

2019年度 博士学位論文

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

群馬大学大学院 理工学府 理工学専攻 物質・生命理工学領域
環境調和型材料科学研究室

橘 陽子

目 次

第1章 序論	3
チーズの概要	4
チーズの公衆栄養学的意義	6
チーズの微生物叢およびその解析手法	7
食品容器包装	9
生分解性プラスチック	10
食品の容器包装に関わる食品衛生法	12
本研究の目的	14
第2章 フランス産ウォッシュチーズからの P(3HB)分解 <i>Cellulosimicrobium</i> 属細菌の単離と特徴付け	15
2-1 諸言	16
2-2 実験方法	17
試薬	17
培地	17
細菌株	18
チーズの生菌数測定および生分解性高分子分解微生物の単離	18
遺伝系統学的解析	18
単離株の P(3HB)分解活性	19
表面形態観察	19
グアニン-シトシン (GC) 含率	19
脂肪酸組成	19
生化学・生理学的性質	19
生育および P(3HB)分解能に及ぼす温度の影響	20
生育および P(3HB)分解酵素産生に及ぼす炭素源の影響	20
ポリメラーゼ連鎖反応-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE) 解析	20
DGGE バンドの DNA 解析	21
DNA アクセッション番号	21
2-3 結果と考察	22
チーズの生菌数測定および生分解性高分子分解微生物の単離	22
P(3HB)分解微生物の単離	22
ウォッシュチーズの微生物叢	23
P(3HB)分解微生物の特徴づけ	26
菌体増殖と P(3HB)分解酵素産生に及ぼす炭素源の影響	29
P(3HB)フィルムの分解能	30
2-4 まとめ	30

第3章 日本産ウォッシュチーズの微生物叢と生分解性高分子分解活性	31
3-1 諸言	32
3-2 実験方法	33
試薬	33
培地	33
細菌株	33
ウォッシュチーズ由来高分子分解微生物の単離	34
遺伝系統学的解析	34
高分子分解能	34
単離株およびチーズの P(3HB)重量減少評価	35
表面形態観察	35
生化学・生理学的性質	35
生育および P(3HB)分解能に及ぼす温度の影響	35
ウォッシュチーズにおける細菌および真菌の定量 PCR	35
ウォッシュチーズにおけるレオロジー測定	36
メタゲノム解析	36
アクセッション番号	37
3-3 結果	38
ウォッシュチーズにおける微生物叢	38
ウォッシュチーズのレオロジー	40
生分解性高分子分解微生物のスクリーニング	41
P(3HB)分解微生物の特徴付け	42
P(3HB)フィルム分解能	46
ウォッシュチーズの微生物量	46
3-4 考察	47
第4章 総括	51
参考文献	55
謝辞	67

第 1 章
序論

チーズの概要

チーズはおよそ8,000年前から作られている発酵食品の一つである [1]。その原料は主に乳、塩、乳を凝固させるためのレンネットおよび発酵に必要なスターター微生物の4種のみで、製造方法も乳の凝固、ホエーの除去、加塩、カード（凝乳）の成形および発酵と単純な工程から構成されている（Figure 1） [2]。原料の配合やそれに影響を及ぼす自然要因および製造過程の差異等により、チーズの風味や形状は多様なものとなり、現在では世界中で1,000を超えるチーズが存在している [3]。

チーズは、ナチュラルチーズおよびナチュラルチーズに乳化剤などを加えて加熱し再成形したプロセスチーズに分類される [4]。ナチュラルチーズは、硬さや熟成方法によって、一般的に8種類のタイプに分類される（Table 1）。

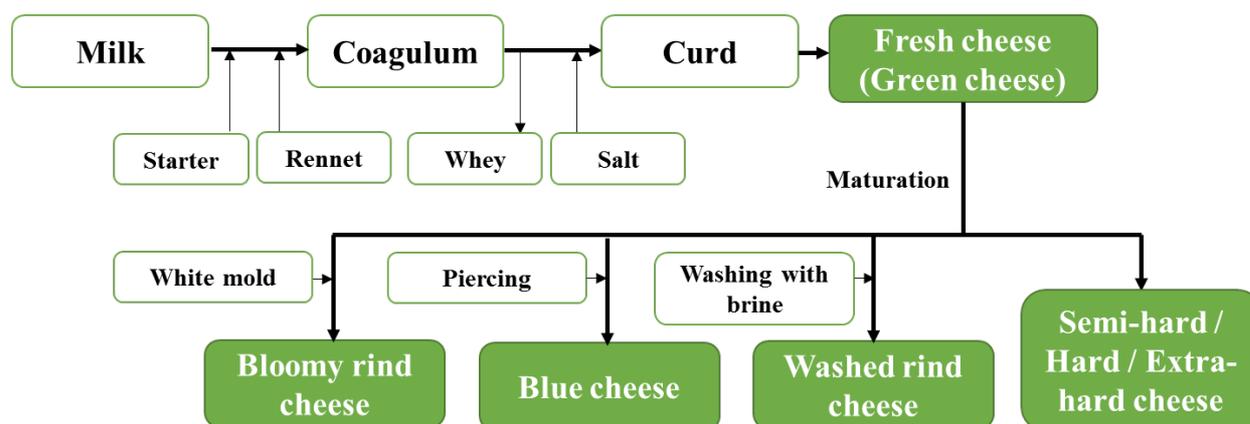


Figure 1. Flow diagram for natural cheese manufacture [2],[5].

Table 1. Classification of natural cheeses [6],[7].

Hardness	Type	Maturation method	Feature	Typical cheeses (country of origin)
Soft	Fresh cheese	Not mature	Cheese that is not aged or hardly aged after adding acid or enzyme in milk to coagulate it and remove moisture.	Mozzarella (Italy) [8] Cottage (Netherlands) [9]
	Bloomy rind cheese	Mold mature	Cheese that is matured from the surface to the center by mold planted on the surface of the cheese.	Camembert (France) [10] Brie (France) [11]
	Washed rind cheese	Surface washing, Bacterial mature	Cheese that is matured by spraying or applying a solution containing salt or alcohol to the surface of the cheese. This operation which is called “wash” promotes growing of specific bacteria.	Époisses (France) [12] Munster (France) [12] Pont-l’èvre lait cru (France) (This thesis in chapter 2) Muchuri (Japan) (This thesis in chapter 3)
	Goat milk cheese	Mold/bacterial mature	Cheese that is made from goat's milk. Unlike cow's or sheep's milk, components of goat's milk are difficult to coagulate with rennet, so the production method is different.	Crottin de Chavignol (France) [13]
Semi-hard	Blue cheese	Mold mature	Cheese that is molded mold inside the cheese, secured a passage of air with holes drilled inside, and promoted the growth of mold for maturation.	Gorgonzola (Italy)[2] Roquefort (France) [2] Stilton (UK) [2]
	Semi-hard cheese	Bacterial mature	Cheese with a weight of 38-46 % moisture with pressing during manufacturing.	Gouda (Netherlands) [14]
Hard	Hard cheese	Bacterial mature	Cheese that is pressed to a moisture content of 38 % or less and matured for approximately 6 months to 1 year.	Cheddar (UK) [15] Emmental (Swiss) [16]
Extra-hard	Extra-hard cheese	Bacterial mature	Cheese that is produced after one or more years of maturation.	Parmigianol Reggiano (Italy) [2]

ヨーロッパでは、チーズをはじめとした食品等において、地理的表示（GI：Geographical Indication）制度をとっている。これには、原産地呼称保護（PDO：Protected Designation of Origin、特定の地理的領域で受け継がれたノウハウに従って生産・加工・製造された食品等を認証）、地理的表示保護（PGI：Protected Geographical Indication、特定の地理的領域と密接に関連した食品等を認証。生産・加工・製造の少なくとも一段階がその地域で行われていなければならない。）および伝統的特産品保護（TSG：Traditional Speciality Guaranteed、定められた伝統製法に基づき生産された食品等を認証）の3つの制度がある。本制度では、ナチュラルチーズの生産において、生乳生産からチーズ製造に至る様々な項目で、決められた仕様を遵守して生産しなければならないことが定められている [17]。従って、本制度の認証を取得していれば、ある一定の品質管理がなされ、個体間の品質の差異が最小限に抑えられていると考えられる。

チーズの公衆栄養学的意義

チーズ摂取によるヒトの健康への影響は、公衆栄養学的観点から、疾患リスクと関連して多数研究されている。

循環器疾患との関連では、冠動脈疾患 [18]および脳卒中 [19],[18]においてチーズの摂取により相対危険が低下するとの報告がある。チーズはこれらの疾患のリスク要因である飽和脂肪酸を多く含む食品であるが、チーズと同量の乳脂肪および飽和脂肪酸を含むバターと比較して、LDL-コレステロールを下げることで報告されている [20],[21]。その要因として、カルシウムやたんぱく質が豊富に含まれること、発酵によりビタミン K やペプチドなどが生成することなどが関与していると考えられているが、そのメカニズムは明らかではない [22]。一方、血圧との関連については、チーズの摂取が血圧の上昇と関連がなく [23]、また高血圧のリスク低下とも無関係であること [19]が報告されている。一方で、チーズの摂取と脈波伝播速度（心拍が動脈を伝わる速度。健常者では血管の弾力性により、脈波が血管壁に吸収され、速度は遅くなる。）低下との関連性が示唆されている [24]。

2型糖尿病に関しては、チーズの摂取によりそのリスクが低減されることが示唆されている [19]。

がんとの関連では、チーズ摂取は大腸がん [25],[26]および子宮内膜がん [27]と関連はなく、前立腺がんのリスクを上昇させる [28]とのシステマティックレビューがある。チーズ摂取による前立腺がんのリスク上昇は、チーズに含まれるカルシウムおよび脂肪以外の成分がリスク上昇に寄与していると推定されている。

骨代謝との関連では、チーズ摂取と股関節骨折のリスクの低下との関連が示唆されている [29]。

総死亡に関しては、長期間におけるチーズ摂取量の多寡は総死亡率と関連しないと示されている [30]。

以上のことから、メカニズムは明らかにされていないものが多いものの、チーズの摂取は多くの生活習慣病のリスクに好ましい影響を及ぼすか、疾患に悪影響を及ぼさない。一部の疾患に関してはリスクの上昇に影響を及ぼす可能性があるものの、総死亡率との関連はないとされている。従って、チーズに特定の効果を期待するよりも、チーズの持つ味わいや風味により、日常の食生活をより豊かにするために摂取すべきであると言える。チーズは世界各地で生産および消費されており、日本においても食生活の変化や生活水準の向上等により、チーズの消費量は増加している [31]。しかし、1人あたり消費量は諸外国と比べると依然として低い水準にあることから [32]、今後も消費の拡大が予想される。チーズは乳由来のカルシウムやたんぱく質などが豊富に含まれており少量でこれらの栄養素が補給できるため、摂食量が減少する高齢者では牛乳よりもチーズの方が摂取しやすく低栄養の予防に適している。また、ラクトース含量がごくわずかであることから、乳糖不耐症患者においても適用可能な食品である [33]。厚生労働省が示す「生活習慣病予防その他の健康増進を目的として提供する食事の目安」 [34]や「食事バランスガイド」 [35]等の媒体にも乳製品の積極的な摂取が明記されており、適切な摂取量であれば日本人の公衆栄養の向上に有用な食品の一つであると考えられる。

チーズの微生物叢およびその解析手法

チーズの風味における特徴を決定づける要因の一つがチーズの微生物叢であり、これはスターターに用いる微生物種の影響を受ける [36]。スターターには、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* や *L. lactis* subsp. *lactis* などの乳酸菌が使用されることが多い [37]。これらの乳酸菌は乳糖から乳酸のみを生成させるホモ乳酸発酵、または乳酸、二酸化炭素およびエタノールを生成させるヘテロ乳酸発酵を経て乳糖を代謝する。生成された乳酸は乳の pH を下げ、カードの生成とホエイの排出を促す [2]。また、乳酸菌の細胞外に存在するタンパク質分解酵素および細胞内に存在するタンパク質およびペプチド分解酵素が、チーズの熟成中にカゼインを加水分解し、チーズの風味や香りに関与する低分子量ペプチドおよび遊離アミノ酸を生成させる [37]。白カビチーズでは *Penicillium camemberti*、ブルーチーズでは *P. roqueforti* などの真菌が乳酸菌と共にスターターとして用いられる。*P. camemberti* はチーズ表皮で、*P. roqueforti* はチーズ内部で生育し、チーズの熟成中にタンパク質および脂肪酸分解に関与する [38]。このように、スターターはチーズの製造初期において重要な役割を果たすとともに、チーズの個性を生み出す主要因子である。チーズの製造に用いられる主なスターターを Table 2 に示す。

Table 2. The variation of starter and its function in cheese production [7].

Starter	Function	Cheese
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Formation of acid and flavor	Various cheeses
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Formation of acid	Various cheeses
<i>Lactococcus lactis</i> var. <i>hollandicus</i>	Formation of flavor	Edam, Gouda
<i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	Formation of acid and flavor	Gouda
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Formation of acid and flavor	Emmentaler, Mozzarella
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Formation of flavor	Gouda, Camembert
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	Formation of flavor	Cheddar
<i>Lactobacillus casei</i>	Formation of flavor	Swiss type cheeses
<i>Lactobacillus lactis</i>	Formation of acid	Emmentaler
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Formation of flavor	Mozzarella
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Formation of flavor	Emmentaler
<i>Penicillium roqueforti</i>	Formation of flavor	Roquefort, Gorgonzola
<i>Penicillium camemberti</i>	Formation of flavor	Camembert, Brie

チーズの微生物叢はスターターに大きく影響を受けるものの、それ以外の要因も存在することが報告されている。Wolf らは、ヨーロッパおよびアメリカの 10 か国における 137 種のチーズの微生物叢をしらべ、チーズ中に 1 %以上存在する微生物は 14 属の細菌と 10 属の真菌に限定されるが、そのうち少なくとも細菌では 60 %、真菌では 25 %がスターターではなく環境由来の微生物であることを報告している [39]。チーズの微生物叢を構成するスターター以外の微生物は、スターターが産生する乳酸による pH の低下で生育が促され、熟成過程において様々な役割を果たす。微生物種としては、多くのチーズの内部で増殖する非スターター乳酸菌、内部および表皮で増殖する乳酸菌以外の細菌、真菌などで、そのチーズの特徴と密接に関連する [2]。非スターター乳酸菌としては、主に通性ヘテロ発酵乳酸桿菌の *Lactobacillus paracasei*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. curvatus* および *Pediococcus acidilactici* が知られている。これらは、チーズの熟成を促し、その風味形成および苦みや辛みを和らげる遊離アミノ酸の生成を促す [40]。チーズ表皮では酸素の供給が可能のため、好気性細菌および真菌の生育がみられる。酵母の増殖は pH を上昇させ、その後に生育する細菌叢の形成を促す。また、白カビチーズでは、酵母の増殖に続き、カビの増殖が促される [41]。

このように、チーズ中の微生物叢は、熟成過程において微生物相互で関連し合い、そのチーズに特有の変化を生じ、最終的なチーズの特徴を作り出す。このため、チーズの微生物叢はこれまでも多くの研究がなされ、その解析手法についても進歩してきている。

微生物叢の解析は、従来の培養法により数十年間研究されてきたが、1990年代以降、DNAやRNAの直接抽出に基づく非培養分子生物学的手法が主流となった。非培養法による手法は、当初、分子フィンガープリント法（PCR-DGGE法、PCR-温度勾配ゲル電気泳動法およびPCR-一本鎖立体配座多型分析法など）またはPCR増幅後の標的rRNA配列のクローニングおよびシーケンスであった。さらに、近年の高性能シーケンシング（HTS：系統的バイオマーカーアンプリコンのディープシーケンスなど）により、従来不可能であった詳細な微生物叢まで解析できるようになった。HTSによるチーズ菌叢構造の報告例は今の所多くはないが、今後これらの手法による精密なチーズの菌叢構造解析が増加すると予想されている [40]。

前述のように、チーズの種類は様々であるが、そのなかでもウォッシュチーズはウォッシュ操作という独特の製法により、他のチーズとは異なる微生物叢が形成される。ウォッシュ操作には2種類あり、まず1つめはold-young smearing法という、熟成チーズを塩水でウォッシュした後、そのウォッシュ液を次に製造するチーズに植菌する手法である。これにより微生物叢の移行が行われるが、同時に *Listeria monocytogenes* や *Staphylococcus aureus* などの病原性をもつ細菌の移行も懸念されている。そこで2つめの手法として、既製品の *Brevibacterium linens*, *Geotrichum candidum* および *Debaryomyces hansenii* などを植菌する方法がとられることも多い [2],[42],[43]。ウォッシュ液には食塩水が用いられることが多く、このため高塩環境が作り出され、*Brachybacterium* 属などの耐塩性細菌が生育する [44]。従来 *B. linens* がウォッシュチーズの主要な細菌であると考えられてきた。しかし、解析技術の進歩により、マイクロコッカス属、スタフィロコッカス属およびコリネバクテリウム属の細菌種がウォッシュチーズ表皮から単離されている [2]。スタフィロコッカス属の細菌は熟成初期に、コリネバクテリウム属の細菌はスタフィロコッカスに変わって熟成16日目ごろからウォッシュチーズの主要細菌として生育する [2]。しかしこれらの微生物の潜在能力は詳細にはしらべられておらず、いくつかある報告例を見ても日本以外のウォッシュチーズについてであり [40],[45],[46]、日本産ウォッシュチーズの微生物叢をしらべた報告例はない。

食品容器包装

チーズの栄養素や風味成分は、保存期間中に変化する。モッツァレラチーズを用いた研究によると、保存日数が増えるごとに水分の損失による固形成分の割合増加が見られるとともに、総脂質、揮発性脂肪酸およびコレステロール、タンパク質が増加する一方、pH は低下することが報告されている [47]。また、ある種のフレッシュチーズにおいて、保存中に *Salmonella* 属菌、*Listeria monocytogenes*、および *Escherichia coli* O157:H7 などの病原性細菌が検出されている [48]。このような保存中の望ましくない変化を避けるためには、チーズに合った容器包装の選択が必要である。容器包装は、内容物となるチーズを物理的および機械的衝撃、環境由来の汚染物質、風味の変化、水分の損失から保護し、品質の劣化を防ぎ、賞味期間を延伸させる [49]。また、現代においては、容器包装は、マーケティングツールとして、イメージ図や製品情報を、そこに印刷することで、内容物を消費者に訴求する。このため、容器包装では、毒性、製品との適合性、耐衝撃性、衛生の維持、臭気および光からの保護、化学的不活性、形状および重量条件、印刷適性およびコストなど様々なことを考慮する必要がある。

様々な包装材の中でも、特にプラスチックは、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から食品の容器包装に広く利用されている [50]。近年では、単身世帯および高齢世帯の増加や女性の社会進出などによる中食市場の拡大などを背景に、プラスチック製食品容器包装の需要は拡大している。一方で、このようなプラスチック消費量の増大は、化石資源の枯渇や、使用後のプラスチック廃棄物の環境負荷など、新たな社会問題を引き起こしている。わが国で排出されるごみのうち、「容器包装廃棄物」は容積比で56.6%を占め、このうちプラスチック類は75%以上を占めている [51]。廃棄物の増大による最終処分場の残存容量のひっ迫から、家庭から一般廃棄物として排出される容器包装廃棄物のリサイクルシステムを構築することを目的に、1997年には「容器包装に係る分別収集および再商品化の促進等に関する法律（容器包装リサイクル法）」が施行され、さらに2006年には、リデュース：廃棄物の発生抑制、リユース：部品等の再使用、リサイクル：使用済み製品等の原材料としての再利用、のいわゆる3Rを推進するための同法の改正が行われた。一方、地球規模ではアジア諸国を中心とした地域からの環境中へのプラスチックごみの流出量は増え続け [52],[53]、プラスチック製ストローによる海洋生物への被害や、マイクロプラスチックによる環境汚染が注目されており、最も身近なプラスチック製品である食品容器包装への対応が課題となっている [54]。2015年に国連サミットにおいて決定された「Sustainable Development Goals (SDGs：持続可能な開発目標)」で、海洋ごみの削減が目標に掲げられるなど、全世界的な取り組みが始まっている [55]。これらの解決策の一つとして、従来の非生分解性プラスチックから生分解性プラスチックへの代替利用が挙げられる。2018年に欧州委員会が採択したEU初のプラスチック戦略では、生分解性プラスチックは自然環境、特に海洋環境では容易に分解されず、堆肥化可能とは言い難いものが多く存在し、従来のプラスチックと混在している現状においてはリサイクル製品にも悪影響を及ぼしかねないという否定的な論調が発表された [56]。しかし、食品の容器包装においては、人体への安全性が最優先されるため、夾雑物の除去に多大なコストがかかるリサイクルは不向きである [54]。業界団体である欧州バイオプラスチックからは、衛生を保持すべき食品への適用は、リサイクルよりも使い捨て可能な生分解性プラスチックに適応性があると主張した意見書がEU議会に提案され [57]、生分解性プラスチックの利用に注目が集まっている。

生分解性プラスチック

生分解性プラスチックとは、通常のプラスチックと同様に使用することができるが、使用後は自然界に存在する微生物の働きで、最終的に水と二酸化炭素などの無機物にまで分解され、自然界で炭素循環するプラスチックのことである。1968年にDarbyらが、ポリエステル型ポリウレタンが微生物によって分解されることを報告して以来 [58], 様々な生分解性プラスチックが提案、開発されてきた。現在では、ポリ乳酸 (PLA) [59],[60],[61], ポリブチレンサクシネート (PBSu) [60],[62], ポリ (ブチレンアジペート-co-ブチレンテレフタレート) (PBAT) [63],[64], ポリカプロラクトン (PCL) [60],[65], 改質デンプン[66], そして、ポリ (3-ヒドロキシブチレート) (P(3HB)) [67],[68]が生分解性プラスチックとして商用生産されている (Figure 2)。それらの使い道としては、日用品、農業用資材に始まり、自動車部品、電子材料の筐体、医療材料などの高機能性材料としての利用も進められている。そして、食品容器包装への利用が拡大している [61],[65],[69]。

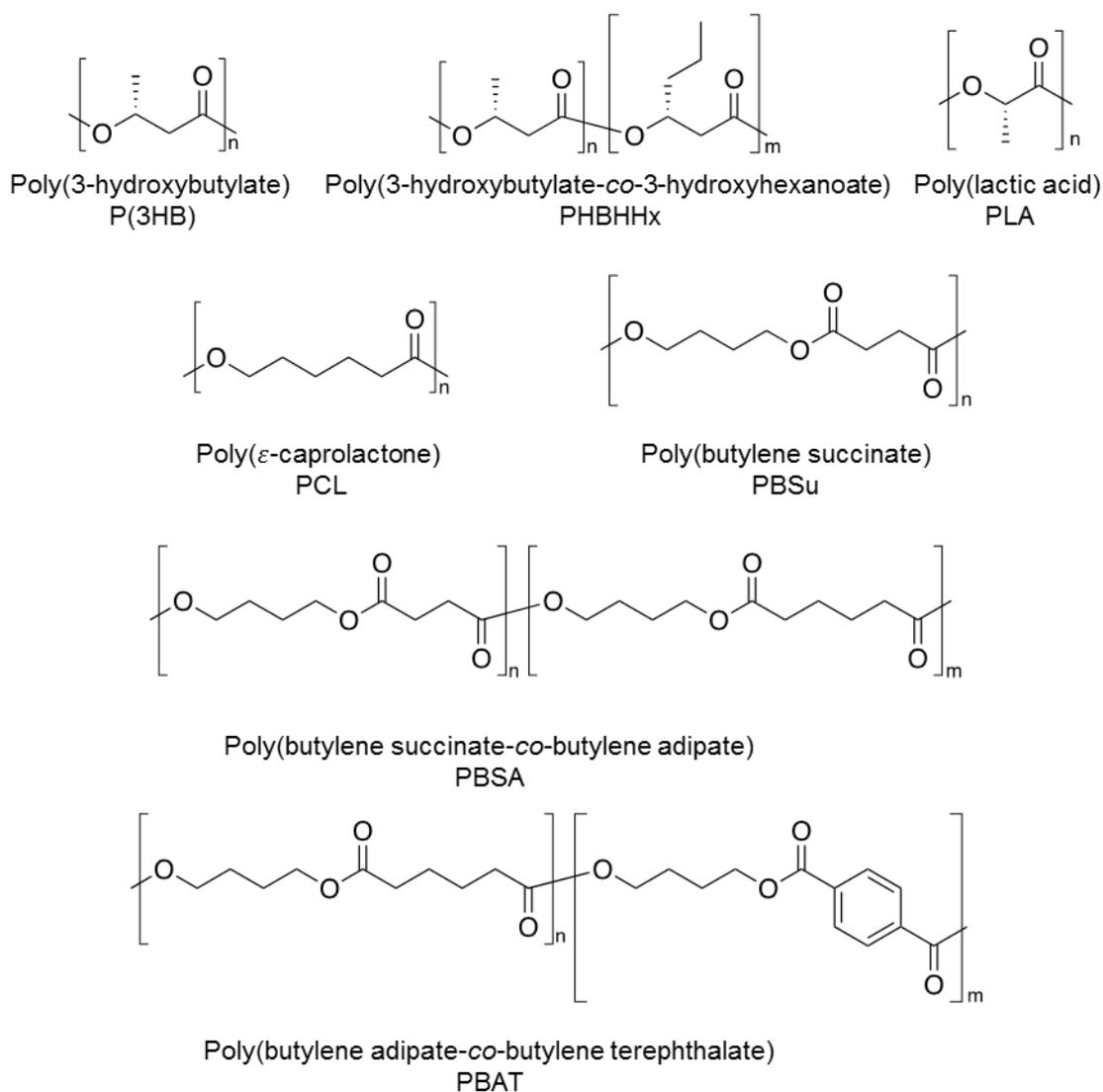


Figure 2. Chemical structures of biodegradable plastics.

食品容器包装に生分解性プラスチックを利用するにあたっては、材料そのもの自体および残存触媒やモノマーの安全性、廃棄後の環境分解性、汎用プラスチックと同等以上の機能的性質およびコストパフォーマンスなどの面から優れた性質であることが求められる。ポリ(3-ヒドロキシアルカン酸)(PHA)の一種であるP(3HB)は、生体適合性のある毒性の少ない素材で、医療用縫合糸にも用いられるなど、安全性が高い。多くの細菌により合成されることが知られており [70]、最近では *Halomonas* 属や *Marinobacter* 属の海洋性細菌が P(3HB)の合成酵素を持ち、菌体内に P(3HB)を蓄積することが報告されている [71],[72]。また、土壌、汚泥、海水などでの広い環境分解性が明らかとなっており、P(3HB)分解菌も多く単離されている [73]。このように安全性および環境特性の点で優れた素材ではあるが、硬くてもろい性質を持ち、生産コストも高いことから [74]、これまでのところ、P(3HB)ホモポリマーが食品容器包装に用いられることはない。P(3HB)の機械的特性を改良し、食品容器包装への適用も可能にするため、様々な共重合体が開発されている。その中でも、P(3HB)と3-ヒドロキシヘキサン酸(3HHx)との共重合体であるPHBHHxは、機械的特性と生分解性に優れた生分解性プラスチックとして商業生産されている。このうち、株式会社カネカが商業生産するPHBHHx(PHBHTM)は、海水中での生分解性が認められており、海洋資材への用途拡大が進められている。また、PHBHTMは、EUにおいて果物および野菜用の袋として用いられており、また、アメリカにおいても2018年にFDAの認可を得、食品包装資材への需要拡大が見込まれている。Danimer Scientificが生産するNodaxTMもPHBHHxであり、FDAの許可を得、食品メーカーや飲料メーカーとの共同で食品用容器包装資材の市場を拡大しつつある [75]。そのほかにも、現在、食品容器包装として利用可能な生分解性プラスチックとしては、PLA、PBAT、改質デンプン、PBSuなどがある。PLAは日本の食品衛生法によっても食品容器包装への使用が認められている生分解性プラスチックで、現在では、国内外を問わず、食品容器包装として広く利用されている。国内では、野菜や果物等の袋や容器、惣菜や弁当用のトレー、菓子類の包装等に利用されている [76]。PLAは高温コンポスト中で速やかに分解するため、食品容器に用いた場合、洗浄の必要がなく、そのまま堆肥化できるために利用価値があるが、自然環境中では生分解しない。このため、海洋汚染など現在の環境問題への対策として利用することはできない。また、EUにおいては、PBATがEcoflex[®]という名称で、改質デンプンがMater-Bi[®]という名称で食品容器包装として利用されている。しかしながらPBATは環境中での分解性が低いという課題があり、他方、改質デンプンは力学的特性が汎用プラスチックに劣っており用途が限定されるという課題がある。PBSuに関しては、BioPBSTM(バイオPBS)の名称で、従来から農業用マルチフィルムに用いられてきたが、2016年にFDAの認可を得たのに伴い、使い捨て食器や紙コップ、ガスバリア包材などの食品包装材用途でも用いられており、日本での適用も期待されている素材である。

食品の容器包装に関わる食品衛生法

日本の食品の容器包装に利用できるプラスチックは、現時点では食品衛生法（昭和22年法律第233号）に基づく「食品、添加物等の規格基準」（昭和34年12月28日厚生省告示第370号）によって、特定の物質の使用が制限される、ネガティブリスト制度による規制が行われている。運用上、法的に使用可能なプラスチックはそのネガティブリストを元にして「合成樹脂製器具又は容器包装の規格基準」（2006年3月31日厚生労働省告示第201号）にポジティブリストのような形で規定されており、これらは、フェノール樹脂、メラミン樹脂、ユリア樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリ塩化ビニリデン、ポリエチレンテレフタレート、ポリメタクリル酸メチル、ナイロン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリメチルペンテン、ポリビニルアルコール、そしてPLAを主成分とするプラスチックに限定されている。一方、欧米やアジア各国での容器包装使用に関する基準では、安全性が認められた物質以外は使用を原則禁止するポジティブリスト制度を採用している [77]。そのため、近年の製品の多様化・輸入品の増加等により、現行の日本の規制では国際的な整合性を図ることが困難となってきた。我が国においても、これらに対応すべく、2018年6月13日にポジティブリスト制への移行を柱とする食品衛生法等の一部を改正する法律が公布された。現在、厚生労働省の食品用器具および容器包装の規制の在り方に関する技術検討会において、ポジティブリスト策定に関する検討が進められており、生分解性プラスチックを含むポジティブリストの策定はポリオレフィン等衛生協議会において進められている。そのリスト中には生分解性プラスチックとしてPLAとPBSuが含まれている。

今後策定されるポジティブリストに生分解性プラスチックを収載するには、残存する触媒やモノマーの安全性を確認する必要があるが、使用中に分解を受けないことが前提となる。生分解性プラスチックの大部分が微生物によって分解された場合は容器包装としての機能が果たせないことに加えて、わずかに分解されただけでも食品衛生法が定める溶出試験に適応できない可能性を示している。特に微生物の活性が高いナチュラルチーズをはじめとする発酵食品では、消費までの間に食品中の微生物が生分解性プラスチックを分解する可能性が考えられる。

生分解性プラスチックを食品に利用する際の、その分解性や安全性に関する研究の必要性は以前から指摘されており [78]、これまでもいくつかの報告がある。Plackett らはPLA 単独およびPLA とPCL とのポリマーブレンドを用い、チーズの容器包装への適用性を検討している。セミハードに分類されるデンマーク原産のダンボーチーズを用い、EU の規格である European standard EN 13130 に従った接触による移行試験では、PCL 成分がわずかにチーズへと移行していることを確認しているが、量的には規格基準を下回るレベルであったと報告している [79]。Houyong らによる、ポリ(3-ヒドロキシブチレート-co-3-ヒドロキシバリレート) (PHBV) に対する移行試験では、PHBV 成分の試験用模擬食品への溶出が確認されたが、その溶出量はEUの規格を下回っていたと報告されている [80]。また、Holm らが行ったPLA のダンボーチーズの容器包装としての適用性に関する研究では、揮発性化合物の移行試験において、WHO のガイドラインに示された飲用水における最大許容量より低い値であったことが報告されている [81]。さらに、キトサン、ガラクトマンナンおよびカルボキシメチルセルロースなどの生分解性を有する可食材料による包装やフィルムがチーズに適用できることも報告されているが、包装材料から食品への物質の移行についてはさらなる研究が必要であると考えられている [82]。可食材料は食経験上から安全性が高い点が優れていると考えられるものの、包装材料に食物アレルギーの原因となる物質が含まれる場合、これらの患者への配慮が必要なことから、限定的な適用となるため、現実的ではないと考えられる。

以上の報告は、チーズ自体が生分解性プラスチックを分解するかを評価したものであるが、表皮が乾燥し、微生物活性が低いと考えられるセミハードチーズが中心である。特に特殊な微生物叢が形成されるウォッシュチーズでは、生分解性プラスチックに与える影響の報告例はない。加えて、チーズ中の微生物が生分解性プラスチックを分解するかに関してはこれまで報告されていない。ウォッシュチーズが生分解性プラスチックに及ぼす影響を検討し、適用可能な条件に関する研究を進めることで、安全性と環境保持に優れた食品容器包装実現のための基礎的資料となり得る。

本研究の目的

食品の容器包装において、安全性、衛生の保持並びに持続可能性の両立を実現させるために、生分解性プラスチックの活用は重要である [57]。日本国内では、三菱ケミカル株式会社がPBSuおよびPBSAをBioPBS™の名称で、株式会社ダイセルがPCLをプラクセル HIPの名称で、株式会社カネカがPHBHHxをカネカ生分解性ポリマー PHBH™の名称でそれぞれ製造販売していることに加えて、食品衛生法の改正が進められるなど、食品容器包装として生分解性プラスチックを利用するための社会環境が整備されつつある。一方、発酵食品などの食品中に含まれる微生物による生分解性プラスチックの分解に関する研究はほとんど行われていない。生分解性プラスチックを安全に食品容器包装へと利用するためには、どのような食品が生分解性プラスチックを分解するかを詳しくしらべる必要がある。

本博士論文では、対象となる食品としてウォッシュチーズに注目した。ウォッシュチーズはウォッシュ液による発酵を経るナチュラルチーズであり、他のナチュラルチーズとは異なる特徴的な微生物叢が形成されている [39]。このため、生分解性プラスチックに対しても通常の食品とは異なる作用を及ぼす可能性が考えられる。ウォッシュチーズはフランスをはじめとしたヨーロッパ各国で多く生産されており、近年では日本国内でも生産されている。特に日本においては、生産量および消費量の伸びと諸外国に比べた消費量の低さから [31],[32]、今後も生産および消費の拡大が見込まれている食品である。このため、ヨーロッパ各国のウォッシュチーズ 8 種 (第 2 章) および日本各地のウォッシュチーズ 4 種 (第 3 章) をターゲットとし、生分解性高分子分解微生物の探索を行った。その結果、フランス産 1 種および千葉県産 1 種のウォッシュチーズから P(3HB)分解菌が単離された。そこで、これらのウォッシュチーズの微生物叢とウォッシュチーズ由来単離菌について詳しくしらべた。

第 2 章では、フランス産ウォッシュチーズを対象とし、DGGE 解析を用いたウォッシュチーズの微生物叢解析を行う。また、種々の生分解性高分子をターゲットとして生分解性を評価し、生分解性を示した高分子を分解する微生物の特徴づけを行う。

第 3 章では、4 種の日本産ウォッシュチーズを対象とし、これまでに報告例のない日本産ウォッシュチーズの微生物叢をメタゲノム解析により評価する。また、種々の生分解性高分子をターゲットとして生分解性を評価し、生分解性を示した高分子を分解する微生物の特徴づけを行う。

第 4 章では、各章の研究結果を総括し、今後の展開および課題について議論する。

第2章

フランス産ウォッシュチーズからの P(3HB)分解 *Cellulosimicrobium* 属細菌の単離と特徴付け

2-1 諸言

生分解性プラスチックは、プラスチックによる環境汚染の解決策の一つであると考えられている。生分解性プラスチックは、環境由来の微生物によって分解されるため、食品容器に適用すると、内容物となる食品由来の微生物によって使用中に劣化および分解される可能性がある。このため、食品に含まれる微生物が生分解性プラスチックの品質に与える影響を研究する必要がある。微生物の作用により製造される発酵食品は、微生物活性の高さから生分解性プラスチックに対して分解を引き起こす可能性が高いと予想される。これまで、*Bacillus subtilis* 株による PESu, PBSu および PBSA の分解 [83]、改質デンプンの分解 [84]が報告されている。また、*Penicillium roqueforti* 株による PLA の分解についても報告されている [85]。これらはそれぞれ納豆 [86]やブルーチーズ [87]の製造に用いられる微生物であるが、発酵食品そのものから単離された微生物が生分解性プラスチックと接触した場合に分解が進行するかはこれまで報告されていない。

第2章では、研究対象としてウォッシュチーズを選択した。ウォッシュチーズの微生物叢をしらべるとともに、微生物による生分解性高分子への分解性の発現を検討することを目的とする。先行研究によると、チーズの原料とする乳の状態、つまり、殺菌の有無および動物種（牛、ヒツジ、ヤギ等）の違いによりチーズの微生物叢との間に有意な差を生じることが示唆されている [39],[88],[89]。そこで、原料乳の異なる8種のヨーロッパ産チーズを対象に、8種の生分解性高分子に対する生分解性評価を行う。また、生分解性高分子に対する分解活性を有していたチーズに対して、微生物叢および生分解性高分子分解活性を詳細にしらべる。

2-2 実験方法

試薬

ポリ(3-ヒドロキシブチレート) [P(3HB)], ポリ(3-ヒドロキシブチレート-co-3-ヒドロキシバリレート) (PHBV), ポリエチレンサクシネート (PESu), ポリブチレンサクシネート (PBSu), ポリ(ϵ -カプロラクトン) (PCL), ポリ乳酸 (PLA), ポリ(52 mol%-ブチレンアジペート-co-48 mol%ブチレンテレフタレート) (PBAT) およびポリ(ブチレンサクシネート-co-ブチレンアジペート) (PBSA) は、三菱ガス化学株式会社, 日本触媒株式会社, 昭和電工株式会社, ダイセル化学工業株式会社, 島津製作所, BASF 社(ドイツ), および昭和電工株式会社から各々提供を受けた。タカラ *Ex Taq*®, プラスミド pMD20 および T4 DNA リガーゼはタカラバイオ株式会社から購入した。オリゴヌクレオチド, GoTaq® ロング PCR マスターミックスおよびヌクレアーゼ P_I は, ユーロフィンズジェノミクス株式会社, プロメガ株式会社およびヤマサ醤油株式会社から各々購入した。その他の試薬は和光純薬工業株式会社およびロシュ・ダイアグノスティクス株式会社から購入した。

高分子はそれぞれクロロホルムに溶解し, メタノールで再沈殿させて精製した。フィルムは高分子キャストリング成形法により作製した。さらに, 熔融結晶化フィルムを調製するために, 熔融キャストフィルムを2枚のテフロンシートの間に入し, 200 °C で1 分間加熱しながらミニテストプレス(東洋製機製作所)で圧縮成形した。融解後, 85 °C に保ちながら3 日間結晶化した。P(3HB)については, 他のポリマーと異なり, 再沈殿後に集めて1 日間真空にて乾燥した。精製 P(3HB)を金型に入れ, カプトンポリイミドフィルム(東レ・デュポン株式会社)で覆った。その後, ミニテストプレス 10(東洋精機製作所)を用い, 15 MPa の圧力で190 °C, 1 分間圧縮した。フィルムを室温で1 日間アニーリングし, 約2×2×0.1 cm³にカットした。使用前に, フィルムをメタノールと蒸留水で洗浄し, 1 日間真空乾燥した。

培地

微生物の成育には Luria-Bertani (LB) 培地および0.2% (w/v) の乳化ポリエリテルまたはオリーブオイルを添加したミネラル培地を使用した。各培地の組成を Table 3 および Table 4 に示す。ポリエステルの乳化は, ポリエステル1 g をクロロホルム100 mL に溶解し, Plysurf(第一工業株式会社)0.01% (wt/v), および蒸留水500 mL を加え, 3 分間超音波処理(Tomy UD-200, OUTPUT level 8)を行った。乳化液中のクロロホルムを, 約12 時間室温で攪拌し続けて除去した。この乳化液に Table 4 に示した試薬および1.5% の寒天を加え, ポリエステル乳化培地とした [83],[90]。ただし, P(3HB)は直接 Table 4 の試薬に加えた。これらの培地を121 °C, 15 分間オートクレーブ滅菌し, その後滅菌シャーレに流し込んだ。

Table 3. The composition of LB medium (pH7.5)

Polypeptone	10.0 g/L
Yeast extract	5.0 g/L
NaCl	5.0 g/L

Table 4. The composition of mineral medium (pH7.0)

KH ₂ PO ₄	4.6 g/L
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	11.6 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.1 g/L
Yeast extract	0.5 g/L
Agar	20 g/L

細菌株

本研究では標準株として *Cellulosimicrobium cellulans* NBRC15516^T を使用した。

チーズの生菌数測定および生分解性高分子分解微生物の単離

Table 5 に示す 8 種のチーズを用いた。各チーズ片 (1.0 g) を 10 mL の超純水に分散したものを 100 μL を LB 培地に植菌した。30 °C で 24 時間培養した後、生菌数を測定した。また、各チーズ片 (1.0 g) を 10 mL の超純水に分散したものを 100 μL を P(3HB), PHBV, PESu, PBSu, PCL, PLA, PBAT および PBSA の各培地に植菌した。30 °C で 10 日間培養した後、コロニーの周囲にクリアゾーンを形成したものを集菌し、画線培養により LB 培地およびポリエステル乳化培地で培養し、純化した。

Table 5. Cheese samples used in this study.

Cheeses	GI ¹ institution	Milk treatment	Milk source	Country	Type
Taleggio	PDO ²	Pasteurized milk	Cow	Italy	Washed rind cheese
Ossou iraty fermier	PDO ²	Raw milk	Sheep	France	Hard cheese
Parmigiano reggiano	PDO ²	Raw milk	Cow	Italy	Hard cheese
Salva cremasco	PDO ²	Raw milk	Cow	Italy	Washed rind cheese
Cure nantais	-	Raw milk	Cow	France	Washed rind cheese
Etivaz	AOP ³	Raw milk	Cow	Swiss	Hard cheese
Trou du cru	-	Pasteurized milk	Cow	France	Washed rind cheese
Pont-l'èveque lait cru	PDO ²	Raw milk	Cow	France	Washed rind cheese

¹:Geographical Indication

²: Protected Designation of Origin

³:Swiss's original GI institution based on the EU system.

遺伝系統学的解析

単離株 (PONα) のゲノム DNA (gDNA) 抽出は、先行研究に準拠して行った [83]。PONα の 16SrDNA をコロニーPCR 法により増幅した。Forward プライマーは 16Sf: 5'-GTTTGATCATGGCTCAG-3' (大腸菌の 16S rDNA 塩基配列の 36-53 に相当), Reverse プライマーは 16Sr: 5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3' (大腸菌の 16S rDNA 塩基配列の 1517-1533 に相当) であった。反応は、1.25 U の ExTaq DNA polymerase (タカラバイオ株式会社), 100 nM の各 primer (16Sf および 16Sr), 25 mM の各 dNTP (dATP, dTTP, dCTP および dGTP), 5 μL の 10×ExTaq buffer (タカラバイオ株式会社) および 100 ng の gDNA を混合し、総量 50 μL として行った。PCR のサーマサイクルは以下のとおり行った。94 °C で 5 分間のプレヒート後、94 °C で 20 秒間の変性、55 °C で 30 秒間のアニーリング、72 °C で 2 分間の伸長を 25 サイクル行い、72 °C で 10 分間の保温を 1 サイクル行った。PCR 生成物は 1.5 % (wt./vol.) のアガロースゲルを用いた電気泳動によりサイズと純度を確認し、その後、T4 リガーゼ (タカラバイオ株式会社) を用い、T-Vector pMD20 (タカラバイオ株式会社) に 16 °C で連結した。16S rDNA 配列はユーロフィンゲノミクス株式会

社により行い、NCBI サイト上のプログラム blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用い GeneBank データと比較した。16S rDNA 塩基配列を DDBJ サイト上のプログラム ClustalW (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) を用いてアライメント解析した。解析データを用いてプログラム Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 (MEGA6) [91]を用い、近隣結合法により系統樹を構築した。

単離株の P(3HB)分解活性

P(3HB), PHB, PHBV, PESu, PBSu, PCL, PLA, PBAT および PBSA の 8 種のポリエステル、オリーブオイルおよびキチンに対する分解活性を、先行研究に準拠してクリアゾーン法により評価した [90]。分解活性の評価は、各種基質を含む乳化培地上に単離株を画線して 37 °C で 14 日間培養し、形成されたコロニー周辺のクリアゾーンの大きさを測定することで決定した。

また、固体の基質に対する分解活性評価は P(3HB), PHBV, PLA および PBAT のフィルム (1 cm×1 cm×0.1 cm) を用い、先行研究に準拠して重量減少法により評価した [83]。各フィルムを置いた培地に単離菌を植菌し、30 °C で 15 日間培養した。培養後、フィルムを回収し、メタノールと超純水で洗浄した。真空乾燥したフィルムの重量を測定し、分解前のフィルムの重量から分解後のフィルム重量を減じることで、分解量を算出した。ポリエステル分解活性能は、1 cm² のフィルムが 1 日に分解されるフィルムの質量として評価した (mg/cm²/day)。

表面形態観察

単離株の菌体を固定化し、金で真空蒸着した [92]。このサンプルを走査型電子顕微鏡 (Tabletop microscope TM3030, 株式会社日立ハイテクノロジーズ) で観察した。

グアニン-シトシン (GC) 含率

単離株および標準株の GC 含率は先行研究に準拠し、高速液体クロマトグラフィーを用いて決定した [93],[94]。標準物質として、λDNA を用いた。それぞれの DNA はヌクレアーゼ P1 (株式会社ヤマサ) によって前処理した。

脂肪酸組成

単離株および標準株の細胞を LB 培地上で 37 °C で一晩振とう培養した。脂肪酸の前処理と同定は先行研究に準拠して MIDI 法により行った [95],[96]。バクテリア酸メチルエステル (BAME) ミックス (シグマアルドリッチジャパン株式会社) を脂肪酸メチルエステルの標準物質として使用した。

生化学・生理学的性質

単離株および標準株の生化学および生理学的性質は API 20NE および API ZYM (ビオメリューバイオテック社) により評価した。API 20NE を用いた分析では、菌株をキットにおいて 30 °C で 24 時間および 48 時間培養した。その後、自発反応および試薬添加による呈色反応を観察し、評価表に基づいて定性的に評価した。API ZYM を用いた分析では、滅菌生理食塩水に懸濁させた菌株をキットにおいて 37 °C で 4 時間培養した。ZYM A 試薬および ZYM B 試薬を各カップに 1 滴ずつ添加した後、コントロールカップ溶液が透明になるまで蛍光灯の光を照射した。呈色程度は判定表に基づき半定量的に評価した。

生育および P(3HB)分解能に及ぼす温度の影響

単離株の生育能は LB 培地で 8 種の温度 (4, 15, 25, 30, 37, 40, 45 および 50°C) で培養したときのコロニーの大きさにより評価した。また, P(3HB)分解能は P(3HB)を含む LB 培地で 6 種の温度 (4, 15, 25, 30, 37 および 50°C) で培養したときのクリアゾーンの大きさにより評価した。

生育および P(3HB)分解酵素産生に及ぼす炭素源の影響

単離株を 3 mL の LB 培地で 37 °C, 20 時間好氣的に培養し, この前培養液を P(3HB), (R)-(-)-3-ヒドロキシ酪酸, (S)-(-)-3-ヒドロキシ酪酸, D-(+)-グルコース, コハク酸, 乳酸, D-(+)-ソルビトール, アジピン酸, D-(+)-マンノース, スクロース, LB, P(3HB)を含む LB および P(3HB)を含むチーズを唯一の炭素源として 0.2% (wt/v) 含むミネラル培地に 10 mL/L の割合で植菌後, 37 °C で 10 日間振とう培養した。生育能は各培養液の OD₆₀₀ を測定し, 評価した。また, P(3HB)分解酵素の活性は先行研究に準拠して決定した [97]。標準分析液は 50 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に P(3HB)顆粒 (モンサント社) 400 mg/L, NaCl 0.5 M および CaCl₂ 1 mM を混合させた。精製 P(3HB)顆粒の懸濁液は超音波発振器 (20 kHz, 250 W) に 10 分間かけて調製した。反応は酵素の添加により開始し, 1 cm のキュベットを用い, 37 °C, 650 nm での P(3HB)顆粒の濁度の減少を測定した。酵素 1 ユニットの定義は, 1 分あたり 1 ずつ OD₆₅₀ を減少させるのに必要な酵素量として定義した。

ポリマーゼ連鎖反応-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE) 解析

ポンレヴェックレクリュの微生物叢は PCR-DGGE 法により解析した。チーズ試料 (0.5 g) から ISOIL for Beads Beating (和光純薬工業株式会社) を用いてメタゲノム DNA を抽出し, 微生物叢解析に用いるまで -80 °C で保存した。16S rDNA を iCycler™ Thermal Cycler (バイオラッド社) を用いて PCR により増幅した。抽出したメタゲノム DNA をテンプレートとして用いて PCR を行った。反応液の組成は, メタゲノム DNA 溶液 (2.0 μL), GoTaq® Long PCR Master Mix 2X (10 μL), 16S rDNA 増幅のための Forward プライマー 341F - GC (5'-CGCCGCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCGCCTACGGGAGGCAGCAG-3') および Reverse プライマー 907R (5'-CCGTCAATTCCTTT RAGTTT-3') (10 pmol ずつ) とした [98]。これらを混合し, 超純水を用いて総量を 20 μL にした。メタゲノム DNA は 98 °C で 10 分間加熱後, 氷水で急冷したものを用いた。16S rDNA を増幅するためのサーマサイクルは, 以下のとおり行った。95 °C 3 分を 1 サイクル, 94 °C 30 秒, 64 °C 10 秒, 72 °C 45 秒を, 1 サイクルごとに 0.5 °C 下げながら 14 サイクル, 94 °C 30 秒, 57 °C 10 秒, 72 °C 45 秒を 16 サイクル, 72 °C 10 分を 1 サイクルとした。目的の DNA の増幅の確認には, アガロースゲル電気泳動を用いた。

チーズの微生物叢解析のため, 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) は, DCode™ Universal Mutation Detection System (バイオラッド社) により行った。DGGE ゲルと DNA 回収バッファの調製はバイオラッド社の手順に従った。変性剤濃度が 100% の 6% アクリルアミド溶液は, 以下の試薬により調製した。40% アクリルアミド/ビス溶液 (5.48 M のアクリルアミドおよび 69 mM の N,N'-メチレンビスアクリルアミド), 50× TAE バッファー (2.0 M のトリス塩基, 0.25 M の酢酸ナトリウムおよび 63 mM のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)), ホルムアミド, 尿素である。これらを混合し, 超純水を用いて総量 50 mL にした。10% の過硫酸アンモニウム溶液と N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミンをゲル化のために

加えた。変性剤濃度勾配ゲル (30~50%の変性剤) は model 475 gradient delivery system (バイオラッド社) を用いて調製した。PCR 産物 19 μL および 10 \times ローディングバッファー 2 μL をゲルに流し込み, 0.5 \times TAE バッファー中で 58 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間, 200 V の電圧下で EPS 601 (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) により電気泳動した。泳動後のゲルは SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (ロシュ・ダイアグノスティック株式会社) で染色し, DNA バンドはハイ・パフォーマンス UV トランスイルミネーター (フナコシ株式会社) で可視化した。切り出した DNA バンドは 37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩, 600 μL の DNA 回収バッファー (5 M の酢酸アンモニウムおよび 2.0 μM の EDTA) 中で保温し, ゲルから DNA を抽出した。抽出した DNA はエタノール沈殿により純化し, 10 μL の超純水に溶解した。

DGGE バンドの DNA 解析

DGGE ゲルから抽出した DNA をテンプレートとして, セミネスト PCR により DNA を増幅した。PCR 反応液は以下の組成とした。2.5 μL の抽出した DNA, 5 μL の GoTaq® Long PCR Master Mix 2X, 16S rDNA 増幅のための Forward プライマー 341F (5'-CCTA CGGGAGGCAGCAG-3') および Reverse プライマー 518R (5'-ATTA CCGCGGCTGCTGG-3') 各 10 pmol を混合し [98], 超純水を用いて総量 10 μL とした。16S rDNA 増幅のための PCR のサーマサイクルは以下のとおり行った。94 $^{\circ}\text{C}$ 2 分を 1 サイクル, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 秒を 25 サイクル, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 分を 1 サイクルとした。増幅した DNA はダイデオキシ法 (ユーロフィンジェノミクス株式会社) によりシーケンシングを行った。これを NCBI の nucleotide BLAST プログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) により GenBank のデータと比較し, 近縁種を探索した。

DNA アクセション番号

単離株である PON α 株の 16S rDNA 配列は日本 DNA データバンク (DDBJ) に LC186053 として登録された。

2-3 結果と考察

チーズの生菌数測定および生分解性高分子分解微生物の単離

各チーズの生菌数および各種生分解性高分子に対するクリアゾーン形成能の結果を Table 6 に示す。8種のチーズのうち、生菌数はポンレヴェックレクリュが最も多く、微生物による活性が最も高いと考えられた。また、ポンレヴェックレクリュのみが P(3HB)の培地上にクリアゾーンを形成した。本チーズに含まれる微生物が P(3HB)分解に関与すると考えられたため、本チーズをその後の実験に用いることとした。

Table 6. Numbers of living bacteria and clearing zone formation for biodegradable plastics.

Cheeses	Number of living bacteria (cfu ¹ /g)	Clearing zone formation							
		P(3HB)	PHBH	PESu	PCL	PLA	PBAT	PBSA	PBSA
Taleggio	320,000	-	-	-	-	-	-	-	-
Ossou iraty fermier	7,900	-	-	-	-	-	-	-	-
Parmigiano reggiano	1,000	-	-	-	-	-	-	-	-
Salva cremasco	74,500	-	-	-	-	-	-	-	-
Cure nantais	1,980,000	-	-	-	-	-	-	-	-
Etivaz	21,900	-	-	-	-	-	-	-	-
Trou du cru	169,000	-	-	-	-	-	-	-	-
Pont-l'èveque lait cru	5,770,000	+	-	-	-	-	-	-	-

¹:colony forming unit

+: means clearing zone was formed.

-: means clearing zone was not formed.

P(3HB)分解微生物の単離

ウォッシュチーズのポンレヴェックレクリュを植菌源とし、P(3HB)を唯一の炭素源として含む培地にクリアゾーンを形成する株、PON α 株を単離した。本株はグラム染色陽性の糸状菌（直径約 0.5 μ m）であった。Figure 3 に、本株の SEM 画像を示す。

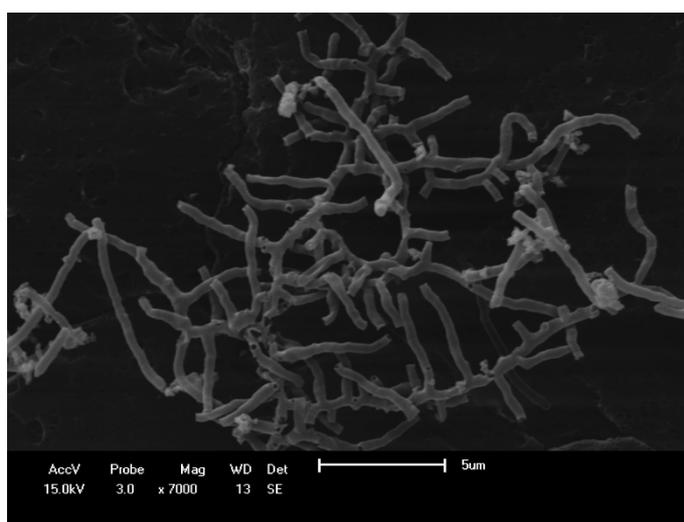


Figure 3. Scanning electron micrograph of strain PON α . The white bar indicates 5 μ m in length.

ウォッシュチーズの微生物叢

ポンレベックレクリュの微生物叢解析は PCR-DGGE 法を用いて行った。電気泳動図より 5 本のバンドが確認され、上部から順に番号を付した。Figure 4 に DGGE の電気泳動図を、Table 7 に DGGE の各バンドによる細菌分類を、Figure 5 に 16S rDNA 配列に基づき作成した系統樹を示す。

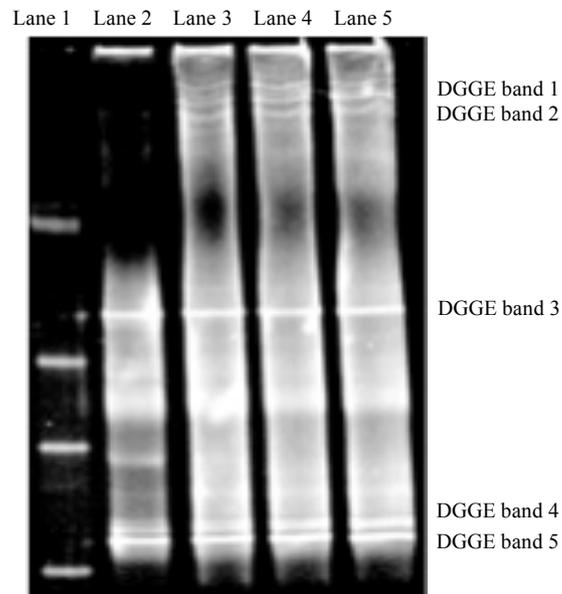


Figure 4. PCR-DGGE analysis of Pont-l'évêque lait cru. Lane 1: DGGE maker Lane 2-5: Pont-l'évêque lait cru.

Table 7. Identification of DGGE bands from Pont-l'évêque lait cru based on 16S rDNA.

Band	Related species	Accession number
DGGE band 1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	LC192945
DGGE band 2	<i>Staphylococcus succinus</i>	LC192946
DGGE band 3	<i>Lactococcus lactis</i>	LC192947
DGGE band 4	<i>Brevibacterium linens</i>	LC192948
DGGE band 5	<i>Brevibacterium</i> sp.	LC192949

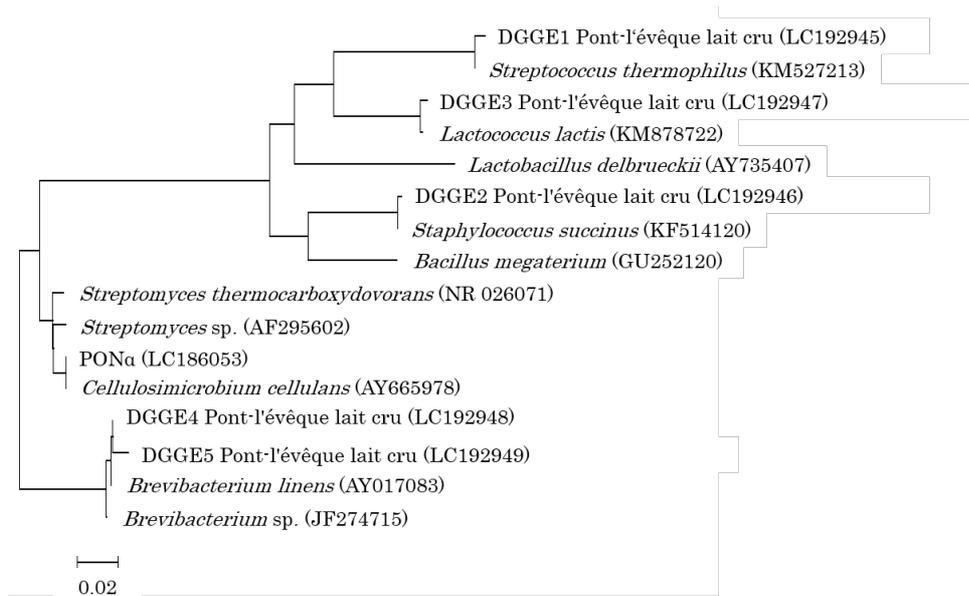


Figure 5. Phylogenetic tree of the P(3HB)-degrading isolate, designated as PONa, 5 bacterial strains detected by PCR-DGGE analysis, and the related strains on the basis of 16S rDNA sequences. The sequences were aligned using the program ClustalW and the tree topology was constructed applying the neighbour-joining method. Accession numbers are given in parentheses. The bar indicates 2% estimated sequence divergence.

ポンレヴェックレクリュのメタゲノムによる 16S rDNA の PCR-DGGE 解析により、本チーズにはフィルミキューテス門 (Bands1-3) およびアクチノバクテリア門 (Bands 4 and 5) に属する細菌が含まれていることがわかった。これらの細菌種は一般的にその他のナチュラルチーズにも含まれていることが知られている [46],[99],[100],[101]。本チーズに含まれていたフィルミキューテス門に属する 3 種の細菌は、乳酸菌に分類される細菌種であった。*Streptococcus thermophilus* はグラム陽性の好熱性連鎖球菌で、チーズやヨーグルトなどの乳製品のスターターに用いられる細菌である [102]。本細菌種は、スターターとして乳酸を産生するだけでなく、菌体外多糖を産生することも報告されている。菌体外多糖は、チーズのレオロジーの改善や水分保持の効果を有しており、低脂肪のモッツァレラチーズやCHEDDARチーズの食感改善および離水防止に利用されている [103],[104]。*Lactococcus lactis* はグラム陽性の連鎖球菌で、他のウォッシュチーズのスターターとして用いられているとの報告がある [46]。また、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* から精製されたシスタチオン β リアーゼは、チーズのフレーバーであるメタンチオール の産生に関与する酵素として報告されている [105]。*Staphylococcus succinus* はグラム陽性の球菌で、他の種類のチーズのスターターとして用いられている [106]。一方、アクチノバクテリア門に属する *Brevibacterium linens* はグラム陽性の桿菌で、*Debaryomyces hansenii* や *Geotrichum candidum* などの真菌とともにウォッシュチーズのウォッシュ液に用いられている [2],[107]。*B. linens* はメチオニン を代謝してメタンチオールなどの硫黄化合物を産生することが報告されており、ウォッシュチーズ特有のにおいについてはこれに由来すると考えられている [2],[108]。これらのことより、今回検出された細菌種はウォッシュチーズをはじめとしたナチュラルチーズのスターターやウォッシュ液として用いられることがある細菌種であった。このため、ポンレヴェックレクリュのスターターおよびウォッシュ液がその由来であった可能性がある。これらの細菌種は、乳酸菌としての乳酸生成やウォッシュチーズの特徴を形成する役割を果たしていたと考えられる。また、これまでにもチーズから検出された細菌種であり、食経験上の安全性があることから、病原性をもつ細菌種ではないと考えられる。

本博士論文に用いた PCR-DGGE 法は非培養法であるため、培養困難な微生物についても検出可能であるが、これまでの研究では、存在比率 1%以下の微生物は検出されないことが報告されている [109]。このため、本研究によりポンレヴェックレクリュの細菌叢の大部分を把握し、既知の細菌種で構成されていることがわかったが、全ての細菌を検出できたわけではないと考えられる。また、今回は細菌をターゲットとし、真菌の解析は行わなかった。今後は、より高性能の微生物叢解析法を用い、細菌叢と真菌叢との関連についてもしらべ、微生物叢の全体像を把握する必要がある。

PON α 株の 16S rRNA 遺伝子のヌクレオチド配列を NCBI データベースの 16S rDNA 配列と相同性探索を行ったところ、PON α 株はアクチノバクテリア門 *Cellulosimicrobium* 属に属することがわかった (Figure 5)。本株の 16S rDNA 配列は *Cellulosimicrobium cellulans* と高い相同性 (99%) を示した。*Cellulosimicrobium* 属細菌はセルロース分解活性を示す細菌種で、これまでに土壌 [110]、ヒトの臨床検体 [111]、および南極の雪 [112]などから検出されているが、食品からの単離例として、9 種のブルーチーズから検出されたことが報告されている [113]。従って本株は食経験上の安全性はあることが推定される。

NCBI のデータベースでは *Cellulosimicrobium cellulans* F16 株の gDNA に P(3HB)分解酵素を示す ORF (KON75583.1, 64–262) が存在していた。一方、今回標準株として用いた *Cellulosimicrobium cellulans* NBRC15516^T のゲノム構造は不明であるが、本株は P(3HB)分解活性を示さなかった。また、これまで *Cellulosimicrobium* 種が P(3HB)を分解することは報告されていない。このため、本報告が *Cellulosimicrobium* 属細菌の P(3HB)分解活性発現について初めての報告となる。他方、*Cellulosimicrobium* 属細菌は、これまでも他のチーズでの単離例があることから、本株を含むと考えられるチーズの容器包装に P(3HB)を適用すると使用中に分解が起こる可能性が示唆された。

P(3HB)分解微生物の特徴付け

本株の gDNA の GC 含率は 71.6 mol% で、標準株である *C. cellulans* NBRC15516^T の 73.8 mol% と異なる値を示した。本株はエスクリンおよびゼラチンの加水分解試験および β-ガラクトシダーゼ試験で陽性を示したが、標準株はゼラチン加水分解試験陰性であった (Table 8)。

Table 8. Biochemical and physiological properties of isolate and the reference strain.

	PON α	NBRC 15516 ^T
Characteristics		
Gram strain	Positive	Positive
Oxidase	-	-
Nitrate reduction	-	+
Indole production	-	-
Oxidation of glucose to gluconate	-	-
Arginine dehydrolase	-	-
Urease	-	-
Hydrolysis of esculin	+	+
Hydrolysis of gelatin	+	-
β-Galactosidase	+	+
Utilization of carbon source		
Glucose	+	+
L-Arabinose	+	+
D-Mannose	+	+
D-Mannitol	-	-
N-Acetyl-D-glucosamine	+	+
Maltose	+	+
Gluconate	+	+
<i>n</i> -Capric acid	-	-
Adipic acid	-	-
DL-Maleic acid	-	-
Citrate	-	-
Phenyl acetate	-	-
DNA G+C content (mol %)	71.6	73.8

+: means present.

-: means negative.

その他の酵素活性は、アルカリホスファターゼ、エステラーゼ (C4)、エステラーゼリパーゼ (C8)、ロイシンアリルアミダーゼ、トリプシン、酸性ホスファターゼ、ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、α-グルコシダーゼ、および N-アセチル-β-グルコサミダーゼが確認され (Table 9)、これらの性質は標準株と類似していた。

Table 9. Enzyme production profile of isolate and the reference strain.

Enzyme	PON α	NBRC 15516 ^T
Alkaline phosphatase	+	+
Esterase (C4)	+	+
Esterase lipase (C8)	+	(+)
Lipase (C14)	-	-
Leucine arylamidase	+	+
Valine arylamidase	(+)	(+)
Cystine arylamidase	(+)	(+)
Trypsin	(+)	(+)
Chymotrypsin	-	-
Acid phosphatase	+	+
Naphthol AS-BI phosphohydrolase	+	+
α -Galactosidase	-	-
β -Galactosidase	+	+
β -Glucuronidase	-	-
α -Glucosidase	+	+
β -Glucosidase	+	+
N-Acetyl- β -glucosaminidase	+	+
α -Mannosidase	-	-
α -Fucosidase	-	-

+: means present.

(+: means weakly present.

-: means negative.

PON α 株の脂肪酸組成は、3-OHC_{12:0}, C_{14:0}, C_{i-15:0}, C_{ai-15:0}, C_{15:0}, C_{i-16:0}, C_{16:0}, C_{i-17:0} および C_{17:0} であった。C_{ai-15:0} を第一主成分とし、次に C_{i-15:0} を多く含んでおり、標準株の組成と類似していた。

LB 培地での生育至適温度の範囲は 37 °C から 40 °C であり、4 °C および 50 °C では生育できず、標準株の結果と類似していた。しかし P(3HB)培地でのクリアゾーン形成は PON α 株が 15 °C から 37 °C で見られたのに対し、標準株ではいずれの温度でも観察できなかった (Table 10)。チーズは一部を除き、大半が冷蔵で流通および保存される食品である。このため、低温環境下で P(3HB)の分解が進まなかったことは、本株が存在するチーズの容器包装に用いても通常の流通温度帯では分解が進行しないことが示唆された。

Table 10. Effect of temperature of the growth on LB medium and clearing zone formation on P(3HB)-containing medium by isolate and the reference strain

Temperature (°C)	PON α		NBRC 15516 ^T	
	Growth	Clearing zone formation	Growth	Clearing zone formation
4	-	-	-	-
15	+	+	+	-
25	++	++	++	-
30	++	++	++	-
37	+++	+++	+++	-
40	+++	ND	+++	ND
45	++	ND	-	ND
50	-	-	-	-

+++: means growth was excellent, or a large clearing zone was formed.

++: means growth was good, or a medium clearing zone was formed.

+: means growth was poor, or a small clearing zone was formed.

-: means not growing, or a clearing zone was not formed.

ND: means no data.

各種生分解性高分子に対する分解活性では、本株は PESu, PBSu, PCL, PLA, PBAT およびオリーブオイルを含む培地ではクリアゾーンを形成しなかったが、P(3HB), P(3HB)を含む LB, PHBV およびキチンを含む培地でクリアゾーンを形成した (Table 11)。PHBV は P(3HB)の共重合体である。このため、本株は P(3HB)を組成に含む共重合体にも分解性を示すことが確認された。一方、標準株はキチン以外のどの培地でもクリアゾーンを形成しなかった。P(3HB)はエステル結合を有する脂肪族ポリエステルである。両株ともエステラーゼ活性およびエステラーゼリパーゼ活性を示したが (Table 9), 標準株のみ P(3HB)の分解が起こらなかったため、これらの酵素は P(3HB)の分解に関与しておらず、本株のみが有する P(3HB)分解酵素活性により分解が起こっている可能性が示唆された。

Table 11. The ability of clearing zone formation on the plates containing polymers and olive oil by isolate and the reference strain

Polyester	PON α	NBRC 15516 ^T
P(3HB)	++	-
LB with P(3HB)	++	-
PHBV	++	-
PESu	-	-
PBSu	-	-
PCL	-	-
PLA	-	-
PBAT	-	-
PBSA	-	-
Olive oil	-	-
Chitin	+++	+++

+++ : means growth was excellent, or a large clearing zone was formed.

++ : means growth was good, or a medium clearing zone was formed.

- : means not growing, or a clearing zone was not formed.

菌体増殖と P(3HB)分解酵素産生に及ぼす炭素源の影響

PON α 株の生育における各種炭素源の影響を 650 nm における培養液の濁度を測定し、評価した。Table 12 に示すとおり、細菌の増殖には培養液に添加する炭素源の影響があることが判明した。

Table 12. Growth levels and P(3HB) depolymerase activity by PON α grown on various media.

Carbon source	Growth	P(3HB) depolymerase activity (mU/mL)
P(3HB)	+	4
R-(-)-3-Hydrobutyric acid	++	42
S-(+)-3-Hydrobutyric acid	++	15
D-(+)-Glucose	++	35
Succinic acid	++	7
Lactic acid	+	0
D-(+)-Sorbitol	+	9
Adipic acid	+	8
D-(+)-Mannose	++	6
Sucrose	+	4
LB	++	8
LB with P(3HB)	+++	11
Cheese	++	0
Cheese with P(3HB)	++	21
None	+	0

+++: means growth was excellent.

++: means growth was good.

+: means growth was poor.

本株は P(3HB)よりもそのモノマーである R-(-)-3-ヒドロキシ酪酸を炭素源として添加した際に、よく生育し、またより高い酵素活性を示した。一方、チーズのみを炭素源とした場合は、生育はしたが酵素活性は見られず、チーズに P(3HB)を添加すると酵素活性を発現した。このことから本株は、チーズを栄養源として生育促進すると示唆された。また、菌が増殖したことで P(3HB)のみの場合よりも酵素産生量が増加したものと考えられた。また、最も生育が促進されたのは LB 培地に P(3HB)を添加した場合であったが、酵素活性はチーズに P(3HB)を添加した場合の方がより高かった。従って、チーズ中の何らかの物質が酵素発現を補助している可能性が示唆された。

P(3HB)フィルムの分解能

P(3HB), PHBV, PLA および PBAT のフィルムを PON α 株とともに好氣的に培養した結果, 30 °C で 10 日間培養後の重量減少は P(3HB) (0.03 mg/cm²/day) および PHBV (0.05 mg/cm²/day) で見られたが, PLA および PBAT フィルムは変化がなかった。このことから, PON α 株は乳化 P(3HB)だけでなく, 固体の P(3HB)および P(3HB)の共重合体である PHBV も分解できることが示唆された。また, 分解速度は P(3HB)よりも共重合体の方が大きかった。生分解性高分子における酵素加水分解は非晶領域で優先的に生じる [114]。共重合体では, 第二モノマーユニットの導入により, ホモポリマーと比較して非晶領域が大きくなるため, P(3HB)より PHBV で分解速度が大きくなったと推定される。

2-4 まとめ

ウォッシュチーズであるポンレヴェックレクリュの微生物叢を解析し, これまでにもチーズから検出されている, 乳酸菌やウォッシュチーズ特有の細菌といった既知の微生物から構成されていることがわかった。また, P(3HB)分解菌として PON α 株を単離し, 特徴づけを行うとともに, P(3HB)のチーズの容器包装への適用可能性をしらべた。本株は *Cellulosimicrobium cellulans* と高い相同性を示した。*Cellulosimicrobium cellulans* F16 の gDNA には P(3HB)分解酵素を示す ORF が推定されているが, これまで *Cellulosimicrobium* 種が P(3HB)を分解することは報告されていないため, 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。本株は P(3HB)を炭素源として利用できるが, モノマーである R-($-$)-3-ヒドロキシ酪酸の方がより増殖に適していた。また, チーズの存在下で生育が促進され, これにより P(3HB)酵素活性が高まることが示された。しかし, 低温環境下では酵素活性は見られなかった。以上のことからチーズに含まれる何らかの物質が本株の P(3HB)酵素活性を補助していると考えられるが, 一般的なチーズの流通および保存温度である低温条件下では分解が進行しないため, (3HB)のチーズ容器包装材料への適用可能性が示唆された。今後は P(3HB)の容器包装材料への実用性を高めるため, ポンレヴェックレクリュに含まれる酵素活性誘導物質を特定する必要がある。

第3章

日本産ウォッシュチーズの微生物叢と生分解性高分子分解活性

3-1 諸言

第2章ではウォッシュチーズが多く生産されているフランス産のポンレヴェックレクリュを用い、微生物叢および生分解性高分子との関連について詳細にしらべた。一方、日本においてもウォッシュチーズは生産されている。ヨーロッパとは異なる製法 - ウォッシュ液に日本酒等を用いる - による製品が存在していることから、ヨーロッパ産のものとは異なる微生物叢が形成される可能性がある。しかし、日本のウォッシュチーズの微生物叢についてしらべた報告はなく、生分解性高分子との関連についても検討された例はない。

そこで第3章では、4種の日本産ウォッシュチーズに対して、メタゲノム解析、および定量PCR (qPCR) 法を用いて菌叢構造をしらべる。加えて、微生物叢構造とチーズレオロジーとの関係をしらべる。さらに、P(3HB)に分解性を示した千葉県産ウォッシュチーズからP(3HB)分解菌を単離し、P(3HB)分解活性について詳細にしらべる。

3-2 実験方法

試薬

P(3HB), PHBV, PLA, PBSu, PBSA, PESu, ポリ (52 mol% α -ブチレンアジペート-co-48 mol%ブチレンテレフタレート) (PBAT) および PCL は, 三菱ガス化学株式会社, 島津製作所, 昭和電工株式会社, BASF 社 (ドイツ) およびダイセル化学工業株式会社から各々提供を受けた。オリゴヌクレオチドは, ユーロフィンズジェノミクス株式会社から購入した。その他の試薬は和光純薬工業株式会社およびロシュ・ダイアグノスティックス株式会社から購入した。

P(3HB)の精製のため, 再沈殿を行い, その後 1 日間, 真空乾燥した。精製した P(3HB)を金型に入れ, カプトンポリイミドフィルム (東レ・デュポン株式会社) で覆った。その後, ミニテストプレス 10 (東洋精機製作所) を用い, 15 MPa の圧力で 190 °C, 1 分間圧縮した。フィルムを室温で 1 日間アニーリングし, 約 2×2×0.1 cm³にカットした。使用前に, フィルムをメタノールと蒸留水で洗浄し, 1 日間真空乾燥した。

培地

微生物の成育には Luria-Bertani (LB) 培地および 0.2 % (w/v) の乳化ポリエステルまたはオリーブオイルを添加したミネラル培地を使用した。各培地の組成を Table 13 および Table 14 に示す。ポリエステルの乳化は, ポリエステル 1 g をクロロホルム 100 mL に溶解し, Plysurf (第一工業株式会社) 0.01 % (wt/v), および蒸留水 500 mL を加え, 3 分間超音波処理 (TOMY UD-200, OUTPUT level 8) を行った。乳化液中のクロロホルムを, 約 12 時間室温で攪拌し続けて除去した。この乳化液に Table 14 に示した試薬および 1.5 %の寒天を加え, ポリエステル乳化培地とした [83],[90]。ただし, P(3HB)は直接 Table 14 の試薬に加えた。これらの培地を 121 °C, 15 分間オートクレーブ滅菌し, その後滅菌シャーレに流し込んだ。

Table 13. The composition of LB medium (pH7.5)

Polypeptone	10.0 g/L
Yeast extract	5.0 g/L
NaCl	5.0 g/L

Table 14. The composition of mineral medium (pH7.0)

KH ₂ PO ₄	4.6 g/L
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	11.6 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.005 g/L
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.1 g/L
Yeast extract	0.5 g/L
Agar	15 g/L

細菌株

本研究では標準株として *Alcanivorax dieselolei* B-5^T (AY683537) [115]を使用した。

ウォッシュチーズ由来高分子分解微生物の単離

Table 15 に示す 4 種の日本産ウォッシュチーズを高分子分解細菌の単離源として使用した。これらのチーズ片 (約 0.5 cm×0.5 cm) を P(3HB), PLA, PBSu, PBSA, PBAT, PCL およびオリーブオイルの各基質と 0.5 % または 3.0 % NaCl を含む各培地上に置き, 30 °C で 4 日間培養した。コロニーの周囲にクリアゾーンを形成したものを集菌し, 30 °C で 7 日間希釈法により同じ培地で培養し, 純化した。

Table 15. Washed-rind cheeses used in this study.

Abbreviation	Product name	Manufacturer	Production area	Raw milk	Washing brine	Color of surface
Cheese 1	Mori-no cheese	Shimizu farm	Nagano	Cow of brown swiss's milk	Non-sterile groundwater containing salt and <i>Brevibacterium linens</i>	Orange color
Cheese 2	Fromage d'Oume	Fromages du Terroir	Tokyo	Cow's milk	Brine and brine with 3 % of Japanese Sake	Off- white
Cheese 3	Fromages de Aile	Cheese factory Adonai	Hokkaido	Cow's milk	About 2 % of brine	Orange color
Cheese 4	Muchuri	Cheese factory Ikagawa	Chiba	Cow of jersey's milk	About 1 % of brine	Orange color

遺伝系統学的解析

単離株 (MC1 株) のゲノム DNA (gDNA) 抽出は, 先行研究に準拠して行った [83]。MC1 の 16S rDNA をコロニーPCR 法により増幅した。プライマーは 16Sf : 5'-GTTTGATCATGGCTCAG-3' および 16Sr : 5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3' と, 27f : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' および 1525r : 5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3' の 2 セットを用いた。反応は, 1.25 U の ExTaq DNA polymerase (タカラバイオ株式会社), 100 nM の各 primer (16Sf および 16Sr), 25 mM の各 dNTP (dATP, dTTP, dCTP および dGTP), 2.5 μL の 10 × ExTaq buffer (タカラバイオ株式会社) および 100 ng の gDNA を混合し, 総量 25 μL として行った。PCR のサーマサイクルは以下のとおり行った。94 °C で 1 分間のプレヒート後, 94 °C で 30 秒間の変性, 55 °C で 30 秒間のアニーリング, 72 °C で 1.5 分間の伸長を 25 サイクル行った。PCR 生成物は 1.5 % (wt./vol.) のアガロースゲルを用いた電気泳動によりサイズと純度を確認し, その後, T4 リガーゼ (タカラバイオ株式会社) を用い, T-Vector pMD20 (タカラバイオ株式会社) に連結した。16S rDNA 配列ノーシーケンシングは GENETYX ver.12 (株式会社 ゼネティックス) により行い, NCBI サイト上のプログラム blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用い GeneBank データと比較した。16S rDNA 塩基配列を DDBJ サイト上のプログラム ClustalW (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) を用いてアライメント解析した。解析データを用いてプログラム MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis [116] を用い, 近隣結合法により系統樹を構築した。

高分子分解能

4 種のウォッシュチーズおよび単離株 (MC1 株) の P(3HB), PLA, PESu, PBSA, PBAT および PCL の 6 種の高分子およびオリーブオイルに対する分解活性を, 先行研究に準拠してクリアゾーン法により評価した [90]。分解活性の評価は, 各種基質を含む乳化培地上にチーズおよび単離株を植菌して 30 °C で 7 日間培養し, 形成されたコロニー周辺のクリアゾーンの大きさを測定することで決定した。

単離株およびチーズの P(3HB)重量減少評価

単離株およびチーズの固体の P(3HB)に対する分解活性評価は、P(3HB)のフィルム（約 1 cm×1 cm×0.1 cm）を用い、先行研究に準拠して、重量減少法により評価した [83]。滅菌したチーズおよび MC1 株を植菌したマリンミネラル（MM）培地、非滅菌チーズを植菌した MM 培地、MC1 株を植菌した MM 培地、MC1 株を植菌した LB 培地および滅菌チーズを植菌した MM 培地にそれぞれ P(3HB)フィルムを置いて 30 °C で培養した。培養後、フィルムを回収し、メタノールと超純水で洗浄した。真空乾燥したフィルムの重量を測定し、分解前のフィルムの重量から分解後のフィルム重量を減じ、P(3HB)分解活性能を決定した。

表面形態観察

単離株およびチーズ 4 とともに 30 °C で 14 日間培養した P(3HB)フィルムの培養前後の表面形態観察を先行研究に準拠して行った [92]。単離株およびフィルムをイオンコーター（JFC-1500, 日本電子株式会社）を用いて金蒸着し、このサンプルを走査型電子顕微鏡で観察した。機器は、単離株については JCM-6000Plus NeoScope™（日本電子株式会社）を、培養前のフィルムについては Miniscope TM4000Plus（株式会社日立ハイテクノロジーズ）を、培養後のフィルムについては Tabletop microscope TM3030（株式会社日立ハイテクノロジーズ）をそれぞれ用いた。

生化学・生理学的性質

単離株および標準株の生化学および生理学的性質は API 20NE および API ZYM（ビオメリューバイオテック社）により評価した。API 20NE を用いた分析では、菌株をキットにおいて 30 °C で 24 時間および 48 時間培養した。その後、自発反応および試薬添加による呈色反応を観察し、評価表に基づいて定性的に評価した。API ZYM を用いた分析では、滅菌生理食塩水に懸濁させた菌株をキットにおいて 37 °C で 4 時間培養した。ZYM A 試薬および ZYM B 試薬を各カップに 1 滴ずつ添加した後、コントロールカップ溶液が透明になるまで蛍光灯の光を照射した。呈色程度は判定表に基づき半定量的に評価した。

生育および P(3HB)分解能に及ぼす温度の影響

単離株の生育能は P(3HB)を含む培地で 6 種の温度（4, 20, 25, 30, 37 および 50°C）で 5 日間培養したときのコロニーの大きさにより評価した。また、P(3HB)分解能は P(3HB)を含む培地で 6 種の温度（4, 20, 25, 30, 37 および 50°C）で 5 日間培養したときのクリアゾーンの大きさにより評価した。

ウォッシュチーズにおける細菌および真菌の定量 PCR

4種のチーズに存在する細菌および真菌のリボソームDNA（r DNA）のコピー数の定量を定量PCR（qPCR）法を用いて行った [117]。qPCRはライトサイクラー480（ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社）により行った。qPCRの反応液の組成は以下のとおりであった。g DNA（1.0 μL）、SYBR® Premix Ex Taq™（タカラバイオ株式会社）（25μL）、細菌の16S rDNA増幅のためのプライマーとしてEUB338（5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'）とEub518（5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'）（各10 pmol）、真菌の18S rDNA増幅のためのプライマーとしてnu-SSU-1196F（5'-GGAAACTCAC-CAGGTCCAGA-

3') と nu-SSU-1536R (5'-ATTGCAATGCYCTATCCCCA-3') (各10 pmol) および超純水 (21.0 μL) である。メタゲノムDNAは98 °Cで10分間加熱後、氷水で急冷したものを用いた。細菌の16S rDNAを増幅するためのサーマサイクルは、以下のとおり行った。95 °C 10 秒を1 サイクル, 95 °C 5 秒, 61 °C 25 秒を45 サイクル, 95 °C 5 秒を1 サイクル, 55 °C 10 秒を1 サイクルごとに0.5 °C 下げながら80 サイクルとした。また真菌のDNAを増幅するためのサーマサイクルは、以下のとおり行った。95 °C 10 秒を1 サイクル, 95 °C 5 秒, 56 °C 35 秒を45 サイクル, 95 °C 1 分を1 サイクル, 55 °C 10 秒を1 サイクルごとに0.5 °C 下げながら80 サイクルとした。プラスミドDNAの検量線は*Rhodococcus fascians* NKCM2511 (AB591807) の16S rDNAおよび*Epichloe* sp. RKCM45 (LC416984) の18S rDNAをテンプレートとして用いて作成した。

ウォッシュチーズにおけるレオロジー測定

4種のチーズのレオロジーは、小型卓上試験機 (EZ-Test, 島津製作所) を用いて測定した。測定は直径 7×10^{-3} m の球状治具を用い、50 mm/min の速度、 5×10^{-2} Pa の圧力下で、室温にて行った。チーズサンプルは厚さ平均約 5 cm とした。ヤング率 E (Pa) はヘルツモデル [118]を用い、以下の式にて計算した。

$$F = \left[\frac{4R^{1/2}}{3(1-\nu^2)} \right] E \delta^{3/2}$$

F は力 (N), R は治具の直径 (m), ν はポワソン比 (ゴム状物質の代表値として 0.5), δ は押し込み (m) を示している。

メタゲノム解析

4種のチーズの微生物叢はメタゲノム解析により解析した。それぞれのサンプルからPowerSoil® DNA isolation kit (MO BIO Laboratories社) を用いてメタゲノムDNAを抽出し、微生物叢解析に用いるまで80 °Cで保存した。細菌の16S rDNAおよび真菌のITS領域を2 step tailed PCR法を用いてPCRにより増幅した。1回目のPCR反応液の組成は以下のとおりとした。メタゲノムDNA (1.0 ng), タカラ Ex Taq® (0.5 ユニット), 10× Ex Taqバッファー (1.0 μL), dNTP 混合液 (2.5 mMずつ, 0.8 μL), 16S rDNA増幅のためのForwardプライマー 515f (5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') およびReverseプライマー 806r (5'-GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (5 μmol ずつ) またはITS領域増幅のためのForwardプライマー ITS1-F_KYO1 (5'-ACACTCTTTCCCTACA CGACGCTCTTCCGATCT-CTHGGTCATTTAGAGGAATAA-3') およびReverseプライマー ITS2_KYO2 (5'-GTGACTGGA GTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-TTYRCTRCTTCTTCATC-3') (5 μmol ずつ) である。これらを混合し、超純水を用いて総量を10 μLにした。16S rDNA領域の1回目の増幅は以下の条件で行った。94 °C 2分を1 サイクル, 94 °C 30 秒, 50 °C 30 秒, 72 °C 30 秒を25 サイクル, 72 °C 5 分を 1 サイクルとした。また、ITS領域の増幅は以下の条件で行った。94 °C 2分を1 サイクル, 94 °C 30 秒, 50 °C 30 秒, 72 °C 60 秒を30 サイクル, 72 °C 5 分を 1 サイクルとした。2回目のPCR反応液の組成は以下のとおりとした。PCR産物 (1.0 ng), タカラ Ex Taq® (0.5 ユニット), 10× Ex Taqバッファー (1.0 μL), dNTP 混合液 (2.5 mMずつ, 0.8 μL), 2回目のForwardプライマー (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-Index2-ACACTCTTTCCCTACACGACGC-3') およびReverseプライマー (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-Index1-GTGACTGGAGTT

CAGACGTGTG-3') (5 μ mol ずつ) である。これらを混合し、超純水を用いて総量を10 μ Lにした。なお、Inex1およびIndex2はそれぞれ以下のとおりである。チーズ1の16S rDNA領域：CATGCCTA および TCGACTAG, チーズ2の16S rDNA領域：CATGCCTA および TTCTAGCT, チーズ3の16S rDNA領域：GATGCCTA および CCTAGAGT, チーズ4の16S rDNA領域：CATGCCTA and GCGTAAGA, チーズ1のITS領域：TCATGAGC および GCGTAAGA, チーズ2のITS領域：TCATGAGC および AAGGCTAT, チーズ3のITS領域：TCATGAGC および GAGCCTTA, チーズ4のITS領域：TCATGAGC および TTATGCGAである。2回目の増幅は以下の条件で行った。94 $^{\circ}$ C 2分を1 サイクル, 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 60 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 30 秒を10 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 5 分を 1 サイクルとした。また、ITS領域の増幅は以下の条件で行った。94 $^{\circ}$ C 2分を1 サイクル, 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 50 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 60 秒を30 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 5 分を 1 サイクルとした。DNAの濃度の決定には、Synergy H1 (Bio Tek社) およびQuantiFluor dsDNA System (プロメガ株式会社) を用い、DNA産物の質の評価には、Fragment Analyzer (アズワン株式会社) および dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies社) を用いた。シーケンシングはMiSeq (イルミナ株式会社) を用いリード長2 \times 300 bpで行った。目的のシーケンスはFASTQ/A Barcode splitter (FASTX-Toolkit : Hannon Laboratory社) を用いて各シーケンスから分離し、プライマーを除去した。その後、シーケンススコア20以下のシーケンスを除去し、sickleを用いて40 bp以下の長さのペアを除去した。paired-end readsはLASHを用いてマージした。全ての条件に合致したシーケンスはUSERCHのUCHIMEアルゴリズムを用いて確認した [119]。キメラを除いた全てのシーケンスは次の分析方法を用いた。OTUピッキング, 系統分類および多様性分析はQIIMEを用いて行った [120]。非計量多次元尺度構成法 (nMDS) は先行研究に準拠し [121], MASSおよびVegan packageを用いて16S rDNAのシーケンスデータ (OTUテーブル) に由来するBray-Curtis指数に基づいて行った。

アクセッション番号

単離株である MC1 株の 16S rDNA 配列は日本 DNA データバンク (DDBJ) に AY683537 として登録された。

3-3 結果

ウォッシュチーズにおける微生物叢

4種の日本産ウォッシュチーズの微生物叢を、16S rDNA アンプリコンシーケンス解析した。細菌の微生物叢は16S rDNAにより515のOTUに分類でき、これらのうち、494のOTUは少なくとも門レベルまで同定できた。その結果、4種のチーズにはプロテオバクテリア門、フィルミキューテス門、バクテロイデス門およびアクチノバクテリア門の4つの門に属する細菌が存在することがわかった (Table 16)。

Table 16. Bacterial genera in 4 cheeses.

Phylum	Genus	Cheese 1	Cheese 2	Cheese 3	Cheese 4
Actinobacteria	<i>Brevibacterium</i>	0.6	0	0.1	3.4
	<i>Corynebacterium</i>	2.1	0	7.2	2.3
	<i>Brachybacterium</i>	0.5	0	0	0
	<i>Microbacteriaceae;Other</i>	0.1	0	0	0
	<i>Leucobacter</i>	0.8	0	0	0
	<i>Microbacterium</i>	0.1	0	0	0.1
	<i>Mycetocola</i>	0	0	0	0.1
	<i>Arthrobacter</i>	5.8	0.1	12.7	0.3
Bacteroidetes	<i>Flavobacteriaceae;g not classified</i>	7.4	0	0	0.2
	<i>Mesonina</i>	0.2	0	0.1	14.1
	<i>Psychroflexus</i>	0.1	0	0	0.2
	<i>Zhouia</i>	0	0	0	2.9
	<i>Sphingobacteriaceae;g not classified</i>	0	0	0	0.6
	<i>Sphingobacterium</i>	0	0.2	0	12.1
Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>	0.1	0	0.2	1.1
	<i>Lactobacillales;f not classified</i>	0	1.3	0	0
	<i>Marinilactibacillus</i>	0.4	0	0	1.6
	<i>Carnobacterium</i>	0.1	0	0	0
	<i>Enterococcus</i>	0.8	17.4	0.5	0.1
	<i>Vagococcus</i>	1.0	0	0	0
	<i>Lactobacillus</i>	0.1	5.7	0	0
	<i>Leuconostoc</i>	0.2	2.8	0	0
	<i>Lactococcus</i>	23.3	51.9	0.1	26.3
	<i>Streptococcus</i>	0	0	14.8	7.5
Proteobacteria	<i>Paracoccus</i>	0	0	0	0.2
	<i>Alcaligenaceae;g not classified</i>	0.2	0	0	0.3
	<i>Arcobacter</i>	3.3	0	0	0
	<i>Marinobacter</i>	3.7	0	0	3.1
	<i>Idiomarina</i>	0	0	0	0.1
	<i>Enterobacteriaceae;Other</i>	1.1	0	0	0
	<i>Enterobacteriaceae;g not classified</i>	0	0.2	0.2	0
	<i>Erwinia</i>	0	0.2	1.3	0
	<i>Proteus</i>	1.7	0	0	0
	<i>Serratia</i>	0	16.1	2.3	0
	<i>Alcanivorax</i>	0	0	0	1.1
	<i>Halomonadaceae;g not classified</i>	0	0	7.1	0
	<i>Halomonas</i>	12.4	0	0	21.9
	<i>Psychrobacter</i>	3.8	0	0.3	0
	<i>Pseudomonadaceae; g not classified</i>	0	3.5	0	0
	<i>Pseudomonas</i>	11.5	0.2	0	0
	<i>Pseudoalteromonas</i>	6.8	0.2	52.7	0.2
<i>Vibrionaceae;Other</i>	0.8	0	0	0	
<i>Vibrio</i>	10.6	0	0.1	0	

The numbers indicate percentages of respective bacterial counts at genus levels in all counts in each cheese.

494 の OTU のうち、*Lactococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Brevibacterium* sp., *Psychrobacter pacificensis* および *Staphylococcus* sp. の 8 属種は 4 種のチーズに共通して存在していた。一方で、チーズ1の140種、チーズ2の101種、チーズ3の66種およびチーズ4の128種の細菌種はそれぞれのチーズ固有のファイロタイプであった。チーズ1, 2および4の主となるファイロタイプは*Lactococcus* sp.であったが、チーズ3は*Pseudoalteromonas* sp.であった。また、*Vibrio* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Halomonas* sp. および *Marinobacter* sp. のような海洋性細菌がチーズ2以外の3種のチーズに相当数含まれていた。加えて、Bray-Curtis指数に基づく非計量多次元尺度構成法 (nMDS) により4種のチーズの微生物群集構造の相同性を比較したところ、Figure 6 に示すようにチーズ1とチーズ4の相同性はチーズ2およびチーズ3との相同性よりも高いことがわかった。

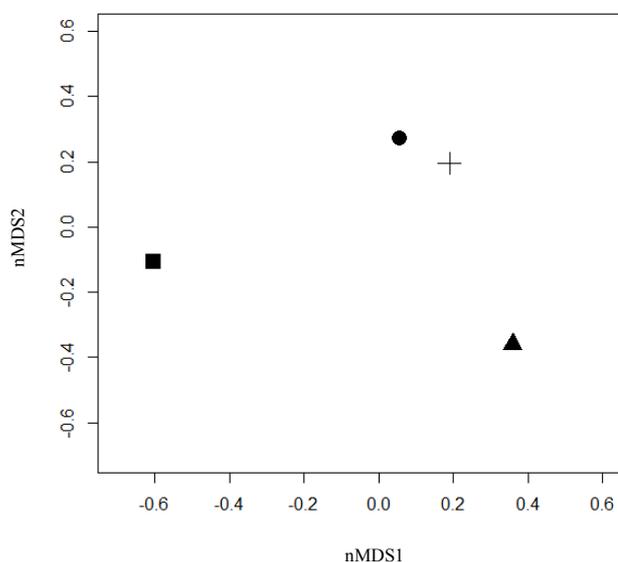


Figure 6. Non-metric multidimensional scaling (nMDS) ordinations of bacterial communities of 4 cheeses. Closed circle, closed triangle, closed square, and cross indicate cheeses 1, 2, 3, and 4, respectively.

真菌の微生物叢は ITS により 74 の OTU に分類できたが、これらのうち、41 の OTU は少なくとも属レベルまで同定できた。その結果、Table 17 に示すとおり、チーズ 3 以外の 3 種のチーズはほとんどが糸状菌門に属する真菌で構成されており、チーズ 3 は担子菌門の真菌も相当数存在することがわかった。

Table 17. Fungal genera in 4 cheeses.

Phylum	Genus	Cheese 1	Cheese 2	Cheese 3	Cheese 4
Ascomycota	<i>Penicillium</i>	0.4	0	0	0
	<i>Microidium</i>	0.1	0.8	0.2	0
	<i>Drechslerella</i>	0	0	2.8	0
	<i>Geotrichum</i>	0	0	0.1	0
	<i>Kluyveromyces</i>	0.1	99.1	0	0
	<i>Candida</i>	0	0	3.9	0
	<i>Debaryomyces</i>	99.2	0.1	79.3	15.1
	<i>Yarrowia</i>	0	0	0.3	0
	<i>Acrostalagmus</i>	0	0	0	0.1
	<i>Fusarium</i>	0	0	0	84.7
Basidiomycota	<i>Trichosporon</i>	0	0	13.3	0
Other	Other	0.1	0	0	0.1

The numbers indicate percentages of respective fungal counts at genus levels in all counts in each cheese.

41のOTUのうち、*Debaryomyces udonii*のみが唯一4種のチーズ全てに共通して存在していた。一方で、チーズ1の7種、チーズ2の5種、チーズ3の8種およびチーズ4の14種の真菌種はそれぞれのチーズ固有のファイロタイプであった。チーズ1および3の主となるファイロタイプは*D. udonii*であったが、チーズ2は*Kluyveromyces lactis*、チーズ4は*Fusarium domesticum*であった。

ウォッシュチーズのレオロジー

4種のウォッシュチーズのレオロジーを測定し、ヘルツモデルを用いて、ヤング率を求めた (Table 18)。

Table 18. Young's modulus of washed-rind cheeses.

Abbreviation	Young's modulus (Pa)
Cheese 1	4.6×10^5
Cheese 2	1.1×10^5
Cheese 3	2.2×10^5
Cheese 4	7.8×10^5

生分解性高分子分解微生物のスクリーニング

4種のチーズ由来の微生物叢の6種の生分解性高分子 (P(3HB), PLA, PBSu, PBSA, PBATおよびPCL) およびオリーブオイルに対する分解能をクリアゾーン法により評価した。4種のチーズ全ては、オリーブオイルと0.5%または3%のNaClを含む培地でクリアゾーンを形成した。チーズ4のみでP(3HB)を含む培地でもクリアゾーンを形成した (Figure 7)。



Figure 7. Clear zone formation ability by 4 cheeses. Four cheeses were incubated on a P(3HB)-containing plate at 30 °C for 4 days.

また、チーズ4は0.5%のNaClを添加した培地よりも3%のNaClを添加した培地でより大きなクリアゾーンを形成した。PLA, PBSu, PBSA, PBATおよびPCLに対してはどのチーズでも分解活性が見られなかった (Table 19)。そこで、P(3HB)分解微生物をチーズ4から単離し、これを詳細にしらべた。

Table 19. The ability of clearing zone formation on the plates containing polymers and olive oil with NaCl by washed rind cheeses.

Substrate	Cheese 1	Cheese 2	Cheese 3	Cheese 4
P(3HB) with 0.5 % NaCl	-	-	-	+
PLA with 0.5 % NaCl	-	-	-	-
PBSu with 0.5 % NaCl	-	-	-	-
PBSA with 0.5 % NaCl	-	-	-	-
PBAT with 0.5 % NaCl	-	-	-	-
PCL with 0.5 % NaCl	-	-	-	-
Olive oil with 0.5 % NaCl	+	+	+	+
P(3HB) with 3.0 % NaCl	-	-	-	++
PLA with 3.0 % NaCl	-	-	-	-
PBSu with 3.0 % NaCl	-	-	-	-
PBSA with 3.0 % NaCl	-	-	-	-
PBAT with 3.0 % NaCl	-	-	-	-
PCL with 3.0 % NaCl	-	-	-	-
Olive oil with 3.0 % NaCl	+	-	+	+

++: means a large clearing zone was formed (≥ 10 mm).

+: means a small clearing zone was formed (<10 mm).

-: means a clearing zone was not formed.

P(3HB)分解微生物の特徴付け

P(3HB)を唯一の炭素源とする培地において、コロニーの周囲にクリアゾーンを形成した株をチーズ 4 から単離し (Figure 8), MC1 株と名付け, 特徴付けを行った。



Figure 8. Clear zone formed by the isolate from cheese 4, strain MC1. The strain was incubated on the plate at 30 °C for 2 days.

MC1 株は無孢子グラム陰性菌で, 約 $0.6 \times 1.5 \mu\text{m}$ の短桿菌であった (Figure 9)。

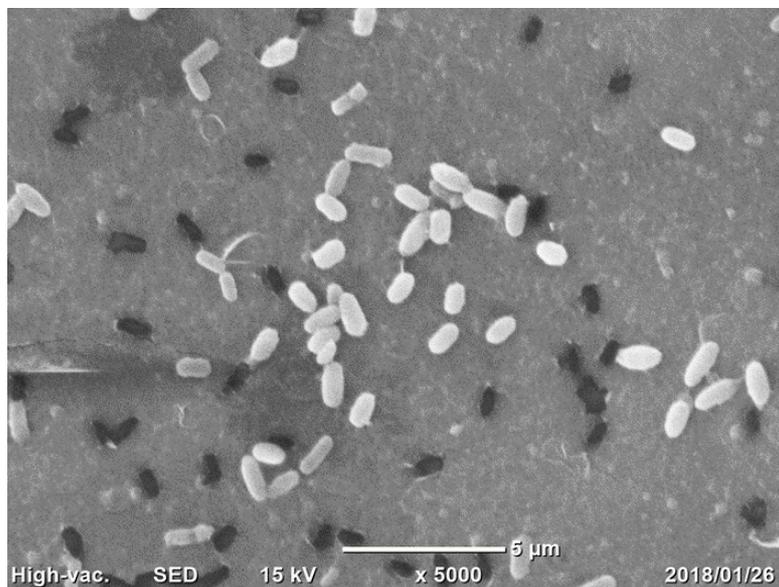


Figure 9. Scanning electron micrographs of strain MC1. White bar indicates 5 μm in length.

本株はオキシダーゼを産生し、アジピン酸を炭素源として利用できた。標準株として用いた *Alcanivorax dieselolei* B-5^T と比較すると、硝酸還元能以外は類似していた (Table 20)。

Table 20. Biochemical and physiological properties of an isolate and the reference strain.

	MC1	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5 ^T
Characteristics		
Gram strain	Negative	Negative
Oxidase	+	+
NO ₃ to NO ₂	-	+
Oxidation of glucose to gluconate	-	-
Arginine dehydrolase	-	-
Urease	-	-
Hydrolysis of esculin	-	-
Hydrolysis of gelatin	-	-
β-Galactosidase	-	-
Utilization of carbon source		
Glucose	-	-
L-Arabinose	-	-
D-Mannose	-	-
D-Mannitol	-	-
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-
Maltose	-	-
Gluconate	-	-
<i>n</i> -Capric acid	-	-
Adipic acid	+	+
DL-Maleic acid	-	-
Citrate	-	-
Phenyl acetate	-	-

+: means present.

-: means negative.

APIZYMキットによる分析では、MC1株においてアルカリフォスファターゼ、エステラーゼ (C4)、エステラーゼリパーゼ (C8)、リパーゼ (C14)、ロイシンアリルアミダーゼ、酸性ホスファターゼ、ナフトール-AS-BI-ホスホヒドラーゼおよびβ-グルクロニダーゼの産生が確認できた (Table 21)。

Table 21. Enzyme production profile of an isolate and the reference strain.

Enzyme	MC1	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5 ^T
Alkaline phosphatase	+	+
Esterase (C4)	+	+
Esterase lipase (C8)	+	+
Lipase (C14)	+	+
Leucine arylamidase	+	+
Valine arylamidase	-	-
Cystine arylamidase	-	+
Trypsin	-	-
Chymotrypsin	-	-
Acid phosphatase	+	+
Naphthol AS-BI phosphohydrolase	+	+
α-Galactosidase	-	-
β-Galactosidase	-	-
β-Glucuronidase	+	-
α-Glucosidase	-	-
β-Glucosidase	-	-
N-Acetyl-β-glucosamidase	-	-
α-Mannosidase	-	-
α-Fucosidase	-	-

+: means present.

-: means negative.

単離株の生育およびクリアゾーン形成の至適温度は30 °Cから37 °Cで、4 °Cおよび50 °Cでは生育もクリアゾーン形成も確認できなかった。一方、標準株では4 °Cでの生育および4 °Cおよび50 °Cでのクリアゾーン形成が見られた (Table 22)。

Table 22. Effect of temperature of the growth and clearing zone formation on P(3HB)-containing plates by an isolate and the reference strain.

Temperature (°C)	MC1		<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5 ^T	
	Growth	Clearing zone formation	Growth	Clearing zone formation
4	-	-	+	-
20	++	++	++	++
25	++	++	++	++
30	+++	+++	++	++
37	+++	+++	+++	+++
50	-	-	+	+

+++: means growth was excellent, or a large clearing zone was formed (≥ 3 mm).

++: means growth was good, or a medium clearing zone was formed (≥ 2 mm).

+: means growth was poor, or a small clearing zone was formed (< 1 mm).

-: means not growing, or a clearing zone was not formed.

種々の高分子に対する分解能は、単離株および標準株ともにPLA, PBSu, PBSA, PBATおよびPCLを含む培地でクリアゾーンの形成が確認できなかったが、P(3HB)およびオリーブオイルを含む培地ではクリアゾーンを形成した (Table 23)。

Table 23. The ability of clearing zone formation on the plates containing polymers and olive oil by an isolate and the reference strain.

Substrate	MC1	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5 ^T
P(3HB)	+	+
PLA	-	-
PBSu	-	-
PBSA	-	-
PBAT	-	-
PCL	-	-
Olive oil	+	+

+ : means a small clearing zone was formed.

- : means a clearing zone was not formed.

MC1株の16S rRNA遺伝子のヌクレオチド配列をNCBIデータベースの16S rDNAシーケンスとの相同性をしらべたところ、プロテオバクテリア門に属する*Alcanivorax dieselolei*と99%の高い相同性を示した (Figure 10)。

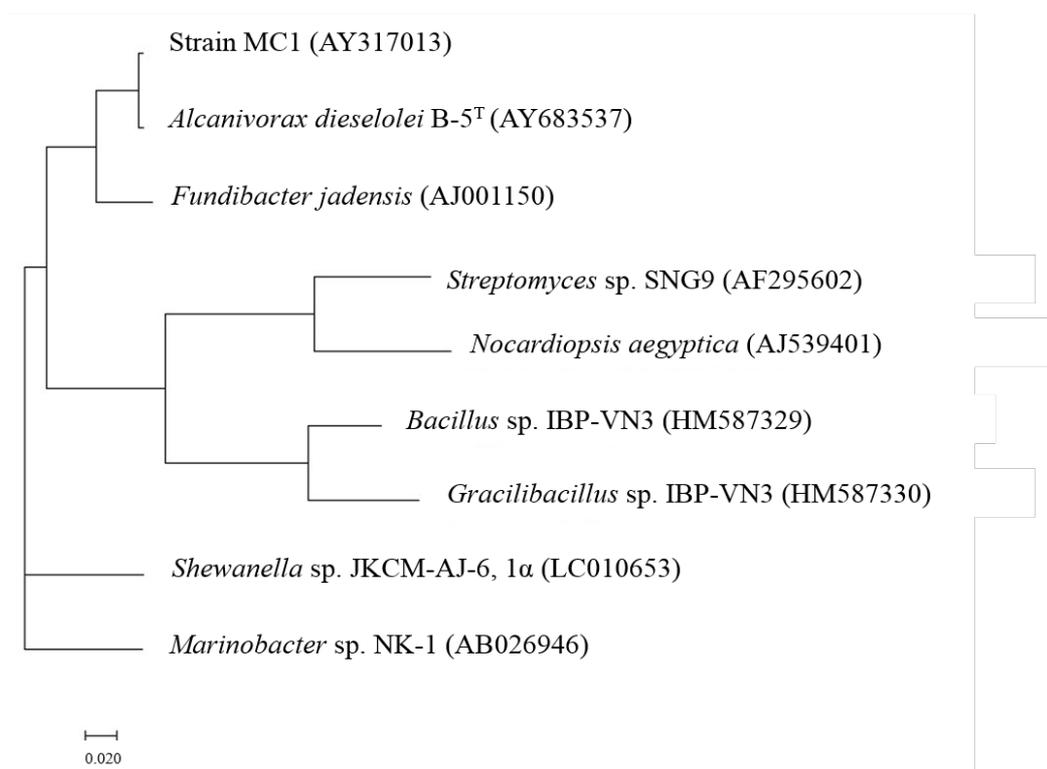


Figure 10. Phylogenetic tree of the P(3HB)-degrading isolate, designated as MC1 and the related strains on the basis of 16S rDNA sequences. The sequences were aligned using the program ClustalW and the tree topology was constructed applying the neighbour-joining method. Accession numbers are given in parentheses. The bar indicates 2 % estimated sequence divergence.

P(3HB)フィルムの分解能

P(3HB)フィルムをチーズ 4 または (および) MC1 株とともに 5 種の条件下で好氣的に培養した。P(3HB)フィルムの重量減少量は、MM 培地上で MC1 株を滅菌したチーズとともに培養した際に最も多く、次いで、ミネラル培地上で滅菌したチーズのみ培養した場合およびミネラル培地上で MC1 株のみ培養した場合の順であった。一方、LB 培地上で MC1 株のみ培養した場合にはほとんど重量減少が見られず、ミネラル培地上で滅菌したチーズのみ培養した場合には全く重量減少しなかった (Table 24)。

Table 24. P(3HB) film degradation by strain MC1 or cheese 4 grown on 5 types of media.

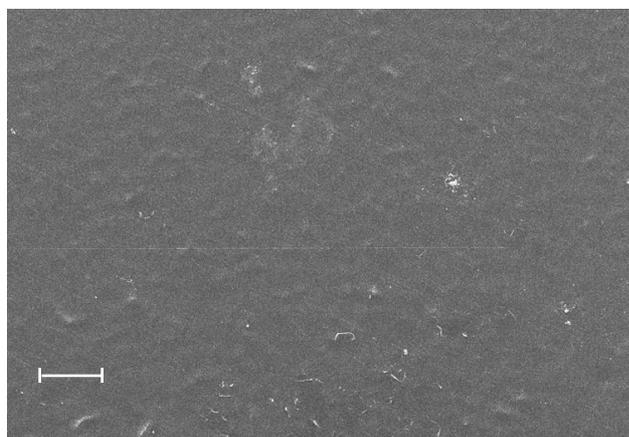
Strain	Medium	Additive	P(3HB) film degradation (mg/cm ² /day)
MC1	MM ^a	Sterilized cheese 4	0.45
-	MM ^a	Non-sterilized cheese 4	0.09
MC1	MM ^a	-	0.09
MC1	LB ^b	-	0.01
-	MM ^a	Sterilized cheese 4	0.00

^a MM: Marine mineral medium

^b LB: Luria-Bertani medium

Figure 11(a) は、P(3HB)フィルム、Figure 11(b) は P(3HB)フィルムを MC1 株とともに 14 日間保温した後の SEM 画像を示している。培養前は表面がなめらかであるが、単離株とともにフィルムを保温した後は、その表面が粗くなり、球晶が現れた。

(a)



(b)

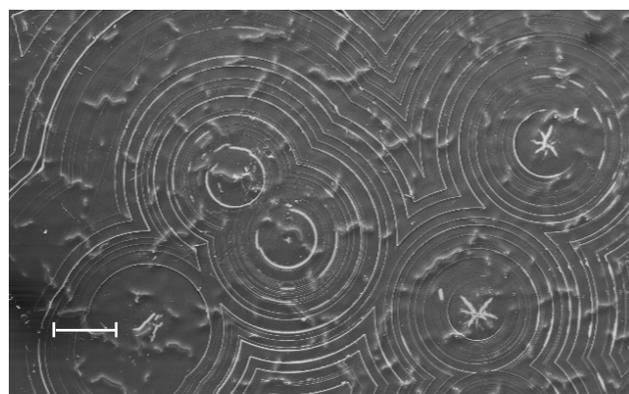


Figure 11. Scanning electron micrograph of P(3HB) film before incubation (a), and P(3HB) film after incubation for 14 ds with strain MC1 (b). White bars indicate 100 μm in length in (a) and (b).

ウォッシュチーズの微生物量

4 種のチーズにおける微生物量を qPCR により推定した [117]。チーズ 1g あたりにおける 16S rDNA コピー数は、チーズ 4 が $6.4 \pm 5.8 \times 10^{10}$ であり、チーズ 1 はこれの 0.7 倍、チーズ 2 は 0.03 倍およびチーズ 3 は 0.4 倍であった。また、チーズ 1g あたりにおける 18S rDNA コピー数は、チーズ 4 が $2.1 \pm 1.8 \times 10^9$ であり、チーズ 1 はこれの 0.2 倍、チーズ 2 は 0.9 倍およびチーズ 3 は 3.4 倍であった。

3-4 考察

日本産の 4 種のウォッシュチーズの微生物叢構造を、メタゲノム解析によって明らかにした。このような日本産ウォッシュチーズの微生物叢に関する報告は、本研究が初めての例である。

細菌叢の結果では、*Lactococcus* 種の細菌がチーズ 1 で 24.9 %、チーズ 2 で 74.4 % およびチーズ 4 で 26.4 % と最も多く存在している細菌であることがわかった。*Lactococcus* 種は、第 2 章でしらべたフランス産ウォッシュチーズからも検出された細菌である。本細菌種は、チーズのスターターとして広く用いられる乳酸菌で [40],[45]、チーズの原料である未殺菌乳および殺菌乳にも存在することが知られている [41],[89]。*Lactococcus* 種の役割としては、チーズの熟成初期において、*Lactococcus lactis* のような *Lactococcus* 種が乳酸を産生することで、pH が下がり、その後の微生物叢形成が促され、脂肪酸分解やたんぱく質分解をとおしてチーズ特有の香気や風味に関与する成分が生成されることが報告されている [122],[123]。チーズ 3 における主要な乳酸菌は *Streptococcus* 種で、第 2 章のポンレヴェックレクリュからも検出された細菌種である。チーズ 3 ではその他の乳酸菌の存在割合が少なく、*Streptococcus* 種がスターターとして用いられた可能性が高い。一方、同じ乳酸菌である *Leuconostoc* 種は、チーズ 1 に 0.2 %、チーズ 2 に 2.8 % と、*Lactococcus* 種や *Streptococcus* 種に比べて存在割合が低かった。*Leuconostoc* 種はチーズの微生物叢において高塩環境では生育が見られないことが報告されており [89]、今回の結果もウォッシュチーズ特有の塩濃度の高さによるものであると考えられる。

チーズ 3 の細菌叢は主に *Pseudoalteromonas* 種で構成され (56.8 %)、先行研究によると、この種は他のウォッシュチーズやウォッシュチーズの製造室の表面からも検出されている [40],[45]。本研究においても、チーズ 1 (7.2 %)、チーズ 2 (0.3 %) およびチーズ 4 (0.2 %) にも存在していることがわかった。*Pseudoalteromonas* 属は海洋性細菌と考えられているガンマプロテオバクテリア綱に属している [89]。ガンマプロテオバクテリア綱に属するその他の海洋性細菌として、本研究では以下の細菌、*Psychrobacter* 種 (チーズ 1 : 4.0 %、チーズ 2 : 0.1 % 未満、チーズ 3 : 0.1 %、チーズ 4 : 0.1 % 未満)、*Vibrio* 種 (チーズ 1 : 11.4 %、チーズ 3 : 0.1 %、チーズ 4 : 0.1 % 未満) および *Halomonas* 種 (チーズ 1 : 12.4 %、チーズ 4 : 21.9 %) が検出された。これまでもウォッシュチーズから海洋性細菌が検出されたとの報告があり、その由来はチーズのウォッシュ液に使用する海塩によるものと考えられている [39],[122],[124]。ウォッシュ操作によりこれらの細菌の生育に適する高塩環境が形成されたためにチーズに残存したと考えられる。一方で、チーズ 2 は他のチーズと比較して海洋性細菌が少なかった。チーズ 2 はウォッシュ液に日本酒を添加して製造されているため、アルコールにより微生物叢の多様性が損なわれた結果であると推測された。

ウォッシュチーズ特有の細菌である *Brevibacterium linens* はチーズ 1 (0.6 %)、チーズ 3 (0.1 %) およびチーズ 4 (3.4 %) に存在していた。ウォッシュチーズはオレンジ色の表皮を有するものが多く、これが *B.linens* と関連しているとの報告がある [107],[125],[126]。*B.linens* 以外にもウォッシュチーズのオレンジ色の色素の産生に関与する細菌として *Corynebacterium* 種、*Micrococcus* 種および *Arthrobacter* 種があるが、色素産生は主に *B.linens* によるものであるとされている [101]。本株の産生する色素は芳香族カロチノイドの一種であるイソレニエラテン、3,3'-ジヒドロキシイソレニエラテンおよび 3-ヒドロキシイソレニエラテンであり、本株以外では、イソレニエラテンは *Microbacterium* のいくつかの株が、2 種のヒドロキシ誘導体は *Streptococcus mediolani* のみが産生することが報告されている [101]。今回の微生物叢解析ではチーズ 2 には *B.linens* のほかにも *Corynebacterium* 種、*Micrococcus* 種、*Arthrobacter* 種、*Microbacterium*

種および *Streptococcus* 種のいずれも検出されなかったかほとんど検出されず、それ以外のチーズではこれらの細菌種が検出された。チーズ 2 の表皮のみオフホワイト色を呈し、ほかの 3 種はオレンジ色であったのは、これらの細菌種および色素と関連しているものと考えられた。

ブレイカーチス指数を用いた非計量多次元尺度構成法 (nMDS, Figure 6) により 4 種のチーズの群集構造の類似性を可視化したところ、以下の 3 つのグループ、チーズ 1 およびチーズ 4 (グループ 1)、チーズ 2 (グループ 2)、チーズ 3 (グループ 3) に分類できることがわかった。また、チーズ 1, 3 および 4 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た [40]。チーズ 2 の細菌叢は、ほぼ 6 種の細菌のみで構成されており、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。このようなチーズ 2 とそのほかの 3 つのチーズとの違いは、ウォッシュ操作に日本酒を用いるという過程がもたらした結果であると考えられる。

加えて、本研究ではチーズの表面に様々な真菌が存在していることも確認できた。糸菌門サッカロミセス目に属する真菌である *Debaryomyces udonii* はチーズ 1 に 99.5 %、チーズ 3 に 100 % という高い割合で存在していた。本株は土壌から単離されたことが先行研究により報告されている [127],[128]。しかし、知る限りでは、チーズから検出されたのは今回が初めてである。近縁種の *Debaryomyces hansenii* はウォッシュ液に使用されることがあり [45]、スメアチーズ (細菌および真菌の溶液を塗布して熟成させるチーズ) の表皮から最も一般的に単離される酵母菌である [129]。一方、チーズ 2 の主たる真菌は *Kluyveromyces lactis* (99.9 %) で、本真菌は他のウォッシュチーズからも単離されたことが報告されている [40],[41]。 *K. lactis* は乳糖を分解することができるため熟成の初期段階からチーズの発酵に関与する [40],[41]。また、本株はアルコールデヒドロゲナーゼを有することが報告されており [130],[131]、ウォッシュ液に用いた日本酒を分解した可能性がある。チーズ 4 の主たる真菌は *Fusarium domesticum* (84.8 %) で、本真菌も他のウォッシュチーズから単離されたとの報告がある [40],[41]。本株をチーズの製造に用いる理由は、チーズ表面を乾燥させるためであるが、このことによりチーズの硬度は上昇する [132]。チーズ 4 のヤング率が他のチーズよりも高値であったのは *F. domesticum* の性質によるものと推定される。

Table 16 および Table 17 に示すとおり、真菌叢は細菌叢と比較して多様性が低く、qPCR による結果では微生物量も少ないことがわかった。この結果はこれまでの日本産以外のウォッシュチーズの微生物叢での報告とも一致していた [2],[39],[43],[45]。

環境低負荷という観点から、食品の容器包装への生分解性高分子活用や開発が非常に注目されている。一方で、発酵食品やチーズ中のある種の微生物は生分解性高分子を分解することが報告されている [79],[133]。チーズ中に存在するこれらの高分子分解微生物を含む様々な微生物により、全ての生分解性高分子がチーズの容器包装に適するとは限らない。2 章ではフランス産チーズの生分解性高分子に対する影響について詳述したが、これまで日本産チーズが生分解性高分子に与える影響について報告された例はなかった。日本産チーズの容器包装材料に生分解性高分子を利用するための基礎資料として、今回 4 種のウォッシュチーズおよびチーズ 4 からの単離株 (MC1) の高分子分解活性についてしらべ、さらに本株の詳細な特徴付けを行った。

4 種のチーズの内、チーズ 4 のみが P(3HB)に対する分解活性を示した (Table 19)。そこで、チーズ 4 から P(3HB)分解活性を有する *A. dieselolei* B-5^T に近縁である MC1 株 (Figure 8,9) を単離した。MC1 株近縁の細菌は、他の 3 種のチーズから検出されなかった。加えて、これまでの研究において *Alkanivorax* 属の

Alcanivorax borkumensis SK2 が P(3HB)合成株として報告されているが [134], *Alcanivorax* 属の株が P(3HB)を分解するという報告は今回が初めてである。MC1 株の液体培養における P(3HB)分解酵素活性は、第 2 章で報告した PON α 株およびこれまでの報告で P(3HB)分解菌として海洋環境から単離された JKCM-AJ-6,1 α 株のおよそ 10 分の 1 以下であった。一方で、固体の P(3HB)フィルムに対する分解量は、JKCM-AJ-6,1 α 株のおおよそ 10 倍の値を示した [135]。このことから、MC1 株は、自身を P(3HB)フィルム表面に結合することで基質との接触を高め、酵素加水分解により効率的に P(3HB)分解を行っている可能性が示唆された。*Clostridium* 属菌などが産生するセルロース分解酵素は複数のたんぱく質から成る複合体であるセルロソームとして存在している。セルロソームは触媒活性をもたない骨格たんぱく質を核としており、骨格たんぱく質中に存在するコヘシンと呼ばれる触媒サブユニット結合ドメインが、触媒サブユニット中のドックリンと呼ばれる骨格たんぱく質結合ドメインと特異的に結合してセルロソームが形成される。これらの複合体が細菌の細胞表層に存在するたんぱく質に結合することでより大きなセルロソームとなると同時に、細胞表層に固定化される [136]。P(3HB)分解酵素がセルロソーム様の構造をとることはこれまで報告されていないが、MC1 株では培養上清にほとんど酵素活性が見られず、固体培地上でのみ発現されたことから、セルロソームと同様、菌体表面に酵素が結合している可能性がある。グラム陰性菌である MC1 株には、細胞内膜と細胞外膜に囲まれた空間であるペリプラズムが存在すると考えられる。ペリプラズムには、各種分解酵素などに結合するたんぱく質が存在することが知られているため [137], P(3HB)分解酵素も MC1 株のペリプラズム中に結合し、基質と接触することで酵素活性を発現できるものと推測される。P(3HB)フィルム上での菌体の SEM 画像では、MC1 株の形状に P(3HB)表面に穴のようなものが観察されたが、このことも上記の仮説を支持していると推定される (Figure 9)。また、MC1 株は P(3HB)フィルムとの結合部分で酵素をはたらかせることで、P(3HB)の非晶部分を優先的に酵素加水分解し、フィルム表面に培養前には見えなかった球晶が出現したと考えられる (Figure 11(b))。

また、フィルム分解における各種培養条件の検討では、MC1 株は滅菌したチーズ 4 の存在下で最も酵素活性を高め、非滅菌チーズの存在下ではその活性が低下した (Table 24)。このことから、チーズ 4 が MC1 株の P(3HB)分解酵素の分泌を促進し、耐熱性の物質がこれに関与している可能性が推測された。チーズ 4 の微生物叢解析では、*Halomonas* 種および *Marinobacter* 種といった海洋性細菌が検出されたが (Table 16), これらの細菌種の一部は、P(3HB)を合成する酵素の遺伝子を持つことが報告されている [71],[72]。つまり、これらの細菌種によりチーズ中で P(3HB)が合成され、これが誘導物質となり MC1 株による酵素活性も上昇したのではないかと推定される。一方で、分解活性は LB 培地上、つまり栄養豊富な条件下では抑制された (Table 24)。このことは、MC1 株の P(3HB)分解酵素は、資化しやすい栄養が存在する条件下では、その活性が低下することを示しており、これまでに報告されている P(3HB)分解細菌と同様の結果を示した [97],[135]。

P(3HB)のチーズの容器包装への適用性を考えると、P(3HB)分解は低温域では進行しないため、流通および保存中に容器包装が分解される可能性は低いと考えられる。チーズが付着した状態で環境中に流出すると、室温状態となり、P(3HB)分解酵素の働きで容器包装の分解が進行する。また、チーズ中の海洋性細菌により P(3HB)が合成される可能性があるため、P(3HB)分解酵素活性が高まり、環境中での分解がより進行しやすい。さらに、海洋環境に流出しても、*A. dieselolei* B-5^T は海洋環境のみから単離された細菌種であるため [115],[138], MC1 株が海洋の生態系に悪影響を及ぼす可能性も低いと考えられる。標準株はグラム陰性の短桿菌で、鎖長 C₅ から C₃₆ のアルカンを分解し、アルカン代謝経路を持つことが報告さ

れており [115],[139], ガンマプロテオバクテリアに存在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役割も報告されている [138]。このため, MC1 株も海洋環境における環境汚染のバイオレメディエーションとして活用することができるかもしれない。

第4章
総括

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 [28]、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しらべ、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1章では、チーズの概要として、分類および公衆栄養学的意義について記述した。また、チーズ中の微生物叢および解析方法について詳述した。さらに、チーズの容器包装に求められる性質および生分解性プラスチックの役割について述べた。加えて、食品衛生法についても説明した。最後に、本博士論文の研究目的を述べた。

第2章では、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。また、本チーズより単離したP(3HB)分解菌の特徴づけを行った。本チーズの微生物叢解析の結果、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。gDNAのGC含率は71.6 mol%であり、エスクリンおよびゼラチンの加水分解試験および β -ガラクトシダーゼ試験で陽性を示したが、硝酸還元能およびゼラチン加水分解で標準株とは異なる性質を示した。また、アルカリホスファターゼ、エステラーゼ(C4)、エステラーゼリパーゼ(C8)、ロイシンアリルアミダーゼ、トリプシン、酸性ホスファターゼ、ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -グルコシダーゼ、およびN-アセチル- β -グルコサミダーゼの各種酵素活性を示し、酵素活性については標準株と類似した性質を持つことがわかった。脂肪酸組成は、C ai-15:0を第一主成分とし、次にCi-15:0を多く含んでいた。LB培地での生育至適温度の範囲は37°Cから40°Cであり、4°Cおよび50°Cでは生育できず、標準株でも類似した結果が得られた。一方、P(3HB)培地でのクリアゾーン形成能に関しては、PON α 株が15°Cから37°Cでクリアゾーンを形成したのに対し、標準株はどの温度でも形成しなかった。また、本株はP(3HB)、P(3HB)を含むLB、P(3HB)の共重合体であるPHBVおよびキチンを含む培地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。NCBIのデータベースでは*C. cellulans* F16にP(3HB)分解酵素を示すORFが推定されたが、これまで*Cellulosimicrobium*属細菌がP(3HB)を分解することは報告されていないため、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種を用い、メタゲノム解析による微生物叢解析を行った。また、6種の生分解性高分子に対する分解活性をしらべ、生分解性を示した株を単離し、詳細に特徴づけを行った。4種のチーズの微生物叢解析では、チーズ1およびチーズ4の細菌群集は比較的類似しており、これらおよびチーズ3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た。チーズ2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。このことから、ウォッシュ操作に日本酒を用いる過程が細菌種の多様性を抑制したと結論付けた。また、真菌ではチーズ1および3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。チーズ4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と関連していると考えられた。4種のチーズのうち、チーズ4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、相同性解析により、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、標準株との比較により特徴づけを行った。本株はオキシダーゼを産生し、アジピン酸を炭素源として利用できたが、硝酸還元能は標準株とは異なる性質を示した。アルカリフォスファターゼ、エステラーゼ (C4)、エステラーゼリパーゼ (C8)、リパーゼ (C14)、ロイシンアリルアミダーゼ、酸性ホスファターゼ、ナフトール-AS-BI-ホスホヒドラーゼおよび β -グルクロニダーゼの各種酵素活性を有し、シスチンアリルアミダーゼおよび β -グルクロニダーゼ以外の酵素活性は標準株と類似していた。生育およびクリアゾーン形成の至適温度は 30 °C から 37 °C で、4 °C および 50 °C では生育もクリアゾーン形成も確認できず、標準株の方が生育可能温度の範囲は広がった。フィルム重量減少は、MM 培地上で MC1 株を滅菌したチーズとともに培養した際に最も多く、次いで、MM 培地上で滅菌したチーズのみ培養した場合および MM 培地上で MC1 株のみ培養した場合であった。一方、LB 培地上で MC1 株のみ培養した場合にはほとんど重量減少が見られず、MM 培地上で滅菌したチーズのみ培養した場合には全く重量減少が見られなかった。以上のことから、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、セルロソーム様構造をとり、細胞表面に P(3HB)酵素が結合し、酵素加水分解により P(3HB) を分解している可能性も示した。以上のことから、MC1 株は P(3HB)分解活性を有するが、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、P(3HB)はチーズの容器包装として適用可能性があるかと結論付けた。また、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[73]、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。

本研究を総括し、今後の課題について議論する。本研究では、微生物の活性が高いウォッシュチーズをターゲットとし [28]、フランス産ウォッシュチーズおよび日本産ウォッシュチーズに P(3HB)分解菌が存在することを明らかにした。フランス産ウォッシュチーズからは放線菌の一種である *Cellulosimicrobium cellulans* が、日本産ウォッシュチーズからは海洋性細菌である *Alcanivorax dieselolei* が、それぞれ P(3HB)

分解菌として単離された。これらの細菌が P(3HB)分解菌であると報告されたのは本博士論文が初めてである。これらの菌は、低温および高温域では生育およびクリアゾーン形成が行われず、菌単独よりもチーズ存在下で P(3HB)分解活性が高まるという共通点を持っていた。P(3HB)をチーズの容器包装として適用させることを考慮すると、チーズの流通および保存温度である低温条件下で分解が進行しないことは、好条件であると考えられる。また、食品の容器包装は、食品が付着した状態で廃棄されることが多いため、チーズの存在と室温条件により分解が進行するのは、チーズの容器包装に用いる生分解性プラスチックとして適用可能性があると考えられる。

環境中に流出したプラスチックは紫外線や温度の影響で微細化され、マイクロプラスチックとなり、海洋に生息する生物の命を脅かす [85]。このため、現在、多くの国で非生分解性プラスチック製袋の使用の禁止や課税が行われており、いくつかの国では非生分解性プラスチック製の食品の容器包装および食器具にも対策が講じられている [140]。また、チーズは公衆栄養学的観点からも、今後消費の拡大が期待される食品であるため、増加が予測される容器包装の廃棄に対して何らかの手立てが必要である。このような中、本博士論文で明らかにしたウォッシュチーズ由来P(3HB)分解細菌を用いた適用例を提案する。すなわち、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。これにより、チーズ中に本株が潜在的P(3HB)分解菌として残存する。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、本株がP(3HB)分解酵素をはたらかせ、容器包装が分解される。海洋環境に流出しても、容器包装が生分解されること、および本株が海洋性細菌であることから、海洋生態系へ悪影響を与えることがない。これらP(3HB)分解細菌のチーズ容器包装への実現可能性を明らかにするためには、チーズの製造から容器包装の廃棄に至る *in situ*での検証が必要であると考え (Figure 12)。本博士論文で得られた知見は、P(3HB)で製造された食品容器包装に対する、その生分解速度制御に応用可能である。

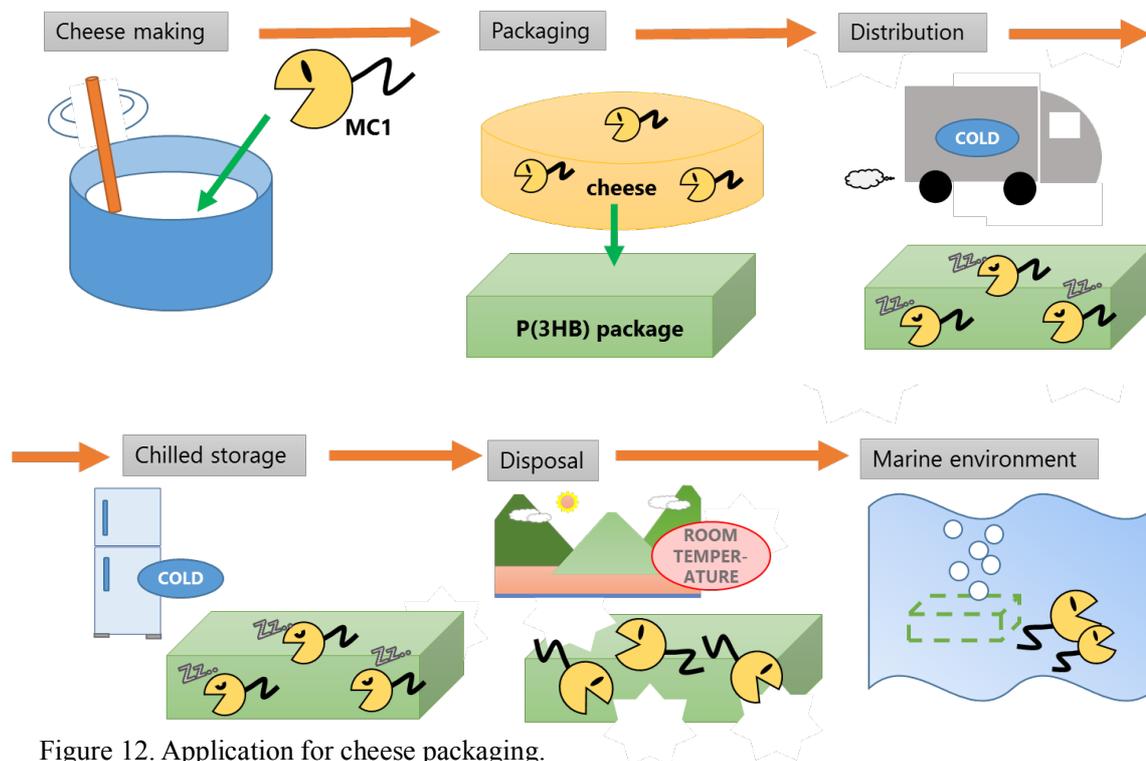


Figure 12. Application for cheese packaging.

参考文献

- [1] E. Ghahremani, M. Mardani, S. Rezapour, Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria from traditional cheese in Khorramabad city of Iran with probiotic potential, *Appl. Biochem. Biotech.* 175 (2015) 2516–2527.
- [2] T. P. Beresford, N. A. Fitzsimons, N. L. Brennan, T. M. Cogan, Recent advances in cheese microbiology, *Int. Dairy J.* 11 (2001) 259–274.
- [3] A. A. Hayaloglu, M. Guven, P. F. Fox, Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese ‘Beyaz Peynir’, *Int. Dairy J.* 12 (2002) 635–648.
- [4] R. Kapoor, L. E. Metzger, Process cheese: Scientific and technological aspects - A review, *Compr. Rev. Food Sci. F.* 7 (2008) 194–214.
- [5] M. Sasaki, Overview of cheese making, *Bull. Japan Dairy Tech. Assoc.* 67 (2017) 16–30.
- [6] B. Walther, A. Schmid, R. Sieber, K. Wehrmüller, Cheese in nutrition and health, *Dairy Sci. Technol.* 88 (2008) 389–405.
- [7] K. Inagaki, Recent natural Cheese manufacturing equipment, *Jan J. Food Eng.* 14 (2013) 75–86.
- [8] D. Ercolini, G. Mauriello, G. Blaiotta, G. Moschetti, S. Coppola, PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese, *J. Appl. Microbiol.* 96 (2004) 263–270.
- [9] D. Y. Kabuki, A. Y. Kuaye, M. Wiedmann, K. J. Boor, Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-american fresh-cheese processing plants, *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 2803–2812.
- [10] S. Henri-Dubernet, N. Desmases, M. Guéguen, Culture-dependent and culture-independent methods for molecular analysis of the diversity of lactobacilli in “Camembert de Normandie” cheese, *Lait.* 84 (2004) 179–189.
- [11] J. Calzada, A. Del Olmo, A. Picon, P. Gaya, M. Nuñez, Effect of high-pressure-processing on the microbiology, proteolysis, texture and flavour of Brie cheese during ripening and refrigerated storage, *Int. Dairy J.* 37 (2014) 64–73.
- [12] J. A. Schulp, R. Rive, M. Leeman, The cheeseboard in Dutch fine dining restaurants, III: Using the FSC model in finding good cheese-wine combinations: A pilot study with red bacteria cheeses, *Res. Hosp. Manag.* 5 (2015) 225–227.
- [13] O. K. Esmer, P. Balkir, A. K. Seckin, R. Irkin, The effect of modified atmosphere and vacuum packaging on the physicochemical, microbiological, sensory and textural properties of Crottin de Chavignol cheese, *Food Sci. Technol. Res.* 15 (2009) 367–376.
- [14] S. K. Gupta, R. M. Whitney, S. L. Tuckey, Brine soluble protein of Cheddar and Gouda cheese, *J. Dairy Sci.* 57 (1974) 540–544.

- [15] Shakeel-ur-Rehman, M. A. Drake, N. Y. Farkye, Differences between Cheddar cheese manufactured by the milled-curd and stirred-curd methods using different commercial starters, *J. Dairy Sci.* 91 (2008) 76–84.
- [16] A. Thierry, M. -B. Maillard, Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*, *Lait.* 82 (2002) 17–32.
- [17] 独立行政法人農畜産業振興機構ホームページ, <https://www.alic.go.jp/index.html>.
- [18] D. D. Alexander, L. C. Bylsma, A. J. Vargas, S. S. Cohen, A. Doucette, M. Mohamed, S. R. Irvin, P. E. Miller, H. Watson, J. P. Fryzek, Dairy consumption and CVD: a systematic review and meta-analysis, *Br. J. Nutr.* 115 (2016) 737–750.
- [19] J. -P. Drouin-Chartier, D. Brassard, M. Tessier-Grenier, J. A. Côté, M. -È. Labonté, S. Desroches, P. Couture, B. Lamarche, Systematic review of the association between dairy product consumption and risk of cardiovascular-related clinical outcomes, *Adv. Nutr.* 7 (2016) 1026–1040.
- [20] P. J. Huth, K. M. Park, Influence of dairy product and milk fat consumption on cardiovascular disease risk: a review of the evidence, *Adv. Nutr.* 3 (2012) 266–285.
- [21] J. Hjerpsted, E. Leedo, T. Tholstrup, Cheese intake in large amounts lowers LDL-cholesterol concentrations compared with butter intake of equal fat content, *Am. J. Clin. Nutr.* 94 (2011) 1479–1484.
- [22] L. -Q. Qin, J. -Y. Xu, S. -F. Han, Z. -L. Zhang, Y. -Y. Zhao, I. MY. Szeto, Dairy consumption and risk of cardiovascular disease: an updated meta-analysis of prospective cohort studies., *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 24 (2015) 90–100.
- [23] R. A. Ralston, J. H. Lee, H. Truby, C. E. Palermo, K. Z. Walker, A systematic review and meta-analysis of elevated blood pressure and consumption of dairy foods, *J. Hum. Hypertens.* 26 (2012) 3–13.
- [24] A. Diez-Fernández, C. Álvarez-Bueno, V. Martínez-Vizcaíno, M. Sotos-Prieto, J. I. Recio-Rodríguez, I. Caverro-Redondo, Total dairy, cheese and milk intake and arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis of cross-sectional studies, *Nutrients.* 11 (2019) 1–14.
- [25] D. Aune, R. Lau, D. S. M. Chan, R. Vieira, D. C. Greenwood, E. Kampman, T. Norat, Dairy products and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, *Ann. Oncol.* 23 (2012) 37–45.
- [26] A. R. Vieira, L. Abar, D. S. M. Chan, S. Vingeliene, E. Polemiti, C. Stevens, D. Greenwood, T. Norat, Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project, *Ann. Oncol.* 28 (2017) 1788–1802.
- [27] X. Li, J. Zhao, P. Li, Y. Gao, Dairy products intake and endometrial cancer risk: a meta-analysis of observational studies, *Nutrients.* 10 (2018).
- [28] D. Aune, D. A. N. Rosenblatt, D. SM Chan, A. R. Vieira, R. Vieira, D. C. Greenwood, L. J. Vatten, T. Norat, Dairy products, calcium, and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies,

Am. J. Clin. Nutr. 101 (2015) 87–117.

- [29] S. Bian, J. Hu, K. Zhang, Y. Wang, M. Yu, J. Ma, Dairy product consumption and risk of hip fracture: A systematic review and meta-analysis, *BMC Public Health*. 18 (2018).
- [30] X. Tong, G. -C. Chen, Z. Zhang, Y. -L. Wei, J. -Y. Xu, L. -Q. Qin, Cheese consumption and risk of all-cause mortality: a meta-analysis of prospective studies, *Nutrients*. 9 (2017) 1–12.
- [31] 農林水産省生産局畜産部牛乳乳製品課, チーズの需給表, (2017). http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/cheese_zyukyu/attach/pdf/index-11.pdf.
- [32] 一般社団法人Jミルクホームページ, <http://www.j-milk.jp/index.html>.
- [33] T. K. Thorning, A. Raben, T. Tholstrup, S. S. Soedamah-Muthu, I. Givens, A. Astrup, Milk and dairy products: good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence, *Food Nutr. Res.* 60 (2016) 32527.
- [34] 健康局がん対策・健康増進課, 生活習慣病予防その他の健康増進を目的として提供する食事について (目安), (2015). <https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkouzoushinka/0000096859.pdf>.
- [35] 農林水産省, 食事バランスガイド, (2015). http://www.maff.go.jp/j/balance_guide/.
- [36] J. Stadhouders, The control of cheese starter activity, *Neth. Milk Dairy J.* 40 (1986) 115–173.
- [37] P. Yanachkina, C. McCarthy, T. Guinee, M. Wilkinson, Effect of varying the salt and fat content in Cheddar cheese on aspects of the performance of a commercial starter culture preparation during ripening, *Int. J. Food Microbiol.* 224 (2016) 7–15.
- [38] P. L. H. Mcsweeney, H. J. Sousa, Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening : A review, *Lait*. 80 (2000) 293–324.
- [39] B. E. Wolfe, J. E. Button, M. Santarelli, R. J. Dutton, Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity, *Cell*. 158 (2014) 422–433.
- [40] F. Irlinger, S. Layec, S. Hélinck, E. Dugat-Bony, Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin, *FEMS Microbiol. Lett.* 362 (2015) 1–11.
- [41] M. -C. Montel, S. Buchin, A. Mallet, C. Delbes-Paus, D. A. Vuitton, N. Desmasures, F. Berthier, Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits, *Int. J. Food Microbiol.* 177 (2014) 136–154.
- [42] N. M. Brennan, A. C. Ward, T. P. Beresford, P. F. Fox, M. Goodfellow, T. M. Cogan, Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 820–830.
- [43] J. Mounier, R. Gelsomino, S. Goerges, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald, T. M. Cogan, Surface microflora of four smear-ripened cheeses, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 6489–6500.

- [44] K. Schubert, W. Ludwing, N. Springer, R. M. Kroppenstedt, J. -P. Accolas, F. Fiedler, Two coryneform bacteria isolated from the surface of French Gruyere and Beaufort cheeses are new species of the genus *Brachybacterium*: *Brachybacterium alimentarium* sp. nov. and *Brachybacterium tyrofermentans* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 (1996) 81–87.
- [45] N. A. Bokulich, D. A. Mills, Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of Artisan cheesemaking plants, *Appl. Environ. Microb.* 79 (2013) 5214–5223.
- [46] V. Delcenserie, B. Taminiau, L. Delhalle, C. Nezer, P. Doyen, S. Crevecoeur, D. Roussey, N. Korsak, G. Daube, Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis., *J. Dairy Sci.* 97 (2014) 6046–56.
- [47] A. M. Ali, K. A. A. –Razing, Cholesterol content of Mozzarella cheese during storage as affected by level of milk fat, *Pakistan J. Nutr.* 10 (2011) 65–70.
- [48] M. Mendoza-Bernardo, L. E. Garay-Martinez, C. A. Gomez-Aldapa, M. R. Torres-Vitela, A. Villarruel-López, V. Navarro-Hidalgo, J. Castro-Rosas, Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and Staphylococcal Enterotoxin in two types of Mexican fresh cheeses, *J. Food Protect.* 75 (2011) 79–84.
- [49] A. D. Karaman, B. Ozer, M. A. Pascall, V. Alvarez, Recent advances in dairy packaging, *Food Rev. Int.* 31 (2015) 295–318.
- [50] M. Ščetar, I. Barukčić, M. Kurek, K. L. Jakopović, R. Božanić, K. Galić, Packaging perspective of milk and dairy products, *Mljekarstvo.* 69 (2019) 3–20.
- [51] 環境省環境再生・資源循環局総務課リサイクル推進室, 容器包装廃棄物の使用・排出実態調査の概要 (平成29年度), (2017). https://www.env.go.jp/recycle/yoki/c_2_research/research_H29.html.
- [52] J. R. Jambeck, R. Geyer, C. Wilcox, T. R. Siegler, M. Perryman, A. Andrady, R. Narayan, K. L. Law, Plastic waste inputs from land into the Ocean, *Science.* 347 (2015) 768–771.
- [53] J. Fabres, H. Savelli, T. Schoolmeester, I. Rucevska, J. Fabres, Marine Litter Vital Graphics, (2016). <http://www.grida.no/publications/60>.
- [54] M. Wagner, C. Scherer, D. Alvarez-Muñoz, N. Brennholt, X. Bourrain, S. Buchinger, E. Fries, C. Grosbois, J. Klasmeier, T. Marti, S. Rodriguez-Mozaz, R. Urbatzka, A. D. Vethaak, M. Winther-Nielsen, G. Reifferscheid. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know, *Environ. Sci. Eur.* 26 (2014) 1–9.
- [55] United nations, Sustainable development goals, (2015). <https://www.un.org/sustainabledevelopment/development-agenda/>.
- [56] European Comission, A European strategy for plastics in a circular economy, (2018). <http://ec.europa.eu/environment/circular-economy/pdf/plastics-strategy-brochure.pdf>

- [57] European. Bioplastics, Biodegradable plastics in the single-use context, (2018). https://docs.european-bioplastics.org/publications/pp/EUBP_PP_Biodegradable_plastics_&_single_use_plastics_June2018.pdf
- [58] R. T. Darby, A. M. Kaplan, Fungal susceptibility of polyurethanes., *Appl. Microbiol.* 16 (1968) 900–905.
- [59] R. Auras, B. Harte, S. Selke, An overview of polylactides as packaging materials, *Macromol. Biosci.* 4 (2004) 835–864.
- [60] Y. Tokiwa, B. P. Calabia, Biodegradability and biodegradation of polyesters, *J. Polym. Environ.* 15 (2007) 259–267.
- [61] V. Siracusa, P. Rocculi, S. Romani, M. D. Rosa, Biodegradable polymers for food packaging: a review, *Trends Food Sci. Tech.* 19 (2008) 634–643.
- [62] J. Xu, B. H. Guo, Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization, *Biotechnol. J.* 5 (2010) 1149–1163.
- [63] U. Witt, T. Einig, M. Yamamoto, I. Kleeberg, W. -D. Deckwer, R. -J. Müller, Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates, *Chemosphere.* 44 (2001) 289–299.
- [64] A. A. Shah, S. Kato, N. Shintani, N. R. Kamini, T. Nakajima-Kambe, Microbial degradation of aliphatic and aliphatic-aromatic *co*-polyesters, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 3437–3447.
- [65] J. -W. Rhim, H. -M. Park, C. -S. Ha, Bio-nanocomposites for food packaging applications, *Prog. Polym. Sci.* 38 (2013) 1629–1652.
- [66] C. Bastioli, Properties and applications of “Mater-Bi” starch-based materials, *Polym. Degrad. Stabil.* 59. 59 (1998) 263–272.
- [67] R. W. Lenz, R. H. Marchessault, Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology, *Biomacromolecules.* 6 (2005) 1–8.
- [68] J. C. C. Yeo, J. K. Muiruri, W. Thitsartarn, Z. Li, C. He, Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 92 (2018) 1092–1116.
- [69] L. Piergiovanni, S. Limbo, Plastic packaging materials, in: *Food Packag. Mater*, Springer International Publishing, 2016: pp. 33–49.
- [70] A. Steinbüchel, H. E. Valentin, Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids, *FEMS Microbiol. Lett.* 128 (1995) 219–228.
- [71] H. Yue, C. Ling, T. Yang, X. Chen, Y. Chen, H. Deng, Q. Wu, J. Chen, G. -Q. Chen, A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates, *Biotechnol. Biofuels.* 7 (2014).

- [72] C. P. Foong, N. -S. Lau, S. Deguchi, T. Toyofuku, T. D. Taylor, K. Sudesh, M. Matsui, Whole genome amplification approach reveals novel polyhydroxyalkanoate synthases (PhaCs) from Japan Trench and Nankai Trough seawater, *BMC Microbiol.* 14 (2014).
- [73] Y. Tokiwa, B. P. Calabia, C. U. Ugwu, S. Aiba, Biodegradability of plastics, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 3722–3742.
- [74] R. Y. U. Takahashi, N. A. S. Castilho, M. A. C. da Silva, M. C. Mitto, A. O. S. Lima, Prospecting for marine bacteria for polyhydroxyalkanoate production on low-cost substrates, *Bioengineering.* 4 (2017).
- [75] Danimer Scientificホームページ, <https://danimerscientific.com/>.
- [76] 食品安全委員会, ポリ乳酸を主成分とする合成樹脂製の器具又は容器包装に関する食品健康影響評価, 2005. <https://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-hyouka-pla170526.pdf#search=%27食品安全委員会+ポリ乳酸%27>.
- [77] 塩ビ食品衛生協議会, 石動正和, 各国の食品用器具・容器包装材料規制～動向と実務対応～改訂増補版, 株式会社情報機構, 2016: pp. 1
- [78] G. Scott, ‘Green’ polymers, *Polym. Degrad. Stabil.* 68 (2000) 1–7.
- [79] D. V. Plackett, V. K. Holm, P. Johansen, S. Ndoni, P. V. Nielsen, T. Sipilainen-Malm, A. Södergård, S. Verstichel, Characterization of L-poly lactide and L-poly lactide–polycaprolactone *co*-polymer films for use in cheese-packaging applications, *Packag. Technol. Sci.* 19 (2006) 1–24.
- [80] H. Yu, C. Yan, J. Yao, Fully biodegradable food packaging materials based on functionalized cellulose nanocrystals/poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) nanocomposites, *RSC Adv.* 4 (2014) 59792–59802.
- [81] V. Kistrup Holm, G. Mortensen, M. Vishart, M. Agerlin Petersen, Impact of poly-lactic acid packaging material on semi-hard cheese, *Int. Dairy J.* 16 (2006) 931–939.
- [82] S. M. El-Sayed, H. Salama, A. M. Youssef, M. H. Abd El-Salam, F. M. Assem, Utilization of edible films and coatings as packaging materials for preservation of cheeses, *J. Packag. Technol. Res.* 1 (2017) 87–99.
- [83] Y. Tezuka, N. Ishii, K. Kasuya, H. Mitomo, Degradation of poly(ethylene succinate) by mesophilic bacteria, *Polym. Degrad. Stabil.* 84 (2004) 115–121.
- [84] Y.-H. Yun, Y.-J. Wee, H.-S. Byun, S.-D. Yoon, Biodegradability of chemically modified starch (RS4)/PVA blend films: Part 2, *J. Polym. Environ.* 16 (2008) 12–18.
- [85] G. Caruso, Plastic degrading microorganisms as a tool for bioremediation of plastic contamination in aquatic environments, *J. Pollut. Eff. Cont.* 3 (2015) e112.
- [86] T. Nagai, F. Yamasaki, *Bacillus subtilis* (*natto*) bacteriophages isolated in Japan, *Food Sci. Technol. Res.* 15 (2009) 293–298.

- [87] J. M. Caruthers, I. Kang, M. J. Rynkiewicz, D. E. Cane, D. W. Christianson, Crystal structure determination of aristolochene synthase from the blue cheese mold, *Penicillium roqueforti*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 25533–25539.
- [88] K. V. Hoorde, M. Heyndrickx, P. Vandamme, G. Huys, Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses, *Food Microbiol.* 27 (2010) 425–433.
- [89] L. Quigley, O. O’Sullivan, T. P. Beresford, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, P. D. Cotter, High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with Artisanal cheeses, *Appl. Environ. Microb.* 78 (2012) 5717–5723.
- [90] N. Ishii, Y. Inoue, T. Tagaya, H. Mitomo, D. Nagai, K. Kasuya, Isolation and characterization of poly(butylene succinate)-degrading fungi, *Polym. Degrad. Stabil.* 93 (2008) 883–888.
- [91] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013) 2725–2729.
- [92] K. Kasuya, H. Mitomo, M. Nakahara, A. Akiba, T. Kudo, Y. Doi, Identification of a marine benthic P(3HB)-degrading bacterium isolate and characterization of its P(3HB) depolymerase, *Biomacromolecules.* 1 (2000) 194–201.
- [93] Y. Katayama-Fujimura, Y. Komatsu, H. Kuraishi, T. Kaneko, Estimation of DNA base composition by high performance liquid chromatography of its nuclease P1 hydrolysate, *Agr. Biol. Chem. Tokyo.* 48 (1984) 3169–3172.
- [94] M. Mesbah, U. Premachandran, W. B. Whitman, Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 (1989) 159–167.
- [95] S. B. Dees, C. W. Moss, Cellular fatty acids of *Alcaligenes* and *Pseudomonas* species isolated from clinical specimens, *J. Clin. Microbiol.* 1 (1975) 414–419.
- [96] L. T. Miller, Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids, *J. Clin. Microbiol.* 16 (1982) 584–586.
- [97] T. Ohura, Y. Aoyagi, K. Takagi, Y. Yoshida, K. Kasuya, Y. Doi, Biodegradation of poly(3-hydroxyalkanoic acids) fibers and isolation of poly(3-hydroxybutyric acid)-degrading microorganisms under aquatic environments, *Polym. Degrad. Stabil.* 63 (1999) 23–29.
- [98] C. H. Nakatsu, V. Torsvik, L. Øvreås, Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64 (2000) 1382–1388.
- [99] R. B. Place, D. Hiestand, S. Burri, M. Teuber, *Staphylococcus succinus* subsp. *casei* subsp. nov., a dominant isolate from a surface ripened cheese, *Syst. Appl. Microbiol.* 25 (2002) 353–359.

- [100] C. L. Randazzo, S. Torriani, A. D. L. Akkermans, W. M. de Vos, E. E. Vaughan, Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an Artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 1882–1892.
- [101] F. P. Rattray, P. F. Fox, Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review, *J. Dairy Sci.* 82 (1999) 891–909.
- [102] S. Lucchini, J. Sidoti, H. Brussow, Broad-range bacteriophage resistance in *Streptococcus thermophilus* by insertional mutagenesis, *Virology*. 275 (2000) 267–277.
- [103] D. Mora, M. G. Fortina, C. Parini, G. Ricci, M. Gatti, G. Giraffa, P. L. Manachini, Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products, *J. Appl. Microbiol.* 93 (2002) 278–287.
- [104] S. Awad, A. N. Hassan, F. Halaweish, Application of exopolysaccharide-producing cultures in reduced-fat cheddar cheese: composition and proteolysis, *J. Dairy Sci.* 88 (2005) 4195–4203.
- [105] A. C. Alting, W. J. M. Engels, S. Van Schalkwijk, F. A. Exterkate, Purification and characterization of cystathionine β -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 and its possible role in flavor development in cheese, *Appl. Environ. Microb.* 61 (1995) 4037–4042.
- [106] E. Coton, M. -H. Desmonts, S. Leroy, M. Coton, E. Jamet, S. Christieans, P. -Y. Donnio, I. Lebert, R. Talon, Biodiversity of coagulase-negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples, *Int. J. Food Microbiol.* 137 (2010) 221–229.
- [107] J. Mounier, S. Goerges, R. Gelsomino, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, N. M. Brennan, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald, T. M. Cogan, Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese, *J. Appl. Microbiol.* 101 (2006) 668–681.
- [108] P. Deetae, P. Bonnarme, H. E. Spinnler, S. Helinck, Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 (2007) 1161–1171.
- [109] L. J. Forney, X. Zhou, C. J. Brown, Molecular microbial ecology: Land of the one-eyed king, *Curr. Opin. Microbiol.* 7 (2004) 210–220.
- [110] J. -H. Yoon, S. -J. Kang, P. Schumann, T. -K. Oh, *Cellulosimicrobium terreum* sp. nov., isolated from soil, *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 57 (2007) 2493–2497.
- [111] J. M. Brown, A. G. Steigerwalt, R. E. Morey, M. I. Daneshvar, L. -J. Romero, M. M. McNeilt, Characterization of clinical isolates previously identified as *Oerskovia turbata*: Proposal of *Cellulosimicrobium funkei* sp. nov. and emended description of the genus *Cellulosimicrobium*, *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 56 (2006) 801–804.
- [112] R. Antony, K. P. Krishnan, S. Thomas, W. P. Abraham, M. Thamban, Phenotypic and molecular identification of *Cellulosimicrobium cellulans* isolated from Antarctic snow, *A. van Leeuw. J. Microb.* 96 (2009) 627–634.

- [113] A. S. Angelidis, M. S. Kalamaki, S. S. Georgiadou, Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a β -D-glucosidase-positive phenotype on Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA), *Int. J. Food Microbiol.* 193 (2015) 114–129.
- [114] Y. Kumagai, Y. Kaneshawa, Y. Doi, Enzymatic degradation of microbial poly(3-hydroxybutyrate) films, *Makromol. Chem.* 193 (1992) 53–57.
- [115] C. Liu, *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55 (2005) 1181–1186.
- [116] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis Version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33 (2016) 1870–1874.
- [117] M. -A. de Graaff, A. T. Classen, H. F. Castro, C. W. Schadt, Labile soil carbon inputs mediate the soil microbial community composition and plant residue decomposition rates, *New Phytol.* 188 (2010) 1055–1064.
- [118] D. C. Lin, D. I. Shreiber, E. K. Dimitriadis, F. Horkay, Spherical indentation of soft matter beyond the Hertzian regime: numerical and experimental validation of hyperelastic models, *Biomech. Model. Mechan.* 8 (2009) 345–358.
- [119] R. C. Edgar, Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, *Bioinformatics.* 26 (2010) 2460–2461.
- [120] J. G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, A. G. P. Noah Fierer, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R. E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J. R. Sevinsky, P. J. Turnbaugh, W. A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld, R. Knight, QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nat. Methods.* 7 (2010) 335–336.
- [121] A. Chao, R. L. Chazdon, R. K. Colwell, T. -J. Shen, Abundance-based similarity indices and their estimation when there are Unseen species in samples, *Biometrics.* 62 (2006) 361–371.
- [122] A. Escobar-Zepeda, A. Sanchez-Flores, M. Quirasco Baruch, Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota, *Food Microbiol.* 57 (2016) 116–127.
- [123] T. Beresford, A. Williams, The microbiology of cheese ripening, in: *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, edited by P. Fox, 2004: pp. 287–317.
- [124] M. Ishikawa, K. Kodama, H. Yasuda, A. Okamoto-Kainuma, K. Koizumi, K. Yamasato, Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses, *Lett. Appl. Microbiol.* 44 (2007) 308–313.
- [125] W. Bockelmann, Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses, *Int. Dairy J.* 12 (2002) 123–131.
- [126] L. Dufossé, P. Galaup, E. Carlet, C. Flamin, A. Valla, Spectrocolorimetry in the CIE $L^*a^*b^*$ color space as

useful tool for monitoring the ripening process and the quality of PDO red-smear soft cheeses, *Food Res. Int.* 38 (2005) 919–924.

- [127] H. V. Nguyen, C. Gaillardin, C. Neuvéglise, Differentiation of *Debaryomyces hansenii* and *Candida famata* by rRNA gene intergenic spacer fingerprinting and reassessment of phylogenetic relationships among *D. hansenii*, *C. famata*, *D. fabryi*, *C. flareri* (= *D. subglobosus*) and *D. prosopidis*: Description of *D. vietnamensis* sp. nov. closely related to *D. nepalensis*, *FEMS Yeast Res.* 9 (2009) 641–662.
- [128] P. Martorell, M. Fernandezspinar, A. Querol, Sequence-based identification of species belonging to the genus, *FEMS Yeast Res.* 5 (2005) 1157–1165.
- [129] P. Deetae, J. Mounier, P. Bonnarme, H. E. Spinnler, F. Irlinger, S. Helinck, Effects of *Proteus vulgaris* growth on the establishment of a cheese microbial community and on the production of volatile aroma compounds in a model cheese, *J. Appl. Microbiol.* 107 (2009) 1404–1413.
- [130] K. D. Breunig, M. Bolotin-Fukuhara, M. M. Bianchi, D. Bourgarel, C. Falcone, I. Ferrero, L. Frontali, P. Goffrini, J. J. Krijger, C. Mazzoni, C. Milkowski, H. Y. Steensma, M. Wésolowski-Louvel, A. M. Zeeman, Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*, *Enzyme Microb. Tech.* 26 (2000) 771–780.
- [131] A. Bozzi, M. Saliola, C. Falcone, F. Bossa, F. Martini, Structural and biochemical studies of alcohol dehydrogenase isozymes from *Kluyveromyces lactis*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1339 (1997) 133–142.
- [132] H. P. Bachmann, C. Bobst, U. Bütikofer, M. G. Casey, M. Dalla Torre, M. T. Fröhlich-Wyder, M. Fürst, Occurrence and significance of *Fusarium domesticum* alias *Anticollanti* on smear-ripened cheeses, *LWT - Food Sci. Technol.* 38 (2005) 399–407.
- [133] I. Steinka, M. Morawska, M. Rutkowska, A. Kukułowicz, The influence of biological factors on properties of some traditional and new polymers used for fermented food packaging, *J. Food Eng.* 77 (2006) 771–775.
- [134] J. S. Sabirova, M. Ferrer, H. Lunsdorf, V. Wray, R. Kalscheuer, A. Steinbuchel, K. N. Timmis, P. N. Golyshin, Mutation in a “*tesB*-Like” hydroxyacyl-coenzyme a-specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 8452–8459.
- [135] C. -C. Sung, Y. Tachibana, M. Suzuki, W. -C. Hsieh, K. Kasuya, Identification of a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading bacterium isolated from coastal seawater in Japan as *Shewanella* sp., *Polym. Degrad. Stabil.* 129 (2016) 268–274.
- [136] S. Kazuo, T. Kimura, S. Karita, K. Omiya, “セルラーゼ複合体”セルロソーム”の構造と機能, *Protein, Nucleic Acid Enzym.* 44 (1999) 1487–1496.
- [137] T. J. Beveridge, Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 4725–4733.
- [138] W. Wang, L. Wang, Z. Shao, Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (*alkB*) genes in the subtropical seawater of Xiamen Island, *Microb. Ecol.* 60 (2010) 429–439.

- [139] W. Wang, Z. Shao, The long-chain alkane metabolism network of *Alcanivorax dieselolei*, Nat. Commun. 5 (2014) 5755.
- [140] United Nations Environment Programme, Single-use plastics -A roadmap for sustainability-, (2018). https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/25496/singleUsePlastic_sustainability.pdf.

業績目録

関連論文

第2章 フランス産ウォッシュチーズからの P(3HB)分解 *Cellulosimicrobium* 属細菌の単離と特徴付け

Yohko Tachibana, S. Hayashi, M. Suzuki, P. Soulethone, Yuya Tachibana, K. Kasuya, Identification of *Cellulosimicrobium* sp., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading bacterium isolated from washed rind cheese, Pont-l'évêque lait cru. J. Polym. Res. 24 (2017) 159.

第3章 日本産ウォッシュチーズの微生物叢と生分解性生分解性高分子分解活性

Yohko Tachibana, K. Kageyama, M. Suzuki, H. Koshigumo, H. Takeno, Yuya Tachibana, K. Kasuya, Microbial composition and polymer hydrolytic activity of Japanese washed-rind cheeses, Polym. Degrad. Stabil. 160 (2019) 264-272.

謝辞

本研究の遂行および本博士論文の執筆にあたり、長きにわたり熱心にご指導いただきました、群馬大学学術研究院、粕谷健一教授に心よりお礼申し上げます。

本博士論文の審査の労を賜るとともに、詳細にご指導いただき、科学に向かう姿勢にもご助言いただきました、群馬大学学術研究院、若松馨教授、同、土橋敏明教授、同、園山正史教授、同、大嶋孝之教授に心より感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、実験のご指導およびご助言をいただきました、群馬大学学術研究院、武野宏之准教授に心よりお礼申し上げます。

また、本研究における実験は、環境調和型材料科学研究室所属の学部生、院生およびスタッフの皆様のご助力なくしては達成できませんでした。深く感謝申し上げます。

最後に、研究者、教員、妻、母としてのそれぞれの立場を理解し、支えてくれた家族に感謝いたします。