ビール醸造関係微生物の新しい系統学的知見とこれを利用した有害微生物検出法

ビール有害菌の検出方法の進歩については、前年度著者に解説していただいたが、今回はビール醸造関係微生物である下面ビール酵母および新たに見つかった偏性嫌気性菌の新しい系統学的知見とこれを利用した有害微生物の検出法の開発について解説していただいた。

尾 形 智 夫

はじめに

ビールの微生物管理は、パスツールにより、「ビールおよびビール用の麦汁が変敗しないことは異種の生命体が存在しないことと一致する」と記載されている¹⁾ことより、古くより重要な管理項目と認識されていた。ビールを混濁・変敗させる有害菌として、古くから乳酸菌などの嫌気性菌と野生酵母が挙げられていたが、近年は、製品品質の維持のために、溶存する酸素濃度を低下させた製品を提供することとなり、ビール有害菌として、偏性嫌気性菌で、新属新種であるペクチネイタス (*Pectinatus*) 菌の出現が見られてきている²⁾。

著者らは、ビール醸造における一層の微生物管理の高度化のために、従来より、ビール有害野生酵母やビール有害偏性嫌気性菌の検出方法の開発の検討をおこなってきたが、この検討過程で、下面ビール酵母やペクチネイタス属細菌の系統学的位置が極めてユニークであることを見出すことができた。これは、近年、発展の著しい分子生物学的手法を用いたことによって判明したものである。

本稿では、これらの系統学的知見をご紹介しますとともに、これらの知見を利用したビール有害微生物検出法についてご紹介する。なお、本稿では分類学 (Taxonomy) と系統学 (Phylogeny) を区別して記載している。これは、著者らが International Journal of Sys-

tematic and Evolutionary Microbiology に投稿した際に、審査員より助言をいただいたことに準拠したものである。すなわち、分類は染色体構造、DNA 塩基配列、形態等を総合的に判断し、種と区別すべきか判断するもので、系統学的考察とは、各種の進化的な系統を考察することであり、これには、染色体構造や DNA 塩基配列の知見が強力な手段となるとのことである。

下面ビール酵母の新しい系統学的知見とこれを利用したビール有害野生酵母検出法の開発

19 世紀後半に、リンデによる冷凍設備の発展と同時期に、パスツールによる微生物の純粋培養が発展し、これらの技術の寄与により、発展してきたビール醸造法が下面発酵法である。この方法が現在に至るまで、全世界のビール醸造法の主流になってきている。このビール醸造法の発展に重要な寄与をしたものの一つに下面ビール酵母の純粋培養が挙げられる。これは、デンマークのカールスバーグ醸造場のハンゼンによっておこなわれたことより³⁾、これをちなみ、この酵母は *Saccharomyces carlsbergensis* (サッカロマイセス・カールスベルゲンシス) と命名された。酵母の命名は、その後、著しく変化し、The Yeast, taxonomic study third editions において、その DNA 相同性や接合性を考慮し、*Saccharomyces cerevisiae* (サッカロマイセス・

Phylogeny of Microorganisms Related to Beer Brewing and Detection Methods of Beer Spoilage Bacteria Using These Observations.

Tomoo OGATA (Tokyo plant, Asahi Breweries, LTD)

セレビスエ), *S. bayanus* (サッカロマイセス・バヤナス) らと, ビール酵母, 清酒酵母, パン酵母等, 実用上なじみ深い酵母のほとんどは, 実験室酵母と同様に全て *S. cerevisiae* とされた⁴⁾。

しかし, この分離は The Yeast, taxonomic study third editions 出版当初より, 疑問が提出され, 特に DNA 相同性に基づいた実験より, Martinii らは, *S. cerevisiae* と *S. bayanus* は別種であり, 下面ビール酵母はこれら二つの種の交雑種で, *S. pastorianus* (サッカロマイセス・パストリアヌス) と分類することが適当であると報告した^{5,6)}。また, 染色体を電気泳動により, 確認することができる手法 (パルスフィールドゲル電気泳動法) を用いて, 酵母の染色体構造を明らかにする試みがなされ, Takata らは, 下面ビール酵母は, 実験室酵母に比べるとその染色体数がきわめて多いことを報告した⁷⁾。Fujii らは, さらに, この手法にサザンハイブリダイゼーションを組み合わせることによって, 下面ビール酵母には *S. cerevisiae* の染色体以外にも *S. bayanus* の染色体が存在していることを報告した^{8,9)}。一方, 下面ビール酵母の遺伝子配列を検討することによって, 1つの遺伝子に2種の配列が存在し, 一方は *S. cerevisiae* 由来であるのに対し, もう一方は, *S. bayanus* であると予想している⁸⁾。これらの報告に対し, Hanzen らも下面ビール酵母の遺伝子には2種の配列が存在し, 一方は *S. cerevisiae* 由来であるのに対し, もう一方は, *S. monacensis* 由来であるとの報告であった¹⁰⁾。また, Ryu らは, パルスフィールドゲル電気泳動法とサザンハイブリダイゼーションを用いて, *S. bayanus* の染色体構造の検討をおこない, その大部分が *S. cerevisiae* と同じであったが, 一部の染色体がその構造が異なっていることを見いだした¹¹⁾ (第1図)。なお, *S. bayanus* の染色体については, 染色体番号が規定されていないので, Ryu らは, 分子量順に番号を定めている。著者らは, これに従っている¹²⁾。本稿においても同様である。

著者らは, これらの報告を基にし, 使用しているビール酵母の純粋性や野生酵母の検出法の開発のため, 下面ビール酵母の染色体構造の検討をおこなった。その結果, *S. cerevisiae* と構造の異なる *S. bayanus* の染色体 (8, 9, 12, 14 番染色体) は下面ビール酵母は全て有していることがわかった¹²⁾ (第2図)。さらに, *S. pastorianus*, *S. carlsbergensis*, *S. monacensis* の type

第1図 酵母 *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の染色体構造 (文献 11, 12 からの転載)。

S. bayanus の 14, 12, 9, 8 番染色体は, *S. cerevisiae* の II, IV, VIII, XV 染色体が組み換わった構造をとっている。

strain も同時に用いたところ, *S. carlsbergensis*, *S. monacensis* の染色体構造は, 下面ビール酵母各株と同様であって, *S. cerevisiae* と *S. bayanus* の双方の染色体を有している交雑体であることがわかった (第3図)。さらに, *S. pastorianus* の染色体構造を検討したところ, *S. bayanus* のものと同様であることがわかった。Kaneko らは, 染色体 DNA の相同性を検討したところ, *S. pastorianus* の type strain は, *S. bayanus* の type strain と極めて相同性が高いことを報告している¹³⁾。また, Kurtzmann らは, 18 S RNA の配列を検討したところ, *S. pastorianus* の type strain は, *S. bayanus* の type strain の配列と一致していることを報告している¹⁴⁾。これらの報告を参考に, 著者らの染色体構造の解析より, 下面ビール酵母を含む酵母の分類を著者らは, 第4図のように提案している。すなわち, The Yeast, taxonomic study third editions に記載されているように, 下面ビール酵母は, *S. pastorianus* に分類されるというよりも, Hanzen の提案の通り, *S. carlsbergensis* に分類され, *S. pastorianus* は, *S. bayanus* に, *S. monacensis* は *S. carlsbergensis* に分類することが適当であると考察している。

さらに, 著者らは, 前述した下面ビール酵母を中心とした新しい系統的知見を利用して, ビール有害菌の検出方法を開発した¹⁵⁾。リボソーム DNA (rDNA)

第2図 *S. cerevisiae* II, IV 染色体と *S. bayanus* 14 番染色体の下面ビール酵母中での存在の確認 (文献 12 からの転載)。

A は, *S. cerevisiae* II, IV 染色体と *S. bayanus* 14 番染色体とサザンハイブリダイゼーションで用いたプローブを示している。B-E の各レーンの菌株は, 1. *S. cerevisiae* X-2180-1 A (実験室酵母), 2. 上面発酵ビール酵母 TF 1 株, 3. 下面発酵ビール酵母 BF 1 株, 4. 下面発酵ビール酵母 BF 2 株, 5. *S. carlsbergensis*^T CBS 1513, 6. *S. pastorianus* IFO 2003 (下面ビール酵母), 7. *S. bayanus*^T CBS 380, 8. *S. monacensis*^T CBS 1503 である。プローブは, B は, *S. cerevisiae* の *PKC 1* 遺伝子, C は, *S. cerevisiae* の *HIR 1* 遺伝子, D は, *S. cerevisiae* の *PDC 2* 遺伝子, E は, *S. cerevisiae* の *RAD 9* 遺伝子を用いた。下面ビール酵母各株と *S. monacensis* の type strain は, *S. cerevisiae* II, IV 染色体と *S. bayanus* 14 番染色体の双方を有していた (B-E, レーン 3 から 5, 8)。他の *S. bayanus* の染色体で *S. cerevisiae* と構造の異なる 12, 9, 8 番染色体についても結果は同様であった¹²⁾。

第3図 *S. cerevisiae* II, IV 染色体と *S. bayanus* 12 染色体の下面ビール酵母中での存在の確認(文献 12 からの転載)。

A から F の各レーンの菌株は、1. *S. cerevisiae* X-2180-1 A (実験室酵母)、2. *S. carlsbergensis*^T CBS 1513、3. *S. pastorianus*^T CBS 1538、4. *S. bayanus*^T CBS 380 である。プローブは、*S. cerevisiae* の遺伝子を用い、A は、*PKC 1* 遺伝子、B は、*PDC 2* 遺伝子、C は、*CDC 28* 遺伝子、D は、*STE 7* 遺伝子、E は、*GCD 1* 遺伝子、F は、*IRA 2* 遺伝子、G は、*ARG 4* 遺伝子である。*S. carlsbergensis* の type strain は、*S. cerevisiae* と *S. bayanus* の双方の染色体を有していた (A-G レーン 2。*S. bayanus* の 14, 12, 9, 8 番染色体は、*S. cerevisiae* の染色体とは構造が異なっていること、見出すことができる (第 1 図、(文献 11))。 *S. pastorianus* の type stain は、*S. bayanus* の染色体のみを有していた (A-G レーン 3)。

<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. carlsbergensis</i> * ¹		<i>S. bayanus</i>	
<i>S. cerevisiae</i> ^T	CBS1171	<i>S. carlsbergensis</i> ^T	CBS1513	<i>S. bayanus</i> ^T	CBS380
Laboratory yeast	X-2180-1A	<i>S. monacensis</i> ^T	CBS1503	<i>S. pastorianus</i> ^T	CBS1538* ²
Top fermenting yeast		Bottom fermenting yeasts			
Sake yeasts		<i>S. pastorianus</i>	IFO2003		
Baker's yeasts		BF1			
Wine yeasts		BF2			
etc.					

第4図 染色体構造から推定される酵母の分類 (文献12からの転載)。

S. carlsbergensis は、*S. cerevisiae* と *S. bayanus* の双方の染色体を有していることより、これらの交雑種であることが確認されたが、*S. pastorianus* の type strain は、*S. bayanus* の染色体のみを有していることから、*S. bayanus* と分類することが適当であると、染色体構造からは推察された。

第5図 rDNA の構造から開発した野生酵母の検出法 (文献15からの転載)。

rDNA のスパーサー領域の制限酵素多型性の観察。各レーンの菌株は、1は、分子量マーカー ϕ x 174 Hinc II, 2は、上面発酵ビール酵母 TF 1株, 3は、下面ビール酵母 BF 1株, 4は、下面ビール酵母 BF 2株, 5は、*S. pastorianus* CBS 1538, 6は、*S. bayanus* IFO 0539, 7は、*S. bayanus* IFO 0676, 8は、*S. bayanus* IFO 1127, 9は、*S. logos* IFO 1226, 10は、*S. logos* IFO 1225, 11は、*S. logos* ATCC 60731, 12は、*S. willianus* IFO 0248, 13は、*S. willianus* ATCC 60731, 14は、*S. willianus* NCYC 106である。

のスパーサー領域 (5 S rDNA と 26 S rDNA の間の領域) を PCR で増幅した後、制限酵素で切断することで、下面ビール酵母と野生酵母が区別できることが判明した。これは、rDNA を有する染色体である *S. cerevisiae* では XII 染色体、*S. bayanus* では 15 番染色体であるが、下面ビール酵母はいずれか1種の染色体のみを有しているとの知見を利用したものである。これ

を用いることで、かなりのビール有害野生酵母を検出できることを見出した (第5図)。

偏性嫌気性菌の新しい系統学的知見と これを利用したビール有害偏性嫌気性 菌検出法の開発

ペクチネイタス属細菌は、ビールを混濁・変敗させる新種新属の有害菌として1978年にアメリカの Coors 社の Lee らによって初めて分離が報告された²⁾。同菌の形態は、偏性嫌気性で運動性のあるグラム陰性桿菌であった。その後類似した形態の細菌が、ビール工場より分離され¹⁶⁾、これらを分類学的に検討した結果、ビール有害菌である *Pectinatus cerevisiphilus* (ペクチネイタス・セレビシフィラス)、*Pectinatus frisingensis* (ペクチネイタス・フリシゲンシス) とビール中ではほとんど生育が見られない *Selenomonas lacticifex*, *Zymophilus paucivorans*, *Z. raffinivorans* とに分けられることがわかった¹⁷⁾。この際、16 S rRNA の配列の比較より、*Pectinatus* は、*Selenomonas* よりも *Zymophilus* に近縁であることが報告されている。

これらの偏性嫌気性菌は、品質維持のため溶存酸素を低下させた製造をおこなっている近年の我が国のビール製造においては、重大なビール有害菌であるので、著者らはこの菌の特異的な検出方法確立を目指していた。ビール有害菌である *Pectinatus cerevisiphillus*, *P. frisingensis* を含む偏性嫌気性菌について 16 S rDNA と 23 S rDNA のスパーサー領域を PCR で増幅したところ、二つの増幅産物が得られた (第6図)。このス

ペーサー領域は、tRNA 遺伝子を有する領域 “long” と、有しない領域 “short” の塩基長で二つに分けられることが他種の細菌についても報告されている¹⁸⁾。著者らはこれらスペーサー領域の PCR 産物の DNA 塩

基配列を決定した。その結果、*Pectinatus* と *Selenomonas* の tRNA 遺伝子を有する “long” のスペーサー配列では、tRNA 遺伝子は 16 S rDNA 方向より Ala, Ile の順であった。これは、通常の細菌では見られない極めて稀な配列順であった (第 1 表)¹⁹⁾。また, “long” のスペーサー配列から得られた系統樹は第 7 図に示したとおりであり、16 S rDNA の配列から得られた系統樹とは異なっており、*Pectinatus* は、*Zymophilus* よりも *Selenomonas* に近縁であった。著者らは、*Pectinatus*, *Selenomonas*, *Zymophilus* の様な極めて近縁である種間の系統比較は、保存性の高い 16 S RNA の塩基配列でおこなうよりも、スペーサー配列の塩基配列でおこなう方が実際の系統学的位置をよく表現しているものと考えている。

さらに、著者らは、これらの知見を生かし、PCR 法を用いた *Pectinatus* の特異的な検出法を開発することを試みた。*Pectinatus* の検出法は、Satokali らによる報告があるが²¹⁾、これは系統学的研究により既に判明していた 16 S rRNA の配列をもとにしたものであり、菌種特異的であるものとは必ずしもいえなかった。そこで、著者らはスペーサー領域から *Pectinatus cerevisiphilus*, *P. firisingensis* のスペーサー領域から菌種特異的な配列を見出し、これを PCR プライマーとした。さらにもう一方の PCR プライマーは、既に報告されている 16 S rDNA の菌種特異的な配列を利用した²⁰⁾。その結果、菌種特異的な検出法が開発された²²⁾ (第 8 図)。著者ら、分子多型性を利用した疫学的調査がビール有害菌でも可能であるかを検討している^{23,24)}。

第 6 図 偏性嫌気性菌の 16 S-23 S rDNA スペーサー領域の PCR 増幅産物のアガロース電気泳動写真 (文献 19 からの転載)。
1. *Pectinatus cerevisiphilus*^T DSM 20476, 2. *S. frisingensis*^T DSM 6306, 3. *S. lactificex*^T DSM 6306, 4. *Z. paucivorans*^T DSM 20756, 5. *Z. raffinivorans*^T DSM 20765。全ての菌種において、分子量が異なる 2 種の増幅産物が得られた。レーン 2 の低分子量の増幅産物は、人工的なもの (artifact products) であると推察している。

第 1 表 ビール醸造場より分離された偏性嫌気性菌の 16 S-23 S rDNA スペーサー領域のまとめ (文献 19 からの転載)。*Pectinatus* と *Selenomonas* は、他の細菌に見られない特異な tRNA 遺伝子の配列順であった。

Species	Designation	Length of spacer (bp)	tRNA (position)
<i>P. cerevisiphilus</i>	Long	724	Ala (245-320), Ile (330-406)
	Short	399	
<i>P. frisingensis</i>	Long	624	Ala (143-218), Ile (229-305)
	Short	442	
<i>S. lactificex</i>	Long	579	Ala (245-321), Ile (325-402)
	Short	321	
<i>Z. paucivorans</i>	Long	553	Ala (263-338)
	Short	375	
<i>Z. raffinivorans</i>	Long	591	Ile (183-259), Ala (301-376)
	Short	376

第7図 偏性嫌気性菌の16S-23S rDNA スペース領域のから作成された系統樹(文献19からの転載)。

16S rRNA の塩基配列より作成された系統樹¹⁷⁾と, *S. lactificex* の系統学的位置が異なり, *Selenomonas* は, *Zymophilus* よりも *Pectinatus* に近縁であることが示された。

第8図 ペクチネイタス属細菌のPCRを用いた特異的検出法について(文献22からの転載)。

- P. cerevisiophilus* の18S-23S rDNA の推定構造, 16C-F (1024-1043) とIC-R (135-153) は, *P. cerevisiophilus* を特異的に検出するために選択したPCRプライマー。
- P. frisingensis* の18S-23S rDNA の推定構造, 16F-F (657-674) とIF-R (195-213, 377-395) は, *P. frisingensis* を特異的に検出するために選択したPCRプライマー。
- PCR試験の結果, 1. *P. cerevisiophilus* のDNAからのPCR産物, 2. *P. frisingensis* のDNAからのPCR産物。

終わりに

ビール醸造に大きな寄与を残したハンゼンの酵母分類が, 著者らの染色体構造の知見から見ても一致することは, うれしいことである。*Saccharomyces pastorianus* は, ビール醸造上では, 当初, 有害菌として分離されたものである。ビール関係者にとって下面ビール酵母は, *S. carlsbergensis* であることが望ましい。一刻も早い分類上の解決が望まれる。本研究の過程において, 酵母分類の世界的権威であるC.P. Krutzmann 博士に重要な示唆をいただいた。すなわち, 各菌株保存機関において, 保存している菌株が本当に一致しているのかということである。著者らは, CBSとIFOの保存株の染色体構造は一致していることを確認している。

また, ビール有害嫌気性菌のスペース領域のDNA配列を検討したところ, *Pectinatus* と *Selenomonas* のtRNA遺伝子を有する“long”のスペース配列は, 通常の細菌では見られない極めて稀な遺伝子順であったことが見出された。この知見は, 偏性嫌気性菌の分類上の位置を考察する上で重要な示唆になりうるものと考えている。また, 著者らの報告と同時期に, *Pectinatus* と同様なスペース領域のtRNA遺伝子順である細菌が存在することが報告された²⁵⁾。今後は, 我々の知見とこれらの知見を生かし, 新しい偏性嫌気性菌の系統学的位置について確立されることが望まれる。

なお, これらの系統学的知見を利用して, 本来の目的であった野生酵母の検出法やビール有害偏性嫌気性菌の検出法が開発できたことも著者らの喜びである。ビール有害菌の検出法については, 著者は別稿に発表

済みである²⁶⁾。ご参考にしていただければ、幸いです。

本研究は共同研究者であるアサヒビール(株)酒類研究所の山岸裕美, 本山靖朗両氏によるものである。改めてこれまでの努力に感謝したい。

文 献

- 1) L.Pasteur, 斉藤日向監修, 竹田正一郎, 北畠克顕 訳: ビールの研究 大阪出版会 (1995)
- 2) S.Y Lee et al. : Int. J. Syst. Bacteriol. **28**, 582-594 (1978)
- 3) E. C. Hansen : C. R. Trav. Lab. Carlsberg **7**, 179-217 (1908)
- 4) D. Yarrow : Sacchromyces Meyen ex Rees., pp 379-395 In : N. J. W. Kreger-van Rij (ed.) The Yeasts, A taxonomic study, 3rd. Edn Elsevier Science Publishers. Amsterdam 1984.
- 5) A. Vaughan-Martini and A. Martini : Antonie v Leeuwenhoek **53**, 77-84 (1987)
- 6) A. Vaughan-Martini and A. Martini : 44. Sacchromyces Myen ex Reess, pp 358-371 In : C. P. Kurtzman and J.W. Fell (ed.), The Yeasts, A taxonomic Study. Amsterdam, Elsevier 1998.
- 7) Y. Takata et al. : Am. Soc. Brew. Chem. J. **47**, 109-113 (1989)
- 8) T. Fujii et al. : Yeast **12**, 593-598 (1996)
- 9) Y. Tamai et al. : Yeast **14**, 923-933 (1998)
- 10) J. Hansen and M. C. Kielland-Brandt : Gene **140**, 33-40 (1994)
- 11) S-L. Ryu et al. : Yeast **12**, 757-764 (1996)
- 12) H. Yamagishi and T. Ogata : System. Appl. Microbiol., **22**, 341-353 (1999)
- 13) Y. Kaneko and I. Banno : IFO Res. Comm. **15**, 30-41 (1991)
- 14) C. P. Kurtzman and C. J. Robnett : Yeast **7**, 61-72 (1991)
- 15) H. Yamagishi et al. : J. Applied Microbiol., **88**, 505-513 (1999)
- 16) A. Haikara : Congr. Eur. Brew. Conv., Vol. 71, p 537-544 IRL press, Oxford (1989)
- 17) K. H. Schleifer et al. : Int. J. Syst. Bacteriol. **40**, 19-27 (1990)
- 18) C. R. Woese : Microbiol. Rev. **51**, 221-271 (1987)
- 19) Y. Motoyama and T. Ogata : Inter. J. System. Evolutionary Microbiol., **50**, 883-886 (2000)
- 20) K. Sakamoto : Congr. Eur. Brew. Conv. Vol. 75, p 631-638 IRL press, Oxford. (1997)
- 21) R. Satokali et al. : J. Food Prot. **60**, 1571-1573 (1997)
- 22) Y. Motoyama and T. Ogata : J. Am. Soc. Brew. Chem., **58**, 4-7 (2000)
- 23) Y. Motoyama et al. : J. Am. Soc. Brew. Chem., **56**, 19-23 (1998)
- 24) Y. Motoyama et al. : J. Am. Soc. Brew. Chem., **58**, 1-3 (2000)
- 25) R. Soller et al. : Inter. J. System. Evolutionary Microbiol., **50**, 909-915 (2000)
- 26) 尾形智夫 : 醸協, **94**, 786-791 (1999)