

日本酒造りにおけるバクテリアの多様性
および生態に関する研究

2021 年 3 月

生物工学専攻
寺寄 桃香

目次

第1章	序論	1
1-1.	日本酒造りにおける微生物の役割	1
1-2.	混入微生物による日本酒の品質への影響	2
1-3.	日本酒の発酵スターター	2
1-4.	本論文の構成	3
1-5.	引用文献	4
第2章	日本酒造りの過程とその産物におけるバクテリア菌叢解析	7
2-1.	序論	7
2-2.	実験方法	9
2-2-1.	日本酒およびその製造過程サンプルと仕込水サンプルからの DNA 抽出	9
2-2-2.	酒粕サンプルからの DNA 抽出	9
2-2-3.	リアルタイム PCR	15
2-2-4.	16S rDNA 配列に基づくバクテリア菌叢解析	16
2-2-5.	バクテリア菌叢結果に基づくクラスター解析	17
2-3.	結果と考察	18
2-3-1.	日本酒サンプルにおける DNA の存在	18
2-3-2.	日本酒及び製造過程サンプルにおけるバクテリア菌叢解析	20
2-3-3.	バクテリア菌叢に基づくクラスター解析	26
2-4.	小括	28
第3章	日本酒造りの過程から分離されたバクテリアとその性状	30
3-1.	序論	30
3-2.	実験方法	31
3-2-1.	分離に使用した培地と初添えおよび醪サンプル	31
3-2-2.	初添えサンプルからのバクテリア分離	35
3-2-3.	分離バクテリアの系統解析	36
3-2-4.	分離バクテリアのエタノール条件下における生育	38
3-3.	結果と考察	39

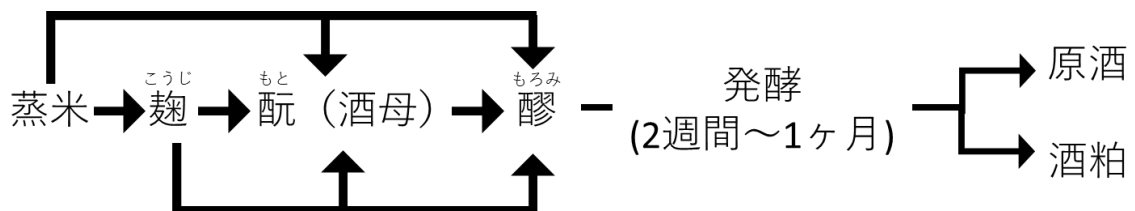
3-3-1.	分離バクテリアの同定と系統解析.....	39
3-2-5.	分離バクテリアのエタノール条件下における生育.....	43
3-4.	小括.....	45
第4章	蔵付きバクテリア <i>Kocuria</i> の分離とゲノム解析.....	47
4-1.	序論.....	47
4-2.	実験方法.....	48
4-2-1.	初添えから分離された <i>Kocuria</i> の全ゲノム解析.....	48
4-2-2.	異なる温度における <i>Kocuria</i> 分離株の増殖曲線.....	48
4-2-3.	TGYm2 培地における日本酒酵母 <i>Kocuria</i> 分離株の共培養.....	49
4-2-4.	TGYm2 培地における <i>Kocuria</i> DNA のリアルタイム PCR.....	51
4-2-5.	麹溶液における <i>Kocuria</i> と日本酒酵母の共培養.....	52
4-3.	結果と考察.....	54
4-3-1.	<i>Kocuria</i> 分離株の全ゲノム解析.....	54
4-3-2.	異なる温度における <i>Kocuria</i> 分離株の増殖曲線.....	60
4-3-3.	TGYm2 培地における日本酒酵母と <i>Kocuria</i> 分離株の共培養.....	61
4-3-5.	TGYm2 培地における <i>Kocuria</i> DNA の存在.....	63
4-3-6.	麹溶液における日本酒酵母と <i>Kocuria</i> 分離株の共培養.....	64
第5章	総括.....	70
謝辞	73
引用文献	74
補足資料	85

第1章 序論

1-1. 日本酒造りににおける微生物の役割

日本酒造りは麴菌 *Aspergillus oryzae* と日本酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を利用して行われる。麴菌は米に含まれるデンプンを糖に分解し、日本酒酵母は糖をエタノールへと変換する[Machida et al, 2005; Manggen et al, 2010]。酒造りにて使用される日本酒酵母は、現在、醸造協会が管理する醸造用酵母の「きょうかい酵母」が主流である[日本醸造協会 きょうかい酵母®]。以前は各酒蔵に住み着く蔵付き酵母を酒造りに利用しており、その中でも優良な酵母がきょうかい酵母として管理・配布されるようになった[塚原, 1955]。醸造に用いられる日本酒酵母はエタノールの他にも有機酸、アミノ酸、エステルを生成する[Ogawa, 2015; 秋田, 1989; 浅野ら, 2000]。また、麴菌が生成する酵素によってタンパク質がアミノ酸やペプチドに分解される[Kanauchi, 2013; 木村, 2016]。有機酸、アミノ酸、エステルなどの化合物は日本酒の風味を形成する[Iwano et al, 1981; 上田, 1968; 来馬, 1956]。麴菌と日本酒酵母はエタノール生産だけでなく、日本酒の味や風味に関わっている。

図 1-1 原酒までの日本酒造りの製法



日本酒酵母と麴菌の他にも、生酛造りでは乳酸菌が用いられる[Masuda et al, 2012]。

日本酒造りの製法を図 1-1 に示す。酏（酒母）は製法によって、速醸酏と生酏の 2 種類に分けられる。速醸酏では、酒母に直接乳酸を添加し、酒母内の雑菌の繁殖を抑制する。一方で生酏は、酒蔵環境由来の乳酸菌が生産する乳酸を利用して、酒母内の雑菌を死滅させる。

1-2. 混入微生物による日本酒の品質への影響

日本酒造りは開放系で行われるため、多くの微生物が混入する。実際、生酏系酒母で酒蔵環境から混入した乳酸菌を利用している。また、硝酸還元菌や野生酵母の混入が報告されている[Koyanagi et al, 2016]。混入した微生物は乳酸、エタノールによって死滅する[Kanauchi, 2013]。生酏造りにおける乳酸生成、醸造りにおけるエタノール生成は微生物によって行われるため、混入した微生物はすぐには死滅せず、造りの過程の一時期において増殖が可能である[野白, 1984]。したがって、日本酒造りにおいて混入した微生物が麹菌と日本酒酵母の代謝に関与することで日本酒の味や風味に影響を与える可能性は高い。また、乳酸菌の一種である火落ち菌は 20%エタノール条件下でも増殖可能であり、日本酒の腐造を引き起こす[Suzuki et al, 2008]。腐造を防ぐために、日本酒造りでは低温殺菌法である「火入れ」が行われる。「火入れ」は、パスツールが低温殺菌法を開発する 300 年も前の室町時代には行われていた[木村, 2016]。

1-3. 日本酒の発酵スターター

日本酒の発酵スターターである酒母には、生酏と速醸酏の 2 種類がある。酏造りでは乳酸により雑菌の繁殖を抑える。この乳酸を、自然由来の乳酸菌から得る製法が生酏造りである[Kanauchi, 2013]。生酏造りでは酒蔵環境からの乳酸菌の混入とその増殖を利用するため、3 週間から 1 ヶ月程度かかる[木村, 2016]。通常、柔らかくなった蒸米と麴を、3 時間ごとに 2 人組で櫛を用いてすりつぶす作業である「山卸し」を生酏

造りでは行う。この作業を省いたものを、山廃酀と言う。山廃酀は生酀系酒母の1つである。生酀系酒母は乳酸菌が増殖するまでに硝酸還元菌や野生酵母が酒母内で増殖する。多様な微生物が酒母造りの過程で生育するため、生酀造りは複雑で濃厚な味や風味となる。一方、速醸酀は酒母に直接乳酸を添加し、雑菌の繁殖を抑える方法である。乳酸菌の生育を待たないため、約2週間ででき、日本酒の味や風味も淡泊で飲みやすいとされる。

1-4. 本論文の構成

開放系で行われる日本酒造りには日本酒酵母と麹菌だけでなく、多種類の微生物が混入し、味や風味に寄与していると考えられる。本研究では、日本酒造りにおける混入微生物を探索し、その影響を明らかにすることを目的とする。本論文は本章を含めた5章から成り立つ。2章では、日本酒造りにおいて混入する細菌に注目し、その種類を明らかにした。日本酒と酒粕およびその製造過程に含まれる細菌DNAをPCRで増幅し、次世代シーケンサーを用いて網羅的にシーケンスを行った。異なる日本酒における細菌DNAの多様性解析に基づき、クラスター解析を行った。3章では、実際の日本酒造りの過程から細菌の分離を行い、16S rDNAシーケンスにより、それらの分類学的な帰属を明らかにした。さらに、いくつかの分離株のエタノール条件下における生育を培養実験により調べた。4章では、酒蔵環境に住み着いている細菌を明らかにし、その細菌と日本酒酵母との関連について調べた。日本酒酵母と細菌の共培養を行い、生菌数やエタノール濃度、有機酸濃度の変化を調べ、細菌の存在による日本酒酵母の代謝への影響の有無を明らかにした。5章にて、本研究の総括を行った。

1-5. 引用文献

Ichikawa E, Hosokawa N, Hata Y, Abe Y, Suginami K and Imayasu S (1991) Breeding of a Sake Yeast with Improved Ethyl Caproate Productivity. *Agric. Biol. Chem.*, 55 (8): 2153-2154

Ito T, Kumagai H, Takahashi H, Sato T, Nakazawa N and Iwano K (2009) Amino acid generation from steamed rice grains digested by a sake koji enzyme. *J. Brew. Soc. Japan* 104(8): 617-626

Iwano K, Iizuka N, Saito K and Nunokawa Y (1981) Production of Amino Acids in Sake Moromi-mash. II. Decrease and Increase of Amino Acids by Yeast Fermentation. *J. Brew. Soc. Japan* 76(4): 272-275

Kanauchi M. (2013) SAKE alcoholic beverage production in Japanese food industry. *Food Industry* chap 3: 39-63

Koyanagi T, Nakagawa A, Kiyohara M, Matsui H, Tsuji A, Barla F, Take H, Katsuyama Y, Tokuda K, Nakamura S, Minami H, Enomoto T, Katayama T, Kumagai H (2016) Tracing microbiota changes in yamahai-moto, the traditional Japanese sake starter. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(2): 399–406.

Machida M, Asai K, Kikuchi H. (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438: 1157-1161

Manggen M, Z. Lewis Liu. (2010) Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*.
Appl. Microbiol. Biotechnol 87: 829-845

Masuda Y, Noguchi T, Takahashi T, Iguchi A, Osawa R and Mizoguchi H. (2012) DGGE and
PFGE analysis of lactic acid bacterial succession during *Kimoto* making. The Soc for Biotechnol,
Japan 90: 684-690

Ogawa H (2015) “Japanese Sake” component and its fragrance and taste におい・かおり環
境学会誌 46(5) 300-339

Suzuki K, Asano S, Iijima K and Kitamoto K. (2008) J Inst. Brew 114(3): 209–223

秋田修 (1989) 酵母による香気生成. J Inst. Brew 84(11): 739–745

浅野忠男, 黒瀬直孝 (2000) 日本酒酵母の有機酸生成について. J. Brew. Soc. Japan 95(4):
227-234

上田隆蔵 (1968) 清酒醸造と有機酸 J. Brew. Soc. Japan 63(7) 739-743

木村克己 (2016) 日本酒の基礎知識. 新星出版社

塚原寅次 (1955) 醸造協会の日本酒酵母について. J. Brew. Soc. Japan 50: 623-625

日本醸造協会「きょうかい酵母®」 <https://www.jozo.or.jp/yeast/> (最終閲覧日: 2020/11/18)

野白喜久雄 (1984) 清酒醸造微生物学の進歩 (4) 日本醸造協会雑誌 79: 229-235

来馬増夫 (1956) 清酒の科学. J. Brew. Soc. Japan 51(4) 239-234

第2章 日本酒造りの過程とその産物におけるバクテリア菌叢解析

2-1. 序論

本章では、日本酒に含まれる DNA に着目した。日本酒造りはオープンな環境下で行われるため、環境由来の微生物が混入する。しかし、乳酸やエタノールによって最終的にはそれらの混入微生物は通常は死滅する。一方、混入微生物の DNA は DNase などに分解されない限りは、バクテリア細胞崩壊によって生じた DNA は細胞外 DNA として製品化された日本酒に存在する。本研究では、大量並列型 DNA シーケンサー Miseq を用いた Amplicon Sequence によって、日本酒および日本酒造りの含まれるバクテリア DNA の検出を試みた。

生命の遺伝物質である DNA は、生物種によってその塩基配列が異なっている。現在、PCR や次世代シーケンサーでサンプル DNA の塩基配列を調べることで、種の特定が可能である場合がある。DNA は細胞内だけでなく、海水や土壌中の環境中にも細胞外 DNA として存在する[Paul et al., 1987; Pietramellara et al., 2009]。環境中において、細胞外 DNA の取り込みは細菌の形質転換を引き起こす[Hara et al., 1981; Lorenz et al., 1994]。環境中に存在する細胞外 DNA はその環境に生息した生物種の痕跡を示す手がかりともなる。実際、12S rRNA 遺伝子の可変領域をターゲットとするプライマーを使用したペアエンドシーケンスにより、水族館の水槽や海洋の水環境中の細胞外 DNA から生息する魚種が特定された[Miya et al., 2015]。

生酏と山麩酏のバクテリア菌叢における連続的な変化の報告によると、生酏を用いた日本酒造りのバクテリア菌叢では、麴の段階では *Bacillus* が初期から後期まで優勢であったが、酒母造りの過程において *Bacillus* (Bacillaceae) から Lactobacillaceae へと優性種の変遷が見られた[Bokulich et al., 2014]。山麩酏のバクテリア菌叢では、常に

Lactobacillaceae に属する *Lactobacillus* が優勢であった[Koyanagi et al., 2016]。また、生酏造りでは *Bacillus* と Lactobacillaceae の他にも *Staphylococcus*, *Lactococcus*, Planocccaceae の DNA が検出され、生酏系酒母での微生物多様性がバクテリア菌叢から見ることができる。乳酸菌を利用する生酏系酒母のバクテリア菌叢の報告はあるが、その一方で速醸酏のバクテリア菌叢に関する報告は知る限りではなかった。そこで、速醸酏のバクテリア菌叢を醪の過程において経時的に調べた。さらに、同じ酒蔵の異なるタンクにて造られた日本酒造りのサンプルを採取し、そのバクテリア菌叢を解析、比較した。

日本酒を絞ったあとの残渣として、酒粕がある。原材料である米は、仕込水と麴、酒母と混合された醪の中で発酵が進むごとにマッシュ状となる。2 週間の発酵後、醪は上槽により固体である酒粕と、液体である原酒に分けられる。日本酒造りで混入した微生物が死滅し溶菌した場合、その DNA は原酒に存在するが、細胞が溶菌しない場合、DNA は固体である酒粕中に存在すると考えられる。そこで、酒粕においてもバクテリア菌叢解析を行った。

2-2. 実験方法

2-2-1. 日本酒およびその製造過程サンプルと仕込水サンプルからの DNA 抽出
実験で使用したサンプルを表 2-1 に示した。

各サンプルを 50 mL ファルコンチューブに適量採取した。分画分子量 10K の Nanoseq 10K ultrafiltration unit (PALL) あるいは Amicon Ultra 15 Centrifugal Filter Units (Merck Millipore) を使用して遠心による限外ろ過を行い、日本酒溶液を濃縮した。次に、NucleoSpin® gDNA Clean-up kit (Macherey-Nagel) のプロトコールに従い、濃縮した日本酒溶液から DNA を精製した（濃縮率は 20~360 倍）。

2-2-2. 酒粕サンプルからの DNA 抽出

実験で使用したサンプルを表 2-1 に示した。

酒粕サンプルの DNA 濃縮・精製方法は福山明香利, 2018, 学士論文を参照した。氷上に置いたねじ付チューブに、約 250 mg の酒粕、低アルカリビーズ 0.1 mm 0.4-0.5 g, ジルコニアビーズ 2 mm 8-10 粒, 750 μ L のビーズ溶液を加えた。その後、60 μ L の C1 溶液(150 mM NaCl, 4% SDS, 0.5 M Tris)を添加し、マルチビーズショッカー(3000 rpm, 60 secON, 60 secOFF, 10 cycles)を行い、遠心（10,000 g, 5-10 分間, 室温）分離した。上清に 250 μ L C2 溶液(133 mM 酢酸アンモニウム)を添加しボルテックスにて混合した。4°C で 10 分インキュベートし、遠心分離（10,000 g, 5 分, 室温）した。上清に 200 μ L C3 溶液(120 mM 硫酸アンモニウムアルミニウム十二水和物)を添加し、ボルテックスにて混合。4°C で 10 分インキュベートし、遠心分離（10,000 g, 5 分, 室温）を行った。上清 500 μ L あたり 800 μ L C4 溶液(5 M GuHCL, 30 mM Tris, 9%イソプロパノール)を添加、転倒混和した。サンプルを FastGene Plasmid Minikit mP カラム（日本ジェネティクス）に通し、その後 700 μ L C5 溶液(10 mM Tris, 100 mM NaCl, 50% EtOH)を加え、mP

カラムに通し遠心（10,000 g, 1 分, 室温）し、洗浄を行った。この洗浄を 3 回行った後、空のスピンカラムを再度遠心（10,000 g, 2 分, 室温）した。100 μ L Low TE Buffer(10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0)を添加後、室温で 1 分静置し、遠心分離（10,000g, 1 分, 室温）を行いサンプル DNA を溶出した。

表 2-1 バクテリア菌叢解析に用いたサンプル

Sample	Type	Production Date (Sampling Date)	Area	Brewery	Notes
A01	clear sake	March 2015	Toyama	A	開封後約 1 年間 7℃保管
A01+	clear sake	March 2015	Toyama	A	A01 と同サンプル A01 の 207 日後にサンプリング
A02	clear sake	June 2016	Toyama	A	
A03	clear sake	June 2016	Toyama	A	
A04	clear sake	January 2016	Toyama	A	
A05	clear sake	November 2016	Toyama	A	
A06	clear sake	July 2016	Toyama	A	
A07	clear sake	December 2016	Toyama	A	
A08	clear sake	November 2016	Toyama	A	
A09	clear sake	November 2016	Toyama	A	
A10	cloudy sake	December 2016	Toyama	A	
A11	clear sake	December 2016	Toyama	A	
B01	clear sake	May 2016	Toyama	B	
C01	clear sake	June 2016	Toyama	C	
D01	clear sake	August 2016	Aichi	D	
E01	clear sake	August 2016	Iwate	E	
F01	clear sake	March 2016	Akita	F	
G01	clear sake	August 2016	Gifu	G	

H01	clear sake	November 2016	Fukui	H
I01	clear sake	April 2016	Ishikawa	I
J01	clear sake	October 2016	Iwate	J
K01	clear sake	December 2016	Iwate	K
L01	clear sake	October 2016	Iwate	L
M1	cloudy sake	February 2017	Toyama	A
M2	clear sake	January 2017	Nara	M
M3	clear sake	January 2017	Aomori	N
M4	clear sake	January 2017	Aichi	O
M5	clear sake	February 2017	Kyoto	P
M6	clear sake	February 2017	Kyoto	Q
M7	clear sake	November 2016	Aomori	R
M8	clear sake	January 2017	Aichi	S
M9	clear sake	January 2016	Iwate	T
M10	clear sake	December 2016	Ishikawa	U
M11	clear sake	March 2017	Kyoto	V
M12	clear sake	November 2016	Ishikawa	W
M13	clear sake	February 2017	Nara	X
M14	clear sake	December 2016	Yamanashi	Y
M15	clear sake	March 2017	Yamanashi	Y
M16	clear sake	February 2017	Ishikawa	Z
M18(A01)	clear sake	April 2017	Toyama	A
M19(I01)	clear sake	February 2017	Ishikawa	I

M20(C01)	clear sake	May 2017	Toyama	C
M21(A10)	cloudy sake	January 2017	Toyama	A
M22	clear sake	June 2017	Iwate	E
M23	clear sake	August 2017	Iwate	E
M24	clear sake	July 2017	Iwate	E
M25	clear sake	July 2017	Iwate	E
仕込水	water	February 8, 2017	Toyama	A
速醸酏	fermentation starter	February 8, 2017	Toyama	A
踊	odori(the day after soe)	February 8, 2017	Toyama	A
醪 (発酵 27 日目)	main fermentation mash	February 8, 2017	Toyama	A
山麩酏	fermentation starter	February 8, 2017	Toyama	A
初添え	soe(first addition)	April 25, 2017	Toyama	A
発酵 1 日目	tome(third addition)	April 28, 2017	Toyama	A
発酵 4 日目	main fermentation mash	May 1, 2017	Toyama	A
発酵 9 日目	main fermentation mash	May 5, 2017	Toyama	A
発酵 12 日目	main fermentation mash	May 8, 2017	Toyama	A
発酵 15 日目	main fermentation mash	May 10, 2017	Toyama	A
原酒	undiluted sake	May 18, 2017	Toyama	A
仲添え	naka(second addition)	May 10, 2017	Toyama	A
F1	sake cake	September 2, 2017	Iwate	E
F2	sake cake	September 3, 2017	Akita	1
F3	sake cake	September 4, 2017	Tottori	2
F4	sake cake	May 18, 2017	Toyama	A

F5	sake cake	April 21, 2017	Ishikawa	3
F6	sake cake	September 19, 2017	Akita	4
F7	sake cake	September 19, 2017	Mie	5
F8	sake cake	September 19, 2017	Akita	6
F9	sake cake	September 19, 2017	Nara	7
F10	sake cake	September 19, 2017	Nara	M
F11	sake cake	September 25, 2017	Toyama	8

2-2-3. リアルタイム PCR

日本酒サンプルから得た DNA 溶液に対してリアルタイム PCR を行った。16S rDNA をターゲットとするバクテリアユニバーサルプライマー[Corless et al., 2000]を使用した。SYBR Green I を含有する FastStart Essential DNA Green Master Mix (Roche) を用いて LightCycler Nano System (Roche) により測定を行った。リアルタイム PCR を行う際、ネガティブコントロール (NTC)として UltraPure™ Distilled Water (Invitrogen) を利用した。実験は3レプリカで行い、それぞれサンプルと NTC 間の ΔC_q 値を求めた。

プライマー配列

Target	Sequence (5' → 3')
Bacteria 16S rDNA [Corless et al., 2000]	F CCATGAAGTCGGAATCGCTAG
	R ACTCCCATGGTGTGACGG

PCR 条件

	Temp(°C)	Ramp(°C/s)	Hold	Acquire
Hold	95	5	10 min	
3-Step Amplification (45 cycles)	95	5	10 sec	
	55	4	10 sec	
	72	5	16 sec	✓
Melting	Initial Stage	60	4	20 sec
	Final Stage	95	0.1	1 sec

2-2-4. 16S rDNA 配列に基づく細菌解析

16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Part # 15044223 Rev. B) (Illumina) のプロトコルに従い、DNA サンプルの増幅と精製を行った。細菌ユニバーサルプライマーを使用した PCR により細菌 16S rDNA の V3-V4 領域を増幅した [Klindworth et al., 2013]。2-2-3 において NTC での DNA 増幅が見られたため、シーケンスサンプル調整では TapeStation による電気泳動結果に基づき、NTC にバンドが出ず、サンプルのみにバンドが見られるサイクル数で Amplicon PCR を行った。2 回目の PCR により各 DNA サンプルに Index 配列を付加した。dNTP やプライマーなどの夾雑物を除去するため PCR ごとに精製を行った。Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technology) を用いて PCR 産物の増幅と精製の確認を行った。最終的に 4 nM の DNA 溶液を得た。

プライマー配列

Target Genet	Sequence (5' → 3')
Bacteria 16S rDNA	F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGC
	CTACGGGNGGCWGCAG
V3-V4 領域	R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGA
	CTACHVGGGTATCTAATCC

N: A, G, C, T W: A, T H: A, C, T V: A, G, G

MiSeq® System Quick Reference Guide (Illumina) に従い、DNA 溶液の変性と希釈を行った。調整した DNA 溶液のうち、製造過程サンプルの T1-T7, TA と製品化サンプル M1-M25 は、MiSeq Reagent Nano Kit v2 500 cycles (Illumina) を使用して 2×250 bp のペ

アエンド法にてシーケンスを行った。その他のサンプルは MiSeq Reagent Nano Kit v3 150 cycles (Illumina) を用いて 2×300 bp のペアエンド法でシーケンスを行った。

QIIME (バージョン 1.9.0, Quantitative Insights into Microbial Ecology, www.qiime.org) を用いてシーケンスデータの解析を行った[Caporaso et al., 2010]。リード連結後、R (<http://www.R-project.org/>) にて Biostrings パッケージを用い 400-500 bp の配列のみ抽出した。次に、QIIME でフィルタリングチェックを行い、Greengenes reference database (<http://greengenes.lbl.gov/>, v13.8) に基づきキメラ配列の除去を行った。得られた配列は BLASTn search (version 2.9.0+) を行い 16S Microbial NCBI (National Center for Biotechnology Information) database (2019/3/12 Download) に対してアラインメントを行った[Terasaki et al., 2020]。検索結果はアクセッション番号にて出力されるため、各アクセッション番号を NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) にて検索した。検索結果から得られた種名を属レベルで統合し、菌叢解析結果とした。本論文にて示すバクテリア菌叢解析のグラフでは、1%以上の検出率のバクテリアを示し、1%未満のものは other としてまとめた。

2-2-5. バクテリア菌叢結果に基づくクラスター解析

バクテリア DNA のシーケンス解析結果を基に、各バクテリア DNA の配列頻度を得た。47 の製品化サンプルと 11 の酒粕サンプルのシーケンス結果を基に、クラスター解析を行った。配列頻度を示した菌叢解析結果から、R (<http://www.R-project.org/>) を用いて単位ベクトル化を行ったのち、ベクトルの 2 点間のユークリッド距離を計算し、距離行列を作成した。MEGA を使用して近隣結合法による系統樹を作成した[Kumar et al., 2018; Saitou et al., 1987]。

2-3. 結果と考察

2-3-1. 日本酒サンプルにおける DNA の存在

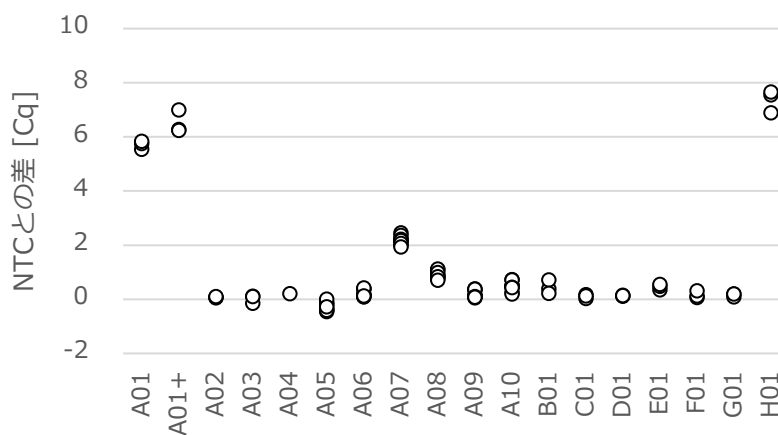
実験の結果、NTC において Cq 値が測定された (表 2-2)。通常ならば、NTC にて DNA は増幅しないため、Cq 値は測定されない。しかし、本実験で使用したバクテリアユニバーサルプライマーのターゲット遺伝子 16S rDNA は、全てのバクテリアが保有する [Van et al., 1996]。16S rDNA はバクテリアゲノム上にマルチコピーで存在する [Case et al., 2007] ため、バクテリアゲノムの混入が少量であっても DNA が増幅してしまう。プライマーと試薬へのバクテリア DNA の混入によって、NTC でも Cq 値が検出されたと考えられる。そこで、NTC の Cq 値との差を求めることによりサンプル中のバクテリア DNA の存在を確認した。

A01 と A01+, H01 の Cq 値は NTC よりも 5 以上低く、32 倍以上バクテリア DNA 量が多いと言える (図 2-1)。バクテリア DNA が多いことから、これらの日本酒造りの過程においてバクテリアが増殖していると考えられる。A01 と A01+は両サンプルとも同じ瓶から得た日本酒サンプルであり、A01 は開封後約 1 年間 7°C で保管、A01+はさらに約 200 日間保管した日本酒サンプルである。H01 は店頭にて樽から直接瓶に注いで売る「量り売り」の日本酒である。いずれも製造直後とは品質が異なっている。A07 はバクテリア DNA 量が 4 倍多く、この日本酒サンプルは火入れが行われていない無濾過生原酒である。すなわち、他と比べてバクテリア DNA 量が多い結果だったサンプルにおいては、高いエタノール濃度において耐性であるバクテリアが増殖した可能性が高いと考えられた。

表 2-2 市販の日本酒におけるバクテリア DNA の Cq 値

Sample	Cq value			Sample	Cq value		
A01	21.26	21.05	20.96	A05	31.33	31.29	31.16
A01+	20.53	19.8	20.56	A06	30.78	30.79	30.75
A02	26.72	26.75	26.7	A07	28.71	28.81	28.95
A03	26.68	26.95	26.7	A08	30.08	30.05	30.18
A04	26.59	ND	ND	A09	30.83	30.78	30.8
B01	26.41	26.08	26.58	A10	30.44	30.68	30.45
C01	26.77	26.63	26.67	NTC	30.94	31.17	30.88
D01	26.68	26.65	26.66				
E01	26.45	26.32	26.25				
F01	26.73	26.67	26.48				
G01	26.6	26.71	26.6				
H01	19.25	19.91	19.14				
NTC	26.8	ND	ND				

図 2-1 市販の日本酒におけるバクテリア DNA の存在



2-3-2. 日本酒及び製造過程サンプルにおけるバクテリア菌叢解析

日本酒及び酒粕におけるバクテリア菌叢を図 2-2 に示す。2-3-1 において、他の日本酒サンプルと比較して多量のバクテリア DNA の存在を示した A01, A01+, H01 では *Lactobacillus* が優勢種として 50%以上検出された。データベースに登録されているシーケンスとの類似性配列検索の結果、日本酒の腐敗菌「火落ち菌」の一種である *Lactobacillus homohiochii* (Accession Number: NR_113818.1) であった。これらの日本酒サンプルは火落ちしていることを明らかにした。

酒粕のバクテリア菌叢は日本酒と比較して多様性が低く、*Staphylococcus* が全ての酒粕サンプルにおいて検出された (F1 から順に F11 まで、89.4%, 97.3%, 89.1%, 3.2%, 2.6%, 2.2%, 4.4%, 5.4%, 95.7%, 56.5%, 69.5%)。一方で、日本酒サンプルでは 47 サンプル中 12 サンプルのみからしか検出されず、その検出率も 5%未満であった。同様に、製造過程のサンプルにおいても 3%未満の検出率を示した。どの酒蔵においても *Staphylococcus* は日本酒造りの過程で混入し、一時的に増殖する可能性が高い。

成政酒造の酒粕 F4 において優勢なバクテリア DNA *Rhodoligotrophos* (42.1%)、*Loriellopsis* (30.2%) は同酒蔵の製造過程サンプル「速醸酛」、「醪 (発酵 27 日目)」においても優勢な DNA として検出された (速醸酛: R-15.2%, L-57.2%, 醪: R-9.5%, L-33.5%) (図 2-3 B)。しかし、日本酒サンプルでは濁り酒 A10 だけが 10%以上の検出率であった。*Rhodoligotrophos* と *Loriellopsis* は醪中に存在するバクテリアだと考えられる。*Loriellopsis* は 10-18.5°C の低温環境から分離されており [Lamprinou et al., 2011]、15°C の日本酒造り環境にて生育可能な菌である。また、成政酒造で造られた製造過程サンプルと酒粕サンプルから検出された *Aerosakkonema* は、成政酒造で造られた日本酒サンプルのうち濁り酒 M1 (31.2%)、M21 (1.2%) のみから検出された。F4 にて検出された *Kocuria* は同じ酒蔵にて造られた濁り酒 A10 において最も高い占有率 (23.5%) であった。醪に含まれるバクテリアのうち、*Staphylococcus* や

Rhodoligotrophos, *Loriellopsis*, *Kocuria* などの酒粕において特徴的な細菌 DNA ほとんどは溶菌しないために酒粕に残り、日本酒においては低い割合を示すと考えられる。

生酛造りの一種である山麩仕込では乳酸菌を利用している。山麩酛の細菌菌叢では *Lactobacillus* (4.1%)、*Leuconostoc* (7.3%) が検出された。一方、山麩仕込の日本酒サンプル A03、A06、A09 から乳酸菌 *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* の DNA は検出されなかった。造りの過程において増殖した細菌の全てが日本酒の細菌菌叢から検出されるわけではない。

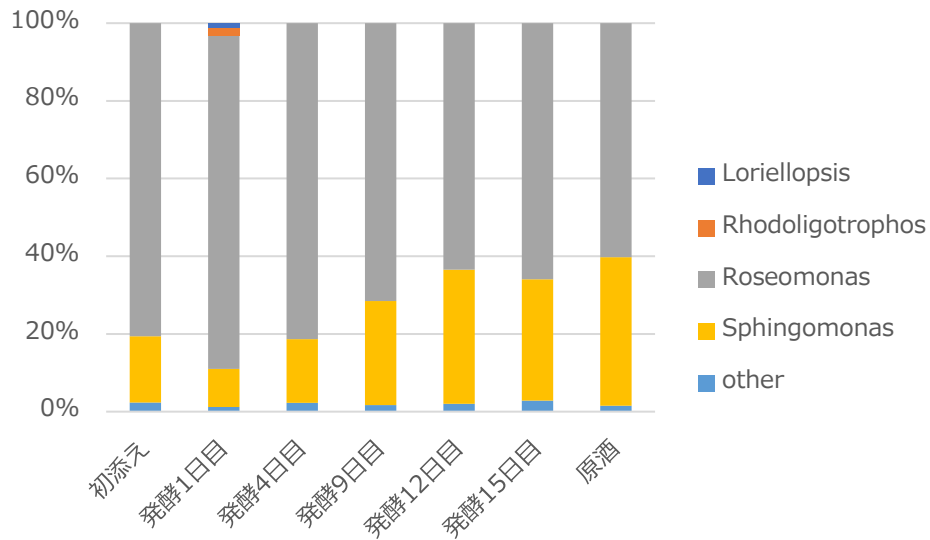
本研究で最も多くのサンプルを解析した成政酒造で造られた日本酒全てのサンプルに共通して検出された細菌 DNA は無かった。日本酒の細菌菌叢では自然環境由来の細菌 DNA が検出された。*Pseudomonas* は E01、H01、M9、M23 の 4 サンプルを除く日本酒サンプルにて検出された。*Pseudomonas* は様々な自然環境中に存在する細菌である[Ravi et al., 2018; Mortensen et al., 1995]。47 サンプル中 28 サンプルで検出された *Delftia* は、米 *Oryza sativa* からの単離報告がある[Sun et al., 2008; Mano et al., 2008]。22 サンプルから検出された *Aerosakkonema* は水環境から分離されている[Kim et al., 2020]。他にも、日本酒サンプルから検出された *Pusillimonas* [Moon et al., 2011; Myunglin et al., 2010]、*Thiobacillus* [Ferroni et al., 1986; Ann et al., 1991]、*Phreatobacter* [Baek et al., 2020; Lee et al., 2017] の DNA も自然環境由来の細菌として考えられる。日本酒には仕込水や酒米などの原料を通して、自然環境由来の細菌 DNA が混入していると考えられる。

菌叢解析に用いた速醸造りでは、初添えから圧搾後の原酒まで、常に *Roseomonas* と *Sphingomonas* が合計 95%以上を占めた (図 2-3 A)。初添えから原酒までの工程では細菌菌叢の大きな変化は無いと言える。醗後期は 20%近いエタノール濃度となるため細菌は死滅していると考えられる[Kanauchi, 2013]。したがって、醗におい

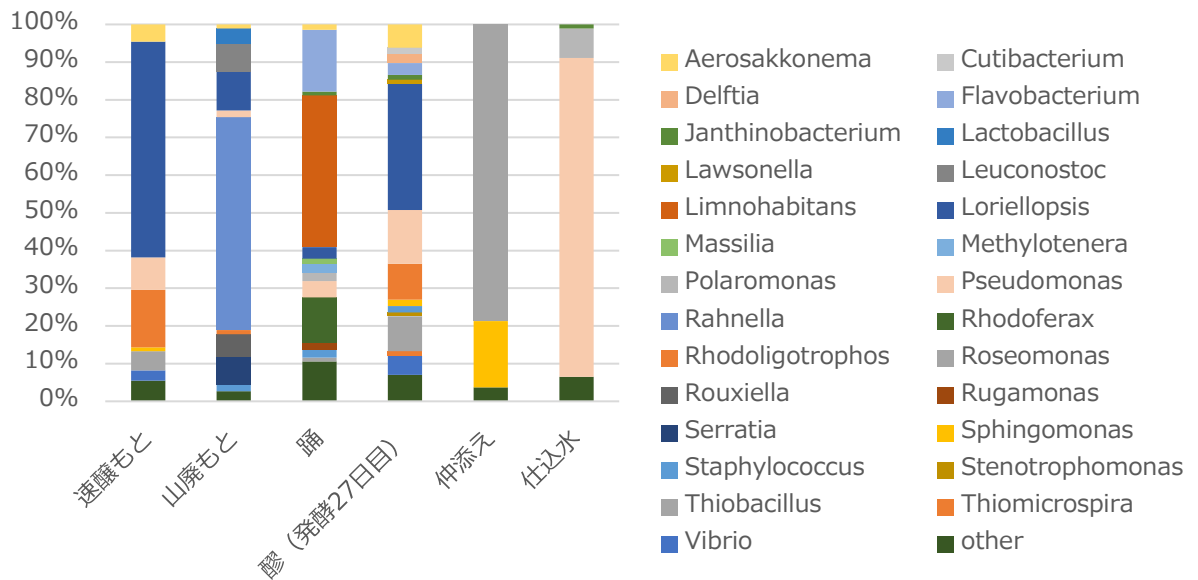
て検出される細菌 DNA は醪にて増殖した細菌ではなく、麹造りあるいは
は酛造りにて混入し増殖した細菌だと考えられる。生酛造りにおいても、初添
えの細菌菌叢は麹と酛の特徴を併せ持ち、初添え以降の醪における大きな変化
がないことが報告されている[Bokulich et al., 2014]。 *Roseomonas* と *Sphingomonas* は速
醸酛、踊、発酵 27 日目の醪からは 2%未満の検出率だった。 *Roseomonas* と
Sphingomonas は今回使用した醪に偶然に混入した細菌である可能性が高く、成
政酒造の酒造りにて常に混入する細菌ではない。解析する醪サンプルが異なる
場合は、異なった細菌が検出されると考えられる。

図 2-3 製造中の日本酒におけるバクテリア菌叢

(A)

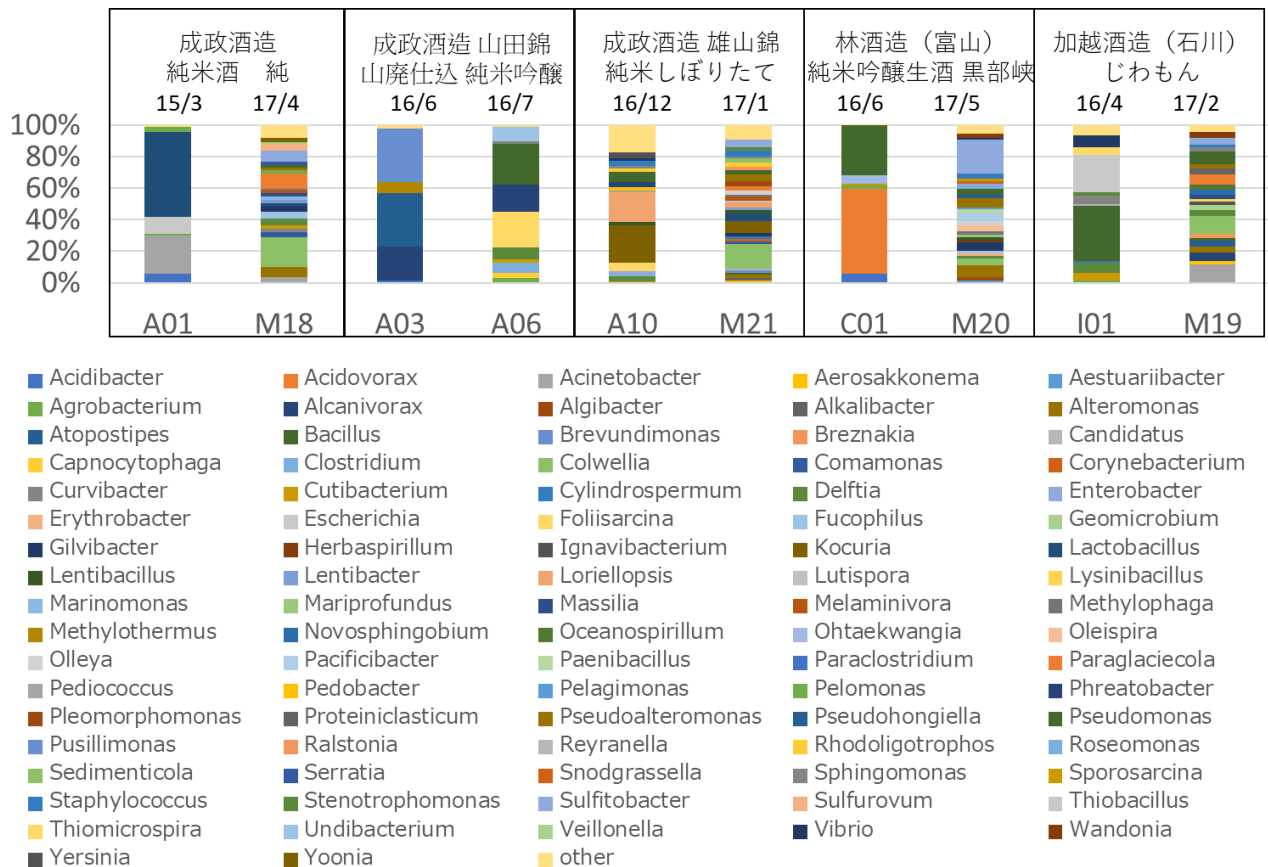


(B)



混入した細菌が日本酒の味や風味に関係しているかを調べるために、製造年月が異なる同じ銘柄の細菌菌叢を比較した（図 2-4）。驚くべきことに、どの銘柄も菌叢パターンは異なっていた。3 組は同じ成政酒造の日本酒だが、それらに共通な細菌 DNA は無い。本研究で行った属レベルでの菌叢解析からは、酒蔵および銘柄による細菌菌叢の特徴は見られなかった。

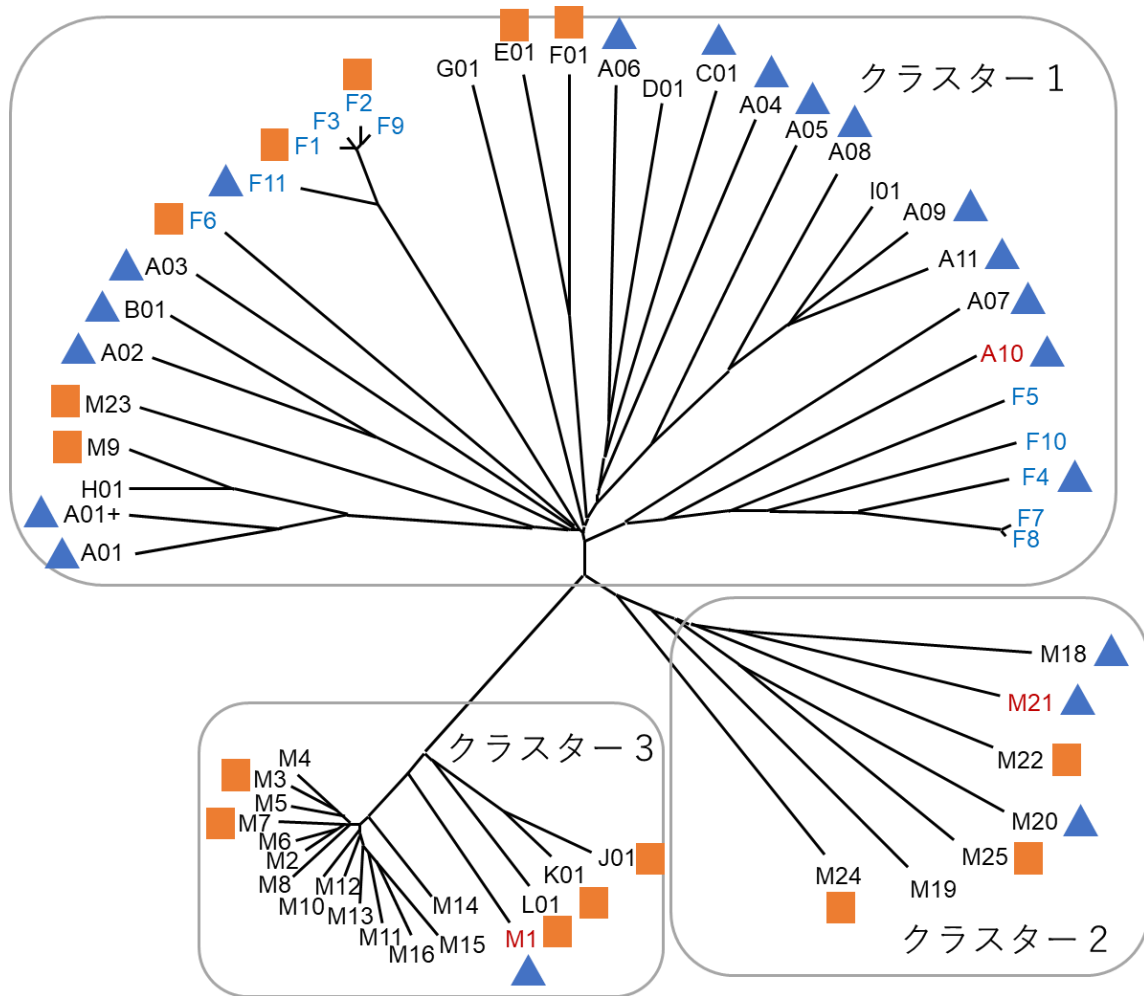
図 2-4 同じ銘柄における細菌菌叢の比較



2-3-3. バクテリア菌叢に基づくクラスター解析

日本酒及び酒粕のバクテリア菌叢において、地域や酒の種類に特有のものがないかを調べるためにクラスター解析を行った。解析の結果、3つのクラスターが形成された(図2-5)。澄んだ酒と濁り酒サンプルは3つのクラスター全てに属し、酒粕サンプルはクラスター1のみに属している。本研究では日本酒47サンプル中、富山の日本酒を18サンプル、東北の日本酒を12サンプル解析した。富山と東北いずれの日本酒も3つのクラスターに分散した。クラスター1には富山を含む中部、東北、近畿、関東地方の日本酒および中部、東北、近畿地方の酒粕が、クラスター2には富山、石川、東北地方の日本酒サンプルが属している。クラスター3には富山、石川、愛知、東北、近畿地方の日本酒サンプルが属している。酒蔵の地域や日本酒の種類が特徴的なクラスターは形成されなかった。属レベルの菌叢解析に基づいたクラスター解析からは、地域や日本酒の種類に特有のバクテリアは見られなかった。酒粕がクラスター1のみに属している理由は、酒粕におけるバクテリア菌叢の多様性の低さによるものだと考えられる。

図 2-5 日本酒と酒粕の菌叢解析結果に基づいたクラスター解析



黒文字は澄んだ酒（clear sake）サンプル、赤文字は濁り酒（cloudy sake）サンプル、青文字は酒粕サンプルを示す。▲は富山の酒、■は東北の酒を示す。

2-4. 小括

リアルタイム PCR から火落ちした日本酒における細菌の増殖を確認した。細菌菌叢解析から、その細菌 DNA が火落ち菌であることを明らかにした。リアルタイム PCR および細菌菌叢解析は日本酒の火落ちをモニタリングすることが可能であることを示している。

日本酒及び酒粕、製造過程サンプルから細菌 16S rDNA の塩基配列を決定し、属レベルでの細菌 DNA を検出した。酒粕において検出される細菌 DNA は溶菌せずに日本酒酵母とともに沈殿した細菌の DNA である可能性が高い。したがって、酒粕と濁り酒から検出される細菌 DNA は日本酒造りにおいて混入し一時的に増殖した細菌の DNA である可能性が高い。日本酒には、造りの過程で混入し、溶菌した細菌の DNA の他にも、原料や酒蔵由来の細菌 DNA が含まれていた。日本酒に含まれている細菌の多くは地域や酒蔵に特異的なものではなく、偶然に混入したものと考えられる。細菌菌叢解析に基づいたクラスター解析では、3つのクラスターが形成された。これらのクラスターは地域や酒蔵に特有なものではなかった。異なる時期に造られた同じ銘柄間の細菌菌叢比較においても、酒蔵や銘柄に特異的な細菌 DNA は見られず、細菌菌叢における特徴は示されなかった。日本酒及び製造過程サンプルの細菌菌叢が予測していたよりも多様であったために、本研究では属レベルで解析を行った。酒蔵に特有の細菌を調べるためには属レベルの菌叢解析では不十分な可能性がある。種、あるいは株レベルでの解析を行うことで、特定の酒蔵に特有な細菌 DNA を示すことが可能かもしれない。

先行研究において、生酏造りでも同様に醪の菌叢は変化せず、さらに初添えの細菌菌叢は麴と酏の特徴を併せ持っていることが報告されている[Bokulich et al., 2014]。

速醸造りのバクテリア菌叢変遷より、速醸造りにおいてもバクテリア菌叢は初添えから原酒まで変化しないことを明らかにした。

第3章 日本酒造りの過程から分離されたバクテリアとその性状

3-1. 序論

バクテリア菌叢解析の結果、日本酒造りへの多様なバクテリアの混入を明らかにした。成政酒造の酏、醪、酒粕及び濁り酒の菌叢から、*Rhodoligotrophos*, *Loriellopsis*, *Kocuria* の成政酒造の醪および酒粕に特徴的なバクテリア DNA を見つけた。一方、本研究で用いた日本酒と酒粕サンプルの菌叢に基づくクラスター解析では、地域や酒蔵に特徴的なバクテリア菌叢は示されず、日本酒に含まれるバクテリアの多くは偶然に混入したバクテリアであると言える。

日本酒の味や風味に影響を与えるバクテリアは、日本酒造りにおいて一時的に増殖し、日本酒酵母や乳酸菌の代謝に影響を与えるバクテリアであると考えられる。日本酒造りにバクテリアは混入するが、酏では乳酸によって、醪ではエタノールによって多くのバクテリアは死滅する[Kanauchi, 2013]。さらに、火入れ、滓引き濾過や活性炭濾過により日本酒に含まれる微生物は取り除かれる[木村, 2016]。そのため、日本酒造りに混入、増殖するバクテリアを明らかにするためには、日本酒造りにおいてバクテリアを分離する必要がある。

前章では、初添えは麴及び酏のバクテリア菌叢の特徴を併せ持ち、初添えから原酒までのバクテリア菌叢は変化しないことを明らかにした。したがって、日本酒造りに混入するバクテリアの分離は初添えから行う必要がある。本章では、成政酒造において造られた異なる日付の初添えからバクテリアの分離を行った。また、異なる酒造会社の発酵 19 日目の醪からバクテリア分離を行い、醪後期においてバクテリアが存在するかを調べた。

3-2. 実験方法

3-2-1. 分離に使用した培地と初添えおよび醗サンプル

使用培地

LB 培地	BD Difco™ Broth, Lennox 20 g/L
Tryptone	10 g/L
Yeast Extract	5.0 g/L
Sodium Chloride	5.0 g/L

TGY 培地

Tryptone (ナカライ)	5.0 g/L
Glucose (和光)	10 g/L
Yeast Extract (ナカライ)	3.0 g/L

TGYm1 培地

Tryptone (ナカライ)	20 g/L
Glucose (和光)	20 g/L
Yeast Extract (ナカライ)	10 g/L

MRS 培地 BD Difco™ Lactobacilli MRS Broth 55.0 g/L

Proteose Peptone No. 3	10 g/L
Beef Extract	10 g/L
Yeast Extract	5.0 g/L
Dextrose	20 g/L
Polysorbate 80	1.0 g/L
Ammonium Citrate	2.0 g/L
C ₂ H ₃ NaO ₂	5.0 g/L
MgSO ₄	0.1 g/L
MnSO ₄	0.05 g/L
K ₂ HPO ₄	2.0 g/L

MB 培地 BD Difco™ Marine Broth 2216 37.4 g/L

Peptone	5.0 g/L
Yeast Extract	1.0 g/L
Ferric Citrate	0.1 g/L
NaCl	19.45 g/L
MgCl ₂	5.9 g/L
MgSO ₄	3.24 g/L
CaCl ₂	1.8 g/L
KCl	0.55 g/L
NaHCO ₃	0.16 g/L
KBr	0.08 g/L
SrCl ₂	34 mg/L

B(OH) ₃	22 mg/L
Na ₂ SiO ₃	4.0 mg/L
NaF	2.4 mg/L
N ₂ H ₄ O ₃	1.6 mg/L
Na ₂ HPO ₄	8.0 mg/L

寒天培地は各組成に Agar 15 g/L を添加し作製した

抗生物質

シクロヘキシミド 0.1 g/L (99.5% エタノールに溶解)

カナマイシン 0.05 g/L (滅菌水に溶解)

各溶媒に溶解後、0.22 μm フィルター滅菌(MILLEX-GP 0.22UM PES 33MM GAMMA STERILIZED, Millipore)を行った溶液を使用した。

採取サンプル

成政酒造株式会社にて造られた初添えサンプルをいただいた。2018年10月から同年12月の異なるタンクにて製造された6サンプルを採取した。成政酒造とは異なる酒造会社にて2019年1月に造られた醪（発酵19日目）サンプルを採取した。また、成政酒造の酒ラックの持ち手と底からバクテリアの分離を試みた（図3-1）。各サンプルのサンプリング日を示した。

表 3-1 初添えおよび醪サンプルのサンプリング日

Sample	Sampling Date
初添え 1	October 23, 2018
初添え 2	November 13, 2018
初添え 3	November 20, 2018
初添え 4	November 27, 2018
初添え 5	December 4, 2018
初添え 6	December 18, 2018
醪（発酵 19 日目）	January 30, 2019

図 3-1 成政酒造の酒ラック



3-2-2. 初添えサンプルからのバクテリア分離

バクテリアの分離

一般的な富栄養培地である LB 培地、TGY 培地、乳酸菌用培地である MRS 培地、海洋性微生物用培地である MB 培地の 4 種の寒天培地を使用した。日本酒造りの過程では日本酒酵母が生育しているため、真核生物のタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを各培地に添加し、日本酒酵母の生育を抑制した。

シクロヘキシミド含有の液体培地 20 mL に初添えあるいは醪サンプル 30 μ L を添加し、15 $^{\circ}$ C と 30 $^{\circ}$ C で 72 時間振とう培養を行った。培養液を寒天培地上に塗布し、15 $^{\circ}$ C と 30 $^{\circ}$ C で静置培養を行った。継代培養にて単菌化を行った。

遠心 (8,000 g, 3 分) した醪の上清 490 μ L に 5 g/L 終濃度 0.1 g/L シクロヘキシミドとなるように添加した。混合液 100 μ L を寒天培地上に塗布し、15 $^{\circ}$ C で 72 時間静置培養を行った。コロニーが認められた場合、同一組成の寒天培地に継代培養し単菌化を行った。

3-2-3. 分離バクテリアの系統解析

DNA 抽出

NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel) キットを使用して菌体からの DNA 抽出を行った。前処理としてリゾチーム処理を行った。リゾチーム溶液 (20 mg/ml lysozyme, 20 mM Tris-HCl, 2mM EDTA) 180 µL に懸濁し、37°Cで 30 分インキュベートした。キット付属の Proteinase K 25 µL を添加し、56°Cで 1 時間インキュベートし、前処理とした。Nano Drop Spectrophotometer ND-1000 を使い抽出 DNA の濃度を測定した。各 DNA 溶液を Nuclease-Free Water で 4 ng/µL に希釈した。

シーケンスサンプルの調整

16S rDNA の V3-V4 領域を標的とするプライマー [Klindworth et al., 2013] を用いて、Go Taq Green Master Mix, 2X (Promega) を使用した PCR により DNA を増幅した。Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technology), D1000 Screen Tape を使用して、得られた PCR 産物を電気泳動した。本プライマーを用いた PCR による PCR 産物の予測サイズは 550 bp である。PCR 産物が一致することを確認した。確認後、NuclepSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) を使用して PCR 産物を精製した。精製後、60 ng/ 20 mL に調整した PCR 産物にシーケンスプライマー (TGTATAAGAGACAGGACTAC) を 9.6 pmol 加えた。

プライマー配列

Target	Sequence (5' → 3')	
Bacteria 16S rDNA (V3-V4 領域)	F	ATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
	R	TGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

N: A, G, C, T W: A, T H: A, C, T V: A, G, G

PCR 条件

	Temp(°C)	Hold
Hold	95	2 min
3-Step Amplification (30 cycles)	95	15 sec
	58	30 sec
	72	30 sec
Hold	4	∞

DNA シーケンス

ユーロフィンジェノミクス株式会社の DNA シーケンスサービス

(<https://www.eurofinsgenomics.jp/jp/service/dnasequence/overview.aspx>) を利用し、DNA 配列を決定した。

分離バクテリアの同定と系統樹作成

シーケンスサービスにより得られた 16S rDNA 部分塩基配列を、NCBI のアライメント検索ツール BLAST を使用して相同性検索を行った。MEGA を使用して近隣結合法による系統樹を作成した[Kumar et al., 2018; Saitou et al., 1987]。

3-2-4. 分離バクテリアのエタノール条件下における生育

分離バクテリアのエタノール耐性を調べた。使用した分離株と系統（表 3-5）を示す。0%, 5%, 10%, 15%にエタノール濃度を調整した TGYm2 液体培地に菌体を懸濁し、15℃にて 10 日間振とう培養した。培養液の段階希釈を行い、希釈液 10 μ L をシクロヘキシミド含有の TGYm2 寒天培地にスポットし、15℃にて静置培養した。培養後、コロニー数を測定した。

表 3-2 使用した分離株とその系統

Isolate	Genus
TGY1127_2	<i>Kocuria</i>
TGY1120_3	<i>Kocuria</i>
TGY1218_3_30	<i>Staphylococcus</i>
TGY1218_4_1	<i>Bacillus</i> (初添え)
MB1023_1	<i>Bacillus</i> (初添え)
MB1	<i>Bacillus</i> (醗)

3-3. 結果と考察

3-3-1. 分離バクテリアの同定と系統解析

成政酒造の初添えサンプルから 46 株、異なる酒造会社の醪サンプルから 6 株のバクテリアが分離された (表 3-3)。分離株の名前は、分離された培地名と初添えのサンプリング日から名付けた。DNA シーケンスサービスにて得られた 16S rDNA の部分配列を BLAST にて相同性検索し、分離株の属を同定した。初添えサンプルから分離された 46 株は *Kocuria* 属 23 株、*Staphylococcus* 属 12 株、*Bacillus* 属 6 株、*Leifsonia* 属 2 株、*Microbacterium* 属 2 株、*Enterococcus* 属 1 株に、醪サンプルから分離された 6 株は全て *Bacillus* 属に同定された。分離株は全てグラム陽性菌であった。驚くべきことに、すべての初添えサンプルから *Kocuria* が分離された。バクテリア菌叢において、*Kocuria* の DNA は 3 つのサンプルから検出されており、それらは全て成政酒造で造られた日本酒および酒粕であった。また、成政酒造の酒ラックからも *Kocuria* が分離された (表 3-4)。*Kocuria* は成政酒造に特有のバクテリアであり、成政酒造の蔵付きバクテリアである。

成政酒造の初添えからの分離株とその近縁種の 16S rDNA 部分配列から系統樹を作成した (図 3-2)。*Kocuria* 属は *Kocuria uropygioeca* に近縁な 18 株と *K. koreensis* に近縁な 5 株の 2 グループに分かれた。*Bacillus* 属は *Bacillus aryabhattai* 5 株、*B. megaterium* 1 株の 2 グループに分類され、*Staphylococcus* 属、*Leifsonia* 属および *Microbacterium* 属、*Enterococcus* 属の分離株はいずれも 1 つのグループに分類された。

K. uropygioeca と *K. koreensis* は系統的に近い[Braun et al., 2018; Park et al., 2010; Wesley et al., 1974]。*K. kristinae* と *K. varians* はビールの醸造プロセスからの分離報告がある[MATOUKOVÁ et al., 2018]。*K. koreensis* は発酵魚介類からの分離報告がある [Park et al., 2010]。また、*Bacillus megaterium*, *Staphylococcus gallinarum* は日本酒の麹お

よび醪の他に、味噌やチョッカル（朝鮮半島の塩辛）などの発酵食品から分離されている[Kaneoka et al., 2014; Onda et al., 2003; Ling et al., 2011]。乳酸菌の一種である *Enterococcus faecalis* はチーズやソーセージといった様々な発酵食品から分離されている[Ozmen et al., 2010]。 *Microbacterium* の発酵食品からの分離報告は知る限りではないが、発酵食品「すぐき」の製造工程における菌叢解析にて *Microbacterium* 属の検出率は高い[Ogihara et al., 2009]。発酵食品に関する *Leifsonia* の報告はなかった。初添えおよび醪サンプルから分離されたこれらの株は、発酵条件下においても生育可能な株である。

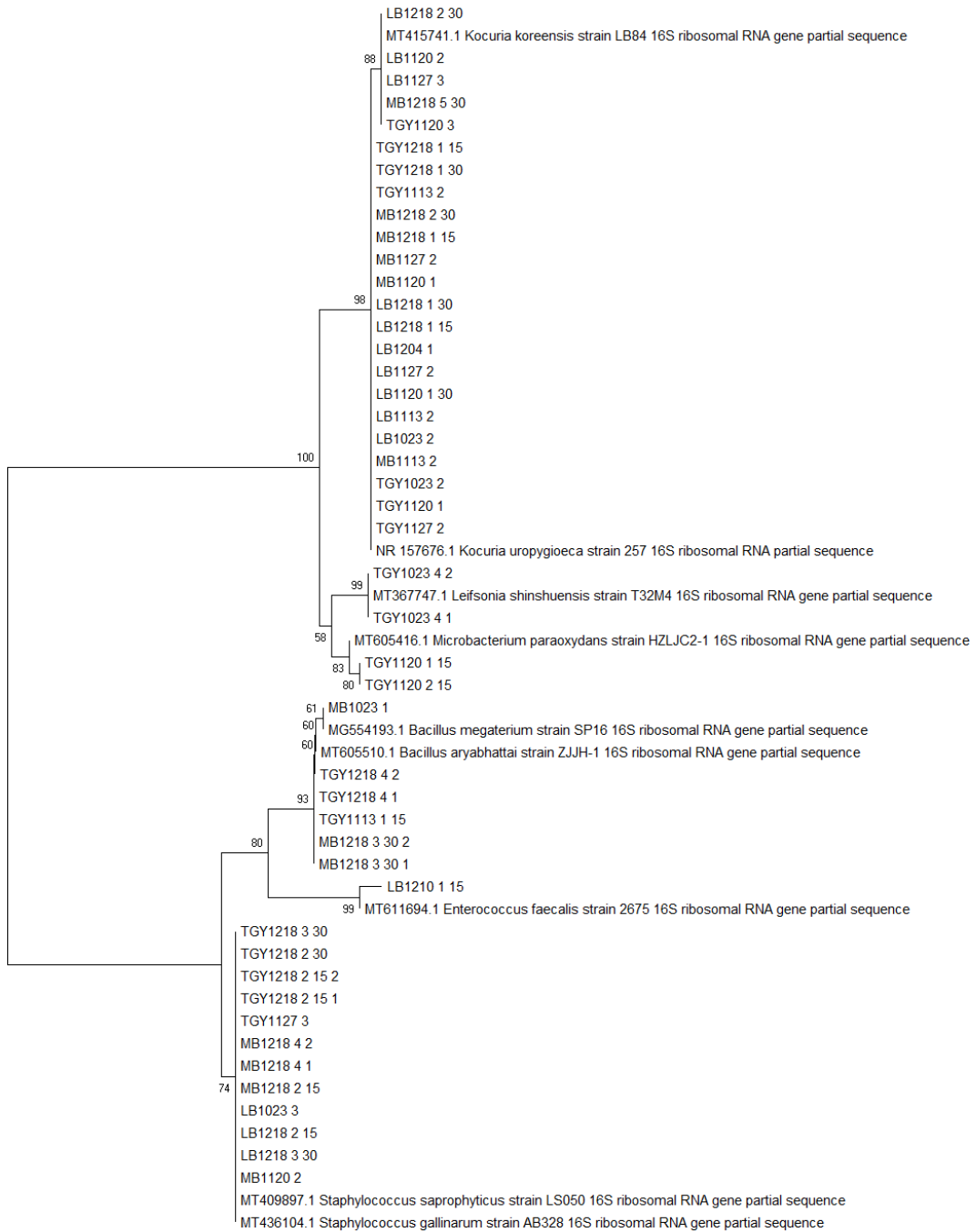
表 3-4 酒ラックから分離されたバクテリア

Sampling point	Isolate	Genus
底	B1	<i>Kocuria</i>
	B2	<i>Microbacterium</i>
	B3	<i>Cellulomonas</i>
	B4	<i>Demacoccus</i>
持ち手	H1	<i>Kocuria</i>

表3-3 初添えおよび膠から分離されたバクテリア

Sample	Isolate	Genus	Sample	Isolate	Genus
初添え1	MB1023_1	<i>Bacillus</i>	初添え6	MB1218_3_30_1	<i>Bacillus</i>
	LB1023_2	<i>Kocuria</i>		MB1218_3_30_2	<i>Bacillus</i>
	TGY1023_2	<i>Kocuria</i>		TGY1218_4_1	<i>Bacillus</i>
	TGY1023_4_1	<i>Leifsonia</i>		TGY1218_4_2	<i>Bacillus</i>
	TGY1023_4_2	<i>Leifsonia</i>		LB1218_1_15	<i>Kocuria</i>
	LB1023_3	<i>Staphylococcus</i>		LB1218_1_30	<i>Kocuria</i>
初添え2	TGY1113_1_15	<i>Bacillus</i>		LB1218_2_30	<i>Kocuria</i>
	LB1113_2	<i>Kocuria</i>		MB1218_1_15	<i>Kocuria</i>
	MB1113_2	<i>Kocuria</i>		MB1218_2_30	<i>Kocuria</i>
	TGY1113_2	<i>Kocuria</i>		MB1218_5_30	<i>Kocuria</i>
	LB1120_1_15	<i>Enterococcus</i>		TGY1218_1_15	<i>Kocuria</i>
	LB1120_1_30	<i>Kocuria</i>		TGY1218_1_30	<i>Kocuria</i>
初添え3	LB1120_2	<i>Kocuria</i>	LB1218_2_15	<i>Staphylococcus</i>	
	MB1120_1	<i>Kocuria</i>	LB1218_3_30	<i>Staphylococcus</i>	
	TGY1120_1	<i>Kocuria</i>	MB1218_2_15	<i>Staphylococcus</i>	
	TGY1120_3	<i>Kocuria</i>	MB1218_4_1	<i>Staphylococcus</i>	
	TGY1120_1_15	<i>Microbacterium</i>	MB1218_4_2	<i>Staphylococcus</i>	
	TGY1120_2_15	<i>Microbacterium</i>	TGY1218_2_15_1	<i>Staphylococcus</i>	
初添え4	MB1120_2	<i>Staphylococcus</i>	TGY1218_2_15_2	<i>Staphylococcus</i>	
	LB1127_2	<i>Kocuria</i>	TGY1218_2_30	<i>Staphylococcus</i>	
	LB1127_3	<i>Kocuria</i>	TGY1218_3_30	<i>Staphylococcus</i>	
	MB1127_2	<i>Kocuria</i>	LB2	<i>Bacillus</i>	
	TGY1127_2	<i>Kocuria</i>	LB3	<i>Bacillus</i>	
	TGY1127_3	<i>Staphylococcus</i>	LBjs1	<i>Bacillus</i>	
初添え5	LB1204_1	<i>Kocuria</i>	MB1	<i>Bacillus</i>	
			MBjs1	<i>Bacillus</i>	
			TGY2	<i>Bacillus</i>	

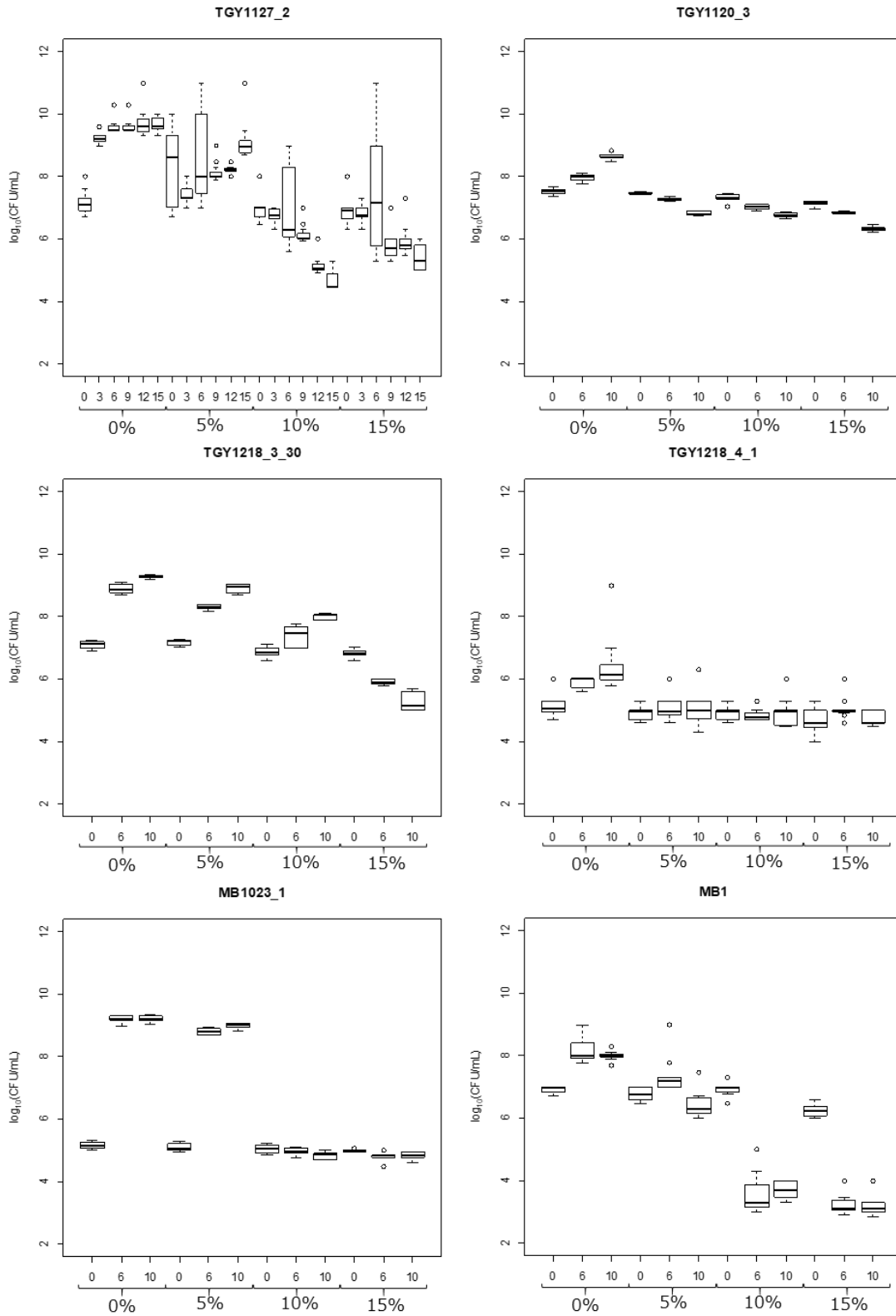
図 3-2 初添えから分離したバクテリアとその近縁種からなる系統樹



3-2-5. 分離バクテリアのエタノール条件下における生育

いずれの分離株も、培養最終日までコロニー形成が見られた。日本酒造りから分離したバクテリアは 15%エタノール条件下で 15°C、10 日間培養の場合、死滅しないことが分かった。TGY1127_2 と TGY1218_3_30、MB1023_1 はエタノール存在下でもコロニー数の増加が見られ、増殖している。TGY1120_3 はエタノール存在下における増殖は見られないが、15%エタノール条件下において培養 10 日目に 10^6 cells/mL のコロニーを形成し、本実験では最も多い。TGY1127_2 と TGY1120_3 はいずれも *Kocuria* だが、近縁種が異なり、エタノール条件下における生育も異なる。同様に、*Bacillus* の TGY1218_4_1、MB1023_1 および MB1 も異なる生育を示した。

図 3-3 分離株におけるエタノール存在下の生菌数



縦軸はコロニー数、横軸は培養日数を示す。

3-4. 小括

本章では、成政酒造の初添えサンプルから 46 株、異なる酒造会社の醪サンプルから 6 株のバクテリアを分離した。初添えサンプルから分離したバクテリアは *Kocuria*、*Staphylococcus*、*Bacillus*、*Leifsonia*、*Microbacterium* および *Enterococcus* の 6 系統に分類された。醪サンプルからの分離バクテリアは全て *Bacillus* であった。成政酒造の濁り酒サンプルおよび製造過程サンプルのバクテリア菌叢解析では、*Kocuria* だけが 20%以上の検出率を示した。*Enterococcus*、*Leifsonia*、*Microbacterium* はいずれのサンプルにおいても検出されず、*Bacillus* と *Staphylococcus* は 8%未満の検出率であった。*Kocuria* は全ての初添えサンプルから分離されたことを考慮すると、*Kocuria* は成政酒造の日本酒造りに頻繁に入るバクテリアであるが、他の 5 系統のバクテリアは偶然に混入したバクテリアと考えられる。初添えおよび醪サンプルから分離された株の近縁種の多くは発酵食品からの分離報告があり（表 3-4）、発酵条件下においても生育可能な株である [Kaneoka et al., 2014; Ling et al., 2011; Onda et al., 2003; Ozmen et al., 2010; Park et al., 2010]。日本酒造りから分離したバクテリアは 15%のエタノール条件下でも 10 日間培養の場合、コロニーを形成し、死滅しないことを明らかにした。

異なる時期の初添えサンプルすべてから *Kocuria* が分離され、さらに *Kocuria* の DNA は先の 58 サンプルの日本酒と酒粕のバクテリア菌叢解析において、成政酒造の 3 サンプルから検出された。成政酒造の酒ラックからも 2 株の *Kocuria* が分離された。*Kocuria* は成政酒造の酒蔵特有のバクテリア、すなわち蔵付きバクテリアである。

表 3-4 本研究において分離された株と同属バクテリアの発酵食品における分離報告

Genus	Species	Origin	References
<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>	麴	Kaneoka et al., 2014
	<i>B. subtilis</i>	麴	Kaneoka et al., 2014
	<i>B. species</i>	チョッカル	Ling et al., 2011
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	チーズ	Ozmen et al., 2010
	<i>E. faecalis</i>	ソーセージ	Ozmen et al., 2010
<i>Kocuria</i>	<i>K. kristinae</i>	発酵中の味噌	Onda et al., 2003
	<i>K. kristinae</i>	発酵中のビール	MATOUKOVÁ et al., 2018
	<i>K. species</i>	チョッカル	Ling et al., 2011
	<i>K. koreensis</i>	発酵魚介類	Park et al., 2010
	<i>K. varians</i>	発酵中のビール	MATOUKOVÁ et al., 2018
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. gallinarum</i>	発酵中の味噌	Onda et al., 2003
	<i>S. Kloosii</i>	発酵中の味噌	Onda et al., 2003
	<i>S. species</i>	チョッカル	Ling et al., 2011

第4章 蔵付きバクテリア *Kocuria* の分離とゲノム解析

4-1. 序論

現代の日本酒造りにて使われる酵母は「きょうかい酵母」と言い、日本醸造協会が管理・販売している。きょうかい酵母が使われる以前は、それぞれの酒蔵に住み着く独自の酵母を利用していた。この酒蔵独自の酵母を「蔵付き酵母」と呼ぶ。きょうかい酵母も、元々は特定の蔵に住み着く蔵付き酵母であった[Ohya et al., 2019]。蔵付き酵母は「野生酵母」に分類され、日本酒造りに混入する場合もある[木村, 2016]。

前章にて、成政酒造の蔵付きバクテリア *Kocuria* の存在を明らかにした。この *Kocuria* 分離株は成政酒造の酒蔵に住み着き、日本酒造りのタンクへ入ると考えられる。醸造りでは乳酸によって酸性条件下となり、醗造りでは日本酒酵母のアルコール発酵によってエタノール条件下となる。微生物は、自身にとって生育が困難な環境に直面した時、遺伝子の水平伝播により環境に適応する[Aminov et al., 2011]。日本酒造りの過程で、蔵付きバクテリアが頻繁にタンクに入る場合、そのバクテリアの性状は日本酒造りの環境へと適応すると考えられる。

本章では、初添えから分離された系統の異なる *Kocuria* 分離株 2 株の全ゲノムを明らかにし、既知の *Kocuria* ゲノムと比較を行い、*Kocuria* 分離株のゲノムにおける特徴を調べた。さらに、*Kocuria* 分離株と実際に成政酒造にて使用されているきょうかい酵母 14 号の共培養を行い、日本酒酵母生育やエタノール生産への影響を調べた。成政酒造の初添えに *Kocuria* が混入していることから、成政酒造の味や風味に *Kocuria* が寄与している可能性が高い。*Kocuria* 分離株が日本酒酵母の生育および代謝を変化させた場合、日本酒の味や風味への蔵付きバクテリアの影響を示すことができると考えている。

4-2. 実験方法

4-2-1. 初添えから分離された *Kocuria* の全ゲノム解析

Kocuria 系統に属する TGY1127_2、TGY1120-3 の全ゲノム解析を行った。TGYm1 寒天培地上のコロニーを TGYm1 液体培地に懸濁、15°Cにて振とう培養した（培地の組成は次頁にて後述）。遠心（3000g, 10分）により集菌した。株式会社ジーンベいの Nanopore シーケンス受託サービスを利用し（<http://genebay.co.jp/nanopore/>）、分離株の全ゲノム配列を決定した。

4-2-2. 異なる温度における *Kocuria* 分離株の増殖曲線

5°C, 15°C, 30°Cにおける *Kocuria* 分離株の増殖曲線を調べた。TGY1120_3 と TGY1127_2 のシングルコロニーをかきとり、TGY 液体培地にて一晚振とう培養（30°C, 150 rpm）した。OD₆₀₀=0.1 となるように TGY 液体培地で希釈した培養液を OD₆₀₀=1.0 となるまで振とう培養（30°C, 150 rpm）した。培養液を 100 倍希釈となるように TGY 液体培地に添加し、各培養温度で 30 日間静置培養した。5 日毎に、培養液を TGY 寒天培地上にまいて生菌数を調べた。

使用培地

TGY 培地

Tryptone（ナカライ）	5 g/L
Glucose（和光）	1 g/L
Yeast Extract（ナカライ）	3 g/L

※寒天培地には寒天末（ナカライ）15 g/L を添加

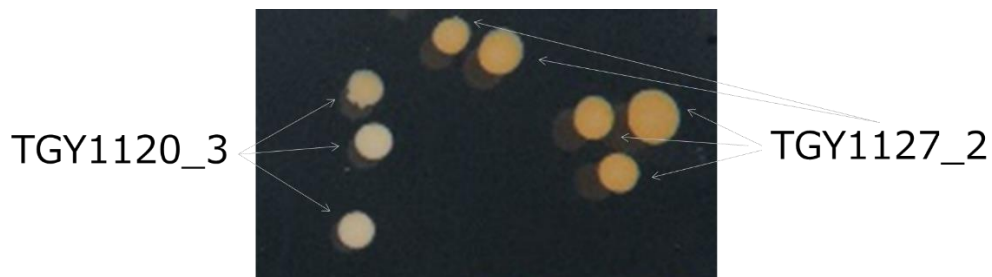
4-2-3. TGYm2 培地における日本酒酵母 *Kocuria* 分離株の共培養

日本酒酵母の生育およびエタノール生成への *Kocuria* 分離株の影響を調べるために、TGYm2 培地における日本酒酵母 K1401（きょうかい 14 号）と *Kocuria* 分離株の共培養を行った。TGY1120_3 と TGY1127_2 のシングルコロニーをかきとり、TGYm1 液体培地にて一晩振とう培養（30°C, 150 rpm）した。OD₆₀₀=0.1 となるように TGYm1 液体培地で希釈した培養液を OD₆₀₀=1.0 となるまで振とう培養（30°C, 150 rpm）した。培養液を 100 倍希釈となるように TGYm2 液体培地に添加し、15°C で静置培養した。アルコール発酵の反応式から、日本酒酵母のアルコール発酵によるエタノール濃度が一般的な日本酒と同等の 20% となるように TGYm2 培地の Glucose を 300 g/L 添加した。



経時的にサンプリングを行い、生菌数とエタノール濃度の変化を調べた。*Kocuria* 選択培地の TGYm1c 寒天培地、日本酒酵母選択培地の TGYm1k 寒天培地に 10 倍ごとに段階希釈した培養液を 5 μ L ずつまいて生菌数を調べた。2 つの *Kocuria* 分離株はコロニーの色によって判別することができる（図 4-1）。エタノール濃度は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて分析した。カラムは Aminex HPX-87H カラム（7.8 mm \times 300 mm; Bio-Rad）を用い、サンプル 5 μ L を移動相 5 mM H₂SO₄ と共に流速 0.6 mL/min で溶出した。ショウデックス示差屈折率検出器 RI-71（昭和電工）を用いてエタノール濃度を検出した。

図 4-1 TGY1120_3 と TGY1127_2 のコロニー



使用培地

TGYm1 培地

Tryptone (ナカライ)	20 g/L
Glucose (和光)	20 g/L
Yeast Extract (ナカライ)	10 g/L

TGYm2 培地

Tryptone (ナカライ)	20 g/L
Glucose (和光)	300 g/L
Yeast Extract (ナカライ)	10 g/L

TGYm1c 寒天培地 (*Kocuria* 選択培地)

Tryptone (ナカライ)	20 g/L
Glucose (和光)	20 g/L
Yeast Extract (ナカライ)	10 g/L
Agar (ナカライ)	15 g/L
Cycloheximide (和光)	0.5 mg/L

TGYm1k 寒天培地 (日本酒酵母選択培地)

Tryptone (ナカライ)	20 g/L
Glucose (和光)	20 g/L
Yeast Extract (ナカライ)	10 g/L
Agar (ナカライ)	15 g/L
Kanamycin (和光)	0.5 g/L

4-2-4. TGYm2 培地における *Kocuria* DNA のリアルタイム PCR

エタノール条件下において *Kocuria* 細胞が溶菌するかを調べるために、TGYm2 培地の上清および沈殿における *Kocuria* の DNA をリアルタイム PCR によって測定した。培養 33 日目の TGYm2 培地における三者培養液をサンプリングし、150,000 rpm で 15 分遠心を行い、上清と沈殿に分けた。TGY1120_3 と TGY1127_2 のクロモソームそれぞれに特異的なプライマーセットを使用した。

プライマー配列

<i>Kocuria</i> 分離株	Sequence (5' → 3')
TGY1120_3	F CTGGAGATCGGTGGGTTTCAC
	R TGAGAATCGCGAACCCCTTC
TGY1127_2	F CGACAAGACTCACCTGTTCG
	R CTCGACGTCGTAGCAGATCA

PCR 条件

	Temp(°C)	Ramp(°C/s)	Hold	Acquire
Hold	95	5	10 min	
2-Step Amplification	95	5	10 sec	
(45 cycles)	70	4	30 sec	✓
Melting	Initial Stage	60	4	20 sec
	Final Stage	95	0.1	1 sec

4-2-5. 麴溶液における *Kocuria* と日本酒酵母の共培養

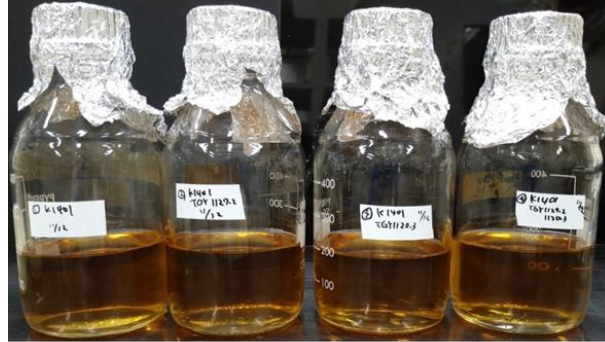
日本酒造りに近い環境における日本酒酵母のエタノールおよび有機酸生成への *Kocuria* 分離株の影響を調べるために、麴溶液における日本酒酵母 K1401（きょうかい 14 号）と *Kocuria* 分離株の共培養を行った。4-2-3 と同様に前培養を行い、OD₆₀₀=1.0 の培養液を 100 倍希釈となるように麴溶液に添加した。麴溶液は麴 30 g（新村こうじみそ 商店）を添加し、蒸留水で 300 mL にメスアップしたものを使用した。麴溶液は 15°C で静置培養した。

経時的にサンプリングを行い、エタノールと有機酸の濃度変化を調べた。エタノール濃度は前章と同様に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて分析した。UV 検出器により、波長 210 nm の吸収から有機酸を検出した。

いであ株式会社の OPA/FMOC によるプレラベル化 HPLC 法による遊離アミノ酸分析サービス (<https://ideacon.jp/>) を利用し、培養 23 日目の遊離アミノ酸組成を分析した。80%メタノールを添加し、タンパク質沈殿を行った。遠心後、上清を 0.2 μm 遠心フィルターでろ過し不溶物を除いた。OPA-3MP 溶液を加えて第 1 級アミノ酸をラベル化した。FMOC 溶液を加えて第 2 級アミノ酸をラベル化した。HPLC にアプライシ分析を行った。

図 4-2 TGYm2 培地と麴溶液の培養のようす

TGYm2培地



麴溶液



4-3. 結果と考察

4-3-1. *Kocuria* 分離株の全ゲノム解析

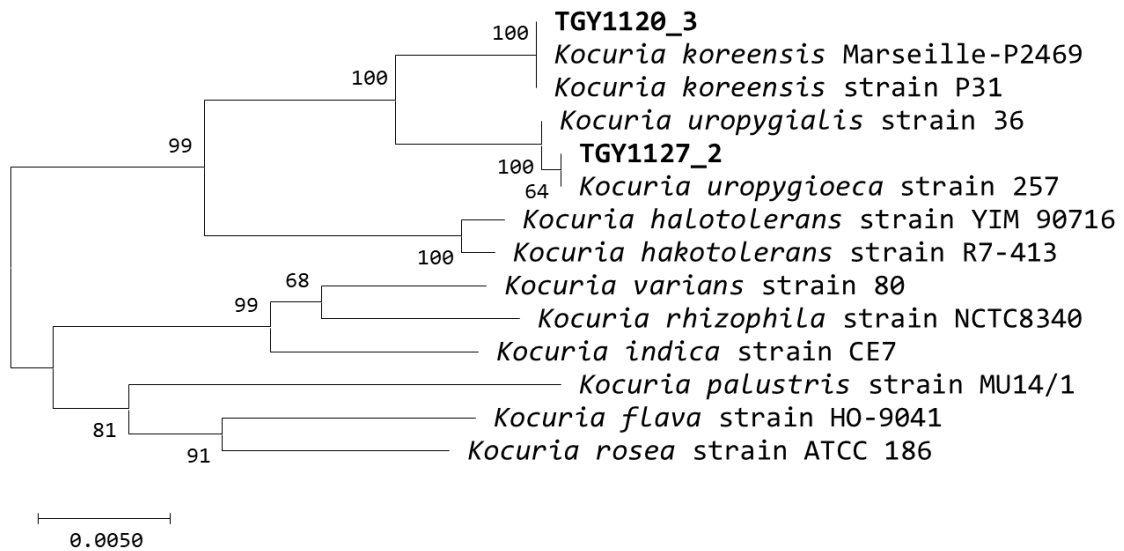
Kocuria 分離株のゲノム概要を表 4-1 に示す。TGY1120_3 は塩基長 2,838,001 bp のクロモソーム (Accession number AP022830) と 32,375 bp、32,277 bp、27,385 bp のプラスミド 3 つ (pTGY1120_3_1、pTGY1120_3_2、pTGY1120_3_3 それぞれ Accession number AP022831、AP022832、AP022833) を持ち、TGY1127_2 は塩基長 2,963,611 bp のクロモソーム (Accession number AP022834) と 33,410 bp のプラスミド 1 つ (pTGY1127_2_1: Accession number AP022835) を持つ。*Kocuria* 分離株の保有するプラスミドはいずれも宿主よりも低い GC 含量を示す。

表 4-1 *Kocuria* 分離株における全ゲノム解析の概要

	Size (bp)	GC 含量 (%)	遺伝子数
TGY1120_3			
クロモソーム	2,838,001	64.8	
pTGY1120_3_1	32,375	59.6	2,556
pTGY1120_3_2	32,277	58.7	
pTGY1120_3_3	27,385	58.6	
TGY1127_2			
クロモソーム	2,963,611	60.9	2,648
pTGY1127_2_1	33,410	60.3	

NCBIにて公開されている *Kocuria* 属の 16S rDNA 配列との比較により、系統樹を作成した (図 4-3)。MEGA X [Kumar et al, 2018]を用い、近隣結合法により系統樹を作成した。1407 塩基を比較した。その結果、TGY1120_3 と TGY1127_2 はそれぞれ *Kocuria koreensis*, *Kocuria uropygioeca* に近縁であり、*Kocuria* 分離株は種レベルの違いがある。*K. koreensis* は発酵魚介類と角膜炎の患者からの分離報告がある [Inaba et al., 2017]。 *K. uropygioeca* はキツツキの尾腺から分離された [Braun et al., 2018]。

図 4-3 *Kocuria* 属における完全長 16S rDNA 配列の比較



TGY1120_3 は3つのプラスミドを保有し、TGY1127_2 は1つのプラスミドを保有している。TGY1120_3 のクロモソーム2ヶ所およびプラスミド pTGY1120_3_2 の1ヶ所、TGY1127_2 のプラスミド pTGY1127_2_1 の1ヶ所の計4ヶ所には、ISL3 ファミリーに属する ISAar30 トランスポゼースをコードする遺伝子が存在する (表 4-2)。これら4つの配列は 1308 bp にわたり完全一致する。トランスポゼースは転移因子であるトランスポゾンが細胞内でゲノム上を転移させるために必要な酵素である[伊藤, 2013; Sadava et al., 2010]。このトランスポゼースコーディング配列を持つプラスミドを介して、*Kocuria* は分離株間で水平伝播を行っている可能性がある。TGY1120_3 はその他にもクロモソームおよびプラスミドに計4ヶ所のトランスポゼースコーディング配列を持つ。

表 4-2 *Kocuria* 分離株のゲノム上におけるトランスポゼースコーディング配列

Nucleotide position		product
start	end	
TGY1120_3		
135621	136928	ISL3 family transposase ISAar30
333370	334677	ISL3 family transposase ISAar30
1669222	1670226	IS481 family transposase ISRae1
pTGY1120_3_2		
20710	22017	ISL3 family transposase ISAar30
29542	30429	IS3 family transposase ISBli17
30426	30734	IS3 family transposase ISBli35
pTGY1120_3_3		
1	426	IS110 family transposase ISBma3
pTGY1127_2_1		
24559	25866	ISL3 family transposase ISAar30

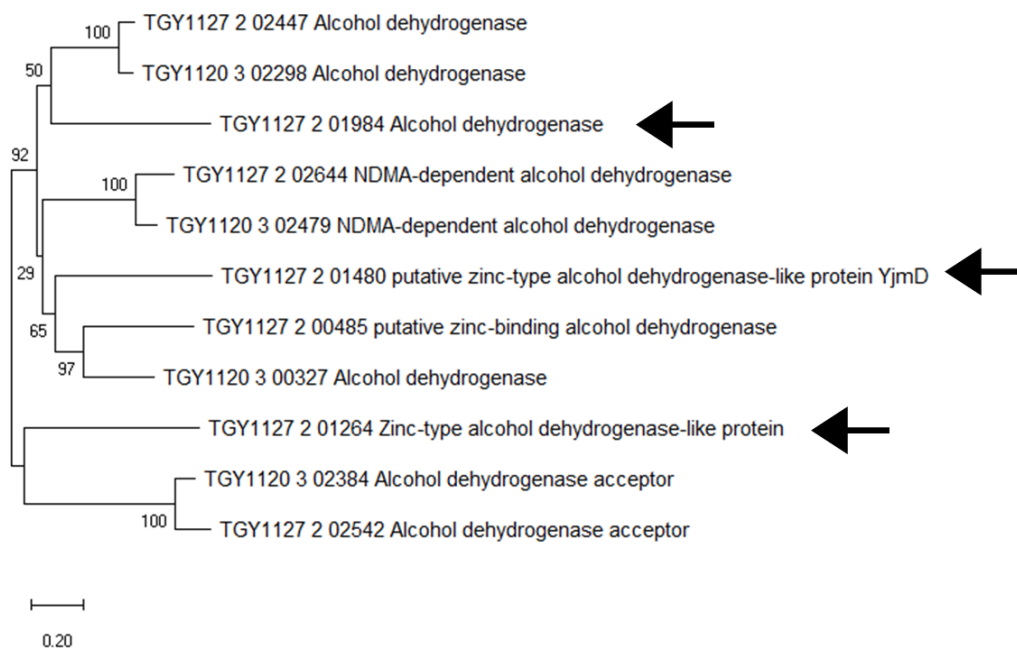
Kocuria は高 GC 含量のゲノムを持つ線菌である。NCBI にてゲノムが公開されている *Kocuria* はいずれも 60%以上の GC 含量を示す (表 4-4)。その多くが 68%以上の GC 含量を示す。*Kocuria* の GC 含量は 66-75%と言われており[Erko Stackebrandt et al., 1995]、それらの *Kocuria* と比較して、初添えからの *Kocuria* 分離株は GC 含量が低い。バクテリアゲノム上の突然変異では GC から AT への変異バイアスが生じる[R M Schaaper et al., 1991]。既知の *Kocuria* よりも GC 含量の低い *Kocuria* 分離株は突然変異が頻繁に生じている可能性がある。

表 4-3 *Kocuria* 分離株と既知の *Kocuria* におけるゲノム情報の比較

Size (Mb)	GC 含量 (%)	Size (Mb)	GC 含量 (%)
TGY1120_3		<i>K. rhizophila</i>	
2.84	64.8	2.7	71.2
TGY1127_2		<i>K. rosea</i>	
2.96	60.9	3.95	72.8
<i>K. koreensis</i>		<i>K. indica</i>	
2.91	64.5	2.81	68.7
<i>K. kristinae</i>		<i>K. varians</i>	
2.36	71.9	2.84	70.6

日本酒造りではエタノールによって大半のバクテリアは死滅すると考えられている。全ゲノム解析より、TGY1120_3 と TGY1127_2 はエタノールの耐性にかかわっていると考えられる。ADH (アルコール脱水素酵素) をコードする遺伝子をクロモソーム上に持つ (図 4-4)。TGY1120_3 は 4 個、TGY1127_2 は 7 個の ADH コーディング配列を持つ。それらの塩基配列を用い系統樹を作成した。系統樹より、TGY1120_3 が持つ 4 つの遺伝子と TGY1127_2 が持つ 4 つの遺伝子はそれぞれ 4 組のノードに分かれ、それぞれが同じ祖先を持つホモログであると分かった。TGY1127_2 のゲノム上には 3 つの特有な遺伝子があり、これらの遺伝子が発現する場合、TGY1127_2 は TGY1120_3 よりも高いエタノール耐性を持つ可能性がある。

図 4-4 *Kocuria* 分離株が持つ ADH 遺伝子



さらに、TGY1127_2 のゲノム上にはウレアーゼクラスターが存在している。ウレアーゼは尿素を二酸化炭素とアンモニアに変換する[Moran et al., 2013]。日本酒造りにおいて、酛造りでは乳酸によって酸性条件下となるが、アンモニアによって酸の影響が低減される可能性がある。

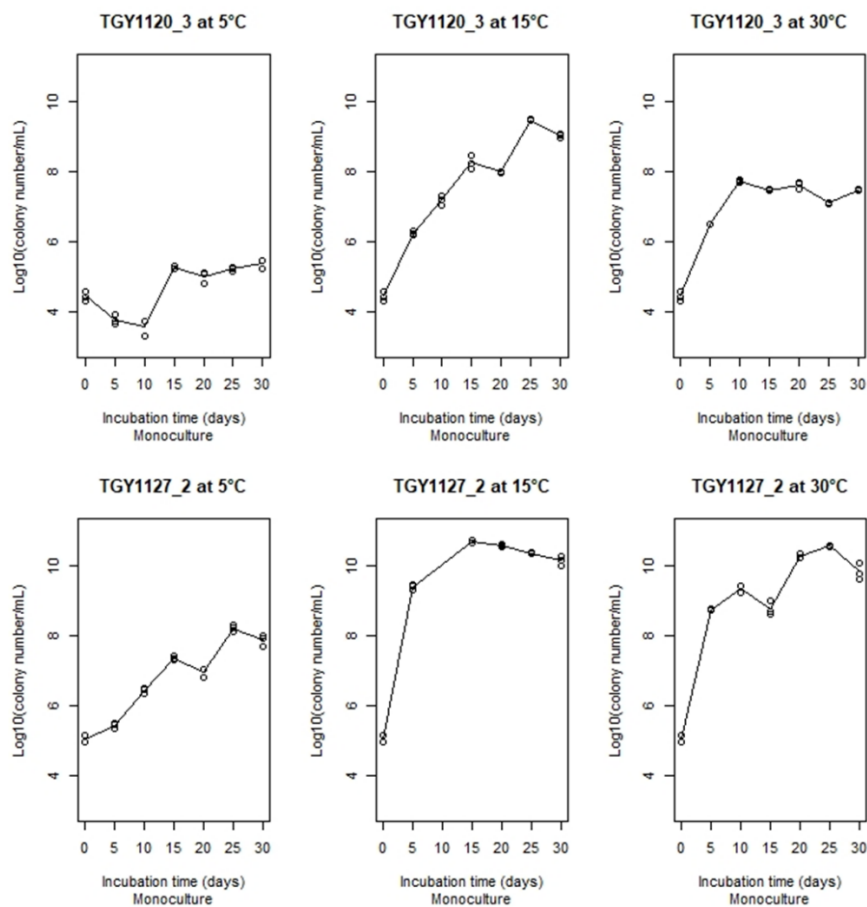
表 4-4 TGY1127_2 におけるウレアーゼクラスター

Nucleotide position		symbol	product
start	end		
1,124,184	1,124,486	ureA	Urease subunit gamma
1,124,502	1,124,930	ureB	Urease subunit beta
1,124,956	1,126,671	ureC	Urease subunit alpha
1,126,701	1,127,189	ureE	Urease accessory protein UreE
1,127,170	1,127,883	ureF	Urease accessory protein UreF
1,127,909	1,128,520	ureG	Urease accessory protein UreG
1,128,521	1,129,423	ureD1	Urease accessory protein UreD
1,129,462	1,130,556	nixA	Nickel transporter NixA
1,130,565	1,131,488		Urea transporter

4-3-2. 異なる温度における *Kocuria* 分離株の増殖曲線

異なる温度における TGY1120_3 と TGY1127_2 の生育を調べた。TGY1120_3 と TGY1127_2 はどちらも、5°Cと 30°Cと比較して、15°Cにおける最大生菌数が多く、生育が最も良い (図 4-5)。TGY1120_3 の近縁種である *K. koreensis* の至適生育温度は 30°Cと 37°C [Park et al., 2010]、TGY1127_2 の近縁種である *K. uropygioeca* の至適生育温度は 35°C [Braun et al., 2018] であり、*Kocuria* 分離株は近縁の *Kocuria* よりも低い温度にて生育しやすいことが分かった。日本酒造りは 15°Cで行われる [Kanauchi, 2013] ことから、*Kocuria* 分離株は日本酒造り環境へと生育条件を適応させてきたことが考えられる。

図 4-5 異なる温度における *Kocuria* 分離株の増殖曲線



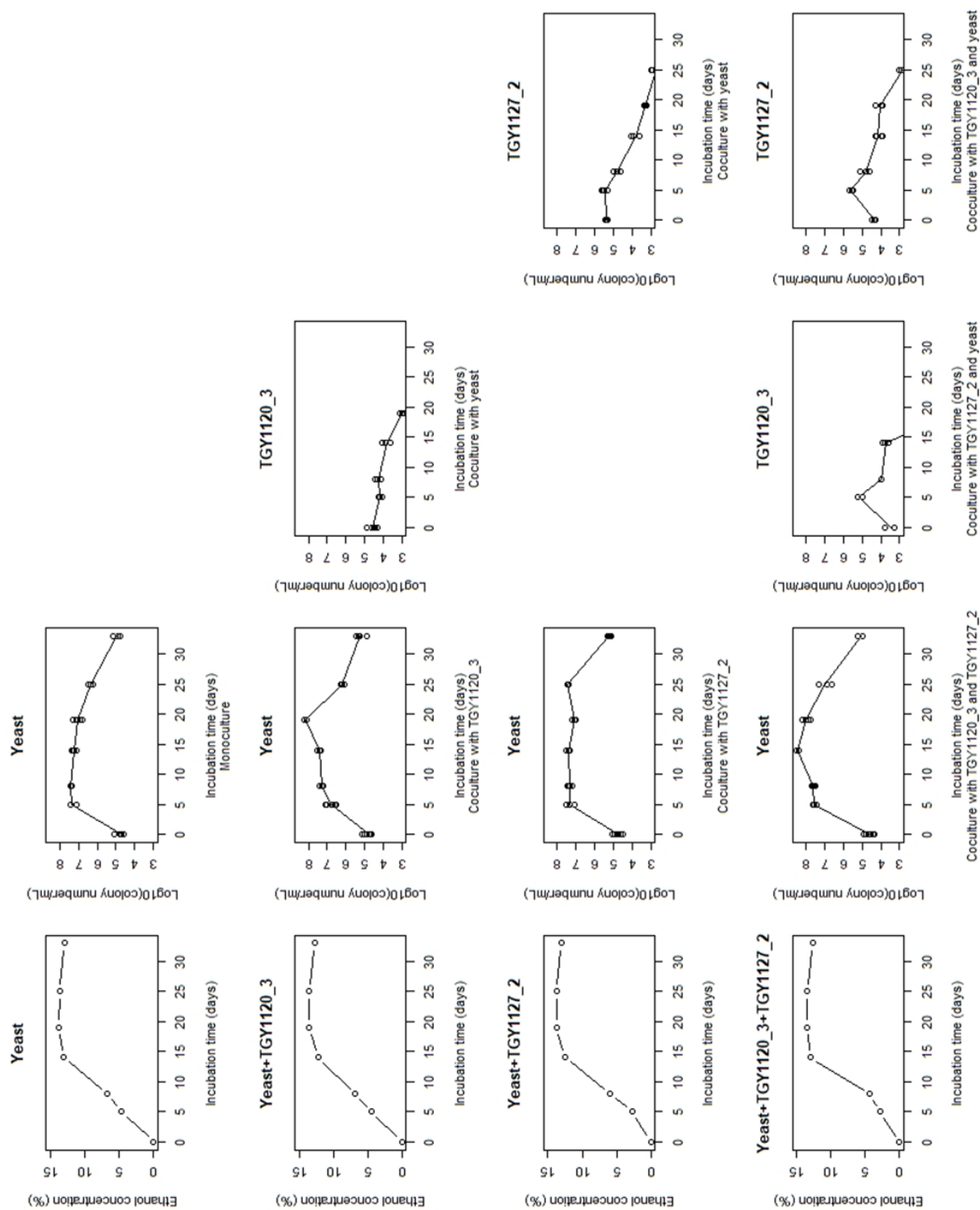
4-3-3. TGYm2 培地における日本酒酵母と *Kocuria* 分離株の共培養

TGYm2 培地での共培養におけるエタノール濃度および生菌数の変化を図 4-6 に示す。日本酒酵母の単培養と比較して、共培養時のエタノール濃度変化は類似していた ($p > 0.05$) (表 4-5, 図 4-6)。日本酒酵母は *Kocuria* 分離株との共培養にて、単培養と同様に生育した。TGY1120_3 は 19 日目以降、TGY1127_2 は 25 日目以降コロニーが形成されず、*Kocuria* 分離株は日本酒酵母との二者培養において増殖しないことが分かった。一方、*Kocuria* 分離株 2 株と日本酒酵母との三者培養では 5 日目まで TGY1120_3 および TGY1127_2 の増殖が見られ、それ以降は二者培養と同様に減少した。三者培養時、エタノール濃度は 8 日目で 4.3%を示し、この濃度は他の培養条件におけるエタノール濃度と比較すると低い (日本酒酵母の単培養は 6.7%, 日本酒酵母と TGY1120_3 の二者培養では 6.0%, 日本酒酵母と TGY1127_2 の二者培養 6.8%)。エタノール濃度が低いことによって、一時的に *Kocuria* 分離株が増殖できる状態であった可能性が高い。

表 4-5 エタノール濃度間に対応のある t 検定における P 値

Control (Yeast) vs.	P -value
Yeast + TGY1120_3	0.1634
Yeast + TGY1127_2	0.1453
Yeast + TGY1120_3 + TGY1127_2	0.0941

図4-6 TGYm2培地における日本酒酵母と*Kocuria*分離株の共培養におけるエタノール濃度と生菌数の変化



4-3-5. TGYm2 培地における *Kocuria* DNA の存在

リアルタイム PCR から得られた Cq (Cycle of Quantification) 値を表 4-5 に示す。*Kocuria* 分離株の DNA は TGY1120_3 と TGY1127_2 どちらも沈殿からのみ検出された。*Kocuria* は 50%エタノール条件下であっても溶菌しないことが報告されており [Fujita et al., 2006]、本研究においても *Kocuria* 細胞は溶菌せずに沈殿に存在することが示唆された。バクテリア菌叢解析においても *Kocuria* の DNA が酒粕と濁り酒のみから検出されており、この結果をサポートする。

表 4-6 培養 33 日目の三者培養 TGYm2 培地における *Kocuria* DNA の Cq 値

Sample	Primer Target	Cq value
上清	TGY1120_3	Not detected
		Not detected
		Not detected
	TGY1127_2	Not detected
		Not detected
		Not detected
沈殿	TGY1120_3	17.7
		17.7
		17.6
	TGY1127_2	19.8
		20.8
		21.4

4-3-6. 麴溶液における日本酒酵母と *Kocuria* 分離株の共培養

麴溶液での共培養におけるエタノール濃度および有機酸の変化を図 4-7 に示す。日本酒酵母の単培養と比較して、TGY1120_3 と日本酒酵母の二者培養、TGY1120_3 および TGY1127_2 と日本酒酵母の三者培養におけるエタノール濃度変化は類似していた ($p > 0.05$) (表 4-7, 図 4-7)。一方で、TGY1127_2 と日本酒酵母の二者培養時における日本酒酵母のエタノール濃度は高い ($p < 0.05$)。

本研究において、乳酸、クエン酸、コハク酸の 3 つの有機酸濃度変化を測定した。うち、クエン酸およびコハク酸濃度では有意差は無い ($p > 0.05$) が、乳酸では TGY1120_3 と日本酒酵母の二者培養において有意差が見られた ($p < 0.05$)。エタノールおよび乳酸の濃度変化では、三者培養では有意差が見られないにもかかわらず、エタノールにおいては日本酒酵母と TGY1127_2 との二者培養、乳酸においては日本酒酵母と TGY1120_3 との二者培養で有意差が生じた。*Kocuria* 分離株は両株が存在する場合、互いに相互作用し、日本酒酵母と乳酸の代謝に対する影響を抑制する可能性がある。

乳酸は培養初日では検出されなかったにもかかわらず培養最終日 (23 日目) では 40 mM を超え、有機酸の中で最も高い濃度を示した。この乳酸は、使用した麴由来の乳酸菌が乳酸を生成していると考えられる。生醸造りでは乳酸菌が乳酸を生産する [Kanauchi, 2013, Koyanagi et al., 2016]。したがって、麴溶液は生醸造りに近い環境であると言える。クエン酸濃度は最も低く、全麴溶液において 2.4 mM から 4.8 mM を示した。コハク酸の初期濃度は 11.8 mM から 19.4 mM と異なるが、すべての麴溶液において 5 日目にて減少し、それ以降増加が見られた。

クエン酸とコハク酸は TCA 回路の中間体である。好氣的条件下では酸化過程を経てコハク酸が消費され、嫌氣的条件下では還元的過程を経てコハク酸が生成される [Muratsubaki et al., 1987, Moran et al., 2013]。5 日目を境としたコハク酸濃度の変化は、

麹溶液を培養する瓶内の環境が好気的環境から嫌気的環境へのシフトしていることを示唆している。同様に、TGYm2 培地において観察された *Kocuria* 分離株の増殖およびエタノール濃度の低さも、TGYm2 培地を培養する瓶内が好気的条件であったためと考えられる。TGYm2 培地は 5 日目から 8 日目の間に嫌気的条件下となり、日本酒酵母によるエタノール発酵が始まったと考えられる。よって、*Kocuria* と日本酒酵母との共培養において、*Kocuria* の生菌数が減少するのは、エタノール濃度の上昇だけではなく、溶液中における酸素濃度の低下も影響している可能性が高い。

麹溶液の最終的なアミノ酸濃度は 4 つのサンプル間で類似していた (図 4-8)。グルタミン酸が最も量が多く、次いでアラニン、ロイシンであった。グルタミン酸とロイシンは酸味と渋味、アラニンは甘味と旨味を示すアミノ酸である[岩野ら, 2004a; 岩野ら, 2004b]。 *Kocuria* 分離株は日本酒酵母と乳酸菌のアミノ酸代謝に影響を与えない。

表 4-7 エタノール濃度および有機酸間に対応のある *t* 検定における *P* 値

Control (Yeast) vs.	<i>P</i> -value			
	エタノール	クエン酸	乳酸	コハク酸
Yeast + TGY1120_3	0.5785	0.2483	0.0430	0.6519
Yeast + TGY1127_2	0.0313	0.8178	0.2738	0.2353
Yeast + TGY1120_3 + TGY1127_2	0.0709	0.9626	0.2855	0.6775

図 4-8 麴溶液における最終的なアミノ酸組成

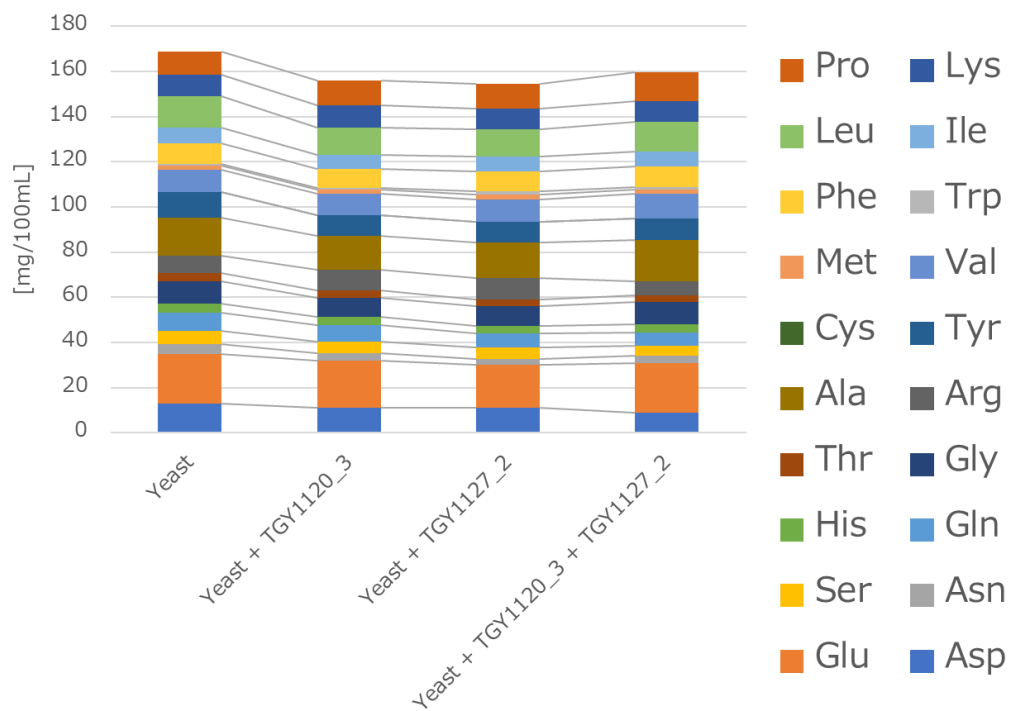
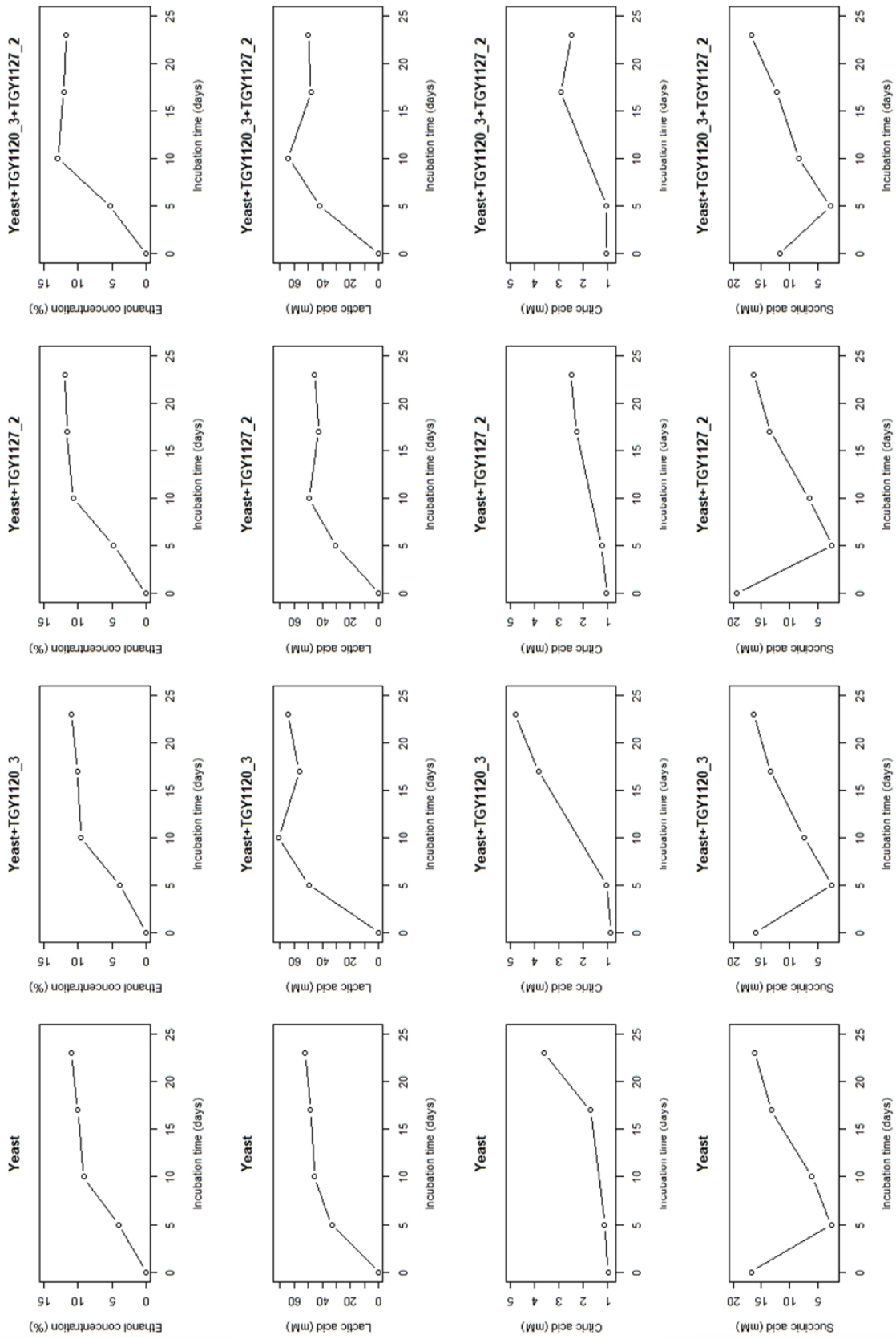


図4-7 懸溶液における清酒酵母とコクリアの共培養でのエタノールおよび有機酸の濃度変化



小活

本章では、蔵付きバクテリアと考えられる *Kocuria* 分離株の全ゲノム解析からそのゲノム情報の特徴を明らかにした。さらに、日本酒酵母との共培養を行い、*Kocuria* 分離株が日本酒酵母のエタノールおよび有機酸代謝に与える影響を調べた。

Kocuria 分離株の TGY1120_3 と TGY1127_2 はそれぞれプラスミドを保有し、その2株は種レベルで異なっている。TGY1120_3 のクロモソームおよびプラスミド、TGY1127_2 のプラスミドに同一配列のトランスポゼースコーディング遺伝子が存在した。この2株はプラスミドを介して株間で遺伝子のやり取りを行っている可能性がある。さらに、*Kocuria* 分離株の GC 含量が既知の *Kocuria* と比較して低いことから、*Kocuria* 分離株のゲノム上で突然変異が生じている可能性もある。

Kocuria 分離株において、TGY1127_2 のほうが ADH をコードする遺伝子が多く、さらにゲノム上にウレアーゼクラスターが存在していた。これらの遺伝子が発現している場合、TGY1127_2 はエタノール耐性を持ち、乳酸による酸性環境を中和することができる。さらに、初添えから分離された *Kocuria* 分離株は、近縁種の *Kocuria* と比較して生育温度が低い。ゆえに、*Kocuria* 分離株が日本酒造りの環境へと適応している可能性が高い。エタノールや酸を用いた培養実験により、*Kocuria* 分離株の性状を明らかにする必要がある。

TGYm2 培地および麹溶液の共培養実験はサンプル数が限られていた。コハク酸濃度変化が4サンプルで一致していることから再現性は得られているが、再現実験を行うことで有意差が生じる可能性がある。TGY1120_3 と TGY1127_2 はそれぞれ乳酸菌と日本酒酵母の代謝に影響を与えられとされる。一方、日本酒酵母と *Kocuria* 2株の三者培養では有意差は生じず、両株が存在する場合、互いに代謝への影響を抑制するかもしれない。実際の日本酒造りにおいては、*Kocuria* 以外にもバクテリアが混入してい

ると考えられ、より複雑な微生物間相互作用によって日本酒酵母が代謝に影響を受ける可能性は高い。日本酒造りの過程で混入する細菌は偶然に混入するものが多いため、仕込によって味や風味が異なると考えられる。そのため、実際の日本酒造りでは加水や、異なるタンク間の原酒をブレンドすることによって最終的な品質調整を行っている。

第 5 章 総括

これまでの日本酒造りと微生物の先行研究は、日本酒酵母の育種や麹菌の生成化合物に着目したものが多く[Ichikawa et al, 1991; Ito et al, 2009; Dahabieh et al, 2010]。しかし、開放系で造られている日本酒には酵母と麹菌、乳酸菌以外の細菌が混入し、それらの細菌が日本酒酵母や乳酸菌の代謝に影響を及ぼすことにより日本酒の味や風味まで影響を与えると考えた。本研究では、日本酒造りに混入する細菌に注目し、細菌菌叢解析および実際の日本酒造りからの細菌の分離、日本酒酵母との共培養実験を通して、細菌が日本酒の味や風味に寄与する可能性を調べた。

2 章では、日本酒とその造りの過程および酒粕の細菌菌叢解析を行った。酒粕の細菌菌叢は日本酒に比べて多様性が低いことから、酒粕において検出される細菌は日本酒造りの過程で細胞が破裂せずに日本酒酵母とともに沈殿する細菌であると考えられた。実際に日本酒造りにおいて混入し一時的に増殖した細菌の多くは酒粕に存在した。日本酒の細菌菌叢には地域や酒蔵に特徴的なものもあるが、その多くは偶然に混入した細菌 DNA だと考えられる。日本酒造りの過程における細菌菌叢解析からは、初添えが麹と醪の細菌菌叢の特徴を併せ持っており、初添え以降の醪は大きな変化が見られないことを明らかにした。複数の醪における細菌菌叢変遷を調べることで、その酒蔵に特徴的な細菌 DNA を見つけることができる可能性が高い。リアルタイム PCR では、低い Cq 値を示した日本酒から火落ち菌の DNA が検出され、日本酒の腐敗を DNA から知ることが可能であった。

初添えが醪および麹、醪の細菌菌叢の特徴を示すことから、日本酒造りにおいて混入する細菌を初添えから分離するのが好ましいと考えた。今回は属レベルの解析を行ったが、さらに種や株レベルでの解析を行うことで、酒蔵に特有のバク

テリアを見つけることができるかもしれない。3章では、初添えからバクテリアの分離を行い、その系統解析を行った。成政酒造の初添え6サンプルから46株のバクテリアを分離した。全ての初添えサンプルから *Kocuria* が分離された。*Kocuria* は先のバクテリア菌叢解析において、成政酒造の日本酒と酒粕からのみ分離され、さらに成政酒造の酒ラックからも分離された。以上の結果から、*Kocuria* は成政酒造の「蔵付きバクテリア」であると言える。成政酒造とは異なる酒造会社で造られた発酵後期の醪からもバクテリアの分離を行い、*Bacillus* 6株が分離された。初添えおよび醪からの分離株をエタノール条件下で培養したところ、それらの分離株は15%エタノール条件下でも増殖はできないが、死滅しないことが明らかになった。しかし、15%エタノール条件下で増殖するバクテリアはおらず、これらのバクテリアが腐敗に影響を及ぼさないと考えられる。実際、それらのバクテリアが分離された日本酒は何ら品質の問題もなく市販されている。成政酒造と同様に、特定の酒蔵で造られた複数の醪サンプルからバクテリアを分離することで、*Kocuria* のような蔵付きバクテリアを見つけることができると考える。

蔵付きバクテリアの *Kocuria* 分離株は2つのグループに分類される。各グループから分離株 TGY1120_3 と TGY1127_2 を選び出し、その2株の全ゲノム解析を行った。ゲノム解析および培養実験結果から、*Kocuria* 分離株が日本酒造りの環境へ適応している可能性が示唆された。さらに、*Kocuria* 分離株と日本酒酵母の共培養の結果、TGY1120_3 と TGY1127_2 はそれぞれ乳酸菌と日本酒酵母の代謝に影響を及ぼすことが分かった。日本酒造りではさらに複雑な微生物叢があると考えられるため、微生物相互によって日本酒の味や風味に影響を受けている可能性は高い。さらに、リアルタイムPCRによって *Kocuria* のDNAが酒粕や醪に含まれていることが分かり、2章にて示された仮定を裏付けた。

本研究では、日本酒造りへのバクテリアの混入を明らかにし、さらに酒蔵に存在す

る蔵付きバクテリアの存在を示した。蔵付きバクテリア *Kocuria* の存在が明らかになったことから、他の酒蔵においても特有のバクテリアが生育していると考えられる。さらに、それらのバクテリアは1種ではなく複数種存在しており、それぞれで微生物相互作用を行っている可能性が高い。このバクテリアの発見は、日本酒造りでこれまで雑菌とされていたバクテリアの新たな可能性を示している。それぞれの酒造会社における蔵付きバクテリアを明らかにすることで、それぞれの酒蔵特有の味や風味の一因を知ることができるだろう。バクテリアによってアミノ酸や有機酸濃度を制御することができるならば、機能性日本酒を造ることも可能である。さらに、初添えに異なる酒蔵の蔵付きバクテリアを添加することで、従来の酒造りでは造れなかった味や風味の日本酒を造ることができるかもしれない。そのためには、蔵付きバクテリアが日本酒の品質へ影響を与えないことを証明する必要がある。年々、日本酒の出荷数は減少している[農林水産省, 2019]一方で、輸出量は増加している。日本酒造りを科学的に解明することで、日本酒造りをより安定かつ安価に大量生産し、輸出の拡大につながる。日本酒の国際性を高め、これからの日本酒需要を高める手助けになると考えている。

本研究の結果は、日本の文化伝統である日本酒の多様性の解明に貢献できるだけでなく、今後の日本酒産業に新しい風を吹き込むことができると考えている。

謝辞

本研究を行うにあたりまして、ご指導を賜りました富山県立大学大学院生物工学専攻 応用生物情報学研究室の西田洋巳 教授に心より深く御礼申し上げます。5年間、丁寧なご指導を頂き、日本酒研究の楽しさを教えて頂きました。大変お世話になりました。

本論文をまとめるにあたり有益なご助言、ご指導を賜りました同研究室 大島拓 准教授、機能性食品工学研究室 生城真一 教授、微生物工学研究室 五十嵐康弘 教授、石川県立大学 食品科学科 小柳喬 准教授に感謝を申し上げます。

研究を進めるにあたって、井上藍瑠さん、木村友妃子さん、赤池美咲さん、宮川滉都さん、福山明香利さん、宮川沙也加さんにご協力を頂きました。同じテーマを研究する仲間として支えて頂きました。有難うございました。

日本酒及び製造過程サンプルの採取は、成政酒造株式会社 山田雅人 博士、成政酒造の皆様にご協力いただきました。御礼申し上げます。森田裕介くんには製造過程サンプルのサンプリングの際にご協力を頂きました。有難うございました。

エタノールおよび有機酸の HPLC 分析は、本学 応用生物プロセス学研究室 戸田弘 講師にご協力頂きました。深く御礼申し上げます。アミノ酸分析は、佐賀大学 農学部 生物資源科学科 北垣浩志 教授にご協力頂きました。深く御礼申し上げます。バクテリア菌叢解析を進めるにあたって、解析方法からプログラミングなど様々なアドバイスを頂きました高橋裕里香 博士に御礼申し上げます。

応用生物情報学研究室の皆様にご御礼申し上げます。この研究室で過ごせたことを心から幸せに思います。特に、同期の高橋沙和子さんには、心から感謝しています。大学の友人として9年間、研究室に入ってから6年半、励まされてばかりで、いつも支えて頂きました。伊藤わかなさん、指宿幸紀さん、深町和貴さんには、博士論文作成に当たり、毎日美味しい食事を作って頂きました。本当に有難うございました。

最後に、博士後期課程への進学を快諾し、9年間の大学生活を支えてくれた両親に感謝いたします。研究生生活に癒しをくれた天国のミーちゃんと実家のおかゆに感謝いたします。

本研究は JSPS 科研費 20J14864 の助成を受けたものです。

寺 寄 桃 香

引用文献

Akaike M., Miyagawa H., Kimura Y., Terasaki M., Kusaba Y., Kitagaki H., & Nishida H (2020) Chemical and Bacterial Components in Sake and Sake Production Process. *Current Microbiology* 77(4): 632–637.

Rustam I. Aminov. (2011) Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 2: 158

Ann P. Wood and Don P. Kelly (1991) Isolation and characterisation of *Thiobacillus halophilus* sp. nov., a sulphur-oxidising autotrophic eubacterium from a Western Australian hypersaline lake. *Archives of Microbiology*, 156: 277–280

Kiwoon Baek, Ahyoung Choi. (2020) Complete Genome Sequence of *Phreatobacter* sp. Strain NMCR1094, a Formate-Utilizing Bacterium Isolated from a Freshwater Stream. *Microbiology Resource Announcements*, 8(37): 100860-19

Bokulich NA, Ohta M, Lee M, Mills DA (2014) Indigenous bacteria and fungi drive traditional kimoto sake fermentations. *Appl Environ Microbiol* 80:5522–5529

Braun MS, Wang E, Zimmermann S, Boutin S, Wink M. *Kocuria uropygioeca* sp. nov. and *Kocuria uropygialis* sp. nov., isolated from the preen glands of Great Spotted Woodpeckers (*Dendrocopos major*). *Syst Appl Microbiol.* (2018) 41: 38–43.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 7: 335–336

Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, and Kjelleberg S. (2007) Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Appl Environ Microbiol*, 73(1): 278-288

Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarski EB, Fox AJ (2000) Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1747-1752

Dahabieh MS, Husnik JI, Van Vuuren HJ (2010) Functional enhancement of Sake yeast strains to minimize the production of ethyl carbamate in Sake wine. *J of Appl. Microbiol*, 109: 963-973

Eduardo P.C. Rocha and Antoine Danchin. (2002) Base composition bias might result from competition for metabolic resources. *TRENDS in Genetics*, 18(6): 291-294

Erko Stackebrandt, Cathrin Koch, Oxana Gvozdiak, and Peter Schumann. (1995) Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(4): 682-692

Fujita K, Hagishita T, Kurita S, Kawakura Y, Kobayashi Y, Matsuyama A, Iwahashi H. (2006) The cell structural properties of *Kocuria rhizophila* for aliphatic alcohol exposure. *Enzyme Microbial Technol*, 39: 511–518.

Fukuda W, Yamada K, Miyoshi Y, Okuno H, Atomi H, Imanaka T. (2012) *Rhodoligotrophos appendicifer* gen. nov., sp. nov., an appendaged bacterium isolated from a freshwater Antarctic lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 62(Pt 8): 1945-1950.

G. D. Ferroni, L. G. Leduc, M. Todd. (1986) Isolation and Temperature Characterization of Psychrotrophic Strains of *Thiobacillus Ferrooxidans* from The Environment of A Uranium Mine. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 32(3): 169-175

Hara T., Aumayr A., & Ueda S, (1981) Genetic Transformation of *Pseudomonas Aeruginosa* with Extracellular DNA. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 27: 109–114.

Inaba N, Shoji J, & Yamagami S (2017) Atopic keratoconjunctivitis complicated by *Kocuria koreensis* keratitis: the first case. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 13

Jun Dai, Can Yu, Zhen Huang, Min Fan, Zhenhua Jia, Xin Li, Zhi Wang, Zhijun Li, Juan Yao, Pei Li, Guobin Zheng, Xiong Chen. (2016) Genome sequencing and annotation of *Kocuria turfanensis* HO-9042, to promote exploring high-salt resistance associated gene resources. *Journal of Biotechnology*, 224: 51-52

Kanauchi M. (2013) SAKE alcoholic beverage production in Japanese food industry. Food Industry chap 3: 39-63

Kaneoka M. (2014) 4-Vinylguaiacol Formation in Sake. Journal of The Brewing Society of Japan, 109(5): 320-326

Kim D, Yoon S, Kim T, Ki J, and Lee O. (2020) Newly recorded genus and species for freshwater cyanobacteria *Aerosakkonema funiforme* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) in Korea. Korean J. Microbiol, 56(3): 222-231

Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, & Glöckner F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Research, 41(1): 1–11.

Koyanagi T, Nakagawa A, Kiyohara M, Matsui H, Tsuji A, Barla F, Take H, Katsuyama Y, Tokuda K, Nakamura S, Minami H, Enomoto T, Katayama T, Kumagai H (2016) Tracing microbiota changes in yamahai-moto, the traditional Japanese sake starter. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 80(2): 399–406.

Konrad U. Foerstner, Christian von Mering, Sean D. Hooper¹ & Peer Bork. (2005) Environments shape the nucleotide composition of genomes. EMBO reports, 6(12): 1208-1213

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35: 1547-1549.

Kyoung Lee, Munkhtsatsral Ganzorig, Ji Yoon Jung, Sachin Kumar Badaya, Jae Yun Lim. (2019) Complete Genome Sequence of *Kocuria indica* CE7, Isolated from Human Skin. Microbiology Resource Announcements, 8(28)

Lamprinou V, Hernández-Mariné M, Canals T, Kormas K, Economou-Amilli A, Pantazidou A. (2011) Morphology and molecular evaluation of *Iphinoe spelaeobios* gen. nov., sp. nov. and *Loriellopsis cavernicola* gen. nov., sp. nov., two stigonematalean cyanobacteria from Greek and Spanish caves. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61(Pt 12): 2907-2915

Soon Dong Lee, Yochan Joung, Jang-Cheon Cho. (2017) *Phreatobacter stygius* sp. nov., isolated from pieces of wood in a lava cave and emended description of the genus *Phreatobacter*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67(9): 3296-3300

Ling Guan, Kyeung Hee Cho, Jong-Hoon Lee. (2011) Analysis of the cultivable bacterial community in *jeotgal*, a Korean salted and fermented seafood, and identification of its dominant bacteria. Food Microbiology, 28(1): 101-113

Lorenz MG, Wackernagel W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the Environment. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 58(3): 563–602

Mano H, Morisaki H (2008) Endophytic Bacteria in the Rice Plant. Microb Environ, 23: 109-117

Dagmar MATOULKOVÁ, Petra KUBIZNIAKO. (2018) Brewing Microbiology – *Kocuria* (*Micrococcus*) and Cultivation Methods for their Detection – Part1. Kvasný průmysl, 64(1)

Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen J. Y. Sato, K. Minamoto, T. Yamamoto, S. Yamanaka, H. Araki, H. Kondoh, M. & Iwasaki W. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. Royal Society Open Science, 2(7).

Mengzhou Zhou, Yi Zhang, Xin Li, Zhi Wang, Jingfeng Tang, Yang Mu, Chengxiang Fang, Xiong Chen, Jun Dai. (2016) Complete genome sequence of *Kocuria flava* strain HO-9041, a heavy metal removal bacterium from Xinjiang. Journal of Biotechnology, 220: 21-22

Moon Su Park, Youn-Je Park, Ji Young Jung, Seung Hyeon Lee, Woojun Park, Kangseok Lee and Che Ok Jeon. (2011) *Pusillimonas harenae* sp. nov., isolated from a sandy beach, and emended description of the genus *Pusillimonas*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61: 2901-2906

L A Moran, H R Horton, K G Scrimgeour, M D Perry (2013) ホートン生化学 (第 5 版) 東京化学同人

Mortensen JE, M C Fisher, J J LiPuma. (1995) Recovery of *Pseudomonas cepacia* and Other *Pseudomonas* Species from the Environment. Infect Control Hosp Epidemiol, 16(1): 30-32.

Myungjin Lee, Sung-Geun Woo, Myoungsoo Chae and Leonid N. Ten. (2010) *Pusillimonas soli* sp. nov., isolated from farm soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 2326-2330

Muratsubaki H. Regulation of reductive production of succinate under anaerobic conditions in baker's yeast. (1987) *J Biochem.* 102:705–714.

Ogihara H, Kawarai T, Furukawa S, Miyao S and Yamasaki M. (2009) Microfloral and Chemical Changes of Salted Pickles (*Suguki*) during Its Manufacturing Process. *Japanese Journal of Food Microbiology*, 26(2): 98-106

Ohya Y, Kashima M. History, lineage and phenotypic differentiation of sake yeast. (2019) *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83: 1442–1448.

S. Ozmen Togay, A. Celebi Keskin, L. Acik and A. Temiz. (2010) Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. *Journal of Applied Microbiology*, 109(3): 1084-1092

T. Onda, F. Yanagida, M. Tsuji, T. Shinohara and K. Yokotsuka. (2003) Time series analysis of aerobic bacterial flora during Miso fermentation. *Letters in Applied Microbiolog*, 37: 162–168

Park E-J, Roh SW, Kim M-S, Jung M-J, Shin K-S, Bae J-W. (2010) *Kocuria koreensis* sp. 306 nov., isolated from fermented seafood. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60: 140–143.

Paul, J. H., Jeffrey, W. H., & DeFlaun. M. F. (1987) Dynamics of extracellular DNA in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(1): 170–179.

Pietramellara G., Ascher J., Borgogni. F, Ceccherini. M. T, Guerri. G., & Nannipieri. P. (2009) Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45(3): 219–235.

Ravi K, Javier García-Hidalgo , Matthias Nöbel, Marie F. Gorwa-Grauslund and Gunnar Lidén. (2018) Biological conversion of aromatic monolignol compounds by a *Pseudomonas* isolate from sediments of the Baltic Sea. *AMB Express*, 8: 32

Sadava D (2010) 大学生物学の教科書 第2巻 分子遺伝学. 石崎泰樹, 丸山敬 監訳・翻訳 講談社

Schaaper RM and R L Dunn. (1991) Spontaneous mutation in the *Escherichia coli* lacI gene. *GENETICS*, 129(2): 317-326

Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.

Sami M., Sugiyama H., Uwagami H., Nakao M., Katoh R., & Uehigashi H. (2004) Effects of deep seawater on yeast during sake-fermentation. *Deep Ocean Water Research*, 5(1): 7–14.

Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X, Song W (2008) Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb Ecol*, 55:415-424

Suzuki K, Asano S, Iijima K and Kitamoto K (2008) Sake and Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria — A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(3): 209-223

Terasaki M, Fukuyama A, Takahashi Y, Yamada M, Nishida H (2017) Bacterial DNA detected in Japanese rice wines and the fermentation starters. *Current Microbiology*, 74: 1432-1437.

Terasaki M, Miyagawa S, Yamada M, Nishida H (2018) Detection of bacterial DNA during the process of sake production using sokujo-moto. *Current Microbiology*, 75: 874-879.

Terasaki M, Nishida H. (2020) Bacterial DNA Diversity among Clear and Cloudy Sakes, and *Sake-kasu*. *Open Bioinformatics Journal*, 13: 74-82

Van de Peer Y, Chapelle S, and Wachter R De. (1996) A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res*, 24(17): 3381–3391.

Wesley E. Kloos, Thomas G. Tornabene, and Karl H. Schleifer. (1974) Isolation and Characterization of Micrococci From Human Skin, Including Two New Species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24 (1): 79-101

Zahra Rezaeeyan, Atefeh Safarpour, Mohammad Ali Amoozegar, Hamid Babavalian, Hamid Tebyanian, Fatemeh Shakeri. (2017) High carotenoid production by a halotolerant bacterium, *Kocuria* sp. strain QWT-12 and anticancer activity of its carotenoid. EXCLI Journal, 16: 840-851

伊藤秀臣. (2013) 環境ストレスとゲノム進化 トランスポゾンの生物学的意義. 科学と生物, 51(9)

岩野君夫, 伊藤俊彦, 中沢伸重. (2004a) 吟醸酒, 純米酒, 本醸造酒及び普通酒のアミノ酸組成の特性. 日本醸造協会誌, 99(7): 526-533

岩野君夫, 高橋和弘, 伊藤俊彦, 中沢伸重. (2004b) 清酒の呈味性に影響を及ぼすアミノ酸の探索. 日本醸造協会誌, 99(9): 659-664

老川典夫. (2015). 日本酒の新たな呈味性成分「D-アミノ酸」. 日本醸造協会誌, 110(4): 189-197.

扇元敬司 (2002) バイオのための基礎微生物学 講談社

木村克己 監修 (2016) 日本酒の基礎知識 新星出版社

中里厚実, 保阪良雄, 武田正久, & 塚原寅次. (1984). 酵素剤仕込での高濃度アルコール生成に及ぼす窒素減とミネラルの影響. 日本醸造協会誌, 79(9): 642-646.

農 林 水 産 省 (2019) 日 本 酒 を め ぐ る 状 況

https://www.maff.go.jp/j/seisaku_tokatu/kikaku/attach/pdf/sake-5.pdf (2020/2/20 アクセス)

古川幸子. (2008). 米タンパク質がもたらす食味と酒造掛米適性の美味しい関係. 日本醸造協会誌, 103(3).

いであ株式会社「遊離アミノ酸分析」 <https://ideacon.jp/>

株式会社ジーンベイ「Nanopore シーケンス受託サービス」 <http://genebay.co.jp/nanopore/>

ユーロフィンジェネミクス株式会社 「DNA シーケンスサービス」

<https://www.eurofinsgenomics.jp/jp/service/dnasequence/overview.aspx>

補足資料

表 2-1 A, B 日本酒におけるバクテリア菌叢解析結果

表 2-2 酒粕におけるバクテリア菌叢解析結果

表 2-3 製造中および仕込水の日本酒サンプルにおけるバクテリア菌叢解析結果

