

酵母の早期凝集沈降性（PYF）に関する研究

－PYF生成菌及び抑制菌の調査－

山下 博、田添 由季、原 明日香
古庄 由佳、室井 史織、岡田 啓介*、若浦 誠**

九州女子大学家政学部栄養学科、北九州市八幡西区自由ヶ丘1-1（〒807-8586）

*アサヒビール株式会社研究生産本部酒類技術研究所、茨城県守谷市緑1-1-21（〒302-0106）

**アサヒビールモルト株式会社品質保証部、滋賀県野洲市三上2311（〒520-2323）

（2014年11月13日受付、2014年12月18日受理）

要 旨

PYF現象を起こす原因となる微生物類の選別、及びPYF因子を分解する微生物類の選別について、各々のスクリーニング法を立ち上げ調査した。その結果、PYF因子生成微生物として活性を持つ4株を、またPYF因子作用抑制作用を示す3株を選別することができた。

PYF生成株の内、強い活性を示す2株について同定した結果、各々を黴1-3：*Aspergillus thubingensis*、黴1-6：*Pyrenophora tritici-repentis*と推定した。黴1-3株が生成する酵母凝集因子は、PYF麦芽からの凝集因子とほぼ同じ高分子酸性多糖成分であることを確認した。

また、PYF現象を抑制する株の内、活性の強い2株について同定した結果、黴1-8：*Rizopus oryzae*、黴G3-1：*Aspergillus clavatus*であることが判った。黴1-8による抑制作用は、菌体外に生成するGlucoamylaseが発酵工程中にデンプン質に作用し生成してくるグルコースによって酵母の増殖がPYFの凝集に勝り、あたかも凝集作用を抑制したかのような現象を呈する結果によることが判った。一方で、G3-1株の場合は、培養液中に生産される菌体外酵素がPYF因子に作用して酵母凝集作用を抑制していると推察されるが、更に精製を進めて実態を調べ、酵素の性質を明らかにする予定である。本酵素については、PYF因子の凝集コア構造の解明にも活用できるものと期待できる。

緒 言

PYF（Premature Yeast Flocculation：酵母の熟成前の早期凝集沈降現象）とは、アルコールの発酵工程中において酵母の資化可能な糖成分がまだ残っているにもかかわらず、酵母が凝集・沈降してしまい、その結果発酵が停滞してしまう現象である¹⁾。

私たちは、既にPYFを引き起こす成分について異なる年度・地域で発生した麦芽から精製しその性質を調べた結果から、高分子の酸性多糖（800KDa、500KDa、300KDaなど）であることを報告した²⁾。このような成分がどのようにして生産されるかについては、過去においてPYFの事故が発生した際の経験（天候不順³⁾、黴など微生物の付着⁴⁻⁶⁾、穀皮の洗浄によ

る抑制効果⁷⁾など)から、大麦に付着したある種の微生物がPYFを発生させているものと推察し、PYF因子生成微生物の調査をスタートさせた。調査にあたっては、まずPYF麦芽からの微生物類の単離、その他環境に存在する微生物類の蒐集、続いてPYF因子生成能を持つ微生物のスクリーニング系の確立と選別、そして生成能を示す微生物の同定、生産されたPYF因子の性質調査について進めることとした。

また、一方で発酵生産の立場からはPYF現象を抑制する手法の樹立が重要課題であることから、PYF因子の抑制法についても併せて行うこととした。

いずれも、PYF因子の詳細（機能の発現に必須の基本コア構造）に迫るに不可欠なところであると考えられる。

実験材料及び方法

1. 材料

カナダ産PYF麦芽及び国内産PYF麦芽を材料として、微生物の単離を行い、PYF因子生成能或いは分解能を示す微生物類のスクリーニングを行った。また、野洲製麦工場の製造ラインから単離された微生物類、或いは環境微生物などから単離した微生物類もその対照としてスクリーニングを行った。

2. 方法

(1) 微生物の分離法

分離培養

黴の分離 : Malt Agar(クロラムフェニコール50ppm添加)

単離 : Potate Dextrose Agar
25℃

バクテリアの分離 : Standard Agar
希釈平板法(0.1ml表面塗布)
30℃

(2) PYF因子生成能を示す微生物の選別

本選別には、液体振盪培養法(図1)に準じて行った。

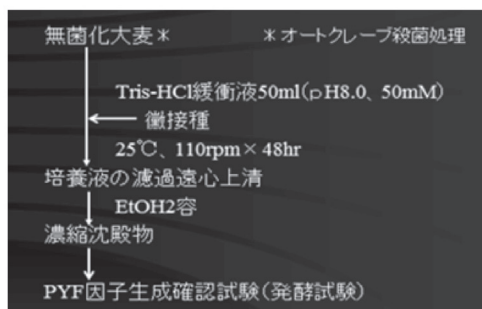


図1. スクリーニング用液体振盪培養法

(3) PYF因子抑制能を示す微生物の選別

選別法としては、基質をオートクレーブ処理により無菌化したPYF麦芽を用い最少培地の条件でPYF因子生成確認試験法に準じて行い、継続的にサンプリングを行って得られてくる培養液中のPYF因子の活性状況から抑制・分解能の有無を判断する方法で実施した(図.2)。

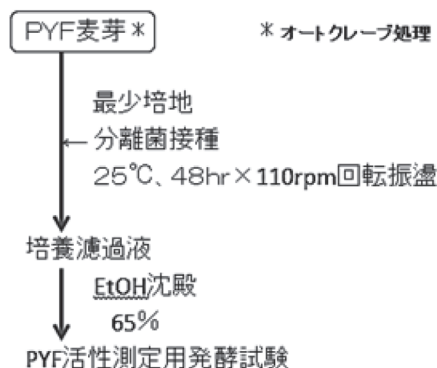


図2. 分離菌株のPYF抑制能試験法

(4) PYF分解酵素の活性測定法

PYF分解酵素の活性測定は、PYF麦芽抽出液(PYF麦芽/水=1:3) 5mlに酵素液1mlを加え、25℃・24時間反応後、12mlのエタノールを加えて沈殿物を遠心して集めた。沈殿物を減圧乾固した後、0.5~1mlの熱水に可溶化後内300~400 μ lを発酵試験に供した。尚、対照としては酵素液を予め加熱処理(100℃・10min)したものを用いて同処理を施したものとした。

(5) PYF活性確認発酵試験法

PYF活性確認試験法は3mlの光学セルを用いた発酵試験により実施した。

無菌化処理した光学セルに、発酵CO₂ガス分離剤として多孔性沸石(ケミカルストーン、関谷理科株) 6粒を置き、Brix13%にグルコースで補糖したコングレス麦汁3ml、PYF因子成分100~300 μ lを加えた後、標準酵母SMA(独VLB)をユニバーサル増殖法で調製した培養酵母を初発酵母数約 10×10^6 cells/mlとなるように加え、25℃の恒温下にて発酵を行い継続的に600nmの吸光度を測定することで酵母の凝集性を追跡調査した。

(6) 各菌株の同定法

PYF生成能或いは抑制能を持つ菌・バクテリアについては、それぞれに適したDNA抽出法(Prepman, Ultra, Extractor-Plant Genome)を用い、26S(LrRNAF及びLrRNA Tag)のプライマーを使ってPCR(反応時間: 94℃ 2.5分、94℃ 30秒、57℃ 30秒後、72℃ 1分、72℃ 3分、4℃ ∞ を30サイクル)後、電気泳動にてシングルバンドである

ことを確認した。シークエンスはDTCS Quik Start Master Mix、26S RTag(LrRNA RTag)を用い、反応温度（96℃ 20秒、48℃ 20秒、60℃ 4分を30サイクル）下で行い、塩基配列解析はCEQ8000 Genetic Analysisを用いて実施、B R A S T（ブラスト）検索により同定した。

結 果

1. 微生物の分離株

2種類のPYF麦芽、製麦工程中更には環境より分離した株は、総数170株であり、それぞれの内訳は以下の通りである。

- a. PYF麦芽
 - カナダ産麦芽 50株
 - 福島産麦芽 43株
- b. 麦芽製造工場
 - アサヒビールモルト野洲工場製麦工程 45株
- c. 環境
 - PYF精製調査環境 32株

2. PYF因子生成能或いは抑制能を示す微生物の選別

（1）選別菌株

カナダ産及び国内産PYF麦芽より単離された株93株、麦芽製造工場の工程ラインから単離された45株、環境分離株32株、計170株を使って、PYF因子生成能を示すものとして10株（PYF麦芽由来3株、製麦工程由来5株、環境由来2株）及び同抑制能を示す10株（PYF麦芽由来4株、製麦工程由来6株）を得た。繰り返し活性測定を行い強い活性を示す株として生成菌4株と分解菌3株を選別した。

表 1. PYF 因子の生成・分解能を持つ菌株の選別

合成能を持つ株	分解能を持つ株
徴1－3	徴1－8
徴1－6	徴 G3－1
バクテリア ZB	バクテリア W2－15
バクテリア SW	

当該微生物の内、発酵試験の一例を図.3 に示す。対照（菌の接種なし）と比較して、PYF生成微生物である徴1－3を接種した発酵反応では酵母が発酵のピークを迎える前に凝集（早期凝集）していることが濁度OD600nmの値の減少傾向から確認でき、一方PYF抑制微生物である徴1－8の場合は、酵母が凝集することなく分散して増殖傾向が続いていることが観察された。

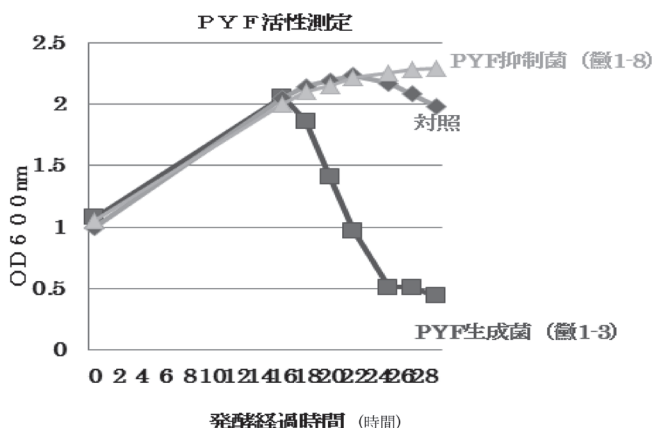


図3. 発酵工程中におけるPYF生成・抑制反応

(2) 菌株の同定

PYF因子を生産する黴であると推定した中で、比較的活性の強い黴1-3、1-6を選んで同定を試みた。黴1-3はDNAの抽出が困難であることから、Mag Extractor—Plant Genome—(TOYOBO)を、また黴1-6の場合は通常使用されるPrepman Ultra(Applied Biosystems)を使用した。PCR及びシーケンスには2節の方法で述べた手法に従って実施した。

黴1-3の塩基配列を以下に示す。

```
CCGNGTGC GTGCCAGGT CAGTCTTAGAACATGCATTATATCGCATGACTGCCATGACCGTAACGCGTTCTCGGTCCAGGCTGGCCGCATTGCACCCCT
GGCTATAAGGTACCCGAGAGGGTACTACATTCCAGGGGCCTTTGAACCGGCCGCCAAACCGACGCTGGCCCGCCACGGGGAAGTACACGGGCACGAAT
GCCGGCTGAACCCCGCGGGCGAGTCTGGTCGCAAGCGCTTCCCTTTCAACAATTTACGTGCTGTTAACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTTGA
TCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCCGGCCAGTATTTAGCTTTAGATGAAATTTACACCCATTTAGAGCTGCATTCCCAACAACCTCGACTCGTCGA
AGGAGCTTTACACGGGCACGGACACCCGCCAAGACGGGATTCTACCCCTCTGTGACGGCCGTTCCAGGGCATTAGACGGGGCCGCACCCAAAGCA
TCCTCTGCAAATTACAATGCGGACTCCGAAGGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGATGCATTCCCGGTTGGTTTCT
TTTCTCCGCTTATTAATGGCCAA
```

同様に黴1-6

```
GCGGCAGCAGGCGAGCCTCTTACCACACCCTATCTACGTCTCGATTATGTCAAGACTAAATGCGCGGACCTCAGTCCAGGCTGGTGGTATGTGCTCTCC
CTATAAGGCTCCCGAAGAGAGGTACGTGACAGAGACCTTTATCCACCGCCAACTGATGCTGGCTGCGTCAGAGAAGTGCACCGGGCACAAAGG
CCCGGCTGAGCAACTGAAGCAAGTCTGGCTGCAAGCGCTTCCCTTTCAACAATTTACGTGCTGTTTACTCTCTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTTGA
ATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCTGGCCAGTATTTAGCTTTAGAAGAAATTTACCTCCATTTAGAGCTGCATTCCCAACAACCTCGACTCGTCG
AAGGGGCTTTACACGGCAATAGCTAGCGACCAGTACGGGATTCTACCCCTCTGTGACGTCTGTTTCCAAGGAATTGGACCGCTGCCAAAGCCAAAGCG
CCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAGAGCCAGATTTCAAATATGAGCTGTCTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCGCTGTTGGTTTC
TTTTTCTCCGCTTATGAAAAGNNNN
```

これらの情報をもとに同定を行った結果、黴 1 - 3 は *Aspergillus* 属の黴で、*Aspergillus thubingensis* と推定された。

また、黴 1 - 6 は *Pyrenophora* 属またはその近縁種であり、*Pyrenophora tritici-repentis* と推定された。

同様に、PYF抑制株の中から活性の強い黴 1 - 8 及び G 3 - 1 株について同定を行った結果、各々 *Rizopus oryzae*、*Aspergillus clavatus* であると推定された。

(3) PYF合成微生物 黴 1 - 3 による酵母凝集因子の性質

PYF因子生成能試験法に準じ培養した培養上清を、オートクレーブ殺菌し不溶化物を遠心除去後、エタノール60%飽和として沈殿物を集めた。沈殿物を50mM Tris緩衝液 (pH8.5、50mM) に溶解後、DEAEカラムにかけ同緩衝液の0~1MNaClのリニアグラジエント法により分画を行った。その結果、PYF麦芽からのPYF因子の精製の時と同様、塩濃度0.3~0.4Mの間に溶出されてくる糖質成分を含む画分に酵母凝集活性が確認できた。このことから黴 1 - 3 の酵母凝集成分はPYF麦芽からの酸性多糖成分PYF因子²⁾と同様の組成を持つものと判断した。

(4) PYF抑制菌 黴 1 - 8 によるPYF活性の抑制反応

黴 1 - 8 が、PYFを抑制している傾向が確認されたが、図3に示す様に対照に比べてPYF活性を抑制しているだけでなく、更に酵母増殖による濁度の上昇が観察されたことから、その詳細について反応経過を追って調査した。

その結果、表2に示す様に培養上清中にグルコース含量の増加が観察された。更に、反応上清からエタノール沈殿法を使ってPYF因子を分別した結果、PYF因子は含有量の変化なく存在していることが確認できた。これらのことから、PYF抑制の現象は、PYF因子に黴 1 - 8 株が直接アタックしているわけではなく、本株がグルコアミラーゼを菌体外に多量分泌することで発酵試験液中にグルコースを生成することにより、酵母の増殖が活性化されて酵母凝集に勝る結果、抑制しているが如くの現象に至ったものであることを示唆している。この確認のため、発酵試験中にグルコースを補糖した結果、PYF因子の有無に関係なく酵母の活発な増殖が起こり凝集現象が観察されないことが判った。

表2. 培養液上清の糖組成分析値		
mg/ml	対照	黴1-8
フルクトース	4.17	5.58
グルコース	9.09	20.34
マルトース	30.84	30.81
マルトトリオース	9.66	2.49
マルトテトラオース	3.51	1.95
マルトペンタオース	1.02	2.25
マルトヘキサオース	0.69	1.59
デキストリン	12.78	6.24
全糖	71.76	71.25

3. PYF生成・抑制酵素類による反応試験

(1) PYF生成菌の菌体外粗酵素液によるPYF生成反応

PYF生成菌の一つである黴1-3を、無菌大麦を培地とした振盪培養により得られる培養液を濾過・遠心分離(8,000rpm×10min)を行い、その上清に冷エタノールを60%飽和度となるように加え不溶化する沈殿物を遠沈して集め、少量の蒸留水に溶かしたものを粗酵素液とした。

PYF生成反応系の微生物接種に替えてこの粗酵素液を添加し、菌のスクリーニング時と同様の条件で反応させ、継時的に一定量をサンプリング、エタノール沈殿として反応液に含まれるPYF因子の量を発酵試験法で確認した。図4に発酵試験の結果を示す。無添加の対照に比べ明らかに接触反応によりPYF活性が確認できてはいるが、反応経過との定量性は認められていない。今後は、更に高生産能を示す菌或いは条件設定を行い、至適条件下でのPYF生成酵素類について精製を進める予定である。

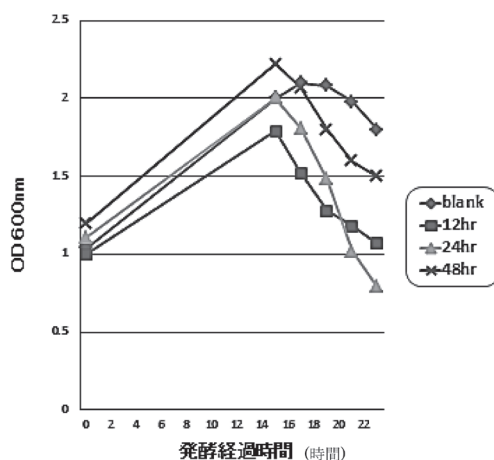


図4. 黴1-3粗酵素液によるPYF生成活性

(2) PYF抑制菌G3-1株粗酵素液によるPYF分解反応

黴G3-1株をPYF麦芽を基質として得られる培養液について、CM-Sephadex C-25によるバッチワイズ法で濃縮した粗酵素液画分を使って、PYF麦汁液(3倍抽出液)を基質として24時間25℃のもとで反応を行った。黴1-8で観察されたグルコアミラーゼ等の作用を加熱処理(105℃、10分)により失活させた後、エタノールを2倍量添加してPYF成分を遠沈して集め、減圧乾燥後0.5~1mlの熱水で溶解、その300~400 μ lを発酵試験に供してPYFの状況を調査した。

発酵試験結果を図5に示す。尚、酵素ブランク(BI)としては、粗酵素液画分を予め100℃10分の加熱処理を行ったものを発酵試験に供したものである。

図5に示される如く、G3-1株の菌体外粗酵素液中にはPYF因子に作用して凝集性

を失わせる作用をもつ酵素が含まれていることを覗かせている。

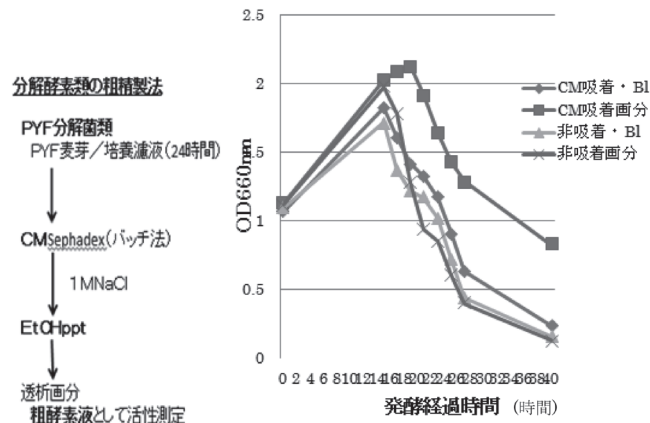


図5. G3-1株培養液のCM抽出粗酵素液のPYF分解活性

(3) PYF因子分解酵素の精製

a. CM Sephadex C-25 カラムクロマトグラフィー

(2) に於いて得られる粗酵素液をCMカラムクロマト (pH5.6、25mM酢酸緩衝液) により分画を行った。図6に示す様に、NaCl濃度0.7 M付近で溶出される画分 (フラクションNo.95~100) にPYF因子分解酵素が溶出されてくることが判った。活性状況を図7に示す。

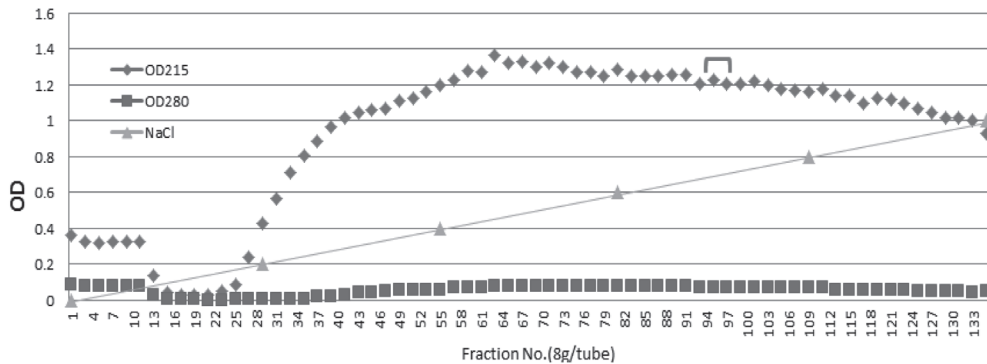


図6. CM-Sephadex C-25 Column Chromatography

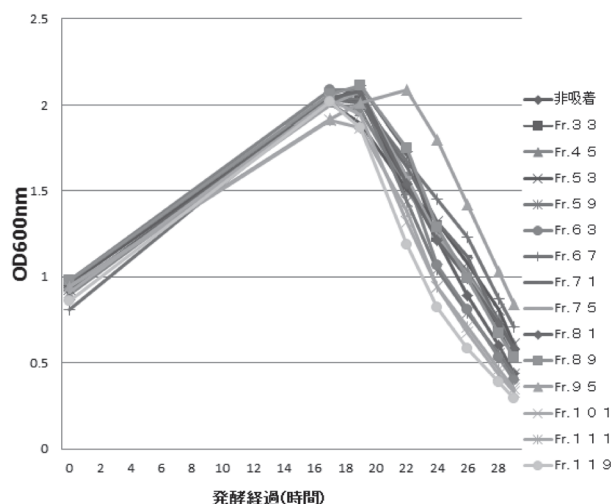


図7. PYF分解酵素各画分の分解活性

b. Hydroxyapatite カラムクロマトグラフィー

CMカラムクロマトにより得られた活性画分を透析後、pH6.8、25mM リン酸緩衝液にて平衡化したハイドロキシアパタイトカラムにかけ、硫酸アンモニウム0～1 Mの濃度勾配の条件で溶出させた。図8にその際の溶出パターンと、図9にPYF分解活性測定結果を示す。フラクションNo.23～29の画分にPYF分解活性が確認できたが、未だ精製までに至っていない。

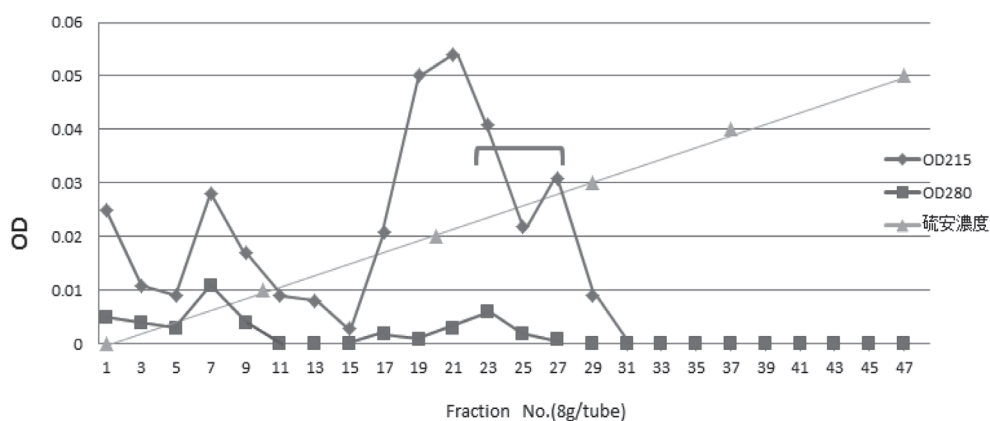


図8. Hydroxyapatiteカラムクロマトグラフィー

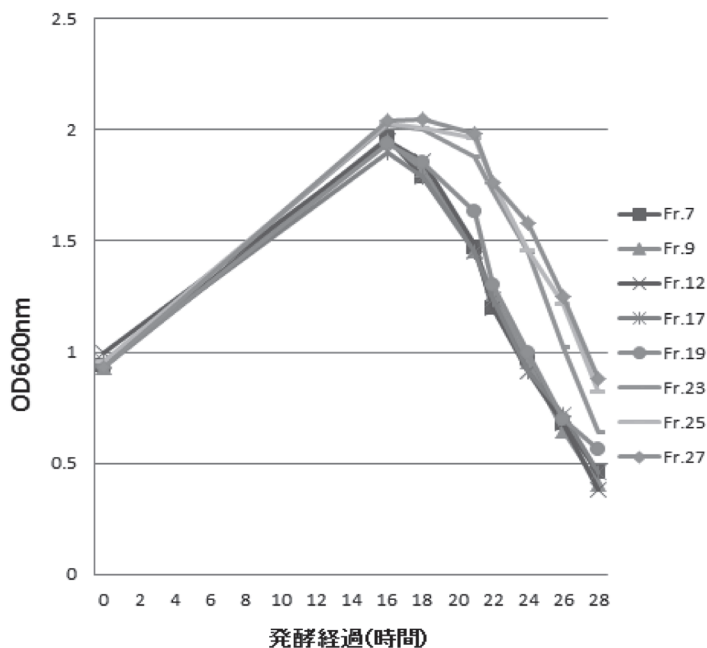


図9. PYF分解酵素各画分の分解活性

更に精製を進め、本酵素の性質からPYFのコア構造の解明へと進める予定である。

考 察

PYF現象を全体的に解明することを目的に検討を進めている。本報では、その中でPYF現象を引き起こす微生物或いは抑制を示す微生物類について、これまで検討してきた結果について完結には至っていないが、纏めることにした。まず、PYF因子の生合成を行う微生物については、可能性として最短距離にあるPYF麦芽から単離した微生物中2種の菌が比較的に強いPYF合成能を有していることが明らかとなった。これら2株については26SrDNAの塩基配列の解析より、菌1-3は*Aspergillus thubingensis*、菌1-6を*Pyrenophora tritici-repentis*として同定した。菌1-3は、その近縁種として*A. ochraceus*があり、カビ毒の代表的なものであるオクラトキシンとの関係に於いて、安全性の面からも興味深い存在である。また、菌1-6についても検索した結果、barley net-spot blotch disease agentで大麦網斑病を発症させる原因菌と近縁種であることが判っている。いずれも病原性を有する菌である。

ところで、このような微生物凝集機能を持つ高分子の多糖類としては、一般的に病原性の微生物が栄養源となる基質に付着し、環境変化や外敵から内部の菌叢を守るバリアーや運搬経路としての機能確保などに関連した細胞外多糖 (EPS: Extracellular Polysaccharide) いわゆるバイオフィルムを形成することが知られている⁸⁻¹³⁾。

これらの共通点、即ちPYF因子が高分子酸性多糖であること、これを生産する微生物がい

ずれも病原性に関連する黴類であること、以上を考え合わせると、バイオフィルムとの関連性が極めて高いものであると推察される。

PYF生合成系に関しては、これらの点からも検討を進めることが必要である。

さて、PYF抑制面については、この度PYF麦芽を基質としたスクリーニング法を立ち上げ検討してきたが、抑制菌として選別した黴1－8 *Rizopus oryzae*の場合は予想だになかったGlucoamylaseによるグルコースの生成が酵母の増殖を活性化することで、PYF凝集作用をあたかも抑制したが如くの影響を及ぼすことが判った。醸造界では以前より、発酵不順が続く状況や発酵酵母の状態が芳しくない状況下では、発酵工程の中期以降に新たに麦汁を添加する方法（クロイゼン）が採られてきた経緯があり、まさにこの現象を今回理論的にも証明することになったものと考えている。但し、このような酵母増殖能を活性化することでPYF現象による問題点を解決できるものであるならば、本方法も確かな対処の一方法として位置付ける意味はあると考えている。

今回、PYF因子に直接作用して酵母凝集作用を抑制している株G3－1 *Aspergillus clabatus*を得ることができた。まだ、精製途中であるため完全には確定はできていないが、黴1－8で検出された観察されたGlucoamylaseの作用による影響（生成物グルコースのエタノール沈殿による反応系からの除去、Glucoamylaseの発酵試験中におけるグルコース生成反応を抑制するための加熱失活処理）を除いた試験系での抑制作用であることは確かであり、PYF因子の分解はもとよりPYFの凝集活性コア構造の解析にも活用できるものと期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、共同研究のかたちで多面のご支援賜りましたアサヒビール株式会社にお礼申し上げます。また、特別研究として本研究課題に対し共に研究を進めてまいりましたが、表示の都合上申し訳ありませんが割愛させていただきました。共同研究者は本報文表記メンバーの他、ゼミで本研究を担当頂いた高尾早紀氏、戸亀郁佳氏、松尾侑紀氏、宮崎智子氏、山田淳美氏、山手優氏の皆さまに深謝申し上げます。

参考文献

1. Koizumi H, Structural features of barley malt polysaccharides inducing premature yeast flocculation, J Am Soc Brew Chem, 67(3), 129-134(2009)
2. Yamashita H, Shimoda Y, Shuto N, Takato M, Bull.K. W.U.,51(1),39-50(2014)
3. Axcell B, Van Nierop S, Vundla W, Malt induced premature yeast flocculation, Tech Q Master Brew Assoc Am, 37(4), 501-504(2000)
4. Herrera VE, Axcell BC, Incuption of premature yeast flocculation by a

- polysaccharide fraction isolated from malt husk, J Inst Brew, 97, 359-366(1991)
5. Jin YL, Ritecy LL, Speers RA, Dolphin PJ, Effect of cell surface hydrophobicity charge and zymolection density on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* , J Am Soc Brew Chem, 59, 1-9(2001)
 6. Nakamura Y, The practical hints for brewing from premature yeast flocculation malt, Oral presentation O48 at the World Brewing Congress, Honolulu(2008)
 7. Van Nierop SNE, Cameron-Clarke A, Axcell BC, Enzymatic generation of factors from malt responsible for premature yeast flocculation, J Am Soc Brew Chem, 62, 108-116(2004)
 8. Akiyama H, Ueda M, Kanzaki H, Tada J, Arata J, Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from impetigo and suruncle role of fibrinogen and fibrin, J Dermatol. Sci., 16, 2-10(1997)
 9. Karamanos N. K., Syrokou A., Panagiotopoulou H. S., Anastassiou E. D., Dimitracopoulos G., The major 20-kDa polysaccharide of *Staphylococcus epidermidis* extracellular slime and its antibodies as powerful agents for detecting antibodies in blood serum and differentiating among slime-positive and negative *S. epidermidis* and other *staphyrococci* species., Arch. Biochem. Biophys., 342, 389-395 (1997)
 10. Simmons P. A., Tomlinson A., Seal D. V., The role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the attachment of *Acanthamoeba* to four types of hydrogel contact lens materials. Optom. Vision Sci., 75, 860-866(1998)
 11. Alam M., Miyoshi S. I., Tomochika K. I., Shinoda S., Purification and characterization of novel hemagglutinins from *Vibrio mimicus*: A 39-kilodalton major outer membrane protein and lipopolysaccharide. Infect. Immunol., 64, 4035-4041(1996)
 12. Elder M. J., Matheson M., Stapleton F., Dart-JKG, Biofilm formation in infectious crystalline keratopathy due to *Candida albicans*. Cornea, 15, 301-304(1996)
 13. Kondo T. Yamamoto D., Yokota A. Suzuki A. Nagasawa H. Sakuda S. Gordonan, an Acidic Polysaccharide with Cell aggregation-Inducing Activity in Insect BM-N4 Cells, Produced by *Godonia sp.* Biosci. Biotechnol. Biochem., 64(11), 2388-2394(2000)

Research on the Premature Yeast Flocculation(PYF) –Investigation of the microorganisms that biosynthesize PYF factors, and the microorganisms that inhibit PYF–

Hiroshi YAMASHITA, Yuki TAZOE, Asuka HARA, Yuka FURUSYO,
Shiori MUROI, Keisuke OKADA*, Makoto WAKAURA**

Department of Nutrition, Faculty of Home Economics,
Kyushu Women's University

1-1 Jiyugaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu-shi, 807-8586, Japan

*ASAHI BREWERIES,LTD.,Department of Brewing Technology Research Laboratories
for Alcohol Beverages

1-21 Midori, 1-Chome,Moriya-shi, Ibaraki, 302-0106, Japan

**ASAHI BEER MALT Co.,LTD, Quality Assurance Department
2311 Mikami Yasu-shi, Shiga, 520-2323, Japan

Abstract

This study reports the development of screening methods for the identification of microorganisms that cause the premature yeast flocculation (PYF) phenomenon, and microorganisms that break down the PYF factors. Four strains with PYF-factor biosynthetic activity and three strains capable of PYF factor inhibition were successfully screened.

Two strains exhibiting strong PYF-biosynthetic activity were identified among the microorganisms screened, and were projected as fungus 1-3: *Aspergillus thubingensis* and fungus 1-6: *Pyrenophora tritici-repentis*. The yeast flocculation factors produced by fungal strain 1-3 were verified as almost identical to the macromolecular acidic polysaccharides generated as the flocculation factor from PYF malt.

With respect to PYF inhibition factors, two strains exhibiting strong PYF inhibitory activity were recognized among the screened strains as fungus 1-8: *Rizopus oryzae* and fungus G3-1: *Aspergillus clabatus*. It was discovered that yeast growth occurred more frequently than PYF in these strains. The inhibitory effect of fungus 1-8 was apparently due to glucose, which was produced by extracellular glucoamylase acting on starch during the fermentation process and blocked the flocculation. In the G3-1 strains on the other hand, extracellular enzymes produced in cultures appeared to act on the PYF factors and inhibited yeast flocculation. These assumptions will be verified by further purification and analysis to clarify the enzyme properties in the future; these enzymes are expected to be utilized to explain the flocculation-core structure of the PYF factors.