

熟成タイプチーズ用富良野地域独自乳酸菌の選抜

八十川大輔, 小林裕之*

Isolation of Furano Original Lactic Acid Bacterium for Ripened Cheese Production

Daisuke Yasokawa and Hiroyuki Kobayashi*

To develop a new type of semi-hard or hard cheese, we isolated 47 lactic acid bacteria (LAB) from regional raw milk in the Furano area, as well as matured cheese. By comparing proteolytic activity, one lactic acid bacterium, *Lactobacillus paracasei* strain #321, was isolated from a matured, semi-hard cheese. The semi-hard cheese was experimentally produced using strain #321 as an adjunct LAB. After 2 months of maturation, the free amino acid content of the test cheese, with strain #321, was higher than that of the control cheese, which did not have strain #321 as an adjunct.

KEY-WORDS : isolation, lactic acid bacteria, flavor formation

キーワード : 選抜, 乳酸菌, 風味形成

現在北海道には100を超すチーズ製造業者が存在し、北海道の豊富で優良な生乳を原料として様々なチーズを製造している。北海道では平成28年3月に策定された「第7次北海道酪農・肉用牛生産近代化計画」において、「北海道産ナチュラルチーズ」の差別化と地域ブランドの発信を挙げ、チーズの増産や品質向上に向けた施策を進めている。

株式会社ふらの農産公社（富良野チーズ工房）は積極的に新商品開発に取り組むチーズ製造業者であり、チェダリングの際にワインを練り込んだ「ワインチェダー」、ローストしたタマネギを練り込んだセミハードチーズ「たまねぎ（ゴータタイプ）」やिकासミを添加した白カビチーズの「セピア」を開発するなど、オリジナリティーの高いチーズを製造販売している。今回、当該企業から北海道有数の観光地である富良野地域オリジナルの乳酸菌を使用して製造した物語性のあるチーズを新製品とし

て開発したいという要望が寄せられた。

そこで、本共同研究課題では独自乳酸菌を活用してうま味（総遊離アミノ酸量）を増強したチーズ製造を目標に、富良野地域独自の乳酸菌（ふらの熟成乳酸菌）を分離・選抜することとした。

実験方法

1. 乳酸菌の分離・同定

平成29年に富良野チーズ工房で製造したゴータタイプのチーズおよび富良野地域で搾乳し富良野チーズ工房に搬入された生乳から乳酸菌を分離した。各試料から生理食塩水による1/10希釈系列の試料懸濁液を調製し、0.1mLずつ2枚のBCP加寒天培地（日水製薬）またはROGOSA寒天培地（Merck）に塗布、30°Cで2～3日間、アネロパックを用いた嫌気ジャー（三菱ガス化学）にて嫌気培養を行った。

*株式会社ふらの農産公社（富良野チーズ工房）

事業名：共同研究

課題名：富良野地域独自乳酸菌（ふらの熟成乳酸菌）を追加することによるうま味チーズの開発

ROGOSA寒天培地では形成されたコロニーを、BCP加寒天培地では周辺が黄変したコロニーを分離した。乳酸菌は16S rRNA遺伝子塩基配列を解読して推定した¹⁾。

2. タンパク質分解活性の比較

タンパク質分解活性は、110°C 15分間オートクレーブして調製した10% (w/v) 還元脱脂乳にMRS培地 (Difco) にて1晩培養した乳酸菌培養液を1% (v/v) 接種し、15°Cで10日間培養した。十分攪拌後3,000回転で10分間遠心しエッペンドルフチューブに上層の培養液を500 µL分取、0.75NのTCAを1 mL、蒸留水を100 µL添加して十分に混和した。室温で10分間静置後15,000回転で10分間遠心し、上清を回収した後、吸光度測定まで-30°Cにて冷凍保存した。測定に使用するOPA (o-フタルジアルデヒド) 溶液は以下のとおり使用時に調製した。四ほう酸ナトリウム・10水和物を0.95 g 蒸留水に溶解して25mLに定量し、ドデシル硫酸ナトリウム20% (w/w) 溶液を2.5mL添加後、OPAを40mgを1 mLのメタノールに溶解し添加した。β-メルカプトエタノールを100 µL添加後攪拌、50mLに定量した。解凍した遠心上清50 µLとOPA溶液1 mLを混合し、室温で2分間静置後直ちに340nmにおける吸光度を測定した²⁾。

3. 還元脱脂乳中での乳酸菌の増殖・pHの低下

MRS培地にて1晩培養した乳酸菌液を3,000回転、10分間遠心して上清を捨て菌体を回収、同体積の生理食塩水に懸濁した。10% (w/v) 還元脱脂乳に1% (v/v) となるように菌懸濁液を接種、30°Cで培養した。培養中還元脱脂乳をサンプリングしてpH測定および希釈系列

を作製してBCP加寒天培地を用いて生菌数測定を行った。

4. 試作チーズ遊離アミノ酸分析

アミノ酸分析は以下のように行った。細切したチーズ1 gを破砕装置 (岩谷産業：クラッシュミルサー) 容器に秤量し、60°Cの蒸留水19mLを添加して直ちに破砕した。5 Aろ紙でろ過後、ろ液1 mLに2% (w/v) スルホサリチル酸を1 mL混合、室温で30分間放置した。3000回転で10分間遠心 (日立：卓上遠心機 himac CT 6EL) して上清を回収、ポアサイズ0.22 µmのナイロンメンブレンフィルターでろ過、自動アミノ酸分析装置 (日立ハイテクフィールドディング：L-8900) で分析した。

実験結果および考察

1. 乳酸菌の分離・同定

富良野チーズ工房で製造されたチーズおよび富良野チーズ工房に搬送された生乳から乳酸菌を選抜した。製造されたチーズを分離源とする都合、市販のスターター乳酸菌を分離する可能性があるため、スターター乳酸菌として使用される *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* を選抜の対象外とした。また、バンコマイシン耐性 *Enterococcus* 属乳酸菌選抜の可能性を排除するため *Enterococcus* 属も除外した。その結果、*Lactobacillus casei/paracasei* 37株、*Lb. helveticus* 2株、*Lb. rhamnosus* 1株、*Lb. delbrueckii* 1株、*Pedococcus pentosaceus* 2株、*P. stilesii* 1株、*Weissella paramesenteroides* 3株の合計47株を分離した (表1)。

表1 ふらの地域で搾乳された原料乳および富良野チーズ工房で製造されたチーズから分離された乳酸菌

No.	菌種	由来等	No.	菌種	由来等
251	<i>Lb. casei</i>	ふらのワインチェダー	343	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
252	<i>Lb. casei</i>	ふらのワインチェダー	344	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
253	<i>Lb. casei</i>	ふらのワインチェダー	345	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
261	<i>Lb. casei</i>	ふらの生乳	346	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
270	<i>Lb. delbrueckii</i>	ふらの生乳	347	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
271	<i>Lb. rhamnosus</i>	ふらの生乳	348	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
320	<i>L. paracasei</i>	ふらのタマネギゴータ	349	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
321	<i>L. paracasei</i>	ふらのタマネギゴータ	350	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
322	<i>L. paracasei</i>	ふらのタマネギゴータ	351	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
323	<i>L. paracasei</i>	ふらのタマネギゴータ	352	<i>P. pentosaceus</i>	ふらの生乳
324	<i>L. paracasei</i>	ふらのタマネギゴータ	353	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
325	<i>L. paracasei</i>	ふらのタマネギゴータ	354	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
326	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳	355	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
327	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳	356	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
328	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳	357	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
329	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳	358	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
330	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳	359	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
331	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳	360	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳
337	<i>L. helveticus</i>	ふらの生乳	361	<i>W. paramesenteroides</i>	ふらの生乳
338	<i>L. helveticus</i>	ふらの生乳	362	<i>P. pentosaceus</i>	ふらの生乳
339	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳	363	<i>W. paramesenteroides</i>	ふらの生乳
340	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳	364	<i>P. stilesii</i>	ふらの生乳
341	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳	365	<i>W. paramesenteroides</i>	ふらの生乳
342	<i>L. paracasei</i>	ふらの生乳			

2. タンパク質分解活性の比較

15°Cで10日間、10% (w/v) 還元脱脂乳中で分離菌株をそれぞれ培養し、タンパク質分解活性を比較した (図1)。その結果「たまねぎ (ゴーダタイプ)」チーズから分離した*Lb. paracasei* #321株が最も高い分解活性を示したため、本菌株を用いて以降の実験を行うこととした。

3. 還元脱脂乳中での選抜乳酸菌の増殖・pH低下能

10% (w/v) 還元脱脂乳30°C培養時の#321株の増殖およびpH低下について図2に示した。pH低下能については培養開始後12時間においてもpHは6.0にならず、カゼインタンパクの等電点 (pH4.6) までpHが低下するまで24時間以上かかった (図2 (a))。以上のことから#321株は酸生成能が低く、単独でのチーズ製造には不適と考えられた (図2 (b))。

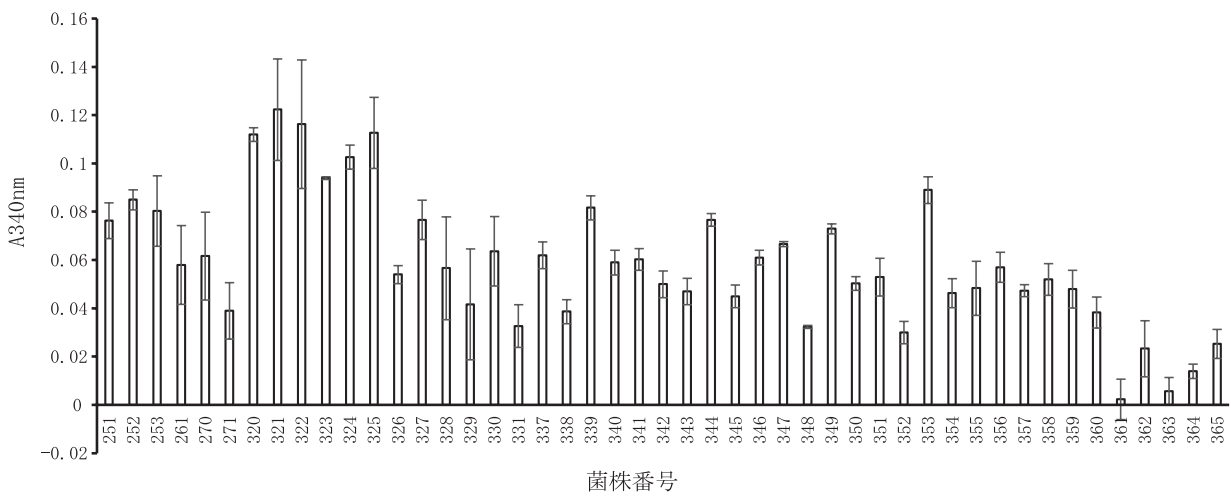


図1 OPA法による分離乳酸菌のたんぱく質分解活性比較

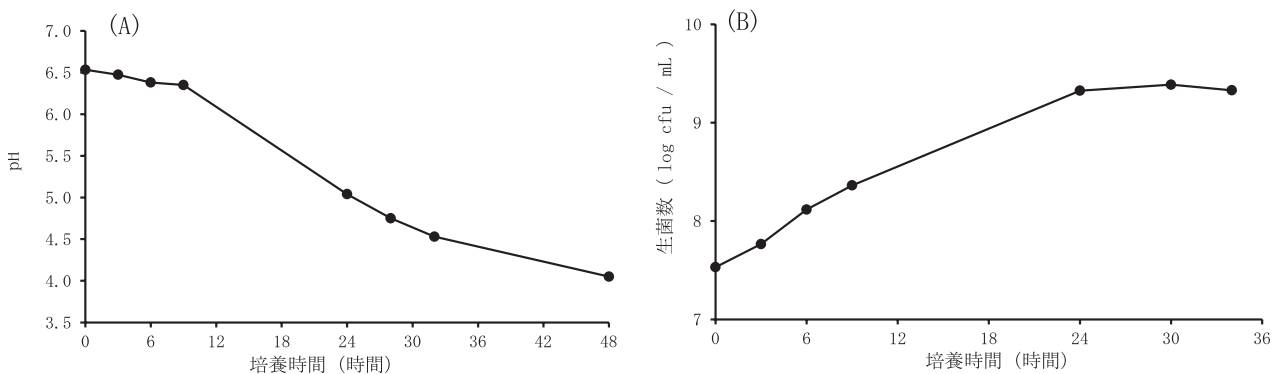


図2 #321株の30°C脱脂粉乳培養でのpH低下および増殖

(A) : pH低下, (B) : 生菌数増加

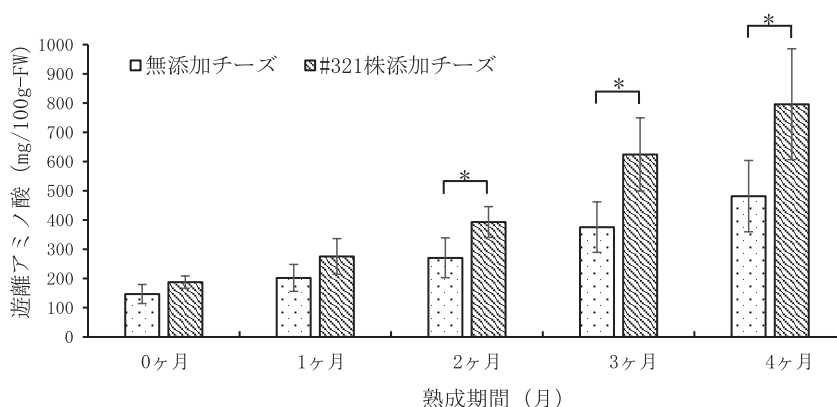


図3 チーズ熟成に対する#321株添加効果

* t-検定, $p < 0.05$ で有意, $n = 5$

4. 選抜乳酸菌を添加したチーズの試作

乳酸菌として市販スターターであるCH-N11（クリスチャンハンセン製）のみを使用したゴーダタイプのセミハードチーズ（対照区チーズ）と、CH-N11スターターに今回分離した*Lb. paracasei* #321株を原料乳に対し 10^7 cfu/mLとなるように添加したチーズ（試験区チーズ）を富良野チーズ工房にて原料300kg規模で試作した。スターター以外の製造条件は同一条件とし、 10°C で熟成し、1ヶ月毎に遊離アミノ酸量の変化を測定した。対照区チーズ、試験区チーズとも5回実規模試作したところ、対照区チーズ、試験区チーズとも熟成につれて遊離アミノ酸量が増加し、熟成2ヶ月目では試験区チーズが対照区チーズの約1.5倍、3ヶ月目および4ヶ月目では約1.7倍となり、試験区チーズの遊離アミノ酸が対照区チーズの遊離アミノ酸より有意に増加していた。

先行研究において、チーズ中から分離した非スターター乳酸菌を製造工程中に人為的に添加することによりチーズの品質向上を図るといった試みがある^{3,4)}。本研究では富良野チーズ工房で製造熟成したチーズから非スターター乳酸菌を分離してそれを熟成を促進しうま味を向上させる乳酸菌として使用することで統計的に有意に遊離アミノ酸含量の高いチーズを製造することが可能となった。

要 約

本研究では、富良野地域で搾乳された生乳を原料に製造された熟成チーズから、還元脱脂乳中でのタンパク質分解活性を指標に乳酸菌*Lb. paracasei* #321株を分離選抜した。この#321株を一般的なセミハードチーズ製造工

程においてスターター乳酸菌と同時に添加することにより、うま味の指標である遊離アミノ酸を無添加の対照区チーズより有意に増加させることが可能であった。

本研究は株式会社ふらの農産公社との共同研究として実施した試験研究である。

文 献

- 1) 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ラ解析への応用, 日本食品科学工学会誌, **45**(1), 58-65.
- 2) Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. (1983). Spectrophotometric Assay Using *o*-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *J. Dairy Sci.*, **66**, 1219-1227.
- 3) Kocaoglu-Vurma, N. A., Harper, W. J., Drake, M. A. and Courtney P. D. (2018). Microbiological, Chemical, and Sensory Characteristics of Swiss Cheese Manufactured with Adjunct Lactobacillus Strains Using a Low Cooking Temperature. *J. Dairy Sci.* **91**(8), 2947-2959.
- 4) C.M. Lynch, C. M., P.L.H. McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M., Drinan, F.D. (1996). Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int. Dairy J.* **6**(8-9), 851-867.