

# 尿素低生産性長野酵母の実醸造試験\*

豊田敦至\*<sup>1</sup>

## Sake Brewing Test Using Nagano Yeast with Low-Urea Productivity Atsushi TOYODA

清酒中のカルバミン酸エチル生成リスクの低減化を目指し、昨年度までに選抜した尿素低生産性長野酵母の実醸造試験を行った。NC由来NCm1株は、実醸造試験において順調な発酵経過を示し、尿素濃度が低く、酸度がやや低めになるものの親株とほぼ同等な清酒の製造ができた。ND由来NDm3-2株も実醸造試験において順調な発酵経過を示し、尿素濃度が低く、親株とほぼ同等な清酒の製造ができた。また、尿素生成の原因遺伝子であるCARI遺伝子にそれぞれ変異が生じていることを確認した。

キーワード：清酒，長野酵母，尿素低生産性，カルバミン酸エチル

### 1 緒言

現在、消費者志向の変化等により、清酒製造数量は漸減傾向にあるが、海外輸出数量は年々増加傾向にある。

一般に酒類にはカルバミン酸エチルが微量に含まれていることが知られている。カルバミン酸エチルは国際がん研究機関により平成19年にグループ2A(おそらく発がん性がある)に分類された物質である。現時点では国内における規制値は存在しないものの、国ごとに規制値が設けられている場合があり、県内清酒製造企業が今後輸出を拡大していく際の障壁となる可能性がある。

清酒におけるカルバミン酸エチルは、酵母が生成する尿素とエタノールが化学的に反応して生成されることが明らかになっている<sup>1)</sup>。そこで、尿素生産性の低い酵母株の取得研究を行い、昨年度までに、長野酵母C(NC)<sup>2)</sup>及び長野酵母D(ND)<sup>3)</sup>のアルギナーゼ欠損自然変異株から親株と尿素生産性以外の性質が同等と考えられる株を分離した<sup>4)</sup>。しかし、小スケールでの発酵試験のみが行われ、実醸造規模での性質検討が課題となっていた。

そこで、本研究では、これまで行えていなかった性質確認試験を行うとともに、総米数百キロ規模の実醸造試験を行い、製造現場レベルの実用性を検討したので報告する。

### 2 方法

#### 2.1 使用酵母

試験には昨年度までに選抜したNC由来尿素低生産性酵母NCm1株、ND由来尿素低生産性NDm3-2株を用いた。試

験の対照としてそれぞれの親株であるNC及びNDを用いた。小仕込み試験の対照として、尿素低生産性きょうかい901号(KArg901)を用いた。

#### 2.2 小仕込み試験によるアルコール耐性試験

前報<sup>4)</sup>の小仕込み試験の配合に従い、15°C一定条件の小仕込み試験を行った。積算減量が45g、60g、65g、70g(推定アルコール分はそれぞれ11.7%、15.8%、17.1%、18.5%)の付近でサンプリングを行い、アルカリメチレンブルー染色法で酵母の死滅率を測定した。

#### 2.3 実醸造試験

NCm1株は、令和3酒造年度(R3BY)にA社とB社でそれぞれ総米600kgを各1回、R4BYにC社で総米810kgを3回(原料米違い)実施した。対照として同時期にNCの仕込みを実施(A社は未実施)した他、R4BYのNC使用清酒を他の4社から9点収集した。

NDm3-2株は、B社でR3BY及びR4BYに総米532kg~1,500kgで計3回実施した。対照としてNDの仕込みを実施した他、R4BYのND使用清酒を他の3社から11点収集した。

#### 2.4 もろみ及び製成酒の分析

もろみ及び製成酒の一般分析は国税庁所定分析法<sup>5)</sup>により、尿素含量はDetectX Urea Nitrogen Colorimetric Detection Kit(Arbor Assays社)により測定した。清酒の一般分析値には、酒造場での分析結果を用いた。

#### 2.5 CARI遺伝子の変異解析

親株及び変異株の全ゲノム解析を共同研究の一部として独立行政法人酒類総合研究所にて実施した。NCm1株は別の機関に委託して取得したリードファイルを酒類総合研究所の手順・ソフトで解析を行った。参照配列には、K7ゲノム(<https://nrifb1.nrif.go.jp/SYGD/>)を用いた。

\* 特別研究，基盤技術力強化支援事業共同研究，産学官連携技術開発推進事業

\*<sup>1</sup> 食品バイオ部

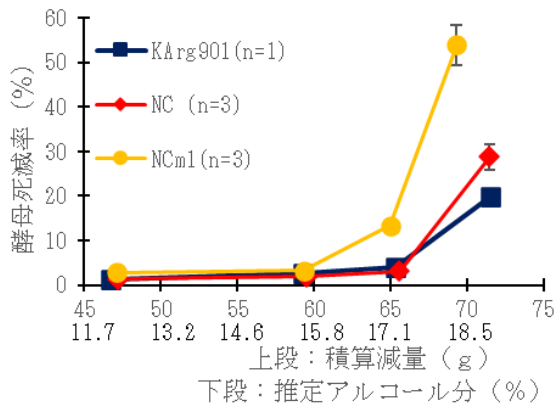


図1 NCm1 株及びNC のアルコール耐性・死滅率

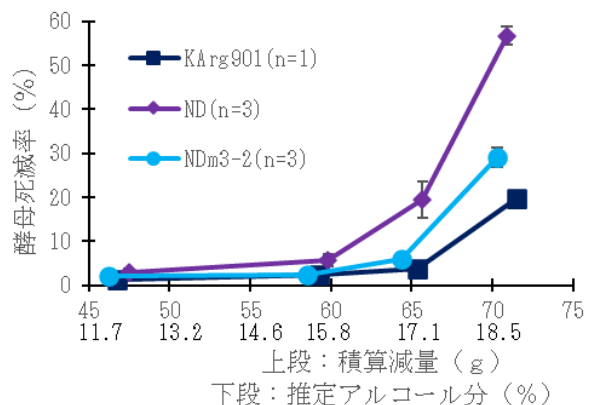


図2 NDm3-2 株及びND のアルコール耐性・死滅率

### 3 結果及び考察

#### 3.1 小仕込み試験によるアルコール耐性試験

もろみ経過に伴ってサンプリングを行い、アルカリメチレンブルー染色法により酵母の死滅率を測定した。NCm1 株及びNC の結果を図1に、NDm3-2 株及びND の結果を図2に示した。

NC はKArg901 と同様にアルコール分17%程度でもほとんど死滅が見られず、アルコール耐性が比較的強い。一方、NCm1 株はアルコール分が17%となる頃には死滅率10%を超えており、親株よりもややアルコール耐性が弱まった。アルコール分16%を超える高いアルコール分を求める清酒の製造を行う際には、上槽時期をしっかりと見極める必要があると考えられる。

ND はアルコール分16%付近で死滅率が10%程度とアルコール耐性が比較的弱い。一方、NDm3-2 株はアルコール分17%付近でも死滅率が6%であり親株よりもアルコール耐性が強まった。より高いアルコール分の清酒の製造にも使用可能になったと考えられる。

#### 3.2 NCm1 株の実醸造試験

実醸造試験により得られた製成酒の分析結果を表1に示した。NCm1 株は、NC と遜色ない発酵経過を示した(データ省略)。

尿素濃度は、B社とC社のいずれも親株の13~22%に減少していた。NCm1 株を使用した3社5仕込の尿素濃度は、 $0.9 \pm 0.3$  mg/Lとなり、前報<sup>4)</sup>の小仕込み試験の結果と同程度に低く、尿素低生産性を示した。なお、NCを使用した6社13点(B, C社含む)の清酒の平均尿素濃度は $6.4 \pm 3.2$  mg/Lであり、これと比較すると14%に減少していた。また、C社の美山錦使用仕込のもろみ経過に伴う尿素濃度の変化を図3に示した。親株NCはアルコール分3.3%(3日目)時に1.0 mg/Lであり、その後もろみの進行に伴って増加し、最終的に3.5mg/Lとなった。一方、NCm1 株は終始約0.5 mg/L前後であり、もろみ末期においても大幅な増加は認められず、尿素低生産性酵母であることを確認した。

同等の仕込みで比較可能なC社の原料米違い3仕込の

分析データを用いて対応のあるt検定(片側)を行った。NCm1 株は酸度が平均1.8と有意に( $p < 0.05$ )低くなった。有機酸成分組成(データ省略)を分析したところ、ピルビン酸が17%に減少( $p < 0.05$ )していた。ピルビン酸はもろみ経過に伴って終盤に親株よりも早く減少する傾向があり(データ省略)、アルコール耐性の弱さも反映していると考えられる。その他の成分に有意差はなかった。

NCm1 株の製成酒について、食品バイオ部員5名による官能評価を実施したところ(データ省略)、評価点に有意差はなく、対照となるNCの清酒とよく似た傾向の酒質と評価された。

以上のことより、NCm1 株はNCと比較して、尿素生成量が15%程度に抑制されること、アルコール耐性の面でやや弱い傾向があること、もろみ後半のピルビン酸のキレが速い傾向にあること、酸度がやや低くなる傾向があること、官能評価の上ではよく似た傾向の酒質となることを確認した。

NCはかつて“アルプス酵母”と呼ばれていた酵母で、当時は高カプロン酸エチル生産酵母として鑑評会・コンテストなどでも多く使用された。多くのカプロン酸エチル高生産酵母が開発された今となってはカプロン酸エチル濃度としては低い部類に入るものとなってはいるが、現在も主に純米酒や純米吟醸酒の製造に使用されている。カプロン酸エチル3~5 ppm、酢酸イソアミル2~4 ppmというややおだやかながらもふくらみのある香りと酸味を伴うフルーティな味わいに特徴があり、食中酒向けとして多く使用されている。

NCm1は、NCと若干の性質差があるものの、酒質を大きく変えることなくカルバミン酸エチル生成リスクを低減させることが可能になるため、今後NCm1 株を尿素低生産性長野酵母C(仮称NArgC)として頒布していきたいと考えている。

#### 3.3 NDm3-2 株の実醸造試験

実醸造試験により得られた製成酒の分析結果を表2に示した。NDm3-2 株は、ND と遜色ない発酵経過を示した(データ省略)。

表1 NCm1株及びNCを用いた実醸造試験 製成酒の分析結果

製造場	酵母	酒米品種	総米(kg)	精米歩合(%)	アルコール分(%)	日本酒度	酸度	AA	グルコース(%)	尿素(mg/L)	酢酸イソアミル(mg/L)	イソアミルアルコール(mg/L)	EA比	カブロン酸エチル(mg/L)	EA比/カブロン酸エチル
A	NCm1	美山錦	600	60	18.1	-4	2	1.5	2.3	0.7	3.0	174	1.7	2.2	0.8
B	NCm1	ひとごこち	600	59	17.2	0	1.6	1.6	1.0	1.4	4.8	188	2.5	3.9	0.6
B	NC	ひとごこち	1,500	59	17.2	1	1.9	1.5	0.8	10.4	3.2	194	1.6	2.9	0.6
C	NCm1	美山錦	810	50	15.6	-6	1.9	1.0	3.7	0.6	5.3	137	3.9	2.6	1.5
C	NC	美山錦	810	50	16.0	-5	2.0	0.8	3.7	3.5	5.1	135	3.8	2.5	1.5
C	NCm1	ひとごこち	810	50	15.8	-4	1.9	0.8	3.2	1.1	5.6	130	4.3	3.9	1.1
C	NC	ひとごこち	810	50	15.5	-5	1.9	0.9	3.1	3.2	4.6	125	3.7	3.3	1.1
C	NCm1	山恵錦	810	50	15.1	0	1.7	0.7	2.7	0.7	3.6	126	2.8	3.6	0.8
C	NC	山恵錦	810	50	15.8	-3	2.1	0.7	3.2	4.4	3.4	126	2.7	2.9	0.9
6社13点	NC	平均値		49~70	16.3	-1	1.9	1.0	2.2	6.4	3.1	148	2.2	2.3	1.0
		標準偏差			0.7	5	0.3	0.3	1.0	3.2	1.3	28	0.9	0.7	0.5

表2 NDm3-2株及びNDを用いた実醸造試験 製成酒の分析結果

製造場	酵母	酒米品種	総米(kg)	精米歩合(%)	アルコール分(%)	日本酒度	酸度	アミノ酸度	グルコース(%)	尿素(mg/L)	酢酸イソアミル(mg/L)	イソアミルアルコール(mg/L)	EA比	カブロン酸エチル(mg/L)	EA比/カブロン酸エチル
B	NDm3-2	山恵錦	532	59	17.2	0	1.6	0.5	1.6	1.2	3.8	136	2.8	2.5	1.1
B	NDm3-2	山恵錦	620	59	17.2	0	1.4	0.6	0.4	0.7	3.8	137	2.8	4.7	0.6
B	ND	ひとごこち	1,200	59	17.2	-2	1.5	0.9	1.4	4.2	3.4	137	2.5	3.8	0.7
B	ND	ひとごこち	600	49	16.2	-5	1.4	1.3	1.7	6.9	3.4	127	2.7	6.4	0.4
B	NDm3-2	ひとごこち	1,500	59	17.3	-1	1.5	0.9	0.5	1.8	4.1	124	3.3	5.2	0.6
B	ND	ひとごこち	1,500	59	16.8	-1	1.5	0.9	0.4	6.4	4.1	149	2.7	6.2	0.4
4社14点	ND	平均値		35~70	16.6	-3	1.7	1.0	2.6	3.8	2.9	131	2.2	3.9	0.6
		標準偏差			0.5	3	0.4	0.2	1.0	1.8	0.8	20	0.5	1.5	0.3

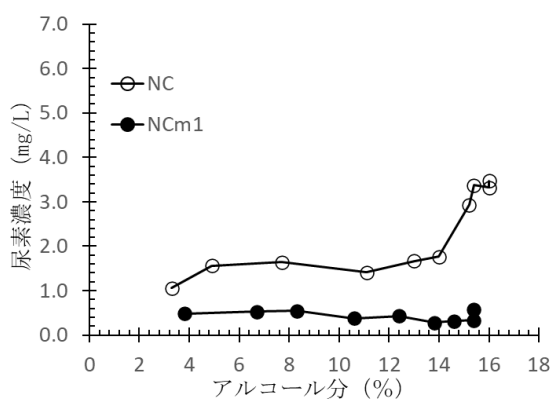


図3 もろみ経過に伴う尿素濃度の変化  
C社, 美山錦, 820kg 仕込

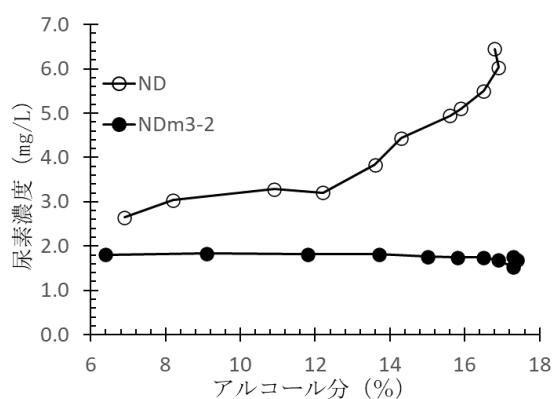


図4 もろみ経過に伴う尿素濃度の変化  
B社, ひとごこち, 1,500kg 仕込

B社NDm3-2株の尿素濃度は、 $1.2 \pm 0.4$  mg/LとB社NDの $5.8 \pm 1.2$  mg/Lの約21%に有意に減少し、前報<sup>4)</sup>の小仕込み試験の結果と同程度に低く、尿素低生産性を示した。なお、NDを使用した4社14点(B社含む)の清酒の平均尿素濃度は $3.8 \pm 1.8$  mg/Lであり、これと比較しても33%に減少していた。また、同等の仕込で比較可能なひとごこち1,500kg仕込のもろみ経過に伴う尿素濃度の変化

を図4に示した。親株NDはアルコール分が6.9%(5日目)時に2.7 mg/Lであり、その後もろみの進行に伴って増加し、最終的に6.4 mg/Lとなった。一方、NDm3-2株は終始約1.7 mg/L前後であり、もろみ末期においても大幅な増加は認められず、NCm1株同様、尿素低生産性酵母であることを確認した。

その他の成分について、有意差は認められなかった。カ

ブロン酸エチルがやや少ない傾向にも見えるが、仕込規模やろみ経過で変動しやすい成分であるので、今後の検討課題としたい。

NDm3-2 株の製成酒について、食品バイオ部員 5 名による官能評価を実施したところ(データ省略)、評価点に有意差はなく、対照となる ND 清酒とよく似た傾向の酒質と評価された。

ND は主に純米酒や純米吟醸酒の製造に用いられており、カブロン酸エチル 3~10 ppm 程度、酢酸イソアミル 2~4 ppm 程度という華やかな香りとキレのある酸味を伴うジューシーな味わいに特徴があり食中酒向けとして多く使用されている。NC より香りの華やかさやジューシーさを求める場合に使用されている。

NDm3-2 は、ND と若干の性質差はあるものの酒質を大きく変えることなく、カルバミン酸エチル生成リスクを低減させることが可能になるため、今後 NDm3-2 株を尿素低生産性長野酵母 D(仮称 NArgD)として頒布していきたいと考えている。

### 3. 4 *CARI* 遺伝子の変異解析

NCm1 株及び NDm3-2 株の全ゲノム解析結果から、尿素生成の原因遺伝子である *CARI* 遺伝子の変異部位の特定を行った。その結果、NCm1 株は 5 塩基の欠失変異によるフレームシフト(Phe283fs)、NDm3-2 株は 1 塩基置換によるアミノ酸置換(Asp261Tyr)が生じていた。これらの変異により、尿素低生産性を示したものと考えられる。その他、親株-変異株間で染色体異数性の差異やゲノム中に挿入・欠失・アミノ酸置換を伴う変異が複数検出されている。アルコール耐性の変化など株間の性質の違いにどのような影響を及ぼしているのかは今後の検討課題である。

## 4 結 論

長野県で育種してきた長野酵母 C(NC)及び長野酵母 D(ND)を親株とした尿素低生産株 NCm1 株及び NDm3-2 株の性質確認試験及び実醸造試験を行った。

(1)小仕込み試験によりアルコール耐性を調べたところ、NCm1 株は NC よりもやや弱く、NDm3-2 株は ND よりもやや強いという性質がわかった。

(2)NCm1 株の実醸造試験において、製成酒は、尿素含量が低く、酸度がやや低くなったが、他の成分値及び官能的には親株 NC とほぼ同等の酒質となった。このことから実用化が十分可能であると判断した。

(3)NDm3-2 株の実醸造試験において、製成酒は、尿素含量が低いが、他の成分値及び官能的には親株 ND とほぼ同等の酒質となった。このことから実用化が十分可能であると判断した。

(4)尿素生成の原因遺伝子である *CARI* 遺伝子部位の変異導入を調べたところ、NCm1 株は 5 塩基の欠失変異によるフレームシフト(Phe283fs)、NDm3-2 株は 1 塩基置換によるアミノ酸置換(Asp261Tyr)が生じており、これらの変異により、尿素低生産性を示したものと考えられる。

## 謝 辞

実醸造試験にご協力いただいた酒造場の皆様、清酒サンプルをご提供いただいた酒造場の皆様に感謝申し上げます。また、共同研究の一部として全ゲノム解析の各種解析を行っていただいた独立行政法人酒類総合研究所醸造微生物研究部門部門長の赤尾健先生に感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) 吉沢淑, 高橋康次郎. 酒中のカルバミン酸エチルの生成に及ぼす温度と酒質の影響. 日本醸造協会誌. 83(1), p. 69-73(1988).
- 2) 蟻川幸彦, 近藤君夫, 桑原秀明, 吉川茂利, 馬場茂, 小栗勇. 変異処理による清酒用酵母の育種(第2報 高酢酸イソアミル・高カブロン酸エチル生産株の育種). 長野食工試研報. 17, p. 52-55 (1989)
- 3) 蟻川幸彦, 榛葉芳夫: 低温高発酵性清酒酵母. 日本醸造協会誌. 103, p. 517-524 (2008)
- 4) 豊田敦至. 尿素低生産性長野酵母の分離に関する研究. 長野県工技センター研報. 17, p. F1-F4(2022)
- 5) 国税庁所定分析法.  
<https://www.nta.go.jp/law/tsutatsu/kobetsu/sonota/070622/pdf/03.pdf>(参照日 2023-06-20)