

### 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	澤田 和敬
審査委員	主査 佐賀大学 教授 北垣 浩志 )
	副査 佐賀大学 准教授 郡山益実
	副査 鹿児島大学 教授 高峯和則
	副査 鹿児島大学 教授 玉置 尚徳
	副査 佐賀大学 教授 染谷 孝
審査協力者	
題目	新規清酒酵母育種のための代謝工学的研究 (Study of metabolic engineering of useful fermentation microorganisms)

清酒醸造において、酵母は原料米のデンプンが麹菌の働きによって変換されたグルコースをエタノールに変換するだけでなく、製成した清酒の香味に寄与する多様な成分を産生することから、清酒の製品設計で大きな役割を持つ。

そこで、澤田氏は清酒の多様化や差別化を図るために、以下の5点について検討を行った。

(1) 清酒酵母の1倍体取得法の高効率化

清酒酵母のランダムスポア法を用いた1倍体取得について、孢子形成培地や細胞壁溶解酵素の処理法、残存した栄養細胞の除去方法を検討し、さらに同時にこれらを組み合わせる手法について検討した。

その結果、酵母を酢酸カリウム培地で培養し、協会7号系酵母と協会9号系酵母では細胞壁酵素処理を使い分け、栄養細胞を除去する方法として、界面活性剤NP-40を用いることで、1倍体の取得率や実験の操作性を向上させることができることを見出した。

(2) 醸造用酵母及び低ピルビン酸清酒酵母K7-TCR7-13株の1倍体株のメタボローム解析

醸造用酵母の代謝産物及び低ピルビン酸低生産性酵母 K7-TCR7-13 株の GC-FID 及び GC/MS を用いたメタボローム解析を行った。その結果、GC-FID を用いたメタボローム解析で、醸造用途に応じクラス分けができ、1 倍体同士は離れて分布していた。GC/MS を用いたメタボローム解析からそれらの 1 倍体の分類には、マンニトール、グリセロール、イノシトールが寄与していることを明らかにした。

(3) 「きょうかい酵母<sup>®</sup>低ピルビン酸低生産性酵母 7 号」及びその泡なし酵母の低ピルビン酸メカニズムの解明

「きょうかい酵母<sup>®</sup>低ピルビン酸低生産性酵母 7 号」のピルビン酸低生産性のメカニズムを明らかにするために次世代シーケンサーによるゲノム解析を行った。その結果、ピルビン酸低生産能を有する菌株の染色体が異数倍数性を持つことを明らかにした。それぞれの染色体のゲノム量をリアルタイム PCR で解析したところ、その発現量は統計的に有意に増加していた。更に染色体が倍加している 1 倍体を多数取得し、小仕込み試験を行ったところ、染色体が倍加していない株に比べ、統計的に有意なピルビン酸の低生産が認められた。以上の結果から、染色体の倍加がピルビン酸の低生産性に寄与していることが示唆された。

(4) 醸造用酵母のミトコンドリアの活性と醪中の酸素濃度、不飽和脂肪酸及びエステル香の合成の相関関係

清酒醸造において、醪の不飽和脂肪酸の主な供給源は米や麴ではなく、清酒酵母であることを明らかにした。また、清酒酵母のミトコンドリアの電子伝達系を阻害すると、不飽和脂肪酸の生合成の量が増加することが明らかになり、ミトコンドリアの活性制御は清酒の香味を制御することにつながることを示唆された。

(5) 麴菌が分泌するグルコシルセラミド (GlcCer) が酵母の発酵プロファイルに与える影響について

麴から脂質を抽出して GlcCer を精製し、pH8.0 での培養試験及び 8 vol/vol % エタノール存在下で培養試験を行ったところ、GlcCer 添加試験区では有意に酵母の増殖が認められた。GlcCer は酵母の細胞膜の生理学特性を変化させ、酵母細胞膜の保護と香味プロファイルの改変を付与することを見出した。以上のことから、麴の GlcCer が、今まで見過ごされていた酵母の発酵制御因子であることを明らかにした。

よって、本論文は、博士（農学）の授与に十分な価値があるものと判定した。