

工業用発酵エタノール中の DNA および タンパク質の分析

藤井桂子, 有馬克志, 佐藤理恵子, 後藤慎吾
(新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)
アルコール事業本部) 平成 16 年 10 月 4 日受理

Analysis of DNA and proteins contaminated in
fermented alcohol for industrial use

Keiko ISHIDA-FUJII, Katsushi ARIMA,

Rieko SATO, Shingo GOTO

R & D Center, Alcohol Enterprise Head Office, New Energy
and Industrial Technology Development Organization (NEDO),
Inagehigashi 4-5-1, Inage-ku, Chiba 263-0031, Japan

The amounts of DNA and proteins contaminated in
fermented ethanol rectified for industrial use were investi-
gated. Ethanol samples were evaporated to dryness,
then dissolved to TE buffer or ultra-pure water. DNA
was analyzed by the UV method, the Pico Green method
and the quantitative PCR analysis. Protein was mea-
sured by the Bradford method and the Micro BCA method.
Detection limits of each method were determined. It is
confirmed that any DNA and protein were not detected in
industrial ethanol products. Distillation tests adding
 λ DNA and BSA were performed. There is no DNA and
protein in distillates come from the distillation tests.
Fermentation and distillation tests using GM corn were
carried out. The amount of detectable DNA was gradu-
ally decreased during the fermentation and distillation
processes. DNA would be degraded and eliminated in the
processes. There were not any DNA and proteins de-
tected in the distillate produced from GM corns.

(Received October 4, 2004)

Key words: Fermented ethanol; DNA; Protein; GMO

工業用エタノールのうち発酵エタノールは、主にサト
ウキビ由来の糖みつ、ミカン果汁みつ、トウモロコシ、
キャッサバなどを原料として発酵および蒸留工程を経て
製造される。その用途は食品分野を中心に広範囲に利用
されている。最近、遺伝子組換え農作物 (GMO, genetically
modified organism) や、GMO または非 GMO 由

來タンパク質から懸念されるアレルギー食品問題など、
食品の安全性が問題となっている。発酵エタノールに関
しても、スターリングなど未承認 GMO 品種の混入問題
から、トウモロコシ原料由来品が忌避される傾向があ
る。また、トウモロコシ以外にサトウキビなどについて
も GM 化の研究・開発は進んでおり⁽¹⁾、実用化も時間の
問題であると予想される。これまでに GMO やアレル
ギー問題に関して、工業用発酵エタノールの原料は不分
別であるが、発酵・蒸留の製造工程において組換え遺傳
子由来の DNA やタンパク質が分解除去されるため、製
品に残存することは理論的にありえないとされてきた。
しかし、これを裏づける科学的検証はなされていなかっ
た。

本報告は、発酵エタノール中の DNA とタンパク質を
分析、定量化する方法を確立するとともに、実際に GM
トウモロコシを原料として発酵・蒸留試験を行ない、製
造工程における DNA およびタンパク質の挙動を調べる
ことを目的とした。エタノール試料を直接分析できないため、試料の前処
理として、ポリプロピレン製滅菌遠沈管（岩城硝子社製）
にエタノール試料の一定量をとり、遠心エバポレーター
CVE-3100（東京理化器械社製）を用いて 60°C で減圧濃
縮・乾燥した。その後、DNA 分析時には 1/10 量の TE
buffer (pH 8.0) に、タンパク質分析時には 1/10 量の超
純水に懸濁した。DNA 濃度の分析は波長 260 nm にお
ける UV 法⁽²⁾または蛍光法 (Pico Green 法, Molecular
Probe 社製) を用いた。タンパク質濃度の分析は Brad
ford 法 (BIO-RAD 社製) または Micro BCA 法 (Pierce
社製) を用いて行なった。Pico Green 法、Bradford 法
および Micro BCA 法はメーカーのマニュアルに従った。
定量の標準物質として λ DNA (日本ジーン社製) ま
たはウシ血清アルブミン (BSA, BIO-RAD 社製) を用い
た。 λ DNA は UV 法または Pico Green 法を用いてあら
かじめ濃度調整してから使用した。UV 法、Bradford 法
および Micro BCA 法には分光光度計 UV-2400 (島津製
作所社製) を、Pico Green 法にはミニフルオロメーター
TD-360 (Turner designs 社製) を用いた。定量 PCR 法
は JAS 分析試験ハンドブックに従った⁽³⁾。すなわち、試
料 200 mg から DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社製)
を用いて DNA を抽出して 100 μ l に調製し、エタノール
を試料とする場合は 1 ml を完全に蒸発させ、残渣を 100
 μ l の滅菌超純水で懸濁した。これら 10 μ l を PCR 反応
に用いた。ターゲットとしてトウモロコシの組換え遺傳
子 (CaMV P35S) および内部標準遺伝子 (SSIIb) の
PCR 増幅を行なった。Primer および TaqMan Probe

Abbreviation :

GM (genetically modified)

GMO (genetically modified organism)

は Fasmac 社製を、反応液 2×PCR Master Mix と反応装置 ABI PRISM7700 は Applied Biosystems 社製を用いて、Comparative Ct 法でメーカーのマニュアルに従って反応・検出を行なった。本法における GMO 存在比率の検出限界は 0.05%，定量限界は 0.1%である。定量限界 0.1%未満は DNA 量がきわめて微量か、低分子化されているために良好な PCR 反応が得られず数値化が困難であることから、CaMV P35S および SSIIb の PCR 増幅産物の有無を定性結果として別に表記した。

添加蒸留試験のサンプルには、試薬エタノール（99.5 vol% 特級、和光純薬社製）を滅菌超純水で 25 vol% に希釈して用いた。この希釈エタノール溶液 200 ml に λ DNA または BSA を加え、蒸留試験を行なった。蒸留エタノール分（約 50 ml）および蒸留残渣（約 150 ml）について DNA とタンパク質濃度を分析した。なお、蒸留装置は、いずれも 500~1,000 ml 仕込み容量の単蒸留装置で、タンパク質分析にはガラス製を、DNA 分析にはステンレス製のものを使用した。DNA 分析にはすべてオートクレーブ滅菌した試薬と器具を用いた。ステンレス製器具の洗浄は必要に応じて 1.5% 硝酸液に浸漬してから行なった。

GM トウモロコシを用いた発酵・蒸留試験には、トウモロコシを粉碎機 P-14 (Fritsch 社製) により粒径 500 μm に粉碎し、あらかじめデンプン価を求めて用いた。709 g の粉碎トウモロコシに滅菌超純水を加え、pH 5.0 に調整後 2.2 l にメスアップした。酒母添加後の仕上がり糖濃度を 20% とした。*Bacillus subtilis* 由来 α -アミラーゼ（和光純薬社製）30 mg を添加して約 40 分間放置して液化し、オートクレーブを用いて 110°C で 30 分間蒸煮した。58°C まで攪拌しながら冷却後、*Rhizopus* 属由来グルクザイム AF6 (天野エンザイム社製) 0.44 g (対糖 0.1%) を添加し、1 時間糖化を行なった。32°C まで冷却し、添加量 10% となるように酒母の添加を行なった。酵母はアルコール酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 396-9-6 V 株を用い、YM 培地 (0.3% 酒母エキス、0.3% 麦芽エキス、0.3% ポリペプトン、1% グルコース、pH 4.5) にて 1 次および 2 次前培養を一晩ずつしたもの用いた。発酵試験の培養は 3 l 容ジャーファーメンター（仕込み容量 2 l、ミツワ理化社製）を用い、32°C で 3 日間連続攪拌 (200 rpm) 培養した。培養開始後 2 時間まで 2 l の培養液当たり 100 ml/min で通気した。発酵終了後、発酵もろみを上述のステンレス製蒸留装置を用いて蒸留し、留出液を蒸留エタノールとした。

発酵・蒸留工程における DNA の挙動分析には、各工程の溶液を 100 ml ずつとり、直ちに -20°C に保存して

測定サンプルとした。これらについて、上述と同様に定量 PCR 分析を行なった。また、発酵・蒸留試験で得られた蒸留エタノールについては、上述と同様に DNA およびタンパク質濃度を分析した。

滅菌超純水を用いて 95 vol% に調整したエタノールに、 λ DNA (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) または BSA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し濃縮・乾燥の前処理を行ない、前処理工程における添加回収率を求めた。回収率 ($n=6$) は $101.7 \pm 2.2\%$ (λ DNA) および $97.4 \pm 5.0\%$ (BSA) でほぼ全量回収されることが明らかとなった。DNA またはタンパク質の検出限界は前処理工程後の分析値の相対標準偏差が 5% 以下となる値 ($n=6$) とした。すなわち、UV 法、Bradford 法、および Micro BCA 法は $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。Pico Green 法は 20 ng/ml であった。低濃度領域の絶対検量線の直線性は、UV 法、0.3~2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で相関係数 $r = 0.999$ ；Pico Green 法、10~100 ng/ml, $r = 0.998$ ；Bradford 法、0.2~1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, $r = 0.999$ ；Micro BCA 法、1.0~3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, $r = 0.991$ であった。

工業用発酵エタノール製品 (95 度特級、95 度 1 級、99 度 1 級、以後製品エタノールという) は、輸入粗精製エタノール (以後粗留エタノールという) を主要原料とし、国内において高度に精製されて製造されている。製品エタノールとトウモロコシを原料とした粗留エタノール中の DNA・タンパク質量の分析を行なった (Table I)。いずれの分析サンプルにおいても検出限界以下であった。粗留エタノールは、前処理後水または buffer に懸濁すると不純物が原因と考えられる白濁を生じ、光学的な分析は困難であった。

25 vol% 濃度に希釈した試薬特級エタノールに 0, 1, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の λ DNA または BSA を添加して添加蒸留試験を行ない、得られた蒸留エタノール中および蒸留残渣中の DNA およびタンパク質濃度を調べた。蒸留エタノール中の DNA およびタンパク質量はいずれのサンプルにおいても検出限界以下であった (Table II, III)。残液中のタンパク質量は添加タンパク質量の 92.5~101% であった。一方、残液中の DNA は UV 法では 140~152.9% であるのに対し、Pico Green 法では 11.3~12.9% であった。この差の原因を探るため、ポリプロピレン製容器に滅菌超純水と λ DNA を入れ、沸騰湯浴中で加熱して加熱の影響を調べた。アガロースゲル電気泳動法により可視化すると、加熱時間の経過とともに DNA が低分子化していた。また、そのサンプル中の DNA 量は Pico Green 法で添加量より低下し、UV 法では添加量より高くなる現象が認められた (ここではデータは示していない)。Pico Green 法は 2 本鎖 DNA

Table I. Analyses of DNA and Proteins of Ethanol Samples.

Ethanol sample	DNA conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		Existence of <i>CaMV35S</i> and <i>SSIIb</i> DNA	Protein conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
	UV	Pico Green		
99% 1 st grade	ND ($n=119$)	ND ($n=4$)	ND ($n=1$)	ND ($n=119$)
95% special grade	ND ($n=19$)	ND ($n=2$)	— ^a	ND ($n=18$)
95% 1 st grade	ND ($n=296$)	ND ($n=6$)	ND ($n=1$)	ND ($n=296$)
Crude corn ethanol	— ^b	— ^b	ND ($n=3$)	— ^b

ND, not detected; n , numbers analyzed.^aNot analyzed. ^bNot optically detectable for cloudy samples.

DNA was measured by the UV method (detection limit: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), the Pico Green method (detection limit: 20 ng/ml). Existence of *CaMV35S* and *SSIIb* DNA sequences was analyzed by the quantitative PCR method in the JAS assay handbook. Protein was measured by the Bradford method (detection limit: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Table II. Residual BSA of Distilled Ethanols and Residues.

Added BSA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Mean ($n=10$) of recovery rate (%) \pm SD (%)			
	Bradford		Micro BCA	
	Distillate	Residue	Distillate	Residue
0	ND	ND	ND	ND
1	ND	92.5 \pm 30.3	ND	101.0 \pm 30.4
3	ND	94.0 \pm 17.2	ND	98.4 \pm 14.8

ND, not detected.

Recovery rate (%) = 100 · (Recovery conc.) · (Recovery volume) / (Added conc.) · (Initial volume)

Distillation tests ($n=10$) were carried out using 200 ml of 25 vol% ethanol added BSA. After distillation the distillate and the residue were analyzed. Protein was measured by the Bradford method and the Micro BCA method. Detection limit of the both methods: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Table III. Residual λ DNA of Distilled Ethanols and Residues.

Added λ DNA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Mean ($n=10$) of recovery rate (%) \pm SD (%)			
	UV		Pico Green	
	Distillate	Residue	Distillate	Residue
0	ND	ND	ND	ND
1	ND	152.9 \pm 23.1	ND	12.9 \pm 1.5
3	ND	140.0 \pm 10.9	ND	11.3 \pm 0.9

ND, not detected.

Recovery rate (%) = 100 · (Recovery conc.) · (Recovery volume) / (Added conc.) · (Initial volume)

Distillation tests ($n=10$) were carried out using 200 ml of 25 vol% ethanol added λ DNA. After distillation the distillate and the residue were analyzed. DNA was measured by the UV method (detection limit: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and the Pico Green method (detection limit: 20 ng/ml).

のみを検出する⁽⁴⁾。一方、UV 法は 2 本鎖 DNA (1 OD = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 以外に、1 本鎖の DNA または RNA (1 OD = 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および、1 本鎖のオリゴヌクレオチド (1 OD = 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の核酸全体を検出する⁽²⁾。UV 法は換算係数に 2 本鎖 DNA の値を用いた。蒸留の加熱により添加 DNA は 1 本鎖化および低分子化されたため、Pico Green 法では低い値になったと考えられた。一方、UV

法において添加 DNA 量より高い数値が検出されたのは 1 本鎖化・低分子化により濃度当たりの吸光度が増加したためと思われる。DNA の組成比が不明であるため、蒸留残液中の濃度を正確に算出することはできないと考えられた。

以上の結果は、蒸留工程においてタンパク質は蒸留液には移行せず、ほとんどが残液に残ることを示唆するも

Table IV. DNA and Protein Analyses of Samples after Fermentation and Distillation Processes using Genetically Modified Corn.

Sample	Appearance rate (%) of recombinant DNA sequence	Existence of <i>CaMV35S</i> and <i>SSIIb</i> DNA sequence	DNA conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Protein conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Milling corn suspension	18.8	D	— ^a	— ^a
Glycosylated solution	<0.1	D	— ^a	— ^a
Fermented broth	<0.1	D	— ^a	— ^a
Distillate	ND	ND	ND	ND
Residue	ND	ND	— ^a	— ^a

D, detected; ND, not detected.

^aNot analyzed.

Milled GM corns added water were glycosylated with enzymes under the heating condition. After fermentation and distillation process, the distillate was analyzed for DNA and protein. The sample (100 ml) in each step was analyzed by the quantitative PCR method. The appearance rate of recombinant DNA sequence was determined by the quantitative PCR method in the JAS assay handbook (detection limit, 0.05%; quantitative limit, 0.1%). The existence of *CaMV35S* and *SSIIb* DNA sequence was showed as qualitative data by above-stated PCR method. DNA was measured by the UV method (detection limit: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and the Pico Green method (detection limit: 20 ng/ml). Protein was measured by the Bradford method and the Micro BCA method (detection limit of the both methods: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The data was showed as the average of duplicate analyses.

のである。同様に、DNAについても蒸留液への移行は認められないことが明らかとなった。

実際にGMトウモロコシを用いて発酵・蒸留試験を行ない各工程におけるGM遺伝子の挙動を調べた (Table IV)。糖化段階において、*CaMV35S*配列および*SSIIb*配列はPCR法で検出されたが、定量できない微量レベルであり、GMO存在比率0.1%未満となった。DNAの低分子化がかなり進んでいると推測された。発酵終了後の発酵もろみの段階ではまだ遺伝子塩基配列が検出されたが、蒸留エタノールでは検出されなかった。

また、蒸留エタノール中のDNAおよびタンパク質量は、UV法、Pico Green法、Bradford法、およびMicro BCA法のいずれの方法においても検出限界以下であった (Table IV)。

実際に発酵から行なった蒸留サンプルにおいてもDNAおよびタンパク質は蒸留液に移行しないことが判明した。また、糖化・発酵段階において、DNAはかなり分解されることが確認された。

本実験やデンプン質原料を酵素糖化する場合では、加熱蒸煮やクルドな糖化酵素に含まれるプロテアーゼやDNaseによりかなりのタンパク質やDNAが分解されると推察された。

以上の結果より、発酵エタノールの製造工程におけるDNAおよびタンパク質の挙動が判明し、発酵・蒸留の製造工程において原料由来のDNAやタンパク質が分解除去されるため、蒸留液に残存しないことが初めて示された。

文献

- 1) *Int. Sugar J.*, **103**, 36 (2001).
- 2) J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis: in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, p. E. 5.
- 3) "遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル: 改訂第2版, 定量的PCR編", JAS分析試験ハンドブック, 農林水産消費技術センター, 埼玉, 2002, p. 7.
- 4) V. L. Singer, L. J. Jones, S. T. Yue & R. P. Haugland: *Anal. Biochem.*, **249**, 228 (1997).