

技術資料

オルニチン高生産清酒酵母で醸造した清酒中の尿素及び カルバミン酸エチルの同時定量

大橋 正孝^{*1)}, 高木 博史^{*2)}

Simultaneous determination of urea and ethyl carbamate in sake brewed with ornithine-overproducing sake yeast

OHASHI Masataka^{*1)}, TAKAGI Hiroshi^{*2)}

おそらく発がん性があるとされるグループ2Aに属するカルバミン酸エチルとその前駆体である尿素を、蛍光検出器付き超高速液体クロマトグラフィーにより同時定量するメソッドを開発した。そのメソッドを使って、オルニチン高生産株である A902-4 株を用いて醸造された清酒中のカルバミン酸エチルと尿素の含有量を測定した結果、協会酵母 (K701 株, K901 株) を用いて醸造された清酒中と同程度であった。

1. 緒言

カルバミン酸エチル (EC) は、酒類を含む発酵食品に含まれる成分で、国際がん研究機関において、おそらく発がん性があるとされるグループ 2A に分類されている¹⁾。日本国内では、EC は食品衛生法により規制されていないが、一部の国 (カナダ) で清酒に対する EC の規制値が定められている²⁾。そのため、海外への輸出を考えると、清酒中の EC 含有量を把握することが望ましい。清酒醸造において、EC は清酒酵母の細胞内でアルギニンがオルニチンと尿素に変換された後、火入れや貯蔵の過程で尿素とエタノールとの化学反応によって生成される³⁾。清酒中の尿素濃度が高いほど EC が生成されやすい²⁾ことが知られているため、清酒中の EC とその前駆体である尿素の濃度を同時に把握することが必要となる。我々は、これまでに細胞内にオルニチンを高生産する清酒酵母の変異株 (A902-4 株) を分離し、A902-4 株を用いて醸造した清酒にはオルニチンが高含有されていることを報告している⁴⁾。その清酒の醸造には、尿素の生成に関連するオルニチンを高生産する酵母を用いているため、清酒中の尿素及び EC の濃度が上昇している可能性がある。これまでの分析方法では、市販測定キット⁵⁾を用いて尿素を、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)²⁾を用いて EC を別々に定量しなければならないため、操作が煩雑で時間を要するという欠点

があった。一方、尿素及び EC をキサンチドロールで誘導体化 (図 1) して、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって、同時定量した事例が報告されている⁶⁾。そこで、HPLC よりも迅速に測定可能な超高速液体クロマトグラフィーを用いて、一般的に清酒醸造で使用される協会酵母 (K701 株, K901 株) とオルニチン高生産株 (A902-4 株) で醸造した清酒中の尿素及び EC を同時に定量した。

2. 実験方法

2.1 菌株及び培地

酵母として、二倍体清酒酵母 K901 株, K701 株, A902-4 株を用いた。

米麹 1kg に水 3L を加えて 55℃で一晩加温後ろ過搾汁し得られた麹汁を、Brix 10 となるように水で希釈し、乳酸で pH を 3 に調整し、オートクレーブで滅菌したものを麹汁液体培地とした。麹汁液体培地を用いて、酵母を 30℃で 48 時間培養した。

2.2 試薬

富士フイルム和光純薬工業株式会社製の尿素、カルバミン酸エチル、酢酸ナトリウム、アセトニトリル、キサンチドロールを用いた。

2.3 装置

株式会社アタゴ製デジタル糖度計 PR-100 を用いて Brix を測定した。清酒の酸度、アミノ酸度を滴定で測定した。アントンパール製振動密度計 DMA 4100M を用いて、清酒

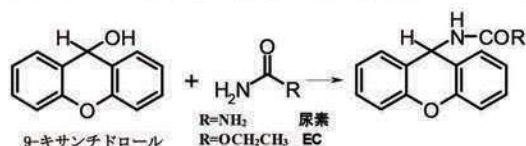


図 1 キサンチドロールによる尿素・EC の誘導体化

^{*1)} メディカル技術支援科 (現: バイオ・食品グループ)

^{*2)} 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学

のアルコール濃度, 日本酒度を測定した. 島津製作所製 UF-Amino Station を用いて, 清酒中のアミノ酸含量を測定した. Waters 社製 UPLC™ (蛍光検出器付き) を用いて, 清酒をキサントドロールで誘導体化後, 尿素, カルバミン酸エチル含量を測定した.

2.4 清酒小仕込み試験

K901 株, K701 株, A902-4 株を用いて, 総米 46g の清酒小仕込み試験 (一段仕込み) を行った. α 化米 36.4 g に乾燥麹米 9.6 g, 90% 乳酸 50 μ L, 培養した酵母を含む水 87 mL を加えて, 15°C, 28 日間培養した. もろみを遠心分離し, 上清を清酒として得た.

2.5 サンプル誘導体化

過去の文献⁹⁾を参考にして, 誘導体化を行った. 尿素及びカルバミン酸エチルを水に溶解し, 10, 1, 0.1, 0.01 μ g/mL の混合標準溶液を調製した. それぞれの混合標準溶液 0.6 mL に, 20mM キサントヒドロール (1-プロパノール溶液) 0.4 mL と 1.5 M 塩酸 0.1 mL を添加して, 30°C, 30 分間暗所で反応させた後, メンブレンフィルター (0.45 μ m) でろ過して, 標準溶液用サンプルとした. また, 清酒を混合標準溶液と同様に誘導体化後, メンブレンフィルター (0.45 μ m) でろ過して, 清酒用サンプルとした.

2.6 UPLC™による尿素・カルバミン酸エチルの定量

過去の文献⁹⁾を参考にして, 尿素・カルバミン酸エチルの測定を行った.

分離カラムに Waters 社製 Acquity UPLC™ HSS T3 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μ m) を用いた. カラム, 移動相, グラジエント条件, オープン温度, 注入量, 蛍光検出器における励起波長および蛍光波長について, 図 2 に示すとおりである. 絶対検量線法により, 尿素, カルバミン酸エチル量を定量した.

Column : UPLCHSS T3 150×2.1mm 1.8 μ m			
移動相 :			
A液 20mM CH ₃ CO ₂ Na (pH 7.2)			
B液 CH ₃ CN			
グラジエント条件			
時間 (分)	流量 (mL/分)	A液 (%)	B液 (%)
0	0.4	75	25
20	0.4	20	80
23	0.4	0	100
25	0.4	75	25
オープン温度 30°C			
注入量 10 μ L			
蛍光検出器条件			
励起波長 (nm)		蛍光波長 (nm)	
240		308	

図 2 UPLC™条件

高い値を示したが, 原因は不明である.

表 1 清酒の成分分析値

株	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	エタノール (%)	日本酒度
K901	3.6	1.9	18.9	8.2
K701	3.2	2.1	20.1	13.1
A902-4	3.2	2.0	19.2	8.5

3.2 清酒中のオルニチン, アルギニン及びプロリン含量

表 2 に, 清酒に含まれるオルニチン, アルギニン及びプロリン含量を示す. A902-4 株で醸造された清酒に含まれるオルニチン量は, それ以外の株で醸造された清酒と比較して 2 倍以上増加し, 醸造過程においてオルニチンを高生産していた. A902-4 株で醸造された清酒に含まれるプロリン量は若干増加していたが, アルギニン含量は大きく増加していなかったことから, オルニチン高生産は主として生合成経路上流のフラックス増加によるものと考えられた.

表 2 清酒中の遊離アミノ酸量

株	単位: μ g/mL		
	オルニチン	アルギニン	プロリン
K901	17	489	183
K701	43	572	198
A902-4	95	559	235

3.3 尿素及び EC の検量線及び定量限界

尿素, EC の検量線は, 0.01~10 μ g/mL の範囲内で高い直線性 ($r^2>0.9999$) を示した (図 3). 尿素及び EC の定量下限値は, $S/N>10$ で, 0.01 μ g/mL であった. また, 尿素と EC の保持時間は, それぞれ 7.8 分, 16.1 分であり, 過去の HPLC で測定した文献⁹⁾と比較して, 保持時間 (尿素: 13.8 分, EC: 20.6 分) が短縮され, 迅速な分析が可能であった.

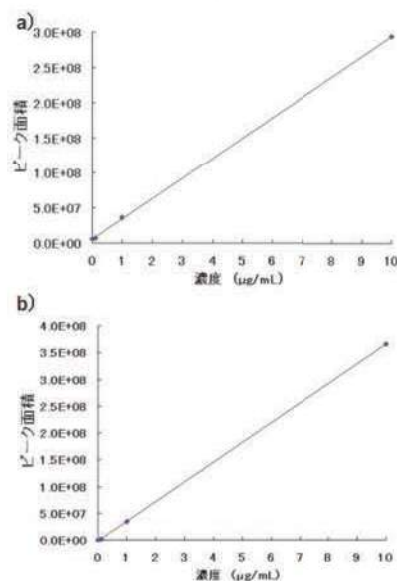


図 3 a) 尿素, b) EC の検量線

3. 結果及び考察

3.1 清酒中の成分分析

表 1 に, 清酒の成分分析値を示す. オルニチン高生産株である A902-4 株で醸造した清酒の酸度, アミノ酸度, エタノール含量について, 協会酵母である K701 株や K901 株で醸造した清酒と同程度の値であった. K701 株を用いた清酒の日本酒度は, それ以外の株で醸造した清酒より

3.4 清酒中の EC 及び尿素含量

表 3 に、清酒中の EC 及び尿素含有量を示す。A902-4 株で醸造した清酒中の尿素含有量は、協会酵母である K901 と K701 株で醸造した清酒中の量の間程度であり、特に増加していなかった。また、A902-4 株で醸造した清酒中の EC 量は、K901 と K701 株で醸造した清酒中とほぼ同程度であった。

表 3 清酒中の EC および尿素含有量

株	EC ($\mu\text{g/mL}$)	尿素 ($\mu\text{g/mL}$)
K901	0.05	17
K701	0.05	26
A902-4	0.05	22

図 4 に示すように、酵母のミトコンドリア内で、グルタミン酸から種々の酵素反応によって、オルニチンが生成された後、細胞質でオルニチンがシトルリン、アルギノコハク酸、アルギニンに変換され、アルギニンが尿素に分解する際にオルニチンが再生される。通常、*N*-アセチルグルタミン酸をリン酸化する酵素である *N*-acetyl glutamate kinase (NAGK) 活性は、アルギニンによるフィードバック阻害を受ける⁷⁾。ところが、A902-4 株では、NAGK をコードする *ARG6* 遺伝子に変異が生じ、NAGK の Thr340 が Ile にアミノ酸残基置換されることによって、NAGK 活性のアルギニンによるフィードバック阻害感受性が減少することで、オルニチンが高生産される⁸⁾。ただ、アルギニンの尿素への分解が促進されることが、オルニチンの高生産に寄与している可能性があるため、今回、オルニチン高生産株である A902-4 株を用いて醸造された清酒中の EC あるいは尿素含有量を測定したが、協会酵母で醸造された清酒中の尿素含有量と大きな差がなかった。向井らの報告⁹⁾では、清酒 125 点中の EC 及び尿素含有量は、それぞれ 0~0.210 $\mu\text{g/mL}$ 、0~32.3 $\mu\text{g/mL}$ であった。今回の A902-4 株で醸造された清酒中の EC 及び尿素含有量は、その報告の範囲内であった。また、カナダの清酒中に含まれるカルバミン酸エチルの規制値 (0.2 $\mu\text{g/g}$; 清酒では概ね $\mu\text{g/mL}$

と同程度)²⁾と比較して、オルニチン高生産株で醸造された清酒の EC 含有量 (0.050 $\mu\text{g/mL}$) は、低かった。

4. 結言

協会酵母 K701 株、K901 株で醸造された清酒と比較して、オルニチン高生産株である A902-4 株を用いて醸造された清酒中の EC 及び尿素含有量は、同程度であり、過去の文献に記載された量の範囲内であった。また、オルニチン高生産株で醸造された清酒の EC 含有量は、カナダの清酒中の規制値より低かった。

参考文献

- 1) List of Classifications, Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1-140. IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. IARC. <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications>.
- 2) ボルジギン ソリナ, 磯谷敦子, 向井伸彦, 長期熟成酒のカルバミン酸エチル含有量の調査, 酒類総合研究所報告, 45-49(2023).
- 3) 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, F1-F4(2022).
- 4) 大橋正孝, 那須野亮, 磯貝章太, 高木博史, オルニチン高生産清酒酵母の分離, 奈良県産業振興総合センター研究報告, 47, 21-27(2021).
- 5) 長井隆, 鈴木利明, 星野敦, 栗林喬, 原崇, 城斗志夫, 市販測定キットを利用した清酒中の尿素の簡易定量分析, 醸協, 115, 109-114(2020).
- 6) Zhang, J., Guoxin, L., Zhang, Y., Gao, Q., Wang, D., Liu, H., Simultaneous Determination of Ethyl Carbamate and Urea in Alcoholic Beverages by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.* 62, 2797-2802(2014).
- 7) Pauwels, K., Abadjieva, A., Hilven, P., Stankiewicz, A., Crabeel, M., The *N*-acetylglutamate synthase / *N*-acetyl glutamate kinase metabolon of *Saccharomyces cerevisiae* allows coordinated feedback regulation of the first two steps in arginine biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 270, 1014-1024(2003). <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03477.x>.
- 8) Ohashi, M., Nasuno, R., Isogai S., Takagi H., High-level production of ornithine by expression of the feedback inhibition-insensitive *N*-acetyl glutamate kinase in the sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 62, 1-9(2020).
- 9) 向井伸彦, 木曾邦明, 酒類の安全性に関する調査 (第4報), 醸協, 100, 705-714(2005).

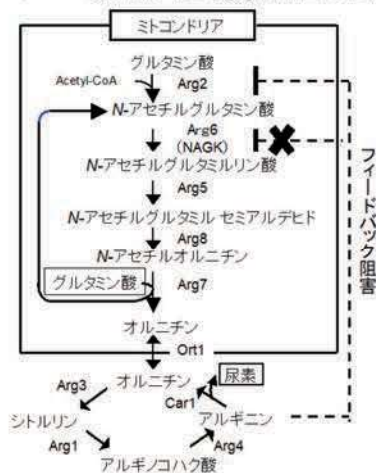


図 4 オルニチン生成経路