

| | |
|--------|---|
| 綜 | 説 |
| Review | |

“清酒酵母 (*Saccharomyces sake*) は日本酒の文化”

清酒酵母が分離できるのは日本だけである

竹 田 正 久*

(平成 15 年 10 月 3 日受付/平成 15 年 10 月 30 日受理)

要約: 清酒酵母 (*S. sake*) の特異性を見出しているが, 外国では清酒酵母は分離されていない。

この理由は外国に清酒酵母 (*S. sake*) が存在しないのではなく, 日本に存在する清酒もろみ (米麴・蒸米・水) が外国では造られていないからである。従って, 外国では清酒酵母が優位に生息できないのである。逆に, 清酒酵母 (*S. sake*) は清酒もろみに優位に生息する性質があるため, 日本においてのみ清酒酵母が分離される。

清酒醸造を行なう日本においてのみ分離できる清酒酵母 (*S. sake*)こそが, 日本酒の文化である。

キーワード: 清酒酵母, *S. sake*, 清酒もろみ, 日本酒の文化

はじめに

古在と矢部¹⁾が日本ではじめて清酒酵母(日本酒酵母)を分離したのが 1895 年で, 分離酵母に *Saccharomyces sake* と命名して発表¹⁾したのが 1897 年である。本菌株が *S. sake* の基準株 (type strain) である。1931 年, Stelling-DEKKER³⁾が前記の *S. sake* (Yabe) を *S. cerevisiae* に同定した。しかし清酒酵母は, 日本独特のものであってビール酵母 (*S. cerevisiae*) らとは異なっているとの考えから詳細に検討すれば清酒酵母の特性があるとの考えから研究が始まった。このようなことから筆者が, 清酒酵母の分類学的性質の研究を始めたのが 1959~1960 (昭和 34~35) からであった。当ても清酒酵母と *S. cerevisiae* の違いは無く同種とされていた, しかし分類の基準となる形質は細胞形態や糖類の資化性と発酵性の性質から同定されていた。このような状況から区別に用いられる多くの形質を見出して分類するのが筆者の研究テーマであった。

清酒酵母は, 酵母分類学の基準書である *The yeasts, a taxonomic study* (以下, “*The yeasts*”) の 1~3 版では *S. cerevisiae* に同定されているが, 4 版では *S. cerevisiae* は *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* の “4 種” に分けられた。ビール酵母などの醸造酵母はこれらの “4 種” に含まれるが, 清酒酵母は筆者の試験研究では *S. bayanus* に同定された。しかし “*The yeasts* (4 版)” の分類では使用酵母に清酒酵母は含まれていない。4 版では, 3 版で *S. cerevisiae* に同定されているのを引用して清酒酵母は *S. cerevisiae* と記載されている。筆者の研究は, これら 4 版での菌株 (species) と清酒酵母の違いを追及する研究であった。

40 数年にも及ぶ研究から “*The yeasts*” の key charac-

ter を始め多くの形質から清酒酵母は前記 “4 種” の酵母から明らかに異なっていることを発見した。学名も *S. sake* と命名するのが妥当であることを確認した。

他国で分離された酵母に *S. sake* は認められず日本で分離された酵母のみに *S. sake* が存在することを発見した。酵母は環境の違いで特異的な生態系が形成されるもので, 他国に無い清酒「もろみ」(米, 麴, 水) で清酒酵母のみが優位に生育していることを意味している。(他国に清酒「もろみ」があれば分離されていると推察される)。筆者は, このような結果から清酒酵母は日本国だけでしか分離できないことから日本酒の文化であることを主張している。

I. 清酒酵母 (*S. sake*) の分類学的特性とは

清酒酵母の original name, *S. sake* を記載しただけで軽視, 軽べつされるのが, 今日この頃である。日本で初めて分離された清酒酵母に *S. sake* と命名されたことさえ知らない人が多い。

酵母の分類書 “*The yeasts*” では *S. cerevisiae* の synonym として *S. sake* が掲載されて, しかも分類試験株に用いられていた。しかし “*The yeasts*” の 4 版 (1998) に至っては使用されていない。国外の分類学者にも清酒酵母が忘れられようとしている。これは国内での清酒酵母分類学の衰退によるものである。

清酒酵母がビール酵母らの *S. cerevisiae* と異なることを報告してきた。多くの意見を耳にしたことを掲載したので, 参考にしてもらいたい。

1. 清酒酵母の分類学的定義: 米, 米麴, 水を原料とする清酒「もろみ」の環境に優位に生育する酵母群である。この酵母群がビール酵母, ワイン酵母などどのように区

* 東京農業大学名誉教授

別できるか、これが戦後（昭和 27～28 年前後）の研究課題であった。長い期間を経て明らかに区別できる形質を見出した。清酒「もろみ」には清酒酵母のみが、ワイン「もろみ」には清酒酵母は存在せず、ワイン酵母のみが例外なく生息していることを確認した。このように生態系を重視することによって定義される。

ビール酵母、ワイン酵母も清酒「もろみ」に増殖して発酵する能力をもっており、将来はワイン「もろみ」から分離したワイン酵母で清酒を造る可能性がある。清酒酵母を *S. sake* に限定するのはおかしいと言う人もいる。これは実用面からの発想であって分類学ではない。

2. 形質導入、交配、変異などによる育種株は分類学の対象としないのが分類学である。細胞質導入によるキラー酵母、反復戻し交配によるキラー酵母、自然突然変異細胞を特殊な方法で分離したアルコール耐性酵母や泡なし酵母などがある。しかし、これらの菌株は分類学、同定の対象株としないのが分類学である。

筆者は、清酒酵母の高泡形成を *S. sake* の key character としている。現在の酒造界では、泡なし酵母を使用している蔵が多いので高泡形成有無の形質を清酒酵母の特性とするのは、おかしいとの意見がある。先にも述べたように、これらの泡なし酵母は変異した細胞を人為的にとり出した菌株であることを認識してもらいたい。

3. 野生酵母が酒蔵で順応して清酒酵母となった。これを分離、保存して分類試験をやっても元の野生に戻るから意味がない。この様な意見をもっている人が意外に多いが誤った見方である。後で述べるが酒蔵外の自然界にも清酒酵母が生息し、また「米麴」から分離して 100 数年も経過した清酒酵母がアルコール 21～23% を生産し、分離当時の酵母と同じ形質である。因に使用した *S. sake* (Yabe) は 1895 年の分離である。

4. 清酒酵母と *S. cerevisiae* 間の DNA 相同性に変わりがないのに *S. sake* とは？、の意見を耳にする。*S.* 属“種”では DNA 交雑試験による DNA 相同性（類似度）が分類に採用されている。DNA 類似度の低い菌“種”間では生理試験による違いが検討され key character として導入する努力がなされている（The yeasts, 4th ed., 1998）。清酒酵母と *S. cerevisiae* 間の類似度は 70% 以上である（近縁種または同種とみなす）。しかし安定した多くの形質で区別されることを見出しているが、表現形質に関係のない塩基配列のイントロンなどをどのように考えるかを含めて検討すべき問題提起でもある。DNA 類似度はあくまでも補足的なもので、絶対的なものでないことを認識してもらいたい。

マスコミの「DNA 鑑定」という言葉自体が、科学的で絶対のものと思わせるイメージがあって指紋以上に個人を識別できる鑑定だと思わせる風潮がある。酵母の分類においても同じであって形質の違いなど全く無視する傾向にある。中瀬⁷⁾は、DNA 相同性は原則論を述べただけで実際は生理試験に基づいて分類されている、と指摘している。

GC% による分類が導入された当時（昭和 40 年前後）は、GC のデータが当時の分類学の知見に合致するかどうかを検討しようとするのに対し本末転倒であると言われ、

形質を無視し GC 一辺倒の風潮さえあった。発酵研究所が DNA 相同値に基づいて同定した *S. cerevisiae*（類似度 70% 以上）の GC 含量は 35.6～40.2%，同“種”間でもその変動範囲は 4.6% である。

5. *S. sake* の特異的な形質は、酒造りに関係あるのか。筆者は清酒酵母の特性を見出し、学名に *S. sake* が妥当であることを主張しているが、意外なことにその形質は酒づくりに関係あるのか、そうでないと *S. sake* を唱えるのはおかしいと言う意見である。*S.* 属“種”の key character に「発育温度」、「ビタミン要求」、「シクロヘキシミド耐性」、「フラクトース能動輸送」などの形質が導入されているが、その理由を問うのと同じである。分類学、同定においては採用した形質の理由や機能は問題視しない。安定した形質で“種”間を明確に区別できれば、どんな形質でも採用してよい。清酒酵母と言えども酒づくりとの関係は考慮しないのが分類学である。清酒酵母が何故、清酒「もろみ」だけに生育するのかその要因を解明したいのは当然であるが、これは他の分野での研究テーマである。酒づくりと関係ある形質でないとだめと言うのは、分類学での同定では通用しない。

酒づくりは、世界に類をみない独特の環境、そこに住みつくのは特異性をもった酵母である。なんでもよいから区別できる形質を見つけよ、と指導して下さったのが分類学者の北原覚雄、塚原寅次、小玉健吉の諸先生方であった。

6. taxonomy（分類学）と identification（同定）および学名と実用との名称を混同されているとの理由で投稿文が、醸造協会誌編集委員会から返却された時の文章である（平成 12 年）。これは、主に清酒酵母（*S. sake*）が、“The yeasts”の分類書でどのように扱われているか、特に 4 版における清酒酵母の学名の位置付を醸造関係者に知ってもらうために投稿した解説文に対する拒否文である。

初めは全く意味が分からなかったが、最初の「分類学と同定を混同」の意味するところは、日頃の発言から形質に違いがあっても酒づくりに関係のない形質だから筆者の *S. sake* の同定は間違っている、と言うことであろう。

次の「学名と実用との名称の混同」は、良い酒をつくる実用酵母（吟醸酵母）とそれ以外の野生酵母とは異なるので学名も違うと言うことである。それにしても投稿文の内容とは関係のない拒否理由であり、支離滅裂である。そして 4 版での分類では、清酒酵母の学名（*S. cerevisiae* でもない）が宙に浮いていることにも全く興味がないらしい。

II. 清酒酵母の分類学的位置付け

酵母分類学の基準書と言っても過言ではない“The yeasts”は初版（J. LODDER and N.J.W. KREGER, VAN RIJ 編）が 1952 年、2 版（J. LODDER 編）1970 年、3 版（N.J.W. KRFRER-VAN RIJ 編）1984 年、4 版（Cletus P. KURTZMAN and Jack W. FELL 編）が 1998 年の発刊である。

米麴から古在と矢部¹⁾が清酒酵母を初めて分離し、1897 年に矢部²⁾が *S. sake* と命名した。本菌株が *S. sake* の基準株（type strain）である。中沢⁴⁾は 1909 年、「もと」から分離した 2 株の清酒酵母に *S. tokyo*, *S. yedo* と命名した。以

上の3株が米麴と「もと」から分離され、しかも分離当時の性質も明らかにされており歴史的にも、生態的にも清酒酵母の代表株である。

筆者は清酒酵母の学名は、矢部が命名した *S. sake* が妥当であると主張⁵⁾している。色々と意見があることも承知である。本文では *S. sake* の学名を用いて清酒酵母の分類学を記述するので理解願いたい。

1. “The yeasts” の初版と2版

前記の清酒酵母3株は初版のなかで、次のように述べられている。*S. sake* Yabe は古在と矢部¹⁾が1895年に米麴から分離し、1897年に矢部²⁾が *S. sake* と命名した。細胞は連鎖しない円形 (6-12 μ) で内生孢子1-3ヶを形成する。そして発酵性糖は glucose+, galactose+ (weak), sucrose+, maltose+, lactose-, raffinose+1/3 であることが、文献から引用して記載されている。そして Stelling-DEKKER³⁾が1931年、本菌株を *S. cerevisiae* に同定したことを紹介している。2版でも同様に *S. cerevisiae* の sym. (異名) として記載された。

S. tokyo Nakazawa と *S. yedo* Nakazawa は酒蔵 (manufacture of “Sake”) から分離され、*S. tokyo* の細胞は円形、楕円形又は長楕円形で細胞は大きく、液体培養での島状の皮膜は器底に沈下する。内生孢子は円形で1-4ヶを形成する。そして発酵性糖は glucose+, galactose+, sucrose+, maltose+, lactose-, raffinose+1/3。一方、*S. yedo* は円形、楕円形又は長楕円形~ソーセイジ形で細胞は大きく、内生孢子と発酵性糖は *S. tokyo* と同じである。と記載されている。

初版では糖類の発酵性と資化性、細胞や孢子の形状などの性質から *S. 属* は30 “種” 3 “変種” に分けられているが、*S. tokyo* Nakazawa と *S. yedo* Nakazawa は細胞が楕円形であることから *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* の sym. として記載された。前記では分離源が “酒蔵” と記載されていたが、“変種” (variety) の origin を紹介したところでは、「中沢(日本)から1934年に受理した *S. yedo* と *S. tokyo* は、中沢が酒蔵の “もと” (“moto” used in the manufacture of sake) から分離した」と記載されている。

1970年発行の2版では103株が試験に用いられているが、前記の清酒酵母3株も含まれている。分類の基準となる糖類、炭素源の種類も多くなり *S. 属* は41 “種”, 6 “変種” に増えたが、細胞形態を重視しなくなったことから、*S. yedo* Nakazawa と *S. tokyo* Nakazawa は、*S. sake* Yabe と同様に *S. cerevisiae* に同定された。

2. “The yeasts” 3版と4版での *S. 属* の変遷

1984年発行の3版が、生理的性質を分類の基準としているのは初版、2版と同じである。基準項目が少なく、特に糖類の発酵性を重視しなくなったのが特徴で、*S. 属* は7 “種” となった。表1でも分かるように ethylamine と cadaverine の資化、cycloheximide (抗生物質) 耐性、sucrose と maltose の資化そして表1にはないが細胞の大きさ、内生孢子の性質などが分類の基準となっている。

a) 生理試験は分類の基準とは成らないとは? :

3版での特徴は *S. 属* の “種” が少なくなったことである。特に2版では独立した “種” として認められていた17 “種” が *S. cerevisiae* に統合されたことである。これは糖類発酵性と資化性を重視しなくなったことによる。また表1でも記載されているように *S. cerevisiae* は他の “種” とは異なり galactose, sucrose, maltose, raffinose の資化性を “V” (variable) でまとめている。“V” は一定でない不安定、信頼性がないと解釈される。即ち3版で *S. cerevisiae* に統合された菌株は、上記の糖類資化性に再現性がないか、又は+or-の性質⁶⁾であることを意味している。現在もそうであるが、「酵母の分類は、生理試験ではだめ」との風潮が広がった一つの要因でもある。しかし前記で述べたように *S. 属* の7 “種” は、生理試験が分類の基準であった。

b) GC含量は *S. 属* の分類基準ではない:

GC含量が分類に採用されるようになったのは昭和40年頃である。*S. 属* でもGC含量による分類が行われた。3版では、7 “種” のGC含量(%)が表に記載(本文表1)されている。*S. cerevisiae*, *S. kluyveri* のGC(%)が39.5と40.0。*S. exiguus*, *S. servazzii* が34.0と34.7。*S. telluris*, *S. unisporus* が33.0と32.5である。このようにGC含量は *S. 属* の各 “種” 間の区別基準とはなっていない。

c) “種” は細胞間交配とDNA-DNA相同性で区別されているとは? :

S. cerevisiae の標準記載のコメントで「交配とDNA相同性で *S. cerevisiae* が統合されている」と記載されているが、実際は各 “種” の説明のなかでは “種” 間のDNA相同性はふれてない。このことについて中瀬⁷⁾は明確な原則を示されただけで実際は個々の “種” については従来の形態学的性状や生理・生化学的性状に基づいて区別されている、と指摘している。

分類学は個々の菌株を同定することにある。細胞間交配試験は、まず活性ある内生孢子形成させることが前提となる。しかし長期保存で孢子形成能が退化するのが多い。しかも同定試験ではtype strainの孢子形成が必要である。*S. 属* のなかには100年以上も保存され孢子形成が困難なのが多い。このような事から交配試験も原則論であって実際は分類の基準には採用できない。

S. sake Yabe, *S. tokyo* Nakazawa, *S. yedo* Nakazawa は2版と同様に *S. cerevisiae* の sym. に記載されている。実験株が breweries (18), wine (33), berries (1), palm wine (1), ……*sake-moto* (3), grape must (6), yeast cake (1), ……が記載されビール酵母、ワイン酵母が多い。

1998年発行の4版では主に生理的性質が採用され基本的には3版と同じである。表2でも分かるように糖類の発酵性、発育温度、ビタミン要求性などがkey characterとして追加採用されている。3版では、清酒酵母を始め多くの醸造酵母が、*S. cerevisiae* に統合されていたが4版では、d-mannitol資化、発育温度、ビタミン要求、フラクトース能動輸送の性質から *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus*, の4 “種” (*Saccharomyces sensu stricto*) に分けられた。

表 1 *Sacch. spp. の性質* (The yeasts, 3 版, 1984)

| “種” | 資 化 | | | | | | | | | シクロヘキシミド | | 生育 | GC% |
|----------------------|-----|----|-----|-----|----|----|------|-----|-----|----------|---------|------|-------|
| | Ga | Su | Ma | Ra | Me | Ce | Ety | Cad | Lys | 100ppm | 1000ppm | 37°C | (平均値) |
| <i>Saccharomyces</i> | | | | | | | | | | | | | |
| <i>cerevisiae</i> | v | v | v | v | v | - | - | - | - | - | - | v | 39.5 |
| <i>dairensis</i> | + | - | - | - | - | - | - | - | - | +(-) | - | +w/- | 37.9 |
| <i>exiguus</i> | + | + | - | +/s | - | - | -/+w | - | - | +(-) | - | - | 34.0 |
| <i>kluyveri</i> | + | + | +/s | + | + | v | + | + | + | - | - | + | 40.0 |
| <i>servazzii</i> | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | v | 34.7 |
| <i>telluris</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | 33.0 |
| <i>unisporus</i> | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | -/+w | 32.5 |

Ga=galactose, Su=sucrose, Ma=maltose, Ra=raffinose, Me=melibiose, Ce=cellobiose, Ety=ethylamine · HCl, Cad=cadaverine · 2 HCl, Lys=L-lysine.

表 2 *Sacch. spp. の性質* (The yeasts, 4 版, 1998)

| “種” | 発酵 ^a | | | 資化 ^a | | | | | | | | | 生育 | | | | |
|-------------------------|-----------------|-----|----|-----------------|----|-----|------|-----|----------|-----|-----|------------|------|------|----------|------------------|-----|
| | Su | Raf | Tr | Carbon source | | | | | N source | | | Cychx 1000 | 30°C | 37°C | Vit-free | Fre ^b | |
| | | | | Su | Ma | Raf | D-Ri | Eth | D-M | Cad | Ety | | | | | | Lys |
| <i>Saccharomyces</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>barnettii</i> | + | + | s | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | n |
| <i>S.bayanus</i> | + | + | - | + | + | + | - | + | v | - | - | - | - | + | - | + | + |
| <i>S.castellii</i> | - | - | - | - | - | - | +/v | - | - | - | - | - | - | + | v | - | n |
| <i>S.cerevisiae</i> | + | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | + | v | - | - |
| <i>S.dairensis</i> | - | - | - | - | - | - | v | v | - | - | - | - | - | + | v | - | n |
| <i>S.exiguus</i> | + | s | + | + | - | + | - | s | - | - | - | - | v | + | - | - | n |
| <i>S.kluyvert</i> | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | + | - | n |
| <i>S.paradoxus</i> | + | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - |
| <i>S.pastorianus</i> | v | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | + |
| <i>S.rosinii</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | n |
| <i>S.sercazzii</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | n |
| <i>S.spencerorum</i> | + | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | - | + | + | - | n |
| <i>S.transuaalensis</i> | - | - | - | - | - | - | - | v | - | v | - | v | - | + | + | - | n |
| <i>S.unisporus</i> | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | + | + | + | v | - | n |

^a Abbreviations: Su, sucrose; Raf, raffinose; Tr, trehalose; Ma, maltose; D-Ri, D-ribose; Eth, ethanol; D-M, D-mannitol; Cad, cadaverine · 2HCl; Ety, ethylamine · HCl; Lys, L-lysine; Cychx 1000, indicates resistance to 1000 ppm cycloheximide in the medium; Vit-free, growth in vitamin-free medium

^b Presence of a fructose transport system; n, not determined.

各“種”形質記載のなかで発酵性糖が8種類、炭素源資化性では38種類の性質が記載されている。炭素源は2版の31種類より多い。その他、GC(%)が記載されているが3版と同様である。またコピキノンの項目を設けてあるが“not determined”が多く、記載してあるのは*S. cerevisiae*と同様に“CoQ:6”である。

DNA 相同値 (intermediate value of nucleotide sequence homology) は一部コメントで記載されているが、中瀬⁷⁾が指摘した様に4版でも生理・生化学的性質に基づいて区別されている。

S. cerevisiae sensu Yarrow をDNA 相同性で4“種”に区別⁸⁻¹⁰⁾し、そして4版で*S. 属*の執筆を担当し、主に生理的性質を基準にして区別したのも同じVaughan-Martiniらである。金子¹¹⁾は、DNA解析が進んでいる*S. 酵母*でもやはり表現形質を分類基準とする方法が提案されているのが現状であると述べている。細菌分類学で、鈴木¹²⁾は16SrRNAによる系統分類の重要性もわかるが、あまりにこれに依存し過ぎてかえってわかりにくい分類体系になったり、普通の方法では同定できなかったりするようでは学名

ユーザーとして微生物学者はついてきてくれない。こういう点も考慮して、わかりやすい分類体系を慎重に構築するのが分類学者の義務であると述べている。*S. 属*の分類においても4版ではこのような配慮がなされたのではなかろうか。

清酒酵母の3株は、*S. cerevisiae*のsym.として記載されているが、3版までは実験に用いられていた清酒酵母は4版では用いられていない。世界には見られない日本酒独特の「もと」、「もろみ」の環境のみに繁殖する清酒酵母が忘れられようとしている。そして4版で示されたkey characterによる*S. sake*の位置付けは不明である。

III. 分類試験に用いた酵母

1. *S. sake*

酵母の分類書“The yeasts”は4版まで発行されている。そのなかで清酒酵母が属する*S. 属*“種”は3版、4版を通して交配、GC、DNA homologyの性質は原則が示されただけで、具体的でなく従来通りの生理・生化学的性質に基づいて区別されていることを前報で紹介した。そして

4版で示された key による清酒酵母の位置付は不明である。清酒酵母がどのような挙動を示すか、これを明らかにすることは清酒醸造に携わる研究者の義務でもある。

3版での *Saccharomyces cerevisiae* sensu Yarrow は、4版で4“種”に分けられたが、筆者がこれから主張する清酒酵母の特性を加えると *S. s. stricto* は *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* 及び *S. sake* の5“種”となる。そのためには、*S. sake* が他の *S. s. stri.* とどのように区別されるかを示さねばならない。今回は比較試験に用いた清酒酵母 (表3) について述べる。

a) 基準株 (type strain) の *S. s. sake* Yabe (1897) IFO 0304

前報で述べたように日本で最初に分離され、*S. sake* と命名された菌株である。“IFO, LIST”には発表された文献が記載されている。分離源は清酒酵母の生存が少ない米麴¹³⁾であるが、矢部¹⁴⁾は麴を培養液に移植すれば酵母が生ずるので純粋培養をして、その性質を検査するに“もと”及び“もろみ”中に存在するのとすこしも異なる点が見られないと述べている。このことから IFO 0304 は米麴を加えた集殖培養で分離されたと思われる。米麴に存在する酵母が清酒酵母の起源であることを見出した研究でもあったが、IFO 0304 株は生態系でも清酒酵母と言える。

細胞は円形～短卵形で、分離当時の円形 (“The yeasts”, 初版) と変わりなかった。孢子形成は困難であったが、麴汁に振盪培養¹⁵⁾ 3日間の間隔で6～7回植代えしてV・8寒天培地に移植し、培養後観察した。僅かであるが孢子2ヶを形成した子のう細胞が見られた。

b) *S. s. tokyo* Nakazawa (1909) と *S. s. yedo* Nakazawa (1909)

前記の IFO 0304 と同様に歴史的にも清酒酵母の代表株である。“IFO, LIST”に文献を引用して記載されている。その他、IFO 0309 (strain Sikenzyo) を用いたが“LIST”では () 内に *S. sake* と記載されている。尚、IFO 0304

を始めとしてこれらの菌株は、協会7号酵母とはパルスフィールド・ゲル電気泳動核型パターンで異なっていた。

c) *S. s. sake* ATCC no.

筆者⁵⁾が1975年(昭和50年)、発酵工学雑誌に“清酒酵母 (*S. sake*) の分類学的研究”の標題で発表した。同年、ATCC (American Type Culture Collection) から同誌に発表した酵母10株 (*S. sake*) を送るよう要請があった。早速、10株を送った。翌年(1976年)4月にATCC accession no. の通知があり“ATCC, CATALOGUE”に記載された。*S. sake* の学名を用いた投稿文が受理、記載されたことで、矢部が命名した original name の *S. sake* が再認識されたと自負している。

表4に送付した ATCC no. 株とその性質を示した。送付にあたり神経を使ったのが10株の選択であった。分離当時は全国の酒蔵が主に協会酵母の6号と7号を添加していた。“もと”や“もろみ”から分離しても多くは添加酵母が再釣菌されているので野生の清酒酵母との区別をしなくてはならない。まず表4に示した性質のほか麦汁での繁殖状態や巨大集落などの性質から10株間を区別して選んだ。そして、これらの菌株と協会酵母の違いを確認した。

そして、その他の性質 (表4) の違いを導入して協会酵母と区別した。その後、酸性ホスファターゼの性質¹⁶⁾、及び核型のパターン²⁶⁾から ATCC no. 10株のなから協会酵母は含まれないことが確認された。

d) 協会7号酵母

現在、日本醸造協会から配布されているのは協会6号酵母、7号、9号、10号、14号、15号(1501号)である(人為的変異株、交配株は除いた)。これらの酵母は分類学的にどのように異なるだろうか。

協会6号酵母は秋田県の新政酒蔵から分離された。6号 (AR・C号) の仕込試験を昭和7年に行ったことが報告¹⁷⁾され、日本醸造協会から昭和10年度酒造期より協会6号酵母として発売した。と記載¹⁸⁾されている。昭和5年

表3 *Sacch. sake* sensu Yabe (使用菌株)

| 菌株 no. | “種” (オリジナル・ネーム) | 分離年度 | 分離源 |
|-------------------|-------------------------|------|----------------------|
| IFO | | | |
| 0304 ^T | <i>S. sake</i> *(1897) | 1895 | <i>sake-ricekoji</i> |
| 0244 | <i>S. tokyo</i> *(1909) | | <i>sake-moto</i> |
| 0249 | <i>S. yedo</i> *(1909) | | <i>sake-moto</i> |
| 0309 | <i>S. sake</i> | | |
| ATCC | | | |
| 32694 | <i>S. sake</i> | 1953 | <i>sake-kimoto</i> |
| 32695 | <i>S. sake</i> | 1961 | <i>sake-oribiki</i> |
| 32696 | <i>S. sake</i> | 1968 | <i>sake-mash</i> |
| 32697 | <i>S. sake</i> | 1968 | <i>sake-mash</i> |
| 32698 | <i>S. sake</i> | 1968 | <i>sake-mash</i> |
| 32699 | <i>S. sake</i> | 1968 | <i>sake-mash</i> |
| 32700 | <i>S. sake</i> | 1968 | <i>sake-mash</i> |
| 32701 | <i>S. sake</i> | 1968 | <i>sake-mash</i> |
| 32702 | <i>S. sake</i> | 1968 | <i>sake-mash</i> |
| 32703 | <i>S. sake</i> | 1968 | <i>sake-mash</i> |
| Kyokai | | | |
| No.7 | | 1946 | <i>sake-shinsyu</i> |

T : type strain,

*Indicate type strain of original name.

(1930年)分離, 10年発売とする池見¹⁹⁾の報告が妥当である。6号酵母については, 分離年数と発売年数が混乱しているようである。

協会7号酵母は長野県の眞澄酒蔵から昭和21年に分離された。分離源は, 昭和21年の醸造協会雑誌41巻, 7-8号1頁に掲載された広告文に「7号酵母は本春優良新酒より分離した芳香発生の強い酵母」と示されている。7号酵母の分離源を示した唯一の記載である。

協会9号酵母は, 昭和28年頃分離され熊本県の酒造研究所で保存, 使用されていたが, 昭和43年から全国に配布された。協会10号酵母は昭和27年に分離され, 昭和52年から配布された。

協会14号酵母²¹⁾の分離年数は明確でないが, 平成6年から配布された。分離当時の酵母(K2・4)の中から吟醸香の高い株(K2・4-76)を選択したのが14号酵母である。変異株であったのか定めないが9号酵母に近縁の酵母と考えられている。

協会15号(1501号)酵母²²⁻²⁴⁾は, 昭和61~62年に分離した菌株のなから香氣成分の生産が高い酵母として選択され, 平成8年から配布されている。

分離源の“もろみ”が7号酵母を添加したもので, 分離酵母は7号酵母の自然突然変異株と推察されている。そして分離後, Froth Flotation法²⁵⁾で自然変異の泡なし細胞を取得した“泡なし酵母”である。“もろみ”中で変異, そして分離後人為的に泡なし変異株をとり出した酵母であることを分類学的(taxonomy)には考慮しておかねばならない。

以上, 多くの協会酵母が配布されているが, 協会酵母を加えた“もと”や“もろみ”から分離されている。添加酵母の再釣菌が十分に考えられるが, 添加酵母と分離酵母との関係についてはこれまで触れてなかった。15号酵母の分離で添加酵母と分離酵母との関係を考察したのは齊藤ら^{22, 23)}が最初である。

昭和56年, 溝口と藤田¹⁶⁾は6号酵母, 7号, 9号, 10号は高リン酸培地でホスファターゼ活性が認められないのに

対し, 1号~5号酵母を初め他の株(ATCC no. 株)はずべて活性を示したことを報告した。

平成2年, 山田ら²⁶⁾は, 核型パターンから6号酵母と7号は同じ泳動パターンを示したことから2株は同じ起源であることが高いと述べている。筆者が行った(平成11年)5号酵母, 6号, 7号, 9号, 10号, 14号, 15号の核型パターンで5号酵母は明らかに異なるが, 他の協会酵母はほとんど同じパターンであった。ただ10号酵母にV番とXI番染色体の間にバンドが見られるのが特異的である。後藤ら²⁷⁾, 齊藤²⁴⁾も同じバンドを報告している。後藤ら²⁷⁾は10号酵母は2倍体で, 染色体セットとして(2n+1)を持つ異数体である可能性があると述べている。

佐藤¹⁷⁾は, 染色体の長さが栄養増殖の継代培養でも無視できない程度の頻度で変化し, 電気泳動核型の知見を酵母株間の識別さらには分類に用いる場合には, 各染色体DNAの安定性にも注意を払う必要があると指摘している。

後藤ら²⁷⁾が述べているように10号酵母の特異的な核型パターンは, 他の協会酵母との判別に有用な標識の一つになるが, 特異的なパターンを除いては他の酵母とほとんど同じである。“もろみ”また分離後の培養期間に, 佐藤²⁸⁾が述べているように10号酵母に変化があったと考えられる。

5号酵母と他の協会酵母は明らかに異なることから山田ら²⁶⁾が指摘している6号酵母と7号が同じ起源であるとすれば, 現在の協会酵母は分類学的には6号酵母を原株とした同種のもので, これは協会酵母を添加した“もと”や“もろみ”から同種の酵母が再分離されていると推察される。前記²⁶⁾の6号~10号酵母のホスファターゼの特異性も同種であることを裏付けるものと思われる。そして香氣生産, 酸生産, 低温発酵性の実用面からの違いは核型パターンには表われない僅かな変異によると思われる。これは, 15号酵母が7号の突然変異株と推定している齋藤^{23, 24)}の報告からも伺うことができる。以上のことから筆者は, 分類学的な研究においては多くの協会酵母を清酒酵母の代表株として導入することは, 混乱の恐れがあるので協会酵母の代表株として7号酵母の1株を用いた。

表4 *Sacch. sake* の ATCC no. と協会7号酵母の性質

| 菌株 no. | 胞子形成 | 皮膜形成 | | 資化 | | 生育 | |
|---------------|------|-------|-------|-----|---------------|--|--|
| | | YM 培地 | α-M-D | Gly | K・free medium | B ₆ ・deficient medium ¹⁾ | |
| <u>ATCC</u> | | | | | | | |
| 32694 | + | w | + | + | + | + | |
| 32695 | w | — | — | + | + | + | |
| 32696 | w | w | + | — | — | + | |
| 32697 | + | 卅 | + | + | — | + | |
| 32698 | + | — | — | — | + | + | |
| 32699 | + | 卅 | — | + | — | + | |
| 32700 | + | w | — | + | — | + | |
| 32701 | + | w | + | + | + | + | |
| 32702 | + | w | — | + | + | + | |
| 32703 | + | + | — | + | + | — | |
| <u>Kyokai</u> | | | | | | | |
| No.7 | — | 卅 | + | + | + | + | |

α-M-D: α-methyl-D-glucoside. Gly: glycerin. K: potassium. B₆: pridoxine-HCl. W: weak.

1) Containing casamino acid as nitrogen source.

表3の7号酵母は、昭和36年(1961年)配布された原株を日本醸造協会から分譲をうけた菌株である。7号酵母はATCC, FUNGI/YEST(17th e. 1987)のLISTではATCC 26422で記載されている。説明の中で()内に*S. sake*の学名が記入されている。

e) 糖類の発酵性と資化性

清酒酵母の糖類の発酵性と資化性を表5に示した。15株ともgalactose, sucrose, maltose, raffinoseを発酵しmelibiose, starchは発酵しなかったが、7号酵母はmaltoseの発酵性に再現性(variable, +or-)がなかった。資化性は全菌株とも同じであった。

以上、試験に用いる清酒酵母について述べたが、*S. sake*を他の*S. s. stri.*と異なるspeiesであることを認識してもらうには、まず清酒酵母のなかには多くの品種が存在すること、一方それに共通な性質が他の*S. s. stri.*とは異なることを証明しなくてはならない。以上、今回は試験に用いる清酒酵母は異なった品種間にあることを記述した。

2. *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus*

試験に用いた*S. s. stri.* Vaughan-Martini & Martiniの4“種”について述べる。使用菌株は発酵研究所(IFO)^{26,29)}が、DNA再会合性実験における類似度から同定されたものである。尚、*S. pastorianus*のtype strain IFO 0613はDNA類似度が、*S. bayanus*とのみ高い値を示したことから*S. bayanus*に同定され、*S. pastorianus*はoriginal nameの*S. carlsbergensis*のtype strain IFO 1167を参考株として用いている。本実験でも発酵研究所の報告に従った。

各菌株のoriginal nameと分離源は“The yeasts”の書籍、“LTST OF CULTURES (発酵研究所)”及び山田ら^{26,29)}、Vaughan-Martiniら³⁰⁻³²⁾の文献から引用した。

a) *S. cerevisiae* s. Vaughan-Martini & Martini

使用した20株を表6に示した。後で報告するが、上段の

(A)グループはmelezitoseを資化できるが、下段の(B)グループは資化できないことから区別した。(A)グループにはビールに関係ある酵母が多く、(B)グループには醸造酵母が少ない。糖類の発酵性と資化性を表10に示した。(A)グループは概ね同じ性質であったが、IFO 1046はstarchを発酵(W)し、original nameの*S. diastalicus*の性質と一致した。一方、(B)グループは多くのタイプに分かれた。

b) *S. bayanus* s. Vaughan-Martini & Martini

使用した9株を表7に示した。4株がビールに関係し3株がjuiceから分離された菌株であった。糖類の発酵性、資化性を表11に示した。galactoseの発酵性と資化性が(-)の菌株が多く、type strain IFO 1127はoriginal nameの*Sacch. bayanus*の性質と一致した。またIFO 0613も同じ性質であった。IFO 0615はmelibioseを発酵しoriginal nameの*S. uvarum*と一致したが、melibiose発酵性(+)は本菌株のみであった。IFO 10557はgalactoseを発酵したが、資化性は(-)であった。

c) *S. pastorianus* s. Vaughan-Martini & Martini

使用した6株を表8に示した。全菌株がビールに関係する酵母であった。original nameの*S. carlsbergensis*(下面酵母)のIFO 1167はmelibioseの発酵性が(VS)であった(表12)。本菌株は*S. pastorianus*の参考株として用いられているが、その他の菌株にも発酵性(V)が多かった。

尚、表中の6株はDNA類似度が*S. cerevisiae*のtype strain及び*S. bayanus*のtype strainの両者に対し中間的な値を示したことから、これら2“種”間の雑種株²⁹⁾と見られている。

d) *S. paradoxus* s. Vaughan-Martini & Martini

使用した6株を表9に示した。由来が樹液または樹木で、醸造酵母がないのが他のグループと異なる(2株は不明)。糖類の発酵と資化性(表13)は、IFO 10554を除いて他の菌株は同じであった。これは前記の*S. cerevisiae*の

表5 *Sacch. sake*の糖類発酵と資化

| 菌株 no. | 発 酵 | | | | | | 資 化 | | | |
|-------------------|-----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|
| | Ga | Su | Ma | Me | Ra | St | Ga | Su | Ma | St |
| IFO | | | | | | | | | | |
| 0304 ^T | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 0244 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 0249 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 0309 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| ATCC | | | | | | | | | | |
| 32694 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 32695 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 32696 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 3Z697 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 32698 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 32699 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 32700 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 32701 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 3Z702 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 32703 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| Kyokai | | | | | | | | | | |
| No.7 | + | + | v | - | + | - | + | + | + | - |

Ga: galactose. Su: sucrose. Ma: maltose. Me: melibiose Ra: raffinose. St: starch. V:variable

表 6 *Sacch. cerevisiae* sensu Vaughan-Martini & Martini (使用菌株)

| IFO no. | | “種” (オリジナル・ネーム) | 分離源 |
|--------------------|------------|---------------------------|-------------------------------|
| 10217 ^T | CBS 1171 | <i>S.cerevisiae</i> * | brewer's top yeast |
| 0253 | CBS 423 | <i>S.chodati</i> * | Wine, Switzerland |
| 0614 | CBS 381 | <i>S.williamsii</i> * | spoiled beer |
| 0751 | NRRL Y 379 | <i>S.carlsbergensis</i> | |
| (A) 1046 | CBS 1782 | <i>S.diastaticus</i> * | super attenuated beer |
| 1049 | NCYC 406 | <i>S.steineri</i> | |
| 1226 | CBS 382 | <i>S.logos</i> * | Brewery, Brazil |
| 20001 | | (<i>S.cerevisiae</i>) | beer yeast, Burton |
| 20111 | | (<i>S.cerevisiae</i>) | Bass beer yeast, No.1 |
| 2018 | | <i>S.cerevisiae</i> | Burton upon trent. No.1 |
| 0210 | CBS 400 | <i>S.chevalieri</i> * | palm wine |
| 1833 | CBS 5635 | <i>S.coreanus</i> * | grape must ² |
| 1836 | CBS 5378 | <i>S.norbensis</i> * | Alpechin ³ , Spain |
| 1837 | CBS 5155 | <i>S.prostoserdovii</i> * | grape must ² |
| (B) 1950 | CBS 1395 | <i>S.ellipsoideus</i> * | |
| 1991 | CBS 2247 | <i>S.capensis</i> * | grape must ² |
| 1994 | CBS 4903 | <i>S.hiempiensis</i> * | Alpechin ³ , Spain |
| 1997 | CBS 3093 | <i>S.oleaceus</i> * | Olive, Spain |
| 1998 | CBS 3081 | <i>S.oleaginosus</i> * | Alpechin ³ , Spain |
| 10055 | CBS 4054 | <i>S.acet</i> * | red wine ⁴ |

T: type strain. (A): melezitose assimilated. (B): melezitose not assimilated.

*Indicate type strain of original name.

- 1) DNA reassociation between *Sacch. cerevisiae* not determined.
- 2) must.: before fermentation of juice.
- 3) alpechin: aqueous solution separated during the manufacture olive oil.
- 4) “Flor” forming (ability to oxidize ethanol).

表 7 *Sacch. bayanus* sensu Vaughan-Martini & Martini (使用菌株)

| IFO no. | | “種” (オリジナル・ネーム) | 分離源 |
|-------------------|----------|--------------------------|------------------------|
| 1127 ^T | CBS 380 | <i>S.bayanus</i> * | beer |
| 0213 | | <i>S.ellipsoideus</i> | |
| 0613 | CBS 1538 | <i>S.pastorianus</i> * | beer |
| 0615 | CBS 95 | <i>S.uvarum</i> * | currant juice |
| 1048 | NCYC 415 | <i>S.heterogenicus</i> | |
| 1343 | CBS 5184 | <i>S.inusitatus</i> | Beer, Sweden |
| 1620 | CBS 425 | <i>S.heterogenicus</i> * | fermenting apple juice |
| 10557 | CBS 424 | <i>S.globosus</i> * | pear juice |
| 10563 | CBS 1546 | <i>S.inusitatus</i> * | beer |

T: type strain

*Indicate type strain of original name.

表 8 *Sacch. pastorianus* sensu Vaughan-Martini & Martini (使用菌株)

| IFO no. | | “種” (オリジナル・ネーム) | 分離源 |
|---------|----------|---|----------------------|
| 1167 | CBS 1513 | <i>S.carlsbergensis</i> * | beer bottom yeast |
| 0250 | CBS 1462 | <i>S.cerevisiae</i> var. <i>festinans</i> | primed ale(beer) |
| 1961 | CBS 1486 | <i>S.carlsbergensis</i> | beer bottom yeast |
| 2003 | | <i>S.pastorianus</i> | lager brewer's yeast |
| 10010 | NCYC 529 | <i>S.pastorianus</i> | lager brewer's yeast |
| 10610 | CBS 1503 | <i>S.monacensis</i> * | beer |

*Indicate type strain of original name.

表 9 *Sacch. paradoxus* sensu Vaughan-Martini & Martini (使用菌株)

| IFO no. | | “種” (オリジナル・ネーム) | 分離源 |
|--------------------|----------|--|--------------------------|
| 10609 ^T | CBS 432 | <i>S.paradoxus</i> * | tree exudate |
| 0259 | CBS 406 | <i>S.mangini</i> var. <i>tetrasporus</i> * | oak exudate |
| 0263 | | <i>S.paradoxus</i> | |
| 10553 | | <i>S.paradoxus</i> | |
| 10554 | | <i>S.paradoxus</i> | exudate of quercus robur |
| 10695 | CBS 7400 | <i>S.douglasii</i> * | douglas strains |

T: type strain.

*Indicate type strain of original name.

表 10 *Sacch. cerevisiae* の糖類発酵と資化

| IFO no. | 発 酵 | | | | | | 資 化 | | | |
|--------------------|-----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|
| | Ga | Su | Ma | Me | Ra | St | Ga | Su | Ma | St |
| 10217 ^T | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 0253 | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| 0614 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 0751 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - |
| (A) 1046 | - | + | + | - | + | ws | - | + | + | + |
| 1049 | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| 1226 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - |
| 2000 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 2011 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 2018 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 0210 | + | + | - | - | + | - | + | + | - | - |
| 1833 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - |
| 1836 | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 1837 | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - |
| (B) 1950 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 1991 | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - |
| 1994 | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - |
| 1997 | + | - | + | + | - | - | + | - | + | - |
| 1998 | + | - | + | + | + | - | + | - | + | - |
| 10055 | - | ws | + | - | - | - | - | + | s | - |

Ga: galactose. Su: sucrose. Ma: maltose. Ra raffinose. St: starch W: weak. S: slow.

表 11 *Sacch. bayanus* の糖類発酵と資化

| IFO no. | 発 酵 | | | | | | 資 化 | | | |
|-------------------|-----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|
| | Ga | Su | Ma | Me | Ra | St | Ga | Su | Ma | St |
| 1127 ^T | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - |
| 0213 | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - |
| 0613 | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - |
| 0615 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - |
| 1048 | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - |
| 1343 | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - |
| 1620 | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - |
| 10557 | +* | + | v | - | - | - | -* | + | + | - |
| 10563 | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - |

V: variadle

*it was reappearance.

表 12 *Sacch. pastorianus* の糖類発酵と資化

| IFO no. | 発 酵 | | | | | | 資 化 | | | |
|---------|-----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|
| | Ga | Su | Ma | Me | Ra | St | Ga | Su | Ma | St |
| 1167 | + | + | + | vs | + | - | + | + | + | - |
| 0250 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 1961 | + | + | + | v | + | - | + | + | + | - |
| 2003 | + | + | + | v | + | - | + | + | + | - |
| 10010 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - |
| 10610 | + | + | + | v | + | - | + | + | + | - |

表 13 *Sacch. paradoxus* の糖類発酵と資化

| IFO no. | 発 酵 | | | | | | 資 化 | | | |
|--------------------|-----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|
| | Ga | Su | Ma | Me | Ra | St | Ga | Su | Ma | St |
| 10609 ^T | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 0259 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 0263 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 10553 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| 10554 | + | + | - | - | + | - | + | + | - | - |
| 10695 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - |

(A) グループと概ね同じタイプである。

以上、清酒酵母 (*S. sake*) と比較試験を行なう *S. s. stri.* の *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* 及び *S. paradoxus* の4“種”について original name, 由来及び糖類の発酵性, 資化性の結果について記載した。使用菌株中, starch を発酵するのは original name の *S. diastaticus* (IFO 1046) のみであったが発酵力は弱かった。しかし資化性は旺盛であった。

e) *S. sake* と *S. cerevisiae* の type strain IFO 10217 間の DNA 類似度

山田ら^{26, 29)} は、清酒酵母の協会酵母を始め original name の *S. sake*, *S. tokyo*, *S. yedo* から多くの酵母が *S. cerevisiae* の type strain と高い DNA 類似度 (71~113%) であったことを報告している。前報で紹介した ATCC no. の清酒酵母も同様に高い DNA 類似度 (70~92%) を示す。このように DNA 再会合性実験結果から清酒酵母は、*S. cerevisiae* s. Vaughan-Martini & Martini の範中にはいる。

Vaughan-Martini ら³²⁾ は生理・生体試験を含めた分類試験で同定した *S. cerevisiae* complex 23 株を挙げているが *S. sake*, *S. tokyo*, *S. yedo* の清酒酵母は見られなかった。

IV. key character (“The yeasts, 4版, 1998”) による分類

“The yeasts”³³⁾ における *S.* “種” の分類は主に生理試験が導入されている。*S. s. stri.* の *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* の分類基準 (key to species) は“ビタミン・フリー培地での増殖”, “d-mannitol 資化”, “発育最高温度”, “fructose 能動輸送”であり, 他の3“種”では染色体 (核型) が導入されている。

本報では清酒酵母を加えた *S. s. stri.* の5“種”について前記の key character (fructose 能動輸送性は省略) の外に melezitose 資化とVI番染色体の大きさの性質を加えて, 前記の使用酵母について試験を行った。

a) 糖類資化性は, Wickerham の斜面 (寒天) 培地で行った。melezitose 資化性は 30~31°C, 15 日間培養した。

b) 発育最高温度は YM 斜面 (寒天) 培地で, 15 日間培養した。

c) ビタミン・フリー培地での増殖は, “The yeasts” の方法で行った。ビタミン・フリー培地 (6 ml/tube) に, 白金線で少量のコロニーをとり接種して 25~27°C, 2 日間培養 (1 日 3 回, 激しく振る) し, 白濁が認められないか, 又は僅かに白濁した培養液 (細胞数 10^5 /ml 以下) の 1 滴を培地 6 ml に接種した。白濁が濃い (10^5 /ml 以上) 場合は, 10 倍以上に希釈して接種。27~28°C, 10 日間培養した。尚, 培地はビタミンフリー培地のほかパントテン酸欠培地とピオチン欠培地でも行った。

d) 第VI番染色体 (核型) の大きさは PFG 核型分析で行った。DNA 試料の調整は CARLE と OLSON の方法³⁴⁾ に従った。泳動装置は Bio-Rad Laboratories を用い, パルス時間 100 秒から 45 秒にリニアに変化させながら電圧 200 V, 冷却装置設定温度 10°C で 24 時間泳動した。

1. 実験結果

各酵母の性質を表 14~18 に示した。

a) 糖類資化性は, *S. cerevisiae* の (A) グループと *S. paradoxus* が melezitose を資化したが, 他の菌“種”は資化しなかった。d-mannitol は *S. paradoxus* が資化した。*S. paradoxus* の key character であり “The yeasts” の記載と一致した。

b) 発育最高温度は, *S. sake* が 40°C で +/-, 37°C で + であった。*S. cerevisiae* 40°C +/-, 37°C +/(-) であった。“The yeasts” では *S. cerevisiae* の 37°C 発育が V と記載されており *S. sake* と *S. cerevisiae* と変わりなかった。

S. bayanus は 34°C -, 33°C + ~ W/-, “The yeasts” では 37°C - と記載されている。Vaughan-Martini ら³²⁾ が 34°C 以上で発育できないと報告しているのと一致する。

S. pastorianus は 35°C -, 34~32°C +/- であった。“The yeasts” に 34°C 又はそれ以下の温度で発育すると記載されているのと一致する。そして前記の *S. bayanus* の発育温度と概ね同じである。これらの発育温度は *S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の2“種”から区別される性質と報告³²⁾ されている。しかし本実験での *S. paradoxus* は 37°C -, 36°C -/(W), 35°C W/-, 34°C + であった。

“The yeasts” では *S. paradoxus* の key character として, 37°C 又はそれ以上 (40~42°C) で発育することを挙げている。本実験の結果と大きく異なる点であり再検討が必要である。

c) ビタミン・フリー培地での増殖は, *S. sake* の全菌株が増殖し *S. bayanus* は 9 株中, 7 株が増殖した。増殖しなかった 2 株はピオチン欠培地で増殖しなかった。“The yeasts” での *S. bayanus* の key character と概ね一致したが, *S. sake* と同じであった。他の3“種”は増殖しなかったが “The yeasts” の key character と一致した。パントテン酸欠培地では増殖しないのと, 増殖する菌株に分かれた。*S. pastorianus* と *S. paradoxus* はパントテン酸欠培地に増殖し, ピオチン欠培地に増殖しなかった。

d) VI番染色体の大きさは *S. sake* 2 株が 270 (kb) の大きさであったが, 他の菌株は 270 (kb) より大きかった (270 <)。IFO 0304, ATCC 32694, 32695, 32701 及び 32703 の核型に VI と III 番が明確でなかったが, バンドに幅があり濃く写っていることから染色体の大きさが同じか, それに近い一本に見えろと考えられる。

S. cerevisiae (A) は 3 株が 270 (kb) であったが, 他は 270 (kb) より小さかった。一方, グループ (B) は 1 株 (IFO 0210) を除いて 270 (kb) より小さかった。以上 *S. cerevisiae* は数株が 270 (kb) で, 大半は 270 (kb) より小さく *S. sake* と異なる傾向にあった。

S. bayanus は明確にできないのもあったが, 全菌株が概ね 270 (kb) 付近の大きさであった。

S. pastorianus は 270 (kb) より小さく, *S. cerevisiae* と同じ傾向を示した。

S. paradoxus は, ほとんどの菌株が 270 (kb) より大きかった。これは *S. sake* と同じ傾向であった。そして両“種”の IX 番染色体の大きさが 440 (kb) 付近にあるのも同

じ傾向であった。また *S. cerevisiae* (B) と *S. pastorianus* の I 番染色体の大きさが、他“種”に比べて小さい傾向にあった。

以上、VI 番染色体の大きさにおいて *S. cerevisiae* は、菌株が 270 (kb) 付近で、その他の菌株はそれより小さく、*S. bayanus* は、270 (kb) 付近、*S. pastorianus* は 270 (kb) より小さかった。一方、*S. sake* と *S. paradoxus* は 270 (kb) より大きく、他の“種”と区別された。

2. *S. sake* の独立性

S. cerevisiae, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* の 4 “種”に *S. sake* を加えた“5 種”について“The yeasts”の key character で分類試験を行った (fructose 能動輸送性試験は省略)。*S. paradoxus* の発育最高温度に“The yeasts”の記載と異ったが、他の性質は一致した。

S. sake と *S. bayanus* がビタミン・フリー培地に増殖した。この性質は図 1 で分かるように *S. bayanus* の key character であることから、*S. sake* は *S. bayanus* に近い。

表 14 *Sacch. sake* の key character (The Yeasts, 4 版, 1998)

| Strain no. | 資化 | | 生育 | | | 生育 | | | | | | VI 番染色体 Size(kb) | |
|-------------------|----|-----|------|------|------|--------------|----|------------------|----|-------------------|----|---------------------|-----------|
| | Mz | D・M | 37°C | 40°C | 41°C | Vt-free days | | P-deficient days | | Bt-deficient days | | | |
| | | | | | | 7 | 10 | 7 | 10 | 7 | 10 | | |
| <u>IFO</u> | | | | | | | | | | | | | |
| 0304 ^T | - | - | + | - | - | w | + | w | + | + | + | + | 270 < (?) |
| 0244 | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | 270 < |
| 0249 | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | 270 = |
| 0309 | - | - | + | - | - | + | + | w | + | + | + | + | 270 = |
| <u>ATCC</u> | | | | | | | | | | | | | |
| 32694 | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | 270 < (?) |
| 32695 | - | - | + | - | - | + | + | - | + | + | + | + | 270 < (?) |
| 32696 | - | - | + | - | - | + | + | - | + | + | + | + | 270 < |
| 32697 | - | - | + | - | - | - | + | - | + | + | + | + | 270 < |
| 32698 | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | 270 < |
| 32699 | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | 270 < |
| 32700 | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | 270 < (?) |
| 32701 | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | 270 < |
| 32702 | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | 270 < (?) |
| 32703 | - | - | + | + | - | - | + | - | + | + | + | + | |
| <u>Kyokai</u> | | | | | | | | | | | | | |
| No.7 | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | 270 < |

Mz: melezitose(30~31°C). D・M: D-mannitol. V-free: Vitamin-free medium.

P-deficient: pantothenate-deficient medium. Bt-deficient: biotin-deficient medium. days: incubation days(27~28°C)

表 15 *Sacch. cerevisiae* の key character (The yeasts, 4 版, 1998)

| IFO no. | 資化 | | 生育 | | | | 生育 | | | | | | VI 番染色体 Size(kb) |
|--------------------|----|-----|------|------|------|------|--------------|----|------------------|----|-------------------|----|---------------------|
| | Mz | D・M | 35°C | 37°C | 40°C | 41°C | Vt-free days | | P-deficient days | | Bt-deficient days | | |
| | | | | | | | 7 | 10 | 7 | 10 | 7 | 10 | |
| 10217 ^T | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 270 > |
| 0253 | + | - | + | + | + | - | - | - | + | + | w | w | 270 > |
| 0614 | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | w | 270 = |
| 0751 | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | w | w | 270 = |
| 1046 | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - | w | w | 270 = |
| (A) 1049 | + | - | + | + | + | - | - | - | +s | + | w | w | ? |
| 1226 | + | - | + | + | + | - | - | - | - | + | - | w | 270 > |
| 2000 | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | w | w | 270 > |
| 2011 | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | 270 > |
| 2018 | + | - | + | + | - | - | - | - | - | w | - | - | 270 > |
| 0210 | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | 270 < |
| 1833 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | 270 > |
| 1836 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | 270 > |
| 1837 | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | w | 270 > |
| 1950 | - | - | + | + | w | - | - | - | - | - | - | - | 270 > |
| (B) 1991 | - | - | + | w | - | - | - | - | + | + | w | w | 270 > |
| 1994 | - | w | + | + | + | - | - | - | - | + | w | w | 270 > |
| 1997 | - | w | + | + | w | - | - | - | w | + | w | w | 270 > |
| 1998 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | 270 = |
| 10055 | - | - | + | + | - | - | - | - | w | + | - | - | 270 > |

しかし *S. bayanus* の発育最高温度が 34°C 以下 (“The yeasts” の記載と一致) であったのに対し, *S. sake* が 37°C で増殖したことで区別される。また, *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* から区別され *S. sake* の独立性が見られる (図 2)。尚, “The yeasts” では type strain の *S. sake* Yabe (1895) は試験に用いられなくなったので, この点チェックが出来なかったと思われる。

V. 清酒「もろみ」での酵母生菌数及びアルコール生産の差異

清酒「もろみ」でのアルコール 20% 前後の生産は米, 米麴, 水を原料とする「もろみ」の特性であってビール酵母, ワイン酵母, パン酵母からも 19~20% を生産することが報告³⁵⁻³⁷⁾された。開放発酵の実地醸造試験であって野生酵母の汚染が考えられるが, その点については考察されていなかった。本実験は, これらを考慮して前報の *S. s. stri.* 5 “種”を用いて清酒「もろみ」でのアルコール生産と酵母の生菌数を測定した。

a) 仕込方法: 清酒「もろみ」の原料配合を表 19 に示し

た。総米 160 g, 麴歩合 23.1%, 汲水歩合 120% の三段仕込である。尚, 「添」の米麴は雑菌を殺菌するためにアルコール (80%) 溶液に浸漬後, 乾燥して用いた。酵母は液体培地に培養した沈でん細胞を「添」の仕込水に懸濁して加えた。

酵母によって発酵力に差異があり「もろみ」中で野生酵母や乳酸菌の汚染を防ぐために酵母の添加量 (前培養 8 ml/tube~200 ml/300 ml 三角フラスコ) や「踊」期間の品温, 日数によって調整した。「留」後の品温は一律 18~20°C で行った。

b) YM 液体培地での酵母の増殖量: YM 液体培地 8 ml/tube に培養した懸濁液を適当に稀釈し, 平面培地に塗抹して出現したコロニー数から ml 中の菌数を算出した。全菌株とも 10⁷ オーダであったが, *S. sake* が多く他の菌“種”より 2~4 倍の数であった。「添」仕込後の生菌数は添加した全細胞数/140 g (米・米麴 40 g + 水 100 ml) から計算して「もろみ」1 g 中の生菌数として表わした。

c) 「もろみ」の酵母生菌数の測定: 容器の三角フラスコを激しく振った後に, 「もろみ」2 ml をとり適当に稀釈

表 16 *Sacch. bayanus* の key character (The yeasts, 4 版, 1998)

| IFO no. | 資化 | | 生育 | | | | 生育 | | | | VI 番染色体 Size(kb) | | |
|-------------------|----|-----|------|------|------|------|--------------|----|------------------|----|---------------------|-------------------|---------|
| | Mz | D・M | 30°C | 32°C | 33°C | 34°C | Vt-free days | | P-deficient days | | | Bt-deficient days | |
| | | | | | | | 7 | 10 | 7 | 10 | | 7 | 10 |
| 1127 ^T | - | w | + | w | - | - | + | + | + | + | + | + | 270=(<) |
| 0213 | - | +/w | + | + | - | - | - | - | + | + | w | w | 270=(<) |
| 0613 | - | - | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | ? |
| 0615 | - | - | + | + | w | - | + | + | + | + | + | + | ? |
| 1048 | - | - | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | ? |
| 1343 | - | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | 270= |
| 1620 | - | - | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | ? |
| 10557 | - | - | + | - | - | - | - | - | +s | + | - | - | 270= |
| 10563 | - | - | + | + | w | - | + | + | + | + | w | + | 270= |

表 17 *Sacch. pastorianus* の key character (The yeasts, 4 版, 1998)

| IFO no. | 資化 | | 生育 | | | | 生育 | | | | VI 番染色体 Size(kb) | | |
|---------|----|-----|------|------|------|------|--------------|----|------------------|----|---------------------|-------------------|------|
| | Mz | D・M | 30°C | 32°C | 34°C | 35°C | Vt-free days | | P-deficient days | | | Bt-deficient days | |
| | | | | | | | 7 | 10 | 7 | 10 | | 7 | 10 |
| 1167 | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | 270> |
| 0250 | - | - | + | + | + | - | - | ws | + | + | ws | ws | 270> |
| 1961 | - | - | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | 270> |
| 2003 | - | - | + | + | w | - | - | - | + | + | - | - | 270> |
| 10010 | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | 270> |
| 10610 | - | - | w | - | - | - | - | - | + | + | - | - | 270> |

表 18 *Sacch. paradoxus* の key character (The yeasts, 4 版, 1998)

| IFO no. | 資化 | | 生育 | | | 生育 | | | | VI 番染色体 Size(kb) | | |
|--------------------|----|-----|------|------|------|--------------|----|------------------|----|---------------------|-------------------|----------|
| | Mz | D・M | 34°C | 35°C | 36°C | Vt-free days | | P-deficient days | | | Bt-deficient days | |
| | | | | | | 7 | 10 | 7 | 10 | | 7 | 10 |
| 10609 ^T | + | + | + | w | - | - | - | + | + | - | - | 270< |
| 0259 | + | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | 270< |
| 0263 | + | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | 270< (?) |
| 10053 | + | + | + | - | - | - | ws | + | + | w | w | 270< |
| 10554 | + | + | + | w | - | - | - | + | + | - | - | 270< |
| 10695 | + | + | + | w | w | - | ws | + | + | w | +s | 270< |

Key to species

3 (1). a Ethylamine-HCl assimilated → 4
 b Ethylamine-HCl not assimilated → 6

4 (3). a Growth in the presence of 1000ppm cycloheximide *S.unisporus*:
 b Absence of growth in the presence of 1000ppm cycloheximide → 5

5 (4). a Maltose, raffinose and ethanol assimilated *S.kluuyveri*:
 b Maltose, raffinone and ethanol not assimilated *S.spencerorum*:

6 (3). a Maltose assimilated → 7
 b Maltose not assimilated → 10

7 (6). a Growth in vitamin-free medium *S.bayanus*:
 b Absence of growth in vitamin-free medium → 8

8 (7). a D-Mannitol assimilated; maximum growth temperature 37°C or greater *S.paradoxus*:
 b D-Mannitol not assimilated; maximum growth temperature less than 37°C or variable at 37°C → 9

9 (8). a Active transport mechanism for fructose present; maximum growth temperature 34°C or below *S.pastorianus*:
 b Active transport mecharusm for fructose not present maximum growth temperature variable *S.cerevisiae*

10 (6) a Sucrose, raffinose and trehalose fermented *S.exiguus*
 b Sucrose, raffinose and trehalose not fermented → 11

↓ 省略

————— : *S. serevisiae* complex

図 1 “The yeasts, 4 版” (1998)

Key to species

6 (3). a Maltose assimilated → 7
 b Maltose not assimilated → 10

7 (6). a Growth in vitamin-free medium;
 growth absent above 34°C *S.bayanus*
 maximum growth temperature 37°C or greater *S.sake*
 b Absence of growth in vitamin-free medium → 8

8 (7). a D.Mannitol assimilated;
 maximum growth temperture 37°C or greater *S.paradoxus*
 b D.Mannitol not assmilated;
 maximum growth temperature less than 37°C or variable at 37°C → 9

9 (8). a Active transport mechanism for fructose present;
 maximum grtwh temperature 34°C or below *S.pastorianus*
 b Active transport mechanism for fructose not present;
 maximum growth temperature 35°C or greater *S.cerevisiae*

図 2 “The yeasts (4 版)” での key to species による清酒酵母 (*S. sake*) の位置付

表 19 発酵試験に用いた清酒「もろみ」の配合

| | 初添 | 踊 (期間) | 仲添 | 留添 | 計 |
|-------------------|-------------------|---------|----|----|-----|
| 総米 (g) | 40 | | 50 | 70 | 160 |
| 蒸米 ¹⁾ | 30 | | 38 | 55 | 123 |
| 麴米 ²⁾ | 10 | (1~3 日) | 12 | 15 | 37 |
| 水 (ml) | 100 | | 92 | | 192 |
| 乳酸 (ml) | 0.2 | | | | |
| 酵母数 ³⁾ | 10 ^{8~9} | | | | |

- 1) 精米歩合 90~92%。
 2) 精米歩合 70~75%。初添の麴はアルコール処理で殺菌した。
 3) YM液体培地 8~200ml に前培養し、上澄液を除去して沈んで細胞を汲水に懸濁して添加した。

し、上記のコロニー形成法で出現したコロニー数から、「もろみ」1g 中の生菌数を算出した。

数回の試験をくりかえし「もろみ」表面のガスが消えるまで容器を振ることで、菌数が最高値を示すことが分かった。尚、野生酵母や乳酸菌の汚染確認にはコロニーの形状、T.T.C 染色及び乳酸菌用培地での増殖有無で確認した。

1. 実験結果

「もろみ」での酵母の生菌数とアルコール生産の経過を表 20~24 に示した。

S. sake (表 20) は「もろみ」期間が 22~33 日で、アルコールの生産は 21.8~23.6% であった。「もろみ」初期の酵母数が $(4.0\sim 8.4)\times 10^8/g$ であった。実地仕込での「もろみ」の菌数より多い傾向であった。精米歩合 90~92% の蒸米を用いたことも考えられるが、タンク内の「もろみ」は泡が発生しており完全に消すことが出来ない。本実験のように酵母が密集している泡を完全に消してから採取したことが、菌数が多く計算されたと推察している。実地仕込でのタンク内の酵母数は実際よりは低く算出されていると思われる。

発酵終了後の生菌数は 1 株 ($7.7\times 10^6/g$) を除いて $(2.6\sim 8.9)\times 10^7\sim (1.1\sim 1.2)\times 10^8/g$ であったが、発酵旺盛な「もろみ」初期の生菌数より少なかった。

S. cerevisiae (表 21) は発酵終了までの期間が 11~34

日、アルコール生産量が12.4~19.9%で菌株によって異なった。「もろみ」初期の酵母数は、 $10^{7\sim 8}/g$ オーダで $3.6\sim 4.6\times 10^8/g$ が最高菌数であった。*S. sake* よりも少なかったが、添加酵母数、「踊」の品温や日数との関連性はなかった。発酵終了時の生菌数は検出されない($10^2 >$)菌株もあったが、 $10^{4\sim 6}/g$ オーダの生菌数が多かった。しかし前記の*S. sake* よりは少なかった。

S. bayanus (表 22) は酵母添加量 ($10^7/g$ オーダ)、「踊」

の日数(2日)と品温(25~26°C)は同じ条件で行った。「もろみ」期間は29と58日を除いて、他は11~20日間であった。アルコール生産は14.6~16.5%で菌株間に大きな違いはなかった。「もろみ」初期の酵母数は $10^8/g$ オーダに達しない菌株もあったが、多くても $(1.0\sim 1.5)\times 10^8/g$ であった。発酵終了時の生菌数は、ほとんどの菌株に検出されなかったが、1株(IFO0615)が $6.4\times 10^4/g$ の生菌数であった。本菌数は58日間の長い期間、僅かにガス発生を継続し

表 20 *Sacch. sake* の清酒「もろみ」発酵試験

| 菌株 | 初仕込後 生菌数 (/g) | 踊 | | 「もろみ」品温：18~20°C | | | | |
|-------------------|---------------------|----|------------|-----------------|------------------|------------|------------------|--------------|
| | | | | 発 酵 | | 発 酵 終 了 | | |
| | | 期間 | 品温 (°C) | 日数 (留後) | 生菌数 (/g) | 日数 (留後) | 生菌数 (/g) | アルコール (%) |
| IFO | | | | | | | | |
| 0304 ^T | $[5.0\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 4 | 6.0×10^8 | 32 | 8.9×10^7 | 22.5 |
| 0244 | $[5.3\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 5 | 5.6×10^8 | 28 | 7.8×10^7 | 21.8 |
| 0249 | $[4.6\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 5 | 6.6×10^8 | 31 | 1.1×10^8 | 22.8 |
| 0309 | $[4.1\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 5 | 7.7×10^8 | 22 | 7.7×10^7 | 21.8 |
| ATCC | | | | | | | | |
| 32694 | $[4.6\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 4 | 4.0×10^8 | 22 | 7.7×10^6 | 22.0 |
| 32695 | $[4.3\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 4 | 8.0×10^8 | 31 | 9.6×10^7 | 22.7 |
| 32696 | $[5.6\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 5 | 8.2×10^8 | 33 | 1.2×10^8 | 23.6 |
| 32697 | $[5.3\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 4 | 7.2×10^8 | 31 | 1.1×10^8 | 23.2 |
| 32698 | $[5.3\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 4 | 5.0×10^8 | 28 | 8.4×10^7 | 23.5 |
| 32699 | $[5.6\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 4 | 7.2×10^8 | 27 | 2.6×10^7 | 22.6 |
| 32700 | $[5.8\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 4 | 8.4×10^8 | 26 | 3.0×10^7 | 22.7 |
| 32701 | $[6.0\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 5 | 7.2×10^8 | 27 | 6.4×10^7 | 22.1 |
| 32702 | $[6.0\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 4 | 7.3×10^8 | 31 | 7.8×10^7 | 23.1 |
| 32703 | $[5.6\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 4 | 7.0×10^8 | 33 | 8.0×10^7 | 22.6 |
| Kyokai | | | | | | | | |
| No.7 | $[5.7\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 5 | 7.8×10^8 | 27 | 1.5×10^7 | 22.0 |

生菌数:酵母の生菌数, 平面培地(YM)に塗抹し出現したコロニー数から計算した。

[] :YM液体培地に前培養した酵母を添加した。「もろみ」1g中の酵母数は添加した生菌数から計算した。

表 21 *Sacch. cerevisiae* の清酒「もろみ」発酵試験

| 菌株(IFO) | 初仕込後 生菌数 (/g) | 踊 | | 「もろみ」品温：18~20°C | | | | |
|--------------------|---------------------|----|------------|-----------------|------------------|------------|------------------|--------------|
| | | | | 発 酵 | | 発 酵 終 了 | | |
| | | 期間 | 品温 (°C) | 日数 (留後) | 生菌数 (/g) | 日数 (留後) | 生菌数 (/g) | アルコール (%) |
| 10217 ^T | $[1.3\times 10^7]$ | 1 | 18~20 | 3 | 1.2×10^7 | 20 | $10^2 >$ | 12.4 |
| 0253 | $[3.0\times 10^6]$ | 2 | 18~20 | 4 | 1.5×10^8 | 20 | 4.0×10^5 | 18.5 |
| 0614 | $[1.2\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 6 | 3.6×10^8 | 26 | 3.6×10^5 | 17.0 |
| 0751 | $[6.0\times 10^6]$ | 2 | 18~20 | 4 | 1.2×10^8 | 34 | 3.0×10^5 | 18.2 |
| (A) 1046 | $[2.1\times 10^6]$ | 2 | 18~20 | 3 | 2.3×10^8 | 11 | 2.0×10^4 | 17.4 |
| 1049 | $[5.0\times 10^6]$ | 1 | 28~30 | 4 | 4.6×10^8 | 27 | 6.3×10^6 | 19.8 |
| 1226 | $[2.4\times 10^6]$ | 2 | 18~20 | 4 | 1.3×10^8 | 29 | 1.3×10^5 | 19.4 |
| 2000 | $[2.2\times 10^6]$ | 2 | 18~20 | 3 | 8.2×10^7 | 13 | $10^2 >$ | 16.2 |
| 2011 | $[1.0\times 10^6]$ | 1 | 18~20 | 6 | 4.0×10^7 | 26 | 1.9×10^5 | 17.2 |
| 2018 | $[2.1\times 10^6]$ | 2 | 18~20 | 3 | 6.0×10^7 | 29 | 1.0×10^5 | 18.0 |
| 0210 | $[6.0\times 10^6]$ | 1 | 28~30 | 4 | 8.4×10^7 | 23 | 9.2×10^5 | 15.8 |
| 1833 | $[3.0\times 10^7]$ | 1 | 28~30 | 5 | 1.2×10^8 | 18 | $10^2 >$ | 18.0 |
| 1836 | $[2.2\times 10^7]$ | 2 | 18~20 | 4 | 5.1×10^7 | 14 | 1.4×10^4 | 17.8 |
| 1837 | $[4.2\times 10^6]$ | 1 | 28~30 | 5 | 3.9×10^8 | 27 | 4.0×10^6 | 19.7 |
| (B) 1950 | $[2.2\times 10^6]$ | 1 | 25~26 | 3 | 1.3×10^8 | 17 | $10^2 >$ | 16.8 |
| 1991 | $[5.3\times 10^6]$ | 1 | 28~30 | 4 | 4.3×10^8 | 27 | 1.9×10^6 | 19.9 |
| 1994 | $[6.6\times 10^7]$ | 1 | 28~30 | 5 | 1.2×10^8 | 16 | 2.8×10^5 | 17.4 |
| 1997 | $[8.0\times 10^7]$ | 2 | 25~26 | 2 | 3.2×10^7 | 23 | 9.0×10^5 | 16.4 |
| 1998 | $[9.3\times 10^7]$ | 2 | 28~30 | 2 | 5.6×10^7 | 23 | 1.4×10^4 | 16.2 |
| 10055 | $[1.0\times 10^7]$ | 2 | 25~26 | 2 | 1.0×10^8 | 20 | 4.0×10^4 | 13.6 |

表 22 *Sacch. bayanus* の清酒「もろみ」発酵試験

| 菌株(IFO) | 初仕込後 | | 踊 | | 「もろみ」品温：18~20℃ | | | | |
|-------------------|------------------------|----|-----------|------------|---------------------|------------|---------------------|-------|--------------|
| | 生菌数 (/g) | 期間 | 品温 (℃) | 発酵 | | | 発酵終了 | | アルコール (%) |
| | | | | 日数 (留後) | 生菌数 (/g) | 日数 (留後) | 生菌数 (/g) | アルコール | |
| 1127 ^t | [1.9×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 3 | 1.5×10 ⁸ | 15 | 10 ² > | 16.5 | |
| 0213 | [7.0×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 2 | 1.0×10 ⁸ | 16 | 10 ² > | 15.6 | |
| 0163 | [1.6×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 4 | 6.6×10 ⁷ | 20 | 10 ² > | 14.7 | |
| 0615 | [4.1×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 3 | 1.4×10 ⁸ | 58 | 6.4×10 ⁴ | 14.6 | |
| 1048 | [6.1×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 4 | 7.0×10 ⁷ | 13 | 10 ² > | 15.1 | |
| 1343 | [6.4×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 2 | 5.0×10 ⁷ | 11 | 10 ² > | 15.0 | |
| 1620 | [1.4×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 3 | 1.8×10 ⁷ | 11 | 10 ² > | 15.4 | |
| 10557 | [7.0×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 3 | 6.4×10 ⁷ | 29 | 10 ² > | 15.4 | |
| 10563 | | 2 | 25~26 | 3 | 1.2×10 ⁸ | 15 | 10 ² > | 16.1 | |

表 23 *Sacch. pastorianus* の清酒「もろみ」発酵試験

| 菌株(IFO) | 初仕込後 | | 踊 | | 「もろみ」品温：18~20℃ | | | | | |
|---------|------------------------|----|-----------|------------|---------------------|------------|---------------------|------------|---------------------|-------------|
| | 生菌数 (/g) | 期間 | 品温 (℃) | 発酵 | | | 発酵終了 | | アルコール (%) | |
| | | | | 日数 (留後) | 生菌数 (/g) | 日数 (留後) | 生菌数 (/g) | 日数 (留後) | | 生菌数 (/g) |
| 1167 | [3.7×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 3 | 1.1×10 ⁸ | 5 | 1.6×10 ⁷ | 18 | 10 ² > | 14.3 |
| 0250 | [4.8×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 2 | 8.0×10 ⁷ | 4 | 2.4×10 ⁷ | 11 | 10 ² > | 16.4 |
| 1961 | [1.4×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 3 | 1.1×10 ⁸ | — | — | 19 | 4.4×10 ³ | 14.8 |
| 2003 | [5.2×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 2 | 1.2×10 ⁸ | 4 | 1.9×10 ⁸ | 23 | 6.0×10 ³ | 16.2 |
| 10010 | [4.1×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 2 | 2.0×10 ⁸ | 5 | 9.0×10 ⁷ | 21 | 10 ² > | 16.2 |
| 10610 | [2.3×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 3 | 2.8×10 ⁷ | 6 | 3.8×10 ⁷ | 19 | 10 ² > | 13.8 |

表 24 *Sacch. paradoxus* の清酒「もろみ」発酵試験

| 菌株(IFO) | 初仕込後 | | 踊 | | 「もろみ」品温：18~20℃ | | | | |
|--------------------|------------------------|----|-----------|------------|---------------------|------------|---------------------|-------|--------------|
| | 生菌数 (/g) | 期間 | 品温 (℃) | 発酵 | | | 発酵終了 | | アルコール (%) |
| | | | | 日数 (留後) | 生菌数 (/g) | 日数 (留後) | 生菌数 (/g) | アルコール | |
| 10609 ^t | [1.0×10 ⁶] | 3 | 25~26 | 5 | 5.2×10 ⁸ | 11 | 10 ² > | 16.8 | |
| 0259 | [8.0×10 ⁵] | 3 | 25~26 | 5 | 3.6×10 ⁸ | 19 | 10 ² > | 17.0 | |
| 0263 | [1.6×10 ⁶] | 3 | 25~26 | 5 | 3.2×10 ⁸ | 13 | 2.1×10 ⁵ | 15.7 | |
| 10553 | [1.6×10 ⁶] | 3 | 25~26 | 5 | 4.0×10 ⁸ | 11 | 10 ² > | 15.1 | |
| 10554 | [1.6×10 ⁷] | 2 | 25~26 | 3 | 2.6×10 ⁸ | 19 | 4.0×10 ⁴ | 16.8 | |
| 10695 | [2.5×10 ⁶] | 3 | 25~26 | 5 | 3.2×10 ⁸ | 16 | 10 ² > | 16.6 | |

たがアルコール生産は 14.6% であった。

S. pastorianus (表 23) は酵母添加量 (10⁷/g オーダ), 「踊」の期間と品温は上記の *S. bayanus* と同じ条件である。「もろみ」期間は 11~23 日間で、アルコール生産は 13.8~16.4% であった。「もろみ」2~3 日後の酵母数 (2.8~8.0)×10⁷~(1.1~2.0)×10⁸/g が、それから 2~3 日経過して生菌数が減少しているのがあった。これは肉眼でも発酵ガスの発生が弱くなったのが感じられた。発酵終了時の生菌数はほとんど検出されなかった。以上、本菌“種”は前記の *S. bayanus* と同じ傾向を示した。

S. paradoxus (表 24) は、酵母の添加量が前記の 2 “種”より少ないが「踊」期間 2~3 日、品温 25~26℃ である。「もろみ」の発酵期間は 11~19 日でアルコール生産は 15.1~17.0% で大差なかった。「もろみ」初期の酵母数は (2.6~5.2)×10⁸/g であった。*S. sake* より少ないが、*S. cerevisiae* のなかで最高菌数を示した菌株と同じ値であった。このように多くの菌数を形成するが発酵期間も短く、発酵終了時

には 2 株に (4.0×10⁴) と (2.1×10⁵)/g の生菌数が認められたが、他の菌株は検出されなかった。

2. *S. sake* の特異性

S. sake は YM 液体培地での増殖が他の菌“種”より 2~4 倍量であった。「もろみ」中でも大半の酵母が (6.0~8.4)×10⁸/g の菌数で他の菌“種”より多かった。一方、発酵終了時のアルコール濃度は 21.8~23.6% であった。菌数は減少しているが、1 株を除いて (1.5~8.9)×10⁷~(1.1~1.2)×10⁸/g の生菌数であった。これはアルコール濃度が 21~23% に達しても酵母が生存しアルコール発酵が行われたもので、*S. sake* の生存能及び発酵能のアルコール耐性は 21~23% であると言える。

S. cerevisiae のアルコール生産は 12.4~19.9% で、発酵終了時の生菌数にも菌株間に差が見られたが、4 株に検出されず他の菌株は 10^{4~6}/g オーダで検出された。*S. sake* と異なるのは、アルコール濃度が低いのに生菌数が少な

い。これは生存能のアルコール耐性が *S. sake* より低いことを意味しており、*S. cerevisiae* の生存能のアルコール耐性は 12~19% 以下である。

S. bayanus はアルコール生産が 14.7~16.5%、生存能のアルコール耐性は 14~16% 以下で発酵終了時は、ほとんどの菌株が消滅していた。

S. pastorianus はアルコール生産が 13.8~16.4%、生存能のアルコール耐性は 13~16% 以下であった。これは前記 *S. bayanus* と同じ傾向であった。

S. paradoxus はアルコール生産が 15.1~17.0%、生存能のアルコール耐性が 15~16% 以下で殆んどの菌株が消滅していたが、生存したとしても $10^{4\sim5}/g$ オータであった。本菌“種”の特徴として「もろみ」初期に $(2.6\sim5.2)\times 10^8/g$ の菌数を形成することであった。

以上、*S. sake* は他“種”と比べて、「もろみ」中に多くの菌数を形成し、生存能のアルコール耐性が高くアルコール生産量も多いのが特性である。

VI. 清酒「もろみ」での高泡形成の差異

発酵旺盛な時期に、清酒「もろみ」は高泡を形成するのが普通である。これは清酒酵母の細胞表層の特性によるもので、表層に疎水基が露出し気泡（発酵ガス）に吸着して高泡を形成すると考えられている。これに対しビール酵母、ワイン酵母、パン酵母らは発酵ガスを発生するが、高泡を形成⁹⁾しない。本実験では、前記で使用した *S. s. stri.* 5 “種”について高泡形成試験を行った。

a) 清酒「もろみ」の原料配合：容器の大きさで異なるが、500 ml 三角フラスコで総米 130 g、水 200 ml。又は円筒形の 1 l 容量で総米 260 g、水 400 ml である。両者とも精米歩合 70~75%、米麴使用歩合 23%、汲水歩合 154%、乳酸 2 ml/水 1 l の割合。酵母は YM 液体培地に前培養した沈でん細胞を加えて 18~20°C に放置した。米麴のアルコール浸漬による殺菌は、高泡形成を弱くするのでそのままを使用した。

b) 麦汁：麦芽 1 kg に 300~400 ml の湯を加え 50~60°C で、約 2 時間放置して濾過後、約 10 分煮沸し再度濾過する。その濾液を 1 l の円筒形容器に 700 ml を入れ、沈でん酵母を加えて 18~20°C に放置した。

実験結果

a) 清酒「もろみ」での高泡形成

酵母添加して 1~3 日後にはガスの発生が認められた。高泡を形成する菌株は、3 日後には高泡を形成し 5~6 日間持続する。その後は泡の形成も弱くなり高泡形成を始めてから 10 日間位を経過すると泡の形成は見られない。しかしガスの発生は持続する。高泡の高さが菌株で異なったが、泡の形成が弱くてはっきりしないのは総米 260 g で行った。また繁殖、ガス発生が遅い菌株は酵母の接種量を多くした。

S. sake はテスト総米 130 g で行った。泡の高低の違いが見られたが全菌株とも明らかに高泡を形成した。

S. cerevisiae, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus*

は全菌株が高泡を形成しなかった（再現性があった）。しかし発酵ガスの発生は旺盛であった。

以上、*S. sake* は高泡を形成するが他の菌“種”はすべて形成しなかったことは、分類での key として用いることができる。

b) 麦汁での高泡形成

各“種”の代表株で行った。酵母を添加して 1 日後には僅かな増殖であったが、2 日後には液内が白濁し表面には高さ 1 cm 位の泡を形成し、5 “種”間に違いは見られなかった。ビールをグラスについた時に発生する泡の性質に似ており粘りけのないさらついた感じで、これは気泡が大きく粘りけのある清酒「もろみ」の泡とは異なった性質であった。

高泡形成試験は、清酒「もろみ」に限定されるが前記のアルコール生産試験で行った「もろみ」では、高泡形成株でも再現性を得ることができない。これは「添」仕込に用いる米麴をアルコール処理すると泡の形成が弱くなること分かった。また「添」仕込で多数の酵母を添加し高温経過をとったため高泡形成に必要なとするデキストリ系の物質が少なく粘性が不足するためと考えられる。

VII. カリ欠培地での増殖、イーストサイジン耐性、細胞表層荷電 (pH 3.0)、抗原構造 No. 5 及びアルシアンブルー染色の差異

1. カリ欠培地での増殖

カリ(K)欠培地⁹⁾を試験管に 5~6 ml 分注し殺菌後、YM 液体培地に前培養した酵母を蒸留水で 3 回洗浄し、その懸濁液 1 滴を接種（細胞数 $10^{4\sim5}/$ 培地 10 ml）して 27~28°C で 10 日間培養する。

2. イーストサイジン耐性

Ballg 7~10 度、pH 6~7 の麴汁を三角フラスコに分注（表面積を広くする）殺菌後、麴菌 (*Aspergillus oryzae*) を 25~27°C、20~25 日間静置培養して濾過する。濾液には麴菌が生産した抗菌性物質のイーストサイジンが含まれる。培養液の一部をとって耐性試験を行う。清酒酵母が増殖し抵抗性の弱い既知の菌株が増殖しないことを確かめて全体を濾過する。清酒酵母より耐性の弱い菌株のなかでも耐性に強弱がある。パン酵母群³⁸⁾に耐性株が多いのでそれから選ぶとよい、例えば IFO 2042³⁹⁾。

濾液を pH 4~5 に調整 (NaOH) し、試験管に 6~7 ml を分注殺菌して培地とする。これに YM 液体培地に前培養した供試株の懸濁液を 1 白金輪接種し 27~28°C、7 日間培養する。増殖する菌株をイーストサイジン耐性+で表示した。尚、抗菌性物質のイーストサイジンは麴汁のみで生産する。

3. 細胞表層荷電 (pH 3.0)^{40,41)}

pH 3.0 の洗浄細胞懸濁液を U 字型泳動セルを用いて、界面移動電気泳動法を行った。細胞が陽極方向への泳動を -、陰極への泳動を + で表示し、酵母細胞表面の荷電状態と同一にした。

4. 抗原構造 No. 5⁴²⁾

抗原として *S. uvarum* IFO 0751 を用いて得られた抗血清から吸収菌として *S. sake* kyokai No. 7 を用いて吸収血清 No. 5 を作製した。YM 寒天培地で培養した供試菌株の細胞懸濁液と吸収血清 No. 5 をスライド上で反応させ、凝集性を示したのを抗原 No. 5 を有する菌株として + で表示した。

5. アルシアンブルー染色⁴³⁾

液体培養細胞を 0.02N・HCl 溶液で洗浄後、沈でん細胞に 0.1% アルシアンブルー溶液を加えた。細胞が青色に染色する菌株を +, 無染色細胞 (白色) を - で表示した。尚、± は neutral である。

実験結果

各酵母の性質を表 25~29 に表示した。

a) カリ欠培地での増殖は、*S. sake* が + と - に分けられたが、他菌 “種” *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* 及び *S. paradoxus* の全菌株に増殖が認められず - であった。

b) イーストサイジン耐性は、*S. sake* の全ての菌株が耐性 + であった (麴菌培養液に増殖)。一方、他の 4 “種” の全菌株に耐性が認められず - であった。

c) pH 3.0 における細胞表層の荷電状態は、*S. sake* は 1 株 (ATCC 32699) が ± (pH 3.0 で neutral, 等電点) で、他の菌株は + 荷電であった。*S. cerevisiae* は 3 株が + 荷電で、他の 17 株は - 荷電。*S. bayanus* は全菌株が - 荷電。*S.*

表 25 *Sacch. sake* の性質

| 菌株 no. | 生 育 | | イーストサイジン耐性 | 細胞表層荷電 (pH3.0) | 抗原 No.5 | アルシアンブルー染色 |
|-------------------|------------|--|------------|----------------|---------|------------|
| | カリ (K) 欠培地 | | | | | |
| <u>IFO</u> | | | | | | |
| 0304 ^T | - | | + | + | - | - |
| 0244 | - | | + | + | - | - |
| 0249 | - | | + | + | - | - |
| 0309 | - | | + | + | - | - |
| <u>ATCC</u> | | | | | | |
| 32694 | + | | + | + | - | - |
| 32695 | + | | + | + | - | - |
| 32696 | - | | + | + | - | - |
| 32697 | - | | + | + | - | - |
| 32698 | + | | + | + | - | - |
| 32699 | - | | + | ± | - | - |
| 32700 | - | | + | + | - | - |
| 32701 | + | | + | + | - | - |
| 32702 | + | | + | + | - | - |
| 32703 | + | | + | + | - | - |
| <u>Kyokai</u> | | | | | | |
| No.7 | + | | + | + | - | - |

表 26 *Sacch. cerevisiae* の性質

| IFO no. | 生 育 | | イーストサイジン耐性 | 細胞表層荷電 (pH3.0) | 抗原 No.5 | アルシアンブルー染色 |
|--------------------|------------|--|------------|----------------|---------|------------|
| | カリ (K) 欠培地 | | | | | |
| 10217 ^T | - | | - | - | + | + |
| 0253 | - | | - | - | + | + |
| 0614 | - | | - | + | + | ± |
| 0751 | - | | - | - | + | + |
| (A) 1046 | - | | - | - | + | + |
| 1049 | - | | - | - | + | + |
| 1226 | - | | - | - | + | + |
| 2000 | - | | - | - | + | + |
| 2011 | - | | - | - | + | + |
| 2018 | - | | - | - | + | + |
| 0210 | - | | - | - | + | + |
| 1833 | - | | - | - | + | + |
| 1836 | - | | - | - | + | + |
| 1837 | - | | - | + | + | ± |
| (B) 1950 | - | | - | + | + | ± |
| 1991 | - | | - | - | + | + |
| 1994 | - | | - | - | + | + |
| 1997 | - | | - | - | + | + |
| 1998 | - | | - | - | + | + |
| 10055 | - | | - | - | + | + |

表 27 *Sacch. bayanus* の性質

| IFO no. | 生 育 | | イースト- サイジン耐性 | 細胞表層荷電 (pH3.0) | 抗原 No.5 | アルシアン ブルー染色 |
|-------------------|------------|---|-----------------|-------------------|---------|----------------|
| | カリ (K) 欠培地 | | | | | |
| 1127 ^T | - | - | - | - | + | + |
| 0213 | - | - | - | - | + | + |
| 0613 | - | - | - | - | + | ± |
| 0615 | - | - | - | - | + | + |
| 1048 | - | - | - | - | + | + |
| 1343 | - | - | - | - | + | + |
| 1620 | - | - | - | - | + | + |
| 10551 | - | - | - | - | + | + |
| 10563 | - | - | - | - | + | + |

表 28 *Sacch. pastorianus* の性質

| IFO no. | 生 育 | | イースト- サイジン耐性 | 細胞表層荷電 (pH3.0) | 抗原 No.5 | アルシアン ブルー染色 |
|---------|------------|---|-----------------|-------------------|---------|----------------|
| | カリ (K) 欠培地 | | | | | |
| 1167 | - | - | - | - | + | + |
| 0250 | - | - | - | - | + | + |
| 1961 | - | - | - | ± | + | ± |
| 2003 | - | - | - | - | + | + |
| 10010 | - | - | - | - | + | + |
| 10610 | - | - | - | - | + | + |

表 29 *Sacch. paradoxus* の性質

| IFO no. | 生 育 | | イースト- サイジン耐性 | 細胞表層荷電 (pH3.0) | 抗原 No.5 | アルシアン ブルー染色 |
|--------------------|------------|---|-----------------|-------------------|---------|----------------|
| | カリ (K) 欠培地 | | | | | |
| 10609 ^T | - | - | - | - | + | + |
| 0259 | - | - | - | - | + | + |
| 0263 | - | - | - | - | + | + |
| 10553 | - | - | - | - | + | + |
| 10554 | - | - | - | - | + | + |
| 10695 | - | - | - | - | + | + |

pastorianus は 1 株が±で、他の菌株は-荷電。*S. paradoxus* も全菌株が-荷電であった。

d) 抗原構造 No. 5 は、*S. sake* の全菌株が-であった。これに対し *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* 及び *S. paradoxus* の全ての菌株が抗原 No. 5 を有しており+であった。

e) アルシアンブルー染色は、*S. sake* の全菌株が-であった。他の菌“種”のなかで *S. cerevisiae* 3 株、*S. bayanus* 1 株、*S. pastorianus* 1 株が±で、他の菌株は全て+であった。以上、5 項目においても *S. sake* は、*S. s. stri.* の 4 “種” から区別される。

VIII. GC 含量と DNA 相同性 (類似度)^{26, 29)}

実験結果

GC 含量は *S. sake* (15 株) 35.7~37.7% の範囲で、*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* は同範囲内にあった。*S. bayanus* と *S. pastorianus* は若干高い傾向であったが、5 “種” 間に区別される値ではなかった (表 30)。

S. sake と他の *S. s. stri.* 4 “種” 間の DNA 類似度を表 30 に示した。*S. sake* (15 株) は *S. cerevisiae* IFO 10217^T との類似度が 70~92% であったのに対し、*S. sake* と *S. bayanus* IFO 1127^T 及び *S. pastorianus* IFO 1167 の 2 種

間との類似度は 50% 以下 (1 株、57%) であった。*S. paradoxus* IFO 10609^T との類似度は 25~61% で広い範囲を示した。以上、*S. sake* と *S. cerevisiae* の基準株が高い DNA 類似度の値を示した。

山田ら²⁹⁾ の報告と比較したのが図 3 である。*S. cerevisiae* IFO 10217^T は *sake yeast* (sym: *S. cerevisiae*, 5 株) との類似度が 71~113% で高い値を示 (図 3 の (A)) し、他の 3 “種” とは低い値を示しているのは、筆者の結果 (図 3 の (B)) と概ね一致する。また *S. paradoxus* との類似度が 46~60% で、25~44% の低い値は見られないが、使用菌株が少ないので比較できない。

各“種”間の DNA 類似度を“The yeasts, 4 版”から紹介するが、*S.* 属の解説文の最後のコメントで次の様に記載されている。具体的な数値ではないが、これを図示したのが図 4 である。*S. s. stri.* 4 “種”間の DNA 類似度が低く、形質の違いも見出されていることから妥当な分類法が確立されている。一方、*S. sake* は“The yeasts, 4 版”においても従来通り *S. cerevisiae* の sym. として扱われている (key character のビタミン要求性は異なる)。山田ら⁴⁴⁾、筆者の実験結果において DNA 類似度が高いことから当然の様に思われるが、“The yeasts, 4 版”では実験株として *S. sake* が使用されていないことも考えておかなばならない。

表 30 *Sacch. sake* と他の *Sacch. sensu stricto* 間の DNA 類似度

| Strains | Percent DNA hybridization (similarity) | | | | |
|--------------------------------------|--|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| | <i>S. sake</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. bayanus</i> | <i>S. pastorianus</i> | <i>S. paradoxus</i> |
| | IFO 0304 ^T | IFO 10217 ^T | IFO 1127 ^T | IFO 1167 | IFO 10609 ^T |
| <i>S. sake</i> IFO 0304 ^T | 100 | 81 | 25 | 38 | 52 |
| Other 14 strains of <i>S. sake</i> | 72~97 | 70~92 | 21~30 | 35~57 | 25~44** 46~61*** |

※4 strains, ※※10 strains

GC (%) : *S. sake* IFO 0304^T, 36.8. Other 14 strains of *S. sake*, 35.7~37.7
S. cerevisiae IFO 10217^T, 36.8. *S. bayanus* IFO 1127^T, 38.4.
S. pastorianus IFO 1167, 38.4. *S. paradoxus* IFO 10609^T, 36.6.

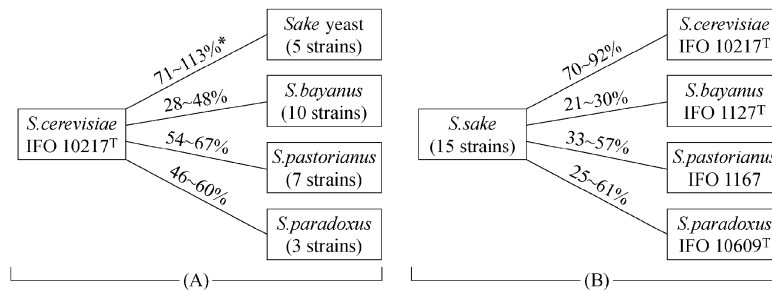


図 3 *Sacch. sensu stricto* の DNA 類似度

(A) 山田, 見方, 坂野 : Bull. JFCC (9), 5-119 (1993)

*Sake yeast : IFO 0304, 71%. IFO 0244, 113%. IFO 0249, 97%.
 IFO 0309, 76%. Kyokai No. 7, 81%

(B) 筆者, 実験

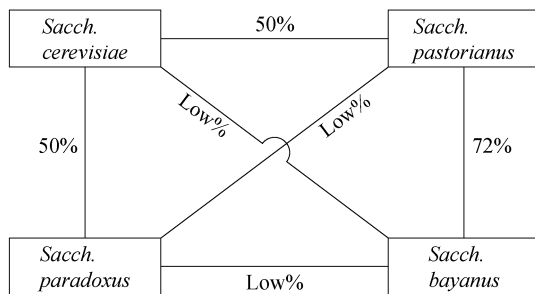


図 4 *Sacch. sensu stricto* 間の DNA 類似度 (The yeasts, 4 版, 1998)

DNA 類似度は、あくまでも補足的なものであって絶対的なものではない。*S. sake* と *S. cerevisiae* の類似度が 70~100% 内であるのに、筆者の研究結果から多くの形質で区別されることは、むしろ問題提起となる。筆者は安定した再現性のある、しかも多くの形質で区別されることを重視して矢部²⁾ が命名した清酒酵母の species original name, *S. sake* は *S. cerevisiae* と区別するのが妥当と考える。

IX. *S. sake* の学名は妥当である

清酒酵母の *S. sake* は、*S. cerevisiae* complex に統合されていた。“The yeasts, 4 版” では DNA 相同性が 4 つに分けられることから、それぞれ *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* 及び *S. paradoxus* の 4 “種” がもうけられている。DNA 類似度のみで分類されたのではなく、各々

の形質の違いが見出され key として採用されている。しかしこれらの key character による清酒酵母の位置付けは明確にされていない。

即ち、先にも述べたが *S. sake* はビタミン・フリー培地での増殖が+で、*S. bayanus* に近い菌“種”となるが、発育温度が 37°C で増殖し、*S. bayanus* は 34°C で発育しない点で異なり *S. s. stri.* 4 “種” のどの“種”にも属しないことになる。しかし、図 2 で見られるように“The yeasts, 4 版”で清酒酵母 (*S. sake*) は独立性を示している。

4 版“The yeasts”の key character にこれまでに述べてきた形質を加え、*S. sake* を含んだ *S. s. stri.* 5 “種”の性質をまとめたのが表 31 である。melezitose の資化性を始めとして新に追加した形質は 9~10 項目である。これらの形質のなかでイーストサイジン耐性、細胞表面荷電、抗原構造 No. 5、アルシアンブルー染色、及び清酒「もろみ」でのアルコール生産と高泡形成等の形質は、*S. sake* の形質に対し他の 4 “種”が全く逆の性質を示し、*S. s. stri.* の 4 “種”とはかけ離れ独立した存在である。そして *S. sake* と *S. bayanus*, *S. cerevisiae* から明確に区別することができた。VI 番染色体の大きさで *S. sake* と *S. paradoxus* が他“種”と異なり 270 (kb) < であったが、他の形質で異なった。

melezitose の資化性は *S. sake*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* が-で、*S. paradoxus* は+であった。*S. cerevisiae* は +/- であるが、+は醸造酵母のビール酵母、ワイン酵母でその他の *S. cerevisiae* は-である。しかし *S. bayanus*, *S.*

表 31 清酒酵母 (*S. sake*) の特性

| 試験項目 | “The yeasts (4版)”による同定 | | | | | |
|------------------------|--------------------------|-----------------------------|--|--|--|-----------------------------|
| | <i>S. sake</i> | <i>S. bayanus</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. pastorianus</i> | <i>S. paradoxus</i> | |
| 資化 | D.マンニトール | — | (V)/— | — | — | + |
| | メレジトース | — | — | +/- | — | + |
| 生育 | 35°C | + | — | + | — | W/- |
| | ビタミン欠培地 | + | +/(—) | — | — | — |
| | カリ (K) 欠培地 | +/- | — | — | — | — |
| 細胞表面荷電 (pH3.0) | +/(±) | — | -/(+) | -/(±) | — | — |
| VI 番染色体長 (kb) | 270</=(=) | 270≠/? | 270>/(<=) | 270> | 270< | 270< |
| アルシアンブルー染色 | — | +/(±) | +/(±) | +/(±) | — | + |
| イーストサイジン耐性 | + | — | — | — | — | — |
| 抗原 No.5 | — | + | + | + | + | + |
| 清酒 (もろみ) | 最高生菌酵母数 (/ml) | (4.0~8.4) × 10 ⁸ | (1.8~7.0) × 10 ⁷ (1.0~1.5) × 10 ⁸ | (1.2~8.4) × 10 ⁷ (1.2~4.6) × 10 ⁸ | (2.8~8.0) × 10 ⁷ (1.1~2.0) × 10 ⁸ | (2.6~5.2) × 10 ⁸ |
| | アルコール生産 (%) | 21.8~23.6 | 14.6~16.5 | 12.4~19.9 | 13.8~16.4 | 15.1~17.0 |
| | 高泡形成 | + | — | — | — | — |
| 生息地 (<i>habitat</i>) | 清酒「もろみ」 (清酒「もろみ」には生息しない) | | | | | |

(): rarely

pastorianus にも醸造酵母が含まれるが, *S. sake* と同様に—であった。

“The yeasts 4版”でビール酵母の *S. cerevisiae* Meyen ex E.C Hansen (1883) に統合されている菌“種”のなかで, melezitose を資化しない醸造酵母以外の酵母は, 新たな菌“種”として区別される可能性がある。

以上, 清酒酵母は“*The yeasts, 4版*”の分類で独立した存在であった。新に追加した形質の違いでより明確に区別することができた。

清酒酵母は *S. sake* の学名が妥当である。

X. *S. sake* は日本だけでしか分離できない

S. sake の特異性を見出したが, 実験に使用した *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* のなかには, *S. sake* に近い菌株は認められなかった。これらの菌株は, 外国で分離されたもので *S. sake* だけは分離できなかったと推察される。

筆者は, 熱殺菌 (高温糖化後, 100°C 40分) した清酒「もろみ」にノルウェーで採集 (8月) したツンドラを加え集積培養後, *S. sake* を分離した。清酒酵母は, 外国に生息しないと言うのでなく特異的な環境を有する清酒「もろみ」が, 外国にないため分離できないものと考えている。ヨーロッパで清酒造りをやれば, 酵母添加をしなくても野生の *S. sake* が優位に生息を形成し日本酒 (清酒) ができて, *S. sake* も簡単に分離できると考えている。

S. sake は清酒造りをやっている日本だけでしか分離できないもので, 日本酒の文化である。

平成15年, 日本生物工学会で座長 (芦沢, サントリー研究所) から *S. sake* の復活を, というコメントがあった。又, *S. sake* は外国で分離されているかとの質問もあった (下飯, 酒類総研)。

S. sake が世界に認められることは清酒業界の発展にもつながる。

参考文献

- 1) KOSAI, Y. and YABE, K., 1895. Central, f. Bakt., II, 1, 619-620.
- 2) YABE, K., 1897. Bull. Imp. Univ. Coll. Agr. Tokyo, 3, 221-224.
- 3) Stelling-DEKKER, N.M., 1931. “Die sporogenen Hefen,” Verhandl. Koninkl. Akad. wetenschap. Afd. Natuurkum, sect. II, 28, 1-547.
- 4) NAKAZAWA, R., 1909. Central. f. Bakt., II, 22, 529-540.
- 5) 竹田正久・塚原寅次, 1975. 発工, 53 (3), 103-111.
- 6) コーワン微生物分類学事典1998. (S.T. コーワン著, L.R. ヒル編: 駒形和男・杉山純多・安藤勝彦・鈴木健一朗・横田 明訳) 学会出版センター.
- 7) 中瀬 崇, 1989. 化学と生物, 27, 332-339.
- 8) Vaughan MARTINI, A. and C.P. KURTZMAN, 1985. Int. J. Syst. Bacteriol. 35, 508-511.
- 9) Vaughan MARTINI, A. and A. MARTINI, 1987. Antonie van Leeuwenhoek. 53, 77-84.
- 10) Vaughan MARTINI, A., 1989. System. Appl. Microbiol. 12, 179-182.
- 11) 金子喜信, 1994. 化学と生物, 32 (10), 641-645.
- 12) 鈴木健一朗, 1995. 生物工学, 73, 429.
- 13) 大内弘造・長井利之・菅間誠之助・野白喜久雄, 1966. 醸協, 61 (7), 646.
- 14) 矢部規矩治, 1985. 東京化学誌, 16, 206-213.
- 15) 竹田正久・塚原寅次, 1960. 醸協, 55 (3), 71-74.
- 16) 溝口晴彦・藤田栄信, 1981. 発工, 59 (2), 186.
- 17) 小穴富司雄・水野三郎, 1934. 醸試, 119, 283-305.
- 18) 小穴富司雄・本多紀元・原田保一・横澤義雄, 1936. 醸試, 124, 205-214.
- 19) 池見元宏, 1981. 醸造論文集, 36, 89-98.
- 20) 塚原寅次, 1961. 醸協, 56 (9), 888-890.
- 21) 北陸酒造技術研究会, 1995. 醸協, 90 (9), 682-684.
- 22) 齊藤久一・渡邊誠衛・田口隆信・高橋 仁・中田建美・岩

- 野君夫・石川雄章, 1993. 醸造論文集, 48, 1-5.
- 23) 齊藤久一, 1996. 醸協, 91 (9), 616-618.
- 24) 齊藤久一, 1997. 学位論文, 東京農業大学.
- 25) Kozo OUCHI, Hiroichi AKIYAMA, 1971. Agri, Biel, Chem., 35 (7), 1024-1032.
- 26) 山田より子・金子喜信・見方洪三郎, 1990. Bull, JFCC, 6, 76-85.
- 27) 後藤邦康・蓮尾徹夫・小幡孝之・原 昌道, 1990. 醸協, 85 (3), 185-189.
- 28) 佐藤雅英, 1994. 生物工学, 72 (6), 493.
- 29) 山田より子・見方洪三郎, 1993. Bull, JFCC, 9, 95-119.
- 30) Vaughan-MARTINI and Cletus P. KURTZMAN, 1985. Int J. system. Bact. 35, 508-511.
- 31) Vaughan-MARTINI, System. 1989. Appl. Microbiol. 12, 179-182.
- 32) Vaughan-MARTINI and MARTINI, 1993. System. Appl. Microbiol. 16, 113-119.
- 33) Cletus P. KURTZMAN and Jack W. FELL, 1998. The yeasts. a taxonomic study. 4th ed.
- 34) CARLE, G.F. and M.V. OLSOM, 1985. Natl. Sci. 82, 3756-3760.
- 35) 山田正一・森 孝三・井上忠夫, 1943. 醸協, 38, 65.
- 36) 山田正一・室谷 博, 1946. 醸協, 41, 9.
- 37) 山田正一・室谷 博・井上忠夫・田中八右衛門, 1946. 醸協, 41, 10.
- 38) 竹田正久・塚原寅次, 1965. 発協, 23, 449-458.
- 39) 穂坂 賢・新宅信彦・矢作直子・中田久保・坂井 勲・塚原寅次, 1987. 発工, 65 (3), 191-197.
- 40) Hiroo MOMOSE, Kimio IWANO and Ryozo TONOIKE, 1969. J. Gen. Appl. 15, 19-26.
- 41) 角野一成・川瀬 治・谷 喜雄・福井三郎, 1966. 発工, 44 (9), 594-601.
- 42) 小玉健太郎・小崎道雄・北原覚雄, 1975. 発工, 53 (11), 763-769.
- 43) BALLOU C.E., 1990. Methods Emzymol. 185, 440-470.
- 44) 山田より子・見方洪三郎・坂野 勲, 1993. Bull. JFCC, Vol. (9), 95-119.

“The *sake* yeast is a culture of Japanese *sake*”
It is only Japan that can isolate the *sake* yeast
(*Saccharomyces sake*)

By

Masahisa TAKEDA*

(Received October 3, 2003/Accepted October 30, 2003)

Summary : The *sake* yeast is not isolated in any other country though in Japan the author found the characteristics of *sake* yeast (*S. sake*).

It is not that the *sake* yeast (*S. sake*) does not existing abroad, but it is just that *sake* mash (*koji* mold, steamed *rice*, and water) existing in Japan is not made abroad. As a whole, the *sake* yeast cannot live dominant abroad. Inversely, the *sake* yeast (*S. sake*) has the characteristics of living dominant in *sake* mash, so that it can be isolated only in Japan.

It is the very *sake* yeast (*S. sake*) that is the culture of Japanese *sake*, as it can be isolated in Japan where *sake* *jozo* is performed.

Key Words : *sake* yeast, *sake* mash, *S. sake*, culture of Japan

* Professor Emeritus, Tokyo University of Agriculture