

Iw201 号酵母からの尿素非生産性自然変異株の分離*

佐藤 稔英**、山下 佑子**、中山 繁喜**、米倉 裕一**

岩手 2 号泡無し酵母 (Iw201) から、自然変異したアルギナーゼ欠損変異株を分離することを試みた。Iw201 を山廃培地に植菌して 8°C で 3 週間培養した培養液を CAO 培地に塗布し、増殖旺盛な 960 株を分離して Arg 培地と Orn 培地を用いて選抜し、8 株のアルギナーゼ欠損変異株を得た。この 8 株を用いて総米 250g の発酵試験を行い、製成酒に含まれる尿素濃度を酵素法により測定した結果、全ての株で親株よりも尿素生産性が低減している事が確認された。中でも製成酒の尿素が検出されず、酸生産量の少ない FOX_4 号を選抜し、総米 25kg にスケールアップした小仕込み試験を行ったところ、その性質の再現性が確認された。

キーワード：日本酒、酵母、Fox-Iw201 号、尿素非生産性、カルバミン酸エチル

Isolation of sake yeast from Iw201 with no urea productivity

Naruhide Sato, Yuko Yamashita, Shigeki Nakayama and Yuichi Yonekura

Sake yeast strains with no urea productivity are isolated from the sake yeast Iw201 strain (non-bubbling sake yeast Iwate No. 2) using CAO plates. Sake mutant strains were selected during a fermentation test using 250-g and 25-kg scale brewing tests. The results indicate that the FOX_4 strain produces less urea than the parental strain.

key words : sake, sake yeast, FOX-Iw201, no urea productivity, ethyl carbamate

1 緒 言

酒類を含む発酵食品中には少量のカルバミン酸エチルが含まれている事が知られている¹⁾。カルバミン酸エチルは、国際がん研究機関により、平成 19 年にグループ 2A (おそらく発がん性がある) に分類された物質であり、現時点では日本国内における規制値は存在しないものの、カルバミン酸エチルの生成機構や低減化に関する研究が精力的に行われてきた。その結果、清酒におけるカルバミン酸エチルは、酵母が生成する尿素とエタノールが化学的に反応して生成されること²⁾が明らかとなっており、清酒中の尿素濃度の低減や貯蔵温度を低く保つことが、カルバミン酸エチルの低減に効果があることが報告されている³⁾。また、尿素を低減させる方法として、原料処理^{4),5)}やウレアーゼの使用⁶⁾、低尿素生産性酵母を利用する方法⁷⁾が報告されている。北本らは、清酒酵母のアルギナーゼ遺伝子を破壊することで非尿素生産性酵母を作出できること⁸⁾、また CAO 培地を用いることで高頻度にアルギナーゼ欠損変異株が取得可能であることを報告している⁹⁾。

本検討では、Iw201 号酵母のアルギナーゼ欠損自然変異株を CAO 培地により選抜育種したので報告する。

2 実験方法

2-1 使用菌株

岩手 2 号泡無し酵母 (Iw201) をアルギナーゼ欠損変異株分離の親株として使用した。小仕込み試験の対照として、協会 701 号 (K-701) および尿素非生産性協会 701 号 (KArg-701) を使用した。

2-2 アルギナーゼ欠損変異株の取得方法

Iw201 を 10mL の山廃培地 (汲水歩合 108% の酵母添加直前の山廃酒母を遠心分離した上清をオートクレーブ滅菌したもの) に植菌して 8°C で静置培養し、定常期の酵母を集菌 (9400rpm/10min)、滅菌水で 3 回洗浄し、CAO 培地 (0.17% イーストナイトロジェンベース (N 源を含まないもの、Difco 社)、10ppm カナバニン、5mM オルニチン、1mM アルギニン、2% グルコース、2% 寒天) 上にストリークし、30°C で培養した (第一スクリーニング)。3 週間後に生育してきたコロニーを分離し、100 μ L の滅菌水に分散して再度 CAO 培地上にストリークした (第二スクリーニング)。出現したシングルコロニーを単離して 1mL の滅菌水に分散し、Arg 培地 (0.17% イーストナイトロジェンベース (N 源を含まないもの)、5mM アルギニン、2% グルコース、2% 寒天) および Orn 培地 (Arg 培地のアルギニンの代わりにオルニチンを 5mM 含む) 上に 2 μ L ずつスポットし

* 平成 27 年度 技術シーズ形成研究事業 (育成ステージ)

** 醸造技術部

て30℃で培養を行った。その結果、Arg 培地では生育できず、Orn 培地で生育できるものを目的とするアルギナーゼ欠損変異株として単離した。単離した目的株は YPD 培地(1%イーストエキス、2%ポリペプトン、2%グルコース)で増殖させ、YPD スラント(YPD 培地に2%寒天を加えたもの)を作製して5℃で保管した。

2-3 小仕込み試験

小仕込み試験は総米 250g と 25kg で行った。250g の発酵試験は、初添を水麴とし、留添に蒸米を添加する2段仕込みとした。原料米は、平成27年産「吟ぎんが」精米歩合55%を用い、岩手県オリジナル麹菌「黎明平泉」(株式会社秋田今野商店製)を使用して製麴を行った。仕込み配合は麴歩合20%、汲水歩合140%とし、品温13.5℃一定で発酵を行い、炭酸ガス減量80gを目安に遠心分離により上槽した。25kgの小仕込み試験の仕込み配合は表1の通りとした。初添の温度を13℃、留添7.0℃、最高品温15℃を目標とし、日本酒度+5.0を目安に上槽した。

表1 総米25kg小仕込み試験配合

	初添	仲添	留添	計
総米	4.3	8.2	12.5	25.0
蒸米	2.9	6.4	10.7	20.0
麴米	1.4	1.8	1.8	5.0
汲水	6.8	11.0	17.2	35.0

*単位はkg

*酵母仕込みによる3段仕込み

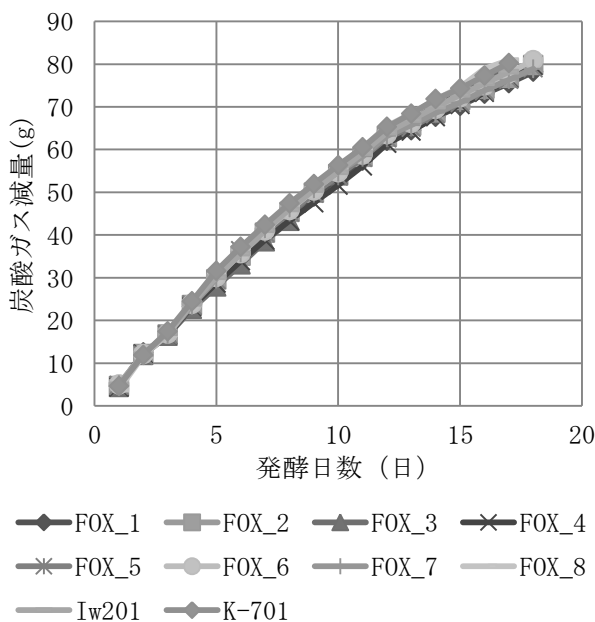


図1 総米250g発酵試験の経過図

2-4 成分分析

製成酒の一般成分は国税庁所定分析法に基づいて分析した。製成酒に含まれる尿素及びアンモニアは宮岡らの方法¹⁰⁾に準じて酵素法 (Roche Diagnostics 社製F-キット 尿素/アンモニア) により測定した。

3 実験結果

3-1 アルギナーゼ欠損変異株の取得

Iw201を親株としてCAO培地を用いアルギナーゼ欠損変異株の単離を行った。その結果、第一スクリーニングの段階ではコロニーの大きさにバラツキがあり、小さなコロニーが多数発生した。比較的大きめのコロニーを1シャーレ当たり5株ずつ選抜して第二スクリーニングを行った結果、比較的大きなコロニーのみが形成された。ここから1シャーレ当たり5株ずつ計960株を単離し、Arg培地とOrn培地に移植した結果、960株中8株が、Arg培地では生育できず、Orn培地で良好な生育を示したため、アルギナーゼ欠損変異株として分離した。

3-2 総米250g発酵試験の経過

図1に総米250g発酵試験の経過図を示す。親株であるIw201が仕込み後18日目に炭酸ガス減量80gに達したのに対し、対照であるK-701は18日目、選抜株も18日目~19日目には炭酸ガス減量80gに達し、発酵経過に大きな差は生じなかった。

3-3 総米250g発酵試験製成酒の成分

総米250g発酵試験製成酒の成分分析結果を表2に示す。分離した8株の尿素生成量は、親株と比較して明らかに低減したものの、菌株により生成量に差が生じていた。発酵経過に大きな差が生じていないことから、製成酒から尿素が検出されず、酸生産量の少ないFOX_4株が良好と考え選抜した。

3-4 総米25kg小仕込み試験の経過と製成酒の成分

選抜したFOX_4株の尿素生産の再現性を検討するため、親株であるIw201と、尿素非生産性酵母として広く利用されているKArg-701株を対照として総米25kgのパイロットスケールでの小仕込み試験を行った。

図2に仕込み時のBMD曲線を示す。また、製成酒の成分分析結果を表3に示す。総米250g発酵試験の場合と同様に、分離した株は親株と同等の発酵経過をたどり、親株は仕込み後18日目、選抜株と対照株であるKArg-701株はともに仕込み後19日目に上槽した。これらの点から、選抜株は親株やKArg-701と同様の醗管理が可能であると考えられる。また、KArg-701と同様に製成酒から尿素は検出されず性質の再現性が確認された。酸度に関しては親株よりもやや高い傾向があるものの、KArg-701よりも低かった。

表2 総米250g発酵試験の成分分析結果

	アルコール (%)	日本酒度	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	尿素 (ppm)
FOX_1	13.8	-14.8	3.8	0.4	4.38
FOX_2	14.0	-14.1	3.7	0.5	3.31
FOX_3	13.0	-20.2	3.7	0.5	6.20
FOX_4	13.3	-21.3	3.4	0.5	N. D
FOX_5	13.8	-14.4	3.8	0.5	N. D
FOX_6	13.7	-13.1	3.7	0.5	4.42
FOX_7	13.7	-11.8	3.8	0.5	3.34
FOX_8	13.2	-19.3	3.5	0.6	4.96
Iw201	13.5	-18.1	3.8	0.3	14.46
K-701	14.1	-13.5	3.6	0.4	11.52

*N. Dは検出限界3.0ppm以下を示す

表3 総米25kg小仕込み試験の成分分析結果

	アルコール (%)	日本酒度	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	尿素 (ppm)
FOX_4	16.5	7.4	2.1	0.5	N. D
Iw201	16.6	5.8	1.7	0.5	16.61
KArg-701	16.0	5.4	2.3	0.4	N. D

*N. Dは検出限界3.0ppm以下を示す

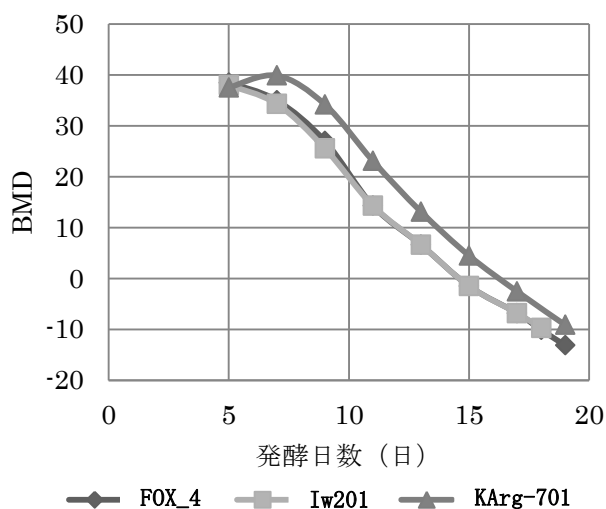


図2 総米25kg小仕込み試験のBMD曲線

4 結 言

Iw201 をアルギナーゼ欠損変異株分離の親株として使用した場合、CA0 培地でのコロニーが現れるのに約3週間と長い時間を要したものの自然変異したアルギナーゼ欠損変異株を取得することが出来た。得られた自然変異株8株について発酵試験を行ったところ、全ての株について尿素生産量は親株よりも明らかに低減した。また、総米25kgの仕込み試験を行い、親株と同等の発酵経過と製成酒の成分からFOX_4株を優良株として選抜した。北本ら⁹⁾は尿素生産量が3ppm(検出下限値)以下の酵母を用

いた清酒は、カルバミン酸エチル濃度が10ppb(検出下限値)以下となり、対照酒が約100ppbのカルバミン酸エチルを生成する加熱処理条件においても、カルバミン酸エチルは検出されないことを示している。これらの結果から、本検討で選抜されたFOX_4株も同様にカルバミン酸エチルの生成量は低いと考えられ、今後は製成酒のカルバミン酸エチル濃度を検討する予定である。

選抜株は平成27年度から県内企業での実地醸造が行われており、製造担当者からは「酸味に特長があり、爛向きの清酒が製成できる」という良好な意見が出されている。今後は同様の手法を用いて尿素生成量を低減させた吟醸酒用酵母を開発する予定である。

文 献

- 1) Hasegawa Yukari, Nakamura Yumiko, Tonogai Yasuhide, Terasawa Shinji, Ito Yoshio, Uchiyama Mitsuru: Determination of Ethyl Carbamate in Various Fermented Foods by Selected Ion Monitoring, Journal of Food Protection, 53(12), pp. 1058-1061 (1990)
- 2) 原昌道, 吉沢淑, 中村欽一: 尿素あるいはその関連物質を含み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), pp.57-63 (1988)
- 3) 吉沢淑, 高橋康次郎: 酒中のカルバミン酸エチルの生成に及ぼす温度と酒質の影響, 日本醸造協会誌, 83(1), pp.69-73 (1988)
- 4) 吉沢淑, 高橋康次郎, 佐藤和夫: 原料処理および醸造工程中の尿素の消長, 日本醸造協会誌, 83(2),

- pp.136-141 (1988)
- 5) 齋藤和夫, 佐藤俊一, 下飯仁, 蓼沼誠, 吉沢淑: 原料処理と清酒中の尿素, 日本醸造協会誌, 83(2), pp.145-149 (1988)
 - 6) 吉沢淑, 高橋康次郎: ウレアーゼによる清酒中の尿素的の分解除去, 日本醸造協会誌, 83(2), pp.142-144 (1988)
 - 7) 田中準浩, 永井英雄, 中沢英五郎, 三島秀夫, 竹村成三: 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), pp.413-417 (1989)
 - 8) Katsuhiko Kitamoto, Kaoko Oda, Katsuya Gomi, Kojiro Takahashi: Genetic Engineering of a Sake Yeast Producing No Urea by Successive Disruption of Arginase Gene, Applied and Environmental Microbiology, 57(1), pp. 301-306 (1990)
 - 9) 北本勝ひこ, 宮崎佳緒子, 山岡洋, 五味勝也, 熊谷知栄子: 変異処理を行わないウレア非生産性清酒酵母の単離, 日本醸造協会誌, 87(8), pp.598-601 (1992)
 - 10) 宮岡俊輔, 森本聡: EK-1 酵母からのウレア非生産性変異株の分離, 愛媛県産業技術研究所報告, 49, pp.6-9 (2011)