

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 農 学 ）	氏名	高 橋 正 之																		
学位授与の要件	学位規則第4条第1・②項該当																				
<p>論 文 題 目</p> <p>酒類製造工程における微生物叢変遷の解析と微生物叢解析のための新規技術の開発に関する研究</p>																					
<p>論文審査担当者</p> <table border="0"> <tr> <td>主 査</td> <td>教 授</td> <td>中 野 宏 幸</td> </tr> <tr> <td>審査委員</td> <td>教 授</td> <td>島 本 整</td> </tr> <tr> <td>審査委員</td> <td>教 授</td> <td>三 本 木 至 宏</td> </tr> <tr> <td>審査委員</td> <td>教 授</td> <td>藤 井 力</td> </tr> <tr> <td>審査委員</td> <td>准教授</td> <td>正 木 和 夫</td> </tr> <tr> <td>審査委員</td> <td>准教授</td> <td>中 山 二 郎</td> </tr> </table>				主 査	教 授	中 野 宏 幸	審査委員	教 授	島 本 整	審査委員	教 授	三 本 木 至 宏	審査委員	教 授	藤 井 力	審査委員	准教授	正 木 和 夫	審査委員	准教授	中 山 二 郎
主 査	教 授	中 野 宏 幸																			
審査委員	教 授	島 本 整																			
審査委員	教 授	三 本 木 至 宏																			
審査委員	教 授	藤 井 力																			
審査委員	准教授	正 木 和 夫																			
審査委員	准教授	中 山 二 郎																			
<p>〔論文審査の要旨〕</p> <p>酒類に含まれる微生物は製品の風味や外観に悪影響を及ぼすことがあり、製造工程における微生物管理は極めて重要である。酒類の微生物叢研究は主に培養法で行われてきたが、培養不能菌は検出できず、分子生物学的手法を用いた網羅的解析が必要である。一方、無添加ワインやビール系飲料など酒類の製法や商品は多様化しており、これらの微生物叢についてはほとんど報告がない。本研究では、酒類の微生物汚染のリスク低減に役立つ情報を得るため、各種酒類における微生物叢解析を実施するとともに、感度の高い微生物検出技術の開発を行った。</p> <p>第1章「緒言」では、酒類製造工程や製品で見られる微生物と酒類への影響、微生物叢解析手法の進歩と多様化、酒類産業への新規参入の現状と課題などをまとめた上で、本研究の意義、目的を述べた。</p> <p>第2章「培養法及び分子生物学的手法を用いた亜硫酸添加／無添加ワイン中の微生物叢の評価」では、ワイン醸造工程及び最終製品における微生物叢の亜硫酸添加／無添加による違いを培養法及びPCR-DGGE法を用いて解析した。赤ワインと白ワインの両方で、発行中の微生物叢は亜硫酸添加よりも無添加の方で多様性が高かった。いずれの方法でもワイン発酵マストから <i>Tatumella terre</i> が検出されたが、亜硫酸添加によりその生育は抑制されており、ワイン製造において予期せぬ微生物の生育抑制に亜硫酸添加が重要な役割を果たしていること、一部の微生物は亜硫酸を添加した発酵マスト中でも生存、生育できることを証明した。さらに、市販ワイン15検体をPCR-DGGE法により解析したところ、<i>Sphingomonas</i> sp., <i>Pseudozyma</i> sp., <i>Ochromonas</i> sp. 及び <i>Methylophilus</i> sp. がワインで初めて検出された。本章の結果より、最終製品の微生物叢はろ過工程や製造環境などの要因に影響を受けることが示唆された。</p> <p>第3章「培養法及び分子生物学的手法によるビール醸造工程の微生物叢の評価」では、試験醸造した1種類のビール（麦芽100%）及び2種類の発泡酒（麦芽50%,25%）の醸造工程におけ</p>																					

る微生物叢の変遷を次世代型シーケンサーで調べた。その結果、検出された微生物は 191 属で、培養法により検出された 18 属より極めて多様な環境であることが明らかとなった。醸造工程中の各細菌数の推移を解析したところ、正常な発行をしているビールにおいても *Bacillus* 属や *Paenibacillus* 属の細菌が発酵中に増殖している可能性があり、これまでにビールから検出例のない *Tissierella* 属など 5 種類の属も新たに発酵過程で増殖する可能性が示された。この結果は、これらの細菌による汚染リスクの存在を示している。

第 4 章「改変 COLD-PCR によるワイン発酵もろみ中に存在する低存在比率微生物の検出」では、酒類中の真菌叢解析に有用な分子生物学的手法の開発を行った。ワイン製造では初期に大量の醸造用酵母を添加するため、その他微量の真菌叢を網羅的に把握することは極めて困難である。この問題を解決するため、多量に存在する微生物由来の核酸の増幅を二本鎖 RNA プローブにより抑制し、低存在比率微生物の検出が可能な改変 COLD-PCR(CO-amplification at Lower Denaturation temperature PCR)法を新規に開発した。モデル実験において、大量に存在する *Saccharomyces cerevisiae* に対して 1/10,000 量の *Schizosaccharomyces pombe* を検出できることを証明した。発酵白ワインもろみにおいて、通常の PCR-DGGE 法では検出できなかった *Candida* sp.や *Cladosporium* sp.が本法では検出できた。また、発行赤ワインもろみの改変 COLD-PCR 法を用いた次世代シーケンサー解析で検出された属数は従来法より多かった。

以上のように、本論文では酒類製造工程中の微生物叢の変遷について、培養法と分子生物学的手法を用いて新しい知見を得ている。さらに、新規に開発した改変 COLD-PCR 法の応用は発酵食品や活性汚泥などの網羅的な微生物叢を解析するのに役立つことが期待される。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士（農学）の学位を授与されるに十分な資格があるものと認められる。