

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 31, 31~37 1996]

## サイトダクション法によるキラーワイン酵母W3K<sub>2</sub>の育成

山崎 豊彦

(山梨大学工学部化学生物工学科)

### Breeding of Killer Wine Yeast Strain W3K<sub>2</sub> by Cytoduction

TOYOHICO YAMAZAKI

*Department of Applied Chemistry and Biotechnology,  
Faculty of Engineering, Yamanashi University, Kofu 400, Japan*

#### Abstract

In the present study, K<sub>2</sub>-type killer plasmid was transferred into Kyokai wine yeast No. 4 (*Sacchromyces cerevisiae* W3) using a two-step cytoduction process in order to investigate the possibility of using the obtained K<sub>2</sub> killer cytoductants as a starter yeast for wine making.

A spore clone from K<sub>2</sub> killer strain RIFY 1185 ( $a/a$  [*kil-K<sub>2</sub>*]) was treated with acriflavine (10mg/l) and the resultant RIFY 1185-12D-RD4 ( $a\rho^-$  [*kil-K<sub>2</sub>*]) was mated (1st cytoduction) with a karyogamy-defective strain *S. cerevisiae* 5044 ( $a$  *leu1 kar1-1*). The resultant RIFY 1185-12D-RD4-*kar-7* ( $a\rho^+$  *leu1 kar1-1* [*kil-K<sub>2</sub>*]) was electrofused (2nd cytoduction) with the petite W3-8A-8A-32A-RD6a ( $a/a\rho^-$  *KHR KHS*) converted from W3-8A-8A-32A ( $a/a$  *KHR KHS*), which had previously demonstrated a higher SO<sub>2</sub> tolerance and fermentation capacity than that of wine yeast W3. Forty-nine colonies were formed in the regeneration medium at a frequency of approximately  $4.9 \times 10^{-6}$  per used protoplasts, from which 15 pure isolates were obtained. All of the isolates were diploid K<sub>2</sub> killer cytoductants ( $a/a\rho^+$  *KHR* [*kil-K<sub>2</sub>*]) with both K<sub>2</sub>-type and KHR killer activity. The representative K<sub>2</sub> killer cytoductants W3K<sub>2</sub>-6 and W3K<sub>2</sub>-7 with a fermentation capacity comparable to that of W3 were selected for the preliminary fermentation tests.

Test wine making with the resultant K<sub>2</sub> killer cytoductants W3K<sub>2</sub>-6 and W3K<sub>2</sub>-7 suggests that these strains are capable of fermenting Koshu grape musts (16 ℓ) to the same level obtained with wine yeast W3, and thus can produce wine of the same high quality as that produced by W3.

#### 緒 論

生成ワインの風味を損なうことを避けるため、ワイン醸造過程には加熱殺菌工程を持たない。したがって、多くの野生酵母が原料ブドウと一緒に果も

ろみ中に持ち込まれる。これらの野生酵母の大部分は、生成アルコールと果汁に添加される亜硫酸(SO<sub>2</sub>)によって死滅する。しかし*Saccharomyces*に属する仮性産膜酵母は、アルコールやSO<sub>2</sub>耐性が強

く発酵終了後まで生き残り、液面に皮膜を形成して酒質を劣化することから、ワインの汚染菌としてよく知られている<sup>1, 2)</sup>。

キラーワイン酵母の利用は、この仮性産膜酵母の防除手段として検討されてきた。すなわち、菌株保存機関や自然界(ワイナリー)におけるキラーワイン酵母の検索<sup>3-6)</sup>に始まり、ワイン発酵中のキラー酵母の動態研究<sup>7)</sup>や有用キラーワイン酵母の育成へと発展した。特に酵母の育種技術の発達に伴い、相補的接合型株間の戻し交配によるK1タイプキラーワイン酵母の造成<sup>2, 8)</sup>、細胞融合法<sup>9)</sup>や形質転換付随細胞融合法<sup>10)</sup>、更に細胞融合によるサイトダクション法<sup>11, 12)</sup>等による育種例が次々に報告された。我々はすでに、比較的低温発酵性の国産優良ワイン酵母*S. cerevisiae* W3<sup>13)</sup> (HO/HO, 2n)を育種のターゲットに選び、SO<sub>2</sub>耐性と発酵力を強化したW3の単孢子株W3-8A-8A-32A (2n)を造成した<sup>14)</sup>。

本報では、このW3単孢子株(2n)にK<sub>2</sub>タイプキラープラスミドを、接合法と電気細胞融合法によりサイトダクション(2回)して、K<sub>2</sub>キラー導入株W3K<sub>2</sub>-6とW3K<sub>2</sub>-7を育成した。これらの育成株は実用ワイン酵母W3と同様に甲州種ブドウ果汁(16ℓ)を順調に発酵させ、W3と大差のない一般分析値を示すワインを醸成した。

## 実験材料と方法

### 1. 供試酵母

Table 1に今回の育種プログラムで用いた菌株を示した。W3-8A-8A-32A株(a/a KHR KHS)は前報<sup>14)</sup>でワイン酵母W3から分離した第3世代の単孢子株であり、SO<sub>2</sub>耐性と発酵力が強化された菌株である。今回はこれを育種ターゲットとした。山梨大学工学部発酵化学研究施設保存株RIFY 1185(a/a kil-K<sub>2</sub>)は、K<sub>2</sub>タイプのキラー酵母である。*S. cerevisiae* 5044株(a leu1 kar1-1)は、核融合欠損遺伝子kar1-1の保持菌である。この遺伝子は、細胞質因子導入(cytoduction)法<sup>15)</sup>でよく用いられ、交配育種に際し核融合を欠損させて実用株の持つ核性の劣性優良形質を保護する機能を持つ。K<sub>2</sub>キラーの判定には仮性産膜酵母*S. cerevisiae* (oviformis) S-75<sup>1)</sup>を、また核性のキラー-KHRとKHS<sup>16)</sup>の判定には*Candida glabrata* IFO 0622株を感受性菌として供試した。

### 2. キラー活性判定法

改良キラー検定培地を用い、前報<sup>17)</sup>に順じて行った。

### 3. 呼吸能欠損株誘導法

変異誘発剤としてアクリフラビン(10mg/l)を用い、前報<sup>18)</sup>に従った。

### 4. 接合によるcytoduction法

相補する接合型を持つ2菌株の一方に核融合欠損株を用い、Lindegrenの集団接合法<sup>19)</sup>により両親細胞を接合させた。

### 5. 電気細胞融合法

両親細胞のプロトプラスト混合液を前報<sup>20)</sup>の条

Table 1. Strains used

Strain	Genotype	Remarks
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
W3-8A-8A-32A	a/a KHR KHS	Spore clone (F3) with higher SO <sub>2</sub> tolerance and fermentation capacity derived from wine yeast W3 <sup>13)</sup> .
RIFY 1185	a/a [kil-K <sub>2</sub> ]	K <sub>2</sub> killer strain.
5044*	a leu1 kar1-1	Karyogamy-defective strain.
<i>S. cerevisiae</i> (oviformis) S-75		
		Sensitive strain to K <sub>2</sub> killer plasmid. Pseudo-film forming yeast <sup>1)</sup> .
<i>Candida glabrata</i> IFO 0622*		
		Strain sensitive to KHR or KHS killer.

\*Obtained from K. Kitano (Research Laboratory, Sainte Neige Wine Co., Ltd.).

件に従い、島津細胞融合装置(SSH-1)を用いて処理し、融合株はグリセロールを唯一の炭素源とした最少培地MMGS [0.67% yeast nitrogen base (W/O amino acids, Difco)+2%グリセロール+1.5Mソルビトール+3%寒天]で選択分離した。

### 6. 接合型の判定および細胞の乾燥重量とDNA含

### 量測定法

前報<sup>21)</sup>に従った。なお、これら後二者の測定値を*S. cerevisiae*の2倍体標準値<sup>22)</sup>と比較し、更に接合型の判定結果も考慮して供試株の倍数性を推定した。

7. 発酵試験方法

山梨大学工学部付属発酵化学研究施設育種試験地で1994年に収穫された甲州種ブドウ生果汁(搾汁率60v/w%, 8,000 RPM連続遠心分離処理, pH3.2, 転化糖分22w/v%)にピロ亜硫酸カリウム(K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)150ppmを添加し、12時間後に酒母5v/v%を加え前記発酵化学研究施設の地下セラー(11-15℃)で発酵させた。

発酵の経時的变化は、屈折計による糖度とアルコール生成量を測定してしらべた。生成ワインの一般分析は、主として国税庁所定分析法注解<sup>23)</sup>に従ったが、残糖はソモギー変法<sup>24)</sup>によって測定した。なお、キラークラー導入株の予備発酵試験は解凍果汁の量を5, 15, 130mlと順次増加させ、発酵温度を10℃とした以外は、上記と同じ条件で行った。

結果と考察

1. キラークラスミド導入W3K<sub>2</sub>株の育成

本研究の最終目的は、ワイン汚染菌として恐れられている仮性産膜酵母の発生をキラートキシンで抑制することにある。ワインというpHの低い(pH 3.2)環境で安定な抗菌性を示すキラークラーとしては、細胞質性のK<sub>2</sub>タイプキラークラーが知られている<sup>25)</sup>。ま

た、交配による実用株の育種では、本来実用株を持つ優良形質を交配によって損なうことは避けなければならない<sup>15)</sup>。このような観点から、今回はまず、K<sub>2</sub>タイプのキラークラー酵母RIFY 1185株に核融合欠損遺伝子(*kar1-1*)を付与(第1回サイトダクション)し、次にこの*kar1-1*遺伝子を持つK<sub>2</sub>キラークラー株と実用ワイン酵母W3の単胞子株とを電気細胞融合(第2回サイトダクション)させて、目的のK<sub>2</sub>キラークラー導入株を造成する、2段階の育種プログラムを組んだ。

1) K<sub>2</sub>キラークラー酵母RIFY 1185への*kar1-1*遺伝子の付与(第1回サイトダクション)

① K<sub>2</sub>キラークラー酵母の一倍体呼吸能欠損株の誘導

K<sub>2</sub>タイプのキラークラー酵母RIFY 1185株( $\alpha/\alpha$  [*kil-K<sub>2</sub>*])からマイクロマニピュレーターで単胞子株を分離(一倍体化)し、これをアクリフラビン処理( $\rho^-$ 化)したRIFY 1185-12D-RD4株( $\alpha\rho^-$  [*kil-K<sub>2</sub>*])を分離した。なお、分離株のキラークラー性を仮性産膜酵母*S.cerevisiae* (*oviformis*) S-75を感受性菌として確認した。これはアクリフラビン処理によりキラークラスミドが脱落する危険性があるためと、ここ

Table 2. Cytoduction products obtained by electrofusion<sup>a</sup>

Parent strain (genotype)	Total no. of		Fusion frequency (B/A)	No. of clones isolated	Representative <sup>d</sup> cytoduction products
	protoplasts <sup>b</sup> used ×10 <sup>7</sup> (A)	clones grown <sup>c</sup> in regeneration medium(B)			
W3-8A-8A-32A-RD26a ( $\alpha/\alpha\rho^-$ <i>KHR KHS</i> )					W3K <sub>2</sub> -6
+	1.0	49	4.9×10 <sup>-6</sup>	15	
RIFY 1185-12D-RD4- <i>kar-7</i> ( $\alpha\rho^+$ <i>leu1 kar1-1 [kil-K<sub>2</sub>]</i> )					W3K <sub>2</sub> -7

Reversion rates were calculated as ratio of number of colonies that reverted in regeneration medium to initial cell number for different strains, and were less than 10<sup>-9</sup>.

- a AC field conditions were 2MHz, 400Vp/cm and DC field conditions were 7kV/cm, 60 μs, 2 pulses at 5s interval (Shimazu SSH-1).
- b Estimated by comparing number of clones grown on YEPD medium with number grown in YEPD medium +1.5M sorbitol.
- c Regeneration medium MMGS: 0.67% yeast nitrogen base (W/O amino acid, Difco) +2% glycerol+1.5M sorbitol +3% agar.
- d K<sub>2</sub> killer cytoductants with fermentation capacity, comparable to wine yeast W3 were selected by preliminary fermentation tests (10℃) using 130ml Kosu grape musts (22 w/v% reducing sugar, pH3.2) containing 150ppm potassium pyrosulfite and 5v/v% starter yeasts.

Table 3. Characteristics of representative  $K_2$  killer cytoductants

Strain (genotype)	Growth in glycerol medium	Killer activity		Dry weight <sup>c</sup> (mg/10 <sup>8</sup> cells)	DNA content <sup>c</sup> (mg/10 <sup>11</sup> cells)	Degree of ploidy <sup>d</sup>			Assumed ploidy	
		$K_2$ a	KHR <sup>b</sup>			Dry wt.	DNA	average		
Parent										
W3-8A-8A-32A-RD6a (a/ $\alpha\rho^-$ KHR KHS)	-	-	+	1.9	3.9	1.9	2.3	2.1	2n	
RIFY 1185-12D-RD4-kar-7 (a $\rho^+$ <i>leu1 kar1-1</i> [ <i>kil-K<sub>2</sub></i> ])	+	+	-	1.1	1.3	1.1	0.8	1.0	n	
Cytoductant										
W3K <sub>2</sub> -6 (a/ $\alpha\rho^+$ KHR [ <i>kil-K<sub>2</sub></i> ])	+	+	+	2.2	4.1	2.2	2.4	2.3	2n	
W3K <sub>2</sub> -7 (a/ $\alpha\rho^+$ KHR [ <i>kil-K<sub>2</sub></i> ])	+	+	+	2.2	4.0	2.2	2.4	2.3	2n	

a Killer activity to *S. cerevisiae* (*oviformis*) S-75 (pH4.2).

b Killer activity to *C. glabrata* IFO 0622 (pH6.0).

c Determined according to previously described procedures<sup>21)</sup>.

d Calculated using diploid yeast cell composition data listed in Table VIII of F. Sherman<sup>22)</sup>.

で育成株に導入する $K_2$ キラープラスミドが仮性産膜酵母を殺すことができるか否かを実証するために行った。

## ② $K_2$ キラープラスミドの核融合欠損株への導入

造成したRIFY 1185-12D-RD4株( $\alpha\rho^-$  [*kil-K<sub>2</sub>*])と核融合欠損株*S. cerevisiae* 5044 (a *leu1 kar1-1*)とを集団接合せ、グリセロール培地、キラー検定、ロイシン要求性の検出処理を順次行い、核融合欠損遺伝子を持ったキラー株RIFY 1185-12D-RD4-kar-7 (a  $\rho^+$  *leu1 kar1-1* [*kil-K<sub>2</sub>*])を造成した。

## 2) 優良ワイン酵母W3への $K_2$ キラープラスミドの導入 (第2回サイトダクション)

前報<sup>14)</sup>で我々は国産優良ワイン酵母*S. cerevisiae* W3から、SO<sub>2</sub>耐性と発酵力を増強した単胞子株W3-8A-8A-32A株を分離した。そこで、この菌株に $K_2$ プラスミドを導入するため、まず呼吸能を欠損させ、得られた菌株W3-8A-8A-32A-RD6a (a/  $\alpha\rho^-$  KHR KHS)と、先に造成した*kar1-1*遺伝子をもつ $K_2$ キラー株RIFY 1185-12D-RD4-kar-7 (a  $\rho^+$  *leu1 kar1-1* [*kil-K<sub>2</sub>*])とを電気融合 (融合頻度 $4.9 \times 10^{-6}$ )し、グリセロールを唯一の炭素源とした最少培地 (MMGS) に希釈平板培養したところ、49個の集落が出現した。そこでこれら集落を鉤菌し、再度MMGS培地で純粋分離を繰り返した結果、15株の分離株を得た (Table 2)。得られた分離株はいずれも、呼

吸能は正常で $K_2$ タイプキラーとKHRキラーを併せ持つ2倍体と判定され (Table 3)、W3単胞子株の $K_2$ キラープラスミド導入株 (a/  $\alpha\rho^+$  KHR [*kil-K<sub>2</sub>*])であることがわかった。そこで解凍したブドウ果汁での予備発酵試験を繰り返し、実用ワイン酵母W3に匹敵する発酵力を示した2菌株W3K<sub>2</sub>-6とW3K<sub>2</sub>-7を代表 $K_2$ キラー導入株として選択した。

## 2. ブドウ果汁における発酵試験

醸造用酵母の育種では、新しい育成株が元の実用株と同様に実際にもろみを発酵させ、発酵産物を醸成し得ることが第一である。

### 1) 発酵経過

ここで育成した代表 $K_2$ キラー導入株W3K<sub>2</sub>-6、W3K<sub>2</sub>-7を酒母 (5v/v%)とした甲州種ブドウ生果汁 (転化糖分22w/v%, pH3.2, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 150 ppm) 16 lにおける発酵試験を実施し、その発酵曲線をFig. 1に示した。

$K_2$ キラー導入株を酒母としたもろみはいずれも、酒母添加2日後に湧付き、発酵初期 (6日目)は実用株W3と同様に糖度が順調に減少した。しかし、中期から後期にかけてわずかに発酵が緩慢になった。このわずかの発酵の遅れはW3単胞子株でも同様に観察された。予備実験での解凍果汁における発酵試験では、キラー導入株や単胞子株はW3にくらべてわずかに強い発酵力を示し、前報<sup>14)</sup> (解凍果汁使用)でのW3と単胞子株の間にも同様の結果が観察されていた。この生果



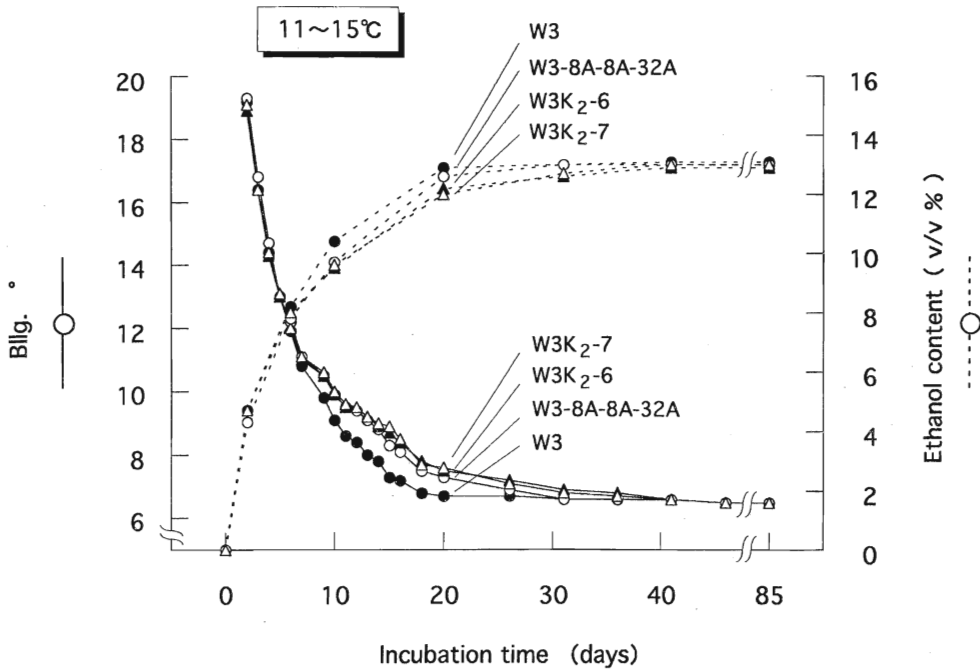


Fig. 1. Time course of fermentation with K<sub>2</sub> killer cytoductants. Fermentation was carried out in the cellar (11–15°C) of the Institute of Enology and Viticulture, Yamanash University, using 16 l of Koshu grape musts (22w/v% reducing sugar, pH3.2) containing 150ppm potassium pyrosulfite and 5v/v% starter yeasts. Symbols: ●, wine yeast W3; ○, W3-8A-8A-32A (F3 spore clone with higher SO<sub>2</sub> tolerance and fermentation capacity derived from W3); ▲, W3K<sub>2</sub>-6 (K<sub>2</sub> killer cytoductants); △, W3K<sub>2</sub>-7 (K<sub>2</sub> killer cytoductants).

汁と解凍果汁におけるW3と単胞子株やキラー導入株の発酵力の逆転現象は、これら菌株間のSO<sub>2</sub>耐性の違い (W3<単胞子株またはキラー導入株) とそれぞれの果汁に含まれる遊離型のSO<sub>2</sub>量 (生果汁<解凍果汁) とに起因すると考えられるが、この点の実験的証明はまだ得られていない。

2) 生成ワインの一般分析

酒母添加85日 (搾引き) 後に、生成ワインの一般分析を行い、その結果をTable 4 に示した。K<sub>2</sub>キラー導入株W3K<sub>2</sub>-6、W3K<sub>2</sub>-7を酒母として醸成したワインは、いずれも実用ワイン酵母W3

やその単胞子株と大差のない分析値を示した。

以上で、今回育成したK<sub>2</sub>キラー導入株が、実用ワイン酵母W3と同様にブドウ果もろみを発酵させ、W3と同等の分析値を示すワインを醸成出来ることがわかった。今後は、育成したK<sub>2</sub>キラー導入株を酒母として発酵させたブドウ果もろみ中の酵母相の動態をしらべ、野生の仮性産膜酵母が実際に淘汰され、K<sub>2</sub>キラー導入株だけでワインの産膜病が防止出来るか否かを実証していく必要がある。

Table 4. Analytical data of wine after fermentation<sup>a</sup> with K<sub>2</sub> killer cytoductants for 85 days

Starter yeast	Ethanol <sup>b</sup> (v/v %)	Brix <sup>c</sup> (w/w %)	pH <sup>d</sup>	R.S. <sup>e</sup> (g/dl)	T.A. <sup>f</sup> (g/dl)	V.A. <sup>g</sup> (g/l)
Parent						
W3	13.1	6.5	3.19	0.18	0.64	0.35
W3-8A-8A-32A	13.0	6.5	3.19	0.16	0.63	0.34
Cytoductant						
W3K <sub>2</sub> -6	12.9	6.5	3.20	0.23	0.63	0.34
W3K <sub>2</sub> -7	13.0	6.5	3.20	0.21	0.63	0.35

a Fermentation conditions: See footnote to Fig. 1.

b By distillation and hydrometer.

c By refractometer.

d By pH meter.

e Reducing sugars (glucose) by modified Somogy's method<sup>24)</sup>.

f Total acids (tartaric) by titration.

g Volatile acids (acetic) by steam distillation and titration.

### 要 旨

K<sub>2</sub>タイプのキラープラスミドをワイン酵母W3に導入し、これを酒母として甲州酒ブドウ果汁を発酵させ、次の結果を得た。

1. K<sub>2</sub>タイプのキラール酵母RIFY 1185株 (a/a [kil-K<sub>2</sub>]) を単孢子分離とアクリフラビン処理して一倍体呼吸欠損株RIFY 1185-12D-RD4 (aρ<sup>-</sup>[kil-K<sub>2</sub>]) を誘導し、これと核融合欠損株*S.cerevisiae* 5044 (a *leu1 kar1-1*) とを接合-サイトダクションして、*kar1-1*遺伝子を付与したK<sub>2</sub>キラール株RIFY 1185-12D-RD4-kar-7 (aρ<sup>+</sup> *leu1 kar1-1* [kil-K<sub>2</sub>]) を造成した。

2. 一方、ワイン酵母W3の第3世代単孢子株W3-8A-8A-32A (SO<sub>2</sub>耐性と発酵力の強化株) から呼吸能欠損株W3-8A-8A-32A-RD6a (a/aρ<sup>-</sup> *KHR KHS*) を造成し、これに*kar1-1*遺伝子を付与したK<sub>2</sub>キラール株RIFY 1185-12D-RD4-kar-7 (aρ<sup>+</sup> *leu1 kar1-1* [kil-K<sub>2</sub>]) を電気融合-サイトダクション (融合頻度4.9×10<sup>-6</sup>) させて15株のK<sub>2</sub>キラール導入株 (a/aρ<sup>+</sup> *KHR* [kil-K<sub>2</sub>]) を育成した。

3. 予備発酵試験で、実用ワイン酵母W3に匹敵する発酵力を示したW3K<sub>2</sub>-6とW3K<sub>2</sub>-7を代表K<sub>2</sub>キラール導入株として選出し、これらを酒母として甲州種ブドウ生果汁 (転化糖分22w/v%, pH3.2) 16 l を発酵 (11-15°C) させた。

4. 育成したK<sub>2</sub>キラール導入株は実用ワイン酵母W3と同様に果汁を順調に発酵させ、生成ワインの一般分析値も、W3と大差のない値を示した。

おわりに、貴重な菌株を分譲いただきましたサントネージュワイン研究所北野一好所長並びに実験に協力いただきました鰻池泰、高野泰臣、渡辺智紀君にお礼申し上げます。

### 文 献

- (1) 小原巖、野々村英夫：山梨大発研報告、8、1-12 (1961).
- (2) S.Hara, Y.Iimura and K.Otsuka, *Am. J. Enol. Vitic.*, 31, 28-33 (1980).
- (3) T.I.Naumova and G.I.Naumov, *Genetika*, 9, 85-90 (1973).
- (4) K.Kitano, M.Sato, T.Shimazaki and S.Hara, *J.Ferment. Technol.*, 62, 1-6 (1984).
- (5) K.Shimizu, T.Adachi, K.Kitano, T.Shimazaki, A.Totsuka, S.Hara and H.Dittrich, *J.Ferment. Technol.*, 63, 421-429 (1985).
- (6) G.M.Heard and G.H.Fleet, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2171-2174 (1987).
- (7) J.E.Petering, M.R.Symons, P.Langridge and P.A. Henschke, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3232-3236 (1991).
- (8) S.Hara, Y.Iimura, H.Oyama, T.Kozeki, K.Kitano and K.Otsuka, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 1327-1334 (1981).
- (9) Y.Yokomori, H.Akiyama and K.Shimizu, *Yeast*, 5, 145-150 (1989).
- (10) 須田幹夫、鳥井和之、中谷和夫、古賀邦生、松本信也、熊田順一：昭和62年度農化大会講演要旨

集、1987, p.342.

- 1) T.Seki, E-H.Choi and D.Ryu, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1211-1215 (1985).
- 2) 風間茂美、北野一好、戸塚昭：昭和62年度農化大会講演要旨集、1987, p.133.
- 3) 横塚勇、後藤昭二、両角しゅう喜：山梨大発研報告、9, 89-98 (1962).
- 4) 山崎豊彦、野々村英夫：醸協、89, 401-407 (1994).
- 5) 大内弘造：「酵母の細胞工学と育種」、永井進編、学会出版センター、東京、1986, pp.33-53.
- 6) 北野一好、戸塚昭、原昌道：「酵母のバイオテクノロジー」、平野正編、学会出版センター、東京、1988, pp.1-8.
- 7) 山崎豊彦、黒田友輔、戸沢一幸：山梨大発研報告、29, 29-37 (1994).
- 18) 山崎豊彦、広田明人、野々村英夫：山梨大発研報告、19, 19-28 (1984).
- 19) C.C.Lindegren and G.Lindegren, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 29, 306-308 (1943).
- 20) T.Yamazaki and H.Nonomura, *J.Ferment. Bioeng.*, 72, 300-302 (1991).
- 21) 山崎豊彦、石川 貢、野々村英夫：山梨大発研報告、17, 1-10 (1982).
- 22) F.Sherman, in "Methods in Enzymology", ed. by C.Guthrie and G.R.Fink, Academic Press, New York, 1991, p.17.
- 23) 注解編集委員会編：国税庁所定分析法注解、第3版、日本醸造協会 (1987) .
- 24) 東京大学農学部農芸化学教室：「実験農芸化学下巻」、朝倉書店、東京、1960, p.639.
- 25) Y.Yokomori, H.Akiyama and K.Shimizu, *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2791-2796 (1988).