

# お酒の中の微生物を改めて知る

醸造技術開発研究部門 高橋正之

## 1. はじめに

酒類中の微生物に関しては従来から精力的な研究が行われてきていますが、近年の遺伝子解析技術の発展により、培養できない微生物を含めた微生物叢を把握することが可能となったことで、酒類中の微生物の実態が少しずつ明らかとなってきましたので、今回は、これまであまり知られていなかった非常に詳細な酒類中の微生物叢に関する最新の研究結果をご紹介します。

## 2. 微生物はどのようにして検出するのか

従来から微生物研究の主力として用いられている手法として培養法があります。培養法では、生育したコロニーの形状や菌体の形状、性質、資化性などから微生物の種類が、コロニー数からどの程度存在しているかが判断でき、酒類の微生物叢に関する数多くの研究はこの方法を用いて行われてきました。しかし、近年の微生物学研究では、地球上に存在する微生物の多くは培養することが困難（難培養性）であると言われており、これまではむしろ“培養できる特別な微生物”を検出していたと考えられています。微生物が難培養である理由には複数の要因があると言われていますが、既存の培養法で検出することは困難なため、培養を介さない遺伝子解析技術を利用する必要があります。

## 3. 微生物検出手法の違いは得られる微生物叢にどのような影響を与えるか

では、培養可能な微生物は、培養法によってすべて検出できているのでしょうか？このことを調べるために、ビール製造工程における糖化直前の乳酸球菌の存在量を、培養法及び遺伝子解析技術である次世代型シーケンサーと定量PCR（以下、「遺伝子解析法」といいます）を用いて推定してみたところ、遺伝子解析法の結果と培養法の結果で大きな開きがあり、実際には培養法での検出数の数十倍存在している可能性が示唆されました（図1（A））。さらに、ビール製造工程中に検出された微生物の総数を培養法と遺伝子解析法で比較すると、程度の差はありますが、培養法では過小に見積もられていることが明らかとなり、もっとも差が小さかったものでも培養法で検出された微生物数は、遺伝子解析法で推定された微生物数の39.4%程度でした（図1（B））。また、培養法は常に培地組成によりバイアスがかかるため、培地ごとに検出できる微生物が異なることも確認できました。これらの結果は、培養法で微生物が検出された場合には、使用した培地で生育できない微生物も含め、見積もられた微生物数の数倍～数百倍の微生物が存在している可能性があることを示唆しています。

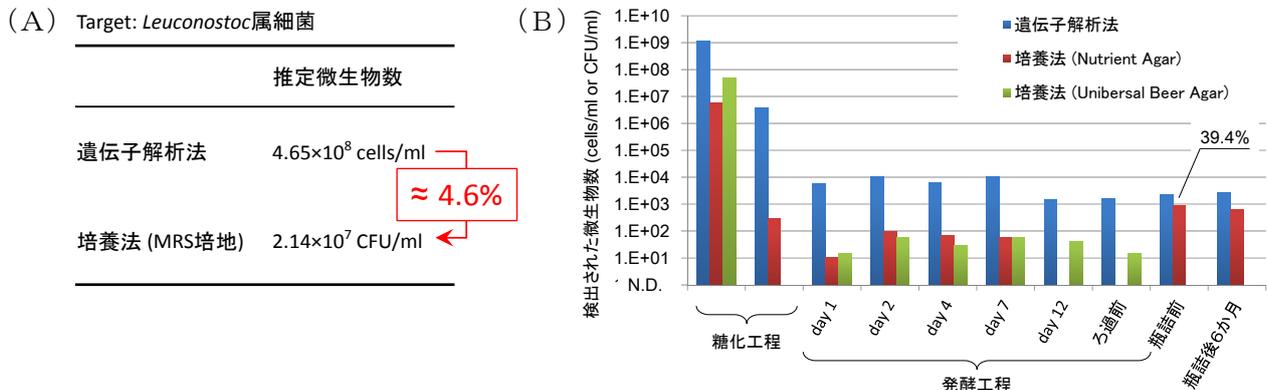


図1 培養法と遺伝子解析法で検出されるビール製造工程中の微生物数の違い

#### 4. 様々な清酒にはどの程度微生物が存在しているのか

近年さまざまな製法で清酒が造られており、従来調べられてきている微生物叢とは違ってきていることが考えられましたので、いろいろなタイプの清酒を遺伝子解析法により微生物叢の解析を行いました。その結果、いくつかのサンプルから微生物が検出され、発泡性清酒に関しては、5点中4点でおおむね  $10^3$  cells/ml を超える微生物が検出され、残る1点からは検出されませんでした（定量限界以下）。微生物が検出された4点はいわゆる瓶内二次発酵により発泡性を持たせていたのに対して、微生物が検出されなかった1点は炭酸ガスを吹き込む方式により発泡性を付与していたことから、製法の違いが起因していると考えられました。検出された微生物は *Lactobacillus* 属細菌など品質に影響を与えることが明らかなものも存在しており、瓶内二次発酵で発泡性清酒を製造する場合には品質管理に十分注意をする必要があると考えられます（図2）。

#### 5. 製造工程中の微生物叢を明らかにする技術の開発

清酒の製造工程中にも醸造用酵母以外の野生酵母の挙動の把握や生酏酒母製造中の特定の乳酸菌以外の細菌の挙動の把握は、優占種である醸造用酵母や乳酸菌が圧倒的に多く存在していることから、PCR 法等の遺伝子解析技術を用いた手法では検出微生物を特定しない網羅的な解析は困難と考えられており、培養法に頼らざるを得ませんでした。この場合前述と同様の問題が生じ、微生物叢の全体像の把握は困難となるため、解決できる技術が求められていました。そこで、微生物叢解析へ応用可能な改変 COLD-PCR 法を開発しました。この技術を用いることにより、発酵中の酵母以外の真菌類の挙動を把握することが可能となりました。

#### 6. おわりに

本研究により明らかとなる酒類中の詳細な微生物叢に関する知見の蓄積は、管理すべき微生物や酒質に影響を与える微生物の実態把握に繋がり、ひいては酒類の安全性の担保及び酒類の品質管理の向上に必ず役立つものと考えています。

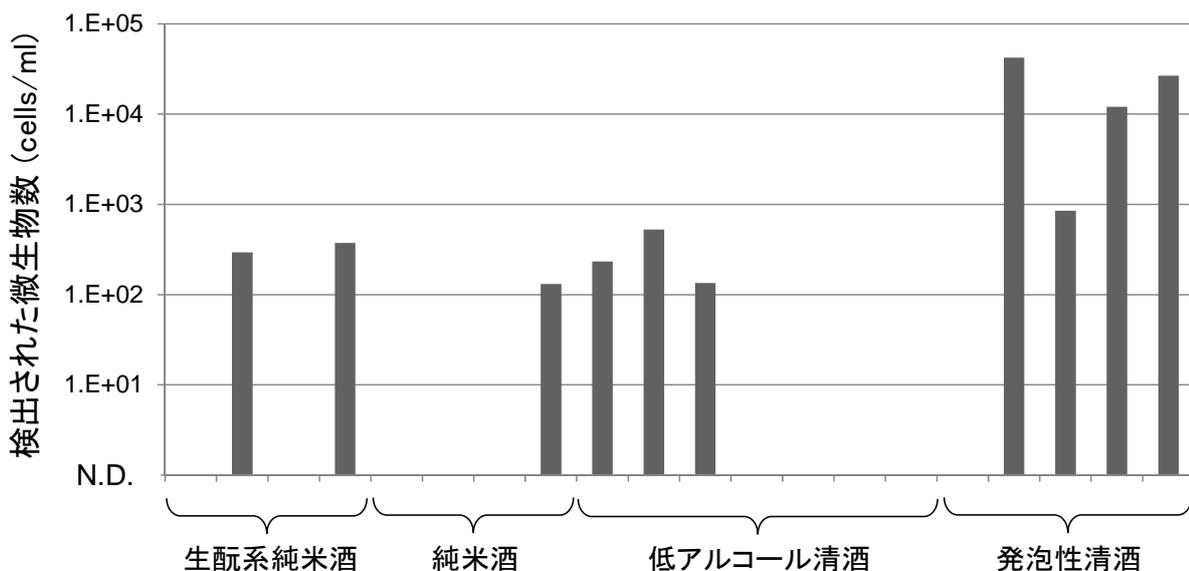


図2 遺伝子解析法による清酒中の微生物叢の解析結果