

# 博士學位論文

論文内容の要旨  
及び  
論文審査結果の要旨

平成30年9月授与

宮崎大学大学院  
農学工学総合研究科

学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条の規定に基づき、平成30年9月に博士の学位を授与した論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を公表する。

課程修了による学位（博士）授与報告書(甲)

報告番号	博士の専攻分野の名称	博士の学位を授与された者			博士論文名	主指導教員
		(フリガナ)氏名	本籍	研究科(専攻)名		
農工総博甲第142号	博士(工学)	タシロ ヨシヤ 田代 佳也	長崎県	農学工学総合研究科 (生物機能応用科学専攻)	糸状菌酵素を用いた機能性オリゴ糖の生産	湯井敏文
農工総博甲第143号	博士(農学)	シモヒラ タケヒコ 下平 武彦	佐賀県	農学工学総合研究科 (生物機能応用科学専攻)	食品に含まれる機能性成分硫酸体の生理機能解明に関する研究	榊原陽一
農工総博甲第144号	博士(農学)	パッタマバディ クンワンリー PATTAMAVADEE KUNWANLEE	タイ王国	農学工学総合研究科 (資源環境科学専攻)	A study of breeding approach using high heterozygosity in <i>Zoysia</i> species ( <i>Zoysia</i> 属草種における高ヘテロ接合性を利用した育種学的研究)	明石 良
農工総博甲第145号	博士(学術)	グエン チ フェ リン NGUYEN THI HUE LINH	ベトナム	農学工学総合研究科 (生物機能応用科学専攻)	Studies on Application of Probiotic <i>Lactococcus lactis</i> Strain K-C2 as Fish Feed Additives in Aquaculture (水産増養殖における養魚飼料添加物としてのプロバイオティクス <i>Lactococcus lactis</i> K-C2株の応用に関する研究)	田岡洋介
農工総博甲第146号	博士(工学)	エコ セティアワン EKO SETIAWAN	インドネシア	農学工学総合研究科 (物質・情報工学専攻)	The Model of Continuous Conduction Mode and Mode Control in Power Converter (パワーコンバータの電流連続モードのモデルとモード制御)	穂高一条

氏 名 田代 佳也

本 籍 長崎県

学位記番号 農工総博甲第142号

学位の種類 博士(工学)

学位授与年月日 平成30年9月21日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科 農学工学総合研究科

専 攻 生物機能応用科学専攻

教育コース 生命機能科学教育コース

学位論文題目 糸状菌酵素を用いた機能性オリゴ糖の生産

学位論文審査委員 主査 教授 湯井 敏文  
副査 教授 横井春比古  
副査 教授 吉田 照豊  
副査 准教授 廣瀬 遵  
副査 准教授 松本 仁  
副査 名誉教授 林 幸男

主指導教員 教授 湯井 敏文

## 学位論文の要旨

フリガナ 氏名	タシロ ヨシヤ 田代 佳也
専攻 入学年度	宮崎大学大学院農学工学総合研究科博士後期課程 生物機能応用科学専攻 平成 24 年度 ( 4月) 入学
学位論文 題目	糸状菌酵素を用いた機能性オリゴ糖の生産
<p><b>【論文の要旨】</b> (和文の場合1,200字程度、英文の場合800語程度)</p> <p>機能性オリゴ糖類は、免疫賦活作用、抗アレルギー作用、整腸作用などの生理活性を有しており、特定保健用食品などの機能性食品の素材として工業的にその価値が注目されている。ゲンチオビオースは抗腫瘍性やカルシウム吸収促進作用とともに、苦み、保湿性、氷点効果作用を有することから、食品の品質改良剤としても有用である。また、機能性オリゴ糖のなかでも代表的な1-kestoseなどのフラクトオリゴ糖は、現在多くの食品に使用されており、食品産業において重要な位置を占めている。これらの機能性オリゴ糖の生産は工業的には一般に微生物由来酵素の加水分解反応または糖転移反応を用いて行われている。</p> <p>本研究では、まず、市販の糸状菌<i>Rhizoctonia solani</i>由来キタラーゼ (主に<math>\beta</math>-1,3-グルカナーゼ)を用いて、水熱処理した<i>Aureobasidium pullulans</i>由来の<math>\beta</math>-1,3-1,6-グルカンを加水分解することによってゲンチオビオースを生産するための酵素反応条件や生成物収率などについて検討した。その結果、pH 5.5、40 °C、基質濃度100 g/Lのとき、41.2 g/Lのゲンチオビオースが生産されたことから、最大収率が41.2 %であることを明らかにした。酵素濃度を高くすることにより反応時間を短縮することができたが、生成物の最大収率はあまり変化しなかった。また、基質濃度を高くすることにより生成物濃度を高くすることができたが、最大収率はあまり変化しなかった。これまでゲンチオビオースはグルコースを原料としてグルコシダーゼの縮合反応により工業生産されているが、今回は多糖の加水分解による方法であり、新しい生産技術として期待される。</p> <p>次に、<i>Penicillium citrinum</i>由来酵素のフルクトース転移活性を用いて、スクロースからの機能性フラクトオリゴ糖の生産について、酵素反応条件や生成物収率などを検討した。その結果、イヌリンタイプのフラクトオリゴ糖 (1-kestose、ニストース) が生産されることを明らかにした。また、フルクトース転移活性の最適反応pH および最適反応温度がそれぞれ5および50 °Cであり、pH4.5~7および50°C以下で安定であることを明らかにした。さらに、基質濃度300g/Lのとき、最大収率が47.1 % (w/w)であることを明らかにした。これまで<i>Penicillium citrinum</i>由来酵素によるイヌリンタイプのフラクトオリゴ糖が高収率で生産された報告がないことから、新しい生産技術として期待される。</p> <p>本研究では、<i>Rhizoctonia solani</i>由来酵素を用いてゲンチオビオースを高収率で生産することができた。また、<i>Penicillium citrinum</i>由来酵素を用いて1-kestoseなどのフラクトオリゴ糖を高収率で生産することができた。すなわち、糸状菌酵素を用いた機能性オリゴ糖の生産に関する有用な成果を得ている。</p> <p>本研究の成果は製糖業界のみならず広く食品産業および医薬品産業における機能性オリゴ糖の有効利用に大きく寄与する技術であると考えられた。</p>	

平成30年8月6日

## 論文審査結果の要旨

専攻 入学年度	生物機能応用科学 専攻 平成24年度(4月)入学	氏名	田代 佳也
論文題目	糸状菌酵素を用いた機能性オリゴ糖の生産		
審査委員 職名及び氏名	主査	教授	湯井敏文
	副査	教授	横井春比古
	副査	教授	吉田照豊
	副査	准教授	廣瀬 遵
	副査	准教授	松本 仁
	副査	名誉教授	林 幸男
審査結果の要旨(800字以内)			
<p>本研究は、糸状菌の生産する酵素を利用して機能性オリゴ糖を効率よく生産することを目的としたものである。まず、糸状菌 <i>Penicillium citrinum</i> 由来酵素を用いたショ糖からのフラクトオリゴ糖の生産について検討した。次に、糸状菌 <i>Rhizoctonia solani</i> 由来のキタラーゼを用いた水熱処理 <i>Aureobasidium pullulans</i> <math>\beta</math>1,3-1,6 グルカンからのゲンチオビオースの生産について検討した。</p> <p>まず、<i>P. citrinum</i> 由来酵素のフルクトース転移活性を用いて、ショ糖からイヌリンタイプのフラクトオリゴ糖(1-ケストース、ニストース)を生産できることを明らかにした。また、最適反応 pH および最適反応温度がそれぞれ 5 および 50 °C であり、pH 4.5~7 および 50 °C 以下で安定であることを明らかにした。さらに、基質濃度 300 g/L のとき、最大収率が 47.1% (w/w) であることを明らかにした。これまで <i>P. citrinum</i> 由来酵素によるイヌリンタイプのフラクトオリゴ糖が高収率で生産された報告がないことから、新しい生産技術として期待される。</p> <p>次に、<i>R. solani</i> 由来のキタラーゼを用いた水熱処理 <i>A. pullulans</i> <math>\beta</math>1,3-1,6 グルカンの加水分解を試み、反応 pH 5.5、反応温度 40 °C、基質濃度 100 g/L のとき、41.2 g/L のゲンチオビオースが生産されたことから、最大収率が 41.2% (w/w) であることを明らかにした。これまでゲンチオビオースはグルコースの縮合反応で工業生産されているが、今回は多糖の加水分解による方法であり、新しい生産技術として期待される。</p> <p>本研究成果は、広く食品産業および医薬品産業における機能性オリゴ糖生産に大きく寄与する技術であると考えられた。</p> <p>公聴会での発表内容や質疑に対する応答も適切であり、本審査委員会は、論文の審査および最終試験に合格したと判定する。</p>			

氏名 下平 武彦

本籍 佐賀県

学位記番号 農工総博甲第143号

学位の種類 博士(農学)

学位授与年月日 平成30年9月21日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科 農学工学総合研究科

専攻 生物機能応用科学専攻

教育コース 生命機能科学教育コース

学位論文題目 食品に含まれる機能性成分硫酸体の生理機能解明に関する研究

学位論文審査委員	主査	教授	榊原陽一
	副査	教授	山崎正夫
	副査	准教授	菅本和寛
	副査	准教授	西山和夫
	副査	准教授	服部秀美
	副査	理事	水光正仁

主指導教員 教授 榊原陽一

## 学位論文の要旨

フリガナ氏名	シモヒラ タケヒコ 下平 武彦
専攻	宮崎大学大学院農学工学総合研究科博士後期課程 生物機能応用科学専攻
入学年度	平成 25 年度 ( 4月) 入学
学位論文題目	食品に含まれる機能性成分硫酸体の生理機能に関する研究
<p><b>【論文の要旨】</b> 食品成分を含む様々な生体外異物、内因性のホルモン等の多くの化合物は、小腸や肝臓において薬物代謝第二相酵素である細胞質硫酸転移酵素群 (SULTs) によって硫酸抱合反応を受ける。これらの化合物の多くは生体内では主にこのような抱合体として存在するため、その機能を解明することは重要である。そこで、我々はSULTsによる代謝物である硫酸体に着目した研究を行った。</p> <p>まず、第一にマウスにおいて生体内で脂質吸収やホルモン様の作用を示す等の様々な機能を持つ胆汁酸の7位の水酸基を特異的に硫酸化するmSULT2A8に着目した。ヒトの硫酸転移酵素は胆汁酸の3位を硫酸化するが、mSULT2A8は7位を特異的に硫酸化するため、ヒトSULTと異なる基質認識機構を持つことが予測されるが、そのメカニズムは判明していない。そこで、mSULT2A8の反応メカニズムの解明と硫酸体の機能解析を目的に研究した。その結果、mSULT2A8は他のSULTと異なる特徴的なアミノ酸残基(His48およびLeu99)を持つことが明らかとなり、胆汁酸の7位の認識に重要であるということが判明した。また、有機合成法にて胆汁酸7位硫酸体を調製し、胆汁酸の標的受容体であるTGR5への作用を解析した。その結果、マウスにおいて胆汁酸は7位水酸基の硫酸化によりその機能が減弱し解毒代謝されることが示唆された。しかしながら、胆汁酸のような複数の水酸基を持つ化合物の硫酸体調製は難しく機能解析が困難だという問題点が判明した。</p> <p>そこで我々は、この問題点を解決するために、食品機能性成分として複数の水酸基を持つポリフェノール化合物の硫酸体に着目した。近年の研究により、ポリフェノール類の硫酸体には新規機能性があるという報告がされている。そのため、このような食品機能性成分の硫酸体の機能解明は重要だと考えられる。複数の水酸基を持つポリフェノール類は位置特異的な硫酸体が複数想定される。しかしながら、このような化合物の硫酸体は有機合成法による調製が困難である。そこで、我々は食品機能性成分の硫酸体の機能解明を目的とした基盤技術の確立として、大腸菌を用いた遺伝子工学的手法でポリフェノール硫酸体を調製する技術を開発した。その結果、特定のSULT分子種を発現させた大腸菌を用いることによって、多くのポリフェノール類を含む食品機能性成分の位置特異的な硫酸体を選択的に生産することが可能となった。また、本技術を用いて調製した様々なポリフェノール硫酸体は質量分析装置(MS)や核磁気共鳴法(NMR)を用いて化合物の構造決定を行い、さらにこれらの硫酸体の機能解析を行った。これらのポリフェノール硫酸体を、ヒト肝癌細胞 (HepG2) に処理したところ、様々なポリフェノール硫酸体にがん増殖抑制作用があることが判明した。さらに、より詳細に硫酸体の機能性を評価するために、硫酸体の作用点として、細胞膜上に存在する受容体に対する作用を評価したところ、様々な疾病や疾患に関与するGタンパク質共役型に作用する可能性が示された。これらの結果により、食品機能性成分を含む様々な硫酸体の機能性の一端が解明された。</p> <p>今後こ、更なる食品機能性成分硫酸体の機能性解明の研究が進むことで、食品化学、医薬品、創薬等の様々な分野への貢献が期待される。</p>	



平成30年6月5日

## 論文審査結果の要旨

専攻 入学年度	生物機能応用科学 専攻 平成25年度(4月)入学	氏名	下平武彦
食品に含まれる機能性成分硫酸体の生理機能解明に関する研究			
審査委員 職名及び氏名	主査	教授	榊原陽一
	副査	教授	山崎正夫
	副査	准教授	菅本和寛
	副査	准教授	西山和夫
	副査	准教授	服部秀美
	副査	宮崎大学理事	水光正仁
審査結果の要旨(800字以内)			
<p>食品成分を含む様々な生体外異物、内因性のホルモン等の多くの化合物は、小腸や肝臓において薬物代謝第二相酵素である細胞質硫酸転移酵素群によって硫酸抱合反応を受ける。これらの化合物の多くは生体内では主としてこの抱合代謝物として存在するため、その機能を解明することは重要である。そのため、下平氏は食品に含まれる機能性成分硫酸体に着目し、その生理機能解明を目指した研究を行った。</p> <p>まずマウスにおいて生体内で脂質吸収やホルモン様の作用を示す等の様々な機能を持つ胆汁酸の7位の水酸基を特異的に硫酸化するmSULT2A8をクローニングし、諸性質を検討した。mSULT2A8は触媒残基として重要な保存されたヒスチジン残基を持たない唯一の酵素であること、代わりにHis48が関与することを部位特異的変異導入により明らかにした。さらに、硫酸化された胆汁酸は受容体TGR5への作用が低下すること、7位硫酸化は7位脱水酸化を抑制し、毒性の高い二次胆汁酸の生成を抑制する可能性を示した。このことにより、mSULT2A8は非常に特殊な酵素であり、マウスにおける胆汁酸の代謝とその生理機能制御に関与する可能性を世界で初めて明らかにした。</p> <p>次に、食品に含まれる機能性成分硫酸体の調製技術開発に関する研究を行った。機能性成分硫酸体の調製には、有機化学的合成、酵素的調製、微生物を用いた遺伝子工学的調製法など有るが、下平氏は大腸菌を用いた遺伝子工学的手法で食品機能性成分(ポリフェノール)硫酸体を調製する技術を開発した。開発した技術は、複数の水酸基を有したポリフェノールの特定の水酸基を標的に位置特異的に硫酸基を導入できる優れた技術である。得られたポリフェノール硫酸体に関しては、NMRと質量分析により構造を明らかにした。さらに、癌細胞に対する増殖抑制作用や受容体への作用を検討し、細胞膜上に食品機能性成分硫酸体が作用する受容体タンパク質が存在する可能性を示した。</p> <p>これらの研究は、基礎研究における学術的貢献にとどまらず、開発した技術により生産された硫酸化代謝産物が、機能性食品や医薬品などへ応用される可能性があり、将来的には国民の健康増進等への貢献も期待される。</p> <p>以上の論文内容ならびに平成30年6月5日に開催された公聴会での発表内容や質疑に対する応答も適切であり、本審査委員会は、論文の審査および最終試験に合格したと判定する。</p>			

氏 名 パッタマワディー クワンリー  
PATTAMAVADEE KUNWANLEE

本 籍 タイ王国

学位記番号 農工総博甲第144号

学位の種類 博士(農学)

学位授与年月日 平成30年9月21日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科 農学工学総合研究科

専 攻 資源環境科学専攻

教育コース 環境共生科学教育コース

学位論文題目 A study of breeding approach using high heterozygosity in  
*Zoysia* species  
(*Zoysia*属草種における高ヘテロ接合性を利用した育種学的研究)

学位論文審査委員 主査 教授 明石 良  
副査 教授 平田昌彦  
副査 教授 石井康之  
副査 教授 出口近士  
副査 准教授 田中秀典

主指導教員 教授 明石 良

## 学位論文の要旨

フリガナ氏名	パッタマワディー クンワンリー PATTAMAVADEE KUNWANLEE
専攻入学年度	宮崎大学大学院農学工学総合研究科博士後期課程 資源環境科学 専攻 2013 年度 (4 月) 入学
学位論文題目	A study of breeding approach using high heterozygosity in <i>Zoysia</i> species ( <i>Zoysia</i> 属草種における高ヘテロ接合性を利用した育種学的研究)
<p>【論文の要旨】 (和文の場合1,200字程度、英文の場合800語程度)</p> <p><i>Zoysia</i> spp. is popular warm-season turfgrass worldwide for ornamental lawns, sports field, and also soil conservation. It is the most wear tolerance of warm-season turfgrasses, but it has poor recuperative potential and slow rate of establishment than another warm-season turfgrass as <i>Cynodon</i> spp. and <i>Paspalum vaginatum</i>. Nevertheless many new <i>Zoysia</i> cultivars have been released in Japan and breeding still continues for the development of new cultivars that combine the characteristics of high quality turf by using selection and breeding method. Earlier approach for zoysiagrass improvement includes the selection of superior ecotype(s) or seed population selection from the wild. Conventional plant breeding methods have been used successfully to transform several species into markedly improved turfgrass. Adaptation and genetic variability are the basic requirement for possible turfgrass species improvement. Since zoysiagrass is an out crossing species with low to high heterozygosity, cross-pollination somehow leads more variation in their progeny due to traits combination from both parents. Genetic information has recently become useful tools to monitor plant species and genetic relationships, and the use of DNA markers has been considered as a preferred method for evaluating the genetic diversity of plant germplasm because it could distinguish closely related genotypes. Genetic diversity of zoysiagrass is the basis to improve and develop new cultivar. Therefore, focusing on the fundamental genetic and breeding studies in zoysiagrass, the specific objectives of my thesis as follows: 1) to estimate turf quality and use microsatellite markers to analyze and distinguish the newly registered <i>Z. matrella</i> ‘Wakaba’ cultivar from other registered and commercial cultivars, and 2) to evaluate the effects of self-pollination of <i>Z. matrella</i> ‘Wakaba’ in terms of morphological traits, genetic structure and the possible selection of lines with superior traits of S<sub>1</sub> progeny.</p> <p>Eleven traits of morphological characters were used to evaluate new <i>Zoysia</i> cultivar registered in PVP in Japan compared and 3 <i>Zoysia</i> commercial cultivars (‘Meyer’, ‘Emerald’, and ‘TM9’). The morphological characteristics of ‘Wakaba’ were similar to ‘TM9’ and ‘Emerald’ in terms of leaf texture. In addition, it showed high turf quality including ground cover, late winter dormancy and green-up after winter dormancy in early spring. Moreover, this study also demonstrated the effectiveness of</p>	

microsatellite markers to distinguish 26 zoysiagrass cultivars. Genetic fingerprinting provided information of the relationship among cultivars. In this study we concluded that 'Wakaba' is useful cultivar for further study of genetic variance and useful for the estimation of genetic control of the traits of interest especially late winter dormancy and spring green-up trait for future breeding program in zoysiagrass.

Morphological traits and genetic structure were used to evaluate the effects of self-pollination of 'Wakaba', in addition to the selection of lines with superior traits from among all the S<sub>1</sub> progeny. Self-pollination reduces genetic load and can express genetic variance of traits, and enabled the easy identification and the selection for a desired trait of 'Wakaba'. S<sub>1</sub> progeny exhibiting wide variation in morphological characteristics and moderate inbreeding depression in almost traits are less severe following self-pollination. In addition, self-progeny showed fitness on turf quality in terms of long green period and high ground cover. Moreover, 26 SSR markers were used and Bayesian-based Structure analysis grouped the progeny in 3 clusters. Genetic markers revealed that homozygosity in S<sub>1</sub> progeny was caused by inbreeding depression. We concluded that self-pollination could be used for the selection of desirable traits of highly heterozygous species such as *Z. matrella* 'Wakaba'.

As a fundamental study on the breeding of zoysiagrass, this study analyzed the possibility of developing improved zoysiagrass cultivars by analyzing morphological characteristics, turf quality, and genotypic fingerprinting for cultivar and progeny differentiation. Utilizing heterozygous zoysiagrass following ecotype selection and self-pollination was useful in finding candidate cultivars with improved traits. Therefore, this breeding approach can also be used in finding key genes that will be used for further breeding studies in heterozygous zoysiagrass. Inbreeding depression can be the advantage value for trait selection. This information could be used in breeding program and further study on quantitative trait loci analysis in *Zoysia*. Moreover, the information gathered from our results can be used to support in the planning and adoption of efficient and suitable management and can also serve as a criterion in the selection of plant breeding.

2018 年 8 月 2 日

## 論文審査結果の要旨

専攻 入学年度	資源環境科学 2013 年度 ( 4 月 ) 入学	専攻 氏名	Pattamavadee Kunwanlee
論文題目	A study of breeding approach using high heterozygosity in <i>Zoysia</i> species ( <i>Zoysia</i> 属草種における高ヘテロ接合性を利用した育種学的研究)		
審査委員 職名及び氏名	主 査	教授	明石 良
	副 査	教授	平田 昌彦
	副 査	教授	石井 康之
	副 査	教授	出口 近士
	副 査	准教授	田中 秀典
審査結果の要旨 (800字以内)			
<p><i>Zoysia</i> 属草種は、日本を中心とした東アジアに広く分布する暖地型芝草であり、庭園、スポーツグラウンド、放牧草地などに利用され、主に <i>Z. japonica</i>、<i>Z. matrella</i>、<i>Z. pacifica</i> の 3 種が品種育成に利用されている。また、<i>Z. matrella</i> は <i>Z. japonica</i> と <i>Z. pacifica</i> の交雑種でありヘテロ接合性が高いことが報告されている。本研究論文は、この <i>Z. matrella</i> の高ヘテロ接合性を利用した育種学的展開を論じたものである。</p> <p>これまでに収集した <i>Zoysia</i> 属遺伝資源から <i>Z. matrella</i> である「わかば」を選抜し、品種登録を目指した特性評価を行った。その結果、「わかば」は既存品種に比べて初期生育が早く冬季の緑度維持と春の緑度回復に優れる系統である事が判明し、優良品種として育成することができた。また、特性評価を行った 4 品種を含む国内外の 26 品種について 24 種のマイクロサテライトマーカーによる品種識別を試みたところ、「Winter carpet」と「Winter field」を除く系統は全て識別が可能であり、「わかば」はどの品種とも異なる遺伝子型を示していた。次に、「わかば」を母材とした新たな品種育成を目指して、その自殖後代 364 系統を作出し、形態的および遺伝的多様性を調査した。その結果、<i>Z. matrella</i> 自殖後代の形態的特性の変異幅は大きく、親系統よりも被覆率や緑度維持率が高い 6 系統を選抜することができた。さらに、マイクロサテライトマーカーを用いて 364 系統の自殖後代における遺伝的構造解析を行ったところ、これらの遺伝的多様性は広く、大きく 3 タイプに分かれることが判明した。</p> <p>以上のことから、本研究は <i>Z. matrella</i> の品種育成および分子マーカーを用いた品種識別、さらには <i>Z. matrella</i> のヘテロ接合性を利用した育種を展開したものであり、これらの結果は、今後の <i>Zoysia</i> 属植物の育種を行う上で重要な基盤技術を構築したものと考えられ、また、本研究論文は学術的に価値があり、学位論文として十分価値のあるものと判断した。公聴会での発表および質疑応答も適切であり、本審査委員会は論文審査および最終試験に合格したと判定する。</p>			

氏 名 NGUYEN<sup>グエン</sup> THI<sup>チ</sup> HUE<sup>フエ</sup> LINH<sup>リン</sup>

本 籍 ベトナム

学位記番号 農工総博甲第145号

学位の種類 博士(学術)

学位授与年月日 平成30年9月21日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科 農学工学総合研究科

専 攻 生物機能応用科学専攻

教育コース 水域生物科学教育コース

学位論文題目 Studies on Application of Probiotic *Lactococcus lactis* Strain K-C2 as Fish Feed Additives in Aquaculture  
(水産増養殖における養魚飼料添加物としてのプロバイオティクス *Lactococcus lactis* K-C2株の応用に関する研究)

学位論文審査委員	主査	教授	田岡洋介
	副査	教授	伊丹利明
	副査	教授	吉田照豊
	副査	教授	鈴木祥広
	副査	教授	林 雅弘

主指導教員	教授	准教授	田岡洋介
-------	----	-----	------

## 学位論文の要旨

フリガナ氏名	グエン チ フェ リン NGUYEN THI HUE LINH
専攻入学年度	宮崎大学大学院農学工学総合研究科博士後期課程 生物機能応用科学専攻 2014年度 (10月) 入学
学位論文題目	Studies on Application of Probiotic <i>Lactococcus lactis</i> Strain K-C2 as Fish Feed Additives in Aquaculture (水産増養殖における養魚飼料添加物としてのプロバイオティクス <i>Lactococcus lactis</i> K-C2株の応用に関する研究)
<p>【論文の要旨】 (和文の場合1,200字程度、英文の場合800語程度)</p> <p>The aim of this study was to isolate lactic acid bacteria in difference materials; to study biochemical properties and antagonistic activity of the isolated strains <i>in vitro</i>, to assess the survival rate of a selected strains after exposure to gastrointestinal fluids; and to determine the effect of microorganisms after use of the strain was selected as a live supplement for cultured marine fish. The content of each chapter in the thesis is as follows: <b>Chapter 1</b>, is general introduction; <b>Chapter 2</b>, is a study on the screening of lactic acid bacteria isolated from fermented food as potential probiotics for aquacultured carp and amberjack; <b>Chapter 3</b>, is a study on the identification and characterization of selected candidate to be used as a potential probiotic for aquaculture; <b>Chapter 4</b>, is a study on the oral administration of <i>Lactococcus lactis</i> strain K-C2 in amberjack (<i>Seriola dumerili</i>) and to evaluate the effect of this strain on fish growth performance, amino acid content and intestinal microflora after feeding trial for amberjack; <b>Chapter 5</b>, is a study on effect of <i>Lc. lactis</i> strain K-C2 on the growth performance, the resistance to pathogen of Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>); <b>Chapter 6</b>, is a general discussion.</p> <p>To isolate lactic acid bacteria from fermented foods and evaluate their probiotic properties for application to aquaculture, sixty-five bacterial strains were isolated using MRS (de Man, Rogosa &amp; Sharpe) media. By assay using a double layer agar method, three strains, GYP 31, L 15 and K-C2, showed antagonistic activities against wide variety of fish pathogens belonging to <i>Edwardsiella tarda</i>, <i>Streptococcus dysgalactiae</i>, <i>S. iniae</i> and <i>Lc. garvieae</i>. These strains were able to survive in a pH range from 2.0 to 9.0 and at NaCl concentrations of 0, 3 and 5 % (w/v). In the tolerance test, strain K-C2 displayed higher tolerance than strains GYP 31 and L 15 under the acidic pH buffers and artificial gastric-intestinal juices. Thus, strain K-C2 was selected as a probiotic candidate and identified as <i>Lc. lactis</i> based on the 16S rRNA gene sequence (1438 bp) analysis. It was observed to be ovoid in shape and to be catalase-negative in morphological and biochemical investigations. In <i>in vitro test</i>, strain K-C2 adhered to carp and amberjack intestinal mucus at the densities of <math>10^{10}</math> cfu/ml with adhesion rates of 62 % and 58 %, respectively. Thus, it was considered that <i>Lc. lactis</i> strainK-C2 with strong antagonistic properties against fish pathogens could be orally introduced to the fish intestine as viable cells.</p> <p>To evaluate the effect of <i>Lc. lactis</i> strain K-C2 supplemented in an extruder pellet diet on the fish growth performance, microbial diversity and release of free amino acid in the intestinal tract and edible part of young amberjack (<i>Seriola dumerili</i>). Experimental fish were fed a test diet containing strain K-C2 (<math>2 \times 10^{10}</math> CFU/g diet) for 25 days, then the body weight, body length and feed conversion ratio were measured to evaluate the growth performance, and the intestinal tract and edible part were collected for further analysis. Microbial diversity and free amino acid profiles were analyzed using the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry methods, respectively. The results indicated that fish growth was significantly enhanced and the levels of asparagine, sarcosine, taurine, alanine, and arginine in the gut content in the treated group were significantly higher (<math>P &lt; 0.05</math>) than those in the control group. There were three genera, <i>Sphingomonas</i>, <i>Propionibacterium</i>, and <i>Mycobacterium</i>, which appeared in both experimental groups; <i>Staphylococcus</i> and <i>Kocuria</i> were detected in one of three samples from control and treated groups; <i>Acinetobacter</i> and</p>	

*Acidobacteria* were each found in one of three samples from the control group; only *Lc. Lactis* was found in one sample of the gut content of fish in the treated group. Briefly, the dietary administration of probiotic *Lc. lactis* indirectly increased the taurine concentration in the gut content, which resulted in, stimulating growth, reduced feed conversion ratio, and improving the nutritional value of cultured amberjack.

To study the effect of probiotic candidate *Lc. lactis* strain K-C2 and commercial probiotic on the growth performance and the resistance to pathogen of Japanese eel (*Anguilla japonica*), these probiotics were orally administered with the diet. The significant differences in growth performances, somatic parameters and disease resistance were not observed among the control and the probiotic-treated groups during 60 days of feeding trial in this experiment.

This study indicated that novel probiotic, *Lc. Lactis* strain K-C2 could enhance the growth of amberjack by modification of amino acid flux in the fish intestine, and the growth promoting effect by strain K-C2 was not common among aquacultured fish species.



平成 30年 8月 16日

## 論文審査結果の要旨

専攻 入学年度	生物機能応用科学 専攻 平成26年度(10月)入学	氏名	NGUYEN THI HUE LINH
論文題目	Studies on Application of Probiotic <i>Lactococcus lactis</i> Strain K-C2 as Fish Feed Additives in Aquaculture 水産増養殖における養魚飼料添加物としてのプロバイオティクス <i>Lactococcus lactis</i> K-C2株の応用に関する研究		
審査委員 職名及び氏名	主査	職名 准教授	氏名 田岡 洋介
	副査	職名 教授	氏名 伊丹 利明
	副査	職名 教授	氏名 鈴木 祥広
	副査	職名 教授	氏名 吉田 照豊
	副査	職名 教授	氏名 林 雅弘
審査結果の要旨(800字以内)			
<p>水産養殖業では頻発する魚病対策として、抗生物質を汎用してきた。しかしながら、薬剤耐性菌の出現の問題により、抗生物質に代わる魚病対策法や持続的養殖技術の開発が求められている。そこで、本研究では、微生物製剤であるプロバイオティクスに注目し、水産養殖における新規プロバイオティクス有望株の探索とプロバイオティクスの有効性について検討した。発酵食品など種々の試料より乳酸菌を分離し、魚病細菌に対する拮抗性や人工胃腸液耐性などを指標に、プロバイオティクス候補乳酸菌のスクリーニングを行った。スクリーニング試験により選抜した発酵キャベツ由来のK-C2株について、16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく系統解析を行ったところ、<i>Lactococcus lactis</i>と同定された。K-C2株を<math>10^{10}</math> cells/g-飼料の密度で、コイ並びにカンパチに経口投与し、腸内での生残性を<i>in vivo</i>で評価したところ、生残率は約60%であった。本試験結果をもとに、K-C2株を用いたカンパチへの給餌試験を25日間実施したところ、対照区(K-C2株未添加区)と比較して、添加区のカンパチの成長が有意に促進された。飼育試験終了時のカンパチ腸内細菌フローラを変製剤密度勾配電気泳動法(DGGE)により解析したところ、<i>Lc. lactis</i>は添加区のカンパチで於いてのみ検出された。カンパチ腸内の遊離アミノ酸組成を分析したところ、アルギニンやタウリンといった、魚類の成長促進因子として知られるアミノ酸含量が、添加区に於いて有意に増加した。<i>Lc. lactis</i>はbile salt hydrolaseを有していないため、カンパチ魚体内で生産される胆汁酸から、直接タウリンを合成することはできない。一方、<i>Lc. lactis</i>はシステイン並びにメチオニンを前駆体とする、タウリン合成経路を有しているため、タウリン含量の増加は、腸内で生残したK-C2株が、本合成経路を介して、タウリンを生産したと推測される。一連の研究は、プロバイオティクスK-C2株が、カンパチ腸内でアミノ酸代謝を改変し、カンパチの成長に寄与する可能性を示したものである。</p> <p>公聴会での発表および質疑応答は適切であり、本審査委員会は論文審査および最終試験に合格したと判定する。</p>			

氏 名 エコ セティアワン  
EKO SETIAWAN

本 籍 インドネシア

学位記番号 農工総博甲第146号

学位の種類 博士(工学)

学位授与年月日 平成30年9月21日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科 農学工学総合研究科

専 攻 物質・情報工学専攻

教育コース 生産工学教育コース

学位論文題目 The Model of Continuous Conduction Mode and Mode Control in  
Power Converter  
(パワーコンバータの電流連続モードのモデルとモード制御)

学位論文審査委員	主査	教授	穂高一条
	副査	教授	田村宏樹
	副査	教授	多炭雅博
	副査	教授	淡野公一
	副査	教授	佐藤 治

主指導教員 教授 穂高一条

## 学位論文の要旨

フリガナ 氏 名	エコ セティアワン EKO SETIAWAN
専 攻 入 学 年 度	宮崎大学大学院農学工学総合研究科博士後期課程 物質・情報工学専攻 (西暦) 2015 年度 (10月) 入学
学位論文 題 目	The Model of Continuous Conduction Mode and Mode Control in Power Converter (パワーコンバータの電流連続モードのモデルとモード制御)

## 【論文の要旨】

The power converter is one of the fundamental parts of any electronics system. The power converter provides a required voltage or current of the system. Failure on the design and control of power converter affects the main system defective. In order to design a power converter with specification, we should use a model that represents the system mathematically. A power converter has two modes which are called a continuous conduction mode (CCM) and a discontinuous conduction mode (DCM). Most researches design the system based on CCM but they never guaranteed that their system will stay on CCM. If the system goes to DCM but if the system is designed in CCM, then the converter may lapse into behavior out of specification.

In Chapter 2, this study proposes to use a symbolic steady state model of buck converter. Since the steady state response is a periodic signal with a period of switching, it may has a Fourier series representation. It is easy to calculate the Fourier series if we are given a numerically represented signal. However, it does not give a clear relationship between constants in the circuit elements and constants in the behavior such as an average and a ripple of voltages and currents. Our method will decompose the steady state signal of buck converter into a sum of several periodic functions called recovery functions. This process is done with a symbolic calculation, and enables to know how a constant in the circuit elements affects a constant such as a ripple. This would give a clear design step of buck converter.

In Chapter 3, this study proposes a nonlinear control of boost converter that forces the behavior inside CCM region. The idea of design step is to use a phase portrait of behavior. Since the controller is given with geometrically understood way, it could describe an initial condition and a reference condition on the portrait. Our proposed controller is shown to bring the voltage and current to a reference point without going into DCM region. The simulation and experiment results show that the proposed controller successfully keeps the boost converter on CCM in any initial condition.

In Chapter 4, this study summarizes a control problem in power converter and describes how the proposed ideas are used to the problem. Then it is pointed out that their ideas may be applied to some problems in power conversion for the future works.

## 論文審査結果の要旨

専攻 入学年度	物質・情報工学専攻 平成 27 年度 ( 10 月 ) 入学	氏名	Eko Setiawan
論文題目	The Model of Continuous Conduction Mode and Mode Control in Power Converter パワーコンバータの電流連続モードのモデルとモード制御		
審査委員 職名及び氏名	主査	教授 穂高 一条	
	副査	教授 田村 宏樹	
	副査	教授 多炭 雅博	
	副査	教授 淡野 公一	
	副査	教授 佐藤 治	
審査結果の要旨 (800字以内)			
<p>パワーコンバータは、電力で動作するほとんどすべての製品の電源回路に用いられており、その技術は動作を記述するモデルと、モデルに基づくフィードバック制御に裏付けられる。とくに DC-DC コンバータの動作は、電流連続モード (Continuous Conduction Mode; CCM) と電流不連続モード (Discontinuous Conduction Mode; DCM) に分類され、一般にはこれら 2 つのモードを遷移する。CCM は DCM に比べて数学的取扱が容易であるため、これまでに知られてきた特徴量 (定常値、リップルなど) の近似計算法やフィードバック制御法は、ほとんどの場合 CCM での動作を前提にしている。したがって CCM から逸脱し、DCM へ入った時間帯に関しては、想定外の動作状況に陥る可能性がある。</p> <p>本論文第 2 章では、DC-DC コンバータの一つである降圧コンバータについて、シンボリックな定常状態モデルを提案する。そこでは、定常応答を「リカバリー関数」を用いることで、定常応答の特徴量を近似を含まないシンボリックな形で表現できることを示した。これによって、回路定数やスイッチング周期などがどのように定常応答に影響するかを追跡でき、コンバータの設計に広く有用であることを示した。</p> <p>本論文第 3 章では、DC-DC コンバータの一つである昇圧コンバータについて、負荷が必要とする電力を供給する新しい非線形フィードバック制御法を提案した。その手法の特徴は、電圧と電流の位相平面上で CCM の領域を可視化してコントローラを設計できる点である。その応用例として、典型的な回路定数をもつ昇圧コンバータについて、電圧と電流を参照値へ近づけ、CCM 内で動作することを保証する非線形フィードバック制御を設計し、従来法の一つである PID 制御と比較して、その優位性を明らかにした。</p> <p>公聴会での発表および質疑応答も適切であり、本審査委員会は論文審査および最終試験に合格したと判定する。</p>			