

## EK-1 酵母からのウレア非生産性変異株の分離

宮岡俊輔 森本 聡

Isolation of Mutants from EK-1 (*Ehime Koubo* No.1) strain which produce No Urea

MIYAOKA Shunsuke and MORIMOTO Satoshi

愛媛酵母 (EK-1 株) から、自然変異したアルギナーゼ欠損株を CAO 培地により取得することを試みた。EK-1 株培養液を CAO 培地に塗布し、30℃で3週間培養したところ、 $3.3 \times 10^{-6}$  の頻度でコロニーが生育した。大きめのコロニー120株を分離し、Arg 培地と Orn 培地を用いて選抜し、4株のアルギナーゼ欠損変異株を得た。この4株について、総米 200g で小仕込み試験を行い、製成酒に含まれるウレア (尿素) を、酵素法により測定したところ、分離した4株のうち3株で検出限界の 1 mg/L 以下であることが確認できた。残りの1株も 1.1 mg/L と元株の 1/10 以下であった。発酵経過及び製成酒の成分から、優良株として CAO-003 及び 004 株を選抜した。この2株について、総米 1kg にスケールアップした仕込み試験でも、その性質の再現性を確認し、その製成酒の成分から CAO-004 株を最も優良な株とした。

キーワード：日本酒、酵母、EK-1、ウレア非生産性、カルバミン酸エチル

## はじめに

酒類を含む発酵食品中には、発がん性について疑いのあるカルバミン酸エチル (ECA) が少量含まれていることが知られている<sup>1)</sup>。1985年カナダにおいて、このことが報告されて以来、ECA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、ECAはウレアとエタノールから生成すること<sup>2)</sup>やウレアを減少させる方法として、原料処理<sup>3)4)</sup>やウレアーゼの使用<sup>5)6)</sup>、低ウレア生産性酵母を利用する方法<sup>7)8)</sup>が報告されている。北本らは、アルギナーゼ遺伝子を破壊することで、尿素非生成の酵母を育種できること、また CAO 培地を用いて効率よくアルギナーゼ欠損変異株を取得できることを報告している<sup>9)~12)</sup>。

本報では、EK-1 酵母のアルギナーゼ欠損自然変異株を CAO 培地により取得し、その性質について調べ、優良な酵母を得ることができたので報告する。

## 実験方法

## 1. 使用酵母

愛媛酵母 EK-1 株を親株として使用した。

## 2. アルギナーゼ欠損変異株の取得

北本らの方法<sup>11)</sup>に準じて実施した。すなわち、YPD 液体培地で、30℃で振とう培養し、定常期に達した酵母細胞を集菌、滅菌水で2回洗浄し、適当な酵母密度にな

るように滅菌水に懸濁した。CAO 寒天培地 (0.17% Yeast Nitrogen Base W/O Amino Acids and Ammonium Sulfate (Difco), 10ppm L-Canavanine (SIGMA), 5mM L-Ornithine Hydrochloride (WAKO), 1mM L-Arginine Hydrochloride (WAKO), 2% Glucose, 2% Agar) 上に 100  $\mu$  L 塗布し、30℃で培養した。約3週間後、生育してきたコロニーを再度 CAO 寒天培地でシングルコロニーに単離し、出現してきたコロニーを Arg 寒天培地 (0.17% Yeast Nitrogen Base W/O Amino Acids and Ammonium Sulfate, 5mM L-Arginine Hydrochloride, 2% Glucose, 2% Agar) 及び Orn 寒天培地 (Arg 寒天培地のアルギニンの代わりに 5mM L-Ornithine Hydrochloride を含む。) に移植し、Arg 培地では生育できず、Orn 培地で生育できるものをアルギナーゼ欠損株とした。

## 3. 分離株の Arg 培地と Orn 培地上での生育

前項で分離した株について、YPD 培地を用いて 30℃で振とう培養し、得た培養液を Arg 培地及び Orn 培地に滅菌した爪楊枝でスポットし、30℃3日間培養後、生育したコロニーの状態を観察した。

## 4. 小仕込み試験

定法<sup>13)</sup>に従い、表1に示す仕込み配合で総米 200g の小仕込み試験を行った。 $\alpha$ 米は YA-50、乾燥麹は TG-50 (両者とも徳島製麹株式会社製)を使用した。

麹汁培地 (Brix. 10, pH 5.4) 10 mL を入れた L 字試験管に酵母を植菌し、バイオフォトレコーダ (TN-2612,

ADVANTEC東洋(株)を用いて28℃、30 rpmで振盪して前培養した。660 nmの吸光度でモニターしながら、吸光度2.0でほぼ一定になったところで前培養終了とした。900 mLのガラス製の瓶に、70 mLの水（0.2 g/L塩化ナトリウム、0.04 g/Lリン酸二水素カリウム、1.5 ml/Lの食添用乳酸を含む。）と乾燥麹40 gを加え、15℃で2時間保持した。前培養酵母を $1.0 \times 10^9$ 個添加し15℃で45時間保持した。蒸留水270 mLを加え、7℃で2時間保持後、 $\alpha$ 米を160 g加えた。7℃でさらに6時間保持後、1℃/日で昇温し15℃に達したら、そのまま保持した。

表1 小仕込み試験の仕込み配合

		1回目	2回目	合計
総米	(g)	40	160	200
アルファ米	(g)		160	160
乾燥麹	(g)	40		40
水	(mL)	70	270	340

1回目は15℃、2回目は7℃で仕込んだ。  
仕込み終了後は、15℃になるまで1℃/日で昇温した。

## 5. 総米 1kg の仕込み試験

小仕込み試験等により選抜した菌株の実用化を目的に、菌株の性質の再現性を検討するため、総米 1kg の仕込み試験を実施した。前項の小仕込み試験と同様の方法で、仕込み配合を表2にスケールアップした。

表2 総米 1kg の仕込み試験の配合

		1回目	2回目	合計
総米	(g)	200	800	1000
アルファ米	(g)		800	800
乾燥麹	(g)	200		200
水	(mL)	350	1350	1700

## 6. 製成酒中の尿素量の測定

製成酒に含まれる尿素及びアンモニアを、酵素法（F-キット 尿素／アンモニア（Roche Diagnostics GmbH, Germany）により測定した。

## 7. 製成酒の香気成分及び一般成分

香気成分は、ヘッドスペースガスクロマトグラフ法で測定した。一般成分は、国税庁所定分析法（第4回改正）に従い分析した。

## 結果と考察

### 1. アルギナーゼ欠損変異株の取得

10mL の YPD 培地で 30℃、21 時間培養した。このとき、吸光度が2.1で生菌数が $1.6 \times 10^8$  cells/mL となった。培養液を、CAO 寒天培地上に $6.0 \times 10^6$  cells / シャーレになるように塗布し、3週間培養後、直径 1mm を超える比較的大きめのコロニーを計数すると、1シャーレあたり約 20 個であった。出現率は、 $3.3 \times 10^{-6}$  であった。コロニーの大きさにはばらつきがあり、小さなコロニーが多数発生した。大きめのコロニーから、1シャーレあたり2個ずつ計120株をCAO寒天培地上で単離後、Arg培地とOrn培地に移植したところ、120株中4株が、Arg培地ではわずかにしか生育できず、Orn培地で良好な生育を示したため、アルギナーゼ欠損株として分離した。

### 2. 分離株の Arg 培地と Orn 培地上での生育

単一コロニーに分離後の性質を確認するため、YPD培地培養液をArg培地とOrn培地に植菌し、生育状態を観察した。その結果、表3に示すとおり、分離した4株はすべてArg培地に生育せず、Orn培地に生育することが確認できた。

表3 分離株の Arg 培地と Orn 培地での生育状態

	Arg 培地	Orn 培地
CAO-001	×	○
CAO-002	×	○
CAO-003	×	○
CAO-004	×	○
EK-1	○	○

### 3. 小仕込み試験の経過

図1に経過図を示した。分離した4株は、元株のEK-1株に比較してやや発酵が遅い傾向にあった。分離株のなかでは、CAO-003株の発酵経過が最も元株に近かった。

### 4. 尿素測定条件の最適化

F-キットを用いた測定において、試料量は0.1から2.0 mLまで変えることができる。試料量が多いほど検出限界の濃度を下げることができるが、日本酒を試料とした場合、アルコール等による測定の障害が生じる可能性がある。そこで、試料量の最適化を図るため、試料量と測定値の関係を検討し、図2に示した。

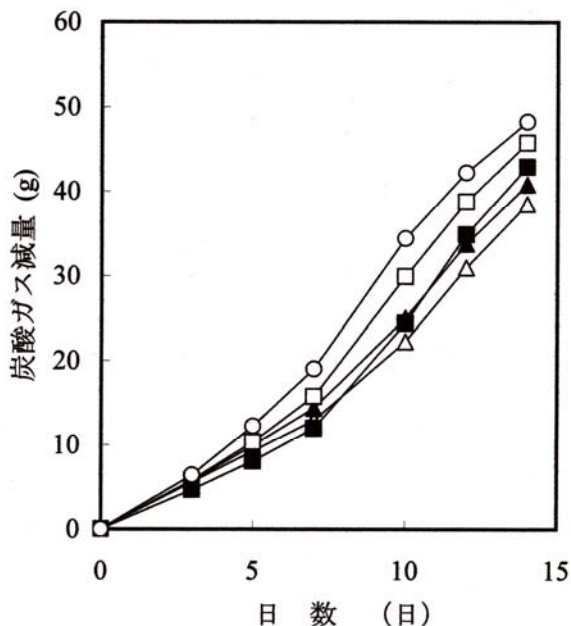


図1 小仕込み試験の経過図

Symbols : △, CAO-001 ; ▲, CAO-002 ; □, CAO-003 ; ■, CAO-004 ; ○, EK-1

表4 小仕込み試験製成酒の尿素量及び一般成分

	酸度	アミノ酸度	アルコール分 (%,v/v)	尿素 <sup>*</sup> (mg/L)	アンモニア (mg/L)
CAO-001	2.3	2.1	15.4	N.D.	14.2
CAO-002	2.3	2.1	15.2	1.1	6.7
CAO-003	2.5	2.1	16.6	N.D.	14.5
CAO-004	2.3	2.0	15.8	N.D.	6.2
EK-1	2.3	2.2	16.6	14.7	7.9

\*N.D.は検出限界 1mg/L 以下を示す。

表5 小仕込み試験製成酒の香り成分

	香り成分 (ppm)							
	アセトアル デヒド	酢酸エチル	ロブロピル アルコール	イソブチル アルコール	酢酸 イソアミル	イソアミル アルコール	カプロン酸 エチル	カプリル酸 エチル
EK-1	30.2	56.4	75.8	61.4	4.2	130.2	4.2	1.6
CAO-001	37.2	48.0	66.0	81.5	5.8	170.8	0.8	0.6
CAO-002	39.6	54.1	74.6	85.4	6.6	165.7	1.0	0.7
CAO-003	37.7	49.5	82.8	85.0	6.6	157.2	3.7	1.2
CAO-004	33.3	39.5	71.4	71.7	4.0	139.0	6.0	1.4

分離した4株の尿素生成量は、元株と比較して明らかに低くなっていた。今回採用した測定法は、試料量 0.3mL のとき検出限界が 1.0mg/L であり、CAO-002 株をのぞいた3株で検出限界以下であった。CAO-002 株も 1.1mg/L と元株の 1/10 であった。アンモニア生成量には菌株により差が生じた。酸度とアミノ酸度は、元株と大きな差はなかったが、アルコール分は、CAO-003 株以外は元株よりやや低い生成量であった。香り成分については、4株中3株において元株より酢酸イソアミルとイソアミルアルコールの生成量が多く、カプロン酸エチルの生成量が少ない傾向にあった。CAO-004 株のみが、元株と同様の香り成分生成能であった。

発酵経過及び製成酒の成分から、CAO-003 及び 004 株が良好と考え選抜した。CAO-003 株は、発酵経過、尿素量が良好だが、酸度がやや高く、酢酸イソアミル及びイソアミルアルコールの生成量が元株より増加していた。CAO-004 株は、発酵経過がやや遅く、アルコール生成が低いものの、香り成分生成能が元株と同様に優れていた。

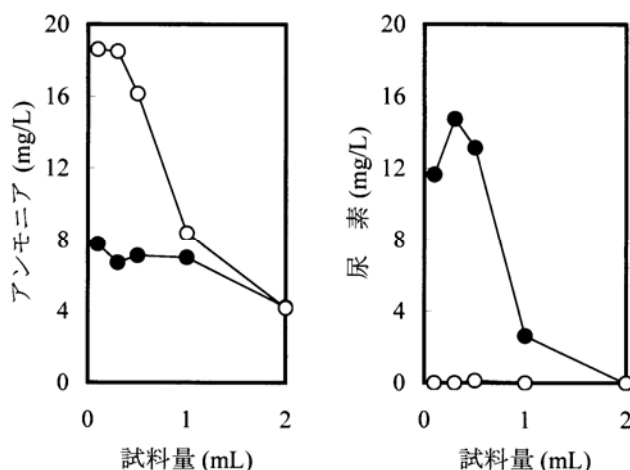


図2 試料量と測定値の関係

Symbols : ●, EK-1 株 ; ○, CAO-001 株

試料量 1 mL、2 mL では、測定値が著しく低くなった。これは、これらの試料量では、日本酒中の成分により反応が大きく阻害されているものと推定される。また、試料量 0.1 mL では、吸光度が 0.0804 と小さく信頼性に欠ける。これらのことから、測定値の最大値を示す試料量 0.3 mL に決定し、以下の測定はこれに従った。

### 5. 小仕込み試験製成酒の成分

小仕込み試験製成酒を分析し、表4に尿素量、アンモニア量及び一般成分を、表5に香り成分を示した。

### 6. 総米 1kg の仕込み試験の経過と製成酒の成分

分離した菌株の性質の再現性を検討するため、総米 1kg にスケールアップした清酒の仕込み試験を実施した。経過を図3に示した。また、製成酒の尿素、アンモニア及び一般成分を表6に香り成分を表7に示した。小仕込み試験の場合と同様、分離した2株はもろみ前半で経過が遅く、21日目をすぎる頃に追いつく様な経過となった。本酵母では、前急型のもろみ管理が必要と考えられる。製成酒のアルコール分は、3株とも 18(%,v/v) 程度となり、十分な発酵能力を有していた。また、分離株の製成酒には、尿素は検出されなかった。酸度とアミノ酸度に

については、CAO-003 株ではやや高い傾向にあったが、CAO-004 株では元株とほぼ同じであった。香氣成分については、小仕込み試験と同様の傾向を示した。これらのことから、スケールアップした仕込み試験でも分離株の性質に再現性があることが示された。また、製成酒の成分の面から、CAO-004 株が最も優良な株であると思われる。

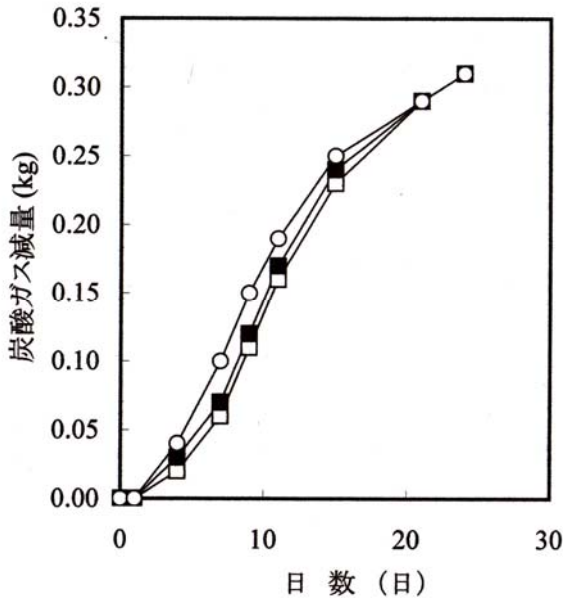


図3 ウレア非生産性酵母 CAO-003 及び CAO-004 株の総米 1kg の仕込み試験経過図  
□ ; CAO-003, ■ ; CAO-004, ○ ; EK-1

表6 総米 1kg 仕込み試験製成酒の尿素量及び一般成分

	酸度	アミノ酸度	アルコール分 (%,v/v)	尿素* (mg/L)	アンモニア (mg/L)
CAO-003	2.30	1.90	18.0	N.D.	18.5
CAO-004	2.15	1.65	17.9	N.D.	10.9
EK-1	2.20	1.65	18.1	13.1	15.5

\*N.D.は検出されず。

表7 総米 1kg の仕込み試験製成酒の香氣成分

	香氣成分 (ppm)							
	アセトアル デヒド	酢酸エチル	n-プロピル アルコール	イソブチル アルコール	酢酸イソ アミル	イソアミル アルコール	カプロン酸 エチル	カプリル酸 エチル
CAO-003	29.7	76.5	83.4	91.5	9.7	180.5	3.6	1.2
CAO-004	22.3	65.5	79.0	91.5	4.8	153.8	5.8	1.5
EK-1	22.1	72.8	75.5	68.8	5.3	155.3	4.3	1.8

## ま と め

1. 愛媛酵母 (EK-1 株) 由来のアルギナーゼ欠損変異株を取得した。

2. EK-1 株のアルギナーゼ欠損の自然変異株は、 $1.1 \times 10^{-7}$  の出現率であった。
3. 得られた 4 株について、総米 200g の小仕込み試験をしたところ、4 株とも尿素生産量は元株の 1/10 以下となった。
4. 総米 1kg の仕込み試験を行い、元株と遜色のない経過と製成酒の成分から CAO-004 株を優良株として分離した。この株は、もろみ前半の経過がやや遅いものの、製成酒の一般成分、香氣成分は元株と差がなく、製成酒から尿素は検出されなかった。

## 文 献

- 1) Y. Hasegawa, Y. Nakamura, Y. Tonogai, S. Terasawa, Y. Ito, and M. Uchiyama: Determination of Ethyl Carbamate in Various Fermented Foods by Selected Ion Monitoring, *Journal of Food Protection*, 53-12, 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むモデル酒中におけるカルバミン酸エチルの生成, *醸協*, 83-1, 57-63 (1988).
- 3) 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, *醸協*, 83-2, 136-141 (1988).
- 4) 斉藤和夫, 佐藤俊一, 下飯 仁, 蓼沼 誠, 吉沢 淑: 原料処理と清酒中の尿素, *醸協*, 83-2, 145-149 (1988).
- 5) 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, *醸協*, 83-2, 142-144 (1988).
- 6) 下飯 仁, 近藤洋大, 山崎厚夫, 家藤治幸, 佐藤俊一, 蓼沼 誠, 原 昌道, 吉沢 淑: 清酒用ウレアーゼ生産菌の分離, *醸協*, 84-6, 418-422 (1989).
- 7) 原 昌道, 飯村 穰, 五味勝也, 吉沢 淑, 中村 欽一: 尿素生産能の低い酵母による清酒醸造, *醸協*, 83-5, 355-359 (1988).
- 8) 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, *醸協*, 84-6, 413-417 (1989).
- 9) K. Kitamoto, K Oda, K. Gomi, and K. Takahashi: Genetic Engineering of a Sake Yeast Production No Urea by Successive Disruption of Arginase Gene, *Applied Environmental Microbiology*, 57-1, 301-306 (1991).
- 10) 小田佳緒子, 北本勝ひこ: ウレア非生産性酵母の分子育種, *醸協*, 86-2, 99-107 (1991).
- 11) 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, *醸協*, 87-8, 598-601 (1992).
- 12) 福田 潔, 北本勝ひこ, 五味勝也, 熊谷知栄子, 協会 7 号清酒酵母からウレア非生産性清酒酵母の取得とそれを用いた清酒醸造試験, *醸協*, 88-8, 633-638 (1993).
- 13) 宮岡俊輔, 森本 聡: 愛媛酵母 EK-1 株の性質, 愛媛県工業系研究報告, 44, 31-36 (2006).