コンテタイプチーズにおける *Lacticaseibacillus rhamnosus* P-17 株のうま味成分増強効果

八十川大輔，荒谷陽介

Analysis of the cheese ripening effect of *Lacticaseibacillus rhamnosus strain* P-17 on Comté-type cheese

Daisuke Yasokawa, Yousuke Araya

The effect of the adjunct starter *Lacticaseibacillus rhamnosus* P-17 was investigated by comparing normal Comté-type cheese (control cheese) with cheese supplemented with P-17 (test cheese). As maturation progressed, the viable LAB count decreased in both cheese types. However, the LAB count in the test cheese remained higher than that in the control cheese. The microflora transition in the control and test cheeses was investigated. *L.rhamnosus*, the same species as P-17, was dominant after approximately two weeks of prematuration, whereas *Lactobacillus delbrueckii*, one of the starter LAB, became dominant in the control cheese. The free amino acid content was higher in the test cheese than in the control cheese after seven months of maturation.

Sensory analysis revealed that the test cheese had a more pronounced milk flavor, firmer texture, and stronger umami flavor than the control cheese.

KEY-WORDS：Adjunct starter, microflora analysis, free amino acid content, organoleptic analysis

キーワード：サブスターター（アジャンクトスターター），細菌叢解析，総遊離アミノ酸，官能評価

北海道は日本の生乳の約57％を生産している酪農地域である[1)]。その豊富な原料を用いたチーズ生産も盛んで，直接消費用ナチュラルチーズの91％が北海道で生産されているが，日本の直接消費ナチュラルチーズに占める国産品の比率は11.2％に過ぎない[2)]。ナチュラルチーズの国内消費量に占める国産（北海道産）のナチュラルチーズのシェアを増やすには，ヨーロッパなど，いわゆる本場のチーズに対抗する独自性と，一層の付加価値向上が必要であると考えられた。そのため平成30年度（2018年度）から令和２年度（2020年度）において，国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農研機構生物系特定産業技術研究支援センターの「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」の補助金を受け，経営体（J-チーズ創出）コンソーシアムにおいて研究を行った[3)]。この研究においてゴーダタイプのセミハードチーズを試作し，「うま味増強，熟成促進」を特徴とするチーズ用サブスターター乳酸菌として４株の新規乳酸菌株を分離し，特許出願を行った（特許第7537668号）。また令和３年度（2021年度）から令和５年度（2023年度）において，前述の新規乳酸菌株の実用化のための研究を，特殊法人日本中央競馬会の「畜産振興事業（国産チーズ・イノベーション事業）」の補助金を受けて実施し，当センターも自ら分離した

事業名：受託研究
課題名：道内チーズ製造施設と連携したご当地チーズスターターの性能・効果実証試験

Lacticaseibacillus rhamnosus P-17株（以下P-17株とする）について検討を行った。

本研究では，P-17株のチーズ用サブスターターとしての使用適性について数種のチーズで検討を行ったところ，コンテタイプチーズについて添加効果が認められたので，その結果について報告する。

実験方法

1．供試乳酸菌

特許出願した乳酸菌P-17株を使用した。これまでの試験により本菌株は，無芽胞，運動性のない桿菌で，10 ℃および40 ℃で増殖能あり，５％食塩添加液体培地で増殖能あり，炭酸ガス産生なし，ジアセチル生成能ありを確認している。また，羊血液培地によるβ溶血活性がなく，改変RMS培地においてチラミン，ヒスタミン生産性がなく，PCRにおいてチラミン，ヒスタミン生合成遺伝子を検出せず，グルコース，ガラクトースおよびラクトースを分解するという生理生化学的性状を有する。

2．チーズの試作および熟成

試料チーズは，北海道内のチーズ製造業者に依頼して試作した。P-17株の添加効果を明らかにする目的で，P-17株添加チーズ（以下，試験チーズとする）と無添加チーズ（以下，対照チーズとする）を試作し，両者の比較を行った。原料乳質をできるだけ揃えるため，両者の製造間隔は数日以内とした。

試作を依頼した製造業者では，メインスターターとし てCHOOZIT TA71 LYO，CHOOZIT LH100 LYO，CHOOZIT MM101 LYO，（いずれもDANISCO社）を使用しており，対照チーズはこれら市販乳酸菌のみで製造し，試験チーズはさらにP-17株を 5 log ～ 6 log cfu/mLとなるように同時に追加して製造した。熟成は製造業者の熟成庫（10 ～ 12 ℃）にて７ヶ月行った。

3．試作チーズの評価

(1) サンプリング

乳酸菌数，乳酸菌叢および総遊離アミノ酸分析は，熟成前（予備乾燥終了後），熟成２ヶ月目，４ヶ月目，６ヶ月目および熟成終了時（７ヶ月目）にサンプリングして分析を行った。試作チーズは１個直径約40 cm，厚さ約10 cmであったため，熟成前および熟成中のサンプリングは，トライヤーにて太さ約１cm，長さ約８cm程度で，できるだけ衛生的に，円柱の側面側から中心方向に，高さの1/2のあたりを水平方向に抜き取ったチーズ片２片ずつを分取した。そのチーズ片２片のうち，できるだけ円柱の中心に近い部分を試料とした。熟成終了時のサンプリングは厚さ約10 cmの大きなチーズ片を用いて行った。予備実験において中心部分とリンド（外皮）部分では遊離アミノ酸量に差があったため，リンドを含む上下3.5 cmずつを除いた，中心の３cm幅の部分を使用することとし，総遊離アミノ酸分析，水分，脂肪分，pHの測定および官能評価に用いた。

(2) 乳酸菌数および菌叢解析

乳酸菌数はトライヤーで分取した試料チーズの中心付近を10ｇ採取し無菌的に細かく磨砕し，90 mLの0.85％（w/v）滅菌生理食塩水にストマッカーにて懸濁した。これを1/10 希釈乳剤として10 倍希釈系列を調製し，それぞれBCP加寒天培地（島津ダイアグノスティクス）に塗抹，嫌気ジャーに入れてアネロパック（三菱ガス化学）を用いて35 ℃で72 時間培養した。出現したコロニー数を計数，希釈率をかけてチーズ１gあたりの乳酸菌数を算出した。

乳酸菌叢については出現したコロニー 96個を無作為に選抜，3130Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズ）を用いて乳酸菌遺伝子の16S rDNA遺伝子の上流約500 bpの塩基配列を解析することにより同定した[3]。

(3) 化学成分分析

チーズのpH，脂肪分および水分については定法[4]に基づき分析を行った。

総遊離アミノ酸分析は以下のように行った。

細切したチーズ0.5 gを2 mLチューブに秤量し、60 ℃の蒸留水0.8 mLを添加しビーズ破砕（トミー工業：MS-100）後、4 ℃ 10,000 r.p.m.（トミー工業：MX-160）で20 分間遠心し水相を回収した。

これを２回繰り返して抽出し、10 mLに定容した。

試料を2 ％ 5-スルホサリチル酸水溶液にて脱タンパクし、ポアサイズ0.22 μmのナイロンメンブレンフィルターで濾過した後、高速アミノ酸分析計（日立ハイテクサイエンス：LA-8080）で分析した。

(4) 官能評価

試作した試験チーズおよび対照チーズの官能評価を２点比較で実施した。パネルはトレーニングを受けていない弊所職員24 名（男性16 名，女性８名）で実施し，評価項目は口に入れる前の鼻先で嗅いだときのチーズ臭，ミルク臭，ヨーグルト臭，不快臭，噛んだ後，飲み込むときのチーズ臭，ミルク臭，ヨーグルト臭，不快臭，噛んだ時の組織の硬さ，滑らかさ，うま味，苦味，酸味，がどちらが強いか，および総合評価として，どちらが好みか，という設問とした。必ずどちらか一方を選択する

という方法で行った。また，どのような香りが「チーズ臭」か，「ミルク臭」か，「不快臭」か，などは定めず，個人の判断により評価を行った。

(5) 統計処理

対照チーズと試験チーズの総遊離アミノ酸量比較はt検定で，官能評価の比較は二項検定で，有意水準5％（$P<0.05$）で検定を行った。ソフトウェアはエクセル2016を用いた。

実験結果および考察

1．熟成中の乳酸菌数および乳酸菌叢

コンテタイプチーズの熟成前，2ヶ月目，4ヶ月

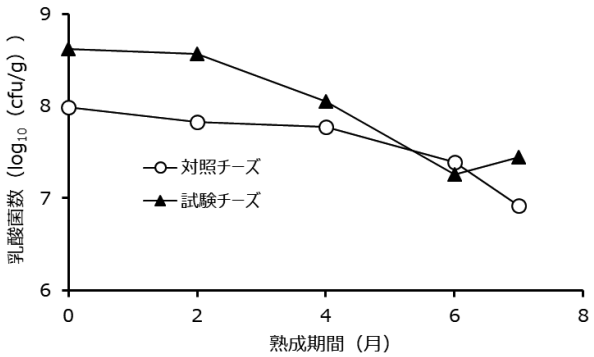

図1　試作チーズ熟成中の乳酸菌数変化

：対照チーズ，：試験チーズ

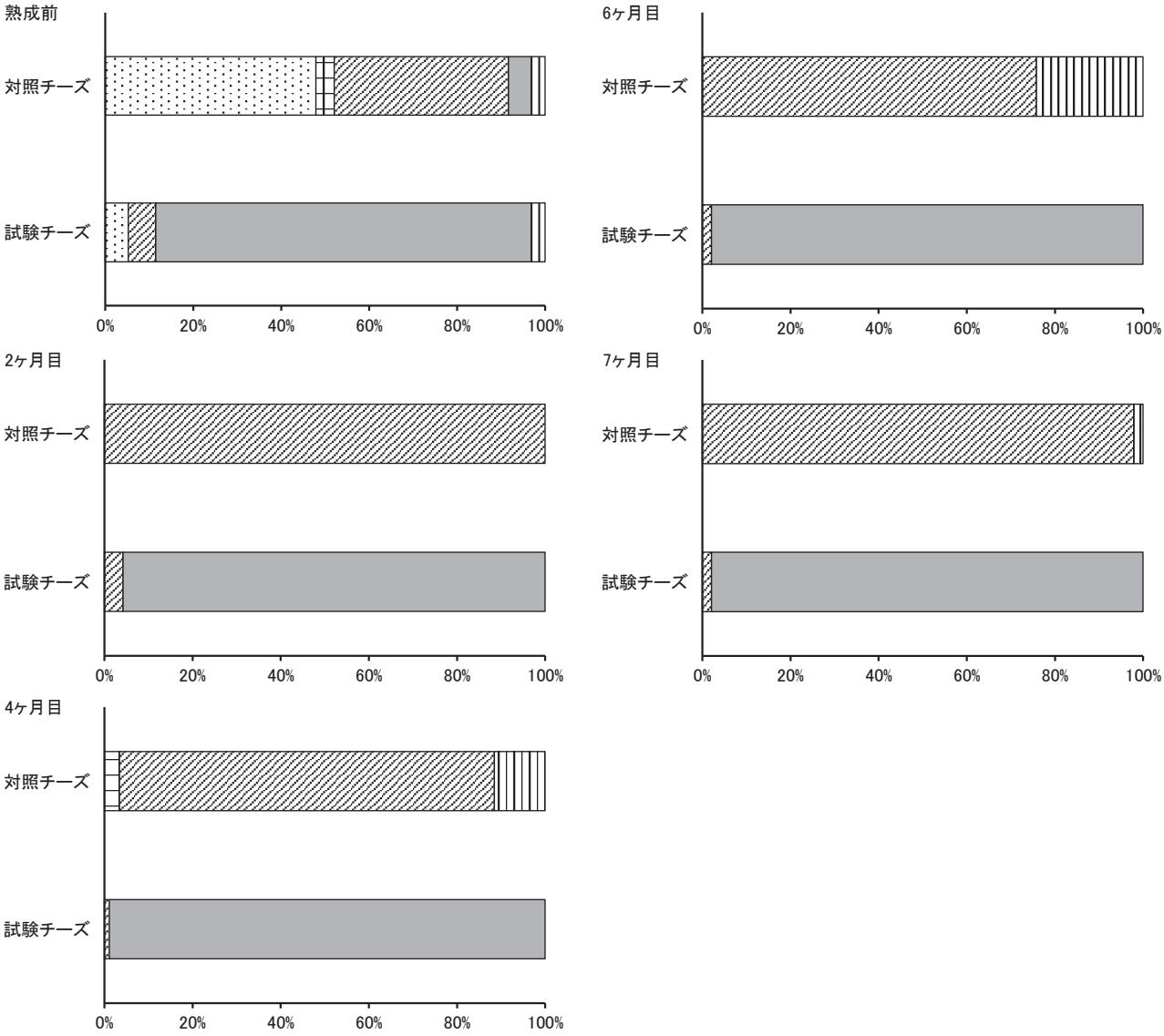

図2　試作チーズ熟成中の乳酸菌叢変化

：*S. thermophilus*，：*L. helveticus*，：*L. delbrueckii*，：*L. rhamnosus*，：other LAB

目，6ヶ月目および7ヶ月目のチーズ中の乳酸菌数および乳酸菌叢を分析した。乳酸菌数は，熟成前は試験チーズ8.6 log cfu/g，対照チーズ8.0 log cfu/gであったが，熟成につれて減少し，7ヶ月目には試験チーズが7.4 log cfu/g，対照チーズが6.9 log cfu/gとなった（図1）。乳酸菌叢は，対照チーズでは熟成前（予備乾燥終了時）はメインスターターの*S. themophilus*が約48％，*L. helveticus*が約4％，*L. delbrueckii*が約40％であったが，熟成2ヶ月目以降は*L. delbrueckii*が大半を占めるようになった。一方で試験チーズでは熟成前に約85％が既にP-17株と同じ*L. rhamnosus*であり，その後熟成期間を通じて95％以上の占有率を占めた（図2）。P-17株は北海道内で製造された熟成チーズ中から，非スターター乳酸菌として分離された菌株である。メインスターター乳酸菌に炭素源（乳糖）を消費された貧栄養化状態で，乳酸が多いという熟成チーズの環境下でも生育可能な乳酸菌株であるため，試作チーズでは*L. rhamnosus*が優勢菌種となり，かつ，菌数を高く維持していると推定した。

2．化学成分分析

(1) 総遊離アミノ酸

総遊離アミノ酸については，熟成7ヶ月で両チーズとも熟成前の約30倍まで増加し，7ヶ月目時点で試験チーズは約4900 mg/100 g，対照チーズが約4600 mg/100 gとなり，試験チーズが対照チーズより有意に多く，うま味成分が多いと考えられた（図3）。7ヶ月目の遊離グルタミン酸は試験チーズが約618 mg/100 g，対照チーズが約569 mg/100 gであり，有意に多かった（*t*-検定：$P=0.019$）。このことから，P-17株がカゼインタンパク質，ペプチドからアミノ酸への分解に寄与していると推定された。

(2) pH，水分および脂肪分

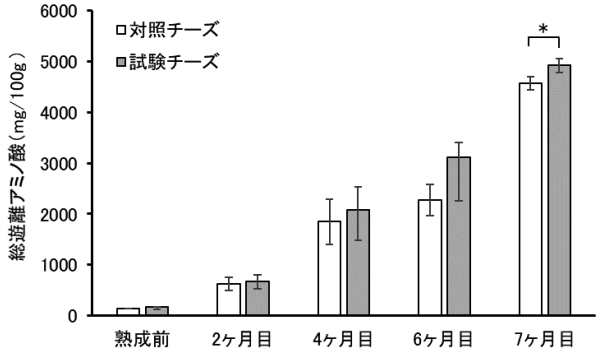

図3　試作チーズ熟成中の総遊離アミノ酸量変化
（*t*検定で有意差あり（*：$P<0.05$））

□：対照チーズ，■：試験チーズ

熟成7ヶ月目の試作コンテタイプチーズのpH，水分および脂肪分を分析したところ，対照チーズ，試験チーズとも，水分約34％，pH約6.0で，脂肪分は対照チーズが約32％，試験チーズが約29％であった。FAO/WHO国際食品規格のチーズ一般国際規格によれば，表1にまとめた結果から，対照チーズ，試験チーズともMFFB（％）が49％～56％の硬質チーズに分類されるが，FDB（％）では対照チーズが48.9％で，45％～60％の全脂肪チーズ，試験チーズは44.3％で，25～45％の中脂肪チーズに分類された。

表1　熟成7ヶ月目試作チーズ分析値

	pH	水分（％）	脂肪分（％）
対照チーズ	5.99	34.2	32.2
試験チーズ	5.97	34.6	29.0

3．官能評価

弊所職員24名（男性16名，女性8名）をパネルとした官能評価の結果は表2のとおりとなり，試験チーズは有意にミルク臭が強く，組織が硬く，うま味が強いという評価の一方，対照チーズは有意にチーズ臭や不快臭が強く，組織が滑らかである，という結果が得られた。組織の硬さと滑らかさの差は成分分析で明らかとなった脂肪分の差による可能性があると推定した。機器分析でも試験チーズと対照チーズの総遊離アミノ酸量および遊離グルタミン酸量に有意な差が認められ，官能評価の「うま味」においても有意な差が得られた（二項検定：$P=0.032$）。

表2　熟成7ヶ月目試作チーズ官能評価結果

			対照チーズ	試験チーズ
香り	鼻先で	チーズ臭**	19	5
		ミルク臭*	71	7
		ヨーグルト臭	14	10
		不快臭**	21	3
	飲み込むとき	チーズ臭	15	9
		ミルク臭*	61	8
		ヨーグルト臭	11	13
		不快臭	15	9
組織		硬さ**	22	2
		滑らかさ**	20	4
味		うま味*	71	7
		苦味	13	11
		酸味	11	13
総合評価			11	13

（二項検定で有意差あり（*：$P<0.05$，**：$P<0.01$））

要　約

既往の研究において特許出願を行ったP-17株についてチーズ用サブスターター乳酸菌としての添加効果についてコンテタイプチーズを試作・分析することで検討を行った。

乳酸菌数は熟成とともに減少したが，P-17株を添加した試験チーズの方が対照チーズの乳酸菌数より多い傾向にあった。乳酸菌叢は対照チーズではスターター乳酸菌として加えられたもののうち乳酸桿菌である*L. delbrueckii*が過半となったが，試験チーズではP-17株（*L. rhamnosus*）が90％以上となった。

総遊離アミノ酸は熟成期間中試験チーズの方が対照チーズより多い傾向を示した。熟成７ヶ月目での嗜好型官能評価では，試験チーズの方が対照チーズに比べてミルク臭が強く，組織が硬く，うま味が強いという評価であった。

コンテタイプチーズにおいて，うま味成分の指標である総遊離アミノ酸の有意な増強が認められ，それが官能的にも識別可能であることから，P-17株の添加効果が認められると判断した。

謝　辞

本研究を行うにあたり，対照チーズおよびP-17株を添加した試験チーズを製造いただいたチーズ工房に深謝します。

文　献

1）農林水産省　牛乳乳製品統計調査　令和４年

2）農林水産省　令和４年度チーズ需給表

3）八十川大輔，高谷政宏，大坪雅史，住佐太，中村正，吉田年成，北村亨，小林美穂（2020）.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．北海道立総合研究機構 食品加工研究センター研究報告　第15号，1-9

4）「乳製品試験法・注解」(1999)，日本薬学会編，金原出版株式会社