



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies to reduce rancidity in ripened cheese caused by koji adjunct from <i>Aspergillus oryzae</i> [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	CHINTAGAVONGSE, Napaporn
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16096号
Issue Date	2024-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93481
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	CHINTAGAVONGSE_Napaporn_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(農学) 氏 名 CHINTAGAVONGSE Napaporn

審査担当者	主査	教授	玖村 朗人
	副査	教授	小池 聡
	副査	助教	早川 徹
	副査	教授	曾根 輝雄 (国際食資源学院)

学位論文題名

Studies to reduce rancidity in ripened cheese
caused by koji adjunct from *Aspergillus oryzae*
(熟成型チーズへの *Aspergillus oryzae* 由来麹添加によって
誘発されるランシッド低減に関する研究)

本論文は英文 79 頁、図 20、表 6、6 章からなり、参考論文 3 編が付されている。

チーズ製造には乳酸菌をはじめとする細菌以外にも糸状菌が用いられる場合がある。しかし、我が国において馴染み深い麹菌の場合、その高いタンパク質分解活性が熟成型のチーズへの応用という点で非常に有望であるにも関わらず、適用される例は殆どない。これは麹菌が産生するリパーゼが乳脂肪から揮発性脂肪酸を遊離して風味に悪影響を及ぼす、いわゆるランシッドを引き起すためである。本研究は麹菌が産生する複数のリパーゼ分子の中からランシッドに強く関わる分子種を同定し、その産生を制御することによって、麹菌がチーズに応用可能かどうかを本学所有の *Aspergillus oryzae* AHU 7139 株を用いて実証したものである。

1) ランシッド誘発リパーゼ分子の同定

乳タンパク質を熱変性によって固形化した乳糖含有培地上で *A. oryzae* AHU 7139 が産生するリパーゼの分布および基質特異性を調査した。培養開始時の pH を 4.0 と 6.5 の二通りに設定したところ、pH 4.0 よりも pH 6.5 で培養を開始した場合の方がリパーゼを多く産生した。また菌体内よりも菌体外の方に多くの活性が認められ、トリオレインよりもジオレインに対して遥かに高い活性を示した。次にこれらの培養条件下で発現するリパーゼ遺伝子を検証した。*A. oryzae* の基準株より推定される 25 のリパーゼ遺伝子を対象に RT-PCR を行ったところ、8 つの遺伝子の発現が確認された。ここから菌体内リパーゼと推定される 3 種を除いた 5 つの遺伝子 (No. 1、No. 19、*cutL*、*tglA*、*mdlB*) を対象として各遺伝子のノックアウト株を作製した。これらを同様に固体培養後、各基質に対する酵素活性を調査したところ、トリオレインに対して反応を示すリパーゼ産生は培養開始時 pH の影響を受け、pH 4.0 では No. 1、No. 19 と *cutL* が、pH 6.5 では *tglA* が産生される主要なリパーゼであることが明らかになった。これに対し、ジオレインに対して反応を示すリパーゼ産生は専ら *mdlB* であり、こちらは培養開始時の pH に強く依存しなかった。さらに変異株の培養物を凍結乾燥し、実験室レベルで調製したチーズに添加して約 1 ヶ月間の保

存試験に供した結果、*tglA* 欠損株とそれに次いで *mdlB* 欠損株において保存期間中の遊離脂肪酸の増加が認められなくなった。この傾向はこれらの変異株の培養に際し、pH 4.0 よりも pH 6.5 で培養を開始する場合の方が顕著であった。

以上の結果よりランシッドに強く関わるリパーゼ分子は TglA と MdlB であること、その基質特異性から乳脂肪に対してまず TglA が作用し、それによって生じたジグリセリドに対して MdlB が活発に作用するという一連の流れが想定された。

2) 培地へのグルコース添加がリパーゼ遺伝子やその転写因子に及ぼす影響

先行研究において *tglA* と *mdlB* は転写因子 FarA の制御を受けること、さらには液体培地へ添加する唯一の炭素源をグルコースとすることで *tglA* と *mdlB* の発現を抑制できることが報告されている。そこで上記培地における炭素源を乳糖からグルコースに置換した条件を新たに設定し、各遺伝子の発現レベルとリパーゼ活性および固形培地中のグルコース消費状況を経時的に定量評価した。その結果、培地中のグルコースが完全に消費されない段階でも *tglA* と *mdlB* の発現自体は認められたものの、グルコース添加によって各酵素活性は著しく低下した。また *farA* の発現レベルもグルコース添加によって低下し、その経時的変動は *tglA* と *mdlB* のそれとよく一致した。

以上の結果より、培地へのグルコース添加は *farA* の発現を抑制し、それに伴って FarA の制御下にある *tglA* と *mdlB* もまた発現が抑制されるものと考えられた。

3) グルコース含有固体培地より得られた麴添加によるランシッド抑制効果の検証

乳タンパク質ベースの乳糖含有固体培地（従来型）と乳糖をグルコースに置換した固体培地（改変型）上で *A. oryzae* AHU 7139 を培養後、凍結乾燥したものをゴーダチーズの製法に倣って調製したチーズカードに混合・加圧した後、3 ヶ月間の熟成に供した。試作品の一般成分分析を行った結果、従来型における遊離脂肪酸含量は対照（培養物無添加）の約 4 倍の値を示し、ランシッドの発生が確認された一方、改変型添加における試作品は対照と同等の遊離脂肪酸含量に止まった。さらにタンパク質分解の指標となる全窒素含量中における水溶性窒素の割合は従来型と改変型で有意差はなく、何れも対照の約 1.6 倍の増加（有意差あり）となった。

このように改変型の麴のチーズへの添加は、ランシッドを回避しつつ、タンパク質分解を促進する上で有効であることが確認された。

以上、本研究は *A. oryzae* が保有する数あるリパーゼの中からランシッドの原因となる分子種を特定し、その産生を培養条件のみによって制御することで、製品の風味特性を著しく改善しうることを実証した。ここで提示された製麴条件は清酒や味噌、醤油などに適用されてきた伝統的な製法と大きく異なり、麴菌の新たな利用法としての可能性を示すと同時に、麴菌の特性を生かした乳製品の実用化にも寄与するものと評価される。

よって審査員一同は、Napaporn Chintagavongse が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。