

## 尿素低生産性三重県清酒酵母の開発

堀場文二\*, 小澤敦揮\*\*, 丸山裕慎\*, 山崎栄次\*

Development of Mie Sake Yeast Strains Suppressed with Urea Productivity

Bunji HORIBA, Atsuki OZAWA, Hironori MARUYAMA and Eiji YAMAZAKI

### 1. はじめに

カルバミン酸エチルは、国際がん研究機関 (IARC)により、「ヒトに対しておそらく発がん性がある」物質 (グループ 2A, 平成 19 年) に分類されている<sup>1)</sup>。日本国内では食品衛生法上の規制値は無いが、海外では清酒の規制値を設けている国もあり (カナダ, チェコ: 200 $\mu$ g/L)<sup>2)</sup>、海外輸出にはその低減化が望まれている<sup>3)</sup>。これまでの研究において、三重県産清酒のカルバミン酸エチル濃度は低く、安全性は担保されていることが明らかになっているが<sup>4)</sup>、県内酒造企業からは、さらなるカルバミン酸エチル低減化の要望も多く聞かれる。

清酒においてカルバミン酸エチルは、尿素とエタノールの化学反応によって生じる<sup>5)</sup>。カルバミン酸エチルの低減化のためには、尿素低生産性酵母の利用が有効であるとの報告がある<sup>6)</sup>。

清酒酵母由来の尿素は、酵母の生体内代謝酵素の一つであるアルギナーゼによってアルギニンが分解されて生じるが、北本らはアルギナーゼ遺伝子の変異により酵母が尿素非生産性になることや、CAO 培地 (Canavanine, Arginine, および Ornithine から成る選択培地) により、アルギナーゼ低活性株を選抜できることを報告している<sup>7,8)</sup>。

本研究では、県産清酒のカルバミン酸エチル濃度の低減化を目的として、三重県清酒酵母 5 株 (MK1, MK3, MK5, MK7, MLA12) を親株としての尿素低生産性酵母の取得を進めることとし、

令和 3 年度から 2 ヶ年の予定で研究事業に取り組んだ。

遺伝子変異株の取得は、薬剤や紫外線などの外部刺激により親株の遺伝子を変異させる方法があるが、目的以外の遺伝子まで変異させ、従来の発酵特性等が変化してしまう恐れがある。三重県産清酒は、令和 2 年に国税庁から地理的表示「三重」の指定を受け、その酒質がブランドとして確立されている ([https://www.nta.go.jp/taxes/sake/hyoji/chiri/200619\\_besshi01.htm](https://www.nta.go.jp/taxes/sake/hyoji/chiri/200619_besshi01.htm))。このため、取得した尿素低生産株は、親株である三重県酵母と同等の酒質であることも求められる。そこで、薬剤や紫外線などによる変異処理を行わず、CAO 培地により自然変異した菌株の取得を試みた<sup>8)</sup>。また、既知の知見では菌株の尿素生産性評価は、生産量の直接測定に依っているが<sup>3,9,10)</sup>、本研究では尿素生産量とアルギナーゼ活性を測定し、両因子の関連についても検討した。

令和 3 年度は、MK5 で 3 株、MK7 で 8 株の変異株を取得できたが、MK3 および MLA12 では、選抜した変異候補株が全てアルギナーゼ活性を有しており、変異株取得頻度は低かった<sup>11)</sup>。MK1 はアルギナーゼ活性および尿素生産量が低く、本質的に尿素低生産性酵母であることが明らかとなった。また、MK5 において、アルギナーゼ活性は高いが尿素生産量の低い株 (MK5-1) を取得した<sup>11)</sup>。

本年度は、変異株の取得頻度向上を目的として、CAO 培地の組成を変更した検討結果を報告する。また、MK5-1 において、親株 (MK5) と比較して尿素低生産性以外に、酒質に影響が生じていないことを確認するため、清酒の小仕込み試験により

\* 食と医薬品研究課

\*\* 四日市地域防災総合事務所環境室

ポーメ、アルコール度、酸度、アミノ酸度など製成酒一般成分、および香気成分や有機酸濃度を調査したので、その結果についても報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試菌株

菌株は、後述の2.3節では、三重県清酒酵母4株 (MK3, MK5, MK7, MLA12) を用いた。また、2.4節では、MK5, MK5-1, 陽性対照として尿素生産性を有することが報告されているきょうかい酵母901号 (K901)<sup>12)</sup>、および陰性対照として尿素非生産性であることが報告されているきょうかい酵母1901号 (KArg1901)<sup>12)</sup>を用いた。

### 2.2 使用培地

使用した培地組成を表1に示す。通常の酵母の培養にはYPD液体培地および最少培地を用いた。アルギナーゼ低活性株の選抜にはCAO培地<sup>8)</sup>および、CAO培地をもとに組成を変更した培地 (CAO改変培地) を用いた。アルギナーゼ活性の評価には、アルギニンのみが窒素源として含まれるArg培地<sup>8)</sup>と、オルニチンのみが窒素源として含まれるOrn培地を用いた<sup>8)</sup>。

### 2.3 アルギナーゼ低活性株の選抜手法の改善

北本らの方法<sup>8)</sup>を参考にして、アルギナーゼ低活性株を選抜した。すなわち、各酵母菌株をYPD液体培地または最少培地に接種し、30℃で2日間静置培養した後、培養液を遠心分離 (5,000 rpm, 4℃, 5 min) して、沈殿した菌体を回収した。菌体を滅菌水で2回洗浄した後、菌体濃度が約10<sup>7</sup>または10<sup>8</sup> cells/plateとなるようにCAO培地またはCAO改変培地上に塗り広げ、30℃で3週間培

養した。直径1 mm以上に生長したコロニーをアルギナーゼ低活性株として選抜した。

### 2.4 小仕込み試験および製成酒の酒質分析

清酒の小仕込み試験にはMK5, その尿素低生産性候補株MK5-1, K901, およびKArg1901を供し、総米200 gの一段仕込みで行った (n=5)。原料米として、精米歩合60%のα化米 (AA-60, 徳島製麹株式会社)、および精米歩合50%の乾燥麹 (G-50, 徳島製麹株式会社) を用いた。また、麹歩合20%、汲水歩合130%にて、乳酸780 μlを添加した。各酵母菌株はYPD液体培地において30℃で2日間静置培養し、小仕込み試験開始時のもろみ中の菌体濃度が約1.5×10<sup>7</sup> cells/mlになるように汲水で調整して仕込んだ。発酵温度は15℃で一定とした。仕込み開始日を1日目とし、22日目に遠心分離 (5,000 rpm, 4℃, 15 min) し、得られた上清を製成酒とした (上槽)。製成酒の酒質について、一般成分 (ポーメ、アルコール度、酸度、アミノ酸度) および香気成分を、国税庁所定分析法<sup>13)</sup>に基づき分析した。有機酸濃度の測定はHPLC (alliance2695, Waters) で行った。試料は、エタノールを等量混合し、沈殿した高分子分画を除去したものをを用いた。HPLCの分析条件は以下のとおりとした。移動相として3 mM 過塩素酸水を用い、流速は1 mL/minで通液した。カラムはShodex KC-811×2本 (昭和電工株式会社) を用い、カラム温度60℃で分離後、ポストカラム法にて0.2 mM BTB溶液を含む15 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液と等量混合し、450 nmの吸光度によりコハク酸、乳酸、および酢酸濃度を測定した<sup>14)</sup>。製成酒中の尿素濃度 (mg/L) は尿素濃度測定キット (F-キット

表1 各培地の組成

|                  | (単位)   | YPD液体培地 | 最少培地 | CAO培地 | CAO改変培地 | Arg培地 | Orn培地 |
|------------------|--------|---------|------|-------|---------|-------|-------|
| 酵母エキス            | %(w/v) | 1       | -    | -     | -       | -     | -     |
| ポリペプトン           | %(w/v) | 1       | -    | -     | -       | -     | -     |
| グルコース            | %(w/v) | 2       | 2    | 2     | 2       | 2     | 2     |
| 寒天               | %(w/v) | -       | -    | 2     | 2       | 2     | 2     |
| YNB w/o AA*      | %(w/v) | -       | 0.67 | -     | -       | -     | -     |
| YNB w/o AA, AS** | %(w/v) | -       | -    | 0.17  | 0.17    | 0.17  | 0.17  |
| カナバニン            | ppm    | -       | -    | 10    | 30      | -     | -     |
| オルニチン            | mM     | -       | -    | 5     | 1.25    | -     | 5     |
| アルギニン            | mM     | -       | -    | 1     | 0.25    | 5     | -     |

\*Yeast Nitrogen Base without Amino Acids

\*\*Yeast Nitrogen Base without Amino Acids and Ammonium Sulfate

尿素／アンモニア，株式会社 J.K.インターナショナル) により測定した。

MK5 と MK5-1 による製成酒中成分の統計的有意差は，t 検定により評価した ( $p<0.05$ )。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 アルギナーゼ低活性株の選抜

三重県清酒酵母 4 株 (MK3, MK5, MK7, MLA12) において，CAO 培地上には直径 1 mm に満たない微小コロニーが多数発生し，アルギナーゼ低活性株を単離することが困難であった。そこで，表 1 のとおり組成を変更した CAO 改変培地を用いたところ，微小コロニーの発生を抑えられた。

CAO 培地へ接種する前段階の，YPD 培地での前培養時には，酵母の液胞中にアルギニンをはじめとする塩基性アミノ酸や，S-アデノシルメチオニン (メチオニンと ATP の化合物) が蓄えられる<sup>15,16)</sup>。そのため，これらが栄養源やエネルギー源となり，CAO 培地上でもわずかに生長し，微小コロニーが多数発生した可能性がある。そこで，最少培地で酵母の前培養を行うよう変更したところ，MK3, MK5, MK7, MLA12 の 4 株について，微小コロニーの発生を抑えられ，1 mm 程度に生長したコロニーから変異候補株を複数取得できた。

アルギナーゼ低活性株はアルギニンを代謝できず，アルギニンのみを窒素源とする培地では生育できないが，アルギニン代謝により生じるオルニチンを含む培地では生育できる。このため，得られた変異候補株から，Arg 培地で生育せず Orn 培

地で生育する株 (アルギナーゼ低活性株) の単離を試みたが，候補株の保存のため，Arg 培地および Orn 培地に接種する前に YPD 液体培地で培養を試みたところ，酵母が増殖せず，アルギナーゼ低活性候補株を全て喪失した。その原因としては，YPD 液体培地への接種時の実験操作が不適切で，それに起因して酵母が増殖しなかった可能性がある。そのため，実験操作を精査し，再度選抜を試みる必要がある。

#### 3.2 小仕込み試験および製成酒の酒質分析

MK5 および MK5-1 による製成酒の各種成分分析結果を表 2 に示す。一般成分分析結果から，ボームは MK5-1 が有意に高く，アルコール度は MK5 が有意に高いことが確認できる。糖組成の分析は行っていないが，ボームの値から，MK5 と比較して MK5-1 の方が発酵が緩やかに進んでおり，上槽日時点での残糖が多くなったと考えられる。また，酸度とアミノ酸度については，株間で有意な差は認められなかった。香気成分分析結果からは，酢酸エチルの生成量は株間で有意な差は認められず，バナナ様の香りをもたらす酢酸イソアミルおよびリンゴ様の香りをもたらすカプロン酸エチルの生成量は MK5-1 の方が有意に高く，イソアミルアルコールは MK5 の方が有意に高いことが確認できる。通常，前駆体であるイソアミルアルコールの生成量が増加することで，酢酸イソアミルの生成量は増加する。そのため，イソアミルアルコールの生成量が多い MK5 の方が，酢酸イソアミルを

表2 製成酒の各種成分分析結果

| 菌株    | 一般成分                   |                         |                         |                          |
|-------|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
|       | ボーム                    | アルコール度(%)               | 酸度(ml)                  | アミノ酸度(ml)                |
| MK5   | 2.65±0.12 <sup>a</sup> | 19.39±0.09 <sup>b</sup> | 4.76±0.24 <sup>a</sup>  | 2.45±0.10 <sup>a</sup>   |
| MK5-1 | 3.58±0.15 <sup>b</sup> | 18.03±0.08 <sup>a</sup> | 4.65±0.14 <sup>a</sup>  | 2.40±0.04 <sup>a</sup>   |
| 菌株    | 香気成分(ppm)              |                         |                         |                          |
|       | 酢酸イソアミル                | カプロン酸エチル                | 酢酸エチル                   | イソアミルアルコール               |
| MK5   | 3.46±0.18 <sup>a</sup> | 0.73±0.03 <sup>a</sup>  | 80.20±4.80 <sup>a</sup> | 176.43±6.29 <sup>b</sup> |
| MK5-1 | 4.21±0.15 <sup>b</sup> | 0.93±0.08 <sup>b</sup>  | 79.40±1.69 <sup>a</sup> | 151.59±3.16 <sup>a</sup> |
| 菌株    | 有機酸濃度(ppm)             |                         |                         |                          |
|       | コハク酸                   | 乳酸                      | 酢酸                      |                          |
| MK5   | 933±127 <sup>a</sup>   | 1540±211 <sup>a</sup>   | 716±44 <sup>a</sup>     |                          |
| MK5-1 | 1004±251 <sup>a</sup>  | 1707±229 <sup>a</sup>   | 867±87 <sup>a</sup>     |                          |

値: 平均値±標準誤差(S.E.) (n=5)

異なる英文字(a,b)を付した数値間には，5%水準の有意差がある。(t検定)

高生成すると考えられたが、予想と異なる結果となった。一因として、イソアミルアルコールを酢酸エチルに変換する酵素であるアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AATFase) の活性が、MK5 と比較して MK5-1 で高くなっている可能性が考えられる。有機酸分析結果からは、MK5 と比較して MK5-1 の方がコクと押し味をもたらすコハク酸、柔らかな味わいを与える乳酸、食酢の匂いをもたらす酢酸の生成量が数値的には多いが、株間で有意な差は認められなかった。

MK5 はコハク酸の生成が多く、酢酸イソアミルの生成が少ない穏やかな香気特性を有している<sup>14)</sup>。また、三重県清酒酵母は、すでにその酒質が県内の清酒製造業者に広く認知されており、尿素低生産株においても、親株と同等の酒質が望まれている。各種成分分析結果からは、いくつかの項目で有意差が認められるものの、MK5 と MK5-1 の酒質はおおむね似た傾向にあることが確認された。

一方、表 3 の各菌株の尿素生産量の分析結果からは、尿素低生産であることが報告されている KArg1901<sup>12)</sup>でも、平均で 48.5 ppm の尿素を生産しており、MK5、MK5-1、K901 ではそれ以上の尿素が生産された。原因について今後の検討課題とするとともに、今回の小仕込み試験の結果では MK5-1 の尿素生産性を評価することができなかつたため、今後再現性を確認する必要がある。

表3 各培地の組成

| 菌株       | 尿素(ppm)  |
|----------|----------|
| MK5      | 80.7±1.3 |
| MK5-1    | 96.7±3.1 |
| K901     | 69.1±0.9 |
| KArg1901 | 48.5±1.3 |

平均値±標準誤差 (S.E.) (n=5)

#### 4. まとめ

三重県産清酒のカルバミン酸エチル濃度の低減化を目的として、その前駆物質である尿素の生産量の低い三重県清酒酵母株を取得することを試みた。MK1 以外の三重県清酒酵母 4 株を供し、CAO 改変培地の使用や、最少培地での前培養によって、尿素の生産に関わるアルギナーゼ遺伝子が自然変異した株を選抜したところ、変異候補株の取得効

率は向上したが、同遺伝子欠損株の取得には至らなかった。

また、尿素低生産株 (MK5-1) の小仕込み試験における製成酒は、親株 (MK5) と比較して一般成分および香気成分で優位な差が確認されたものの、おおむね親株 (MK5) と似た酒質となった。

一方、尿素の生産量については、尿素低生産性酵母である KArg1901 においても、尿素が生産される一方で、MK5、MK5-1、K901 ではそれを上回る尿素が生産されたことから、正確な評価のため今後の再確認を要する結果となった。

#### 参考文献

- 1) International Agency for Research on Cancer : “Alcohol consumption and ethyl carbamate”. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans”. 96, Lyon (2010)
- 2) EFSA (European Food Safety Authority) : “Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages”. The EFSA Journal, 551, p1-44 (2007)
- 3) 渡部貴志ほか : “輸出用に適した群馬清酒酵母の育種に関する研究”. 平成 30 年度群馬県立産業技術センター研究報告 (第 3 報), p1-4 (2018)
- 4) 山岡千鶴ほか : “三重県で醸造された清酒のカルバミン酸エチル濃度と三重県清酒酵母のアルギナーゼ活性”. 三重県工業研究所研究報告, 40, p45-48 (2016)
- 5) 原 昌道ほか : “尿素あるいはその関連物質を含むモデル酒中におけるカルバミン酸エチルの生成”. 日本醸造協会誌, 83(1), p57-63 (1988)
- 6) 田中準浩ほか : “カルバミド生産能の低い清酒酵母の単離”. 日本醸造協会誌, 84(6), p413-417 (1989)
- 7) K. Kitamoto et al. : “Genetic engineering of a sake yeast producing no urea by successive disruption of Arginase gene”. Appl. Environ. Microbiol., 57, p301-306 (1991)
- 8) K. Kitamoto et al. : “Mutant isolation of non-urea producing sake yeast by positive selection”. Journal of fermentation and bioengineering, 75(5), p359-363 (1993)
- 9) 佐藤稔英ほか : “Tw201 号酵母からの尿素低生

- 産性自然変異株の分離”. 岩手県工業技術センター研究報告, 19, p54-57 (2017)
- 10) 谷本昌太ほか: “広島吟醸酵母の尿素低生産性株の育種”. 愛媛大学教育学部紀要, 56, p269-276 (2009)
- 11) 小澤敦揮ほか: “三重県清酒酵母の尿素低生産性化”. 三重県工業研究所研究報告, 46, p41-46 (2022)
- 12) 蓮田寛和ほか: “きょうかい酵母(R)清酒用尿素低生産性高エステル酵母 1901 号(KArg1901)について”. 日本醸造協会誌, 109(8), p576-581 (2014)
- 13) 国税庁: “国税庁所定分析法注解 第4版”. 日本醸造協会. p7-33 (1993)
- 14) 丸山裕慎ほか: “三重県清酒酵母の遺伝的及び醸造特性の包括的評価”. 日本醸造協会誌, 118(2), p115-127 (2023)
- 15) 北本勝ひこ: “清酒醸造における酵母液胞の働き”. 日本醸造協会誌, 84(6), p367-374 (1989)
- 16) 金井宗良: “清酒酵母の機能性成分高蓄積機構とその応用に関する研究”. 生物工学会誌, 100(3), p112-118 (2022)