琉球大学学術リポジトリ

[寄稿]ビール工場におけるビール有害菌の同定方法の進歩

メタデータ	言語: 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): ビール有害菌, ポリメラーゼ連鎖反応(PCR), リボタイピング キーワード (En): HACCP 作成者: 宮城, 剛, MIYAGI, Tsuyoshi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016606

南方資源利用技術研究会誌，Vol.19 No.1，35～40，2003

寄　稿

ビール工場におけるビール有害菌の同定方法の進歩

宮　城　　剛

*オリオンビール株式会社　名護工場　研究開発室

Advanced method of identification of beer spoilage microorganisms in brewery

Tsuyoshi MIYAGI

Orion Breweries, LTD.

Keywords：ビール有害菌，ポリメラーゼ連鎖反応（PCR），リボタイピング，*HACCP*

はじめに

ビールの微生物管理はビールの品質を維持するための最重要項目の一つである。特に流通するビールの多くが生ビールである日本ではビールに有害な微生物への対処方法が盛んに研究されてきている。

一般的にビールは(1)pHが低い、(2)アルコールを含有する、(3)ホップ苦味成分（グラム陽性菌に抗菌活性）を含む、(4)溶存酸素が極めて少ない、(5)醗酵性糖含量が低いなどの理由から、ほとんどの微生物はビール中で生育できない。またビール中で人体に悪影響を及ぼす微生物が増殖した事例も報告されておらず、実験的に食中毒菌を多量にビールへ接種した場合でも、芽胞を形成しない菌は死滅していく（表１）。さらに、芽胞も長期間残留するが増殖することはない。一方、上記の悪条件にも関わらずビール中で増殖し、ビールを混濁・変敗させる菌として古くから乳酸菌などの嫌気性菌と野生酵母が知られている。さらに近年のビールは「お客様により新鮮なビールを造りたてのままで届けたい」との醸造メーカーの思いから、熱処理を行なわない生ビールが主流となってきていることや、また、酸素による品質劣化を抑えるため、製造工程中から溶存する酸素を低減させる動きなどは皮肉にも偏性嫌気性である新種の*Pectinatus*（ペクチネイタス）菌の出現をもたらしている。これらの微生物は「ビール有害菌」と呼ばれ、ビール製造における微生物管理では特に重要視されている。

表１．淡色ビールに接種した食中毒菌の生菌数

そこで本稿では、代表的なビール有害菌や試験法、そして近年発展が著しい分子生物学的手法を用いたビール有害菌の検出・同定法について紹介していきたい。

代表的なビール有害菌

上述したように、ビールは微生物生育に対する阻害要因を有している。本稿で述べるビール有害菌とは通性または偏性嫌気性菌であると共に上述した阻害要因に対し耐性を持った微生物のことである。微

*沖縄県名護市東江２丁目２番１号

生物のビール中での生育性、即ちビール生育性は菌種ごと、ビールのタイプごとに異なっている。

1．細　菌

(1) *Lactobacillus* 属

*Lactobacillus*属は通性嫌気性、グラム陽性菌で乳酸菌群に属する。グラム陽性菌ではあるがホップ苦味成分に対して耐性を持つ菌種がある。ホップ苦味成分の抗菌活性はpHが低いほど高くなるので、*Lactobacillus*属細菌のビール生育性はビール中のホップ苦味成分量とpHに大きく左右される。細胞形状は短桿菌、あるいは長桿菌であり、単一または２連、鎖状、菌塊をなす。ほとんどの場合運動性はない。乳酸とジアセチルを生成し、ビールに不快な香味を与える。代表的な菌種として *L. brevis*、*L. lindneri*、*L. casei*、*L.plantarum*、*L.coryniformis* が挙げられる。この中で*L.brevis*、*L.lindneri*のビール生育性は特に高く、ビール汚染事例のそれぞれ１／３又は１／４がこれらの菌種によるものといわれている。

(2) *Pediococcus* 属

Pediococcus 属も乳酸菌群に属する。通性嫌気性、グラム陽性菌であり、*Lactobacillus* 属と同様にホップ耐性を持つ菌種がある。細胞形状は球菌で主に２連または４連球菌として存在する。運動性はない。主にジアセチルを生成する。代表的な菌種としては *P.damunosus* であるが、*L.brevis*ほどビール生育性は強くない。その他、*P. inopinatus*が*L. casei*、*L.coryniformis*と同程度の弱いビール生育性を示すといわれている。

(3) *Pectinatus* 属

*Pectinatus*属は混濁したビールから *Pectinatus cerevisiiphilus*としてはじめて単離された。現在は *P. frisingensis* と *P. cerevisiiphilus* の２種に分類されている。偏性嫌気性、グラム陰性菌であり、胞子形成能はない。細胞形状はわずかに彎曲した桿菌である。若い菌体には短桿状のものが多く、特徴的なX字状の運動性を示す。老化した菌体は20μm以上にまで伸張し運動性を失うか緩やかに蛇行する場合が多い。*P. frisingensis* のビール生育性は *L. brevis*、*L. lindneri* と同程度であり、*P. cerevisiiphilus* はわずかに弱い。２菌種あわせて汚染事例の１／４程度を占めるといわれ、ビールに生育すると激しく混濁し強い硫黄臭あるいは下水臭を生じる。

(4) *Megasphaera* 属

Megasphaera 属は偏性嫌気性、グラム陰性菌であり、胞子形成はない。細胞形状は球菌であるが、完全な球菌ではなくやや楕円である。*Pectinatus* 菌等と比較してビール生育性は高くないが高pH、低アルコールのビールは注意を要する。本菌がビールで生育すると硫黄臭、あるいは下水臭が発生する。

2．酵　母

(1) *Saccharomyces* 属野生酵母

醸造に用いることのない *Saccharomyces* 属の全ての菌株や菌種は野生酵母と見なされる。現在 *Saccharomyces cerevisiae* に分類されている *S. diastaticus*、*S. ellipsoideus*、*S. logos*、*S. willianus*、*S. bayanus*は比較的低pH、低醗酵性糖含量のビール中でも増殖し、混濁を引き起こすことがある。ビール中に生育すると硫化水素、フェノール類その他の化合物を生成する。

(2) *Brettanomyces* 属

Brettanomyces 属酵母では、*B. claussenii* と *B. bruxellensis*が代表的である。醗酵性糖含量が高いビール中で増殖する場合があり、不快臭物質として酢酸を生成する。

(3) *Candida* 属

Candida 属酵母は、以前 *Mycoderma* 属と称された属を含む多様なグループの酵母からなる。*Brettanomyces*属酵母と同様に醗酵性糖含量が高いビール中で増殖する場合がある。

(4) 醸造用酵母

製品ビール中で醸造酵母が増殖すると、混濁を生じる可能性がある。故に、濾過ビールの最終製品段階では醸造酵母もビールを混濁させる有害菌であると見なしたほうがよい。

試　験　法

日本でのビール製造における微生物分析法についてはEBC（European Brewing Convention欧州醸造会議）Analytica Microbiologica Ⅱを基にしたBCOJ（Brewing Convention of Japan日本ビール酒造組合）微生物分析法に体系的にまとめられているので参考にしていただきたい。ここでは微生物検査の対象試料、培養法、性状調査について簡単に

紹介する。

ビール製造に関わる微生物試料には、麦汁・ビール・水などの液体試料、炭酸ガス・窒素ガス・エアーなどの気体試料、ビン・缶などの包装資材、設備・大気中などの環境由来の試料がある。液体試料の多くはメンブランフィルター濾過法によって検査を行なう。しかしながら、醗酵試料など酵母を多く含む試料は平板塗抹法により検査する。気体試料は滅菌生理食塩水に試料ガスを曝気し、滅菌生理食塩水をメンブランフィルター濾過することによって検査する。ビンや缶などの包装資材は滅菌生理食塩水で内部をすすぎ、生理食塩水をメンブラン濾過するか、王冠・缶蓋などの小さな資材は数個を直接生理食塩水に浸漬して、メンブラン濾過する。大気中の微生物はシャーレを５～15分開放し、落下してくる微生物を捕捉するか、市販のエアサンプラーで捕捉する。また、設備の表面などは滅菌綿棒で拭き取り、滅菌生理食塩水に懸濁する拭き取り検査によって捕捉する。さらに培地を直接設備に接触させることで検査する簡便な市販キットも使用される。

通性または偏性嫌気性であるビール有害菌を培養するには嫌気的な環境が必要とされる。そのために炭酸ガスで置換できる培養器や嫌気キャビネット、密閉容器中で炭酸ガスを発生させる簡便なキットなどが培養に用いられる。培地についてはビールメーカーごとに様々な工夫がなされており統一されてはいないが、「BCOJ微生物分析法」に対象とする微生物に応じて推奨される培地が載っているので参照していただきたい。

培地から微生物が検出された場合、その微生物がビール有害菌であるかを判定する必要がある。そのため、菌種の推定やビール中での生育性試験を行なう。はじめに顕微鏡観察で微生物の大きさ、形状、運動性を観察する。続いて、グラム染色、カタラーゼ試験を行なうことで、ビール有害菌のいずれに該当するか大まかに把握することができる。さらに調査を進める場合は、一般的に胞子形成性、糖資化性、ガス発生性、代謝産物などにより同定を試みることになるが、多大な労力と時間を費やさなくてはならない。そこで、近年ではビール有害菌かどうかを迅速・簡便に判定する技術が検討されてきている。

分子生物学的手法を用いたビール有害菌判定法の開発

ビール工場において検出された菌の判定はビールの品質を保証することはもちろん、汚染源を特定する意味においても大変重要である。先の項で述べたように培地から菌が検出された場合、これまでは顕微鏡観察やグラム染色、糖資化性、代謝産物などによって菌を推定してきた。しかしながら、このような手法は多大な時間と労力を費やすわりには正確な同定がなされているかは疑問である。このような背景を基に近年では、ビール醸造に携わる多くの研究者の手によって様々な分子生物学的手法を用いたビール有害菌の判定方法が開発されてきている。そこでこの項では、最も検討がなされていると思われるPCR法やその他の判定法、さらに遺伝子多型性を利用した疫学的調査手法について紹介する。

１．PCR法を用いたビール有害菌の判定方法

PCR（polymerase chain reaction）法は、*in vivo*におけるDNAの複製現象を模倣した反応で、特定のDNA領域を*in vitro*で選択的に増幅することができる。この方法は医学分野の臨床診断や未知の遺伝子の単離解析に飛躍的な進歩をもたらし、現在では様々な分野で利用されている。ビール業界でもビール有害菌の同定作業にPCR法が利用されているが、それは以下の理由からである。

PCR法に使用するプライマーの塩基配列を菌種に特異的になるように選択することで特定の菌種を同定することが可能である。現在、乳酸菌や*Pectinatus*菌といったビール有害菌の検出に利用されるPCRプライマーはリボゾームRNA（rRNA）をコードする遺伝子（rDNA）の塩基配列を基に設計されている[1-7]。これは、rDNAの配列が広く各菌種に保存されている配列とある菌種に特有の配列を含むからであり、菌種の分類に重要なことから塩基配列の情報が蓄積されているからである。また、Motoyamaらは*Pectinatus*属菌を特異的に検出するプライマーを16S-23S rDNAスペーサー領域からも設計している[8]（図１）。

次に、PCR法はDNAの熱変性、プライマーのアニーリング、DNAポリメラーゼによる伸長反応を繰り返えすことで鋳型DNAの目的とする領域が指数的に増幅される。故にきわめて微量の鋳型DNA

図１．PCRを用いた*Pectinatus*属細菌の特異的検出法（参考文献８より転載）

A, *P. cerevisiiphilus* の 18S － 23S rDNA の推定構造と *P. cerevisiiphilus* を特異的に検出するために選択されたプライマー
B, *P. frisingensis*の18S－23S rDNAの推定構造と*P. frisingensis* を特異的に検出するために選択されたプライマー
C, AとBのプライマーを用いたPCR結果。レーンMはpHYマーカー、レーン１は *P. cerevisiiphilus* の PCR 産物、レーン２は *P. frisingensis*のPCR産物。

Y. MotoyamaとT. Ogataによって設計された*Pectinatus*属細菌に特異的なプライマーは、rDNAの配列だけでなくそのスペーサー領域にも注目してプライマーを設計している。

から目的のDNA断片を検出することができるので、検出された菌体量が少なくても同定作業を行なうことができる。さらにPCR法はプライマーに特異性を持たせることで、微生物を単離することなく同定作業に移れるという利点もあり、短時間培養とPCRを組み合わせることで細菌検査から微生物の同定までの期間を飛躍的に短縮できる[9]。さらにPCR法を用いて乳酸菌のビール生育性を決定する方法も考案されている。これは乳酸菌のホップ耐性と関連があるhor A遺伝子をPCRで検出する方法で、検出された乳酸菌が実際にビールを混濁させる可能性があるのかを探ることができる[10]。

ビール酵母の菌株同定や野生酵母の検出にPCRを用いた報告もある。これには、酵母染色体上の転座領域の配列をプライマーとして利用したものや、[11]（図２）ゲノム中の繰り返し配列をプライマーとして得られる増幅多型から菌株を同定するもの[12]、ランダムプライマーを用いたRAPD法などがある[13) 14]。さらにPCRとRFLPを組み合わせた方法[15]や重要なビール有害酵母である *Saccharomyces diastaticus*のグルコアミラーゼ遺伝子の配列を利用した方法もある[16]。

図２．染色体上の転座領域（RPL2）を利用した*Saccharomyces*属酵母の識別

レーン１は*S. cerevisiae*菌株。1. 1kbのPCR産物が増幅される。
レーン２は*S. bayanus*菌株。1. 9kbのPCR産物が増幅される。
レーン３は*S. paradoxus*菌株。PCR産物が得られないか、1. 1kbのPCR産物がわずかに増幅される。
レーン４は*S. pastorianus*菌株。1. 1kbと1. 9kbの両方のPCR産物が増幅される。
レーンMは分子量マーカーのφX174 *Hae*Ⅲdigestとλ-*Hin*dⅢdigest。

RyuらはRPL2転座領域を利用したPCRとrDNA内部転写スペーサー領域のPCR[26]を組み合わせることによって、*S. cerevisiae*・*S. bayanus*・*S. paradoxus*・*S. pastorianus*の迅速な同定が可能であると結論づけている。

２．その他の手法を用いたビール有害菌判定方法

ビール有害菌の判定方法にはPCR法以外にも様々な方法が検討されてきている。抗体を用いた方法としては乳酸菌の細胞表面蛋白質であるgroupEに反

応する抗体[17]や*P. cerevisiiphilus*の細胞表面に反応する抗体[18]を作製した例が報告されている。その他には各種ビール有害菌の代謝産物パターン[19]や脂肪酸を測定する方法[20]、さらに蛍光プローブを直接菌体のrRNAに反応させるFluorescent *in situ* hybridization（FISH）法も報告されている[21]。酵母についてはパルスフィールド電気泳動によって染色体構造を明らかにする試みが古くからなされている[22) 23]。これらは酵母の系統学的知見を得る目的がほとんどあるが、下面ビール酵母と野生酵母の染色体構造は異なるので、パルスフィールド電気泳動を用いて識別することも有効な手段の一つであると考えられる。

3．遺伝子多型性を利用した疫学的調査手法

2000年に発生した雪印の微生物汚染事故は日本全国に大きな衝撃を与えた。また食中毒事故ではないものの、ビール業界においても過去に大規模なビール混濁事故が発生しており、商品ブランドが一つ消滅している。これらの事故は消費者のみならず食品製造に携わる全ての人に微生物管理の重要性を再認識させると共に、より高いレベルの微生物管理法の研鑽及び導入を促している。このような流れの中で、従来から行なわれている抜き取り検査による最終製品の保証だけでなく、HACCP（Hazard Analysis Critical Control Point System）のように製造工程中の危機管理ポイントを把握し、それらを重点的に管理することで工程全体から最終製品に至るまでの品質を保証する動きが強まっている。ビール業界においては、従来から最終製品の検査のみならず製造工程（半製品）においても微生物検査が行なわれており、まさにHACCPの精神を実施してきたと言える。

このような製造工程中の危害分析に威力を発揮するのが遺伝子多形性を利用した菌のタイピングであろう。これは製造工程中から検出された微生物をタイピングしておくことにより、製品に混入するおそれのある微生物の汚染源を把握することができ、より進んだ危害分析と重点管理点の把握が可能になるからである（図３）。タイピングの方法としては、リボゾームRNAの多型性を利用したリボタイピングが最も有力な手段の一つであろう。ビール有害菌のリボタイピングの報告としては*Pectinatus*属と[24]、*Lactobacillus*属菌で行なわれている[25]（図４）。これらの報告ではリボタイピングから種の決定と株の分別が可能であることが示されており、まさに製造工程中の危害分析に応用可能なことが証明されている。

図３．分子生物学的手法を用いた疫学的調査の概念図（参考文献27より転載）

製品から検出された菌のリボタイプが洗壜機から検出された菌と一致することから、汚染源は洗壜機であることが予想される。

図４　各種*Lactobacillus*属のリボタイプ（参考文献25より転載）

A, *L. brevis*のリボタイプ；B, *L. casei*のリボタイプ；C, *L. coryniformis*のリボタイプ；D, *L. lindneri*のリボタイプ：E, *L. plantarum*のリボタイプ

Motoyamaらは、菌種に保存されているリボタイプが種（species）の分類に利用でき、さらにそのバリエーションによって菌株（strain）の分類にも利用できることから、リボタイピングが醸造所の疫学的調査にも利用できると結論づけている。

おわりに

これまでビール業界における微生物管理について言及してきたが、言うまでもなく微生物管理の最も

重要なキーは人である。HACCPやISOでいくら立派なシステムを構築しても、雪印の例を見ても分かるように事故は発生する。故に完全な微生物管理を行なうには、微生物管理に従事する従業員の教育と微生物に対する意識を常に保つことが要求される。これらのことを踏まえ当工場では、現場スタッフを含めた微生物管理チームを発足し、微生物管理対策会議（仮題）を開催することで従業員の教育と意識の向上を図っている。また、月に１回のクリーンデーでは、あらゆる製造を止めて工場全体の無菌化に努めている。

新聞等でも報道されているように当社はアサヒビールとの提携に伴いオリオンドラフトビールの本土向け出荷を強化している。また、今年からはビールシェア・トップブランドであるスーパードライを含むアサヒビールの２つの製品をライセンス生産している。これらのことは言うまでもなく当社にとって大きな好機となっているが、これからはより一層厳重な微生物管理が求められることになる。そこで当工場でもこれまでに行なってきた既存の微生物管理に加え、これまで紹介した分子生物学的手法を用いて微生物管理を行なっている。特にリボタイピングを用いた疫学的調査法によって、より進んだ危害分析と重点管理点の把握が可能になると期待している。

冒頭でも述べたが、わが国で消費されるビールの大部分は生ビールである。これは言うまでもなく、生ビールが加熱ビールより美味しいとお客様に評価されてきた結果である。故に、これからも当工場の全ての醸造者は常に厳しい微生物管理と品質管理を徹底し、お客様に美味しい生ビールをお届けするために従事する所存である。

参考文献

1）Y. Tsuchiya et al. :J. Am. Soc. Brew. Chem. 50, 64-67 (1992)

2）Y. Tsuchiya et al.:J. Am. Soc. Brew. Chem. 51, 40-41 (1993)

3）L. J. DiMichele and M. J. Lewis:J. Am. Soc. Brew. Chem. 51. 63-66 (1993)

4）H. Taguchi et al.:Proc. 25th. Congr. Eur. Brew. Conv. , Brussels, p621-628, IRL press, Oxford (1995)

5）K. Sakamoto et al. :Proc. 26th. Congr. Eur. Brew. Conv. , Brussels, p631-638, IRL press, Oxford (1997)

6）T. Yasui et al. :Can. J. Microbiol. 43, 157-163 (1997)

7）R. Satokari et al. :J. Food Protection 60, 1571-1573 (1997)

8）Y. Motoyama and T. Ogata. :J. Am. Soc. Brew. Chem. 58 (1) , 4-7 (2000)

9）R. Juvonen and R. Satokari. :J. Am. Soc. Brew. Chem. 57 (3) , 99-103 (1999)

10）M. Sami et al. :J. Am. Soc. Brew. Chem. 55 (4) , 137－140 (1997)

11）S-L. Ryu et al. : J. Fermen. Bioeng. 86 (3) , 249-252 (1998)

12）F. Ness et al. :J. Sci. Food. Agric. 62, 89-94 (1993)

13）T. Tompkins et al. : J. Am. Soc. Brew. Chem. 54 (2) , 91-96 (1996)

14）L. laidlaw et al. : J. Am. Soc. Brew. Chem. 54 (2) , 97-102 (1996)

15）H. Yamagishi et al. :J. Appl. Microbiol. 86, 505-513 (1999)

16）H. Yamauchi et al. : J. Am. Soc. Brew. Chem. 56 (2) , 58-63 (1998)

17）T. Yasui and K. Yoda:J. Ferment. Bioeng. 84, 35-40 (1997)

18）S. L. Gares et al. :J. Am. Soc. Brew. Chem. 51. 158-163 (1989)

19）A. Foster and L. B. Andersen. : J. Am. Soc. Brew. Chem. 57 (3) . 91-93 (1999)

20）M. B. Beverly et al,:J. Am. Soc. Brew. Chem. 55 (2) . 79-82 (1997)

21）T. Yasuhara et al. : J. Am. Soc. Brew. Chem. 59 (3) . 117-121 (2001)

22）G. P. Casey et al. :J. inst. Brew. 94, 239-243 (1988)

23）Y. Takata et al. :J. Am. Soc. Brew. Chem. 47. 109-113 (1989)

24）Y. motoyama et al. :J. Am. Soc. Brew. Chem. 56, 19-23 (1998)

25）Y. motoyama et al. :J. Am. Soc. Brew. Chem. 58, 1-3 (2000)

26）P. Valente et al. :FEMS. Microbiol. Lett. 137, 253-256 (1996)

27）尾形智夫：醸協、94、786-791 (1999)

28）尾形智夫：醸協、95、803-810 (1999)

29）ビール酒造組合、国際技術委員会（分析委員会）編集、「BCOJ微生物分析法」、財団法人日本醸造協会

30）ビール酒造組合、国際技術委員会（BCOJ）編集、「ビールの基本技術」、財団法人日本醸造協会