

北海道大学

北方圏フィールド科学センター



教授

玖村 朗人

経歴

1992年 北海道大学農学研究科博士課程
単位取得退学

1992年 北海道大学農学研究科 助手

1999年 北海道大学農学研究科 助教授

2010年 北海道大学農学研究院 教授

2021年 北海道大学大学北方圏フィールド
科学センター 教授

糸状菌を利用した低カロリーチーズの開発へ向けた基盤研究

〔研究背景と目的〕

北海道では日本全国の56%もの生乳が生産され、そのうちの75%が加工用に充当されている。生乳から分離した脂肪分（クリーム）は製菓用のみならずバターの原料としても使用できるが、副産物として生じる脱脂乳は用途が限られ、その殆どは保存性が高い脱脂粉乳の原料となっている。脱脂粉乳は製品特性の差別化が難しく、常に輸入品との厳しい価格競争に晒されてきたが、新型コロナウイルス感染拡大による乳製品の需要減少が追い打ちをかけ、現在の北海道では脱脂粉乳の在庫過剰という問題を抱えている。このように現在の日本の酪農産業においては、これまで以上に脱脂乳の新たな活用法が望まれている。

通常、生乳からクリームを分離する工程は殺菌前に行われるため、生じる脱脂乳の熟履歴は少なく、チーズの原料として適した状態が保たれている。無脂肪乳でチーズを製造すると非常に硬い組織に仕上がりが、食用には到底適さない。食用に耐える食感の製品を得るためには、通常の熟成型チーズの半分程度の脂肪率を有する原料乳を用いる必要があるが、これはタンパク質の比率を高めた「低カロリーチーズ」と称することも可能ではある。そこで申請者は、この低カロリーチーズの組織の軟化と風味の向上を促すために、高いタンパク質分解活性を有する食用糸状菌を用いた製法を創案した。これはチーズそのものに糸状菌を繁殖させる白カビ、青カビタイプのチーズとは異なり、糸状菌を予め好適な条件で培養しておき、得られる麹製剤をチーズに添加して熟成させる方法であり、酵素産生力の高いニホンコウジカビは勿論、他に健康保健機能を有する二次代謝産物を産生することで知られる紅麹菌も使用対象となる。本製法は余剰脱脂乳の特性を生かしながら、新しいタイプの乳製品を開発する上で有効な手段となり得る。

チーズに適した麹には、高いプロテアーゼ活性と同時にリパーゼ活性がないものが理想

的である。これは麩中のリパーゼが過度に乳脂肪に作用することで揮発性脂肪酸を遊離し、ランシッドと称される不快な風味が発生すると共に、チーズの pH 低下によって、組織が脆弱になるという問題を引き起こすためでもある。特に紅麩菌の場合は、そのプロテアーゼやリパーゼ活性自体に関心が持たれることが少なかった。そこで、本研究ではニホンコウジカビと紅麩菌を対象として高プロテアーゼ活性、かつ低リパーゼ活性の麩調製法を検討し、得られた麩の有用性を比較した。

〔研究方法〕

供試菌：ニホンコウジカビについては本学が有する *Aspergillus oryzae* AHU 7139 の他、樋口松之助商店より高プロテアーゼ産生株としてご提供頂いた *A. oryzae* KC43 株および *A. sojae* KC41 株を用いた。一方、紅麩菌については独立行政法人 製品評価技術基盤機構より入手した *Monascus ruber* NBRC 4527、NBRC 9203、NBRC 32317 および NBRC 32318 株を用いた。これらの紅麩菌は、報告者の先行研究より抗肥満作用や抗糖尿病作用、抗腫瘍作用などが期待されている二次代謝産物であるモナシンを多く産生する菌株であることが明らかとなっている。

培養と酵素の調製：ニホンコウジカビについてはホエイタンパク質濃縮パウダー80 (whey protein concentrate : WPC) または市販のおからパウダー粉末に対して 3 倍重量の純水を加え、pH 4.0 とした後、10 g を 100 ml 容三角フラスコに分注し、湿熱滅菌した固体培地を用いて培養した。pH 調整は WPC 培地の場合は乳酸を、おから培地にはリン酸水素ナトリウムを用い、さらにこれらの培地に 5% グルコースを添加して滅菌した培地も併用した。培地に対し、 3.8×10^4 spore の胞子を播種し、20°C、7 日間培養後、回収した培養物と等量の純水を加えてホモジナイズした後、遠心分離によって上清を回収した。沈殿物に対して等量の純水を加えてホモジナイズした後、遠心分離によって上清を回収する操作をこの後、2 回繰返した。この合計 3 回の遠心分離によって得られた上清のプールを菌体外酵素とした。一方、得られた沈殿物は凍結乾燥に供し、その後、乳鉢で粉碎したものを菌体内画分とした。菌体内画分は 0.2 M トリス-マレイン酸緩衝液 pH 5.5 で分散させた懸濁状態で酵素反応に供した。

紅麩菌については 5% 米粉と 6% ホエイ粉を含む 10 g の液体培地 (pH 4.0) を 100 ml 容三角フラスコに分注し、湿熱滅菌後、 1.2×10^4 spore の胞子を播種して 25°C 10 日間静置培養した。培養後の菌体部分を回収し、凍結乾燥後、乳鉢で粉碎した粉末を 0.05 M トリス-マレイン酸緩衝液 pH 5.5 で分散させた懸濁状態で酵素反応に供した。

酵素活性測定：リパーゼ活性については、0.2 M トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 5.5) を含むポリビニルアルコールで乳化したトリオレインまたはジオレイン (共に 1%) を基質と

して各酵素を 30°C20 分間反応させた。ヘプタン：イソプロパノール：0.5 mol/L 硫酸の混合液（25：25：1）を添加して反応を停止させ、有機溶媒層に抽出された脂肪酸をフェノールレッド法（斎藤, 1979, 日畜会報 710-715）によって定量し、遊離脂肪酸量よりリパーゼ活性を評価した。

プロテアーゼ活性については、0.2%カゼインを含む 0.05 M トリス-マレイン酸緩衝液 pH 5.5 を基質として各酵素を 30°C10 分間反応させた。トリクロロ酢酸と酢酸ナトリウム、酢酸の混合液を添加して反応を停止させ、沈殿物を濾別した後、透過液をアルカリ下でフェノール試薬と混合して発色させた。この後、分光光度計を用いた測定を行い、遊離チロシンに換算することによりプロテアーゼ活性を評価した。

模擬チーズの試作と遊離脂肪酸、水溶性窒素評価: 通常よりも脂肪率を半減した原料乳（脂肪率 1.5%）を用いて調製したゴーダ・タイプチーズのカードに対して選出した麩粉末を *Aspergillus* 由来の場合は 0.5%、紅麩の場合は 0.2%の重量比で混合し、25 g ずつ 6 パックに個包装した後、真空包装し、12°Cで 4 週間保持した。

遊離脂肪酸の測定は、採取したサンプルを栓付試験管に移し、6.7 mol/L の塩酸を加えて沸騰水に 30 分間浸して試料を溶解させた後、ヘプタン：イソプロパノール：0.5 mol/L 硫酸の混合液（25：25：1）を添加して有機溶媒層側に脂肪酸を抽出し、リパーゼ活性の測定と同様の手順で遊離脂肪酸量を定量した。培養産物無添加の模擬チーズを対照とし、それぞれ 1 g 当たりに含まれる遊離脂肪酸量（オレイン酸換算）を求めた。

水溶性窒素の測定は、採取したサンプルに純水を加えて 40°Cに加温し、乳脂肪が十分に液化した後、遠心分離を行った。上清をガラスフィルターで濾過し、濾液に炭酸ナトリウムを加えた後、フォリン-チオカルト試薬を添加して、発色させた。培養産物無添加の模擬チーズを対照とし、それぞれ 1 g 当たりに含まれるチロシン含量を求めた。

〔結果〕

1. *Aspergillus* 3 菌株によるリパーゼ産生 (図 1)

供試した 3 菌株のリパーゼ活性は、ごく一部の例外を除き、トリオレイン (TO) よりもジオレイン (DO) に対する活性の方が高かった。

TO に対する活性は 3 菌株の何れにおいてもおから麩の方が WPC 麩より高く、中では KC43 株が最も活性が低かった。

DO に対しては、AHU 7139 株が高い活性を示した。WPC 培地にグルコースを添加することによって、*A. oryzae* 2 株の菌体外 DO 分解性酵素の産生が抑制された。しかし、このグルコース添加効果は、おからを用いた場合には認められなかった。

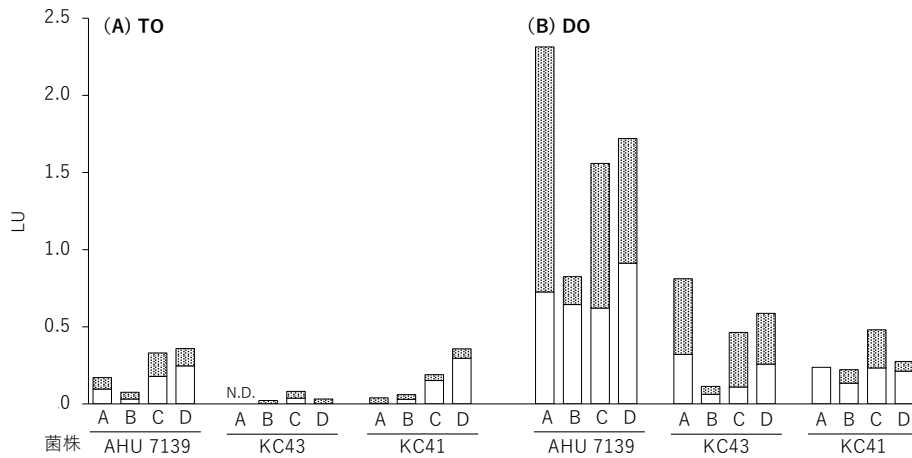


図1 供試した3菌株の *Aspergillus* が各培地上で産生したリパーゼの活性

WPC培地 (A)、5%グルコース添加WPC培地 (B)、おから (C) または5%グルコース添加おから (D) で20°C、7日間培養した *A. oryzae* AHU 7139、*A. oryzae* KC43および *A. sojae* KC41の培養物から得られた菌体内 (□) と菌体外 (■) 画分中のリパーゼ活性。トリオレイン (TO) またはジオレイン (DO) を基質とし、培養物1 gから得られた各画分の酵素が、30°C、1時間あたりにオレイン酸1 mmolを遊離したものを1 LUとして表記した。

2. *Aspergillus* 3 菌株によるプロテアーゼ産生 (図2)

プロテアーゼ産生は何れの菌株においてもおからを用いた場合の方が圧倒的に高かった。WPC 培地にグルコース添加によると、プロテアーゼの産生はやや増加した。しかし、おからにグルコースを添加した場合、その効果は菌株によって異なった。

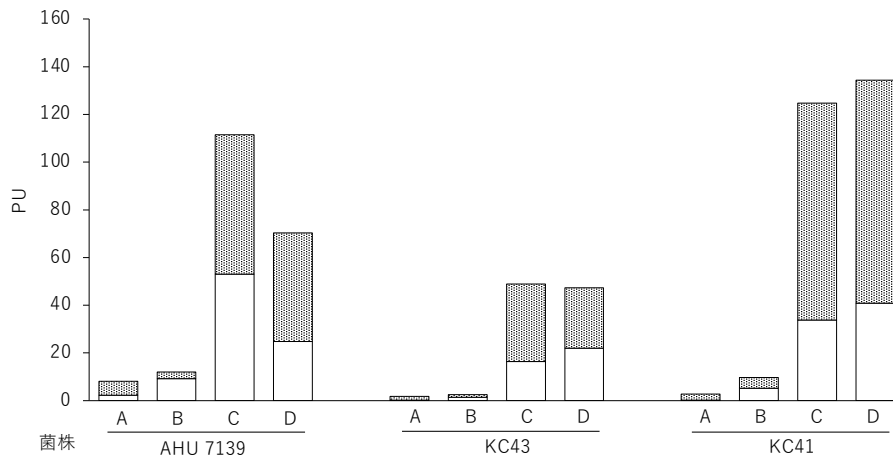


図2 供試した3菌株の *Aspergillus* が各培地上で産生したプロテアーゼの活性

WPC培地 (A)、5%グルコース添加WPC培地 (B)、おから (C) または5%グルコース添加おから (D) で20°C、7日間培養した *A. oryzae* AHU 7139、*A. oryzae* KC43および *A. sojae* KC41の培養物から得られた菌体内 (□) と菌体外 (■) 画分中のプロテアーゼ活性。カゼインを基質とし、培養物1 gから得られた各画分の酵素が、30°C、1時間あたりにチロシン1 mgを遊離したものを1 PUとして表記した。

3. *Monascus* 4 菌株によるリパーゼおよびプロテアーゼ産生 (図3)

紅麴菌の菌体が単位重量当たりには有するリパーゼ活性は前述の *Aspergillus* 属 3 株よりも高かった。この 4 つの麴は、TO よりも DO に対する活性の方が高かった NBRC 4527、NBRC 32318 と、TO と DO に対する活性がほぼ同じ NBRC 9203 と NBRC 32317 の 2 つのタイプに区別された。中では NBRC 9203 株が最も低いリパーゼ活性を示したが、同時にプロテアーゼ活性もまた低かった。

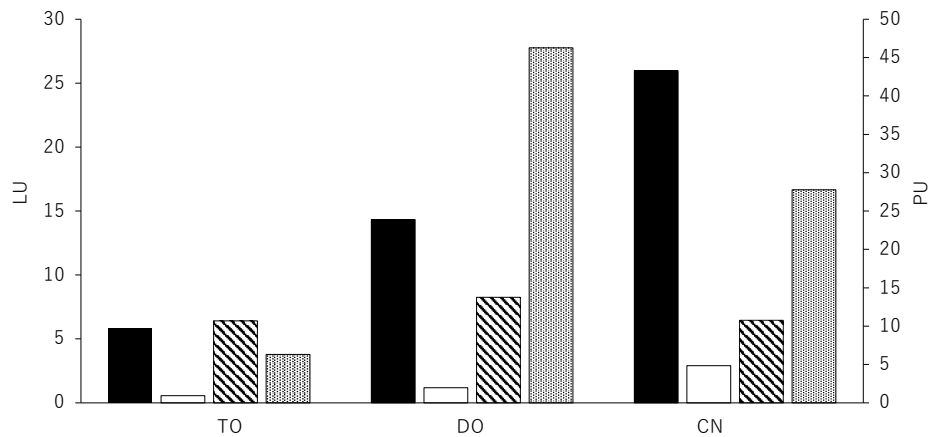


図3 供試した4菌株の*Monascus*の乾燥菌体が有するリパーゼおよびプロテアーゼ活性
M. ruber NBRC 4527 (■)、*M. ruber* NBRC 9203 (□)、*M. ruber* NBRC 32317 (▨)
 および*M. ruber* NBRC 32318 (▩)を米粉を含むホエイ液体培地で25°C、10日間培養
 後に回収した菌体を凍結乾燥後、粉碎したものの懸濁物が示すリパーゼおよび
 プロテアーゼ活性。基質にはトリオレイン (TO)、ジオレイン (DO) またはカゼイン
 (CN) を用いた。菌体粉末1 gから得られた酵素活性を図1、2と同様な活性表記で示した。

以上の結果からリパーゼを全く産生しない菌株あるいは培養条件を見いだすことができなかつたため、本試作を行う前段階として、下記の観点から幾つかの麴を選出し、これを実験室レベルで調製した模擬チーズに添加することで生じる遊離脂肪酸と水溶性窒素を簡易評価することとした。

- 1) 麴無添加 (コントロール)
- 2) AHU 7139 の WPC 培養：先行研究によってランシッドが際立っていたもの
- 3) AHU 7139 のおから培養：先行研究の培地を WPC からおからに変更して比較検証
- 4) KC43 の WPC 培養：DO リパーゼ活性は高いものの、TO リパーゼ活性が微弱
- 5) KC41 のおから培養：TO-リパーゼ活性は2) とほぼ同等、DO-リパーゼ活性は2) の5分の1程度。プロテアーゼ活性は3) 以上
- 6) NBRC 32318 菌体：先行研究により、最もモナシン産生が多いもの

4. 選出した麩を用いた模擬チーズの試作と遊離脂肪酸評価 (図 4)

麩無添加とほぼ同レベルであったのは TO に対する活性を殆ど示さなかった KC43 の WPC 麩を用いた場合であった (4)。一方、KC41 株のおから麩は、KC43 株の WPC 麩よりも DO に対する活性は低かったにも関わらず、麩無添加よりも 1.9 倍の遊離脂肪酸が認められた (5)。これよりもやや高いレベル遊離脂肪酸を生成したものは AHU 7139 株の WPC 麩添加区で、麩無添加の 2.1 倍であった (2)。この KC41 株のおから麩と AHU 7139 株の WPC 麩を比較すると、TO に対してほぼ同等のリパーゼ活性を有する一方で、DO に対する活性は AHU 7139 株の WPC 麩の方が約 5 倍高い。今回の模擬チーズの実験で AHU 7139 株の WPC 麩添加時に最大の遊離脂肪酸となった理由は、強力な DO に対する活性ゆえであろう。以上の結果は、乳脂肪の主体をなすトリグリセリドだけではなく、分解によって生じたジグリセリドがさらなる基質となって活発に分解されるという一連の流れを示唆している。しかしながら、AHU 7139 株のおから麩 (3) は同株の WPC 麩よりも TO に対する活性が 2 倍程度高く、KC41 株のおから麩よりも DO に対する活性が 3 倍程度高かったにも関わらず、模擬チーズ中の遊離脂肪酸は 1.5 倍程度に止まっていたという事実は、単なる酵素活性測定だけでは説明しきれない矛盾を提示している。これについてはリパーゼが共存するプロテアーゼ (同菌由来のみならず、カード調製時に用いた凝乳酵素中に含まれるキモシンやペプシン等) の影響を受けて、活性に変化が生じていなかったかどうかを検証する必要がある。一方、NBRC 32318 麩の場合、リパーゼ活性が最も高かったにも関わらず、模擬チーズ中の遊離脂肪酸レベルは対照の約 1.1 倍の増加に止まった。元々、紅麩菌の発育適温は *Aspergillus* よりも高いことから、紅麩菌が産生する酵素は、チーズの熟成温度域での反応速度が極端に低下しているのかもしれない。

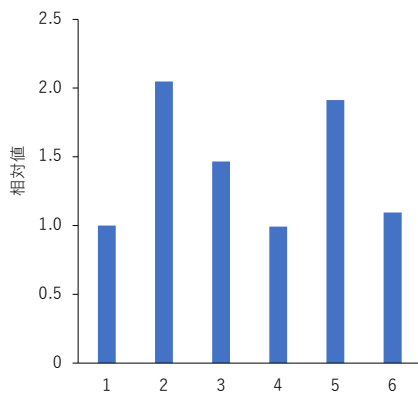


図4 各種麩を添加した模擬チーズ中の遊離脂肪酸
調製したカードに1) 麩無添加 (コントロール)、
2) AHU 7139のWPC麩、3) AHU 7139のおから麩、
4) KC43のWPC麩、5) KC41のおから麩、
6) NBRC 32318菌体を添加し、12°C4週間保存後の
単位重量 (g) 当たりの遊離脂肪酸の相対値を示した。

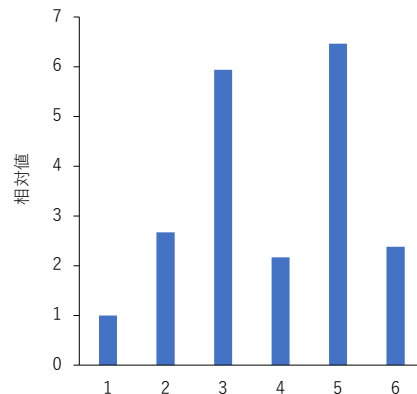


図5 各種麩を添加した模擬チーズ中の水溶性窒素
調製したカードに1) 麩無添加 (コントロール)、
2) AHU 7139のWPC麩、3) AHU 7139のおから麩、
4) KC43のWPC麩、5) KC41のおから麩、
6) NBRC 32318菌体を添加し、12°C4週間保存後の
単位重量 (g) 当たりの水溶性窒素の相対値を示した。

5. 選出した麩を用いた模擬チーズの試作と水溶性窒素評価 (図 5)

水溶性窒素に関しては全ての実験区において対照よりも増加していた。遊離脂肪酸の場合と異なり、こちらはおから麩を用いた場合 (3、5) の方が WPC 麩 (2、4) よりも高い値を示すという、ほぼ予想通りの結果となった。一方、NBRC 32318 の菌体には AHU 7139 株のホエイ麩の 5 倍近いプロテアーゼ活性が認められていたにも関わらず、模擬チーズ中における水溶性窒素のレベルは AHU 7139 株のホエイ麩添加時よりもやや低くなった。ここでもまた紅麩菌プロテアーゼの反応速度がチーズの熟成温度域で極端に低下していた可能性がある。

[まとめ]

低カロリーチーズの組織の軟化と風味の向上を促すために、高いタンパク質分解活性を有する麩を調製するのであれば、*Aspergillus* をおからで培養する方法がよい。しかし、おからは WPC よりもトリグリセリドに作用するリパーゼの産生もまた増加させる傾向がある。おから培養時におけるリパーゼ産生の抑制にグルコースは無効であったことから、製麩条件を改善するためには、培養開始時 pH や培養温度、水分活性などにも検証を加える必要がある。一方、紅麩については模擬チーズ中の遊離脂肪酸含量に顕著な増加はなく、タンパク質分解については緩やかに進行していたことから、長期熟成型のチーズとしての応用が適しているものと思われる。

[今後の展望]

本研究から得た結果を基に、今後、*Aspergillus* に関しては、おから培養時に最もリパーゼ産生が低かった KC43 株を用いて製麩条件を確立し、試作品の一般成分および香気成分分析および組織学的な評価を行なっていきたい。紅麩に関しても同様であるが、菌体を得る際の培養条件 (液体) によって菌体の香気性が変わるようであり、香りは嗜好性に多大な影響を与える因子であることから、この方面についても研究を進めていきたい。

[謝辞]

本研究の遂行にあたりご支援下さいました公益財団法人 サッポロ生物科学振興財団に心より感謝申し上げます。