

ビール製造における微生物品質保証技術開発について ～食の安心・安全を守るために～



①



②



③



④

アサヒビール株式会社食の基盤技術研究所栄養生理解析部

部長 佐 見 学①

アサヒビール株式会社知財戦略部

課長補佐 坂 本 幹 太②

アサヒビール株式会社名古屋工場品質管理部

部長 鈴 木 康 司③

アサヒビール株式会社酒類技術研究所酒類微生物技術部

主任研究員 飯 島 和 丸④

はじめに

日本においては加熱殺菌処理を施さない生ビールが主流であり、この流れは世界的にも認められつつあるなか、生であるがゆえに混入微生物が生育し混濁不良品が発生する品質リスクは無視できない。乳酸菌は古くから主要なビール変敗微生物として知られており、欧州ではビールにおける約60～90%の微生物事事故事例が乳酸菌を原因としたものであると報告されている。これらビール混濁性乳酸菌による変敗の形態としては、製品ビールの混濁、酸敗、異臭の発生などが挙げられる。また、乳酸菌に属せばどの菌種でもビールに生育して混濁させるわけではなく、ビール混濁性乳酸菌は *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri* および *Pediococcus damnosus* など数種に限定されるが、分類学上お互いに近縁関係にない。その一方、例えば *L. brevis* に属していてもビール混濁性を全く示さない株も多数おり、乳酸菌のビール混濁性は菌種に必ずしも依存しない性質であることが知られていた。また、筆者らが最近報告した *L. paracollinoides* の事例が示すように、既知の種に属さないにもかかわらず強いビール混濁性を示す未知の乳酸菌種が突然出現することがある。そのため、ビール産業で主流であった既知菌種に対する同定検査法では、乳酸菌のビール混濁性を迅速に予見することは困難であった。また、ビール産業におけるもう一つの大きな問題は、品質検査で用いられる微生物検出培地でビール混濁性乳酸菌が生育しない事例があることである。そのため、従来型の検査培地では検出が困難なビール混濁性乳酸菌に対して有効な培地の開発が望まれてきた。筆者らはビール産業が抱えていたこれら諸問題を解決すべく、新たな微生物検査法構築を目指し研究開発を行ってきた。

1. 検査培地の開発

食品の微生物検査は、品質上問題となる微生物を検体から漏れなく検出し、製品に対する危害度を正確に判定するのが基本である。そのため、当該微生物を検査培地で確実に検出することが微生物検査の要である。ところが、ビール品質事故の大半を引き起こす乳酸菌は非常に検出が難しい。これは、従来型の検査培地に生育しないビール混濁性乳酸菌が多いためである。実際に、検査培地で検出がないにもかかわらず品質事故が発生した事例は国内外を問わず多いとされている。また、このような検出困難な乳酸菌で品質事故が発生した場合、相手の姿が検知できないがゆえに、原因の究明や再発防止を進められない。したがって、これまでビール産業では、ビール混濁性乳酸菌を確実に検出できる培地がないのが悩みの種であった。筆者らは、なぜビール混濁性乳酸菌が検査培地に生育し難いかを二十

数年にわたり研究し、これらの乳酸菌がビールという特殊環境に棲息を続けるうちに極度に環境適応し、培地での生育性が著しく低減することを裏づけるデータを得た。また、ビール環境に高度に適応した乳酸菌は、従来型培地で培養するとあたかもショック死したかのように死滅していく現象を見いだした。したがって、多くのビール混濁性乳酸菌が従来型検査培地に生育性を示さないのは、ビール環境への高度適応が関与していると推察した。さらに、本研究の知見を基に検査培地組成を検討した結果、培地中の栄養成分がむしろ生育阻害要因となっていることを見だし、ビールを基に栄養成分添加を少量にとどめた培地が培養困難であったビール混濁性乳酸菌の検出に有効であることを明らかにした。これまで、難培養性の混濁性乳酸菌を生育させる未知の栄養成分があるはずとの前提のもと、培地の開発が行われてきた。ところが、一連の研究結果から、過剰な栄養成分を加えずビールに近い培地のほうが有効であるという培地開発の新たな方向性を示すことができたと考えている。筆者らが開発した ABD (Advanced Beer-spoiler Detection) 培地は、従来型の培地で検出困難であった *L. lindneri* や *L. paracollinoides* などを含め、包括的にビール混濁性乳酸菌の検出を可能とし、従来型微生物検査で防ぎ切れなかった品質事故の解決策の一つとして提案した(図1)。また、ABD培地を用いた製造環境調査で分離されたビール混濁性乳酸菌株のうち、従来型培地で生育性を示さないものが大半を占めており、ビール製造環境に潜む微生物品質リスクの大きさを明らかにするに至った。なお、アサヒビール社では、現在、本培地を国内全工場および海外ライセンス工場に展開し、その培地組成も広く一般公開している。

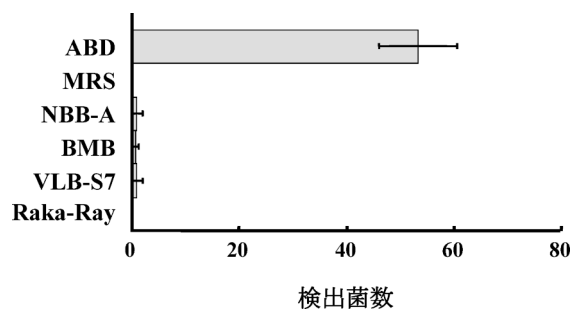


図1 検出困難なビール混濁性乳酸菌 *L. lindneri* に対する各検査培地の検出力
European Brewery Convention あるいは American Society of the Brewing Chemists により推奨されるビール混濁性乳酸菌検査培地を用いて比較を行った。

2. ホップ耐性に関する研究

ビール混濁性乳酸菌は、19世紀に Pasteur が酸敗したビールから発見した微生物であり、300種以上報告がある乳酸菌種の中でも一部の菌種に属する特定の乳酸菌株に限定される。これは、ビール原料であるホップに含まれる抗菌成分が、一般細菌を含めほとんどの乳酸菌の生育を阻害するためである。そのため、ビールの微生物検査において培地で微生物が検出された際、ビール混濁性乳酸菌か否かを正確に判定する必要がある。しかし、乳酸菌のビール混濁能は菌種のみ依存する形質でないことがわかっており、これを実現する迅速検査法はなく、1週間以上要する製品植菌試験に長年依存してきた。これでは、微生物検出時の製品の出荷判定あるいは出荷後製品の回収の要否を判断するには実用性がない。一方、ビール混濁性乳酸菌株はホップ成分に強い耐性を示すという性質を持つが、なぜごく一部の乳酸菌株だけがホップ耐性を示すのかは、ビール醸造微生物学において百年以上大きな謎の一つだった。筆者らによるビール混濁性乳酸菌のホップ耐性研究は十数年に及び遂行され、ホップ耐性遺伝子の発見およびその機能解析に始まり、元々は混濁能のない乳酸菌が遺伝子の水平伝播と呼ばれる現象によりホップ耐性形質を外部から獲得しビール混濁性乳酸菌に変化したこと、それゆえに菌種ではなく当遺伝子の有無を検査することによりビール混濁能を正確に判定できるようになることなど、全く新規の知見を得るに至った。これらのことは、これまでビール産業を不安ならしめてきた未知混濁性乳酸菌種の新出現に対して、我々が初めて有効な対抗策を持ったことを意味する。さらに、当時困難とされた乳酸菌の膜タンパク質発現系を構築し、筆者らが見いだした二つの遺伝子 *horA* および *horC* が多剤排出ポンプをコードしていることを示し、その結

果ホップ耐性化していることを実証した(図2)。これまで、150株以上のビール混濁性乳酸菌を調査したが、全株について菌種に依存せず *horA* または *horC* の少なくとも一方を保有していることが示され、漏れのない微生物検査に役立っている。また、ごく最近新菌種提案されたばかりの混濁性乳酸菌である *L. backi* や *P. claussenii* に属すビール工場環境分離株から *horA* または *horC* が検出されることが示され、未知混濁性乳酸菌出現に対する本検査法の有効性についても検証できた。なお、食品の変敗形質に着目した遺伝子マーカーを用いて菌種非依存型の微生物検査法を開発したのは、筆者らが知る限り *horA* 遺伝子検査法が食品・飲料産業において世界初の事例である。

3. 除菌フィルター評価法の構築

以上の研究を通じて、ビール混濁性乳酸菌がその長い発生的歴史の中でビールという特殊な生育環境に高度に馴化し、ホップ耐性遺伝子を水平伝播させながら誕生してきたという仮説を提唱し、長年謎であったビール混濁性乳酸菌の出現に対して一つの解を示した。また、この研究過程において、混濁性乳酸菌株を一般乳酸菌用培地で培養した場合とビールに馴化した場合で、性状が大きく異なることを見いだした点も意義深い。この一例として、混濁性乳酸菌がビールに馴化することにより、生ビール製造最終工程に使用されている除菌フィルターを千倍以上通過しやすくなる現象を発見した。本現象の原因を調査した結果、ビール中で生育させた混濁性乳酸菌は一般的な培地で生育させた同一株と比較して明らかに菌の形態が矮小化していることが明らかとなった(図3)。これまで、ビール産業における除菌フィルターの性能評価法は標準化されていなかったが、多くの場合は短期間で大量の菌体が得られる一般的な培地で前培養がなされており、これはすなわち生ビール製造で重要な役割を果たすフィルターの除菌性能を過大評価していたことになる。そのため、筆者らは誰でも入手可能な *L. lindneri* 基準株を用いた評価方法を開発し、矮小化させるのに最適な前培養条件とともに本法を広く一般公開し、除菌フィルターにおける適正かつ厳格な微生物リスク評価に役立てている。

おわりに

ビールは紀元前 8000 年から 6000 年前にメソポタミアで誕生

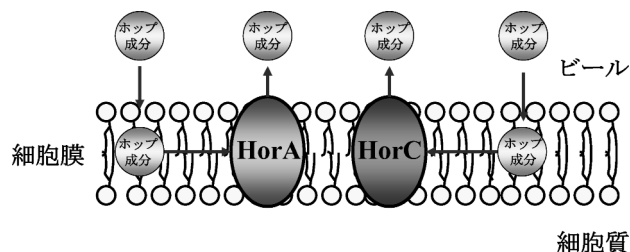
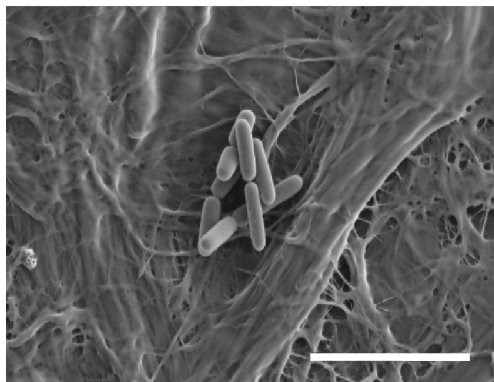


図2 HorA および HorC タンパク質によるホップ耐性機構

ビール馴化 *L. lindneri*
DSM 20690^T (LRV:2.43)



ビール未馴化 *L. lindneri*
DSM 20690^T (LRV:5.71)

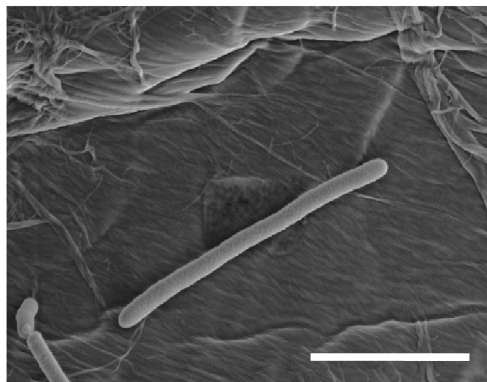


図3 ビール馴化乳酸菌株と未馴化菌株の形態比較
括弧内に除菌フィルター評価試験における LRV (Log Reduction Value) を示す。Bar, 5 μm

したといわれており、ホップがビールの原料に使われるようになったのは5~9世紀ごろであったとされる。筆者らの研究により、ビール混濁性乳酸菌はこの長いビール醸造の歴史の中で競合微生物が少ないビール環境に住みつき共生を果たしてきた微生物群であるという新たな仮説が立てられるに至った。この共生の歴史の中で、ビール混濁性乳酸菌はホップ耐性遺伝子を水平獲得しながら、ビール環境で生き残るために複雑な耐性機構を異菌種間で共有しながら発展させてきたと考えられる。また、ビール混濁性乳酸菌によく観察される検査培地で生育しない現象も、これら乳酸菌のビール環境への高度適応が大きく関与すると推察される。このような環境適応は、ビールだけでなく、シードルやワイン、清酒などの酒類変敗乳酸菌についても同様のことが観察されている。そして、これら変敗乳酸菌を検

査するために、それぞれの酒類への環境適応を逆に利用した検査法が開発されるようになってきた。今後は、環境適応を切り口とした変敗微生物検査法が、酒類分野だけでなく伝統的な発酵食品の分野にも広がっていくものと考えられる。

本賞の成果は、東京大学微生物学研究室およびオランダ・Groningen大学の共同研究者、ならびにアサヒビール株式会社の関連部門の皆様のご尽力に負うところが多かったことを付記し、ご協力いただきました皆様にこの場を借りてお礼を申し上げます。また、本賞にご推薦いただきました東京大学教授の北本勝ひこ先生および選考委員の先生方に厚くお礼申し上げます。