

〔醸酵工学 第56巻 第5号 618-629. 1978〕  
照井会長退任記念特集号

## 総 説

# 酵母を中心とする清酒醸造の微生物管理\*

秋 山 裕 一

国税庁醸造試験所

## 1. 清酒醸造の生態学的特色

清酒醸造法の特色は、開放発酵方式によりながらも、酵母の自然純粋培養環境を完成し、並行複発酵によって、20~22%にも達する高濃度アルコールを生成することである。西欧のビール醸造では糖化と発酵工程とが、糖化もろみの煮沸という殺菌工程によって区分されている方式（単行発酵）によっている点で対比される醸造方式で、洋の東西の考え方の差に由来するものとして興味深いものである。

その主役を演じる清酒酵母の研究は、前世紀の末期からはじめられ、<sup>1)</sup>わが国の今日の発酵学、微生物学の基盤になっている。良い清酒を造るために良い酵母を検索することは高橋(眞)<sup>2)</sup>以来、今日も続いており、実用化が計られている。しかし清酒造りはあくまでも開放発酵であるから、斎藤<sup>3)</sup>がその著書で「同一工場の同一酒母でも、異なった型の酵母が混生していることは興味ある事実」と指摘し、また北原<sup>4)</sup>も「正しく育成された醸の酵母でも *Saccharomyces sake* と呼ばれる限定された一種と考えてよいかどうか、ここに得られる“清酒酵母”は1つの酵母の生態群を示すもの」と述べている通り、20年前には純粋培養酵母は使用されていたが、接種酵母がどのように増殖しているか不明であった。

塚原<sup>5)</sup>が速醸もとへ酵母の添加時期を変えて、野生酵母の増殖があることを証明したのが1954年である。植村ら<sup>6,7)</sup>は微生物生態学の研究の代表的な場として、清酒醸造をとりあげ、その方法論を考究した。著者<sup>8,9)</sup>もこれらの研究をヒントに栄養要求性変異酵母株や

TTC 重層法<sup>10,11)</sup>を使用し、山廃酒母やもろみでの酵母の生態を調べ、<sup>12)</sup>清酒醸造の微生物管理に応用した。さらに芦沢<sup>13)</sup>や小西ら<sup>14)</sup>の研究とあわせ、山廃もとの微生物の消長とその生産物との微妙な関連など、開放発酵による酵母の自然純粋培養法の理論を明確にすることが出来た。

生態学的および遺伝学的研究手法の進展によって、種々の新しいタイプの酵母が発見、造成また応用されるようになってきた。例えば、泡なし酵母の再発見<sup>16)</sup>と優良酵母からの泡なし変異株の誘導、<sup>15)</sup> killer factor を生産する清酒酵母の発見<sup>17)</sup>と交配による優良 killer 酵母の造成、<sup>18)</sup>ワイン酵母への導入、<sup>19)</sup>アルコール耐性酵母の誘導とその実用化、<sup>20,21)</sup>またもろみの泡や末期の状貌と酵母との関係から、厚ふたの成因と発酵停滞現象の関連が明らかにされた。<sup>22)</sup>近年、アミノ酸、核酸発酵から「代謝制御発酵」が大きく進展しているが、アミノ酸代謝系の制御発酵によって、清酒の微妙な風味に関係する成分の生成をコントロールすることが可能であることが示された。

以上清酒醸造の全般にわたり酵母を中心として、その生態学的特色を示し、それを基とした酒造管理法について、また新しい有用酵母株の造成と利用にふれ、清酒の品質の個性化の確立に役立つことなどについて述べる。

## 2. 清酒酵母の性質とその判別法

清酒酵母は矢部<sup>11)</sup>の記載の時からラフィノース 1/3 発酵性等により、上面発酵ビール酵母に類似するとされており、Stelling-Dekker<sup>23)</sup>によって *Saccharomyces cerevisiae* に統合され、最近の Lodder<sup>24)</sup>の分類でもこれが引き継がれている。高橋(雅)<sup>25)</sup>は酵母分類の key には採用されていないビタミン要求性を各種の醸造酵

\* A Microbiological Control of Saké Brewing from the Standpoint of Ecology of Yeasts. —A Review— AKIYAMA, H. (National Research Institute of Brewing, Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114)

Table 1. Differentiation media for *saké* yeasts.

TTC-Medium <sup>11)</sup>			$\beta$ -Alanine Medium <sup>33)</sup>	
A medium		B medium		
Glucose	0.5 g	Glucose	10 g	Glucose
TTC	0.05 g	Peptone	2 g	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Agar	1.5 g	Yeast Ext.	1.5 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
Water	100 ml	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
			0.4 g	Water
			1000 ml	pH
			5.5-5.7	Agar
				$\beta$ -Alanine
				200 $\mu\text{g}$
				Pyridoxine
				Nicotinic acid
				Inositol
				Biotin
				PABA

A medium: overlay medium containing TTC.

B medium: plate medium.

母について比較し、清酒酵母はビオチン要求しない点でビール酵母などと異なっていることおよび無機N培地でパントテン酸を要求しないことを報告した。井上ら、<sup>26)</sup> 勝屋ら<sup>27)</sup> も清酒酵母の性質を比較研究したが、竹田ら<sup>28)</sup> はビオチン要求性、K欠培地におけるNa利用性の差、ビタミン不含硫安培地での生育、メレチトース資化性(−)などから *S. sake* の独立を提唱している。

このように醸造酵母群間の異同についての報告はあるが、清酒酵母株間での差異、判別については、従来はコロニーの差などで経験的に分別されていたにすぎなかった。

著者らは、永井の TTC 重層法<sup>29)</sup>により清酒酵母株間の判別がある程度可能であることを見出し、酒母やもろみに応用した。

**TTC 重層法とその応用** TTC 重層法の培地は Table 1 の通りで、下層培地に 30°C、2 日間培養後、上層培地を静かに上層し、2~3 時間 30°C に保つと、コロニーが赤~ピンク~白色に呈色して来る (TTC: 2, 3, 5-triphenyl-tetrazolium chloride)。協会酵母やもろみから分離した野生酵母株、産膜酵母などについて検討した結果は Table 2 の通りで、発酵力の強い協会酵母 6 号、7 号は赤色に、多くの野生酵母はピンク色に呈色し、判別できることが知られた。<sup>11, 12)</sup> しかしこのコロニーの呈色が TTC の還元で生成する formosan によるのに、菌株により色調が違う理由につい

ては不明のままである。<sup>30)</sup>

この方法により実際の各地醸造場のもろみを調査した結果を Table 3 に示す。昭和38~40年頃はもろみの半数は相当に野生酵母に汚染されていたことが知られるが、<sup>31)</sup> それから約10年後には75%がほぼきれいで、酵母管理が大きく進んだことがわかる。しかし、なお13%もの汚染100%という工場がある事実に注目しなければならない。<sup>32)</sup>

協会 7 号酵母は1962年(昭36年)以来、ビタミン要求性に変異がおこり、35°C で  $\beta$ -alanine を利用できなくなったことが菅間ら<sup>33)</sup>により明らかにされ、この株の特性として、検出法 (Table 1) に利用されるように

Table 2. Grouping of yeasts by TTC-agar-overlay technique.<sup>11)</sup>

Colony color	Strains
Red.....	{ Kyokai No. 6, No. 7 Alcohol yeast Hakken No. 1
Pink...	{ reddish pink... <i>Saké</i> yeast H pink.....{ Kyokai No. 8 "Non-foaming yeast" A-63 <i>Zygosacch.</i> sp. 2025 <i>Hansenula anomala</i> 2038 <i>Phichia</i> var. No. 2050
White.....	{ <i>Candida</i> sp. <i>Pichia</i> sp. <i>Hansenula</i> sp. RD-mutants

Table 3. Yeast population in *saké* mashes inoculated with K-7.

Year of investigation	Region	Purity of the yeast (%)				
		100-80	-60	-40	-20	-0
1975 <sup>92)</sup>	nationwide	75	5	4	3	13
1965 <sup>91)</sup>	Takamatsu	58	9	2	6	25
	Nagoya	15	20	5	5	55
	Sendai	45	2	4	7	43
1963 <sup>93)</sup>	nationwide	43	30	5	12	10

なった。Table 3 の50年度の酵母調査も本法を応用している。なお TTC 重層法では産膜酵母にピンク色に呈色するものがあり野生酵母と見誤りやすいので、産膜酵母と清酒酵母の判別培養法（ピロガロール嫌気培養、酢酸エチル培地、アルコール培地など）が考案され、<sup>34)</sup> 酿造工程全般にわたり、生態学的研究が一段と促進された。なお協会酵母 6, 7 および 8 号は K-6, K-7 および K-8 と略記した。これらの判別は 35°C,  $\beta$ -alanine 培地および TTC 重層法で可能である。

### 3. 変異酵母をマーカーとする醸造工程における酵母の動態の研究

**使用酵母株と判別法** No. 328-81 株：アデニン、アルギニン要求性のビール酵母変異株（東大応微生物池田教授より分譲）。麹汁寒天培養でコロニーが赤紅色を呈するので、正常な清酒酵母と判別できる。発酵力はやや弱い。<sup>8)</sup>

No. 7-1 株：パントテン酸要求性協会 7 号変異株。発酵力等は親株と同じであるが、硫安-グルコース培地でパントテン酸を要求する。<sup>10)</sup>

K-6 および K-7：菅間の方法による。<sup>35)</sup>

#### (1) 速釀系酒母における酵母の動態

塚原の報告<sup>5)</sup>があるが、No. 328 株を麹汁に 2 日間前培養し、速釀もとに  $10^5/g$ 、高温糖化もとに  $10^6/g$ 、No. 7-1 株を速釀もとに  $10^5/g$  の割合で、仕込み時に添加し、酒母育成日順に従って、それぞれの検出法で純度を判定した。その結果、No. 7-1 株を仕込み時に  $10^5/g$  添加しても、なお約 10% の汚染が見られ、やや弱い No. 328 株では高温糖化により麹の雑酵母など淘汰した後でもなお汚染が見られた。この事実は、接種酵母の活性と濃糖多酸培地への適性が重要であることと、速釀もとは清酒酵母の増殖しやすい環境であるから、米麹や仕込み容器、用具を清浄にすることが必要であることを示すものである。米麹の酵母は著者らは  $10^3 \sim 10^5/g$ <sup>11)</sup>

と、菅間らは  $0 \sim 10^3/g$ <sup>36)</sup> と報じているが、麹室の 30°C 近い室温は酵母の増殖の可能性を示すものである。

速釀もとは塚原の指摘のように純粋培養酵母を早期に多量に接種する必要があることが再確認された。

#### (2) 山廃もとにおける酵母の動態

山廃もとの早湧は亜硝酸によって防止しうることは古くから知られていたが、<sup>36)</sup> 酵母の消長については調査されていなかった。著者らは No. 7-1 変異株と TTC 重層法による酵母群の判別法とを利用し、仕込みから酵母添加までの約 2 週間の野生酵母群の消長と酒母成分との関係を精査し、さらに酵母接種後、意外と思われるほど純度の高い酒母が得られることを知った。<sup>12)</sup>

山廃もとの仕込みは標準通り行い、仕込み後毎日、平面培養法によって全酵母数を、TTC 重層法、酸度、亜硝酸など成分分析を行った。

Table 4 にその経過を示した。仕込み初期の酵母総数は  $10^3 \sim 10^4/g$  であったが、10 日目頃からむしろ減少傾向が見られる。TTC 重層法による 3 群の酵母については、数的に最も多い W 酵母（産膜酵母が主）は 7 ～ 10 日までやや増殖したが、 $10^3/g$  オーダーで、発酵が始まるまで検出された。P 酵母（野生清酒酵母と産膜酵母の一部）は数の変動が大きかったが、亜硝酸が存在して、乳酸が生成はじめた 9 日目を境にして消失し、以後検出されなかった。R 酵母（発酵力のある清酒酵母）は  $10^2/g$  オーダーの少数で、増殖は見られなかった。

14 日目に培養酵母（No. 7-1）を  $10^5/g$  台接種し、品温を上昇させて発酵に導き、20 日目に分け、熟成させた。この間 No. 7-1 以外の汚染酵母は 2 ～ 0.2% と僅かで、殺菌工程もないのに、極めて純度の高い酒母が得られた。

この結果は開放発酵における純粋培養法として古来の山廃もとが非常にすぐれた方法であることを示したものである。著者と同時に芦沢ら、<sup>13)</sup> 小西ら<sup>14)</sup> の精力

Table 4. Population changes of yeasts in the process of *yamahai moto* making with a mutant strain.<sup>12)</sup>

Days	Total count of yeasts × 10 <sup>3</sup> /g	Differentiation by TTC-over lay method			Acidity	Nitrite p.p.m.
		Red colonies × 10 <sup>3</sup> /g	Pink colonies × 10 <sup>3</sup> /g	White colonies × 10 <sup>3</sup> /g		
1	4.6	0.05	0.5	4.0		
3	3.6	0.1	0.3	3.2		0
5	6.4	0.3	1.4	4.7	0.1	0.5
9	11.6	0.6	5.4	5.6	2.1	1.0
10	4.2	0.8	0	3.6	2.8	1.0
12	2.4	1.0	0	1.4	4.0	3.0
13	1.4	0.4	0	1.2	4.3	0.5
14↓	190	188	0	2.0	5.6	0
15	800	800	0	0.1	6.5	0
20	23,000	13,000	0	0	10.8	0

↓ ; addition of pure culture yeast, No. 7-1.<sup>10)</sup>

的な研究があり、これらを総合し、山廃もとの微生物遷移のモデルを Fig. 1 に示した。

硝酸還元菌としては *Pseudomonas* 属細菌が、<sup>14)</sup> 乳酸菌は低温性の *Leuconostoc mesenteroides* と *Lactobacillus sakei* が順次生育することが大切であり、<sup>4)</sup> 成分的には亜硝酸の存在 (10→1 ppm) 中に、乳酸の生成が行われることが、山廃もと育成管理のポイントで、亜硝酸と乳酸の共存により野生酵母が淘汰され、純粋な山廃もとが得られることになる。

なお、山廃もとと速醸もとは成分的にも差異があり

(Fig. 2)，山廃もとのアミノ酸度は乳酸の生成と並行して急速に進行し、速醸もとの 2~3 倍に達する（しかし可溶性全窒素はほぼ同量）。また酸度も大きいが、山廃もとのアミノ酸の成因については諸説があり、今後に解明をまつ課題である。<sup>37)</sup>

山廃もとは枯し（保存）が効くといわれ、以前は仕込みだめしたものであった。山廃もとの酵母の特性については、植村ら<sup>40)</sup>が手がけ、石戸ら<sup>39)</sup>はモデル山廃もとによって、酵母の生存率が良いことを報じた。しかし分け時の成分（特にアルコール分）によっても影響されるらしい。<sup>40)</sup>

この伝来の酒母について菌の遷移という面では解明され、製造管理の指針も明らかにされたが、生態学的な突っこんだ部分での問題はまだ沢山残されたままである。

### (3) もろみにおける酵母の動態

開放発酵法による清酒もろみでは、野生酵母の汚染が常に起こっており、酒母の項で既にふれ、また TTC 重層法を用いたもろみ調査結果でも明白なところであるが、もろみ期間中に接種酵母と汚染酵母との間にどのような関係（共存あるいは拮抗）があるかは1960 年頃までは不明のままであった。著者は変異酵母 No. 328 株を用いて、酵母間の拮抗により、はげしい遷移が起こることを初めて証明し、また野生泡なし酵母 A-63 株でも協会酵母との拮抗を観察した。その後今村ら<sup>17)</sup>により killer 酵母が見出され、酵母間の拮抗現象の 1 つが解明された。

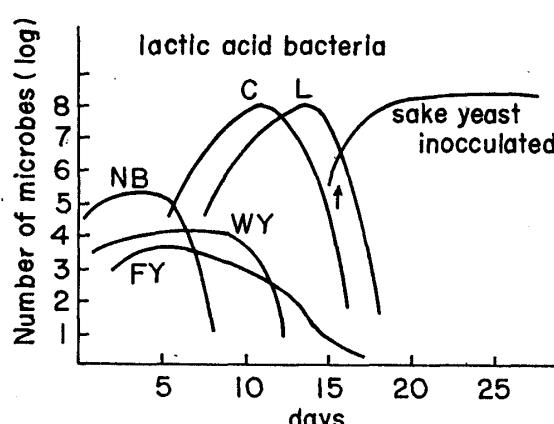


Fig. 1. A model of microflora in the process of *yamahai moto* making.

C: cocci

L: lsd

NB: nitrate-reducing bacteria

WY: wild yeasts

FY: film forming yeasts

↑: addition of pure yeast culture

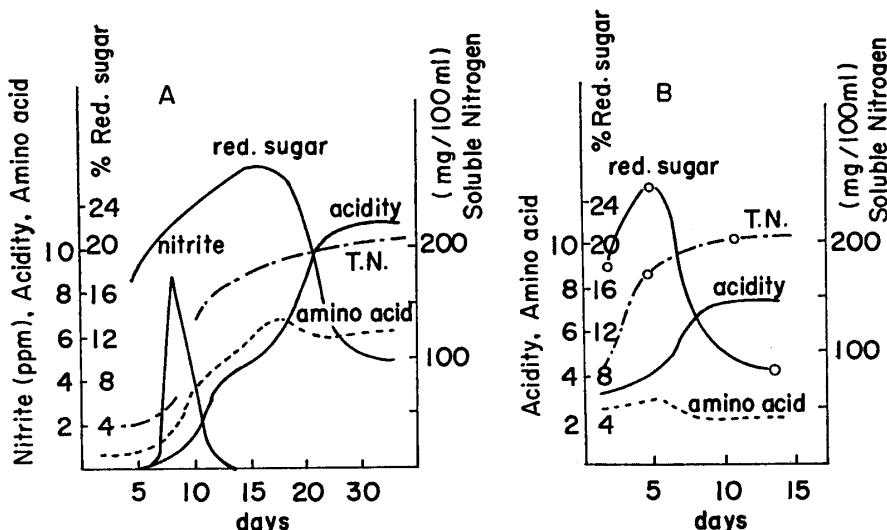


Fig. 2. Changes of the components in the process of *moto* making.<sup>87)</sup>  
A: *Yamahai moto*    B: *Sokujō moto*

(i) No. 328 株使用による酵母間の拮抗現象の証明  
変異株 No. 328 を接種した高温糖化もと（純度50%）を使用したもろみにおいて、酵母間にはげしい遷移が観察された。その様相を Table 5 に示した。仕込み後、おどりおよびもろみ 3 日目頃までは接種酵母 No. 328 株の順調な増殖が見られていたが、3 日目から 5 日目の間に急激な変化が起り、野生株が優勢になり、No. 328 株は減少→消失（不検出）という結果になり、もろみ中期以降の発酵は汚染の野生株によって営まれたことになった。<sup>8)</sup>

この拮抗の原因について、汚染酵母（W）を分離して検討した。麴汁中では K-6 とも拮抗したが、混合培養（K-6: W, 5:1 あるいは 10:1）して 3 日後に W 株は優勢になるが、ほぼ 1:1 と 6 号が検出されていること、麴汁寒天上で cross test で、No. 328 株には明らかに阻止部が見られたが（栄養要求性の強いことに原因するを考えた）、K-6 では観察されなかった。これらの結果から、当時は killer 酵母の報告もなく、メチレン青添加培地の使用など killer 現象の検出法も勿論なかったので、汚染酵母 W 株が killer 生産株であったかは不明であるが、可能性はうすいと考えている。

(ii) No. 7-1 株による山廃もと使用もろみの場合  
純度98%以上の山廃もと（Table 4）を用いて、もろみを仕込んだ経過は非常な好結果が証明され、良好な酒質を得た。<sup>9)</sup>著者は、山廃もとでも吟醸酒が造れることを提唱した。

以上の結果およびその後の著者の経験や菅間らの調査<sup>35, 41)</sup>などを総括すると、もろみの酵母純度は酒母に

Table 5. Changes of yeast population in the process of *moromi* using a mutant.<sup>8)</sup>

Day	Odori	Baume	Alcohol of yeasts	Total count	Purity of No. 328 strain
				× 10 <sup>5</sup> /g	% inoculated
3	9.1	6.3	8.5	825	75
5	3	5.2	6.0	840	80
7	5	3.2	7.0	1,920	10
10	7	1.6	11.5	1,920	10
15	10	0.5	13.5	2,700	4
24	15	0.3	17.0	2,500	0.3

より左右され、酒母への野生酵母の汚染がわずか（10～20%）でも、もろみでは相当に拡大される場合が多く、後述する killer 酵母や野生泡なし A-63 株の汚染の場合のように、完全に野生酵母に占領されてしまうこともある。従って、酒母の純度、汚染酵母の性質に常に監視の目をゆるめてはならない。なお菅間ら<sup>41)</sup>は酒造工場の年間の酵母の動態を調査し、溝など湿った所が汚染源となり、仕込み期にふえ、ある期間を経て、こうじ→酒母→もろみ、そして庫内全体の汚れということになり、もろみは重度の汚染状態となるとしている。

### (iii) 泡なしもろみの発生と原因

著者は泡なし酵母を島根県の 1 酒造場のもろみから分離したが、この工場は毎年、協会酵母を使用しても、仕込みを重ねるうちに、泡なしもろみになった。この泡なし酵母がどこで生き続け、どこから侵入して

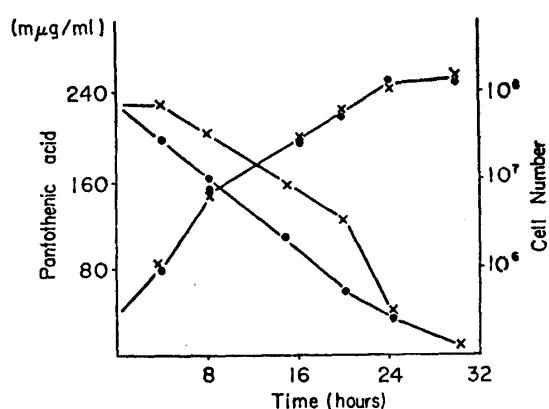


Fig. 3. Growth and uptake of pantothenic acid.

● Kyokai No. 7 yeast  
x Non-foaming yeast

Two yeast strains were incubated in a synthetic medium in the presence of sufficient Ca-pantothenate at 30°C with standing.

来るのか不明のままである。また別の工場で、この酵母で仕込んだもろみから、10日後、15日後に仕込んだもろみに飛火し、泡なしもろみになった例が起きた。そこでこの泡なし酵母株 A-63 を K-7 と混合培養したり、栄養要求性などを比較し、汚染の原因を探した。

A-63 株は K-7 との混合培養で 1/10 位の接種でもすぐに逆転し優勢に生育するが、K-7 が消滅して plate されなくなることはなかった。後に A-63 株は killer factor 生産性のないことが知られた。また生育速度や栄養要求性も検討したが大差がなかったので、栄養のとりあいによる拮抗現象と考え比較したところ、Fig. 3 に示したような取り込み速度に差が見られた。すなわち、生育の初期に A-63 はパントテン酸の取り込みが大きく、K-7 は比較的ゆっくりであることから、混合培養した場合 A-63 はもろみのパントテン酸を急速に消費し、K-7 の分が不足し、急速に弱化して(メチレン青染色性増大) A-63 の優勢が起こるのではないかと推測した。<sup>44)</sup> この点についてはその後検討されていないので確認されているわけではないが、killer 株でない酵母の汚染現象は今でも可成りあるわけで、<sup>32)</sup> その理由についてはなお今後残された問題である。

一方 A-63 株は優勢になるが、15°C 培養を 30°C に急昇温させるとこの A-63 株は急激に衰え、再び K-7 が再増殖することが見られた。生もとや山廃もとの「分け」直前に「ぬくみ取り」と称して酵母を 30°C 近くまで昇温させる操作が行われ、その目的は弱性酵母の淘汰とされていたが、この操作も勘やもろみ状貌によってのみ管理していた昔の醸造法からあみ出された対策ではないかと推測される(その後反対現象も見

られているので、さらに検討を要する問題と考えている)。

(iv) 野生酵母による厚ぶたの形成と発酵の低下

清酒もろみはその末期に坊主、ちりめん、渋皮、厚ぶたなど様々な様相を呈するが、厚ぶたになったもろみは発酵がにぶり、多酸で香りが悪くなることが昔から知られていた。その理由については蒸し米や麹が軟らかいことなどがあげられていたが、齊藤ら<sup>31)</sup>が厚ぶたもろみ酵母は TTC ピンクの野生酵母が多いこと、菅野らが多酸で発酵のにぶいもろみから分離した野生酵母も厚ぶたをつくること、秋山の分離した A-63 株はもろみの初期は泡なしであるが、末期にふたがかかり、K-8 もふたになることなど、TTC ピンク系の酵母に多く見られる現象であることが知られてきた。

菅野<sup>22)</sup>が四国地方から分離した野生酵母は(昭和38～40年頃)発酵力( $Q_{CO_2}$ )は K-7 などと差異はないが、米もろみでの発酵は弱く、ふたを形成して実際のもろみと同様であったことから、「ふた」と酵母との関係を検討した。

この「ふた」は膜様物質と酵母との凝集体で、K-7 もろみから酵母を除き、米粒を十分糖化した残渣が A-63 と凝集することから、この物質は米粒の胚乳細胞膜であることがわかった。この凝集現象には酵母の株と Age が関係し、若い細胞は凝集せず、老熟した細胞によって起こり、K-7 のような「ふた」を形成しない酵母は老若ともに凝集せず、もろみ中によく分散している(これが発酵の旺盛さ、くい切りの良さをもたらすと思われる)。さらに胚乳細胞膜の代わりにろ紙織維あるいは粉末セルロースを加えても凝集が起こり、厚ぶた形成酵母の老菌体はセルロースと結合する特異性を示すようになる。

清酒酵母と胚乳細胞壁との凝集機構について A-63 菌体を 0.1N NaOH や mannan-protein complex 脱離試薬: エチレンジアミンで処理すると凝集性を失うことから、表層のたんぱく質が凝集の主役を果たしていると推定した。そこで若細胞(15°C, 4 日間培養)と老細胞(15°C, 10 日間培養)から細胞壁を分離し、アミノ酸分析の結果から、塩基性アミノ酸、とくにリジン含量が凝集性株に多いことが認められた(Table 6)<sup>43)</sup>。

また、表層に露出していると思われる -COOH 基、-NH<sub>2</sub> 基、-PO<sub>4</sub> 基などを化学修飾し、凝集性を検討したところ、Chloramine T および HNO<sub>2</sub> による NH<sub>2</sub> 基を修飾した場合に凝集が阻害された。

上記のことから、もろみの厚ぶたは凝集性株では細

Table 6. Composition of three groups of amino acid in young and old cells of *saké* yeasts.<sup>42)</sup>

Period of days	Strains	% (μM) of total amino acid			
		Acidic amino acids	Neutral amino acids	Basic amino acids	Ammonia
4	Kyokai No. 6*	16.7	67.0	4.2	12.0
	Kyokai No. 7*	16.9	67.1	4.3	11.8
	A-63	15.8	64.5	5.9	13.8
	S-38	15.8	66.2	4.1	13.9
	S-60	16.1	66.6	4.5	12.1
	Kyokai No. 8	15.5	68.1	4.2	12.1
10	Kyokai No. 6*	16.3	67.7	4.3	11.8
	Kyokai No. 7*	16.8	67.9	3.8	11.4
	A-63	16.0	60.3	8.2	15.5
	S-38	16.0	60.7	7.7	15.6
	S-60	15.8	60.5	8.4	15.4
	Kyokai No. 8	15.6	62.6	7.3	14.5

\* *Saké* yeasts non-aggregating with cellulose.

胞が古くなると細胞表層は mannan-protein complex のたんぱく部が表層に露出し、アミノ基が活性基となって米粒胚乳細胞壁と相互作用を起こして凝集し、これに発酵ガスがからんで、もろみの上層に浮上することにより起こる。その結果、もろみ中で活動している酵母密度が下がり、発酵が停滞してくる。ビール酵母の凝集 (flocculation) もくい切りに深い関係があるが、清酒酵母におけるこの現象とは非常に異なっている。

凝集性酵母は熟成酒母では多少の凝集をしているから、この酵母のかなりの汚染があつても、plate culture では少なく計数されるから注意が必要である。この酵母が killer 非生産株ならば酒母へ接種する培養酵母量を増し、工場を清潔にして汚染を防止するようしなければならないが、killer 生産株の場合は、後述の方法などによって十分な対策を立てる必要がある。

#### 4. 新しい酵母の造成と利用

**泡なし酵母の再発見と改良<sup>43)</sup>** 泡なし酵母は善田や高橋によって、大正5年に発見、報告されており、著者は再発見をしたわけであるが、ここで分離された A-63 株は多酸性で、もろみの前半は急進するが後半に「ふた」をつくり、香りも良くなく、雑味の多い清酒となった。<sup>15)</sup>

しかし泡なし酵母によれば、泡笠も消泡機も不要で、発酵タンクの利用効率も20~30%は向上し、タンクの

洗浄などに要する労力も少なくてすむメリットがある。そこで著者らは、優良な泡なし酵母を選択することとした。

熊谷らは、Fig. 4 のように顕微鏡下で、高泡酵母は気泡によく吸着するが、泡なし酵母は全く吸着しないことを観察し、この性質を利用して保存株から泡なし酵母を選択した。パン酵母やしょうちゅう酵母は泡なし性であったが、もろみの風味が不良で良い結果が得られなかった。<sup>44)</sup> 大内は、この性質を利用した通気法 froth flotation method と、百瀬らが指摘していた泡なし酵母細胞の静電気的特性を利用する乳酸菌との凝集法を考案し、K-7 から優良な泡なし性変異株を分離した。<sup>16)</sup> その後、表層の特性を利用する泡なし酵母の分離法は、Table 7 に示したように種々考案され、どの酵母株からでも分離が可能となった。<sup>45)</sup> 最近では、原が見出したアルコール耐性の強い K-7 変異株からも

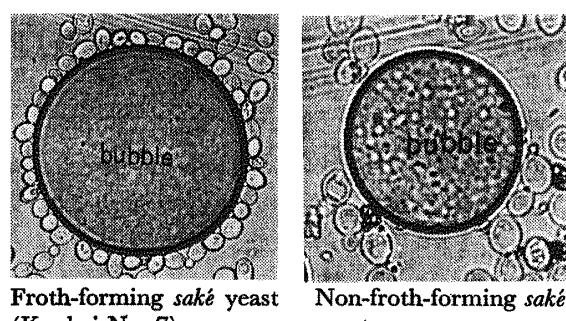


Fig. 4. Affinity of *saké* yeast cells to air bubble.

Table 7. Selection of non-foaming mutants.<sup>45)</sup>

1. Froth flotation method
2. Cell agglutination method
a) electrostatic force {microbes..... <i>Lactobacillus</i> , <i>Bacillus</i> , etc. {non-viable materials
{solid .....celite, phosphocellulose, etc. {liquid .....PVS-K, SDS, etc.
b) surface activity (?) .....sugar ester, fatty acid soap

泡なし性株が分離され、実用化の試験中である。<sup>20, 21)</sup>

K-7 泡なし変異株（現在協会 701 酵母として頒布されている）は昭和44年冬から実用されたが、その醸造上の性質は、親株の K-7 もろみと比較して

(1) やや前急的でボーメの切れ、アルコールの生成が早い

(2) 酸の生成はやや少ない

(3) 酒質は差異がないが、きれいな軽い酒質となるなどが指摘された。(1) は麹の力価や蒸し米の調整を適切にすれば、もろみ期間の短い点はむしろメリットとなり得るし、今後の大量仕込みや純米酒造りに生かされると考えられる。また K-9 株の泡なし株は吟醸造りに適している。

**高泡酵母泡なし酵母の表層構造** 大内ら<sup>46)</sup>は、細胞壁の分析から、マンナンとグルカン含量やアミノ酸組成などには大差のことと、下記の諸性質から両酵母の表層と気泡への付着性の差異について、

高泡酵母は

(1) 気泡界面によく吸着される

(2) プロテアーゼ処理によって気泡親和性を失う

(3) 水-ベンゼン 2 層系で菌体はベンゼン層に分散する

ことから、高泡酵母の表層には mannan-protein complex 中のアミノ酸の疎水基が露出し、疎水性が強いために気泡に吸着する。

泡なし酵母は

(1) 気泡親和性がない

(2) マンナーゼ処理で気泡親和性を示す

(3) 水-ベンゼン 2 層系で菌体は水層に分散する

ことから、泡なし酵母には細胞壁 mannan--protein complex 層の上にさらにマンナン層があって親水性を増し、気泡に吸着しない。これらをまとめ、高泡酵母と泡なし酵母の表層構造のモデルを Kidby ら<sup>52)</sup>のモデルをもとに示した。<sup>53)</sup>

一方、熊谷<sup>47)</sup>は、酵母の気泡付着性と関連があると推測される細胞壁表層マンナンの構造を研究し、

Peat, Lee や Stewart らがパン酵母マンナンについて示している構造に類似していることを示した。<sup>48)</sup>すなわちメチル化法、過沃素酸酸化と Smith 分解によりグリコシド結合の位置を、加酢分解や部分酸加水分解法によって側鎖構造を検討し、その構造は  $\alpha$ 1-6 結合を主鎖とし、すべての主鎖のマンノース残基から  $\alpha$ 1-2 結合の分枝で側鎖があり、側鎖のうちで最も長いものは末端に  $\alpha$ 1-3 結合が 2 個、主鎖に近い方に  $\alpha$ 1-2 結合からなり、パン酵母のものよりマンノース残基 1 個長い側鎖が存在する。また、側鎖の  $\alpha$ 1-2 と  $\alpha$ 1-3 結合の割合はパン酵母では 1:1 であるが、清酒酵母では 1:2 である。また、高泡酵母も泡なし酵母もマンナン構造については同じであり、免疫反応も同じであった。しかし細胞の電顕による所見は相当に異なっている。<sup>49)</sup>さらに熊谷は *Oerskovia* sp. 株を酵母マンナンあるいは菌体を培地として培養し、生産されるマンナーゼ、プロテアーゼ、細胞壁溶解酵素区分をクロマト法により分別し、これらを組み合わせて酵母の気泡付着性と酵母細胞の最表層の構造との関係を検討し、上記の想定の妥当性を示した。<sup>50)</sup>なお小幡は、同菌の酵母細胞壁溶解酵素について研究し、プロテアーゼの一種に細胞壁溶解性のあることを最近報告し、細胞壁のグルカン層の中にもたんぱく質が組み込まれていることを推測した。<sup>51)</sup>これらをまとめ、高泡酵母と泡なし酵母の細胞壁のモデルを Fig. 5 のように示した。

**交配による優良 killer 清酒酵母の造成と応用** 今村ら<sup>17)</sup>は Bevan や Woods らが報告した killer factor 生産性酵母が清酒酵母の中にもいることを見つけた。これはある工場のもろみが培養酵母を接種していても、間もなく発酵状態の違ったもろみになることに注目し、このもろみから killer 酵母を分離した。 *S. cerevisiae* に属する酵母の生産する killer factor は同属の sensitive 株の対数増殖期の細胞に作用して致死させるもので、細胞膜の透過性に異常を生じ、ATP が菌体外に漏出するために起こる現象とされている。この作用は pH 4~5 という清酒もろみの pH で強く働き、15°C

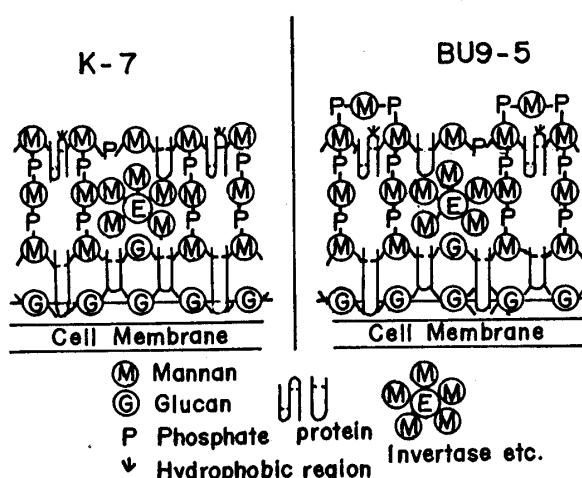


Fig. 5. Presumed difference in cell surface structure between high-froth-forming yeast (K-7) and non-froth-forming yeast (BU9-5). (after Kidby,<sup>52)</sup> Ouchi<sup>53)</sup> and Obata<sup>51)</sup>

以下で比較的安定である点も、火落菌とともに清酒造りには困った問題といわなければならない。

今日、広く使用されている協会酵母はすべて sensitive 株であるが、清酒酵母には免疫性のある neutral と killer 株とがあり、抵抗性株も得られている（アルコール耐性株はこれに属する<sup>20)</sup>）。

今村らは、killer 酵母の酒造場での出現頻度は比較的少なく、湿け麴やおり酒からも発見したが（もろみへの侵入経過もこの辺からであろうと推測）、昭和50年度には発見できなかったとしている。大内らは、醸造試験所の保存株で昭和40年前後に分離されたものの中から17.6%もの killer 株を発見し、また昭和50年度に全国調査した時にも211場中9場から killer 株を見出したことから、以前は全国的にかなりこの酵母に汚染されていたのではないかと思われるが、近年は酵母管理の徹底から減少したと解している。ただ50年度の調査から、killer 酵母占率100%というのは1場で、90%台の場合は neutral 酵母と共に存し、killer 酵母が2%から16%といった低率の場合には sensitive 株と共に存していたことは興味あるところである。<sup>32)</sup>

killer 酵母は多酸性で香りが悪いものが多いので望ましい酵母といえないが、その侵入経過が明白でなく、またその作用機作も特殊なためにこれまで十分な防御対策はなく、圧倒的多数の培養酵母を酒母に添加し、これを繰り返して防ぐといったところであった。

そこで著者らは killer 生産株に優良酵母の性質導入をはかり、反復戻し交配によって実用性のある killer 生産性で K-7 の特性 ( $\beta$ -アラニン培地で 35°C 生育、

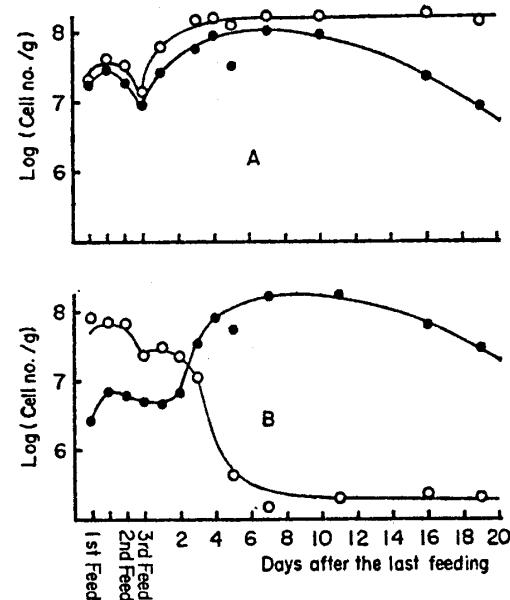


Fig. 6. Population change of yeasts in fermenting saké mashes.

A: 3HY11 (●) and KL25 (○),  
B: 3HY11 (●) and K-8 (○).

Yeast populations in fermenting saké mashes (100 kg rice) were counted on a  $\beta$ -alanine medium depending upon the distinctive growth between 3HY11 and the others.

香気生成能など）を持った雑種を造成した。<sup>54)</sup> 野生 killer 清酒酵母 KL88、この株と K-7 との 3 代交配株 3HY11 と K-7 および K-8 によりそれぞれ酒母をつくり、単菌仕込みもろみ、等量混合あるいは K-8: 3HY11 (10: 1) 混合のもろみを仕込んで、経日的にもろみ経過と拮抗現象を追跡した。K-8 を用いた理由は、3HY11 株と  $\beta$ -アラニン培地 35°C 培養で判別がつき、K-7 と同じ sensitive 株であるからである。

その結果は Fig. 6 に示したように、3HY11 株は killer 株 KL25 株とともに killer 生産性で共存したが、K-8 との混合もろみでは、今村の指摘の通り、3 ~ 5 日目の間に逆転し 3HY11 が優勢を占めた。単菌仕込みもろみの経過は、3HY11 は K-7 とほとんど同一で、香気成分の生成もほぼ同様であった。

killer 酵母の汚染対策としては、優良 neutral 酵母または killer 耐性株を使うことも一策であるが、これらは通常起こっている野生酵母の汚染には無効であるから、交配により優良性質を獲得した交配株を使うことが良策と考えられる。しかし今日、直ちにこの交配株を実用することは、他の優良酵母が使いにくくなること、この株が汚染菌となった場合に防止策がないことなどから、見合はせているところである。

killer factor は、核支配の細胞質因子プラスミドにより生産されるから、この性質はそのままとし、交配によって優良な性質を核に導入することが可能で、その実例を示したが、さらに飯村ら<sup>19)</sup>は、ワインの貯蔵中に起こる *S. bayanus* による変質を防止するため、この考えを応用した。すなわち、*S. bayanus* は killer factor sensitive であるところから、ワイン酵母 OC-2 (SO<sub>2</sub> 耐性をもつことが重要) と killer 生産性 KL88 (清酒酵母で SO<sub>2</sub> 耐性がない) とを交配し、SO<sub>2</sub> 耐性をもつ killer 生産株を造成し、ワイン醸造に応用し成功した。この例は世界で初めてで、ワインもろみにいる *S. bayanus* などを、もろみ初期に死滅させてしまい、貯蔵を安全にする方策である。

**耐アルコール性酵母の造成と利用** 原は、20% アルコールに浸漬しておいてもなお生存している酵母から、アルコール耐性の著しく強い株を分離した。<sup>20,21)</sup> K-7 を用いて耐性株 6-4-C 等を得たが、この耐性株は親株の性質とほとんど変わりないが、もろみ末期アルコール分が18%以上になっても弱ってこない点が違う。K-7 では、高アルコールによる死によって菌体成分、とくにアミノ酸の溶出（菌体内的 carboxy peptidase の活性化による）があり、もろみのアミノ酸の増加に

よる清酒の保存性の劣化（例えば着色性の増大）、また溶出ペプチド等による火持ち性の低下などが起こるが、耐性株ではこれらがないことから、酒化率を上げても製品の保存性が良いメリットが生じる。もろみの発酵はややおそく、酸度も多くなるが、清酒の酸組成でもりんご酸が多くなる特色がある。これまでの一般的清酒は主要な酸であるこはく酸：乳酸：りんご酸の比率は、5:5:2-3 であるが、耐性株はりんご酸が多く 5:3:5 程度になり、やわらかい酸味で酒質の多様化の一手段となろう。

このアルコール耐性酵母は細胞表層に特色があるらしい、killer factor に抵抗性で、また酵母細胞壁溶解酵素にも溶けにくい。前者の性質から killer 酵母対策に用い得るし、後者の性質を用い耐性酵母を効率よく集殖することができる。

**代謝制御発酵の応用** 清酒の香気成分として重要な高級アルコールとそのエ斯特ルは、(1) Ehrlich の経過により、相当するアミノ酸から生成される場合と、(2) グルコースからアミノ酸合成系にそってケト酸から生成される場合と 2通りある。

清酒の香気成分の組成は、古くから多くの研究がある。<sup>56,57)</sup> 著者らも種々の酵母について香気成分の生成

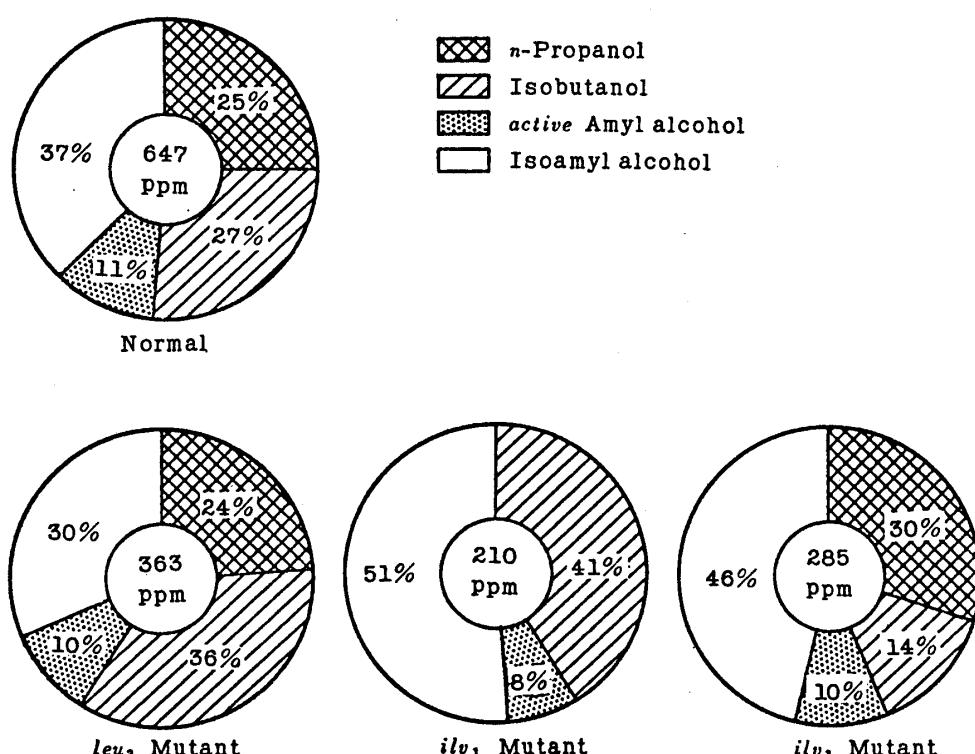


Fig. 7. Profiles of the main higher alcohols in saké produced by a saké yeast and the metabolic mutants.<sup>55)</sup>

Values in the inner circles are the total amount of the four higher alcohols.

の差異を検討したが、酵母株により生産性には差はあるが、主要アルコールの組成比には大差がなく、従って香りの性質は類似性が強いと判断している。そこで清酒の香気を根本的に変えて個性化をはかるためには、(2)の代謝系の欠落株、mutant を使用するか、(1)の相当するアミノ酸を特異的に代謝してしまう株（酵母でなくてもよいが）を用いるかであろう。坂口は、昭和43年の講演すでにこのことを指摘している。<sup>58)</sup>

著者らは目下(2)に関連する系の mutants を使用して試醸し、Fig. 7 に示す特色のある香気成分組成をもつ清酒を得た。<sup>55)</sup>しかしこの酵母の発酵力が弱く、アルコールの生成も、また香気成分の生成も少ないので、目下のところアイディアの提出といったところであり、今後優良 mutant 造りを目指さねばならないと考えている。なお(1)については、清酒もろみが並行複発酵方式で、もろみの最後まで各種アミノ酸の供給があるから難題であろう。

### 5. おわりに

実用清酒酵母の判別法が種々考案され、実際の酒造工程管理に応用されて、今日では純粋もろみをつくる管理法が確立されたといつても過言ではない。佐藤ら<sup>59)</sup>により、清酒の成分と味覚との関係、とくに甘辛の感覚と酸と糖量との関係が示されているから、これとも関連させて、酵母株の特性を生かした個性のある醸造法へ進むべきものと考える。一方、昭和50年度のもろみ酵母についての調査から、まだ不純もろみが10%程度ではあるが、あることも記憶しておかなければならない。

酵母の自然純粋培養法である山廃もとのからくりの解説ができ、伝来の手法の合理性が明らかにされた。しかし今日、この酵母の育成が繁雑なために非常に減少してしまっていることは残念であり、山廃もとの良さの再検討を、高度化した微生物管理技術のもとで再開すべきではないかと考える。

泡なし酵母、アルコール耐性の強い酵母、killer 酵母の造成など新しい酵母により、その個性を生かした醸造法が実用化されており、今後は清酒のみでなく、ワイン等の醸造にも広く役立つと思われる。これらの酵母は、従来使用されてきた酵母と醸造適性は大差ないが、細胞表層の性質がそれぞれ相當に異なっていることが注目され、清酒もろみの高濃度アルコールの成因や、ビール酵母の flocculation との関連でも興味深い問題である。

### 文 献

- 1) 矢部：東化， **16**, 206 (1895).
- 2) 高橋、江田、奥村、山本、中沢、渋川、湯川：醸試報， **54**, 1 (1914).
- 3) 斎藤：清酒醸造の菌学、大阪醸造学会 (1950).
- 4) 北原：微生物の生態、東大応微研シンポジウム、第2集, p. 20 (1960).
- 5) 塚原：農化， **28**, 405 (1954).
- 6) 植村：微生物生態論、学会出版 (1978).
- 7) 古坂、須藤、植村、藤井：醸工， **29**, 158 (1951).
- 8) 秋山、梅津：醸工， **37**, 586 (1959).
- 9) 秋山、古川：農化， **36**, 358 (1962).
- 10) 古川、秋山：農化， **37**, 398 (1963).
- 11) Akiyama, H., Sugano, N.: *J. Ferment. Technol.* **45**, 1093 (1967).
- 12) 秋山、古川：農化， **37**, 403 (1963).
- 13) 芦沢：醸協， **61**, 749 (1966).
- 14) 小西、柄倉、緒方：醸工， **45**, 795 (1967).
- 15) 秋山、岩田、長繩：醸工， **43**, 629 (1965).
- 16) Ouchi, K., Akiyama, H.: *Agric. Biol. Chem.* **35**, 1024 (1971).
- 17) 今村：酵母における適応と制御、(長谷川編), p. 143 学会出版 (1978).
- 18) 大内、秋山：醸工， **54**, 615 (1976).
- 19) 飯村、原：醸酵工学会大会要旨集, p. 34 (1977).
- 20) 原、野白：醸協， **73**, 14 (1978).
- 21) 原、野白：醸協， **73**, 76 (1978).
- 22) 菅野：醸協， **70**, 723 (1975).
- 23) Stelling-Dekker, N. M.: *Die Sporogenen Hefen* (1931).
- 24) Lodder, J.: *The Yeasts*, p. 595 (1970).
- 25) 高橋：農化， **28**, 398 (1954).
- 26) 井上：酵母学(橋谷編), p. 556, 岩波書店, 東京 (1967).
- 27) 勝屋、北村：醸協， **44**, 7 (1949).
- 28) 竹田、塚原：農学集報(東京農大), **18**, 251 (1974).
- 29) 永井：蛋核酵， **12**, 506 (1967).
- 30) 秋山、古川：農化， **37**, 533 (1963).
- 31) 斎藤：醸協， **60**, 898 (1965).
- 32) 秋山、大内、植田：醸試報， **148**, 1 (1967).
- 33) 菅間、山川、鷹岡、山村、野白：醸協， **60**, 453 (1965).
- 34) 菅間、大内、忍頂寺、野白：醸協， **61**, 164 (1966).

- 35) 菅間, 大内, 加藤, 麻生, 川崎: 酿協, **62**, 1022 (1967).
- 36) 花岡: 酒類, **13**, (2号) 1 (1918).
- 37) 秋山: 日本の酒の歴史 (加藤編), p. 406, 研成社, (1976).
- 38) 植村: 酒類, **56**, 941 (1961).
- 39) 石戸, 笠原, 秋山: 酒類, **66**, 434 (1971).
- 40) 大内, 板野, 秋山: 酒類, **73**, 307 (1978).
- 41) 菅間: 酒類, **62**, 927 (1967).
- 42) 菅野, 鈴木, 秋山: 農化, **49**, 141 (1975).
- 43) 布川, 大内: 化学と生物, **11**, 216 (1973).
- 44) 秋山, 熊谷, 田中, 大内: 酒類, **66**, 516 (1971).
- 45) 大内, 布川: 酒類, **67**, 54 (1972).
- 46) Ouchi, K., Nunokawa, Y.: *J. Ferment. Technol.* **51**, 85 (1973).
- 47) 熊谷, 布川, 秋山: 酒類試報, **143**, 31 (1971).
- 48) 三崎: 総合多糖類科学 (原田, 三崎編), 下巻 p. 19, 講談社, 東京 (1974).
- 49) 秋山, 岩田: 酒類, **44**, 1 (1966).
- 50) 熊谷, 秋山: 農芸化学会大会要旨集, p. 266 (1978).
- 51) Obata, T., Iwata, H., Namba, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2387 (1977).
- 52) Kidby, D. K., Davies, R.: *J. Gen. Microbiol.*, **61**, 327 (1970).
- 53) 大内, 菊池, 布川: 酒類, **52**, 811 (1974).
- 54) 大内, 秋山: 酒類, **54**, 615 (1976).
- 55) Akiyama, H., Yoshizawa, K., Ouchi, K.: *Analysis of Foods and Beverages, Headspace Techniques*, p. 228 Academic Press, New York (1978).
- 56) 佐藤編: 酒類成分一覧, p. 25, 日本醸造協会, 東京 (1977).
- 57) 佐藤編: 酒類成分一覧, p. 56, 日本醸造協会, 東京 (1977).
- 58) 坂口: 古酒新酒, p. 136, 講談社, 東京 (1974).
- 59) 佐藤, 川島, 丸山: 酒類, **69**, 774 (1974).

(昭53. 6. 1受付)