

鳥取県内の生乳から分離した乳酸菌を使用した カマンベールチーズの製造

Production of Camembert Cheese Using Lactic Acid Bacteria

Isolated from Raw Milk in Tottori Prefecture

西垣ひろ美・西尾 昭

Hiromi Nishigaki and Akira Nishio

電子・有機素材研究所 発酵生産科

鳥取県内で生産された牛生乳、ヤギ生乳から乳酸菌の分離を試み、ヤギ生乳から分離した乳酸菌が、同定試験および発酵試験の結果よりチーズ製造に使用できる乳酸菌であると考えられた。分離株を使用してカマンベールチーズの製造を行った結果、市販乳酸菌スターターを使用した場合と遜色のないチーズができることを確認した。

1. はじめに

発酵乳製品であるチーズは、日本国民1人当たりの消費量（2016年）において年間2.7 kg（1位デンマーク28.1 kg）とまだ少ないが、近年増加傾向にあり、今後さらに伸びていくことが期待される¹⁾。

チーズはワインと相性の良い食べ物とされ、どのチーズにはどのワインを合わせるといった、相性の良い組み合わせ（マリアージュ）の原則が示されている²⁾。一方、日本酒とチーズの相性はこれまでほとんど考えられてこなかったが、2015年ミラノ国際博覧会において多くの日本酒とチーズのマリアージュが提案され大好評であったとのこと²⁾で、ワインと同じようにマリアージュは十分に期待できる。

現在、鳥取県にチーズ製造企業は数社しかなく、美味しいチーズを造るための製造技術、特徴ある製品開発が課題となっている。チーズ製造には乳酸菌による乳酸発酵が必要なものが多く、発酵はチーズの味、香り、テクスチャー等を決定する重要な役割を担う。地域の特徴を持ったチーズ開発のためには、地域の自然に存在する乳酸菌を用いることが有効な方法と考えられる。

本研究では、日本酒に合う鳥取県独自のチーズ開

発を目標に、鳥取県内の生乳から新たに天然乳酸菌をスクリーニングし、分離した乳酸菌を使用してチーズを試作したので報告する。

2. 実験方法

2.1 原材料

乳酸菌の分離源として、牛生乳（鳥取県畜産農協）、ヤギ生乳（メイちゃん農場）を用いた。

乳酸菌の培養には、スキムミルク（雪印メグミルク）を蒸留水で10%（w/v）に調製し、105℃、7分間オートクレーブ殺菌した10%還元スキムミルク液を使用した。

チーズ試作には、牛生乳（畜産試験場）を用い、63℃、30分間殺菌し、使用した。

2.2 試薬

乳酸菌分離用培地は、Lactobacilli MRS Broth（Difco）を使用した。寒天培地には炭酸カルシウム1%、寒天1.6%を加えてオートクレーブ滅菌し、プレートを作製した。

チーズ製造に用いる凝乳酵素レンネットは、発酵生産キモシン CHY-MAX（クリスチャンハンセン、デンマーク）を使用した。

2.3 菌株

培養試験およびチーズ製造の対照乳酸菌として市販乳酸菌スターターCHN-11(クリスチャンハンセン)を使用した。また、チーズ製造に、白カビPCA1(*Penicillium candidum*, クリスチャンハンセン)、ジオトリカムGE0 CD1(*Geotrichum candidum*, クリスチャンハンセン)を使用した。

2.4 乳酸菌の分離

乳酸菌の分離は、Tuliniら³⁾および、鈴木⁴⁾の方法を基に一部改変して行なった。すなわち、Tuliniらの方法では、0.1%Pepton Waterで原料乳を $10\sim 10^6$ 倍に希釈し、各希釈液をMRS寒天培地上に100 μ L塗布し、30 $^{\circ}$ Cで3~4日間培養した。鈴木の方法では、原料乳を0.85%滅菌食塩水で $10\sim 10^6$ 倍に希釈し、それぞれの希釈液をシャーレに100 μ L滴下し、その上から45 $^{\circ}$ Cに冷ましたMRS寒天培地を流し入れ、寒天培地が固まった後30 $^{\circ}$ Cで3日間培養した。培養には、嫌気ジャーを用い、シャーレとともに脱酸素剤(アネロパック)を封入した。培養後、周囲の炭酸カルシウムが溶解している単一コロニー(酸生成)を滅菌楊枝で穿刺し、MRS液体培地に植菌し5日間程培養した。MRS液体培地で繁殖した菌は2回目の分離を行った。2回目以降の分離は、0.85%滅菌食塩水で培養菌液を $10\sim 10^6$ 倍に希釈し、それぞれの濃度の希釈液100 μ LをMRS寒天培地に塗布し、脱酸素剤(アネロパック)とともに嫌気ジャーに封入して、生育状況を確認しながら30 $^{\circ}$ Cで2~6日間培養した。その後、上記操作を2回繰り返して、計4回の分離を行った。

2.5 乳酸菌の同定

乳酸菌の同定は、鈴木⁴⁾の方法に従い、以下の項目について行った。

2.5.1 グラム染色

フェイバーG「ニッスイ」(日水製薬)を使用して行った。青く染色すればグラム陽性、赤ければグラム陰性。乳酸菌はグラム陽性である。

2.5.2 カタラーゼ試験

最終の培養菌液を遠心して上清を捨て、残った菌

体に、3%過酸化水素水を1mL添加し、発泡の有無を観察した。発泡がなければ、カタラーゼ陰性。乳酸菌はカタラーゼ陰性である。

2.5.3 ガス生成

MRS液体培地8mlの入ったダーラム管入りの試験管に、最終の培養菌液を10 μ L採取し、30 $^{\circ}$ Cで3日間培養した。ダーラム管に気体がたまっていればガス生成ありでヘテロ発酵、たまっていなければガス生成なしでホモ発酵をする乳酸菌と推定できる。

2.5.4 16S リボソーム DNA 配列

分離株の16SリボソームDNA配列解析は、外部機関(テクノスルガ・ラボ)に委託した。

2.6 培養特性

分離株を用いてカマンベールチーズを試作するため、濱岡ら⁵⁾の方法を参考に乳酸菌の培養特性を次のように解析した。

培養は10%(w/v)スキムミルク液での静置培養とした。分離株は冷凍保存ストックから、対照であるCHN-11は乾燥菌体から30 $^{\circ}$ Cで16~18時間培養し、これをマザースターターとした。次いで、新しい培地にマザースターターを5%(v/v)加えて30 $^{\circ}$ Cで16~18時間培養し、これをバルクスターターとした。さらに新しい培地にバルクスターターを5%(v/v)加えた被験区をそれぞれ22、30、37 $^{\circ}$ Cで培養し一定時間ごとにpH、酸度を測定した。

それぞれの測定は次のとおり行った。pHはガラス電極を用いて直接測定し、酸度は被験試料を9.0g秤量し、蒸留水20mLを加えて懸濁し、0.1mol/L水酸化ナトリウム液でpHが8.4になるまで滴定して終点を確認し、中和に消費した水酸化ナトリウム液の容量から算出した。

分離株については、生育温度が20~30 $^{\circ}$ C位の中温菌と思われたが、確認のため一部の菌株については被験区41 $^{\circ}$ Cでも上記同様の試験を実施した。

2.7 カマンベールチーズの試作

チーズの試作は、濱岡ら⁵⁾、Ricki Carroll⁶⁾、Jim Law⁷⁾を参考に一部改変して以下の工程で行なった。

2.7.1 凝乳

殺菌した原料乳の温度が 37°C になったことを確認し、乳酸菌スターターを添加し 3 分間攪拌、続いて白カビ PCA1 とジオトリカム GE0 CD1 を添加し 2 分間攪拌した。各原料の添加量は、分離株はスキムミルク液でバルクスターターを作成したうえで、原料乳の 5% (v/v) に相当する量とし、市販乳酸菌 CHN-11 は乳量 1,000L 当たり 100U 相当量とした。白カビは仕込量 1,000L に対して 4-5U、ジオトリカムは仕込量 1,000L に対して 1-2U とした。上記原料すべてを添加後 90 分静置したのち、レンネット CHY-MAX を 0.002% (w/v) 添加し 5 分間攪拌し、45 分静置した。

2.7.2 カッティング

凝乳した原料乳 (カード) にパレットナイフを刺し、澄んだホエイがしみ出るような適度な強度であることを確認したら、カードを 2.5cm 程度のサイコロ状にカットし、そのまま 15 分静置した。カードの体積が減り、大量に排出されたホエイは、カードと同レベルの高さまで排除した。

2.7.3 型詰め・ホエイ排除

直径 7.5cm (容量約 480mL) の穴あきのチーズ型にカードをすくい移し、型が一杯になるまで詰め、ホエイを漏出させた。型の中のホエイがある程度排出され、カードの体積が減り、型の反転が可能となった時点で 1 回目の反転を行った。反転は、チーズ型の上に小型の箕の子 (すのこ) を置き、手のひらでしっかり押さえ、端からチーズがこぼれないよう、もう一方の手で素早く反転させた。その後、20°C の環境に移動し、1 時間おきに 4 回反転させホエイの漏出を促進させた。

2.7.4 加塩

翌日、型からはずし、それぞれのチーズの重量を測定し、1.4% (w/w) 相当の塩をカードの両面に施した。具体的には、まず片面に 1.4% (w/w) の半量にあたる塩をすりつけ、4 時間程度静置して塩の浸透を待ち、その後、反対面に同様の操作を行った。

2.7.5 乾燥

環境温度を 16°C に下げ、庫内ファンを稼働させ、チーズ表面の乾燥を開始した。乾燥の間チーズを 1 日 1~2 回反転させた。

2.7.6 一次熟成

表面が乾燥したら、チーズをフタ付の熟成ボックスへ移動し、湿度を高く保つため、水を入れた小型ピーカーも併せて入れ、環境温度を 7°C に下げた。この間も 1 日 1 回反転させた。

2.7.7 包装

数日後、表面にうっすらと白カビが生えそろうたのを確認したら、白カビの過剰繁殖を抑制するため、チーズをクッキングシートで包んだ。

2.7.8 二次熟成

チーズを包んだ日を起点に 4~6 週間熟成させ、チーズの中心部にカードの芯がなく、内部全体がクリーム状に変質しているのを確認し完成とした。完成までの間、最初の 1 週間は 1 日 1 回、その後は 3~4 日おきに反転を継続した。

2.8 官能評価

試作した 2 種類のチーズ (分離株、市販乳酸菌) については、その風味について 20 名のボランティア評価者による官能評価を行った。官能評価は、色、匂い、味、食感について、良い 1 点・普通 2 点・悪い 3 点で評価し、チーズの好みについては選択方式、その他全般については記述式のコメントを得た。

3. 結果と考察

3.1 乳酸菌の分離

牛生乳、ヤギ生乳ともに乳酸菌の分離を 4 回行い、最終的に牛生乳からは 4 株、ヤギ生乳からは 1 株を分離することができた。

3.2 乳酸菌の同定

牛生乳から分離した 4 株 (Cow1~4) と、ヤギ生乳から分離した 1 株 (G1) についてグラム染色を行ったところ、いずれもグラム陽性であった。同じく、カタラーゼ試験を行ったところ、いずれも発泡はなく、カタラーゼ陰性であった。以上の結果より、これらは乳酸菌であると推定された (表 1)。

表1 分離した乳酸菌の簡易同定試験結果

	Cow1	Cow2	Cow3	Cow4	G1
分離源	牛生乳	牛生乳	牛生乳	牛生乳	ヤギ生乳
グラム染色	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
カタラーゼ試験	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
ガス生成	有	無	有	有	無
乳酸発酵型	ヘテロ	ホモ	ヘテロ	ヘテロ	ホモ
細胞形態	球菌	球菌	球菌	球菌	球菌

また、ガス生成試験を行ったところ、牛生乳から分離した4株のうち、3株ではガス生成が観察され、残る1株ではガス生成は観察されなかった。よって、ガス生成が観察された3株はヘテロ発酵をする乳酸菌であり、残る1株はホモ発酵菌であることがわかった。ヤギ乳から分離した1株については、ガス生成は観察されず、ホモ発酵菌であることがわかった(表1)。

分離した乳酸菌5株の16SリボソームDNAの部分塩基配列約500bpを決定し、国際塩基配列データベース(DDBJ/ENA(EMBL)/GenBank)に対してBLAST相同性検索を行った結果、高い相同率で表2のとおり種属が推定された。牛生乳から分離した3株(Cow1,3,4)は塩基配列が同じであったため同じ乳酸菌であると判断した。

3.3 培養特性

牛生乳から分離したヘテロ株 Cow1、ホモ株 Cow2と、ヤギ生乳から分離した株 G1、対照として市販乳酸菌 CHN-11 について、培養特性試験を実施した。

10% (w/v) スキムミルク液にバルクスターターを5% (v/v) 加えた被験区を、CHN-11 と Cow1

表2 分離した乳酸菌のDNA塩基配列解析

検体名	推定種属	相同率
Cow1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	498/498(100%)
Cow2	<i>Lactococcus</i> sp.	504/506(99.6%)
Cow3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	498/498(100%)
Cow4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	498/498(100%)
G1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	498/498(100%)

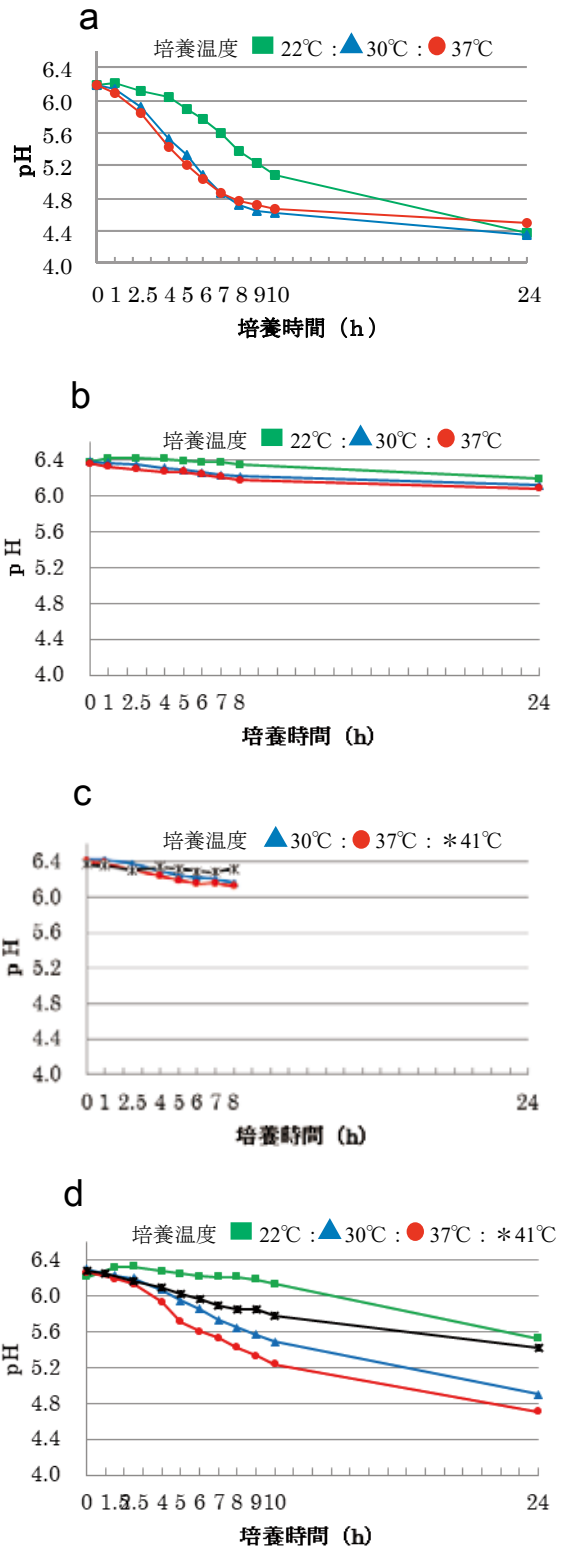


図1 乳酸菌を添加したスキムミルク液のpH低下曲線
a : 市販乳酸菌 CHN-11 (対照)
b : 牛乳より分離した乳酸菌 Cow1
c : 牛乳より分離した乳酸菌 Cow2
d : ヤギ乳より分離した乳酸菌 G1

は 22、30、37℃で、Cow2 は 30、37、41℃で、G1 では 22、30、37、41℃で培養した。温度特性が不明であったため、牛生乳から分離した 2 株については被験区をずらして実施した。対照である CHN-11 は中温菌なので 41℃の被験区培養は行わなかった。その結果、CHN-11 では 30℃と 37℃の培養温度で、開始 2~7 時間の pH 低下が同程度に顕著であり、24 時間後にはすべての温度帯で pH が 4.4 前後となった (図 1a)。Cow1 株、Cow2 株ともにすべての被験区において顕著な変化はみられず、G1 株では 37℃での pH 低下が顕著であった (図 1b~d)。酸度に関しても pH 同様、CHN-11 では 30、37℃で、G1 株では 37℃での酸生成能が高かったが、Cow1 株、Cow2 株ともにほとんど変化は見られなかった (データ非掲載)。これは、Cow1 株については 16S リボソーム DNA 配列で判明した菌種が、ほとんど酸生成しない乳酸菌である⁸⁾ ことと合致している。また、Cow2 株についてはホモ発酵菌ではあるものの、16S リボソーム DNA 配列で、チーズの乳酸菌として適応かどうか不明であったが、培養特性上適応ではないと判明した。G1 株については、pH、酸度ともに 37℃での変化が顕著ではあったが、いずれの被験区においても CHN-11 に比べ pH の低下は遅く、酸の生成能も低かった。

3.4 チーズの試作

培養特性試験で酸生成が確認された G1 株と、対照の CHN-11 を用いて原料乳各 3L でカマンベールチーズを試作した。当初、一般的なカマンベールチーズ製造に適温とされている 32℃^{6) 7)} での試作を試みたが、G1 株については、その凝固特性のせい、ホエイが排出されているにもかかわらずチーズが非常にやわらかく、塩をしたのちでも型からはずすと形状を保つことが困難であったため、G1 株の培養特性で pH 低下が顕著であった 37℃を試作の適温とした。CHN-11 についても条件をそろえるために 37℃での試作を行った。その結果、G1 株のチーズのゆるさが解消され形状を保つことができる扱いやすい性状となった。

塩の量については、明確に記載されている文献がなく、当初は市販のカマンベールチーズのパッケージに記載されている塩分濃度(2%)を参考にしたが、非常に塩味の強いチーズが出来上がったため、塩量を検討した結果 1.4% (w/w) が適当と判断した。チーズ内部の塩分濃度を塩分濃度計で測定した結果、2% (w/w) の塩を施したチーズの塩分濃度は 1%程度、1.4% (w/w) の塩を施したチーズは 0.6%程度であった。

3.5 官能評価

試作品の風味について健常成人 20 名のボランティア評価者による官能評価を行った。その結果、G1 株のチーズは、色 1.1、匂い 1.7、味 1.6、食感 1.3 であり、対照の CHN-11 チーズの、色 1.7、匂い 1.6、味 1.4、食感 1.4 という結果と比べても遜色ない良好なものであった。また、好みについては、G1 株チーズを好んだ評価者が 9 名、CHN-11 チーズを好んだ評価者が 11 名と、大差はなかった。G1 株チーズについては、癖がなく食べやすいというポジティブなコメントが目立ったが、それ故にか、味が淡泊、特徴がない、物足りないなどを感じる評価者も目立った。CHN-11 チーズについては、お酒やワインに合いそうと感じた評価者が多かった。他には、味が濃い、塩辛い、アンモニア臭を感じるなどが目立った。

4. おわりに

鳥取県内で生産された牛生乳、ヤギ生乳から乳酸菌をスクリーニングし、分離した乳酸菌を使用してカマンベールチーズを試作した結果、以下の知見が得られた。

- (1) 牛生乳から 4 株、ヤギ生乳から 1 株の計 5 株の乳酸菌を分離することができた。
- (2) その内ヤギ生乳から分離した乳酸菌が、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* と推定され、培養特性試験よりチーズ製造に使用できる乳酸菌であると考えられた。
- (3) 分離株を使用してカマンベールチーズの試作を行った結果、市販乳酸菌スターターを使用した

場合と遜色のない良好なチーズが製造可能であることを確認した。

乳酸菌スターターの特徴，チーズを科学する，株式会社幸書房，p.33

謝辞

快く生乳を提供していただきました、鳥取県畜産農協、メイちゃん農場、鳥取県畜産試験場の皆様に深謝いたします。

文献

- 1) 農林水産省；平成 29 年度チーズの需給表
- 2) 斎藤忠夫；チーズの科学（ブルーバックス），株式会社講談社，p.75（2016）
- 3) Fabricio L Tulini, Nolwenn Hymery, Thomas Haertle, Gwenaelle Le Blay, and Elaine C P De Martinis ; Screening for antimicrobial and proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from cow, buffalo and goat milk and cheeses marketed in the southeast region of Brazil, Journal of Dairy Research, 83, p.115-124 (2016)
- 4) 鈴木チセ；4.基本的な実験操作 1) 食品からの乳酸菌の分離・簡易同定に関する操作，平成 20 年度農林水産省補助事業（食料産業クラスター展開事業）食品機能性評価マニュアル集第 III 集，社団法人日本食品科学工業会，p41-48 (2008)
- 5) 濱岡直裕，八十川大輔，奥村幸広，中川良二，田中達大；北海道内で分離した乳酸菌 *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* を利用したモッツァレラチーズ製造技術，Nippon Shokuhin Kogaku Kiashi, 64(3), p.132-138 (2017)
- 6) Ricki Carroll；Camembert, Home Cheese Making, recipes for 75 homemade cheeses, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data , p.158-159 (2002)
- 7) Jim Law, 翻訳：亀和田俊一，カマンベール，〈職人技がわかる本〉キッチンで始める職人チーズ作り，アールアイシー出版株式会社 2010, p.144-146 (2010)
- 8) NPO 法人チーズプロフェッショナル協会；3.2.2