

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目：ウォッシュチーズのマイクロバイオーームと生分解性プラスチック分解活性
(Microbial composition and polymer hydrolytic activity of washed-rind cheeses)

氏 名 橋 陽 子 印

チーズをはじめとした食品の容器包装として多用されているプラスチックは、衛生的、軽量、耐腐食性、断熱性、ガスバリア性等の優れた特徴を持ち、望まない微生物の増殖や栄養素の経時変化および風味の退化を防ぎ、賞味期間の延伸が可能となる。一方、プラスチックごみの環境流出により引き起こされる環境汚染が世界的問題となっている。このような問題の解決策として、使用後に自然界に循環される生分解性プラスチックが注目されている。本博士論文では、生分解性プラスチックの食品容器包装への適用に向けた基礎的研究として、微生物の多様性が高いウォッシュチーズを用い、各種生分解性高分子を分解する微生物の探索を行い、単離株の特徴づけを行った。また、フランス産および日本産ウォッシュチーズの微生物叢を調べ、ウォッシュチーズの微生物叢の多様性を明らかにし、生分解性高分子分解微生物との関連について検討した。

第2章において、フランス産ウォッシュチーズの一種、ポンレヴェックレクリュを用い、PCR-DGGE法を用いた微生物叢解析を行った結果、これまでもチーズからの検出が報告されているフィルミキューテス門およびアクチノバクテリア門に属する既知の細菌種から構成されていることがわかった。また、本チーズから生分解性高分子 P(3HB)の分解菌、PON α 株を単離し、詳細に特徴づけを行った。本株はグラム染色陽性の糸状菌で、遺伝系統解析により、*Cellulosimicrobium cellulans* と高い相同性を有することがわかった。本株は低温で生育及びクリアゾーン形成能を発現しなかった。また、本株は P(3HB)および P(3HB)の共重合体である PHBV でクリアゾーンを形成し、フィルム重量減少も、P(3HB)および PHBV で見られた。本株による P(3HB)分解酵素活性は、炭素源に P(3HB)のモノマーである R-($-$)-3-ヒドロキシ酪酸を用いた場合に最も活性が高くなり、P(3HB)のみを用いた場合よりも、チーズも添加した場合の方が酵素活性は増加した。以上のことから、P(3HB)および PHBV をチーズの包装材として使用する場合は、低温での流通および保存下で適用できる可能性が示唆された。なお、本報告が *Cellulosimicrobium* 属細菌の P(3HB)分解について初めて報告されたものである。

第3章では、日本産ウォッシュチーズ4種をメタゲノム解析したところ、長野県産チーズおよび千葉県産チーズの細菌群集は比較的類似しており、これらおよび北海道産チーズの細菌群集はヨーロッパで製造されたウォッシュチーズの表皮の細菌群集と類似していることがわかった。東京都産チーズの細菌

叢は存在する細菌種が少なく、ヨーロッパのウォッシュチーズがより多くの細菌種から構成されているのとは異なっていた。東京都産チーズは製造過程において日本酒を用いていることが細菌種の多様性を抑制したと結論付けた。また、真菌では長野県産チーズおよび千葉県産チーズに*Debaryomyces udonii*が高い割合で存在していたが、本株がチーズから検出されたのは今回が初めてであった。千葉県産チーズは*Fusarium domesticum*が主要な真菌であり、本真菌の持つ表面を乾燥させる性質がヤング率の高さに関連していると考えられた。また、6種の生分解性高分子に対する分解活性を調べた結果、千葉県産チーズのみP(3HB)に対する分解活性を示す細菌が存在したため、本株（MC1株）を単離した。MC1株は無孢子グラム陰性の短桿菌で、プロテオバクテリア門に属する*Alcanivorax dieselolei*と高い相同性を示した。*Alcanivorax*属細菌のMC1株がP(3HB)を分解するという報告は今回が初めてであったため、詳細な特徴づけを行った。本株は低温で生育及びクリアゾーン形成能を発現しなかった。また、チーズ4の存在下で酵素活性が促される可能性が示唆された。この要因として、チーズ4の微生物叢解析で明らかとなった*Halomonas* 種および*Marinobacter*種といった海洋性細菌がチーズ中にP(3HB)を合成することで酵素活性が上昇した可能性を示した。また、P(3HB)分解酵素は、基質結合ドメインによりP(3HB)に結合することで効率的にP(3HB)を酵素加水分解する可能性も示した。以上のことから、P(3HB)をチーズの包装材として使用するには限界があるが、チーズの流通および保存条件である低温域では分解活性を示さなかったため、適用の可能性はあると結論付けた。また、さらに、MC1株をはじめ、チーズ2以外にはガンマプロテオバクテリアに属する海洋性細菌が存在することが確認された。チーズが付着したP(3HB)容器包装が海洋環境に流出しても、海洋の生態系に悪影響を及ぼさず、ガンマプロテオバクテリアが有するアルカンヒドロキシラーゼ（*alkB*）により海洋環境に流出した油を除去する、環境汚染のバイオレメディエーションとして活用できると推測した。

本博士論文の最終章において、ウォッシュチーズ由来P(3HB)分解細菌を用いた適用例として、P(3HB)を容器包装に用いるチーズの製造において、MC1株を添加することで、流通および保存中は容器包装の分解は進行しないが、チーズが付着した状態で環境に廃棄されれば、本株のP(3HB)分解酵素により、容器包装が分解されることを提案した。

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目：ウォッシュチーズのマイクロバイオーームと生分解性プラスチック分解活性
(Microbial composition and polymer hydrolytic activity of washed-rind cheeses)

氏 名 Yohko Tachibana 印

Plastics, which are widely used as containers and packaging for foods such as cheese, have excellent features such as hygiene, weightlessness, corrosion resistance, heat insulation, and gas barrier properties, allowing to grow undesired microorganisms, change of nutrients, prevent the deterioration of flavor and extend the shelf life. On the other hand, environmental pollution caused by environmental waste of plastic waste has become a global problem. As a solution to such problems, biodegradable plastics have attracted attention. In this thesis, as basic research for applying biodegradable plastics to food containers and packaging, search for microorganisms that degrade various biodegradable polymers from washed rind cheeses with high diversity of microorganisms, and the isolates were characterized. In addition, we investigated the microbiome of French and Japanese washed rind cheeses, clarified the diversity of the microbiome of washed rind cheeses, and examined the relationship with biodegradable polymer-degrading microorganisms.

In chapter 2, microbiome analysis using PCR-DGGE method for one of the French washed rind cheeses, Pont-l'évêque lait cru, showed that the microbiome of the cheese was composed the bacteria belonging to phylum Firmicutes and Actinobacteria which have detected from other cheeses so far. In addition, strain PON α , a biodegradable polymer P (3HB) degrading bacteria, was isolated from this cheese and characterized in detail. The strain was a gram-positive, filamentous shaped. Genetic phylogenetic analysis revealed that it had high homology with *Cellulosimicrobium cellulans*. This strain did not grow and form clearing zone at low temperature. The strain formed a clearing zone for P(3HB) and PHBV, a copolymer of P (3HB), and degraded film of these biodegradable polymers. The activity of P (3HB) degrading enzyme by this strain is highest when R-(-)-3-hydroxybutyric acid, which is a monomer of P (3HB), is used as a carbon source. The enzyme activity increased when cheese was added to P(3HB) compared to only P(3HB). These suggest that P (3HB) and PHBV cheese packaging may be applicable under low temperature distribution and storage.

In chapter 3, metagenomic analysis for four Japanese washed rind cheeses revealed that the bacterial communities of the cheese made in Nagano are relatively similar to those in Europe. Bacterial communities of the cheese made in Nagano, Chiba and Hokkaido were similar to those in Europe, whereas the cheese made in Tokyo had fewer bacterial abundance and diversity. It was concluded that the use of sake in washing brine reduced the diversity of bacterial species. In addition, *Debaryomyces udenii* was present at a high rate of fungi from Nagano's and Chiba's cheeses. The main fungi of the cheese made in Chiba was *Fusarium domesticum*. This fungus that dries the surface could be related to the high Young's modulus of the cheese. Moreover, degradability to P(3HB) was detected from Chiba's cheese, and bacteria isolated from this cheese, designated as strain MC1. Strain MC1 was a Gram-negative, non-spore-forming, and short rod-shaped bacteria. The phenotypic properties and phylogenetic inference indicated that strain MC1 is closely related to *Alcanivorax dieselolei* B-5^T, which is a marine inhabitant. Since this was the first report that *Alcanivorax* species degrades P(3HB), detailed characterization was performed. This strain did not grow and form a clearing zone at low temperatures. It was also suggested that the enzyme activity could be promoted in the presence of the cheese. It is supposed that marine bacteria such as *Halomonas* species and *Marinobacter* species which consisted of the microbiome of this cheese increased P(3HB) in the cheese, and the enzyme activity was induced. In addition, it might be that P(3HB) depolymerase hydrolyzed P(3HB) by binding to P(3HB) through the substrate binding domain. From the above, it is concluded that P(3HB) is suitable for cheese packaging in low temperature which is the distribution and storage conditions of cheese. Furthermore, all cheeses except the cheese made in Tokyo included marine bacteria belonging to gammaproteobacteria. If P(3HB) packaging with cheese spills into the marine environment, it does not adversely affect the marine environment and it could be used as bioremediation of environmental pollution by alkane hydroxylase (*alkB*) possessed by gammaproteobacteria.

In conclusion, as an application example using P(3HB) degrading bacteria from washed rind cheese that clarified in this thesis, strain MC1 is added to the cheese in the production of cheese using P(3HB) for packaging. P(3HB) packaging is not degraded by the strain during distribution and storage, whereas in the environment, it is degraded by P(3HB) depolymerase from the strain in the cheese.