

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 矢内 隆章

本論文は、ワインのアロマ生成に関与するグリコシダーゼの探索、その酵素の特性解析、さらにこれらの酵素を利用した新たなワイン醸造への応用に関するものであり、3章からなる。

第1章では、これまで研究例の少ない non-Saccharomyces 酵母よりアロマの生成に関与するグリコシダーゼの探索を行い、*Pichia capsulata* X91 より  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase( $\alpha$ -AF)を、*Pichia angusta* X349 から  $\alpha$ -L-rhamnosidase( $\alpha$ -Rha) を、*Candida utilis* IFO 0639 から  $\beta$ -D-xylosidase( $\beta$ -Xyl)を、そして *Debaryomyces hansenii* Y-44 から  $\beta$ -glucosidase( $\beta$ -Glu)を見出すことに成功している。さらに、各酵素を精製し、その生化学的性質の検討を行っている。 $\alpha$ -AF は $\alpha$ -L-アラビノフラノシド構造に高い特異性を示し、アラビナンやアラビノガラクトンからアラビノースのみを遊離した。アラビノ-オリゴサッカライドの分解では、主要生産物は基質より一つアラビノース単位が短いオリゴサッカライドであり、本酵素はエキソ型の加水分解活性を有していた。 $\alpha$ -Rha は $\alpha$ -L-ラムノピラノシド構造に高い特異性を示し、天然フラボノイドのナリンジン、ルチン、ヘスペリジンおよびクエルシトリンのラムノシルグリコシドにも作用し、L-ラムノースのみを遊離した。 $\beta$ -Xyl は $\beta$ -D-キシロピラノシド構造に高い特異性を示し、キシロ-オリゴサッカライドの分解では、主要生産物は基質より一つキシロース単位が短いオリゴサッカライドであり、本酵素はエキソ型の加水分解活性を有していた。 $\beta$ -Glu は *p*-NP  $\beta$ -D-glucopyranoside と グルコースが $\beta$ -1, 3 結合した laminaribiose に対する特異性が非常に高く、 $\beta$ -1, 2 結合の sophorose と $\beta$ -1, 4 結合の cellobiose にわずかに作用した。このことより、本 $\beta$ -Glu は基質のグリコシド結合の $\beta$ -アノマー配置に対する特異性が非常に高く、非還元末端の $\beta$ -D-glucose の構造を厳密に認識しているものと推測した。

次に、*D. hansenii* Y-44 の $\beta$ -glucosidase 遺伝子のクローニングを行い、その配列を初めて明らかにした。本遺伝子は、837 アミノ酸残基からなる分子量 92,289 のタンパク質をコードしており、精製した $\beta$ -glucosidase の分子量と一致した。本酵素はアミノ酸の一次配列や触媒基による分類から糖質加水分解酵素の family 3 に分類され、その構造は $\alpha$ -helix と $\beta$ -strand モジュールが一次配列上で交互に 8 回現れる( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>-barrel 構造に、7 個の $\beta$ -strand から成る $\beta$ 鎖リッチドメインが付加したダブルドメイン構造をしているものと推測された。

ここで得られた各酵素は、高糖濃度のブドウ果汁や高エタノール存在下のワイン中でもグリコシド配糖体に作用してアロマ活性物質であるモノテルペンを遊離化し、果汁やワインの品質を向上させることを明らかにした。

第2章では、グルコース及びエタノール耐性の活性を有する $\beta$ -glucosidase 産生株 *D. hansenii* Y-44 とアルコール発酵能を有するブドウ酒酵母 *S. cerevisiae* W-3 との異種間細胞融合により、グルコース及びエタノール耐性を有する $\beta$ -glucosidase 活性とアルコール発酵能の形質を併せもつワイン醸造用酵母の育種について述べている。

第3章では、各種グリコシダーゼを用いたワイン醸造試験を行い、香氣成分等に及ぼす影響について詳細な解析を行っている。また、細胞融合によって育種した株によるマスカット果汁の発酵試験により、リナロールの香りを特徴とするテルペン香のリッチな優れたワインが得られることを示した。

以上、本論文はワインの醸造において non-*Saccharomyces* 酵母から高濃度のグルコースおよびエタノール存在下で高い活性を有する各種のグリコシダーゼを産生する株を選択しこれらの酵素を利用すること、およびグリコシダーゼ生産株との細胞融合により育種したワイン酵母を利用することにより、モノテルペン依存型ブドウ品種を原料としたワインに関して、アロマのより優れたワインを醸造することが可能であることを示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。