

## 輸出用に適した群馬清酒酵母の育種に関する研究（第3報）

渡部貴志・佐藤勝也\*・林 秀謙\*\*・増淵 隆\*\*\*

Breeding of non-urea producing Gunma sake yeasts which are suitable for export  
Takashi WATANABE, Katsuya SATOH,  
Hidenori HAYASHI and Takashi MASUBUCHI

発がん性が疑われているカルバミン酸エチルは、清酒酵母が生産する尿素とエタノールの化学反応により生成する。また、清酒中のカルバミン酸エチル含有量に規制値を設ける国が将来的に増えてくることが懸念されている。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、群馬県独自酵母の尿素非生産化に取り組んでいる。本年度では、試作株を用いた実地醸造試験を実施し、得られた製成酒のカルバミン酸エチル生成能が低減されたことを確認したので報告する。

キーワード：清酒、群馬清酒酵母、尿素、カルバミン酸エチル、イオンビーム

Ethyl carbamate (EC), considered as probably the cause of cancer, is produced on the chemical reaction of urea and ethanol. These materials are produced by sake yeasts. It is considered that the countries, regulating volume of EC in Japanese sake, would be also increased. Therefore, the purpose of this study was to reduce the volume of EC in Japanese sake, we attempted to breed Gunma sake yeasts which do not produce urea as a precursor of EC. In this year, we demonstrated the real scale brewing test with non-urea producing candidate and confirmed that few EC was formed in the brewed sake.

Keywords: Japanese sake, Gunma sake yeast, urea, ethyl carbamate, ion-beam

### 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<sup>1)</sup>。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。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ている。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。

当センターでは、群馬県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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。これらの成果

は、群馬県の清酒輸出量の増大に少なからず貢献していると言える。

しかしながら、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できると考えられ、既に実用例が報告されている<sup>4)</sup>。

そこで本研究では、群馬県独自酵母の優れた醸造特性を維持しつつ、尿素非生産性となった酵母を取得・実用化することを目的に検討している。昨年度までに群馬KAZE酵母1号（KAZE1）、群馬KAZE酵

母2号（KAZE2）、泡なし群馬G2酵母の尿素非生産候補株を取得した。また、KAZE2の試作株については、当センターのパイロットプラント試験醸造でも良好な結果を確認した<sup>5,6)</sup>。今年度は、KAZE1の試作株を用いたパイロットプラント試験醸造を行い、KAZE2の試作株については実地醸造試験を行ったので報告する。

## 2 実験材料と方法

### 2.1 供試酵母と使用培地

群馬県独自酵母KAZE1、KAZE2は、県内酒蔵に頒布しているスラントのものを使用した。また、昨年度取得したKAZE1およびKAZE2の尿素非生産性試作株は、グリセロールストックにしたものを用いた。

菌株のリフレッシュのための前培養は、YM寒天培地（酵母エキス3 g/L、麦芽エキス3 g/L、ペプトン5 g/L、グルコース10 g/L、寒天 20 g/L）を用いた。

### 2.2 パイロットプラント醸造試験

平成29年度兵庫県産山田錦（40%精米）を用い、表1に示す配合で総米75 kgの試験醸造を行った。酵母の拡大培養は、麴エキス（Brix 5°）18.75 mLで23℃、4日間静置培養により行った。麴米は、ハイG（樋口松之助商店）を種麴として製麴したものをを用いた。掛米の吸水率は、酒母32%、初添28%、仲添27%、留添27%になるよう調整した。なお、酒母の汲水は水道水を加工し（リン酸二水素カリウム0.8 g/L、硫酸マグネシウム・七水和物0.2 g/L）、乳酸30 mL加えて中温速醸にて5日間の酒母造りを行った。また、もろみの汲水は水道水を用いた。

### 2.3 製成酒の評価

得られた製成酒の尿素は、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。酸度、アミノ酸度、日本酒度は国税庁所定分析法に準拠して分析した。グルコース、マルトース、およびエタノールは、高速液体クロマトグラフ、示差屈折率検出器を用い、分析を行った。香氣成分（酢酸エチル、イソアミルアルコール、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル）は、ヘッドスペースガスクロマトグラフを用いて分析した。製成酒の官能検査は、5点法で行った。

### 2.4 実地醸造試験

実地醸造試験を実施して頂ける県内酒造会社を広く募集したところ、4社に委託することになった。酵母の拡大培養用培地は、食品添加物用の酵母エキス、ミーストP1G（アサヒフードヘルスケア）3 g/L、グルコース50 g/Lを用いた。群馬県独自酵母と同様の手順で拡大培養を行い、酒造会社が指定した期日に酵母をお渡しした。用いる原料米の種類と精米歩合の指定はせず、本醸造酒、純米酒、純米大吟醸酒の試作を委託した。また得られた製成酒について、尿素有量の分析と酒造技術者の利き酒のために提出して頂き、もろみ経過データは発酵状態が健全であることを確認するために集めた。

### 2.5 カルバミン酸エチル生成試験

実地醸造試験を実施して頂いたA社から、対照となるKAZE2号を用いて同じ条件で醸造を行った製成酒を提供して頂き、それぞれの試料を50℃で24時間加温してカルバミン酸エチル生成試験を行った。なお、カルバミン酸エチルの含有量は、橋口らの方法<sup>7)</sup>にしたがってエキストルレートNT3カラム（メルク社）を用いて固相抽出し、GC/MS（アジレント・テクノロジー社）を用いて分析した。

表1 パイロットプラントでの仕込み試験条件

	酒母	初添	仲添	留添	追水	計
総米 (kg)	3.75	12.50	22.50	36.25		75.00
掛米 (kg)	2.50	8.75	17.00	31.25		60.00
麴米 (kg)	1.25	3.75	5.00	5.0		15.00
汲水 (L)	5.00	13.75	30.00	52.50	15.00	131.25
温度 (℃)	22	12	8	6~12		

### 3 結果と考察

#### 3.1 KAZE1の試作株の醸造特性

育種酵母を実用化する場合、小仕込み試験の検討で多くの候補株の中から試作株を選抜し、パイロットプラントで一連の清酒製造工程を行い、もろみ経過データと醸成酒を検証する必要がある。その結果を踏まえ、酒造会社にどのような性質を持った株で、どのような造り方をしたら良いかを提案できるようになる。昨年度検討したKAZE2からの尿素非生産性酵母試作株に引き続き、今年度はKAZE1号およびその試作株について、当センター内のパイロットプラントを用い、総米75 kgの試験醸造を行った。

今年度の試験醸造では、甑による蒸米吸水率を調べるために、吸水率を低めに設定したところ、麴米の糖化力価が低くなってしまった。その影響からかポーメがもろみ後半で切れすぎてしまい、KAZE1（表2）、試作株（表3）ともに辛口となってしまった。一方で、試作株の各成分の経時変化は、KAZE1のものとはほぼ同じ傾向を示していた。また、酒造技術者約40名の利き酒により回答を頂いた感想は、両者で

ほぼ同じであったことから、醸造特性を維持できていることを確認した（データ略）。さらにKAZE1の醸成酒の尿素的含有量は15.3 mg/Lであったのに対し、試作株の値は0.8 mg/Lであり、尿素が生産されていないことが確認できた。

#### 3.2 KAZE2の試作株の実地醸造試験

当センターのパイロットプラントでは、同じ原料米を用いて同時進行で試験が行える反面、年に一回しか実施できないので得られるデータが限られてしまう。一方、酒造会社では、様々な種類の原料米を用い、酒造会社毎に異なった水や酒造環境となるため、開発した酵母を実用化するためには、実地醸造試験での評価が必須となる。昨年度はKAZE2の試作株について、当センターのパイロットプラントで有用性を確認したことから、実地醸造試験を行った。

A~D社では、それぞれ原料米が異なっていたが、20~30日のもろみ日数で上槽されており、試作株の発酵力には実用的に問題無いことが確認された。また、醸成酒の分析値をみると、B社ではカプロン酸エチルが低いものの、その他の試料では5.0 mg/L以上あり、KAZE2の高カプロン酸エチル生成能が維持されていた（表4）。さ

表2 KAZE1のパイロットプラント醸造試験のもろみ経過のまとめ

1号機 KAZE1	酵母					もろみ													
	2d	3d	4d	5d	添加前	踊り	4d	6d	8d	11d	13d	15d	18d	20d	22d	25d	27d	28d	
ポーメ (日本酒度)	13.4	13.7	11.9	8.7	7.1	10.2	7.2	7.1	6	4.1	2.84	1.97	1.13	0.74	0.43	0.01	-0.15	-0.31	
酸度	3.55	4.5	5.63	5.84	5.95	1.7	0.7	0.95	1.4	1.5	1.5	1.45	1.45	1.9	1.7	1.72	1.75	1.75	
アミノ酸度	0.85	0.55	0.65	0.56	0.82	0.64	0.2	0.35	0.65	0.65	0.7	0.8	0.85	0.85	1	1.17	1.1	1.1	
エタノール (%)	-	-	-	6.1	-	-	4.4	4.6	6.4	9.4	11.1	12.2	13.8	14.9	15.1	16	16.4	16.9	
グルコース (%)	-	-	-	-	-	-	11.4	10.9	9.2	6.5	5.0	4.1	3.2	2.9	2.6	2.3	2.1	2.1	
マルトース (%)	-	-	-	-	-	-	2.5	2.8	2.9	2.5	2.2	1.7	1.2	1.1	0.9	0.8	0.7	0.6	
酵母数 (10e8個/ml)	-	-	-	2.2	-	-	1.2	1.5	1.3	2.0	1.9	2.1	2.1	1.6	1.8	1.6	1.8	2.0	
生菌率 (%)	-	-	-	100.0	-	-	100.0	100.0	100.0	100.0	94.9	100.0	100.0	100.0	100.0	94.4	100.0	95.3	
イソアミルアルコール (ppm)	-	-	-	-	-	-	40.7	55.2	64.5	103.2	101.8	115.6	126.3	136.3	138.8	144.4	145.6	145.3	
酢酸イソアミル (ppm)	-	-	-	-	-	-	0.0	0.4	0.6	0.8	1.0	1.3	1.9	1.8	1.9	2.1	2.2	2.1	
カプロン酸エチル (ppm)	-	-	-	-	-	-	0.2	0.7	1.2	2.1	1.6	2.2	3.5	3.7	4.7	5.1	5.6	5.4	
酢酸エチル (ppm)	-	-	-	-	-	-	5.8	12.1	19.2	17.9	26.8	33.6	42.4	52.2	49.6	50.8	57.1	56.5	
イソブチルアルコール (ppm)	-	-	-	-	-	-	17.9	22.6	27.3	37.1	41.0	45.6	49.2	52.2	52.4	54.1	54.4	54.0	
E/A比	-	-	-	-	-	-	0.0	0.7	0.9	0.8	1.0	1.2	1.5	1.3	1.4	1.4	1.5	1.4	

表3 試作株 (KAZE1) のパイロットプラント醸造試験のもろみ経過のまとめ

2号機 試作株 (KAZE1)	酵母					もろみ													
	2d	3d	4d	5d	添加前	踊り	4d	6d	8d	11d	13d	15d	18d	20d	22d	25d	27d	28d	
ポーメ (日本酒度)	13.5	13.8	11.5	8.3	6.6	9	6.6	6.8	5.9	4	2.76	1.69	0.91	0.47	0.07	-0.23	-0.41	-	
酸度	3.6	4.59	5.31	5.66	6.11	1.22	0.75	1.08	1.45	1.5	1.6	1.5	1.5	1.8	1.6	1.64	1.7	-	
アミノ酸度	0.97	0.8	0.6	0.49	0.55	0.51	0.35	0.35	0.6	0.6	0.7	0.75	0.9	0.85	0.9	1.2	1.09	-	
エタノール (%)	-	-	-	6.7	-	-	2.6	4.0	5.9	9.0	11.0	12.5	13.8	15.1	15.2	16.1	16.7	-	
グルコース (%)	-	-	-	-	-	-	10.6	10.6	9.4	6.7	5.1	4.1	3.2	2.7	2.4	2.1	2.0	-	
マルトース (%)	-	-	-	-	-	-	1.9	2.3	2.5	2.2	1.8	1.6	1.1	0.9	0.7	0.6	0.6	-	
酵母数 (10e8個/ml)	-	-	-	2.9	-	-	1.0	1.6	1.7	1.9	2.2	2.1	2.1	1.5	1.6	1.5	1.8	-	
生菌率 (%)	-	-	-	100.0	-	-	100.0	96.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	94.9	100.0	-	
イソアミルアルコール (ppm)	-	-	-	-	-	-	39.5	53.7	68.4	96.0	108.9	122.1	136.5	144.3	146.6	152.3	153.0	-	
酢酸イソアミル (ppm)	-	-	-	-	-	-	0.0	0.4	0.6	1.2	1.4	1.6	2.1	2.3	2.5	2.6	2.7	-	
カプロン酸エチル (ppm)	-	-	-	-	-	-	0.3	0.5	1.1	2.1	1.7	2.1	3.4	3.9	4.9	5.0	5.5	-	
酢酸エチル (ppm)	-	-	-	-	-	-	5.1	7.7	9.8	20.8	28.7	34.3	47.1	54.6	55.4	57.5	60.2	-	
イソブチルアルコール (ppm)	-	-	-	-	-	-	16.6	21.6	26.9	36.4	41.9	45.6	49.5	51.9	52.2	53.6	53.7	-	
E/A比	-	-	-	-	-	-	0.0	0.7	0.9	1.2	1.3	1.3	1.5	1.6	1.7	1.7	1.8	-	

表4 KAZE2および試作株の実地醸造試験製成酒の各種成分のまとめ

	尿素 (mg/L)	日本酒度	エタノール (度)	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	グルコース (g/100mL)	マルトース (g/100mL)	イソアミルアルコール (ppm)	酢酸イソアミル (ppm)	カプロン酸エチル (ppm)	酢酸エチル (ppm)	イソブチルアルコール (ppm)	E/A (%)
A社KAZE2	23.9	3.1	16.7	1.6	0.9	1.5	0.5	172.9	1.9	5.7	45.7	53.7	1.1
A社試作株	3.1	0.9	16.5	1.8	1.0	1.1	0.4	202.0	1.9	6.4	42.9	60.9	0.9
B社試作株	3.9	-6.0	16.2	1.8	0.8	3.1	0.3	167.1	2.2	2.6	71.2	50.9	1.3
C社試作株	3.3	3.0	16.6	1.7	-	2.9	0.4	190.4	3.2	5.5	54.4	61.7	1.7
D社試作株	0.9	-2.8	17.9	1.9	-	2.5	0.6	180.9	3.8	5.4	58.8	124.7	2.1

らに、試作株の製成酒の尿素含有量が4.0 mg/L以下であり、A社のKAZE2のものの値（23.9 mg/L）より明らかに低くなっていた。さらに、酒造技術者約40名による製成酒の官能評価により回答を頂いた総合評価は、基準値の3.0より良い値であり、KAZE2の良質な酒質を維持していた。

### 3. 3 カルバミン酸エチル生成能

本研究の最終目標は、清酒中の尿素を低減させることにより、カルバミン酸エチルの生成量を減らすことである。一方、カルバミン酸エチルは、火入れと長期保存によって生成する。そこで、先の検討により作成した、A社の試作株とKAZE2を用いた製成酒を用い、50℃で24時間加温処理することにより、カルバミン酸エチルの生成能について評価することにした。

KAZE2の製成酒の加温前のカルバミン酸エチルの量は、33 ppbであったのに対し、加温後には115 ppbまで増加し、カルバミン酸エチル生成能があることが確認された（図1）。一方、試作株のものでは加温前が2 ppbであり、KAZE2のものより大幅に低くなっており、加温後でも3 ppbとほとんど増加しなかった。これらのことにより、試作株によるカルバミン酸エチルの低減効果が認められた。

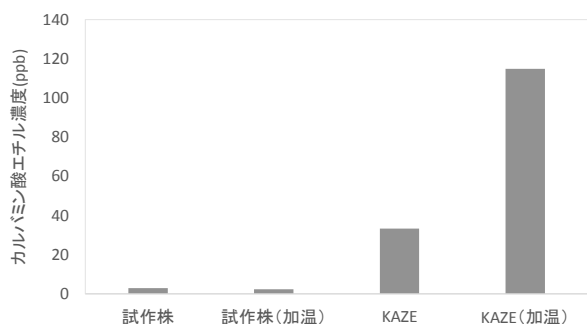


図1 加熱前後のカルバミン酸エチル濃度

## 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、群馬県独自酵母KAZE1、KAZE2の尿素非生産性試作株の実用性を試験醸造により評価した。また、KAZE2の試作株については、実地醸造試験で得られた製成酒でも尿素が低減されており、カルバミン酸エチルの低減効果も確認することができた。

## 謝 辞

群馬県内外の酒造技術者の皆様には、試験醸造製成酒の官能評価を行って頂いた。

## 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、106-114（1993）
- 5) 渡部貴志ら：平成28年度群馬産業技術センター研究報告、11-14
- 6) 渡部貴志ら：平成29年度群馬産業技術センター研究報告、10-14
- 7) 橋口知一ら：日本醸造協会誌、519-525（2006）