

The yeasts, a taxonomic study 第5版の Key to species による 国酒酵母の分類学的特徴付け

森谷千星, 小泉麻衣子, 中山俊一, 鈴木健一郎, 門倉利守*

東京農業大学応用生物科学部醸造科学科 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

清酒, 泡盛, 焼酎が「国酒」に位置づけられ, 国酒醸造に用いられる清酒酵母, 泡盛酵母, 焼酎酵母は国酒酵母 (*kokushu yeast*) と総称できる. これらの酵母は, 1952年に出版された *The yeasts, a taxonomic study* (以下 *The yeasts*) で清酒酵母が *Saccharomyces cerevisiae* に分類されたことを機に, ほとんどが分類学的には *S. cerevisiae* として扱われている. しかし, *S. cerevisiae* は多様な起源を有する複合群として成り立っており, 実際には国酒醸造に適した酵母は, 独自の特性を有している. そこで, 多くの国酒由来の酵母を収集し, 分類学的特性を再確認することを目的に, *The yeasts* 第5版の *Saccharomyces* 属 *Key to species* に従って, 国酒由来の酵母 96 株の特徴付けを行った. *Key to species* の7項目の生理学的試験のうち, 特にビタミン欠如培地での生育試験において, *S. cerevisiae* は陰性とされているのに対し, 国酒由来の酵母の 90 株は陽性を示した. *Key to species* の結果から, これら国酒酵母は *S. cerevisiae* とは異なる性質を有し, 他の種とも一致しない一群を形成し, 本研究では国酒酵母を含む *Saccharomyces* 属の表現性状で改めて整理を行い, その結果は *Saccharomyces* 属の種レベルの分類体系の再構築の基盤となるとともに, 実用上の有用菌株の選択にも貢献するものと考えられた.

キーワード: *Saccharomyces cerevisiae*, sake yeast, *awamori* yeast, *shochu* yeast, taxonomy, characteristics

序 文

微生物が認識される以前から酒類醸造は経験的に行われ, 品質の向上が図られてきたが, 欧米でも酒類醸造にかかわる微生物の科学的な解明は 19 世紀のパスツールの登場を待たなければならなかった. 日本の伝統的な酒類の醸造工程が研究され, 初めて酵母が分離されたのは 19 世紀末でそれほど時代的隔たりはなく, 生態学, 形態学, 生理学的な相違からさまざまな学名が付けられ, 識別されていた. 清酒酵母は Kozai & Yabe (1895) により初めて米麹から純粹分離され, Yabe (1897) により *Saccharomyces sake* と命名された. その後, Nakazawa (1909) は清酒由来の試料から清酒酵母を分離し, *Saccharomyces tokyo*, *Saccharomyces yedo* と命名した. また, 泡盛酵母は Inui (1901) が泡盛醪から分離し, *Saccharomyces awamori* と命名した. 一方, 焼酎醪からは 1915~1960 年頃に多様な焼酎酵母が分離され, それぞれに異なる学名が付けられている (西谷, 1982). そして, 2010 年に日本の清酒, 泡盛, 焼酎が「国酒」と称されるようになった (佐藤, 2013) ことから, 清酒酵母, 泡盛酵母,

焼酎酵母をまとめて, 国酒酵母 (*kokushu yeast*) と呼ぶことができる. 一方, 酵母分類学の進展とともに, 1931年にオランダの Stelling-Dekker により清酒酵母は *S. cerevisiae* の一変種 (variety) としてまとめられた (Stelling-Dekker, 1931). そして, これを機に日本の醸造における異なる学名が付された酵母は, *The yeasts, a taxonomic study* (以下 *The yeasts*) で *Saccharomyces cerevisiae* のシノニムとして記載されるようになっていった (Lodder & Kreger-van Rij, 1952; Van der Walt, 1970; Yarrow, 1984; Vaughan-Martini & Martini, 1998, 2011). また, *S. awamori* については, 当初, 子嚢胞子形成が不明確であったため, *Candida robusta* として議論され, *The yeasts* 第3版 (Yarrow, 1984) まで分類位置が不明 (*incertae sedis*) となっていたが, *The yeasts* 第4版 (Vaughan-Martini & Martini, 1998) ではじめて *S. cerevisiae* のシノニムとして記されたという経緯をもつ株も含まれる. *S. cerevisiae* は自然界の多様な環境から分離されるだけでなく, 酒類, パンを始めさまざまな食品製造および醸造過程にかかわる株を包む複合群と理解されている. したがって, 国酒酵母は *S. cerevisiae* という種に包含されると認識され, それ以上の分類学的検討はあまり行われていないが, 多くの清酒酵母, 泡盛酵母の株に対する分類学的検討により, その独自性の解明が

*Corresponding author

E-mail: kadokura@nodai.ac.jp

Accepted: August 20, 2020

試みられ、いくつかの国酒酵母の特性が報告されてきた（竹田・塚原, 1971, 1975; 竹田ら, 1983; 中田ら, 1984, 1985a, b). さらに、最近では多くの国酒醸造で利用されている日本醸造協会頒布の「きょうかい酵母®」（以後、協会酵母と称す）や県試験場などの実用酵母として、アルコール発酵能、香味成分生成能が高い等、多様な醸造上優良な株が選抜されている。これらの酵母の特性については、協会酵母の代謝機構解明（浅野, 2007; 渡辺・高木, 2016）、醸造特性にかかわる遺伝子の同定（赤尾ら, 2018; 根来ら, 2017）、協会酵母と実験室酵母の比較（加藤・下飯, 2010）、協会酵母の系統進化（赤尾, 2014）等の報告がある。しかし、これらの研究に用いられた株は系統的には限定的であり、胞子形成能の衰退などから Gallone *et al.* (2016) が述べているように、産業的に馴化され、収斂した酵母である可能性も考えられる。最近では *S. cerevisiae* の多様性の解明にはゲノム情報を用いた解像度の高い系統解析が行われるようになってきた。そのなかで国酒酵母の分類学的位置を明確にするためには、より多くの国酒由来の酵母、特に古くに分離された株を集めてその分離源、醸造特性などの情報とともに表現性状に基づく分類を明らかにしておく必要がある。そこで、できるだけ多様な由来の清酒酵母、泡盛酵母、焼酎酵母を集め、現在酵母分類学の基準となっている The yeasts 第5版の *Saccharomyces* 属 Key to species に基づいて同定を試み、国酒醸造に関連した酵母の分類学的な性質と、国酒酵母の実用的な特性や識別との関連を調べ、典型的な *S. cerevisiae* のそれと比較検討することとした。

材料と方法

1) 供試菌株

本研究に使用した酵母は、清酒由来の株を Table 1、泡盛・焼酎由来の株を Table 2 に、他の *S. cerevisiae* 株を Table 3 に示し、通し番号 1-96 を付した。清酒由来の酵母は、竹田・塚原 (1970, 1971) により各種清酒醪から分離された研究室保存株 (Table 1 通し番号 1-15 以下同様)、塚原ら (1961) により各種清酒醪から分離され NRIC に寄託された NRIC 株 (16-20; 41-43, Table 1)、Kozai & Yabe (1895) により米麴から分離された *S. sake* の IFO 株と *S. sake* と付された NI (長尾研究所) 株 (21-23)、Nakazawa (1909) により清酒醪から分離された *S. tokyo* および *S. yedo* の IFO 株と *S. tokyo*, *S. yedo* と付された NRIC 株と NI 株 (24-29)、清酒醸造に汎用されている協会清酒酵母 11

株 (30-40) を含む計 43 株を用いた。泡盛由来の酵母は、竹田・塚原 (1971) により泡盛醪から分離された研究室保存の S 株 (44-56)、Inui (1901) により泡盛醪から分離された *S. awamori* と付された NRIC 株と NI 株、泡盛の麴から分離された *S. awamori* の OUT 株 (金子, 2013) (57-59)、玉城ら (1981) により泡盛醪から分離された泡盛 1 号 (Awamori No. 1) (60) を含む計 19 株を用いた。焼酎由来の酵母は、竹田・塚原 (1971) により各種焼酎醪から分離された研究室保存の S 株 (63-90)、日本の焼酎醪から分離された *S. batatae* の NRIC 株 3 株 (91-93)、菅間 (1972) により米焼酎醪から分離された協会焼酎 2 号の SH-4 株 (94)、甘藷焼酎醪から宮崎県工業試験場によって分離された宮崎株 (95) (柏田, 1990)、泡盛醪から鹿児島県試験場によって分離された鹿児島株 (96) (高峯ら, 1992) を含む計 34 株を用い、国酒由来の酵母として全 96 株を供試した。対照として、*S. cerevisiae* には、国酒由来の酵母を含め、かつては原名 (original name) として多様な学名を有し、現在は *S. cerevisiae* のシノニムとして記載されている酵母が多く存在していることから、*S. cerevisiae* のシノニムとして学名の記載のある *S. cerevisiae* 株 23 株 (Table 3) を供試した。

2) The yeasts 第5版の *Saccharomyces* 属 Key to species による同定試験

The yeasts 第5版の試験方法 (Kurtzman *et al.*, 2011) に準じて、*Saccharomyces* 属の Key to species に用いられている以下の7項目の試験、すなわち、ビタミン欠如培地での生育試験、37°Cにおける生育試験、melibiose 資化性、glycerol 資化性、D-mannitol 資化性、inulin 資化性、maltose 発酵性を行った。供試菌株の前培養は、試験管当たり 10 ml の YM 液体培地 (Glucose, 関東化学 1%; Yeast extract, DIFCO 0.3%; Malt extract, DIFCO 0.3%; Hipolypepton, 日本製薬 0.5%; pH 無調整) で 25°C, 2 日間静置培養したものをを用いた (培地濃度%はすべて w/v, 以下同じ)。

(1) ビタミン欠如培地での生育試験用培地

Yeast vitamin free base (FORMEDIUM) 1.7%, glucose 1.0% の液体培地を試験管に 10 ml ずつ分注した物をビタミン欠如培地とした。また、対照には Yeast nitrogen base (DIFCO) 0.67%, glucose 1.0% の液体培地をビタミン完全培地として用いた。前培養した菌体を滅菌水で 3 回洗浄後、滅菌水 10 ml に懸濁した物を、試験培地にそれぞれ 1 白金耳接種し、

Table 1 Strains of yeast derived from sake used in this study

No.	Strain No.	Other strain designations			Original strain designation	Original name	Isolation area	Isolation source	Isolation year	Notes
		ATCC	NRIC	RIB						
1	31	32694	1410			T. Tsukahara 31	<i>Saccharomyces sake</i>	Hyogo, Japan	sake- <i>kimoto</i> , Kikumasamune	1953
2	52	32695	1411			M. Takeda & T. Tsukahara 52	<i>Saccharomyces sake</i>	Kumamoto, Japan	sake- <i>oribiki</i> , Kameman	1961
3	B2PR	32696	1412			M. Takeda & T. Tsukahara B2PR	<i>Saccharomyces sake</i>	Hyogo, Japan	sake-mash, Kikumasamune	1968
4	B54R	32697	1413			M. Takeda & T. Tsukahara B54R	<i>Saccharomyces sake</i>	Kyoto, Japan	sake-mash, Kyonoharu	1968
5	B59P	32698	1414			M. Takeda & T. Tsukahara B59P	<i>Saccharomyces sake</i>	Chiba, Japan	sake-mash, Fujinotomo	1968
6	B66PR	32699	1415			M. Takeda & T. Tsukahara B66PR	<i>Saccharomyces sake</i>	Nagano, Japan	sake-mash, Kikusui	1968
7	B61R	32700	1416			M. Takeda & T. Tsukahara B61R	<i>Saccharomyces sake</i>	Shizuoka, Japan	sake-mash, Kumika	1968
8	B73P	32701	1417			M. Takeda & T. Tsukahara B73P	<i>Saccharomyces sake</i>	Kumamoto, Japan	sake-mash, Chiyonosono	1968
9	B76P	32702	1623			M. Takeda & T. Tsukahara B76P	<i>Saccharomyces sake</i>	Osaka, Japan	sake-mash, Sakuragawa	1968
10	B79P	32703	1624			M. Takeda & T. Tsukahara B79P	<i>Saccharomyces sake</i>	Hiroshima, Japan	sake-mash, Seikyo	1968
11	32					M. Takeda 32		Miyagi, Japan	sake-mash, Uragasumi	1960
12	33					M. Takeda 33		Kumamoto, Japan	sake-mash, Tsujun	1960
13	47					M. Takeda 47		Tokyo, Japan	sake-mash, Isonosawa	1952
14	49					M. Takeda 49		Nagano, Japan	sake-mash, Masumi	1952
15	55					M. Takeda 55		Hiroshima, Japan	sake-mash, Seikyo	1950
16	NRIC 0012		0012			T. Tsukahara Gekkeikan		Kyoto, Japan	Gekkeikan	
17	NRIC 0013		0013			T. Tsukahara Suishin		Hiroshima, Japan	Suishin	
18	NRIC 0014		0014			T. Tsukahara Hakutaka		Hyogo, Japan	Hakutaka	
19	NRIC 0015		0015			T. Tsukahara Kikukawa		Gifu, Japan	Kikukawa	
20	NRIC 0016		0016			T. Tsukahara Kikumasa		Hyogo, Japan	Kikumasa	

ATCC, American Type Culture Collection, USA; NRIC, NODAI Research Institute Culture Collection, Tokyo University of Agriculture, Japan; RIB, National Research Institute of Brewing, Japan; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal and Yeast Collection, Netherlands

Table 1 Continued

No.	Strain No.	Other strain designations			Original strain designation	Original name	Isolation area	Isolation source	Isolation year	Notes
		ATCC	NRIC	RIB						
21	IFO 0304			0001	GIB, B-5	<i>Saccharomyces sake</i>	sake-rice <i>koji</i>	1895		
22	IFO 0309			0005	GIB (strain Sikenzyo)	<i>Saccharomyces sake</i>				
23	NI 7245					<i>Saccharomyces sake</i>				
24	IFO 0244			0006	GRIF (R. Nakazawa)	<i>Saccharomyces tokyo</i>	sake- <i>moto</i>			
25	NRIC 0024			0024	Nagao Inst.	<i>Saccharomyces tokyo</i>				
26	NI 7459					<i>Saccharomyces tokyo</i>				
27	IFO 0249			0007	GRIF (R. Nakazawa)	<i>Saccharomyces yedo</i>	sake- <i>moto</i>			
28	NRIC 0023			0023	Nagao Inst.	<i>Saccharomyces yedo</i>				
29	NI 7476					<i>Saccharomyces yedo</i>				
30	K1			0001			sake- <i>moto</i> , Sakuramasamune	1906	sake yeast Kyokai no. 1	
31	K2			6002			sake-mash, Gekkeikan	1912	sake yeast Kyokai no. 2	
32	K3			0002			Suishin	1914	sake yeast Kyokai no. 3	
33	K4			0003				1924	sake yeast Kyokai no. 4	
34	K5			0004			sake- <i>moto</i> , Kamoduru	1922	sake yeast Kyokai no. 5	
35	K6			0005			Aramasa	1930	sake yeast Kyokai no. 6	
36	K7			1685			sake- <i>shimshu</i> , Masumi	1946	sake yeast Kyokai no. 7	
37	K9			0007			Koro	1952	sake yeast Kyokai no. 9	
38	K10			1008			sake-mash	1952	sake yeast Kyokai no. 10	
39	K14			6008			sake-mash	1991	sake yeast Kyokai no. 14	
40	K15			6009			sake-mash	1986, 87	sake yeast Kyokai no. 15	
41	NRIC 0009			0009	T. Tsukahara				402Y, wild type sake yeast	
42	NRIC 0010			0010	T. Tsukahara				409Y, wild type sake yeast	
43	NRIC 0011			0011	T. Tsukahara				410Y, wild type sake yeast	

ATCC, American Type Culture Collection, USA; NRIC, NODAI Research Institute Culture Collection, Tokyo University of Agriculture, Japan; RIB, National Research Institute of Brewing, Japan; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal and Yeast Collection, Netherlands; IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japan; NI, Nagao Institute, Tokyo, Japan (defunct); GIB, See RIB; GRIF, Government Research Institute of Formosa, Taiwan

Table 2 Strains of yeast derived from *awamori* and *shochu* used in this study

No.	Strain No.	Other strain designations			Original strain designation	Original name	Isolation area	Isolation source	Isolation year	Notes
		ATCC	NRIC	RIB						
<i>Awamori</i> yeast										
44-56	SI-3, 5-8, 10-12, 14-16				M. Takeda		Okinawa, Japan	<i>awamori</i> -mash	1964	
57	NRIC 0018		0018			<i>Saccharomyces awamori</i>				
58	NI 7214					<i>Saccharomyces awamori</i>				
59	OUT 7009				CLMR	<i>Saccharomyces awamori</i>	Okinawa, Japan	<i>awamori-koji</i>	1930	
60	Awamori No. 1				Tamashiro		Okinawa, Japan	<i>awamori</i> -mash	1981	
61	IFO 2110						Okinawa, Japan		1965	Okinawa strain
62	NRIC 1487		1487							Awamori (Kawachi)
<i>Shochu</i> yeast										
63-90	SI8-25, 27-33, 35-39, 41-45, 47-49				M. Takeda		Kumamoto or Kagoshima, Japan	<i>shochu</i> -mash of rice <i>koji</i> , rice, wheat, sweet potato and rice bran etc. at the <i>shochu</i> factory	1964	
91	NRIC 0019		0019			<i>Saccharomyces batatae</i>				
92	NRIC 1383		1383		CLMR (K. Saito)	<i>Saccharomyces batatae</i>	Hachijojima, Tokyo, Japan			
93	NRIC 1388		1388		CLMR (H. Naganishi)	<i>Saccharomyces batatae</i>		<i>shochu moromi</i>	1907	
94	SH-4			6852	Sugama (NRIB)		Kuma, Kumamoto, Japan	rice <i>shochu</i> -mash	1965	<i>shochu</i> yeast Kyokai no. 2
95	A11						Miyazaki, Japan	sweet potato <i>shochu</i> -mash	1951	
96	A12				Ind. Exp. Sta. Kagoshima (T. Katsuta)		Kagoshima, Japan	<i>awamori</i> -mash	1952	

ATCC, American Type Culture Collection, USA; NRIC, NODAI Research Institute Culture Collection, Tokyo University of Agriculture, Japan; RIB, National Research Institute of Brewing, Japan; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal and Yeast Collection, Netherlands; NI, Nagao Institute, Tokyo, Japan (defunct); OUT, Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Japan; IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japan; CLMR, Central Laboratory, South Manchurian Railway Co. Ltd.

Table 3 Strains of *Saccharomyces cerevisiae* and its synonyms used in this study

Species	Strain No.	Other strain designations				Original strain designation	Original name	Isolation area	Isolation source	Notes	
		ATCC	NRIC	CBS	DBVPG						NRRL
<i>S. cerevisiae</i>											
	IFO 10217 ^T	18824	1560	1171	6173	Y-12632	A.C. van Wijk	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Netherlands	Brewer's top yeast	Type strain of <i>Saccharomyces</i>
	IFO 0253	2367		423	6048	Y-1536		<i>Saccharomyces chodati</i>	Switzerland	wine	<i>chodati</i>
	IFO 0614	10615		381	6049	Y-1566	H. Naganishi	<i>Saccharomyces williamsii</i>		spoiled beer	<i>williamsii</i>
	IFO 0751	10596	1419			Y-379		<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>			
	IFO 1046	13007	1396	1782	6175	Y-2416	R.B. Gilliland	<i>Saccharomyces diastaticus</i>		super-attenuated beer	Type strain of <i>Saccharomyces</i> <i>diastaticus</i>
	IFO 1049		1401				R.B. Gilliland	<i>Saccharomyces steineri</i>			
	IFO 1226		0087	382	6043		P. Lindner	<i>Saccharomyces logos</i>	Brazil	Logos brewery	Type strain of <i>Saccharomyces</i> <i>logos</i>
	IFO 0210	9804	1390	400	6174	Y-12633	A. Guilliermond	<i>Saccharomyces chevalieri</i>	Cote D'Ivoire	Palm wine	Type strain of <i>Saccharomyces</i> <i>chevalieri</i>
	IFO 1833			5635	6295	Y-12637	A.E. van Kerken	<i>Saccharomyces coreanus</i>	South Africa	grape must	Type strain of <i>Saccharomyces</i> <i>coreanus</i>
	IFO 1836	16041		5378		Y-12656	J. Santa Maria	<i>Saccharomyces norbensis</i>	Spain	alpechin	Type strain of <i>Saccharomyces</i> <i>norbensis</i>
	IFO 1837			5155	6296	Y-6680	V.I. Kudriavzev	<i>Saccharomyces prostoserdonii</i>		grape must	Type strain of <i>Saccharomyces</i> <i>prostoserdonii</i>
	IFO 1950		0083	1395	6039	Y-1529	N.H. Claussen	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>			Type strain of <i>Saccharomyces</i> <i>ellipsoideus</i>
	IFO 1991			2247	6172	YB-4237	J.P. van der Walt	<i>Saccharomyces capensis</i>	South Africa	grape must	Type strain of <i>Saccharomyces</i> <i>capensis</i>
	IFO 1994	16043		4903	6301	Y-6677	J. Santa Maria	<i>Saccharomyces hienpiensis</i>	Spain	alpechin	Type strain of <i>Saccharomyces</i> <i>hienpiensis</i>
	IFO 1997	14085		3093	6601	Y-12657		<i>Saccharomyces oleaceus</i>	Spain	alpechin	Type strain of <i>Saccharomyces</i> <i>oleaceus</i>
	IFO 1998	16044		3081	6302	Y-6679	J. Santa Maria	<i>Saccharomyces oleaginosus</i>	Spain	alpechin	Type strain of <i>Saccharomyces</i> <i>oleaginosus</i>
	IFO 10055	14084		4054	6292	Y-12617	J. Santa Maria	<i>Saccharomyces acetii</i>	Spain	red wine	Type strain of <i>Saccharomyces</i> <i>acetii</i>
	NRIC 0055		0055				M. Kozaki, A-2	<i>Saccharomyces italicus</i>	Japan	Apple juice	
	NRIC 1400	48554	1400	2421				<i>Saccharomyces italicus</i>	Japan	Japanese kefir grain	
	NRIC 0032		0032				K. Suminoe	<i>Saccharomyces mandshuricus</i>			
	NRIC 1362		1362				CLMR (H. Naganishi, strain normal)	<i>Saccharomyces mandshuricus</i>			
	NRIC 1374		1374				OUT 7005 (Y. Ohtani, forma I)	<i>Saccharomyces agglutinans</i>	Kumamoto, Japan	potato which sank in the sea	
	NRIC 1382		1382				GRIF (R. Nakazawa)	<i>Saccharomyces anamensis</i>			

ATCC, American Type Culture Collection, USA; NRIC, NODAI Research Institute Culture Collection, Tokyo University of Agriculture, Japan; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal and Yeast Collection, Netherlands; DBVPG, Industrial Yeast Collection, Dipartimento di Biologia Vegetale e Biotecnologia Agroambientale, Università di Perugia, Italy; NRRL, Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, USA; IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japan; CLMR, Central Laboratory, South Manchurian Railway Co. Ltd.; OUT, Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Japan; GRIF, Government Research Institute of Formosa, Taiwan

25℃, 10日間培養した。

(2) 37℃での生育試験用培地

YM液体培地に培養用高品質寒天(フナコシ)1.5%を加えたYM斜面培地を37℃での生育試験用培地とした。前培養した菌体を試験培地に1白金耳接種し、37℃, 3週間培養した。

(3) 炭素源資化性試験

Yeast nitrogen base 0.67%, 炭素源 0.5%, 培養用高品質寒天 1.5%を加えて、試験管に7mlずつ分注した斜面培地を炭素源資化性試験培地とした。また、炭素源は glycerol (関東化学), melibiose (関東化学), D-mannitol (関東化学), inulin (関東化学)を用いた。前培養した菌体を滅菌水で3回洗浄後、滅菌水 10 mlに懸濁したものを、試験培地にそれぞれ1白金耳接種し、25℃, 3週間培養した。

(4) Maltose 発酵性試験

Yeast extract 0.45%, Hipolypepton 0.75%を、Durham 管入りの小試験管に2.6mlずつ分注後、オートクレーブ殺菌し、別殺菌した maltose (関東化学) 6%溶液を終濃度2%に添加したものを maltose 発酵性試験培地とした。前培養した菌体を試験培地に1白金耳接種し、25℃, 2週間培養した。

結果と考察

1) The yeasts 第5版の *Saccharomyces* 属 Key to species による国酒由来の酵母の性質

結果をまとめたものを Table 4 に示す。国酒由来の酵母 96 株中 53 株 (グループ 1) が、ビタミン欠如培地での生育試験+, 37℃における生育試験+, melibiose 資化性-, glycerol 資化性-, D-mannitol 資化性-, inulin 資化性-, maltose 発酵性+という性質であり、35 株 (グループ 2) が、ビタミン欠如培地での生育試験+, 37℃における生育試験+, melibiose 資化性-, glycerol 資化性+, D-mannitol 資化性-, inulin 資化性-, maltose 発酵性+という性質であった。このことから、Key to species の同定試験7項目によって国酒由来の酵母の性質は大きく2つのグループと、それらとは異なる8株に分けられた。Maltose の発酵については NRIC 0012 と S23 の2株が-であったが、弱い清酒酵母の存在も報告されており(向井ら, 1998), これらはビタミン欠如培地での生育は+であったことから、maltose 発酵は例外的に-(rarely-)として、清酒由来の NRIC 0012 は国酒由来の酵母のグループ1に、焼酎由来の S23 はグループ2と合わせて考えていくことにした。グループ1とグ

ループ2は、glycerol 資化性の違いによって分かれ、清酒由来の酵母の全44株中27株が glycerol を資化し、泡盛由来の酵母の全19株中13株および焼酎由来の酵母の全34株中29株が資化しなかった。したがって、清酒由来の酵母が glycerol を資化するのに対して、泡盛および焼酎由来の酵母は資化しない傾向にあった。Glycerol の資化性は、The yeasts 第5版における *S. cerevisiae* の standard description では variable (V) であるのに対し、ビタミン欠如培地における生育試験は-と記載されていることから、国酒由来の酵母においても glycerol 資化性は V とすれば、2グループはまとめられ、*S. cerevisiae* とはビタミン欠如培地での生育試験が+であることで、これを国酒酵母の主体をなす一群(以下、国酒酵母群という)とした。

2) 他の *S. cerevisiae* のシノニムの株との比較

The yeasts では、多く試験株の性質に基づいて *S. cerevisiae* の standard description が定められていることから、国酒酵母群は *S. cerevisiae* の多くの株と性質が異なると考えられる。そこで、対照のシノニムの株を含む *S. cerevisiae* 23 株の結果を Table 5 に示す。*S. cerevisiae* のシノニム全23株中9株は The yeasts 第5版における *S. cerevisiae* の standard description と一致していた。しかし、それ以外の14株でも11株は、ビタミン欠如培地における生育試験-で、そのうち37℃における生育試験-が2株、maltose 発酵性-が3株、melibiose 資化性+が8株で、melibiose 資化性+の株のうち、maltose 発酵性-が2株、D-mannitol 資化性+が2株で、いずれも *S. cerevisiae* の standard description とは異なった。また、残りの2株は、国酒酵母群を形成するものと同様にビタミン欠如培地での生育試験が+であることから *S. cerevisiae* の standard description と異なり、うち1株は melibiose 資化性+であったが、NRIC 0055 と NRIC 1382 の2株は、国酒酵母群のグループ2と一致していた。そこで、国酒酵母群でも分離ときに学名が付された株には melibiose 資化性+である株が存在したように、同じ *S. cerevisiae* でも分離ときに学名を付された多様な *S. cerevisiae* のシノニムの株には standard description とは一致しない性質をもつ株が存在することが明らかとなった。これは、*S. cerevisiae* が The yeasts 第3版以降に多くの種が統合されたことにより、現在でも「複合群」を形成していることに起因しているものと考えられる。しかし、本研究で供試した *S. cerevi-*

Table 4 Physiological properties of yeast strains derived from *kokushu* based on the key to species for the genus *Saccharomyces* of The yeasts 5th ed.

Strain	Growth		Assimilation				Fermentation
	VF	37°C	Melibiose	Glycerol	D-Mannitol	Inulin	Maltose
Group 1							
Yeast derived from sake							
31, B2PR, B59P, 49, 55, NRIC 0013, NRIC 0014, NRIC 0016, NI 7245, NRIC 0024, NI 7459, NRIC 0023, NI 7476, NRIC 0010							
Yeast derived from <i>awamori</i>							
S1, S2, S3, S5, S6, S8, S10, S11, S12, NRIC 0018, NI 7214, Awamori no.1, NRIC 1487	+	+	-	-	-	-	+
Yeast derived from <i>shochu</i>							
S18, S19, S21, S22, S24, S27, S28, S29, S30, S31, S32, S33, S35, S36, S39, S41, S42, S43, S44, S45, S48, S49, NRIC 0019, NRIC 1383, NRIC 1388, SH-4							
S23	+	+	-	-	-	-	-
Group 2							
Yeast derived from sake							
52, B54R, B66PR, B61R, B73P, B76P, B79P, 32, 33, 47, NRIC 0015, IFO 0304, IFO 0309, IFO 0244, IFO 0249, K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K9, K10, K14, K15	+	+	-	+	-	-	+
Yeast derived from <i>awamori</i>							
S14, S15, S16, OUT 7009, IFO 2110							
Yeast derived from <i>shochu</i>							
S37, S38, S47, A12							
NRIC 0012	+	+	-	+	-	-	-

+, positive; -, negative. Vitamin-free medium test was based on Yeast vitamin free base (FORMEDIUM) containing (NH₄)₂SO₄ as N source. Carbon source utilization test was based on Wickerham medium. VF, growth without vitamins; 37°C, growth at that temperature

siae のシノニム全 23 株中 20 株はビタミン欠如培地での生育試験が-で *S. cerevisiae* と一致しているのに対し、国酒由来の酵母は 96 株中 90 株が+で、ほぼ明確に区別される。そして、The yeasts における *S. cerevisiae* の standard description を決定する際の試験株として、清酒酵母が用いられていた The yeasts 第 2 版および第 3 版では、ビタミン欠如培地での生育試験が variable (V) で表されているのに対して、試験株として用いられなくなった The yeasts 第 4 版からは - と記載されている。これらのことは、*S. cerevisiae* の standard description に対し、国酒由来の酵母を除

外したことに起因している。また、この性質を The yeasts 第 5 版における *Saccharomyces* 属の 7 種の standard description (Vaughan-Martini & Martini, 2011) と比較しても、国酒酵母群は、*Saccharomyces* 属のいずれの種の性質にも一致しなかった (Table 6)。

以上のことから、国酒酵母群は *S. cerevisiae* とそのシノニム株およびその他の *Saccharomyces* 属の各種と比較しても表現性質上特異な一群を形成することが明らかとなった。このことから、国酒酵母群の分類学的特性は、The yeasts 第 5 版の Key to species に

Table 4 Continued

Strain	Growth		Assimilation				Fermentation
	VF	37°C	Melibiose	Glycerol	D-Mannitol	Inulin	Maltose
Yeast derived from sake NRIC 0009	-	+	-	-	-	-	+
Yeast derived from <i>shochu</i> S20, S25	-	+	-	+	-	-	+
Yeast derived from <i>awamori</i> S7	-	+	-	+	-	-	+
Yeast derived from <i>shochu</i> A11	-	+	+	-	-	-	+

+, positive; -, negative. Vitamin-free medium test was based on Yeast vitamin free base (FORMEDIUM) containing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as N source. Carbon source utilization test was based on Wickerham medium. VF, growth without vitamins; 37°C, growth at that temperature

Table 5 Physiological properties of the strains of *S. cerevisiae* and its synonyms based on the key to species for the genus *Saccharomyces* of The yeasts 5th ed.

Strain	Growth		Assimilation				Fermentation
	VF	37°C	Melibiose	Glycerol	D-Mannitol	Inulin	Maltose
IFO 0253, IFO 0614, IFO 1046, IFO 1049, IFO 1226, IFO 1950, IFO 1991, IFO 10055, NRIC 1374	-	+	-	+	-	-	+
IFO 1998, IFO 0751, NRIC 0032, NRIC 1362	-	+	+	+	-	-	+
IFO 10217 ^T , IFO 1837	-	-	-	+	-	-	+
IFO 1994, IFO 1997	-	+	+	+	+	-	+
IFO 1833, IFO 1836	-	+	+	+	-	-	-
IFO 0210	-	+	-	+	-	-	-
NRIC 0055, NRIC 1382	+	+	-	+	-	-	+
NRIC 1400	+	+	+	+	-	-	+

+, positive; -, negative. Vitamin-free medium test was based on Yeast vitamin free base (FORMEDIUM) containing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as N source. Carbon source utilization test was based on Wickerham medium. VF, growth without vitamins; 37°C, growth at that temperature

従って, maltose 発酵性+ (rarely-), melibiose 資化性-, glycerol 資化性 V, D-mannitol 資化性-, inulin 資化性-, ビタミン欠如培地での生育試験+, 37°Cにおける生育試験+であると, 定義づけることができると考えられた. しかし, 国酒由来の酵母のなかでもこの一群に含まれなかった6株や, *S. cerevisiae* のシノニムのなかで国酒酵母群と同じ性質を示した *S. italicus* NRIC 0055, *S. anamensis* NRIC 1382 について, 今後遺伝子による系統解析などを用いてさらに検討する必要があると考えられた. 国酒酵母群の特異性の要因となったビタミン欠如培地での生育に関しては, これまでにそれぞれのビタミン要求性について検

討されている. *S. cerevisiae* はビオチンやパントテン酸, チアミン, イノシトールなど, 複数のビタミンを要求することが報告されている (篠原ら, 1996; 鈴木, 1961a, b). 一方で国酒酵母は, 他の醸造酵母とは異なり, 共通してビオチン要求性がないとされ (竹田・塚原, 1962; 竹田ら, 1983), 清酒酵母の協会7号と実験室酵母の S288c による比較ゲノム解析からも, 協会7号にのみビオチン生合成にかかわる遺伝子 *BIO6* の存在 (Akao *et al.*, 2011) が報告されている. このようにビタミン要求性のないことの重要性は, 分子生物学的にも支持されている. したがって, *S. cerevisiae* と同定された国酒由来の酵母は複数のビタミン

Table 6 Comparison of the physiological properties of the *kokushu* yeast strains with the *Saccharomyces* species

Species	Growth		Assimilation				Fermentation
	VF	37°C	Melibiose	Glycerol	D-Mannitol	Inulin	Maltose
<i>Kokushu</i> yeast	+	+	-	v	-	-	+ / (-)
<i>S. cerevisiae</i>	-	+	-	v	-	-	+
<i>S. cariocanus</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. paradoxus</i>	-	+	-	v	+	-	v
<i>S. mikatae</i>	-	-	+	-	+	-	S
<i>S. kudriavzevii</i>	-	-	-	v	v	+	+
<i>S. bayanus</i>	+	-	v	+	v	-	+
<i>S. pastorianus</i>	-	-	-	v	-	-	+
<i>S. arboricola</i>	+	-	+	-	v	-	-

+, positive; -, negative; V, variable; S, positive but slow; (-), rarely negative. Vitamin-free medium test was based on Yeast vitamin free base (FORMEDIUM) containing (NH₄)₂SO₄ as N source. Carbon source utilization test was based on Wickerham medium. VF, growth without vitamins; 37°C, growth at that temperature.

The data for *kokushu* yeast are based on the 90 of 96 *kokushu* strains studied.

The data for *Saccharomyces* species are cited from Vaughan-Martini & Martini (2011).

を要求する可能性が示され、ビオチンを含め詳細に調べる価値があると考えられる。

3) The yeasts 第5版の Key to species による国酒酵母の再同定

S. cerevisiae とそのシノニム株およびその他の *Saccharomyces* 属の各種に対しても、国酒酵母群が特異な一群を形成していることが明らかとなったため、改めて The yeasts 第5版の *Saccharomyces* 属 Key to species に従った同定を試みた。Key to species の試験順に従って、ビタミン欠如培地での生育試験が+で、maltose 発酵性が+の株は *S. bayanus* に同定されることから、国酒由来の酵母の全96株中90株は、*S. bayanus* に同定されることになる。しかし、*S. bayanus* は37°Cにおける生育試験が-であることから、国酒酵母群は *S. bayanus* と明確に区別された。また、それ以外の国酒由来の酵母6株についても再同定した。まず、清酒由来の NRIC 0009、泡盛由来の S7、焼酎由来の S20、S25、A11 の5株は、ビタミン欠如培地での生育試験が-、melibiose 資化性が-、37°Cにおける生育試験が+、D-mannitol 資化性が-であることから *S. cerevisiae* に同定された。次に、清酒由来の NRIC 0011 は、ビタミン欠如培地での生育試験が-、melibiose 資化性が+であることから *S. mikatae* に同定された。しかし、実際には *S. mikatae* は D-mannitol 資化性が+で、37°Cにおける生育試験が-であることから、この株は *S. mikatae* と異なった。これらのことから、国酒由来の酵母の多くは The

yeasts 第5版の *Saccharomyces* 属 Key to species によって *S. cerevisiae* ではなく、異なる種に同定されるという結果となった。そして、国酒由来の酵母のなかで *S. cerevisiae* に同定される株は、少数であった。したがって、The yeasts の指標では、国酒酵母の同定は的確に行えないことが明らかとなった。

以上のことから、本研究に用いた国酒由来の酵母は96株のうち一群を形成する国酒酵母群90株が、The yeasts 第5版の Key to species ではいずれの種とも一致せず、それは glycerol の資化で2群に分けられた。分離当時に国酒由来の酵母は、さまざまな特異性から区別されていたが(竹田・塚原, 1971, 1975)、The yeasts 第4版以降からは *Saccharomyces* 属を区別するための指標として、ビタミン欠如培地における生育試験が導入されたにもかかわらず、国酒由来の酵母の同定に適切に使われていないことが明らかとなった。そこで本研究では、国酒由来の酵母の特性を多くの *S. cerevisiae* のシノニムも含めて現在の指標により検討し、国酒酵母が一群を形成するような特異性を保持していることを明確にした。

これにより、酵母分類学における *Saccharomyces* 属のなかで国酒由来の酵母の表現型による識別が可能であることが改めて示され、国酒酵母の分類学的な定義付けの一つとなると考えられた。さらに、近年自然界から分離され国酒醸造に利用されている酵母は、ビタミン欠如培地での生育が可能であることが報告されていることから(木下ら, 2008)、本研究の結果は、新規の株を分離し、国酒醸造に適した株を選抜するための

識別法としても有効であると考えられる。本研究は、*Saccharomyces* 属酵母のなかで、国酒酵母の表現性状の独自性を明らかにし、The yeasts 第5版の Key to species の問題点を明らかにした。Key to species の違いだけでは分類学的な結論は導き出せないものの、国酒酵母が *S. cerevisiae* とは異なる一群を形成することは、The yeasts にもあるようにテクノロジーの分野である醸造学的な選択には価値があるものと考えられる。また、最近では清酒酵母などの系統学的な特徴が報告されており、著者らもそれらを見出しているが(未発表)、種の議論までにはいたっておらず、今回の結果を基にして、今後、分類学的な結論については遺伝子の系統解析などと併せて慎重に検討したいと考えている。

謝 辞

菌株の提供にご協力頂いた大阪大学大学院工学系研究科の金子嘉信博士に謝意を表します。

文 献

- Akao, T., Yashiro, I., Hosoyama, A., Kitagaki, H., Horikawa, H., Watanabe, D., Akada, R., Ando, Y., Harashima, S., Inoue, T., Inoue, Y., Kajiwara, S., Kitamoto, K., Kitamoto, N., Kobayashi, O., Kuhara, S., Masubuchi, T., Mizoguchi, H., Nakao, Y., Nakazato, A., Namise, M., Oba, T., Ogata, T., Ohta, A., Sato, M., Shibasaki, S., Takatsume, Y., Tanimoto, S., Tsuboi, H., Nishimura, A., Yoda, K., Ishikawa, T., Iwashita, K., Fujita, N. & Shimoi, H. 2011. Whole-genome sequencing of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no. 7. DNA Res. **18**: 423-434.
- 赤尾 健 2014. ゲノムから見た清酒酵母の系統分化と育種への新たな視点. 化学と生物 **52**: 223-232.
- 赤尾 健, 周 延, 渡辺大輔, 岡崎直人, 下飯 仁 2018. 優良きょうかい清酒酵母菌株を判別可能な DNA マーカーの設定と保存菌株への適用. 醸協 **113**: 631-641.
- 浅野忠男 2007. 清酒酵母の有機酸生成に関する研究. 生物工学会誌 **85**: 63-68.
- Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S. & Verstrepen, K.J. 2016. Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. Cell **166**: 1397-1410.
- Inui, T. 1901. Untersuchungen über die niederen Organismen welche sich bei der Zubereitung des alkoholischen Getränkes "Awamori" beteiligen. J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo **15**: 465-476.
- 金子嘉信 2013. (60周年記念特別企画「還暦を迎えた微生物株」4) OUT 7009 (大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻, OUT). 日本微生物資源学会誌 **29**: 31-32.
- 柏田雅徳 1990. 宮崎県工業試験場. 醸協 **85**: 561.
- 加藤 拓, 下飯 仁 2010. 清酒酵母の一倍体の取得と実験室酵母との交配による醸造特性の遺伝解析. 醸協 **105**: 500-506.
- 木下友香理, 門倉利守, 数岡孝幸 2008. 花から分離した酵母の性質と清酒醸造における特長. 東京農業大学農学集報 **53**: 100-106.
- Kozai, N. & Yabe, K. 1895. Ueber die bei der Sakebereitung beteiligten Pilze (Vorl. Notiz). Central. f. Bakt. Abt., II **1**: 619-620.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. & Robert, V. 2011. Methods for isolation, phenotypic, characterization and maintenance of yeasts. In Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. (eds.), The Yeasts, A Taxonomic Study, fifth edition. vol. 1, p. 87-110, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Libkind, D., Hittinger, C.T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P. and Sampaio, J.P. 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **108**: 14539-14544.
- Lodder, J. & Kreger-van Rij, N.J.W. 1952. The Yeasts: A Taxonomic Study, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- 向井伸彦, 岡田 彦, 鈴木昭紀, 高橋利郎 1998. ビール酵母とその他の醸造用酵母のビール醸造特性. 醸協 **93**: 967-975.
- 中田久保, 穂坂 賢, 坂井 劭 1984. 泡盛酵母の分類学的研究. 醸協 **79**: 647-650.
- 中田久保, 黒木裕章, 谷口好正, 穂坂 賢, 坂井 劭 1985a. 焼酎酵母の分類学的研究. 醸協 **80**: 476-479.
- 中田久保, 穂坂 賢, 坂井 劭 1985b. 泡盛, 焼酎,

- 清酒酵母および他の *Saccharomyces cerevisiae* 間の差異. 醸酵工学会誌 **63** : 509-515.
- Nakazawa, R. 1909. Zwei Saccharomyceten aus Sakehefe. Central. f. Bakt. Abt., II **22**: 529-540.
- 根来宏明, 小高敦史, 松村憲吾, 秦 洋二 2017. 清酒酵母のリンゴ酸高生産に寄与する変異遺伝子の同定と育種への応用. 化学と生物 **55** : 434-437.
- 西谷尚道 1982. 焼酎酵母研究のあゆみ (I). 醸協 **77** : 599-605.
- 佐藤宜之 2013. 「国酒プロジェクト」に端を発した政府の取り組みについて. 醸協 **108** : 700-706.
- Stelling-Dekker, N.M. 1931. Die sporogenen Hefen. Verh. K. Ned. Akad. Wetensch., Afd. Natuurk., Sect. 11, **28**: 1-547.
- 篠原 隆, 押田明成, 柳田藤寿 1996. ワイン酵母のビタミン要求性と生育温度の影響. 山梨大学醸酵研究所研究報告 **31** : 1-8.
- 菅間誠之助 1972. しょうちゅう酵母. 醸協 **67** : 672-677.
- 鈴木弥彦 1961a. パン酵母に及ぼすビタミン効果の研究 (第1報). 日本農芸化学会誌 **35** : 648-654.
- 鈴木弥彦 1961b. パン酵母に及ぼすビタミン効果の研究 (第4報). 日本農芸化学会誌 **35** : 1244-1248.
- 高峯和則, 瀬戸口真治, 亀沢浩幸, 美坂幸子, 浜崎幸男 1992. 鹿児島県工試酵母の分類学的研究. 鹿児島県工業技術センター研究報告 **5** : 5-11.
- 竹田正久, 塚原寅次 1962. 酵母とビタミン B 群に関する研究 (第2報). 醸協 **57** : 1109-1111.
- 竹田正久, 塚原寅次 1970. 清酒酵母の特性. 東京農業大学農学集報 **14** : 199-209.
- 竹田正久, 塚原寅次 1971. *Saccharomyces sake* の特性 (第3報) 醸造酵母 (分離株) の同定. 東京農業大学農学集報 **16** : 59-67.
- 竹田正久, 塚原寅次 1975. 清酒酵母 (*Saccharomyces sake*) の分類学的研究. 発酵工学雑誌 **53** : 103-111.
- 竹田正久, 中里厚実, 塚原寅次 1983. *Saccharomyces sake* と焼酎酵母, 泡盛酵母の相違. 醸酵工学会誌 **61** : 11-14.
- 玉城 武, 忍頂寺晃嗣, 高江洲朝清, 下地 博, 玉那覇勉 1981. 泡盛1号酵母の形態学的, 生理学的諸性質. 醸協 **76** : 198-201.
- 塚原寅次, 坂井 劭, 竹田正久 1961. 清酒酵母の分類について. 東京農業大学農学集報 創立70周年記念論文集 特別号 : 221-231.
- Van der Walt, J.P. 1970. Genus 16. *Saccharomyces* Meyen emend. Reess, In Lodder, J. (ed.), The Yeasts, A Taxonomic Study, second revised and enlarged edition. p. 555-604, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Vaughan-Martini, A. & Martini, A. 1998. 44. *Saccharomyces* Meyen ex Reess, In Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (eds.), The Yeasts, A Taxonomic Study, fourth revised and enlarges edition. p. 358-371, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Vaughan-Martini, A. & Martini, A. 2011. *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870), In Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. (eds.), The Yeasts, A Taxonomic Study, fifth edition. vol. 2, p. 733-746, Elsevier Science Publishers B.V., San Diego.
- 渡辺大輔, 高木博史 2016. ここまでわかった! きょうかい酵母 (清酒用) の高発酵力を生み出す *RIM15* 変異遺伝子. 醸協 **111** : 638-647.
- Yabe, K. 1897. On the origin of sake yeast (*Saccharomyces Sake*). Coll. Agric. Tokyo. Bull. **3**: 221-224.
- Yarrow, D. 1984. Genus 22. *Saccharomyces* Meyen ex Reess, In Kreger-van Rij, N.J.W. (ed.), The Yeasts, A Taxonomic Study, third revised and enlarged edition. p. 379-395, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Taxonomic characterization of *kokushu* yeast based on the Key to species of The yeasts,
a taxonomic study 5th edition

Chise Moriya, Maiko Koizumi, Shunichi Nakayama, Ken-ichiro Suzuki and Toshimori Kadokura

Department of Fermentation Science, Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture

Kokushu (sake, *shochu*, and *awamori*), an alcohol of Japanese origin, is traditionally brewed from rice and other materials. It is brewed by saccharification of *koji* and alcoholic fermentation of yeast. Since the 19th century, many strains of yeast have been isolated and studied taxonomically for *kokushu* brewing. Since the book “The yeasts, a taxonomic study” was published in 1952, all the original names assigned to these yeast strains are the synonym of *Saccharomyces cerevisiae*. Nonetheless, *kokushu* can be fermented exclusively by specific *kokushu* yeast strains. To confirm this, 96 yeast strains were collected, taxonomically characterized, and used for comparison with other strains of the genus *Saccharomyces*. Then, seven tests were performed as described as “Key to species” of the book “The yeasts, a taxonomic study (5th ed.)” most of the *kokushu* yeast strains formed a homogeneous cluster and were separated from other species of the genus *Saccharomyces*. Of the 96 *kokushu* yeast strains that were studied and grown on vitamin-free medium, growth difference from *Saccharomyces cerevisiae* was observed in 90 strains. These results showed that *kokushu* yeast strains are unique in their phenotypic characteristics; thus, more information can be obtained from these strains for taxonomic studies on genomics and selection of yeast strains possessing specificity for *kokushu* brewing.