

## 北海道の食品から分離した乳酸菌を用いたチーズ用 補助スターターの開発

八十川大輔, 高谷政宏<sup>1</sup>, 大坪雅史<sup>2</sup>, 住佐 太<sup>3</sup>, 中村 正<sup>4</sup>,  
吉田年成<sup>5</sup>, 北村 亨<sup>6</sup>, 小林美穂<sup>7</sup>

### Development of Adjunct Cheese Starter Culture of Lactic Acid Bacteria Isolated from Hokkaido Food Products

Daisuke Yasokawa, Masahiro Takaya<sup>1</sup>, Masashi Otsubo<sup>2</sup>, Futoshi Sumisa<sup>3</sup>, Tadashi Nakamura<sup>4</sup>,  
Toshinari Yoshida<sup>5</sup>, Toru Kitamura<sup>6</sup> and Miho Kobayashi<sup>7</sup>

Dairy is an important industry in Hokkaido, owing to the cold and temperate climate. With more than 100 artisanal cheesemakers, the annual production of natural cheese in Hokkaido is approximately 21,000 tons. To facilitate production of high-grade semi-hard type cheese, original lactic acid bacteria (LAB) selected from Hokkaido fermented food products were used for developing Hokkaido original adjunct cheese starter culture. Among 500 isolates of LAB, *Lactobacillus paracasei* OUT0010 and *Lactobacillus curvatus* 33-5 were selected and direct vat starters were prepared. These strains were used in true scale test production as adjunct starters. Qualitative analyses of the respective cheeses after a two-month maturation period revealed that the two types of cheese had higher levels of glutamate as well as certain flavor components than the control cheese. Furthermore, the addition of Hokkaido original adjunct starter LAB was effective in shortening the ripening period and characterizing the product as Hokkaido original cheese.

**KEY-WORDS** : Lactic acid bacteria, Cheese, Starter, Adjunct

**キーワード** : 乳酸菌, チーズ, スターター, 補助スターター

<sup>1</sup>公益財団法人 とかち財団, Tokachi Foundation

<sup>2</sup>公益財団法人 函館地域産業振興財団, Hakodate Resional Industry Promotion Organization

<sup>3</sup>公益財団法人 オホーツク財団, Okhotsk Foundation

<sup>4</sup>国立大学法人 帯広畜産大学, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

<sup>5</sup>ノースプレーンファーム株式会社, North Plain Farm

<sup>6</sup>雪印種苗株式会社, Snow Brand Seed Co., Ltd.

<sup>7</sup>国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門, Institute of Livestock and Grassland Science, National Agriculture and Food Research Organization

事業名 : 外部資金研究

課題名 : 国産スターターを用いたブランドチーズ製造技術の開発

北海道は国内有数の酪農地域であり、農業産出額における生乳の構成比は全国シェアの30%と高く（平成24年）、乳製品の付加価値向上による新たな需要喚起が強く求められている。また、北海道が策定した「北海道酪農・肉用牛生産近代化計画」では、「6次産業化や農工商の連携など、食クラスター活動の推進」や「牛乳・乳製品や畜産物の需要拡大」が推進方策として掲げられている。これらを達成するための具体例として道産ナチュラルチーズ製造の取組の促進や、牛乳乳製品の有用性の啓発が例示されており、北海道内のチーズ製造企業からも地域独自性を有する製品や、輸入品との差別化が可能な製品の開発に資する乳酸菌の開発が要望されている。

酪農家などがチーズ製造に取り組む際には、原料乳の生産地や乳牛の飼養方法などが製品差別化の要素となりうる。しかし、チーズ製造において乳酸発酵を行わせるチーズスターター（以下、メインスターター）や、チーズに特徴的な風味を与えるために添加する補助（アジャクト）スターターは輸入品が利用されており、安価な外国産ナチュラルチーズとの明確な差別化が困難な要因となっている。一方、チーズ製造には数ヶ月の熟成期間を要するため、熟成庫の空き容積により製造量が制限されることが大きな問題であり、熟成期間短縮技術の開発が求められている。チーズの熟成中には生乳由来のブラズミン<sup>1,2)</sup>、レンネットに含まれるペプシンおよびスターター乳酸菌やチーズ中に生残する乳酸菌由来のプロテアーゼ、ペプチダーゼ、リパーゼなどがタンパク分解や脂肪分解に働き、風味を形成するとされている<sup>3)</sup>。プロテアーゼ活性が高い乳酸菌を補助乳酸菌スターターとして活用し風味の向上を図る研究例もある<sup>4)</sup>。

そこで本研究では地場産食品等からチーズ熟成を促進する能力を有する乳酸菌を選抜し、「旨味増強、熟成促進」を特徴とする北海道産乳酸菌チーズスターターを開発することを目的とした。さらに本品を熟成促進のための補助スターターとして用いることで、物語性のある地域ブランドチーズの創出を目指すこととして北海道の発酵食品などから乳酸菌の分離選抜を行い、ナチュラルチーズの熟成促進に効果が期待できる乳酸菌株3株を選抜した<sup>5)</sup>。ここでは原料への添加量検討、乾燥スターター化およびチーズ熟成中の乳酸菌叢と風味成分の推移の検討結果について報告する。

## 実験方法

### 1. 使用乳酸菌

北海道内の5研究機関（当センター、とち財団、オ

ホーツク財団、函館地域産業振興財団および帯広畜産大学）で各研究機関50株以上の乳酸菌を、北海道内で製造された加工食品（主に発酵食品）から分離した。その際、製造過程において人為的に加えた乳酸菌であることが明らかでない菌種は除外した。その結果、当センターではナチュラルチーズ9点および漬物類7点から乳酸菌82株、とち財団では40食品から59株、オホーツク財団107株、函館地域産業振興財団は38種類の発酵食品から67株、帯広畜産大学194株の合計509株の乳酸菌を分離した。これら乳酸菌からゴーダタイプのセミハードチーズでの利用を前提に選抜された*L. paracasei* OUT0010と*L. curvatus* 33-5の2株<sup>6)</sup>を以下の試験に用いた。

乳酸菌の培養および計数には、MRS培地（Becton Dickinson & Company (BD) 社、Merck社など）およびBCP加プレートカウントアガール（日水製薬（株））を用いた。

チーズ製造用メインスターターには市販のCHN-11 (Chr. Hansen) を用いた。

### 2. 市販スターター乳酸菌と分離乳酸菌の共培養

供試乳酸菌懸濁液をMRS培地に1% (v/v) 濃度で接種し、定常期（一晚程度）まで培養した。培養液の590nmによる濁度を測定し、対応する生菌数をプレートカウント法で算定した。培養液は滅菌0.85% (w/v) 食塩水を用いて希釈した。試験用スキムミルク培地は、250mL容量のサンプル瓶に10% (w/v) スキムミルク200mLを調製し、オートクレーブにて滅菌し（110°C、5分間）、pH経時測定の前1時間前に30°Cに設定した恒温培養器で保温した。市販チーズスターターカルチャー（CHN-11, 50U, Chr. Hansen）10mgを0.85% (w/v) 食塩水1000 $\mu$ Lに懸濁し、そのうち200 $\mu$ Lを接種して混合した。前培養した試験乳酸菌1mLを遠心分離によって集菌し、等量の滅菌生理食塩水で3回洗浄した後、再度1mLの同液に懸濁し、接種菌液とした。前培養の到達濁度から菌数を概算し、概ね $1 \times 10^6$  cfu/mLとなるように接種し、混合した。70% (v/v) エタノールで殺菌したpHガラス電極を乳酸菌を接種した試験用スキムミルク培地内に直接沈め、30°Cあるいは37°Cに設定した培養器に静置した。YUSB-01/PH pH Transducer（山形東亜DKK（株））を用い、機器マニュアルに従って1時間毎に測定しながら24時間連続で行った。

### 3. スターターの製造と保存性試験

分離選抜した乳酸菌のDVS（Direct Vat Set：直接投入可能な凍結乾燥菌体）化を行った。3Lジャーフェンターおよび2tタンクによるDVS用乳酸菌の培養

は、それぞれ表1および表3に示した食品あるいは食品添加物として使用可能なものを用いた培地により行った。いずれの培養も30℃で行い、培養後に遠心分離により回収された菌体に保護剤として10% (w/v) トレハロース含有1% (w/v) グルタミン酸水素ナトリウム溶液を加えて凍結乾燥を行った。3Lジャーフェーマンターで培養した際は、一次乾燥：0℃、二次乾燥20℃で行い、1,600L培養の際は、一次乾燥：0℃、二次乾燥：32℃で行った。

DVS化乳酸菌粉末はアルミ蒸着袋に0.5gずつ密封し、9℃および-20℃での保存試験に供した。

#### 4. チーズの試作およびその評価

各ロット370Lの生乳を原料としてゴーダチーズの製法で4kg玉を9個製造した。メインスターターは市販のCHN-11を使用し、本研究開発で分離選抜した乳酸菌はメインスターターとほぼ同時にDVS化した*L. parcasei* OUT0010および*L. curvatus* 33-5の粉末を原料乳に対し $10^5$  cfu/mLとなるように添加した。塩水浸漬による加塩後、17日±2日の予備乾燥を行い、真空包装して10℃の熟成庫で熟成した。3種類のチーズをそれぞれ3回ずつ製造した。

##### (1) 乳酸菌数および菌叢解析

乳酸菌数測定は、試作チーズの10gを採取し、90mLの生理食塩水を加えストマッカーにて2分間処理後、10倍希釈系列を作成しBCP加寒天培地に各希釈2枚ずつ塗抹した。アネロバックケンキ（三菱ガス化学（株））を用いた嫌気条件下で30℃、48時間培養して出現した黄変コロニー数を計数、定法にて2枚の平均値と希釈倍率から模擬チーズ1g当たりの乳酸菌数を算出した。

乳酸菌叢解析は上記乳酸菌数測定時に出現したコロニーそれぞれについて16S rRNA遺伝子塩基配列を決定<sup>7)</sup>して菌種の同定を行うことにより試作チーズの乳酸菌叢分析を行った。その際の16S rRNA遺伝子増幅にはGoTaq MasterMix（プロメガ社）を用い、塩基配列の決定にはBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いた。チーズ1サンプル当たり約50~100コロニーについて菌種同定を行い占有割合にてチーズ菌叢とした。

分離乳酸菌の菌種推定/同定はGenetic Analyzer 16S rRNA遺伝子の塩基配列をGenetic Analyzer 3130（Applied Biosystems社）を用いて決定し、得られた塩基配列を米国立医学図書館生物学情報センター（National Center for Biotechnology Information, NCBI）の相同性検索アルゴリズムBLAST（Basic

Local Alignment Search Tool using a nucleotide query, blastn; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）解析に供することで行った。

##### (2) 化学成分分析

アミノ酸分析はProminenceアミノ酸分析システム（（株）島津製作所）を用いて行った。分析カラムはShim-pack Amino-Li 6.0mmφ×100mmを用いた。チーズ塊中央部を起点として扇状に切り分けたチーズ片（約200g）の、中央部に相当する辺より20mm内を試料とした。硬化した外皮は5mm以上内側まで除去した。試料切片から5gを精密に秤量し、水に対し半量の0.5Nトリクロロ酢酸を混合した溶液（破碎溶液）20mLに添加した。ホモジナイザーにて8,000rpm、3分間磨砕し、上清をメスフラスコに回収後、沈殿を再び破碎溶液25mLに懸濁し8,000rpm、2分間磨砕後に上清を回収、50mLにメスアップした。液の一部（数mL）を分取し、等量のヘキサンを添加混合して脱脂を行い、上清120μLと0.3M水酸化リチウム40μLを混合し、pHを2~3に調整した。クエン酸リチウム緩衝液pH2.2で10倍に希釈後、0.2μmフィルターでろ過、これを分析サンプルとしてHPLCに供した。

香気成分分析については以下のとおり行った。チーズ2.00±0.05gを20mL容バイアル瓶に採集して密栓し、純水素（G2 grade）と圧縮空気（G3 grade, 太陽日酸（株））がセットアップされたフラッシュGCノーズ（フラッシュGCノーズ HERACLES II アルファモス社製）を用いた自動芳香成分分析を行った。検体を60℃、15分間加温した後、ヘッドスペースの気層（5mL）を試料として装置に注入し、Tenax TAに50℃、30秒間吸着濃縮したのち、240℃まで昇温、35秒間保持することにより揮発成分を離脱した。移動相には純水素を用い、注入口流量10mL/分、カラム流量1mL/分とした。カラムにはMXT-5（5%ジフェニル）およびMXT-WAX（100%ポリエチレングリコール）を用い、初期温度45℃から1.5℃/秒で250℃まで昇温させ、その後60秒間保持した。検出はFIDにより260℃で行い、得られたクロマトグラムの解析は、付属のAlpha SoftとAroChem Base（保持指標とにの関する化合物ライブラリー）を用いて試料の主要香り成分の推定・同定、並びにピーク面積値を求めた。各香り成分のピーク面積値の統計解析は、市販統計ソフト（エクセル統計 社会情報社）を用いて行った。

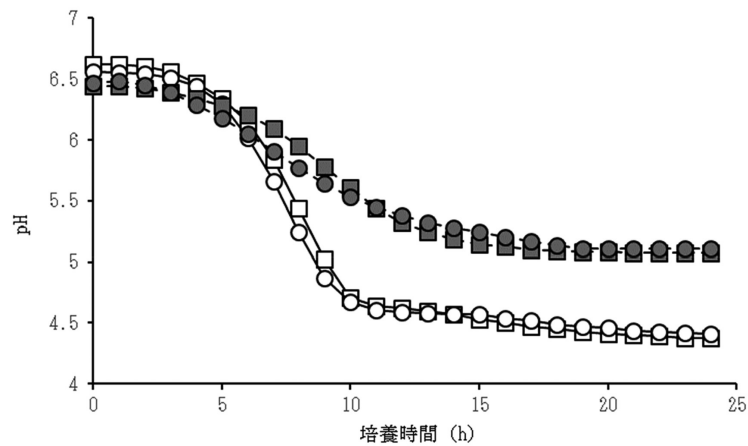
## 実験結果および考察

### 1. チーズ製造における補助スターター添加の影響

分離された乳酸菌を補助スターターとして利用する際、補助スターターの追加によりpHの低下速度が大きく変化することでカードメイキングを難しくしたり、逆にメインスターターの増殖を阻害したりしてはいけない。そこで、スキムミルク中でメインスターターとの共培養を行い、pH低下速度が大きく変化するか検討した(図1)。その結果、*L. curvatus* 33-5添加区が37°Cでの共

培養において多少pH低下速度の上昇を示したが、30°Cにおいては*L. paracasei* OUT0010、*L. curvatus* 33-5添加区ともにpH低下速度が大きく変化することはなかった。両株ともゴーダチーズのようなセミハードチーズ製造時に補助スターターとして使用することを想定している。セミハードチーズ製造時に使用する温度域、特に、カードメイキングに大きく影響を及ぼす培養開始から数時間においてpH低下曲線はほぼ一致していたことから、チーズ製造時に補助スターターを追加することはチーズ製造工程に影響を及ぼさないと推定された。

(A)



(B)

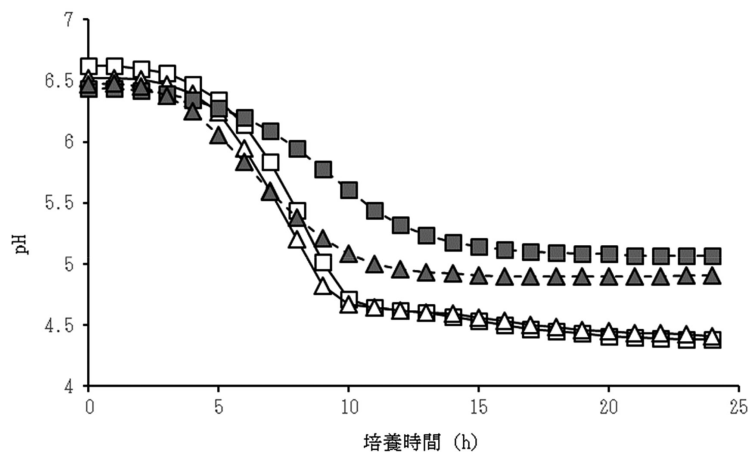


図1 共培養における供試乳酸菌の市販メインスターターに対する影響

(A) *L. paracasei* OUT0010添加試験, (B) *L. curvatus* 33-5添加試験

—□—メインスターター 30°C, —○—OUT0010共培養 30°C, —■—メインスターター 37°C,  
 —●—OUT0010共培養 37°C, —△—33-5共培養 30°C, —▲—33-5共培養 37°C



## 2. 供試乳酸菌の乾燥スターター化

*L. paracasei* OUT0010および*L. curvatus* 33-5を補助スターターとして利用するために、原料の低温殺菌乳に直接添加可能なダイレクト・バット・セット (DVS) にする条件について検討した。まず*L. paracasei* OUT0010および*L. curvatus* 33-5の両菌株について、3 L容ジャーフェーマンターで培養試験を実施した。スターターはチーズ製造に使用し、後工程で除去することができないため、培地成分は食品添加物として使用可能なものとした(表1)。*L. paracasei* OUT0010は30℃、pH 6.0、*L. curvatus* 33-5は30℃、pH 5.5の条件で培地体積2 Lで培養を行った。得られた菌体に保護剤溶液を加えて凍結乾燥を行い、得られた粉末の生菌数を測定した。粉末は両株とも約20gであった。両菌株の培養条件と培養液および凍結乾燥粉末の菌数を表2にまとめた。得られた

凍結乾燥粉末中の全生菌数が液体培養終了時の約半分になっていたが、補助スターター DVSとしての使用に問題ない菌濃度が得られたため、培地組成、培養条件、凍結乾燥条件についてほぼ確立できたと判断した。

さらに*L. paracasei* OUT0010についてDVS化のための実規模(2 t培養タンク)培養および凍結乾燥試験を実施した。培地組成は3 Lジャーフェーマンターでの試験結果を踏まえ表3として、培地1,600Lで30℃、pH 6.0の条件で培養を行った。得られた菌体に上記同様に保護剤を加えて凍結乾燥を行い、凍結乾燥粉末を得た(18.5kg)。培養条件と培養液および凍結乾燥粉末の菌数を表4にまとめた。培養液と凍結乾燥粉末の全菌数の比較において、生菌の回収率が3 L容ジャーフェーマンターで行った際より低く約13%であった。

表1 DVS調製用ジャーフェーマンター培養時の培地組成

成分	(g/L)	
	成分	配合量
ブドウ糖		20
酵母エキス		10
カゼインペプトン		10
硫酸マグネシウム		0.2
硫酸第一鉄		0.01
マンガン含有酵母		0.6
Tween80		0.5

表2 ジャーフェーマンター培養菌体のDVS化条件とその結果

	培養温度 (℃)	培養pH	培養時間 (時間)	培養液生菌数 (cfu/mL)	凍結乾燥粉末 (cfu/g)
<i>L. paracasei</i> OUT0010	30	6.0	17	$4.4 \times 10^9$	$1.5 \times 10^{11}$
<i>L. curvatus</i> 33-5	30	5.5	24	$4.8 \times 10^9$	$2.4 \times 10^{11}$

表3 実規模DVS調製(2 tタンク)培地組成

成分	(g/L)	
	成分	配合量
含水結晶ブドウ糖		21.9
酵母エキス		21.9
カゼインペプトン		10
硫酸マグネシウム		0.2
硫酸第一鉄		0.01
マンガン含有酵母		0.6

表4 実規模スケールDVS化時の培養条件および凍結乾燥による生残率への影響

	培養温度	培養pH	培養時間	培養液生菌数 (cfu/mL)	凍結乾燥粉末 (cfu/g)	乾燥後生残率 (%)
<i>L. paracasei</i> OUT0010	30℃	6.0	19時間	$1.0 \times 10^{10}$	$1.1 \times 10^{11}$	12.7

本方法で調製したこれら菌体の実用性を検討する目的で3L容ジャーフェーマンターで培養しDVS化した凍結乾燥粉末菌体の保存性について検討を行った。

ガスバリア性アルム蒸着フィルム包装した*L. paracasei* OUT0010のDVS試料について冷蔵条件(9℃)と冷凍条件(-20℃)にて1g当たりの生菌数の変化を比較することにより保存性を検討した。その結果、冷蔵条件では7ヶ月目で褐変が始まり、いずれの菌株も約1/20程度に生菌数の減少が認められた。10ヶ月目では褐変が進行するとともに飴状に固化し、生菌数も1g当たり $10^{11}$ 台であった生菌数が $10^6$ 台へ減少した。一方、冷凍条件では14ヶ月目においても着色や生菌数の変化はなかった(表5 a, b)。

これらのことから本条件で調製したDVS化スターターは冷凍保存することで実用が可能であると判断した。

### 3. 試作チーズの熟成中乳酸菌数、乳酸菌叢

実規模試作チーズの熟成中の乳酸菌数および乳酸菌叢変化について分析した。菌数については、対照チーズの菌数が $7 \times 10^8$  cfu/g程度から熟成3ヶ月目には $1 \times 10^6$  cfu/g程度に減少したが、熟成3ヶ月目において*L. paracasei*添加チーズ $4 \times 10^7$  cfu/g程度、*L. curvatus*添加チーズは $8 \times 10^6$  cfu/g程度と、対照区チーズに比べ生存乳酸菌は多くなっていた(図2)。この傾向は3回の実規模製造においてほぼ再現されていた。乳酸菌叢については、補助チーズにおいては熟成2ヶ月目から添加した乳酸菌種が菌叢のほぼ全てを占めていた(図3)。

表5 DVS化した乳酸菌スターターの保存性試験

	(cfu/g) (a)		(cfu/g) (b)	
	<i>L. paracasei</i> OUT0010	<i>L. curvatus</i> 33-5	<i>L. paracasei</i> OUT0010	<i>L. curvatus</i> 33-5
1ヶ月目	$1.1 \times 10^{11}$	$1.4 \times 10^{11}$	$1.1 \times 10^{11}$	$1.4 \times 10^{11}$
3ヶ月目	$1.7 \times 10^{11}$	$1.1 \times 10^{11}$	$1.7 \times 10^{11}$	$2.3 \times 10^{11}$
5ヶ月目	$1.0 \times 10^{11}$	$8.7 \times 10^{10}$	$1.0 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{11}$
7ヶ月目	$6.2 \times 10^9$ 褐変	$6.9 \times 10^9$ 褐変	$5.5 \times 10^{10}$	$5.4 \times 10^{10}$
10ヶ月目	$4.0 \times 10^6$ 褐変, 飴状固化	$1.0 \times 10^6$ 褐変, 飴状固化	$1.1 \times 10^{10}$	$9.6 \times 10^{10}$
			12ヶ月目	$1.1 \times 10^{11}$
			14ヶ月目	$1.2 \times 10^{11}$

(a) : 9℃保存, (b) : -20℃保存

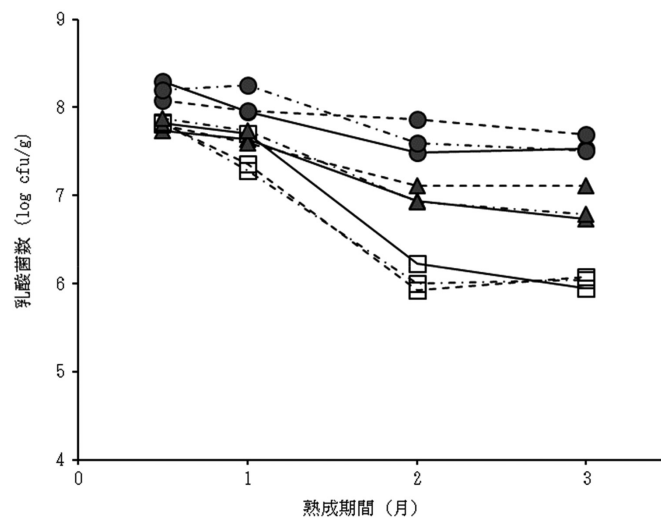


図2 実規模試作チーズ熟成中の乳酸菌数変化

□-対照チーズ1回目, □-対照チーズ2回目, □-対照チーズ3回目,  
●-*L. paracasei* OUT0010添加1回目, ●-*L. paracasei* OUT0010添加2回目, ●-*L. paracasei* OUT0010添加3回目,  
▲-*L. curvatus* 33-5添加1回目, ▲-*L. curvatus* 33-5添加2回目, ▲-*L. curvatus* 33-5添加3回目

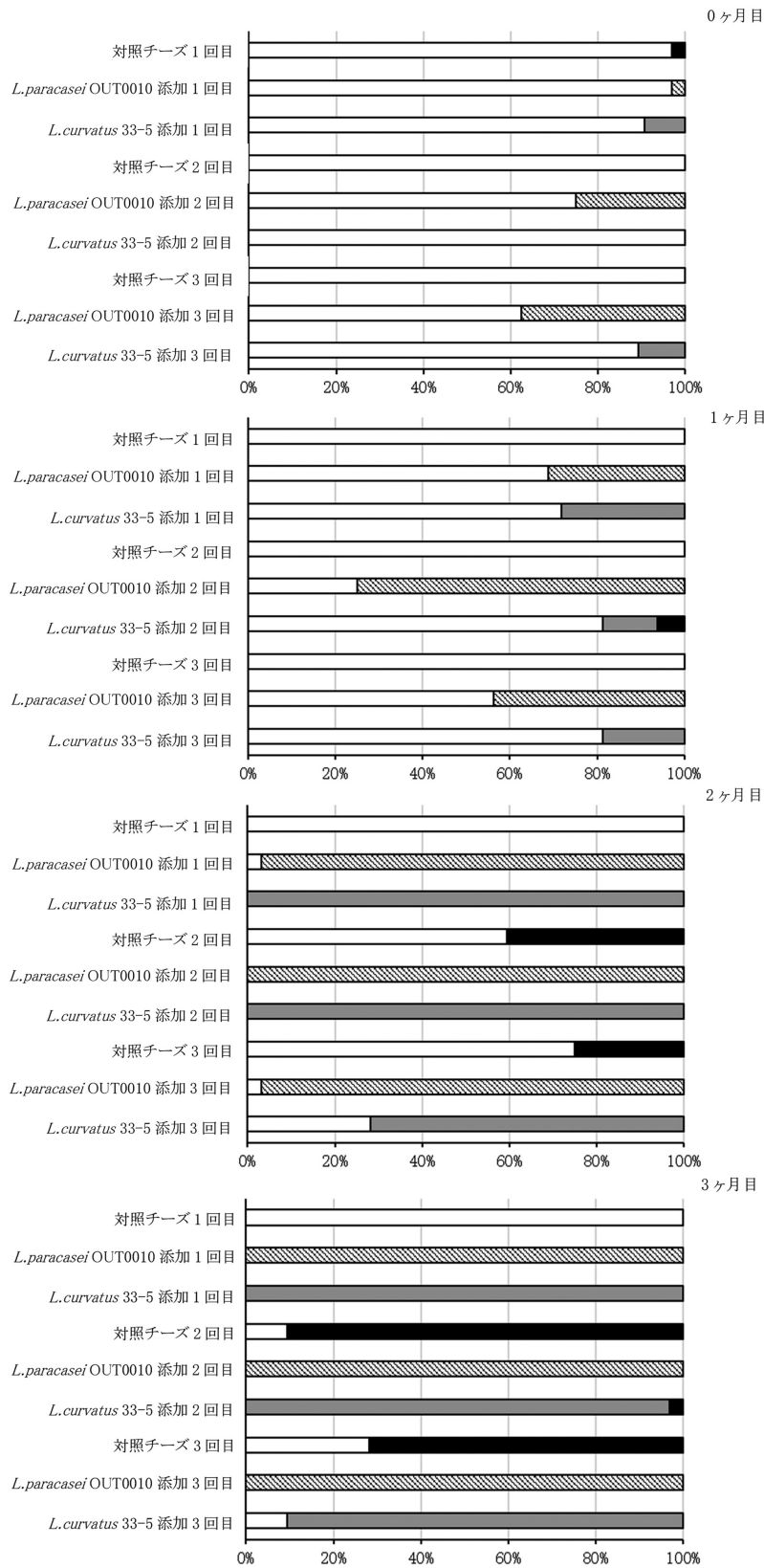


図3 実規模試作チーズ熟成中の乳酸菌叢変化

□ スターター乳酸菌, ▨ *L. paracasei*, ▩ *L. curvatus*, ■ その他乳酸菌

#### 4. 試作チーズの呈味成分・香気成分分析

補助スターターはチーズの品質風味を改変する目的でメインスターターと共存させて使用する微生物である。*L. paracasei* OUT0010および*L. curvatus* 33-5の添加効果を実証する目的で、これら菌株を補助スターターとして使用し、セミハードタイプ（ゴータタイプ）のチーズをそれぞれ実規模試作して呈味成分および香気成分を分析した。

補助スターター添加チーズおよび対照チーズの比較において総遊離アミノ酸量には差が認められなかったが（データ不掲載）、旨味アミノ酸であるグルタミン酸の量については熟成2ヶ月目、3ヶ月目と補助スターター添加チーズで多くなり、特に*L. paracasei*添加チーズでは、熟成2ヶ月目で対照チーズが109.8mg/100gFWに対し149.5mg/100gFWと約1.36倍含まれており、熟成3ヶ月目で対照チーズは150.6mg/100gFWに対し197.9mg/100gFWと約1.31倍になっていた。また*L. curvatus*添加チーズでは熟成2ヶ月目、3ヶ月目がそれぞれ対照チーズの1.19倍、1.09倍となっていた（図4）。

このように熟成2ヶ月目3ヶ月目のチーズで対照チーズに比較して*L. paracasei*添加チーズおよび*L. curvatus*添加チーズのグルタミン酸濃度が高い傾向がみられた

が、熟成2ヶ月目の*L. paracasei*添加チーズと3ヶ月目の対照チーズのグルタミン酸量が同等だったことから、*L. paracasei*添加による熟成期間の1ヶ月短縮効果が期待された。また、グルタミン酸の定量値、特に対照区チーズの値にばらつきが大きかったことから、製造工程および分析工程の精度を向上させ、各試験区の処理数を多くすることにより有意差のあるデータとなり、添加効果が明瞭になるものと考察した。

DVS化補助スターターを用いた試作チーズの香気成分に関して分析を行った。熟成0ヶ月目から3ヶ月目の全てにおいて、*L. paracasei*添加チーズと*L. curvatus*添加チーズのアセトアルデヒド、ジアセチル、テトラメチルピラジンは対照チーズより多かった。また、これら香気成分について、乳酸菌株間の差を比較すると*L. paracasei*添加チーズの含量が*L. curvatus*添加チーズよりも多かった（表6）。アセトアルデヒドはヨーグルトの香り、ジアセチルは乳製品、バターの香り、テトラメチルピラジンは納豆、チョコレート、ローストしたナッツ様の香りとしてされており、チーズの熟成香に寄与する<sup>1,8,9)</sup>。これら補助スターターの香り成分増強効果が、チーズの差別化、付加価値向上に資する可能性が示された。

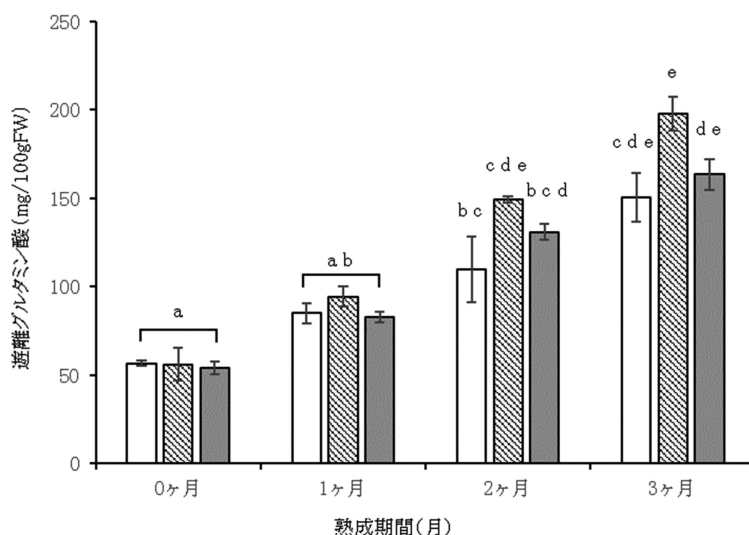


図4 実規模試作チーズ熟成中の遊離グルタミン酸量変化

□ 対照チーズ, ▨ *L. paracasei* OUT0010添加, ■ *L. curvatus* 33-5添加

エラーバーは標準偏差。異符号間にはTukeyの多重比較検定により5%水準で有意差があることを示す。



表6 実規模試作チーズ熟成中の香り成分の変化

試料	Actaldehyde	Diacetyl	Butan-2-one	Acetoin	Propanoic acid	Butylacetate	Acetic acid	Tetramethylpyrazine
熟成 0ヶ月 対照チーズ	1359±564	7385±3379	872±379	1039±1279	trace	318±144	trace	7056±3588
<i>L. paracasei</i> 添加	1958±364	10154±1478	393±271	740±302	ND	561±138	trace	11076±2449
<i>L. curvatus</i> 添加	3036±1336	10103±2861	987±393	429±220	trace	628±187	trace	10088±2064
熟成 1ヶ月 対照チーズ	1344±342	6483±1864	745±525	348±251	trace	562±115	trace	8690±2894
<i>L. paracasei</i> 添加	1516±451	8447±2243	650±318	834±896	trace	537±204	trace	9589±2587
<i>L. curvatus</i> 添加	1564±508	11391±3652	1057±356	1223±1476	trace	543±123	trace	11548±4213
熟成 2ヶ月 対照チーズ	1281±204	5571±1473	1298±523	213±169	trace	651±132	trace	7734±952
<i>L. paracasei</i> 添加	1401±266	7754±1450	948±524	304±92	trace	457±173	trace	10260±2569
<i>L. curvatus</i> 添加	1395±205	8357±1756	1553±455	trace	trace	739±182	trace	10042±1759
熟成 3ヶ月 対照チーズ	1183±351	3821±2470	834±527	trace	trace	818±228	trace	6011±2081
<i>L. paracasei</i> 添加	1337±245	6629±2823	969±366	trace	trace	530±134	trace	7998±3762
<i>L. curvatus</i> 添加	1468±437	8329±2239	1679±505	trace	trace	630±143	trace	9171±2587

数値は相対的なピーク面積値。trace：微量，ND：検出せず。

北海道の食品から独自に分離選抜したこれら乳酸菌は、市販のメインスターターとの共培養においてメインスターターの主要な役割である乳酸生成によるpHの低下を阻害することなく、また模擬チーズ、実規模試作チーズ中で熟成中に増殖してチーズ中の主要な微生物叢を占めた。グルタミンの増加を促進する効果、香り成分を増強する効果を示した。またDVS化することにより冷凍で1年間以上の保存が可能であった。これらのことから、両菌株を補助スターターとしてセミハードチーズ製造に使用することにより、北海道独自の乳酸菌を使用し、地域性、うま味、香りを付与したチーズとして位置づけること、また、熟成期間を短縮してチーズを出荷できることでコスト削減にも活用することが可能であると判断した。

## 要 約

北海道内発酵食品から分離した乳酸菌のうち2株は、補助スターターとしてゴーダタイプのセミハードチーズ製造に活用可能である。原料乳に添加して使用することにより、熟成中にチーズ中の主要乳酸菌となり、うま味アミノ酸であるグルタミン酸の増加を促進する効果が期待された。香气成分についても無添加の対照チーズよりも多く生成した。また、乾燥スターターにすると、-20℃で1年以上保存可能であることを明らかとした。

## 謝 辞

本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（経営体強化プロジェクト）」課題名「国産スターターを用いたブランドチーズ製造技術の開発」の資金を受け、経営体（J-チーズ創出）コンソーシアムが実施した。

## 文 献

1) Bastian, E. D. and Broun, R. J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: an update, *Intl. Dairy*

*J.*, **6**(5) 435-457.

- 2) Somers, J. M. and Kelly, A. L. (2002). Contribution of plasmin to primary proteolysis during ripening of cheese: effect of milk heat treatment and cheese cooking temperature, *Lait*, **82**, 181-191.
- 3) Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2017). *Biochemistry of Cheese Ripening*. in” *Fundamentals of Cheese Science*,” Springer, pp. 391-442.
- 4) Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., and Drinan, F. D. (1996). Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions., *Intl. Dairy J.*, **6**(8-9), 851-867.
- 5) 特願（2019年10月29日）
- 6) 高谷政宏，大坪雅史，八十川大輔，中村正（投稿準備中）
- 7) 長島浩二，八十川大輔，中川良二，池田隆幸（1998）. 塩基配列に基づく細菌同定法の食品マイクロフロー解析への応用，*日本食品科学工学会誌***45**(1)，58-65.
- 8) Kim, K. H. and Lee, H. J. (1991). Optimum conditions for the formation of acetoin as a precursor of tetramethylpyrazine during the citrate fermentation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biover. *diacetylactis* FC1., *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**(3), 202-206.
- 9) Van Leuven, I., Van Caelenberg, T. and Dirinck, P. (2008). Aroma characterisation of Gouda-type cheeses., *Intl. Dairy J.*, **18**(8), 790-800.

## 引 用 U R L

- i) 国立医薬品食品衛生研究所 化合物とにのの説明 <http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/chemical/kanshi/index-kanshi.html> (2020.8.5)