

生酏における乳酸菌叢のDGGE及びPFGE解析

増田 康之^{1*}・野口 智子¹・高橋 俊成¹・井口 純²・大澤 朗³・溝口 晴彦¹

¹菊正宗酒造株式会社総合研究所, ²宮崎大学IR推進機構,

³神戸大学大学院農学研究科・応用動物学講座動物多様性利用科学分野

(2012年3月14日受付 2012年9月14日受理)

DGGE and PFGE analysis of lactic acid bacterial succession during *Kimoto* making

Yasuyuki Masuda^{1*}, Tomoko Noguchi¹, Toshinari Takahashi¹, Atsushi Iguchi², Ro Osawa³, and Haruhiko Mizoguchi¹ (General Research Laboratory, Kiku-Masamune Sake Brewing Co. Ltd., 1-8-6 Uozaki-nishimachi, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo 658-0026¹; Interdisciplinary Research Organization, University of Miyazaki, 5200 Kihara, Miyazaki 889-1692²; Animal science division, department of Bioresource Science, Graduate School of Agricultural Science Kobe University, Kobe, Hyogo 657-8501³) *Seibutsu-kogaku* **90**: 684-690, 2012.

To examine the bacterial microflora in *kimoto* (the traditional seed mash for sake brewing), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified ribosomal DNA (rDNA) was applied to DNA extracted directly from the sake mash and its seed mash in the Heisei 22 brewing year (2010-2011). The result revealed that *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus sakei* were the particular populations, and was very consistent with previous reports using traditional plating and isolation of LAB strains. Unfortunately, non-target amplification products from rice mitochondrial DNA were found, even when using WBAC1-WBAC2 primer set for selective amplification of bacterial DNA in wine fermentation. Next, multiyear isolates of *L. mesenteroides* and *L. sakei* from *kimoto* and the surroundings, which were identified by 16S rRNA gene sequencing, were characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Sma*I-PFGE patterns showed that the same or almost identical types of *L. mesenteroides* were present in *kimoto* over the years, implying that the habitat of *L. mesenteroides* might be the surrounding equipment. On the contrary, *Not*I-PFGE analysis of *L. sakei* revealed that no strains had identical PFGE patterns in different years, while some isolates were identical to *L. sakei* isolated from *koji* of that year. These results demonstrate that it might be difficult for *L. sakei* to survive over a year in sake breweries after the brewing season.

[**Key words**: DGGE, PFGE, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei*, yeast starter, sake]

清酒醸造における酒母には、大きく分けて速醸酒母と生酏の二種類がある。今日一般に用いられている速醸酒母は、仕込時に乳酸を加えて、低pHにすることにより雑菌汚染を回避すると同時に、耐酸性に優れた清酒酵母を添加培養する。それに対して伝統的な製法である生酏では、仕込時から数日間を6~7°Cの低温に保つことにより、限られた乳酸菌を選択的に増殖させ、これらの乳酸菌が蓄積する乳酸により雑菌汚染を回避している。生酏中では、球菌である *Leuconostoc mesenteroides* に続いて *Lactobacillus sakei* への遷移が観察され、いずれの

乳酸菌も生酏中で、酵母によるアルコール発酵にともなって死滅することが知られている^{1,2)}。

しかしながら近年、百瀬らは、*L. sakei*の検出されない生酏系酒母がしばしば存在することを報告するとともに³⁾、上記の二種以外の乳酸菌桿菌の存在を示唆している⁴⁾。また、米麴中から低温増殖性の球菌 *Leuconostoc citreum* が分離され、*L. mesenteroides* に替わって生酏に生息する可能性が示唆されている⁵⁾。時代を経て環境が変化したため、今日の生酏の菌叢が一般的に変わりつつあるのか興味深い。

*連絡先 E-mail: y-masuda@kikumusamune.co.jp

変性剤（100%：尿素7M，ホルムアミド40%（v/v）の濃度勾配が30–60%になるように調節した8%（w/v）ポリアクリルアミドゲルを用いた。電気泳動は、10×TAE緩衝液中で60°C、50Vの条件で6時間行った。電気泳動マーカーにはDGGE marker II（ニッポンジーン）を用いた。泳動ゲルは染色後、任意のDGGEバンドを切り出し、0.5 M酢酸アンモニウム、10 mM酢酸マグネシウム、1 mM Na₂-EDTAを含む緩衝液中で一晩インキュベート後、QIAEX II gel extraction kit（Qiagen）を用いて、ゲルからDNAを抽出した。抽出DNAを鋳型として、WBAC1とWBAC2（5'-CCCGGGAACGTA-TTCACCGC-3'）のプライマーセットを用いて上述の条件でPCR増幅後、精製して上述のようにアウトソーシングにより塩基配列の解読を行った。得られた配列は、DDBJのBLASTを用いて相同性検索を行った。

PFGE解析 MRSで培養した菌体を適切な細胞数に調整後、アガロースを溶かした緩衝液に懸濁して固め、Lysozym（50 mg/ml）を含む緩衝液中に37°C一晩、Proteinase K（20 mg/ml）を含む緩衝液中に50°Cで2時間反応させた。最終的にSmaI緩衝液またはNotI緩衝液で洗浄後、*L. mesenteroides*については制限酵素SmaI（200 units/ml）、*L. sakei*についてはNotI（200 units/ml）を加え、37°Cで4時間以上反応させた。電気泳動は、6 V/cm、18時間、Initial 1秒、Final 20秒の条件で行った。対照として、DNA size standardであるLambda Ladder PFG Marker（New England Biolabs）を泳動した。ゲルはエチジウムブロマイドにて染色した。得られたバンドパターンはBio-1D software V96.11（Vilber-Lourmat）を用いて解析した。系統解析にはJaccard係数を使用してデンドログラムを作成した。その後Tenoverらが設定したPFGEの疫学解析基準¹¹⁾を参考にして、平均バンド数のうち7本が異なる場合を系統的に異なるかと判断して、その際の類似度（%）を求めて系統分類を行った。

アルコール濃度の測定 国税庁所定分析法注解¹²⁾に従い分析した。

実験結果および考察

DGGE法による酒母の菌叢解析 選択培地を用いる培養法によって、平成22酒造年度に生酏中の乳酸菌の消長をみたところ、Fig. 1に示す結果を得た。よく知られているような球菌と桿菌の遷移現象と、酵母によるエタノール生成に伴って急激に死滅する現象が、今日製造されている生酏においても観察された。スクロース培地に生育したコロニーの周囲には例外なくデキストラン生成が認められたことから、これらの*Leuconostoc*属は*L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* または*L. mesenteroides*

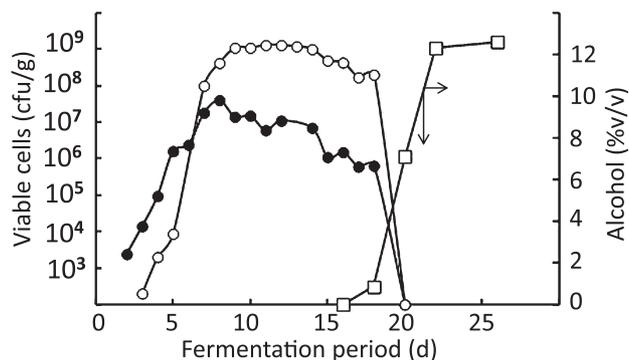


Fig. 1. Time course of quantitative lactic acid bacteria counts in the starter mash (*kimoto*) for sake brewing. Symbols: (○), the *Leuconostoc* genus; (●), the *Lactobacillus* genus; (□), alcohol concentration.

subsp. *dextranicum*と考えられた。また、桿菌も大きなエタノール感受性を示すことから、いわゆる腐造乳酸菌ではないと想像されるが、釣菌した多数の株のすべてを同定するためにペプチドグリカンタイプを含む生理的試験を行うことは容易ではない。筆者らは以前、同様の培養方法により生酏から多数の乳酸菌を分離して、新留らの方法¹³⁾によりDNA-DNA交雑を併用して同定し、球菌は*L. mesenteroides*であり、桿菌は*L. sakei*であると推定した¹⁴⁾。この方法による同定は目視で行うために簡便だが、多数の分離株について行う必要がある点は生理的試験と同様に多大な労力を要する。

そこで、菌叢の全体像を把握すると同時に個々の菌種を高い精度で推定する方法として、PCR-DGGE法を検討することにした。プライマーとして、ブドウ、酵母、糸状菌のDNAを増幅することなく、乳酸菌の16S rDNAの選択的増幅により菌種判別を行えるWBAC1、WBAC2^{GC}を用いて¹⁰⁾、酒母および醪を試料とするDGGEを行った（Fig. 2）。検出された主要なバンドの塩基配列解析を行い、閾値98.7%を基準に相同性から同定¹⁵⁾した結果をTable 1に示す。用いたPCRプライマーは、ヨーロッパブドウ（*Vitis vinifera*）のDNAを増幅しないことが報告されている。しかしながら、イネのDNAは増幅され、明瞭なバンドDとその上下にひろがるスミアなバンド群のすべてが、イネ（*Oryza sativa*）のミトコンドリアDNAに由来することを確認した。清酒醪では蒸米をそのまま原料として仕込むために、本来のPCRを妨害する多量の米由来のDNAの存在は避けられない。しかしながら、生酏の仕込後3日目から、*L. sakei*に由来するバンドE、Fと、*L. mesenteroides*に由来するバンドGが明瞭に観察され、清酒醪においても乳酸菌に由来するバンドF、Gが認められた。なお、選択培地を用いる培養法では、5日目および12日目の清酒醪

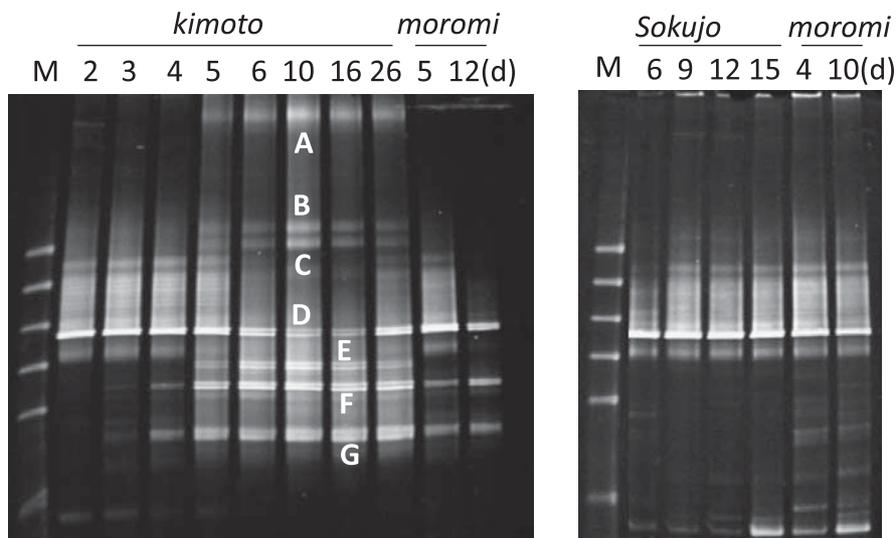


Fig. 2. DGGE analysis of partial 16S rRNA fragments amplified with the WBAC1-WBAC2^{GC} primer set from the starter mash (*kimoto* and *sokujo*) and the respective main mash (*moromi*) for sake brewing. “M” indicates a reference marker. Bands indicated by letters were excised and, after reamplification, subjected to sequence.

Table 1. Sequencing results of bands cur from DGGE gels

Band ^a	Size (bp)	Closest relative	%Identity	Source ^b
D	335	<i>Oryza sativa</i> (Nipponbare mitochondrion)	100	DQ167400
E	272	<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> (DSM20017 ^T)	99	AY204893
F	285	<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> (DSM20017 ^T)	99	AY204893
G	285	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (BRC100496 ^T)	99	AB681194

^aBands are lettered as indicated on DGGE gels shown in Fig. 2.

^bAccession number of sequence of closest relative found with Blast search.

から乳酸菌は検出されなかった。清酒醪を試料としたDGGEで見られた乳酸菌由来のバンドは、生菌由来ではなく、醪に加えた生酏中に分解されずに存在していた死滅菌のDNAから増幅されたものと考えられる。その他、生酏において不鮮明なバンドA, B, Cが観察されたが、バンドを切り出して再び増幅後DGGE解析を行った結果、いずれもヘテロダイマーと同定された。他方、速醸酒母では細菌に由来するバンドが見られず、速醸酒母を用いた清酒醪において数本の薄いバンドが認められた。これらは三段仕込みの過程で乳酸が希釈され、静菌状態にあった乳酸菌がわずかに増殖した結果ではないかと推察される。全体の1%未満の菌群をPCR-DGGEで検出することは難しい¹⁶⁾とされていることから、健全に育成された生酏では、*L. sakei*と*L. mesenteroides*の二種が優占菌であると見なしてよいと思われる。また、他の乳酸菌が菌叢を形成している場合、具体的な菌数把

握は難しいとしても検出可能であることから、PCR-DGGEを生酏育成管理に適用可能と考えられ、今後さらに明解な結果が得られるように、PCR条件およびプライマーの改良を検討したい。

***L. mesenteroides*の酒造蔵内における生残性** 近縁の菌株が蔵内に生息して、経年的に生酏の優占菌となっているかどうかを推察するために、過去に生酏から分離、保存されていた菌株を用いて検討を試みた。平成4酒造年度(4BY)、平成9酒造年度(9BY)に分離された各5株、平成5酒造年度(5BY)、平成9酒造年度(10BY)に分離された各1株に、参照株としてNBRC3426を加えてPFGEを行い、そのパターンから菌株の近縁関係を示すデンドログラムを作成した。その結果、Fig. 3に示すように6つの系統タイプに分かれ、NBRC3426は系統タイプaに、4BY分離株はb, c, dの3系統タイプに、9BY分離株はe, fの2系統タイプに分離され、*L. mesenteroides*

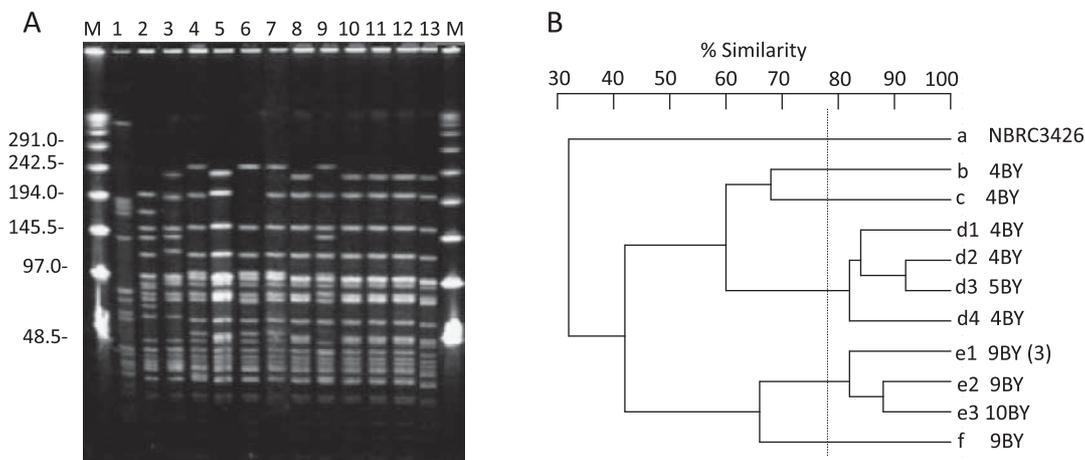


Fig. 3. *SmaI*-PFGE patterns (A) and the dendrogram based on Jaccard (B) for *Leuconostoc mesenteroides* stock strains isolated from the starter mash (*kimoto*). (A) Lane M, λ -size marker; Lane 1, NBRC3426; Lane 2-6, five isolates in the Heisei 4 brewing year (BY); Lane 7, one isolate in 5BY; Lane 8-12, five isolates in 9BY; Lane 13, one isolate in 10BY. (B) Dot line indicated the cut-off value used to define PFGE types. If there are more than two strains in a type, the number of strain are in parentheses.

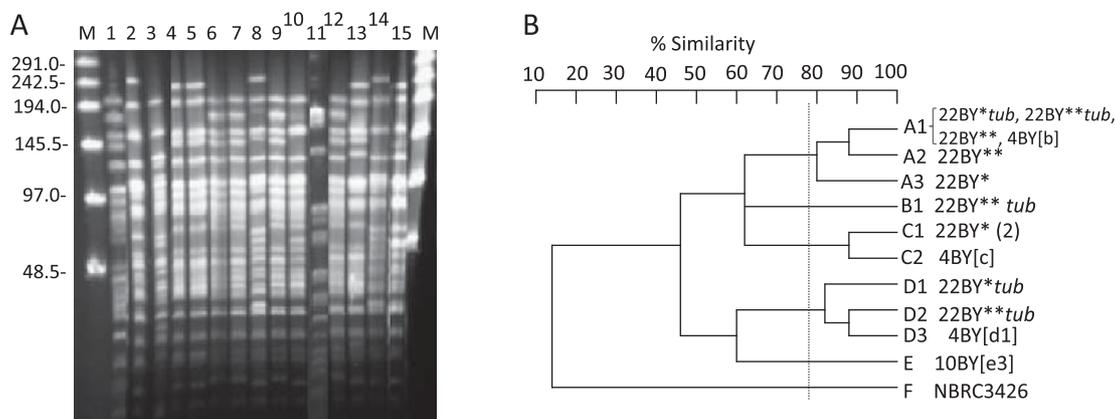


Fig. 4. *SmaI*-PFGE patterns (A) and the dendrogram based on Jaccard (B) for *Leuconostoc mesenteroides* isolated from the starter mash (*kimoto*) and the wooden tub prepared for *kimoto* making. (A) Lane M, λ -size marker; Lane 1-3, three isolates from the wooden tub prepared for batch number 12 in 22BY; Lane 4-6, three isolates from *kimoto* (batch no.12) in 22BY; Lane 7-8, two isolates from the wooden tub prepared for batch number 26 in 22BY; Lane 9-10, two isolates from *kimoto* (batch no. 26) in 22BY; Lane 11, NBRC3426; Lane 12-15, four isolates of PFGE type b, c, d1, and e3 in Fig. 3 respectively. (B) *Batch no. 12, **Batch no. 26. Added "tub" means the isolates from the wooden tub. PFGE type given in Fig. 3 is in square bracket. Refer to the legend of Fig. 3 for further explanation.

は種内多様性が大きいという報告¹⁷⁾と矛盾しない結果となった。また、系統タイプdとeには小さなバンドの変動が多くみられてサブタイプに分類され、5BY分離株がタイプdのなかのサブタイプ (d3) に、10BY分離株がタイプeのなかのサブタイプ (e3) に分類された。これらのサブタイプは、それぞれ約90%の高い類似度を示していることから、前年の分離株に由来する菌株が、翌年に現れた可能性も考えられた。

そこで、22BYの生酏、および仕込のために準備した桶 (半切り桶) から分離した株を加えて、さらに検討を加えた。22BYの仕込12号生酏から3株、同じく桶から

3株、仕込26号生酏から2株、同じく桶から2株を分離し、Fig. 3に示した系統タイプからb, c, d1, e3の各1株を加えてPFGEパターンを解析した。結果をFig. 4に示す。系統タイプAのなかのサブタイプ (A1) に、22BYの桶並びに酒母分離株と4BY分離株がともに含まれた。また、系統タイプCのなかには、22BY分離株 (サブタイプC1) と4BY分離株 (サブタイプC2) が含まれ、これらはきわめて近縁であると推察された。さらに、系統タイプDに、桶から分離した株 (サブタイプD1, D2) と4BY保存株 (サブタイプD3) が含まれた。これらのことから、複数の系統の*L. mesenteroides*が酒造蔵内に

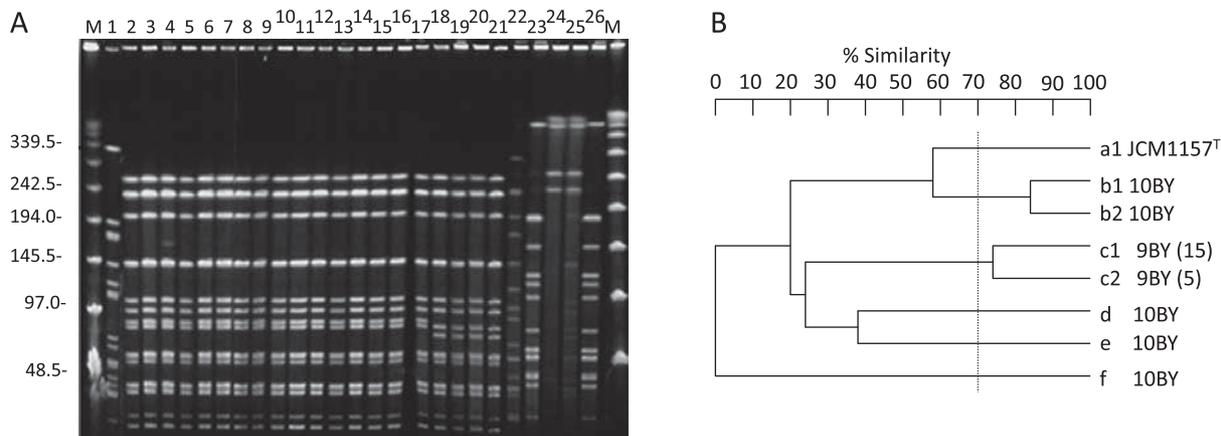


Fig. 5. *NotI*-PFGE patterns (A) and the dendrogram based on Jaccard (B) for *Lactobacillus sakei* stock strains isolated from the starter mash (*kimoto*). (A) Lane M, λ -size marker; Lane 1, JCM1157^T; Lane 2-21, 20 isolates in the Heisei 9 brewing year (BY); Lane 22-26, five isolates in 10BY. (B) Refer to the legend of Fig. 3 for the dot line and the number in parentheses.

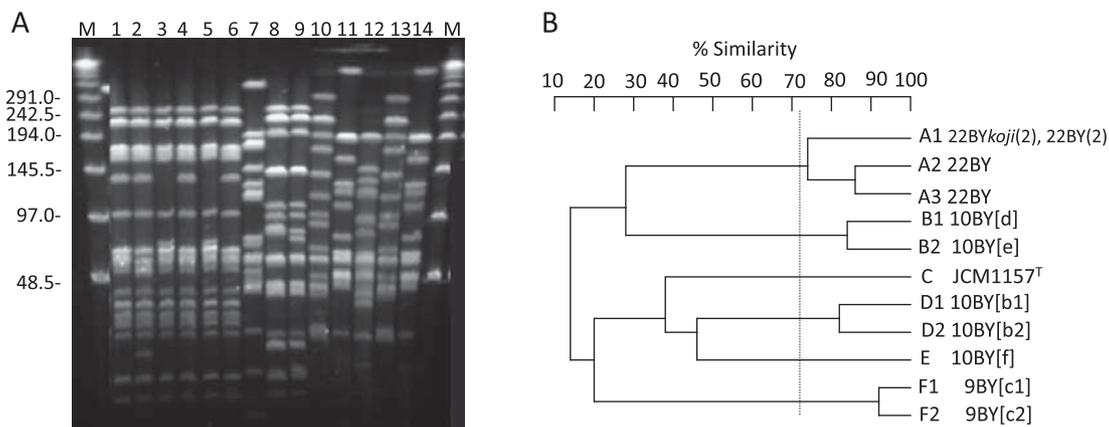


Fig. 6. *NotI*-PFGE patterns (A) and the dendrogram based on Jaccard (B) for *Lactobacillus sakei* isolated from the starter mash (*kimoto*) and *koji* used for *kimoto* making. (A) Lane M, λ -size marker; Lane 1, one isolate from *koji* for batch number 12 in 22BY; Lane 2-3, two isolates from *kimoto* (batch no. 12); Lane 4, one isolate from *koji* for batch number 26 in 22BY; Lane 5-6, two isolates from *kimoto* (batch no. 26) in 22BY; Lane 7, JCM1157^T; Lane 8-14, seven isolates in the order corresponding to lane 2, 18, 24, 23, 22, 25, 26 in Fig. 5A. (B) Added “*koji*” means the isolates from *koji*. PFGE type given in Fig. 5 is in square bracket. Refer to the legend of Fig. 4 for further explanation.

広くハビタットを持っており、多年にわたり生酏の *L. mesenteroides* の起源になっていると可能性が考えられる。

***L. sakei* の酒造蔵内における生残性** 同様に生残性を *L. sakei* についても検討した。1997年と1998年に連続して保存株が残されていたので、これらと基準株 JCM1157^T の PFGE パターンから菌株の近縁関係を示すデンドログラムを作成した (Fig. 5)。その結果、1997年分離株はすべて同一の系統タイプ c に属し、1998年分離株はこれとは異なる複数の系統タイプ b, d, e, f に属した。また、半切り桶から菌の分離を試みたが、そのほとんどは *L. mesenteroides* であり、*L. sakei* を検出することはできなかった。これらのことから、*L. sakei* が近

縁株として蔵内に生息し、翌年も生酏に現れる可能性は低いであろうと思われる。

ふつう米麴から検出される細菌の多くは *Micrococcus* 属、*Bacillus* 属であるが、平均して 10^2 – 10^3 cfu/g の乳酸菌が検出される¹⁸⁾。そこで、生酏の *L. sakei* の起源は酒母麴であると考えて、22BY の仕込12号生酏と26号生酏についてそれぞれ、生酏から2株、それに使用した米麴から1株の *L. sakei* を分離した。これらの分離株とともに、Fig. 5 の系統タイプから b1, b2, c1, c2, d, e, f の合計7株を PFGE に供して、そのパターンからデンドログラムを作成した (Fig. 6)。その結果22BY 分離株6株はすべて系統タイプ A として独立して分類された。そ

のうち、酒母および酒母麴から分離された各2株がひとつのサブタイプ (A1) になった。これらのことから、一酒造年度の中で麴室などにハビタットを得た *L. sakei* が、生酏中の乳酸菌の有力な起源になっていると推察されるが、同じ株またはそれに派生する近縁株が酒造蔵内に生残して、翌年以降に生酏に現れる可能性はきわめて低いと推察される。これは、環境によって凝集性や耐熱性が増大する¹⁹⁾ *L. mesenteroides* に比較して、*L. sakei* は複雑な栄養要求性をもつことが関係していると思われる。

木製の設備や道具類は、生酏に見いだされる乳酸菌にハビタットを提供していると考えられるが、特に酒造期間中30~40°Cに保たれる麴室周辺は種々の乳酸菌の有力な増殖環境であろうと考えられる。生酏においては Fig. 2に見られるように、*L. mesenteroides* と *L. sakei* が優占菌として菌叢を形成しており、そのことが結果的に腐造酸敗のない安全醸造を可能にしている。これら2菌種の選択的な集殖は、その低温増殖能¹⁾に主に依存している。特に、*L. sakei* は酒造蔵内に安定したハビタットを持たないと思われるため、生酏中の優占菌となるように酒母造りを行うためには、生酏初期の温度管理とともに醸造環境のモニタリングも重要な意味を持つものと考えられる。

要 約

清酒醸造における伝統的な酒母 (生酏) の乳酸菌叢の解析を、平成10酒造年度にPCR-DGGE法を用いて試み、*L. mesenteroides* と *L. sakei* が優占菌であるという従来の知見を再確認した。しかし、ワイン発酵における乳酸菌叢解析のためのプライマーセットを用いたところ、原料の蒸米に由来するDNAが非標的配列の増幅をもたらした。清酒醸造の工程管理に適用するためには、PCR条件やプライマー設計の再検討が期待される。

生酏等から分離された保存株間の関連性を、PFGE法を用いて調査した。*L. mesenteroides* は、酒造蔵内の木製道具類などにハビタットを持つと推定され、酒造年度をまたいで同じ系統タイプの株が現れた。他方 *L. sakei*

では、年度をまたいで同じ系統タイプが現れることはなかった。しかし、酒母麴から分離された株と同じ系統タイプが、酒造期間内の生酏には認められた。このことから、酒造期を終えた蔵内に *L. sakei* が生残する可能性は低いと推察される。

文 献

- 1) 大林 晃, 北原覚雄: 日農化, **33**, 839-845 (1959).
- 2) 秋山裕一: 清酒酵母の研究, p.410, 清酒酵母研究会 (1972).
- 3) 百瀬洋夫, 鎌尾敦子: 醸協, **88**, 76-88 (1993).
- 4) 百瀬洋夫, 藤倉寛子: 醸協, **91**, 834-837 (1996).
- 5) 黒瀬直孝, 浅野忠男, 川北貞夫, 垂水彰二: 生物工学, **82**, 183-190 (2004).
- 6) 太養寺真弓, 安藤 聡, 島 純: 食総研報, **70**, 23-28 (2006).
- 7) 内村 泰, 岡田早苗: 乳酸菌実験マニュアル, 朝倉書店 (1992).
- 8) Lane, D. L.: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Ed. E. Stackebrandt, M. Goodfellow), Jhon Wiley&Sons (1991).
- 9) <http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>
- 10) Lopez, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., Vander Gheynst, J., and Mills, D. A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6801-6807 (2003).
- 11) Tenover, F. C., Arbeit R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray B. E., Persing, D. H., and Swaminathan, B.: *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2233-2239 (1995).
- 12) 注解編集委員会編: 第4回改正国税庁所定分析法注解, p.50-54, 日本醸造協会 (1993).
- 13) 新留亜子, 後藤 (山本) 奈美, 溝口晴彦, 原 昌道: 生物工学, **73**, 27-31 (1995).
- 14) 溝口晴彦: 微生物増殖学の現在・未来 (福井作蔵, 秦野琢之編), 314-323, 地人書館 (2008).
- 15) Stackebrandt, E. and Gaebel, E.: *Microbilo. Today*, **33**, 152 (2006).
- 16) Muyer, G. and Smalla, K.: *Antonie Leeuwenhock*, **73**, 127-141 (1998).
- 17) 鈴木正人, 岡田早苗, 駒形和男: 日本生物工学会大会要旨集, p.54 (1996).
- 18) 奈良原英樹, 真野史義, 川井嘉子, 松山正宣: 醸協, **64**, 915-918 (1969).
- 19) Bergey, D. H. and Boone, D. R.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Volume 3*, p.631, Springer (2009).