

三重県で醸造された清酒のカルバミン酸エチル濃度と 三重県酵母のアルギナーゼ活性

山岡千鶴*, 山崎栄次*, 栗田 修*

Ethyl Carbamate Concentrations of Sake Brewed in Mie Prefecture and Arginase Activities of Sake Yeasts Distributed to Sake Brewery by Mie Prefecture Industrial Research Institute

Chizuru YAMAOKA, Eiji YAMAZAKI and Osamu KURITA

Ethyl carbamate which is upgraded to a Group 2A carcinogen by International Agency for Research on Cancer (IARC) is detected in fermented foods and alcoholic beverages. With the aim of achieving food safety, ethyl carbamate concentrations in eight different sakes brewed by sake factories in Mie prefecture were measured. Also, arginase activity, which is closely related with the formation of ethyl carbamate, was determined for four sake yeasts distributed from our laboratory to Mie sake brewery. As a result, all ethyl carbamate concentrations in the sakes were less than 200 µg/L (the regulatory limit in Canada and Czech Republic). The arginase activities of the yeasts were lower than that of Kyokai No. 9 (K-9).

Key words: Ethyl Carbamate, Sake Yeast, Arginase Activity

1. はじめに

酒類や発酵食品に広く含まれるカルバミン酸エチル ($C_2H_5OCONH_2$) は、平成 19 年に国際がん研究機関 (IARC) において、グループ 2A (ヒトに対しておそらく発がん性がある) に分類された物質であり¹⁾、食の安全性の観点から関心が持たれている。日本国内では、現在のところ食品衛生法上の規制値が定められていないものの、一部の国においては規制があり、カナダ及びチェコでは清酒に対して規制値が設けられている²⁾。そこで、平成 26 年度より開始した、食品の広域流通に係る課題解決や新商品開発を支援する「海外・大都市圏を目指すグローバル食品の開発促進事業」において、県産清酒のカルバミン酸エチル含量の調査を行った。また、清酒では、カルバミン酸エチルは主に尿素とエタノールの化学反応により生成し、その尿素的の多くは酵

母によるアルギニン代謝で生じることから、三重県酵母の尿素生成能を把握するため、アルギナーゼ活性を測定した。

2. 実験方法

2. 1 清酒のカルバミン酸エチルの定量

2. 1. 1 試料の調製

試料は、橋口ら³⁾の方法に従って以下のように調製した。すなわち、清酒 3 mL に内部標準として 10 ppm のカルバミン酸ブチルを 30 µL 加えて混合し、エキストレルート NT3 カラム (メルク社製) に 10 分間保持させた。その後、ヘキサン：酢酸エチル=1:1 混合溶液 18 mL で溶出し、ロータリーエバポレータにより、約 1 mL まで減圧濃縮し、無水硫酸ナトリウム約 250 mg を加えて乾燥したものを試料とした。検量線用の標準物質カルバミン酸エチルは、アセトン溶液として調製した。

* 食と医薬品研究課

表 1 GC-MS の分析条件

カラム	Restek, Stabilwax (長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μ m)
カラム温度	100 °C (5 min) - 10 °C/min - 146 °C (10 min) - 10 °C/min - 155 °C (7.5 min) - 30 °C/min - 230 °C (3 min)
注入口温度	190 °C
注入量	1 μ L
カラム流量	1 mL/min (キャリアガス: ヘリウム)
イオン化法	EI+
イオン源温度	230 °C
イオン化電圧	70 eV
測定イオン	m/z 62
インターフェース温度	220 °C

2. 1. 2 GC-MS の分析条件

カルバミン酸エチルの定量は、GC-MS (日本電子社製 JMS-T100GCv 4G) を用いて、カルバミン酸エチル及びカルバミン酸ブチルの面積比により行った。分析条件は表 1 に示すとおりで、橋口ら³⁾の方法をもとに設定した。

2. 2 酵母のアルギナーゼ活性の測定

2. 2. 1 供試菌株

三重県酵母 MK-1, MK-3, MK-5 及び MLA-12 を用いた。また、清酒製造に広く使用されている酵母の一つであり、そのカルバミン酸エチルの生成能が報告されていることから⁴⁾、きょうかい酵母 9 号 (K-9) を対照株として用いた。

2. 2. 2 アルギナーゼ活性測定

YPD 培地 (酵母エキス 1%, ポリペプトン 2%, グルコース 2%) で定常期まで 30 °C で培養した菌液を、北本ら⁴⁾の方法により、酵母窒素ゲンベース (アミノ酸及び硫酸アンモニウム不含) 0.17%, 5 mM 硫酸アンモニウム, グルコース 2% 及び 10 mM アルギニンを含む培地に 1/100 容量植菌し、30 °C, 150 rpm で 40 時間振とう培養した。

粗酵素液の抽出は、以下のように行った。すなわち、遠心分離で集菌した後、滅菌水で洗浄し、10 mM 塩化マグネシウムを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁した。MSK 細胞ホモジナイザー (Braun 社製) を用い、4,000 rpm, 90 秒間破碎した後、遠心分離して得られた上清を粗酵素液とした。

アルギナーゼ活性の測定は、Whitney ら⁵⁾の方法をもとに行った。すなわち、粗酵素液 0.1 mL に 100 mM グリシン及び 50 mM アルギニンの混合液 (pH9.5) を加え、最終容量を 2.0 mL とした。30 °C, 30 分間保温した後、15%過塩素酸を 3 mL 加えて酵素反応を停止した。これを遠心した上清

1.4 mL に対して、Archibald⁶⁾の方法をもとに、硫酸:リン酸:蒸留水=1:3:1の混合液 1 mL 及び α -イソニトロソプロピオフェノン (4%, w/v, エタノール溶液) 80 μ L を添加し、沸騰水中で 15 分間加熱した。室温に戻してから 15 分後に 540 nm の吸光度を測定し、尿素を定量した。

タンパク質の濃度は、Bio-Rad 社製 Protein Assay キットを用いて定量した。

3. 結果と考察

3. 1 カルバミン酸エチルについて

県内の 8 酒造メーカーの清酒 8 点中のカルバミン酸エチルを定量し、その清酒の製造管理について調査を行った結果を表 2 に示す。なお、カルバミン酸エチルの定量は、表 2 の貯蔵条件に加え、15 °C, 3 ヶ月間保管後に行った。カルバミン酸エチル含量は、全ての清酒で、カナダ及びチェコの清酒における規制値 (200 μ g/L)²⁾の 30%以下と低かった。また、国税庁で平成 25 年度に実施された全国市販酒類調査での清酒 97 点中のカルバミン酸エチル含量の平均値 (68 μ g/L)⁷⁾よりも低かった。カルバミン酸エチルは、貯蔵温度が高いほど、また貯蔵期間が長いほど増加する。その低減策として、清酒の火入れ後の急冷や低温貯蔵が示されている⁸⁾。実際に、貯蔵温度が高く、貯蔵期間が長い清酒 H や、火入れ後の急冷がなされていない清酒 G は、カルバミン酸エチル含量が高かった。また、粕歩合が低い清酒でカルバミン酸エチル含量が高い傾向にあったが、原料の麴や蒸米に由来する尿素は製成酒には影響しないことが報告されており⁹⁾、このような傾向を示した要因は不明である。

3. 2 酵母のアルギナーゼ活性について

3. 1 より、県産清酒のカルバミン酸エチル含量

表2 県産清酒のカルバミン酸エチル含量, 一般成分, 製造及び貯蔵条件

	A	B	C	D	E	F	G	H
カルバミン酸エチル (µg/L)	nd	6.3	38.5	6.6	9.2	12.3	54.0	57.2
酒造年度 (BY)	26	26	26	25	25	25	24	24
品種	五百万石	あきたこまち キヌヒカリ	美山錦	山田錦	山田錦 五百万石	神の穂	山田錦	五百万石 加工用米
精米歩合 (%)	60	60	40	55	60	65	50	60
アルコール (%)	16.2	15.9	15.5	15	15	15	17.7	15.8
日本酒度	-2	-2	+2	+4	+7	+5	+0.5	+5
酸度 (mL)	1.5	1.8	1.2	1.2	1.4	1.3	1.4	2.2
酒母	速醸	速醸	速醸	速醸	速醸	速醸	アンプル	速醸
留温度 (°C)	7	8.5	12	7.5	8	9	9.5	8
もろみ最高温度 (°C)	12.1	13	15.2	12.2	15.5	15.5	13.2	14.5
発酵形式	前急後急	前急後急	前急後緩	前急後緩	前急後緩	前急後緩	前緩後緩	前急後緩
もろみ日数	17	28	18	32	28	23	28	21
粕歩合 (%)	40	43	28	63	35	29	25	20
火入れ	無し	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り
火入れ後急冷	—	有り	有り	有り	有り	有り	無し	有り
貯蔵温度 (°C)	1	室温	0	0	2	20	8	16
貯蔵期間 (月)	1	1	1	不明	6	10	16	18
貯蔵形態	タンク	瓶	タンク	瓶	瓶	タンク	タンク	タンク

は低いことが分かったが、清酒中のカルバミン酸エチルは主に酵母のアルギニン代謝によって生じる尿素とエタノールの化学反応によって生成することから、三重県酵母について、アルギニンを尿素とオルニチンに分解する酵素であるアルギナーゼの活性を確認することにした。その結果、全ての三重県酵母は K-9 よりもその活性が低かった (表3)。つまり、同じ条件で醸造した場合、三重県酵母を用いれば K-9 よりもカルバミン酸エチルが低濃度の醸成酒を得ることが可能と考えられる。K-9 の醸成酒のカルバミン酸エチル含量については、北本らが、65°C で 30 分間火入れ後、30°C

で 45 日間及び 150 日間貯蔵した場合、約 46 µg/L 及び約 181 µg/L であったと報告している⁴⁾。したがって、三重県酵母の醸成酒のカルバミン酸エチル含量は、カナダ及びチェコの規制値 200 µg/L より低く抑えることが可能と考えられ、加えて、火入れ後の急冷や低温貯蔵を徹底することでさらに低減化を図ることができる。

4. まとめ

酒類等に含まれており、発がん性の可能性のあるカルバミン酸エチルについて、県産清酒中の含量を定量したところ、カナダ及びチェコにおける規制値よりも低かった。また、三重県酵母のアルギナーゼ活性はきょうかい酵母 9 号 (K-9) よりも低かった。三重県酵母の醸成酒は、火入れ後の急冷や低温貯蔵の徹底により、カルバミン酸エチルの生成を規制値より低く抑えることが可能と考えられる。

参考文献

1) International Agency for Research on

表3 酵母のアルギナーゼ活性

菌株	アルギナーゼ活性 (µmol urea/h/mg of protein)
K-9	33.4
MK-1	29.3
MK-3	18.4
MK-5	22.2
MLA-12	19.8

- Cancer : “ 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) 橋口知一ほか: “酒類中のカルバミン酸エチルの簡易定量法” . 日本醸造協会誌, 101(7), p519-525 (2006)
- 4) K. Kitamoto : “Genetic engineering of a sake yeast producing no urea by successive disruption of arginase gene” . Appl. Environ. Microbiol., 57, p301-306 (1991)
- 5) P. A. Whitney et al. : “The induction of arginase in *Saccharomyces cerevisiae*” . J. Biol. Chem., 248, p6197-6202 (1973)
- 6) R. M. Archibald: “Colorimetric determination of urea” . J. Biol. Chem., 157, p507-518 (1945)
- 7) 国税庁: “全国市販酒類調査の結果について(平成 25 年度調査分)” . <https://www.nta.go.jp/shiraberu/senmonjoho/sake/shiori-gaikyo/seibun/2014/pdf/01.pdf>
- 8) 吉沢淑ほか: “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), p69-73 (1988)
- 9) 北本勝ひこ: “ウレア非生産性清酒酵母の育種と実地醸造試験” . 日本醸造協会誌, 88(2), p106-114 (1993)