

## PCR-DGGE による酒粕の細菌叢解析

細井知弘

## Bacterial Composition of Sake Lees Analyzed by PCR-DGGE

Tomohiro Hosoi

The microbial flora of the fermentation broth used in the processing of Japanese sake (rice wine) affects the quality of the final sake product. In this study, the bacterial compositions of five commercially available sake lees were analyzed using the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) technique. Live bacteria in the samples were pre-cultured in Trypticase Soy broth and MRS broth, followed by DNA extraction, PCR-DGGE for the variable V3 region of 16S rDNA, and DNA sequencing. The results showed that the bacterial compositions differed depending on the kinds of sake lees used for culturing and that the samples contained microorganisms belonging to the genus *Bacillus* and *Lactobacillus*. These differences in the microflora of sake lees may have varying effects on the quality of the final sake products.

(Accepted Feb. 3, 2006)

日本酒は、原料となる米に、麹カビ *Aspergillus oryzae* を繁殖させた米麹と、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を含む酒母を添加・作用させ、糖化とアルコール発酵を並行して進めることにより得られる<sup>1-3)</sup>。そのもろみには、麹、米、水、酒母、使用器具、仕込みタンク、及びタンク外の工場環境等から、麹カビや酵母以外の様々な微生物が混入する可能性が存在する。それらの汚染微生物は、製品の品質に影響を及ぼすのみならず、ときに発酵停止を招いて飲用不可の酒にさせることもある。したがって、麹、酒母、及びもろみの微生物管理は、日本酒製造において極めて重要である。

本研究では、発酵最終段階のもろみの微生物菌叢を反映していると思われる酒粕に着目し、5種類の市販酒粕の細菌叢をPCR-DGGEとDNA塩基配列解析により解析した<sup>4)</sup>。その結果、酒粕の種類により細菌叢が異なること、また糖やタンパク質の分解能が高く酸やアルコールに耐性の高い胞子を形成する *Bacillus* 属や、腐造や火落ちの原因となり得る *Lactobacillus* 属細菌が存在することを明らかにした。

## 実験方法

市販の酒粕5種を購入し、約10倍量のTrypticase Soy Broth (TSB) 及びMRS培地を用いて35°C、48時間好氣的に増菌培養後に、各菌懸濁液1mLからDNA抽出キット (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) を用いて指定の方法でDNAを抽出した。大腸菌 *Escherichia coli* において16S rDNA position 341-534に相当する領域 (菌種により配列に特異性を有するDNA領域) を、一方にGCクランプを結合させたプライマー対 (5'-CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCAGCGGGGCGCTACGGGAGGCAGCAG-3' 及び 5'-ATTACGCGGCTGCTGG-3')<sup>5)</sup> を用いてPCR (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) により増幅した。PCR反応は、反応試薬HosStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) を用いて指定の方法により行った (テンプレート 10 µL, プライマー溶液 (10 pmol/µL) 各 1 µL, 反応溶液総量 50 µL)。PCRのサイクリング条件は、熱変性を94°C、45秒間、アニーリングを52°C、60秒間、伸長反応を72°C、180秒間、40サイクルとし

た. 各増幅産物を精製 (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) 後, 各酒粕ごとに 2 種の増菌培地由来の PCR 増幅産物を混合した試料 10 $\mu$ L を用いて, Dcode システム (Bio-Rad) により DGGE (150V, 4h) を行った. 泳動ゲルの条件は, Acrylamide/bis 8%, 変性剤 Formamide/Urea 濃度 20–50%とした. 泳動後にバンドの切り出しと DNA 抽出 (QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen) を行い, 再び前述のプライマー対を用いて PCR を行った. さらに, 前述と同様に増幅産物の精製後, シーケンシング反応を同プライマー対の一方とともに BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて行い, Centri-sep スピニングカラム (Applied Biosystems) により精製後, DNA シークエンサー (ABI 310, Applied Biosystems) を用いて各 DNA 断片の塩基配列を解析した. 解析結果を遺伝子データベース DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の BLAST で照合し, 相同性を利用して菌種推定を行った (図 1).

1. 複数の液体培地を用いた試料中の微生物の増菌
2. 増菌培養後の菌懸濁液からの微生物由来 DNA 抽出
3. GCクランプ付きプライマーを用いた 16S rDNA 領域の DNA 増幅 (PCR) 及び精製
4. 電気泳動 (DGGE)
5. 泳動後のゲル切り出しによる単独菌種由来 DNA 抽出
6. シーケンス反応 (PCR) と精製
7. DNA 塩基配列の解析
8. DNA 配列データベースとの照合による菌種推定

図 1 本研究における PCR-DGGE を利用した細菌叢解析の手順

#### 実験結果及び考察

PCR-DGGE と DNA 塩基配列解析の結果, 酒粕の種類により細菌叢が異なることが明らかとなった (図 2). すべての酒粕から, タンパク質, ペプチド, 糖などの分解酵素を産生し, 酸やアルコールの耐性が高い胞子を形成する *Bacillus* 属細菌が検出された. また酒粕 1 種 (No.4) からは, もろみを腐造に導くとされる耐酸性の *Lactobacillus plantarum* が検出され, また酒粕 3 種 (No.1, 2, and 4) からはアルコール耐性が強く火落ちを招くこともある *L. casei* が検出された<sup>1)</sup>.

*Bacillus* 属細菌が麴に増殖すると, 麴が納豆のように糸を引いて「粘り麴」と呼ばれる麴になることがあり, またその香りが悪くなることも知られている<sup>6)</sup>.

また *Bacillus* 属細菌は, 麴カビの生育を阻害することからも, 製品の品質に損失を与えると予想される<sup>6)</sup>.

*Lactobacillus* 属細菌については, 野生酵母の発育を抑制し, またアルコール耐性が弱く最終的にもろみ中で死滅するという点から日本酒製造に有益とされる菌種 *L. sakei* が知られているが, 他方, 腐造や火落ちに関わるとされる *L. plantarum*, *L. homohiochii*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii* の存在も知られている<sup>1–3)</sup>.

PCR-DGGE 法では, 死滅した微生物や培養困難な微生物の検出も理論的には可能であり, 本解析法は, 日本酒を含めたさまざまな発酵食品の微生物菌叢の把握, ひいては微生物制御に大きな役割を果たすものと思われる.

本研究では, 一般細菌と乳酸菌培養用の 2 種の液体培地を用いて, 試料中の生菌を増菌し, DNA を抽出して解析を行った. これは, 増菌培養を経ないと, 非常に少数の微生物を PCR-DGGE により検出することが困難なためである. しかしながら, 増菌培養を経ると, すでに死滅した試料中の微生物の検出は困難であり, また培養条件が影響して生じる増菌時のバイアスにより, 検出する微生物種が試料中の微生物種を反映しないという可能性も生じる. そのため, 非常に少数の死滅微生物を含めた解析を行う際には, 増菌培養をせずに微量 DNA 試料の全ゲノム増幅を行うことや, さらなる DNA 抽出と PCR 等の条件検討が必要と思われる. また日本酒の原材料である水, 蒸し米, 麴, 酒母, もろみや, 最終製品, また麴室, 発酵タンク, ろ過機, 貯蔵タンクなどの菌叢を PCR-DGGE により解析し, それらの製品の品質に対する影響を検討することも, 製品の品質改善を図る上で非常に有意義と考えられる.

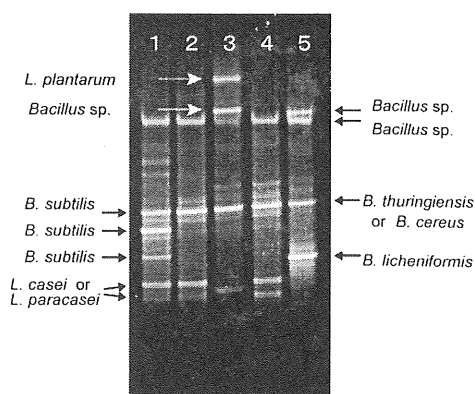


図 2 市販酒粕 5 種の PCR-DGGE 解析結果

## 要 約

日本酒の製造工程において、もろみ中の微生物菌叢が最終製品の品質に影響を及ぼすことが知られている。そこで、5種類の市販酒粕の細菌叢を、PCR-DGGEとDNA塩基配列解析により解析した。各酒粕中の生菌を検討する目的で、各試料をTrypticase Soy Broth培地とMRS培地を用いて増菌後、16S rDNAのV3可変領域を対象としたPCR-DGGEを行い、生じたバンドについてDNA塩基配列解析と遺伝子データベースとの照合を行い、酒粕中に存在する菌種の推定を行った。その結果、酒粕の種類により細菌叢が異なることが判明し、糖やタンパク質の分解能が高く酸やアルコールに耐性の高い胞子を形成する*Bacillus*属や、腐造や火落ちの原因となり得る*Lactobacillus*属細菌の存在が確認された。このような酒粕ひいてはもろみの細菌叢の差異が最終製品の品質に異なる影響を及ぼしているものと考えられる。

## 文 献

- 1) 石川雄章, 清酒, 「発酵ハンドブック」, (共立出版, 東京), pp. 531-536 (2001).
- 2) 秋山裕一, 清酒, 「醸造学」, (養賢堂, 東京), pp. 10-65 (1987).
- 3) 岡田早苗, 乳酸菌による食品の変敗, 「乳酸菌の科学と技術」, (学会出版センター, 東京), pp. 280-286 (1996).
- 4) 北垣浩志, 山崎真狩, 北本勝彦, 清酒・焼酎醸造における難培養・複合系微生物, 醸協, **99**, 767-772 (2004).
- 5) Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G., Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695-700 (1993).
- 6) 芦沢長, 日本酒醸造の神秘.  
(<http://www8.plala.or.jp/ashiza/nihonshu/nihonshu.html>).

(平成18年2月3日受理)