

新規な国産乳酸菌補助スターターによる チーズの高付加価値化

大坪雅史、清水健志、鳥海滋、緒方由美、三上大輔、高谷政宏*、葛西大介*、
八十川大輔**、中村正***、小林美穂****

Enhancing the Added Value of Cheese Using New Domestic Lactic Acid Bacteria Adjunct Starters

Masashi Ohtsubo, Takeshi Shimizu, Shigeru Toriumi, Yumi Ogata, Daisuke Mikami,
Masahiro Takaya*, Daisuke Kasai*, Daisuke Yasokawa**, Tadashi Nakamura***,
Miho Kobayashi****

要 旨

チーズ用補助スターターとして開発し特許化した国産乳酸菌 (*Lacticaseibacillus paracasei* OUT0010、*Lacticaseibacillus rhamnosus* P-17、*Latilactobacillus curvatus* 33-5) のうち、OUT0010 と p-17 の各種チーズへの有用性を検討した。OUT0010 はミモレットタイプ、P-17 はモッツァレラチーズの呈味、香り、並びに、好ましさを向上させることが認められ、これら乳酸菌によりチーズの付加価値が高まることが期待できた。2023 年、国産乳酸菌の使用を希望する各地のチーズ製造者は、共同で OUT0010 の凍結乾燥スターターの製造委託を開始し、これにより OUT0010 は工業段階での利用が可能となった。2024 年、OUT0010 を利用したチーズが商品化された。

2018 年に発効された日欧経済連携協定の該当輸入品目の中にはチーズが含まれ、その関税が段階的に引き下げられ続けるため、国内のチーズ製造者にはより一層の特長ある製品づくりが求められている。北海道にはナチュラルチーズを製造する工房が数多くあり各地域で様々なチーズが製造されているが、国産乳酸菌スターターはほとんど普及しておらず、多くの工房では外国産の同じ乳酸菌スターターが用いられることが多いため、乳酸菌の特長による差別化は難しい現状にあ

る。我々は、地域で生産されるナチュラルチーズの高付加価値化にあたり、北海道から分離した乳酸菌をチーズスターターとして用いることで、その乳酸菌がチーズの熟成を促進しうま味と芳香を醸しチーズの風味がより豊かとなること、熟成期間の短縮化ができ、それに伴い製造コストが低下すること、さらには、同乳酸菌をチーズ製造に使用すること自体に物語性があり地域ブランド力の高いチーズの開発に繋がること、これらのことが期待できるのでないかと考えた。そして、そ

* 公益財団法人とかち財団 ものづくり支援部

** 地方独立行政法人北海道立総合研究機構 食品加工研究センター

*** 北海道国立大学機構 帯広畜産大学 畜産学部

**** 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門

責任者連絡先 (Masashi Ohtsubo) : ohtsubo@techakodate.or.jp

表 1 ガスクロマトグラフィー質量分析による試作チーズの香り成分分析

試作 チーズ	試料間において含有量の 差異が認められた香り成分	香り性質	ピーク面積(平均±標準誤差 n=3)	
			対照	国産乳酸菌添加*
ミモレットタイプ	Ethyl Acetate	パイナップル	4080± 258	5251± 201
	Methyl Alcohol	薬品	17408± 8399	4759± 830
	Butanal, 3-methyl-	苦い、辛い	10688± 221	2032± 460
	Methylene chloride	甘い有機溶媒	4306± 373	2695± 192
	Ethanol	アルコール	298485±26643	666826±43387
	2-Pentanone	甘酸っぱいにおい	35622±10205	181912±18550
	Pyridine	油脂	10083± 195	8883± 443
	Hexanoic acid, ethyl ester	酸っぱいフルーツ	5959± 378	8349± 525
	2-Nonanone	脂肪、グリーン臭	34588±11221	25694±11563
	Octanoic acid, ethyl ester	リンゴ	897± 44	1248± 55
	Propanoic acid	酸っぱい	13109± 3785	1165± 77
	Butanoic acid	熟成チーズ	505280±23286	378735±51030
	Butanoic acid, 3methyl-	酸っぱい	395121±19780	143226± 9352
	Hexanoic acid	山羊の臭い	335703± 6736	191530±15391
モッツアレラ チーズ	Diacetyl	バター、チーズ	130042± 3198	110630± 586
	Acetoin	バター、チーズ	271784±22725	327468±20712
	Hexanoic acid	山羊の臭い	56149±10192	107964±12294

*: 試作チーズにおいて、ミモレットタイプはOUT0010を添加し、モッツアレラチーズはP-17を添加した。

の実現に向けて検討し次のことを既報とした。道内各地の発酵食品から約 250 株以上の乳酸菌を分離同定し、これらからプロテアーゼ高活性、ジアセチル生成等を重視して優良株を選抜し国産乳酸菌として、3 株（*Lacticaseibacillus paracasei* OUT0010、*Lacticaseibacillus rhamnosus* P-17、*Latilactobacillus curvatus* 33-5）を開発した。同乳酸菌について、2020 年に特許を出願し 2024 年に特許登録された¹⁾。OUT0010 と 33-5 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有用で、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と香気成分 butane-2-one（バター・チーズの香り）が無添加の対照チーズよりも多く生成しチーズの味と風味をより豊かとすることが期待できた¹⁾²⁾。また、熟成 2 ヶ月目の OUT001 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、OUT0010 添加による熟成期間の 1 ヶ月短縮効果が期待された²⁾。

本研究では、国産乳酸菌の様々なチーズへの実用化を目標に、道内各地のチーズ工房の協力を得て、5 種類のチーズ（ミモレットタイプ、モッツアレラチーズ、パルミジャーノタイプ、カマンベール、クリームチーズ）への添加効果について検

討した。この中で、当センターは、ミモレットタイプおよびモッツアレラチーズへの国産乳酸菌の添加効果について検討したので報告する。

試験方法は次の通りとした。

ミモレットタイプの試作については、市販スターターを用いた通常のみもレットタイプ（対照）及び市販スターターに補助スターターとして OUT0010 を添加したミモレットタイプ（OUT0010 添加）の 2 種類を試料区分とし、道南地域の N チーズ工房で実施した。

モッツアレラチーズの試作については、市販スターターを用いた通常のみもツアレラチーズ（対照）及び市販スターターに補助スターターとして P-17 を添加したモッツアレラチーズ（P-17 添加）の 2 種類を試料区分とし、道南の Y チーズ工房で実施した。

両チーズの製法は、後述のオリジナル乳酸菌モデルチーズ製造事例集を参照されたい。

香り成分分析については、チーズ試料 2g をバイアル瓶に採取して密栓して 60℃で加温し、ヘッドスペースの成分を固相マイクロ抽出法にて抽出及び濃縮し、ガスクロマトグラフィー質量分析装置 MSD 5977A（Agilent Technologies 社）に供し、対照と国産乳酸菌添加の両区分の測定結果を

表 2 試作チーズの遊離アミノ酸含量 (mg/100g)

呈味別 アミノ酸成分	ミモレットタイプ		モッツアレラチーズ	
	対照	OUT0100 添加	対照	P-17 添加
うま味アミノ酸合計 ^a	972.42	904.23	2.29	4.02
甘味アミノ酸合計 ^b	752.01	704.92	2.65	4.14
苦味アミノ酸合計 ^c	1876.17	1794.18	2.48	6.03
合計	3600.60	3403.33	7.43	14.19

a: アスパラギン酸、グルタミン酸の含量合計。b: スレオニン、セリン、グリシン、アラニン、プロリンの含量合計。c: バリン、システイン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン、リジン、ヒスチジン、アルギニンの含量合計。

比較し差異の見られた成分について解析した。

遊離アミノ酸含量測定については、チーズ 6g に 4 倍量の蒸留水を添加し、ミルサーによりチーズを破碎、攪拌し、得られた懸濁液を 5°C、18,000rpm で 20 分間遠心分離し、清澄液をろ過してチーズ抽出液を得て、このチーズ抽出液を検体として PTC アミノ酸分析法により行った。

官能評価については、その実施について事前に被験者に説明し、被験者には自身の自由意志により試験に参加頂いた。被験者には、対照と国産乳酸菌添加の両区分のチーズを食べてもらい香り、組織、呈味、好ましさについて強く感じた試料区分を選択する 2 点試験法³⁾で評価した。

菌叢解析については、試料から MRS 寒天平板培養 (30°C) により分離菌株を集め (チーズ試料 96 株、OUT0010 スターター 5 株)、各株の細胞を溶菌して DNA 試料を調製した。DNA 試料中の 16SrDNA 全長を PCR 増幅した。増幅産物を DNA シーケンサー Applied Biosystems 3130 Genetic

Analyzer (Thermo Fisher Scientific 社) に供し、上流約 500 塩基配列を決定した。次に、決定配列について解析プログラム BLAST を用いて公共データベース GenBank から類似配列を検索して同定し解析した。

はじめに、ミモレットタイプの試験を行った。結果を以下に記す。

香り成分分析の結果 (表 1)、OUT0010 添加は、パイナップル、甘酸っぱい、甘酸っぱいフルーツ、リンゴの性質をもつ香り成分が多く、概して、爽やか、重くない、不快でない香りが特徴と見做した。対照は、薬品、苦い、辛い、アルコール、油脂、脂肪、グリーン臭、熟成チーズ、酸っぱい、山羊の臭いの性質を持つ香り成分が多く、概して、重い、油脂、不快な臭いが特徴と見做した。

遊離アミノ酸含量測定の結果 (表 2)、うま味アミノ酸、甘味アミノ酸、苦味アミノ酸それぞれの合計含量は、対照が OUT0010 添加より高かった。

官能評価の結果 (表 3)、対照は、チーズ臭、不快臭、苦味のポイントが高く、OUT0010 添加はうま味と好ましさのポイントが高かった。ポイントの高さは、それぞれの試料区分の特徴と見做した。対照において、官能評価での香りの評価 (チーズ臭、不快臭) は、香り成分分析の評価 (重い、油脂、不快な臭い) と類似すると推定した。

OUT0010 添加においては、今回の官能評価の香りの項目では、香り成分分析結果の特徴を十分に捉えられなかった。今後、ミモレットタイプの官能評価については、香り成分分析の評価を参考に、甘酸っぱい、フルーツなどの香りに関する項目を追加する必要があると考えた。次に、うま味のポイントは、好ましさのポイントと関連すると推定した。また、うま味のポイントには、うま味アミノ酸と甘味アミノ酸の含量が関わると考えられる。しかし、表 2 と表 3 の通り、OUT0010 添加では、対照よりもうま味アミノ酸と甘味アミノ酸の含量が低かったが、官能評価ではうま味のポイントが高かった ($p<0.05$)。この原因は不明であるが、うま味アミノ酸と甘味アミノ酸以外に官能評価のうま味のポイントに影響する他の要因が存在する可能性があると考えた。

菌叢解析の結果 (表 4)、対照及び OUT0010 添加からは、市販スターターに含まれる 3 種の乳酸

表 3 試作チーズの官能評価

評価項目		ミモレットタイプ (n=19)		モッツアレラチーズ (n=15)	
		対照	OUT0010 添加	対照	P-17 添加
香り	チーズ臭	12	7	3	12*
	ミルク臭	10	9	3	12*
	ヨーグルト臭	8	11	2	13*
	不快臭	13	6	7	8
組織	硬さ	8	11	14*	1
	滑らかさ	11	8	1	14*
呈味	うま味	5	14*	4	11
	苦味	13	6	4	11
	酸味	10	9	2	13*
好ましさ		8	11	4	11

* $p<0.05$

表 4 試料由来分離菌株の 16S rDNA 部分塩基配列 (約 500 塩基) の相同性検索に基づく菌叢解析			
試料	同定菌種名	配列 一致率 (%) ^b	菌種 構成比 (%)
試作 ミモレットタイプ (対照)	<i>Lactococcus lactis</i>	100.00 ^c	33.3
	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> Type A ^a	100.00 ^d	65.6
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.07 ^e	1.1
	計		100.0
試作 ミモレットタイプ (OUT0010 添加)	<i>Lactococcus lactis</i>	100.00 ^c	52.1
	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> Type B ^a	99.78 ^d	39.6
	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> Type A ^a	100.00 ^d	7.3
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.07 ^e	1.0
	計		100.0
国産乳酸菌 スターター OUT0010	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> Type B ^a	99.78 ^d	100.0
計		100.0	
試作 モッツアレラ チーズ (対照)	分離株検出されず		計
試作 モッツアレラ チーズ (P-17 添加)	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	100.00 ^f	100.0
計		100.0	

a : 配列決定領域に1塩基違いを有する2種類の塩基配列を *Lactocaseibacillus paracasei* と同定し、それぞれをType AとType Bとした。b: 分離菌株の塩基配列と各菌種のINSD Accession No.の塩基配列を比較して算出した。
c: NR_040955.1との比較。d: NR_025880.1との比較。
e: NR_074957.1との比較。f: NR_113332.1との比較。

菌 (*L. lactis*, *L. paracasei*, *L. mesenteroides*) が検出され、両区分間における菌種構成比は、多少異なるが大きな違いではないと推定した。しかしながら OUT0010 添加から分離した *L. paracasei* は、塩基配列決定領域内の 1 塩基が異なる 2 種類であることが確認された。一般に 16S rDNA に基づく細菌の同定の解像度は種レベルまでであり、それ以下のレベルを区別できないと考えられているが、この 2 種類は、株レベルの違いで検出されたので、各々に Type A 及び Type B の名称を与えた。そして、対照から検出されるのは Type A のみであり、さらに国産乳酸菌スターターOUT0010 は Type B

であったことから、Type A は市販スターター由来の菌株、Type B は国産乳酸菌スターターOUT0010 由来の菌株であると推定した。前述の試作チーズの香り成分分析、遊離アミノ酸分析、官能評価において、対照と OUT0010 添加に違いが見られたことは、Type A と Type B はチーズスターターとして異なる特徴を有し、それに起因すると推定した。以上より、国産乳酸菌スターターOUT0010 は、ミモレットタイプチーズの香り、うま味、並びに、好ましさを向上させる効果が高く、チーズの価値を高める効果があると推定した。

次に、モッツアレラチーズの試験を行った。結果を以下に記す。

香り成分分析では(表 1)、両チーズ試料においてチーズの香り成分であるジアセチルとアセトイン含量に大きな違いは見られなかった。遊離アミノ酸含量測定の結果(表 2)、P-17 添加のうま味、甘みのアミノ酸含量は、対照より高かったが各々の値は約 4mg/100g で、グルタミン酸の認知閾値は 0.027%濃度とする報告⁴⁾を下回っていた。よって、今回、試作したモッツアレラチーズの遊離アミノ酸含量は官能評価のうま味のポイントに影響しないと推定した。

官能評価の結果(表 3)、P-17 添加において、香りのチーズ臭、ミルク臭、ヨーグルト臭のポイントは有意に高かった(p<0.05)。組織の滑らかなのポイントは有意に高く (p<0.05)、その一方で、硬さが有意に低かった (P<0.05)。これと関連すると考えるが、食感、は、柔らかくしなやかな弾力を有し他にない価値のある特徴に思えた(データ示さず)。呈味においては、有意ではないがうま味のポイントが高かった。苦味も同様にポイントが高かったが、被験者から両試料間に差はなかったとするコメントが多数だったので、今回、苦味について考慮しなくてもよいと考えた。好ましさも有意ではないがポイントが高かった。

菌叢解析の結果(表 4)、対照は、分離株が得られず菌叢解析はできなかった。P-17 添加は、*L. rhamnosus* のみが検出された。

MRS 寒天平板法による乳酸菌計数の結果、P-17 添加の乳酸菌数は 1.3×10⁵CFU/g だったが、対照は 2×10²CFU/g と P-17 添加の約 1/1000 倍だった(データ示さず)。

菌叢（表 4）と乳酸菌計数の結果について考察した。第 1 に、使用した市販スターターは高温乳酸菌である *S. thermophilus* であるが、P-17 である *L. rhamnosus* の耐熱性は、*S. thermophilus* より高いと推定した。第 2 に、モッツアレラチーズ製造の延伸工程（チーズを熱湯に浸し伸ばす）における加熱の作用は、乳酸菌スターターに損傷を与え、とりわけ、*S. thermophilus* への影響が大きかったと推定した。そのため、*S. thermophilus* の分離培養が困難となり、菌叢解析では、対照の解析ができず、P-17 添加では、市販スターターを併用しているにも関わらず、*S. thermophilus* は検出されなかったと推定した。第 3 に、*S. thermophilus* の熱損傷は、乳酸菌計数にも影響を与え、対照の計数値が P-17 添加よりも低くなったと推定した。以上より、*S. thermophilus* と *L. rhamnosus* の耐熱性の違いと延伸工程での加熱作用が、両試料間において、菌数や菌叢の結果に違いを与えたと考えた。

次に、官能評価の結果（表 3）を中心に試験結果全体を考察した。P-17 添加の組織と食感の特徴は、菌叢において優勢な *L. rhamnosus*（表 4）の強いプロテアーゼ活性^{1) 2)}によるものと推定した。すなわち、チーズの固さ、弾力などの物性に大きく影響する乳タンパク質に、*L. rhamnosus* のプロ



図 2 商品化された国産乳酸菌スターターOUT0010

テアーゼが作用し組織が柔らかくしなやかとなったと推定した。次に、官能評価の香りのポイントと香り成分含量（表 1）との関連は低いと推定した。また、官能評価のうま味のポイントと遊離アミノ酸含量（表 2）との関連性は低いと推定したことはすでに述べた。むしろ、官能評価の香り、うま味、さらには好ましさのポイントは、P-17 のプロテアーゼ活性の作用により組織が柔らかくしなやかとなったことで、官能評価において被験者が試料を食し咀嚼する際、香りや呈味の成分が口内や鼻腔にすみやかに拡散し、香りや呈味が強く感覚され評価に影響したものと推定した。

以上より、国産乳酸菌スターター *L. rhamnosus* P-17 は、モッツアレラチーズに柔らかくしなやかな弾力を与え、香り、うま味、好ましさを向上させる効果を有し、チーズの価値を一層高める効果があると考えられた。尚、製造における発酵時間は、7 時間以内に留めることが望ましい。発酵時間が 7 時間を超えると、P-17 のプロテアーゼの作用で強い苦味が生成し（データ未示）、官能評価での苦味のポイントが高くなり、それによって、



図 1 オリジナル乳酸菌モデルチーズ製造事例

好ましさのポイントが低くなる可能性がある。

本研究では、他に、パルミジャーノタイプ、カマンベール、クリームチーズについても、国産乳酸菌の添加によりチーズの香り、うま味、または好ましさ等が向上することが確認された（データ一示さず）。これらの結果等を基に、オリジナル乳酸菌モデルチーズ製造事例集を作成し（図 1）、展示会等で配布する他インターネット上で公開している（<https://www.tokachi-zaidan.jp/data/fd/000000/05/0000000572/GJuse5y71717577487.pdf>）。2023 年、国産乳酸菌の使用を希望する各地のチーズ製造者は、共同で OUT0010 の凍結乾燥スターターの製造委託を開始し（図 2）、これにより OUT0010 は工業段階での利用が可能となった。2024 年現在、OUT0010 を用いたゴーダチーズやミモレットタイプ等が商品化されており、今後、全国各地のチーズ工房で利用されることが期待される。

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平成 29-31 年度」および日本中央競馬会「畜産振興事業 令和 3-5 年度」の資金を受け実施した。関係各位に謝意を表す。

参考文献

- 1) 小林美穂、守谷直子、萩達朗、木元広実、鈴木チセ、佐々木啓介、中島郁世、野村将、八十川大輔、葛西大介、高谷政宏、住佐太、武内純子、小林秀彰、福澤明里、太田裕一、大坪雅史、清水健志、鳥海滋、林美貴成、豊田知紀、酒向佑輔、渡邊ゆずは、野口宗彦、星一美、森瞳、中村正、高屋朋彰、北村亨：特許第 7537668 号（2024）
- 2) 八十川大輔、高谷政宏、大坪雅史、住佐太、中村正、吉田年成、北村亮、小林美穂：北海道立総合研究機構食品加工研究センター研究報告、No.15（2020）、pp.1-9
- 3) 日本官能評価学会編：官能評価士テキスト（建帛社）、（2009）、pp.130-132
- 4) 福田ひとみ、平川智恵：帝塚山学院大学人間文化学部研究年報、No.8（2006）、pp.99-108