



SAPPORO

サッポロビール株式会社

ビール製造工程の微生物管理向上への一貫した取り組み

はじめに

近代細菌学の祖であるパスツールが考案した低温殺菌法（パストリゼーション）は、ワイン、ビール、牛乳などの分野で広く活用されてきた。世界的に見れば、大規模生産されるびん、缶のビールはパストリゼーションを施されて出荷されることが一般的である。一方、日本においては、パッケージング工程の前に除菌ろ過のみを行ない、「非熱処理」（パストリゼーションを行なわない）をうたう「生ビール」がビール市場の大勢を占めている。その「生ビール」の歴史は、ビール中で増殖し得る細菌との長い戦いの歴史でもある。

ビールは香味品質の観点からも可能な限り酸素を排除して充填されるため、容器内は嫌気的な環境にある。また、ビール原料のホップに由来する苦味成分イソ α 酸が強い抗菌活性を有するため、ビール中で増殖し得る細菌の種類はもともと少ない。それでも、*Lactobacillus brevis* など、そういった環境下で生育可能な微生物も存在しており、それは製品中に数cellでも残存していると、ビール中で増殖し目視できる混濁となり、（人体には危害をおよぼすことはないものの）ビールの外観品質および香味品質を大きく損なうこととなる。

こういった懸念に対しては、微生物の混入・増殖を防止するビール製造工程での対策とともに、製品中に、微生物、とりわけビール中で増殖し混濁の生成につながり得る微生物（以下、ビールで増殖が可能な微生物を「ビール増殖菌」、その特性を「ビール増殖性」と定義する）がいないことを保証するための工程管理技術が必須である。また、新鮮な製品の出荷や在庫圧縮のために、確実かつ迅速に製品の安全性を保証し、出荷することが求められる。そのために、ビール増殖菌の迅速な検出・同定法が求められてきた。サッポロビール株式会社（以下、サッポロ社）はこれまで、その時々最新の技術であるPCR法、RMDS法、LAMP法などを取り入れて、ビール増殖菌の迅速・特異的検出や、ビール増殖性の迅速判定などの技術を開発し、それらの独自技術を現場で運用可能な管理手法にまで落とし込み、工場への実装を行なってきた。また、醸造環境から新規のビール増殖菌を発見・同定し、微生物品質管理の対象の拡充も進めてきた。

長年広範囲に進めてきたサッポロ社の微生物管理技術に関する取り組みを紹介したい。

1. PCR (Polymerase Chain Reaction) 法の微生物検出への応用技術開発

ビール工場における微生物検査は、分析対象のビールをメンブランろ過し、捕捉される微生物を培養し、その後の同定等の検査に供する培養法が基本である。しかし、ビール増殖菌の多くは増殖が遅く、検出までに時間がかかることが長年の課題であった。また、仮に、菌が検出された場合にも、ビール増殖性を迅速に判定できる技術がなく、菌をビールに接種して増殖性

を判定するためにさらに時間がかかっていた。仮に、何らかの菌が検出された場合、その間、疑わしい製品は出荷することができず、市場で需要が発生した際に迅速に対応できないという点は、産業上の大きな課題であった。

培養法で検出された微生物がビール増殖性を有するかどうかといった課題を解決し得る手法として、サッポロ社は1980年代に開発されたPCR法の応用研究にいち早く着手し、検出された細菌のわずかな遺伝子から、ビール増殖性や菌種を同定する技術を確認した¹⁾。そのPCR技術については、微生物検査のほか、ビール原料である大麦やホップの品種判定への応用の可能性も検討した。PCR法では5S rRNA や16S rRNA 遺伝子を検出対象とした菌種特異的な検出を始め、*gyrB* 遺伝子を対象にしたビール増殖性乳酸菌の特異的検出や、リアルタイムPCRの融解曲線解析、さらにT-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析を応用することによる、複合菌叢からのビール増殖菌の網羅的検出など、最新の知見、技術と組み合わせることで活用範囲を広める試みも継続的に実施してきた²⁾。

2. LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法の応用技術開発

LAMP法は鎖置換反応を活用した標的遺伝子の増幅技術であり、PCR法で使われるサーマルサイクラーを必要としない定温（60～65℃）の反応で、高速で特異性の高い増幅を可能とした。LAMP法のもう一つの特長として、遺伝子増幅の副産物として生成されるピロリン酸マグネシウムが析出することにより、標的遺伝子の増幅を反応液の白濁で目視確認できるという点がある。本技術にもいち早く着目し³⁾、工場で活用可能なビール増殖菌の検出キットを開発、PCR法よりもより簡便かつ迅速な同定技術として2004年以降全工場で運用している。本技術もPCR同様、ビール中の微生物検査以外の用途開発も行っており、カビに汚染された大麦の判定や、清涼飲料水中の耐熱性好酸性菌の検出などの技術も開発した。

3. ビール工場向けのRMDS (Rapid Microbe Detection System) 法の開発と安定的な運用

前述のPCR法とLAMP法は微生物の同定技術として、培養後の生菌のビール増殖性の判定に貢献した。一方で、ビール増殖菌を迅速に検出するために、サッポロ社は、菌体に含まれるATPの検出に着目した。RMDS法は、ATP生物発光法、高感度CCDカメラ、データ解析システムで構成され、非常に少量の微生物の存在の有無を迅速に検出、判定することができる手法であるが、ビール工場での実用化にあたっては、測定プロセスで混入するビールや培地由来成分が偽陽性につながる問題を有していた。種々検討の結果、少量の微生物細胞を検出できる感度を維持しながら、測定中に混入する外来のATPによる偽陽性を抑制できるシステムを構築した⁴⁻⁶⁾ (図1)。結果として



図1. 自社向けに最適化したMicroStar®-RMDS-SPSの外観

ビール増殖菌の検出に通常の培養法では2~4日かかっていた判定を16~24時間に短縮したRMDS法は、1994年からの試験運用を経て、1999年以降、全工場で微生物迅速検査に活用されている。

4. 新規なビール増殖菌の発見と同定

ビールに特有の苦味成分であるイソ α 酸はグラム陽性菌に対して強い抗菌作用を示すが、その環境下でも増殖し得る「ビール増殖菌」が非熱処理の「生ビール」を出荷する日本のビールメーカーにとっての管理対象である。過去、不幸にして、市場に流通したビール製品の容器内でこういったビール増殖菌が増殖し、製品回収に至った例が何件かあるが、厳しい微生物管理体制の中でもそういった例が起こる一因として、それまで管理対象としていなかった新たなビール増殖菌がビール工場環境中に存在していたことが挙げられる。それを予防するためには、新たなビール増殖菌をあらかじめ発見し、管理対象を拡充していくことが必要とされる。

そのために継続的に実施してきた環境微生物調査の中から、16S rRNA解析と生理学的性状に基づいて、BS-1株、EM-63株など、これまでに報告されていなかった新たなビール増殖菌を発見、同定してきた⁴⁾。このうち、EM-63株はグラム陰性の偏性嫌気性菌であり、発見から20年近くを経て、新種のビール増殖菌 *Prevotella cerevisiae* と同定された⁷⁾。それまでビール増殖性を有するグラム陰性菌は *Veillonellaceae* 科に属する *Pectinatus* 属や *Megasphaera* 属が知られていたが、*Prevotella cerevisiae* は *Prevotellaceae* 科に属するビール増殖菌として初めて分離、同定された(図2)。

おわりに

サッポロ社はビール工場における微生物管理について、新たな分析技術の検討、新規ビール増殖菌の同定といった基礎研究から、工場現場での迅速、簡易な管理技術の実用化まで多岐に

わたる取り組みを行ない、長年にわたり、①ビール増殖菌判定技術の実用化による同定精度向上及び簡便検査体制の確立、②製品の出荷判定の迅速化、③未知のビール増殖菌の発見と増殖挙動調査の知見を活かした微生物管理体制の拡充などを実現してきた。近年消費者の嗜好の多様化に伴いビールをはじめとする酒類の中味の多様化も進んできている。今後もよりよい品質のビール、酒類を消費者に安定的に提供するために微生物管理技術を追求していきたい。

(引用文献)

- 1) Tsuchiya Y, Kaneda H, Kano Y and Koshino S. Detection of Beer Spoilage Organisms by Polymerase Chain Reaction Technology. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1992; 50: 64-67.
- 2) Nakakita Y, Maeba H and Takashio M. Grouping of *Lactobacillus brevis* Strains Using the *gyrB* Gene. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2003; 61: 157-160.
- 3) Tsuchiya Y, Ogawa M, Nakakita Y, Nara Y, Kaneda H and Watari J. Identification of Beer-Spoilage Microorganisms Using the Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2007; 65: 77-80.
- 4) Nakakita Y, Takahashi T, Tsuchiya Y, Watari J and Shinotsuka K. A Strategy for Detecting of All Beer-Spoilage Bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2002; 60: 63-67.
- 5) Takahashi T, Nakakita Y, Watari J and Shinotsuka K. Application of Bioluminescence Method for the Beer Industry: Sensitivity of MicroStar™-RMDS for detecting Beer-spoilage Bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000; 64: 1032-1037.
- 6) Takahashi T, Nakakita Y and Nakamura T. Rapid Single Cell Detection of Lactic Acid Bacteria in the Beer Using Bioluminescence Method. *Biocontrol Science.* 2019; 24: 29-37.
- 7) Nakata H, Kanda H, Nakakita Y, Kaneko T. and Tsuchiya Y. *Prevotella cerevisiae* sp. nov., Beer-Spoilage Obligate Anaerobic Bacteria Isolated from Brewery Wastewater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019; 69: 1789-1793.

謝辞 本賞にご推薦いただきました静岡大学・河岸洋和教授に深謝いたします。また、本研究の推進にあたり、RMDS法、LAMP法に関してそれぞれ協働で取り組んだ日本ミリポア株式会社(現メルク株式会社)、栄研化学株式会社の関係者の方々に厚く御礼申し上げます。本研究成果はサッポロビール株式会社ならびにサッポロホールディングス株式会社の多くの関係者の尽力によるものであり、関係の皆様感謝いたします。

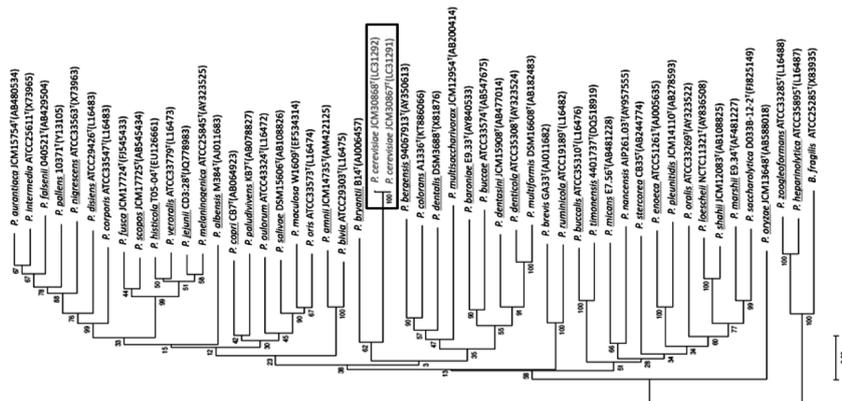


図2. 16S rRNAに基づく *Prevotella* 属の系統樹 (*P. cerevisiae* を新種として提唱)