

## 三重県清酒酵母の尿素低生産性化

小澤敦揮\*, 丸山裕慎\*, 山崎栄次\*

### Reduction of Urea Productivity of Mie Sake Yeasts

Atsuki OZAWA, Hironori MARUYAMA and Eiji YAMAZAKI

Urea formed by arginase of sake yeasts can lead to the formation of ethyl carbamate (ECA) that is classified into group 2A carcinogens by International Agency for Research on Cancer (IARC). Many studies have been conducted to reduce ECA concentration of sake, and it was reported that using low urea producing yeast could minimize the formation of ECA. In order to obtain low urea producing yeasts from Mie Sake Yeasts, selection tests for mutant strains with low arginase activity was carried out by using a medium for the positive screening of the mutants (CAO medium). Arginase activity of the selected strains and of the parental strains were assayed, and then urea concentrations of the sakes brewed with these yeasts were measured. As a result, a yeast with low urea productivity was isolated from the sake yeast MK5, and MK1 has low urea productivity by its nature.

Keywords: Mie Sake Yeast, Ethyl Carbamate, Low Urea Productivity, Arginase Activity

#### 1. はじめに

カルバミン酸エチルは、平成 19 年に国際がん研究機関により「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る<sup>1)</sup>。日本国内においては食品衛生法上の規制はないが、カナダおよびチェコは酒類のカルバミン酸エチル濃度に規制値を設けており<sup>2)</sup>、清酒に関しては 200 µg/L を規制値としている。酒類の海外輸出の観点からもカルバミン酸エチルの低減化が望まれているが<sup>3)</sup>、三重県においては、平成 28 年の研究報告で県産清酒のカルバミン酸エチル濃度がこれらの国における規制値を下回っていることを報告した<sup>4)</sup>。しかし、その報告にて調査した清酒サンプルの数は限られており、また今後は一層規制が厳しくなる可能性もあるため、県内酒造企業から県産清酒の調査サンプルの拡充、およびカルバミン酸エチル濃度のさらなる低減化を望む声が上がっている。

清酒におけるカルバミン酸エチルは、尿素とエタノールが化学的に反応することで生成する<sup>5)</sup>ため、尿素低生産性酵母を利用することでカルバミン酸エチルを低減化できることが報告されている<sup>6)</sup>。清酒酵母由来の尿素は、酵母のアルギナーゼによりアルギニンが加水分解される過程で生成するが、北本らはアルギナーゼ遺伝子を変異させることで尿素生産性が失われること、アルギナーゼ活性の低い株は CAO 培地（カナバニン、アルギニンおよびオルニチンを含む選択培地）により選抜できることを報告している<sup>7,8)</sup>。

本研究では、県産清酒のカルバミン酸エチル濃度の低減化を目的として、三重県清酒酵母 5 株（MK1, MK3, MK5, MK7, MLA12）からの尿素低生産性酵母の取得を目指した。遺伝子変異株は一般的に、薬剤などの変異原により遺伝子変異を誘発することで取得できる。しかし、このような変異処理は変異導入部位のコントロールが困難であり、目的以外の遺伝子を変異させ、酵母の発酵特性などを損なう恐れがある。そこで本研究では、

\* 食と医薬品研究課

薬剤などによる変異処理を行わず、CAO 培地を用いて繰り返し培養を行うことで、アルギナーゼ遺伝子が自然に変異した株の取得を試みた<sup>8)</sup>。また、既報では選抜したアルギナーゼ低活性株の尿素生産量を測定することで尿素低生産性を確認しているが<sup>3,9,10)</sup>、本研究では尿素生産量に加えてアルギナーゼ活性も測定し、アルギナーゼ活性と尿素低生産性の関係についても検討した。その結果、MK1 はアルギナーゼ活性および尿素生産量が低く、尿素低生産化が既に達成されていることを明らかにでき、また、MK5 においてアルギナーゼ活性は高いものの尿素生産量の低い株を取得できたので報告する。

## 2. 実験方法

### 2. 1 供試菌株

供試菌株として、三重県清酒酵母 5 株 (MK1, MK3, MK5, MK7, MLA12) を用いた。また、清酒醸造に広く使用されている酵母であり、尿素生産性を有することが報告されているきょうかい酵母 901 号 (K901) および、アルギナーゼ遺伝子が欠損しており、尿素低生産性であることが報告されているきょうかい酵母 1901 号 (KArg1901) を対照株として用いた<sup>11)</sup>。

### 2. 2 使用培地

酵母の培養には半合成培地 (酵母エキス

ス w/o amino acid and ammonium sulfate 0.17 % (w/v), カナバニン 10 ppm, オルニチン 5 mM, アルギニン 1 mM, グルコース 2 % (w/v), 寒天 2 % (w/v)) を用いた<sup>8)</sup>。アルギナーゼ低活性の確認には、窒素源としてアルギニンのみを含む Arg 培地 (イーストナイトロジェンベース w/o amino acid and ammonium sulfate 0.17 % (w/v), アルギニン 5 mM, グルコース 2 % (w/v), 寒天 2 % (w/v)) と、窒素源としてオルニチンのみを含む Orn 培地 (イーストナイトロジェンベース w/o amino acid and ammonium sulfate 0.17 % (w/v), オルニチン 5 mM, グルコース 2 % (w/v), 寒天 2 % (w/v)) を用いた<sup>8)</sup>。

### 2. 3 アルギナーゼ低活性株の選抜

2.3 から 2.5 までの実験手順については図 1 に示した。アルギナーゼ低活性株の選抜は北本らの方法を参考にして行った<sup>8)</sup>。すなわち、各酵母菌株を半合成培地に接種し、30 °C で 2 日間培養した後、培養液から遠心分離 (5,000 rpm, 4 °C, 5 min) により菌体を回収した。菌体を滅菌水にて 2 回洗浄した後、菌体濃度が約 10<sup>7</sup> cells/plate となるように CAO 培地上に塗布し、30 °C で 3 週間培養した。直径 1 mm 以上に生長したコロニーから爪楊枝で菌体を採取し、20 μl の滅菌水に懸濁した後、Arg 培地および Orn 培地上に 5 μl ずつ滴下して 30 °C で 2 日間培養した。Arg 培地では生育できず、Orn 培地では生育できる株をアルギナーゼ低

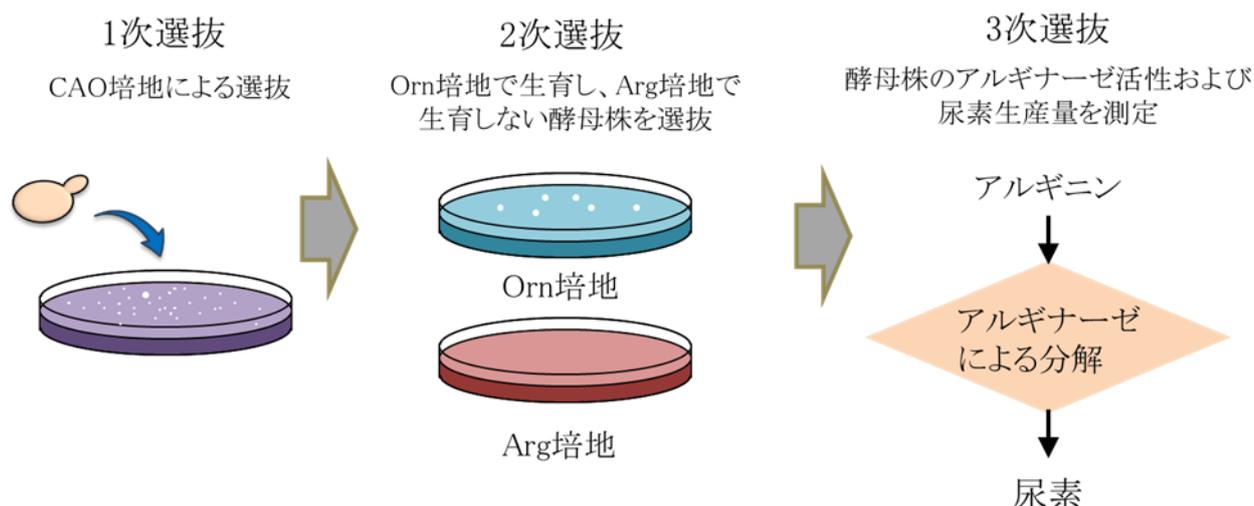


図1 アルギナーゼ低活性株の選抜およびそのアルギナーゼ活性と尿素生産量の確認

0.5 % (w/v), ポリペプトン 0.5 % (w/v), グルコース 5.0 % (w/v)) を用いた。アルギナーゼ低活性株の単離には CAO 培地 (イーストナイトロジェンベー

活性株として選抜した。

### 2. 4 酵母のアルギナーゼ活性測定

酵母菌株を半合成培地にて 30 °C で 2 日間静置

培養した後、培養液を遠心分離により濃縮または滅菌水にて希釈し、菌体濃度が約  $7.5 \times 10^7$  cells/ml になるように調整した。このうち 100  $\mu$ l を 4 ml の半合成培地に植菌し、30  $^{\circ}$ C , 100 rpm で 4 時間振とう培養した。培養液から遠心分離 (5,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C , 5 min) により菌体を回収し、滅菌水にて 2 回洗浄した後、1 ml の滅菌水に懸濁した。そのうち 500  $\mu$ l を菌体濃度の測定に供し、残りの 500  $\mu$ l から遠心分離 (5,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C , 5 min) により菌体を回収した。菌体に 50  $\mu$ l の酵母蛋白抽出試薬 (Y-PER™ Plus Dialyzable Yeast Protein Extraction Reagent, Thermo Fisher Scientific, Inc.) を加えてタッピングにより攪拌した後、5 分おきに攪拌しながら 20 分間保持した。その後、遠心分離 (12,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C , 5 min) により回収した上清を酵素抽出液とし、アルギナーゼ活性測定キット (QuantiChrom Arginase Assay Kit, Bioassay Systems Corp.) を用いてアルギナーゼ活性の測定を行い、測定値を菌体濃度で除して菌体濃度当たりのアルギナーゼ活性 (unit/ $10^6$ cells) を算出した。

## 2. 5 小仕込み試験および尿素濃度の測定

小仕込み試験は総米 50 g の一段仕込みとした。原料米として、60 % 精米の  $\alpha$  化米 (AA-60, 徳島製麹株式会社, 50 % 精米の麴 (G-50, 徳島製麹株式会社) を用いた。麴歩合 20 %, 汲水歩合 180 % にて行い、乳酸 30  $\mu$ l を添加した。各酵母菌株は半

min) にて上槽し、得られた上清を製成酒とした。製成酒中の尿素濃度 (mg/L) は尿素濃度測定キット (F-キット 尿素/アンモニア, 株式会社 J.K. インターナショナル) により測定した。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 アルギナーゼ低活性株の選抜

三重県清酒酵母 5 株 (MK1, MK3, MK5, MK7, MLA12) を CAO 培地上で培養し、得られたコロニーを Arg 培地および Orn 培地に植菌した。アルギナーゼ低活性株はアルギニン代謝できず、アルギニンのみを窒素源とする培地では生育できないが、アルギニン代謝により生じるオルニチンを含む培地では生育できることから、Arg 培地で生育せず Orn 培地で生育する株をアルギナーゼ低活性株として単離した。

その結果、MK5 から 3 株を、図 2 のように MK7 から 8 株を選抜できたため、親株である MK5 および MK7 とともに、これらの株のアルギナーゼ活性測定および小仕込み試験を実施した。MK1 は CAO 培地上で非常に多数のコロニーが出現したことから、元々アルギナーゼ低活性株であると思われるため、上記の測定試験に供した。MK3 および MLA12 は、CAO 培地上でコロニーを形成したが、取得できたコロニーは全て Arg 培地で生育した。すなわち、MK3 および MLA12 からアルギナーゼ低活性株は選抜できなかった。MK3 および

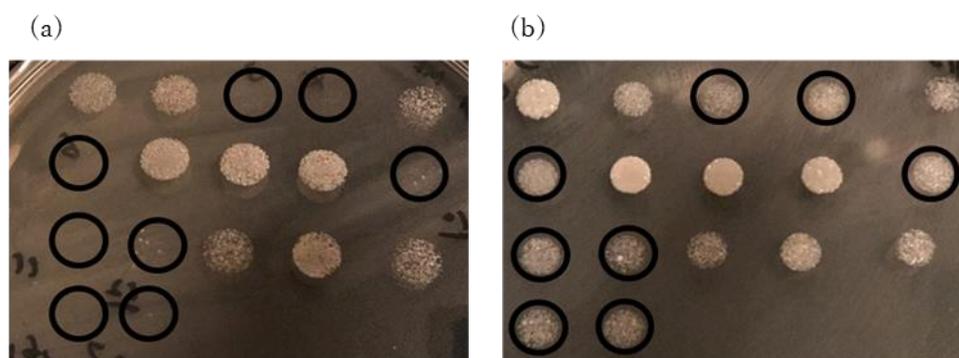


図2 MK7からアルギナーゼ低活性株として単離された8株のArg培地(a)およびOrn培地(b)での生育の様子 (8株はそれぞれの培地上に丸で示した)

合成培地にて 30  $^{\circ}$ C で 2 日間静置培養し、もろみの初発菌体濃度が約  $5 \times 10^5$  cells/ml になるように汲水で調整して仕込んだ。発酵温度は 15  $^{\circ}$ C で一定とした。仕込み開始日を 1 日目とし、16 日目または 17 日目に遠心分離 (5,000 rpm, 10  $^{\circ}$ C , 10

MLA12 は脂肪酸合成系の遺伝子 (FAS2) が変異したカプロン酸エチル高生産酵母である<sup>12)</sup>が、FAS2 変異株からのアルギナーゼ遺伝子 (CAR1) の自然変異株の取得頻度は低い場合があるとされており<sup>10,13,14)</sup>、そのためこれらの酵母からアルギ

ナーゼ低活性株が選抜できなかったものと思われた。FAS2 と CAR1 が酵母の第 16 番染色体上の近接した位置にあること<sup>14)</sup>などが、取得頻度の低さに関係していると予想されるが、詳しい原因は不明である。

### 3. 2 アルギナーゼ活性の測定

三重県清酒酵母 MK1, MK5, MK7 および選抜したアルギナーゼ低活性株のアルギナーゼ活性の測定結果を図 3 に示す。アルギナーゼ低活性株は、MK5 から単離した 3 株を MK5-1, -2, -3, MK7 から単離した 8 株を MK7-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8 と記した。MK1 のアルギナーゼ活性は、尿素生産性株でとされる K901 より低く、尿素低生産性の KArg1901 に近かったことから、MK1 はアルギナーゼ低活性株であると判断した。MK5 および MK5-1, -2, -3 は、K901 よりもアルギナーゼ活性が低かったが、KArg1901 と比較するとかなり高いことから、アルギナーゼ低活性株ではないと判断した。MK5-1, -2, -3 がアルギナーゼ低活性株ではなかったにもかかわらず、Arg 培地上で生育できなかった理由として、これらの株のアルギニン取り

残糖濃度とアミノ酸度が高い傾向が見られたことから<sup>12)</sup>, MK5 はアミノ酸膜透過酵素の活性が低いことが推察され、MK5-1, -2, -3 も同様の特徴を有していたと考えられた。MK7 および MK7-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8 のアルギナーゼ活性も K901 よりアルギナーゼ活性が低かったが、KArg1901 と比較するとかなり高いことから、アルギナーゼ低活性株ではないと判断した。MK7 は MK5 のセルレニン耐性株から選抜された酵母であることから、MK5 と同じようにアミノ酸膜透過酵素の活性が低く、MK7-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8 についても同様であったと考えられる。MK5, MK7 およびこれらの株から単離された株のアミノ酸膜透過酵素の活性の確認については、今後の課題である。

### 3. 3 小仕込み試験による製成酒の尿素濃度の測定

三重県清酒酵母 MK1, MK5, MK7 および選抜したアルギナーゼ低活性株を用いた製成酒の尿素濃度の測定結果を図 4 に示した。

MK1 を用いた製成酒の尿素濃度は尿素低生産性株である KArg1901 の製成酒より低く、MK1 は

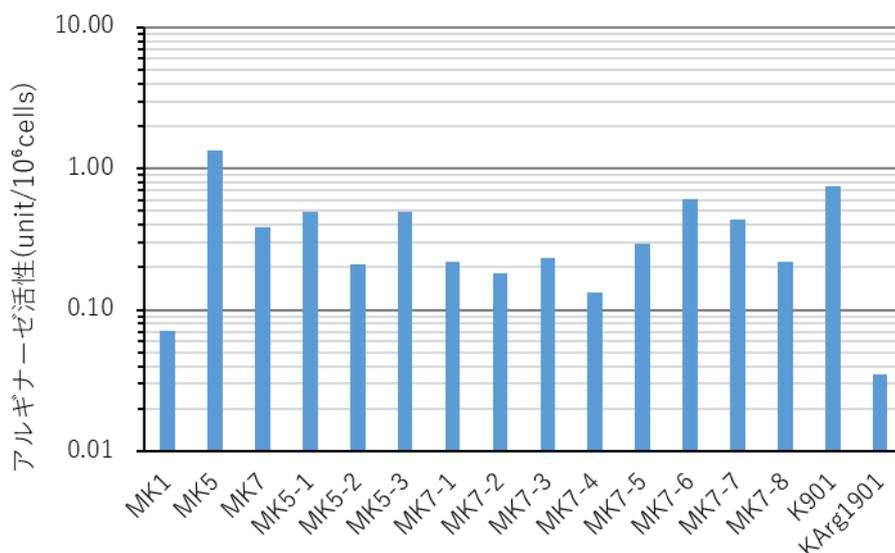


図3 各酵母菌株のアルギナーゼ活性測定結果

込みに関わる酵素系の活性が低く、代謝が抑制された可能性が考えられる。アルギニン等のアミノ酸の取り込みに関わる酵素(アミノ酸膜透過酵素)の遺伝子が欠失した酵母は、親株に比べて発酵力が弱く、製成酒の残糖濃度およびアミノ酸度が高いという特徴がある<sup>15)</sup>。既報において MK5 を用いた製成酒は、他の三重県酵母やきょうかい酵母を用いた製成酒に比べ、アルコール度数が低く、

尿素低生産性株であることが推察された。MK5 および MK5-1 を用いた製成酒の尿素濃度は KArg1901 の製成酒より低く、これらの株は尿素低生産性であることが推察された。先述のとおり、これらの株はアミノ酸膜透過酵素の活性が低い可能性があり、そのためアルギニンの取り込みおよび資化が抑制され、結果的に尿素低生産性になったと推察された。MK5-1 を用いた製成酒の尿素濃

度は MK5 の製成酒に比べてさらに低く、より尿素生産量の低い酵母を取得できたことが推察された。MK5-2, -3 および MK7, MK7-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8 を用いた製成酒の尿素濃度は KArg1901 の製成酒より高かった。先述のとおり、これらの株もアミノ酸膜透過酵素の活性が低く、アルギニンの取り込みおよび資化が抑制されていたにもかかわらず

はなかったが、アミノ酸膜透過酵素の活性が低いなどの理由で尿素低生産性となっていると思われた。また MK1 はアルギナーゼ活性が KArg1901 と同程度に低く、尿素生産量は KArg1901 より低かった。すなわち、MK1 の尿素低生産化は変異を導入するまでもなく、既に達成されていることを明らかにできた。

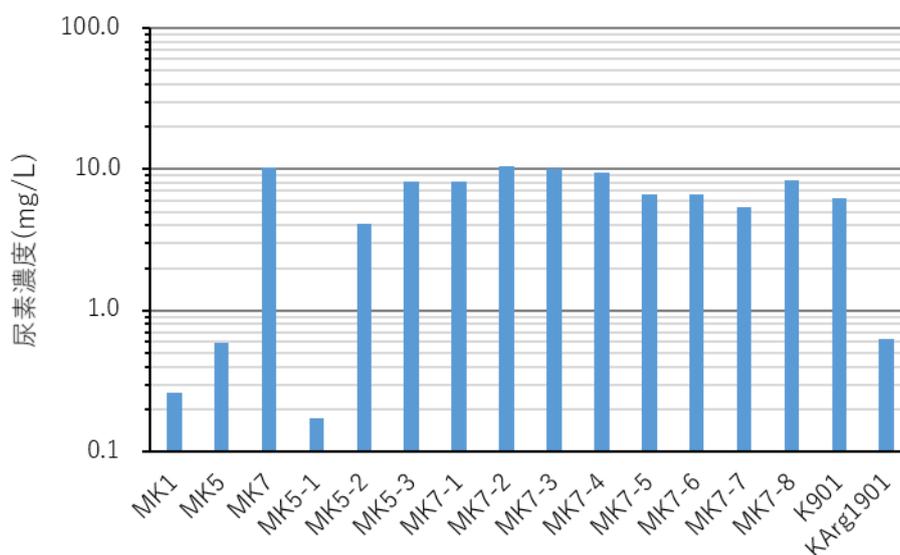


図4 各酵母菌株の製成酒の尿素濃度測定結果

らず、尿素低生産性ではないことが示された。その理由として、これらの株の選抜の過程において、アミノ酸膜透過酵素の活性の低下に関わる遺伝子変異が一部修復された可能性が考えられる。酵母によっては低温下でアルギニンの取り込み能が高くなる場合があるため<sup>16)</sup>、CAO 培地や Arg 培地での培養条件に比べて低温条件で行われる小仕込み試験ではアルギニンの取り込み能が高まり、結果として尿素生産量が高くなったと考えられる。

#### 4. まとめ

三重県産清酒のカルバミン酸エチル濃度の低減化を目的として、その前駆物質である尿素の生産量の低い三重県清酒酵母株を取得することを試みた。三重県清酒酵母 5 株から、尿素の生産に関わるアルギナーゼ遺伝子が自然に変異した株を選抜したところ、MK5 において、尿素低生産性株である KArg1901 および親株の MK5 より尿素生産量の低い株を取得できた。この株はアルギナーゼ活性が KArg1901 より高く、アルギナーゼ低活性株で

#### 参考文献

- 1) International Agency for Research on Cancer : “Alcohol consumption and ethyl carbamate”. 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) 渡部貴志ほか : “輸出用に適した群馬清酒酵母の育種に関する研究”. 群馬県立産業技術センター研究報告, p14-17 (2016)
- 4) 山岡千鶴ほか : “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清酒酵母のアルギナーゼ活性”. 三重県工業研究所研究報告, 40, p45-48 (2016)
- 5) 原昌道ほか : “尿素あるいはその関連物質を含むモデル酒中にわたるカルバミン酸エチルの生成”. 日本醸造協会誌, 83(1), p57-63 (1988)
- 6) 田中準浩ほか : “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), p413-417 (1989)
- 7) K. Kitamoto et al. : “Genetic engineering of a sake yeast producing no urea by successive disruption of arginase gene”. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, p301-306 (1991)
- 8) K. Kitamoto et al. : "Mutant isolation of non-urea producing sake yeast by positive selection". *Journal of fermentation and bioengineering*, 75(5), p359-363 (1993)
- 9) 佐藤稔英ほか：“Iw201号酵母からの尿素低生産性自然変異株の分離”. 岩手県工業技術センター研究報告, 19, p54-57 (2017)
- 10) 谷本昌太ほか：“広島吟醸酵母の尿素低生産性株の育種”. 愛媛大学教育学部紀要, 56, p269-276 (2009)
- 11) 蓮田寛和ほか：“きょうかい酵母(R)清酒用尿素低生産性高エステル酵母 1901号(KArg1901)について”. 日本醸造協会誌, 109(8), p576-581 (2014)
- 12) 丸山裕慎ほか：“三重県清酒酵母の遺伝的及び醸造特性の包括的評価”. 日本醸造協会誌 (印刷中)
- 13) 玉川英幸ほか：“セルレニン耐性を有する清酒酵母から尿素低生産性株の取得”. 岩手県工業技術センター研究報告, 23, p57-63 (2020)
- 14) T. Kuribayashi et al. “Breeding of a non-urea-producing sake yeast carrying a FAS2 mutation”. *Mycoscience*, 58(4), p302-306 (2017)
- 15) 小杉昭彦ほか：“清酒醸造における酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のアミノ酸膜透過酵素欠失による影響”. 日本醸造協会誌, 94(2), p141-149 (1999)
- 16) 岩野君夫ほか：“清酒酵母の増殖における選択的アミノ酸取込みに及ぼす醸造要因”. 日本醸造協会誌, 99(11), p801-808 (2004)