

尿素低生産性および酢酸イソアミル高生産清酒酵母の開発

小田木 美保* 飛田 啓輔* 武田 文宣*

1. はじめに

近年、和食のユネスコ無形文化遺産登録の影響により、海外における日本酒の認知度が急激に高まり、日本酒の海外進出は年々増加している。茨城県内においても、過半数の酒造メーカーが日本酒の海外輸出を行っており、年々その割合が増加している。

しかしながら、海外では日本酒に含まれるカルバミン酸エチルの含有量に規制を設けている国が存在する。カルバミン酸エチルとは、清酒中のアミノ酸代謝により生成する尿素がエタノールと縮合することで生成される物質であり、国際がん研究機関 (IARC) により「ヒトに対する発がん性が恐らくある」とされるグループ 2A に属している。現在、カナダやチェコといった一部の国において規制値を設けており、この動きが今後世界に拡大することが想定される。

2. 目的

本研究では、清酒中のカルバミン酸エチル含有量を低減させる目的で、その前駆物質である尿素的の生成量の低い茨城県独自の清酒酵母の育種を行った。親株として、県内外で広く使われている明利小川酵母を使用した。また、親株と比較して、清酒の吟醸香の一つである酢酸イソアミルを多く産生することを、選抜の指標とした。

清酒中における尿素は、酵母がアミノ酸の一種であるアルギニンをアルギナーゼにより分解することで生産される。従って、アルギナーゼを持たないアルギナーゼ欠損株が尿素低生産性株である。アルギナーゼ欠損株は、アルギニンの構造類似体であるカナバニンを含んだ CAO 培地で生育可能であることが報告されている¹⁾。本報告では、CAO 培地を用いて育種したアルギナーゼ欠損株より選抜した株に対し、小仕込み試験を行った結果について報告する。

3. 研究方法

3.1 供試酵母および培地

固形タイプの泡なし明利小川酵母は、明利酒類株式会社から購入した。明利小川酵母の再分離は、麴エキスを寒天培地 (麴エキス (Brix 2)、2%寒天) を用いた。アルギナーゼ欠損株の取得は、CAO 培地、Arg 培地、Orn 培地を用いた。各選抜培地の組成は表 1 に示す。発酵試験は、麴エキス培地 (Be 5) を用いた。

3.2 アルギナーゼ欠損株の取得

アルギナーゼ欠損株の取得は、北本らの方法に準拠した¹⁾。すなわち、麴エキスを寒天培地にて再分離した明利小川酵母の単一コロニーを、適当な酵母密度になるよう滅菌水で希釈した。得られた酵母希釈液を CAO 培地に塗布し、30℃で 3~4 週間培養した。その後、生育してきたコロニーを釣菌し、再度 CAO 培地にて培養

し、生育が良好とみられる単一コロニーを選抜した。その後、Arg 培地と Orn 培地に滅菌した爪楊枝でスポットして、30℃で 72 時間培養し、Arg 培地では生育できず、Orn 培地で生育できる株を候補として選抜した。選抜した酵母は、麴エキス 10 mL を分注した試験管に一白金耳接種し、15℃にて 14 日間静置培養した。発酵終了後、遠心分離して回収した上清の香気成分分析を行い、親株よりも酢酸イソアミルの産生量の多い株を選抜株とした。香気成分分析は、ヘッドスペース法によるガスクロマトグラフィー分析により行った。

表 1 選抜培地 1 L 当たりの組成

	CAO 培地	Arg 培地	Orn 培地
イーストニトロジェンベース (窒素源を含まない) (g)	1.7	1.7	1.7
カナバニン (mg)	10	0	0
アルギニン (mg)	174	870	0
オルニチン塩酸塩 (mg)	840	0	840
グルコース (g)	20	20	20
寒天 (g)	20	20	20

3.3 小仕込み試験

小仕込み試験は、総米 128 g スケールで行った。まず、麴エキス 10 mL を分注した試験管に酵母を一白金耳摂取し、30℃にて 24 時間静置培養したものを酵母培養液とした。乾燥 α 化米 128 g、乾燥麴 105 g、精製水 275 mL、乳酸 125 μL を 500 mL 容量ポリプロピレン製容器内で混合した後、酵母培養液 5 mL を添加し、12℃にて 5 日間維持した後、11.5℃一定で仕込んだ。全てのもろみの重量が 45 g 以上減少した時点で発酵を終了し、遠心分離により上槽した。重量減少率は、仕込み直後の重量と発酵終了後の重量により算出した。

3.4 製成酒の成分分析

製成酒の一般成分 (日本酒度、アルコール度数、酸度およびアミノ酸度) は、国税庁所定分析法に従って分析した²⁾。香気成分分析は、既述の方法に従った。尿素的の定量分析は、F-Kit 尿素 / アンモニア (Roche/R-Biopharm 製) を用いた酵素法により測定した。

3.5 官能評価

官能評価パネルは、清酒の官能評価について十分訓練された当センターの職員 3 名とした。評価方法は、プロファイル用語 (カブロン酸エチル、酢酸イソアミル、高級アルコール、香り全体のバランス) を指定した上で、各指標に対し親株の強度を 3 と設定した際の 5 段階による相対評価とした。結果は一元配置分散分析 (Dunnett の片側検定) を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

*フード・ケミカルグループ

表2 成分分析結果 (N.D.は検出限界3 ppm以下を示す)

酵母名	重量減少率 (%)	日本酒度	アルコール (%)	酸度	アミノ酸度	酢酸エチル (ppm)	酢酸イソアミル (ppm)	イソアミルアルコール (ppm)	カプロン酸エチル (ppm)	尿素 (ppm)
対照 (親株)	10.1%	14.5	17.3	1.9	1.5	98.3	6.9	204.1	2.4	18.2
No.1	9.8%	7.2	16.5	2.7	1.8	91.1	14.0	194.9	1.8	N.D.
No.2	10.1%	9.1	16.6	2.2	1.9	70.8	7.6	193.4	1.9	N.D.
No.3	9.9%	10.1	16.6	2.3	1.8	115.4	13.9	189.3	1.6	N.D.
No.4	10.2%	11.4	16.7	2.2	1.6	100.3	12.2	190.1	1.7	N.D.
No.5	9.9%	10.6	16.5	2.2	1.9	76.7	8.4	209.0	2.0	N.D.
No.6	10.1%	11.9	16.7	2.2	1.8	72.3	7.6	209.8	2.2	N.D.
No.7	9.9%	7.6	16.4	1.9	1.8	117.3	16.7	187.3	2.2	N.D.
No.8	9.8%	7.6	16.3	2.3	1.9	77.8	8.9	189.6	2.2	N.D.
No.9	9.4%	7.2	15.9	2.4	1.8	90.7	9.1	203.0	2.6	N.D.
No.10	9.9%	11.7	16.5	2.3	1.6	100.5	9.7	208.8	2.1	N.D.
No.11	9.6%	9.5	16.2	2.1	1.9	85.8	10.5	205.3	2.5	N.D.
No.12	10.4%	8.9	16.2	2.2	2.0	92.0	9.8	204.5	2.5	N.D.

4. 研究結果と考察

4.1 アルギナーゼ欠損株の取得

明利小川酵母を親株としてCA0培地を用いたアルギナーゼ欠損株の育種を行った。40枚のプレートから、計2,000株のコロニーが得られた。このうち、比較的大きなコロニー80株を釣菌し、再度CA0培地にて培養後、単一コロニーを選抜し、Arg培地およびOrn培地で生育を確認した。その結果、19株がOrn培地では生育するが、Arg培地では生育できなかったことから、アルギナーゼ欠損株と判定した。これら19株について、香気成分産生能を確認し、親株よりも酢酸イソアミル産生量が高かった12株を選抜株とし、小仕込み試験に使用した。

4.2 小仕込み試験

4.2.1 製成酒の成分分析

小仕込み試験製成酒の重量減少率、一般成分、香気成分および尿素的の定量分析結果を表2に示す。重量減少率と一般成分分析の結果から、No.9を除く計11株ではいずれも対照（親株）との発酵特性に大きな差は認められなかった。香気成分分析の結果、選抜した12株は、対照（親株）に比べて酢酸イソアミルが高い一方で、イソアミルアルコールは同程度またはそれ以下だった。イソアミルアルコールは酢酸イソアミルの前駆体であり、増加するとオフフレーバーの原因となる。つまり、イソアミルアルコールが増加せず、かつ酢酸イソアミルを高産生する株が望ましいことから、今回の選抜株が良好な特性をもつことが示唆される。特に、酢酸イソアミル濃度が9 ppmを超えた7株を良好と判断した。尚、全ての選抜株において尿素的の含量は検出限界以下であった。以上の成分分析結果より、No.1、3、4、7、10、11、12の計7株を良好と判断した。

4.2.2 製成酒の官能評価

選抜株の複合的な香気成分産生力の評価を目的として、官能評価を行い、一元配置分散分析により解析した。対照と比較した際、No.1、3、7、8、9、10の計6株で酢酸イソアミルが優位に高く感じられた。香り全体のバランスについては、No.3、7、9、10の計4株で優位に優れていると感じられた（図1）。なお、図には示していないが、カプロン酸エチルおよび高級アルコールについては、親株といずれの選抜株の間に優位な差は認められなかった。

以上より、No.3、7、9、10の計4株を官能評価結果として良好と判断したが、先の成分分析結果を考慮し、最終的にNo.3、7、10の計3株を優良株と判断した。

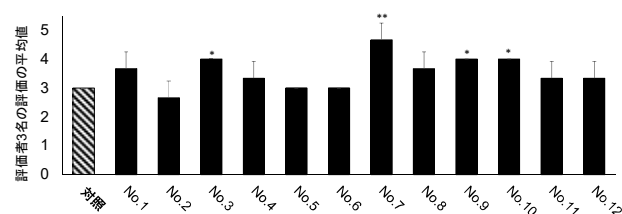


図1 官能評価結果（項目：香り全体のバランス）
横軸は試料名、縦軸は評価者3名の平均値を表す
(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

5. まとめ

県内産の清酒の海外輸出量増加に向け、清酒中のカルバミン酸エチル含有量を低減させる目的で、その前駆物質である尿素的の生成量が低い茨城県独自の清酒酵母の育種を行った。明利小川酵母を親株とし、CA0培地を用いたアルギナーゼ欠損株の育種を行ったところ、計12株の候補株が得られた。次に、小仕込み試験を実施し醸造特性や化学的成分について評価を実施した結果、いずれの株も尿素的の低生産性が確認された。さらに、官能評価による香気成分産生能を評価した結果、No.3、No.7、No.10の計3株が好ましい特性をもつことが示唆された。

6. 今後の課題

最終的に選抜した3株の実用化に向け、仕込み量をスケールアップさせた醸造試験を行う予定である。

7. 参考文献等

- 1) 北本勝ひこ、宮崎佳緒子、山岡洋、五味勝也、熊谷知栄子：日本醸造協会誌、87、598-601（1992）
- 2) 国税庁編：国税庁所定分析法（昭和36年1月11日国税庁訓令第1号、最終改正令2国税庁訓令第9号）