変異処理を行わないウレア非生産性清酒酵母の単離

北本勝ひこ・宮崎佳緒子*・山岡 洋**・五味勝也・熊谷知栄子

(国税庁醸造試験所, *(株)宮崎酒造店, **高松国税局鑑定官室)

平成4年2月20日受理

Isolation of Sake Yeasts Producing No Urea without Mutagenesis Treatment

Katsuhiko KITAMOTO, Kaoko MIYAZAKI, Hiroshi YAMAOKA,

Katsuya GOMI and Chieko KUMAGAI

(National Research Institute of Brewing, 2-6-30, Takinogawa,
Kita-ku, Tokyo 114, Japan)

Isolation of sake yeast strains which produce no urea was attempted without mutagenesis treatment, for the purpose of producing sake containing no urea, the main precursor of ethyl carbamate, a suspected carcinogen in sake. The isolation was made to obtain arginase-deficient mutants, because urea is produced by the action of arginase in yeasts. Thus, Kyokai sake yeast No.9 and No.10 were cultured on CAO medium, on which arginase-deficient mutants can grow but wild type sake yeasts can not. Strains grown on CAO medium were inoculated to media containing arginine or ornithine, to obtain mutants which can grow on ornithine but not on arginine. Laboratory scale sake brewings carried out with these isolated arginase-deficient sake yeasts gave as good fermentability and quality of sake as those with their parent strains.

The resulting sake contained no urea and no production of ethyl carbamate was observed after heat treatment.

Key words: ウレア非生産性酵母・カルバミン酸エチル 酵母育種

緒 言

筆者ら^{1,2)}は、清酒酵母協会9号³⁾から2段階の *CAR1* 遺伝子破壊によりアルギナーゼ欠損清酒酵母を造成し、それを用いた清酒の小仕込試験により、発酵特性や製成酒の一般成分、きき酒評価では親株とほとんど変わらず、ウレアが検出されないこと、火入れ貯蔵後にもカルバミン酸エチル(ECA)が検出されないことを明らかにした。このようなアルギナーゼ欠損株のみが生育する培地(CAO培地)を設定し、これを用いて通常の Ethylmethane sulfonate (EMS) 変異処理によりウレア非生産性清酒酵母を協会9号、10号から単離した³⁾。これらの変異株による清酒小仕込試験で上記の遺伝子破壊株で得られたのと同様の結果が確認された。清酒酵母のような実用株での変異処理では、目的の遺伝子のほかに醸造にとって重要な遺伝子にも変異が入る危険が考えられ、このような観点からは過度の変異処理は望ましくない。

清酒酵母において、アミノ酸アナログなどの耐性株のように優性変異を持つ株では、変異処理なしでも取得することが可能であるが、本研究のような劣性変異をホモに持つ株の取得の試みはこれまで報告されていない。そこで、本報では、変異処理をせずに低頻度で起こる自然変異によるアルギナーゼ欠損変異株を CAO 培地を用いることにより取得することを試み、目的とする株を単離することができたので報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株および培地

協会9号(K-9)、協会10号(K-10)を親株として使用した。小仕込試験の対照として、K-9からの遺伝子破壊株 ALI¹⁾、ALK 9³⁾、前報で取得した EMS 変異処理により取得した ALM 91³⁾、および K-10 から EMS 変異処理により取得した ALM 101³⁾ を使用した。1倍体株での取得頻度を調べるためのコントロールとしては X 2180-1A (Yeast Genetic Stock Center, USA, Cali-

fornia) 株を使用した。

アルギナーゼ欠損株の単離には CAO 培地³⁾ (0.17% イーストナイトロジェンベース (N源を含まないもの, Difco 社), 10 ppm カナバニン, 5 mM オルニチン, 1 mM アルギニン, 2% グルコース, 2% 寒天) を, 通常の生育には YPD 培地 (1% イーストエキス, 2% ポリペプトン, 2% グルコース, 2% 寒天) を使用した。アルギナーゼ欠損株の確認には Arg 培地 (0.17% イーストナイトロジェンベース (N源を含まないもの), 5 mM アルギニン, 2% グルコース, 2% 寒天) および Orn 培地 (Arg 培地のアルギニンの代わりにオルニチンを 5 mM 含む。) を使用した。

2. アルギナーゼ欠損株の取得方法

K-9, K-10 を YPD 液体培地で, 30°C 振とう培養し, 対数増殖期の酵母細胞を集菌, 滅菌水で洗浄し約 4×10^7 細胞/ml となるように滅菌水に懸濁した。1 枚のプレートに $4 \sim 10 \times 10^6$ となるように, CAO 培地にまき, 30°C で培養した。1~2 週間後, 生育してきたコロニーを再度 CAO 培地でシングルコロニー単離を行い, 出現したコロニーを Arg 培地と Orn 培地にレプリカし, Arg 培地では生育できず, Orn 培地で生育できるものを目的とするアルギナーゼ欠損株として単離した。同様の実験を静止期まで full growth させた酵母細胞を用いても行った。

3. 小仕込試験

難波ら⁴⁾の方法に従って, Table 1 の仕込配合により, 総米 200 g の仕込試験を行った。留は 7°C に仕込み, 1°C/日ずつ温度を上げ 15°C となつてからはそのまま 15°C 一定とした。炭酸ガス発生による減少量を測定し,

Table 1 Raw Materials for Sake Brewing.

	Mizu-Koji (1st)	Soe (2nd)	Naka (3rd)	Tome (4th)	Total
Amount of Rice (g)	10	25	65	100	200
Rice for steaming (g)	—	25	55	80	160
Rice for Koji (g)	10	—	10	20	40
Water (ml)	55	—	75	130	260
Temperature (°C)	15	15	9	7	

約 60 g となつたところで (約 18 日) 遠心分離により上槽した。

4. 製成酒成分の分析

製成酒の一般分析は国税庁所定分析法⁵⁾により, ウレア含量は酵素法 (東洋醸造(株)測定試薬)により, カルバミン酸エチル (ECA) は 70°C, 12 時間加温後 (30°C で約 4 カ月貯蔵とほぼ同じ条件), 加藤ら⁶⁾の方法により定量した。

5. きき酒方法

審査員 8 名により, 3 点法 (1: 良い, 2: 普通, 3: 悪い) により蛇の目チョコを用いて行った。

実験結果

1. アルギナーゼ欠損株の取得

K-9 および K-10 を親株として CAO 培地を用いアルギナーゼ欠損株の単離を行った。10 枚のプレートから合計でそれぞれ, 41 株, 18 株のコロニーが得られた。これらのうち, それぞれ 16 株について再度 CAO 培地でシングルコロニー単離を行い, 続いて Arg 培地, Orn 培地および YPD 培地にレプリカした。K-9 では 13 株が Orn 培地で生育するが, Arg 培地では生育でき

Table 2 General Components, Urea, ECA, and Sensory Score of Sake Brewed with the Mutants from Kyokai No. 9 (Laboratory Scale Brewing Experiment No. 1).

Strains	Acidity	Amino acidity	Sake meter	Alcohol (%)	Urea (ppm)	ECA (ppb)	Sensory score
1 K-9 (Parent)	2.5	1.9	0.0	18.4	25.4	78	1.7
2 K-9-M1	2.6	1.9	1.0	18.6	ND*	ND*	2.0
3 K-9-M3	2.7	1.7	1.0	18.4	ND	ND	2.4
4 K-9-M5	2.2	2.1	0.0	18.6	ND	ND	2.1
5 K-9-M6	2.3	1.8	2.0	18.7	ND	ND	2.0
6 K-9-M7	2.5	2.3	-2.0	18.2	ND	ND	2.0
7 K-9-M8	3.0	1.7	-1.0	18.4	ND	ND	2.4
8 K-9-M10	2.6	1.9	0.0	18.3	ND	ND	2.1
9 K-9-M11	2.6	1.9	0.0	18.4	ND	ND	1.9
10 K-9-M12	2.3	2.0	2.0	18.8	ND	ND	1.6
11 K-9-M13	2.7	1.8	-2.0	18.2	ND	ND	1.9
12 ALM91	2.4	2.0	1.0	18.7	ND	ND	1.6
13 AL1	2.5	1.6	1.0	18.5	ND	ND	2.8
14 ALK9	2.4	1.7	-1.0	18.2	ND	ND	1.8

* ND, Not detected. (Less than 3 ppm and 10 ppb contents could not be detected for urea and ECA, respectively)

Table 3 General components, Urea, ECA, and Sensory Score of Sake Brewed with the Mutants from Kyokai No. 10.

Strains	Acidity	Amino acidity	Sake meter	Alcohol (%)	Urea (ppm)	ECA (ppb)	Sensory score
1 K-10 (Parent)	2.0	1.8	2.0	18.4	38.7	106	1.5
2 K 10-M 1	2.4	1.8	-1.0	18.2	ND*	ND*	1.9
3 K 10-M 3	2.2	1.7	-5.0	18.0	ND	ND	1.6
4 K 10-M 7	1.9	1.8	-1.0	18.1	ND	ND	1.6
5 K 10-M 18	2.0	1.8	0.0	18.5	ND	ND	1.9
6 K 10-M 32	2.2	1.9	0.0	18.5	18.8	66	2.4
7 ALM 101	2.0	2.1	-2.0	18.1	ND	ND	1.9

* ND, Not detected.

なかったことからアルギナーゼ欠損株と判定された。これらを K 9-M 1 から K 9-M 13 と命名した (Table 2)。これらのうち、YPD 培地での生育が親株と同様のものを 10 株選び次の小仕込試験に使用した。同様にして、K-10 では 6 株がアルギナーゼ欠損株と判定され、YPD 培地での増殖のよい 5 株 (K 10-M 1, -M 3, -M 7, -M 18, -M 32) を小仕込に使用した (Table 3)。これら是对数増殖期の酵母細胞を用いた結果であるが、静止期の細胞を用いた変異株の取得でも K-9 では CAO 培地で単離した株の 70% 以上が、K-10 では約 30% がアルギナーゼ欠損株であり、対数増殖期の細胞を用いた時とほぼ同様の結果が得られた。取得率においてはむしろやや高いようであった。

2. 変異株による小仕込試験

親株である K-9 と今回取得した変異株 10 株、それに前回 EMS 変異処理により取得した変異株 ALM 91 株、および CAR1 遺伝子破壊により育種した AL1, ALK 9 の 2 株を用いて小仕込試験を行った。同様にして、親株 K-10 と今回取得した変異株 5 株、それに前回取得した ALM 101 株を使用した小仕込を行った。代表例として K 9-M 12 と K 10-M 7 についての発酵経過をそれぞれ Fig. 1, Fig. 2 に示す。今回得られた変異株ではいずれも親株との発酵特性に大きな差は認められなかった。

3. 製成酒の一般成分、ウレア、ECA およびきき酒結果

製成酒の一般成分は Table 2, 3 に示すように、個々の仕込によるバラツキは認められたものの全体としては親株と比べ特に差は認められなかった。ウレアについては、K-9 では親株が 25.4 ppm に対して、いずれも不検出であった。K-10 では親株が 38.7 ppm であった。変異株として取得した K 10-M 32 では 18.8 ppm 検出されたが、それ以外の変異株はすべて不検出であった。K 10-M 32 は親株の混入か使用菌株の復帰変異によるためと思われる。ECA については、K-9, K-10 がそれ

Fig. 1 Sake Brewing using *car1* Mutant and its Parent Strain, Kyokai No. 9. **Fig. 2** Sake Brewing using *car1* Mutant and its Parent Strain, Kyokai No. 10.

ぞれ 78 ppb, 106 ppb であったのに対しウレア不検出の清酒からは ECA も不検出であった。

3 点法によるきき酒では、いずれの清酒も対照酒と比べ大きな差は認められなかった。これらのことから、EMS 等の変異処理をせずに取得したアルギナーゼ欠損株もウレア非生産性であり、ECA の生成されない清酒の製造が可能であることが確認された。

Table 4 General Components, Urea, ECA, and Sensory Score of Sake Brewed with the Mutants from Kyokai No.9 (Laboratory Scale Brewing Experiment No.2).

Strains	Acidity	Amino acidity	Sake meter	Alcohol (%)	Urea (ppm)	ECA (ppb)	Sensory score
1 K-9	1.8	1.8	11.0	19.2	36.8	88	2.4
2 K-9-M12	2.2	1.9	10.0	18.8	ND*	ND*	2.0

* ND, Not detected.

考 察

1 倍体株である実験室株 X 2180-1 A では CAO 培地で生育してくる大きなコロニーのうち、ほぼ 100% がアルギナーゼ欠損株であった。K-9, K-10 では CAO 培地でのコロニーが現れるのに約 1～2 週間と長い時間を要したが、1 倍体株の X 2180-1 A ではほぼ 1/2 の 3 日～1 週間ほどで現れた。

今回の方法による変異株の単離では、EMS 変異処理による単離に比べ、取得頻度は低く、かつ所要日数も長かった。これらのことは、2 倍体である清酒酵母では CAR1 遺伝子にホモに変異が入らねばアルギナーゼ欠損とならないために gene conversion の時間が必要であることを示唆している。対数増殖期と静止期の細胞では、静止期まで長時間培養した細胞の方がやや取得頻度が高かったことと関連があるかもしれない。この点については、もっと多くの実験が必要であろう。

EMS 変異処理により取得した変異株では、小仕込試験の発酵経過等で遅れるものが見られるが³⁾、今回の変異株では親株といずれも大きな差がなかった。このことは、実用株での育種において可能ならば変異処理を行わずに目的とする株を単離することの重要性を示していると思われる。

なお、今回の変異処理を行わずに取得した株 (K-9 由来の 10 株, K-10 株由来の 5 株) のうち 1 株 (K 10-M 32) で、小仕込試験でウレアが生成された。大部分の 14 株でウレアが不検出であったことから、この K 10-M 32 株についての再仕込試験等は行っていないが、アルギナーゼ遺伝子内部の変異は 1 塩基の変異であることが想定されるので、この株では復帰変異が起こったことも考えられる。

そこで、発酵特性の良好であった K 9-M 12 を選び再現性を見るための 2 回目の小仕込試験を行った。Table

4 に示したように、ウレア、ECA ともに不検出であることが確認された。また、植え継ぎ等による安定性に関しても、これまでの変異処理により取得した株と大差なく、変異処理をしていないことによる不安定性は特に認められなかった。以上のことから、今回の取得法のように自然変異による単離株の方が、実際の清酒醸造を考えると EMS 等の変異処理により取得した株より優れていると考えられる。

要 約

1. 清酒酵母協会 9 号, 10 号由来のアルギナーゼ欠損変異株 (*car1* 変異株) を変異処理をせずに取得することができた。
2. この変異株を使用した小仕込試験により、ウレアを含まない清酒の製造が可能であった。これらの清酒では対照酒が約 100 ppb の ECA を生成する加熱処理条件によってもウレアを含まない清酒からは ECA は検出されなかった。
3. ウレア非生産性清酒酵母による醗の発酵経過、生成酒の一般成分、きき酒結果等、親株と大きく変わった点は認められなかった。

文 献

- 1) K. KITAMOTO, K. ODA, K. GOMI and K. TAKAHASHI: *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 301 (1991)
- 2) 小田 佳緒子, 北本 勝ひこ: 醸協, 86, (2) 99 (1991)
- 3) K. KITAMOTO *et al.* (*J. Ferment. Bioeng.*) 投稿中
- 4) 難波康之祐, 小幡孝之, 萱島 進, 山崎与四良, 村上光彦, 下田高久: 醸協, 73, (4) 295 (1978)
- 5) 注解編集委員会編: 国税庁所定分析法注解, (財) 日本醸造協会
- 6) 加藤 泉, 下飯 仁, 蓼沼 誠, 原 昌道, 吉沢 淑, 田村學造: 醸協, 84, (5) 349 (1989)