

尿素低生産性酵母開発に資する尿素分析法及び酵母培養条件の検討

製品化・人材育成支援グループ 田中 秀典、清野 珠美、和田 潤

要旨

本研究では、尿素低生産性酵母開発に資する、迅速かつ多検体の分析が可能な尿素分析法の検討と、酵母の尿素生産性を評価可能な培養条件の検討を行った。尿素分析法については市販のQuantiChrom Urea Assay Kitを用いることで精度良く多検体を同時に分析することができ、培養条件については乾燥麹を添加した麹汁培地を用いて14日間培養を行うことで、酵母の尿素生産性を良好に評価できることが分かった。

キーワード：清酒酵母、日本酒、カルバミン酸エチル、尿素、尿素分析、麹汁、乾燥麹

1. 緒言

日本酒の国内出荷量は、昭和48年を境に減少傾向にあるが、輸出量は増加傾向にある。日本酒を含む発酵食品中には、カルバミン酸エチル (EC, Ethyl Carbamate) が存在し¹⁾、現在、カナダやチェコでは日本酒中のEC含有量に対して200 µg/Lという規制値が設けられている。また、アメリカやフランス、ドイツ等では日本酒には規制値を設けていないがワインやスピリッツ、フルーツブランデーに対してEC含有量に規制値が設けられている²⁾。令和4年度に調査された日本酒52点のEC平均値は110 µg/L³⁾と規制値以下であるが、日本酒業界において、国際的に関心が高まっているEC含有量を低減することが課題となっている。

日本酒において、ECは酵母の代謝産物である尿素とエタノールの化学的な反応で生成されるため⁴⁾、EC量を低減させるために(1)尿素低生産性酵母の使用⁵⁾、(2)ウレアーゼ(尿素分解酵素)の使用⁶⁾、(3)低温管理(火入れ後の速やかな冷却、貯蔵・流通時の低温管理)⁷⁾、の3つの方法が実用化されている。しかし、(3)低温管理は運搬や貯蔵・販売時の徹底した温度管理が重要となるため、輸出用の日本酒の対策として不十分である。また、長期間貯蔵する古酒(熟成酒)においても不十分な処理と考えられる⁸⁾。(2)ウレアーゼの使用は尿素を分解するためECは生成されないが、製造工程としてウレアーゼ処理及び澱引き(ウレアーゼの除去)が追加されるため、原材料費や人件費・労力がかさむ。一方、(1)尿素低生産性酵母の使用は製造に用いる酵母をかえるだけで、製造から流通まで他の日本酒と同様に扱うことができる。現在、輸出を想定した日本酒の製造において尿素低生産性酵母の使用は必須の要素になりつつあり、清酒酵母を頒布している日本醸造協会や公設試験研究機関が

尿素低生産性酵母を開発し、実用化している⁹⁻¹¹⁾。

一方、研究所が現在まで行ってきた発酵試験や尿素分析法では、酵母が生成する微量の尿素を正確に定量することができず、酵母の尿素生産性を詳細に評価することができなかった。そこで、本研究では、研究所が開発した京都酵母¹²⁾の尿素低生産性株の開発に資する迅速かつ多検体に対応した尿素的微量分析法と、酵母の尿素生産性を評価できる培養条件を検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 尿素的定量分析

2.1.1 使用分析キット及びその定量分析法

表1に示すとおり測定原理など特徴の異なる市販の尿素濃度分析キットを6種類購入し、分析に使用した。

尿素濃度は、キットの使用方法に従い、各キットに付属の標準溶液を用いた検量線から算出した。ただし、キットA、Bについては、96穴マイクロプレート上で反応を行えるように容量を調整して用いた。

2.1.2 尿素標準試料の調製

尿素溶液は尿素を蒸留水に溶解させて300 mg/L溶液を調製し、4℃で保存した。使用時に蒸留水及びエタノール溶液を用いて希釈し、エタノール濃度15%の尿素標準試料(0、15、30、50 mg/L)を調製して分析に供した。また、300 mg/L尿素溶液を後述するYPD培地及び日本酒に10分の1量添加し、尿素添加試料を調製して分析に供した。

2.2 酵母間の尿素生産性を評価する培養方法

2.2.1 使用菌株

きょうかい酵母901号(K901)及び尿素低生産性であるきょうかい酵母KArg901号(KArg901)を用いた。

表1 検討した市販の尿素キットと特徴

	測定法	測定対象	測定波長 (nm)	その他
キットA	酵素法 + 比色法	NADH (*)	340	サンプル含有のアンモニア量を差し引いて尿素濃度を算出
キットB	酵素法 + 比色法	NADH (*)	340	サンプル含有のアンモニア量も加算された尿素濃度を算出
キットC	酵素法 + 比色法	NADH (*)	340	サンプル含有アンモニアを除去後にウレアーゼ処理を行い算出
キットD QuantiChrom Urea Assay Kit (BioAssay Systems)	比色法	尿素と色原体の 着色複合体	430	アンモニアや25%以下のエタノールは影響なし
キットE	酵素法 + 比色法	色原体 (**)	557	
キットF	比色法	(記載なし)	450	81.9 nM - 81.9 mM のアンモニアは影響なし

*: ウレアーゼにより尿素から生じたアンモニアをグルタミン酸に変換する際に消費

** : ウレアーゼにより尿素がアンモニアへと分解される際のpH変化で発色

2.2.2 培養方法

酵母の培養には、YPD培地（酵母エキス1%、ポリペプトン2%、グルコース2%）、YPD5培地（酵母エキス1%、ポリペプトン2%、グルコース5%）、麴汁培地（ α 化米及び乾燥麴を55℃で一晩糖化した上清を希釈してボーム5に調製）、乾燥麴添加麴汁培地（重量比で乾燥麴：麴汁培地 = 4：11になるように混合）を用いた。培養は、15℃で7日間又は14日間静置培養し、重量変化を炭酸ガス減少量として記録した。また、酵母未植菌の培地も同様に操作し、ブランク試料とした。培養終了後、培養液を遠心分離（8000 x g, 4℃, 10 min）して得られた上清液を尿素の分析に供した。

3. 結果と考察

3.1 尿素の定量分析方法の検討

エタノールを含有するサンプルに対する表1に示すキットの定量精度を確認するために、2.1.2の方法で作成した尿素標準試料を分析に供し、尿素濃度を算出した。なお、マイクロチューブや試験管、分光光度計を用いた測定を推奨しているキットであっても、大量の尿素低生産候補株サンプルからスクリーニングを行うことを想定して、96穴マイクロプレート上で反応を行い、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。その結果、キットD (QuantiChrom Urea Assay Kit) 及びキットFにおいて、15%エタノールを含有する既知濃度の尿素標準試料を精度良く測定できた。

次に、この2つのキットD及びFについて、検量線の直線性をより詳しく確認した（図1）。0、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50 mg/Lの尿素濃度において検量線を作成したところ、キットDの決定係数（ R^2 値）は0.9998で、キットFは0.9727であった（0-12.5 mg/Lの濃度範囲では0.9992）。複数回分析を行ったところ、キットFは分析毎に高濃度範囲における検量線の直線性にバラつきが見られた。そのため、本研究では検量線の直線性や定量分析の操作性を考慮し、キットDを用いて、尿素濃度を分析した。

2.1.2に示す尿素添加試料の尿素濃度を測定したところ、YPD培地及び日本酒サンプルのどちらにおいても、添加前の試料と比較して、理論値に近い30 mg/L程度の尿素濃度の増加を確認できた。様々な成分を含有している試料においても、キットDを用いることで、共存物質の影響を受けずに精度良く尿素の定量分析が可能であることが分かった。

3.2 尿素生産性を評価可能な培養条件の検討

清酒酵母の醸造特性を把握するためには、米と麴を用いた小仕込み試験を行う必要があるが、一段仕込みであったとしても操作が煩雑になることや、一度に数株しか試験できないといったデメリットがある。酵母の選抜操作の簡便性及び再現性を向上させるため、本研究では液体培地を用いた培養条件を検討した。条件検討のために清酒酵母K901及びKArg901を用いた。YPD培地、

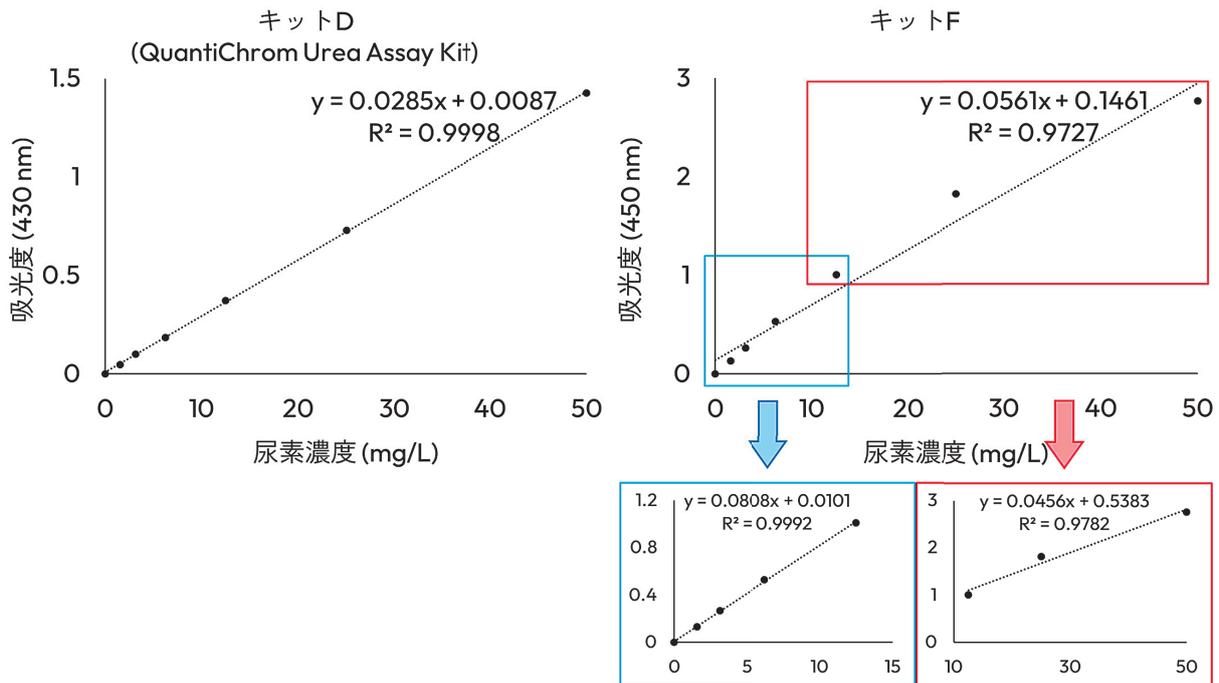


図1 尿素濃度0-50 mg/Lにおける検量線の直線性
左：キットD (QuantiChrom Urea Assay Kit) 右：キットF

YPD5培地、麴汁培地の3種を用いて1週間、15℃で培養した結果、K901とKArg901間で炭酸ガス減少量に大きな差が見られず、尿素的生産能にも差が見られなかった(図2左)。

次に、斎藤らのアルコール脱水麴を用いた培養方法¹³⁾を一部改変し、麴汁培地及び乾燥麴添加麴汁培地を用いて2週間、15℃で培養を行った(図2右)。麴汁培地での培養においては1週間培養と同様に尿素濃度に明瞭な差は見られなかったが、乾燥麴添加麴汁培地におけるK901培養液では顕著に高い尿素濃度が確認され、KArg901培養液ではブランク試料と同程度の尿素濃度となり明確な増減は見られなかった。酵母はアミノ酸の一種であるアルギニン代謝の際に尿素を生産するため、K901は乾燥麴から供給される大量のアミノ酸を資化する中でアルギニンも代謝したために多量の尿素が生産されたと考えられた。一方、KArg901はアルギナーゼ(アルギニン分解酵素)遺伝子を欠損しており、アルギニンを分解できないために尿素低生産性という特性を有している。乾燥麴から大量のアミノ酸が供給されていたが、アルギニンを分解できないため尿素は生産されず、しかしその他の豊富な栄養源を資化することでKArg901はK901と同等の炭酸ガス減少量に対応する発酵を行ったと考えられた。

尿素低生産性酵母はアルギニンの構造類似体であるカナバニンを用いた育種により変異処理を行わずに選抜可能であるが¹⁴⁾、得られる尿素低生産候補株の中には、KArg901のようにアルギナーゼ遺伝子を欠損している菌株以外に、菌体外からのアルギニン取り込み能が低下している菌株も存在する¹⁵⁾。清酒酵母のアミノ酸取り込み量・資化量は培養条件の影響を大きく受けることから¹⁶⁾、EC濃度の低い日本酒製造のためにはアルギナーゼ遺伝子欠損株を取得することが望ましい。そのため、尿素低生産候補株からアルギナーゼ遺伝子欠損株を選抜するためにはアルギナーゼ活性を測定するステップが必要であると考えられるが、乾燥麴添加麴汁培地を用いて14日間培養を行うことで、炭酸ガス減少量に差を生じさせることなく、尿素的生産量に明確な差を生じさせることができたため、スクリーニングの1つのステップとして酵母の尿素的生産能を良好に評価できる培養条件であることが分かった。

4. 結言

尿素低生産性酵母を使用することで、EC濃度の低い日本酒製造に寄与することができる。そこで、本研究では、酵母の尿素的生産能を評価するための尿素的分析法と培養条件を検討した結果、QuantiChrom Urea Assay

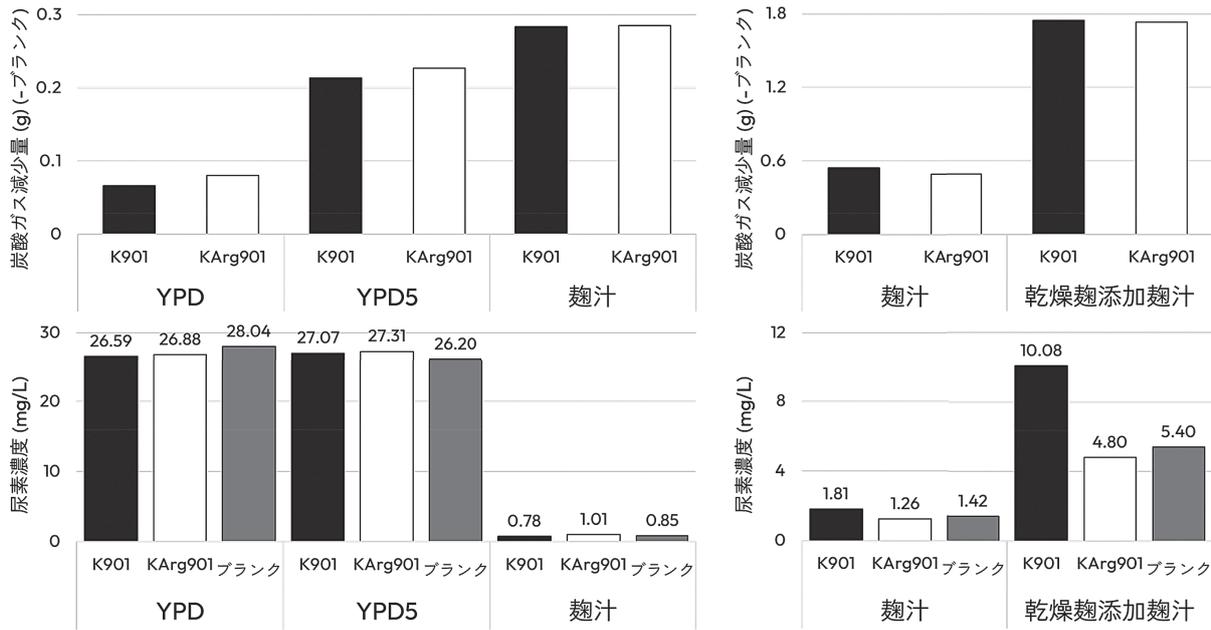


図2 各種培地におけるK901及びKArg901培養液の炭酸ガス減少量と尿素濃度
左：培養7日間 右：培養14日間

Kitによる定量方法及び乾燥麴添加麴汁培地を用いた培養条件では、多数の試料を簡便にそして一斉に評価可能であることがわかった。また、尿素の生産能だけでなく、有機酸や香気成分等の生産能も比較できる培養条件であるため、選抜の初期段階で目的の酵母株が存在するかを判断可能であり、非常に効率的に選抜が行える条件となっている。

京都酵母は多数の酒造会社によって使用されているため、輸出用の日本酒を製造するにあたって京都酵母の尿素低生産性株を使用する場合、従来株と異なる特徴を有していると、商品設計や製造の際に余計な負担を強いてしまう。そのため、尿素生産性のみ低減しており、その他の特徴は変化していない酵母株を選抜・開発することで、京都酵母を使用してきたこれまでの製造経験を活かした日本酒製造を行うことが可能となる。

今後、北本らの方法¹⁴⁾により望んでいない箇所に変異が入るリスクを抑えた育種を行い、本研究で検討した方法により現在の京都酵母の特徴そのままに尿素生産性が低い酵母株を選抜することで、輸出用日本酒の製造過程の省力化を図ることができ、輸出量や利益の増加については京都の酒造業界の活性化に寄与することが期待される。

参考文献

- 1) Y. Hasegawa *et al.*: J. Food Prot., 53, 1058 (1990).
- 2) J. Alexander *et al.*: EFSA J., 551, 1 (2007).
- 3) 国税庁: 全国市販酒類調査結果 令和4年度調査分 (2024).
- 4) 原昌道 他: 日本醸造協会誌, 83, p. 57 (1988).
- 5) K. Kitamoto *et al.*: Appl. Environ. Microbiol., 57, 301 (1991).
- 6) 吉沢淑, 高橋康次郎: 日本醸造協会誌, 83, p. 142 (1988).
- 7) 吉沢淑, 高橋康次郎: 日本醸造協会誌, 83, p. 69 (1988).
- 8) ボルジギン ソリナ 他: 酒類総合研究所報告, 195, p. 45 (2024).
- 9) 蓮田寛和: 日本醸造協会誌, 109, p. 576 (2014).
- 10) 三井俊 他: 日本醸造協会誌, 116, p. 703 (2021).
- 11) 渡部貴志 他: 令和5年度群馬県立産業技術センター研究報告, p. 47 (2023).
- 12) 廣岡青央, 清野珠美: 化学と生物, 59, p. 354 (2021).
- 13) 斎藤久一 他: 日本醸造協会誌, 87, p. 915 (1992).
- 14) 北本勝ひこ 他: 日本醸造協会誌, 87, p. 598 (1992).
- 15) 小澤敦揮 他: 三重県工業研究所研究報告, 46, p. 41 (2022).
- 16) 岩野君夫 他: 日本醸造協会誌, 99, p. 801 (2004).