

氏名(本籍)	きたもとひろこ 北本宏子(神奈川県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第1607号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Studies on the Prevention of Aerobic Spoilage of Silage by Killer Yeast, <i>Kluyveromyces lactis</i> (キラ酵母 <i>Kluyveromyces lactis</i> による, サイレージの好気的変敗の防止に関する研究)
主査	筑波大学教授 農学博士 中原 忠 篤
副査	筑波大学教授 農学博士 祥雲 弘 文
副査	筑波大学教授 農学博士 松尾 勝
副査	筑波大学教授 理学博士 山根 國 男

論文の内容の要旨

サイレージは、牧草をサイロ内で嫌氣的に乳酸発酵させた保存性の高い飼料であり、酪農家が用いる自給飼料の7割を占めている。しかし、そのうちの約2割が、密封性の悪いサイロ内やサイロを開封した後に野性酵母や細菌の働きにより好気的に変敗する。変敗したサイレージは栄養価と嗜好性、飼料としての安全性が低く、大きな問題となっている。この問題を解決するために安価でかつ安全性が高い変敗防止技術の確立が望まれている。

以上のことを踏まえ、本研究では微生物によるサイレージ発酵の制御を目的として、キラ酵母添加によるサイレージの好気的変敗防止の可能性について検討した。すなわち、キラ酵母の選択、育種を行い、この株の野性酵母に対するキラ効果等を調べた。さらに、組換え酵母をサイレージに用いる際の安全性評価についても考察を加えた。本論文の内容は以下の4項目に整理される。

1. 研究手法の開発 サイレージ試料中の乳酸と糖を迅速かつ簡便に分析する方法を開発した。本法は酵素法と比色法を組み合わせたものである。また、選抜されたキラ酵母のエレクトロポレーション法による効率的遺伝子組換え法を検討した。
2. サイレージ添加用キラ酵母の選抜 サイレージの変敗に関わる酵母に広いキラ活性を示すキラ酵母として *Kluyveromyces lactis* IFO 1267 株を選抜した。本酵母は、サイレージ発酵モデル系において検定酵母の生育を抑制した。本研究では、チーズ産業廃液、ホエーの有効利用のために、これをサイレージへの添加炭素源として使用することを試みている。本酵母は乳糖を利用できるので、この目的に合致した。しかし、本酵母自身が乳糖を利用して変敗の原因になる可能性があり、ホエーを添加剤として用いるには乳酸で生育しないキラ酵母の育種が必要となった。
3. 乳酸で生育しないキラ酵母の育種 *Saccharomyces cerevisiae* では、糖新生系を制御する酵素、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) の遺伝子破壊株は乳酸を利用できない。このことに着目し、PEPCK 欠損キラ酵母を作製した。まず、*K.lactis* の PEPCK 遺伝子 (*PICK1*) をクローニングした。次に、相同組換え用のベクターとして *PICK1* に薬剤耐性遺伝子を挿入して破壊した遺伝子断片を試験管内で作出し、これを *K.lactis* IFO 1267 株に導入し、部位特異的相同組換えを行い、*PICK1* 遺伝子が破壊された株を作製することに成功した。以上の実験により目的の株が育種された。

4. 組換えキラ酵母によるサイレージの好気的変敗の遅延効果 組換えキラ酵母をサイレージ調製時に添加して、好気的変敗を遅延できるかどうか、サイレージ発酵モデル系および実験室規模でのサイレージを調製して解析した。組換えキラ酵母がサイレージの乳酸の消費とpHの上昇を起こさないことを確認した上で、変敗酵母 *Pichia anomala* と混合培養した。組換えキラ酵母は変敗酵母の増殖を阻害し、これに伴う乳酸や糖の消費とpHの上昇を抑えた。さらに、生トウモロコシを用いた実験室規模のサイレージを調製して、組換えキラ酵母と親株の添加効果を調べた。キラ酵母添加区では、開封後の乳酸資化性酵母の増殖とpHの上昇が明らかに遅延された。これは、キラ酵母添加によりサイレージ中の酵母のフロラが変わったためであると考えられる。キラ酵母添加区では、変敗に対し関与の少ない酵母が培養後期に支配的となり、開封後はそれらの酵母がゆっくり増殖し、乳酸の消費が遅れ、変敗を遅延させたと考えられた。最後に組換え酵母をサイレージに適用する際の安全性について、他の生物への影響や組換え遺伝子の伝搬の可能性等について考察した。

以上、本研究はサイレージのような複合微生物系を対象にして、モデル系での予測、生物工学的手法を用いた目的微生物の育種、サイレージでの再現について検討を加え、所期の目的を達成した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は微生物による複合微生物系の制御という視点にたち、キラ酵母を用いてサイレージの好気的変敗を防止する技術の構築を目指したものである。サイレージは、牧草をサイロ内で嫌氣的に乳酸発酵させた保存性の高い飼料であるが、生産されたサイレージの約2割が好気的変敗を起こすとされ、安価でかつ安全性の高い変敗防止技術の確立が望まれている。したがって、本研究の社会的ニーズは極めて高い。

まず、サイレージ試料中の乳酸と糖を迅速、簡便かつ安価に分析する方法を開発した。また、選抜したキラ酵母のエレクトロポレーション法による効率的遺伝子組換え法を確立した。これによって研究を効率的に進めることが可能となった。次に、サイレージ変敗の主原因である酵母に対し、広いキラ活性を示す酵母を探し、*Kluyveromyces lactis* IFO 1267株を選抜することに成功した。本酵母は、チーズ産業廃液ホエー中のラクトースを利用できる一方で、不都合なことに、サイレージ中の乳酸を資化してサイレージの変敗を引き起こす可能性がある。そこで、乳酸を利用できないキラ酵母を育種した。糖新生系を制御する酵素、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子を破壊することにより、目的とする組換えキラ酵母を取得できた。続いて、育種した組換えキラ酵母をサイレージ調製時に添加し、好気的変敗が遅延されるかどうか、サイレージ発酵モデル系と実験室規模でのサイレージを調製して解析した。その結果、組換えキラ酵母の添加により、サイレージ中の酵母のフロラが変わり、変敗の遅延が観察され、所期の目的を達成することができた。

本研究は、複合微生物系を微生物で制御するという極めて新規性の高いものであり、高く評価できる。また本研究は、酪農地内の環境に対する負荷を抑えて飼料を効率的に生産するための、新しい技術の開発に重要な知見を与えている。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。