

博士論文

酒類製造工程における微生物叢変遷の解析と微生物叢解析のための
新規技術の開発に関する研究

平成 27 年 9 月

高橋 正之

目次

略号	1
第1章 緒言	3
1.1. はじめに	3
1.2. 先行研究における課題	3
1.3. 微生物叢解析手法の進歩と多様化	4
1.4. 近年の日本における酒類産業の現状	5
1.5. 本論文の目的と構成	5
第2章	
培養法及び分子生物学的手法を用いた亜硫酸添加／無添加ワイン中の微生物叢の評価 ...	12
2.1. 序言	12
2.2. 実験材料と方法	13
2.2.1. 使用した試薬及び培地	13
2.2.2. 供試菌株	14
2.2.3. ワイン醸造	14
2.2.4. DNA 抽出	15
2.2.5. PCR 条件	15
2.2.6. PCR 産物の DGGE 解析	15
2.2.7. DNA 塩基配列の決定及び微生物種の推定	15
2.2.8. 培養法での生菌数測定	16
2.2.9. コロニー形成微生物種の推定	17
2.2.10. 統計解析	17
2.3. 結果	17
2.3.1. 発酵経過の概要	17

2.3.2. PCR-DGGE 法を用いた発酵中の赤及び白ワインマスト中の微生物叢の解析	17
2.3.3. PRC 解析	18
2.3.4. 培養法を用いた微生物叢解析	18
2.3.5. 市場流通ワインの PCR-DGGE 法による解析	19
2.3.6. ワイン中の <i>Propionibacterium acnes</i> .	19
2.4. 考察	19
2.5. 図表	23
2.6. 小括	35
第3章	
培養法及び分子生物学的手法によるビール系酒類醸造工程の微生物叢の評価	36
3.1. 序言	36
3.2. 実験材料と方法	37
3.2.1. 使用した試薬及び培地	37
3.2.2. ビール醸造	37
3.2.3. 麦汁及びビールの一般分析	38
3.2.4. DNA 抽出	38
3.2.5. 次世代型シーケンサーによる解析	38
3.2.6. 定量 PCR	39
3.2.7. 細菌数の推定法	39
3.2.8. 蛍光 <i>in situ</i> hybridization 及びフローサイトメトリー	40
3.2.9. 統計解析	40
3.2.10. 培養条件	41
3.2.11. コロニー形成微生物種の推定	41
3.3. 結果	42
3.3.1. 発酵経過の概要	42

3.3.2. ビール発酵過程における微生物叢の変遷	42
3.3.3. ビール系酒類醸造過程における細菌叢	42
3.3.4. ビール系酒類醸造過程における真核微生物叢の変遷	43
3.3.5. 発酵工程中及び貯蔵中の細菌の消長	44
3.4. 考察	44
3.5. 図表	47
3.6. 小括	63

第4章

改変 COLD-PCR によるワイン発酵もろみ中に存在する低存在比率微生物の検出 64

4.1. 序言	64
4.2. 実験材料と方法	65
4.2.1. 使用した試薬及び培地	65
4.2.2. 供試菌株	65
4.2.3. サンプルの調製	65
4.2.4. DNA 抽出	66
4.2.5. PCR 条件	66
4.2.6. PCR 産物の DGGE 解析	66
4.2.7. <i>in vitro</i> transcription 用鋳型 DNA の調製	66
4.2.8. dsRNA プローブの作成	67
4.2.9. 融解曲線解析	67
4.2.10. mCOLD-PCR 条件	67
4.2.11. DNA 塩基配列の決定及び微生物種の推定	68
4.2.12. 統計解析	68
4.2.13. 次世代型シーケンサー解析	68
4.3. 結果	68
4.3.1. モデル実験系における mCOLD-PCR 法の検証	68

4.3.2. mCOLD-PCR 法の DGGE 法を用いた微生物叢解析への応用	69
4.3.3. 長鎖核酸断片の増幅への mCOLD-PCR 法の適用	70
4.3.4. 次世代型シーケンサーを用いた微生物叢解析への mCOLD-PCR の適用..	70
4.4. 考察	70
4.5. 図表	74
4.6. 小括	83
第5章 要旨	84
引用文献	87
公表論文	97
謝辞	98

略号

AAB	Acetic acid bacteria
BLAST	Basic local alignment search tool
CFU	Colony forming unit
COLD-PCR	CO-amplification at lower denaturation temperature PCR
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DMDS	Dimethyl disulfide
DMS	Dimethyl sulfide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
EDTA	Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FAM	carboxyfluorescein
FCM	Flowcytometry
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
FITC	Flourescein isothiocyanate
ITS	Internal transcribed spacer
JCM	Japan Collection of Microorganism
LAB	Lactic acid bacteria
LSU-rRNA	Large subunit rRNA
MacQIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology for Mac
MID	Multiplex identifier
MLF	Malolactic fermentation
NGS	Next-generation sequencer
OTU	Operational taxonomic unit
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PRC	Principal response curve analysis
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	ribosomal RNA
RS	Reference sequence
SCABA	ServoChem Automatic Beer Analyzer
SDS	sodium dodecyl sulfate
SNPs	Single nucleotide polymorphisms

SSCP	Single strand conformation polymorphism
SSU-rRNA	Small subunit rRNA
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TAMRA	carboxytetramethylrhodamine
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
tRNA	transfer RNA
TTGE	Temporal temperature gradient gel electrophoresis
VBNC	Viable but nonculturable

第1章 緒言

1.1. はじめに

酒類はもっとも古くから造られている発酵飲食品の一つであり、遺物の記録や出土した容器などから、紀元前 3000 年～4000 年頃の文明ではすでにワインやビールを造っていたと考えられている (Michel and McGovern, 1992; Feasey, 2007)。その製造には、微生物の代謝(発酵)が深く関与しており、酵母などの一部の微生物は酒類製造にはなくてはならない存在である一方、酒類中で生育する多くの微生物は酒類の香りや味を変質させ、品質を劣化させる(すなわち腐敗させる)有害な存在である。酒類は、人類に長く親しまれてきた嗜好品であるが、個人の嗜好に違いがあるとはいえ、大半の消費者が嫌悪感を抱く香りや味は忌避され、製造工程中でそのような欠点を与える要因は可能な限り排除されるように改良が続けられてきた。

一例をあげると、清酒、ワイン、ビールで嫌われる香气成分としてバターやヨーグルトなどの乳製品様の香りを感じさせるジアセチルがある。これは *Lactobacillus* 属や *Pediococcus* 属などの乳酸菌群の生育などによって生じることが知られており、ワインで用いられるマロラクティック発酵(以下、「MLF」という。)のような意図的な乳酸菌の生育以外は、乳酸菌の生育抑制は醸造酒類製造において、もっとも重要な品質管理点となっている。

酒類醸造産業は、農産物及び微生物を利用した産業であるため、その品質は原料、温度管理等の各種操作、醸造用微生物の種類やその他の微生物の生育等により影響を受けるという特徴がある。中でも、好ましくない微生物による汚染は、品質に与える影響が極めて大きいために、これまでも精力的に研究がなされてきており、表 1.1. 及び表 1.2. に示すとおり多種にわたる微生物がワインやビールの品質に対して様々な影響を与えることが報告されている (Crowell and Guymon, 1975; Rainbow, 1981; Romano and Suzzi, 1993; Jespersen and Jakobsen, 1996; Jackson, 2008; Bisson and Joseph, 2009; Guillamón and Mas, 2009; König and Fröhlich, 2009)。

1.2. 先行研究における課題

これまでの研究は、そのほとんどがワインやビールなどのサンプルを直接培地に加えて、生育したコロニーや菌体を同定するといった培養法による解析が行われてきた。しかしながら、培養法による解析では、培養条件や培地の組成などによって生育してくる微生物が大きく異なるほか、生育速度の速い微生物が共存している条件では、至適の培地であっても生育の遅い微生物を見落とすことや、培地成分中に特定の細菌の生育を阻害する物質が含まれることがあるなど、網羅的に微生物を検出することは困難であった (Gans *et al.*, 2005; Hara *et al.*, 2012)。それらの微生物に関して、たとえ存在していたとしても酒類環境下で生育しなければ、品質に与える影響は小さく問題は少ないとも考えられるが、技術の進歩や製品コンセプトの多様化により従来と異なった環境になった場合に、これまでに汚染微生物とは考えられていなかった微生物が生育してくるリスクが存在している。例えば、*Pectinatus* 属細菌と *Megasphaera cerevisiae* はいずれも偏性嫌気性細菌であり、それぞれ 1978

年、1985年に汚染されたビールから初めて単離された (Lee *et al.*, 1978; Engelmann and Weiss, 1985)。 *Pectinatus* 属細菌や *Megasphaera cerevisiae* は嫌気的条件下で生育し、ビールの品質に悪影響を与えることが明らかとなっている (表 1.2.)。近年、これらの微生物が問題となってきたのは、瓶詰等の技術が進歩した結果、瓶内中の溶存酸素が減少したことにより、偏性嫌気性細菌が生育可能となったためである (Van Vuuren and Priest, 2003)。また、 *Selenomonas* 属細菌は 2000 年代に入るまでビール中では生育しないと考えられていたが、近年の研究により、ビール中で生育することが明らかとなった (Vaughan *et al.*, 2005)。

このように、新規製法の導入や特殊な製品環境中では生育可能となる、あるいは、未知の潜在的な汚染微生物が未だ存在している可能性がある。そのような微生物を効率的に検出するには培養によるバイアスが検出可否に大きく影響するため、培養を介さない手法により微生物を網羅的に検出することが望ましい。

1.3. 微生物叢解析手法の進歩と多様化

分子生物学的手法の発展に伴い、容易に核酸の塩基配列を解析することが可能になったことで、微生物の同定も特定の遺伝子の塩基配列に基づいて行われるようになってきた。多くの場合マーカー遺伝子として rRNA 遺伝子が用いられるが、その理由として、①すべての生物に共通して存在する遺伝子であることや、②微生物種によって多様性の高い可変領域とほとんど差のない保存領域が複数存在するためユニバーサルプライマーを設計できること、③データベースが整備されていることなどが挙げられる (図 1.1.)。rRNA 遺伝子等の核酸配列を微生物種同定に利用可能であることが明らかとなってから、様々な分子生物学的手法による微生物叢解析技術が開発されてきた。ユニバーサルプライマーを用いれば環境中に存在する微生物の rRNA を網羅的に増幅できるが、得られる増幅産物の塩基長はほぼ同程度となるため、各微生物由来の断片を分離する手法が必要であった。増幅産物を分離する手法として 1980 年代後半にクローンライブラリー法を用いた手法が開発され、環境中の微生物を培養することなく検出することができるようになった (Pace *et al.*, 1986)。クローンライブラリー法では、解析したクローンの数が得られる微生物叢の緻密さに直結するため、できるだけ多く解析することが望ましいが、微生物叢の経時的な変化を追跡する場合などでは多大な労力を必要とすることが欠点であった。1990 年代には、同一塩基長の核酸断片であっても塩基配列依存的に各断片の分離が可能な電気泳動法である DGGE 法が微生物叢解析に応用できることが報告された (Muyzer *et al.*, 1993)。DGGE 法では分離可能な塩基長に制限があるものの、簡便に低コストで多くの試料の微生物叢解析を行うことができるようになった。いずれの技術でも、培養によるバイアスが問題とならないため難培養性微生物の検出が可能であるばかりでなく、従来のように微生物種の同定を行う際に形態学的、生理学的な専門知識が必ずしも必要ではないことも利点として挙げられる。さらに、近年開発された、いわゆる次世代型シーケンサーは 1 回の分析で数億～数兆塩基対にも上る膨大な塩基配列データを取得することができるため、微生物叢解析に応用することで、非常に詳細な微生物叢を解析することが可能である。現在、微生物叢解析で主流となっている rRNA 遺伝子をターゲットとした PCR-DGGE 法による解析や、次世代型シーケンサー

を用いた解析は比較的簡便で得られる情報量の多い強力なツールであり、環境中などの細菌叢解析では近年報告数が増加している。

1.4. 近年の日本における酒類産業の現状

日本における酒類業への新規参入は、1994年の酒税法の改正に伴う小規模製造者のビール事業参入により本格的に始まり、製造場数自体は減少しているものの販売数量は増加傾向にある。ワインに関しても構造改革特別区域制度による果実酒の小規模製造者の参入により今後増加が見込まれるほか、国内で製造されている果実酒も増加している（図 1.2. 及び図 1.3.）。近年、市場も拡大してきており、ますます品質の管理が重要な課題となっている。

また、消費者の嗜好の多様化への対応や他社との差別化が必要との背景から、現在も各社多くのアイテムを製造しているが、今後もより一層製法や商品品質の多様化が進む可能性があり、従来生育しなかった微生物による汚染のリスクが存在する。

1.5. 本論文の目的と構成

本論文では、ワインとビールについて、前述のツールを用いて、従来解析対象となっていなかった微生物も含め、酒類醸造工程中の詳細な微生物叢を改めて解析し、微生物汚染のリスク軽減に役立つ情報を収集することを目的として研究を実施した。

第2章では、ワインの醸造工程及び市販ワインについて微生物叢解析を実施した。近年、消費者の食の安全性への意識の高まりを受けて、保存料などの食品添加物を添加しない飲食品が増加傾向にあり、ワイン醸造においても、抗酸化作用や微生物の生育抑制作用を持つ亜硫酸を添加していないワインが市場で流通している。ワインの原料であるブドウ果皮等には多種の微生物が存在していることが報告されているが (Barata *et al.*, 2012)、ブドウは製造開始時に殺菌されるわけではない。ワイン製造においては雑菌の生育抑制は低 pH や、亜硫酸塩等の添加、多量の酵母添加などによって達成されている。そのため、これまでも、製造工程における亜硫酸添加の細菌叢への影響を調べた報告は多く、亜硫酸添加が乳酸菌や野生酵母の生育抑制に与える影響については、Romano と Suzzi (1993) が、*Wine Microbiology and Biotechnology* の中で詳細に解説している。近年では、Andorrà ら (2008) が、分子生物学的手法を用いて乳酸菌、酢酸菌、野生酵母に亜硫酸添加が与える影響を評価しており、亜硫酸添加により乳酸菌を低いレベルに保つことが可能であると報告している。しかしながら、これまでの研究は、乳酸菌や野生酵母などを主な対象としており限定的であったことから、ワイン醸造工程及び市販ワイン中の微生物叢に対する亜硫酸塩添加の影響を、培養法と PCR-DGGE 法を用いて解析し、野生酵母や乳酸菌に限らず、幅広い微生物について評価した。

また、第3章では、ビールや発泡酒等の醸造工程における微生物叢の変遷を調べた。通常、ビール醸造はプラントで行われることが多く、初期に原料を煮沸した上で密閉されたタンク中で発酵するのに加えて、抗菌作用を有するホップ成分を含むため、ある程度微生物の管理ができていると考えられていた。そのため、近年開発された分子生物学的手法を

用いた解析の報告は、ランビック等の微生物の混入が起りやすいタイプに限られ、一般的なビールについては少ない現状にあった (Bokulich *et al.*, 2012a)。さらに、消費者の嗜好の多様化や、日本の税体系上、麦芽使用比率の違いによって賦課される税金が異なることもあり、麦芽の一部の代わりに大麦を使用する醸造法も用いられ、これまでとは異なる微生物叢となっている可能性がある。そこで、次世代型シーケンサーを用いて、ビール及び発泡酒の醸造工程中の詳細な微生物叢を解析し、どのような微生物がどの工程で消失し、また、増加するかを定量的に調べることにした。

上述の解析で、特に真菌叢の解析において、大きな障害となったのは、発酵開始時に添加する醸造用酵母であった。網羅的に調査することが目的のため、真菌全般を対象として検出可能な PCR 用プライマーセットを用いる必要があり、その結果、当然ながら醸造用酵母も検出対象に含まれることになる。通常、汚染リスクを回避するため、発酵開始時に多量の醸造用酵母を添加するので、検出される微生物のほとんどが醸造用酵母となり、醸造工程中における醸造用酵母以外の詳細な真菌叢を網羅的に把握することは、極めて困難であった。また、真菌叢に限らず、醸造用酵母中のオルガネラが細菌叢検出用の PCR 用プライマーセットで検出されることもあり、細菌叢解析に影響が出る可能性があるため、醸造用酵母を対象とせず、その他の微生物を網羅的に検出する技術の開発が求められていた。そこで、第4章では、SNPs を有する野生型と変異型の核酸混合物から変異型のみを優先的に増幅する PCR 手法の一つである Improved and complete enrichment co-amplification at lower denaturation temperature PCR (*ice-COLD-PCR*) (図 1.4.) から着想を得て、特定の配列の核酸の増幅を抑制し、その他の配列の核酸を優先的に増幅する PCR 手法の開発を行い、ワイン醸造工程中における醸造用酵母以外の真菌叢の解析を試みた。

表 1.1. ワイン醸造工程や製品ワイン中で見られる微生物と酒質への影響

関与する微生物	酒質に与える代表的な影響※
<i>Lactobacillus</i> 属細菌	ジアセチル(バター様臭)の生成 酒石酸の代謝による pH の上昇や味の変化 グリセロールの代謝によるアクロレインの生成(苦味の増強) 酢酸やマンニトールの生成 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine (クラッカー臭)の生成 ソルビン酸の代謝による 2-ethoxy-3,5-hexadiene (ゼラニウム様臭)の生成
<i>Pediococcus</i> 属細菌	ジアセチル(バター様臭)の生成 ポリサッカロイドの生成により粘度を上昇 グリセロールの代謝によるアクロレインの生成(苦味の増強)
<i>Leuconostoc</i> 属細菌	酢酸等やマンニトールの生成
<i>Oenococcus</i> 属細菌	ソルビン酸の代謝による 2-ethoxy-3,5-hexadiene (ゼラニウム様臭)の生成 システインの代謝により硫化水素もしくは 2-メルカプトエタノールを生成 メチオニンの代謝により DMDS などを生成
<i>Streptomyces</i> 属細菌	(-)-geosmin や 2-methylisoborneol(カビ臭)の生成
<i>Paenibacillus</i> 属細菌	グリセロールの代謝によるアクロレインの生成(苦味の増強)
<i>Weissella</i> 属細菌	酢酸等やマンニトールの生成
<i>Acetobacter</i> 属細菌	酢酸やジヒドロキシアセトン、グルコン酸の生成に関与
<i>Gluconobacter</i> 属細菌	酢酸やジヒドロキシアセトン、グルコン酸の生成に関与
<i>Clostridium</i> 属細菌	酢酸やアセトン、n-酪酸、1-ブタノール、2-プロパノールを生成
<i>Dekkera/Brettanomyces</i> 属	高濃度の揮発酸、エステル 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine (クラッカー臭)の生成 4-ethylguaiacol や、4-ethylphenol などのフェノール臭の生成
<i>Pichia</i> 属	酢酸臭、酢酸エチル臭、アセトアルデヒド臭の生成 エタノールの代謝によるアルコール分の減少
<i>Hansenula</i> 属	酢酸臭、酢酸エチル臭、アセトアルデヒド臭の生成
<i>Torulaspora</i> 属	酪酸エチルやヘキサノ酸、オクタン酸、デカン酸を含む揮発性化合物の生成
<i>Metschnikowia</i> 属	酢酸臭、酢酸エチル臭、アセトアルデヒド臭の生成
<i>Aureobasidium</i> 属	酒石酸の代謝による味の変化
<i>Exophiala</i> 属	酒石酸の代謝による味の変化
<i>Hanseniaspora/Kloeckera</i> 属	高濃度のエステル 株によっては、キラートキシンの生成により <i>S. cerevisiae</i> の生育を抑制
<i>Candida</i> 属	酢酸臭、酢酸エチル臭、アセトアルデヒド臭の生成
<i>Zygosaccharomyces</i> 属	酸度の減少 再発酵の恐れ

※ 菌体の増加による一般的な混濁は除く。

表 1.2. ビール醸造工程中、または製品ビール中で見られる微生物とその影響

関与する微生物	酒質に与える代表的な影響※
<i>Lactobacillus</i> 属細菌	ジアセチル(バター様臭)の生成 グリセロールの代謝によるアクロレインの生成(苦味の増強) 酢酸やマンニトールの生成 スーパーアテニューエーション(味の平坦化)
<i>Pediococcus</i> 属細菌	ジアセチル(バター様臭)の生成 ビールの粘度の上昇
<i>Lactococcus</i> 属細菌	乳酸の生成により味に影響
<i>Micrococcus</i> 属細菌	微量の生育でも果実香の生成に寄与
<i>Pectinatus</i> 属細菌	プロピオン酸、酢酸、コハク酸、酪酸、脂肪酸、メチルメルカプタン、DMS、硫化水素を生成(複合的に肥料様の臭い)
<i>Megasphaera</i> 属細菌	プロピオン酸、酢酸、コハク酸、酪酸、脂肪酸、メチルメルカプタン、DMS、硫化水素を生成(複合的に肥料様の臭い)
<i>Zymophilus</i> 属細菌	プロピオン酸、酢酸、コハク酸、メチルメルカプタン、DMS、硫化水素の生成
<i>Zymomonas</i> 属細菌	高濃度のアセトアルデヒドや硫化水素を生成
<i>Obesumbacterium</i> 属細菌	パースニップ様臭の生成 2,3-butanediol, DMS, DMDS, アセト乳酸の生成に関与
<i>Enterobacter</i> 属細菌	2,3-butanediol, DMS, DMDS の生成に関与
<i>Acetobacter</i> 属細菌	酢酸生成に関与
<i>Gluconobacter</i> 属細菌	酢酸生成に関与
<i>Saccharomyces</i> 属	スーパーアテニューエーション(味の平坦化) フェノール臭の生成
<i>Pichia</i> 属	酢酸臭、酢酸エチル臭、アセトアルデヒド臭の生成 エタノールの代謝によるアルコール分の減少
<i>Hansenula</i> 属	酢酸臭、酢酸エチル臭、アセトアルデヒド臭の生成
<i>Debaryomyces</i> 属	酵母臭及びエステル臭の生成
<i>Torulopsis</i> 属	スーパーアテニューエーション(味の平坦化)
<i>Brettanomyces</i> 属	酢酸の生成
<i>Kloeckera</i> 属	清澄困難な混濁を生成
<i>Candida/Kluyveromyces</i> 属	清澄困難な混濁の生成 エタノールの代謝によるアルコール分の軽微な減少

※ 菌体の増加による一般的な混濁は除く。

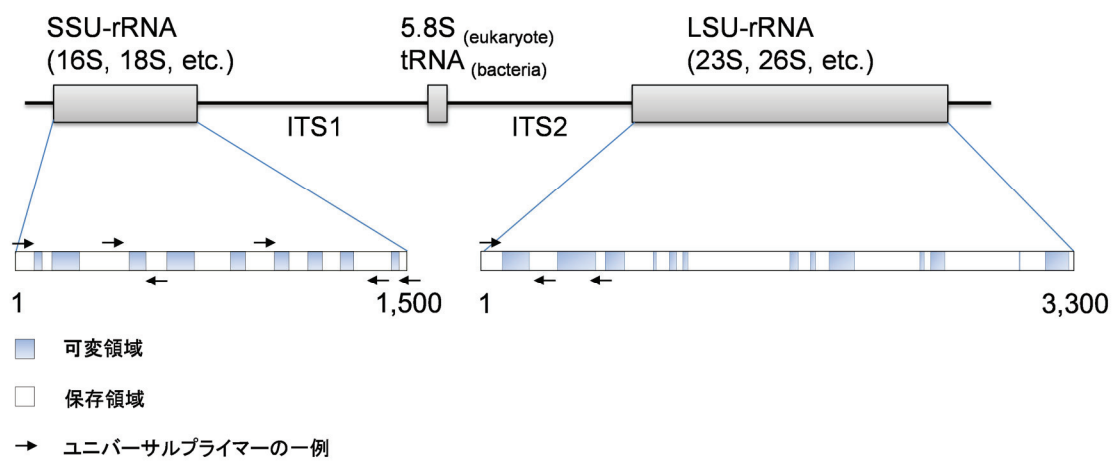


図 1.1. rRNA 遺伝子の構造

SSU-rRNA には、9 個の可変領域が存在し、5'-末端側から V1 ~ V9 であり、LSU-rRNA には 13 個の可変領域が存在し、5'-末端側から D1 ~ D12 (D7 は a, b の 2 つ) である。

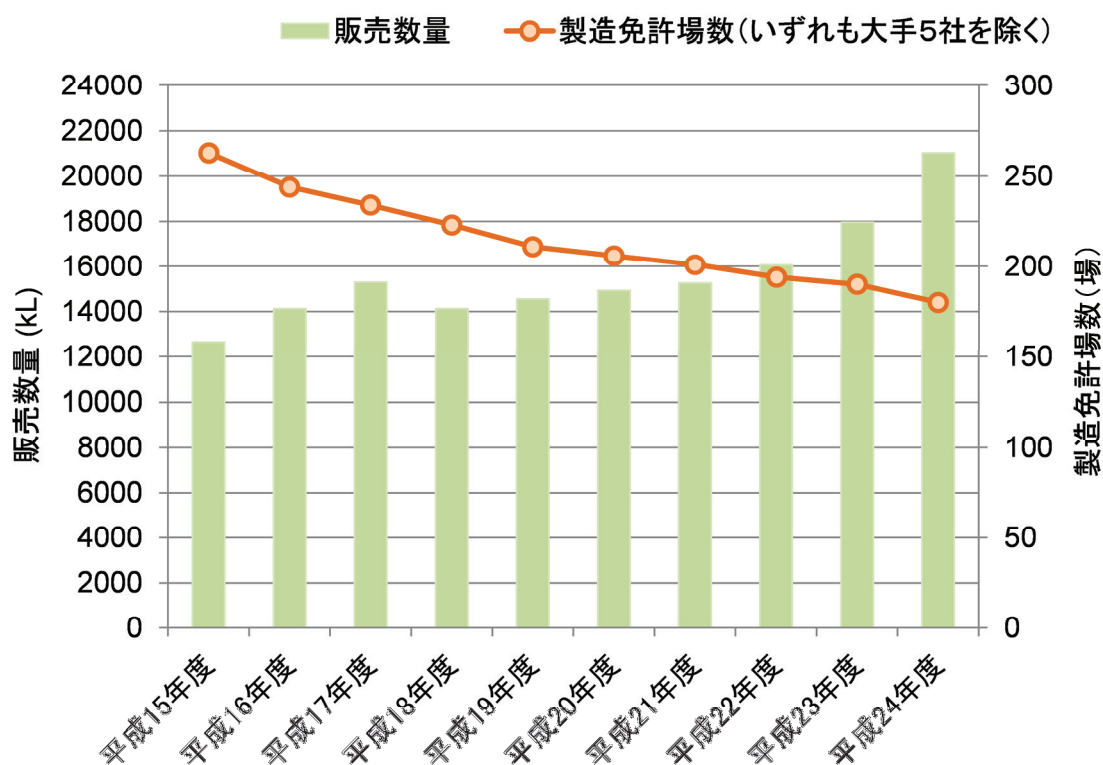


図 1.2. 地ビール等製造場数及び販売数量の推移

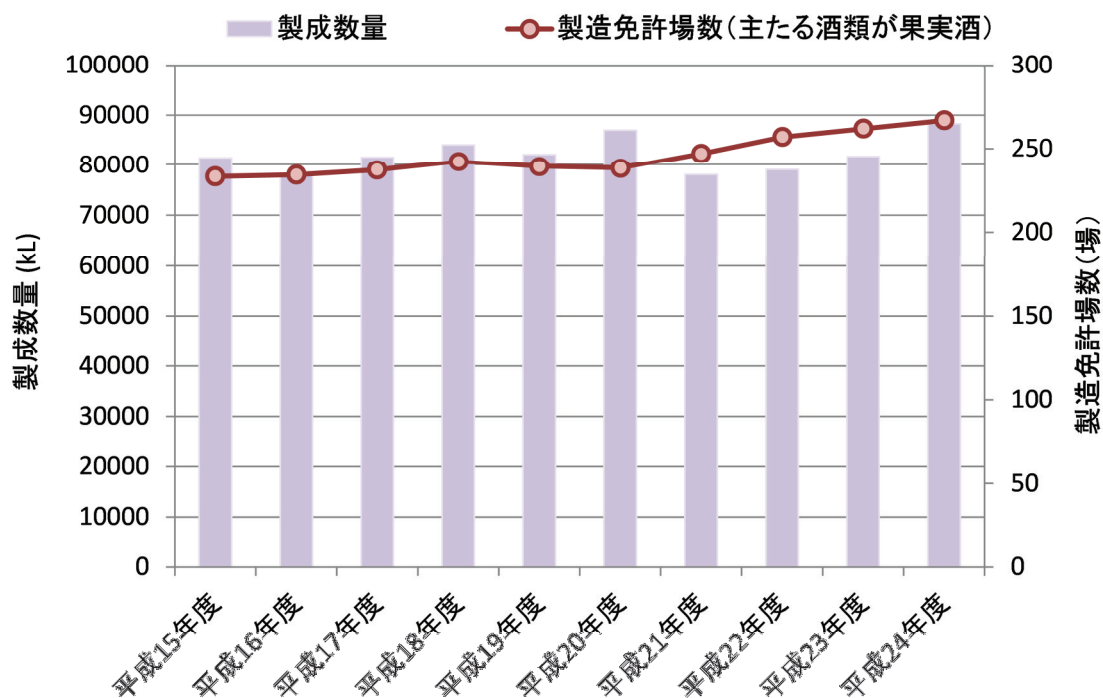


図 1.3. 果実酒製造場数及び製成数量の推移

出典：国税庁ホームページ (<https://www.nta.go.jp/>) から該当データを引用しグラフを作成

Reference Sequence (RS) 作成の基準

- Wild typeと同一の配列
- 3'末端はリン酸化処理
(PCRの伸長阻害のため)
- 増幅対象より両末端を削る
(鋳型となるのを防ぐため)

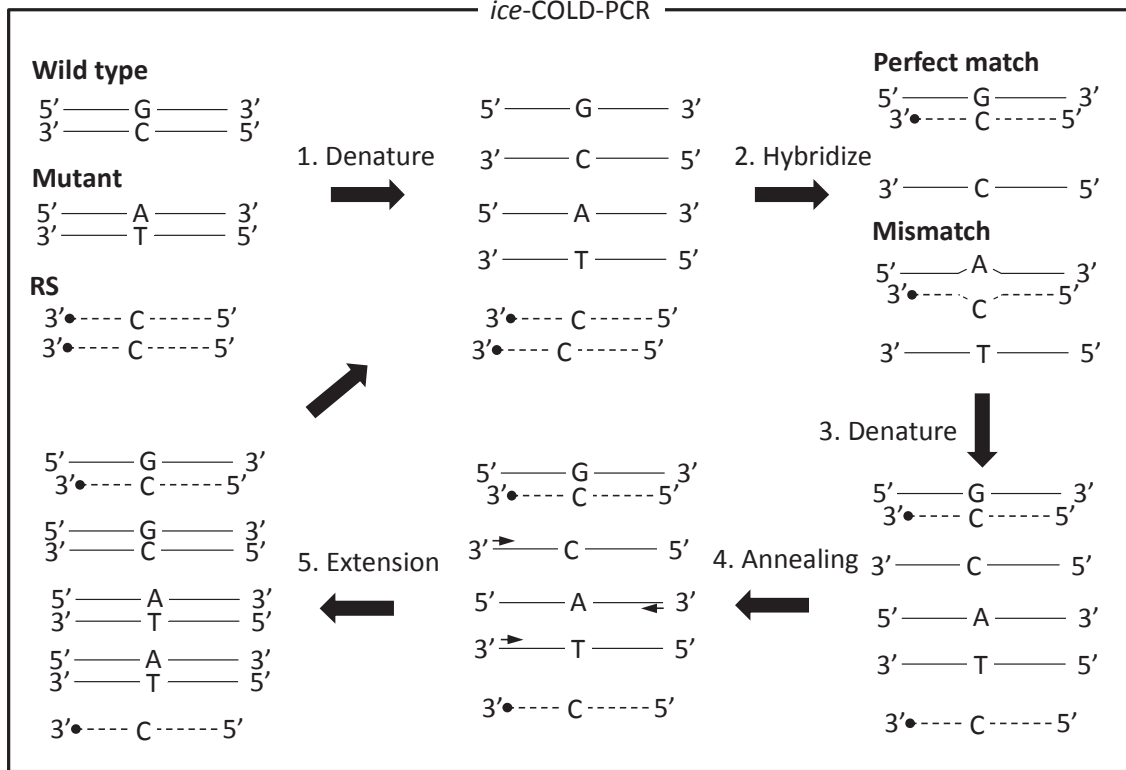
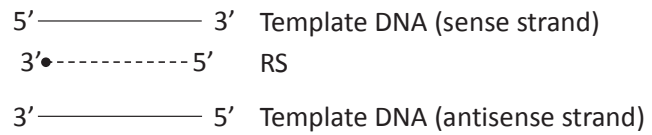


図 1.4. *ice*-COLD-PCR 法の原理

1. 熱変性により一本鎖 DNA に解離する
2. 70°C のハイブリダイズ工程で、RS と鋳型 DNA のセンス鎖をハイブリダイズする
3. 形成されたミスマッチを含む二本鎖のみが解離する温度で再変性
4. プライマーのアニーリング
5. ポリメラーゼによる伸長反応

1~5 を繰り返すことで、変異が存在する DNA が優先的に増幅される。

Milbury *et al.*, 2011 を引用。

第2章

培養法及び分子生物学的手法を用いた亜硫酸添加／無添加ワイン中の微生物叢の評価

2.1. 序言

ワイン製造において、汚染微生物の生育抑制はワインの品質と安全性を確保するうえで非常に重要である。ブドウ果皮や醸造設備等のワイン製造環境からは、多種にわたる微生物が検出されており (Bae *et al.*, 2006; Constantini *et al.*, 2009; Barata *et al.*, 2012)、それらの微生物はワイン発酵もろみ (以下、「マスト」という。) に移行することが報告されている (Nisiotou *et al.*, 2007)。しかしながら、移行した微生物のほとんどは、低い pH や亜硫酸の添加、多量の酵母の接種によりその生育が抑制される (Andorra *et al.*, 2008; Bartowsky, 2009)。

亜硫酸は、従来からワイン製造において、抗菌及び抗酸化を目的として用いられてきている (Ough and Crowell, 1987)。亜硫酸は、果汁の段階と発酵後に、SO₂ ガスの吹き込みや K₂S₂O₅ の形で添加され、野生酵母や、乳酸菌群 (以下、「LAB」という。) に代表されるような多くの汚染に係る細菌の生育を抑制する。これまで、様々な研究グループが培養法及び分子生物学的手法を用いて、野生酵母や LAB、酢酸菌群 (以下、「AAB」という。) に対する亜硫酸添加の影響について報告しているが (Andorra *et al.*, 2008)、LAB や AAB 以外の細菌に対する亜硫酸の効果はあまり調べられていない。また、近年、添加物を使用しないワインの生産量も増加してきており、微生物汚染が懸念される。

本章では、亜硫酸添加ワイン及び亜硫酸無添加ワインの製造工程における LAB 及び AAB 以外の細菌も含めた広範な微生物叢を、培養法及び分子生物学的手法を用いて明らかにし、亜硫酸の添加が微生物叢に与える影響について考察した。

2.2. 実験材料と方法

2.2.1. 使用した試薬及び培地

本研究で使用した試薬及び培地の組成については以下のとおりであり、試薬の溶解後、121°C で 20 分間オートクレーブし、生育阻害剤を添加する培地については 60°C 程度に冷却後に 0.2 µm のカートリッジフィルターでろ過滅菌したクロラムフェニコールあるいはシクロヘキシミドを添加したものを使用した。ただし、変法 GAM 寒天培地に関しては、オートクレーブは 115°C で 15 分間実施した。

50× TAE ストック溶液

Tris (Sigma-Aldrich)	242 g
Acetic Acid (和光純薬工業)	57.1 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0) (同仁化学)	100 mL
H ₂ O	最終液量 1 L

40%アクリルアミドストック溶液

Acrylamide-HG (和光純薬工業)	97.4 g
N,N'-methylenebis (acrylamide)-HG (和光純薬工業)	2.6 g
H ₂ O	最終液量 250 mL

ニュートリエント寒天培地 (Nutrient Agar)

Beef extract (DIFCO)	3.0 g
Peptone (DIFCO)	5.0 g
NaCl (和光純薬工業)	5.0 g
Agar (和光純薬工業)	15.0 g
H ₂ O	1 L
10 mg/mL Cycloheximide (和光純薬工業)	1 mL
pH	6.8

MRS 寒天培地 (de Man, Rogosa and Sharpe Agar)

Difco MRS Agar (DIFCO)	70.0 g
H ₂ O	1 L
10 mg/mL Cycloheximide (和光純薬工業)	1 mL
pH	6.5

ポテトデキストロース寒天培地 (Potato Dextrose Agar)

Difco Potato-Dextrose Agar (DIFCO)	39.0 g
H ₂ O	1 L
10 mg/mL Chloramphenicol (和光純薬工業)	1 mL
pH	5.6

変法 GAM 寒天培地 (GAM Agar, Modified “Nissui”)

GAM Broth, Modified “Nissui” (日水製薬)	41.7 g
Agar (和光純薬工業)	15.0 g
H ₂ O	1 L
10 mg/mL Cycloheximide (和光純薬工業)	1 mL
pH	7.3

2.2.2. 供試菌株

赤ワイン醸造には市販ワイン酵母 Zymaflore F15 (*Saccharomyces cerevisiae*) を、白ワイン醸造には市販ワイン酵母 Zymaflore VL1 (*S. cerevisiae*) を使用した。また、*Propionibacterium acnes* は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室から分譲を受けた *P. acnes* JCM 6425^T を用いた。

2.2.3. ワイン醸造

赤ワイン及び白ワインの小仕込みは、それぞれ酒類総合研究所圃場で栽培された、1.0 kg のカベルネ・ソーヴィニヨンと、果皮や種子を除去済みの 800 mL のシャルドネ果汁を用いて行った。各醸造工程について、図 2.5.1. に示した。赤ワインにおいては残糖分を減らすことや強い酸味を緩和することを目的として後発酵とそれに続く MLF が行われることがあるが、主発酵終了時にほとんどの酵母が除去されワインの製成とみなされる。亜硫酸は、各ブドウ果汁に対し、150 mg/L となるようにメタ重亜硫酸カリウム (和光純薬) を添加し、室温で 6 時間静置後酵母添加を行い、亜硫酸無添加ワインについては、各果汁が得られた後、すぐに酵母添加を行った。赤ワイン及び白ワインマストの発酵温度はそれぞれ、28°C 及び 15°C とし、発酵経過は炭酸ガスの減少量、各マストの密度減少及びそれらから算出されるエタノール濃度により管理した。炭酸ガス減少量の測定はサンプリング前後の重量測定により行い、密度の測定は振動式密度比重計 DA-520 (京都電子工業) を用いた。醸造工程中のサンプリングは毎日行った。また、市販製品の微生物叢解析のため、表 2.5.1. に示すワイン 15 点を酒販店から購入し、サンプルとして用いた。

P. acnes を含有する赤ワインマストは、800 mL の破碎したカベルネ・ソーヴィニヨンに *P. acnes* JCM 6425^T の菌体懸濁液 (>10⁶ cfu/mL) を 1 mL 加えた後、メタ重亜硫酸カリウムを添加し、室温で 6 時間静置後に酵母を加えることで調製した。サンプリングは酵母添加後 3 時間後及びそれ以降 1 日おきに行った。

2.2.4. DNA 抽出

各ワインマストからの DNA の抽出は、Renouf らの方法 (2007) に準じて行った。すなわち、10 mL のマストを遠心分離 (10,000 ×g, 30 min, 4°C) し、上清を除去後、ペレットを直径 106 μm 以下のガラスビーズによるマルチビーズショッカー (安井器械) を用いたビーズビーターティング (2,500 rpm, 5 min, 4°C) により物理的に破碎し、得られた破碎抽出液から Nuclei lysis solution 及び Protein precipitation solution (Promega) を用いて DNA を抽出後、OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research) を用いて精製した。市販ワインに関しては、100 mL のワインを孔径 0.20 μm のセルロース混合エステルタイプメンブランで微生物を捕集し、メンブランを細かく刻んだ後、前述の方法により DNA を得た。DNA 溶液は使用まで -30°C で保存した。

2.2.5. PCR 条件

PCR は 50 μL の反応系で実施し、反応液組成は、1× KOD-plus Neo バッファー、1.5 mM の MgSO₄、0.2 mM の dNTP 混合溶液、1 U の KOD-plus Neo (東洋紡)、0.3 μM の各プライマーセット (真菌及び細菌共通検出用として GC-341F/531R (以下、「ユニバーサルプライマーセット」という。)、真菌検出用として GC-NL1/LS2 (以下、「真菌用プライマーセット」という。)) 及び細菌検出用として GC-968F/1378R (以下、「細菌用プライマーセット」という。)) であり、鋳型として 100 ng のゲノム DNA を用いた。本章で用いたプライマーを参考にした文献とともに表 2.5.2. に示す。サーマルサイクラーの温度プログラムは、96°C で 3 分の予備変性工程後、96°C で 15 秒、50°C で 30 秒及び 68°C で 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクルとした。PCR により得られた増幅産物の塩基長は、100 bp DNA ラダーマーカー (タカラバイオ) とともに 1.2% のアガロースゲルで電気泳動することにより推定した。

2.2.6. PCR 産物の DGGE 解析

DGGE 解析は 1× TAE 及び変性剤を含有する 8% アクリルアミドの変性剤濃度勾配ゲルを使用し、泳動は DCcode システム (バイオラッド) で行った。変性剤は、最終濃度 7 M の尿素及び 40% のホルムアミドとなるよう調製したものを 100% とした。変性剤の濃度勾配は、プライマーセット毎に設定し、ユニバーサルプライマーセットを用いた増幅産物は 20% から 80%、真菌用プライマーセットを用いた増幅産物は 40% から 55% 及び細菌用プライマーセットを用いた増幅産物は 40% から 70% の変性剤濃度勾配とし、60°C、100 V で 16 時間電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルは GelRed (Biotium) で 30 分間染色し、UV 照射下で電気泳動像の撮影後、バンドの切り出しを行った。

2.2.7. DNA 塩基配列の決定及び微生物種の推定

電気泳動後のゲルから、滅菌したパスツールピペットを用いてバンドを切り出し、微生物種を推定した。具体的には、切り出したバンドを滅菌済みの PCR チューブに入れ、2.2.5. に記載の条件で再度 PCR により増幅し、得られた増幅産物を Nucleospin Extract II (マッハライ・ナーゲル社) を用いて精製後、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing キット及び ABI

PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。得られた塩基配列はBLASTを用いてGenBankのデータベースから最も類似した配列を持つ微生物種を相同性検索し、微生物種の推定を行った。なお、相同性検索の条件としてGenBankのデータベース上 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) に存在する uncultured/environmental sample 由来の配列は除外し、微生物種を推定する際の最低限の相同性の閾値は98%とした。

原核微生物の種推定は、まず、細菌用プライマーセットにより増幅されるV6～V8領域の塩基配列を用いて行った。V6～V8領域の塩基配列で相同性が同一の候補細菌種が複数あるなど、種が推定できなかった場合には、ユニバーサルプライマーセットで増幅されるV3領域の塩基配列による推定結果も併せて検討し、V3及びV6～V8領域の塩基配列の両方に対して、最も高い相同性が見られた細菌種を、どちらの塩基配列もその細菌種由来であると推定した。真核微生物に関しても同様の条件で推定を行っているものの、DGGE解析で得られた塩基配列では種まで推定するには短いため、属までの推定とした。また、得られた塩基配列では属レベルでの区別も困難だった *Metschnikowia* 属及び *Candida* 属に関しては、ITS領域を対象とした属特異的なプライマーセット (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3'及び5'-CTTAAGTTCAGCGGGTAGTC-3') を用いてPCRを行い、シーケンスにより塩基配列を決定することで、属の推定を行った。また、いくつかのバンドについては非常に近接しており、分離することができなかったことから、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) を用いて、プラスミドにDGGEゲルから切り出し後の再増幅産物を組み込んだ後、コンピテントセル *Escherichia coli* DH5αに導入し、アンピシリン含有LB培地で培養することで得られたコロニーの所有するプラスミドに組み込まれた配列を決定することで、微生物種の推定を行った。なお、本章で得られた塩基配列はDDBJに登録を行っており、AB769285～AB769301及びAB846588～AB846643のアクセッション番号が付与されている。

2.2.8. 培養法での生菌数測定

真菌の検出は、10 µg/mLのクロラムフェニコールを含むポテトデキストロース寒天培地上で好気条件下、30°C、24時間の培養で行い、細菌の検出は、10 µg/mLのシクロヘキシミドを含むニュートリエント寒天培地上で好気条件下、37°C、48時間の培養を行い、乳酸菌の検出は10 µg/mLのシクロヘキシミドを含むMRS寒天培地上でアネロパック・ケンキ(三菱ガス化学)を用いた嫌気条件下で、30°C、1週間の培養を行った。*P. acnes*の検出は、変法GAM培地上(日水製薬)でアネロパック・ケンキを用いた嫌気条件下で、37°C、1週間の培養により行った。各ワインマストは、滅菌水で段階希釈し、100 µLを前述の各培地に塗抹した。赤ワインマストは、発酵期間中毎日採取したサンプル全てについて培養法による解析を行い、白ワインマストは、発酵開始後1～5日目、7日目、11日目、15日目及び19日目に採取したサンプルについて培養法による解析を行った。形成されたコロニーを計数し、1 mL当りのcfuを算出した。

2.2.9. コロニー形成微生物種の推定

各プレートで形成されたコロニー数が 10 以下の場合にはすべてのコロニーを、また、10 以上の場合は形や大きさの異なるコロニーを優先的に選択し、コロニーダイレクト PCR により rRNA 遺伝子を増幅した。細菌については表 2.5.2. に示した 341F 及び 1378R プライマーを、真菌については NL1 及び NL4 プライマーを用いて、それぞれ SSU-rRNA 遺伝子及び LSU-rRNA 遺伝子の内部配列を増幅した。得られた増幅産物はシーケンサーにより塩基配列を決定し、BLAST を用いた相同性検索により GenBank のデータベースから微生物種を推定した。

2.2.10. 統計解析

DGGE のバンドは、Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) により定量し、統計解析ソフトウェア R (<http://www.R-project.org/>) 及び解析用パッケージとして Community Ecology Package (<http://CRAN.R-project.org/package=vegan>) を用いて PRC 解析や Shannon index の算出、クラスター解析 (Ward 法) を行った。R による解析に際しては、同一の移動度を示したバンドは同一の配列を持った増幅産物であるとみなした。なお、PRC 解析は冗長性分析の一つであり、薬剤処理等が細菌群集構造に与える影響を、時間依存的に評価する手法である。Cdt 値の絶対値が大きいほど対照と薬剤処理等の群集構造が異なることを示す。本章では、対照を亜硫酸添加ワインマストの微生物叢として解析を実施した。

2.3. 結果

2.3.1. 発酵経過の概要

亜硫酸添加の有無が発酵経過に与える影響を、各マストのアルコール濃度に基づいて比較したところ、表 2.5.3. 及び表 2.5.4. に示すように、赤及び白ワインマストいずれの発酵経過も、亜硫酸添加の有無にかかわらず、ほぼ同一であった。また、赤ワインマストでは発酵開始が早かったのに対し、白ワインマストでは発酵開始が遅れた。発酵終了時の赤ワイン及び白ワインのアルコール濃度は亜硫酸添加の有無にかかわらず、それぞれ 14.6 容量% 及び 13.3 容量%であった。

2.3.2. PCR-DGGE 法を用いた発酵中の赤及び白ワインマスト中の微生物叢の解析

DGGE 法による微生物叢解析の結果、いずれのワインマストからも様々な微生物が検出された (図 2.5.2. 及び図 2.5.3.)。ユニバーサルプライマーセット及び細菌用プライマーセットを用いた発酵中の白ワインマストの細菌叢の解析結果から、亜硫酸塩添加により *Leuconostoc mesenteroides* の生育が発酵中を通して抑制されること及び発酵開始後 4~5 日目で *Tatumella terre* の生育がやや抑制されることが示された (図 2.5.2.A 及び C)。また、真菌用プライマーセットを用いた真菌叢の解析結果から、亜硫酸無添加白ワインマストでは、*Candida* sp.が発酵開始後 4~11 日目で検出されたのに対して、亜硫酸添加白ワインマストでは検出されなかった (図 2.5.2.B)。

細菌用プライマーセットを用いた発酵中の赤ワインマストの細菌叢の解析結果から（図 2.5.2.C）、亜硫酸無添加のマストでは発酵開始後 6～9 日後に GenBank のデータベース上の既知の配列との相同性が 98%以下のバンドが検出され、もっとも相同性が高い種は *Pseudomonas* sp.であったものの、その相同性は 95%であった。

DGGE 法の電気泳動のバンドパターンから Shannon index を算出したところ、発酵中の赤ワインマストの細菌の多様度は、発酵中期で 1.45、発酵終了時で 1.69 であり、それぞれ白ワインマストの 0.28、0.19 を上回っていた（表 2.5.5.）。また、亜硫酸添加の有無で Shannon index を比較すると、赤ワインマスト、白ワインマストいずれにおいても亜硫酸無添加で多様度が高いことが示された。

赤ワインマストにおいては、ユニバーサルプライマーセット及び真菌用プライマーセットでの増幅産物の DGGE 解析結果からは、亜硫酸添加の有無による微生物叢変遷の違いは見られなかった。

2.3.3. PRC 解析

発酵中の赤及び白ワインマストにおける亜硫酸の微生物叢変遷に対する影響を DGGE 法のバンドを定量化し、PRC 解析により比較した（図 2.5.4.）。その結果、赤ワインマストでは、亜硫酸添加が発酵中継続して同程度の影響があったのに対し、白ワインマストでは、発酵初期で Cdt 値が 2.0 以上に対し、発酵中期から後期で 0.5 以下と、発酵初期で強く亜硫酸添加の影響が見られた。

2.3.4. 培養法を用いた微生物叢解析

PCR 法では死菌体由来の DNA も増幅することができるため、PCR-DGGE 法で検出された微生物は生菌か死菌か区別することができない。そこで、発酵マスト中に存在する生菌を検出するために発酵マストを培養法で解析した。赤ワインマストの結果を表 2.5.3. に、白ワインマストの結果を表 2.5.4. に示す。

白ワインマストをニュートリエント寒天培地で培養したところ、発酵開始後 7 日目まではコロニー数の増加が見られたが、11 日目以降ではコロニーが検出されなかった。また、発酵開始初期では、亜硫酸添加で 2.0×10^3 cfu/mL（4 日目）、 1.3×10^4 cfu/mL（5 日目）に対し、亜硫酸無添加で 9.6×10^4 cfu/mL（4 日目）、 1.9×10^5 cfu/mL（5 日目）と亜硫酸の添加の有無で差が表れ、亜硫酸無添加のマストで多く検出された（表 2.5.4.）。いくつかのコロニーからコロニーダイレクト PCR で SSU-rRNA 遺伝子の V3～V8 領域を増幅し、配列決定後、菌種推定を行ったところ、*T. terreus*, *Bacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Paenibacillus* sp.などが検出された。

赤ワインマストについてニュートリエント寒天培地で解析したところ、白ワインマストと比べ 1 mL あたりの cfu が少なかった。白ワインマストと同様の方法で、コロニーの菌種推定を行った結果、亜硫酸で生育が抑制される微生物として、*Microbacterium tesraceum*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Curtobacterium* sp., *Bacillus pumilus*及び *Bacillus megaterium* が検出された。*Microbacterium* 属については、

PCR-DGGE 法では亜硫酸添加の有無にかかわらず検出されていた。表 2.5.3 では省略しているが、赤ワインマストについては、ニュートリエント寒天培地で検出された微生物が少なかったことから、ポテトデキストロース寒天培地及び MRS 寒天培地にも接種を行い、解析した。ポテトデキストロース寒天培地を用いた解析の結果、発酵スターターである *S. cerevisiae* の添加前の段階で、*Hanseniaspora vineae*, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. 及び *Acremonium* sp. が検出されたものの、*S. cerevisiae* を添加後の発酵マストでは *S. cerevisiae* の数があまりにも多く、培養法で真菌叢を明らかにすることはできなかった。また、MRS 寒天培地ではコロニー形成が見られなかった。

2.3.5. 市場流通ワインの PCR-DGGE 法による解析

市場流通ワインの微生物叢解析のため、3 本の亜硫酸無添加ワインを含む 15 本の市販ワインを小売店から購入し、PCR-DGGE 解析に供した。その結果、*S. cerevisiae* を含む 15 種の微生物が検出されたものの、亜硫酸無添加ワインやブドウ以外の原料を使用したワインに特徴的な微生物は検出されなかった。また、DGGE 法により得られたバンドパターンを定量化し、それらを変数としてクラスター解析を行ったが、亜硫酸を添加したことによる影響は見られなかった (図 2.5.5.)。

2.3.6. ワイン中の *Propionibacterium acnes*

今回解析に供した全ての市場流通ワイン及び赤ワインマストから、*P. acnes* が PCR-DGGE 法により検出されたため、Nakamura ら (2003) によって報告されている *P. acnes* の種特異的なプライマーを用いて確認したところ、15 点中 11 点から *P. acnes* が検出された。そこで、*P. acnes* が発酵ワインマスト中に存在する赤ワインマストを調製し、そのマスト中から *P. acnes* が培養法で検出されるか検討した。GAM 寒天培地に接種し嫌氣的に培養したが、*P. acnes* のコロニーはどの時点でも検出されなかった。

2.4. 考察

近年、食品添加物の使用の有無に対して、消費者の関心が高まっており、そのような背景から亜硫酸無添加ワインのように食品添加物を使用しない製品が増えてきている (Kurihara *et al.*, 2010)。ブドウの表面には、乳酸菌や酢酸菌など非常に多種にわたる微生物が存在しており、亜硫酸のマストへの添加はそれらの乳酸菌や野生酵母などの生育を抑制することが知られている (Carr *et al.*, 1976; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983; Romano *et al.*, 1993)。本章の研究では、培養法と PCR-DGGE 法を用いて、亜硫酸の添加の有無による微生物群集構造の違いを解析し、PCR-DGGE 法による解析の結果、亜硫酸塩添加により *Leu. mesenteroides* 及び *Candida* sp. の生育が抑制されることを明らかにした。*Lactobacillus hilgardii* や *Pediococcus parvulus*, *Leu. mesenteroides* など特定の乳酸菌はカダベリンやプトレシン、チラミンやヒスタミンなどの生体アミンを産出することが報告されているため (Landete *et al.*, 2005; Pircher *et al.*, 2006)、亜硫酸の添加によりそのような微生物の生育を抑制することは重要である。また、本研究では、亜硫酸を添加していない赤ワインマストで、発酵後期に未

知の細菌が検出されており、未知の微生物の生育を抑制するためにも亜硫酸の添加は効果的であると考えられる。

Tatumella terrea が亜硫酸の添加の有無にかかわらず検出されたが、亜硫酸を添加したマストからは亜硫酸無添加のマストと比べ、1日遅く検出された。本研究では、培養法による解析で各微生物の cfu/mL は算出していない。しかし、*T. terrea* と同定されたコロニーと同じサイズ、同じ形状のコロニーを *T. terrea* とみなして推定した結果、ランダムにコロニーを選択し、プレート当りの解析総数に対する割合を算出していれば、*T. terrea* の検出比率は 90% を超えていたと考えられる。*T. terrea* は通性嫌気性でグラム陰性桿菌であり、土壌や果樹、グラッパの製造工程からの検出報告がある (Kageyama *et al.*, 1992; Brady *et al.*, 2010; Maragkoudakis *et al.*, 2013)。*T. terrea* の基準種は pH が 5.0 以下では生育しないと報告されているが、本研究では pH が 4.0 を下回るワインマストから培養法により検出されており、*T. terrea* の生育可能な pH の範囲はおそらく株によって異なるものと考えられる。*T. terrea* は培養法では発酵開始後 11 日目以降では検出されず、*T. terrea* はエタノールの蓄積により死滅したか、VBNC な状態となっていることが示唆された。グラッパで行われた先行研究では、*T. terrea* はマールの発酵及び貯蔵の初期でのみ検出されており (Maragkoudakis *et al.*, 2013)、本研究の結果とも一致している。

P. acnes は、耐気性嫌気性を示すグラム陽性細菌であり、健康な成人の表皮に常在している。本研究では、*P. acnes* は、PCR-DGGE 法により発酵中のマストや市販ワインの多くから検出された。Kato ら (2010) もまた、ワイン製造工程中から PCR-DGGE 法により *P. acnes* を検出しており、製造時のコンタミネーションの可能性を指摘している。本研究において、*P. acnes* JCM 6425^T を接種した発酵中のワインマストを培養法により解析したものの検出することはできず、*P. acnes* の基準種はワイン醸造工程では生育できないことが示された。また、近年の研究により、ブドウに細胞内共生している *P. acnes* が新たに発見されていることから (Campisano *et al.*, 2014)、PCR-DGGE 法で検出された *P. acnes* は細胞内共生細菌であった可能性も考えられる。

本研究において、PCR-DGGE 法により検出された微生物と培養法により検出された微生物に差があった (図 2.5.6.)。従来から PCR 法に基づく微生物叢解析では、生菌と死菌を区別して検出することはできないことが指摘されており (Cocolin *et al.*, 2004)、本研究においても、*T. terrea* は培養法では発酵開始後 11 日目以降では検出されていないのに対して、PCR-DGGE 法による解析では発酵終了時まで検出された。また、*Microbacterium* 属について、培養法の結果と PCR-DGGE 法の結果を比較すると、培養法では亜硫酸無添加の赤ワインマストのみで検出されており、PCR-DGGE 法では亜硫酸添加の有無にかかわらず検出されていたことから、*Microbacterium* 属細菌が亜硫酸添加やアルコールの生成によって死滅していることを示唆している。生菌と死菌を区別して検出するためには、Ethidium monoazide (EMA) や Propidium monoazide (PMA) による死菌 DNA の修飾技術を PCR 法と組み合わせる手法などを検討する必要がある (Nocker *et al.*, 2006)。EMA-PCR 法や PMA-PCR 法は、生菌のみを検出することが可能なため、DGGE 法と EMA-PCR 法を組み合わせることで得られる結果は、培養法の結果と近くなると考えられるが、本研究において培養法で検

出されなかったもののすべてが死菌だったわけではなく、使用した培養条件が生育条件に一致していなかったものや、VBNC 状態となっていたものが存在していた可能性もある。

一方で、培養法により検出され、PCR-DGGE 法で検出されていない細菌も存在している。従来の研究では、PCR-DGGE 法では 10^3 cfu/mL 以下の低含量の微生物や、存在比率が共存する他の微生物の 1%以下である微生物などは PCR-DGGE 法では検出することが困難であることが報告されている (Cocolin *et al.*, 2000, Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Nisiotou *et al.*, 2007)。したがって、培地上で生育可能な状態の微生物が微量存在したとしても、死菌体が多量に共存していれば、PCR-DGGE 法ではそのような微生物は検出されず、培養法でのみ検出されることとなる。培養法では、特定の微生物に適した培地組成や培養条件を用いることで、複雑な微生物叢の中から存在比率の低い特定の微生物を検出することが可能なため、網羅的な微生物叢解析のためには、複数のアプローチを組み合わせる必要がある。

PCR-DGGE 法により得られたバンドパターンを数値化し行った PRC 解析によれば、発酵中の微生物叢に対する亜硫酸の影響は、白ワインマストでは発酵初期で強かったが、赤ワインマストでは初期では弱かった。赤ワインマストの発酵速度は白ワインマストに比べ早く、速やかにエタノールが蓄積していたことから、発酵中の微生物叢に対するエタノールの影響が、発酵初期で赤ワインマストの方が白ワインマストに比べ大きかったことによるものと考えられ、白ワインマストの発酵が遅れたため、亜硫酸添加の影響が赤ワインマストより白ワインマストでより大きく見られた可能性がある。

PCR-DGGE 法と培養法の両方の結果から、赤及び白ワインマスト共に、亜硫酸を添加したマストにおける微生物叢よりも、亜硫酸を添加していないマストの微生物叢の方が多様であることが示された。この結果は、ワイン醸造工程において亜硫酸の添加が予期しない微生物の生育抑制に重要な役割を果たしていることを示すものである。しかしながら一方で、一般的に使用される程度の亜硫酸を添加した場合においても、多くの微生物が発酵マスト中で生存または生育していたことが明らかとなった。

PCR-DGGE 法による解析で、市場流通ワイン中にも非常に多様な微生物が検出されており、そのうちのいくつかは、先行研究でワインまたはブドウ果皮から検出されているものの (Nisiotou *et al.*, 2007; Renouf *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2010; Barata *et al.*, 2012)、*Sphingomonas* sp., *Pseudozyma* sp., *Ochromonas* sp., *Methylophilus* sp. はワインから初めて検出された。また、*Acinetobacter* sp. や *Methylophilus* sp., *P. acnes* は本研究で用いたすべてのワインから検出されており、これらの微生物は、環境水中、土壌及び果樹等広く環境中に分布していることから、これらの微生物によるコンタミネーションはワイン醸造工程中及び瓶詰中に容易に起こると考えられる。桃やイチゴなどブドウ以外の原料を用いて造られたワインの微生物叢について、ブドウを原料として作られたワインと比較したが、その微生物叢はほぼ同じであった。今回の解析で検出された微生物がワイン中において生存しているか否かは不明だが、それらの微生物はワイン製造工程のいずれかの段階で存在していたことが明らかとなった。市場流通ワインに関しては、亜硫酸の添加の有無で微生物叢にはっきりとした違いが見られなかったことから、製品ワイン中の微生物叢は亜硫酸の添

加の有無だけでなく、瓶詰前のろ過や製造設備、貯酒環境によっても影響を受けることが示唆された。

ワイン醸造における亜硫酸添加は従来効果が調べられていた LAB のみならず、その他の細菌群の生育も抑制するため、発酵管理上は亜硫酸添加を行うことが望ましいと考えられるが、一方で製品ワインにおいては亜硫酸添加による微生物叢への影響が見られなかったことから、LAB や AAB 以外の汚染微生物の生育抑制という点からは亜硫酸添加の影響は発酵初期～中期に限定されるものと考えられる。

2.5. 図表

表 2.5.1. 本研究で使用した市場流通ワインの概要

No.	メーカー ¹	タイプ	原料	アルコール分 (v/v%)	亜硫酸
1	A	赤ワイン	ブドウ	12	添加
2	B	赤ワイン	ブドウ	11	添加
3	C	赤ワイン	ブドウ	12	添加
4	D	赤ワイン	ブドウ	11	添加
5	E	赤ワイン	ブドウ	10	無添加
6	F	赤ワイン	ブドウ	10.5	無添加
7	A	白ワイン	ブドウ	12	添加
8	B	白ワイン	ブドウ	10	添加
9	C	白ワイン	ブドウ	12.5	添加
10	D	白ワイン	ブドウ	11	添加
11	E	白ワイン	ブドウ	10	無添加
12	E	フルーツワイン	桃	6	添加
13	E	フルーツワイン	イチゴ	6	添加
14	G	赤ワイン	ブドウ	14	添加
15	G	白ワイン	ブドウ	14	添加

¹ 同一アルファベットは、同一のメーカーの製品であることを示す。

表 2.5.2. 本研究に用いたプライマー

Target	Primer name ¹	Sequence 5' - 3' ²	PCR amplicon size (bp)	Reference
Universal	GC-341F	gc - CCTACGGGAGGCAGCAG	≈ 200 bp (Eukaryote)	Bae <i>et al.</i> (2006)
	531R	ACCGGGCTGCTGGC	≈ 230 bp (Prokaryote)	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
Eukaryote	GC-NL1	gc - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG		
	LS2	ATTCCCAAAACAACCTCGACTC	≈ 280 bp	Cocolin <i>et al.</i> (2000)
Prokaryote	GC-968F	gc - AACGCCAAGAACCCTTAC		Nubel <i>et al.</i> (1996)
	1378R	CGGTGTGTACAAAGGCCCGGGAACG	≈ 480 bp	Heuer <i>et al.</i> (1997)
Eukaryote	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG		
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	≈ 600 bp	O'Donnell <i>et al.</i> (1993)
Prokaryote	341F	CCTACGGGAGGCAGCAG		
	1378R	CGGTGTGTACAAAGGCCCGGGAACG	≈ 1000 bp	Andrighetto <i>et al.</i> (2009)

¹ F, forward primer; R, reverse primer

² gc, GC-clamp sequence, CGCCCGCCGCCGGCGGGGGGGGGGGGGCGACGGGGGG

表 2.5.3. 赤ワインマストから単離された細菌

Name (Accession No.)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9
亜硫酸添加ワインマスト									
エタノール濃度 (v/v%)	0.0	3.2	6.8	9.9	11.7	12.7	13.3	13.9	14.6
cfu/mL ^{1,2}	1.5×10 ²	N.D.	N.D.	N.D.	1.0×10 ²	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Bacillus cereus</i> (AB769298)	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus tequilensis</i> (AB769299)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
亜硫酸無添加ワインマスト									
エタノール濃度 (v/v%)	0.0	2.6	6.1	9.3	11.4	12.7	13.4	14.0	14.6
cfu/mL ^{1,2}	5.0×10 ²	1.0×10 ²	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Microbacterium testaceum</i> (AB769294)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> (AB769295)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (AB769296)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Curtobacterium</i> sp. (AB769300)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> (AB769297)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> (AB769301)	-	+	-	-	-	-	-	-	-

¹ 培養菌数は、ニュートリエント寒天培地の結果を示した。

² 「N.D.」は、検出下限 (<10² cfu/mL) であることを示す。

表 2.5.4. 白ワインマストから単離された細菌

Name (Accession No.)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 7	Day 11	Day 15	Day 19
亜硫酸添加ワインマスト エタノール濃度 (v/v%) cfu/mL ^{1,2}	0.0 9.0×10 ²	0.0 2.1×10 ³	0.1 2.5×10 ³	0.1 2.0×10 ³	0.2 1.3×10 ⁴	0.4 9.1×10 ⁴	8.6 N.D.	12.0 N.D.	13.3 N.D.
<i>Tatumella terra</i> (AB769289)	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> (AB769290)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> (AB769285)	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Lactococcus</i> sp. (AB769292)	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Paenibacillus</i> sp. (AB769286)	+	+	-	-	+	+	-	-	-
亜硫酸無添加ワインマスト エタノール濃度 (v/v%) cfu/mL ^{1,2}	0.0 1.2×10 ³	0.0 2.3×10 ³	0.1 5.1×10 ³	0.1 9.6×10 ⁴	0.3 1.9×10 ⁵	0.5 1.8×10 ⁵	8.3 N.D.	12.1 N.D.	13.3 N.D.
<i>Tatumella terra</i> (AB769291)	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Cellulosimicrobium</i> sp. (AB769288)	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> (AB769287)	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Lactococcus</i> sp. (AB769293)	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Paenibacillus</i> sp. (AB769286)	+	+	+	+	+	+	-	-	-

¹ 培養菌数は、ニュートリエント寒天培地の結果を示した。

² 「N.D.」は、検出下限 (<10² cfu/mL) であることを示す。

表 2.5.5. PCR-DGGE 解析結果から算出されたワインマストにおける Shannon Index

サンプル	発酵初期	発酵中期	発酵後期	発酵終了時
亜硫酸添加白ワインマスト	0.68 (day 1) ¹	0.28 (day 7)	0.11 (day 15)	0.19 (day 19)
亜硫酸無添加白ワインマスト	1.49 (day 1)	0.61 (day 7)	0.62 (day 15)	0.81 (day 19)
亜硫酸添加赤ワインマスト	1.51 (day 1)	1.45 (day 3)	2.29 (day 6)	1.69 (day 9)
亜硫酸無添加赤ワインマスト	1.79 (day 1)	1.52 (day 3)	1.94 (day 6)	1.99 (day 9)

¹ 括弧内の数字は、発酵開始後の日数を示す。

表 2.5.6. 市販ワインから検出された微生物¹

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Acinetobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Methylophilus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sphigomonas</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Propionibacterium acnes</i> ²	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pediococcus</i> sp.	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterobacteriaceae	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetobacteriaceae	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Pseudozyma</i> sp.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida</i> sp.	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Ochromonas</i> sp.	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>Aureobasidium</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+

¹ 下線があるサンプルは、亜硫酸無添加ワインである。

² *P. acnes* のリパーゼ遺伝子及び 16S rRNA 遺伝子の内部配列を対象とした種特異的プライマーを使用した (Nakamura *et al.*, 2003)。

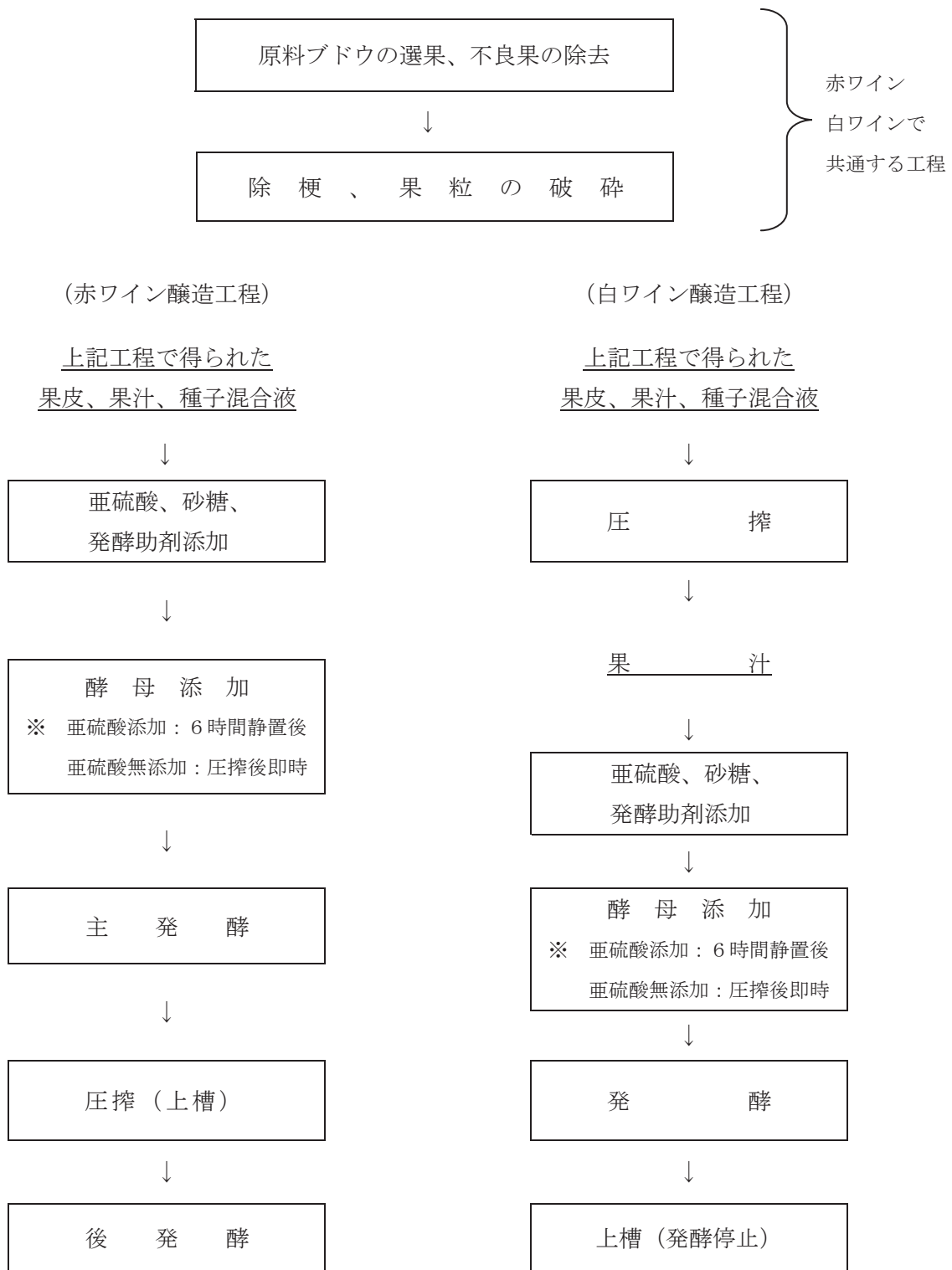


図 2.5.1. ワイン試験醸造工程の概要

黒枠で囲った部分が各種操作を示す。

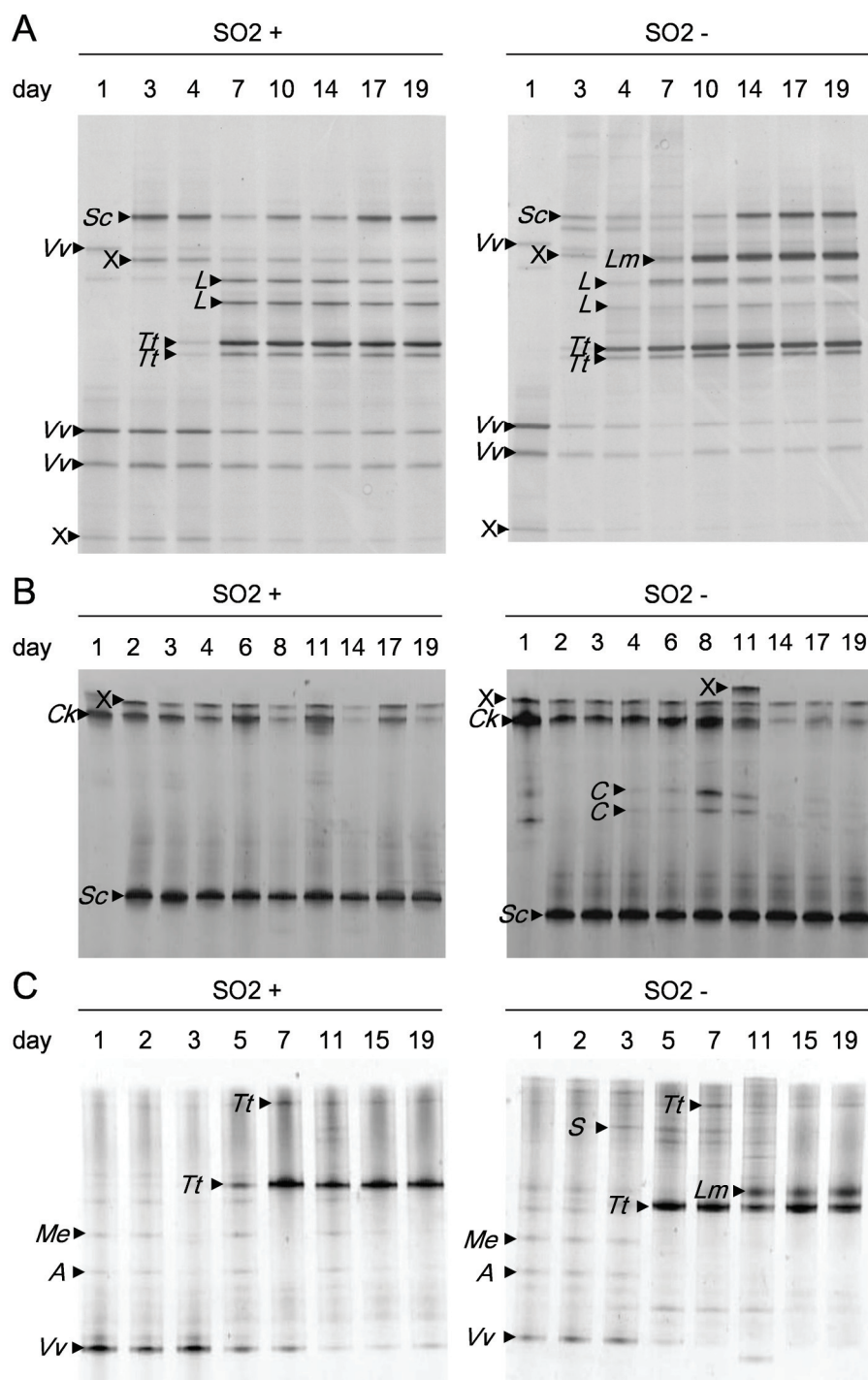


図 2.5.2. 発酵中白ワインマストの PCR-DGGE 解析結果

ユニバーサルプライマーセット (A), 真菌用プライマーセット (B) 及び細菌用プライマーセット (C) を用いた結果を示す。亜硫酸添加及び無添加はそれぞれ SO₂ + 及び SO₂ - で示した。微生物名の略記号は次のとおり。Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Vv, *Vitis vinifera*; Lm, *Leuconostoc mesenteroides*; L, *Lactococcus* sp.; Tt, *Tatumella terreza*; Ck, *Candida kofuensis*; C, *Candida* sp.; S, *Streptococcus* sp.; Me, *Methylophilus* sp.; A, *Actinomyces* sp.; X, non-sequencable.

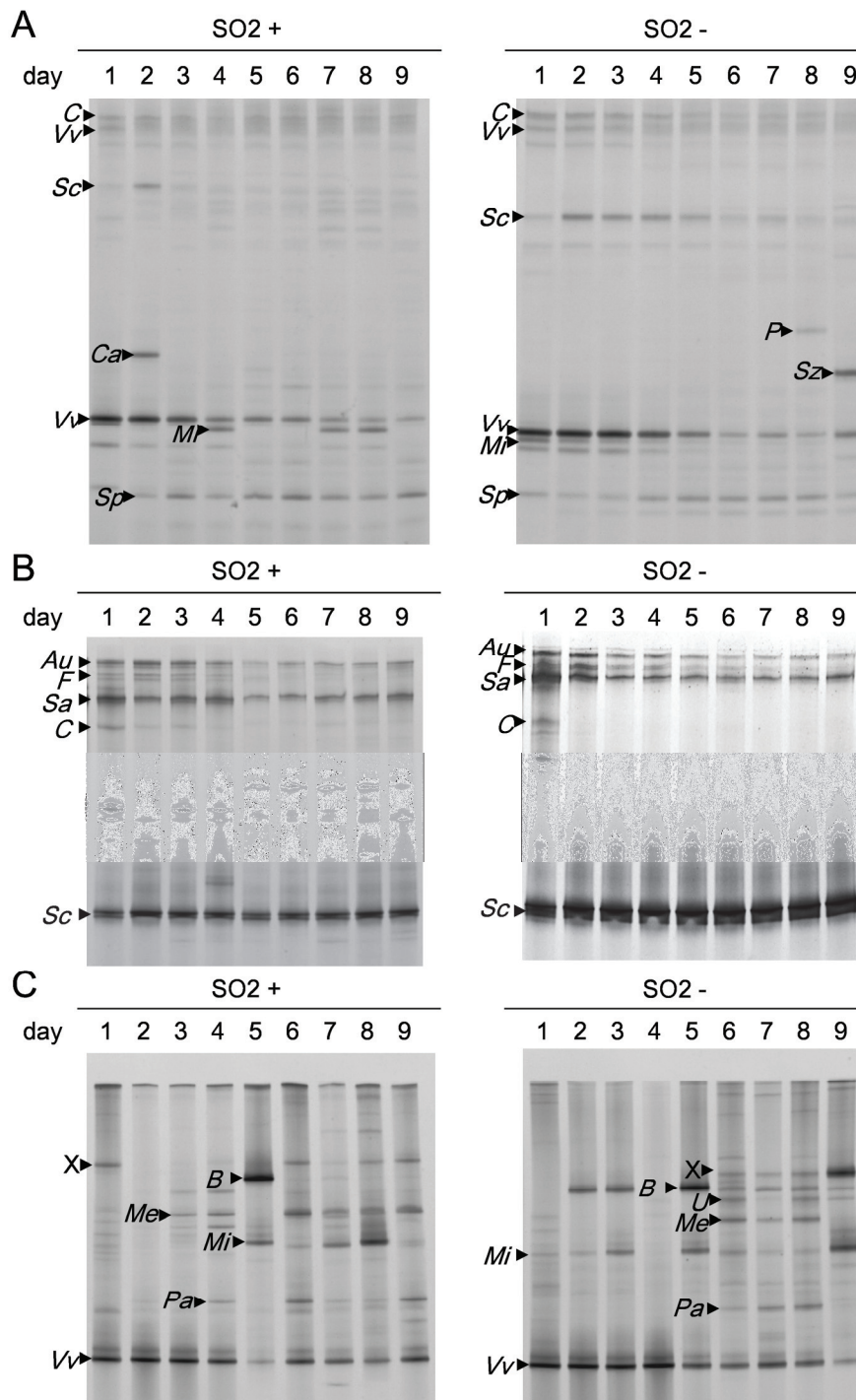


図 2.5.3. 発酵中赤ワインマストの PCR-DGGE 解析結果

ユニバーサルプライマーセット (A), 真菌用プライマーセット (B) 及び細菌用プライマーセット (C) を用いた結果を示す。亜硫酸添加及び無添加はそれぞれ SO₂+ 及び SO₂- で示した。微生物名の略記号は次のとおり。Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Vv, *Vitis vinifera*; C, *Candida* sp.; Me, *Methylophilus* sp.; P, *Pediococcus* sp.; Ca, *Caulobacteraceae*; Sz, *Schizosaccharomyces* sp.; Mi, *Microbacterium* sp.; Sp, *Sphingomonas* sp.; Au, *Aureobasidium* sp.; F, *Fungal* sp.; Sa, *Saccharomyces* sp.; B, *Brevundimonas* sp.; Pa, *Propionibacterium acnes*; U, unidentified bacterium.

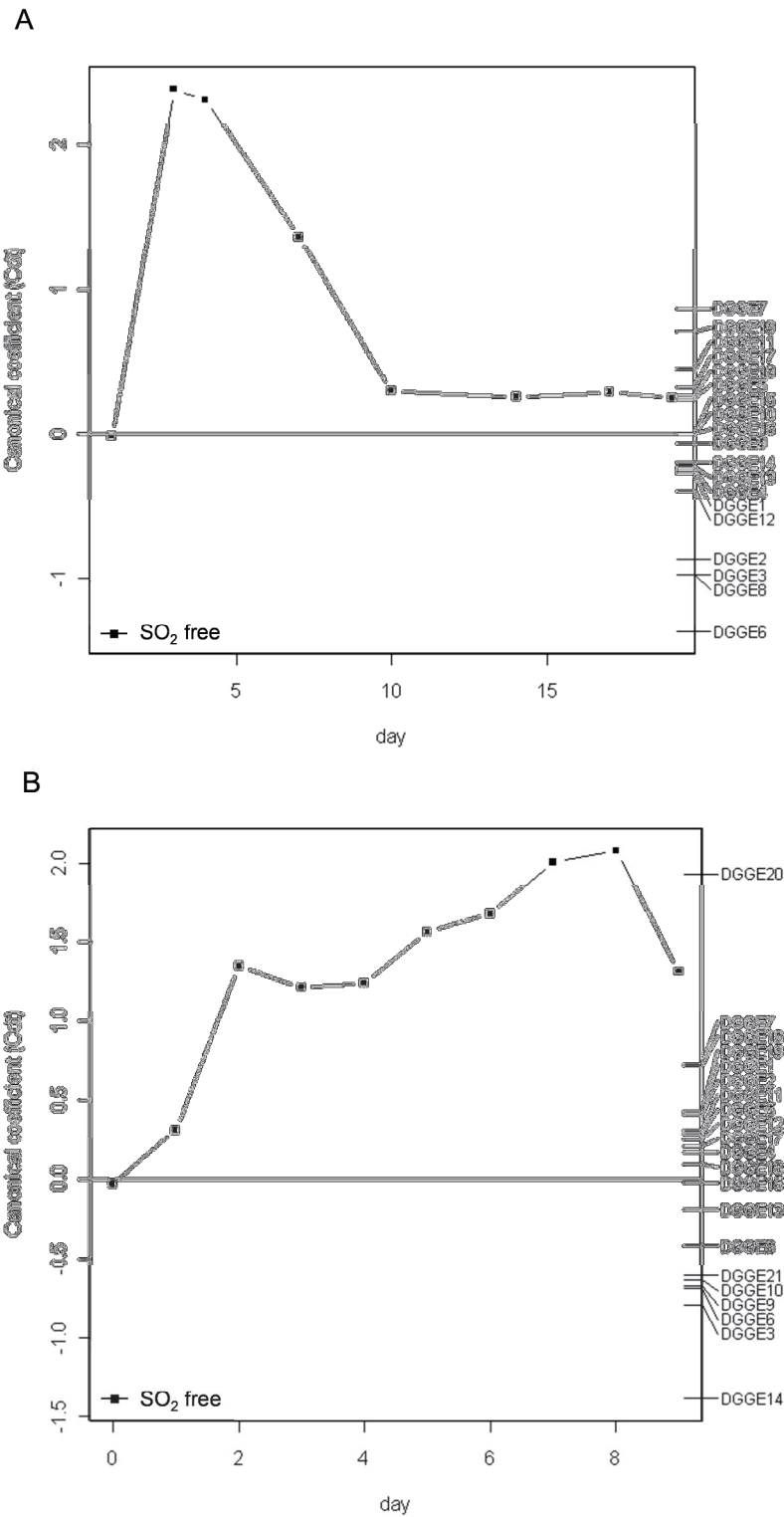


図 2.5.4. PCR-DGGE 解析結果に基づく PRC 解析結果

白ワインマスト (A) 及び赤ワインマスト (B) の解析結果を示す。横軸は発酵開始後の日数、縦軸は canonical coefficient (Cdt) を示す。赤及び白ワインマストいずれにおいても、亜硫酸添加ワインマストの Cdt は常に 0 の値をとる。

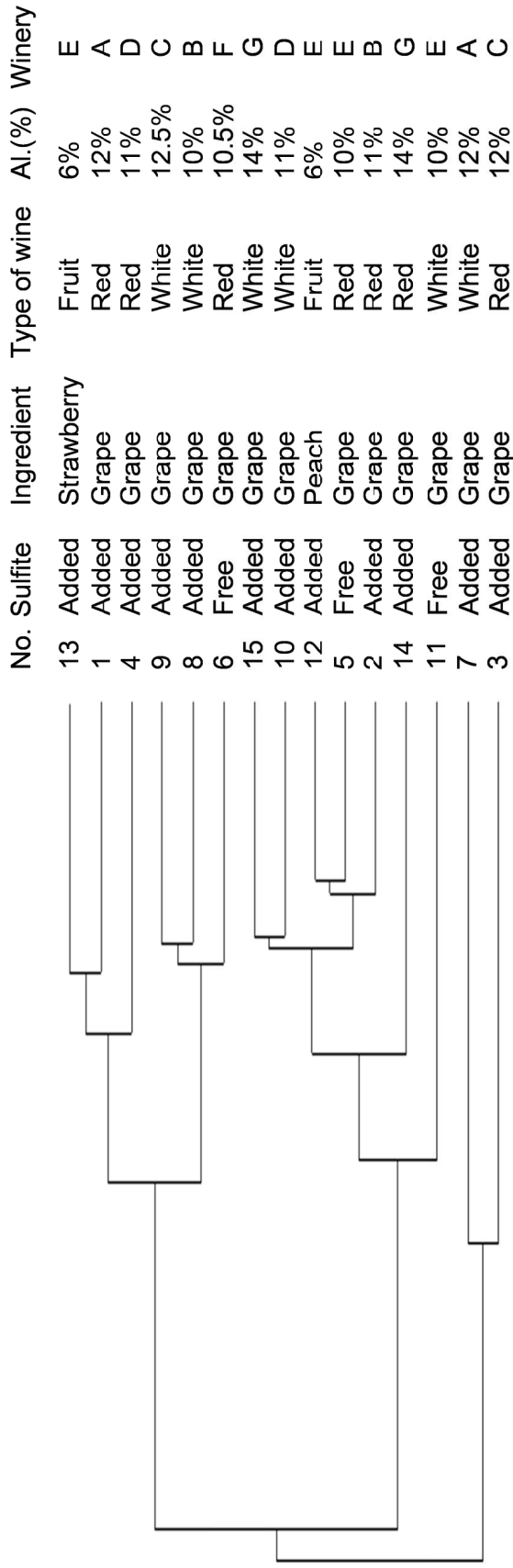


図 2.5.5. 市販ワインの微生物叢のクラスター解析結果

市販ワインの PCR-DGGE 法により得られたバンドを定量化し作成した樹状図。No. 1～15 は、表 2.5.1. の No. と一致する。

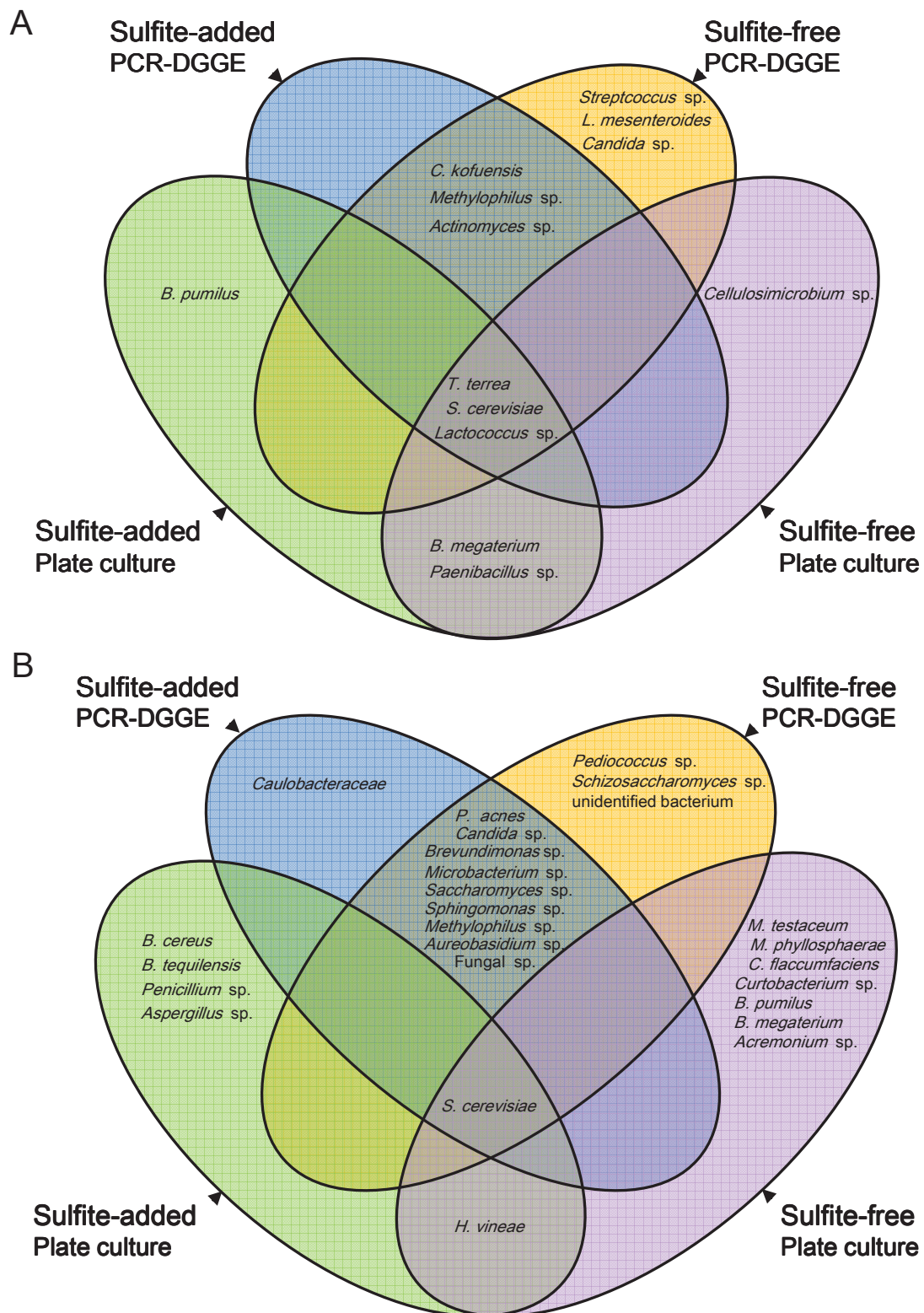


図 2.5.6. 培養法及び分子生物学的手法で検出された微生物を示すベン図

白ワインマスト (A) 及び赤ワインマスト (B) の発酵中に検出されたすべての微生物を示した。ベン図中に示されている微生物には、一過性で発酵終了時には検出されていない微生物も含まれる。

2.6. 小括

ワイン醸造工程及び最終製品における乳酸菌や酢酸菌以外の細菌及び野生酵母を含む微生物叢の亜硫酸添加／無添加による違いを培養法及び PCR-DGGE 法を用いて解析した。培養法により検出された微生物と PCR-DGGE 法により検出された微生物は異なっていたが、おそらくそれは、培地の選択性や PCR を介する手法の特徴によるためである。赤ワインと白ワインの両方において、発酵中の微生物叢は亜硫酸無添加ワインよりも亜硫酸添加ワインの方で多様性が低かった。培養法及び PCR-DGGE 法の両方で発酵中のマストから、*T. terreus* が検出され、亜硫酸添加によりその生育はある程度抑制された。ワイン製造における予期しない微生物の生育抑制に亜硫酸添加が重要な役割を果たしていることが確認できたが、一方で、いくつかの微生物は亜硫酸を添加したワイン発酵マスト中でも生存及び生育できることが明らかとなった。さらに 15 点の市販ワインを PCR-DGGE 法により解析したところ、様々な微生物が検出された。それらの中でも、*Sphingomonas* sp., *Pseudozyma* sp., *Ochromonas* sp., *Methylophilus* sp. は、私の知る限りワイン中から初めて検出された。亜硫酸無添加ワインでのみ検出される微生物を特定することはできなかった。最終製品の微生物叢はろ過工程や製造設備、貯蔵環境などのようなその他の要因に影響されることが示唆された。

第3章

培養法及び分子生物学的手法によるビール系酒類醸造工程の微生物叢の評価

3.1. 序言

上質なビール醸造を行うための最も重要な要因の一つに微生物の適切な管理があり、これまでに行われている多くの先行研究により、醸造工程中の微生物の生育はビールの品質に悪影響をもたらすことが報告されている (Rainbow, 1981; Jespersen and Jakobsen, 1996; Suzuki *et al.*, 2008; Bokulich and Bamforth, 2013)。一例をあげると、真菌に関しては、*Wickerhamomyces* や *Pichia* (旧名 *Hansenula*)、*Brettanomyces/Dekkera* などはオフフレーバーの原因となり、*Kloeckera* や *Candida* は混濁を生じさせる。また、細菌に関していえば、*Pediococcus damnosus* のような乳酸菌や *Pectinatus* 属、*Megasphaera* 属細菌はオフフレーバーの生成や混濁の生成、味の劣化をもたらす (Rainbow, 1981; Campbell, 2003; Priest, 2003; Van Vuuren and Priest, 2003; Boulton and Quain, 2006)。ランビックのような特定のビールについては、前述の微生物のいくつかは、製品の特徴づけにかかわっていることもあるものの (Oevelen *et al.*, 1977; Spitaels *et al.*, 2014)、通常はこれらの微生物は品質の劣化を引き起こすものとして見なされている。たとえ、生育により香味に影響を与えないような微生物であったとしても、栄養分を消費することで発酵経過が遅れる可能性がある。Haakensen と Ziola (2008) は、従来ビール中で生育すると考えられていなかった細菌がビール中で生育できることを報告している。そのため、醸造工程中の微生物叢を詳細に把握し、ビールの品質や発酵に影響を与える微生物を制御することは重要である。しかし、これまでに行われている微生物叢解析の研究のほとんどが培養法を用いて行われており、培地によるバイアスや VBNC 状態の微生物の存在など、検出されていない微生物が多く存在している (Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Desfossés-Foucault *et al.*, 2012)。PCR-DGGE 法や次世代型シーケンサーによる解析など、培養法を用いない分子生物学的手法を用いることで、培養によるバイアスを排除した上で効果的に多種の微生物を検出することができるが、これまでに分子生物学的手法を用いて、網羅的に各種ビール醸造工程中の微生物叢の解析を行った例は少ない (Bokulich *et al.*, 2012a)。さらに、日本国内では、味わいを軽くする目的や、麦芽の使用比率により税率が異なる税体系であることから、低い税率の適用を受ける目的で、麦芽の一部を大麦に置き換えて醸造される発泡酒や新ジャンルと呼ばれるビール類似製品 (以下、ビールも含め「ビール系酒類」という。) が造られているが、大麦を使用したビールの微生物叢に関してほとんど報告されていない。本章では、麦芽 100%のビール (以下、「麦芽 100%ビール」という。)、麦芽使用比率 50%の発泡酒 (以下、「麦芽 50%発泡酒」という。) 及び麦芽使用比率 25%の発泡酒 (以下、「麦芽 25%発泡酒」という。) を試験醸造し、ビール系酒類醸造工程における微生物叢を次世代型シーケンサーにより詳細に解析した。

3.2. 実験材料と方法

3.2.1. 使用した試薬及び培地

50× TAE ストック溶液、ニュートリエント寒天培地、MRS 寒天培地、ポテトデキストロース寒天培地については、第2章 2.2.1. に従って調製した。ユニバーサルビール寒天培地の組成は以下のとおりであり、121°C で10分間のオートクレーブ処理後、60°C 程度に冷却後に 0.2 μm のカートリッジフィルターでろ過滅菌したシクロヘキシミドを添加したものを使用した。

ユニバーサルビール寒天培地 (Universal Beer Agar)

Difco Universal Beer Agar (DIFCO)	62.0 g
H ₂ O	750 mL
Commercial Beer	250 mL
10 mg/mL Cycloheximide (和光純薬工業)	1 mL
pH	6.3

3.2.2. ビール醸造

ビールの小規模試験醸造は酒類総合研究所のビールプラントを用いて、最終液量約 120 L の系で実施し、麦芽 100%ビールでは 20 kg の麦芽を、麦芽 50%発泡酒では 10 kg の麦芽及び 10 kg の大麦を、麦芽 25%発泡酒では麦芽 5 kg 及び大麦 15 kg を原料として用いた。なお、麦芽はドイツ産の市販麦芽を、大麦は酒類総合研究所の実験用圃場で栽培されたものを使用した。ホップは煮沸開始時にナゲット産 Type 90 を 50 g、煮沸開始 30 分後にハラタウ産 Type 45 を 15 g、煮沸開始 80 分後にザーツ産 Type 45 を 35 g 計 100 g 添加した。麦汁は、インフュージョン法で製造し、150 分間の糖化、ろ過、90 分間の煮沸、ワールプールによる清澄化及びプレートクーラーによる冷却により冷麦汁を調製した。冷麦汁は調製後すぐに発酵タンクに移動し、*Saccharomyces pastorianus* W34/70 を添加し、10°C で 23 日から 24 日間主発酵を行い、その後、2°C で後発酵を実施した。ろ過は、SUPRADisc II modules (Pall) を用いて行った。なお、大麦使用時は麦芽を使用した場合に比べ酵素の力価が低くなるため、糖化用及びタンパク分解用の酵素を添加した。糖化プログラム等、具体的な醸造工程は図 3.5.1. に示す。発酵の管理はビール自動分析装置 SCABA (Tecator AB) により分析したエタノール濃度に基づいて行った。サンプリングは、表 3.5.1 に示した時点で行い、発酵タンクに設置してあるサンプリングコックから、それぞれ 100 mL を採取した。サンプルは採取後すぐに、培養法による解析に使用するものは 4°C で、分子生物学的手法による解析に使用するものは -40°C で、使用時まで保存した。

3.2.3. 麦汁及びビール的一般分析

アルコール分、滴定酸度、pH 及び濁度などの一般分析は、ビール酒造組合発行の改訂 BCOJ ビール分析法に従った (Brewery Convention of Japan, 2004)。

3.2.4. DNA 抽出

各サンプルからのゲノム DNA の抽出は、NucleoSpin Soil キット (マッハライ・ナーゲル社) を用いて行った。得られたゲノム DNA の濃度はピコドロップ微量分光光度計 (ピコドロップ社) により行い、使用時まで -30°C で保存した。

3.2.5. 次世代型シーケンサーによる解析

次世代型シーケンサーによるアンプリコン解析のための PCR は、 $50\ \mu\text{L}$ の系で実施し、反応液組成は、 $1\times$ KOD-plus Neo バッファー、 $1.5\ \text{mM}$ の MgSO_4 、 $0.2\ \text{mM}$ の dNTP 混合溶液、 $1\ \text{U}$ の KOD-plus Neo、 $0.3\ \mu\text{M}$ の各プライマーセット及び鋳型として $100\ \text{ng}$ のゲノム DNA を用いた。プライマーセットは、細菌叢解析用として SSU-rRNA をターゲットとした 968F 及び 1492R (以下、「細菌叢解析用プライマーセット」という。)、真菌叢解析用として LSU-rRNA をターゲットとした NL1 及び NL4 (以下、「真菌叢解析用プライマーセット」という。)を用いた。なお、それぞれのプライマーにはサンプル識別用タグである MID と次世代シーケンスに必要なシーケンス用配列を 5'末端側に付加しており、本章で使用したプライマーと MID はそれぞれ表 3.5.2. 及び表 3.5.3. に示す。サーマルサイクラーの温度プログラムは、 96°C で 3 分の予備変性工程後、 96°C で 15 秒、 50°C で 30 秒及び 68°C で 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクルとした。PCR により得られた増幅産物の塩基長は、 $100\ \text{bp}$ DNA ラダーマーカーとともに 1.2%のアガロースゲルで電気泳動することにより推定した。得られた増幅産物は、ベックマンコールタージェノミクス社に分析を委託し、Roche/454 GS FLX Titanium を用いて解析を行い、得られた塩基配列データは、SFF Tools ver. 2.6 を用いた MID 毎の振り分け及びシーケンス用プライマーの除去を行った。

SSU-rRNA 遺伝子のアンプリコン解析により得られた配列は、DDBJ から入手した 16S.seq.gz (2013 年 2 月 16 日ダウンロード) を参照配列とした ChimeraSlayer (Haas *et al.*, 2011) により PCR に由来するキメラ配列を除去した後、MacQIIME (Caporaso *et al.*, 2010) を用いて、RDP classifier アルゴリズムを使用し、confidence threshold は 0.8 の条件下で属の推定を行った。また、細菌を対象とした SSU-rRNA 遺伝子の解析であっても、真核微生物のオルガネラなど一部真核微生物由来の SSU-rRNA 遺伝子の増幅が見られるため、真核微生物の SSU-rRNA 遺伝子として推定されたものを除き、細菌の群集構造推定結果とした。

真核微生物の群集構造については、NL1 及び NL4 プライマーで増幅された LSU-rRNA 遺伝子のアンプリコン解析結果から推定した。具体的には、得られた配列を blastclust により相同性 98%の閾値で OTU として、6 以上の配列から構成される OTU については、454 GS De Novo Assembler を用いてアセンブルすることで各 OTU を代表する配列 (以下、「代表配列」

という。)とした。5以下の配列から構成される OTU に関しては、もっとも冗長度の高く長い配列を代表配列とした。なお、454 GS De Novo Assembler を用いたアセンブルは株式会社ジナリスに委託した。得られた代表配列は RDP classifier 及び UNITE OTU (ITS) を使用した QIIME による属の推定を行ったが (Abarenkov *et al.*, 2010; Lan *et al.*, 2012)、*Saccharomyces* 属など UNITE OTU (ITS) では属の推定ができない配列も存在したため、存在比率が 2%を超え、かつ、QIIME による解析で属レベルまで推定できていない物については、GenBank のデータベースから 98%以上のカバー率及び98%以上の相同性を示すものを BLAST により検索し、種の推定を行った。この際、単一の種に絞り込めない場合は、相同性が高い上位 10 種の内もっとも頻出の種に同定し、最終的に属レベルまで推定した後、各サンプルの総リード数と各 OTU に含まれるリード数から各微生物の検出比率を算出した。

3.2.6. 定量 PCR

細菌及び真核微生物の rRNA 遺伝子の定量 PCR による定量はそれぞれ、Nadkarni らの方法 (2002) 及び Liu らの方法 (2012) に従った。具体的には、PCR は 20 μ L の系で実施し、表 3.5.2 記載の 0.1 μ M のフォワードプライマー、リバースプライマー及び二重標識加水分解プローブを含有する 1 \times EagleTaq Master Mix with ROX (ロシュ・ダイアグノスティックス) で行った。

細菌の rRNA 遺伝子数の定量のため、検量線作成用として *Lactobacillus hilgardii* の 16S rRNA 遺伝子を含む pCR4Blunt-TOPO プラスミド (全長 5489 bp) を使用した。サーマルサイクラーの温度プログラムは、50°C で 2 分、95°C で 10 分の予備加熱工程後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクルとした。定量下限は検量線の直線性から、反応チューブ当たり 400 コピーとした。

真核微生物の rRNA 遺伝子数に関しては、検量線作成用として *Saccharomyces cerevisiae* の SSU-rRNA の内部配列を含む pCR4Blunt-TOPO プラスミド (全長 5315 bp) を使用し、サーマルサイクラーの温度プログラムは、50°C で 3 分、95°C で 10 分の予備加熱工程後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分を 1 サイクルとして 45 サイクルとした。定量下限は検量線の直線性から、反応チューブ当たり 200 コピーとした。定量 PCR による解析は 3 回の繰り返し試験を行った。

3.2.7. 細菌数の推定法

細菌数 cells/mL は次の基準に従って推定した。

(1) 次世代型シーケンサー解析により得られた各細菌の存在比率を、定量 PCR により得られた各細菌の SSU-rRNA のコピー数に掛け合わせる。

(2) 上記により得られた細菌毎の rRNA コピー数を各細菌の持つ rRNA 遺伝子のコピー数で割る。

本研究で用いた各細菌の持つ rRNA 遺伝子のコピー数は、Ribosomal RNA Operon Copy Number Database (<http://rrndb.umms.med.umich.edu/>) から引用した (Klappenbach *et al.*, 2001)。

3.2.8. 蛍光 *in situ* hybridization 及びフローサイトメトリー

蛍光 *in situ* hybridization は、Rigottier-Gois らの方法 (2003) に従った。また、フローサイトメトリーは、Cleusix らの方法 (2010) に従った。まず、サンプルを 100 μm のストレーナー (BD Falcon) でろ過し、10,000 $\times\text{g}$ 、4°C で 5 分間遠心分離した。それからペレットを PBS で懸濁したものに、PBS の 3 倍量の 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝生理食塩水を添加し、固定した。固定後の菌体は、10,000 $\times\text{g}$ 、4°C で 5 分間遠心分離し、ペレットを PBS で洗浄した後で、再度 10,000 $\times\text{g}$ 、4°C で 5 分間遠心分離し、得られたペレットを 220 μL の PBS で懸濁した。その後、2 mg/mL の Zymolyase を 25 μL (最終濃度 4 U/mL) 及び 2-メルカプトエタノールを 5 μL 添加し、室温で 5 分間反応させた後、Tris-EDTA バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA) で洗浄し、1 mg/mL の Lysozyme で室温、10 分間処理した。処理後の菌体は、ハイブリダイゼーションバッファー (900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% (w/v) SDS, 30% formamide) で 2 度洗浄し、100 pmol のオリゴヌクレオチドプローブを含む 100 μL のハイブリダイゼーションバッファーに懸濁し、35°C で終夜ハイブリダイゼーションを行った。なお、オリゴヌクレオチドプローブは、細菌検出用は EUB338、真核微生物検出用は Pf2 を用いた (表 3.5.2.)。ハイブリダイゼーション終了後、菌体は洗浄用バッファー (64 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% SDS) で 37°C、20 分間処理し、10,000 $\times\text{g}$ で 15 分間遠心分離した。その後、ペレットを 100 μL の PBS に懸濁し、800 μL のクエン酸添加 Tris-EDTA バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), 30 mM クエン酸カリウム (pH 8.0)) 及び 100 μL の Flow-Count Fluorosphere beads (ベックマンコールター) を添加し、1 mL とした。なお、Flow-Count Fluorosphere beads は濃度既知の標準粒子であり、本研究に用いたものは、994 個/ μL であった。フローサイトメトリーによる解析は、微生物の検出には FITC ラベルされたオリゴヌクレオチドプローブを使用していることから、525 nm の フィルターを、Flow-Count Fluorosphere beads の検出には 610 nm のフィルターを用い、フローレートは 1000 events/sec を超えないように設定した。フローサイトメトリーによる解析は、Coulter Elite flow cytometer (ベックマンコールター) により行った。

3.2.9. 統計解析

定量 PCR と次世代型シーケンサーによる解析結果から推定された各細菌の菌体数の製造工程中の変遷は、統計解析ソフトウェア R 及びヒートマップ解析用パッケージである Heatplus を用いて、ヒートマップ解析を行った (R Core Team, 2011; Ploner, 2012)。なお、ヒートマップ解析前の処理として、次の基準に基づいてデータを加工した。

(1) 発酵開始前のデータは除去（これは、煮沸工程前の微生物叢が非常に多様で菌数も多いため、データの標準化を行った際に、発酵中の微生物叢の変遷が理解しにくくなるためである。）

(2) 発酵中及び貯蔵中に1度も100 cells/mL以上の菌体数が検出されなかったデータは除去

3.2.10. 培養条件

各サンプルは、サンプリングしたその日に各種培地に接種した。真核微生物の検出には、10 µg/mLのクロラムフェニコールを含むポテトデキストロース寒天培地を用いて、30°Cで48時間培養した。一般細菌の検出には、10 µg/mLのシクロヘキシミドを含むニュートリエン寒天培地を用いて、37°Cで48時間培養した。乳酸菌の検出には、10 µg/mLのシクロヘキシミドを含むMRS寒天培地を用いて、嫌気条件下25°Cで1週間培養した。ビール汚染細菌の検出には、10 µg/mLのシクロヘキシミドを含むUBA培地を用いて、好気条件下25°Cで48時間及び嫌気条件下25°Cで1週間培養した。各原料のcfu/gを算出するため、使用した大麦及び麦芽をLaboratory Disk Mill (Universal DLFU)で破碎し、1gに滅菌水を加えて10 mLとしたものを培養法により解析した。サンプルは、滅菌水で原液~10,000倍まで10倍の段階希釈し、100 µLを各種培地に接種した。

3.2.11. コロニー形成微生物種の推定

形成されたコロニーはPCR-RFLP法及びrRNA遺伝子の配列決定により微生物種の推定を行った。具体的には、各プレートで形成されたコロニーが12以下の場合にはすべてのコロニーを、また、12以上の場合にはランダムに12個のコロニーを選択し、表3.5.2.に示す27F/1492Rのプライマーセットを用いて、コロニーダイレクトPCRによりrRNA遺伝子のほぼ全長を増幅した。サーマルサイクラーの温度プログラムは、96°Cで3分の予備変性工程後、96°Cで15秒、53°Cで30秒及び72°Cで90秒を1サイクルとして40サイクルとした。増幅産物はHinf I及びHae IIIでそれぞれ制限酵素処理し、得られたDNA断片は1.2%のアガロースで電気泳動を行い、同一バッチの発酵タンクから採取されたサンプル由来のコロニーでいずれの制限酵素でも同一の切断パターンを示すものは同一の微生物とみなした。同一バッチの発酵タンク由来で、切断パターンが異なるものは全てrRNA遺伝子の内部配列をシーケンスにより配列決定し、BLASTを用いて相同性検索を行い微生物種の推定を行った。細菌の種推定はSSU-rRNA遺伝子の内部配列に基づいて行い、シーケンスは、まず、表3.5.2.記載の341Fで行い、得られた結果で種の推定ができない場合は、531R及び1492Rを用いたシーケンスを行った。真核微生物の種推定には、表3.5.2.記載のNL1及びNL4プライマーにより増幅されるLSU-rRNA遺伝子の内部配列を用い、NL1プライマーを用いてシーケンスを行った。なお、本章で得られた塩基配列はDDBJに登録を行っており、AB934934~AB934985のアクセッション番号が付与されている。

3.3. 結果

3.3.1. 発酵経過の概要

ビール系酒類の発酵中の一般成分分析結果を図 3.5.2. に示す。麦芽 100%ビールは、アルコール濃度の増加と外観エキスの減少が遅く、その他の発泡酒と比較して発酵の遅れが見られた (図 3.5.2.A, B)。滴定酸度は麦芽 100%ビールと、麦芽 50%発泡酒及び麦芽 25%発泡酒で明らかに違いが見られたのに対し、pH ではほとんど差が見られなかった (図 3.5.2.C, D)。また、660 nm の光学密度から推定される酵母密度の増加は、麦芽 25%発泡酒で最も早く、麦芽 100%ビールと麦芽 50%発泡酒ではほぼ同程度であった (図 3.5.2.E)。

3.3.2. ビール発酵過程における微生物叢の変遷

次世代型シーケンサーによる解析結果について、細菌叢解析用プライマーセットを用いて得られた結果を表 3.5.4. に、真菌叢解析用プライマーセットを用いて得られた結果を表 3.5.5 に示す。この結果を利用し、細菌及び真核微生物の菌体数を、定量 PCR と次世代型シーケンサーを組み合わせた方法 (以下、「rRNA 遺伝子定量法」という。)、フローサイトメトリー法、培養法で推定した結果が表 3.5.6、表 3.5.7. 及び図 3.5.3. である。細菌数はフローサイトメトリーでも定量を試みたが、菌体の密度が少なく、定量が困難だった。また、真核微生物も次世代型シーケンサー及び定量 PCR で解析は行ったものの、各真核微生物の遺伝子上に存在する rRNA 遺伝子のコピー数に関するデータベースが存在しないため、菌体数を算出することができなかった。

rRNA 遺伝子定量法及びフローサイトメトリー法で得られた総菌体数の増減傾向は、培養法で得られた物と類似していた。一方で、総菌体数に関しては、rRNA 遺伝子定量法及びフローサイトメトリー法により得られた総菌体数は、培養法により得られた菌体数よりも多く、総細菌数と総真菌数いずれも培養法では 1 桁~2 桁少なく推定された。今回醸造した 3 種類のビール系酒類の発酵中の細菌数の推移は、ほとんど一致しており、煮沸によって顕著に減少し、発酵初期に若干の増加が見られ、発酵後期に向かって徐々に減少し、ろ過でわずかに増加する傾向にあった (図 3.5.3. 及び表 3.5.6.)。麦芽 100%ビールの細菌数は、発泡酒 2 種に比べ多くなっていたものの、真核微生物に関しては、分子生物学的手法及び培養法いずれの手法を用いてもサンプル間での顕著な違いは見られなかった。

3.3.3. ビール系酒類醸造過程における細菌叢

培養法による解析で様々な細菌が検出されており、その結果を表 3.5.8、表 3.5.9. 及び表 3.5.10. に示す。乳酸菌及び *Enterobacteriaceae* spp. は麦芽の使用比率にかかわらず、仕込み時に検出されたものの、仕込や煮沸など熱の加わる工程以降では、分子生物学的手法及び培養法いずれの手法でも検出されなかった。培養法で検出されたほとんどの細菌が、*Proteobacteria* 門か *Firmicutes* 門に属しており、*Bacillales* 目に属する細菌が発酵中のサン

ルから検出された。また、使用原料に由来する細菌数を調べた結果、麦芽では 10^6 cfu/g 程度のオーダー、大麦では $10^3 \sim 10^5$ cfu/g 程度のオーダーの細菌が検出された (表 3.5.11.)。

次世代型シーケンサーを用いた解析では、図 3.5.4. に示すとおり門レベルでも非常に多種の細菌が検出され、28~88 属の細菌が検出された。なお、発酵中のサンプルからは、真核微生物のオルガネラに由来する配列も検出され、そのほとんどが *Saccharomyces* 属として推定された。*Enterobacteriaceae* 科及び *Leuconostocaceae* 科に属する細菌も検出され、仕込み開始時には多数を占めていたが、仕込及び酵母添加後では、その検出比率が大きく減少した。麦芽に由来すると考えられるものとして、*Achromobacter* 属、*Arthrobacter* 属、*Blastococcus* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Clavibacter* 属、*Corynebacterium* 属、*Curtobacterium* 属、*Janthinobacterium* 属、*Luteimonas* 属、*Massilia* 属、*Pedobacter* 属、*Pseudoclavibacter* 属、*Rhizobium* 属及び *Sanguibacter* 属の細菌が、仕込み開始時または煮沸前の段階ですべての仕込みから検出されたものの、これらも煮沸によって検出比率が大きく減少した。また、*Acinetobacter* 属、*Bacillus* 属、*Escherichia* 属、*Methylobacterium* 属、*Paenibacillus* 属、*Propionibacterium* 属、*Pseudomonas* 属、*Ralstonia* 属、*Actinomycetales* 目、*Rhizobiales* 目の細菌及び未同定細菌が、すべての仕込みの発酵工程で検出されたものの、そのうち *Acinetobacter* 属、*Methylobacterium* 属、*Pseudomonas* 属、*Propionibacterium* 属、*Ralstonia* 属及び *Rhizobiales* 目の細菌については、培養法では検出されなかった。一方、大麦に由来すると考えられるものとして、*Agrococcus* 属、*Hymenobacter* 属、*Nocardoides* 属、*Okibacterium* 属、*Plantibacter* 属及び *Sphingobacterium* 属の細菌が、麦芽 50%発泡酒及び麦芽 25%発泡酒の仕込み開始時または煮沸前の段階で検出された。

3.3.4. ビール系酒類醸造過程における真核微生物叢の変遷

培養法を用いた解析によって、仕込み開始時に、麦芽 100%ビールでは *Pichia fermentans* 及び *Wickerhamomyces anomalus* が、また、麦芽 50%及び 25%発泡酒では *Cyberlindnera fabianii*、*Pichia fermentans* 及び *S. cerevisiae* が検出された。発酵開始後はコロニー数が大きく増加したが、それらのコロニーをランダムに選んで種の推定を行った結果、すべてが *S. pastorianus* であり、添加したビール醸造用酵母が検出されていた。次世代型シーケンサー解析結果でも、*Pichia* 属や *Wickerhamomyces* 属を含む多くの属の真核微生物が検出されており、サンプリングポイントや麦芽の使用比率によっても異なるものの、9~38 属の真核微生物が検出されたが、*Pichia* 属及び *Wickerhamomyces* 属が占める検出比率は低く、それぞれ、7%以下及び 3%以下であった。図 3.5.5. に示すとおり、酵母添加後のサンプルでは、次世代型シーケンサー解析で得られた配列のほとんど (約 98%以上) が、*Saccharomyces* 属であった。また、サンプリングのタイミングや麦芽の使用比率に関わらず、すべてのサンプルから *Saccharomyces* 属及び *Candida* 属が検出された。*Alternaria* 属、*Aureobasidium* 属、*Cryptococcus* 属、*Cystofilobasidium* 属、*Dioszegia* 属、*Fusarium* 属、*Gibberella* 属、*Hanseniaspora* 属、*Kazachstania* 属、*Penicillium* 属、*Sporidiobolus* 属、*Sporobolomyces* 属及び *Wickerhamomyces*

属の真核微生物が、仕込み開始時または煮沸前の段階ですべての仕込みから検出された。仕込み開始時または煮沸前の真核微生物叢に着目すると、各仕込みに特徴的なものとして、*Saturnispora* 属が麦芽 50%または 25%発泡酒より、麦芽 100%ビールでより多く検出されたが、一方で、*Didymosphaeria* 属、*Eurotiomycetes* 属及び *Udeniomyces* 属は、麦芽 100%ビールと比較し、麦芽 50%または 25%発泡酒でより多く検出された。*Hannaella* 属、*Haplotrichum* 属及び *Wallemia* 属は、発酵初期～中期にかけて検出され、*Aspergillus* 属、*Cladosporium* 属、*Dipodascus* 属、*Exidia* 属、*Galactomyces* 属、*Kluyveromyces* 属、*Malassezia* 属、*Pichia* 属、*Schizosaccharomyces* 属及び *Torulaspota* 属は、すべての仕込みの発酵工程で見られた。ろ過後のサンプルからは、真核微生物は検出されなかった。

3.3.5. 発酵工程中及び貯蔵中の細菌の消長

rRNA 遺伝子定量法で得られた発酵及び貯蔵中の菌体数の増減に基づいて、ヒートマップ解析を行った結果を図 3.5.6. に示す。主として発酵の初期から中期にかけて増加傾向を示す *Acidovorax* 属、*Bacillus* 属、*Brevundimonas* 属、*Caulobacter* 属、*Chryseobacterium* 属、*Methylobacterium* 属、*Paenibacillus* 属、*Polaromonas* 属、*Pseudomonas* 属、*Ralstonia* 属、*Roseateles* 属、*Sphingomonas* 属、*Stenotrophomonas* 属、*Tepidimonas* 属及び *Tissierella* 属の細菌が検出された。

3.4. 考察

これまでの研究では、乳酸菌など特定の微生物の調査は精力的に行われているものの、ビール製造工程中の網羅的な微生物叢に関する研究は少ない現状にある (Bokulich and Mills, 2012; Bokulich *et al.*, 2012a)。本章では、3 種類のビール系酒類を試験醸造し、培養法及び分子生物学的手法を用いて、その微生物叢を明らかにすることを目的として研究を行った。分子生物学的手法による微生物叢解析にあたり、定量 PCR 及び次世代型シーケンサーを用いて細菌数を推定する rRNA 遺伝子定量法を開発し、各仕込みににおける細菌数の定量に使用した。なお、rRNA 遺伝子定量法は、複雑な微生物叢における細菌数の定量を次世代型シーケンサーにより行う上で有用ではあるが、同属の種間で顕著に rRNA 遺伝子のコピー数に差がある場合には、本手法で推定される菌体数と実態が異なる可能性があることに留意する必要がある。

本章の研究により、ビール醸造工程中の微生物叢は極めて多様であることが明らかとなった。検出された細菌の内、これまでに汚染微生物として報告のあるものとしては、*Acetobacter* 属、*Enterobacter* 属、*Gluconobacter* 属、*Hafnia* 属、*Klebsiella* 属、*Lactobacillus* 属、*Micrococcus* 属、*Pediococcus* 属及び *Rahnella* 属だが (Rainbow, 1981; Priest, 2003; Van Vuuren and Priest, 2003)、*Bacillus* 属細菌のようにいくつかの細菌は発酵工程中で生存可能であることを見出し、潜在的な汚染細菌である可能性を示した。それらの細菌の汚染原因としては、麦芽や大麦から持ち込まれた芽胞等が煮沸工程を生き延びて残存する可能性や、

送液ラインや培養酵母、またはエアレーションチューブの汚染など煮沸工程以降に持ち込まれた可能性が考えられる。今回試験醸造した3種類のビール系酒類の内、原料混合時（仕込み開始直前）のサンプルの結果を比較すると、麦芽100%ビールから検出された細菌数が約 10^9 cells/mLと最も多かった。おそらくこれは、麦芽自体の細菌数が大麦と比較して多いためであると考えられる（表 3.5.11.）。しかしながら、種類数で見た場合、麦芽100%ビールよりも麦芽50%及び25%発泡酒の方が、はるかに多様性がある（表 3.5.4.、表 3.5.8.、表 3.5.9. 及び表 3.5.10.）。これは、先行研究でも明らかとなっているように製麦工程で微生物叢が変遷しているため (Juste *et al.*, 2014)、麦芽の微生物叢と大麦の微生物叢が異なっていることを示唆している。真菌においても、麦芽の使用比率で検出比率に差が出ているものが存在していた。*Saturnispora* 属が麦芽100%ビールでより多く検出された一方で、*Didymosphaeria* 属、*Eurotiomycetes* 属及び*Udeniomyces* 属は、麦芽50%または25%発泡酒でより多く検出された。これらの真核微生物は、仕込前の工程、すなわち、製麦の工程において、生育または死滅しているものと考えられる。ただし、大麦と麦芽の微生物叢の違いについて信頼性のある評価を行うためには、複数のサンプルを用いて更なる解析を行う必要がある。

Bacillus 属及び *Paenibacillus* 属の細菌は、次世代型シーケンサー、培養法、いずれの手法によっても発酵中に検出されており、この結果は、*Bacillus* 属や *Paenibacillus* 属細菌がビール中で生育可能であるとする先行研究とも一致している (Haakensen and Ziola, 2008)。しかしながら、rRNA 遺伝子定量法で推定される *Bacillus* 属及び *Paenibacillus* 属細菌の菌数 (cells/mL) は、培養法により算出される菌数 (cfu/mL) よりも多い。また、次世代型シーケンサーにより検出された属の総数は、191 属であり、培養法で検出された属数の約10倍にあたる（表 3.5.4.）。これらは、分子生物学的手法による結果が多数の死菌を検出しているためである可能性はあるものの、一方で、培養法では、培地の選択性により特定の細菌しか検出できないことや、生存している細菌も VBNC 状態へ移行しているために、検出できていないことにより、実際の微生物叢の多様性を著しく低く見積もっている可能性も否定できない。

真菌叢に関しては、原料混合時では麦芽100%ビールで 10^6 cfu/mL程度、麦芽50%発泡酒と麦芽25%発泡酒では 10^3 cfu/mL程度の真菌が検出されたが（図 3.5.3.）、煮沸により死滅した。酵母添加により検出される真菌数は増加したが、培養法では解析したすべてのコロニーが*S. pastorianus*であり、rRNA 遺伝子定量法でも *Saccharomyces* 属の検出比率が98%を超えていたことから、検出された真菌数のほぼすべてが *S. pastorianus* であったと考えられる。

ヒートマップ解析によれば、*Bacillus* 属及び *Paenibacillus* 属の細菌が発酵初期から中期にかけて検出されていた。上述のとおり、この結果は培養法及び rRNA 遺伝子定量法のいずれの手法でも同様の傾向があり、Haakensen と Ziola (2008) による先行研究とも一致している。さらに、水や発酵食品、発酵飲料などで検出の報告がある *Tissierella* 属、*Tepidmonas* 属、

Polaromonas 属、*Chryseobacterium* 属及び *Sphingomonas* 属などに属する細菌が、初めて発酵中のビール系酒類から検出された (Loy *et al.*, 2005; Koyanagi *et al.*, 2011; Bokulich *et al.* 2012b)。本研究では、それらの細菌が *Bacillus* 属細菌等と同様にビール系酒類の発酵過程で生存している可能性があることを示した (図 3.5.6)。しかしながら、それらの細菌がビール系酒類の品質に影響を与えているかどうかを判断するにはさらなる研究が必要である。*Chryseobacterium* 属のいくつかの種が、ビール瓶詰設備で検出されており、また、環境中から単離された *Chryseobacterium* sp. strain WG4 は香气成分を生成することも知られている (Herzog *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2011)。したがって、発酵初期で *Chryseobacterium* spp. が生育した場合、ビールの香りに影響を与える可能性がある。

今回解析した 3 種類の仕込みの発酵中及び貯蔵中の細菌総数は、rRNA 遺伝子定量法により推定すると約 $10^3 \sim 10^4$ cells/mL であった。また、培養法及び rRNA 遺伝子定量法による解析で、ろ過によって若干の増加が見られた (図 3.5.3.A 及び表 3.5.6.)。本研究でろ過に用いたフィルターは再使用こそしているものの、使用後の逆洗浄及び 40%エタノール中での保存をしておき衛生管理が疎かではないにもかかわらず、十分な殺菌が行われていなかったものと思われる。ろ過工程による汚染が品質劣化に繋がる可能性もあるため、より徹底した除菌及び殺菌処理、ろ過フィルターやろ過モジュールの使用前の品質管理、使用直前の熱水殺菌、もしくはろ過フィルター等を定期的に新しいものに変えるなどの対応が必要であることが初めて確認された。

本章の研究では、ビール製造工程における詳細な微生物叢が明らかとなるとともに、ビール発酵工程においていくつかの細菌が生育できる可能性があることが示唆された。さらに、大麦の使用比率の違いによりその微生物叢が異なることも示唆されたが、単一の麦芽及び大麦による結果であることから、信頼ある結果とするためには、さらなる追加実験による確認が必要である。ビールの醸造工程中の微生物叢に関する詳細な研究結果を活用し、ビール醸造工程における微生物管理を徹底することで、汚染を防ぎ、品質の安定化に貢献できるものと考えている。

3.5. 図表

表 3.5.1. サンプルングポイントと実施した解析

サンプルングポイント	培養法 による解析	分子生物学的手法 による解析
仕込前（糖化前）	○	○
仕込後（糖化後）	○	—
煮沸前	○	○
煮沸後	○	—
酵母添加後の冷麦汁	○	○
発酵開始 2 日目	○	○
発酵開始 3 日目	○	—
発酵開始 4 日目	○	○
発酵開始 7 日目	○	○
発酵開始 12 日目	○	○
ろ過前	○	○
ろ過後	○	○
貯蔵 6 か月後	○	○

表 3.5.2. 本章で使用したプライマーセット

No.	Sequence 5' - 3'*	Comment	Target	Application	Reference
1	5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' 5'-GGACTACCAGGGTATCTAAATCCTGTT-3' (6-FAM)-5'-CGTATTACCGGGCTGCTGGCAC-3'-(TAMRA)		Bacteria (SSU-rRNA gene)	qPCR	Nadkarni <i>et al.</i> , 2002
2	5'-GGRAAACTCACCCAGGTCCAG-3' 5'-GSWCTATCCCCAKCACGA-3' (6-FAM)-5'-TGGTGCATGGCCGTT-3'-(TAMRA)		Eukaryote (SSU-rRNA gene)	qPCR	Liu <i>et al.</i> , 2012
3	(FITC)-5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	EUB338	Bacteria	FISH	Amann <i>et al.</i> , 1990
4	(FITC)-5'-CTCTGGCTTCAACCCTATTC-3'	PF2	Eukaryote	FISH	Kempf <i>et al.</i> , 2000
5	(FITC)-5'-ACATCCTACGGGAGGC-3'	Non-EUB338	Negative control	FISH	Wallner <i>et al.</i> , 1993
6	5'-(SeqF)-(MID)-AACGGGAAGAACCCTTAC-3' 5'-(SeqR)-GGHWACCTTGTTACCGACTT-3'	968F 1492R	Bacteria (SSU-rRNA gene)	NGS	Heuer <i>et al.</i> , 1997 Modified from Turner <i>et al.</i> , (1999)
7	5'-(SeqF)-(MID)-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' 5'-(SeqR)-GGTCCCGTGTTCAAGACGG-3'	NL1 NL4	Eukaryote (LSU-rRNA gene)	NGS	O'Donnell, 1993
8	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' 5'- ACCGGGCTGCTGGC-3' 5'-GGHWACCTTGTTACGACTT-3'	27F 341F 531R 1492R	Bacteria (SSU-rRNA gene)	General purpose	Lane, 1991 Muyzer <i>et al.</i> , 1993 Endo and Okada, 2005 Modified from Turner <i>et al.</i> , (1999)
9	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' 5'-GGTCCCGTGTTCAAGACGG-3'	NL1 NL4	Eukaryote (LSU-rRNA gene)	General purpose	O'Donnell, 1993

* SeqF, CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAG; SeqR, CTATCGCCTTGCCAGCCCCGCTCAG.

表 3.5.3. 本章でを使用した次世代型シーケンサー用 MID 配列

No.	MID Sequence
1	ACGAGTGCGT
2	ACGCTCGACA
3	AGACGCACTC
4	AGCACTGTAG
5	ATCAGACACG
6	ATATCGCGAG
7	CGTGTCTCTA
8	CTCGCGTGTC
9	TCTCTATGCG
10	TGATACGTCT
11	CATAGTAGTG
12	CGAGAGATAC
13	ATACGACGTA
14	TCACGTACTA
15	CGTCTAGTAC
16	TCTACGTAGC
17	TGTACTACTC
18	ACGACTACAG
19	CGTAGACTAG
20	TACGAGTATG
21	TACTCTCGTG
22	TAGAGACGAG
23	TCGTCGCTCG
24	ACATACGCGT
25	ACGCGAGTAT
26	ACTACTATGT
27	ACTGTACAGT
28	AGACTATACT
29	AGCGTCGTCT
30	AGTACGCTAT

表 3.5.4. 細菌叢解析用プライマーセットによる増幅産物の NGS 解析結果の概要

Sample Name*	Total sequences	Valid sequences	Valid OTU	Micro-organisms (level; genus) [§]	Micro-organisms (total) [†]	Bacterial sequences	Bacteria (level; genus)
All-malt No. 1	19724	17390	613	56	90	17386	55
All-malt No. 2	11826	11665	237	39	64	11663	38
All-malt No. 3	6201	6180	141	37	65	1024	35
All-malt No. 4	7988	7703	377	47	90	4608	45
All-malt No. 5	7839	7645	284	42	77	3291	41
All-malt No. 6	8331	8110	306	48	85	3905	46
All-malt No. 7	8657	8475	373	58	99	3564	55
All-malt No. 8	1809	1765	106	38	64	1576	37
All-malt No. 9	1371	1312	107	33	58	1312	33
All-malt No. 10	5794	5585	282	57	90	5582	56
Half-malt No. 1	12003	10686	605	89	125	10680	88
Half-malt No. 2	8410	7295	495	77	120	7293	76
Half-malt No. 3	7884	7692	285	41	75	4223	39
Half-malt No. 4	10553	10048	464	54	100	6371	51
Half-malt No. 5	11389	11031	392	46	95	5329	44
Half-malt No. 6	6783	6603	219	39	70	2729	36
Half-malt No. 7	7776	7669	228	46	81	2368	44
Half-malt No. 8	7833	7596	267	42	80	6712	40
Half-malt No. 9	4475	4302	240	56	87	4298	55
Half-malt No. 10	6501	6128	276	42	74	6125	41
Low-malt No. 1	13539	11951	806	75	114	11945	74
Low-malt No. 2	13013	11227	676	78	116	11225	77
Low-malt No. 3	7170	7094	208	45	78	3111	44
Low-malt No. 4	7905	7523	291	44	81	3757	42
Low-malt No. 5	5384	5333	147	30	56	1197	28
Low-malt No. 6	9249	9173	234	35	66	1955	33
Low-malt No. 7	9265	9128	295	44	85	2861	41
Low-malt No. 8	4294	4142	186	40	65	3918	39
Low-malt No. 9	10731	10347	380	54	100	10337	53
Low-malt No. 10	14262	13355	559	64	106	13349	63
Total	257959	244153	6334	195	291	173694	191

* Sample Name 欄に記載の All-malt は麦芽 100%ビールを、Half-malt は麦芽 50%発泡酒を、Low-malt は麦芽 25%発泡酒を示し、No.はそれぞれ以下のサンプリングポイントを示す。

No.1, 仕込前 (糖化前)、No.2, 煮沸前、No.3, 酵母添加後の冷麦汁、No.4, 発酵開始 2 日目、No.5, 発酵開始 4 日目、No.6, 発酵開始 7 日目、No.7, 発酵開始 12 日目、No.8, ろ過前、No.9, ろ過後、No.10, 貯蔵 6 か月後

[§] Microorganisms (level: genus) 欄は、*S. cerevisiae* など真菌も含む。

[†] Microorganisms (total) 欄は、属レベルまで同定できなかった細菌や真菌を含む。

表 3.5.5. 真菌叢解析用プライマーセットによる増幅産物の NGS 解析結果の概要

Sample Name*	Total sequences	Valid sequences	Valid OTU	Eukaryotic microorganisms (level; genus)	Eukaryotic microorganisms (total) [§]
All-malt No. 1	12267	12267	646	33	54
All-malt No. 2	2723	2723	145	20	33
All-malt No. 3	16197	16197	139	16	23
All-malt No. 4	8200	8200	102	13	19
All-malt No. 5	8998	8998	88	13	20
All-malt No. 6	6664	6664	80	13	19
All-malt No. 7	7617	7617	98	13	20
All-malt No. 8	4717	4717	54	11	17
All-malt No. 9	7358	7358	138	17	31
All-malt No. 10	2516	2516	60	15	25
Half-malt No. 1	6342	6342	423	33	50
Half-malt No. 2	8197	8197	451	33	52
Half-malt No. 3	10842	10842	142	16	22
Half-malt No. 4	12418	12418	138	14	21
Half-malt No. 5	11795	11795	160	16	26
Half-malt No. 6	8029	8029	96	11	16
Half-malt No. 7	9397	9397	125	13	19
Half-malt No. 8	6226	6226	92	10	17
Half-malt No. 9	5043	5043	108	19	29
Half-malt No. 10	4056	4056	90	17	26
Low-malt No. 1	9819	9819	575	38	64
Low-malt No. 2	95	95	31	17	20
Low-malt No. 3	9357	9357	104	13	19
Low-malt No. 4	9028	9028	104	14	20
Low-malt No. 5	7937	7937	92	9	16
Low-malt No. 6	11593	11593	127	17	24
Low-malt No. 7	9679	9679	104	11	18
Low-malt No. 8	7980	7980	103	15	21
Low-malt No. 9	4926	4926	102	16	25
Low-malt No. 10	4304	4304	107	16	26
Total	234320	234320	1931	45	76

* Sample Name 欄に記載の All-malt は麦芽 100%ビールを、Half-malt は麦芽 50%発泡酒を、Low-malt は麦芽 25%発泡酒を示し、No.はそれぞれ以下のサンプリングポイントを示す。

No.1, 仕込前 (糖化前)、No.2, 煮沸前、No.3, 酵母添加後の冷麦汁、No.4, 発酵開始 2 日目、No.5, 発酵開始 4 日目、No.6, 発酵開始 7 日目、No.7, 発酵開始 12 日目、No.8, ろ過前、No.9, ろ過後、No.10, 貯蔵 6 か月後

§ Eukaryotic microorganisms (total) 欄は、属レベルまで同定できなかった真菌も含む。

表 3.5.6. rRNA 遺伝子定量法を用いた細菌数定量結果

Sample No.*	All-malt beer	Half-malt beer	Low-malt beer
NGS & qPCR (\log_{10} cell number mL^{-1})			
1	9.05 ± 0.03	7.05 ± 0.03	7.38 ± 0.01
2	6.57 ± 0.03	5.34 ± 0.03	5.71 ± 0.01
3	3.77 ± 0.07	3.05 ± 0.11	3.00 ± 0.08
4	4.01 ± 0.02	3.62 ± 0.03	3.25 ± 0.09
5	3.78 ± 0.02	3.53 ± 0.07	3.12 ± 0.01
6	4.02 ± 0.04	3.58 ± 0.03	3.35 ± 0.02
7	3.17 ± 0.04	3.52 ± 0.07	3.27 ± 0.05
8	3.20 ± 0.02	2.85 ± 0.20	2.84 ± 0.05
9	3.36 ± 0.09	3.22 ± 0.20	3.02 ± 0.08
10	3.42 ± 0.10	3.17 ± 0.09	3.39 ± 0.04

表 3.5.7. FISH 及び FCM を用いた真菌数定量結果

Sample No.*	All-malt beer	Half-malt beer	Low-malt beer
FISH & Flow cytometry (\log_{10} cell number mL^{-1})			
1	Not tested	Not tested	Not tested
2	Not detected	Not detected	Not detected
3	6.47 ± 0.14	5.44 ± 0.06	5.54 ± 0.14
4	5.59 ± 0.10	5.66 ± 0.16	5.65 ± 0.14
5	6.27 ± 0.10	6.23 ± 0.04	6.37 ± 0.04
6	6.72 ± 0.22	6.81 ± 0.08	6.79 ± 0.02
7	6.78 ± 0.09	6.94 ± 0.03	6.67 ± 0.05
8	4.54 ± 0.87	4.44 ± 0.36	4.03 ± 0.30
9	Not detected	Not detected	Not detected
10	Not tested	Not tested	Not tested

* 表 3.5.6 及び表 3.5.7 の Sample No.欄に記載の All-malt は麦芽 100%ビールを、Half-malt は麦芽 50%発泡酒を、Low-malt は麦芽 25%発泡酒を示し、No.はそれぞれ以下のサンプリングポイントを示す。

No.1, 仕込前 (糖化前)、No.2, 煮沸前、No.3, 酵母添加後の冷麦汁、No.4, 発酵開始 2 日目、No.5, 発酵開始 4 日目、No.6, 発酵開始 7 日目、No.7, 発酵開始 12 日目、No.8, ろ過前、No.9, ろ過後、No.10, 貯蔵 6 か月後

表 3.5.8. 培養法による麦芽 100%ビール醸造工程中の細菌叢解析結果

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Bacillus</i> sp.	-	4.13×10 ²	2.71×10 ²	-	-	-	-	-	1.40×10 ¹	-	-	-	-
<i>Bacillus firmus</i>	-	-	2.90×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	4.00×10 ²	-
<i>Bacillus homeckiae</i>	-	1.62×10 ²	-	-	-	-	-	1.19×10 ¹	5.70×10 ¹	4.30×10 ¹	1.40×10 ¹	3.32×10 ²	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	1.40×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brevibacillus agri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.00×10 ²	1.60×10 ²
<i>Brevibacillus fluminis</i>	-	-	-	-	-	-	1.40×10 ¹	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia</i> sp.	-	-	-	-	6.70×10 ¹	2.40×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cohnella xylanilytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.32×10 ²	1.60×10 ²
<i>Cronobacter sakazakii</i>	7.30×10 ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kosakonia cowanii</i>	6.22×10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7.13×10 ⁶	2.57×10 ²	5.70×10 ¹	-	-	-	-	-	1.40×10 ¹	1.40×10 ¹	-	-	-
<i>Leuconostoc citreum</i>	2.14×10 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus elgii</i>	-	-	-	-	1.70×10 ¹	-	4.30×10 ¹	3.80×10 ¹	4.30×10 ¹	1.40×10 ¹	-	1.00×10 ²	3.20×10 ²
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	-	-	-	-	-	1.86×10 ²	2.10×10 ¹	6.50×10 ¹	-	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	1.87×10 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 3.5.8、表 3.5.9 及び表 3.5.10 中の番号は、それぞれ、以下のサンプリングポイントを示す。

No.1, 仕込前 (糖化前)、No.2, 仕込後 (糖化後)、No.3, 煮沸前、No.4, 煮沸後、No.5, 酵母添加後の冷麦汁、No.6, 発酵開始 2 日目、No.7, 発酵開始 3 日目、No.8, 発酵開始 4 日目、No.9, 発酵開始 7 日目、No.10, 発酵開始 12 日目、No.11, ろ過前、No.12, ろ過後、No.13, 貯蔵 6 か月後

表 3.5.9. 培養法による麦芽 50%発泡酒醸造工程中の細菌叢解析結果

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Bacillus aryabhattai</i>	-	2.43×10 ²	4.30×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	8.60×10 ¹	-	-	-	-	1.40×10 ¹	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	2.40×10 ³	4.30×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brevibacillus agri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.30×10 ¹	-
<i>Brevibacillus fluminis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.80×10 ¹
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1.43×10 ³	1.90×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cohnella xylinolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.39×10 ²	9.00×10 ¹
<i>Escherichia hermannii</i>	1.88×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erwinia persicina</i>	7.53×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc citreum</i>	1.43×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium oxydans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.60×10 ¹	-
<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	-	2.43×10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus elgii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.14×10 ²	2.30×10 ¹
<i>Paenibacillus humicus</i>	-	-	-	-	-	-	5.70×10 ¹	-	1.40×10 ¹	1.40×10 ¹	-	-	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	-	3.80×10 ¹	-	-	-	-	1.40×10 ¹	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	1.79×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.60×10 ¹	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3.57×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表中の番号については、表 3.5.8 を参照。

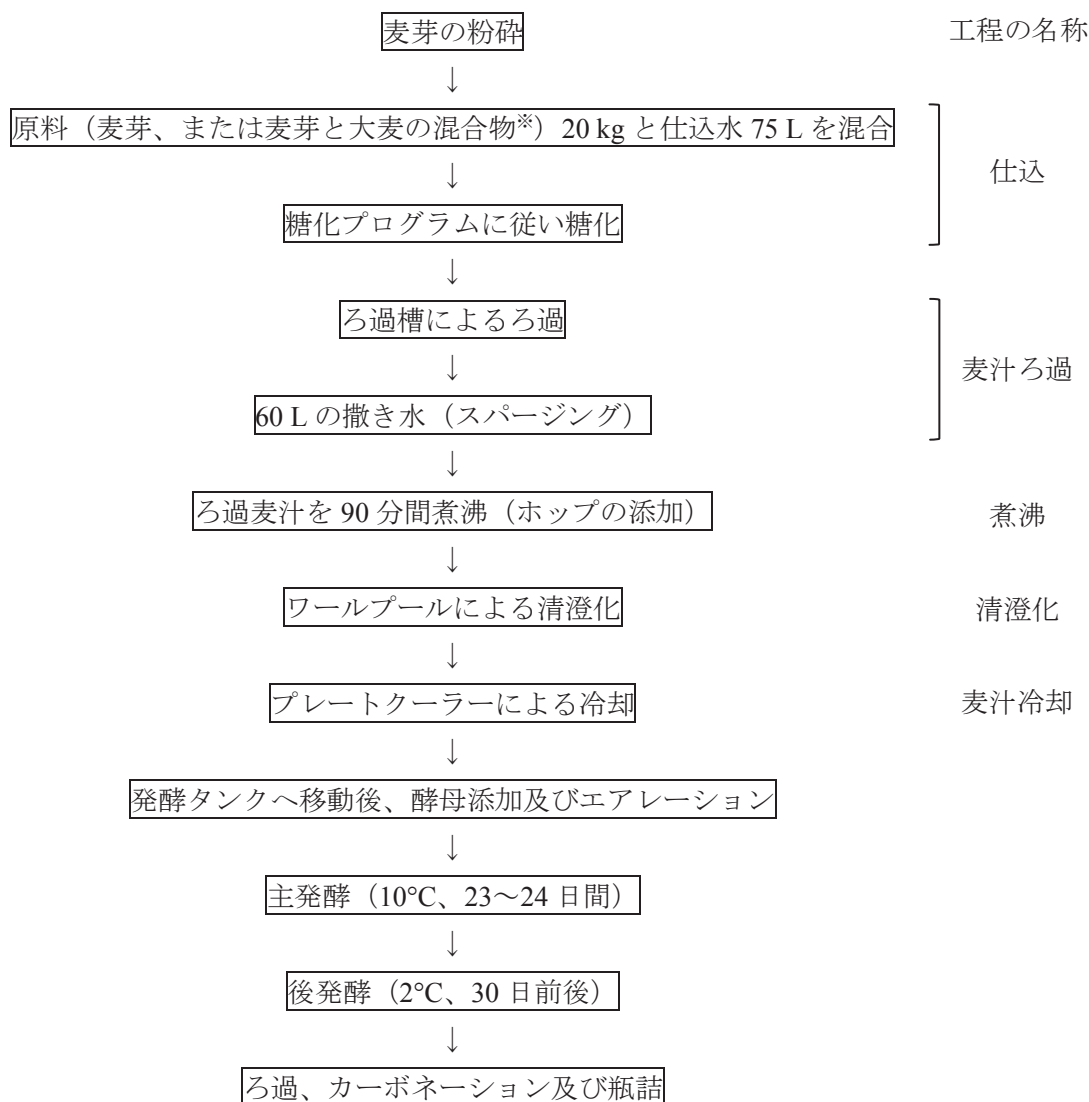
表 3.5.10. 培養法による麦芽 25%発泡酒醸造工程中の細菌叢解析結果

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Bacillus aryabhattai</i>	-	3.33×10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	1.00×10 ¹	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	3.33×10 ²	1.00×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	3.75×10 ³	4.50×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brevibacillus agri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.00×10 ³	-
<i>Brevibacillus brevis</i>	-	1.11×10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia</i> sp.	7.50×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1.00×10 ³	1.30×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.80×10 ¹
<i>Cohnella xylanilytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.45×10 ²
<i>Cronobacter sakazakii</i>	7.50×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dermaococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.00×10 ³	1.00×10 ⁴	-
<i>Erwinia persicina</i>	6.67×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erwinia</i> sp.	-	3.33×10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kosakonia cowanii</i>	1.50×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rhizophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.00×10 ³	-
<i>Leuconostoc citreum</i>	2.50×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	-	5.56×10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus elgii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.50×10 ¹
<i>Paenibacillus humicus</i>	-	-	1.00×10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	-	1.11×10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	1.17×10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表中の番号については、表 3.5.8 を参照。

表 3.5.11. 原料大麦及び麦芽に存在する培養菌数定量結果

	(cfu g ⁻¹)			
	Nutrient Agar	UBA	MRS	PDA
Barley	4.11 × 10 ⁵	8.78 × 10 ⁵	3.00 × 10 ³	7.92 × 10 ⁵
Malt	4.81 × 10 ⁶	3.85 × 10 ⁶	1.29 × 10 ⁶	1.22 × 10 ⁶



糖化プログラム		ホップ添加のタイミング	
温度制御	時間 (分)	煮沸開始後経過時間 (分)	添加量 (g)
45 °C	30	0 (煮沸開始時に添加)	50
+0.9 °C/min	20	30	15
63 °C	80	80	35
+1.3 °C/min	10		
76 °C	10		

図 3.5.1. ビール試験醸造工程の概要

* 大麦使用時はアミラーゼ S 「アマノ」 35G を 120 g、プロテアーゼ N 「アマノ」 2 g 及びウマミザイムを 4 g 使用

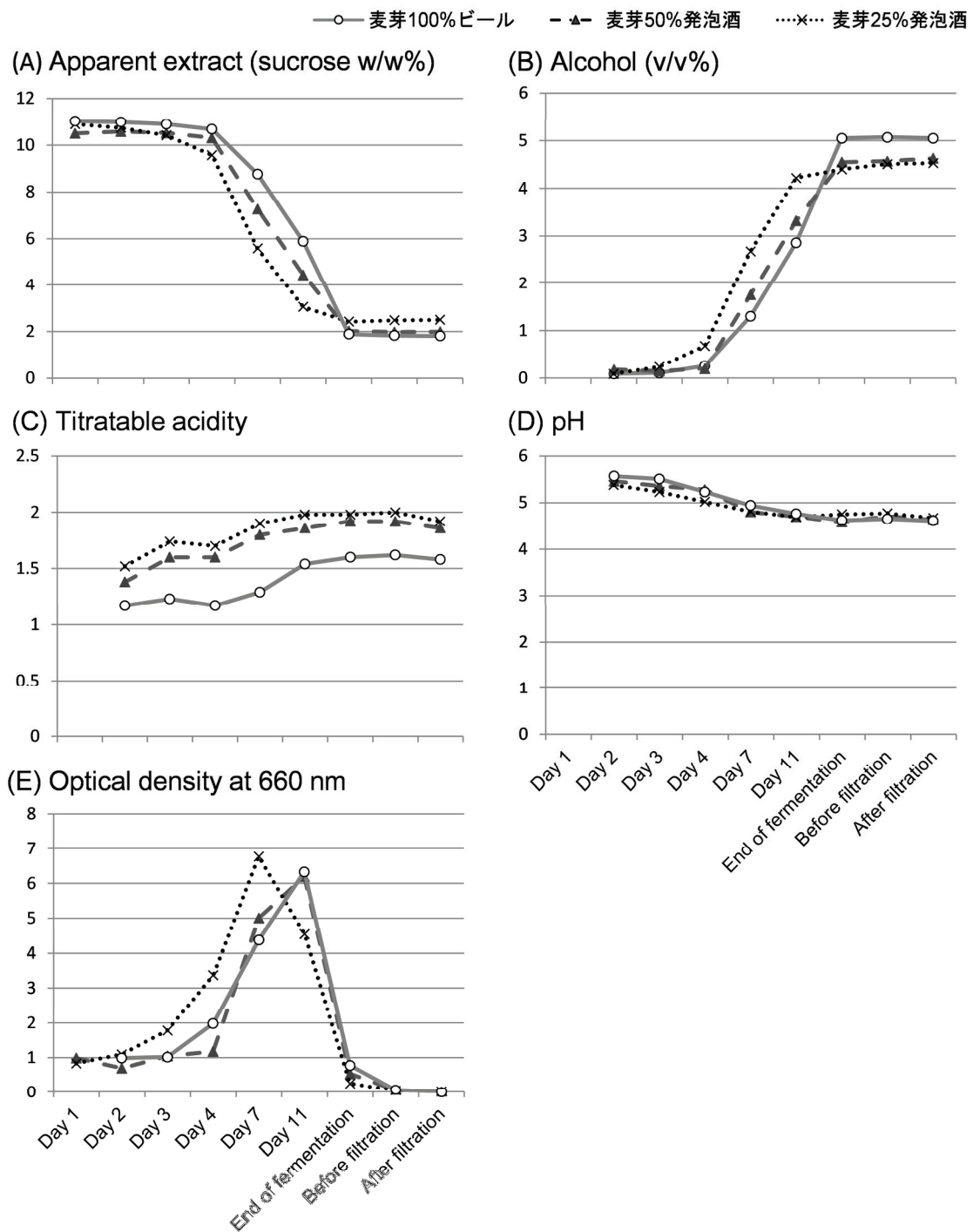


図 3.5.2. ビール系酒類醸造工程中の一般成分分析結果

ビール系酒類醸造工程中の外観発酵度 (A), アルコール度数 (B), 滴定酸度 (C), pH (D), 光学密度 (E) の経過を示した。各分析は改訂 BCOJ ビール分析法に従った。

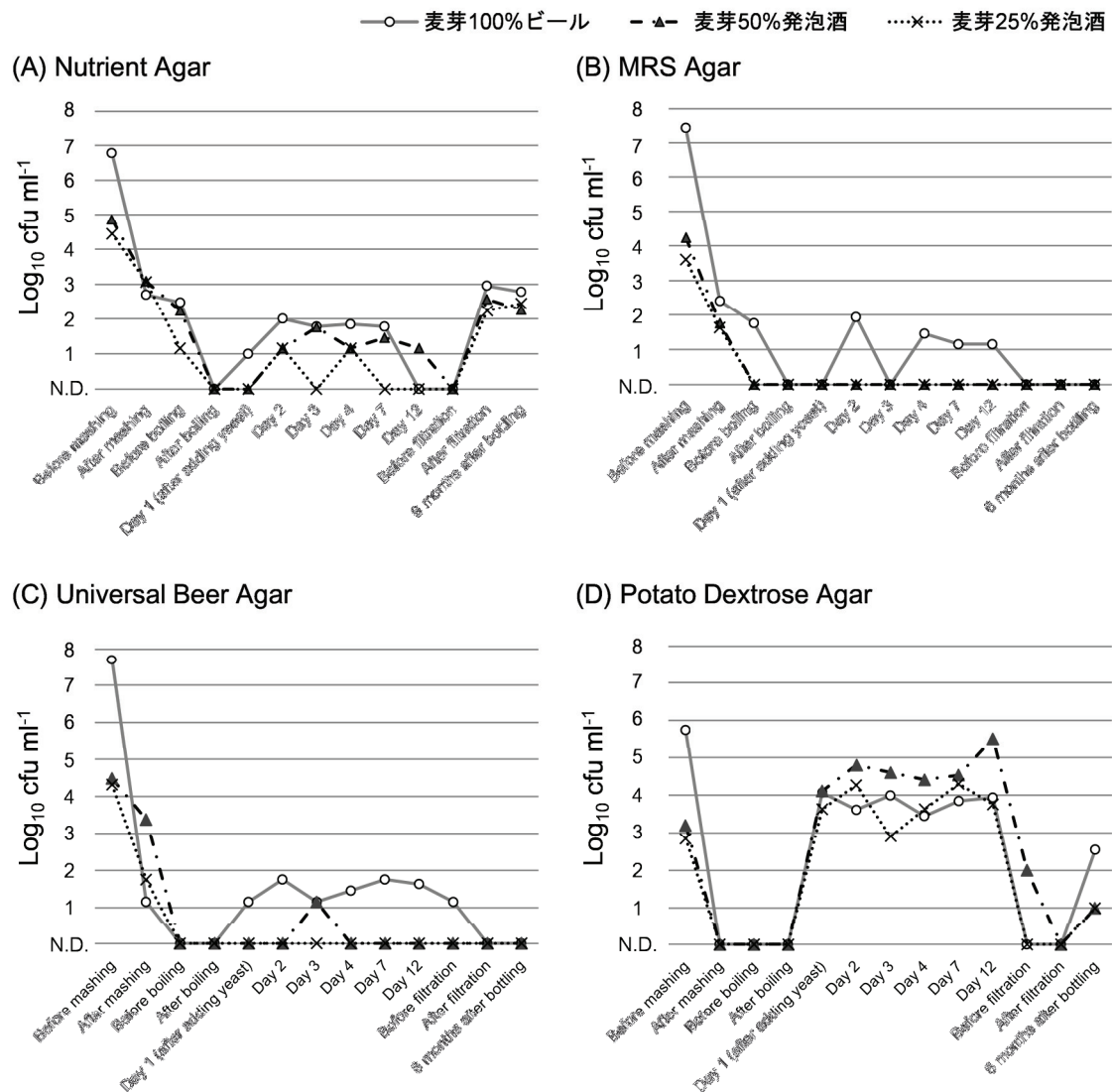


図 3.5.3. 各種培地によるビール系酒類醸造工程中の微生物数の測定結果

シクロヘキシミド含有ニュートリエント寒天培地 (A), シクロヘキシミド含有 MRS 寒天培地 (B), シクロヘキシミド含有ユニバーサルビール寒天培地 (C), クロラムフェニコール含有ポテトデキストロース寒天培地 (D) の結果を示した。

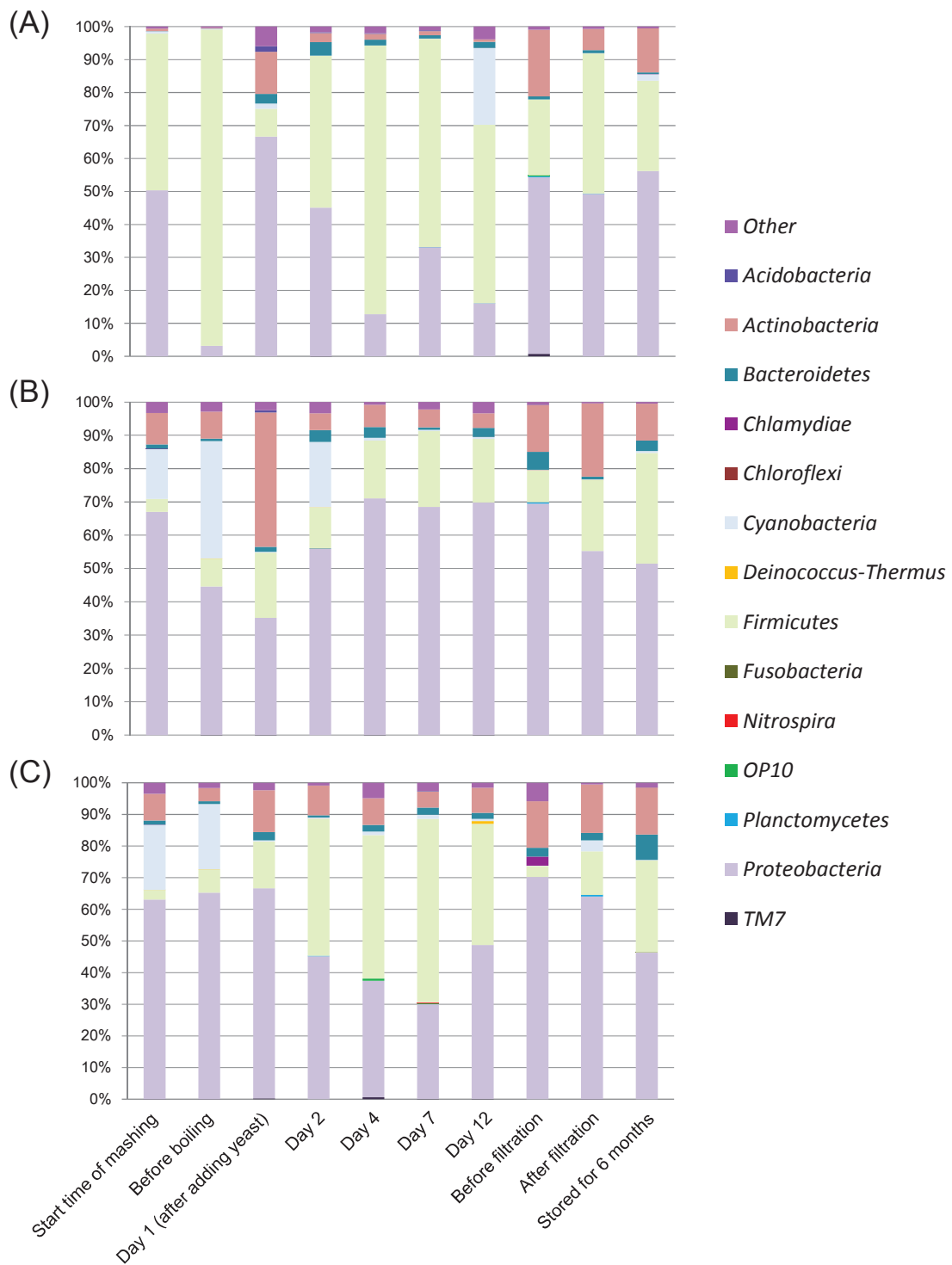


図 3.5.4. NGS を用いたビール系酒類醸造工程中の細菌叢解析結果

細菌叢解析用プライマーセットを用いて増幅した PCR 産物を Roche/454 GS FLX Titanium により解析した結果であり、(A)、(B) 及び (C) はそれぞれ、麦芽 100%ビール、麦芽 50%発泡酒及び麦芽 25%発泡酒を示す。

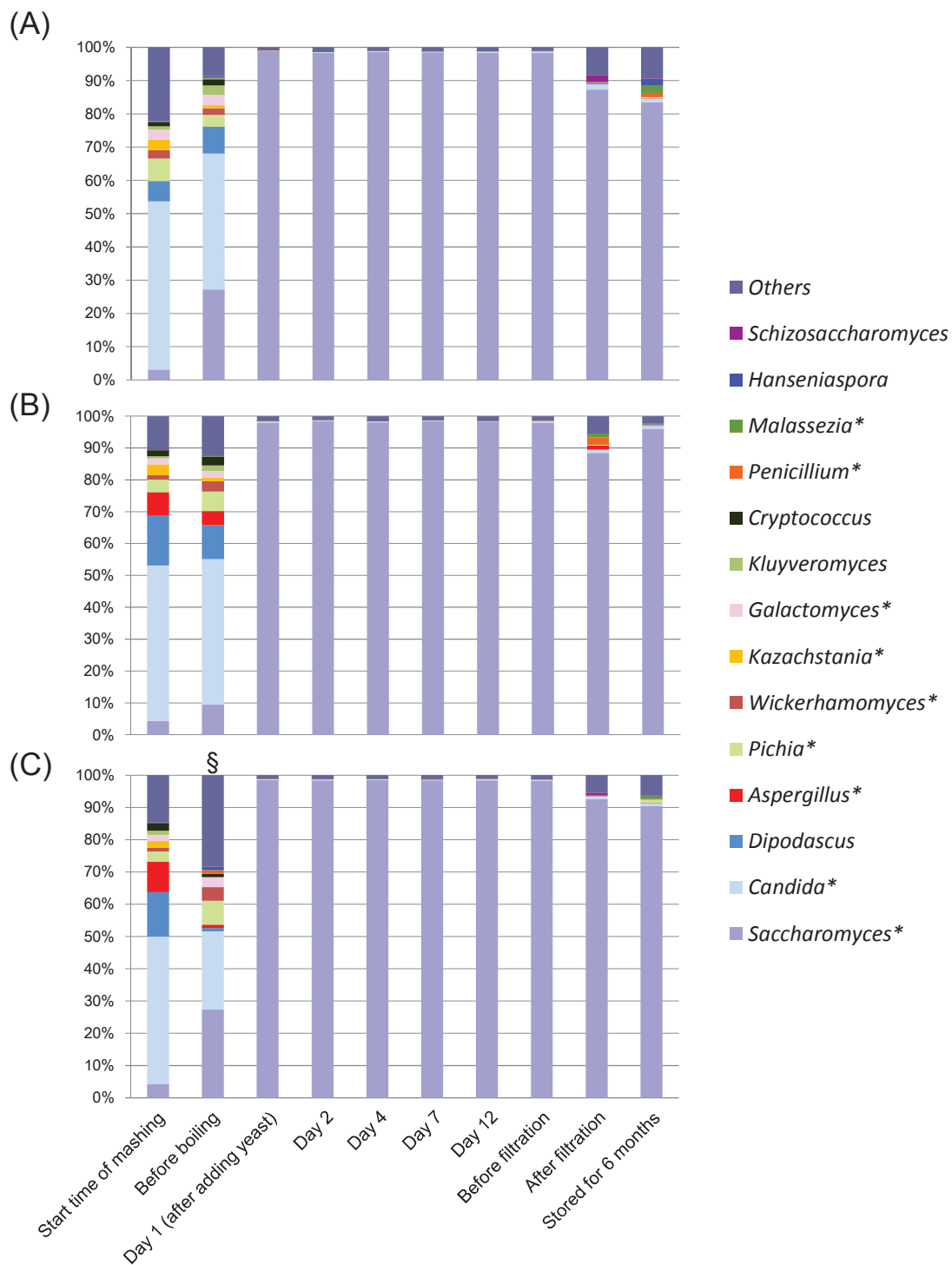


図 3.5.5. NGS を用いたビール系酒類醸造工程中の真菌叢解析結果

真菌叢解析用プライマーセットを用いて増幅した PCR 産物を Roche/454 GS FLX Titanium により解析した結果であり、(A)、(B) 及び (C) はそれぞれ、麦芽 100%ビール、麦芽 50%発泡酒及び麦芽 25%発泡酒を示す。図中のアスタリスクは、QHIME を用いて UNITE により提供されている配列データを参照とした RDP classifier アルゴリズムによる解析では、属の同定ができなかったのもので、GenBank のデータベースを参照とした BLAST により相同性の高い配列が抽出され、その中から属レベルでの推定ができたものを示す。また、セクションマークのついているサンプルは、得られた配列数が少なく、信頼性が低い。

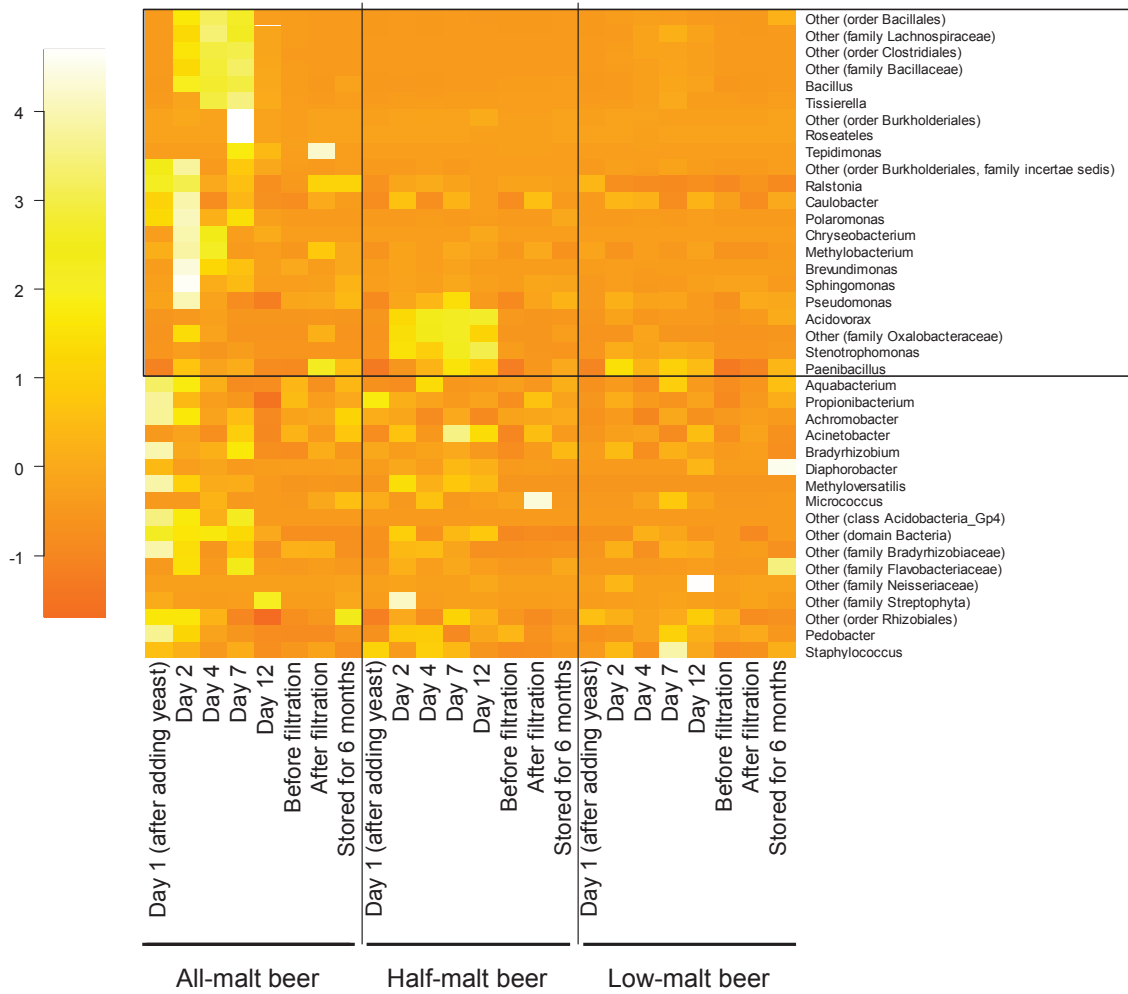


図 3.5.6. rRNA 遺伝子定量法により得られた菌叢解析結果のヒートマップ解析

属レベルで集約した菌対数をデータとして、ヒートマップ解析を行っている。属レベルまで推定できていない配列については‘Other’として示し、括弧内に推定できた上位分類を記載している。黒枠内は、いずれかのビール系酒類醸造工程において、発酵過程に菌体数の増加傾向が見られた細菌群を示している。

3.6. 小括

醸造産業において、製品の品質管理に微生物の管理は重要な役割を果たす。本章の研究では、1種類のビール（麦芽 100%）と2種類のビール系飲料（麦芽 50%, 25%）について次世代型シーケンサー、定量 PCR、フローサイトメトリー、培養法を用いて微生物叢を調査した。その結果、28 属から 88 属のバクテリアが検出され、特に、*Pseudomonas* 属、*Acinetobacter* 属、*Escherichia* 属、*Ralstonia* 属、*Methylobacterium* 属、*Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属、*Rhizobiales* 目、*Actinomycetales* 目及び未同定の微生物が、3種類すべてのサンプルの醸造工程中を通して検出された。また、9 属から 38 属の真核微生物が検出され、*Candida* 属及び *Saccharomyces* 属は3種類すべてのサンプルの醸造工程中を通して検出された。多くの微生物は特定の期間のみで検出され、ほとんどすべての微生物は煮沸工程で死滅していた。しかしながら、*Bacillus* 属、*Tissierella* 属、*Tepidimonas* 属、*Polaromonas* 属、*Chryseobacterium* 属、*Methylobacterium* 属、*Brevundimonas* 属、*Sphingomonas* 属、*Ralstonia* 属、*Caulobacter* 属、*Acidovorax* 属及び *Stenotrophomonas* 属が発酵初期で検出され、増加していた。この結果は、これらの細菌による汚染のリスクが存在することを示している。これらの結果は、ビール醸造工程中の微生物叢の制御や汚染の防止によるビール品質の安定化に繋がることが期待される。

第4章

改変 COLD-PCR によるワイン発酵もろみ中に存在する低存在比率微生物の検出

4.1. 序言

PCR 法に基づく遺伝子解析手法は、環境サンプル中に存在する微生物叢の解析に広く利用されており、VBNC 状態となっているような難培養性微生物も検出することができるため、培養法では通常問題となる微生物の状態や培地によるバイアス等なしに網羅的な微生物叢を解析するのに有効である。特に、第2章で使用した PCR-DGGE 法は、微生物叢解析技術の中でも最も重要な技術の一つとなっており、現在も広く用いられている (Muyzer and Smalla, 1998; Florez and Mayo, 2006; Lors *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2010; Suzzi *et al.*, 2012)。しかしながら、PCR-DGGE 法を含む PCR 法に基づく微生物叢解析手法にはいくつかの欠点がある。一つ目は、生菌と死菌を区別できず、死菌であっても DNA が残存している場合には検出してしまうこと、二つ目は、極めて多量に存在する微生物中に別の微生物が低含量で共存した場合、低含量の微生物を検出することができないことである (Andorra *et al.*, 2008)。図 2.5.1. で示すとおりワインなどの発酵飲料の製造工程においては、*Saccharomyces cerevisiae* のようなスターターが添加され、その菌叢において圧倒的多数を占める。PCR 法に基づく手法では、そのような菌叢を解析することが困難であり、低存在比率の微生物を効率的に検出できる手法についての報告はこれまでになかった。

本研究では、低存在比率の真菌叢を PCR 法に基づく解析手法により明らかにするために、SNPs の解析のために開発された COLD-PCR (CO-amplification at lower denaturation temperature PCR) を改変し、真菌叢解析に適用可能かを検討した。COLD-PCR は、多量の野生型の中に含まれる微量の SNPs 変異を持つ変異型を検出可能とするために開発された技術であり、特定の配列を優先的に増幅するのに有効な手法である (Li *et al.*, 2008)。COLD-PCR 法には fast-COLD-PCR や full-COLD-PCR、ice-COLD-PCR など、いくつかの変法が報告されており (Li *et al.*, 2008; Milbury *et al.*, 2011)、もっとも汎用性が高いのは ice-COLD-PCR であり、特徴として、(1) 野生型の配列の増幅を抑制するために、約 110 bp 程度の reference sequence (RS) と呼ばれる野生型の配列のアンチセンス鎖と同一の配列を持った一本鎖 DNA を PCR の反応溶液中に添加すること、(2) PCR の温度プログラムにおいて、変性工程後に RS と野生型配列が二本鎖を形成するためのハイブリダイゼーション工程及び SNPs を持った変異型のみが一本鎖となるような温度を設定した再変性工程を追加することで、その後のアニーリング工程及び伸長工程で、RS とすでに二本鎖を形成している野生型にはプライマーが結合できず、変性している変異型のみが増幅される点が挙げられる (図 1.4.)。

本章では、微生物叢解析への応用のため ice-COLD-PCR を改変し、RS として用いられていた一本鎖 DNA の代わりに二本鎖 RNA を使用する改変 COLD-PCR (以下、「mCOLD-PCR」という。) を開発し、*S. cerevisiae* が優占種として存在するワイン発酵もろみ (以下、「マスト」という。) の真菌叢の解析に適用可能かを検討した。また、微生物の同定にあたっては得られている配列が長いほど正確な同定が可能となるため、増幅対象が長い領域であっても mCOLD-PCR 法が適用可能かについても検討を行った。

4.2. 実験材料と方法

4.2.1. 使用した試薬及び培地

50×TAEストック溶液、40%アクリルアミドストック溶液については、第2章2.2.1.に従って調製した。その他の培地の組成は以下のとおりであり、オートクレーブは121°Cで20分間処理した。

YPD 液体培地 (Yeast Extract-Peptone-Dextrose Medium)

Difco YPD broth (DIFCO)	50 g
H ₂ O	1 L
pH	6.5

YES 液体培地 (Yeast Extract with supplement Medium)

Yeast Extract (DIFCO)	5 g
Glucose (和光純薬工業)	30 g
L-Leucine (和光純薬工業)	225 mg
L-Histidine (和光純薬工業)	225 mg
L-Lysine (和光純薬工業)	225 mg
Adenine (和光純薬工業)	225 mg
Uracil (和光純薬工業)	225 mg
H ₂ O	1 L
pH	6.0

4.2.2. 供試菌株

Laffort 社から販売されている市販ワイン酵母 Zymaflore F15 (*S. cerevisiae*) を赤ワイン醸造に、Zymaflore X16 (*S. cerevisiae*) を白ワイン醸造に用いた。また、モデル実験系のための微生物株として、当所保存の出芽酵母 *S. cerevisiae* RIB1003 株及び分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* RIB5315 株を用いた。モデル実験系における微生物懸濁液の調製にあたっては、*S. cerevisiae* 及び *Sz. pombe* をそれぞれ YPD 液体培地及び YES 液体培地を用いて、25°C で 24 時間の前培養を 2 回行い、得られた前培養液 1 mL をそれぞれ 100 mL の YPD 液体培地と YES 液体培地に接種し、前培養と同一条件で本培養したものをを用いた。

4.2.3. サンプルの調製

赤ワイン及び白ワインの小仕込みは、酒類総合研究所圃場で栽培された、1.0 kg のカベルネ・ソーヴィニヨン及び果皮及び種子除去済みの 800 mL のシャルドネ果汁をそれぞれ用いて行った。亜硫酸は、各ブドウ果汁に対し、150 mg/L となるようにメタ亜硫酸カリウムを添加し、室温で 6 時間静置後酵母添加を行った。赤ワイン及び白ワインマストの発酵温度はそれぞれ、28°C 及び 15°C とし、発酵終了時のアルコール分は、アルコメイト（理研計

器)を用いて測定し、赤ワインで 14.6%、白ワインで 13.1%であった。DGGE 解析用として白ワインマストを発酵開始後 1 日目、3 日目、11 日目及び 21 日目にサンプリングし、また、NGS 解析用として果汁、発酵開始直後及び発酵開始後 8 日目の赤ワインマストをサンプリングした。

4.2.4. DNA 抽出

S. cerevisiae と *Sz. pombe* のゲノム DNA は、Gen とるくん™ (酵母用) (タカラバイオ) を用いて抽出した。果汁及びワインマストからのゲノム DNA 抽出は、Renouf らの方法 (2007) に準じて行った。詳細は第 2 章 2.2.4. の項に記載のとおりである。DNA 溶液は使用まで -30°C で保存した。

4.2.5. PCR 条件

本章で使用した PCR のプライマーセットを、表 4.5.1. に記載した。従来型の PCR (以下、「conv.PCR」という。) は、それぞれ DGGE 解析用及び NGS 解析用として、表 4.5.1. 記載の No.2 及び No.5 を使用した。PCR は 50 µL の反応系で実施し、反応液組成は、1× KOD-plus Neo バッファー、1.5 mM の MgSO₄、0.2 mM の dNTP 混合溶液、1 U の KOD-plus Neo、0.3 µM の各プライマーセット及び鋳型として 100 ng のゲノム DNA もしくは 1 ng の PCR 増幅産物を用いた。サーマルサイクラーは、GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用い、温度プログラムは、96°C で 3 分の予備変性工程後、96°C で 15 秒、50°C で 30 秒及び 68°C で 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル実施した。PCR により得られた増幅産物の塩基長は、100 bp DNA ラダーマーカー (タカラバイオ) とともに 1.2%のアガロースゲルで電気泳動することにより推定した。

4.2.6. PCR 産物の DGGE 解析

DGGE 解析は、第 2 章 2.2.6. の項に従って行った。変性剤の濃度勾配は 35%から 60%とし、60°C、100 V で 16 時間電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルは GelRed で 30 分間染色し、UV 照射下で撮影後、バンドの切り出しを行った。

4.2.7. *in vitro* transcription 用鋳型 DNA の調製

dsRNA プロブの調製のために用いる二つの鋳型 DNA は、5'末端側に T7 プロモーター配列を付加した二組のプライマーセットを用いて調製した。DGGE 解析に用いた dsRNA プロブ合成のための鋳型 DNA は、図 4.5.2. の下線で示される *S. cerevisiae* のバンドを滅菌済みパスツールピペットで切り出し、表 4.5.1. に記載の No.3 及び No.4 の各プライマーセットでそれぞれ前述の条件で増幅し、調製した。NGS 解析に用いた dsRNA プロブは、*S. cerevisiae* RIB1003 のゲノム DNA を表 4.5.1. 記載の No.7 及び No.8 の各プライマーセットで増幅し、調製した。得られた増幅産物は、Nucleospin Extract II で精製し、得られた DNA 溶液の濃度は、Picodrop spectrophotometer (Picodrop Ltd.) を用いて測定した。

4.2.8. dsRNA プローブの作成

dsRNA プローブは、DGGE 解析用と NGS 解析用の二つを調製した。dsRNA は、*in vitro* transcription T7 kit (タカラバイオ) を用いて、前項で調製した鋳型 DNA から合成した。T7 RNA ポリメラーゼにより合成された ssRNA は反応液中でアニーリングし dsRNA となる。その後、残存する鋳型 DNA 及び dsRNA プローブの一本鎖領域を DNase I 及び RNase T1 により処理した。鋳型 DNA が残存した場合、その後の反応で再び鋳型として働くため、十分に除く必要があることから、DNase I 及び RNase T1 の処理後エタノール沈殿処理により一度 dsRNA を回収し、マンガン含有 DNase I バッファー (40 mM Tris-HCl, 0.66 mM MnCl₂) に溶解し、再度 DNase I により処理を行った (Melgar and Goldthwait, 1968; Bauer *et al.*, 1997)。酵素処理溶液は、Nucleospin RNA clean-up kit (マッハライ・ナーゲル社) により精製し、純度と塩基長を 260 nm 及び 280 nm の吸光度の比、及び RNA-PAGE により確認した。

4.2.9. 融解曲線解析

PCR 産物及び dsRNA プローブの 260 nm 及び 280 nm における融解曲線解析は、Tm-analysis ソフトウェア、UV-1700 及び S-1700 (島津製作所) を用いて行った。融解曲線解析は、2 mM MgSO₄ を含む 1× KOD-plus Neo バッファー中の核酸に対し、70°C から 100°C の範囲について毎分 0.1°C の温度上昇率で実施し、吸光度の測定は、0.1°C 上昇するごとに行った。Tm 値は、Tm-analysis ソフトウェアにより微分法を用いて算出した。

4.2.10. mCOLD-PCR 条件

mCOLD-PCR 法を用いた低存在比率微生物由来 DNA の優先的増幅は、次に示すように二段階の PCR で行った。まず、ゲノム DNA を鋳型として、表 4.5.1. に記載の No.1 もしくは No.5 のプライマーセットを用いて conv.PCR と同一条件で増幅し、Nucleospin Extract II を用いて精製した。その後、精製済みの PCR 増幅産物を鋳型として、同一のプライマーセットを使用し、mCOLD-PCR 法を行った。mCOLD-PCR 法は、50 µL の反応系で実施し、反応液組成は、1× KOD-plus Neo バッファー、2.0 mM の MgSO₄、0.2 mM の dNTP 混合溶液、1 U の KOD-plus Neo、0.4 µM の各プライマーセット、100 nM の dsRNA プローブ及び鋳型として 1 ng の精製済み PCR 増幅産物を用いた。温度プログラムは、96°C で 3 分の予備変性工程後、98°C で 10 秒、75°C で 10 分、90°C で 15 秒、50°C で 30 秒、68°C で 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル実施した。マグネシウムイオン濃度及び dsRNA プローブ濃度は予備実験により決定し、温度プログラム中の再変性温度 (90°C) は、増幅抑制対象 DNA 配列と dsRNA プローブとの Tm 値から決定した。mCOLD-PCR 法により得られた増幅産物は Nucleospin Extract II により精製し、100 bp DNA ラダーマーカー (タカラバイオ) とともに 1.2% のアガロースゲルで電気泳動することにより塩基長を推定した。精製した PCR 増幅産物はその後直接サンガー法によるシーケンス解析を行うか、表 4.5.1. 記載の No.2 もしくは No.6 のプライマーセットでそれぞれ 4.2.5. の項に記載の条件で増幅し、前者は DGGE 解析に、後者は NGS 解析に供した。

4.2.11. DNA 塩基配列の決定及び微生物種の推定

DGGE 法により分離した DNA バンドは、微生物種推定のため、次の処理を行った。まず、パスツールピペットを用いてゲルから切り出し、再度 4.2.5. の項に記載の PCR 条件で増幅した。増幅産物は、DGGE 法により単一のバンドであること及び切り出したバンドと同じ移動度であることを確認した上で、Nucleospin Extract II を用いて精製し、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit を用いてダイレクトシーケンスにより配列を決定した。得られた塩基配列は、BLAST を用いて GenBank データベース上の既知の配列と相同性検索を行い、最も相同性の高い配列を持つ微生物種として推定した。

DGGE 法による解析で非常に近接したバンドとなり、切り出したバンドから得られた増幅産物が再度 DGGE 法による解析で単一のバンドが得られなかったものに関しては、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing 及び *Escherichia coli* strain DH5 α を用いて、プラスミドに導入し配列決定を行った。

4.2.12. 統計解析

ClustalX を用いて DGGE 法による解析で得られた塩基配列のアラインメントを行い、近隣結合法により樹状図を作成した。作図には Figtree v1.3.1 を用いた (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)。

4.2.13. 次世代型シーケンサー解析

大規模シーケンス解析は、Beckman Coulter Genomics に委託し、Roche/454 Genome Sequencer FLX Titanium を用いて行った。シーケンス用配列及びサンプル毎に付したタグ配列の除去及び blastclust を用いて 98%以上の相同性を閾値とした OTU への集約は、株式会社ジナリスに委託し実施し、各 OTU の代表配列とクラスターサイズを得た。クラスターサイズが 4 リード以上の OTU については、別途 Unipro UGENE を用いて CAP3 によりアセンブリを行い、得られた配列を各 OTU の代表配列とした (Huang and Madan, 1999; Okonechnikov *et al.*, 2012)。代表配列は、GenBank データベース上の既知の配列と相同性検索を行い、98%以上のクエリカバレッジ及び相同性を閾値として、最も相同性の高い配列を持つ微生物種として推定した。ただし、クエリカバレッジ、相同性及び e-value から単一の微生物種に絞り込めなかった場合には、それら候補微生物種の内、最頻出の微生物種であると推定した。最終的に BLAST により推定された微生物は属レベルで集約し、サンプル毎に各 OTU のクラスターサイズを各サンプルの総リード数で割ることで検出比率を算出した。

4.3. 結果

4.3.1. モデル実験系における mCOLD-PCR 法の検証

本来 ssDNA を使用し SNPs 解析に用いられていた ice-COLD-PCR 法を dsRNA を使用することによって微生物叢解析に適用可能な mCOLD-PCR 法を開発した。mCOLD-PCR 法の開発にあたっては、まず、マグネシウムイオン濃度を 0.5 mM から 2.5 mM の範囲で、また、dsRNA プロブ濃度は 10 nM から 500 nM の範囲で変えて様々な組み合わせを検討し、

dsRNA プローブが PCR を阻害せず、かつ、対象の配列の増幅を抑制するようにマグネシウムイオン濃度と dsRNA プローブ濃度を決定した。その結果、本章の研究で使用するのに適したマグネシウムイオン濃度は 2.0 mM であり、dsRNA プローブ濃度は 100 nM であった。

まず、*S. cerevisiae* のゲノム DNA と *Sz. pombe* のゲノム DNA の等量混合物を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液を鋳型 DNA 溶液として、conv.PCR 法による増幅と mCOLD-PCR 法による増幅について比較した。表 4.5.1. 記載の D1 領域を対象としたプライマーセットによる PCR で得られる増幅産物は、いずれの酵母でもほぼ同程度の長さとなり、アガロースゲル電気泳動では識別が困難であることから、DGGE 法による解析を実施した。その結果、conv.PCR により得られた増幅産物では、図 4.5.2. のレーン 1 及びレーン 2 で示されるように、二本の *S. cerevisiae* のバンド及び一本の *Sz. pombe* のバンドが検出されたのに対して、mCOLD-PCR で得られた増幅産物では、レーン 4 に示されるように、*Sz. pombe* 由来の単一のバンドのみが検出された。これは、*S. cerevisiae* 由来の DNA は mCOLD-PCR 法では、増幅されなかったことを示している。また、図 4.5.3. に示すとおり、conv.PCR で増幅された DNA 断片と mCOLD-PCR で増幅された DNA 断片のサンガー法を用いた解析により得られるエレクトロフェログラムを比較すると、conv.PCR による増幅産物では *S. cerevisiae* 由来の大きなピークと *Sz. pombe* 由来の小さなピークが見られているのに対して、mCOLD-PCR による増幅産物では、*S. cerevisiae* 由来のピークはほぼ表れず *Sz. pombe* 由来のピークのみが検出された。

次に、*S. cerevisiae* 及び *Sz. pombe* の初期の DNA 量比が異なる場合の影響について検討した。*S. cerevisiae* と *Sz. pombe* のゲノム DNA の混合比率が、1:1, 10:1, 100:1, 1,000:1, 10,000:1 となるように調製した 5 系列の DNA 溶液を鋳型として解析を行ったものが図 4.5.4. である。conv.PCR を用いた場合、*Sz. pombe* のバンドは、*S. cerevisiae* とのゲノム DNA 量比にして 0.1% 以下では検出されなかったが、mCOLD-PCR を用いた場合、0.01% まで検出することができた。

4.3.2. mCOLD-PCR 法の DGGE 法を用いた微生物叢解析への応用

一般的な微生物解析と同様に、ワイン製造工程における微生物叢を PCR-DGGE 法により解析する場合、rRNA 遺伝子をターゲットとしたユニバーサルプライマーが用いられるが、それらのユニバーサルプライマーは醸造用酵母も検出対象とするため、多量添加される *S. cerevisiae* などの醸造用酵母がその他の微生物の検出を困難にしていた。低存在比率微生物を含めた微生物叢を明らかにするため、果汁及びワインマストから微生物のゲノム DNA を包括的に抽出し、mCOLD-PCR によって真核微生物の LSU-rRNA の D1 領域を対象として増幅したところ、概ね 280 bp の塩基長の DNA 断片が得られ、微生物叢解析を DGGE 法により実施した (図 4.5.5.)。対照として、conv.PCR による増幅産物も DGGE 法による微生物叢解析を行った結果、発酵期間を通じて *S. cerevisiae* の濃いバンドと *Hanseniaspora* sp. の薄いバンドが検出された一方で、mCOLD-PCR を用いた結果では、*S. cerevisiae* のバンドが非常に薄くなり、果汁でも検出されている *Candida* sp. や *Cladosporium* sp. 及び *Hanseniaspora* sp. のバンドが検出された。

4.3.3. 長鎖核酸断片の増幅への mCOLD-PCR 法の適用

LSU-rRNA 遺伝子の D1/D2 領域のような長鎖核酸断片に mCOLD-PCR 法が適用できるか検討を行った。まず、モデル実験系として、*S. cerevisiae* のゲノム DNA と *Sz. pombe* のゲノム DNA の等量混合物を含む DNA 溶液を鋳型として、conv.PCR 及び *S. cerevisiae* の dsRNA プロブを用いた mCOLD-PCR でそれぞれ増幅し、得られた増幅産物をサンガー法によりシーケンスを行い、エレクトロフェログラムを比較した (図 4.5.6.)。conv.PCR で増幅した増幅産物の解析結果では、*S. cerevisiae* 由来のピークと *Sz. pombe* 由来のピークが重なって検出されていたのに対して、mCOLD-PCR により増幅した増幅産物の解析結果では、ほぼすべてのピークが *Sz. pombe* 由来のものであった。

4.3.4. 次世代型シーケンサーを用いた微生物叢解析への mCOLD-PCR の適用

赤ワインマストに関しても *S. cerevisiae* を除いた微生物叢解析を DGGE 法により行ったものの、白ワインマストと比べて得られた DGGE プロファイルが複雑だったため、次世代型シーケンサーによる解析を試みた。DGGE 法による解析と同様、果汁及び赤ワインマストから微生物のゲノム DNA を包括的に抽出し、表 4.5.1. 記載の No.5 のプライマーセットを用いて真核微生物の LSU-rRNA の D1/D2 領域を対象とした conv.PCR 及び *S. cerevisiae* の dsRNA プロブを用いた mCOLD-PCR により得られた増幅産物を、次世代型シーケンサーにより解析した。次世代型シーケンサーにより得られた配列は属レベルまで推定し、その検出比率を算出した。図 4.5.7. においては、検出比率が 1%未満の配列及び属まで推定できなかった配列については、Others のカテゴリーに集約した。*Saccharomyces* 属由来の配列の検出比率に着目すると、酵母添加前の果汁段階では 5.7%であり、酵母添加により 80.8%まで増加した。主発酵末期 (day 8) でも 74.3%と酵母添加後では、添加された醸造用酵母が検出されることから、赤ワインマスト中において低存在比率の微生物を検出することは次世代型シーケンサーを使用しても非効率的であった。一方、mCOLD-PCR を用いて主発酵末期 (day 8) のサンプルを増幅し、次世代型シーケンサー解析を行ったところ、*Saccharomyces* 属の検出比率が 8.8%と conv.PCR を使用した場合に比べ低い値をとり、*Acremonium* 属や *Cladosporium* 属などその他の真核微生物の検出比率が高い値を示した。

赤ワインマストの次世代型シーケンサーによる解析では、主発酵末期 (day 8) で conv.PCR を用いた増幅産物から *Malassezia* 属が約 10%程度検出されている一方で、同じ主発酵末期 (day 8) 由来のサンプルからにもかかわらず、mCOLD-PCR を用いた増幅産物からは *Malassezia* 属がより低い存在比率で検出されていた。

4.4. 考察

PCR-DGGE 法や PCR-SSCP 法、PCR-TTGE 法などに代表される PCR により微生物群集全体の特定遺伝子を増幅し、配列の違いで分離し特定する手法は、環境サンプルにおける微生物叢を解析するのに有効な手法である。しかしながら、それらの手法により微生物叢を網羅的に解析しようとする場合、特定の微生物が多量に存在している場合に、その他の低

存在比率の微生物を検出することは極めて困難であった (Andorra *et al.*, 2008)。そのような理由から、特定の微生物を製造工程において添加することの多い発酵食品における微生物叢解析は、特定の細菌群を対象を絞って解析するなどの対応をとることとなり、得られる結果に一定の制限があった。

そこで本章では、COLD-PCR の原理を応用することにより前述の PCR を用いる欠点を克服できないか検討した。従来 SNPs 解析で用いられている ice-COLD-PCR では、増幅抑制プローブとして用いる ssDNA は、それ自身がテンプレート及びプライマーとして働かないように増幅用のプライマーが結合する配列の一部を削ったり、3'末端をリン酸化するなどの対応が必要なため、化学合成により調製する必要があった (Milbury *et al.*, 2011)。しかしながら、化学合成では、合成できる長さに制約があり (最長で 200 bp)、種推定精度を高めるためできるだけ長い領域を増幅したい微生物叢解析に直接適用するには不十分であった。そこで本研究では、ssDNA の代わりに、dsRNA をプローブとして用いることで、微生物叢解析に適した mCOLD-PCR 法を開発した。mCOLD-PCR の適用にあたっては、一般的に、過剰の RNA はマグネシウムイオンをキレートすることにより PCR を阻害する一方、マグネシウムイオンが過剰に存在する場合、短い DNA 断片の増幅を行うと目的の増幅産物が得られず、アガロースゲル電気泳動ではスミアなバンドとして検出される可能性が高まる。本章ではマグネシウム濃度は 2.0 mM、dsRNA プローブは 100 nM で反応を行っているが、適切なマグネシウムイオン濃度は、従来用いていた dsRNA プローブと大きく長さの異なるプローブを使用する場合には、再度予備実験により決定する必要がある。mCOLD-PCR で用いる dsRNA プローブは、DNA polymerase の鋳型とならず、化学合成により調製する必要のある ssDNA に比べて安価に合成でき、さらに、dsRNA とすることで、RNase による分解もされにくい。mCOLD-PCR の原理は、図 4.5.1. に示すとおりであり、基本的には ice-COLD-PCR 法とほぼ同様である。すなわち、特徴としては、増幅抑制したい配列と同じ配列を持った dsRNA プローブを添加すること、及び DNA/RNA ヘテロ二本鎖を形成後、ミスマッチの存在するヘテロ二本鎖のみ変性させる再変性ステップをサーマルサイクラーの温度プログラムに含むことである。

S. cerevisiae と *Sz. pombe* を用いたモデル実験系の結果では、conv.PCR で増幅した場合、優占種の 1%程度の存在量を占めていないと検出できないのに対し、mCOLD-PCR で増幅した場合は、優占種の 0.01%程度の存在量まで検出できることが明らかとなっており、この結果は、conv.PCR に比べて mCOLD-PCR は、低存在比率微生物を高感度に検出することができることを示している (図 4.5.4.)。さらに、次世代型シーケンサーによる解析との組み合わせを見据え、真核微生物の種推定に用いられることの多い LSU-rRNA 遺伝子の D1/D2 領域を対象とした解析に mCOLD-PCR が適用可能か検討した結果、長鎖核酸断片の増幅に適用可能であることが示された (図 4.5.6.)。

また、本研究では、ワイン酵母を多量に含むワインマスト中の低存在比率微生物の検出に mCOLD-PCR が適用できたことを示した。しかしながら、mCOLD-PCR の温度プログラムにおいて、DNA/RNA ヘテロ二本鎖の Tm 値と比較して、低い再変性温度を設定した場合、抑制対象の配列 (すなわち、dsRNA の配列) と類似度の低い配列から優先的に増幅されて

しまう点について注意が必要である。DNA/RNA ヘテロ二本鎖の T_m 値に比べ再変性温度があまりに低い場合には、低存在比率の微生物由来の核酸であっても多量に存在する微生物由来の核酸と類似度の高いものは十分に変性されず、結果として DNA/RNA ヘテロ二本鎖の変性のしやすさ（抑制対象配列との相同性）に基づいてバイアスがかかる。本研究においても、白ワインマストを mCOLD-PCR 増幅産物を DGGE 解析した結果（図 4.5.5.A）では、*Hanseniaspora* sp. に比べて *Candida* sp. がより優先的に増幅されていた。図 4.5.5.B で示すとおり、得られた配列の相同性を比較すると *S. cerevisiae* とその他の微生物の相同性よりも *Candida* sp. と *S. cerevisiae* の相同性の方が低いためと考えられる。従来法の PCR により得られた増幅産物を解析することで推定される微生物叢の方が、増幅によるバイアスが発生する可能性がない分、mCOLD-PCR を用いて推定される微生物叢より実態に近いと考えられ、このバイアスをできる限り減少させるためにも、再変性温度はパーフェクトマッチの DNA/RNA ヘテロ二本鎖が変性しない範囲においてもっとも高い温度で設定することが重要である。

本章において、mCOLD-PCR 増幅産物はサンガー法によるシーケンスや DGGE 解析、次世代型シーケンサーによる解析など様々な手法に適用可能であることを示した。特に、次世代型シーケンサーによる解析は近年、急速に進んできており、一度に大量の塩基配列を解析することができ、機種によっては、400 bp~1,000 bp 程度を解析することができるものもあるため、rRNA 遺伝子をターゲットとしたアンプリコン解析など網羅的な微生物叢解析に非常に有用な解析技術である。本章で行ったような、ワインの微生物叢における次世代型シーケンサーを用いた解析はあまり行われておらず (Bokulich *et al.*, 2012b)、特に真菌叢に関する報告はこれまでにない。本章で得られた次世代型シーケンサーによる解析結果では、赤ワインマストから 32 属の真核微生物と多くの未同定微生物が検出され、そのうちいくつかの微生物については、これまでの研究によりブドウ果皮や果汁、ワイン、圃場などから検出されているものであった (Bokulich *et al.*, 2012c; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Romancino *et al.*, 2008; Suzzi *et al.*, 2012)。主発酵末期 (day 8) の赤ワインマストからは、conv.PCR を用いた場合、12 属の微生物が検出されたのに対して、mCOLD-PCR を用いた場合、同じサンプルにも関わらず 17 属の微生物が検出された。また、*Saccharomyces* 属の検出比率も conv.PCR の 74.3% から mCOLD-PCR では 8.8% と検出比率の低下が見られ、mCOLD-PCR は発酵中のサンプルにおける長鎖核酸断片をターゲットとした微生物叢解析にも適用可能であることが示された。一方で、DGGE 解析では、増幅抑制対象の微生物 (*Saccharomyces* 属) と相同性の低い微生物ほど優先的に増幅されていたことから、次世代型シーケンサーによる解析でも、DNA/RNA ヘテロ二本鎖の T_m 値に比べ再変性温度が低く、DGGE 解析によるものと同様のバイアスがかかっている可能性が否定できないため、低存在比率の微生物の検出比率は実際の存在比率を反映していない可能性がある。また、主発酵末期 (day 8) の次世代型シーケンサーによる解析結果では、conv.PCR を介した場合 *Malassezia* 属が 10% 程度検出されているのに対し、mCOLD-PCR を介した場合、0.1% 以下の検出比率となった。この原因としては、*Malassezia* 属は表皮に常在するため、解析に供した conv.PCR を用いて調製したサンプル自体が *Malassezia* 属によりコンタミネーションしてい

たか、もしくは dsRNA プローブ調製に使用した DNA が *Malassezia* 属によりコンタミネーションしていたことにより、mCOLD-PCR により *Saccharomyces* 属とともに *Malassezia* 属の増幅も抑制されてしまった可能性が考えられる。

課題は残されているものの、mCOLD-PCR によって検出された微生物には、ワインでは初めて検出された微生物もいくつか含まれており、酵母添加を行ったワインマスト中には、たとえ次世代型シーケンサーを用いたとしても、従来型の PCR による増幅産物の解析では、検出できない低存在比率の微生物が存在していると考えられる。中でも *Glomus* 属が今回初めてワイン製造工程中から検出されたことは興味深い。通常の PCR では、次世代型シーケンサーを用いても検出できないレベルの低含量であったとはいえ、*Glomus* 属はアーバスキュラー菌根菌として知られており、菌根以外には存在しないと考えられるため、おそらく土壤に分布した胞子が果皮に付着しワインマスト中に持ち込まれたのではないかと推察される。mCOLD-PCR と次世代型シーケンサーを組み合わせることは、発酵飲食品に代表されるような特定の微生物が多量に存在するサンプル中から低存在比率の微生物を検出するための強力なツールとなる。今後、特定の微生物が多量に存在するサンプルの解析に活用していくことで、これまでに報告されていない微生物の検出やその挙動を詳細に解析できるようになるものと期待される。

4.5. 図表

表 4.5.1. 本章で使したプライマーセット

No.	Primer name	Sequence 5' - 3' ^{1, 2, 3, 4, 5, 6}	Target region	Downstream application
1	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	D1	DGGE
	LS2	ATTCCCAAACAACCTCGACTC		
2	GC-NL1	gc - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	D1	DGGE
	LS2	ATTCCCAAACAACCTCGACTC		
3	A6-T7-NL1	A6 - T7 - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	D1	dsRNA preparation for DGGE
	LS2	ATTCCCAAACAACCTCGACTC		
4	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	D1	
	A5-T7-LS2	A5 - T7 - ATTCCCAAACAACCTCGACTC		
5	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	D1/D2	General purpose
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG		
6	NL1 for seq.	SeqA - MID - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	D1/D2	NGS
	NL4 for seq.	SeqB - GGTCCGTGTTTCAAGACGG		
7	A6-T7-NL1	A6 - T7 - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	D1/D2	dsRNA preparation for NGS
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG		
8	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	D1/D2	
	A6-T7-NL4	A6 - T7 - GGTCCGTGTTTCAAGACGG		

¹ gc, GC-clamp sequence, CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG

² A5, AAAAAA; A6, AAAAAA

³ T7, T7 promoter sequence, TAATACGACTCACTCACTATAGGG

⁴ SeqA, 454 primer A adaptor sequence and key sequence, CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG

⁵ SeqB, 454 primer B adaptor sequence and key sequence, CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG

⁶ MID, Multiplex Identifier adaptor sequence; (1) ACGCGATCGA, (2) ACTAGCAGTA, (3) AGTGATCGAT or (4) ACGCTAGACT

表 4.5.2. 次世代型シーケンサーによる解析で検出された微生物

Genus (%) ¹	conv. PCR			mCOLD-PCR
	juice	must (Day 1)	must (Day 8)	must (Day 8)
<i>Acremonium</i>	0.4	0.4	1.0	27.3
<i>Aspergillus</i>	N.D.	N.D.	N.D.	0.1
<i>Alternaria</i>	N.D.	< 0.1	N.D.	N.D.
<i>Aureobasidium</i>	1.3	0.1	N.D.	N.D.
<i>Botryobasidium</i>	N.D.	N.D.	< 0.1	N.D.
<i>Botrytinia</i>	19.3	4.8	N.D.	N.D.
<i>Candida</i>	36.0	7.0	6.4	0.7
<i>Cladosporium</i>	14.6	2.2	2.3	48.1
<i>Clavispora</i>	0.1	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Cryptococcus</i>	0.1	< 0.1	N.D.	< 0.1
<i>Dissoconium</i>	0.1	< 0.1	N.D.	N.D.
<i>Exidia</i>	N.D.	N.D.	< 0.1	< 0.1
<i>Glomus</i>	N.D.	N.D.	N.D.	0.9
<i>Galactomyces</i>	0.5	N.D.	0.1	N.D.
<i>Hanseniaspora</i>	11.4	0.2	< 0.1	N.D.
<i>Kazachstania</i>	N.D.	0.1	< 0.1	N.D.
<i>Kluyveromyces</i>	N.D.	< 0.1	N.D.	N.D.
<i>Lecytophora</i>	0.4	0.1	0.1	0.2
<i>Malassezia</i>	N.D.	0.1	10.4	< 0.1
<i>Penicillium</i>	N.D.	< 0.1	0.9	< 0.1
<i>Phialemonium</i>	N.D.	N.D.	N.D.	< 0.1
<i>Pichia</i>	N.D.	N.D.	N.D.	< 0.1
<i>Ramularia</i>	N.D.	N.D.	N.D.	0.1
<i>Ramichloridium</i>	N.D.	< 0.1	N.D.	N.D.
<i>Rhodotorula</i>	0.4	< 0.1	N.D.	N.D.
<i>Saccharomyces</i>	5.7	80.8	74.3	8.8
<i>Schizosaccharomyces</i>	N.D.	N.D.	N.D.	< 0.1
<i>Sporidiobolus</i>	0.1	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Tilletiopsis</i>	N.D.	N.D.	N.D.	0.1
<i>Trichaptum</i>	N.D.	N.D.	N.D.	< 0.1
<i>Zygothiala</i>	0.1	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Zygosaccharomyces</i>	0.1	N.D.	N.D.	N.D.
unclassified	9.5	4.1	4.4	13.3
Total read counts	1671	3739	5380	2682

¹N.D. は「検出限界以下」を示す。

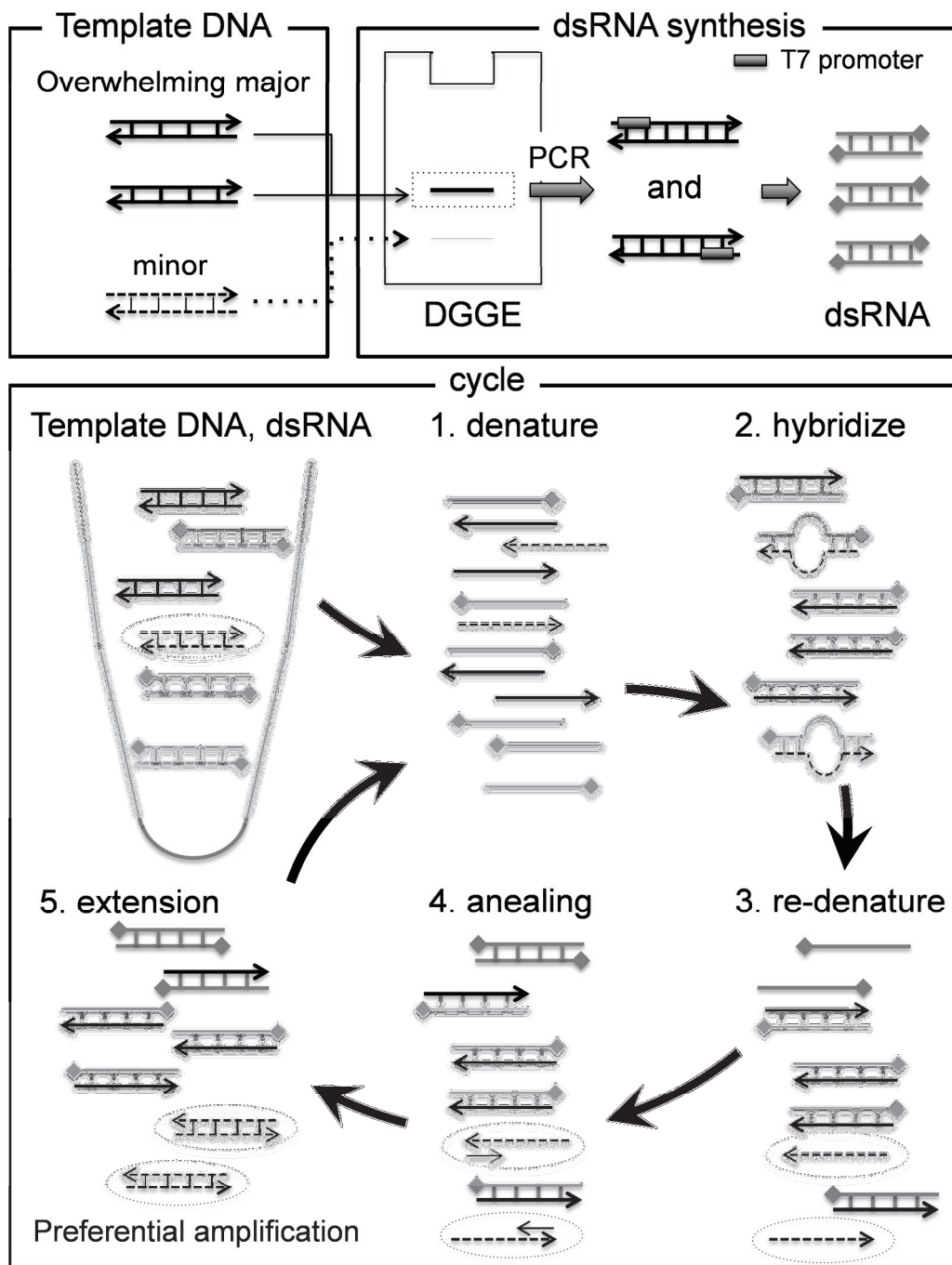


図 4.5.1. mCOLD-PCR 法の原理

(1) PCR 反応液中に共存する dsRNA は最初の熱変性工程で一本鎖に解離する。(2) 続くハイブリダイズ工程で鋳型 DNA とヘテロ二本鎖を形成する。この際 dsRNA は過剰量存在するため、ほぼすべての DNA は RNA プロブと会合する。(3) 再変性工程でミスマッチの存在するヘテロ二本鎖のみが一本鎖に解離する。(4) プライマーの結合が可能な温度に速やかに下げることでプライマーが一本鎖核酸にアニーリングする。(5) DNA にアニーリングしたプライマーがポリメラーゼにより伸長し、増幅される。なお、RNA は逆転写活性を持たない DNA polymerase の鋳型にはならない。

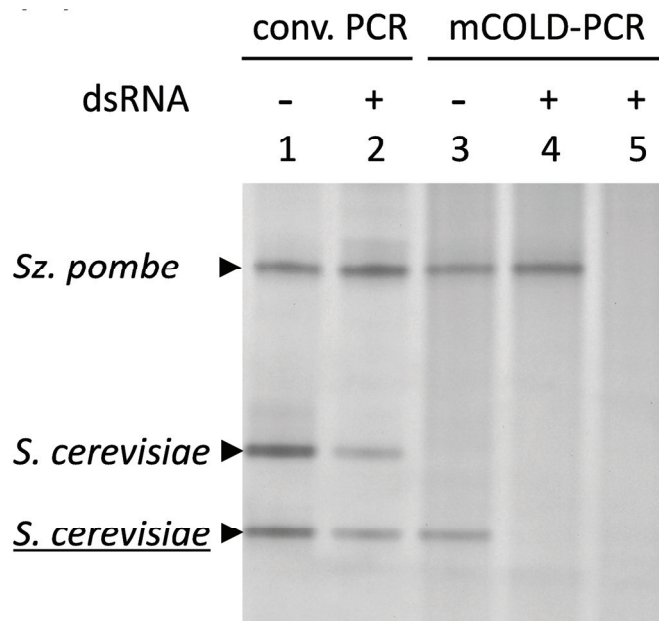
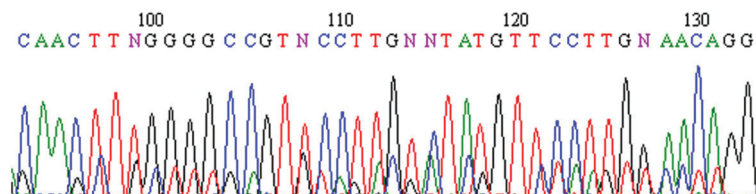


図 4.5.2. モデル実験系における conv.PCR と mCOLD-PCR により得られる増幅産物の DGGE 法による比較

S. cerevisiae 及び *Sz. pombe* の LSU-rRNA 遺伝子の D1 領域増幅産物の等量混合物を鋳型として、conv.PCR 及び mCOLD-PCR で増幅し、DGGE 法により解析した結果であり、レーン 1 及び 2 は、conv.PCR により増幅したもの、レーン 3~5 は mCOLD-PCR により増幅したものである。PCR 反応液中への dsRNA プローブの添加の有無は、レーン番号のすぐ上に +/- を示すことで表した。なお、レーン 5 は、鋳型 DNA の含まれない陰性対照である。

S. cerevisiae CAACTT TGGGGCCG TCCCTTGTCTATG TTCCTTGGAAACAGG
Sz. pombe GAAGCT GCTTTGAG GTAGACGATCGG TCTAAGTTCCTTGG

conv. PCR product without dsRNA (Lane No.1)



mCOLD-PCR product with dsRNA (Lane No.4)

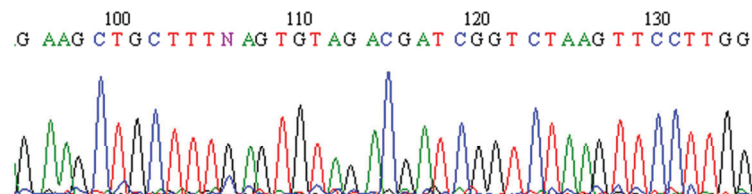


図 4.5.3. モデル実験系における conv.PCR と mCOLD-PCR により得られる増幅産物のサンガー法エレクトロフェログラムによる比較

S. cerevisiae 及び *Sz. pombe* の LSU-rRNA 遺伝子の D1 領域増幅産物の等量混合物を鋳型として、conv.PCR 及び mCOLD-PCR により得られた増幅産物を精製し、直接サンガー法シーケンスにより配列決定を行った結果である。黒枠で囲っている部分が *S. cerevisiae* と *Sz. pombe* で配列の異なる部分である。Lane No.1 及び Lane No.4 は、それぞれ図 4.5.2 におけるレーン 1 及びレーン 4 のサンプルをシーケンス解析に供したことを示す。

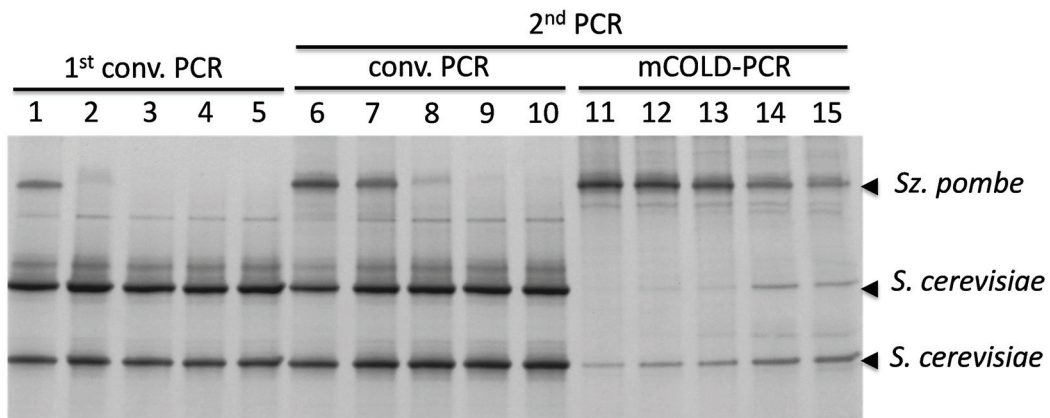


図 4.5.4. conv.PCR 及び mCOLD-PCR による低存在比率微生物の検出結果の比較

鋳型となる DNA 混合溶液において、*S. cerevisiae* と *Sz. pombe* 由来 D1 領域増幅産物の初期の混合比を 1:1 ~ 10,000:1 まで段階的に変えて、conv.PCR 及び mCOLD-PCR により増幅し、DGGE 法により解析した結果である。レーン 1, 6 及び 11 は混合比 1:1、レーン 2, 7 及び 12 は混合比 10:1、レーン 3, 8 及び 13 は混合比 100:1、レーン 4, 9 及び 14 は混合比 1,000:1、レーン 5, 10 及び 15 は混合比 10,000:1 である。

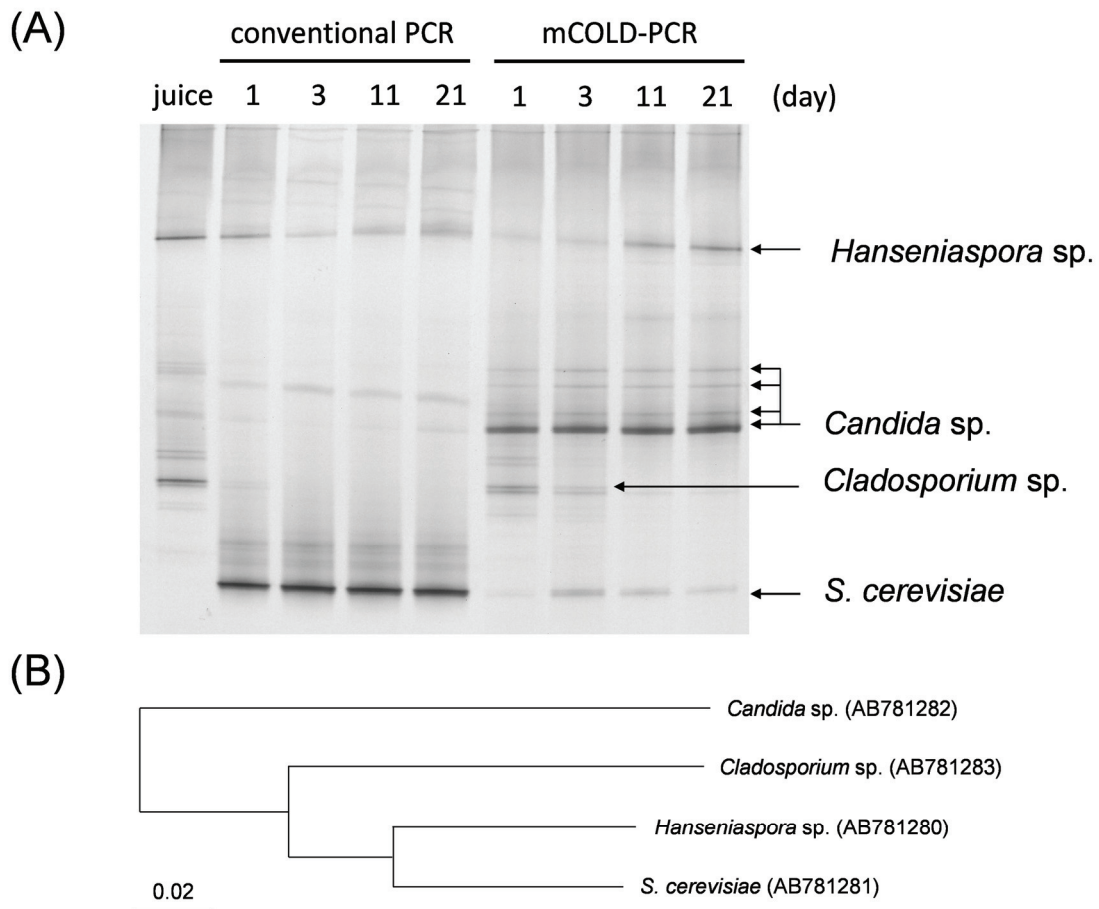


図 4.5.5. conv.PCR 及び mCOLD-PCR による白ワインマストの微生物叢解析結果の比較

(A) 白ワインマストの発酵過程で経時的にサンプリングを行い、抽出した DNA を鋳型として得られた D1 領域増幅産物を conv.PCR 又は mCOLD-PCR により増幅を行い、DGGE 法により解析した結果である。なお、mCOLD-PCR に使用した dsRNA プローブは *S. cerevisiae* を抑制対象とするものである。レーン上の juice は酵母添加前の果汁を示し、レーン上の数字は酵母添加後の日数を示す。(B) DGGE 法による解析で得られた核酸断片をサンガー法シーケンスにより解析した塩基配列を基に作成した樹状図。括弧内はそれぞれ DDBJ に登録済みのアクセッション番号を示す。

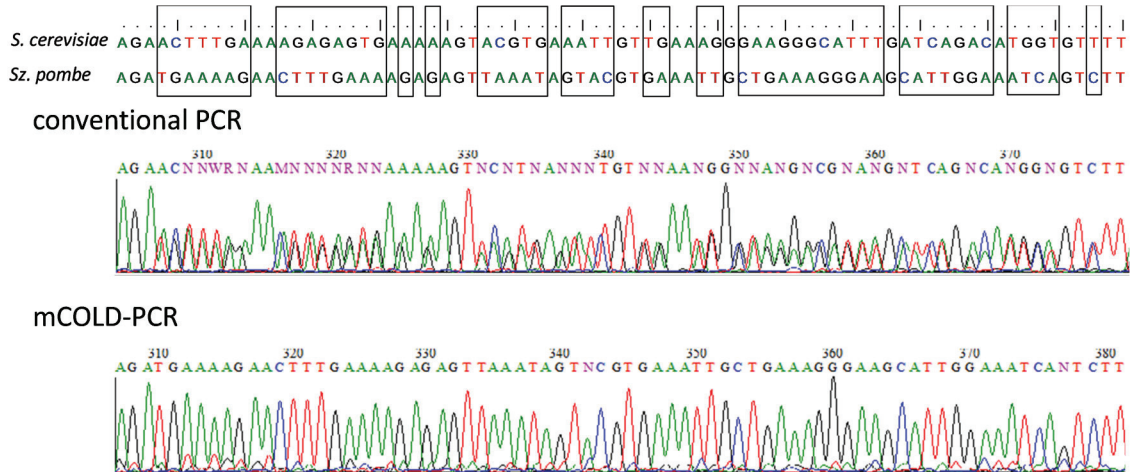


図 4.5.6. 長鎖を増幅対象としたモデル実験系における conv.PCR 及び mCOLD-PCR により得られた増幅産物のサンガー法シーケンスのエレクトロフェログラムの比較

S. cerevisiae 及び *Sz. pombe* の LSU-rRNA 遺伝子の D1/D2 領域増幅産物の等量混合物を鋳型として、conv.PCR 及び mCOLD-PCR により得られた増幅産物を精製し、直接サンガー法シーケンスにより配列決定を行った結果である。黒枠で囲っている部分が *S. cerevisiae* と *Sz. pombe* で配列の異なる部分である。

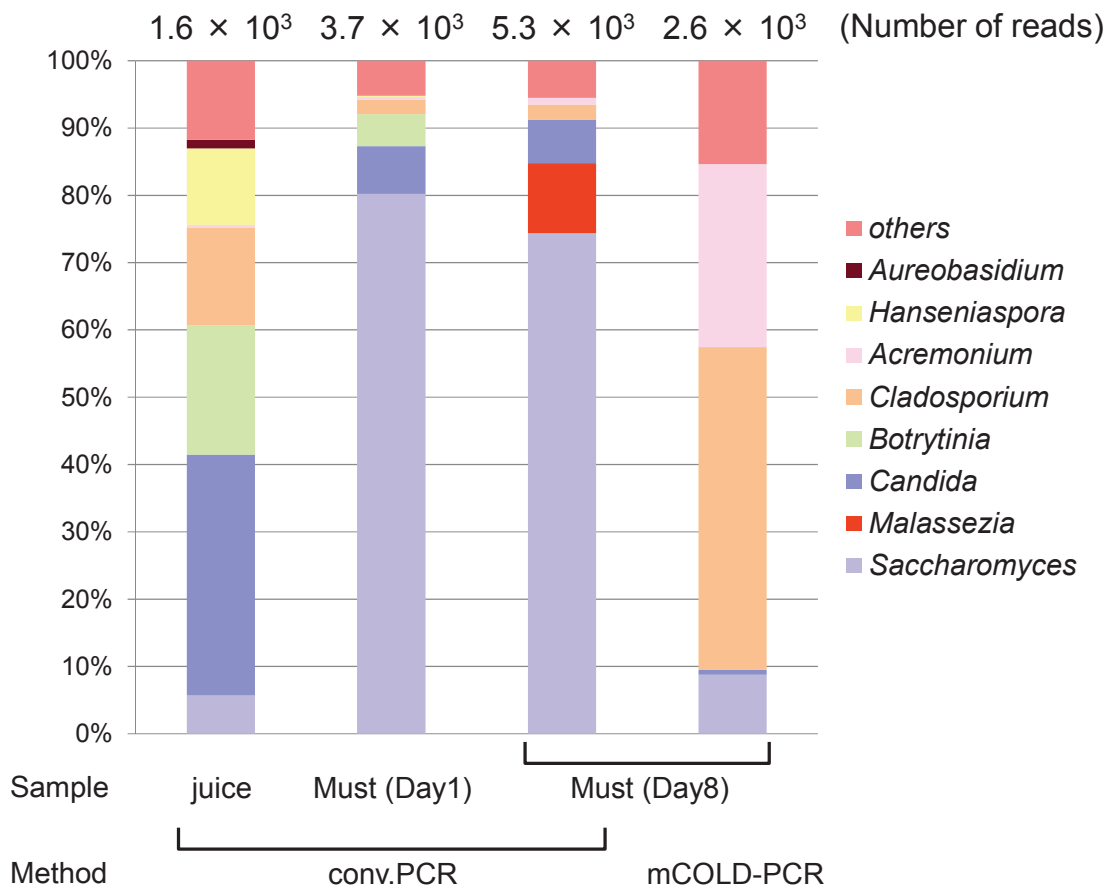


図 4.5.7. conv.PCR 及び mCOLD-PCR による赤ワインマストの微生物叢解析結果の比較

果粒破碎液、赤ワインマスト酵母添加1日目及び赤ワインマスト酵母添加8日目にサンプリングを行い、抽出した DNA を鋳型として conv.PCR 又は mCOLD-PCR により増幅を行い、得られた増幅産物を次世代型シーケンサーにより網羅的に解析した結果である。なお、mCOLD-PCR に使用した dsRNA プローブは *S. cerevisiae* を抑制対象とするものである。各積み上げグラフ上の数字は、各サンプルから得られた総リード数である。

4.6. 小括

サンプル中に特定の微生物が非常に多量する場合、PCR を介する手法で低存在比率の微生物を検出することは困難である。そこで、多量存在する微生物由来の核酸の増幅を二本鎖 RNA プローブにより抑制し、低存在比率微生物の検出を可能にする mCOLD-PCR 法を開発した。mCOLD-PCR 法を DGGE 法や次世代型のシーケンサーと組み合わせて使用することで、サンプル中に特定の微生物が多量に存在していたとしても効率的に低存在比率の微生物を検出することができるようになる。本章では、モデル試験において、mCOLD-PCR-DGGE 法を用いた解析により、多量の *S. cerevisiae* と共存するごく微量の *Sz. pombe* を検出できることを証明した。また、発酵白ワインもろみを mCOLD-PCR-DGGE 法により解析した結果、通常の PCR-DGGE 法では検出できなかった *Candida* sp. や *Cladosporium* sp. が検出できた。発酵赤ワインもろみの mCOLD-PCR 法を用いた次世代シーケンサー解析では、*Saccharomyces* 属の検出比率が劇的に減少し、その他の微生物の検出比率が増加したほか、通常の PCR を用いた結果と比較し、検出された属数も増加していた。このように、mCOLD-PCR 法の応用は発酵食品や発酵飲料などの網羅的な微生物叢を解析するのに役立つことが期待される。

第5章 要旨

酒類製造において、意図した微生物以外の生育は製品のコンセプトを崩す原因となるほか、不快な香気成分の生成や苦味の増加、味の平坦化など品質に与える影響が非常に大きいため、従来から微生物管理の重要性は広く認識されてきた。酒類は、農産物及び微生物を利用した製品であるため、その品質は原料、温度管理等の各種操作、醸造用微生物の種類やその他の微生物の生育等により影響を受けるという特徴があり、同一の品質を製造するには熟練した技術が必要である。中でも、好ましくない微生物による汚染は、品質に与える影響が極めて大きいため、これまでも精力的に研究がなされており、多種にわたる微生物が酒類の品質に対して様々な影響を与えることが報告されている。

微生物の検出にはさまざまな手法が利用されるが、広く用いられるものとして培養法と分子生物学的手法（PCR-DGGE 法や次世代型シーケンサー法など）がある。これまでの酒類中の微生物に関する研究は、そのほとんどが培養法により行われてきた。培養法では、使用した培地や培養条件で検出される微生物にバイアスが生じるため、酒類中に存在している微生物をすべて対象としているわけではなかった。そのため本来酒類中で生育しているにも関わらず、培養法では検出されない未知の微生物も存在していると考えられる。一例として、*Pectinatus* 属細菌と *Megasphaera cerevisiae* はいずれも偏性嫌気性細菌であり、20世紀後半に汚染されたビールから初めて単離された微生物である。これらの細菌は嫌気的条件下で生育し、ビールの品質に悪影響を与えることが明らかとなった。近年、これらの微生物が問題となってきたのは、瓶詰等の技術が進歩した結果、瓶内中の溶存酸素が減少したことにより、偏性嫌気性細菌が生育可能となったためである。このように、新規製法の導入や特殊な製品環境中では生育可能となる、あるいは、未知の潜在的な汚染微生物が未だ存在している可能性がある。したがって、培養による影響を受けずに微生物を網羅的に検出する必要がある。

近年、酒税法等の規制緩和を受け、ビールやワインなどの酒類業への新規参入により中小企業規模の製造者が増加した。それに伴い、クラフトビールや日本ワインの市場も拡大してきたため、ますます品質の管理が重要な課題となっている。本論文では、そのような新規参入を果たした小規模事業者の数多く存在するワインとビールについて、培養法や分子生物学的手法を用いて、従来解析対象となっていなかった微生物も含め、酒類醸造工程中の微生物叢を改めて解析し、詳細な知見を得ることを目的として研究を実施した。

まず初めに、ワインの醸造工程及び市販ワインについて微生物叢解析を実施した。近年、消費者の食の安全性への意識の高まりを受けて、保存料などの食品添加物を添加しない飲食品が増加傾向にあり、ワイン醸造においても、抗酸化作用や微生物の生育抑制作用を持つ亜硫酸を添加していないワインが市場で流通している。ワインの原料であるブドウ果皮等には多種の微生物が存在していることが知られているが、ブドウは製造開始時に殺菌されるわけではない。ワイン製造においては雑菌の生育抑制は低 pH や、亜硫酸塩等の添加、多量の酵母添加などによって達成されている。そのため、これまでも、醸造工程における亜硫酸添加の影響を調べた報告はあるが、乳酸菌や野生酵母などを主な対象としており限

定的であった。そのため、ワイン醸造工程及び市販ワイン中の微生物叢に対する亜硫酸添加の影響を、培養法と PCR-DGGE 法を用いて解析し、野生酵母や乳酸菌に限らず、幅広い微生物について評価した。その結果、醸造工程中及び市販ワインで様々な微生物が検出され、*Sphingomonas* sp., *Pseudozyma* sp., *Ochromonas* sp., *Methylophilus* sp. は、ワイン中から初めて検出された。亜硫酸添加で生育抑制を受ける微生物として、PCR-DGGE 法で *Tatumella terreus* や *Leuconostoc mesenteroides* が検出され、*T. terreus* は培養法でも同様の傾向で検出された。*T. terreus* は、グラッパの製造過程やカカオ豆の発酵過程等で検出報告がある。しかしながら、香気成分の生成や味の変化など官能面での検討はなされておらず、その影響は不明であるが、生育により資化性糖などを消費すると考えられる。*T. terreus* や *Leu. mesenteroides* が、亜硫酸の添加によりその生育が制限されることが本研究で明らかとなったが、亜硫酸無添加ワインではその生育も早くなるため、微生物管理上は亜硫酸に代わる生育抑制技術の導入を行うことが望ましい。

続いて、ビールや発泡酒等の醸造工程における微生物叢の変遷を調べた。通常、ビール醸造はプラントで行われることが多く、初期に原料を煮沸した上で密閉されたタンク中で発酵するのに加えて、抗菌作用を有するホップ成分を含むため、ある程度微生物の管理ができていたと考えられていた。そのため、近年開発された分子生物学的手法を用いた解析の報告は、ランビック等の微生物の混入が起こりやすいタイプに限られ、一般的なビールについては少ない現状にあった。さらに、消費者の嗜好の多様化や、日本の税体系上、麦芽使用比率の違いによって賦課される税金が異なることもあり、麦芽の一部の代わりに大麦芽を使用する醸造法も用いられ、これまでとは異なる微生物叢となっている可能性がある。そこで、次世代型シーケンサーを用いて、ビール及び発泡酒の醸造工程中の詳細な微生物叢を解析し、どのような微生物がどの工程で消失し、また、増加するかを定量的に調べることにした。次世代型シーケンサーによる解析の結果、検出された微生物における属レベルの多様性は 191 属と、培養法により検出された 18 属と比較し、10 倍を超える極めて多様な環境であることが明らかとなった。醸造工程中の各細菌数の推移を解析したところ、健全な発酵をしているビールにおいても *Bacillus* 属や *Paenibacillus* 属の細菌は発酵中に増殖している可能性を示し、これまでにビール中から検出例のない *Tissierella* 属、*Tepidmonas* 属、*Polaromonas* 属、*Chryseobacterium* 属及び *Sphingomonas* 属も新たに発酵過程で増殖する可能性が示された。この結果は、これらの細菌による汚染のリスクが存在することを示している。

最後に、分子生物学的手法で、酒類中の真菌叢解析を行う際に必要となる技術の開発を行った。分子生物学的手法を用いて真菌叢の解析を行う場合に、大きな障害となったのは、発酵開始時に添加する醸造用酵母であった。網羅的に調査することが目的のため、真菌全般を対象として検出可能な PCR 用プライマーセットを用いる必要があり、その結果、当然ながら醸造用酵母も検出対象に含まれることになる。通常、汚染リスクを回避するため、発酵開始時に多量の醸造用酵母を添加するので、検出される微生物のほとんどが醸造用酵母となり、醸造工程中における醸造用酵母以外の詳細な真菌叢を網羅的に把握することは、極めて困難であった。また、真菌叢に限らず、醸造用酵母中のオルガネラが細菌叢検出用

の PCR 用プライマーセットで検出されることもあり、細菌叢解析に影響が出る可能性があるため、醸造用酵母を対象とせず、その他の微生物を網羅的に検出する技術の開発が求められていた。そこで、SNPs を有する野生型と変異型の核酸混合物から変異型のみを優先的に増幅する PCR 手法である CO-amplification at lower denaturation temperature PCR (COLD-PCR) から着想を得て、特定の配列の核酸の増幅を抑制し、その他の配列の核酸を優先的に増幅する改変 COLD-PCR 法を開発した。改変 COLD-PCR 法は、モデル実験系において、*Saccharomyces cerevisiae* の 0.01%しか存在しない *Schizosaccharomyces pombe* を検出できることを示した。続いて、ワイン醸造工程中における醸造用酵母以外の真菌叢の解析を試みた。まず、白ワイン発酵もろみを改変 COLD-PCR-DGGE 法により解析した結果、通常の PCR-DGGE 法では検出できなかった *Candida* sp. や *Cladosporium* sp. が検出できた。さらに、赤ワイン発酵もろみの改変 COLD-PCR 法を用いた次世代シーケンサー解析では、醸造用酵母である *Saccharomyces* 属の検出比率が劇的に減少し、その他の微生物の検出比率が増加したほか、通常の PCR を用いた結果と比較し、検出された属数も増加していた。本研究において開発された改変 COLD-PCR 法は、発酵飲食品等の特定の微生物が多く存在している中での低存在比率の微生物の動態を観察するのに適しており、今後それらのサンプルに対して活用していくことで、これまでに報告されていない微生物の検出やその挙動を詳細に解析できるようになるものと考えられる。また、改変 COLD-PCR 法は非常に低存在比率の微生物を検出できるため、次世代型シーケンサーと組み合わせることにより、極めて詳細な微生物叢を明らかにするのに役立つと期待している。

酒類製造において製造工程中に存在する微生物を知ることは、品質の安定化や品質の向上、安全性の確保を達成する上で重要な基盤となる。今回検出された *T. terreus* や *Bacillus* 属などの細菌が各酒類にどのような影響を与えているか現時点では不明であり、今後は、影響評価などを行う必要がある。本研究により得られた知見及び開発された技術が、製品に潜在的に存在する細菌が、何らかのきっかけで品質の劣化等を引き起こした際の迅速な対応の一助になるとともに、予防的対応をとるために貢献することを期待したい。

引用文献

Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Larsson, K.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Hoiland, K., Kjoller, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A.F., Tedersoo, L., Ursing, B.M., Vralstad, T., Liimatainen, K., Peintner, U. and Koljalg, U. (2010) The UNITE database for molecular identification of fungi--recent updates and future perspectives. *New phytologist* 186: 281-285.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1919-1925.

Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J.M. and Esteve-Zarzoso, B. (2008) Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology* 25: 849-856.

Andrighetto, C., Lombardi, A., Ferrati, M., Guidi, A., Corrain, C. and Arcangeli, G. (2009) Lactic acid bacteria biodiversity in Italian marinated seafood salad and their interactions on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 20: 462-468.

Bae, S., Fleet, G.H. and Heard, G.M. (2006) Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology* 100: 712-727.

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2012) The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153: 243-259.

Bartowsky, E.J. (2009) Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology* 48: 149-156.

Bauer, P., Rolfs, A., Regitz-Zagrosek, V., Hildebrandt, A. and Fleck, E. (1997) Use of manganese in RT-PCR eliminates PCR artifacts resulting from DNase I digestion. *BioTechniques* 22: 1128-1132.

Bisson, L.F. and Joseph, C. L. (2009) Yeasts. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* pp.47-60. Berlin Heidelberg: Springer.

Bokulich, N.A. and Mills, D.A. (2012) Differentiation of mixed lactic acid bacteria communities in beverage fermentations using targeted terminal restriction fragment length polymorphism. *Food Microbiology* 31: 126-132.

- Bokulich, N.A., Bamforth, C.W. and Mills, D.A. (2012a) Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. *PLoS ONE* 7: e35507.
- Bokulich, N.A., Joseph, C.M., Allen, G., Benson, A.K. and Mills, D.A. (2012b) Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. *PLoS ONE* 7: e36357.
- Bokulich, N.A., Hwang, C.F., Liu, S., Boundy-Mills, K. and Mills, D.A. (2012c) Profiling the yeast communities of wine fermentation using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *American Journal of Enology and Viticulture* 63: 185-194.
- Bokulich, N.A. and Bamforth, C.W. (2013) The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77: 157-172.
- Boulton, C. and Quain, D. (2006) Microbiology. In *Brewing Yeast and Fermentation*. pp.510-530. Oxford: Blackwell Science.
- Brady, C.L., Venter, S.N., Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., De Vos, P. and Coutinho, T.A. (2010) Transfer of *Pantoea citrea*, *Pantoea punctata* and *Pantoea terrea* to the genus *Tatumella emend.* as *Tatumella citrea* comb. nov., *Tatumella punctata* comb. nov. and *Tatumella terrea* comb. nov. and description of *Tatumella morbirosei* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 484-494.
- Brewery Convention of Japan (2004) Wort and Beer. In *Beer analysis methods* ed. BCOJ Analysis Committee. Tokyo: Brewers Association of Japan.
- Campisano, A., Ometto, L., Compant, S., Pancher, M., Antonielli, L., Yousaf, S. and Rota-Stabelli, O. (2014) Interkingdom transfer of the acne-causing agent, *Propionibacterium acnes*, from human to grapevine. *Molecular Biology and Evolution* 31: 1059-1065.
- Campbell, I. (2003) Wild yeasts in brewing and distilling. In *Brewing microbiology* eds. Priest F.G. and Campbell, I. pp.247-266. London: Chapman and Hall.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Gonzalez, P.A., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J. and Knight, R. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7: 335-336.

Carr, J.G., Davies, P.A. and Sparks, A.H. (1976) The toxicity of sulphur dioxide towards certain lactic acid bacteria from fermented apple juice. *Journal of Applied Microbiology* 40: 201-212.

Cleusix, V., Lacroix, C., Dasen, G., Leo, M. and Le, B.G. (2010) Comparative study of a new quantitative real-time PCR targeting the xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase bifidobacterial gene (*xfp*) in faecal samples with two fluorescence in situ hybridization methods. *Journal of Applied Microbiology* 108: 181-193.

Cocolin, L., Bisson, L.F. and Mills, D.A. (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189: 81-87.

Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R. and Comi, G. (2004) Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1347-1355.

Costantini, A., Vaudano, E., Del Prete, V., Danei, M. and Garcia-Moruno, E. (2009) Biogenic amine production by contaminating bacteria found in starter preparations used in winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 10664-10669.

Crowell, E. A. and Guymon, J. F. (1975) Wine constituents arising from sorbic acid addition, and identification of 2-ethoxyhexa-3, 5-diene as source of geranium-like off-odor. *American Journal of Enology and Viticulture* 26: 97-102.

de Melo Pereira, G. V., Miguel, M. G. D. C. P., Ramos, C. L. and Schwan, R. F. (2012) Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 5395-5405.

Desfossés-Foucault, É., Dussault-Lepage, V., Le Boucher, C., Savard, P., LaPointe, G. and Roy, D. (2012) Assessment of probiotic viability during Cheddar cheese manufacture and ripening using propidium monoazide-PCR quantification. *Frontiers in Microbiology* 3: 1-11.

Divol, B. and Lonvaud-Funel, A. (2005) Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *Journal of Applied Microbiology* 99: 85-93.

Endo, A. and Okada, S. (2005) Monitoring the lactic acid bacterial diversity during *shochu* fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99: 216-221.

- Engelmann, U. and Weiss, N. (1985) *Megasphaera cerevisiae* sp. nov.: A new Gram-negative obligately anaerobic coccus isolated from spoiled beer. *Systematic and Applied Microbiology* 6: 287-290.
- Feasey, P. (2007) A brief history of beer. *Food Australia* 59: 191-196.
- Florez, A.B. and Mayo, B. (2006) Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology* 110: 165-171.
- Gans, J., Wolinsky, M. and Dunbar, J. (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387-1390.
- Guillamón, J. M. and Mas, A. (2009) Acetic acid bacteria. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* pp.31-46. Berlin Heidelberg: Springer.
- Haakensen, M. and Ziola, B. (2008) Identification of novel *horA*-harbouring bacteria capable of spoiling beer. *Canadian Journal of Microbiology* 54: 321-325.
- Haas, B.J., Gevers, D., Earl, A.M., Feldgarden, M., Ward, D.V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S.K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T.Z.; Human Microbiome Consortium, Petrosino, J.F., Knight, R. and Birren, B.W. (2011) Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research* 21: 494-504.
- Hara, S., Isoda, R., Tahvanainen, T. and Hashidoko, Y. (2012) Trace amounts of furan-2-carboxylic acids determine the quality of solid agar plates for bacterial culture. *PLoS ONE* 7: e41142.
- Herzog, P., Winkler, I., Wolking, D., Kampf, P. and Lipski, A. (2008) *Chryseobacterium ureilyticum* sp. nov., *Chryseobacterium gambrini* sp. nov., *Chryseobacterium pallidum* sp. nov. and *Chryseobacterium molle* sp. nov., isolated from beer-bottling plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 26-33.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. and Wellington, E.M. (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3233-3241.

Huang, X. and Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9: 868-877.

Jackson, R.S. (2008) Postfermentation treatments and related topics. In *Wine Science: Principles and Applications* pp.418-519. London: Academic press.

Jespersen, L. and Jakobsen, M. (1996) Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology* 33: 139-155.

Juste, A., Malfliet, S., Waud, M., Crauwels, S., De, C.L., Aerts, G., Marsh, T.L., Ruyters, S., Willems, K., Busschaert, P. and Lievens, B. (2014) Bacterial community dynamics during industrial malting, with an emphasis on lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 39: 39-46.

Kageyama, B., Nakae, M., Yagi, S. and Sonoyama, T. (1992) *Pantoea punctata* sp. nov., *Pantoea citrea* sp. nov., and *Pantoea terrea* sp. nov. isolated from fruit and soil samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42: 203-210.

Kato, S., Ishihara, T., Hemmi, H., Kobayashi, H. and Yoshimura, T. (2010) Alterations in D-amino acid concentrations and microbial community structures during the fermentation of red and white wines. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111: 104-108.

Kempf, V.A.J., Trebesius, K. and Autenrieth, I.B. (2000) Fluorescent *in situ* hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 830-838.

Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R. and Schmidt, T.M. (2001) rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research* 29: 181-184.

König, H. and Fröhlich, J. (2009) Lactic acid bacteria. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* pp.3-29. Berlin Heidelberg: Springer.

Koyanagi, T., Kiyohara, M., Matsui, H., Yamamoto, K., Kondo, T., Katayama, T. and Kumagai, H. (2011) Pyrosequencing survey of the microbial diversity of 'narezushi', an archetype of modern Japanese sushi. *Letters in Applied Microbiology* 53: 635-640.

Kumar, P.A., Srinivas, T.N., Prasad, A.R. and Shivaji, S. (2011) Identification of fruity aroma-producing compounds from *Chryseobacterium* sp. isolated from the Western Ghats, India. *Current Microbiology* 63: 193-197.

Kurihara, S., Shimoura, S., Maruyama, A., Nakamura, T. and Brennan, M.A. (2010) International difference in consumers' food safety concern: Comparison between Japan, the United States, China, and Ireland. *HortResearch* 64: 67-75.

Lafon-Lafourcade, S., Carre, E. and Ribereau-Gayon, P. (1983) Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 874-880.

Lan, Y., Wang, Q., Cole, J.R. and Rosen, G.L. (2012) Using the RDP classifier to predict taxonomic novelty and reduce the search space for finding novel organisms. *PLoS ONE* 7: e32491.

Landete, J.M., Ferrer, S. and Pardo, I. (2005) Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *Journal of Applied Microbiology* 99: 580-586.

Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial systematics* eds. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. pp.115–175. New York: John Wiley.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

Lee, S. Y., Mabee, M. S. and Jangaard, N. O. (1978) *Pectinatus*, a new genus of the family *Bacteroidaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 28: 582-594.

Li, J., Wang, L., Mamon, H., Kulke, M.H., Berbeco, R. and Makrigiorgos, G.M. (2008) Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nature Medicine* 14: 579-584.

Liu, C.M., Kachur, S., Dwan, M.G., Abraham, A.G., Aziz, M., Hsueh, P.R., Huang, Y.T., Busch, J.D., Lamit, L.J., Gehring, C.A., Keim, P. and Price, L.B. (2012) FungiQuant: a broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiology* 12: 255.

Lors, C., Ryngaert, A., Perie, F., Diels, L. and Damidot, D. (2010) Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. *Chemosphere* 81: 1263-1271.

Loy, A., Beisker, W. and Meier, H. (2005) Diversity of bacteria growing in natural mineral water after bottling. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3624-3632.

- Maragkoudakis, P.A., Nardi, T., Bovo, B., D'Andrea, M., Howell, K.S., Giacomini, A. and Corich, V. (2013) Biodiversity, dynamics and ecology of bacterial community during grape marc storage for the production of grappa. *International Journal of Food Microbiology* 162: 143-151.
- Melgar, E. and Goldthwait, D.A. (1968) Deoxyribonucleic acid nucleases. II. The effects of metals on the mechanism of action of deoxyribonuclease I. *Journal of Biological Chemistry* 243: 4409-4416.
- Michel, R.H. and McGovern, P.E. (1992) Chemical evidence for ancient beer. *Nature* 360: 24.
- Milbury, C.A., Li, J. and Makrigiorgos, G.M. (2011) *Ice*-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations. *Nucleic Acids Research* 39: e2.
- Millet, V. and Lonvaud-Funel, A. (2000) The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30: 136-141.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Muyzer, G. and Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A. and Hunter, N. (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148: 257-266.
- Nakamura, M., Kametani, I., Higaki, S. and Yamagishi, T. (2003) Identification of *Propionibacterium acnes* by polymerase chain reaction for amplification of 16S ribosomal RNA and lipase genes. *Anaerobe* 9: 5-10.
- Nisiotou, A.A., Spiropoulos, A.E. and Nychas, G.J. (2007) Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6705-6713.

Nocker, A., Cheung, C.Y. and Camper, A.K. (2006) Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods* 67: 310-320.

Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W. and Backhaus, H. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 178: 5636-5643.

O'Donnell, K. (1993) Fusarium and its near relatives. In *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* eds. Reynolds, D. and Taylor, J. pp.225–233. Wallingford, United Kingdom: CAB International.

Oevelen, D., Spaepen, M., Timmermans, P. and Verachtert, H. (1977) Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze. *Journal of the Institute of Brewing* 83: 356-360.

Okonechnikov, K., Golosova, O. and Fursov, M. (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28: 1166-1167.

Ough, C.S. and Crowell, E.A. (1987) Use of sulfur dioxide in winemaking. *Journal of Food Science* 52: 386-388.

Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J. and Olsen, G.J. (1986) The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. In *Advances in Microbial Ecology* ed. Marshall, K.C. pp.1-55. New York: Springer.

Pircher, A., Bauer, F. and Paulsen, P. (2006) Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology* 226: 225-231.

Ploner, A. (2012) Heatplus: heatmaps with row and/or column covariates and colored clusters. R package version 2.6.0.

Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H. and Heard, G.M. (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4: 865-877.

Priest, F.G. (2003) Gram-positive brewery bacteria. In *Brewing Microbiology* eds. Priest, F.G. and Campbell, I. pp.181-217. London: Chapman and Hall.

R Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rainbow, C. (1981) Beer spoilage microorganisms. In *Brewing Science*, Vol 2. ed. Pollock, J.R.A. pp.491-550. London: Academic Press.

Renouf, V., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A. (2007) Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 149-164.

Rigottier-Gois, L., Bourhis, A.G., Geneviève, G., Rochet, V. and Doré, J. (2003) Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 237-245.

Romancino, D.P., Di Maio, S., Muriella, R. and Oliva, D. (2008) Analysis of non-*Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). *Journal of Applied Microbiology* 105: 2248-2254.

Romano, P. and Suzzi, G. (1993) Sulphur dioxide and wine microorganisms. In *Wine Microbiology and Biotechnology* ed. Fleet, G.H. pp.373-393. Switzerland: Harwood Academic Publishers.

Ruiz, P., Sesena, S., Izquierdo, P.M. and Palop, M.L. (2010) Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1555-1562.

Spitaels, F., Wieme, A.D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H.M., Van Landschoot, A., De Vuyst, L. and Vandamme, P. (2014) The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLoS ONE* 9: e95384.

Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K. and Kitamoto, K. (2008) Sake and beer spoilage lactic acid bacteria — a review. *Journal of the Institute of Brewing* 114: 209-223.

Suzuki, K. (2011) 125th Anniversary Review: Microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *Journal of the Institute of Brewing* 117: 131-155.

Suzzi, G., Arfelli, G., Schirone, M., Corsetti, A., Perpetuini, G. and Tofalo, R. (2012) Effect of grape indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains on Montepulciano d'Abruzzo red wine quality. *Food Research International* 46: 22-29.

Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W. and Palmer, J.D. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 327–338.

Van Vuuren, H.J.J and Priest, F.G. (2003) Gram-negative spoilage bacteria. In *Brewing Microbiology* eds. Priest, F.G. and Campbell, I. pp.219-245. London: Chapman and Hall.

Vaughan, A., O'Sullivan, T. and Sinderen, D. (2005) Enhancing the microbiological stability of malt and beer—a review. *Journal of the Institute of Brewing* 111: 355-371.

Wallner, G., Amann, R. and Beisker, W. (1993) Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA - targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14: 136-143.

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G. H. and Lee, T. H. (1985) Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 36: 302-313.

第 2 章

Takahashi, M., Ohta, T., Masaki, K., Mizuno, A. and Goto-Yamamoto, N. (2014) Evaluation of microbial diversity in sulfite-added and sulfite-free wine by culture-dependent and-independent methods. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117: 569-575.

第 3 章

Takahashi, M., Kita, Y., Kusaka, K., Mizuno, A. and Goto-Yamamoto, N. (2015) Evaluation of microbial diversity in the pilot-scale beer brewing process by culture-dependent and culture-independent method. *Journal of Applied Microbiology* 118: 454-469.

第 4 章

Takahashi, M., Masaki, K., Mizuno, A. and Goto-Yamamoto, N. (2014) Modified COLD-PCR for detection of minor microorganisms in wine samples during the fermentation. *Food Microbiology* 39: 74-80.

謝辞

本研究をまとめ、論文を執筆するに当たり、丁寧なご指導とご助言をいただきました広島大学大学院生物圏科学研究科食資源科学講座の中野宏幸教授に、心より厚く御礼申し上げます。また、丁寧な審査と適格なご助言をくださいました広島大学大学院生物圏科学研究科の三本木至宏教授、島本整教授、藤井力教授、正木和夫准教授、九州大学農学研究院の中山二郎准教授に、心より厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行する上で、公私ともにお世話になりました独立行政法人酒類総合研究所の皆様へ深く感謝いたします。後藤奈美理事には、研究開始時よりの確なご助言をいただき、何より本研究の場を与えていただきましたこと、心より厚く御礼申し上げます。また、本研究を進めるに当たり、多大なるご支援、ご配慮を賜りました水野昭博部門長、日下一尊主任研究員、喜多靖子さん、濱田涼子さん、大田民さん、醸造技術応用研究部門、醸造技術基盤研究部門、品質・安全性研究部門、研究企画知財部門の皆様へ深く感謝いたします。特に、様々な研究に取り組んでいる研究員の皆様との公私にわたる交流は、研究を進める上で大きな原動力となりました。心より感謝いたします。

最後になりましたが、私を見守ってくれた、両親、姉、そして、研究に集中できるよう最も近くで支えてくれた妻に心より感謝いたします。