

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 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

氏 名 高 橋 正 之

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に、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 terrestra* や *Leuconostoc mesenteroides* が検出され、*T. terrestra* は培養法でも同様の傾向で検出された。*T. terrestra* 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、香气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. terrestra* 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、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とした。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。