カルバミド生産能の低い清酒酵母の単離

田中準浩・永井英雄・中沢英五郎・三島秀夫・竹村成三
(白鶴酒造<株>)

平成元年 1 月 26 日受理

Isolation of Mutants having Low Carbamide-Producing Ability from Sake Yeast

Norihiro TANAKA, Hideo NAGAI, Eigoro NAKAZAWA, Hideo MISHIMA
and Shigezo TAKEMURA

(Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd. 4-5-5 Sumiyoshi-minami-machi,
Higashinada-ku, Kobe 658)

Mutants resistant against methylamine were isolated from UV-irradiated or non-irradiated cells of sake yeast K-701. Among these mutants, strains having low carbamide-producing ability in media composed of *koji*, steamed rice and water were selected. Laboratory-scale sake brewing experiments were carried out by using these strains. One of the strains, named MR-99, produced about one-third amount of carbamide as that produced by the parent strain, and gave more isoamyl acetate and malate than the parent. The pattern of carbamide and ammonia incorporation in fermentation tests were different for the strains MR-99 and K-701.

Key words: 清酒酵母・尿素生成・突然異変

緒 言

清酒成分の中でカルバミドは香味に悪影響を与えるものであり¹⁾、吉沢らが原料処理方法²⁾やウレアーゼによる分解方法³⁾等を報告しているように、近年種々のカルバミド低減方法が開発されている。

また、原らは酵母におけるカルバミドの主要な生成経路であるカルバミドサイクルに注目し、アルギニンの取り込み及び分解に関与する遺伝子の突然変異によってカルバミド生産能の低い清酒酵母の造成に成功したと報告している⁴⁾。

一方、酵母はカルバミドを分解する酵素としてウレアーアミドリラーゼを持つことが知られている⁵⁾。この酵素の生産はいわゆる Nitrogen Catabolite Repression の制御を受けアンモニアの存在下では抑制されているが、アンモニアのアナログ剤であるメチルアミンの耐性突然変異株としてこの酵素の生産が脱抑制されている株を取得できると COOPER は報告している⁶⁾。従って、清酒酵母に変異を与えウレアーアミドリラーゼの生産を脱抑制できれば、生成されたカルバミドが酵母菌体内で分解され、

その結果カルバミド濃度の低い清酒の醸造が可能になると考えられる。

著者らは、清酒酵母よりメチルアミン耐性突然変異株を分離し、それらの中にカルバミド生産能が親株に比べて大幅に低い株を見い出したので報告する。

実 験 方 法

1. 供 試 菌 株

日本醸造協会 701 号酵母を用いた。

2. 前培養条件を変えた小仕込試験

供試酵母を 10 mM カルバミド、あるいは 0.1% 硫安を含む YCB 培地 (Difco 社製, Yeast-Carbon-base 1.17%) 1 l で、30°C, 1 夜振とう培養し、得られた菌体を集菌、滅菌水で 3 回洗浄した。この菌体を、麴 75 g, 蒸米 324 g, 水 405 ml, 醸造用乳酸 1 g と混合し、15°C 一定で発酵させた (初期菌濃度 3×10^8 cells/ml-滅水)。

3. メチルアミン耐性突然変異株の分離方法

供試菌株を YM 培地 (酵母エキス 0.3%, 麦芽エキス 0.3%, ポリペプトン 0.5%, グルコース 1%) 5 ml で、30°C, 24 時間培養し、得られた菌体を集菌、滅菌水

10 ml で 2 回洗浄した。その一部については常法⁴⁾により紫外線照射を行い、紫外線照射前後の菌体を各々 $2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ cells/ml の濃度に滅菌水で懸濁した。この懸濁液 0.1 ml をメチルアミン 200 mM、カルバミド 10 mM を含む YCB 培地（選択培地）プレートに塗抹し、30°C、4～6 日間培養後、出現したコロニーを釣菌した。釣菌した株は YM 培地プレート上でシングルコロニーとして単離した。単離した株を YM 培地で 24 時間培養後、再度選択培地プレートに塗抹し、旺盛に生育してくる株をメチルアミン耐性突然変異株とした。

4. 1 段仕込みによるカルバミド生産能の低い株の選択

メチルアミン耐性突然変異株を YM 培地 20 ml で、30°C、2 日間静置培養し、得られた菌体を集菌洗浄後、麴 25 g、水 35 ml 及び醸造用乳酸 0.1 g と混合した。15°C で 1 日間放置後、水 100 ml、蒸米 108 g を加え、15°C 一定で 12 日間発酵させ、遠心分離により上槽した。

5. 小仕込試験

仕込配合は Table 1 に示す。品温経過は 15°C 一定とした。YM 培地で、30°C、1 晩振とう培養した酵母を集菌洗浄し、汲水 1 ml 当たり 3×10^7 cells の濃度で添加した。上槽は、炭酸ガス減量が 300 g に達した時点で遠心分離により行った。また上槽前の醪を一部、分取し、白米 1 kg 当たり純 Alc 200 ml の割合で 35% アルコールを添加し、10°C で 1 日間放置後、同様に上槽した。

6. 醪及び製成酒の成分分析

醪及び製成酒のカルバミド量の測定は既報²⁾に準じ、製成酒の一般成分は国税庁所定分析法注解⁷⁾に準じて測定した。アミノ酸組成は日立高速アミノ酸分析計で、有機酸組成はベーリンガー・マンハイム社の F キット法で分析した。乳酸の分析は D-Lactate dehydrogenase も添加し、DL-型の乳酸を定量した。香氣成分の分析はヘッドスペースガスクロマトグラフィーで定量した。

7. アンモニアとカルバミドの取り込み実験

唯一の窒素源として 10 mM カルバミドを用いた YCB 培地、0.1% 硫酸を用いた YCB 培地、あるいは 10 mM カルバミドと 0.1% 硫酸の両方を用いた YCB 培地の 3 種類で、供試菌株と変異株を、30°C で対数増殖

期末期まで培養し、遠沈集菌後、滅菌水で 3 回洗浄した。この菌体を、カザミノ酸 0.1%、カルバミド 40 ppm、アンモニア 40 ppm、グルコース 5% を含む YCB 培地 50 ml に、 3×10^7 cells/ml の濃度で植菌し、25°C で振とう培養した。経時的に 1 ml ずつサンプリングを行い、遠沈して上澄み液のカルバミド、アンモニア濃度を測定した。

実験結果及び考察

1. 醪のカルバミド量に及ぼす前培養の影響

前培養時の窒素源としてカルバミドを用いた酵母とアンモニアを用いた酵母で小仕込試験を行い、醪中のカルバミド濃度を比較した。その結果を Fig. 1 に示す。

カルバミドを用いた場合、アンモニアを用いた場合に比べて醪中のカルバミド濃度が約 1/2 量で経過した。ウレアアミドリアーゼはカルバミドを唯一の窒素源として培養すれば誘導され、その活性が細胞内でかなり安定に維持されることを COOPER ら⁸⁾が報告している。今回の実験は初期菌濃度を汲水 1 ml 当たり 3×10^8 cells と多くし、また前培養の影響が出やすい 1 段仕込みで行ったが、今回の結果からウレアアミドリアーゼの活性化で醪中のカルバミドを低減できると考えた。

2. メチルアミン耐性突然変異株の取得

自然誘発のものから 137 株、紫外線照射（生存率 0.6%）したものから 13 株、選択培地上に生育してきたコロニーを単離した。コロニーが生育してきた頻度は $10^{-6} \sim 10^{-7}$ であり、紫外線照射の有無で差は認められなかった。

これらの株の中から選択培地プレート上での生育が速

Fig. 1 Effect of Pre-incubation on Carbamide Production.

Total amount of rice was 300g and added in one batch. Temperature of moromi mash was kept at 15°C. Nitrogen source of pre-incubation in YCB medium was 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: (○) and 10mM carbamide: (●) respectively. Initial cells concn. was 3×10^8 cells/ml.

Table 1 Proportion of raw materials for laboratory-scale sake making.

	First addition	Second addition	Final addition	Total
Total rice (g)	175	325	500	1,000
Kakemai (g)	125	275	400	800
Kojimai (g)	50	50	100	200
Water (ml)	275	375	700	1,350

い株を 60 株選んだ。これらの株は、 β -アラニン代替能が温度感受性であり、TTC 染色で赤色を示した。また、アンモニアを窒素源とした YCB 培地プレートでよく生育するので、アンモニアの透過性に関係した変異株ではないと考えられた。

3. 1 段仕込みによるカルバミド生産能の低い株の選別

上記のメチルアミン耐性突然変異株 60 株について、1 段仕込みを行いカルバミド生産能を調べた。その結果を 19 株の突然変異株について Table 2 に示した。

突然変異株の発酵力に関しては、醪が変敗してしまうほど発酵力の弱い株から親株と同等の発酵力を示す株まであった。また今回紫外線照射を行って分離した突然変異株は全て発酵力が劣っていた。

醪中のカルバミド濃度は発酵に伴って増加することを考慮しなければならないが、親株に比べ 1/2~1/3 のカルバミド生産能を示した株が 27 株あった。一方、親株と同程度のカルバミド生産能を示す株も 20 株ほどあった。発酵力の強い株はカルバミド生産能も高い傾向にあった。

メチルアミンに耐性であってもカルバミド生産能が低い変異株があることの原因としては、各々の変異株のウレアアミドリラーゼ活性が違っている可能性や醪中のような低いカルバミド濃度では脱抑制しにくい変異株

Table 2 General components and carbamide concentration of sake produced with the methylamine-resistant mutants derived from K-701.

Strain	Bé	Alcohol (%)	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)	Carbamide (ppm)
K-701	2.2	16.7	3.0	2.5	30.5
MR-5	3.3	15.1	3.2	2.6	13.6
MR-13	5.1	13.3	4.3	2.9	15.3
MR-14	3.0	15.7	3.3	2.3	19.2
MR-22	2.3	16.6	2.9	2.3	32.4
MR-27	2.5	16.3	2.9	2.3	31.1
MR-35	5.0	12.8	4.1	2.9	14.4
MR-37	3.1	15.7	3.0	2.6	19.3
MR-56	3.2	15.2	3.6	2.3	15.4
MR-71	2.2	16.6	3.0	2.2	22.0
MR-82	2.1	16.7	3.1	2.3	30.1
MR-99	3.6	14.9	3.5	2.0	13.3
MR-101	3.4	14.8	3.4	2.4	10.1
MR-103	5.5	12.4	5.2	3.1	12.4
MR-110	3.6	15.0	3.1	2.4	16.8
MR-112	2.0	16.7	2.9	2.1	27.2
MR-127	1.7	17.0	3.4	2.1	34.2
MR-129	4.2	14.0	3.5	2.4	11.2
MR-138	2.6	16.1	3.2	2.6	34.2
MR-140	4.8	13.3	5.0	2.8	22.6

Yeast cells were cultured in YM medium for 2 days at 30°C without shaking. Moromi mash was kept at 15°C for 12 days.

があること等が考えられる。この点はウレアアミドリラーゼの観点からカルバミド生産能を検討していく上で興味あるものと考えている。

4. カルバミド生産能の低い変異株による小仕込試験
一段仕込みの結果からカルバミド生産能が低く、加えて製成酒の酒質も良好であった株を 10 株選択し、総米 1 kg の小仕込試験を行い醸造特性を調べた。

炭酸ガス減量が 300 g に達したのは、K-701, MR-5, MR-14, MR-37, MR-71, 及び MR-110 の 6 株が留後 11 日目, MR-129 が留後 12 日目, MR-99 及び MR-101 が留後 13 日目, MR-56 が留後 14 日目であった。MR-103 は発酵力が弱く留後 14 日目に炭酸ガス減量が 279.7 g の時点で上槽した。

アルコール無添加の製成酒の分析値ならびに官能評価を Table 3 に、アルコール添加酒については Table 4 に

Table 3 Analysis of sake produced in laboratory-scale sake makings with the mutants (Alcohol not added).

Strain	Sake meter	Alcohol (%)	Acidity	Amino acidity	Carbamide (ppm)	Sensory evaluation*
K-701	-11.1	17.0	2.9	1.7	34.5	3.0
MR-5	-13.1	17.4	2.7	2.0	43.8	2.2
MR-14	-14.3	16.7	2.7	1.9	25.9	3.2
MR-37	-11.3	17.4	2.5	1.8	28.3	2.5
MR-56	-14.3	17.1	3.1	2.0	24.5	2.3
MR-71	-11.2	17.2	2.6	1.8	26.7	2.5
MR-99	-15.9	16.8	3.2	1.6	13.2	2.5
MR-101	-13.9	17.1	3.1	1.9	15.8	4.2
MR-103	-24.2	16.0	3.9	2.7	21.2	4.8
MR-110	-14.1	16.9	2.5	2.1	36.8	3.0
MR-129	-14.3	17.0	2.8	2.1	30.3	3.2

* Sensory evaluation was performed by a 5 point method: 1, excellent; 5, inferior. Score points were expressed as mean value of 10 paneller's one.

Table 4 Analysis of sake produced in laboratory-scale sake makings with the mutants (Alcohol added*).

Strain	Sake meter	Alcohol (%)	Acidity	Amino acidity	Carbamide (ppm)	Sensory evaluation
K-701	+2.0	20.9	1.8	2.5	33.7	3.0
MR-5	-1.2	21.0	1.7	2.7	38.9	3.0
MR-14	-1.6	20.5	1.9	2.7	24.4	3.0
MR-37	-1.5	21.4	1.7	2.7	26.2	3.2
MR-56	-2.5	21.0	2.0	2.5	21.0	3.0
MR-71	+1.0	21.1	1.8	2.4	28.0	3.0
MR-99	-3.4	20.4	2.1	2.3	14.5	2.0
MR-101	-1.0	20.5	2.0	2.4	17.5	3.0
MR-103	-12.8	19.8	3.1	2.9	17.2	4.0
MR-110	-3.4	20.4	1.6	2.7	33.7	2.7
MR-129	-3.2	20.7	1.8	2.7	29.6	2.2

* 35% ethanol was added in the ratio of 100% ethanol 200ml/rice 1kg.

After fortification moromi mash was kept at 10°C for 1 day.

Table 5 Amino acid composition in sake (Alcohol not added).

	K-701	MR-99		K-701	MR-99
Asp	0.61	0.56	Tyr	1.15	1.20
Thr	1.93	1.71	Phe	0.76	0.85
Ser	0.98	0.96	GABA	0.67	0.79
Glu	1.79	2.05	Orn	0.19	0.28
Gly	1.88	2.01	Lys	0.99	1.10
Ala	2.73	2.84	EtOHNH	1.30	1.38
Cys	0.12	0.28	NH ₃	0.73	0.86
Val	1.47	1.63	His	0.43	0.47
Met	0.39	0.44	Trp	0.01	0.03
Ile	0.79	0.86	Arg	1.85	2.67
Leu	1.65	1.69	Pro	1.82	2.31
			Total	24.22	24.64

(mmol/l)

Table 6 Acid composition in sake (Alcohol not added).

	K-701	MR-99
Citrate	108.1	116.7
Malate	255.2	456.0
Lactate	245.2	266.8
Pyruvate	344.7	401.0
Succinate	374.7	419.9

(ppm)

示した。官能評価は5点法で行った。

調べた変異株の中には MR-5 や MR-110 のようにカルバミド生産能が不安定である株もあったが、MR-99 や MR-101 は親株より若干発酵が遅れたもののカルバミド生産能は親株の約 1/3~1/2 と安定して低かった。なかでも MR-99 は酸度が 0.3 ml/ほど高い他は親株と大差がなく、官能評価でも高い評価を得た。そこで MR-99 について、アミノ酸組成、有機酸組成及び香気成分組成を親株と比較し、Table 5, 6, 7 に示した。

アミノ酸組成については、カルバミドの生産に大きく関与するアルギニンにおいて MR-99 は親株より4割ほど高い値を示したが、その他は大きな差がみられなかった。MIDDELHOVEN はアルギナーゼの脱抑制したメチルアミン耐性株を分離したと報告している⁹⁾ので、MR-99 においてもアルギニンの代謝系に何らかの変化が起きている可能性は考えられる。ただし MR-99 は親株と同じくカナバニンには感受性であった。

有機酸組成を比較した結果、リンゴ酸の含量が大きく異なっており、MR-99 は親株の約 1.8 倍のリンゴ酸を生成していた。また香気成分を比較した結果、MR-99 は酢酸イソアミルの生成量が多く、E/A 比も親株の 1.7 倍と高かった。MR-99 の製成酒の官能評価が高かったことは、これらに起因しているものと考えられる。

以上の結果から、今回分離したメチルアミン耐性突然

Table 7 Volatile components in sake (Alcohol not added).

	K-701	MR-99
n-Propanol (ppm)	127.3	131.3
i-Butyl alcohol (ppm)	94.2	97.4
i-Amyl alcohol (ppm)	208.5	197.7
Ethyl acetate (ppm)	69.7	70.9
i-Amyl acetate (ppm)	5.57	9.16
Ethyl caproate (ppm)	1.80	2.08
E/A ($\times 100$)*	2.67	4.63

* E/A($\times 100$): i-amyl acetate/i-amyl alcohol $\times 100$ **Fig. 2** Comparison of Carbamide and Ammonia Incorporation by K-701 and MR-99.

Contents of carbamide ($\blacktriangle$) and ammonia ($\bullet$) were measured in the medium. K-701 (A-C) and MR-99 (D-F) were pre-incubated with different nitrogen sources respectively and inoculated to be initial cells concn.: 3×10^7 cells/ml.

Nitrogen sources of pre-incubation were A, D: 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, B, E: both 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 10 mM carbamide and C, F: 10 mM carbamide.

変異株のうち MR-99 は、発酵力は若干劣るものの製成酒の酒質も良好であり、かつカルバミド生産能も低いことから、カルバミド濃度の低い清酒の醸造において有用な酵母であると考えている。

5. アンモニア及びカルバミドの取り込みパターンの比較

K-701 と MR-99 についてアンモニアとカルバミドの取り込みパターンを比較した結果を Fig. 2 に示した。

カルバミドを唯一の窒素源として前培養した酵母はウレアミドリラーゼやカルバミドの透過に関与する酵素が誘導されており、培地中のカルバミドとアンモニアは両株とも並行して減少した (C, F)。一方、アンモニアで前培養した酵母はこれらの酵素が生成されておらず、培地中のカルバミドはアンモニアより遅れて取り込まれた (A, D)。

アンモニアとカルバミドの両方で前培養した場合、K-701 は Nitrogen Catabolite Repression によりウレアミドリラーゼ等の生産が抑制され、アンモニアで前

培養した場合と同じ取り込みパターンを示した (B)。一方、MR-99 はカルバミドで前培養した場合と同じパターンを示し、培地中のアンモニアとカルバミドは並行して減少した (E)。このことより、MR-99 は Nitrogen Catabolite Repression の制御からカルバミドの分解に関与する酵素が脱抑制されると推察される。

COOPER はカルバミドを唯一の窒素源としてメチルアミン耐性突然変異株を分離すれば、ウレアアミドリアゼが構成的に生産される変異株も取得できたと報告している⁶⁾が、本実験による取り込みパターンから判断してMR-99 は構成的な変異ではないと考えられる。

要 約

カルバミド生産能の低い清酒酵母を育種することを目的として、COOPER の方法⁶⁾に準じて清酒酵母からメチルアミン耐性突然変異株の取得を試み、次の結果を得た。

(1) K-701 から自然誘発あるいは紫外線照射によってメチルアミン耐性突然変異株を分離した。60 株の変異株について1段仕込み(総米 100 g)試験を行いカルバミド生産能を調べた結果、カルバミド生産能が親株に比べ 1/3~1/2 と低い株を数株見出した。

(2) 総米 1 kg の小仕込試験を行った結果、突然変異株 MR-99 は発酵が若干遅れたが、カルバミド生産能

は親株の約 1/3 であり、リンゴ酸の生成量が多く、製成酒の E/A 比が高く、官能評価の結果も良好であった。

(3) MR-99 と K-701 では、培養実験において培地中のアンモニアとカルバミドの取り込みパターンに差が認められ、MR-99 は Nitrogen Catabolite Repression の制御から脱抑制されることが示唆された。

文 献

- 1) 原 昌道, 秋山裕一, 野白喜久雄: 特許, 昭 56-20830
- 2) 吉沢 淑, 高橋康次郎, 佐藤和夫: 醸協, 83, (2) 136 (1988)
- 3) 吉沢 淑, 高橋康次郎: 醸協, 83, (2) 142 (1988)
- 4) 原 昌道, 飯村 稔, 五味勝也, 吉沢 淑, 中村 欽一: 醸協, 83, (5) 351 (1988)
- 5) R. J. ROON, B. LEVENBERG: *J. Biol. Chem.*, 245, 4593 (1970)
- 6) T. G. COOPER: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 82, 1258 (1978)
- 7) 注解編集委員会編: 第三回改正国税庁所定分解法注解 p. 6, 日本醸造協会 (1974)
- 8) T. G. COOPER, R. A. SUMRADA: *J. Bacteriol.*, 155, 623 (1983)
- 9) W. J. MIDDELHOVEN: *J. Gen. Microbiol.*, 100, 257 (1977)