

# 十勝産発酵食品における品質向上のための製造技術の検討（第1報）（平成16年度）

研究開発課 葛西大介、大庭 潔、永草 淳

## 1. 研究の目的と概要

現在、管内のチーズ生産は活発化しており、良質な手作りチーズに付加価値を与え、消費者へ強力なアピールを行うため、「十勝ブランド」の認証品目にも選定された。しかし、乳製品の食中毒事故が散発する中、消費者の信頼を得るための説得力ある製造、検査への取り組みが必要とされている。検査体制は「十勝圏ナチュラルチーズ品質管理研究会」において、定期的な微生物検査が実施されているところではあるが、より積極的な衛生危害防止への取り組みとして抗菌性物質(ナイシン)を産生する市販乳酸菌スターターを使用した衛生危害の低減、異常発酵の低減について検討を行い、実製造へ導入するための知見を得た。

## 2. 試験研究の方法

### (1) 衛生危害対象菌

乳酸菌スターターが産生したナイシンの抗菌性を確認するため、*B.cereus* NBRC15305、*S.aureus* NBRC15035、*L.monocytogenes* ATCC7644、*C.butyricum* NBRC13949を用いた。

前3者は食中毒危害菌、後者はチーズ膨張を引き起こす品質低下危害菌である。

### (2) 標準試薬<ナイシン A (Sigma)>による試験

抗菌スペクトルの確認は各対象菌に適した寒天培地(前3者はトリプトソイ寒天、後者は変法 GAM 寒天)に各対象菌を別個に表面塗抹し、乾燥後、50~500ppmの標準ナイシン液を10 $\mu$ l滴下し、阻止円の有無を確認した。

最少発育阻止濃度(MIC)は前3者はアガーウェル法、すなわち予め一晚培養した各対象菌液を別個に混釈した1%トリプトソイ寒天培地に直径6mmの穴(ウェル)を開け15分間乾燥後、1~500ppmの標準ナイシン液20 $\mu$ lを各ウェルに滴下し、37 $^{\circ}$ Cで1晩培養した。判定は阻止円が10mm以上のとき生育阻止されたと定義し、阻止円が10mm前後となる数段階の濃度の直径を測定して阻止円直径とナイシン濃度の相関を求め、このときの近似式(相関係数は全て $r^2=0.98$ 以上)から、直径10mmとなるときナイシン濃度をMICとした。後者は試験管にダーラム管を入れたBryant-Burkeyブイヨン培地に一晚嫌気培養した酪酸菌液を50 $\mu$ l添加し、各試験管に10~50ppmとなるようにナイシンを添加して37 $^{\circ}$ Cで一晩嫌気培養し、ガス産生の有無でMICを求めた。

### (3) ナイシン産生乳酸菌以外の抗菌性試験

他の市販乳酸菌スターターの抗菌性

比較試験としてCHR-HANSEN社製CH-N11(ハードタイプ用)、TCC-3(フレッシュタイプ用)(野澤組)を用いて10%脱脂粉乳培地、pH7.0、37 $^{\circ}$ C、8時間培養し、各培養液をBS-10培養液とともにアガーウェルに滴下して阻止円の有無を確認した。

pH、乳酸の抗菌性に与える影響

1%乳酸にリン酸水素二Na粉末を加えてpH3.0~6.0の4緩衝液を作成し、BS-10培養液とともにアガーウェルに滴下して阻止円の有無を確認した。

### (4) ナイシン産生市販乳酸菌スターターによる試験

市販乳酸菌スターターはCHR-HANSEN社製BS-10(野澤組)を使用した。

試験培地は実製造に近づけるため脱脂粉乳培地を用い、121 $^{\circ}$ C、15min滅菌後、試験に供した。培養試験は温度(32 $^{\circ}$ C及び37 $^{\circ}$ C)、基質濃度(8、10、12%)、初発pH(7.0、6.5、6.0)

を変えた条件で BS-10 を 50  $\mu$ l/L 添加して 0~8 時間培養し、その間の pH、乳酸酸度、乳酸菌数、ナイシン濃度を比較した。pH は pH メーター、乳酸酸度は 0.1N NaOH による滴定、乳酸菌数は標準寒天混濁培養法を用いて 48 時間後に測定した。ナイシン濃度は各条件での各時間における培養液を原液、5 倍、10 倍、15 倍、20 倍希釈液に調製し *L.monocytogenes* を混濁したアガーウェルを用いて標準ナイシン MIC と同様に阻止円直径を測定し、10mm 前後となる希釈段階の阻止円直径と希釈倍率の相関を求め、このときの近似式(相関係数は全て  $r^2=0.98$  以上)から、直径 10mm となるときの希釈倍率を計算し、*L.monocytogenes* の標準 MIC (直径 10mm のときの標準ナイシン濃度) に希釈倍率を乗じて産生ナイシン濃度を求めた。

### 3. 試験研究の結果

#### (1) 標準試薬<ナイシン A>による試験

*B.cereus*、*L.monocytogenes*、*C.butyricum* は 50ppm で阻止円が確認され、*S.aureus* も 100ppm で阻止円が確認された。この結果を参考に *B.cereus*、*L.monocytogenes*、*S.aureus* を別個に混濁したアガーウェルに 6~8 段階の濃度の標準ナイシン液を滴下し、形成された阻止円の直径とナイシン濃度(ppm)の相関を求めたところ、全ての対象菌において高い相関係数を示したため、このときの近似式から最少発育阻止濃度(MIC)を求めた。また、*C.butyricum* は標準ナイシンを含むブイヨン培地による培養試験において 18ppm 以下の全ての試験管でガス産生が見られ、20ppm 以上の全ての試験管でガスの産生が見られなかった。以上の結果を表 1 にまとめた。

	MIC
<i>L.monocytogenes</i>	28
<i>S.aureus</i>	111
<i>B.cereus</i>	46
<i>C.butyricum</i>	20

表 1) 各対象菌の標準 MIC (ppm)

このことから、本試験に供した衛生危害対象菌のうち、*S.aureus* が最も発育を抑制しにくいことが示唆され、逆にいえばナイシン産生乳酸菌スターターの使用により *S.aureus* の発育を阻止するナイシン濃度がチーズ中に産生されれば、他の対象菌も十分に阻止することができるかと推察された。

#### (2) ナイシン産生乳酸菌以外の抗菌性試験

他の市販乳酸菌スターターの抗菌性を確認したところ BS-10 に大きな阻止円が形成された反面、他の 2 者には阻止円が形成されず、抗菌性がないことが確認された。また、pH や乳酸の抗菌性に与える影響を確認したところ、各 pH に調製した乳酸緩衝液に阻止円形成は見られず、通常の乳酸菌培養で得られる pH や乳酸濃度では抗菌性を示さないことが確認された。

#### (3) ナイシン産生市販乳酸菌スターターによる試験

温度の比較では pH、乳酸酸度に大きな違いは見られなかったが、乳酸菌数、ナイシン濃度は 32 の方が高くなることが示唆された。基質濃度の比較では pH に差は見られなかったが、乳酸酸度では基質濃度が高くなるにつれて高い値を示した。

乳酸菌数とナイシン濃度は 8%と 10%で大きな違いは見られなかったが、12%では乳酸菌数、ナイシン濃度ともに他の濃度より高くなることが示唆された。初発 pH の比較では pH の低下度合いは初発 pH が高いほど多く低下したが、乳酸酸度、乳酸菌数、ナイシン濃度は初発 pH6.5 が最も高く、初発 pH7.0 が最も低かった。また、ナイシン濃度は全ての条件においてスターター添加時 0 時間で既に 100ppm 前後を含んでおり、培養 2 時間後には対象菌中最も阻止しにくいと推察される *S.aureus* の MIC を超えた。このことはチーズ製造工程においてホエイ排除までの間に十分に危害対象菌に対する抗菌性を付与できることを示唆するものと考えられた(図 1)。

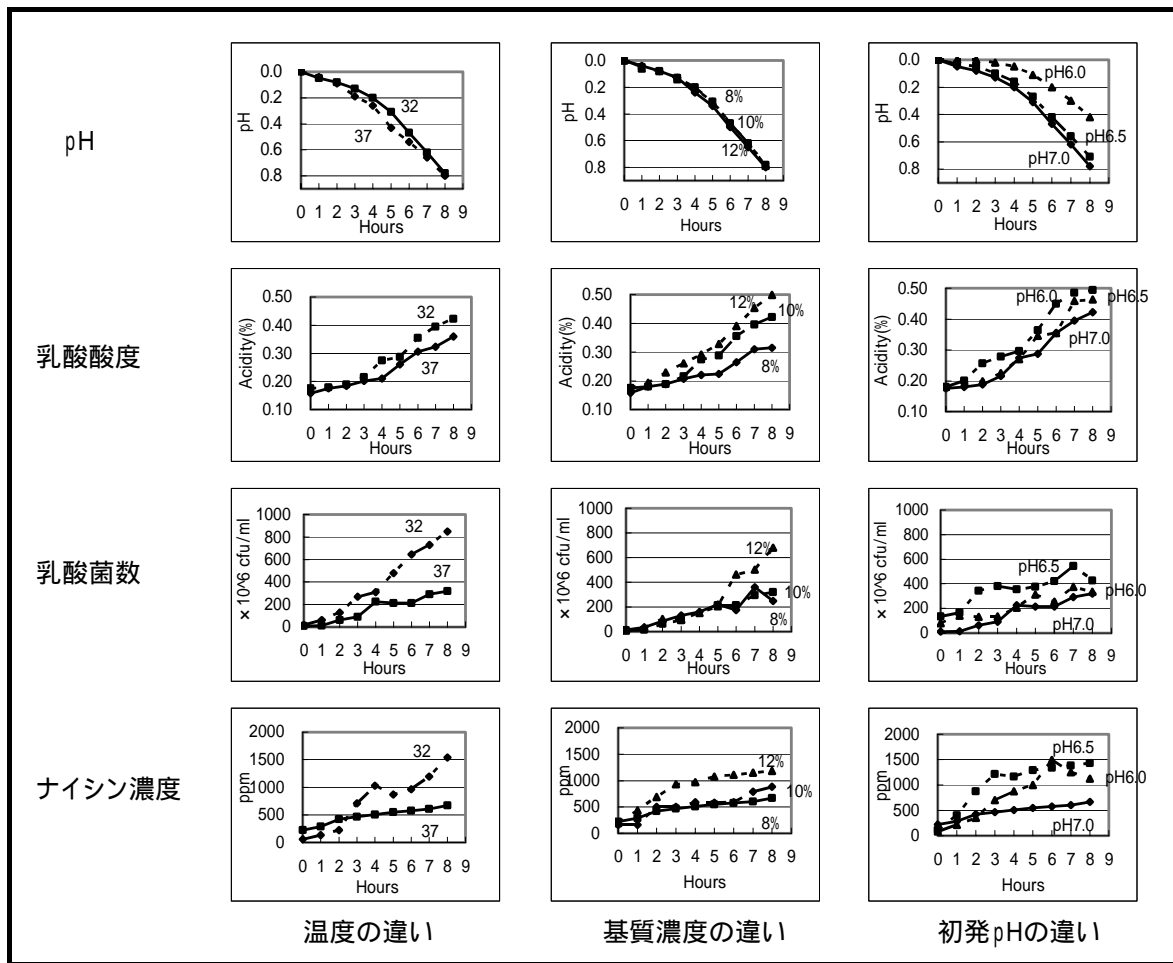


図 1) 各培養条件を変えたときの pH、乳酸酸度、乳酸菌数、ナイシン濃度の経時変化

#### 4. まとめ

ナイシン産生市販乳酸菌スター-BS-10 をチーズ製造に導入するための基礎的な知見を得た。

培養条件としては 37 よりも 32 の方がナイシン産生量が高く、フレッシュタイプよりむしろハードタイプの製造で大きな効果が得られると考えられた。また、基質濃度については通常原料の無脂乳固形分でも問題はないが、脱脂粉乳を添加して固形分を上げることで大きな効果が得られると考えられ、これを目的とした新しいチーズの製造を検討することも可能と考えられた。初期 pH については pH6.5 前後が最もよく、通常の原料乳の pH も 6.7 程度であることから、あまり調整の必要はないと考えられた。これらの結果から、BS-10 の使用は危害対象菌について十分な抗菌性を付与し、高品質（低衛生危害）なチーズ製造を可能とすることが示唆された。

しかし、BS-10 単独では風味に奥行きがなく、多種類のタイプがあるチーズ生産に対応しにくい。また、複数のチーズ生産者が独自の風味のチーズを開発する際にも開発の幅を狭めてしまうため、他の市販乳酸菌スターとの複合使用が絶対条件となる。今後は本年度に得られた知見を基に、他の市販乳酸菌スターとの複合使用を検討し、実際にチーズを試作して抗菌性の評価を行い、管内のチーズ生産者に高品質（低衛生危害）チーズ製造のための一手段として提案を行う予定である。

### 1. 研究の目的と概要

十勝管内で生産される良質な手作りチーズについて、より積極的な衛生危害低減、異常発酵の防止を目的としてナイシン産生性市販乳酸菌スターターBS-10を使用した製造方法の検討を行った。昨年度は衛生危害菌に対する効果を確認し、通常の製造方法でも効果が期待できることを報告した。そこで、本年度は他の市販乳酸菌スターターに対する影響の確認と、ナイシンを有効に活用する製造方法について検討を行った。

### 2. 試験方法

#### (1) 他の市販乳酸菌スターター

ナイシンの乳酸菌に対する影響を確認するため、市販複合スターターとしてCH社製CH-N11、CH-N22、TCC-3、DANISCO社製PROBAT505を、単一菌株として当センター保有菌株から*L.lactis*、*L.cremoris*、*L.diacetilactis*、*S.thermophilus*、*L.bulgaricus*、*L.acidophilus*、*L.casei*を用いてアガーウェル法（前報参照）にて抗菌スペクトル及び最少発育阻止濃度（MIC）を評価した。

#### (2) BS-10を用いたゴーダタイプチーズの試作

HTST牛乳1LにBS-10をスターターとして0.005~2.000%まで添加し、30分間、32℃で培養後、塩化カルシウム0.01%並びにレンネット0.004%を添加してよく攪拌後、静置した。約30~40分後に凝乳度合を見てカッティングを行い、10分後にクッキングを開始して30分間で38℃まで昇温してホエイを排除し、型詰めして5kg・1時間、10kg・2時間のプレスを行った。その後、型から取り出し、製品重量に対して3%の食塩をすり込み、一晩室温乾燥させてから10日の冷蔵庫で熟成した。

#### (3) チーズからのナイシン抽出

熟成チーズからのナイシン抽出はチーズを蒸留水で3倍希釈し、ポリトロンホモジナイザーで均質化後、ろ液（TOYO5A）を更に0.20µmDISMICフィルターで除菌して試験に供した。

#### (4) ナイシンの定量

ナイシン抽出液を試験液としてアガーウェル法（前報参照）を用いて定量を行った。

### 3. 結果と考察

#### (1) 他の市販乳酸菌スターターに対する影響

標準ナイシン試薬ナイシンA（Sigma製）を用いて、他の市販乳酸菌スターターに及ぼす影響を評価したところ、複合スターターではCH-N11、TCC-3はナイシンに対する感受性が高く、少ない濃度で生育を阻止された。これに対してCH-N22とPROBAT505はナイシンに対して比較的耐性を有した（図1）。

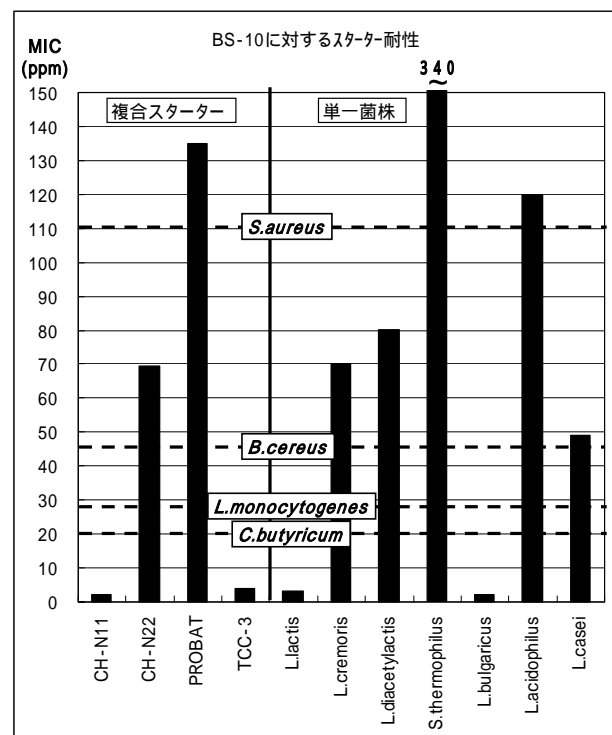


図1 各乳酸菌スターターのナイシン耐性

CH-N11、CH-N22 及び PROBAT505 は複合された菌種構成は同一であるにもかかわらず、ナイシン耐性に差があらわれた理由はスター製品中の菌株の違いや配合割合の違いによるものと考えられた。

そこで、単一菌株でのナイシンの影響を確認したところ、*L.lactis*、*L.bulgaricus* はナイシンに対する感受性が高く、少ない濃度で生育を阻止された。これに対して *S.thermophilus*、*L.acidophilus* はナイシンに対して比較的耐性を有した (図 1)。

この結果は BS-10 と他の市販乳酸菌スターの併用によりチーズ製造をする場合のスター選択の判断材料として利用できると考えられた。すなわち、BS-10 を用いて酪酸菌、リステリア菌、セレウス菌を抑制しながら、他の乳酸菌併用による風味改良を行うには *L.cremoris*、*L.diasetilactis*、*S.thermophilus*、*L.acidophilus*、*L.casei* を選択する必要があるが、逆に *L.lactis*、*L.bulgaricus* を併用しても効果を期待できないことが示唆され、複合スター使用時にもこれを考慮する必要があると考えられた。

#### (2) BS-10 添加量の違いによるナイシン生成量

BS-10 をスターとして 0.005 ~ 2.0% まで添加したチーズを試作し、各々の熟成中のナイシン生成量を測定した結果、0.1% 以上の添加で酪酸菌阻止濃度以上のナイシンが生成されることを確認したが、コストが市販スターの 10 倍以上になった。コスト的には 0.005 ~ 0.01% が望ましいが、この添加量では十分なナイシンが生成されないことが示唆された (図 2)。このため、コストに見合う添加量で十分なナイシン生成を促す製造方法を検討する必要があった。

#### (3) ナイシン生成に有効な製造方法の検討

BS-10 添加量 0.005% で衛生危害菌を抑制するナイシン量を生成する製造方法を検討した結果、原料乳にスターを添加後、20 で一晩の培養を行ってからレンネットを添加して製造を進めることで、40ppm のナイシンを生成することができた (図 3)。この方法は決して特殊な方法ではなく一部のチーズにおいて採用される方法であり、導入については設備や製造計画を検討することで可能と考えられた。

### 4. まとめ

ナイシン産生市販乳酸菌スター BS-10 の使用は危害対象菌について十分な抗菌性を付与し、高品質 (低衛生危害) なチーズ製造の可能性を示唆した。しかし、通常の使用量では危害菌抑制のための十分なナイシン量を生成できない可能性が示唆され、逆に危害菌を抑制しうる使用量では高コストとなることが示唆された。このため、通常の使用量でも効果を発揮する製造方法の検討を行い、スター添加後、長時間の低温培養工程を加えることで効果を期待できることが示唆された。

今後はさらなる製造方法の検討を行うとともに、BS-10 とともに他の微生物 (乳酸菌、カビ、酵母など) を併用した場合のナイシン量の経時的な変化を確認し、試作を重ねることで実製造への導入について提案を行いたい。

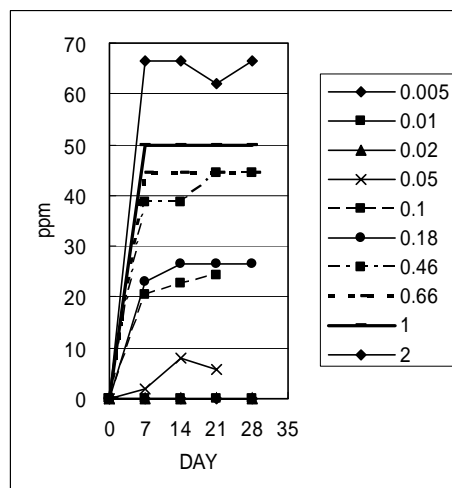


図 2 添加量とナイシン生成量

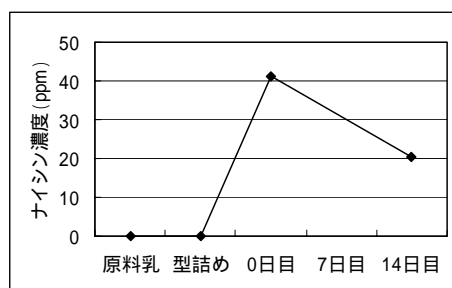


図 3 製造方法の検討

# 十勝産発酵食品における品質向上のための製造技術の検討（第3報）（平成18年度）

研究開発課 葛西大介、大庭 潔、永草 淳

## 1. 研究の目的と概要

管内で生産される良質な手作りチーズについて、より積極的な衛生危害低減、異常発酵の防止を目的としてナイシン産生性市販乳酸菌スターターBS-10（CH社）を使用した製造方法の検討を行った。これまで、衛生危害菌及び市販乳酸菌スターターに対するナイシンの効果を確認するとともに、ナイシンの生産性を向上する、より効率的な製造方法について報告した。そこで、本年度は新たにチーズ製造に用いられる他の微生物（酵母、白カビ、プロピオン酸菌）についてもナイシンの影響を検討し、BS-10を有効に活用するチーズ製造方法について更なる検討を行うとともに、実際に酪酸菌を添加したチーズを試作してBS-10による酪酸菌抑制効果の検証を行った。

## 2. 試験方法

### (1) 使用菌株と微生物数測定

衛生危害菌として *L.monocytogenes* ATCC7644（リステリア）、*B.cereus* NBRC15305（セレウス）、*C.butyricum* NBRC13949（酪酸菌）を用いた。乳酸菌は昨年度の試験で最もナイシンに耐性を示した *S.thermophilus*（センター保有株）を用いた。チーズ製造に利用される他の微生物として *K.lactis* M-28 株（酵母、帯広畜産大学保有株）、*P.camemberti*（白カビ、チーズ分離株）、PS-1（プロピオン酸菌、CH社）を用いた。

微生物数の測定には、各微生物に応じた培地と培養条件で測定を行った（表1）。

### (2) 乳、ホエイ及びチーズからのナイシン抽出と定量

乳、ホエイはそのまま 80℃、15min.の加熱殺菌後、上澄みを 0.20µm DISMIC フィルターでろ過し、ろ液を必要に応じて減圧濃縮してナイシン定量に供した。チーズは蒸留水で2倍希釈し、ポリトロンホモジナイザーで均質化後、乳、ホエイと同様に殺菌し、上澄みのろ液をナイシン定量に供した。

ナイシンの定量はナイシン抽出液を試験液としてアガーウェル法（第1報参照）を用いて定量を行った。

### (3) 化学分析

pHの測定はpHメーター（TOA HM-50V）、乳酸酸度（LA）の測定はフェノールフタレインを指示薬としたNaOH滴定法（乳酸表示法）により測定した。有機酸分析はHPLCポストカラム法（図1）を用いて分析した。

### (4) ゴータタイプチーズの試作（酪酸菌抑制試験）

ネガティブコントロールは、生乳15LにCH-N11をスターターとして0.45g添加し、30分間、32℃で培養後、塩化カルシウム0.01%並びにレンネット0.004%を添加してよく攪拌後、静置した。約30~40分後に凝乳度合を見てカッティングを行い、10分後に攪拌を開始して30分間で38℃まで昇温してホエイを排除した。その後、型詰めしてホエイ中で予備圧搾（4kg・30分間）、本圧搾8kg・1時間、12kg・一晩のプレスを行った。プレス後、型から取り出し、製品重量に対して3%の食塩をすり込み、14℃、RH80%で1週間乾燥させ、12℃、RH90%の恒温恒湿装置内で熟成した。

表1 微生物測定培地と条件

リステリア	トリプトソイ寒天培地(日本)35℃
セレウス	NGKG寒天培地(日本)30℃
酪酸菌	変法GAM寒天培地(日本)、アネロバック使用35℃ クロストリジア測定用培地(日本)、パウチ使用35℃
乳酸菌	BCP寒天培地(栄研)35℃
酵母	PDA寒天培地(栄研)25℃
白カビ	PDA寒天培地(栄研)25℃
プロピオン酸菌	BCP寒天培地(栄研)、アネロバック使用35℃

### 有機酸HPLC条件

HPLC: TOSO 8020 series  
Column: Shodex RS Pack KC-811 × 2  
Eluent: 4.8mM HClO<sub>4</sub>  
Reagent: 1/10 ST3-R (for post-column method)  
Flow rate: Eluent 1.0ml/min. Reagent 1.1ml/min.  
Detector: UV-Vis 430nm  
Col.Temp.: 50℃

図1 HPLC分析条件

ポジティブコントロールは、ネガティブコントロールに予め培養して菌数を確認した酪酸菌液を 16.5cfu/ml となるよう添加し、同様に製造した。

BS-10 試験区は、生乳 15L に BS-10 をスターターとして 0.005% 添加し、さらに酪酸菌液を 16.5cfu/ml となるよう添加して 20 一晚培養（エージング）後、32 まで加温して塩化カルシウム、レンネットを加え、他のチーズと同様に製造した。

### 3. 結果および考察

#### (1) 衛生危害菌へのナイシンの影響評価

これまで、衛生危害菌のナイシン耐性を最少発育阻止濃度（MIC）として微生物検査培地で評価してきた（第 2 報参照）が、実際のチーズ製造でも同様の結果が得られるか確認するため、標準ナイシン試薬ナイシン A（Sigma 製）50ppm を含む滅菌した 10% ホエイ培地に衛生危害菌を個別に添加（セレウスは 100ppm ナイシンとした）し、その生菌数の変化とナイシンの残存量を測定した。各衛生危害菌は予め培養して菌数を確認した培養液を表 2 の菌数となるよう添加した。この菌数は通常、汚染があった場合の初発菌数の 10~100 倍の量として設定した。培養条件は個別に設定し、リステリア菌は 35 で好気培養、セレウス菌は 30 で好気培養、酪酸菌は 35 でアネロパックを用いて嫌気培養した。

この結果、ナイシン存在下でのホエイ培地中の各衛生危害菌はいずれも培養開始 1 日目で未検出となり、その後 14 日間未検出のままだった。このときのナイシン残存量はリステリア菌、酪酸菌とも変化がなかったが、セレウス菌においては経時的にナイシン量が減少した（図 2）。

このことから、リステリア、酪酸菌はナイシンを消費しないことが示唆されたが、セレウスは抑制されながらもナイシンを消費している可能性が示唆された。

食品の汚染においては、菌数の少ない汚染初期に生育を抑制することが重要であり、本試験結果はチーズ製造開始時点で原料乳に十分な量のナイシンが存在すれば、この汚染初期の生育を抑制し衛生危害を防止する可能性があることを示唆した。従って、実際のチーズ製造においても、BS-10 により十分なナイシン量を生成することができれば、衛生危害のリスクを低減させることができると考えられた。

表 2 初発菌数の設定

リステリア	100cfu/ml
セレウス	10cfu/ml
酪酸菌	10cfu/ml

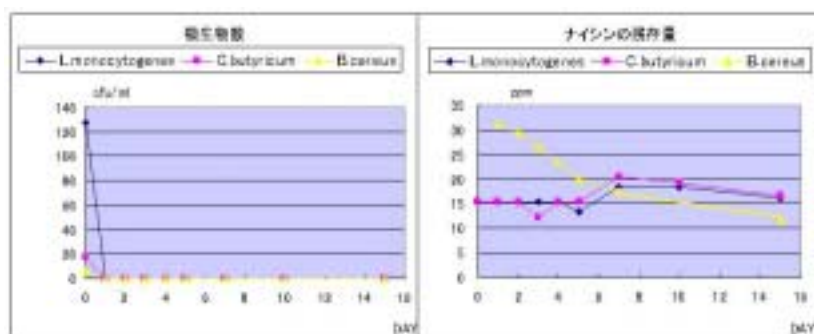


図 2 衛生危害菌の菌数変化とナイシン残存量

#### (2) チーズ用微生物へのナイシンの影響評価

これまで、チーズ用微生物として市販乳酸菌スターターのナイシン耐性を最少発育阻止濃度（MIC）として微生物検査培地で評価してきた（第 2 報参照）。本年度は新たにカマンベールタイプに使用される *P.camemberti*（白カビ）、ソフトタイプチーズに使用される *K.lactis*（酵母）のほか、エメンタールチーズに使用される PS-1（プロピオン酸菌）の MIC を測定した。この結果、白カビ、酵母はナイシンの影響を受けないが、プロピオン酸菌は乳酸菌同様、ナイシンの影響を受けることが示唆された（表 3）。

このことから、カマンベールタイプやその他のソフトタイプチーズの製造において、乳酸菌以外はナイシンの影響を受けず、比較的チーズ製造が行いやすいと考えられたが、エメンタールチーズはプロピオン酸菌により特有の風味とチーズアイ（ガスホール）を形成しているため、BS-10 を併用してチーズを製造することは困難であると考えられた。

そこで、微生物検査培地ではなく、実際のチーズ製造でも同様の結果が得られるか確認する



表 3 各微生物の MIC

白カビ	1000ppm以上
酵母	1000ppm以上
プロピオン酸菌	26.6ppm

表 4 初発菌数の設定

乳酸菌	$1.3 \times 10^5$ cfu/ml
白カビ	$1.0 \times 10^7$ cfu/ml
酵母	$1.4 \times 10^6$ cfu/ml

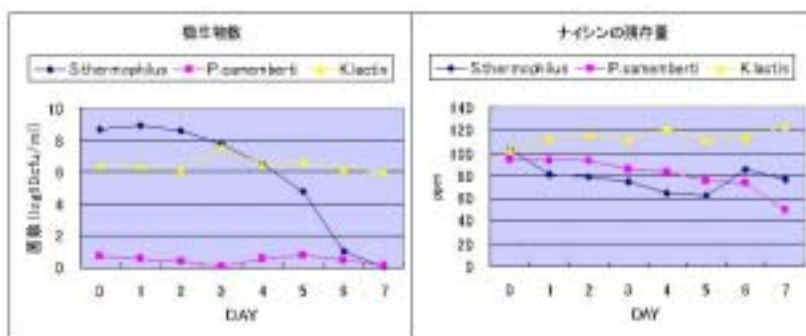


図 3 チーズ用微生物の菌数変化とナイシン残存量

ため、前項同様標準ナイシン 100ppm を含む滅菌した 10%ホエイ培地にチーズ用微生物を個別に添加し、その生菌数の変化とナイシンの残存量を測定した。

チーズ用微生物としては昨年度の試験で最もナイシン耐性を示した *S. thermophilus* を乳酸菌の代表として試験に供し、本年度の試験で耐性が確認された *P. camemberti* (白カビ) *K. lactis* (酵母) を試験に供した。各微生物は予め培養して菌数を確認した培養液を表 4 の菌数となるよう添加した。この菌数は通常、チーズ製造の初期段階の量として設定した。培養条件は個別に設定し、乳酸菌は 35 で好気培養、白カビ、酵母は 25 で好気培養した。

この結果、白カビ及び酵母の菌数は変化がなかったが、乳酸菌の菌数は耐性 (MIC340ppm) があるにも関わらず培養開始 2 日目から減少し始め、7 日目で未検出となった。このときのナイシン残存量は酵母では変化がなかったが、白カビ、乳酸菌では暫減していた (図 3)。

このことから、MIC の結果と同様、白カビと酵母はナイシンの影響を受けず、これらを使用したチーズの製造は比較的行いやすいことが示唆された。しかし、乳酸菌は比較的ナイシン耐性を有するものを使用しても時間の経過とともに死滅することが推測され、BS-10 と他の乳酸菌との併用が難しいことを示唆した。

本試験では、ナイシン濃度 100ppm という高濃度での試験を実施しており、実際に BS-10 を使用したチーズ製造ではこれほどの量のナイシンは生成しないと考えられる。このため、今後、もっと低いナイシン含有量のときの菌数の動向についても検討を行う必要があった。

### (3) ナイシン生成に有効な製造方法の検討

#### ナイシン生成要因の検討

昨年度の試験で、BS-10 を用いて衛生危害菌を抑制するナイシン量を生成する製造方法を検討した結果、原料乳にスターターを添加後、低温 (20 以下) で一晩の培養を行ってからレンネットを添加して製造を進める <エージング工程> が必要であることを報告した。そこで、エージング工程で効率良くナイシンを生成する要因について検討を行った。乳酸酸度無調整区、+0.1%乳酸添加区、+0.2%乳酸添加区の 10%ホエイ培地を作成し、各々について HCl または NaOH で初発 pH を 6.4、6.0、5.0 とした時の BS-10 (0.005%添加) のナイシン生成量を測定し、乳酸菌数、生成した乳酸量、最終的な全乳酸量、初発 pH とナイシン生成量に関係があるか検討した。

この結果、乳酸菌数が同等でも初発 pH によってナイシン生成量が違うことや生成乳酸量、最終的な全乳酸量の傾向とナイシン量の傾向が一致せず、初発 pH がナイシン生成量と大きな関連があることが示唆された (図 4)。このため、これらの各項目とナイシン生成量について近似式を求め、相関の有無を検討した結果、初発 pH とナイシン生成量に高い相関 ( $R^2 = 0.934$ ) が認められた。

このことから、エージング工程でナイシンを効率よく生成するためには、pH6.0 前後の初発 pH が必要と考えられた。

しかし、実際のチーズ製造でこのような低 pH の原料乳からチーズを製造してはカード不良により良質なチーズは期待できない。このため、いかに初発 pH を低下させずに、ナイシンを生成するかが課題となった。





図4 ナイシン生成要因の検討

#### 共役スターターの利用

初発 pH を低下させずにナイシンを生成する方法として、エージング中に pH を低下（チーズ製造に悪影響を及ぼさない程度に）させることを目的に、pH 低下のための共役スターターの添加を検討した。使用する共役スターターとしては乳酸生成力が高く、速やかな pH 低下が見込める *S.thermophilus* と *L.helveticus* を使用した。

10%ホエイ培地に BS-10 を 0.005%添加すると同時に共役スターターを 0.5、1.0、2.0%添加して 15、16 時間エージングを行い、その後 32 に昇温してレンネットを添加して 5 時間の培養を行った。このときのナイシン生成量と pH を測定した結果、どの試験区でもエージング終了時（レンネット添加時）の pH は最低 6.4 とチーズ製造が可能な pH といえた。また、エージング終了時のナイシン生成量はどの試験区でも大差のないものであったが、レンネット添加後 5 時間の時点では *L.helveticus* を添加した試験区で対照区に比べてナイシン生成量が多くなることが示唆された（図 5）。

この時点は実際のチーズ製造においては型詰め後の圧搾時に相当し、共役スターターとして *L.helveticus* を用いることでナイシンの生成量が増加する可能性が示唆された。

そこで、実際に HTST 牛乳を原料乳としてチーズ試作の小規模試験を行った結果、pH の速やかな低下は見られたものの、ナイシン量は BS-10 単独の場合とあまり変わらなかった。

このため、今後、複数回の試験により確認試験を行うとともに、他の共役スターターの検討も必要と考えられた。

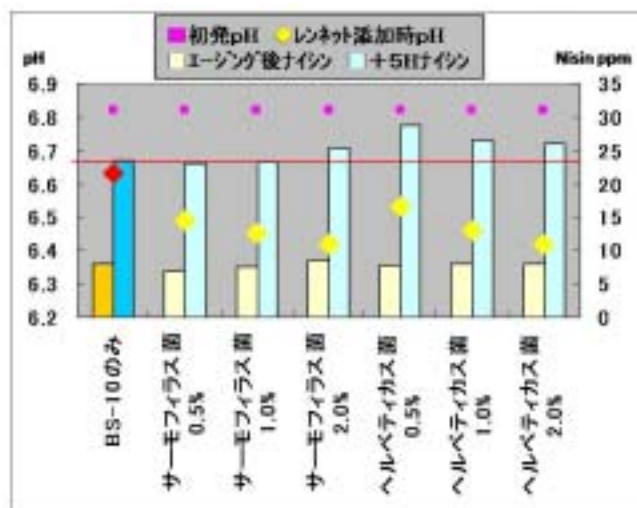


図5 共役スターターによるナイシン生成

#### (4) チーズ試作による酪酸菌抑制試験

BS-10 を用いて製造したチーズの衛生危害菌抑制効果を確認するため、実際にゴーダタイプのチーズを試作した。ネガティブコントロールとして CH-N11 (CH 社) のみを添加したもの、ポジティブコントロールとして CH-N11 と酪酸菌を添加したもの、試験区として BS-10 と酪酸菌を添加したものを製造し、熟成中に酪酸菌による異常膨張が起こるか検証した。

この結果、熟成 1 ヶ月ではどの区も異常膨張は見られず、BS-10 の効果を確認することができなかった (図 6)。但し、通常のチーズでも、熟成 1 ヶ月では膨張は起こらず、熟成 2~3 ヶ月で膨張の兆候が見られることから、今後も引き続き、膨張の有無を確認することとした。

同時に、チーズ中有機酸を分析し、酪酸菌による酪酸の増加が見られないか検討したが、どの区も酪酸は検出されなかった (データ省略)。

しかし、チーズ中の酪酸菌検査を行った結果、ネガティブコントロール、BS-10 試験区には酪酸菌が検出されなかったが、ポジティブコントロールである CH-N11 と酪酸菌を添加した区では酪酸菌が検出された。この時のナイシン量を測定すると、BS-10 試験区では熟成 1 ヶ月後においても 8.9ppm のナイシンを含有していた (図 7)。

このことから、本試験において意図的な異常膨張チーズを製造し、その BS-10 による抑制効果を確認することはできなかったが、製造したチーズ中の酪酸菌を抑制していることは確認することができ、この結果、チーズの異常膨張を抑制できる可能性が示唆された。

図 6 酪酸菌抑制試験 (熟成 1



ヶ月)

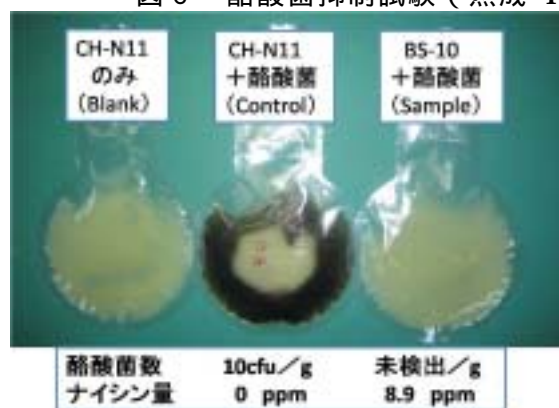


図 7 チーズ中の酪酸菌検査

#### 4. まとめ

ナイシン産生市販乳酸菌スターター BS-10 の使用は衛生危害菌について十分な抗菌性を付与し、高品質 (低衛生危害) なチーズ製造の可能性を示唆した。しかし、BS-10 を利用して衛生危害菌の抑制効果を得るためには効率的なナイシン生成を促すチーズ製造法が必要と考えられ、本試験では低温培養によるエイジング工程がひとつの解決策となりうることを提案するとともに共役スターターの活用も検討価値があることを見出した。

実際に酪酸菌を意図的に添加したチーズ製造試験では熟成 1 ヶ月の時点で酪酸菌が検出されず、酪酸菌による異常膨張や風味劣化の抑制が可能であることを示唆した。

しかし、同時に併用する乳酸菌にもその効果は及び、熟成開始初期の段階で急激に他の乳酸菌が死滅する可能性も示唆された。BS-10 単独の使用ではチーズの風味が単調なものとなり、魅力あるチーズの製造が難しいことが予想される。このため、何らかの形で風味を形成する微生物の併用が必要と考えられ、この点において、白カビ、酵母がナイシンの影響を受けないことはチーズの風味形成において利用価値が高いと考えられた。また、併用した乳酸菌が死滅しても、その菌体内酵素は死滅とともに菌体外に溶出し、チーズの熟成に関与することが知られており、乳酸菌併用におけるチーズ熟成中の効果についても検討が必要であった。

このため、BS-10 をチーズ製造に導入するには未だ多くの検討が必要であり、今後の試験が必要であるといえた。