

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 浅野 静

---

ビールは抗菌性を示すホップ成分を含むとともに pH が低いこと、アルコールを含むこと、溶存酸素が極めて低いことなどから、微生物学的に安定な食品といわれている。しかし、一部の微生物はこのような過酷な条件下でも生育することができ、ビールに混入すると混濁や異臭を引き起こすことが知られ、ビール混濁性菌と呼ばれている。このような汚染事故は、100 ml あたり数個レベルという低い菌数で引き起こされるのに加えて被害の規模が大きいため、ビール醸造においては厳しい微生物管理が必要とされている。

本論文はビール混濁性細菌の迅速検査法の確立を目的として行われたものであり、5章からなる。第1章の序論に続き、第2章では、強いビール混濁性細菌として報告されている12菌種を対象としたマルチプレックスPCR法の構築について述べている。ビール混濁性乳酸菌6菌種、*Lactobacillus brevis*、*L. lindneri*、*L. paracollinoides*、*L. coryniformis*、*L. plantarum*、および *L. casei* を一括して検出するプライマーL. multiplex、*Pectinatus* 属2菌種 *Pectinatus cerevisiiphilus* および *Pect. frisingensis* を一括して検出するプライマーP. multiplex、ならびにビール混濁性球菌4菌種 *Pediococcus damnosus*、*Ped. inopinatus*、*Ped. clausenii*、および *Megasphaera cerevisiae* を一括して検出するプライマーC. multiplex を構築し性能を調べたところ、いずれも実用水準を満たす検出感度、特異性を有していることが確認された。

第3章では、ビール製造工程で使用されている除菌フィルター性能を評価する目的で、供試菌とその培養条件について詳細な検討を行った。その結果、ビール環境に順応しているビール混濁性乳酸菌は通常の実験室株よりもフィルターを通過しやすくなっていることを見いだした。その要因の一つが細胞の大きさの矮小化であることが示唆されたため、通常使用されるMRS培地培養株では正確なフィルター性能評価ができていない危険性が認められた。そこで、強いビール混濁性を示す *L. lindneri* ならびに *L. paracollinoides* について、さらに高度にビール馴化を行い、性状調査を行ったところ、植え継ぎ回数が増加するに従って、両株は徐々にMRS培地上の生育性が低下することを見いだした。さらに、ビールで40回から70回程度の植え継ぎを行った株、および30回植え継いだ後ヒートショックを施した株では、蛍光活性染色法などでは一定数の生菌数が確認できるのに対して、MRS培地で全く検出できなくなる現象が観察された。これらのことから、ビールに極度に馴化した乳酸菌株は、通常使用される培地で検出されることなく品質事故を引き起こす可能性が示唆された。また、ビール環境に順応したビール混濁性乳酸菌は、メンブレンフィルターを用いた除菌工程、およびMRS培地を使

用した微生物検査を逃れる可能性が示唆され、ビール馴化株、あるいは難培養株を用いた微生物管理の重要性を示した。

第4章では、難培養株も含めて包括的にビール混濁性乳酸菌を検出できる ABD 培地と、蛍光染色法を組み合わせた新規検査系の開発を行い、ビール混濁性乳酸菌を3日以内で検出する方法を確立した。本法では第一ステップとして、ABD 培地上での短時間培養によりビール混濁菌を特異的に増殖させ、第二ステップとして、自動検出できる蛍光顕微鏡にて蛍光染色された微小マイクロコロニーを高感度で検出する。この方法における検出感度および特異性を調べたところ、数 cells/検体レベルの混入混濁菌を検出できる感度を有し、さらにビール混濁性を持たない工場環境頻出菌に対して擬陽性反応を示さないことが確認された。また、検出されたマイクロコロニーに対して、ビール混濁性乳酸菌の rRNA 遺伝子と相補する配列を持つ蛍光プローブを用いて FISH 法を行ったところ、煩雑な操作を必要とせず菌種同定できたことから、連続してビール混濁性乳酸菌判定ができるマイクロコロニー FISH 法が構築できたことが示された。第5章では、総括と展望が述べられている。

以上、本研究は、ビール混濁性細菌のビール馴化による形態や生理学的性質の変化について詳細な解析を行なうとともに、これらの知見をもとにしたビール醸造における微生物検査法の迅速化を確立したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。