

# 京都酵母の尿素低生産株の取得 (第1報)

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、研究所が開発した「京都酵母」の尿素低生産株の取得を試みた。CAO 培地や乾燥麹添加麹汁培地を用いた培養試験、乾燥麹及び $\alpha$ 化米を用いた小仕込み試験により、親株と比較して尿素生産性のみ低下し、その他の特性は変化していない尿素低生産候補株2株を「京の恋」から取得・選抜することができた。また、この2株のアルギナーゼ活性を測定したところ、親株と比較して大きく低下しており、アルギナーゼ欠損株であることが示唆された。

キーワード：京都酵母、清酒酵母、尿素低生産、尿素、日本酒、醸造

## 1. 緒言

研究所が開発・分譲してきた「京都酵母」<sup>1)</sup>は、京都域内の多数の酒造会社によって個性豊かな日本酒の製造に用いられている。日本酒の海外輸出は拡大傾向にあり、カルバミン酸エチルの含有量に規制値を設けている国に輸出する際には、カルバミン酸エチル量の低減対策を施す必要がある。カルバミン酸エチルの大部分は酵母がアルギニンをオルニチンに代謝する際に生じる尿素とアルコール発酵により生じるエタノールの化学的な反応で生成されるため<sup>2)</sup>、アルギナーゼ（アルギニン分解酵素）を欠損した尿素低生産酵母を使用した発酵によって尿素生成量を低減させる方法<sup>3)</sup>やウレアーゼ（尿素分解酵素）によって製成酒中の尿素を分解する方法<sup>4)</sup>などが行われている。京都でも日本酒の輸出に取り組まれる一方、京都酵母の尿素生産性は評価できていないため、京都酵母を使用した日本酒では、尿素を分解するウレアーゼ処理及び添加したウレアーゼを除去する必要がある。そこで、製造工程の省力化を図りながらも従来製造してきた酒質の日本酒を製造できるように、京都酵母それぞれの香味特性は変化せず尿素生産性のみ低下している尿素低生産株を取得するために、前報<sup>5)</sup>で検討した尿素分析法及び酵母培養条件により尿素生産性を評価しながら尿素低生産候補株を選抜したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 使用菌株

京都酵母5株（京の琴、京の華、京の咲、京の珀、京の恋）を用いた。また、対照として、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。

### 2.2 尿素低生産候補株の取得

#### 2.2.1 CAO 培地を用いた培養試験

渡部らの方法<sup>6)</sup>を参考にして、京都酵母5株からカナバニン耐性株を取得した。具体的には、YPD 液体培地（酵母エキス1%、ポリペプトン2%、グルコース2%）で30℃、3日間の静置培養を行った酵母培養液を集菌し、続いて滅菌蒸留水で2回洗浄した後、CAO 培地（Yeast Nitrogen Base without Amino Acids and Ammonium Sulfate 0.17%、カナバニン 10 ppm、アルギニン塩酸塩 1 mM、オルニチン塩酸塩 5 mM、グルコース 2%、寒天 2%）に100  $\mu$ L ずつ塗布し、30℃で培養を行った。

#### 2.2.2 Arg 培地及び Orn 培地を用いた培養試験

北本らの方法<sup>7)</sup>に従って、アルギナーゼ欠損候補株を取得した。具体的には、カナバニン耐性株を、Arg 培地（Yeast Nitrogen Base without Amino Acids and Ammonium Sulfate 0.17%、アルギニン塩酸塩 5 mM、グルコース 2%、寒天 2%）、Orn 培地（Yeast Nitrogen Base without Amino Acids and Ammonium Sulfate 0.17%、オルニチン塩酸塩 5 mM、グルコース 2%、寒天 2%）、及びYPD 寒天培地（寒天 2%）にそれぞれ植菌し、30℃で3日間培養を行った。

#### 2.2.3 乾燥麹添加麹汁培地を用いた培養試験

前報<sup>5)</sup>を改良して、尿素低生産候補株を選抜した。具体的には、麹汁培地（ボーメ5）で30℃、3日間の静置培養を行った酵母培養液300  $\mu$ Lを、50 mL 三角フラスコ中の乾燥麹添加麹汁培地（乾燥麹8g、麹汁培地22 mL）に植菌し、15℃で14日間静置培養を行った。培養

終了後、培養液を遠心分離（6,000 x g、4℃、10 min）して得られた上清液を後述の成分分析に供した。

#### 2.2.4 乾燥麹及びα化米を用いた小スケール一段仕込みによる培養試験

既報<sup>8)</sup>に従って、一段仕込みを行った。具体的には、麹汁培地で30℃、3日間の静置培養を行った酵母培養液40 mLを集菌、洗浄した後、300 mL トールビーカー中で総米100 g（乾燥麹（精米歩合60%）20 g、α化米（精米歩合60%）80 g）、汲み水160 mL、10% 乳酸0.5 mLと混合し、15℃で14日間発酵させた。発酵終了後、醪を遠心分離（6,000 x g、4℃、20 min）して得られた上清液を後述の成分分析に供した。

#### 2.3 培養液及び製成酒の成分分析

尿素<sup>5)</sup>、有機酸<sup>9)</sup>の分析は既報に従って行い、香気成分の分析は国税庁の所定分析法に従って行った。

#### 2.4 アルギナーゼ活性測定

酵母のアルギナーゼ活性測定は、小澤らの方法<sup>10)</sup>を参考にして行った。具体的には、YNB 最小培地（Yeast Nitrogen Base without Amino Acids 0.17%、グルコース 2%）に酵母を1白金耳植菌し、30℃で72時間の前培養を行った後、新しいYNB 最小培地に1% 植菌して、30℃で72時間の本培養を行った。本培養菌体 $2 \times 10^7$  cellsを集菌し、生理食塩水で2回洗浄した後、菌体に50 μL の Y-PER™ Plus Dialyzable Yeast Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) を加え、5分毎にタッピングにより攪拌して20分間保持し、細胞内タンパク質を抽出した。遠心分離（12,000 x g、4℃、5 min）により回収した上清液を酵素抽出液とし、QuantiChrom Arginase Assay Kit (BioAssay Systems) を用いて、酵素抽出液のアルギナーゼ活性を測定した。測定値を菌体量で除し、菌体量あたりのアルギナーゼ活性（Unit/10<sup>11</sup> cells）に換算した。

### 3. 実験結果と考察

#### 3.1 京都酵母の尿素低生産候補株の取得・選抜

京都酵母5株及び対照としてK901株、KArg901株をCAO培地に植菌し、3日間培養を行った。その結果、KArg901株のみ生育し、京都酵母5株及びK901株は生育しなかったため、京都酵母5株はアルギナーゼを欠損していない尿素生産株であることが示唆された。そこで、

京都酵母5株の尿素低生産株を取得するために、まずはカナバニン耐性株の取得を試みた。一次選抜としてCAO培地を用いて試験した結果、「京の珀」は1週間程度で多数の大きいコロニーが出現したが、「京の琴」、「京の咲」、「京の恋」は2週間から1ヶ月経過した時点で大きいコロニーが出現し始めた。一方、「京の華」はCAO培地による培養を繰り返しても良好に生育してくるコロニーを得られなかった。これらの1週間から1ヶ月程度で出現したコロニーをカナバニン耐性株として選抜した。

二次選抜としてArg培地とOrn培地を用いて、京の琴、京の咲、京の珀、京の恋のカナバニン耐性株からアルギナーゼ欠損候補株を取得した。Orn培地及びYPD培地で生育でき、Arg培地で生育できなかったものをアルギナーゼ欠損候補株として選抜した結果、カナバニン耐性株から京の琴が5割、京の咲が3割、京の珀が10割、京の恋が約9割の割合で選抜できた。一方、Arg培地でも良好に生育した京の咲のカナバニン耐性株は5割存在し、これらをCAO培地に植継いでも生育したため、カナバニンの取り込み能の低下もしくは細胞外への排出能の向上が起こっていたと考えられた。

次に、三次選抜として乾燥麹添加麹汁培地を用いてアルギナーゼ欠損候補株の培養を行い、尿素低生産候補株を取得した。アルギナーゼ欠損候補株とそれぞれの親株を培養し、親株と比べて尿素濃度のみが低減し、炭酸ガス減少量や有機酸量、香気成分量が同等である菌株を尿素低生産候補株として選抜した結果、京の琴から1株、京の咲から2株、京の珀から4株、京の恋から3株を取得できた（表1）。

続いて、四次選抜として小スケールの一段仕込み試験を行い、親株と比べて尿素濃度のみが低減している菌株を選抜した。尿素低生産候補株10株とそれぞれの親株及び対照としてK901株、KArg901株を小仕込み試験に供した結果、全ての株で尿素濃度は低下していたが、親株と比較して発酵力（炭酸ガス減少量及びアルコール度数）が大きく低下している株や、有機酸生成量及び香気成分生成量が大きく変化している株が大半を占めていた（表2）。一方、京の恋\_1株及び京の恋\_9株は、親株と比較して発酵力や有機酸生成量及び香気成分生成量の変化が小さい株であったため、本2株を選抜した。

#### 3.2 尿素低生産候補株のアルギナーゼ活性の測定

京の恋と選抜した尿素低生産候補株2株及び対照株

表 1. 乾燥麹添加麹汁培地を用いた培養の結果

菌株名	炭酸ガス 減少量 (g) (親株との差)	尿素濃度 (ppm)	有機酸量 (選抜株/親株)		香気成分量 (選抜株/親株)		
			リンゴ酸	コハク酸	リンゴ酸 /コハク酸	酢酸 イソアミル	カプロン酸 エチル
京の琴	0	13.6	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
京の琴_3	-0.141	5.1	1.2	1.1	1.1	1.0	1.0
京の咲	0	14.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
京の咲_14	-0.204	5.5	1.3	1.3	1.0	1.2	1.3
京の咲_16	-0.192	5.1	1.1	1.2	0.99	0.91	1.2
京の珀*	0	15.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
京の珀_27	-0.028	4.5	1.0	0.91	1.1	1.0	0.96
京の珀_33	0.019	4.9	1.1	1.1	0.99	0.83	0.96
京の珀*	0	13.3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
京の珀_72	-0.223	3.5	1.0	1.0	0.98	1.0	0.96
京の珀_74	-0.351	3.4	1.0	1.1	0.98	0.94	1.0
京の恋	0	13.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
京の恋_1	-0.308	5.1	1.0	1.1	0.89	1.2	1.1
京の恋_9	-0.201	5.3	1.0	1.1	0.89	0.92	1.1
京の恋_35	-0.266	5.2	1.2	1.2	1.0	0.91	1.1

\*: 京の珀のみ培養試験を2回に分けて実施したため、親株の測定結果が2つ存在する。

表 2. 乾燥麹及び $\alpha$ 化米を用いた小仕込み試験の結果

菌株名	炭酸ガス 減少量 (g)	アルコール 度数 (%)	尿素濃度 (ppm)	有機酸濃度 (ppm)			香気成分濃度 (ppm)		
				リンゴ酸	ピルビン酸	コハク酸	リンゴ酸 /コハク酸	酢酸 イソアミル	カプロン酸 エチル
K901	31.3	17.3	9.3	264.0	6.5	729.6	0.36	3.7	1.0
KArg901	29.2	16.2	2.4	212.6	8.7	870.5	0.24	4.2	1.0
京の琴	30.9	16.0	7.9	156.0	7.1	834.4	0.19	3.3	2.0
京の琴_3	25.6	14.4	1.9	246.8	50.5	662.8	0.37	7.3	1.9
京の咲	31.7	17.5	14.3	335.1	10.2	625.6	0.54	6.1	0.9
京の咲_14	26.7	14.9	1.9	351.9	16.2	777.5	0.45	4.9	0.9
京の咲_16	29.9	16.4	3.5	359.7	11.4	766.9	0.47	7.5	1.0
京の珀	28.7	16.1	4.8	184.4	8.9	705.8	0.26	3.7	0.9
京の珀_27	26.7	14.6	1.2	134.4	22.4	588.7	0.23	2.5	1.0
京の珀_33	23.8	12.9	2.0	130.7	7.8	705.5	0.19	3.8	0.8
京の珀_72	25.9	14.2	1.9	125.8	10.9	595.7	0.21	2.3	0.9
京の珀_74	24.1	13.1	2.8	137.4	11.0	553.8	0.25	2.5	0.8
京の恋	29.0	16.4	9.1	192.8	8.2	694.6	0.28	5.9	1.9
京の恋_1	27.2	15.3	1.6	216.0	13.1	685.9	0.31	5.9	1.8
京の恋_9	28.9	15.4	1.7	238.6	18.1	669.5	0.36	6.6	1.9
京の恋_35	25.7	14.2	1.4	203.3	9.7	782.3	0.26	5.2	1.6

炭酸ガス減少量、アルコール度数は、親株と比較して、K901とKArg901間の差 (2.1 g、1.1%) よりも顕著に変化しているものを、有機酸濃度、香気成分濃度は、親株と比較して変化量が1割よりも顕著に変化しているものを塗りつぶした。

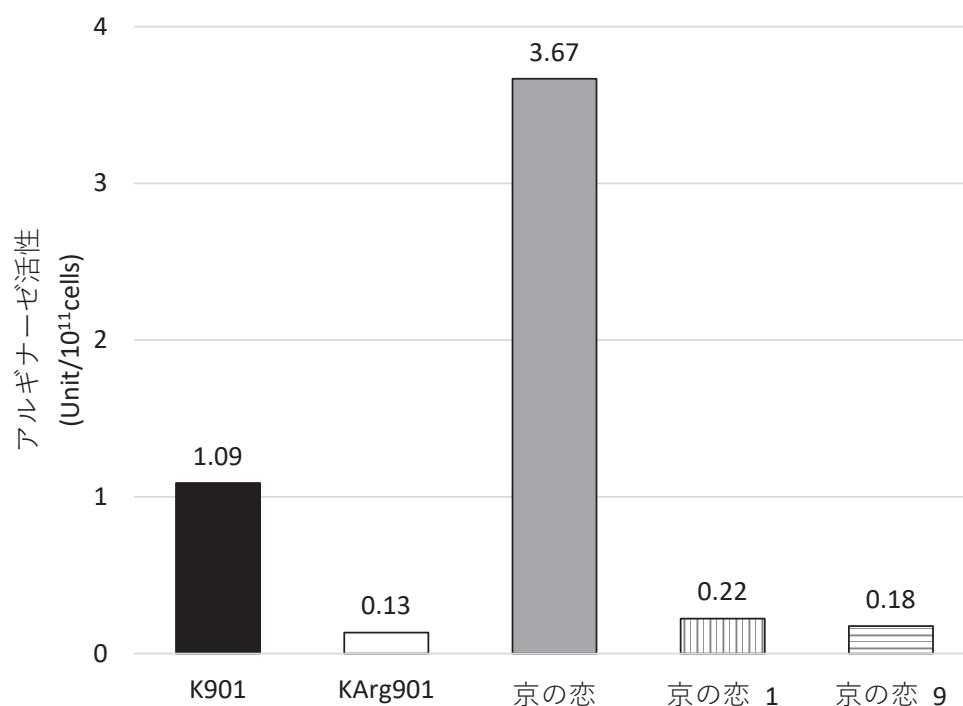


図 1. 各菌株のアルギナーゼ活性

(K901 株、KArg901 株) のアルギナーゼ活性を測定した結果、京の恋\_1 株及び京の恋\_9 株は親株と比較してアルギナーゼ活性が大きく低下し、また KArg901 株と同等の値まで低下していることがわかった (図 1)。アルギナーゼ活性が低下していたことから、候補株 2 株の尿素低生産性は、酵母の培養条件の影響を受けて変動するアルギニン取り込み能の低下に起因するものではなく、アルギナーゼ遺伝子の欠損に起因する恒常的なものであると示唆された。

#### 4. 結論

京都酵母を用いて製造された日本酒のカルバミン酸エチル量低減を目指し、本研究では京都酵母の尿素低生産株 (アルギナーゼ欠損株) の取得を試みた。今回は、尿素生産性のみ低下し、その他の特性は変化していない酵母株を選抜したところ、京の琴、京の咲、京の珀では小仕込み試験において発酵力や有機酸生成量及び香气成分生成量の変化が比較的大きい傾向であったが、京の恋においては親株の特性を維持しつつ尿素低生産性を示す有望な候補株を取得することができた。今後、スケールを大きくした小仕込み試験を行い、親株の特性を有する京の恋\_1 株及び京の恋\_9 株の性質を詳細に調べ、実用化を目指していく。

#### 参考文献

- 1) 廣岡青央, 清野珠美: 化学と生物, **59**, p. 354 (2021).
- 2) 原昌道 他: 日本醸造協会誌, **83**, p. 57 (1988).
- 3) K. Kitamoto *et al.*: Appl. Environ. Microbiol., **57**, 301 (1991).
- 4) 吉沢淑, 高橋康次郎: 日本醸造協会誌, **83**, p. 142 (1988).
- 5) 田中秀典 他: 京都市産業技術研究所研究報告, **14**, p. 33 (2024).
- 6) 渡部貴志 他: 平成 28 年度群馬県立産業技術センター研究報告, p.11 (2016).
- 7) 北本勝ひこ 他: 日本醸造協会誌, **87**, p. 598 (1992).
- 8) 廣岡青央, 清野珠美: 京都市産業技術研究所研究報告, **8**, p. 86 (2018).
- 9) 田中秀典 他: 京都市産業技術研究所研究報告, **10**, p. 49 (2020).
- 10) 小澤敦揮 他: 三重県工業研究所研究報告, **46**, p. 41 (2022).