

ナラノヤエザクラ酵母のセゾンスタイルビール醸造への応用及び 酢酸イソアミル高生産酵母の分離

栞原 智也^{*1)}, 大橋 正孝^{*1)}

Application to the saison-style beer brewing of “Naranoyaezakura” yeast and the isolation of the strain with isoamyl acetate high production

KUWAHARA Tomoya^{*1)}, OHASHI Masataka^{*1)}

Saccharomyces cerevisiae var. *diastaticus* (*S. diastaticus*) は、*Saccharomyces cerevisiae* の変種で分泌性グルコアミラーゼを産生できる酵母であり、ベルギービールの 1 つであるセゾンスタイルビールの醸造に使用されている。以前に *S. diastaticus* であると強く示唆された、県保有のナラノヤエザクラ酵母を用いてセゾンスタイルビールを醸造し、その醸造特性を評価した。その結果、ナラノヤエザクラ酵母はセゾンスタイルビールらしいドライなビールを醸造できるものの、市販のセゾン酵母と比較して醸造したビールのエステル香が乏しいことが明らかとなった。そこで、ナラノヤエザクラ酵母で醸造したビールに特徴的な香りを持たせるため、フルーティーな香気成分の 1 つである酢酸イソアミルを高生産する酵母の分離を行った。ナラノヤエザクラ酵母を変異原処理して得られた変異株の中から、5,5-トリフルオロロイシン耐性があり、かつ、細胞内ロイシン含量の高い変異株を選抜した結果、親株よりも酢酸イソアミルを 4.2 倍高含有するビールを醸造可能な酢酸イソアミル高生産酵母 B17-L02 株の分離に成功した。

1. 緒言

ビールは最も古い発酵飲料の 1 つであり、世界で最も消費されているアルコール飲料と考えられている¹⁾。ビールは主に、上面発酵酵母により醸造されるエールビールと下面発酵酵母により醸造されるラガービールに分類される。一般的にエールビールの発酵温度は 18°C~25°C 程度（最高 37°C）であるのに対して、ラガービールの発酵温度は、8°C~15°C 程度（最高 34°C）であり、両者は使用する酵母が異なるだけでなく、発酵温度も異なる²⁾。

セゾンスタイルビールは、エールビールの 1 つであり、ベルギーが発祥のビールスタイルである。セゾンスタイルビールの特徴は、ドライな味わいでかつ華やかな香りをもつことであり、これらの特徴はセゾン酵母と呼ばれる酵母を使用して高い発酵温度で醸造されることで作り出される³⁾。市販されているセゾン酵母は、主に *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (*S. diastaticus*) である。*S. diastaticus* は、*Saccharomyces cerevisiae* の変種で分泌性グルコアミラーゼを産生できる酵母であり、エールビール醸造で一般的に使用されている *S. cerevisiae* が資化できない多糖類を資化できるため、この酵母で醸造することによって、ビール中に糖類がほとんど残らないドライなビールが醸造可能である。

県保有のナラノヤエザクラ酵母は、分離当初 28S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列から *S. cerevisiae* と同定されていたが、PCR 法による簡易同定の結果、*S. diastaticus* であることが強く示唆された⁴⁾。しかし、これまでナラノヤエザクラ酵母は、セゾンスタイルビール用酵母としての評価はされていない。そこで本研究では、ナラノヤエザクラ酵母を用いてセゾンスタイルビールを醸造し、市販のセゾン酵母を用いたビールと比較することで、その醸造特性を評価した。

さらに、ナラノヤエザクラ酵母で醸造したセゾンスタイルビールは、市販セゾン酵母と比べてエステル香が乏しかったことから、ビールにフルーティーな香りを持たせるため、ナラノヤエザクラ酵母を親株とした酢酸イソアミル高生産酵母の分離を行った。得られた変異株の遺伝子解析並びにその変異株を用いたセゾンスタイルビール醸造を行い、その醸造特性を評価した。

2. 実験方法

2.1 使用酵母及び培地

県有酵母のナラノヤエザクラ酵母、市販ビール酵母の SafAle US-05 (Fermentis 社)、VOSS Kveik (社)、LalBrew Belle Saison (Lallemand 社)、SafAle BE-134 (Fermentis 社)

*1) メディカル技術支援科 (当時: バイオ・食品グループ)

を使用した。酵母の培養には、YPD 培地（グルコース 2%、ペプトン 2%、酵母エキス 1%）、YPM20 培地（マルトース 20%、ペプトン 2%、酵母エキス 1%）、SMal 培地（マルトース 2%、Yeast nitrogen base w/o amino acid 0.67%）を使用した。5,5,5-トリフルオロロイシン（TFL）耐性株のスクリーニングには、SMal 培地に TFL を 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した培地を使用した。

2.2 セゾンビール小仕込み試験

各酵母を YPD 5 mL で 30°C、100 rpm で一晩培養後、培養液 400 μL を YPD 40 mL に添加し、30°C、100 rpm で 24 時間培養した。その後、集菌し滅菌水で 2 回洗浄した菌体を滅菌水 10 mL に再懸濁させ、既報の方法⁴⁾で調製した麦汁 500 mL に OD₆₀₀ が 0.2 となるように菌体懸濁液を添加し、30°C で 8 日間静置培養した。培養液の重量変化を CO₂ 減量として計測し、CO₂ 減量をモニターすることによって、発酵能を評価した。発酵終了後、発酵液を 10,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清をビールとした。アルコメイト AL-2（理研計器株式会社）を用いて、ビール中のアルコール濃度を測定した。また、pH、比重、Brix を、それぞれ、コンパクト pH メーター B-211（株式会社堀場製作所）、あまからメイト DA-120（京都電子工業株式会社）を用いて測定した。

2.3 香気成分の測定

ビール中の香気成分として、高級アルコール類のプロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコール、エステル類の酢酸エチル、酢酸イソブチル、酪酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル、カプリル酸エチル、フェノール類の 4-ビニルグアイアコール（4VG）を定量した。4VG 以外の成分をガスクロマトグラフ質量分析装置（GCMS）を用いて、4VG を高速液体クロマトグラフ質量分析装置（HPLC）を用いて測定した。

GCMS 測定には、GCMS-QP2010Ultra（株式会社島津製作所）を使用した。20 mL バイアル瓶にサンプル 1.8 mL、内部標準 0.2 mL（2,000 mg/L n-アミルアルコール及び 50 mg/L カプロン酸メチルの混合溶液）を添加して密閉後、70°C で 30 分間加熱し、ヘッドスペース中の香気成分 2 mL をカラムにスプリット比 1:5 で注入した。分離カラムに HP-INNOWAX（60 m \times 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 mm; アジレントテクノロジー社）を使用し、オープン温度を 40°C（5 min） \rightarrow 4°C/min \rightarrow 60°C（0 min） \rightarrow 1°C/min \rightarrow 70°C（0 min） \rightarrow 10°C/min \rightarrow 120°C（0 min） \rightarrow 15°C/min \rightarrow 240°C（5 min）で昇温させた。インターフェース温度を 250°C、イオン源温度を 200°C、イオン化電圧を 70eV（EI）とした。

HPLC 測定には、LC-20 Prominence（株式会社島津製作所）を使用した。0.45 μm フィルターでろ過したサンプル

を C18 カラムで分離し、254 nm の吸光度で定量した。移動相には、50 mM 酢酸（pH4.0）とメタノールを 60:40 で混合させた溶液を使用し、流速は 0.5 mL/min とした。分離カラムに Inertsil ODS-3（5 μm , 4.6 \times 250 mm, ジーエルサイエンス株式会社）を使用し、カラム温度を 40°C とした。

2.4 5,5,5-トリフルオロロイシン耐性株の取得

ナラノヤエザクラ酵母を YPD で 30°C、100 rpm で一晩培養後、菌体を集菌し滅菌水で洗浄した。次に洗浄した菌体約 1.0×10^8 cells を 2%エチルメタンスルホン酸（EMS）含有 100 mM リン酸緩衝液（pH7.0）5 mL 中で、30°C、20 分間振とうすることで変異原処理を行った。その後、10%チオ硫酸ナトリウム 1 mL で中和し、菌体を遠心分離で集菌後、滅菌水で洗浄した。変異原処理した菌体を TFL 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有 SMal 寒天培地に塗布し、30°C で 3 日間培養後に生育したコロニーを TFL 耐性株として単離した。

2.5 細胞内ロイシン含量の測定

酵母を SMal 培地で 30°C、48 時間培養し、集菌後、滅菌水で洗浄した。OD₆₀₀=10 量の菌体を 500 μL の滅菌水に懸濁後、99°C で 20 分間熱水抽出を行った。遠心分離後、アミノ酸分析システム UF-Amino Station（株式会社島津製作所）を使用して、3-アミノピリジール-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート（APDS）によるプレカラム誘導体化法により、細胞内のロイシン含量を測定した。アミノ酸分析システムの測定条件については、立本ら⁵⁾の方法に従った。

2.6 YPM20 培地での発酵試験

YPD で 30°C、100 rpm で一晩培養後、菌体を滅菌水で洗浄した。発酵は、洗浄後の菌体を YPM20 10 mL に OD₆₀₀ が 1 となるよう添加し、20°C で 7 日間静置培養した。培養液を 0.45 μm の PTFE フィルターでろ過し酵母を除去後、GCMS により培地中のイソアミルアルコール及び酢酸イソアミル含量の測定を行った。

2.7 LEU4 遺伝子の DNA シーケンス

酵母のゲノム DNA を鋳型に LEU4 遺伝子の前後 500 bp を含む領域を LEU4-519_Fw（5'-CTTATGCTTCTGTTCTCC GCTTTGA-3'）と LEU4-750_Rv（5'-CGATGTCCATGAAAT CCCATTAGA-3'）のプライマーと TaKaRa Ex PremierTM DNA Polymerase（タカラバイオ株式会社）を用いて、VeritiTM 96-Well Fast サーマルサイクラー（Thermo Fisher Scientific 社）で増幅させた。PCR 産物は ExoSAP-IT（Thermo Fisher Scientific 社）を用いて精製し、DNA シーケンス用の DNA 断片とした。下記プライマーを用いて、LEU4 遺伝子領域の塩基配列を決定した。LEU4_Seq1_Fw（5'-GGATTCTCACACTAGAAGTTTACTG

TAG-3'),

LEU4_Seq1_Rv (5'-GAGTTTCACCTTGAGCACG-3'),
 LEU4_Seq2_Fw (5'-TCCAAATGTTTATGCTGATCAG-3'),
 LEU4_Seq2_Rv (5'-ATCCGTGCTTCTAGTAATTATATGG-3')

2.8 IPMS の立体構造予測解析

IPMS のアミノ酸置換によるロイシン結合への影響を推測するため、*Mycobacterium tuberculosis* の IPMS (PDB ID: 3FI) ⁶⁾ をテンプレートとして、PyMOL (<http://www.pymol.org/>) を用いて IPMS の立体構造予測をおこなった。

3. 結果及び考察

3.1 ナラノヤエザクラ酵母のセゾンスタイルビール醸造特性

ナラノヤエザクラ酵母, Belle saison 株, BE-134 株, US-05, VOSS Kveik 株 の 4 種類の酵母を用いて, 一般的なエールビール醸造よりも高温で発酵させるセゾンスタイルビール醸造の発酵条件でビール小仕込み試験を行った。Belle saison 株と BE-134 株は, セゾン酵母として市販されている *S. diastaticus* に属する。また, US-05 株は, 一般的なエール酵母として市販されており, 穏やかな香りのビール醸造が可能な *S. cerevisiae* に属する酵母で, VOSS Kveik 株は, 高温発酵でもオフフレーバーがほとんど発生せず穏やかな香りのビール醸造が可能な Kveik 酵母として市販されている *S. cerevisiae* に属する酵母である。

発酵中の累積 CO₂ 発生量の経時変化を図 1 に示す。エー

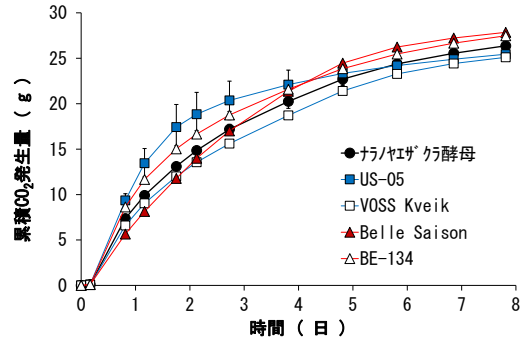


図 1 セゾンスタイルビール小仕込み試験の発酵経過

ル酵母である US-05 株の CO₂ 発生量は, 発酵初期段階で顕著に増加し, 発酵が早期に完了した。一方, ナラノヤエザクラ酵母の CO₂ 発生量は, 他のセゾン酵母と同様に緩やかに継続的に増加した。これは, 麦汁内のマルトースやグルコースの消費後も分泌性グルコアミラーゼによって麦汁内のオリゴ糖分解が継続して行われているためと考えられる。

次に, 醸造したビール中の一般成分分析結果を表 1 に示す。ナラノヤエザクラ酵母で醸造されたビールのアルコール含量は, 市販エール酵母 (US-05 株) あるいは市販セゾン酵母 (Belle saison 株あるいは BE-134 株) で醸造されたビールの間程度であった。このことから, ナラノヤエザクラ酵母は, 市販セゾン酵母には劣るものの, セゾンスタイルビールらしいドライなビールをつくることが可能であることが示された。

表 2 に示すように, ナラノヤエザクラ酵母で醸造したビール中の香気成分濃度について, 高級アルコール類含量と 4VG 含量は市販セゾン酵母で醸造したビールと同程度であった。また, ビールの華やかな香りに寄与するエステル

表 1 ビール小仕込み試験結果 (一般成分)

	ナラノヤエザクラ酵母	US-05	VOSS Kveik	Belle Saison	BE-134
アルコール	6.6±0.1	6.3±0.1	6.2±0.0	6.9±0.0	6.8±0.0
初期比重	1.0563	1.0563	1.0563	1.0563	1.0563
最終比重	1.0066±0.0004	1.0091±0.0014	1.0084±0.0001	1.0037±0.0000	1.0044±0.0002
pH	4.4±0.0	4.6±0.1	4.4±0.0	4.4±0.0	4.3±0.0
酸度	4.0±0.2	3.2±0.2	4.1±0.2	4.6±0.6	4.3±0.1

表 2 ビール小仕込み試験結果 (香気成分)

香調	ナラノヤエザクラ酵母	US-05	VOSS Kveik	Belle Saison	BE-134	ビール中間値
ブロパノール	28.5±1.2	18.1±3.0	13.0±0.4	17.0±0.3	21.4±0.6	800 mg/L ⁷⁾
イソブタノール	20.8±1.1	15.9±4.6	15.7±0.5	24.0±0.4	21.4±0.7	200 mg/L ⁷⁾
イソミルアルコール	59.4±1.5	52.0±9.5	50.9±0.5	77.0±0.7	53.1±0.5	65 mg/L ⁷⁾
酢酸エチル	16.3±0.3	18.8±6.7	22.0±1.3	23.4±0.6	41.8±5.7	30 mg/L ⁷⁾
酢酸イソブチル	0.03±0.00	0.04±0.02	0.03±0.00	0.04±0.00	0.06±0.00	1.6 mg/L ⁸⁾
酪酸エチル	0.09±0.00	0.08±0.02	0.08±0.00	0.13±0.00	0.19±0.01	0.4 mg/L ⁹⁾
酢酸イソアミル	0.73±0.06	0.90±0.44	0.63±0.03	1.07±0.03	1.08±0.07	1.2 mg/L ⁷⁾
カブロン酸エチル	0.32±0.02	0.16±0.02	0.19±0.02	0.24±0.01	0.13±0.02	0.21 mg/L ⁷⁾
カブリン酸エチル	0.19±0.01	0.11±0.02	0.18±0.01	0.22±0.01	0.14±0.02	0.9 mg/L ⁷⁾
4VG	2.9±0.2	1.0±0.1	N.D.	2.7±0.0	2.8±0.0	0.2 mg/L ¹⁰⁾

N. D. : 不検出

類については、カブロン酸エチル含量 (0.32 mg/L) は市販セゾン酵母で醸造したビール (0.24, 0.13 mg/L) よりも高く、カプリル酸エチル含量 (0.19 mg/L) は、市販セゾン酵母で醸造したビール (0.22, 0.14 mg/L) と同程度、酢酸イソアミルを含めたそれ以外のエステル類含量は市販セゾン酵母で醸造したビールよりも低く、市販エール酵母と同程度であった。ナラノヤエザクラ酵母で醸造したビールは、清酒の吟醸香成分であるカブロン酸エチル含量が高く、爽やかな香りが特徴のビールと推察された。一方で、ビール中の香气成分は成分ごとに閾値が異なるため、低濃度であっても官能的な寄与が大きいこともありうる。そこで、成分濃度を閾値で割った Odor Unit を算出し、高級アルコール類、エステル類、フェノール類の Odor Unit からビールの香りの傾向を評価した (表 3)。その結果、ナラノヤエザクラ酵母で醸造されたビールでは、エステル類の Odor Unit が市販セゾン酵母に比べて低く、エステル香が乏しいビールであることが明らかとなった。

表 3 ビール香气成分の Odor Unit

	高級アルコール類	エステル類	フェノール類
ナラノヤエザクラ酵母	1.05	3.12	14.47
US-05	0.90	2.52	5.13
VOSS Kveik	0.88	2.59	0.16
Belle Saison	1.33	3.43	13.33
BE-134	0.95	3.59	14.05

3.2 5, 5-トリフルオロロイシン耐性株の取得及び細胞内ロイシン高蓄積株の選抜

ナラノヤエザクラ酵母のセゾンスタイルビール醸造特性を評価したところ、市販セゾン酵母のような高い麦汁発酵能があったものの、醸造したビールのエステル香が市販セゾン酵母よりも乏しいことが明らかとなった。そこで、醸造したビールに華やかなエステル香を持たせるため、ナラノヤエザクラ酵母を親株として、エステル香の中でもフルーティーな香りの 1 つである酢酸イソアミルを高生産する酵母の育種を検討した。これまで清酒酵母や泡盛酵母において、TFL 耐性を指標とした酢酸イソアミル高生産酵母の育種が報告されており^{11,12,13)}、ナラノヤエザクラ酵母も同様の方法で育種を行った。

ナラノヤエザクラ酵母を親株として EMS による変異原処理の結果、TFL 耐性のある変異株を 32 株取得した。32 株の細胞内ロイシン含量を測定したところ、全ての株で親株よりも細胞内ロイシン含量が高く、特に高かった上位 2 株の B17-L02 株と B17-L09 株を細胞内ロイシン高蓄積株として選抜した (図 2)。

3.3 細胞内ロイシン高蓄積株のイソアミルアルコール及び酢酸イソアミル生成能

取得した細胞内ロイシン高蓄積株 B17-L02 株と B17-L09

株について、YPM20 培地中に生成した酢酸イソアミルと前駆体のイソアミルアルコール生成量を測定した結果を図 3 に示す。親株 (ナラノヤエザクラ酵母) と比較して、B17-L02 株、B17-L09 株ともに培地中の酢酸イソアミル濃度が 2 倍以上となり、親株よりも酢酸イソアミルを高生産していた。

3.4 酢酸イソアミル高生産株を用いたセゾンビール小仕込み試験

取得した酢酸イソアミル高生産酵母 2 株のうち、最も酢酸イソアミルを高生産した B17-L02 株を使用してセゾンスタイルビール小仕込み試験を行った。ビール中のアルコール含量は 6.5% で、親株 (アルコール含量 6.6%) と同程度であった。ビール中のイソアミルアルコール及び酢酸イソアミル含量は、それぞれ親株と比較して、3.7 倍、4.2 倍に増加した (図 4)。官能試験でも、B17-L02 株で醸造したビールは、親株で醸造したビールと比較して、酢酸イソアミ

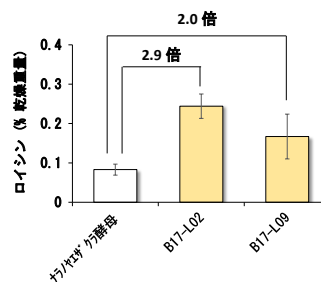


図 2 細胞内ロイシン含量 (SMal 培地)

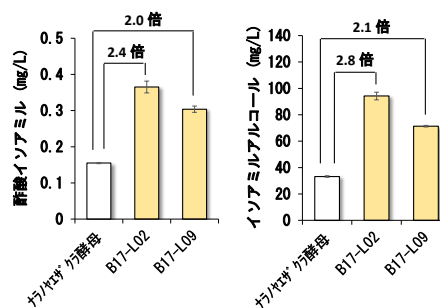


図 3 YPD20 培地中の酢酸イソアミル及びイソアミルアルコール含量

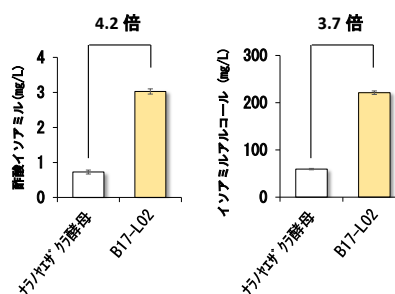


図 4 ビール中の酢酸イソアミル及びイソアミルアルコール含量

ル特有のフルーティーな香りが顕著にした。測定した香気成分のうち、イソamilアルコール及び酢酸イソamil以外の成分含量は親株と同程度であった。

セゾンスタイルビールは、*S. diastaticus* をはじめとしたセゾン酵母を使用して高い温度で発酵させるため、非常にドライでかつ華やかな香りが高い特徴をもつ。B17-L02 株で醸造したビールも、ドライでフルーティーな香りが高い特徴があり、B17-L02 株は、セゾンスタイルビールの醸造に適した変異株と考えられる。

3.5 酢酸イソamil高生産メカニズムの推定

酢酸イソamilは、酵母細胞内でピルビン酸から複数の酵素反応により合成される(図5)。この酢酸イソamil生合成経路において、 α -ケトイソ吉草酸から α -イソプロピルリンゴ酸への反応を触媒する α -イソプロピルリンゴ酸合成酵素(IPMS)は、同じく酢酸イソamil生合成経路内で α -ケトイソカプロン酸からアミノ基転移酵素(BCAT)の触媒反応で生成されるロイシンのIPMSの調節ドメインへの結合により、フィードバック阻害を受けるため、その活性が低下することが知られている^{14,15}。しかし、ロイシンアナログであるTFLに耐性があり、細胞内にロイシンを高蓄積する酵母は、IPMSをコードする*LEU4*にアミノ酸置換を伴う変異があり、IPMSのロイシンによるフィードバック阻害感受性が低下するために、酢酸イソamilの前駆体であるイソamilアルコールを高生産し、その結果、酢酸イソamilを高生産することが知られている^{11,12,13,16,17}。これまでに、IPMSのアミノ酸置換(G514D, N515D, G516D, G516S, S519T, S520P, E540F, H541P, S542F, A551V, A552T, D578Y)で、ロイシンによるIPMSのフィードバック阻害感受性が低下することが報告

されている。

そこで、本研究で取得した酢酸イソamil高生産株のB17-L02株とB17-L09株についても、*LEU4*の塩基配列を解析し、酢酸イソamil高生産メカニズムの推定を行った。その結果、B17-L02株及びB17-L09株ともに、親株と比較してアミノ酸置換を伴うヘテロな変異が1箇所ずつ入っていた(図6)。B17-L02株では、*LEU4*の1658番目のシトシンがチミンに変異することで、IPMSの553番目のセリンがフェニルアラニンに置換(S553F)されていた。B17-L09株では、1625番目のシトシンがチミンに変異することで、IPMSの542番目のセリンがフェニルアラニンに置換(S542F)されていた。S542Fは、これまでに報告されているアミノ酸置換である一方、S553Fはこれまでに報告のない新規のアミノ酸置換であった。

B17-L02株で見出した新規変異S553Fについて、IPMSの立体構造予測により酢酸イソamil高生産への関与を推測

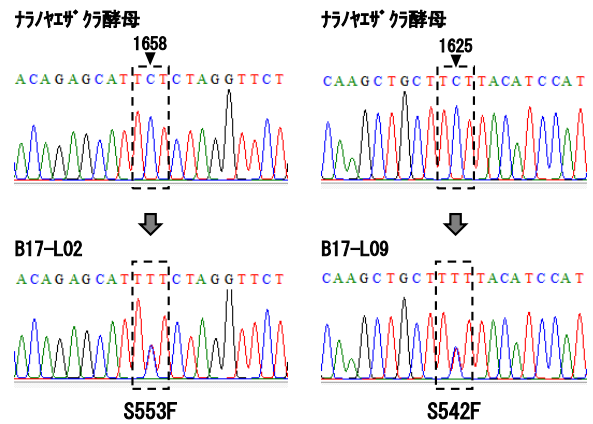


図6 *LEU4*の変異箇所

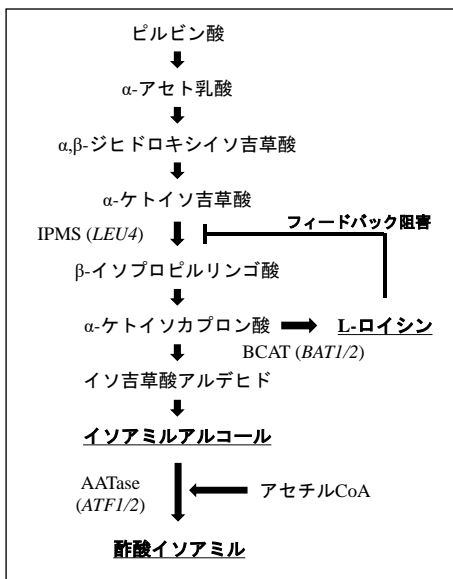


図5 酵母の酢酸イソamil生合成経路

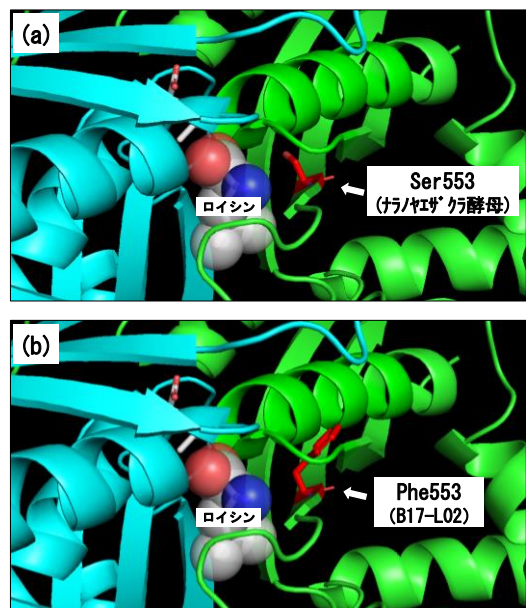


図7 IPMSの立体構造予測

した。テンプレートには、Takagi ら¹¹⁾と同様に *M. tuberculosis* の IPMS を使用した。立体構造予測の結果、S553F は、ロイシン結合ポケットからは少し離れた位置にあることが分かった (図 7 (a))。しかし、553 番目のアミノ酸残基がセリンから嵩高いフェニルアラニンに置換されることで、ロイシン結合ポケットの一部を形成する α ヘリックスに干渉する可能性が示唆された (図 7 (b))。これにより、ロイシン結合ポケットの立体構造が変化することで、IPMS のフィードバック阻害感受性が低下したのではないかと推察された。今後、組換え IPMS を使用した実験によりこの仮説を証明する必要があると考える。

4. 結言

S. diastaticus と強く示唆されたナラノヤエザクラ酵母について、セゾンスタイルビール醸造特性を評価した。その結果、ナラノヤエザクラ酵母はセゾンスタイルビールらしいドライなビールを醸造可能であることが分かった。一方で、ナラノヤエザクラ酵母で醸造されたビールは、セゾン酵母で醸造されたビールと比較してエステル香が乏しいことが明らかとなった。そこで、ビールにフルーティな香りを持たせることのできる酵母の育種を行った。ナラノヤエザクラ酵母に変異原処理をして得られた変異株の中から、TFL 耐性があり、かつ、細胞内ロイシン含量の2倍以上高い変異株を選抜した結果、培養液中に、親株より2倍以上酢酸イソアミルを高生産する B17-L02 を分離した。B17-L02 株を用いて、セゾンスタイルビール小仕込み試験を実施したところ、ビール中の酢酸イソアミル含量が親株よりも4.2倍増加したフルーティな香りのビールを醸造することができ、セゾンスタイルビール醸造に適した変異株の分離に成功した。さらに、B17-L02 株の IPMS をコードする *LUE4* にアミノ酸置換を伴う新規な変異 (S553F) を見出し、この変異が酢酸イソアミル高生産に寄与している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Piron, E., and E. Poelmans., "Beer, the Preferred Alcoholic Drink of All? Changes in the Global and National Beer Consumption since 1960 and Convergence and Trends since the 1990s.", *Brewing, Beer and Pubs*, p.205-227, 2016
- 2) Stewart, G.G., "Saccharomyces species in the Production of Beer." *Beverages*, 2, 34, 2016
- 3) Poelmans, E., Taylor, J., "Belgium's historic beer diversity: Should we raise a pint to institutions?," *J. Institutional Econ.*, 15(4), p.695-713, 2019
- 4) 栗原智也, "ナラノヤエザクラ酵母のビール醸造特性", 奈良県産業振興総合センター研究報告, No.49, p.54-57, 2023
- 5) 立本行江, "奈良県産シャクヤク花の抗酸化能成分と遊離アミノ酸量評価", 奈良県産業振興総合センター研究報告, No.49, p.9-18, 2023
- 6) Koon, N. et al. "Crystal structure of LeuA from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in leucine biosynthesis." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, p.8295-8300, 2004
- 7) Olaniran, A. O. et al "Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control." *J. Inst. Brew.*, 123, p.13-23, 2017
- 8) Meilgaard, M., "Flavor chemistry of beer: part II: flavor and threshold of 239 aroma volatiles.", *Tech. Q. MBAA*, 12, p.151-168, 1975b
- 9) Meilgaard, M., "Flavor chemistry of beer. part i: flavor interaction between principal volatiles." *Tech. Q. MBAA*, 12, p.107-117, 1975a
- 10) Vanbeneden, N. et al., "Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of pad1 activity among brewing yeasts", *Food Chem.* 107, p.221-230, 2008
- 11) Takagi, H. et al., "Isolation and characterization of awamori yeast mutants with l-leucine accumulation that overproduce isoamyl alcohol." *J. Biosci. Bioeng.*, 119, p.140-147, 2015
- 12) Abe T. et al., "Characterization of a New *Saccharomyces cerevisiae* Isolated From Hibiscus Flower and Its Mutant With L-Leucine Accumulation for Awamori Brewing. *Frontiers in Genetics*." 2019
- 13) Takagi H. et al., "Influence of mutation in the regulatory domain of α -isopropylmalate synthase from *Saccharomyces cerevisiae* on its activity and feedback inhibition." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 86, p.755-762, 2022
- 14) Baichwal VR et al., "Leucine biosynthesis in yeast: identification of two genes (*LEU4*, *LEU5*) that affect α -isopropylmalate synthase activity and evidence that *LEU1* and *LEU2* gene expression is controlled by α -isopropylmalate and the product of a regulatory gene." *Curr Genet*, 7, p.369-377, 1983
- 15) Watanabe M. et al., "Mutants of bakers' yeasts producing a large amount of isobutylethanol or isoamyl ethanol, flavour components of bread.", *Appl Microbiol Biotechnol*, 34, p.154-159, 1990
- 16) Cavalieri, D. et al., "Trifluoroisoleucine resistance and regulation of α -isopropyl malate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Gen. Genet.*, 261, p.152-160, 1999
- 17) Oba T. et al., "Asp578 in LEU4p is one of the key residues for leucine feedback inhibition release in sake yeast.", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, p.1270-1273, 2005