

報 文

島根県における新規ビール酵母の探索と醸造特性評価

Isolation and Characterization of Novel Beer Yeast Strains from Shimane Prefecture

大渡 康夫*・松尾 安浩**

本研究は、島根県内の自然環境から新規ビール酵母を探索し、島根県オリジナルのビール製品開発を目的として実施した。島根県内で採取された酵母 467 株から、マルトース資化性や発酵力を指標に段階的選抜を行い、株番号 1858 および 1860 の *Saccharomyces cerevisiae* を有望株として特定した。両株は高い発酵力を示し、果実様香を有するエステル（酢酸イソアミル、カプロン酸エチルなど）や、燻製様香の 4-ビニルグアイアコールを特徴として生成した。特に 1860 は発酵後に強く凝集し、発酵液の澄清化を容易にする可能性があった。小規模醸造試験では、両株は市販酵母に匹敵する高いアルコール生成量と外観発酵度を有し、官能評価においても香味バランスが良好であった。これらの結果から、新たに開発された島根県オリジナルビール酵母の発酵特性と香気形成能が明らかとなり、地域酵母資源としての有用性が示された。

1. はじめに

近年、国内クラフトビール市場では、地域性や独自性を前面に打ち出した製品開発が盛んになっており、若い消費者の支持による継続的な成長を示している。

ビールは麦芽、ホップ、酵母、水といった原料からなる。特に、ビール醸造において酵母は、アルコール発酵を担うだけでなく、発酵副産物として生成される多様な香気成分の形成や、発酵後の自身の凝集性・沈降性などの物理特性も様々であることから、最終製品の品質や個性を左右する重要な要素である。その中で地域由来の新規酵母の探索・開発は、製品差別化やブランド価値向上を実現する有効な手段として注目されている¹⁾。既存の商業酵母では得られない新たな香気プロファイルや発酵特性を持つ酵母は、消費者に新鮮な味わい体験を提供するとともに、地域資源の有効活用にもつながる。

ビール酵母に関する先行研究は、商業酵母の改良に関する研究と、自然界からの新規酵母分離・評価に関する研究の二つに大別される。前者では遺伝子改変や突然変異誘発により発酵速度や香気生成能を改善する試みが行われ²⁾、後者では花、果実、樹皮、穀類、発酵食品など多様な環境から分離された酵母がビールやワイン等に応用されている³⁾。国内では北海道や三重県など、地域固有の自然環境を背景とした酵母探索事例があり、地域特有の香味特性を持つビール開発が報告されている^{4,5)}。しかし、島根県を対象としたビール酵母探索や、その醸造特性評価に関する事例はほとんど存在せず、地域産クラフトビールの差別化に資する酵母資源は未開拓である。

本研究は、島根県の特定の自然環境や農産資源からビール醸造に適した新規酵母を分離・同定し、その遺伝学的特性および発酵能、香気生成能、凝集性や沈降性などの物理的特性を含む醸造特性を詳細に評価することで、島根県オリジナルのビール酵母を開発することを目的とする。これにより、地域発の独自性の高いビール製品を創出し、島根県のクラフトビール産業の発展と地域ブランド力の向上を目指す。

2. 試料および方法

2.1 酵母の分離とスクリーニング

酵母の選抜は、効率的にビール酵母として有用な株を取得するため、①自然界からの分離（一次選抜）、②マルトース資化性の確認（二次選抜）、③ビール醸造適性の評価（三次選抜）の3段階で実施した。

一次選抜は、島根大学が保有する酵母ライブラリーより分離を行った。このライブラリーには、島根県内各地から採取した花、果実、葉、樹液、土、水など自然界から分離された酵母が含まれる（採取時期・場所は省略）。酵母の分離培地は、YPD 培地（酵母エキス 1%、ペプトン 2%、グルコース 2%、クロラムフェニコール 0.01%）を用いた。

二次選抜は、ビール酵母としての適性を評価するため、マルトースを糖源とする ME 培地（麦芽エキス 10%）に分離酵母を接種し、20℃で6日間静置培養した。その後、アルコール発酵による炭酸ガスの発生量によりマルトース資化性株を選抜した。

三次選抜は、ホップを含むモルトエキス（Morgan's Australian Lager）で調製した麦汁を用いた。10%モルトエキスを含む麦汁をオートクレーブで115℃、10分間加熱殺菌した。評価する酵母を10mLの麦汁に1白金耳ずつ接

* 食品技術科, ** 島根大学生物資源科学部

種し、30℃で2日間振盪培養した。遠心分離により、培養した酵母を集菌し、300mLの麦汁に添加して、20℃で7日間静置して発酵試験を行った。発酵中は、経時的に重量変化を計測して発酵経過を観察した。

2.2 分子生物学的同定

選抜した株の酵母菌種の同定を以下のとおり行った。菌体からゲノムDNAを抽出し、DNAシーケンサー法で28S rDNA D1/D2領域(約650bp)の塩基配列解析を行った。決定した塩基配列は、BLASTによりシーケンサーデータベースに対して相同性検索を実施して酵母菌種を同定した。シーケンシングはBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) および Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

2.3 小規模醸造試験

選抜した株の醸造特性を評価するために、上面発酵(エール)および下面発酵(ラガー)の2つのタイプで小規模醸造試験(仕込み量10L)を実施した。原料には、クリスマス・ホリディエールE05-F10(アドバンストブルーイング)およびゴールデンラガーA09-F10(アドバンストブルーイング)の各醸造キットに付属の原料(麦芽、ホップ、ハーブ、スパイスなど)を使用した。麦汁の調製は、キットに付属のマニュアルに従い行った。

試験には、選抜株とは別に、上面発酵酵母S-04(Fermentis)および下面発酵酵母S-23(Fermentis)を対照として使用した。評価する各酵母を上面発酵は100mL、下面発酵は200mLの10%モルトエキス培地で30℃、一晩振盪培養した。遠心分離により、培養した酵母を集菌し、調製した麦汁2.5Lに添加した。温度制御付きのインキュベーターMIR-153(SANYO)に静置して、上面発酵は13日間、下面発酵は16日間発酵させた。上面発酵の発酵温度は22℃で開始し、2日目には20℃に下げた。7日目以降は1日1℃ずつ下げていき、16℃に達した後は13日目までその温度を維持した。下面発酵は開始から14日目まで12℃で維持し、15日目には10℃に、16日目には5℃に下げた。発酵中は、経時的に重量変化を計測して発酵経過を観察した。

発酵終了後の若ビールに炭酸ガスを溶け込ませるため、プライミングシュガー(グラニュー糖)を若ビール1Lあたり、上面発酵は3.5g、下面発酵は5.5g添加した。瓶詰め後、打栓して瓶内発酵(カーボネーション)を実施した。上面発酵は16℃で12日間保存した後、冷蔵に移した。一方、下面発酵は12℃で瓶内発酵を開始し、発酵途中で炭酸ガスの溶け具合を確認したところ不十分だったため、12日目から16℃に温度を上げて合計25日間保存した後、冷蔵に移した。

2.4 ビール分析

発酵終了後、発酵液は遠心分離し、No.5Aのろ紙を用い、自然ろ過して脱気した。BCOJビール分析法⁶⁾を一部改変

表1 GCMS測定条件

オートサンプラー	TriPlus RSH
SPMEファイバー	50/30μm DVB/CAR/PDMS
注入モード	Splitless, 2min
注入口温度	250℃
キャリアガス	He, 200kPa 定圧
カラム	TG-Wax MS (60m × 0.25mmI.D. × 0.25μm df)
オープン	40℃ (3min) → 5℃ /min → 250℃ (5min hold)
トランスファー	250℃
イオン源	EI, 200℃
スキャン範囲	33 - 300 amu
スキャン速度	0.2 秒 /scan

して、アルコール、pH、比重、外観エキス、外観発酵度、糖組成、香气成分を測定した。アルコールはガスクロマトグラフGC-2030(島津製作所)あるいは酒類用振動式密度計DA-155(京都電子工業)、pHは卓上型pHメーターF-74(HORIBA)、比重は酒類用振動式密度計DA-155、糖組成は高速液体クロマトグラフNexera XR(島津製作所)、香气成分はガスクロマトグラフ質量分析計GCMS ISQ-OD(Thermo Fisher Scientific)を用いた。GCMS測定条件を表1に示す。サンプル1mLをヘッドスペースバイアルにとり、60℃、20分間SPMEファイバーで揮発性成分を吸着し、GCMS測定を行った。外観エキスおよび外観発酵度は比重の測定値から算出した。

$$\text{外観エキス (wt\%)} = -460.234 + 662.649 \times (\text{比重}) - 202.414 \times (\text{比重})^2$$

$$\text{外観発酵度 (\%)} = \frac{\{\text{原エキス (wt\%)} - \text{外観エキス分 (wt\%)}\}}{\text{原エキス (wt\%)}} \times 100$$

2.5 官能評価

官能評価は、パネラー4名で行った。総合評価、香り、味の3つを評価項目とし、「すばらしい ← (1)・(2)・(3)・(4)・(5) → 難点あり」の5段階で評価した。評価方法は、ビールのタイプごとに実施し、評価試料には3桁の乱数番号を付与したブラインドテスト形式で行った。

3. 結果

3.1 酵母の分離と同定結果

酵母ライブラリーに含まれる合計467株の酵母の中から、ビール醸造に適する酵母の選抜を行いME培地中でアルコール発酵能(炭酸ガス発生能)が確認された60株を一次選抜株とした。このうち、炭酸ガス発生量が高く、アルコール発酵力が強いと推定された39株を二次選抜株とした。分子生物学的同定の結果、食経験の報告がある菌種として、さらに18株を三次選抜に供した。これら選抜株の菌種の内訳は、*Saccharomyces cerevisiae* (11株)、*Schizosaccharomyces japonicus* (3株)、*Saccharomyces paradoxus* (2

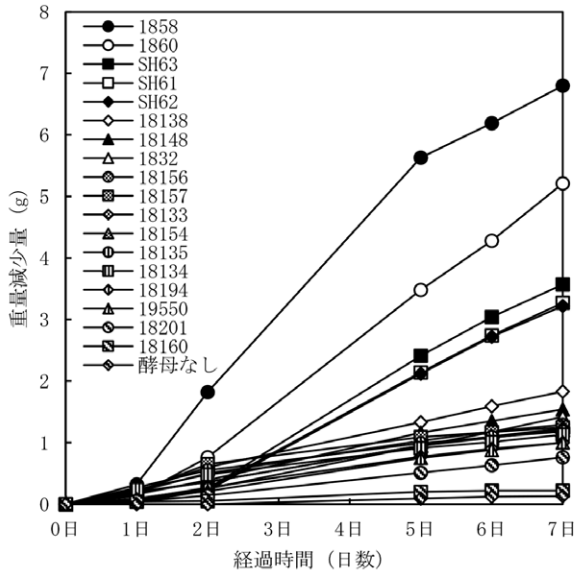


図1 発酵経過

表2 一般成分値

酵母名	菌種	アルコール (vol%)	比重 (20/20)	外観エキス (wt%)	外観発酵度 (%)
1858	Sc	3.4	1.0041	1.1	85.0
1860	Sc	3.1	1.0062	1.6	77.4
SH63	Sj	1.7	1.0147	3.7	47.0
SH62	Sj	1.6	1.0154	3.9	44.3
SH61	Sj	1.6	1.0167	4.3	39.8
18138	Sc	1.0	1.0212	5.4	23.8
1832	Lt	0.8	1.0226	5.7	19.1
18148	Sc	0.7	1.0231	5.9	17.1
18156	Sc	0.6	1.0237	6.0	15.0
18135	Sc	0.6	1.0237	6.0	15.1
18157	Sc	0.6	1.0238	6.0	14.9
18133	Sc	0.6	1.0232	5.9	16.9
18134	Td	0.6	1.0238	6.0	14.8
18154	Sc	0.6	1.0239	6.0	14.5
19550	Sp	0.5	1.0247	6.2	11.6
18194	Sc	0.5	1.0239	6.1	14.3
18201	Sc	0.4	1.0261	6.6	6.6
18160	Sp	0.1	1.0281	7.1	0.0
酵母なし	-	0.1	1.0280	7.1	0.0

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sj: *Schizosaccharomyces japonicus*, Sp: *Saccharomyces paradoxus*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Td: *Torulaspora delbrueckii*
 外観発酵度は、麦汁の原エキス (7.1%) から算出した。

株), *Lachancea thermotolerans* (1株), *Torulaspora delbrueckii* (1株) であった。

選抜株のビール醸造適性を評価するため、ホップを含むモルトエキスで調製した麦汁を用いて発酵試験を行った。経時的な重量変化 (発酵経過) を図1に、発酵終了後の一般成分値 (アルコール, 比重, 外観エキス分, 外観発酵度) を表2に示した。発酵中の重量変化は、アルコール発酵により発生した炭酸ガスによる重量減少量を示しており、酵

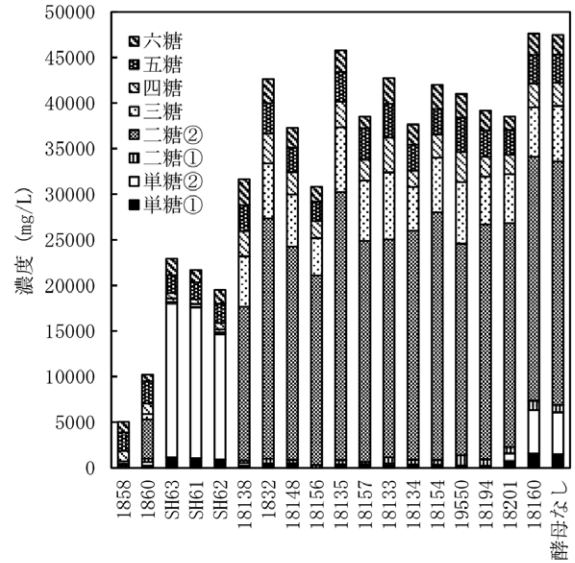


図2 糖組成

単糖①：フルクトース, 単糖②：グルコース,
 二糖①：スクロース, 二糖②：マルトース,
 三糖：マルトトリオース, 四糖：マルトテトラオース,
 五糖：マルトペンタオース, 六糖：マルトヘキサオース

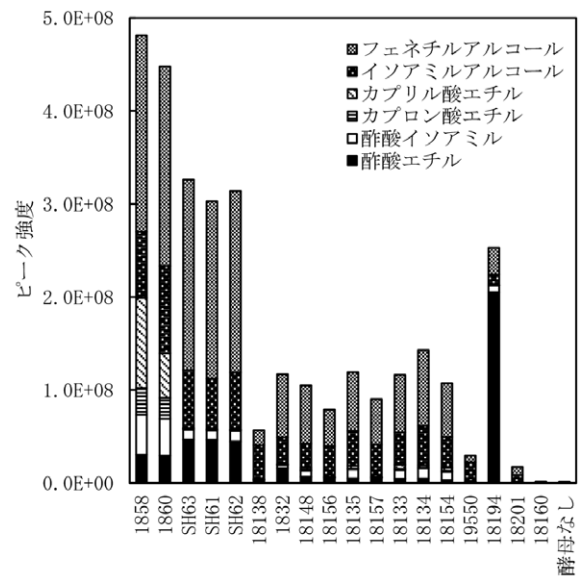


図3 香気成分

縦軸は主要6成分のピーク強度の総和を表す。

母の発酵力が強いほどその減少量は大きくなる。また、比重から算出される外観エキス分および外観発酵度は、アルコールと共にアルコール発酵の程度を示す値であり、製造工程において重要な管理指標となる。

試験の結果、発酵中の重量減少量が大きく、アルコールや外観発酵度が高い有望な候補株2つ (1858 および 1860) を選抜した。発酵液中の糖組成を図2に、香気成分を図3に示した。候補株の1858と1860は、ともに他の株と比べ

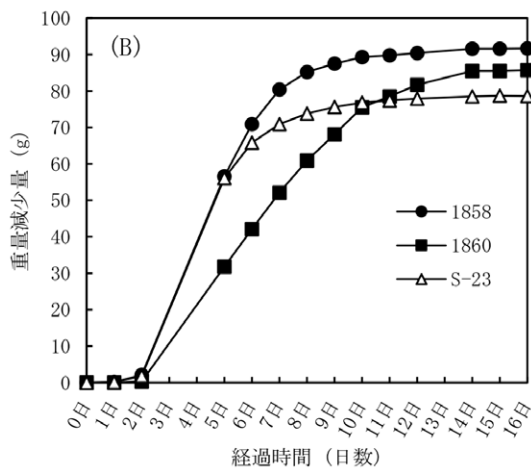
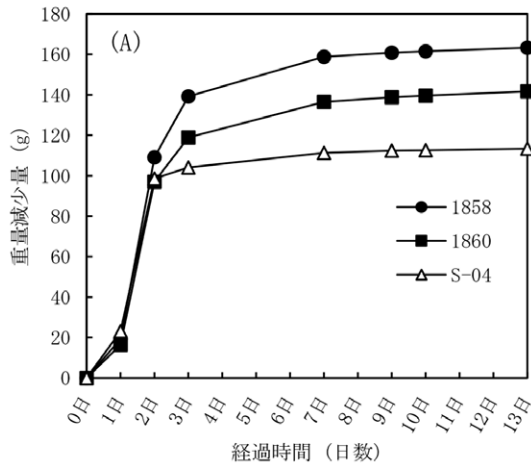


図4 発酵経過

(A) 上面発酵, (B) 下面発酵

て糖類の資化能力が非常に高かった。単糖から三糖までの発酵性糖だけでなく、四糖から六糖以上の非発酵性糖も資化する特徴がみられた。さらに、GCMS分析によりビールの主要な香り成分を分析したところ、1858と1860は他の株と比べて多くの香り成分を生成していた。特に、酢酸イソアミルやカプロン酸エチル、カプリル酸エチルなど果実様の香りを有するエステル成分も含まれていた。菌種の同定結果、1858および1860は、ともに *Saccharomyces cerevisiae* であった。この菌種は、ビール、日本酒、ワインなど酒造用として一般的に用いられる酵母である。

以上の結果より、1858および1860は、鳥根県オリジナルのビール酵母として有望であると考えられた。

3.2 小規模醸造試験における発酵特性

図4に、各酵母株（および対照酵母）の経時的な重量変化から計測した発酵経過を示した。上面発酵では、1858および1860は、対照酵母（S-04）に比べて重量減少量が大きく、強い発酵力を示した。下面発酵では、1860の発酵開始時の立ち上がりは遅かったが、徐々に重量減少量は増加し、発酵終了時には1858とともに、対照酵母（S-23）に比べて強い発酵力を示した。

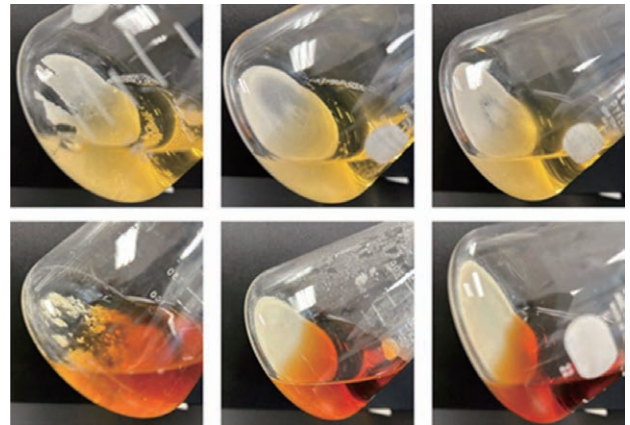


図5 1860株の凝集性

(上段) YES 培地, (下段) YPD 培地
(左) 20℃, (中央) 25℃, (右) 30℃

興味深いことに、上面発酵の発酵終了後、1860で醸造したビールでは、酵母が凝集し、発酵容器の底に沈殿物が密着する現象が確認された。しかも、この沈殿物は他の酵母とは異なり、発酵容器を傾けても崩れないほど強い塊を形成していた。そのため、1860で発酵させた若ビールを瓶に移す際、酵母の混入が少なく、クリアなビールを回収することができた。図5に示すとおり、2種類の培地（YES, YPD）を用いて再現した実験においても、1860は高い凝集性を示し、培養温度が高いほど培養容器の底に強く密着していた。

3.3 醸造ビールの化学成分分析

表3に、発酵終了後の一般成分値（アルコール、pH、比重、外観エキス分、外観発酵度）の結果を示した。上面発酵では、1858および1860は、対照酵母（S-04）に比べてアルコールや外観発酵度が高く強い発酵力を示した。下面発酵においても、1858および1860は、対照酵母（S-23）に比べて発酵力が高かった。上面発酵と下面発酵の2種類のビールタイプにおいても、外観発酵度が80%以上と高く、市販の酵母に対しても遜色ない高い発酵力を示した。

図6に、ビールの香り成分をGCMS測定した結果を、図7に、検出された全ての香り成分の網羅解析による主成分分析の結果を示した。分析の結果、上面発酵および下面発酵において、1858と1860は定性的に検出される香り成分の傾向が同様であった。市販酵母に比べて、酢酸イソアミル（バナナ様香）、カプロン酸エチル（リンゴ様香）、カプリル酸エチル（アプリコット様香）など、果実様の香りの特徴を持つエステル成分のピーク強度が高かった。

その他に、スパイシーな特異臭として4-ビニルグアイアコール（クローブ様香、燻製様香）が比較的高いピーク強度で検出された。4-VGと略記されるこの化合物は、ワイン酵母やビール酵母には生成活性が見られるが、焼酎酵母や清酒酵母にはこの活性がないことが報告されている⁷⁾。そのため、清酒ではオフフレーバーの一種として捉えられ

表3 一般成分値

タイプ/ 酵母	アルコール (vol%)	pH	比重 (20/20)	外観エキス (wt%)	外観発酵度 (%)
上面発酵					
1858	7.4	4.1	1.0094	2.4	84.8
1860	7.5	4.3	1.0087	2.2	85.9
S-04	5.9	4.4	1.0203	5.1	67.4
下面発酵					
1858	5.0	4.3	1.0045	1.2	89.1
1860	4.8	4.3	1.0060	1.5	85.4
S-23	4.3	4.5	1.0100	2.6	75.7

外観発酵度は、上面発酵の麦汁の原エキス（15.8%）、下面発酵の麦汁の原エキス（10.5%）からそれぞれ算出した。

表4 官能評価

タイプ/ 酵母	総合評価	香り	味
上面発酵			
1858	16	14	16
1860	12	11	12
S-04	15	12	16
下面発酵			
1858	11	13	13
1860	12	12	14
S-23	12	11	12

各評価項目はパネラー4名の合計点で示した。

るが、ビールにおいては、ヴァイツェン酵母やベルジャン系酵母(セゾンなど)の特徴香として広く認知されている。

3.4 官能評価

表4に、パネラー4名で簡易的に行った官能評価の結果を示した。有意差は見られなかったものの、1858および1860は、上面発酵と下面発酵のどちらの市販酵母のビールと比べても遜色ないか、あるいは良好な評価結果だった。

上面発酵の評価コメントでは、副原料（ハーブ、スパイス）の影響が強かったためか、香りは市販酵母とほぼ同じ内容だったが、「酸味」、「ガス感」、「あっさり」といった、

口当たりや後味に関するコメントに違いがみられた。これは、1858および1860の高い発酵力、特に糖質化能力の高さがもたらす「あっさり」とした後味と、「酸味」のバランスを示唆していると考えられた。

下面発酵では、「香りが良い」、「バナナ様の香り」、「ガス感」、「飲みごたえあり」といった、好意的なコメントが多かった。これは、香気分析で検出された酢酸イソアミルが「バナナ様の香り」として具体的に認識されていることに対応する。

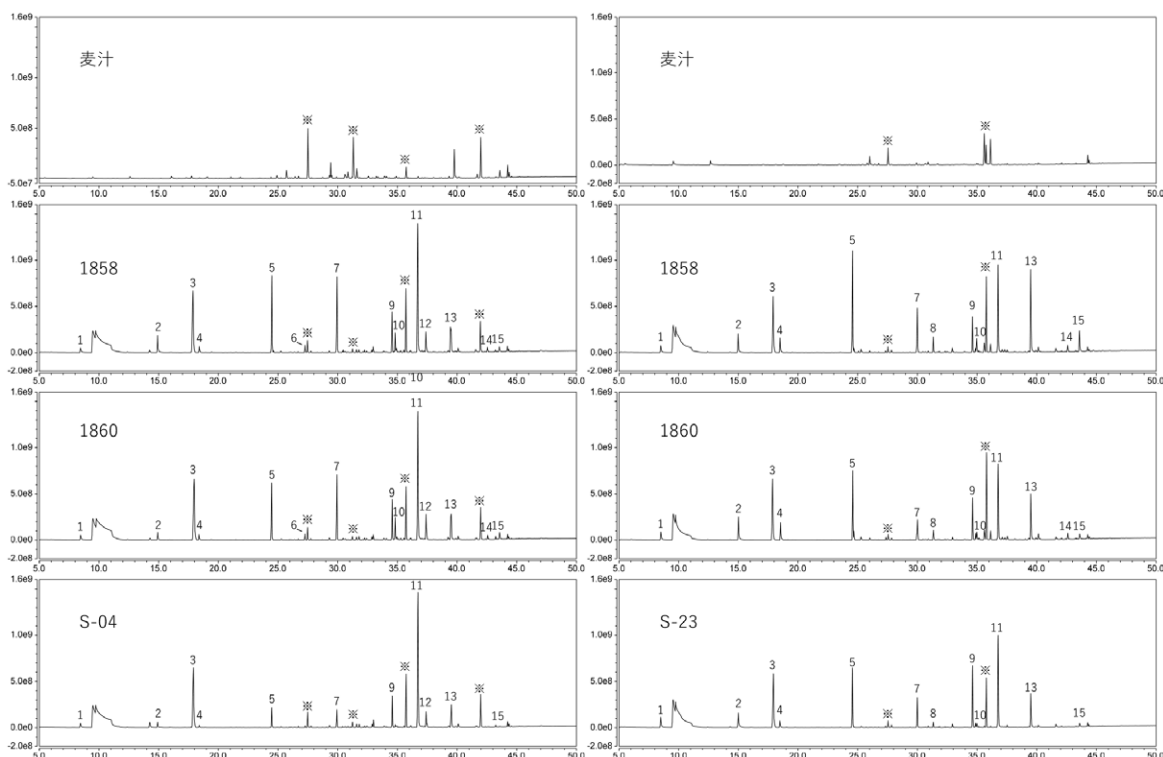


図6 GCMS測定

(左) 上面発酵, (右) 下面発酵

1: 酢酸エチル, 2: 酢酸イソアミル, 3: イソアミルアルコール, 4: カプロン酸エチル, 5: カプリル酸エチル, 6: ノナン酸エチル, 7: カプリン酸エチル, 8: trans-4-デセン酸エチル, 9: 酢酸2-フェニルエチル, 10: カプロン酸, 11: フェネチルアルコール, 12: 酢酸3-フェニルプロピル, 13: カプリル酸, 14: 4-ビニルグアイアコール, 15: カプリン酸, *: 麦汁由来

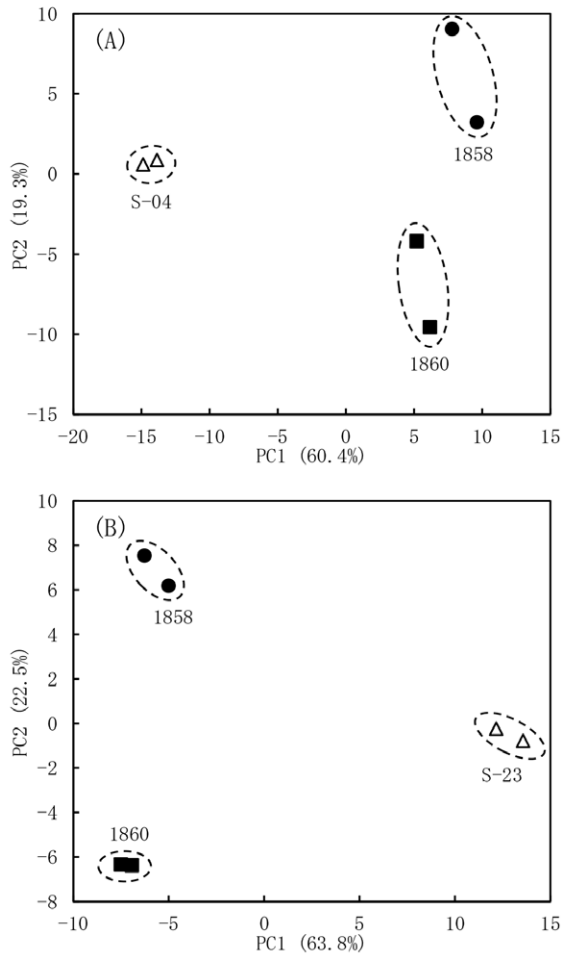


図7 主成分分析

(A) 上面発酵, (B) 下面発酵

各サンプル N=2 で測定し, 主成分分析は, GCMS によりピーク検出・ライブラリー同定された全成分を対象として行った。

4. 考察

4.1 選抜過程および菌種構成の解釈

段階的スクリーニングにより 467 株から最終的に 18 株を選抜した。本研究での一次～三次選抜は, ME 培地やホップを含むモルトエキス麦汁での炭酸ガス発生能, 重量減少量, 糖資化能力, 既知の食経験報告および分子生物学的同定を組み合わせた実用的な選抜法である。最終選抜群において *Saccharomyces cerevisiae* が多数を占めたことは, この菌種が酒類(ビール, 日本酒, ワイン等)への適合性を有することを反映していると考えられる。

4.2 1858 および 1860 の発酵特性と利用可能性

1858 および 1860 は, モルトエキス麦汁を用いた発酵試験および小規模醸造試験で高い発酵力を示した。1858 は温度差に関わらず十分な発酵力を示したため, さまざまなタイプのビールへの適用が期待される。1860 は下面発酵における発酵初期の立ち上がりが遅く, 上面発酵よりも発酵が緩慢であったことから, 高温短期の上面発酵の方が適していると考えられる。

1860 の高い凝集性は, 発酵終了後に酵母が強固な沈殿

塊を形成し, 若ビールの瓶詰め時に酵母混入が少なく, クリアなビールを回収できるという実用的利点を示す。液体培地 (YES, YPD) による再現実験でも同様の凝集性が確認され, 培養温度が高いほど底面への密着が強かった。ビール酵母には凝集性を示すものが知られているが, 本株の示す凝集の程度や温度依存性の特徴は顕著であるため, そのメカニズムが下面発酵酵母と同様か否かを含め, さらなる検討が必要である。

4.3 香気プロファイルと官能評価の整合性

GCMS および主成分分析の結果から, 1858 と 1860 は果実様の香りを与えるエステル類(酢酸イソアミル, カプロン酸エチル, カプリル酸エチルなど)のピーク強度が高かった。官能評価においても, 下面発酵サンプルで「バナナ様の香り」や「香りが良い」といった好意的なコメントが多く, これら分析結果と整合している。一方で, 4-ビニルグアイアコール (4-VG) が比較的高いピーク強度で検出された点は注意を要する。4-VG はスタイルにより好まれることもあれば, オフフレーバーと見なされることもあるため, 想定するビールスタイルに応じた酵母選択が必要である。

4.4 実用的意義と今後の課題

強い凝集性を有する 1860 は, 濾過設備を持たないクラフトビール醸造所にとってクリアなビール製造や酵母回収効率の向上, 賞味期限延長の可能性をもたらす。一方で, 凝集メカニズムの解明が必要であるほか, スケールアップ時の発酵挙動や品質安定性, 酵母残存による再発酵や自己消化に起因するオフフレーバー発生リスクについても検討が求められる。さらに, 本研究の官能評価はパネラー数が少なく簡易的であったため, 専門家パネルによる詳細な官能評価や大規模パネルによる嗜好性評価, 並びに長期保存試験を実施することが望まれる。

5. まとめ

本研究では, 島根大学が保有する酵母ライブラリーから, ビール醸造に適した有望株 1858 および 1860 を選抜した。1858 および 1860 はともに高い発酵力と果実様の香気成分を生成する特性を有し, 特に 1860 は高い凝集性という実用的利点を示した。これらは島根県オリジナルのビール酵母として有望である。今後はスケールアップ試験, 凝集メカニズムの解明, 大規模官能評価および保存性評価を実施し, 実用化に向けた安定性および製品品質の検証を行うことが必要である。これらの研究を進めることで, 島根発のユニークなクラフトビールの創出, 地域ブランドの向上, 製品ラインナップの拡充および地元農産物・観光資源との連携強化といった地域の多様な産業への複合的な貢献が期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり, 醸造試験や官能評価では, 浜田

技術センターの松林和彦科長，上野祐美研究員，小林こずえ研究助手に協力していただいた。ここに謝意を示します。

文 献

- 1) 株式会社セツロテック HP
<https://www.setsurotech.com/official/11574/> (参照：2025年10月1日)
- 2) Dequin, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*. 2001, vol. 56, p.577-588.
- 3) Pinto, F. O.; Lopes, T.; Vieira, A. M.; Oliveira, R. O.; Gomes, F. F.; Fabricio, M. F.; Ayub, M. A. Z.; Mendes, S. S. C.; Pagani, D. M.; Valente, P. Isolation, Selection and Characterization of Wild Yeasts with Potential for Brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2022, vol. 81, no. 2, p.221-232.
- 4) 鈴木成宗, 坂宮章世, 金澤春香, 栗田 修, 矢野竹男, 菊田修一. 樹液から単離した香気生産野生酵母のビール香気特性および実用性の評価. *日本食品工学会誌*. 2016, vol. 17, no. 2, p.59-69.
- 5) 武内純子, 阪内淳逸, 山崎雅夫. 自然界からの酵母分離および分離された *Lachancea thermotolerans* の酒類製造上の性質と活用. *日本食品科学工学会誌*. 2025, vol. 72, no. 1, p.1-10.
- 6) ビール酒造組合国際技術委員会. 改訂 BCOJ ビール分析法. 日本醸造協会. 2025.
- 7) 向井伸彦, 岡田明彦, 鈴木昭紀, 高橋利郎. ビール酵母とその他の醸造用酵母のビール醸造特性. *日本醸造協会誌*. 1998, vol. 93, no. 12, p.967-975.
- 8) Soares, E. V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Journal of applied microbiology*. 2011, vol. 110, no. 1, p.1-18.