



助 教
早川 徹

2011 年 北海道大学大学院農学院
博士課程修了
2011 年 University of Massachusetts
Medical School 博士研究員
2012 年 帯広畜産大学 畜産衛生学専攻
助教
2016 年 北海道大学大学院農学研究院
助教

糸状菌を利用した低カロリーチーズの 開発に適した麹調製に関する研究

〔研究背景と目的〕

本研究は、貴財団が北海道食産業振興助成研究として 2022 年度に採択下さった「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」¹⁾（以下、前研究）を引継いで実施したものである。前研究では北海道における余剰脱脂乳の有効活用を勘案し、原料乳に対する脱脂乳の混合比を高めることによってチーズの低脂肪高タンパク質化を図ると共に、麹を添加・熟成に供することで、風味強化の点からも製品の差別化を実現するために好適な麹の調製法の探索が行われた。本研究では前研究の成果を基に試作品を製造、分析した後、麹菌のリパーゼ産生性の観点から、本製法に適したより多くの麹菌株を選抜するための指針を検討した。

〔研究方法〕

供試菌：紅麹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 32318 を用いた。ニホンコウジカビについては樋口松之助商店よりご提供頂いた *Aspergillus oryzae* KC43 を用いた。

菌の培養とチーズ添加剤の調製：紅麹菌については 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 25°C 10 日間静置培養した。培養後、菌体部分を回収し、凍結乾燥後、乳鉢で粉碎した粉末をチーズに添加した。

ニホンコウジカビについては市販のおから粉末に対して3倍重量の純水を加え、リン酸水素ナトリウムを用いてpH 4.0とした後、100 ml 容三角フラスコに10 g ずつ量りとり湿熱滅菌した。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、凍結乾燥を行い、乳鉢で粉碎した粉末をチーズに添加した。

チーズの試作：全乳と脱脂乳を混合し、通常よりも脂肪率を半減した原料乳（脂肪率1.48±0.05%）を用い、ゴーダタイプの製法に従ってカードを調製した。カード1 kg に対して紅麴菌体破碎粉末については1 g、ニホンコウジカビのおから麴凍結乾燥粉末については2.5 g を混合した後、プレス、加塩し、11~12°Cで3ヶ月間熟成させた。

一般成分分析：水分、脂肪、タンパク質は定法によって行なった²⁾。塩分はバターの塩分測定法を参考に²⁾、試料を灰化後、硝酸に再溶解し、pH 調整後に硝酸銀で滴定することで算出した。遊離脂肪酸は試料と塩酸を混合し、沸騰水中で完全に溶解させた後、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、有機溶媒層に抽出された脂肪酸をフェノールレッド法³⁾によって定量した。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。上清をガラスワールで濾過し、濾液をマイクロケルダール法に供してチーズ中に可溶化した窒素含量を測定した。

紅麴菌二次代謝産物測定：チーズからモナシンを抽出する場合はメタノールを、シトリニン抽出する場合は35 mmol/L 塩酸含有酢酸エチルを用いた。各抽出物を乾固した後、アセトニトリルに再溶解し、高速液体クロマトグラフィーで定量した⁴⁾。

DNA シークエンシング：*A. oryzae* KC43 または AHU7139 株の胞子を液体窒素中で凍結後、粉碎したものに中性フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、遠心分離した後に得られた水層を回収した。これを常法に従い、エタノールで沈殿させたものを鋳型とし、*tg1A*（AO09000300150）コード領域をPCRで増幅したものをシークエンス解析に供した。

〔結果と考察〕

1. *M. ruber* NBRC32318 を用いた紅麴チーズ

紅麴チーズの外観を図1aに、2024年1月9日に熟成終了後、2週間以内に測定した一般成分および二次代謝産物の含量について表1に示した。ここでの対照は紅麴菌体破碎粉末無添加である。一般的なゴーダチーズのタンパク質：脂肪は1：1であるのに対し、低脂肪化によって2：1となったが、このレベルでの違いであれば風味やテクスチャに違和感を覚えることはなかった。紅麴菌が産生するモナシンの90%が菌糸体内に貯留していること

から、菌糸体のみを回収してチーズに添加したが、チーズへの添加量が多くなり過ぎると苦味が強くなるため、試行錯誤の末に添加量は0.1%としている。この添加量でも紅麹チーズでは全窒素に対する水溶性窒素の割合が対照の約2倍となり、紅麹菌体内プロテアーゼによるタンパク質の分解作用が強く示唆された。また紅麹チーズ中の遊離脂肪酸は対照よりも10%程度高くなり、菌体内リパーゼの作用が伺われたものの、風味の異常は認められなかった。また紅麹チーズ中からは肝腎毒性を示すと考えられているシトリニンは検出されず、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モナシンが認められた。全体として本紅麹チーズには苦味はなくテクスチャにも問題はなかった。



図1 (a) 紅麹 (*M. ruber* NBRC32318) 添加チーズの外観、
(b) 麹無添加チーズ (対照) の外観、
(c) *A. oryzae* KC43 麹添加チーズの外観 (ドリップ発生部分を示す)

表1 紅麹チーズの成分分析結果

	水分	脂質	タンパク質	塩分	水溶性窒素/全窒素	遊離脂肪酸	モナシン
対照チーズ	40.9	15.3	34.8	1.2	7.1	6.0	n.d.
紅麹チーズ	41.0	15.7	34.9	1.2	13.8	6.8	203.6

単位は遊離脂肪酸の場合、mmol/100 g、モナシンは μ g/100 g、それ以外は%

2. *A. oryzae* KC43 を用いたニホンコウジチーズ

当該チーズの外観を図 1c に、2023 年 10 月 5 日に熟成終了後、6 ヶ月間冷蔵保存したもののについて一般成分分析を行なった結果を表 2 に示した。

表2 ニホン麹チーズの成分分析結果

	水分	脂質	タンパク質	塩分	水溶性窒素/全窒素	遊離脂肪酸
対照チーズ	41.3	17.7	33.2	0.8	21.8	4.0
麹添加チーズ	35.8	20.5	36.1	1.1	28.0	5.5

単位は遊離脂肪酸の場合、mmol/100 g、それ以外は%

麹添加チーズの場合、対照 (図 1b) と比べて著しいドリップが発生した。その結果、水分含量の低下を招くと同時に、その反動で全体における脂質、タンパク質、塩分の割合が増加した。全窒素に対する水溶性窒素の割合については、麹添加チーズの方が対照よりも

増加したものの、その増加率は紅麹添加の場合よりも低く、1.3 倍に満たなかった。しかし、実際に試食してみると対照との風味の違いは上述の紅麹チーズと対照とのそれ以上であったことから、水溶化したペプチド成分がドリップと共に流出した可能性が考えられた。また遊離脂肪酸については、麹添加チーズの方が対照よりも1.4倍程度増加していたものの、ランシッドが認められるレベルではなかった。全体としてこのニホンコウジチーズは、呈味性の点では好評価が得られたものの、ドリップの発生に伴う水分流出とテクスチャのベタつき感にはマイナスの評価を与えざるを得ず、今後の改善が必要とされる点である。

3. *A. oryzae* KC43 のリパーゼ遺伝子発現と *tgla* の塩基配列

A. oryzae AHU 7139 のホエイ固体培養麹をチーズに添加し、熟成させると乳脂肪分解が促進され、揮発性遊離脂肪酸の蓄積に伴う風味異常（ランシッド）を強く誘発する⁵⁾。*A. oryzae* AHU 7139 がホエイ固体培地上で発現するリパーゼ遺伝子を確認するために、*A. oryzae* において推定されている25のリパーゼ遺伝子を対象にRT-PCRによって定性的に観察した結果、8種のリパーゼ遺伝子の発現が確認されている⁶⁾（表3）。さらに *A. oryzae* AHU 7139 が発現するリパーゼ遺伝子のノックアウト株の結果から、チーズの熟成中にまず *tgla* が乳脂肪の98%を占めるトリグリセリドに作用し、そこで生じたジグリセリドに対して *mdlB* が作用して、遊離脂肪酸の増加が加速されることが示唆された⁶⁾。これに対し、*A. oryzae* KC43 株を用いた場合、ランシッドが認められなかったことから、KC43 株を同じくホエイ固体培地で培養後、同様に RT-PCR によってリパーゼ遺伝子の発現を観察した。その結果、KC43 株が発現するリパーゼは *cutL* のみで *tgla* の発現は認められなかった（表3）。

表3 *A. oryzae* AHU7139とKC43における定性的リパーゼ遺伝子発現評価

遺伝子	AHU 7139	KC43	備考
AO09000300150	○		<i>tgla</i> : TG, DG, MGに活性あり
AO090701000644	○		<i>mdlB</i> : DG, MGに活性あり
AO090005000029	○	○	<i>cutL</i> : TG, DG, MGに活性あり
AO090012000690	○		TG-リパーゼ
AO090005001319	○		カルボキシエステラーゼ
AO090005001602	○		菌体内TG-リパーゼ
AO090023000717	○		〃
AO090003000839	○		〃

A. oryzae AHU 7139 株および KC43 株はトリグリセリドよりもジグリセリドに対する活性の方が著しく高いため¹⁾、乳脂肪分解の連鎖反応を防ぐ上で *tgla* の発現抑制は重要と考えられたが、KC43 株において *tgla* そのものが発現しなくなった原因を探るべく、当該遺伝子のシーケンスを行なった。その結果、KC43 の場合、第2エキソンにグアニン1塩

基の挿入があり、これによってフレームシフトが生じて第2エキソンの段階で翻訳が終結することが示唆された（図2）。*tglA* の活性中心は第3エキソンにコードされているため、KC43 の場合は翻訳産物がリパーゼ分子として機能せず、これが KC43 がランシッドを誘発しない原因と考えられた。

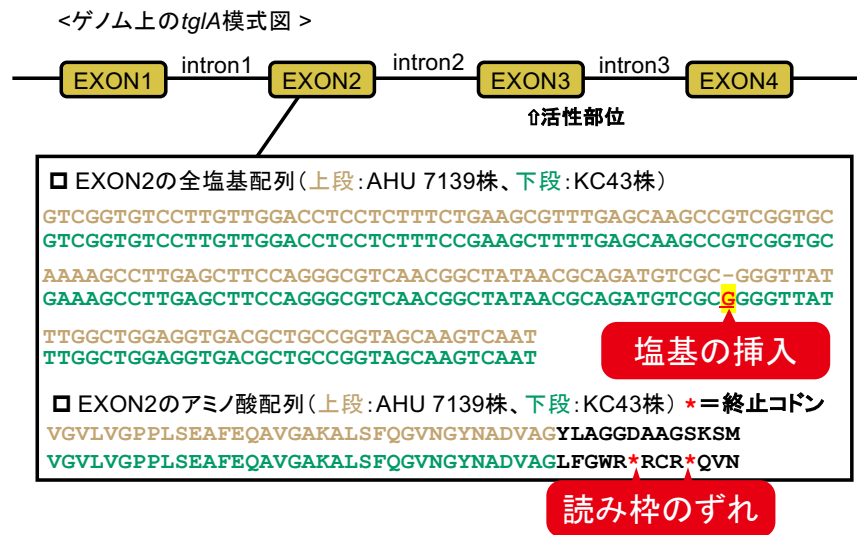


図2 *A. oryzae* AHU 7139とKC43の*tglA*コード領域における塩基配列の違い

〔今後の展望〕

低カロリーチーズは、たんぱく質とカルシウムを豊富に含む用途の広い食材である。特に硬質タイプのチーズはホエイへのカルシウム流失が少ない製法を経るという点でフレッシュタイプのチーズよりも本目的に叶っている。申請者らはさらなる付加価値を求め、チーズカードに麴を添加して熟成に供し、たんぱく質分解を促進させることによって呈味性の向上を図る製法を検討してきた。

紅麴菌については本年（2024年）3月に紅麴サプリメントによる健康被害が社会的な問題となり、紅麴菌自体の安全性と培養・管理技術に注目が集まった。このサプリメントは1ヶ月以上もの長期間固体培養を行なった発酵産物から調製されているのに対し、本研究で適用した培養条件は10日間の液体培養であり、チーズへの添加量も僅か0.1%である。本研究で確立した紅麴チーズは、外観や呈味性において従来にない特徴を備えたインパクトのある食品だけに、今後の紅麴菌の安全性に対する信頼回復を待ちたい。

ニホンコウジカビについては、製麴条件と菌株選定においてなお、改善の余地がある。

ニホンコウジカビの酵素産生能を生かすために固体培養による製麴が望ましいが、今回製麴素材として用いたおからはニホンコウジカビのプロテアーゼ産生を強く誘導する利点

がある¹⁾ 反面、おから麴のチーズへの添加は著しいドリップの発生を引き起した。このような現象は、紅麴菌を米粉含有液体培地で培養した後、その培養物全てを凍結乾燥した後、にチーズに添加・熟成させた場合でも認められていた（玖村、未発表データ）。このような試作実績を基に推測すると、ドリップ発生の原因は製麴素材（ニホンコウジカビの場合はおから、紅麴菌の場合は米粉）に由来する澱粉成分が、チーズの熟成中に分解したためと考えられる。この問題を解決するためには、ホエイタンパク質や卵白等、澱粉不含で熱凝固性を有するタンパク質を固形化して製麴素材とする方法が考えられる。

一方、ニホンコウジカビの菌株選定については、本年 10 月に独立行政法人 酒類総合研究所がパンゲノム解析データベースの公開を予定しており、本研究における KC43 株のように、塩基の挿入によって *tglA* のリパーゼとしての機能が失われた菌株の他にも、一次構造の部分的な変異によって、*tglA* としての機能に変化が生じた候補菌株の選出が容易になるものと期待される。

〔まとめ〕

紅麴菌 (*Monascus ruber* NBRC 32318) を米粉ホエイ液体培地で静置培養し、得られた菌体を凍結乾燥後、粉末化したものをチーズに添加・熟成に供することで、外観や呈味性において従来にない特徴を備えたチーズを提案することが可能である。

ニホンコウジカビを用いる場合は、穀類よりは熱凝固によって固形化したタンパク質を製麴素材とする方が熟成中のドリップ発生を回避する上で好ましいと考えられる。また、今後のニホンコウジカビのデータベース CAoGD (Comprehensive *Aspergillus oryzae* Genome Database) の整備によって、使用する菌株選定の効率化が期待される。

〔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。

〔参考文献〕

- 1) 玖村 朗人 (2023) 第 11 回 公益財団法人 サッポロ生物科学振興財団 北海道食産業振興助成研究報告書
- 2) 乳製品試験法・注解 (1999) 日本薬学会
- 3) 斎藤 善一 (1979) 日畜会報 50 710-715.
- 4) Wu, C. et al. (2011) J. AOAC Int. 94 179-190.
- 5) Kumura, H. et al. (2017) J. Adv. Dairy Res. 5 1000188
- 6) Chintagavonse, N. et al. (2024) J. Biosci. Bioeng. 137 381-387.