, 豊のミドリ由来高エチルアルコール生成 *S. cerevisiae* 菌株数は20.0%であった。これらの結果からカボス (*C. sphaerocarpa*) の大分1号及び豊のミドリの花から高エチルアルコール生成能を有する *S. cerevisiae* 菌株を獲得する初期条件「YMP⁺培地, 15°Cでの試験管培養」が再確認された。対照である清酒用協会酵母9号, 7号の生成エチルアルコール濃度を比較すると, 7号は9号の1.08倍, 1.15倍と僅かに高いことが示された。この結果から高エチルアルコール生成能を有する基準として, 協会9号の生成エチルアルコール濃度を採用した。カボス (*C. sphaerocarpa*) 花由来高エチルアルコール生成能を有する *S. cerevisiae* 菌株15株の中で, 協会9号と同等の生成エチルアルコール濃度を示す *S. cerevisiae* 菌株数はエチルアルコール生成能順位の9位から15位の7菌株 (koy174-04, koy176-01, koy176-02, koy172-01, koy026-05, koy173-03, koy172-02), 高エチルアルコール生成 *S. cerevisiae* 菌株総数の46.67%であった。また協会9号以上の生成エチルアルコール濃度を示す *S. cerevisiae* 菌株数はエチルアルコール生成能順位の1位から8位の8菌株 (koy178-04, koy177-03, koy162-01, koy187-01, koy176-04, koy180-04, koy188-04, koy188-03) で, 高エチルアルコール生成 *S. cerevisiae* 菌株総数の53.3%と高い割合を示した。また最も高いエチルアルコール生成能を有する *S. cerevisiae* 菌株名はkoy174-04菌株で, 協会9号の2.44倍, 次いでkoy177-03菌株で2.10倍となった (図-2)。

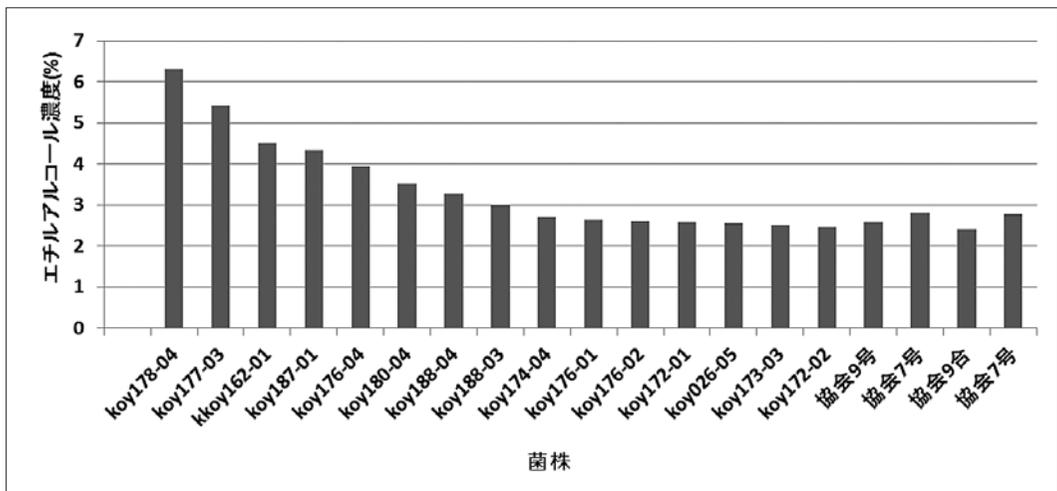


図-2 カボス (*C. sphaerocarpa*) 花由来 *S. cerevisiae* 菌株の 30°C, 48 時間培養での清酒用協会酵母 7 号及び 9 号とのエチルアルコール生成能比較

表一七 高エチルアルコール生成能を有す *S.cerevisiae* の初期条件に基づく菌株数比較

培養温度	培養容器	液体培地	培地容量	高エチルアルコール生成能を有す <i>S.cerevisiae</i> 菌株数		
				大分1号	豊のミドリ	合計
30℃	三角フラスコ	YMP ⁺	50ml	0	0	0
		YPD ⁺		1	0	1
	試験管	YMP ⁺	10ml	0	0	0
		YPD ⁺		0	0	0
15℃	三角フラスコ	YMP ⁺	50ml	0	0	0
		YMP ⁻		0	0	0
		YPD ⁺		0	0	0
	試験管	YMP ⁺	10ml	11	3	14
		YPD ⁻		0	0	0
		YPD ⁺		0	0	0
合計				12	3	15

要 約

カボス (*C. sphaerocarpa*) の花からの *S. cerevisiae* を最短工程で分離可能な最適初期条件を探索した。その方法として全工程を6工程とし、第1工程に発泡性または濁りを有する培地の選抜、第2工程にコロニー観察による *S. cerevisiae* 様菌株の純粋分離、第3工程に *S. cerevisiae* 様菌株のダーラム管発泡試験による高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌株の選抜、第4工程に高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌株の顕微鏡観察での形態確認による *S. cerevisiae* 形態類似菌株の選抜、第5工程にマルチプレックスPCRを用いたSSU1, AWA1, BIO6, FLO1の4種類の遺伝子確認による *S. cerevisiae* 菌株の選抜、第6工程に30℃、48時間培養での生成エチルアルコール濃度測定による高エチルアルコール生成 *S. cerevisiae* 菌株の選抜を行った。第1工程での全条件数を10種類とし、カボス (*C. sphaerocarpa*) の品種、培養温度、採取用容器は各2種類、培地も2種類であるが、抗生物質及び防カビ剤の有無により4種類とした。これらの初期条件設定により採取用培地の合計本数を290本とした。第1工程で選抜された培地数は172本、更にこれら培地から第2工程の純粋分離で得られた *S. cerevisiae* 様菌株数は812株であった。*S. cerevisiae* 様菌株を第3工程に供し、選抜された高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌株は335株となり、*S. cerevisiae* 様菌株総数に対する比率は41%と高い値が示された。高発泡性 *S. cerevisiae* 様菌株を第4工程に供し、選抜された *S. cerevisiae* 形態類似菌株は62株となり、最大数獲得初期条件は「YMP⁺培地、15℃での試験管培養」であった。この条件下で *S. cerevisiae* 形態類似菌株総数の88.7%が獲得された。更に *S. cerevisiae* 形態類似菌株を第5工程に供し、選抜された *S. cerevisiae* 菌株数は31株となり、*S. cerevisiae* 形態類似菌株総数の50.0%が *S. cerevisiae* 菌株と同定された。最大数獲得初期条件「YMP⁺培地、15℃での試験管培養」下で *S. cerevisiae* 菌株総数の93.5%が獲得された。また31株の *S. cerevisiae* 菌株数を工程6に供し、清酒用協会酵母9号より高いエチルアルコール生成能を有する *S. cerevisiae* 菌株は15菌株となった。最多の高エチルアルコール生成能を有する分離 *S. cerevisiae* 菌株数を与えた初期条件は「YMP⁺培地、15℃での試験管培養」で14菌株、高エチルアルコール生成能を有する *S. cerevisiae* 菌株の93.3%を占めた。

参考文献

- 1) Hidehiko Fujihara, Mika Hino, Kimiko Asada, Hideharu Takashita, Yasuhiro

Kajiwara, Toshimasa Nakamura, Keiko Okamoto and Kensuke Furukawa
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 78 1086-1089 (2014)

- 2) 廣岡青央, 日本生物工学会誌, 89, 31 (2011)
- 3) 堤 浩子, 日本生物工学会誌, 89, 717-719 (2011)
- 4) 久田 隆 日本醸造協会誌 107, 205-209 (2012)
- 5) 満生慎二, 古屋和樹, 山崎 努, 中山俊一, 大場孝宏, 末永 光, 織田淳史, 中島康夫, 日本醸造協会誌 107, 775-781 (2012)
- 6) 柳内敏晴, 清川良文, 岩井芳則, 醸造工学 67, 159-165 (1989)
- 7) 岩井芳則, 柳内敏晴, 日本醸造協会誌 84, 240-244 (1989)
- 8) 富永美穂子, 宮本ゆり香, 三崎恵里, 家藤治幸, 佐藤一精, 日本農芸化学会誌 72, 481-488 (1998)