

経済産業省 平成20年度「地域イノベーション創出共同体形成事業」
「北海道地域イノベーション創出協働体形成事業」
研究開発環境支援事業

「地域独自スターターを利用した チーズ製造マニュアル」 (第2版)



フロピオン酸菌利用チーズ



酵母利用チーズ

北海道立総合研究機構 食品加工研究センター
北海道立十勝圏地域食品加工技術センター

目次

はじめに	1
I. プロピオン酸菌を併用したチーズ	3
(1) プロピオン酸菌を併用したチーズの概要	4
(2) プロピオン酸菌利用チーズ製造マニュアル	6
(3) プロピオン酸菌スターター培養マニュアル	18
II. 酵母を併用したカマンベールチーズ	21
(1) 酵母を併用したチーズの概要	22
(2) 酵母併用チーズ製造マニュアル	24
(3) 酵母スターター培養マニュアル	36
III. 試作試験における確認	38
IV. 乳酸菌スターターの調製	39
V. 製造記録の例	40
VI. プロピオン酸菌を利用したヨーグルト	41
VII. チーズのアミノ酸分析	47

はじめに

近年、全国的にナチュラルチーズの製造に取り組む事業者が増えてきており、個性的なチーズの開発、製造がすすめられています。

各事業者は原料にこだわり、製造工程に工夫を凝らして、品質の高いナチュラルチーズの生産をめざして努力を重ねています。

個性的で高品質のナチュラルチーズを生産するための一つとして、製造時に使用する発酵微生物(スターター)に着目し、これを改善していく手法があります。

本マニュアルでは独自のスターターとしてプロピオン酸菌と酵母に着目し、これらを利用したナチュラルチーズの製造方法について解説してあります。

高品質で競争力を持つナチュラルチーズを開発するためのアプローチとして本マニュアルが利用されることを期待しております。

なお、本書マニュアルの作成にあたりご協力いただきました、北海道士幌高等学校様、士幌町食品加工研修センター様、(有)富田ファーム様、(有)十勝野フロマージュ様、(農)共働学舎新得農場様に御礼申し上げます。

**独自スターター
プロピオン酸菌利用**

プロピオン酸菌を併用したチーズ

プロピオン酸菌を併用したチーズの製造

1. はじめに

ナチュラルチーズ製造に使用する微生物は大きく乳酸菌、カビ、その他に分けることができ、その他の微生物には酵母、リネンス菌、ブドウ球菌、プロピオン酸菌があげられます。

半硬質系チーズに使用される微生物は乳酸菌とプロピオン酸菌で、プロピオン酸菌を利用したチーズとしてアルペンタイプのエメンタール、グリエールなどがあります。

しかし、プロピオン酸菌を利用したチーズ製造は国内であまり製造されておらず、プロピオン酸菌を併用する効果は広く普及しているとはいえないのが現状です。

ここでは、北海道立食品加工研究センターが分離したプロピオン酸菌 *Propionibacterium freundenreichii* PF-2株を用いた半硬質チーズの製造方法とその効果について紹介します。

2. 使用する微生物

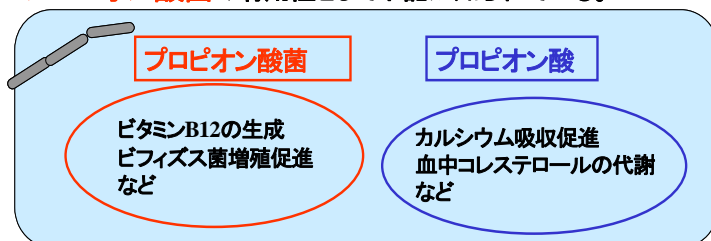
Propionibacterium freundenreichii PF-2

プロピオン酸菌とは

プロピオン酸菌 (*Propionibacterium*) はプロピオン酸をつくる有用菌として知られ、人の皮膚や腸管などにも生息しています。食品ではスイスチーズの発酵などに利用されています。



プロピオン酸菌の有用性として下記が知られている。



GYP白亜寒天培地

糖発酵試験

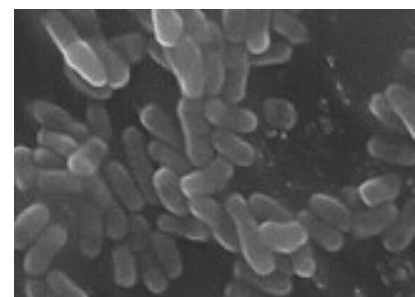
L-アラビノース	-	セルビオース	-
D-キシロース	-	マルトース	-
グルコン酸ナトリウム	-	メルビオース	-
グルコース	+	シュクロース	+
フルクトース	+	ラフィノース	-
ガラクトース	+	サリシン	-
マンノース	-	トレハロース	-
ラムノース	-	マンニトール	-
ラクトース	+	ソルビトール	-

ラフィノースなどのオリゴ糖を利用しない

ビフィズス菌との混合も可能

乳酸発酵

牛乳中のラクトース(乳糖)を乳酸に変換発酵乳に利用可能



× 8000

電子顕微鏡(SEM)写真

3. プロピオン酸菌を利用する効果

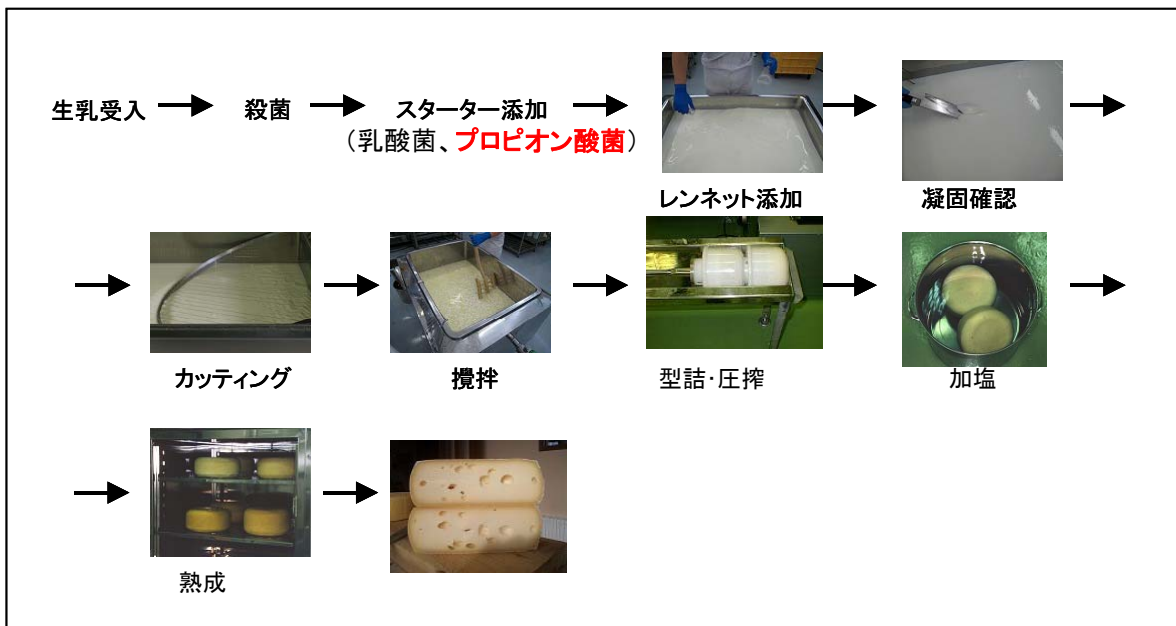
①特徴的な風味の付加

プロピオン酸菌を利用し製造した半硬質チーズは、特徴的なナッツ様の風味を示します。
PF-2株を添加量することで、**ゴータチーズなど通常の半硬質チーズと異なる風味のチーズを製造することが可能**です。

②機能性の付与

プロピオン酸菌の多くはビフィズス菌増殖性を示します。

4. 製造工程の概要



5. 製造にあたっての注意事項

①プロピオン酸菌を使用すると、**製造環境がプロピオン酸菌に汚染されます。**

有用微生物ですが、使用すると製造環境に定着し、他のチーズ製造に影響する可能性があります。特にプロピオン酸は嫌気条件で炭酸ガスを発生します。このため、熟成を伴う半硬質チーズなどでは異常な膨張を引き起こすことがあります。一度、定着した菌を製造環境から除去することはかなりの費用と労力を要しますので、試作する際は商品製造とは隔離された環境での使用をお勧めします。

②プロピオン酸菌は空気のないところををよく繁殖します。このため、チーズのサイズが大きく、チーズ内部の酸素量が少ない場合や真空包装などでチーズ内の酸素を取り除いた場合、**プロピオン酸菌が異常発酵する場合**があります。

今回、紹介する製造方法は2kg程度のチーズを製造する方法です。大きなサイズの場合や真空包装を予定する場合別途お問い合わせください。

③スターターの入手

PF-2株は北海道立食品加工研究センターで管理しています。親株は同センターから提供可能ですが、バルクスターターでの提供は現在のところ行っておりません。入手後、自社培養をしていただく必要があります。同等のスターターとして市販品のチーズ用プロピオン酸菌が販売されており、これを利用して同様の製造が可能です。

プロピオン酸菌利用チーズ製造マニュアル

作業工程

写真

①原料乳の検査と計量

新鮮な牛乳を使用。
ロット毎に風味等、良質な牛乳か確認。

②濾過

異物の除去。ストレーナー又は濾過布を使用。機器は必ず分解して洗浄、殺菌。場合によっては、クリームを一部除き、成分の標準化を行う。



③殺菌

病原菌を死滅させ、安全な製品をつくるために必要不可欠な作業。汚染菌を減らし、後で添加する乳酸菌の増殖を促す。バッチ式の場合は63℃30分間のLTLT法、連続式の場合は72℃15秒間のHTST法。



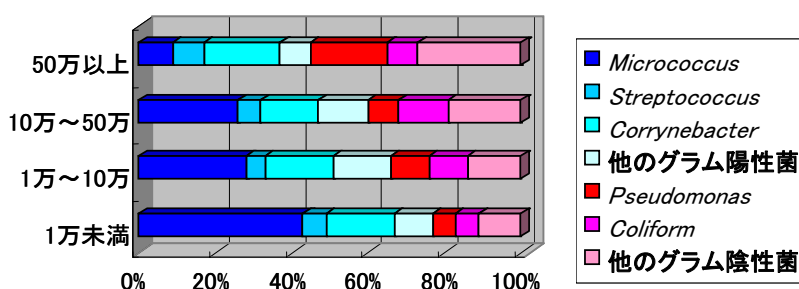
④冷却

耐熱性菌等の残存している菌が増殖しないように、次の工程への移行を迅速に行う。発酵に適した温度になるように管理する。殺菌終了後、冷水で間接的に35℃まで冷却。

参考

チーズ製造に利用する原料乳には良質なものが求められます。原料乳の細菌数が多いとグラム陰性菌の割合が増加します。(右図の赤いグループ) グラム陰性菌の中にはシュードモナスや大腸菌群などチーズ製造に悪影響を与える高い酵素活性の細菌が存在するため注意が必要です。

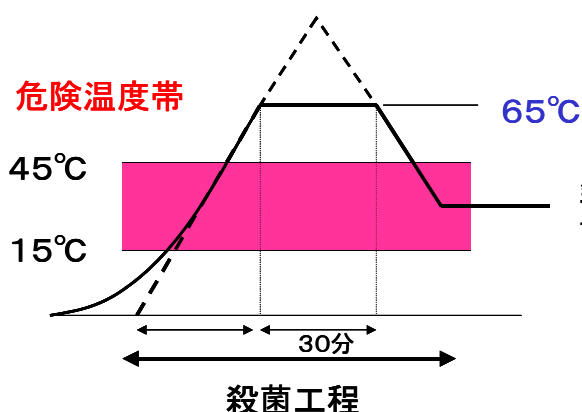
低温貯蔵生乳の細菌汚染分布



原料乳の検査と計量

原料乳の検査項目は多数あるが、最低限、乳温とpHまたは酸度のチェックをおこなう。これらの項目はチーズ製造の各工程でも重要となるため必要に応じて確認、記録する。参考として製造記録(製造日報)の例をp40に掲載した。

原料乳の殺菌について



乳酸菌の働く温度
まで冷却する。

微生物の繁殖しやすい15-45°Cを危険温度帯と呼ぶ。殺菌ではできるだけ速く危険温度帯を通過させる。チーズ製造では乳酸菌を働かせるために危険な温度で作業するので、殺菌は迅速にスターター以外の微生物混入を防ぐように行う。

作業工程

写真

⑤スターターの添加 (微生物による発酵開始)

使用する乳酸菌は *Lactobacillus helveticus* と *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* を 2:1 の割合で混合して利用し、原料乳に対して 1% のバルクスターターを添加する。

→乳酸菌スターターの調製 (p39) 参照

培養プロピオン酸菌 PF-2 を 0.05~0.1% 添加。

市販乾燥スターター(乳酸菌、プロピオン酸菌)を使用する場合は各メーカーの使用目安に従う。



⑥レンネットの添加

場合により、レンネットによる凝乳を助けるため、塩化カルシウムを 0.01~0.02% の範囲で熱水に溶解して添加する。

レンネットは原料乳の pH が 6.3~6.4 になってから 0.002~0.005% 添加する。原料乳の pH やレンネット力価により凝固の進み具合が変わるため、添加してから 35~50 分後にカッティングができるよう添加量を調整する。



液体レンネット

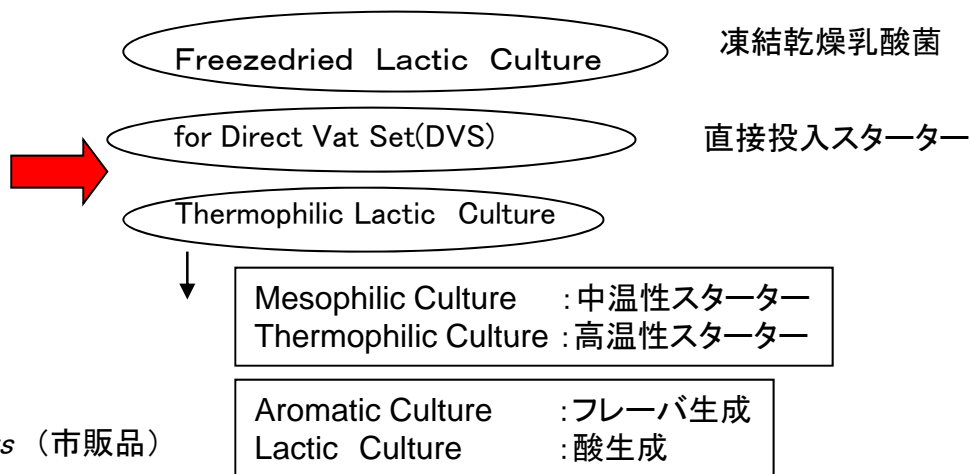


参考

乳酸菌について



Lactobacillus helveticus (市販品)



Streptococcus salivarius
subsp. *Thermophilus* (市販品)



市販のプロピオン酸菌
Propionibacterium freundenreichii
subsp. *shermani*

主に使用するレンネット

カーフ(子牛)レンネット(液体)

微生物レンネット(タブレット、顆粒)

主な市販品(乳酸菌、白カビ、レンネット)入手先

- (株)三幸商会 011-661-0171
- 協和ハイフーズ(株)乳製品部 03-5566-2787
- 小野化工(株) 0424-62-5622
- (株)野澤組カルチャー 03-3543-9225
- 三栄源エフ・エフ・アイ(株) 011-612-2241

作業工程

⑦静置

レンネット添加後は、素早く攪拌し、攪拌方向を逆転させながらレンネットを原料乳に均一に分散させる。分散後は攪拌による原料乳の流れを完全に止め、静置する。

写真



⑧カッティング

35～50分後に目標の硬さにまで凝乳したことを確認し、カードナイフ又はカッティングワイヤーで8～10mm角の立方体に切断し、米粒大のカードに整える。

カッティングの目安は原料乳が凝集し始めた時点(セッティング)から20～30分後。



⑨静置、攪拌

カッティング後、ホエイの分離排出を促進するため、5～10分間そのまま静置する。その後、カードがくっついたり、壊れたりしないように緩やかに30～40分間攪拌し、適度なカードを形成。



参考



カッティングワイヤー



円筒バットに使用。真上から差し込み、勢いをつけて45～90度回転させる。ゆっくり動かすとカードごと回転して、カードが切れない。



カッティングナイフ



角型バットに使用。最初に水平ワイヤーから挿入するのが一般的。水平面をカット後、垂直ワイヤーにて垂直面をカット。回数を多くすることでカードの大きさを調整できる。



カッティングハーブ



鍋型バットに使用。縦切りしかできないため、ゆっくり攪拌しながら、浮いたカードをさらに切断するよう、動かし、カードを均一にする。

作業工程

⑩加温(クッキング)

攪拌後のチーズバットの温度を徐々に上昇させ30～40分加温する。加温は2分に1℃の割合で50～55℃まで上昇させる。所定の温度に達してから、さらに30～60分攪拌する。

写真



⑪モールドィング (型詰め)

チーズカードを多孔、多穴の板でバット内に寄せ、バット内で圧搾して直方体のブロックに固める。カードはモールドの形に合わせて切り分け、カードを崩さないように角を押し込み型詰めする。



⑫圧搾、反転

型詰めしたチーズをチーズプレスで圧搾する。圧搾中はチーズが冷却によって内部と外部に温度差が生じないようにしないように保温する。チーズ内部に温度差が生じると乳酸菌の生育に差が生じ乳酸濃度が不均一になる。特に10kgぐらいの大型のチーズの場合、一次熟成で問題となるので注意が必要。



参考

スターターの添加から加温(クッキング)までの工程は使用するスターターの性質に合わせた温度で実施する必要がある。
 チーズに使用する乳酸菌には30℃付近でよく発育する中温性の乳酸菌と40℃付近でよく発育する高温性の乳酸菌がある。

プロピオン酸菌を利用したチーズを製造する場合には高温性の微生物(乳酸菌、プロピオン酸菌)を利用します。
 このためクッキングの作業は通常のチーズより高い温度まで上昇させて行います。



プロピオン酸菌と利用する乳酸菌の例

Lactobacillus helveticus (桿菌)
Streptococcus thermophilus (球菌)

乳業用乳酸菌の培養条件

	発育温度			接種量 %	培養 温度 ℃	時間 hr
	最低 ℃	最適 ℃	最高 ℃			
<i>Lactococcus lactis</i>	8~10	28~32	40	1	22	14~18
<i>Lactococcus cremoris</i>	8~10	22~28	37~39	1	22	14~18
<i>Lactococcus diacetylactis</i>	8~10	28~32	37~39	2	22	16~18
<i>Leuconstoc cremoris</i>	4~10	20~25	37	2~5	22	20~24
<i>Lactobacillus casei</i>	10	30	40	2	30	16~20
<i>Streptococcus thermophilus</i>	20	37~43	52	1~2	37~43	6~8
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	22	37~45	52	1~2	37~43	6~8
<i>Lactobacillus helveticus</i>	20~22	37~43	52	1~2	42	6
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	20~22	37~43	45~48	2~5	37~42	14~16
<i>Bifidobacterium sp</i>	20	37~43	48	5~10	42	6

作業工程

写真

⑬デモールドティング（型外し）

ホエー排除のための静置後、成型された生チーズをモールドから取り出す。この時、生カードが割れると内部に空気の混入や微生物の汚染が発生しプロピオン酸菌のガス発生を阻害するので、注意して丁寧に行う。



⑭加塩

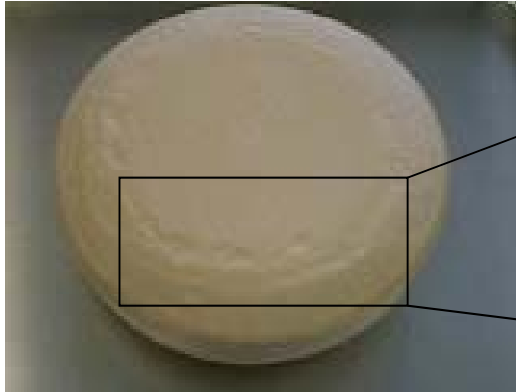
取り外したチーズを飽和食塩水（20%程度、pH5.0、冷蔵庫保管）に浸す。食塩の浸透具合は食塩水（ブライン液）の温度により変わるため、いつも一定となるよう心がける。浸漬時間はチーズの塩分濃度が0.8～1.0%となるよう、2kgの製品で5～8時間行う。



⑮乾燥

ブライン液から取り出し、10～15℃の庫内で1～2日乾燥させる。

参考



チーズ表面にできる凸凹
表面が均一に調製されていないと
カビの発生などの問題が生じる



型外しの際、
モールドのネットやカードを包んだ寒冷紗
などがカードにくい込むことがあり、
これがカードのカードの脱落、
チーズ表面の凹凸の原因となる



カードを型から外す場合
ネットや寒冷紗の上から金属へらなどで
カードが脱落しないように表面を削り、擦り
ながらゆっくりネット等を外していくと
カードの脱落がなく、チーズ表面の
凹凸が解消される。

作業工程

写真

⑩一次熟成（高い温度の熟成）

20～25℃、湿度80～85%の熟成庫内で10～14日間熟成させ、プロピオン酸菌が乳酸を炭酸ガス、有機酸、フレーバーへと変換させます。2kgのチーズで2週間程度でチーズの膨張が外側から確認できます。



⑪二次熟成（低い温度の熟成）

一次熟成後、7～10℃、湿度80～85%程度の熟成庫内で2次熟成を行い、プロピオン酸菌の特徴的なナッツのようなフレーバーを形成させる。熟成が進み、適度な組織とコク、うまみ味が出るまで4～12ヶ月間保管する。



⑫包装

必要に応じて切断小分けして、ガスの透過しないバリア性の高いフィルムで包装後冷蔵保管する。



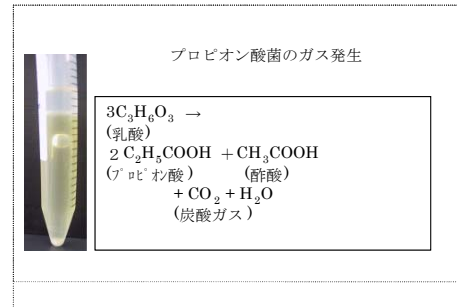
⑬製品検査

出荷前の製品は外観や風味が良い状態であることを確認し、箱詰めする。定期的に有害菌などの微生物検査を行う。



参考

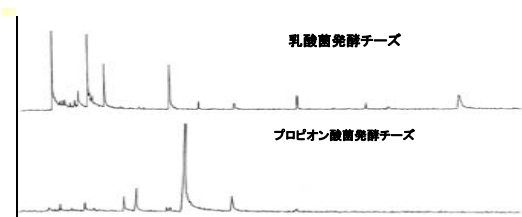
チーズ内部の乳酸を分解して
炭酸ガスを発生チーズアイを形成する。



プロピオン酸菌を使用することによって
ナッツ様の特徴的なフレーバーが付与
される。

フレーバーの違い

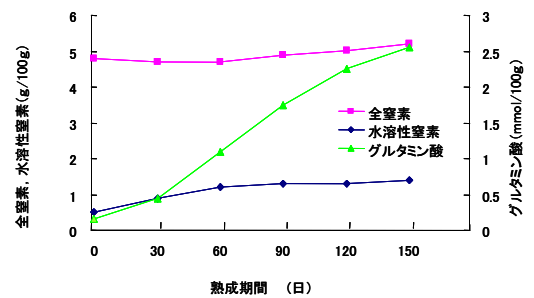
熟成6ヶ月目のチーズフレーバーを比較



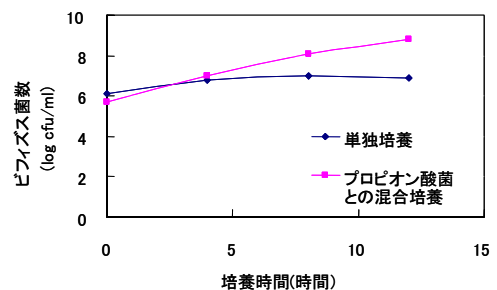
プロピオン酸発酵チーズは乳酸菌のみで造られる半硬質
チーズと全く異なるフレーバーパターンを示した。
ナッツ様の特徴的な香りをもつチーズとなった。

プロピオン酸菌を主体とする熟成はゆっくり
と進みタンパク質はアミノ酸へ分解されます。

熟成中のタンパク質分解



プロピオン酸菌PF-2株は
ビフィズス菌を増殖させる。



ビフィズス菌増殖性

フロピオン酸菌 スターター培養マニュアル

作業工程

写真

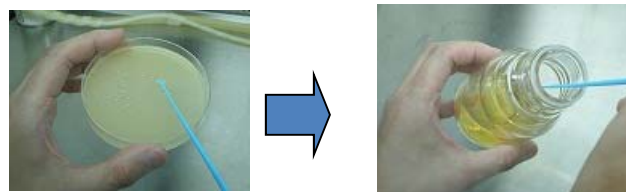
①菌株の準備

食品加工研究センターから提供されるPF-2株はGYP寒天培地にて生育状態で提供される。
(要冷蔵保管)



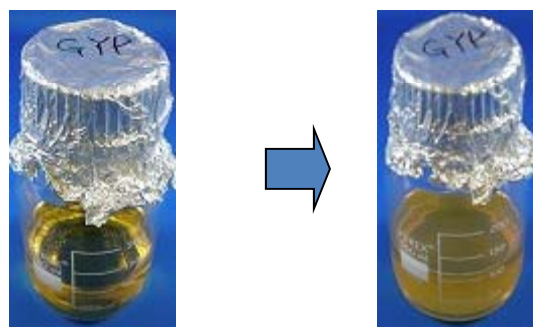
②前培養準備 (マザースターター用)

フロピオン酸菌は脱脂粉乳培地でも培養可能であるが、冷凍、冷蔵で保管された菌株の生育は遅延する。
このため下記に示す組成のGYP液体培地で前培養する。
培地各成分を蒸留水100mlに加えて溶解する。
オートクレーブにて121°C、15min.滅菌を行う。
滅菌後、常温にて放冷する。



③菌株接種

GYP寒天培地から生育したPF-2株を1白金耳削りとり、GYP液体培地に無菌的に接種する。
接種後、よく振って溶解混合する。
35°Cにて培養する。培養後18~24時間で $10^7 \sim 10^8$ cfu/mlに達する。
培養後、液体培地は濁りを生じる。



培養前

培養後

GYP液体培地組成 (100ml)

ブドウ糖	1.0g
酵母エキス	1.0g
ペプトン	0.5g
肉エキス	0.2g
酢酸ナトリウム	0.2g
salts solution*	0.5ml
Tween80溶液** (50mg/ml)	1.0ml

* salts solutionの調製

下記の無機塩を加えて100mlにする。

MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.0g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.2g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.2g

** Tween80溶液の調製

Tween80 5gを100mlに希釈する。

④脱脂乳培地の準備（バルクスターター用）

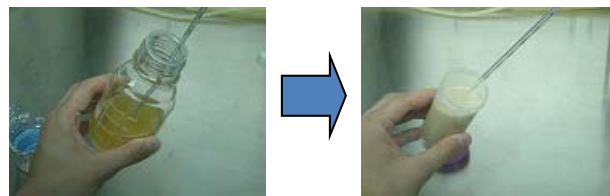
10%脱脂粉乳培地造るを調整する。
調整量は使用する原料乳にあわせる。
（原料乳に対して0.05～0.1%添加）

脱脂粉乳と蒸留水を1:9で混合、よく攪拌溶解する。
オートクレーブにて121℃、15min.滅菌を行う。
滅菌後、常温にて放冷する。



⑤菌株接種

GYP液体培地から生育したPF-2株を0.1%量ピペット
でとり、脱脂乳培地に無菌的に接種する。
接種後、よく振って溶解混合する。
35℃にて培養する。培養後18時間で脱脂乳培地は
凝固し、バルクスターターとして製造に利用可能な
プロピオン酸菌が調製される。



⑥菌株の保管

製造に使用するバルクスターターは使用時に都度調製する。
余剰のバルクスターターは、冷蔵保管（5℃が望ましい）
で1週間程度保存でき、これをマザースターターとして利用できる。

スターターの継体培養は乳酸菌スターターの培養（p39）を参照する。

参考

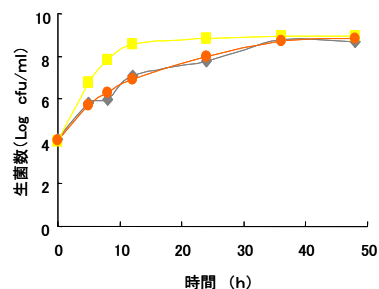
菌株を集菌保存する必要がある場合は③のGYP液体培地
を用いて培養し遠心分離して集菌する。（p39参照）

菌数を測定する必要がある場合はGYP寒天培地に塗抹し
形成したコロニーをカウントするか、分光光度計、プレート
リーダーを用いて菌液の濁度を測定する。

プロピオン酸菌は脱脂乳培地で生育しますが炭素源として乳酸を使用する速やかに生育します。
乳酸培地、ホエイ培地などが利用できません。



プレートリーダー



プロピオン酸菌の増殖

- ◆ グルコース
- ラクトース
- 乳酸

独自スターター酵母利用

酵母を併用したカマンベールチーズ

酵母を併用したカマンベールチーズの製造

1. はじめに

ナチュラルチーズ製造に使用する微生物は大きく乳酸菌、カビ、その他に分けることができ、その他の微生物には酵母、リネンス菌、ブドウ球菌、プロピオン酸菌があげられます。

カマンベールチーズに使用されるその他の微生物は主に酵母で、国内での使用例も少なく、これをアピールポイントとしているチーズは見当たりません。

このため、チーズ製造における酵母スターターの影響はあまり評価されておらず、酵母を併用する効果は広く普及しているとはいえないのが現状です。

ここでは、国立大学法人 帯広畜産大学の保有する酵母 *Galactomyces geotrichum* 13-13 株をカマンベールチーズの製造に用いる場合の製造方法とその効果について紹介します。

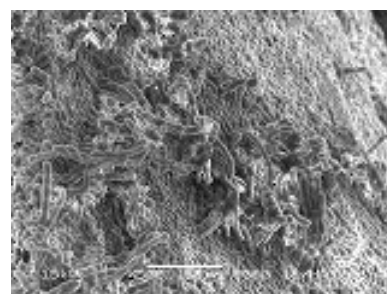
2. 使用する酵母

Galactomyces geotrichum 13-13 (GEO 13-13)

分類	酵母
細胞形状	角型楕円形, 長楕円形
細胞の大きさ	7~10×6~9 μ m
偽菌糸の形成	長角形細胞から連鎖した角形細胞が分岐
コロニーの形状	ラフ
コロニーの色	灰色
糖類発酵性	
Glucose	—
Galactose	—
Lactose	—
Maltose	—
Raffinose	—
Sucrose	—
糖類資化性	
Glucose	+
Galactose	+
Inulin	—
Lactose	—
Maltose	—
Raffinose	—
Sucrose	—
硝酸塩資化性	
	—
至適生育温度	
37°C生育性	弱い
その他	
菌種の同定方法	形態的・生理的性質とITS領域のDNA塩基配列解析
特許の有無	あり 出願番号2006-143938 菌株寄託番号NITE --233 出願人:財団法人 十勝圏振興機構



PDA寒天培地25°C4日間



× 500



× 2000

電子顕微鏡(SEM)写真

3. 酵母を併用する効果

①白カビの生育制御(抑制)

ここで紹介する方法で製造した場合、チーズ表面及びチーズ中の白カビの生育を抑制します。
GEO13-13 の添加量を調整することで、**熟成中の白カビの生育を適度に遅らせることが可能**です。

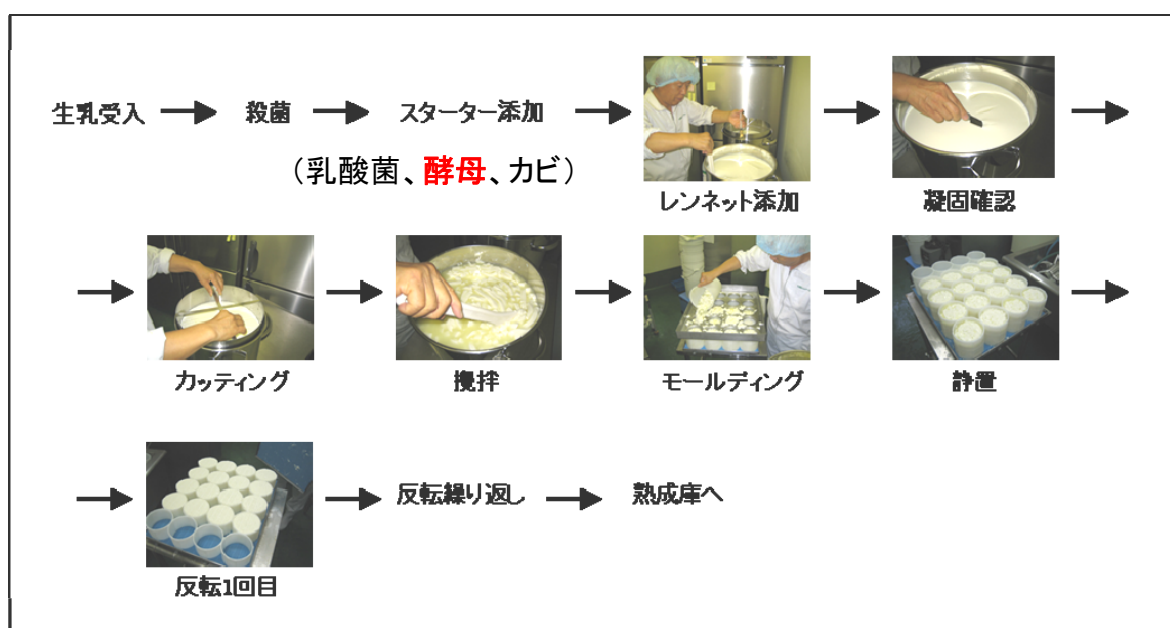
②熟成の緩慢化

白カビによる熟成を緩慢にすることで、**美味しく食せる賞味期間が延長**されます。

③マイルドな風味とコクの付与

白カビの抑制とGEO13-13 の働きで**風味を穏やかにし、コク味が増します**。

4. 製造工程の概要



5. 製造にあたっての注意事項

①酵母を使用すると、**製造環境が酵母に汚染されます**。

GEO13-13 は有用酵母ですが、使用すると製造環境に定着し、他のチーズ製造に影響する可能性があります。一度、定着した菌を製造環境から除去することはかなりの費用と労力を要しますので、試作する際は商品製造とは隔離された環境での使用をお勧めします。また、商品化する場合は、その環境で製造される全てのチーズに使用の方が、風味ムラの危険性を低くします。

②白カビを**表面噴霧する場合は違った効果**になります。

今回、紹介する製造方法は白カビをスターターとして原料乳に添加混合する方法です。カマンベールチーズの製造方法には白カビを出来上がったチーズに表面噴霧する方法もありますが、その場合、カビを抑制することはできません。逆に熟成を促進し、美味しく食せる賞味期間が短縮されます。(熟成期間の短縮により商品の回転を速めます。)

③**GEO13-13 スターターの入手**

GEO13-13 は国立大学法人 帯広畜産大学の保有菌株です。親株は帯広畜産大学から有料で提供可能ですが、バルクスターターでの提供は現在のところ行っておりません。入手後、自社培養をしていただく必要があります。

酵母併用カマンベールチーズ製造マニュアル

作業工程

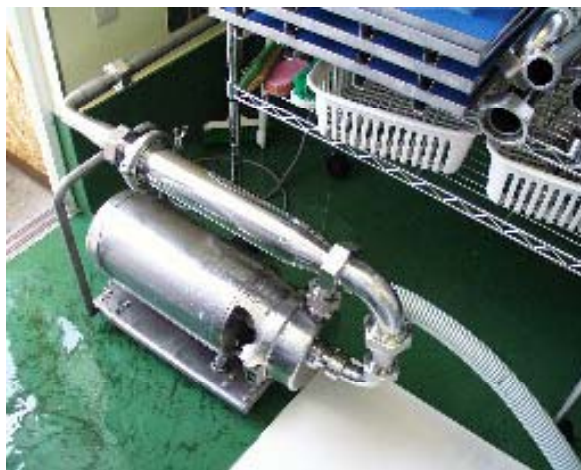
写真

①原料乳の検査と計量

新鮮な牛乳を使用。
ロット毎に風味等、良質な牛乳か確認。

②濾過

異物の除去。ストレーナー又は濾過布を使用。機器は必ず分解して洗浄、殺菌。
場合によっては、クリームを一部除き、成分の標準化を行う。



③殺菌

病原菌を死滅させ、安全な製品をつくるために必要不可欠な作業。汚染菌を減らし、後で添加する乳酸菌の増殖を促す。
バッチ式の場合は63°C30分間のLTLT法、連続式の場合は72°C15秒間のHTST法。



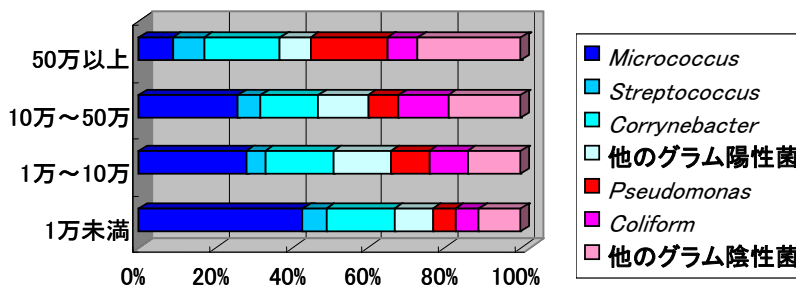
④冷却

耐熱性菌等の残存している菌が増殖しないように、次の工程への移行を迅速に行う。発酵に適した温度になるように管理する。
殺菌終了後、冷水で間接的に30~34°Cまで冷却。

参考

チーズ製造に利用する原料乳には良質なものが求められます。原料乳の細菌数が多いとグラム陰性菌の割合が増加します。(右図の赤いグループ) グラム陰性菌の中にはシュードモナスや大腸菌群などチーズ製造に悪影響を与える高い酵素活性の細菌が存在するため注意が必要です。

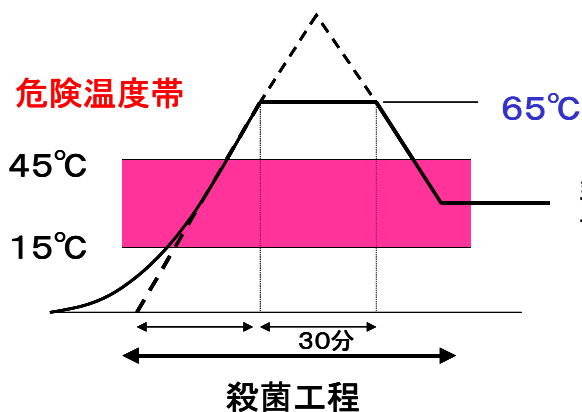
低温貯蔵生乳の細菌汚染分布



原料乳の検査と計量

原料乳の検査項目は多数あるが、最低限、乳温とpHまたは酸度のチェックをおこなう。これらの項目はチーズ製造の各工程でも重要となるため必要に応じて確認、記録する。参考として製造記録(製造日報)の例をp40に掲載した。

原料乳の殺菌について



乳酸菌の働く温度
まで冷却する。

微生物の繁殖しやすい15-45°Cを危険温度帯と呼ぶ。殺菌ではできるだけ速く危険温度帯を通過させる。チーズ製造では乳酸菌を働かせるために危険な温度で作業するので、殺菌は迅速にスターター以外の微生物混入を防ぐように行う。

作業工程

写真

⑤スターターの添加 (微生物による発酵開始)

市販乾燥スターターの場合は使用目安に従う。
白カビスターターを0.2～1.0unit/100L添加する。
GEO13-13を $10^5 \sim 10^7$ cfu/100L添加。

乳酸菌



白カビ



GEO13-13



⑥レンネットの添加

場合により、レンネットによる凝乳を助けるため、塩化カルシウムを0.01～0.02%の範囲で熱水に溶解して添加する。
レンネットは原料乳のpHが6.3～6.4になってから0.002～0.005%添加する。原料乳のpHやレンネット力価により凝固の進み具合が変わるため、添加してから35～50分後にカッティングができるよう添加量を調整する。

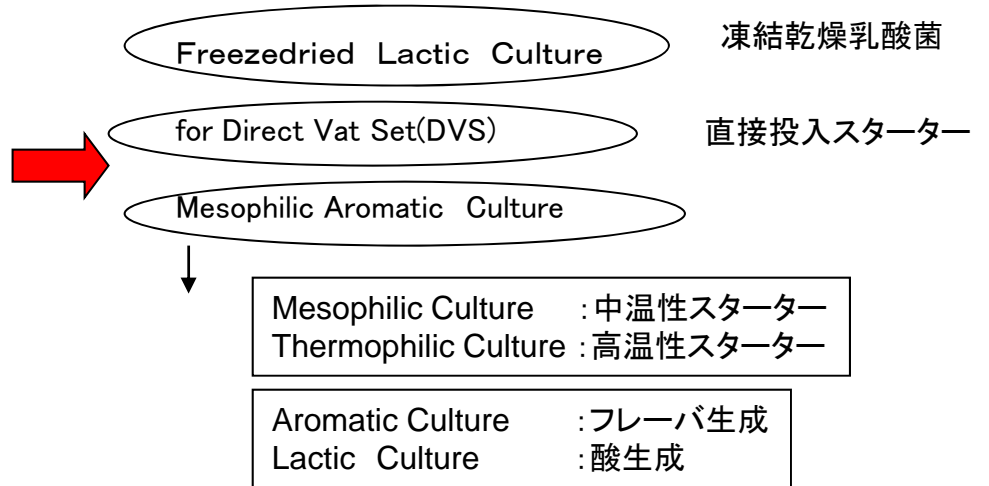


液体レンネット



参考

乳酸菌について



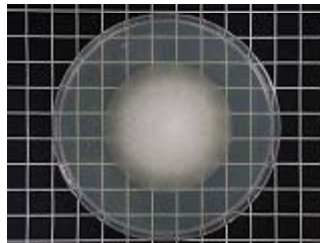
主に使用する白カビ

Penicillium candidum
Penicillium caseicolumn



主に使用する白カビ様酵母

Galactomyces geotrichum
(*Geotrichum candidum*)



主に使用するレンネット

カーフ(子牛)レンネット(液体)
微生物レンネット(タブレット、顆粒)

主な市販品(乳酸菌、白カビ、レンネット)入手先

- (株)三幸商会 011-661-0171
- 協和ハイフーズ(株)乳製品部 03-5566-2787
- 小野化工(株) 0424-62-5622
- (株)野澤組カルチャー 03-3543-9225
- 三栄源エフ・エフ・アイ(株) 011-612-2241

作業工程

写真

⑦静置

レンネット添加後は、素早く攪拌し、攪拌方向を逆転させながらレンネットを原料乳に均一に分散させる。分散後は攪拌による原料乳の流れを完全に止め、静置する。



⑧カッティング

35～50分後に目標の硬さにまで凝乳したことを確認し、カードナイフ又はカッティングワイヤーで1.5～2.0cm角の立方体に切断する。カッティングの目安は原料乳が凝集し始めた時点(セッティング)から15～20分後。



⑨静置、攪拌

カッティング後、ホエーの分離排出を促進するため、10～20分間そのまま静置する。その後、カードがくっついたり、壊れたりしないように緩やかに30分間攪拌し、適度なカードを形成。

⑩ホエー排除

攪拌後のカードがモールドディングに適した硬さになったら、余分なホエーを原料乳の40～50%程度排除する。



参考



カッティングワイヤー



円筒バットに使用。真上から差し込み、勢いをつけて45～90度回転させる。ゆっくり動かすとカードごと回転して、カードが切れない。



カッティングナイフ



角型バットに使用。最初に水平ワイヤーから挿入するのが一般的。水平面をカット後、垂直ワイヤーにて垂直面をカット。回数を多くすることでカードの大きさを調整できる。



カッティングハーブ



銅型バットに使用。縦切りしかできないため、ゆっくり攪拌しながら、浮いたカードをさらに切断するよう、動かし、カードを均一にする。

作業工程

写真

⑪ モールドディング（型詰め）

ホエーごとチーズカードをすくいとり、生チーズの厚さが同じになるようにモールド（型枠）にカードを充填する。厚さが異なると熟成がばらつく原因となる。充填は迅速に行わないと、ホエイが時間経過とともに排除され均等に成型されないので注意。1個の生チーズ全体を均一に熟成させるには出来上がりのチーズ高さが100gの製品で25～30mmとなるようなモールドを使用する。



⑫ 反転、ホエイ排除

カマンベールチーズの場合、プレスせずに自重でホエーを排除する。室内の温度、湿度によりホエイ排除の速度が変わるため、一定条件で3～4時間ごとに2～3回反転させる。最終的に16～20時間静置する。



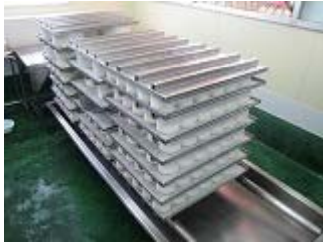
⑬ デモールドディング（型外し）

ホエイ排除のための静置後、成型された生チーズをモールドから取り出す。この時、生チーズが割れると熟成中にカビ、酵母の集落が中に侵入するので、注意して丁寧に行う。



参考

カマンベールチーズの反転



次へ

作業工程

写真

⑭加塩

取り外したチーズを飽和食塩水(20%程度、pH5.0、冷蔵庫保管)に浸す。食塩の浸透具合は食塩水(ブライン液)の温度により変わるため、いつも一定となるよう心がける。浸漬時間はチーズの塩分濃度が1.4~1.6%となるよう、100gの製品で10~20分間行う。



⑮乾燥

ブライン液から取り出し、ステンレス製のラックに並べ、15~18℃、湿度70~80%の室内で塩水を切り、一晩乾燥させる。



⑯一次熟成

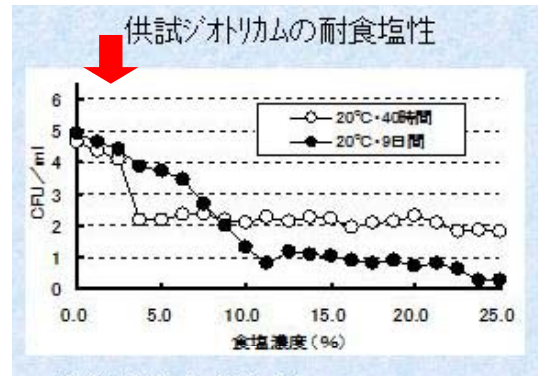
12~14℃、湿度95~98%の熟成庫内で10~14日間熟成させ、酵母とカビの生育を促す。酵母は熟成3日目頃から表面に黄色い酵母斑として確認され、その後毛足の長い白い被膜でチーズを覆う。白カビは熟成7日目頃から目視で毛足の長い集落として発生が確認される。



参考

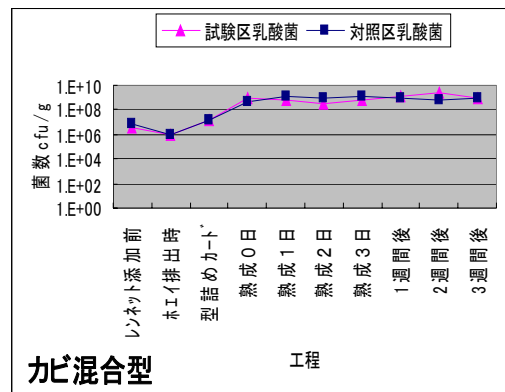
GEO13-13は塩分2.5%までは生育良好

カマンベールチーズは通常、塩分1.4～1.6%であり、GEO13-13は生育に食塩の影響を受けない。



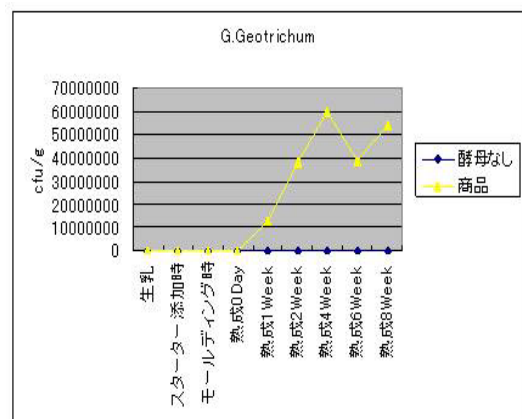
GEO13-13は乳酸菌には影響しない

GEO13-13を添加しても、乳酸菌の生育を阻害することはない。
また、余分な残存乳糖を速やかに消費してくれる効果も期待できる。



GEO13-13はチーズ中で増殖する

GEO13-13はセミハードタイプのチーズ中では酸素不足により増殖できないが、カマンベールタイプのチーズ中では、内部でも十分に増殖する。



作業工程

写真

⑰包装

1次熟成が終了したチーズは、一定の通気性と防水性を持つ2次熟成に適した包材で包む。手作業となるので、手袋を着用し衛生的取扱いをすることが重要。

⑱二次熟成

包装後、8～10℃、湿度90%程度の熟成庫内で2次熟成を行い、酵母と白カビの産生する酵素により内部まで熟成が進み、適度な組織とコクのある穏やかな風味が出るまで2～3週間保管する。

⑲冷蔵

包装後、5～7週間で完熟するため、組織の保形性、アンモニア臭などの風味を考慮して賞味期間を設定し、通常2～3週間の2次熟成後、冷蔵保管する。
場合によっては、熟成を止め、保存性を向上するために含気殺菌を行い、冷蔵保管する。

⑳製品検査

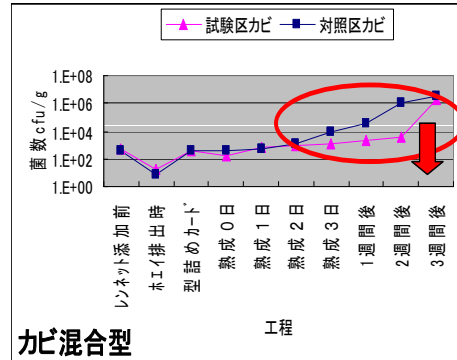
出荷前の製品は外観や風味が良い状態であることを確認し、箱詰めする。
定期的に有害菌などの微生物検査を行う。



参考

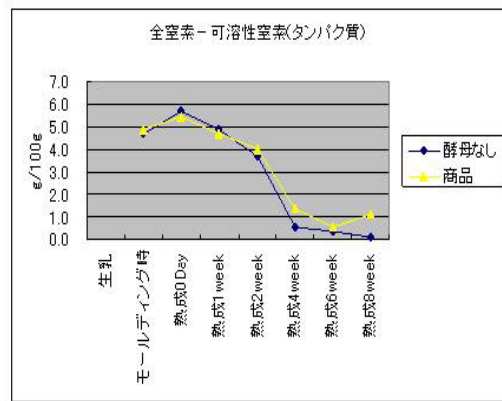
GEO13-13は白カビの生育を抑制する

GEO13-13の添加により、内部に存在するカビと競合して生育し、カビの生育を抑制する。これはカビよりも増殖速度が速いためと推定される。



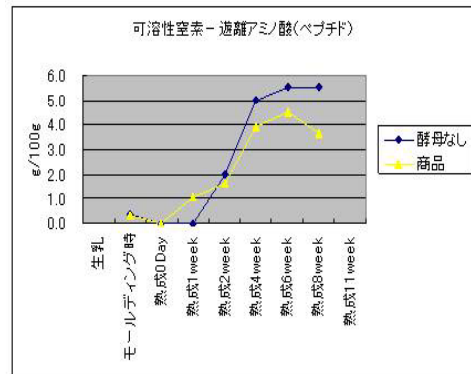
GEO13-13はタンパク分解を抑制する

白カビの抑制により、白カビによるタンパク分解も間接的に抑制される。GEO13-13もタンパクを分解するが、白カビの抑制によるタンパク残存の方が上回るためと推定される。



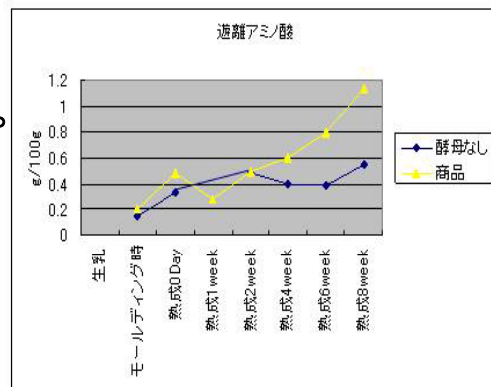
GEO13-13はタンパク分解を抑制しつつも、苦味の原因となる分解物の量を減少する。

GEO13-13はタンパク分解産物であるペプチドを減少させる。これは、ペプチドをGEO13-13が分解しているものと推定される。ペプチドはうま味やコク味にも関与するが、苦味を生じることが多く、GEO13-13によるペプチドの減少は苦味の低減により相対的にうま味やコク味を増すように感じる可能性がある。



GEO13-13はタンパク分解を抑制しつつも、うま味のもととなるアミノ酸の量を増加する。

GEO13-13はタンパク分解で生じたペプチドを優先的に分解してアミノ酸を生成していると推定される。アミノ酸の増加によりうま味やコク味を増すことが推定される。



GE013-13 スターター準備マニュアル

作業工程

写真

①脱脂粉乳培地の準備

10%脱脂粉乳培地300mlをつくる。
脱脂粉乳30gを500ml容三角フラスコに量り入れ、
蒸留水270mlを加えてよく攪拌溶解する。
オートクレーブにて121°C、15min.滅菌を行う。
滅菌後、常温にて放冷する。



②GE0 13-13株の準備

帯広畜産大学から提供されるGE013-13株は
スラント(PDA寒天)培地にて生育状態で提供
される。(要冷蔵保管)



③菌株接種

スラント培地から生育したGE013-13株を1白金耳
削りとり、脱脂粉乳培地に無菌的に接種する。
接種後、よく振って溶解混合する。
25°Cにて培養し、1日2回以上、よく振る。
振る回数にもよるが、4~5日で 10^6 cfu/mlに達する。

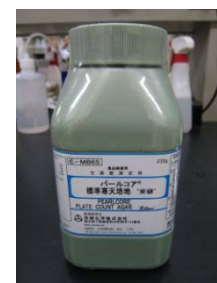


④菌数測定、汚染の有無確認

培養液を1mlとり、滅菌希釈水9mlに懸濁(10^1 希釈液)する。この操作を繰り返し、 $10^4 \sim 10^6$ の段階希釈液を調製する。段階希釈液1mlをシャーレにとり、滅菌済み標準寒天(SPC)培地を流し込み、25°Cで3日間培養する。菌数は1日目に仮計測し、2日目を本計測とする。汚染菌は3日目にその有無を確認する。残りの培養液はこの間、冷蔵庫(5°Cが望ましい)で保管する。



SPC培地(栄研)



SPC培地(栄研)

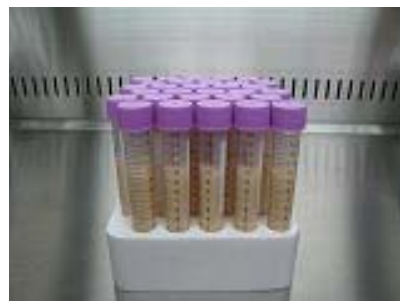
⑤ 添加菌数の計算

菌数確認にて把握した結果から、仕込み原料乳に対しての必要スターター量を計算する。

例) GEO13-13 を 10^7 cfu/100L原料乳 添加する場合。
GEO13-13スターターの菌数が 2.0×10^6 cfu/ml
であれば、 10^7 cfu添加するにはスターター量として
 $X(\text{ml}) = (10 \times 10^6)(\text{cfu/ml}) / (2 \times 10^6)(\text{cfu}) = 5(\text{ml})$

⑥ スターターの小分けと保管

計算により算出された1バッチ毎のスターター量を滅菌済スポイトや分注器を用いて滅菌済チューブに小分けし、冷蔵保管(5°Cが望ましい)する。
5°C保管の場合は3か月は保管可能。
冷凍保管は現状では不可。



参考

冷蔵4°CにおけるGEO13-13株の菌数

	製造時	検査時	生残率
6ヶ月保存	1.9×10^6	1.9×10^6	100%
12ヶ月保存	5.8×10^6	8.4×10^5	14.5%

冷凍-20°CにおけるGEO13-13株の生存率

	2ヶ月後	4ヶ月後	6ヶ月後	8ヶ月後	10ヶ月後
2/15製造	3.7	2.0	1.4	2.1	1.2
2/19製造	1.4	0.5	0.4	0.6	0.4

試作試験における効果の確認

確認項目

①乳酸菌・フロピオン酸菌の菌数

BCPカウントプレート寒天培地またはGYP白垂寒天培地にて常法により測定する。
10⁵~10⁸段階希釈液での測定が必要となる。

②白カビ、GEO13-13株の菌数

ポテトデキストロース(PDA)寒天培地にて常法により測定する。
GEO13-13株は培養開始2日以内に生育。白カビは7日程度で生育するので、時間差を利用してコロニーの形態の違いを確認しながら測定する。白カビで10²~10⁵、GEO13-13株で10⁴~10⁶段階希釈液での測定が必要となる。

③チーズ中の塩分の確認

チーズ1gに蒸留水4mlを加え(5倍希釈)、よく磨砕する。
磨砕液をろ紙でろ過し、ろ液を簡易塩分計で測定する。

④チーズ中のタンパク質分析

チーズ0.2~0.5gを用い、マクロケルダール法にて分析する。
自動ケルダール蒸留滴定装置を用いる。

⑤可溶性窒素の分析

サンプルバッグにチーズ10gをとり、蒸留水90mlを加えて密閉し、60℃の恒温水槽中で30min.溶解する。溶解液をろ紙でろ過し、ろ液5mlを用いて、マクロケルダール法にて分析する。
自動ケルダール蒸留滴定装置を用いる。

⑥遊離アミノ酸の分析

終濃度70%エタノールにて遊離アミノ酸を抽出し、抽出液をフェニルチオカルバミル(PTC)誘導体化後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法にて分析する。
高速液体クロマトグラフ(HPLC)装置を用いる。

⑦微生物(乳酸菌、酵母、カビ)の顕微鏡観察

SPC培地、BCP培地、PDA培地等による菌数測定で得たコロニーを白金耳で釣菌し、スライドガラス上の少量の水に懸濁して、カバーガラスを乗せ、位相差顕微鏡を用いて200~1000倍で観察する。

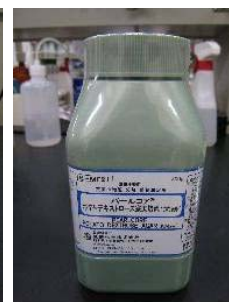
⑧チーズ表面の観察

デジタル顕微鏡を用いて、0~50倍で観察する。場合により100~1000倍での観察も可能。フリーアングルシステムを用い、あらゆる角度からの観察を行う。

機器写真



BCP培地(栄研)



PDA培地(栄研)



デジタル塩分計
(ATAGO)



自動ケルダール
蒸留滴定装置
ケルテックオート
2300
(FOSS)



高速液体
クロマトグラフ
LC-2010CHT
(島津製作所)



位相差顕微鏡
ECRIPSE 80シリーズ
デジタルカメラセット
(Nikon)



デジタル
マイクروسコープ
100F
(KEYENCE)

乳酸菌スターターの調整

乳酸菌等を自ら培養して使用する場合にはスターターをシードカルチャーからマザースターター、バルクスターターと順次培養して使用します。



シードカルチャー



マザースターター



バルクスターター

1) シードカルチャー

シードカルチャーは種となる微生物です。培養した菌を遠心濃縮し、凍結乾燥菌粉末するのが一般的で、必要に応じて造粒されます。市販品は粉末、液状、凍結で供給され、利用方法はマニュアルに従い行います。



遠心分離機



真空凍結乾燥機
(KYOWAC RLE II -204)



押出造粒機

2) マザースターター

マザースターターは乳製品製造の基本となるものです。雑菌等の汚染がないように、無菌的な方法で調製する必要があります。

- ① 器具の滅菌 使用する試験管、三角フラスコ、ピペット、薬さじ等は洗浄し、必要に応じて160℃、1時間の乾熱滅菌します。器具類は滅菌済のディスポタイプのものも使用できます。
- ② 培地の滅菌 試験管または三角フラスコに10%脱脂乳を容器の半分量程度入れ、綿栓を硫酸紙 またはアルミホイルで包んで121℃、10～15分の高圧蒸気滅菌、冷却します。
- ③ 所定の培養温度まで冷却されたことを確認し、試験管等の口を火炎で殺菌し、雑菌による汚染がないようにシードカルチャーを接種します。
- ④ 所定の温度、時間で培養し、培養後は冷蔵する。(10℃以下できれば5℃以下)

3) バルクスターター

バルクスターターは製造の際、原料乳に直接加えるスターターです。バルクスターターの調製は基本的にマザースターターの調製と同様に行います。バルクスターターは牛乳を褐変させないように90～95℃で30～60分間の殺菌を行いできるだけ速く培養温度まで冷却し、接種します。

製造記録の例

製造記録

製造日報		平成 年 月 日	日～月 日	Lot No.	kg		責任者
製品名		原料乳		kg		スターター:	g
担当者		pH	酸度	一般細菌数	レンネット:		g

項目	規定条件	確認	日付	時間	乳温	pH	酸度	大腸菌群	備考
搾乳				~ : ~					
貯乳	℃			~ : ~					バルクタンクの温度管理
殺菌	℃、min			~ : ~					
冷却	℃			~ : ~					
スターター添加	g(ml)			~ : ~					
発酵	pH			~ : ~					
レンネット添加	g(ml)			~ : ~					
ブリーズ				~ : ~					
カットイング				~ : ~					
マッサージ				~ : ~					
加温				~ : ~					
ホエー排除				~ : ~					ホエーの検査
モールドイング				~ : ~					
プレス				~ : ~					室温の管理
反転-1				~ : ~					室温の管理
反転-2				~ : ~					室温の管理
反転-3				~ : ~					室温の管理
ブライン	%			~ : ~					冷蔵庫の温度管理
熟成	日間			~ / ~					熟成庫の温度管理
包装				~ : ~					大腸菌・大腸菌群の検査

食味・食感等チェック項目、メモ(出庫状況等)

**独自スターター
プロピオン酸菌利用**

プロピオン酸菌を利用したヨーグルト

フロピオン酸菌利用ヨーグルト製造マニュアル

作業工程

写真

①原料乳の検査と計量

新鮮な牛乳を使用。
ロット毎に風味等、良質な牛乳か確認。

②濾過

異物の除去。ストレーナー又は濾過布を使用。機器は必ず分解して洗浄、殺菌。
場合によっては、クリームを一部除き、成分の標準化を行う。



③殺菌

病原菌を死滅させ、安全な製品をつくるために必要不可欠な作業。汚染菌を減らし、後で添加する乳酸菌の増殖を促す。
バッチ式の場合は85℃15分間加熱処理を行う。



耐熱性菌等の残存している菌が増殖しないように、次の工程への移行を迅速に行う。発酵に適した温度になるように管理する。殺菌終了後、冷水で間接的に40℃まで冷却。

作業工程

写真

⑤スターターの添加 (微生物による発酵開始)

プロピオン酸菌培養マニュアルに従って
バルクスターターを調整した場合
液体バルクスターターを0.5~2%添加。

凍結乾燥粉末スターターを利用する場合
0.01~0.1%添加する。

凍結乾燥粉末スターターを利用する場合
粉末がダマにならないように注意しながら少
量の牛乳に懸濁して使用する。
また、牛乳の温度が低い状態、もしくは温度
が高すぎる状態で乳酸菌を加えると発酵不
良になる場合があるので注意する。

造粒タイプ(2mm)の凍結乾燥スターターは
乳糖などを加えて溶解性を高めているが、
粉末タイプに比べ菌数が1/10程度に減少し
ている。

凍結乾燥スターターは保存状況によって発
酵の遅れが生じることがある。

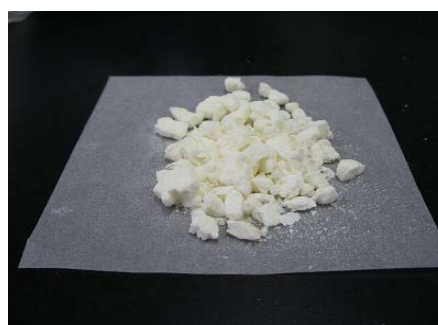
プロピオン酸菌は乳酸菌の様にヨーグルトフ
レーバーを作りません、このため、ヨーグルト
のフレーバーが必要な場合、乳酸菌との混
合培養が必要となります。

プロピオン酸菌の発酵温度は高温性の乳酸
菌と同じです。任意の乳酸菌との混合培養
が可能と考えられます。

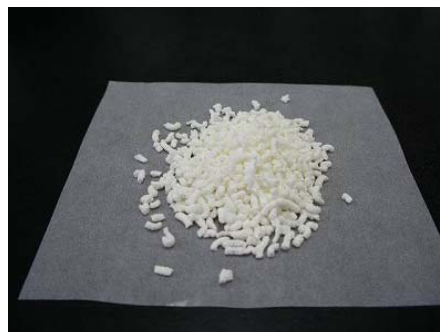
プロピオン酸菌は乳酸菌の作る乳酸を炭素
源として速やかに増殖するため、乳酸菌と混
合培養することで発酵時間が短縮されます。
(プロピオン酸菌培養マニュアル参照)



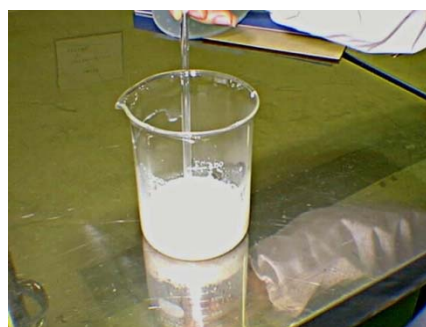
液体バルクスターター



凍結乾燥スターター
(粉末タイプ)



凍結乾燥スターター
(造粒タイプ)



作業工程

写真

⑥発酵

40～42℃で4～12時間培養する。



⑦pH確認、発酵停止

発酵が進んでくると、粘度が増加する。
pHが4.5前後になったところで冷却して
発酵を止める。



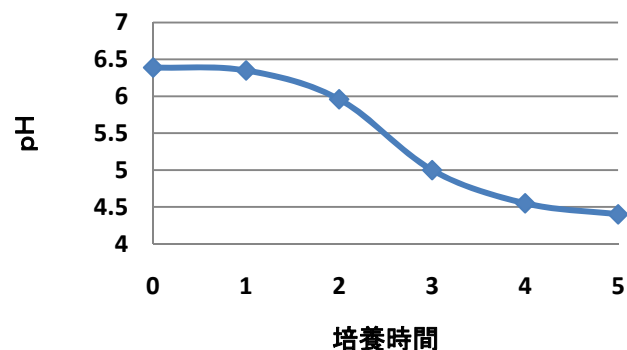
⑧充填

容器に定量充填、包装後冷蔵保管する。

⑨製品検査

出荷前の製品は外観や風味が良い状態であることを確認し、箱詰めする。
定期的に有害菌などの微生物検査を行う。

発酵乳のpH変化



フロピオン酸菌 スターター培養マニュアル

作業工程

写真

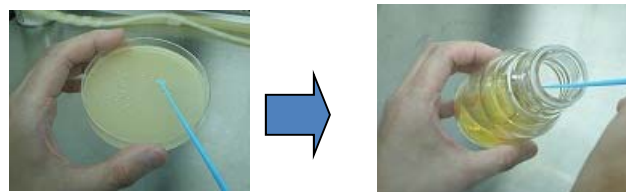
①菌株の準備

食品加工研究センターから提供されるPF-2株はGYP寒天培地にて生育状態や凍結乾燥状態で提供される。(要冷蔵保管)



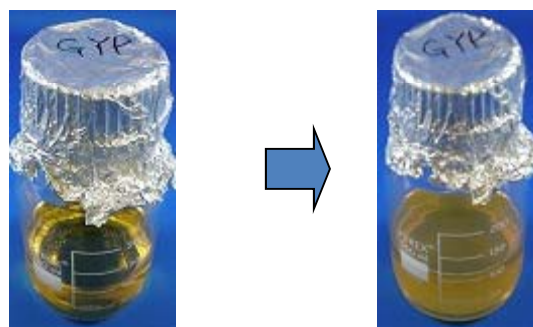
②前培養準備 (マザースターター用)

フロピオン酸菌は脱脂粉乳培地でも培養可能であるが、冷凍、冷蔵で保管された菌株の生育は遅延する。このため下記に示す組成のGYP液体培地で前培養する。培地各成分を蒸留水100mlに加えて溶解する。オートクレーブにて121°C、15min.滅菌を行う。滅菌後、常温にて放冷する。



③菌株接種

GYP寒天培地から生育したPF-2株を1白金耳削りとり、GYP液体培地に無菌的に接種する。接種後、よく振って溶解混合する。35°Cにて培養する。培養後18~24時間で $10^7 \sim 10^8$ cfu/mlに達する。培養後、液体培地は濁りを生じる。



培養前

培養後

GYP液体培地組成 (100ml)

ブドウ糖	1.0g
酵母エキス	1.0g
ペプトン	0.5g
肉エキス	0.2g
酢酸ナトリウム	0.2g
salts solution*	0.5ml
Tween80溶液** (50mg/ml)	1.0ml

* salts solutionの調製

下記の無機塩を加えて100mlにする。

MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.0g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.2g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.2g

** Tween80溶液の調製

Tween80 5gを100mlに希釈する。

④脱脂乳培地の準備（バルクスターター用）

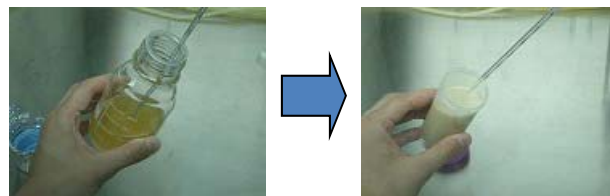
10%脱脂粉乳培地造るを調整する。
調整量は使用する原料乳にあわせる。
（原料乳に対して0.05～0.1%添加）

脱脂粉乳と蒸留水を1:9で混合、よく攪拌溶解する。
オートクレーブにて121℃、15min.滅菌を行う。
滅菌後、常温にて放冷する。



⑤菌株接種

GYP液体培地から生育したPF-2株を0.1%量ピペット
でとり、脱脂乳培地に無菌的に接種する。
接種後、よく振って溶解混合する。
35℃にて培養する。培養後18時間で脱脂乳培地は
凝固し、バルクスターターとして製造に利用可能な
プロピオン酸菌が調製される。



⑥菌株の保管

製造に使用するバルクスターターは使用時に都度調製する。
余剰のバルクスターターは、冷蔵保管（5℃が望ましい）
で1週間程度保存でき、これをマザースターターとして利用できる。

スターターの継体培養は乳酸菌スターターの培養（p39）を参照する。



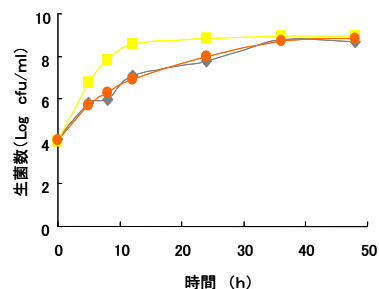
参考

菌株を集菌保存する必要がある場合は③のGYP液体培地
を用いて培養し遠心分離して集菌する。

菌数を測定する必要がある場合はGYP寒天培地に塗抹し
形成したコロニーをカウントするか、分光光度計、プレート
リーダーを用いて菌液の濁度を測定する。

プロピオン酸菌は脱脂乳培地で生育しますが炭素源として乳酸を使用する速やかに生育します。
乳酸培地、ホエイ培地などが利用できません。

プレートリーダー



プロピオン酸菌の増殖

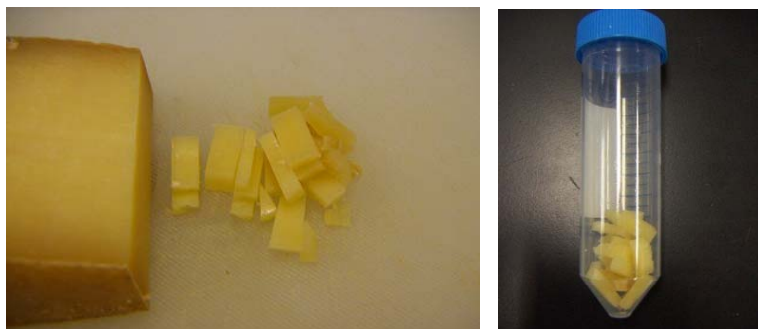
- ◆ グルコース
- ラクトース
- 乳酸

チーズのアミノ酸分析

チーズのアミノ酸分析

I. チーズからのアミノ酸抽出

①チーズをナイフで3mm角に細断し、5gを秤量して50ml遠心管に投入する。



②80%エタノール45mlを加え、50mlとする。

③ポリトロンホモジナイザーで10,000rpm.、1min.均質化する。



④そのまま、バランスをとり、遠心分離3,000rpm.、15min.。

⑤冷凍庫に1晩放置。

⑥シリンジを利用して上澄み液を0.2 μ m DISMICフィルターにかける。



⑦ろ液を試料液とする。(チーズの10倍抽出液となる。)

⑧試料液の残りは冷凍保管し、糖分析に使用する。

注1) 必要な試薬 ・エタノール

注2) 上記の方法は糖分析の前処理も兼ねることができる。

II. 専用溶離液の作成

- ①A液: アセトニトリル: 60mM酢酸ナトリウム緩衝液 (6:94) <最終pH5.60>
②B液: " : " (60:40) <最終pH6.95>

調製方法

- ・ 酢酸Na三水和物 (1mol=136.08g) 16.33gを蒸留水で2Lにメスアップ
- ・ A液は2Lビーカーにアセトニトリル90mlと酢酸Na水溶液1410mlを別々に加え50%酢酸にてpHを5.60に調整する。
- ・ B液は1Lビーカーにアセトニトリル600mlと酢酸Na水溶液400mlを別々に加え50%酢酸にてpHを6.95に調整する。
- ・ 調製した各溶離液を容器ごと超音波洗浄機に浸し、水流アスピレーターにて20分間、脱気する。

注1) 必要な試薬 ・アセトニトリル (HPLC用)

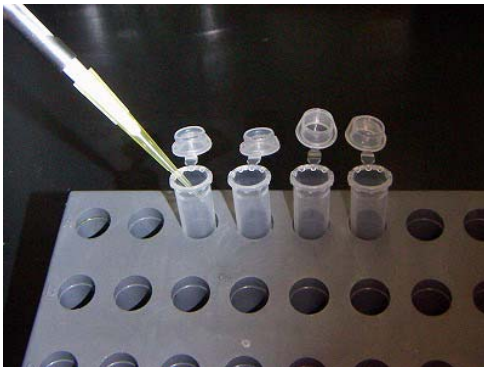
・酢酸Na三水和物

注2) PTCアミノ酸において、溶離液のpHはアミノ酸ピークの分離に大きく影響するので、シビアな調整が必要。

ピーク分離はpH及びHPLC流路長により変わるため、予備試験による条件確立が必要。

III. PTC誘導体化

- ①試料液およびアミノ酸混合標準液を必要量(注2)エッペンドルフチューブに採取。



- ②真空乾燥機で減圧乾燥する。(45℃)



- ③エタノール／精製水／トリエチルアミン (TEA) 混合溶液 (2:2:1) 20 μ l 加え、攪拌。
- ④減圧乾燥 (45 $^{\circ}$ C)
- ⑤エタノール／精製水／TEA／PITC 混合溶液 (7:1:1:1) 20 μ l 加え、攪拌。
- ⑥室温にて20分間反応させる。
- ⑦減圧乾燥 (45 $^{\circ}$ C)
- ⑧分析まで冷凍保存 (-20 $^{\circ}$ C)。一応3ヶ月使用可能であるが、できれば、用事作成。
- ⑨分析時に溶離液Aを1ml加え、溶解する。
- ⑩1mlシリンジを利用して0.2 μ m DISMICフィルターにかけ、HPLC用バイアルに移しHPLCに供する。



注1) 必要な試薬

- ・アミノ酸標準液 H型、B型、グルタミン、アスパラギン
- ・トリエチルアミン
- ・イソチオシアン酸フェニル
- ・エタノール

注2) アミノ酸混合標準液は2.5 μ mol/mlのものを各々10 μ lずつ加える。
 H型とB型はそのまま、Gln、Aspは調製したものを10 μ l、合計40 μ l。
 試料液は50 μ l。(このとき、標準アミノ酸に対し、試料液は5倍投入されている。)

IV. HPLC条件

- ①HPLC シマズ Prominence
- ②Column TOSO ODS-80Ts 25cm+15cm
- ③Col.Temp. 40°C
- ④Flow Rate 1.0ml/min.
- ⑤Eluate Asol. CH₃CN:60mMAceticBuffer=6:94
Bsol. CH₃CN:60mMAceticBuffer=60:40
- ⑥Detector UV254nm
- ⑦Gradient 0 - 7.5 - 25 - 50 - 50 - 70 - 70 - 90 min. 90min./cycle
0 - 10 - 29 - 62 - 100 - 100 - 0 - 0 %(Bsol.)
- ⑧Inj.vol. 100μl

注1)チーズ中のアミノ酸量は熟成初期は少ないため、標準液の5倍量投入。
注2)従って、PTC誘導体化5倍×注入量5倍=25倍投入のため、計算注意。

**平成20年度
地域イノベーション創出共同体形成事業
研究開発環境支援事業**

地域独自スターターを利用したチーズ製造マニュアル

**平成21年3月
(平成22年10月4日改訂)**

**〒001-0021 北海道札幌市北21条西12丁目
財団法人 北海道科学技術総合振興センター**

**〒069-0836 北海道江別市文京台緑町589-4
地方独立行政法人北海道立総合研究機構
産業技術研究本部食品加工研究センター
(旧名称) 北海道立食品加工研究センター**