

輸出用に適した群馬清酒酵母の育種に関する研究

渡部貴志・高橋仁恵・増渕 隆

Breeding of non-urea producing Gunma sake yeasts which are suitable for export
Takashi WATANABE, Hitoie TAKAHASHI, Takashi MASUBUCHI

清酒の海外輸出量は年々増加傾向にあるが、清酒中に含まれるカルバミン酸エチルの規制値を設ける国が増えてくると懸念されている。カルバミン酸エチルは、国際がん研究機関（IARC）によって「ヒトに対する発ガン性がおそらくある」とされるグループ2Aに属する化合物である。そこで本研究では、清酒中のカルバミン酸エチル含有量を減らす目的で、その前駆物質である尿素を生産しない群馬県独自の清酒酵母を育種することにした。本年度は、群馬KAZE酵母の尿素非生産化に成功したので報告する。

キーワード：清酒、群馬清酒酵母、尿素非生産性、カルバミン酸エチル

Although, export volume of Japanese sake has been gradually increased, it is considered that the countries regulating volume of ethyl carbamate in Japanese sake, would be also increased. Ethyl carbamate is classified the group 2A “probably the cause of cancer” by International Agency for Research on Cancer (IARC). Therefore, the purpose of this study was to reduce the volume of ethyl carbamate in Japanese sake, we attempted to breed Gunma sake yeasts which do not produce urea as a precursor of ethyl carbamate. In this year, we succeed to obtain the candidates from Gunma sake yeast KAZE2.

Keywords: Japanese sake, Gunma sake yeast, non-urea productivity, ethyl carbamate

1 はじめに

清酒は、我が国の主食である米を醸して造る伝統的な酒類であり、國酒として親しまれてきた¹⁾。また、清酒の風味は地域性に富み、国内各地の郷土料理とともに独自の飲食文化を形成してきた。さらに、米の精白技術の向上により、吟醸酒は近代になってから開発された清酒であり、常に時代とともに清酒は進化している。当係では、酒造組合と共同で県独自の吟醸用酵母の開発に取り組んできており、群馬KAZE酵母として県内酒蔵に広く普及している²⁾。さらに、県農業技術センターと共同で県独自の酒造好適米「舞風」も開発している³⁾。

一方、欧米諸国からは吟醸酒がライスワインとして認知され、親しまれてきており、近年の日本食ブームで海外輸出量は年々増

え、Ginjo-shuという名前も浸透しつつある。特に地元産の米や水、酵母で造られる地酒は、ワインでいうテロワールという観点から、欧米諸国から好まれている。

ところが、海外輸出量増加に伴い、清酒中に含まれるカルバミン酸エチルに規制値を設ける国が増えてくることが懸念されている。カルバミン酸エチルは、国際がん研究機関（IARC）によって「ヒトに対する発ガン性がおそらくある」とされるグループ2Aに属する化合物である。カルバミン酸エチルは、清酒中の尿素とエタノールが火入れ貯蔵中に縮合して生成する。したがって、清酒酵母が尿素を生産しなくなれば、清酒のカルバミン酸エチルの生成量は低減出来ると考えられ、既に実用例が報告されている⁴⁾。しかしながら、県独自で開発した酵母は、様々な遺伝子に変異が入ってお

り、尿素非生産性にすることによって、その酵母がもつ優れた発酵特性・香气成分生成能を損なう場合も想定される。

海外輸出においてテロワールという観点からも、群馬KAZE酵母の果たす役割は大きい。その優れた醸造特性を維持しつつ、尿素のみを生成しない新たな酵母を育種する意義は大きい。昨年度の予備的検討において、群馬KAZE酵母は既存の方法による尿素非生産化には至らなかった（非公開）。本年度は、この原因を調べる為、群馬KAZE酵母の親株である清酒酵母きょうかい901号（K901）などと比較しつつ、群馬KAZE酵母に適した尿素非生産化の方法を検討したので報告する。

2 実験材料と方法

2.1 供試酵母と使用培地

前年度と同様、群馬KAZE酵母の中で最も使用頻度が高い、KAZE2号（KAZE2）を育種対象にした。清酒酵母きょうかい701号（K701）、K901は日本醸造協会より購入したものをを用いた。

前培養は、YM培地（酵母エキス3 g/L、麦芽エキス3 g/L、ペプトン5g/L、グルコース10 g/L）を用いた。窒素飢餓処理は、無窒素YNBD培地（YNB w/o amino acids and ammonium sulfate 1.7 g/L、グルコース20 g/L）を用いた。尿素非生産性酵母の選抜培地の組成の検討は、北本ら⁴⁾のCAO培地（YNB w/o amino acids and ammonium sulfate 1.7 g/L、カナバニン10 mg/L、アルギニン塩酸塩0.21 g/L、オルニチン塩酸塩0.84 g/L、グルコース20 g/L、寒天20 g/L）、Arg培地（CAO培地の窒素源をアルギニンのみにしたもの）、Orn培地（CAO培地の窒素源をオルニチンのみにしたもの）を基準にした。発酵試験は、簡易発酵試験培地（酵母エキス10 g/L、麦芽エキス30 g/L、ペプトン10 g/L、リン酸一カリウム0.5 g/L、硫酸マグネシウム・七水和物0.1 g/L、グルコース100 g/L）を用いた。

2.2 選抜培地の検討

YM 5mL含む試験管に酵母を一白金耳接種し、30℃にて24時間、150 rpmの往復振とう培養、あるいは静置培養により酵母の前培養を行った。得られた前培養液をそのまま、あるいは滅菌蒸留水に置換したものを、無窒素YNBD培地で窒素飢餓処理をしたものを、それぞれ選抜培地に塗布し、30℃で静置培養を行い、カナバニンによる酵母の増殖抑制の有無を評価した。

2.3 尿素非生産性酵母の選抜

北本らの方法⁴⁾に準拠し、カナバニン耐性となった候補株について、Arg培地で生育できず、Orn培地で生育できるものを尿素非生産性酵母として選抜した。

2.4 簡易発酵試験による尿素的定量

YM 5mLを含む試験管に酵母を一白金耳接種し、30℃にて24時間、150 rpmの往復振とう培養を行った。簡易発酵試験培地20 mLを100 mL容三角フラスコに加え、前培養液200 μ Lを接種し、15℃で7日間、75 rpmの回転振とう培養を行った。培養前後の重量減少量を計測した。

培養液10 mLを15 mL試験管に採取し、遠心分離（3,000 rpm \times 5分間）を行って、上清全量を新たな試験管に採取した。遠心上清1 mLを1.5 mLチューブに分取し、80℃で15分間加温を行うことで、残存する酵素活性を失活させた。得られた試料の尿素をF-kit 尿素／アンモニア（Roche Diagnostics GmbH, Germany）を用い、アンモニアの値を差し引いて測定した。

3 結果と考察

3.1 KAZE2の尿素非生産化方法

酵母の尿素生産は、アミノ酸の一種であるアルギニンを酵母細胞内に取り込み、酵素アルギナーゼの働きでアルギニンをアミノ酸のオルニチンと尿素に加水分解して行われる。北本らは、アルギニンのアナログ物質であるカナバニン耐性株の選抜により、アルギナーゼの機能を欠損させることによって、アルギニンから尿素への変換経路が無くなり、酵母の尿素非生産化に成功した

表1 選択培地条件が酵母の生育抑制に与える影響

	窒素飢餓	pH 調整	K701	K901	KAZE2
カナバニン硫酸塩	無し	無し	+	+	++
	有り	無し	-	-	+
	有り	有り	-	-	+
カナバニン	無し	無し	-	-	+
	有り	無し	-	-	±
カナバニン+硫酸	有り	有り	-	-	+

++:生育が良い、+:生育する、±:わずかに生育する、-:生育が抑制

4). このCAO培地を用いた方法が優れている最大の特徴は、変異処理を施さなくてもアルギナーゼ遺伝子 (*CARI*) の自然変異株が得られることである。つまり、他の遺伝子が変異を起こすことは、ほとんど無いと言っていいほど少なく、醸造特性に影響を及ぼさないと考えられている。

一方、前年度の予備的検討では、確実に尿素非生産性変異株を得ることを主眼としてしまい、イオンビーム照射による変異処理を施した検討に終始してしまった。このため、KAZE2から尿素非生産性変異株が得られない原因を明らかにすることが出来ず、その対処方法が見出せなかった（非公開）。そこで原点に立ち戻り、北本らが用いたK701、K901も合わせて選択培地の検討をすることで、KAZE2のCAO培地の生育抑制条件を見つけることにした。

前年度の予備的検討では、イオンビーム照射処理後の酵母細胞をYM培地などで回復培養した後、無窒素YNBD培地で窒素飢餓処理を行い、カナバニンの濃度を従来の10 mg/Lから30 mg/Lに増やしたCAO培地に塗布することで、ようやくカナバニンの生育抑制がかかるようになった（非公開）。また、イオンビーム照射処理に供する酵母細胞は、通常の変異処理で用いられる好気培養ではなく、嫌気培養により培養したものを用いていた。一方、新潟県醸造試験場によると、窒素飢餓処理は、カナバニンを用いたCAO培地ではなく、カナバニンの価格の5分の1で購入可能なカナバニン硫酸塩を用いたCAO培地での、新潟酵母の尿素非生産化検討の時に見出したものであることが判明した。これらの情報から、以下の5つの問題点を検討する必要性が考えられた。

- ① CAO培地に塗布する酵母細胞の前培養条件は、好気培養と嫌気培養のどちらで行うべきか。
- ② CAO培地に塗布する酵母細胞は、窒素飢餓処理が必要であるのか。
- ③ カナバニンとカナバニン硫酸塩のどちらを、KAZE2用の選択培地に用いることが適当であるのか。
- ④ カナバニンの添加量はどの程度が妥当であるのか。
- ⑤ カナバニン耐性酵母を取得する為には、どの程度の培養日数が必要か。

選択培地条件の結果の概要を表1にまとめる。詳細について、上記の①については好気培養の方が良く、②については前培養液を滅菌水で置換するだけで良く、③については、硫黄成分の蓄積がKAZE2のカナバニン耐性に大きく影響を与えているようであった。また、④について様々な組成で検討したところ、アルギニンとオルニチンの濃度を既存のCAOの半量にするだけで（カナバニン濃度は10 mg/Lのまま）、KAZE2の完全な生育抑制が確認出来た。さらに、⑤についてこれらの条件を整えた後、KAZE2の自然変異によるカナバニン耐性株の取得を試みたところ、4週間の培養で、400枚のCAO培地から4株の候補株が得られた。なお、北本らの報告では、KAZE2の親株のK901からは、10枚の培地から43株の候補株が得られており⁴⁾、単純計算でKAZE2の取得率は、K901の430分の1であることが分かった。

次に、得られた4株のカナバニン耐性株に対し、尿素非生産性の指標となるアルギナーゼ欠損株の選抜を試みたところ、いず

表2 簡易発酵試験の結果のまとめ

	尿素 (mg/L)		アンモニア (mg/L)		重量減少量 (g)	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
KAZE2	ND	-	15.66	8.35	1.00	0.02
K901	ND	-	18.97	5.61	1.00	0.04
自然-1	ND	-	8.06	0.87	0.95	0.02
自然-3	ND	-	8.47	0.64	0.99	0.04
自然-4	ND	-	22.19	0.68	1.03	0.01

ND : 検出限界以下

れもOrn培地で生育し、そのうち3株がArg培地で生育することが出来ない、アルギナーゼ欠損株であることが確認出来た。

3. 2 発酵能と尿素生産性の評価

先の検討によって得られた酵母が、実用規模の清酒造りに使用可能であるか評価するためには、高い発酵能力が保持されていること、清酒の味や香りのバランスが優れていること、などを確認する必要がある。このような評価を行う為には、実際の酒造りを模した小仕込み試験を行う必要がある。しかしながら、一回の小仕込み試験は、一ヶ月以上の日数がかかってしまう為、大多数の酵母の評価を1度に行うことは難しい。したがって、今回は調製が容易な液体培地である簡易発酵試験培地を用い、発酵試験による酵母の発酵能力と尿素生産量を調べた。

簡易発酵試験培地を用いた場合、酵母の発酵能力を示す重量減少量については、差が認められなかった(表2)。しかしながら、尿素を計算する際に差分の値となるアンモニアの値のばらつきが、親株で特に大きくなり、見かけの計算上は全ての酵母の尿素生産量は検出限界以下であった。アンモニアは、尿素やアミノ酸の分解で生じてくる為、簡易発酵試験培地に用いていたペプトンなどの窒素源から遊離してきたものであると考えられる。これらのことから、簡易発酵試験培地で尿素生産量を正確に評価することは難しいと考えられた。一方で、自然-1、自然-3のアンモニアの値は、親株より低い値となっていたため、尿素非生産性であると示唆されている。さらに、清酒酵母の拡大培養に用いられる麴エキス培地で培養してみたが、同様に尿素生産量の正

確な検出は出来なかった(データ略)。しかし、麴エキス培地では、自然変異株の重量減少量が低くなっており、大まかに酵母を選抜するためには有用であった。今後は、変異処理によりKAZE2の醸造特性を維持した尿素非生産株の取得を試みる。

4 まとめ

本研究では、清酒中のカルバミン酸エチル含有量を減らす目的で、その前駆物質である尿素を生産しないKAZE2の変異株の取得に成功した。なお、尿素生産量の定量には、液体培地は不適切であったが、麴エキス培地では重量減少量の評価は適切に行っていた。したがって、まずはその値を指標に選抜し、酵母の数を絞った後で小仕込み試験を行って、全体的な醸造特性と、尿素生産性を評価することが、効率よく酵母の尿素非生産化に繋がると考えられた。

謝 辞

新潟県醸造試験場の佐藤圭吾主任研究員に、選択培地の検討でご助言を頂いた。

文 献

- 1) 和田美代子：日本酒の科学 (2015)
- 2) 増淵 隆ら：平成17年度群馬産業技術センター研究報告、35-38
- 3) 増淵 隆ら：平成18年度群馬産業技術センター研究報告、40-43
- 4) 北本勝ひこら：日本醸造協会誌、598-601 (1992)