

身近で活躍する有用微生物 食品と有用微生物－和食文化と微生物2

日本酒と微生物

さ　　とう　　かず　　お
佐　藤　和　夫
Kazuo SATO

はじめに

日本酒は蒸し米に黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*、以下麹菌と称す) を生やした、麹の酒 (カビ酒) に分類される。日本酒のアルコールを造るのは酵母の働きであるが、酵母は蒸し米のデンプンを分解することができない。そこで、麹菌が分泌するアミラーゼによってデンプンをブドウ糖に分解すると、ブドウ糖が酵母細胞内に取り込まれてアルコール発酵が行われるという仕組みである。

麹は穀類や豆類などの固体原料にカビを生やしたもので、紀元前 12 世紀以前に中国で開発された技術である。日本には縄文時代以前には存在せず、弥生時代に水田稲作とともに大陸から伝来したと考えられているが、日本酒と中国酒の麹には大きな違いがある。第一に日本酒の麹は蒸し米に麹菌を生やしたもので、形状は米粒のままのバラ (散) 麹である。これにたいして中国酒の麹は原料を蒸すことはなく、生のままの小麦・エンドウ・米などを粉にして餅のように固めたもの (餅麹) である。中でも白酒と呼ばれる中国の蒸留酒用の麹 (大曲) はレンガブロックほどの大きさがある。中国麹のカビの種類は主にクモノスカビ (*Rhizopus* 属) やケカビ (*Mucor* 属) などであるが、一部には麹菌も含まれる。日本と中国でカビが異なる理由には諸説があるが、理由の一つはクモノスカビやケカビの酵素は蒸されていない生のデンプンをよく分解するのに対して、麹菌の酵素は生デンプン分解能力が小さいことである。また餅麹では内部が嫌気状態になるため、嫌気条件でも増殖するクモノスカビやケカビが優位になるともいわれている。

さて日本の歴史を簡単にひも解くと、麹で酒を造ったことがわかる最も古い記述は奈良時代の播磨国風土記 (713 年) である。これには蒸し米に自然にカビが生えたのでこれを原料にして酒を造ったとある。日本酒の製造方法が初めて詳細に記されたのは律令の注釈書である平安時代の延喜式 (927 年) である。その酒造りの方法は原料が米と米麹であるのは今と変わらないが、一部に麦芽 (ビールの原料で麹に似た機能を持つ) も用いるとある。もろみの発酵は今とはかなり違って、1 回だけの仕込みではアルコールが薄いので、できた酒でまた次の仕込みを行い、順次にアルコール濃度を高めるやり方 (醗法) であった。

時代が下って鎌倉時代になると市中のいたるところに酒屋ができたが、麹は酒屋ではなく麹座の独占販売であった。室町時代になると寺院での酒造り (僧坊酒という) により技術的な進歩があり、火入れ (酒の加熱殺菌法) や酸法 (仕込みを数回に分けて行い、順にスケールアップする、現在の日本酒の仕込み方法) などの新技術が生み出された。さらに江戸時代初期～中期の伊丹 (現在の伊丹市) や江戸中期以降の灘地域 (現在の神戸市・西宮市) ではほぼ現在の日本酒造りの形が出来上がった¹⁾。

明治時代に西欧の化学・微生物学が導入されて、はじめて日本酒が微生物の働きでできることが明らかになった。しかし当時の欧米の学者にとっても日本酒の発酵は不思議だったようで、もろみ中の酵母が麹菌から派生した細胞かどうかを巡って議論が沸騰したという逸話が残っている²⁾。その後現在に至るまで、細胞生理学や遺伝学的研究の進展を基に日本酒関連微生物の機能解明が進んでいる。本稿ではそのなかのトピックスのいくつかを紹介する。

I. 麹菌

「一麹、二酏（酒母）、三もろみ」という日本酒造りに携わる者への格言があるが、これは麹造りの重要性をうたう言葉である。日本酒の麹は蒸し米を原料として麹菌を培養したもので、種麹とも種もやともよばれるスターター（胞子を大量に着生させた麹を乾燥したもの、または胞子を分離して粉状にしたもの）を振るって蒸し米に胞子を付着させるところから始まる³⁾。

麹造りは原料の蒸し米が固体状態であるので固体培養という形式に分類されるが、原料の水分が少ないことと微生物が直接空気に接する状態で増殖する点が液体培養法とは異なる。培養（製麹）は40～50時間程度行い、麹菌が増殖した麹中にはアミラーゼのほかにタンパク質をアミノ酸にまで分解するプロテアーゼや、脂質を分解するリパーゼなどの酵素が多量に含まれる。この酵素の大量生産は液体培養ではみられないので、固体培養の特異的酵素生産現象とよばれる。例えば、麹ではデンプンをブドウ糖に分解するグルコアミラーゼが大量に生産されるが、このメカニズムは2種類のグルコアミラーゼ遺伝子のうちのひとつが固体培養でのみ発現することによるとわかった⁴⁾。つまり、2種類のグルコアミラーゼ遺伝子 *glaA* と *glaB* のうち *glaB* が固体培養でのみ高発現するがその発現量は特異性のない *glaA* よりもはるかに大きい。このとき、*glaB* の遺伝子発現に影響する要因が麹造りの操作条件と符合することがわかり、経験的な操作の裏付けがなされた。固体培養の特異的酵素生産は酒粕を褐色に変化させる麹菌のチロシナーゼ遺伝子などについても見られる⁵⁾。このように麹菌は真菌の中ではきわめて高いタンパク質分泌能をもち、安全性も高いことから、宿主に用いて異種タンパク質や二次代謝産物を生産する試みも行われている⁶⁾。

さて、麹菌のゲノム配列は2005年に報告されたが^{7,8)}、そのゲノムサイズは約30Mb、推定遺伝子数は約8,000で、ともに出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) よりも大きい。また本誌（モダンメディア第60巻10号）で紹介されたように麹菌とカビ毒アフラトキシンを生産する *A. flavus* とは形態的にはほとんど見分けがつかない。また両者はゲノムのホモ

ロジーが100%近く、遺伝学的にほとんど見分けがつかない⁹⁾。わが国の醸造産業にとってこれはゆゆしき問題であるので、醤油麹菌 (*A. sojae*) とともに麹菌にアフラトキシン合成遺伝子が存在するかどうか調べられた¹⁰⁾。その結果によると、麹菌の大部分の菌株はアフラトキシン合成遺伝子クラスターを保有することがわかったが、これらを培養してもアフラトキシンの生産は見られなかった。そこで麹菌のアフラトキシン合成遺伝子クラスターの構造を調べたところ、そのプロモータ領域が変異して遺伝子の転写スイッチが働かないグループやプロモータ領域が欠損したグループに分けられることがわかった^{11,12)}。かって数百株に及ぶ麹菌のカビ毒生産性調査¹³⁾により、醸造用麹菌の中にアフラトキシン生産菌がないことが報告されてはいたが、遺伝学的にも麹菌の安全性が証明されたことになり醸造関係者は胸をなでおろしたのであった。

ところで麹菌はゲノムのホモロジーから見て *A. flavus* から人為的に育種されたカビという推測がなされている⁸⁾。しかし親株というべき *A. flavus* はこれまでに日本の自然環境や国産の農産物・食品中には検出されていないので、その育種の経緯については疑問が残る。麹菌のミステリーの一つである。



図1 日本山海名産図会（部分）

1799年に大坂の酒造家・文人の木村兼葭堂孔恭が出版した物産図録で、伊丹の酒造の様子が描かれている。この図は麹造りを描いたもので、蒸し米を筵の上で冷却してから右上の漆喰造りの麹室に運び、麹蓋とよばれる杉の柵目板製の箱の中で麹菌を培養する。麹蓋は今でも大吟醸酒などの高級酒の麹製造に用いられている。

II. 清酒酵母

現在、日本酒製造用に用いられる清酒酵母は実際の酒造場から分離された菌株とその育種菌株で、これらはすべてパン酵母と同種の *Saccharomyces cerevisiae* に属する。その特徴は、①低温発酵性、②20%以上のアルコール生産能、③日本酒に固有の香味生成、などである。全国の日本酒の製造場では(財)日本醸造協会が頒布している清酒酵母(協会酵母)が多く使われているが、協会酵母の数は現在のところ約30種である。そのなかで代表的なものは協会7号酵母で清酒酵母の標準株とされる。協会7号酵母のゲノム配列の解析結果は2011年に公表されたが、これを *S. cerevisiae* の実験室株のゲノム配列と比較すると約5%のホモロジーの違いがあった¹⁴⁾。この違いの中に、協会7号酵母だけが持つ遺伝子として酵母のビタミンであるビオチン合成遺伝子(BIO6)、もろみでの高泡を形成する遺伝子(AWA1)が見出された。

高泡とは日本酒のもろみに特有な現象で、清酒酵母の細胞表面のタンパク質と炭酸ガスの気泡が疎水結合することにより気泡表面に酵母細胞が付着することが原因である(写真1)。高泡は日本酒の発酵が最も旺盛な時期(炭酸ガスの発生量が最も多い時期)に発生し、その後鎮静する(落ち泡と呼ばれる)。この泡の移り変わりをみて酒造杜氏(日本酒職人の親方)はもろみの発酵状態を判断するが、ごくまれ

にもろみに高泡が発生しない場合があった。その原因が酵母にあることがわかったため、泡のないもろみから酵母(泡なし酵母)が分離された。この酵母で造られた酒は品質上問題があったため実用化されなかったが、1968年に協会7号酵母から泡なし変異株(協会701号酵母)が分離されて普及した^{15, 16)}。

現在では、この高泡を形成する遺伝子(AWA1)が同定され、高泡形成のメカニズムも明らかとなった^{17, 18)}。それによると、高泡現象はAwa1タンパク質の疎水性領域が炭酸ガスの気泡に付着することにより気泡が安定化することによって考えられた。このAwa1タンパク質は酵母の細胞表面に局在し、糖脂質の一種であるグルコシル・フォスファチジル・イノシトール(GPI)を介して細胞壁のグルカンに結合する分子構造(GPIアンカータンパク質)をとっている。一方、泡なし変異株ではAWA1遺伝子に転座による欠落が生じ、GPIアンカー部分が欠失して細胞壁への結合能を失ったものであることがわかった。つまり泡なし変異株は細胞表面にAwa1タンパク質が存在しないため気泡に付着せず、気泡の安定性がなくなって高泡が発生しないと推測されている(写真1)。

泡あり酵母を使用したもろみでは高泡が発生する容量を考慮する必要があるため、タンクへの仕込み容量を減らす。また泡消し機とよばれる装置をタンク上部に備え付けて泡が仕込みタンクからこぼれないようにする。泡なし酵母を利用するとタンクへの仕込み容量を増やすことができ、泡消し機も不要とな

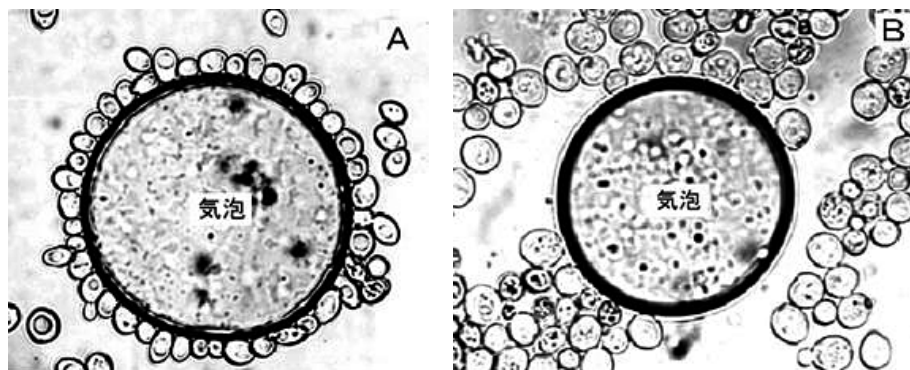


写真1 泡あり清酒酵母(左図)と泡なし清酒酵母(右図)

アルコール発酵により日本酒のもろみ中に発生した炭酸ガスの気泡に泡あり酵母が付着して高泡を形成する。泡なし酵母は気泡付着能がないので高泡を形成しない。

((財)日本醸造協会HP¹⁹⁾より)

る。また泡への酵母の付着がなくなるため、もろみ本体の酵母密度が増大して発酵速度が大きくなる。その結果、発酵期間が短くなって効率的であるが、タンク壁面への泡の付着によるもろみの酸化や微生物汚染も減って酒質の向上効果もある。これらのメリットにより現在使用される清酒酵母の多くは泡なし酵母である。その使用割合は年々増加し、現在、日本醸造協会が頒布する酵母のうち泡なし酵母は全体の約 83% である。

さて、日本酒のもろみでは生成するアルコール濃度が最高で 22% にまで到達する。この値は世界の醸造酒（蒸留操作を行わず、発酵液をそのまま飲む酒）のなかで最も高いといわれている。この理由は清酒酵母のアルコール生成能が高いことに加えてアルコールにたいする耐性が強いことにあるとされる。また、これらの特徴を增強する要因として清酒特有のデンプンの糖化とアルコール発酵を同時に行う並行複発酵形式や麹菌由来のプロテオリピドによる酵母細胞の保護効果などがあげられてきた²⁰⁾。

しかし最近になって、実験室酵母と清酒酵母の DNA マイクロアレイ解析結果から意外な事実が明らかとなった。それによると、実験室酵母に比べて清酒酵母にはストレス応答関係の遺伝子の発現量が少なく、高濃度アルコールに対する防御機能が低いことがわかった。つまり実験室酵母は自身が生成するアルコールが高濃度に達すると防御機能が働いてアルコール生成を停止するが、清酒酵母はストレス応答能力が低いためにアルコールが高濃度になっても発酵を持続するため、もろみのアルコール濃度が高くなるわけである。この逆説的な推論は実験室株のストレス応答遺伝子破壊株が親株よりも約 50% 高い濃度のアルコール生成を示したことにより裏付けられた²¹⁾。

このほかに、清酒酵母のさまざまな育種が行われて実用化されている。その一つが日本酒の香気を強く生成する吟醸酒用酵母である。吟醸酒は最も高品質な日本酒に位置付けられ、毎年の全国新酒鑑評会（独立行政法人酒類総合研究所・日本酒造組合中央会の共催）などでその品質により杜氏の腕が評価されている。その香りは吟醸香とよばれ、バナナやリンゴのようなフルーティな香りで、主な成分は酢酸イソアミルやカプロン酸エチルなどのエステルである。かつては吟醸香をいかに強く出せるかが酒造杜

氏の腕の見せ所であった。しかし今では育種された酵母を用いることにより、秘伝の技によらずとも高い香気の本酒を造ることができる。例えば酵母の脂肪酸合成阻害剤であるセルレニン耐性株の中からカプロン酸エチル高生産酵母を得ることができるので²²⁾、協会酵母からセルレニン耐性の泡なし変異株がスクリーニングされ、吟醸酒用酵母として広く普及している²³⁾。

このほか、日本酒のカルバミン酸エチル (ECA) 低減のために協会酵母由来のアルギナーゼ欠損変異株が尿素非生産性酵母として実用化された。ECA は尿素がアルコールと非酵素的に反応してできるが、発がん性を疑われる物質であるためカナダやアメリカでは酒類中の含有量に規制値が設けられている（わが国の食品衛生法では規制値は設けられていない）。カナダでは日本酒に対して 200 μ g/L という規制値が設けられているため、過去にはこの値を上回った日本酒が輸入禁止となったことがあった。ECA のもととなる尿素は酵母の細胞内でアルギナーゼによりアルギニンから合成される。そこで清酒酵母の中からアルギナーゼ欠損変異株を取得して日本酒を醸造すると ECA 含量が少ない日本酒が製造できた²⁴⁾。このほか、ECA 低減策として、びん詰後の加熱殺菌を行う際には急速冷却するなどの対策を実施し、さらに ECA 値を分析してから輸出するなどの措置が取られている。なお余談ながら日本酒の輸出量は年々増加し、最近 10 年間で 2 倍となっている。

Ⅲ. 乳酸菌

酵母を育成するための小スケールのスターターもろみを酒母またはもとというが、乳酸菌は生もとや山卸しやまは廃もと（山廃もと）という特殊な酒母の製造には必要であるが、それ以外は細菌はすべて汚染菌に位置づけられる。生もとは江戸時代に、また山廃もとは明治時代に開発された酒母の製造法である。山廃もとは生もと造りで行われる「もとす摺り（仕込み後に原料を權棒ですりつぶす操作で山卸しともいう）」を行わないのが特徴である。これらは発酵経過には大きな違いはないのでまとめて生もと系酒母とよぶ。

生もと系酒母では多くの微生物の変遷が生じる。

図2にみられるように、仕込みが行われると *Pseudomonas* 属、*Enterobacter* 属、*Micrococcus* 属などの硝酸還元菌が増殖して仕込み水などに含まれる硝酸を還元して亜硝酸を生成する。次いで *Leuconostoc mesenteroides* (球状乳酸菌) や *Lactobacillus sakei* (桿状乳酸菌) などが増殖して乳酸を生成し、酒母の pH を低下させると亜硝酸と低 pH の相乗効果で野生酵母が死滅する。乳酸菌が増殖してさらに pH が低下したところで清酒酵母が加えられると、酵母が生成するアルコールによって乳酸菌も死滅し、最終的に清酒酵母が純粋培養に近い状態で増殖して酒母が出来上がる仕組みである²⁵⁾。微生物の存在が知られない時代に、経験だけでこのような微生物の遷移を誘導する操作法が生み出されたことは大変な驚きである。

生もと系酒母は約1カ月にわたる長期の育成期間を要し、仕込み操作が複雑で時には微生物の遷移がうまくいかない場合がある。そこで明治時代に、あらかじめ酒母の仕込み水に乳酸を加えてから酵母を加える速醸酒母が考えだされた。速醸酒母は名前の通り生もと系酒母の半分以下の育成期間でできあがり仕込み操作も簡便なため、現在ではほとんどの酒造場でこの方法が採用されている。しかし生もと系酒母は速醸酒母よりもアミノ酸の量が数倍多く、でき上がった酒にコクがあって爛酒に向くといわれる。また酵母の安定性が高いなどの特徴がある²⁶⁾。そのため、個性的な日本酒造りを目的として徐々にではあるが採用する酒造場が増えてきている。

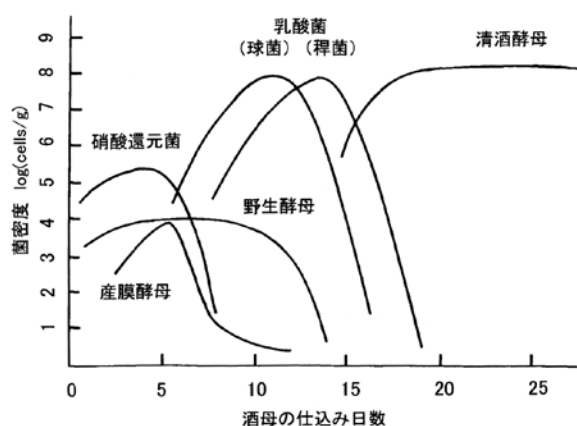


図2 生もと系酒母の微生物マイクロフローラの遷移²⁷⁾

硝酸還元菌による亜硝酸生成、乳酸菌による酒母のpH低下、清酒酵母によるアルコール生成の順に推移して最終的に清酒酵母が純粋培養に近い状態となる。

さて、日本酒には他の酒類には見られない悪玉の細菌がいる。微生物管理が徹底していなかった戦前・戦後には、これらの細菌が暴れて日本酒のもろみが腐造する事故がしばしば発生した(とりわけ1949年は大腐造年といわれた)。いったん腐造が発生すると、もろみ1本だけではなく蔵内で製造中の酒母やもろみ全体に波及したことから、酒屋の経営を危うくするとして大変おそれられた(宮尾登美子作の小説「蔵」にその有様が描かれている)。これは *Lactobacillus casei* や *L. plantarum* などに属する腐造乳酸菌の仕業であった。通常の乳酸菌はもろみのアルコールが13%以上になると死滅するが、腐造乳酸菌はアルコール18%以上でも増殖する²⁸⁾。腐造乳酸菌による汚染が進むともろみの酸度が異常に増加するとともに清酒酵母の増殖が阻害されてアルコール生成が停止する。腐造は現在でも酵母の育成に失敗した酒母を用いたときなどに発生することがある。

これとは別に、出来上がった酒をタンクで貯蔵している場合やビン詰め後の酒が白濁して異臭を放つことがある。この現象は火落ちとよばれ、日本酒の加熱殺菌(火入れ)が不十分な場合に発生する。火落ちはきわめて強いアルコール耐性を持つ火落ち菌(*Lactobacillus* 属の乳酸菌の一種)による汚染が原因である。火落ち菌には乳酸のみを生成するホモ型発酵菌と乳酸以外に炭酸ガスやアルコールを生成するヘテロ型発酵菌がある。また麹菌由来のメバロン酸を要求するものを真性火落ち菌、要求性がないものを火落ち性乳酸菌に分類する。このうち最もアルコール耐性が強いものはホモ発酵型真性火落ち菌(*L. homohiochii*)で、アルコール22.5%まで増殖可能である。その他、ヘテロ発酵型真性火落ち菌は *L. fructivorans*、ホモ発酵型火落ち性乳酸菌は *L. casei* など、ヘテロ発酵型火落ち性乳酸菌は *L. hilgardii* などに分類する²⁹⁾。

市販の日本酒はアルコール濃度15%前後であるので、火落ちを防止するために通常は出荷時に火入れが行われる。火入れの最も古い記録は中国の北宋時代(1116年頃)の北山酒経という文書である。日本では室町時代の御酒之日記という文書(14~15世紀?)が最も古い。火入れが中国から伝来した技術かどうかはわからない。ちなみに西欧ではパストールがワインの加熱による低温殺菌法(pasteurization)

を発表したのが1865年で、中国や日本よりも数百年後のことである。そこで、火入れは日本や中国の醸造技術の先進性を示すものとしてよく引き合いに出される。

おわりに

麹菌や清酒酵母の機能はゲノム情報をもとに解明が進んでいるが、これまでの結果からこれらが日本酒醸造という特殊な環境に特化した微生物であることがわかってきた。このような酒造微生物の選別過程を考えると、日本酒の千年以上にわたる長い歴史を感じさせる。現在、全国には1600ほどの酒造場があるが、「酒屋万流」といって酒造りの流儀は多様である。その背景には日本酒のもろみは並行複発酵という複雑な発酵形式であるため、酒造用水や原料米のほかさまざまな環境要因により酒の品質が変化する現象がある。これらの酒造場の多くは中小の規模であって、そこでは今なお杜氏の経験的知識と勘に基づいて酒造りが行われている。微生物を操る人間の技を感じ取ることができれば日本酒の味わいもおのずと増すように思われる。

文 献

- 1) 加藤百一. 日本の酒の歴史(日本の酒造りの歩み). 東京: 研成社; 1977. 75-260.
- 2) 野白喜久雄. 清酒醸造微生物学の進歩(2). 日本醸造協会. 1984; **79**: 106-110.
- 3) 奈良原英樹. 麹学(Ⅱ 種麹(もやし)). 東京: 日本醸造協会; 1986. 32-47.
- 4) 秦洋二、石田博樹. 分子麹菌学(清酒醸造の固体培養(麹造り)で大量に発現するグルコアミラーゼ遺伝子について). 東京: 日本醸造協会; 2003. 50-58.
- 5) Obata H, Ishida H, Hata Y et al. Cloning of a Novel Tyrosinase-Encoding gen (*melB*) from *Aspergillus oryzae* and its Overexpression in Solid-State Culture (Rice Koji). *J. Biosci. Bioeng.* 2004; **97**: 400-405.
- 6) 五味勝也. 分子麹菌学(清酒用麹菌の遺伝子操作技術). 東京: 日本醸造協会; 2003. 11-19.
- 7) Machida, M. et al. . Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature.* 2005; **438**: 1157-1161.
- 8) 秋田修. 麹菌ゲノム解析プロジェクトの概要とポストゲノム研究. 醸協. 2006; **101**: 536-548.
- 9) 杉山純多. 分子麹菌学(*Aspergillus*属の分子系統分類学: 最近の進歩と展望). 東京: 日本醸造協会; 2003. 119-137.
- 10) Kusumoto K, Nogata Y, Ohta H. Directed deletions in the aflatoxin biosynthesis gene homolog cluster of *Aspergillus oryzae*. *Curr Genet.* 2000; **37**: 104-111.
- 11) Tominaga M, Lee Y-H, Hayashi R, et. al. Molecular Analysis of an Inactive Aflatoxin Biosynthesis Gene Cluster in *Aspergillus oryzae* RIB Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; **72**: 484-490.
- 12) 山田修. 麹菌 *Aspergillus oryzae* のアフラトキシン生合成遺伝子ホモログクラスタの解析—麹菌がアフラトキシンを作らない理由—. 醸協. 2008; **103**: 665-669.
- 13) 佐々木正興. 麹学(Ⅲ-3 麹菌生産物). 東京: 日本醸造協会; 1986. 110-165.
- 14) 赤尾健. 清酒酵母のゲノム解析: その現状と展望. 醸協. 2012; **107**: 366-380.
- 15) 大内弘造. 泡なし酵母の歴史. 醸協. 2010; **105**: 184-187.
- 16) 秋山裕一. 清酒酵母—その生態学と高濃度アルコールの成因を中心に—. 発酵と工業. 1977; **27**: 814-825.
- 17) Shimoi H, et. al. The AWA1 Gene is Required for the Form-Forming Phenotype and Cell Surface Hydrophobicity of Sake Yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; **68**: 2018-2025.
- 18) 下飯仁. 清酒酵母の高泡形成に関与する遺伝子AWA1. 醸協. 2002; **97**: 474-480.
- 19) <http://www.jozo.or.jp/i.topicsPart7.htm>
- 20) 野白喜久雄. 清酒醸造微生物学の進歩(3). 醸協. 1984; **79**: 180-184.
- 21) 渡辺大輔. なぜ清酒酵母はアルコール発酵力が高いのか?. 化学と生物. 2012; **50**: 723-729.
- 22) 市川英治. カブロン酸エチル高生産酵母. 醸協. 1993; **88**: 101-105.
- 23) 吉田清. きょうかい酵母清酒用1801号—新規優良清酒酵母の育種・開発の経緯—. 醸協. 2006; **101**: 910-922.
- 24) 北本勝ひこ、宮崎香緒子・山岡洋ほか. ウレア非生産性清酒酵母による清酒実地醸造試験. 醸協. 1992; **87**: 602-607.
- 25) 秋山裕一. 酒づくりのはなし(日本古来の酒母づくり—自然的酵母純粋培養法—). 東京: 技報堂出版; 1983. 109-128.
- 26) 溝口晴彦、原昌道. 「生醗造り」に関する一考察. 醸協. 2010; **105**: 124-138.
- 27) 野白喜久雄. 清酒醸造微生物学の進歩(4). 醸協. 1984; **79**: 229-235.
- 28) 百瀬洋夫. 火落ち菌の分類. 醸協. 1975; **70**: 305-308.