

## 広島吟醸酵母の尿素低生産性株の育種

(家政教育教室) 谷 本 昌 太  
(広島県立総合技術研究所食品工業技術センター) 藤 井 一 嘉\*

### Breeding of Sake Yeasts with Lower Urea Productivity from *S. cerevisiae* Hiroshima ginjo kobo

Shota TANIMOTO and Kazuyoshi FUJII

(平成 21 年 6 月 5 日受理)

#### 欧文抄録

Sake yeast strains with lower urea productivity were bred from *S. cerevisiae* Hiroshima ginjo kobo 12BY and 13BY strains using a mutation technique and CAO plates. Sake mutant strains (12BY-16 and 13BY-5) were selected during a fermentation test by using a koji extract medium supplemented with alcohol-dehydrated koji, 200-g and 1500-g scale brewing tests, and a pilot scale brewing test. The pilot scale brewing test showed that both of the selected strains demonstrated almost identical fermentation ability and almost the same amounts of major components in sake, when compared to the parental strain. Also, there were no significant difference in sake sensory score between the selected strains and the parental strains. Furthermore, the 12BY-16 and 13BY-5 produced 10 and 20 times lower urea than the parental strain, respectively. These results suggest that both of the selected strains not only can give the same quality of *Ginjo* sake (quality sake brewed from the finest rice) as the parent strains but also have lower urea productivity, or can depress the formation of ethyl carbamate in the sake.

Key words: lower urea productivity, Hiroshima ginjo kobo, sake yeast, breeding

\*現広島県立総合技術研究所農業技術センター

キーワード：尿素低生産性，広島吟醸酵母，清酒酵母，育種

#### 1.はじめに

カルバミン酸エチルは、発がん性物質の可能性がある<sup>1)</sup>ことが知られており、酒類を含む発酵食品にも少量含まれている。<sup>2)</sup>現時点で国内における規制値はないものの、第64回FAO/WHO合同食品添加物専門者会議(2005年)は「ある種の酒類については低減策を継続すべきである」と述べている。ワインや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する。<sup>3)</sup>したがって、清酒中の尿素的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。<sup>4)</sup>これまでに、清酒中の尿素濃度の低減化について、ウレアーゼの添加や尿素低もしくは非生産酵母の使用などいくつかの方法が報告・実用化されている。<sup>5-9)</sup>前者の場合、清酒の製成・貯蔵段階にウレアーゼを作用させることにより尿素を分解する方法である。しかしながら、昨今の消費者の無添加・天然志向を考えると、清酒に本来含まれないものを添加することは好ましい印象を与えない。一方、後者は酵母の尿素生産量を低下させるため、醸造工程において何ら添加物を加える必要がない。北本らは、酵母の尿素生成に関与する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作出できること、また、CAO培地を用いることで変異株の中から高い確率で尿素非生成株を取得可能なことを報告している。<sup>8-10)</sup>セルレニン耐性

酵母<sup>11)</sup>である広島吟醸酵母は、高いカプロン酸エチル生成能と低酸性を特徴とし、華やかな香りの清酒の醸造が可能である。<sup>12, 13)</sup>そのため、広島県のみならず、中国地方を中心に全国で吟醸酒や純米吟醸酒用の酵母として使用されている。また、これまで高いカプロン酸エチル生成能を有する清酒酵母で、尿素低生産株を選抜したといった報告はされていない。そこで、本研究では広島吟醸酵母12BYおよび13BYの尿素低生産株を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.供試菌株および培地

広島吟醸酵母12BYおよび13BYを供試菌株とした。培地としてCAO培地(0.17%Difco社製イーストニトロゲンベースw/o amino acid and ammonium sulfate, 10 ppmカナバニン, 1 mMアルギニン塩酸塩, 5 mMオルニチン塩酸塩, 2%ブドウ糖, 2%寒天), アルギニン培地(0.17%Difco社製イーストニトロゲンベースw/o amino acid and ammonium sulfate, 5 mMアルギニン塩酸塩, 2%ブドウ糖, 2%寒天), オルニチン培地(0.17%Difco社製イーストニトロゲンベースw/o amino acid and ammonium sulfate, 5 mMオルニチン塩酸塩, 2%ブドウ糖, 2%寒天), YPD培地(1%酵母エキス, 2%ポリペプトン, 2%ブドウ糖), 麴汁培地およびアルコール脱水麴添加培地<sup>14)</sup>を用いた。アルコール脱水麴添加培地には麴と

して徳島製麴(株)製の乾燥麴(精米歩合50%「山田錦」)を用いた。

### 2-2.尿素低生産性変異株の分離

12BYおよび13BYをエチルメタンサルホン酸により変異処理後、CAO培地に塗布し、30℃、3日間の培養後に出現したコロニーを単離した。単離した変異株をアルギニン培地およびオルニチン培地に塗布し、アルギニン培地に生育できず、オルニチン培地に生育できるものを選抜した。単離した変異株を再度CAO培地に塗布し30℃で培養後に菌体を釣菌し、この操作を2回繰り返して分離株を得た。

### 2-3.アルコール脱水麴添加培地による発酵試験

アルコール脱水麴添加培地による発酵試験は、斉藤らの方法<sup>14)</sup>を若干改変して行った。すなわち、酵母をYPD培地に一白金耳植菌し、30℃で2日間静置培養した。培養液をアルコール脱水麴添加培地に添加し、15℃で14日間静置培養した。発酵終了後、遠心分離を行い、上清の一般成分(日本酒度, アルコール, 酸度, アミノ酸度), 香気成分および尿素の測定を行った。

### 2-4.清酒小仕込試験

総米200gおよび1500g規模の清酒小仕込試験を行った。仕込配合を表1に示す。吟醸もろみの品温経過とし、

表1 清酒小仕込試験の仕込配合

	添	仲	留	合計
総米200g				
総米 (g)	41	62	97	200
蒸米 (g)	30	50	80	160
麴 (g)	11	12	17	40
水 (mL)	50	90	140	280
活性酵母 (mL)	10			10
総米1500g				
総米 (g)	308	464	728	1500
蒸米 (g)	225	375	600	1200
麴 (g)	83	89	128	300
水 (mL)	376	674	1050	2100
活性酵母 (mL)	75			75

水には、0.42%乳酸を含む加工水を用いた。

添を13℃，踊を15℃，仲を8℃，留を6℃とし，その後5日目に最高品温が11℃となるように1℃/日ずつ品温を上昇させ，以後上槽まで一定とした。掛米は精米歩合50%「千本錦」，麴は徳島製麴（株）製の乾燥麴（精米歩合50%「山田錦」）を用いた。総米200g規模の小仕込試験では，もろみの重量が留より55g以上減少した時点で発酵を終了した。一方，総米1500g規模の小仕込試験では，日本酒度が±0になった時点で発酵を終了し，遠

心分離により上槽した。酵母の前培養には麴汁培地を用いた。製成酒の分析は一般成分，香气成分および尿素について行った。また，総米1500g規模の試験については，製成酒の官能評価も行った。

2-5.パイロットスケールの仕込試験

仕込試験は表2に示す仕込配合で行った。原料米としては精米歩合50%「千本錦」を用いた。吟醸もろみの品

表2 パイロットスケール仕込試験の仕込配合

	添	仲	留	4段	合計
12BY					
総米 (kg)	20	30	50	0	100
蒸米 (kg)	15	23	42	0	80
麴 (kg)	5	7	8	0	20
水 (L)	30	40	70	0	140
35%アルコール (L)	0	0	0	30 (31)	30 (31)
活性酵母 (L)	3	0	0	0	3
90%乳酸 (mL)	75	0	0	0	75
13BY					
総米 (kg)	20	30	50	0	100
蒸米 (kg)	15	23	42	0	80
麴 (kg)	5	7	8	0	20
水 (L)	30	40	80	0	150
30%アルコール (L)	0	0	0	36	36
活性酵母 (L)	3	0	0	0	3
90%乳酸 (mL)	75	0	0	0	75

カッコ内の値は，12BY-16株におけるアルコール添加量を示す。

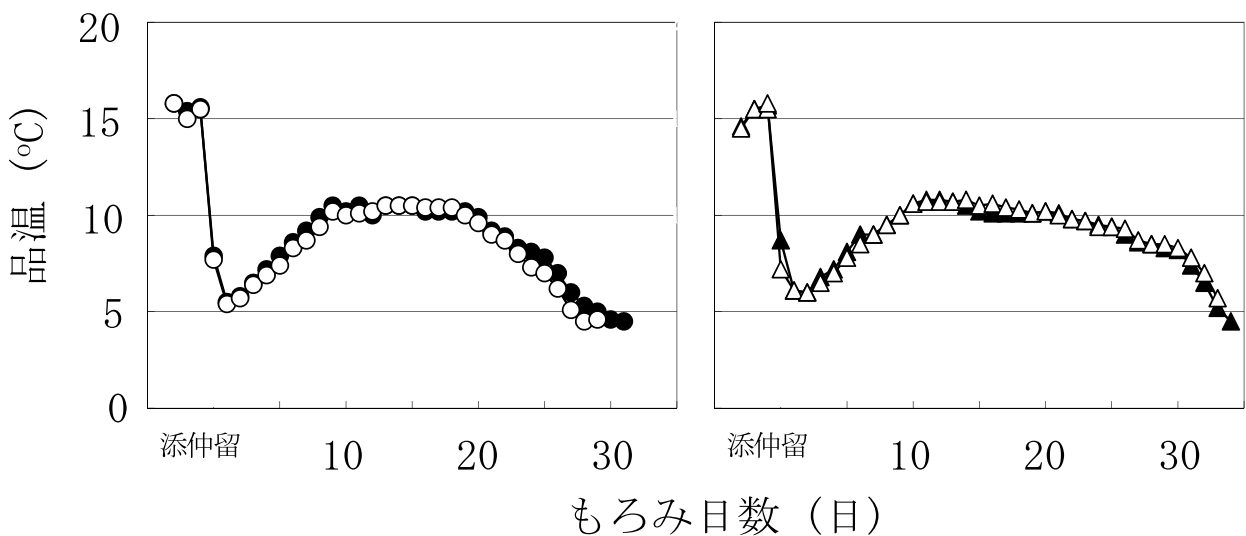


図1 パイロットスケールの仕込試験におけるもろみの品温変化  
○, 12BY-16株; ●, 12BY (親株); △, 13BY-5株; ▲, 13BY (親株)

温経過とし、添および踊を14℃、伸を7℃、留を5℃とした。その後8または9日目に最高品温をおよそ10.5℃となるように品温を上昇させた(図1)。日本酒度が-2を越えた時点でアルコールを添加し、上槽した。酒母廃止仕込みとし、活性酵母を用いた。活性酵母の培養には麴汁培地を用いた。白米の浸漬については、吸水率25~31%の限定吸水を行った。麴については、蓋麴法を行った。もろみの分析は一般成分について行った。製成酒の分析は一般成分、香氣成分、ブドウ糖および尿素について行った。また、製成酒の官能評価も行った。

## 2-6.成分分析

もろみのアルコールを除く一般成分<sup>15)</sup>は国税庁所定分析法に準じて分析した。もろみのアルコールの測定には、理研計器(株)製の簡易測定装置AL-2型を用いた。香氣成分<sup>15)</sup>は国税庁所定分析法に修正を加えて行った。すなわち、ガスクロマトグラフィー分析を以下の条件で行った。検出器、FID; カラム、J&W Scientific製化学結合型のシリカメガボアカラムDB-wax(内径0.53 mm; 長さ30 m; 膜厚1 μm); カラム温度、40℃で1分間保持後、20℃/分で昇温し、80℃で1分間保持、さらに20℃/分で昇温し、180℃で4分間保持し注入口温度、200℃; キャリアーガス、窒素; 流速、30 mL/分とした。ヘッドスペース法による香氣成分の捕集および導入は、バイアルに試料5 mLおよび100 mg/Lのカプロン酸メチル0.5 mL(内部標準)を加え、密栓し、ヘッドスペースオートサンプラー(Tekmar社製 Tekmar 7000, 香氣成分平衡時間; 65℃, 35分間)により行った。ブドウ糖はグルコースCII-テストワコー(和光純薬工業(株))を用いて測定した。

## 2-7.尿素的分析

尿素は、アルコール脱水麴添加培地による発酵試験および清酒小仕込試験ではF-キット法((株)J.K.インターナショナル)、パイロットスケールの仕込試験では(株)日立ハイテクノロジーズ製の高速アミノ酸分析計L-8800Aを用いてそれぞれ測定した。

## 2-8.官能評価

製成酒の官能評価は、香り、味、総合評価について、

5点法(1, とても良い; 2, 良い; 3, 普通; 4, 悪い; 5, とても悪い)による絶対評価で行われた。1500g規模の清酒小仕込試験では8名、パイロットスケールの仕込試験では13名の訓練されたパネリストが評価した。パイロットスケールの仕込試験の結果は、Microsoft Office Excel 2007を用いて官能評価値の平均値の差について有意差検定を行った。

## 3. 結果と考察

### 3-1.CAO培地による選抜株の分離およびアルコール脱水麴添加培地による発酵試験

12BYおよび13BYを変異処理後、CAO培地に塗布し、比較的大きなコロニーを釣菌した。続いて、アルギニン培地に生育できず、オルニチン培地に生育できるものを選抜し、さらに再度CAO培地を用いて分離株を得た。12BYおよび13BYからそれぞれ32および23株を取得した。それらをアルコール脱水麴添加培地による発酵試験に供した。日本酒度が高く、発酵力が比較的良好と考えられるものについて、酸度、アミノ酸度、香氣成分および尿素を測定した。アミノ酸度および香氣成分が親株と同等の値で尿素生産量の低いものを優良株として選抜した(データは省略)。

### 3-2.清酒小仕込試験

アルコール脱水麴添加培地による発酵試験において選抜した株(12BYおよび13BYからそれぞれ5株)を200g規模の清酒小仕込試験に供した。親株と比べてもろみ日数が同等または短く、アミノ酸度および香氣成分が親株と同等の値で尿素生産量の低いものを優良株として選抜した(データは省略)。12BYおよび13BYからそれぞれ3株が優良株として選抜された。

次に、選抜株について仕込み規模を1500gにスケールアップして小仕込試験を行った。製成酒の成分分析結果を表3に、官能試験の結果を表4に示す。12BY由来では親株と比べて日本酒度がやや低く、アミノ酸度がやや高く、酢酸イソアミルが低いものの、カプロン酸エチルが高く、アルコール、酸度およびその他の香氣成分は同等であり、官能的に良好でかつ尿素が1/10以下であった12BY-16株を選抜した。一方、13BY由来では一般成分とほとんどの香氣成分が親株と同等であり、官能的に良

表3 1500g規模の清酒小仕込試験の分析結果

	もろみ日数 (日)	日本 酒度	アルコール (%)	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	酢酸 エチル (mg/L)	イソ ブチル アルコール (mg/L)	酢酸 イソ アミル (mg/L)	イソ アミル アルコール (mg/L)	カプロン酸 エチル (mg/L)	カプリル酸 エチル (mg/L)	カプリン酸 エチル (mg/L)	尿素 (mg/L)
12BY-11	37	-0.5	17.6	2.78	1.52	53.8	34.5	2.10	106.7	7.78	1.29	0.16	2.3
12BY-16	37	-1.6	17.1	2.73	1.50	59.0	36.5	2.41	118.1	6.58	1.13	0.15	0.8
12BY-25	37	-2.6	17.2	2.25	1.56	46.2	29.6	1.53	99.2	7.86	1.24	0.16	不検出
12BY (親株)	36	+4.0	17.7	2.76	1.21	79.5	41.5	3.20	119.9	4.91	1.07	0.16	16.6
13BY-5	38	-0.7	16.6	2.27	1.38	28.3	34.3	1.80	129.0	15.77	1.99	0.38	不検出
13BY-12	37	-0.6	16.4	2.19	1.32	16.9	48.8	1.12	138.9	10.28	1.62	0.35	不検出
13BY-17	37	-1.2	16.5	2.90	1.32	30.1	33.2	1.68	132.6	15.10	1.98	0.38	0.9
13BY (親株)	38	-1.6	16.6	2.24	1.37	37.5	35.0	1.76	118.7	14.26	1.21	0.18	15.0

表4 清酒小仕込試験 (1500g) 製成酒の官能検査結果

	香り	味	総合評価
12BY-11	1.7±0.52	1.8±0.41	2.1±0.76
12BY-16	1.8±0.42	2.0±0.89	2.0±0.83
12BY-25	1.7±0.52	1.8±1.33	2.5±0.86
12BY (親株)	2.8±0.75	2.8±1.33	2.5±0.83
13BY-5	1.3±0.52	1.6±0.49	1.8±1.07
13BY-12	2.0±0.89	1.7±0.82	2.1±0.83
13BY-17	1.3±0.52	1.8±0.75	2.0±1.13
13BY (親株)	1.7±0.52	1.8±0.75	1.7±0.68

5点法により8人のパネリストが行った官能評価の平均値±標準偏差を示す。

好でかつ尿素が不検出であった13BY-5株を選抜した。

### 3-3.パイロットスケールの仕込試験

1500g規模の清酒小仕込試験において選抜した2株 (12BY-16および13BY-5) を使用し100kg規模の仕込試験を行った。もろみの一般成分の経時変化を図2および3に示す。もろみ初期における日本酒度の減少とアルコールおよび酸度の増加が両選抜株で親株と比べて若干小さい傾向が認められた。その他の部分については、もろみにおける一般成分の変化に選抜株と親株の間に大きな差はなかった。もろみ日数は12BY-16株で29日、13BY-5株で33日と親株 (12BYで31日、13BYで34日) と比べて1日ないし2日短くなった。製成酒の成分分析結果を表5および6に、官能試験の結果を表7に示す。一般成分、ブドウ糖および香氣成分は両選抜株ともに親株とほぼ同等の値を示した。選抜株において親株と比べて粕歩合が高く、アルコール取得量が低くなったが、大きな差

ではなかった。これについては両選抜株の発酵が順調に進んだためこのような結果となったと考えられる。尿素については12BY-16株で0.5 mg/Lで親株 (5.8 mg/L) の1/10以下に、一方、13BY-5株で0.5 mg/Lで親株 (10.8 mg/L) の1/20以下に低減することが可能であった。官能評価の結果は香り、味、総合評価のすべてにおいて、両選抜株とそれぞれの親株の間に有意な差が認められなかった。

以上の結果から、広島吟醸酵母由来の両選抜株 (12BY-16および13BY-5) は、尿素的生産量は抑制しながら、親株と同等の品質を有する清酒の醸造を可能とする。すなわちこの酵母を使用することで、醸造工程を変えることなく、カルバミン酸エチルの生成を抑制可能であることが示唆された。今回育種した選抜株は尿素低生産性ではあるが、非生産性ではない。しかし広島吟醸酵母の用途は、主に吟醸酒の醸造に限定されており、通常の清酒と比べて、発酵温度が低いいため尿素的生産量は低

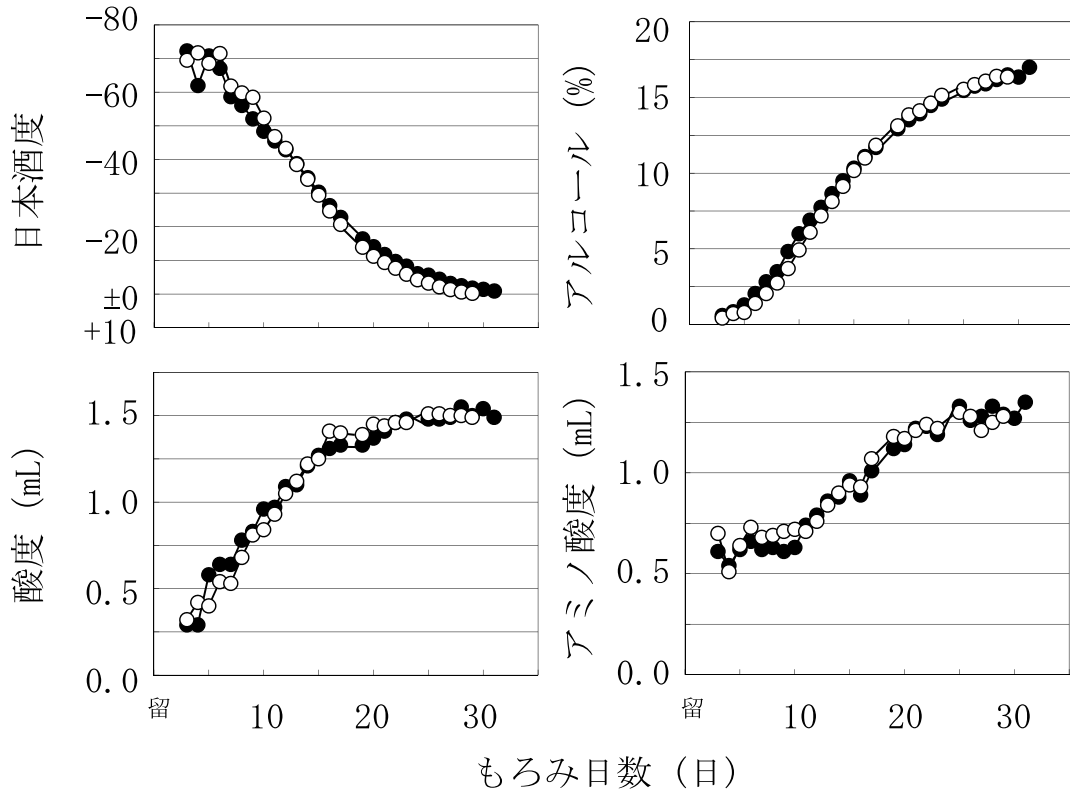


図2 パイロットスケールの仕込試験におけるもろみの一般成分の変化 (12BY)  
○, 12BY-16株; ●, 12BY (親株)

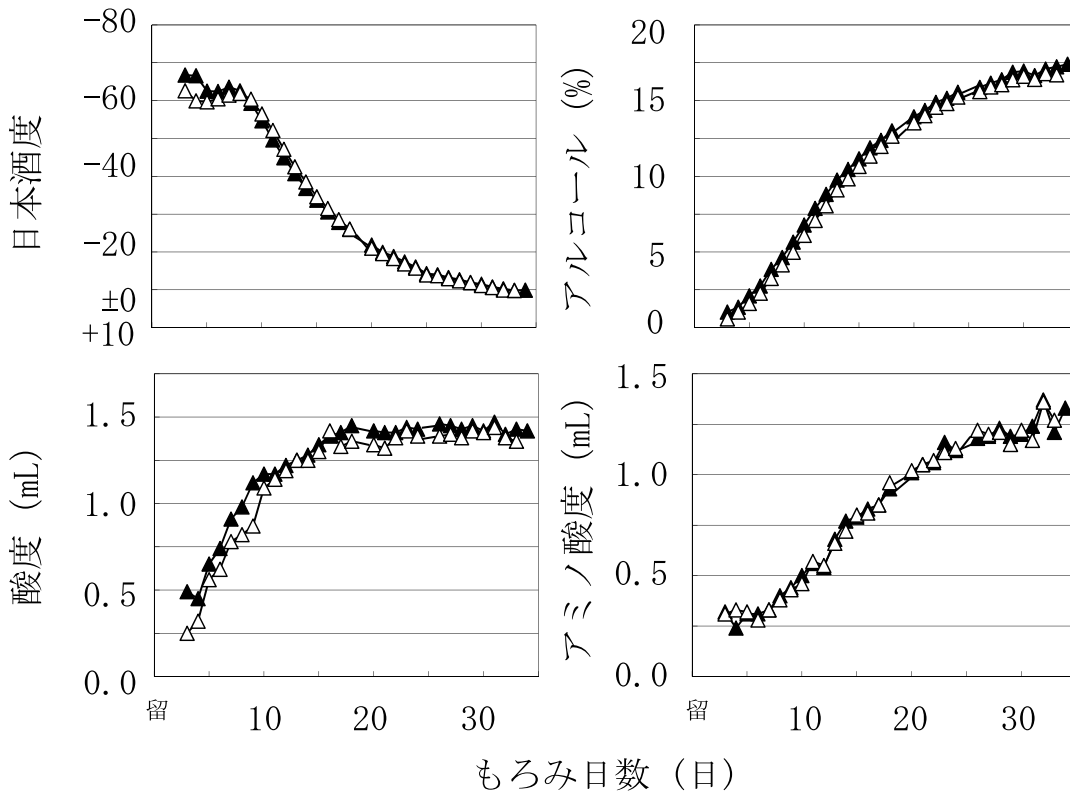


図3 パイロットスケールの仕込試験におけるもろみの一般成分の変化 (13BY)  
△, 13BY-5株; ▲, 13BY (親株)

表5 パイロットスケール仕込試験製成酒の一般成分および歩合

	12BY-16	12BY (親株)	13BY-5	13BY (親株)
日本酒度	+7.5	+7.1	+6.0	+5.8
アルコール (%)	18.0	18.2	18.0	18.2
酸度 (mL)	1.45	1.52	1.32	1.34
アミノ酸度 (mL)	1.12	1.06	1.12	1.12
粕歩合 (%)	61.2	59.2	46.3	43.2
アルコール収得量 (L/t)	252.2	259.1	292.5	301.5

表6 パイロットスケール仕込試験製成酒の尿素,ブドウ糖および香気成分

	12BY-16	12BY (親株)	13BY-5	13BY (親株)
尿素 (mg/L)	0.5	5.8	0.5	10.8
ブドウ糖 (%)	1.34	1.35	1.29	1.21
酢酸エチル (mg/L)	36.9	31.2	21.0	21.6
イソブチルアルコール (mg/L)	34.8	35.7	32.3	36.5
酢酸イソアミル (mg/L)	1.98	1.71	1.43	1.58
イソアミルアルコール (mg/L)	112.0	108.3	107.2	124.6
カプロン酸エチル (mg/L)	4.94	5.23	11.55	12.03
カプリル酸エチル (mg/L)	0.90	0.88	1.46	1.38
カプリン酸エチル (mg/L)	0.14	0.14	0.27	0.24

表7 パイロットスケール仕込試験製成酒の官能評価結果

	12BY-16	12BY (親株)	13BY-5	13BY (親株)
香り	2.2±0.80	1.8±0.69	1.5±0.78	1.9±0.86
味	2.3±0.95	2.2±0.73	2.4±0.65	2.0±0.82
総合評価	2.4±0.87	2.2±0.69	1.9±0.86	2.2±0.90

5点法で13人のパネリストが行った官能評価の平均値±標準偏差を示す。香り, 味, 総合評価のすべてにおいて, 選抜株と親株の間に官能評価値の有意差は認められなかった ( $p < 0.05$ )。

く、<sup>6)</sup> また、カルバミン酸エチルの生成に影響を与えるアルコール濃度や貯蔵温度が低く、かつ貯蔵期間は短い<sup>4)</sup>。したがって、両選抜酵母は清酒醸造現場で十分利用することが可能と考えられる。

### 3-4.まとめ

広島吟醸酵母12BYおよび13BYの変異処理によりCAO培地に生育可能となった株から尿素低生産性株の選抜育種を行った。アルコール脱水麹添加培地による発酵試験、2段階の清酒小仕込試験およびパイロットスケールの仕込試験により、12BY-16株および13BY-5株の2株を選抜した。パイロットスケールの仕込試験の結果は、両選抜株ともに親株と比べて発酵力、製成酒の各種成分に大きな差が認められず、官能的にも親株と同等であり、しかも尿素生産性は親株の1/10以下に低減していた。以上の結果から、両選抜育種株（12BY-16株および13BY-5株）を用いることで、尿素量を低減しながら、親株と同等の品質を有する吟醸酒を醸造することが可能である。すなわち、カルバミン酸エチルの生成抑制が可能であることを示唆する。

### 参考文献

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所「国際化学物質安全性カードー日本語版ー」, <http://www.nihs.go.jp/ICSC/icssj-c/icss0314c.html> (2009) .
- 2) Y. Hasegawa, Y. Nakamura, Y. Tonogai, S. Terasawa, Y. Ito, and M. Uchiyama, *J. Food Prot.* **53**, p1058 (1990) .
- 3) 原昌道, 吉沢淑, 中村欽一, 醸協, 第83巻, p57 (1988) .
- 4) 吉沢淑, 高橋康次郎, 醸協, 第83巻, p69 (1988) .
- 5) 吉沢淑, 高橋康次郎, 醸協, 第83巻, p142 (1988) .
- 6) 吉沢淑, 高橋康次郎, 佐藤和夫, 醸協, 第83巻, p136 (1988) .
- 7) 原昌道, 飯村穰, 五味勝也, 吉沢淑, 中村欽一, 醸協, 第83巻, p351 (1988) .
- 8) 北本勝ひこ, 醸協, 第88巻, p106 (1993) .
- 9) 福田潔, 北本勝ひこ, 五味勝也, 熊谷知栄子, 醸協, 第88巻, p633 (1993) .
- 10) 小田佳緒子, 北本勝ひこ, 醸協, 第86巻, p99

(1991) .

- 11) E. Ichikawa, N. Hosokawa, Y. Hata, Y. Abe, K. Suginami, and S. Imayasu, *Agric. Biol. Chem.* **55**, p2153 (1991) .
- 12) 大土井律之, 松本英之, 藤井一嘉, 谷本昌太, 末成和夫, 広島県立食品工業技術センター研究報告, 第23巻, p15 (2004) .
- 13) 谷本昌太, 松本英之, 藤井一嘉, 大土井律之, 山根雄一, 若林三郎, 醸協, 第104巻, p312 (2009) .
- 14) 齊藤久一, 渡邊誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 中田健美, 岩野君夫, 石川雄章, 醸協, 第87巻, p915 (1992) .
- 15) 国税庁「国税庁所定分析法」, <http://www.nta.go.jp/shiraberu/zeiho-kaishaku/tsutatsu/kobetsu/sonota/070622/pdf/03.pdf> (2007) .