

禁転載

# ご当地乳酸菌チーズスターター カルチャー開発マニュアル



**経営体（J-チーズ創出）コンソーシアム**

代表 国立研究開発法人  
農業・食品産業技術総合研究機構  
畜産研究部門

2021年3月

# 目次

## はじめに

### I 発酵食品からの乳酸菌の分離と同定

1. 微生物試験に必要な機器類等
2. 分離方法
3. 同定方法
4. 保存方法

### II 分離乳酸菌の特性評価

1. 乳たんぱく質分解性
2. 糖の資化性
3. ブドウ糖を炭素源としたガス生産性
4. 高温および低温増殖性
5. 耐塩性
6. 細胞壁溶解活性
7. ジアセチル生産性
8. 市販チーズスターターカルチャーとの混合発酵系（共培養）による生育性
9. 乳製品香り成分生産性
10.  $\beta$ 溶血性
11. ヒスタミン生産性

### III スターター選抜例とチーズの評価

1. スターター選抜
2. スターター乳酸菌の確認
3. アミノ酸組成分析
4. 香り成分分析
5. テクスチャー分析
6. 味覚センサーによる評価

7. 官能評価

**IV スターターカルチャーの製造と保存**

1. スターターカルチャーの製造
2. 保存性評価
3. 推奨保存方法

**参考資料**

**担当窓口、連絡先**

## はじめに

チーズの総消費量はここ 10 年間で 24 万 t から 35 万 t に増加しており、チーズが国民の食生活に浸透していることが示されている。しかし、ナチュラルチーズに換算したチーズ総消費量のうち国産割合は、19.4%から 13.6%に低下しており、国産ナチュラルチーズの消費拡大のために、高付加価値化や輸入チーズとの差別化が求められている。酪農家などがチーズ製造に取り組む際には、原料乳の生産地や乳牛の飼養方法などが製品差別化の要素となりうる。しかし、乳発酵食品である熟成型チーズの製造において、乳酸発酵を行わせるチーズスターター（メインスターター；乳酸菌など発酵用微生物の凍結乾燥粉末等）のみならず、チーズの特徴付けに添加される補助スターターも輸入品が利用されており、安価な外国産ナチュラルチーズとの明確な差別化が難しい。農研機構は、2017 年から 2019 年にかけて、生物系特定産業技術研究支援センターが公募した「革新的技術開発・緊急展開事業」の支援を受け、「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」のプロジェクトを実施し、国産ご当地食品から分離した乳酸菌で、“ご当地乳酸菌”チーズスターターを開発し、「J チーズスターター」として広報している。J チーズスターターの乳酸菌は、北海道と栃木県のご当地食品から分離した約 700 菌株の乳酸菌から、生育温度帯、食塩耐性、乳たんぱく質の分解活性、香り成分の生成能力などを考慮して選抜した。J チーズスターターを用いて試験製造したゴーダチーズでは、「うま味増強、熟成促進」効果を確認している。さらに、一般消費者をパネリストとした評価試験や、イベント会場でのアンケートで高い評価を得ている。本マニュアルでは、地域ブランドチーズ開発を担う方々として都府県地域産業部局、公設試験場、乳加工業者などを想定し、プロジェクトで開発した J チーズスターターを例に、国産ご当地食品からのチーズスターター開発の基盤となる乳酸菌の分離方法を解説するとともに、開発した J チーズスターターの導入事例、評価事例も一部紹介する。

## ■ 免責事項

- 本手順書に紹介されたスターターの選抜法は、一例であり、本手順書に紹介された技術を利用したこと、あるいは何らかの理由で技術が利用できないことでもたらされる結果について、農研機構が責任を負うものではありません。
- 本手順書に示したJチーズスターターは、ゴーダチーズなど半硬質の熟成型チーズの補助スターターとして利用することを想定しており、他のチーズ種の製造に用いた場合の効果や、適性容量については未確認です。
- 本手順書に示したJチーズスターターの効果は、試験製造したミニゴーダチーズ、実規模製造したゴーダチーズにおける一例です。本手順書に紹介された技術を利用したこと、あるいは何らかの理由でJチーズスターターの「うま味増強、熟成促進」効果がえられないことでもたらされる結果について、農研機構が責任を負うものではありません。

# I . 発酵食品からの乳酸菌の分離と同定

## 1. 微生物試験に必要な機器類等

クリーンベンチ (あれば)

高圧蒸気滅菌器 (オートクレーブ)

恒温培養器

遠心分離機

光学顕微鏡

ガスバーナー

ボルテックスミキサー

嫌気ジャー

マイクロピペット

滅菌白金耳

滅菌シャーレ

滅菌チップ

滅菌した爪楊枝

滅菌コンラージ棒

70% (v/v) エタノール

プラスチックバイアル

## 2. 分離方法

### (1) 準備するもの

#### ・試薬・消耗品

- ・MRS 培地 (Becton Dickinson & Company (BD) 社、Merck 社など)
- ・滅菌生理食塩水
- ・炭酸カルシウム
- ・精製寒天末 (ナカライテスク (株) など)
- ・脱酸素剤 (三菱ガス化学 (株) など)

### (2) 手順

- ① サンプル 1 g (地元の伝統的発酵食品など) を 9 mL の滅菌生理食塩水に懸濁し、適当な濃度に希釈後、0.8%(w/v)の炭酸カルシウムを添加した MRS 液体培地に 1.5%(w/v)程度の寒天末を加えた培地に塗抹する。
- ② ①の培地を脱酸素剤と共に嫌気ジャーに入れ、嫌気培養 (30℃、48 時間程度) を行う。
- ③ 寒天培地上に出現したコロニーのうち、クリアゾーン (透明環) をつくるコロニー (単一で生育しているもの) を、滅菌した爪楊枝などで穿刺し、MRS 液体培地 (1~4 mL 程度) に接種する。クリアゾーンは、細菌が生成した乳酸により炭酸カルシウムが溶かされて形成される。

### (3) 注意点等

- ① 乳酸菌の分離源は、食経験のあるものを推奨する。
- ② 市販の発酵乳製品や漬物などは市販スターター乳酸菌を使用していることがあり、市販スターター乳酸菌は知的財産権を保有している可能性があることから、分離した乳酸菌

がこれらのスターター乳酸菌でないことを確認する必要がある。スターター乳酸菌の菌種の確認は、食品の製造元への問い合わせやスターター乳酸菌のカatalogを参照されたい。

- ③ サンプルが固体の場合は、5 mm 程度に細断したものを滅菌生理食塩水に混ぜて、ホモジナイザーやボルテックスミキサーを用いて、よく攪拌する。チーズからサンプリングする場合、チーズ片を 37℃付近で温めた滅菌 1%(w/v)クエン酸ナトリウム溶液と混ぜ、乳鉢やホモジナイザーでつぶし、可溶化する必要がある。
- ④ 炭酸カルシウム入り MRS 寒天培地作製方法：MRS 液体培地に寒天末を 1.5% (w/v)濃度で添加して、121℃、15 分間の滅菌処理を行う。培地を 50℃程度まで冷ましたのち、乾熱滅菌済みの炭酸カルシウムを 0.8%(w/v)濃度になるように同培地に混ぜて、滅菌シャーレに注いで静置する（直径 90 mm のシャーレであれば 15～20 mL 程度）。寒天が固化したら使用可能。
- ⑤ 混釈法（50℃程度の寒天培地に菌液を入れて、シャーレに注いで固化させる）にてコロニーを形成させても良い。
- ⑥ コロニー表面の滑らかさ、大きさ、色を観察し、様々な種類のコロニーを釣菌した方が多様な乳酸菌を分離できる。乳酸菌のコロニーの色は一般的に白色であるが、黄色の場合もある。
- ⑦ 酵母やカビなどを分離しないように、コロニーを釣菌して光学顕微鏡下で形態を観察することも重要である。

(木元広実)



### 3. 同定方法

#### A 16S rRNA 系列解析による菌種同定

##### (1) 目的

16S rRNA シーケンシングによる微生物の菌種同定は、世界中で広く一般に用いられている方法である。

##### (2) 準備するもの

###### ・試薬・消耗品

###### ・プライマー

27f: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'

1406r: 5'-ACG GGC GGT GTG TAC -3'

- ・ PCR 用酵素 : EX Taq (TAKARA) など
- ・ 10×TAE Buffer : 10 mM EDTA 含有 400 mM Tris/酢酸緩衝液 (pH 8.0) 。10 倍希釈したもの (1×TAE Buffer) を、アガロースゲル電気泳動の際にゲルの調製や電気泳動時の泳動バッファーとして使用する。
- ・ 2%アガロースゲル : 1 g アガロースに 50 mL の 1×TAE Buffer を加えて電子レンジなどで溶解する。
- ・ PCR 産物精製キット : Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics) など。

###### ・装置・器具

- ・微量高速遠心機
- ・分光光度計 (紫外線領域の波長測定が可能なもの)
- ・サーマルサイクラー

・核酸電気泳動装置

### (3) 手順

近年では安価なシーケンス受託解析サービスがあることから、それらを利用すると効率的である。これらのサービスには菌株を渡して解析してもらう方法と、以下のような方法により調製した PCR 産物を解析してもらう方法がある。多検体の場合には後者の方がより迅速かつ効率的に解析を進めることが出来る。

- ① 試験に供する乳酸菌を、乳酸菌培養用の寒天培地に適正な希釈倍率あるいは画線塗抹し、コロニーあるいは菌ペレットを形成させる。試験には、十分生育した新鮮なコロニーを用いる。
- ② 寒天培地上のコロニーから滅菌済の白金耳や爪楊枝で微量の菌体を採取し、100  $\mu$ L の滅菌水に懸濁する。
- ③ 100 mM NaOH を 50  $\mu$ L 添加して混合し、95 $^{\circ}$ C以上で 10 分間加熱する。
- ④ 冷却後、1M Tris-HCl (pH 7.0)溶液 11  $\mu$ L を添加して混合する。
- ⑤ 遠心分離 (12,000 rpm (13,000  $\times$  g) 、1 分間) に供し、得られた上清 (DNA サンプル) をテンプレートとして PCR を行う。
- ⑥ 下の表に従って調製した反応液を 200  $\mu$ L の PCR チューブに 45  $\mu$ L ずつ分注し、⑤ の DNA サンプル 5  $\mu$ L を加えて混合したのち、PCR を行う。PCR 反応は[95 $^{\circ}$ C、3 分]  
→[94 $^{\circ}$ C、30 秒 → 58 $^{\circ}$ C、45 秒 → 72 $^{\circ}$ C、90 秒]  $\times$ 35 サイクル→[72  $^{\circ}$ C、5 分]で行ったのち、4 $^{\circ}$ Cに冷却して反応を停止させる。

表 PCR 反応溶液の組成

	2 samples (μL)	10 samples (μL)
10×EX Taq Buffer	10.0	50.0
dNTP Mixture	8.0	40.0
27f (5 μM)	5.0	25.0
1406r (5 μM)	5.0	25.0
EX Taq	0.5	2.5
Distilled Water	61.5	307.5
Total	90.0	450.0

- ⑦ PCR 産物を DNA Ladder マーカーとともにアガロースゲル電気泳動に供し、約 1.4 kb のバンドを確認したのち、PCR 産物の精製を行う。(Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics)のマニュアル参照。)
- ⑧ 分光光度計を用いて、精製した PCR 産物の濃度を測定し、各シーケンス受託解析サービス指定の濃度に調整するとともに、27 f または 1406 r のプライマーと混合してシーケンス解析用試料とする。
- ⑨ 解析により得られた各試料のシーケンス結果を DDBJ などのデータベースで blast 検索 (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/blastn?lang=ja>) を行う。

#### (4) 注意点等

- ① 今回、例示した DNA 試料の調製方法は、厚生労働省の通知：「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」(食安

監発 1120 第 1 号) に記載の方法を一部改変したアルカリ熱抽出法であるが、これ以外にもアルカリ処理を行わない熱抽出法や市販のキットを用いた方法など様々な方法がある。乳酸菌はグラム陽性菌であるため、熱抽出法よりもアルカリ熱抽出法の方が抽出効率が高い場合が多いが、良好な結果が得られない場合には市販の抽出キットを用いることも検討すると良い。

- ② 今回プライマーとして 27 f と 1406 r を用いたが、27 f と 1492r (CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT) あるいは 1525 r (5'-AAA GGA GGT GAT CCA GCC-3') を用いても良い。また、第十七改正日本薬局方に収載されたプライマー配列 10F(5'-GTT TGA TCC TGG CTC A-3')および 800R(5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3')を用いてもある程度の菌種の同定は可能である。
- ③ 市販の発酵食品には乳酸菌スターターを使用して製造されているものも多く、それらを分離して使用することは知的財産の観点から、また、倫理的観点からも避けた方が良い。従ってこのような発酵食品から新たな乳酸菌を分離・使用する場合には、乳酸菌スターターとして使用されていない菌種であることを確認する必要がある。

(中村 正)

## **B MALDI-TOF MS profiling による菌種同定**

### **(1) 目的**

MALDI-TOF (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型) 質量分析計を用いた微生物の同定は、微生物のタンパク質群の特徴 (組合せ、量比) をデータベースと照合することにより行う。16S rRNA シーケンシングの結果と高い一致性があり、迅速に結果が得られる。本項では Bruker 社 MALDI BioTyper® を用いた方法を例として紹介する。

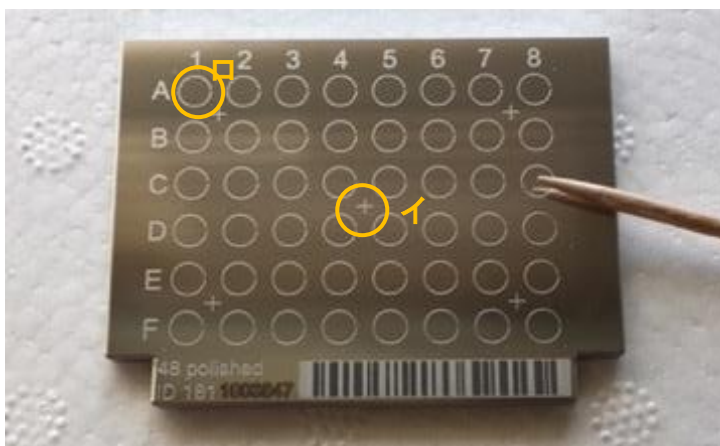
## (2) 準備するもの

### ・試薬・消耗品

- ・標準溶解液（アセトニトリル 50%, 水 47.5%, トリフルオロ酢酸 2.5%）
- ・80%(v/v)トリフルオロ酢酸
- ・70%(v/v)ギ酸溶液
- ・70%(v/v)エタノール
- ・アセトニトリル LC-MS グレード
- ・キャリブレーションスタンダード（Bruker Bacteria Test Standard; Bruker Daltonics）
- ・マトリックス（ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid; Bruker Daltonics）
- ・滅菌した爪楊枝
- ・乳酸菌培養用の寒天培地（MRS broth、M17 broth : BD 社、Merck 社 など）、1.5%(w/v)精製寒天末（ナカライテクス（株） など）

### ・装置・器具

- ・MALDI バイオタイパー（Bruker Daltonics）
- ・MALDI バイオタイパー用ターゲットプレート



### (3) 手順

#### ① 使用器具等の準備

ターゲットプレートは使用までデシケーターで保管する。

#### ② 試験乳酸菌の培養

試験に供する乳酸菌を、乳酸菌培養用の寒天培地に適正な希釈倍率あるいは画線塗抹し、コロニーあるいは菌ペレットを形成させる。試験には、十分生育した新鮮なコロニー（48 時間培養まで）を用いる。

#### ③ 試験用試薬の準備

マトリックスおよびキャリブレーションスタンダードは、メーカーが提供するマニュアルに従って、標準液に溶解し、使用する。

#### ④ スタンダードのターゲット調製

ターゲットプレートの任意のポジション（例：写真 1 のイ）に、キャリブレーションスタンダード溶液 1  $\mu\text{L}$  をスポットし、乾燥させる。

#### ⑤ 検体のターゲット調製

コロニーを滅菌爪楊枝で少量かきとり、プレートの○内（例：写真 1 のロ）に薄く塗布し、乾燥させる。次いで、70%(v/v)ギ酸溶液 1  $\mu\text{L}$  を滴下し、乾燥させる（オプション）。

#### ⑥ マトリックスによるスタンダードと検体のコート

キャリブレーションスタンダードおよび検体が乾燥したことを確認し、マトリックス溶液 1  $\mu\text{L}$  を滴下し、乾燥させる。

#### ⑦ MALDI バイオタイパーシステムの操作

#### ⑧ メーカーが提供する機器マニュアルおよび、ソフトウェアマニュアルに従って実施する。

#### ⑨ 判定

⑩ 解析ソフトウェア (MBT compass; Bruker Daltonics) において、Score value の判定が「High-confidence identification」である場合に、菌種まで同定が可能。「Low-confidence identification」以下の場合には、16S rRNA 遺伝子解析、あるいは菌種特異的 PCR 試験など、他の方法で同定する。使用データベース (MBT compass Library) は 2021 年現在約 3,329 種 (593 属) の微生物についてマススペクトルデータが登録されている。菌種同定においては、分子量 2,000-20,000 Da を測定範囲としている。

⑪ ターゲットプレートの洗浄

\* 70%(v/v)エタノール溶液に 5 分間浸漬した後に取り出し、水道水で流しながらキムワイプでプレートの表面を拭く。さらに 70%(v/v)エタノールを含ませたキムワイプで表面を拭く。\* を繰り返す。

次に、100  $\mu$ L の 80%(v/v)トリフルオロ酢酸をプレート表面に添加し、キムワイプで強めに拭く。

最後に超純水ですすぎ、キムワイプで水分を除いた後、プレートを完全に乾燥させ、次の試験に使用するまでデシケーターで保管する。

#### (4) 注意点等

- ① TFA は強い酸性で揮発性も高いことから、溶液調製はドラフトで実施する。
- ② 試薬類は高速液体クロマトグラフグレード以上の純度の高いものを使用する。
- ③ セルスミア法では検定の難しい菌は、供給元のマニュアルに従い、エタノール・ギ酸抽出法で検体のターゲット調製を実施すると結果が改善する場合がある。

(小林美穂)

## 4. 保存方法

### A 継代培養保存法

#### (1) 準備するもの

- ・試薬・消耗品
  - ・MRS Broth (BD 社、Merck 社など)
  - ・炭酸カルシウム
  - ・精製寒天末 (ナカライテスク (株) など)

#### (2) 手順

MRS 液体培地に炭酸カルシウムを 1%(w/v)、寒天末を 1.5%(w/v)濃度で添加して滅菌し、培地を冷却後、試験管などに分注して固化させる。一昼夜培養した菌液を滅菌白金耳にとり、作製した培地に試験管の底に到達するまで刺す。乳酸菌の至適温度で 2~7 日間培養し、乳酸菌の生育を確認したあと、4℃で保存する。2~3 か月程度は保存可能。

### B 凍結保存法

#### (1) 準備するもの

- ・試薬・消耗品
  - ・MRS Broth (BD 社、Merck 社など)
  - ・スキムミルク (雪印メグミルク (株) など)
  - ・グリセロール
- ・装置・器具
  - ・-80℃の超低温槽 (ディープフリーザー) もしくは液体窒素容器



## (2) 手順

一昼夜培養した菌体 20  $\mu\text{L}$  程度を 10~17%(v/v) のグリセロールを含む滅菌した MRS 液体培地 1 mL に懸濁し、 $-80^{\circ}\text{C}$  のディープフリーザーや液体窒素に入れて保存する。ミルク培地で増殖しやすい菌の場合は、10%(w/v) スキムミルク培地に菌液を懸濁しても良い。5 年程度は保存可能。

## (3) 注意点等

- ①  $-20^{\circ}\text{C}$  前後の温度は微生物にとって一番障害がある温度であり、この温度帯で長期間保存しないことを推奨する。
- ② 凍結菌体の融解は、バイアルを  $40^{\circ}\text{C}$  程度のお湯に浸漬し、速やかに行う。溶液の一部を培地に移し、至適条件で培養する。

## C 凍結乾燥法

### (1) 準備するもの

#### ・試薬・消耗品

- ・20%(w/v) スキムミルク
- ・滅菌済みのフタ付プラスチックバイアル

#### ・装置・器具

- ・真空凍結乾燥機

### (2) 手順

一昼夜培養した菌体 10  $\mu\text{L}$  程度を滅菌した 20%(w/v) スキムミルク溶液 0.5 mL を入れたプラスチックバイアルに懸濁し、 $-80^{\circ}\text{C}$  以下で凍結する。凍結状態のままバイアルのフタを緩めて、一晩程度真空凍結乾燥を行う。乾燥終了後、機器が常圧に戻った際にフ

タを閉める。菌株にもよるがこの方法で 30 年以上保存することができる。

### (3) 注意点等

- ① プラスチックチューブの代わりにアンプルチューブを用いても良い。この場合は、アンプル溶封の設備が必要。
- ② 20%(w/v)スキムミルク溶液 0.5 mL を保護剤に用いた場合は、1 mL の滅菌水をチューブに加え、菌株の至適温度で培養して生育を確認する。
- ③ スキムミルクで生育しにくい菌株の場合は、0.6% (v/w) 酵母エキス、1%(w/v)グルコースを添加した 20%(w/v)スキムミルクを保護剤に使用する。
- ④ スキムミルクは高温（121℃）で滅菌を行うと褐色化するため、110～115℃、5～10 分間程度の滅菌条件が望ましい。

(木元広実)

## Ⅱ. 分離乳酸菌の特性評価

### 1. 乳たんぱく質分解性

#### (1) 目的

熟成チーズに特有の濃厚な味や香りは、乳酸菌の持つ酵素などによって乳たんぱく質が呈味性を持つ低分子のペプチド、アミノ酸に分解され、さらにアミノ酸からアンモニア、アミン類、アルデヒド類などの化合物が生成することによって形成される。ここでは熟成チーズの風味形成に重要な乳酸菌の乳たんぱく質分解活性の測定方法について述べる。

#### (2) 準備するもの

##### ・試薬・消耗品

- ・MRS 培地 (BD 社、Merck 社など)
- ・1%(w/v)グルコース添加 10%(w/v)スキムミルク培地 (10 mL)
- ・マイクロチューブ
- ・アゾカゼイン
- ・リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4)
- ・110 mM トリクロロ酢酸

##### ・装置・器具

- ・振盪培養機 (レシプロ式 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ で温度設定が可能なもの。)
- ・遠心分離機
- ・分光光度計
- ・天秤
- ・スパーテル

- ・オートクレーブ
- ・試験管立て
- ・ガスバーナー
- ・白金耳
- ・マイクロピペット

### (3) 手順

- ① 20%(w/v)グルコース溶液と最終体積の95%体積の10%(w/v)スキムミルク溶液を別々に調製し、それぞれ121℃、15分間と115℃、10分間の条件で滅菌し、培養直前に終濃度が1%(w/v)グルコース添加10%(w/v)スキムミルク培地10 mL（1試験菌株あたり）になるように両溶液を混合して使用する。
- ② 各菌株をMRS液体培地で一晩前培養（30℃）し、菌体を洗浄した後、この洗浄菌体懸濁液を $OD_{600} = 1.0$ となるように調製する。1%(w/v)グルコース添加10%(w/v)スキムミルク培地（10 mL）に、この菌液500  $\mu$ Lを接種し、本培養（30℃、120 rpm、24時間）を行う。次いで、この培養液をボルテックスミキサーでよく攪拌し、12,000 rpm（13,200  $\times g$ ）で1時間遠心分離を行い、上清を回収して酵素液とする。
- ③ 基質溶液 2.5%(w/v)アゾカゼイン含有リン酸緩衝生理食塩水（pH7.4、400  $\mu$ L）に、この酵素液100  $\mu$ Lを添加して反応（30℃、6時間）させた後、110 mMトリクロ酢酸溶液1 mLを加えて反応を停止する。この反応液を10,000 rpm（9,170  $\times g$ ）、10分間遠心分離を行い、上清の440 nmにおける吸光度を測定する。

### (4) 注意点等

活性の低い菌株の場合は6時間では $OD_{440}$ の値が低く（0.005程度）、評価が難し

いことがある。そのような場合は反応時間を例えば 18 時間などに延ばして実施しても良い。

## (参考) 実施例

表 分離乳酸菌と標準菌株の乳タンパク分解活性

菌種名	菌株名	分解活性 (OD <sub>440</sub> )
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	OUT0010	0.0088
	ATCC 25302 <sup>T</sup>	0.0056
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	P-17	0.0204*
	NBRC 3425 <sup>T</sup>	0.0081
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	33-5	0.0116*
	JCM 1096 <sup>T</sup>	0.0053

結果は平均値 (n = 3)

\*, 標準株に比べて有意な差がある ( $P < 0.05$ )

標準菌株 : ATCC 25302<sup>T</sup>、NBRC 3425<sup>T</sup>、JCM 1096<sup>T</sup>

ATCC (American Type Culture Collection)

NBRC (NITE Biological Resource Center)

JCM (*Japan Collection of Microorganisms*)

標準菌株は菌株バンクより購入可能。

*Lactobacillus paracasei*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus casei* は、2020 年にそれぞれ *Lacticaseibacillus paracasei*、*Lacticaseibacillus rhamnosus*、*Latilactobacillus curvatus* に再分類された。以下 *L. paracasei*、*L. rhamnosus*、*L. curvatus* と略す。

(高谷政宏)

## 2. 糖の資化性

### (1) 目的

一つのサンプルから分離された複数の菌株は同一の菌株の可能性もある。菌株間の違いを明らかにするためには、糖の資化性を調べる方法が有効である。ここでは、API50CH（細菌による 49 種類の糖の資化性を調べるキット）を用いた方法について述べる。

### (2) 準備するもの

#### ・試薬・消耗品

- ・API50CH（バイオメリュー社）
- ・API50CHL Medium（バイオメリュー社）
- ・サスペンションメディウム（バイオメリュー社）
- ・マックファーランドスタンダード（濁度 2）
- ・ミネラルオイル
- ・乳酸菌培養用の寒天培地（MRS broth、M17 broth : BD 社、Merck 社など）、1.5%(w/v)精製寒天末（ナカライテクス（株）など）

#### ・装置・器具

- ・APIWEB 同定用ソフトウェア（バイオメリュー社）

### (3) 手順

予め分離菌株の至適培養温度を確認しておく。API50CH および API50CHL に添付されているマニュアルに従って行う。

- ① 試験に供する乳酸菌を、乳酸菌培養用寒天培地に画線塗抹し、分離菌株の至適培養温度で 24 時間培養する。
- ② 寒天培地から白金耳または滅菌綿棒で菌体を回収し、2 mL のサスペンションメディアに懸濁して濃厚菌液を調製する。
- ③ 5 mL のサスペンションメディアに②で調製した濃厚菌液を 10  $\mu$ L ずつ滴下してマックファーランド濁度 2 の溶液を調製する。必要な濃厚菌液の量を記録しておく。
- ④ API50CHL Medium に、③で記録した濃厚菌液の量の 2 倍量の濃厚菌液を接種する。
- ⑤ API50CH のプレートのチューブ部分（カップ部分は除く）に④で調製した菌液を接種した後、カップ部分にミネラルオイルを重層する。
- ⑥ 分離菌株の至適培養温度で 48 時間、好気条件下で培養する。
- ⑦ 培養後、糖の資化状況を色の変化として目視で読み取る。本データを専用のソフトウェア（APIWEB 同定用ソフトウェア）で解析することにより、菌種同定にも利用できる。本方法を用いた微生物の同定は、16S rRNA シーケンシングの結果と高い一致率がある。

(中村 正)

### 3. ブドウ糖を炭素源としたガス生産性

#### (1) 目的

ガス生産性の有無は、乳酸菌をスターターに用いた場合の製品品質に大きく影響することから本試験を実施する。

#### (2) 準備するもの

##### ・試薬・消耗品

・試験乳酸菌培養用の培地（MRS broth、M17 broth など）

##### ・装置・器具

・10 mL 容量の蓋付き丸底試験管

・ダーラム管

#### (3) 手順

##### ① 使用器具の準備

10 mL 容量の試験管に、ダーラム管を開放部が下になるように入れ、乳酸菌培養用の培地 5 mL を充填し、オートクレーブにて滅菌（121℃、15 分間）する。滅菌終了後に速やかに冷却することでダーラム管内の気泡を抜く。

##### ② 試験乳酸菌の前培養

試験に供する乳酸菌を、前培養に用いる培地に 1%(v/v)濃度で接種し、定常期（一晩程度）まで培養する。

##### ③ ガス生産性の検定

ダーラム管入りの培地に試験菌を 1%(v/v)濃度で接種し、試験菌の生育適温で 24 時間（必要に応じて培養時間を延長する）静置培養する。試験乳酸菌がガスを産生する場合には、ダーラム管内に気泡が観察される。



## 4. 高温および低温増殖性

### (1) 目的

分離乳酸菌の特性を評価する上で、増殖温度の確認は実用の上でも菌株の同定・保存・管理の上でも重要なポイントとなる。ここでは、分離乳酸菌の高温および低温での増殖性評価について述べる。

### (2) 準備するもの

#### ・試薬・消耗品

- ・MRS 培地 (BD 社、Merck 社など)
- ・M17 培地 (BD 社、Merck 社など)

#### ・装置・器具

・恒温水槽 (室温以下の温度も設定可能なもの、あるいは室温 + 5℃以上で使用する恒温水槽を 4℃程度の低温室に持ち込んで使用。±0.1℃で温度設定が可能なもの。)

- ・天秤
- ・スパーテル
- ・オートクレーブ
- ・試験管立て
- ・ガスバーナー
- ・白金耳
- ・マイクロピペット

### (3) 手順

- ① 保存菌株について1白金耳を培地（乳酸桿菌は MRS 液体培地、球菌は M17 液体培地）に無菌的に接種し、30℃で一晩培養して前培養液を調製する。
- ② 新鮮な MRS または M17 液体培地に前培養液をそれぞれ 1%（v/v）濃度で無菌的に接種し、低温増殖性については 10℃、恒温増殖性については 40℃の恒温水槽で培養を行う。
- ③ 3～5 日間培養を行い、目視により濁度の上昇を認めたものを増殖性あり、濁度に変化がないものを増殖性なしとする。

（八十川大輔）

## 5. 耐塩性

### (1) 目的

チーズ製造工程中にブライン漬けや乾塩添加、塩水磨きを行うなど、チーズによって加塩する工程があり、耐塩性は重要な特性となる。

### (2) 準備

#### ・試薬・消耗品

- 塩化ナトリウム
- MRS 液体培地 (BD 社、Merck 社など)
- M17 液体培地 (BD 社、Merck 社など)
- 2%(w/v)NaCl 添加液体培地
- 5%(w/v)NaCl 添加液体培地

#### ・装置・器具

- 恒温水槽
- 天秤
- 試験管立て
- スパーテル
- オートクレーブ
- ガスバーナー
- 白金耳
- マイクロピペット

### (3) 手順

- ① 保存菌株について 1 白金耳を培地 (乳酸桿菌は MRS 液体培地、球菌は M17 液

体培地) に無菌的に接種し、30℃で一晩培養して前培養液を調製する。

- ② 新鮮な 2%(w/v)および 5%(w/v)NaCl 添加液体培地に前培養液をそれぞれ 1%(v/v)濃度で無菌的に接種し、30℃の恒温水槽で培養を行う。
- ③ 3～5 日間培養を行い、目視により濁度の上昇を認めたものを 2%または 5%食塩耐性あり、濁度に変化がないものを 2%または 5%食塩耐性なしとする。

(八十川大輔)

## 6. 細胞壁溶解活性

### (1) 目的

補助スターターカルチャーとしての特性として、メインスターター菌の細胞壁を溶解して菌体内プロテアーゼ（タンパク質分解酵素）の溶出を促進する活性をもつことが望ましいことから、本試験を実施する。メインスターター菌を培養してその菌体に対する溶解活性を観察してもよい（注意点等(4)-②に記載）が、スクリーニングとしては感度が良いほうが好ましいため、ここでは溶解されやすい *Micrococcus* 菌体を指標菌に用いる。

### (2) 準備するもの

#### ・試薬

- *Micrococcus* 菌体 (*Micrococcus luteus* (和光 138-12681)、または *Micrococcus lysodeikticus* ATCC No. 4698 (Sigma, M3770-5G))
- 試験乳酸菌培養用の培地 (MRS broth、M17 broth など)
- 精製寒天末 (ナカライテスク (株) など)
- 滅菌シャーレ (直径 90 mm)
- 100 mL 容量の培地瓶
- 嫌気培養ジャー
- 脱酸素剤 (三菱ガス化学 (株) など)

### (3) 手順

#### ① 試験乳酸菌の前培養

試験に供する乳酸菌を、前培養に用いる液体培地 (MRS broth など) に 1%(v/v) 濃度で接種し、定常期 (一晩程度) まで培養する。

## ② *Micrococcus* 菌体入り MRS 寒天平板培地の準備

MRS broth 3.3 g、培地用寒天 0.96 g、*Micrococcus* 菌体 120 mg に純水 60 mL を加えてオートクレーブにて滅菌（121℃、15 分間）を行う。オートクレーブ後、クリーンベンチ内で *Micrococcus* 菌体が沈殿しないように攪拌しながら滅菌プレート 4 枚に広げ、平板培地を作製する（15 mL/プレートの厚みにすると、菌体が溶解したクリアゾーン（透明環）が見やすい）。培地表面が乾くまで乾燥させる。

## ③ 試験乳酸菌の接種、培養

①で一晩培養した試験乳酸菌培養液 1  $\mu$ L を②の平板培地にスポットする。スポット間隔を空ければ 1 枚のプレートで 12 株程度は試験が可能である。スポットした液滴が乾いたらアネロパックなどで嫌気条件にし、試験菌の至適温度（30℃または 37℃）で一晩培養する。翌朝でも観察可能だが、冷蔵庫に移して 1~2 日置くとさらにクリアゾーンが広がり観察しやすい。

## ④ 撮影

クリアゾーンの写真を撮る場合は、プレートの下から光を当てて、光源からプレートまでの距離を調節する。

## (4) 注意点等

① 指標菌としてメインスターター菌（*Lactococcus lactis* など）を使用したい場合は、前培養した菌 2~3 mL を 40 mL の滅菌培地（M17broth に 0.5% グルコースを加えた GM17 培地）の入った 50 mL 容滅菌遠心チューブに接種し、 $OD_{620} = 1.3$  くらいまで 4~5 時間培養する。8,000 rpm（5,800 $\times$ g）で 10 分間の遠心分離後、上清を取り除き、菌体を用いて（3）②の操作と同様に平板培地を作製する。

## (5) 参考文献

Chatterjee et al. (1976) Isolation and Characterization of a Mutant of *Staphylococcus aureus* Deficient in Autolytic Activity. *J. Bacteriol.* 125(3), 961-967

Kaneda (1997) Isolation and Characterization of Autolysin-Defective Mutants of *Staphylococcus aureus* That Form Cell Packets. *Curr. Microbiol.* 34, 354-359

### (参考) 実施例

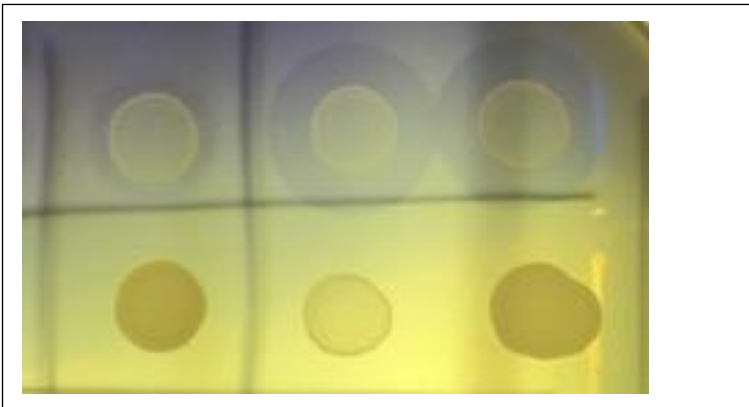


図 *Micrococcus* 菌体入り MRS 寒天平板培地上での試験乳酸菌によるクリアゾーン  
(上 3 株はクリアゾーンありと判定、下 3 株はなしと判定)

(鈴木チセ)

## 7. ジアセチル生産性

### (1) 目的

分離乳酸菌の特性を評価する上で、ジアセチル生産性の確認はチーズの風味に影響を与える重要なポイントとなる。ここでは、分離乳酸菌のジアセチル生産性の評価について述べる。

### (2) 準備するもの

#### ・試薬・消耗品

- マイクロチューブ（容積：1.5 mL 以上が望ましい）
- ピペットチップ
- MRS 培地（BD 社、Merck 社など）
- 10%(w/v)スキムミルク（1%(w/v)グルコース含有）
- クレアチン一水和物
- 15%(w/v)クエン酸ナトリウム水溶液
- 40%(w/v)KOH 水溶液

#### ・装置・器具

- インキュベーター
- 天秤
- オートクレーブ
- マイクロチューブ立て
- ボルテックスミキサー
- ガスバーナー
- スパーテル



- 白金耳
- マイクロピペット

### (3) 手順

- ① 保存菌株について1白金耳をMRS液体培地に無菌的に接種し、30℃で24時間培養して前培養液を調製する。
- ② 終濃度が0.15%(w/v)となるように滅菌(121℃、15分間)した15%(w/v)クエン酸ナトリウム水溶液を、滅菌した(121℃、15分間)10%(w/v)スキムミルク(1%(w/v)グルコース含有)に添加する(用時調製)。
- ③ ②で調製した0.15%(w/v)クエン酸含有10%(w/v)スキムミルク(1%(w/v)グルコース含有)をマイクロチューブに450 $\mu$ L/チューブとなるように分注し、①の前培養液50 $\mu$ Lを接種し、30℃で24~48時間培養する。
- ④ 40%(w/v)KOH水溶液500 $\mu$ Lに対して10mgのクレアチン水和物を添加して攪拌溶解し、クレアチン含有KOH水溶液を調製する(用時調製)。
- ⑤ ③で培養したチューブに④で調製したクレアチン含有KOH水溶液500 $\mu$ Lを添加し、直ちに転倒攪拌してからボルテックスミキサーでさらに攪拌し、室温で1時間静置して溶液の呈色を観察する。赤色となればジアセチル生成陽性、変化がなければ陰性と判断する。

### (4) 注意点等

手順③において、24時間の培養の場合、株により判定困難(目視の差が無い)となることがあるため、48時間の培養を推奨する。手順⑤において、可能ならば継時的に観察しつつ3時間から半日程度静置した後の観察も有効である。

(高屋朋彰)

## 8. 市販チーズスターターカルチャーとの混合発酵系（共培養）による生育性

### (1) 目的

ご当地乳酸菌を、チーズの熟成促進や特徴付けのために補助スターターカルチャーとして用いる場合、メインスターターである市販チーズスターターカルチャーの乳酸産生能に対する影響を確認する必要があることから、本試験を実施する。

### (2) 準備するもの

#### ・試薬・消耗品

- 試験乳酸菌培養用の培地（MRS broth、M17 broth など）
- スキムミルク（雪印メグミルク（株） など）
- 市販チーズスターターカルチャー（Chr. Hansen CHN-11 など）
- 生理食塩水

#### ・装置・器具

- pH 計 YUSB-01/PH pH Transducer（山形東亜 DKK（株））
- 250 mL 容量のサンプル瓶
- 1.5 mL マイクロチューブ

### (3) 手順

#### ① 使用器具等の準備

1.5 mL マイクロチューブ他、試験に必要な消耗品類、生理食塩水、前培養に用いる培地は、事前にオートクレーブにて滅菌する（121℃、15 分間）。

#### ② 試験乳酸菌の前培養と菌数測定

試験に供する乳酸菌を、前培養に用いる培地に 1%(v/v)濃度で接種し、定常期

(一晩程度)まで培養する。培養液の最終 OD を測定し、対応する生菌数をプレートカウント法\*で算定する。培養液は滅菌生理食塩水を用いて希釈する。

### ③ 試験用スキムミルク培地の準備

試験用スキムミルク培地は、250 mL 容量のサンプル瓶に、10%(w/v)スキムミルク 200 mL を調製し、オートクレーブにて滅菌し (110°C、5 分間)、pH 経時測定の前 1 時間前に 30°C に設定した恒温培養器で保温する。

### ④ 接種乳酸菌の調整

前培養した試験乳酸菌 1 mL を遠心分離によって集菌し、等量の生理食塩水で 3 回洗浄した後、再度 1 mL の同液に懸濁し、接種菌液とする。

### ⑤ 市販チーズスターターカルチャーと試験乳酸菌の接種

市販チーズスターターカルチャー (Chr. Hansen CHN-11, 50 U) 10 mg を、生理食塩水 1 mL に懸濁し、そのうち 200  $\mu$ L を接種して振り混ぜる。

市販チーズスターターの効力に対する、試験乳酸菌の添加影響を明確にするため、試験乳酸菌は、補助スターターとして添加する量の 10 倍量を添加することとし、前培養液の到達 OD から菌数を概算し、概ね  $1 \times 10^6$  cfu / mL (市販スターター乳酸菌数の 1/10 程度) となるように菌液を接種し、振り混ぜる。

### ⑥ 混合発酵系の pH モニタリング

pH 計のガラス電極は、試験前にエタノールスプレー (70%(v/v)エタノール) で殺菌し、測定用サンプル瓶内に直接沈め、分離菌株の至適培養温度に設定した培養器に静置する。混合発酵系の pH 測定は、YUSB-01/PH pH Transducer を用い、機器マニュアルに従って 1 時間毎に測定しながら 24 時間連続で実施する。

## (4) 注意点等

- ① 試験菌の前培養は試験直前に実施する。
- ② 市販チーズスターターカルチャーは、実際に技術を導入しようとするチーズ工房が日常的に使用しているものを用いる。
- ③ 自動モニタリングができない場合には一定時間毎に発酵培養系の pH を手動で測定しても良い。

## (5) 用語説明

\*プレートカウント法：培養液の OD を測定後、生菌数を測定するため、滅菌生理食塩水で段階的に希釈し、その一定量をとってプレート培養を行い、生じるコロニーの数を数えて菌数を測定する方法

## (参考) 実施例



図 1. 混合発酵系における 24 時間 pH モニタリング

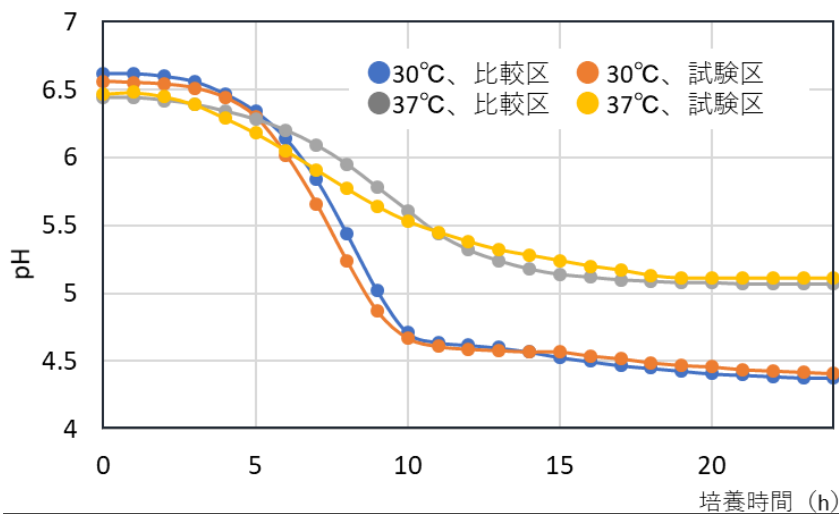


図 2. 市販チーズスターターカルチャーと *L. paracasei* OUT0010 の 30℃あるいは 37℃混合発酵系の pH 経時変化

比較区 市販スターター 0.02 U/200 mL 接種  
 試験区 市販スターター 0.02 U/200 mL  
 及び乳酸菌 OUT0010  $2 \times 10^8$  cfu/200 mL 添加

実施例では、殺菌したスキムミルクに対して、比較区には市販チーズスターターのみを添加し、試験区には市販チーズスターターと試験乳酸菌 OUT0010 を添加し、1 時間毎に pH を測定した。試験温度は、ゴーダチーズ製造における乳酸発酵温度 30℃と、チーズカード加温時 37℃の 2 条件について試験した。試験乳酸菌の添加量は、補助スターターとして用いる場合の 10 倍量とし、OUT0010 の場合、 $2 \times 10^8$  cfu / 200 mL 添加した。試験区では比較区よりも総乳酸菌数が多いため、pH 低下の開始は早いものの、低下速度は変わらず、最終到達 pH も同じであることから、OUT0010 は、市販チーズスターターの乳酸発酵を阻害せず、かつ、過度な pH 低下を引き起こさないと結論した。

(小林美穂)

## 9. 乳製品香り成分生産性

### (1) 目的

分離乳酸菌の特性を評価する上で、乳酸菌株が生成する香り成分の確認は、菌株の新規性、実用の上でも重要なポイントとなる。ここでは、分離乳酸菌の産生する各種の香り成分の測定について述べる。

### (2) 準備するもの

#### ・試薬・消耗品

- M R S 液体培地 (BD 社、Merck 社など)
- M17 液体培地 (BD 社、Merck 社など)
- スkimミルク (北海道skimミルク (雪印メグミルク (株) ) など)
- クエン酸 3 ナトリウム (和光純薬工業 (株) など)

#### ・装置・器具

- 臭い識別装置 (フラッシュ G C ノーズ HERACLES II アルファ・モス・ジャパン社)
- 純空気 (G3 太陽日酸 (株) など)
- 純水素 (G2 太陽日酸 (株) など)
- 20 mL 容バイアル瓶 (アルファ・モス・ジャパン社)
- バイアル瓶キャップ (アルファ・モス・ジャパン社)
- キャッパー (アルファ・モス・ジャパン社)
- 天秤
- 試験管立て
- オートクレーブ

- ガスバーナ
- 白金耳
- ピペット
- 1.5 mL マイクロチューブ
- 葉包紙
- 統計解析ソフト（エクセル統計、（株）社会情報サービスなど）
- 遠心分離機（マイクロチューブ用 エッペンドルフジャパン社など）

### (3) 手順

- ① 保存菌株を 1 白金耳、乳酸桿菌は M R S 液体培地、乳酸球菌は M17 液体 培地に、無菌的に接種し、30℃で一晩培養して前培養液を調製する。  
前培養液 1 mL を遠心分離して菌体を回収する。
- ② 菌体洗浄として、滅菌リン酸緩衝液 1 mL を菌体に添加して懸濁し、再度遠心分離して沈殿を回収する。
- ③ 菌体洗浄を 3 回行う。
- ④ 沈殿物にリン酸緩衝液を 0.5 mL 添加して混和し菌体懸濁液を調製し、その 0.5 mL を滅菌（110℃、10 分）した 0.15%クエン酸 3 ナトリウム含有 10%(w/v)脱脂乳 10 mL に接種する。
- ⑤ 30℃で 24 時間培養する。
- ⑥ 培養物 2.00±0.05 g を 20 mL 容バイアル瓶に採集し、キャップを用いてバイアル瓶キャップで密栓し検体とする。
- ⑦ 純水素と純空気がセットアップされたフラッシュGCノーズ（アルファモス社製）を用いた芳香成分分析を自動で以下の通り行う。 検体を 60℃、15 分間加温した後、ヘッド

スペースの気層（5 mL）を試料として装置に注入して分析する。すなわち、装置に注入された気層を TenaX TA に 50℃、30 秒間吸着濃縮したのち、240℃まで昇温、35 秒間保持することにより揮発成分の離脱を行う。移動相には純水素を用い、注入口流量 10 mL / 分、カラム流量 1 mL / 分とする。カラムには MXT-5（5%ジフェニル）および MXT-WAX（100%ポリエチレングリコール）を用い、初期温度 45℃から 1.5℃ / 秒で 250℃まで昇温させ、その後 60 秒間保持する。検出は FID により 260℃で行う。得られたクロマトグラムの解析は、付属の Alpha Soft と AroChem Base（保持指標とにおいに関する化合物ライブラリー）を用いて試料の主要香り成分の推定・同定、並びにピーク面積値を求める。

- ⑧ 各香り成分のピーク面積値の統計解析は、市販統計ソフトを用いて行う。その結果を分離乳酸菌株の香り成分生成についての新規性・実用性の評価の参考とする。

#### **(4) 注意点等**

- ① 試験菌の前培養は試験直前に実施し、混合発酵系試験には新鮮なものを使用する。
- ② 臭い識別装置（フラッシュGCノーズ HERACLES II アルファ・モス・ジャパン社）は純空気と純水素をセットアップすること。

#### **(参考) 実施例**

##### **ご当地乳酸菌の選抜例**

**目的** 当地乳酸菌候補として OUT0010 株が得られ、既知の菌種 *Lacticaseibacillus paracasei* (旧分類名 ; *Lactobacillus paracasei*, 以下 *L. paracasei*) に同定された。OUT0010 株を実用化するためには、同種の既存株より有用で新規な株でなければならない。今回、乳酸菌の香り成分の生成量を評価項目として有用性を検討した。



尚、比較する同種既存株は標準菌株とし *L. paracasei* ATCC25302<sup>T</sup> を用いた。

**結果および考察** *L. paracasei* OUT0010 と *L. paracasei* ATCC25302<sup>T</sup> をそれぞれ 0.15%(w/v)クエン酸 3 ナトリウム含有 10%(w/v)脱脂乳 10 mL に接種培養しその香り成分を、フラッシュ GC ノーズを用いて、測定した。結果を表に示した。*L. paracasei* OUT0010 株は、同種標準株より香気に優れ有用で新規な株であることが明らかとなった。

表 *L. paracasei* 菌株の 10%(w/v)スキムミルク（クエン酸含有）培養後の香り成分

菌株	香り成分 フラッシュ GC ノーズ計測ピーク面積			
	アセトアルデヒド エーテル臭 フレッシュ フルーティ 刺激臭 ジメチル	ジメチルスルフィド キャベツ臭 フルーティ ガス臭	ジアセチル バター臭 キャラメル臭 フルーティ	ブチルアセテート バター臭 キャラメル臭 クリーム臭
<i>L. paracasei</i> OUT0010	14279±185**	817±216	6273±1898	1205±14*
<i>L. paracasei</i> ATCC 25302 <sup>T</sup>	1030±82	571±100	18492±8323	1080±40

結果は平均値±標準偏差 (n = 3)

\*, *L. paracasei* ATCC 25302<sup>T</sup> の間に有意差あり(p<0.05)

\*\* , *L. paracasei* ATCC25302<sup>T</sup> の間に有意差あり(p<0.01)

(大坪雅史)

## 10. β溶血性

### (1) 目的

ご当地乳酸菌を、チーズの熟成促進や特徴付けのために補助スターターカルチャーとして用いる場合、乳酸菌の安全性には十分注意する必要があることから、本試験を実施する。

### (2) 準備するもの

#### ・試薬・消耗品

- ヒツジ血液寒天培地 (M) (BD 社など)
- 試験乳酸菌培養用の培地 (MRS broth など)
- 白金耳
- 恒温培養器
- 嫌気ジャー
- 脱酸素剤 (三菱ガス化学 (株) など)

### (3) 手順

#### ① 試験乳酸菌の前培養

試験に供する乳酸菌を MRS 液体培地に接種し、至適温度に設定した恒温培養器内で一晩程度培養する。

#### ② 血液寒天培地での乳酸菌の生育試験

①の試験乳酸菌について、一白金耳 (1 μL)をヒツジ血液寒天培地に画線塗沫する。シャーレを嫌気ジャーに入れ、至適温度に設定した恒温培養器内で 24 時間培養する。

#### ③ β溶血性の確認培養後のシャーレを取り出し、溶血環を観察する。溶血素を作る菌の

コロニー周辺は赤血球が溶血して壊れるため、溶血環が形成される。

#### (4) 注意点等

- ① 試験菌の前培養は試験直前に実施し、生育が良いものを使用する。
- ② 乳酸菌によっては $\alpha$ 溶血性を示す。

#### (参考) 実施例

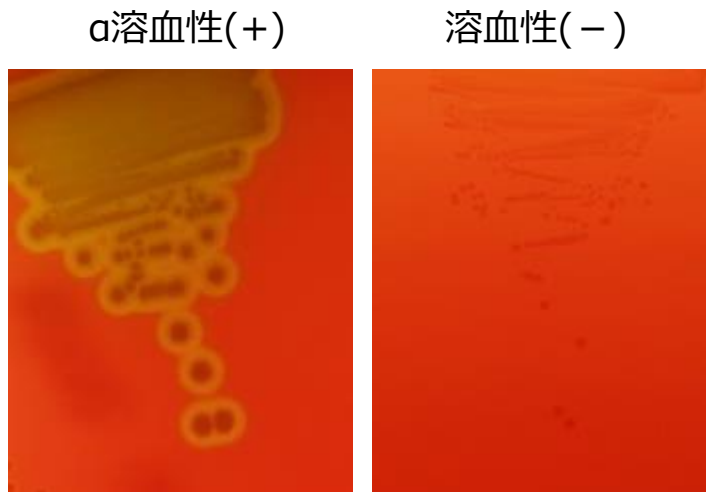


図  $\alpha$ 溶血性を示す乳酸菌（左側）  
コロニー周辺が黄～黄緑色に変色する。右側  
が非溶血性で、赤血球が破壊されることはない  
ため溶血環は認められない。

(守谷直子)

## 11. ヒスタミン生産性

### (1) 目的

ご当地乳酸菌を、チーズの熟成促進や特徴付けのために補助スターターカルチャーとして用いる場合、乳酸菌の安全性には十分注意する必要があることから、本試験を実施する。

### (2) 準備するもの

#### ・試薬・消耗品

- 試験乳酸菌培養用の培地 (MRS broth など)
- 滅菌生理食塩水
- トリプトン (ナカライテスク (株) など)
- 酵母エキス (日本製薬 (株) など)
- NaCl (富士フィルム和光純薬 (株) など)
- グルコース (同上)
- Tween 80 (同上)
- 硫酸マグネシウム (同上)
- 炭酸カルシウム (同上)
- ブロモクレゾールパープル (同上)
- 硫酸マンガン(II) (同上)
- 硫酸鉄(II) (同上)
- L-ヒスチジン塩酸塩 (同上)

#### ・装置・器具

- 高圧蒸気滅菌機 (オートクレーブ)
- 遠心分離機

- 恒温培養器

### (3) 手順

#### ① ヒスタミン生産性確認試験培地の調製

・トリプトン	0.5 g
・酵母エキス	0.5 g
・NaCl	0.5 g
・グルコース	0.1 g
・Tween 80	0.05 g
・MgSO <sub>4</sub> ・7 H <sub>2</sub> O	0.02 g
・CaCO <sub>3</sub>	0.01 g
・ブロモクレゾールパープル	0.006 g
・MnSO <sub>4</sub> ・4H <sub>2</sub> O	0.005 g
・FeSO <sub>4</sub> ・7 H <sub>2</sub> O	0.004 g
・L-ヒスチジン塩酸塩	1 g

上記の試薬を、純水または超純水に溶解する。希塩酸を用いて pH を 5.0 に調整し、純水または超純水を用いて 100 mL にメスアップした後、オートクレーブにて滅菌（121℃, 15 分間）する。

#### ② 試験乳酸菌の前培養

試験に供する乳酸菌を MRS 液体培地に接種し、至適温度に設定した恒温培養器内で一晩程度培養する。

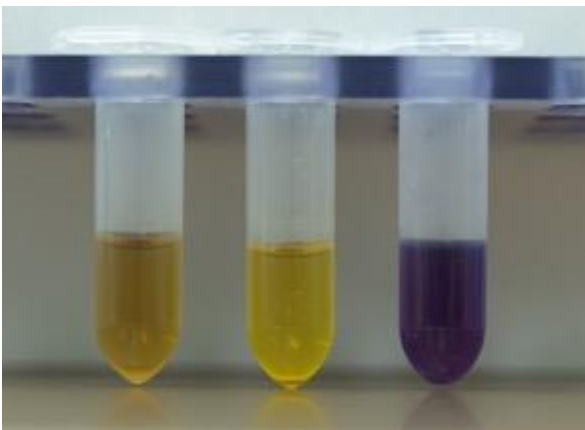
#### ③ ヒスタミン生産性確認試験培地での乳酸菌の生育試験で用意した試験乳酸菌は、滅

菌生理食塩水を用いて 2 回洗浄する。①で用意したヒスタミン生産性確認試験培地に乳酸菌を 1 % (v/v) 濃度で接種し、至適温度に設定した恒温培養器内で 24 時間から 48 時間培養する。

- ④ ヒスタミン生産性の確認培養後の培地の色を観察する。ヒスタミンを産生する菌の培地は pH がアルカリ性に傾くため、紫色を呈する。一方、ヒスタミンを産生しない菌の培地は pH が酸性に傾くため、黄色を呈する。

#### (4) 注意点等

試験菌の前培養は試験直前に実施し、生育が良いものを使用する。



#### (参考) 実施例

図 ヒスタミン産生株および非産生株による培地色の変化  
ヒスタミンを産生する乳酸菌の培地は pH がアルカリ性に傾くため、紫色を呈する（右）。一方、ヒスタミンを産生しない菌の培地は pH が酸性に傾くため、黄色を呈する（中央）。左は培養前の pH5.0 の培地。

(守谷直子)

## Ⅲ. スターター選抜例とチーズの評価

### 1. スターター選抜

#### (1) スターター用乳酸菌の選抜について

チーズスターターの最も重要な特性として、チーズ製造の初期には乳糖を資化して有機酸を生成し、乳の pH を素早く低下させるという酸生成能が挙げられる。次に熟成工程においてチーズ特有の好ましい香味や食感を生じさせ、不快な香味を生成しないことも重要となる。今回のご当地乳酸菌をチーズ製造に使用するという試みにおいては、チーズ製造時に必要な酸生成能は市販のスターター乳酸菌によって達成することとし、今回分離・選抜した乳酸菌には、熟成中チーズのうま味・香りを向上させ商品価値向上効果、あるいは短い熟成期間で目標とするうま味・香りを獲得するという熟成短縮効果を期待しており、いわゆるアジャクト乳酸菌スターターとして使用する。そのため、本マニュアルで選抜する乳酸菌は乳たんぱく分解活性が高いこと（本マニュアル II の 1）、ブドウ糖からガス産生なし（同 II の 3）、10℃で増殖可能（同 II の 4）、5%食塩に耐性（同 II の 5）、市販スターターとの共培養での生育性良好であること（同 II の 8）、ジアセチルを含む乳製品香り成分生産性あり（同 II の 7）、β溶血性なし（同 II の 10）という条件を満たす菌株であることが必要である。

#### (2) 選抜乳酸菌について



チーズスターター用ご当地乳酸菌の複数候補株の生理・生化学的特性を比較するため、また、候補に挙げられた乳酸菌株の将来の利活用のため、表にまとめてカタログ化することとした。

## (参考) 実施例

### ご当地乳酸菌の選抜例

ご当地乳酸菌 *L. paracasei* OUT0010 株、*L. rhamnosus* P-17 株、*L. curvatus* 33-5 株および *L. curvatus* OY-57 株について生理・生化学的特性を表にまとめた。記載した項目は、菌種、株番号、分離源、分離機関、写真、推奨培養温度、乳たんぱく分解力、10℃での生育、40℃での生育、2%食塩耐性、5%食塩耐性、ガス産生性、ジアセチル産生能、市販スター乳酸菌との共培養性、β溶血性、ヒスタミン産生性、細胞壁溶解活性、グルコース資化性、ラクトース資化性、ガラクトース資化性である。

表 スターター菌株として選抜した乳酸菌の特性比較

菌株番号	OUT0010	P-17	33-5	OY-57
分離源	酒粕	熟成チーズ	熟成チーズ	三五八漬け
分離機関	帯畜大	食加研	道工技セ	小山高専
写真				
推奨培養温度	35~40℃	35℃	30℃	30℃
乳たんぱく分解力*	+	+	+	+
増殖性 (MRS)	10℃	+	+	+
	40℃	+	+	+
耐塩性 (MRS)	2%	+	+	+
	5%	+	+	+
ガス産生	-	-	-	-
ジアセチル産生	+	+	+	+
市販スターとの共培養性	+	+	+	+
β溶血性	-	-	-	-
ヒスタミン産生	-	-	-	-
細胞壁溶解活性	実施せず	-	実施せず	実施せず
糖資化性	グルコース	+	+	+
	ラクトース	-	+	+
	ガラクトース	+	+	+

\*乳たんぱく分解力は、各菌種の標準菌株と比較して活性が高い場合は+、低い場合は-と表記した。

(八十川大輔)



## 2. スターター乳酸菌の確認

### (1) 目的

本マニュアルで開発するご当地乳酸菌チーズスターターは、うま味や香り成分の増強や熟成期間の短縮を目的に補助スターターとしてメインスターター添加と同時に追加するスターターである。補助スターターであるため、原料乳に対しメインスターターの 1/100 程度の菌数となるように添加する。添加したご当地乳酸菌は熟成中にチーズの中で十分に増殖していることが期待される。

本項では、ご当地乳酸菌チーズスターターの増殖の確認のため、当該スターターを添加して製造したチーズからの乳酸菌の分離方法、および 16S rDNA を用いた乳酸菌種同定によるご当地乳酸菌の増殖確認方法について述べる。

### (2) 準備するもの

#### ・試薬・消耗品

- MRS 寒天培地 (BD 社、Merck 社など)
- BCP 加培地 (日水製薬 (株) )
- 試験管
- 70%(v/v)エタノール
- 使い捨て手袋
- 滅菌生理食塩水
- ストマッカー袋
- コンラージ棒
- 脱酸素剤 (三菱ガス化学 (株) など)
- 滅菌爪楊枝

- 0.2 mL 容 PCR チューブ
- TNE バッファー： トリス (pH8.0) 10 mM, NaCl 10 mM, EDTA (pH8.0) 1 mM
- PCR 試薬 (GO Taq Green Master Mix:プロメガ社など)
- 27f プライマー： AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
- 518r プライマー： GTATTACCGCGGCTGCTGG
- 1492r プライマー： CGGTTACCTTGTTACGACTT
- PCR 産物精製用スピнкаラム (シリカメンブレンを使用したものなど)
- T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub> バッファー： トリス (pH8.0) 10 mM, EDTA (pH8.0) 0.1mM
- ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 (サーモフィッシャー)
- 蛍光色素除去用スピнкаラム (Centri-Sep Spin Columns code401762 サーマフィッシャーなど) または BigDye XTerminator Purification Kit code4376484 (サーモフィッシャー)
- Hi-Di ホルムアミド (サーモフィッシャー)
- 96 穴 PCR プレート用耐熱シール

#### ・装置・器具

- ストマッカーあるいはカップや刃の部分が滅菌可能なホモジナイザー
- まな板
- 包丁
- 天秤
- ピンセット
- スパーテル

- オートクレーブ
- 試験管立て
- ガスバーナー
- 白金耳
- マイクロピペット
- 嫌気ジャー（三菱ガス化学（株）など）
- ボルテックスミキサー
- サーマルサイ클ラー
- 高速冷却遠心機
- DNA シーケンサー（サーモフィッシャー）

### **(3) 手順 1 : チーズ 1 g 中の乳酸菌数測定**

以下の手技は、チーズに直接触れる器具、手指からの微生物の混入を避ける目的で、可能な限りオートクレーブや乾熱滅菌した器具を使用し、滅菌できないものは 70% (v/v)エタノールを噴霧、清拭する。使い捨ての手袋を着用して手指からの汚染を防ぐ。

- ① 供試チーズを切り分け、さらにチーズ中心部を切り分け細切する。そのうち 10 g をストマッカー袋あるいはホモジナイザーカップに分取する。ストマッカー袋を使用する際は瓶の底等でチーズを押しつぶし、さらに細かくする。
- ② ストマッカー袋あるいはホモジナイザーカップに 90 mL の滅菌生理食塩水を添加し、60 秒間処理、チーズの 1/10 懸濁液を調製する。
- ③ 試験管に 9 mL の生理食塩水を 5 本用意し、チーズ 1/10 懸濁液 1 mL を最初の 1 本に加えて十分に混和、1/100 懸濁液とする。さらに希釈操作を繰り返し、1/10<sup>6</sup>

までの段階希釈液を調製する。

- ④ 各希釈液 0.1 mL を 2 枚ずつ MRS 寒天培地あるいは BCP 加寒天培地\*に塗抹し、30℃で 3 日間嫌気培養を行う。
- ⑤ 出現したコロニー数が 30~300 の希釈率のシャーレ 2 枚についてコロニー数の平均値を算出し、希釈率を乗じて 0.1 mL あたり (0.1 g あたり) の菌数を出す。この数に 10 を乗じてチーズ 1 g あたりの菌数とする。

#### (4) 手順 2 : チーズ中の乳酸菌叢分析

上記の手順 1 によりシャーレに出現したコロニーそれぞれについて 16S rDNA 塩基配列を用いて菌種の同定を行う<sup>(1)</sup> ことにより、そのチーズ中の乳酸菌叢を分析する。チーズ 1 サンプルあたり約 100 コロニーについて行う。

- ① コロニー 1 個を滅菌爪楊枝で 0.2 mL 容 PCR チューブ中の TNE バッファー 50  $\mu$ L に懸濁する (菌体はほんのわずかで良い)。10 秒間ボルテックスミキサーにて菌体をバッファー中に分散させる。
- ② サーマルサイクラー (99℃、8 分間  $\rightarrow$  4℃、ホールドのプログラム) インキュベートすることによりバッファー中に DNA を溶出させる。10 秒間ボルテックスにかける。
- ③ 2 分間遠心分離を行い、菌体を沈殿させる。上清の 5  $\mu$ L を以降の手順で使用する。
- ④ 予め 27f プライマーと 518r プライマーを最終濃度 0.4  $\mu$ M となるように添加した PCR 試薬を、最終体積 1 サンプルあたり 25  $\mu$ L (上記 3) (DNA 溶液 5  $\mu$ L を加えた最終体積が 25  $\mu$ L。この時点では 1 サンプルあたり 20  $\mu$ L となる。) となるようにメーカー指定の用量を、分析するコロニー数分、予め混合し新しい PCR チューブ (約 100 本) に 20  $\mu$ L ずつ分注して氷上のアルミブロックに置いておく。16S rDNA 遺伝

子のほぼ全長 (1.5 kbp) を解析する際は 518r プライマーの代わりに 1492r プライマーを使用する。

⑤ ここで③の上清 5  $\mu$ L を加え (全体で 25  $\mu$ L) 、ボルテックスにかける。遠心後サーマルサイクラーにかける。

⑥ プログラムは以下の通り

93 $^{\circ}$ C	3 分	
93 $^{\circ}$ C	30 秒	36 サイクル
50 $^{\circ}$ C	15 秒	
72 $^{\circ}$ C	30 秒 <sup>注</sup>	
72 $^{\circ}$ C	7 分	
4 $^{\circ}$ C	ホールド	

これにより 16S rDNA 約 1,500 bp 中の前方約 500 bp が増幅される。

注 : 1492r プライマーを用いて 16S rDNA のほぼ全長 (1.5 kbp) を解析する際は 72 $^{\circ}$ C の伸長反応時間を 30 秒間から 90 秒間に延長する。

⑦ PCR 産物精製スピナラムなどを用いてメーカー指定の方法で⑥で作製した PCR 産物を精製する。産物を 35  $\mu$ L の T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub> バッファーに溶解する。

⑧ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 を用い、DNA 増幅断片の塩基配列を決定する。予め分析するコロニー数分の以下の試薬等を混合しておき、0.2 mL 容 PCR チューブに 19  $\mu$ L ずつ分注して氷上のアルミブロックに置いておく。

## 予め混合する試薬等

・ 滅菌水	13 $\mu\text{L}$
・ シーケンシングプレミックス	2 $\mu\text{L}$
・ シーケンシングバッファー	3 $\mu\text{L}$
・ 1.6 $\mu\text{M}$ 518r プライマー	1 $\mu\text{L}$ <sup>注</sup>
合計	19 $\mu\text{L}$

(シーケンシングプレミックスとシーケンシングバッファーはキットのもの、滅菌水と 518r プライマーは別途準備)

注：27f プライマーと 1492r プライマーで増幅した 1.5 kbp の DNA 断片の配列を解析する際は、1.6  $\mu\text{M}$  に調製した文献<sup>(1)</sup>記載の 12 種のプライマーを用いてほぼ全長の解析を行う。

- ⑨ 上記⑦で調製した DNA 増幅断片をそれぞれ 1  $\mu\text{L}$  ずつ PCR チューブに加えて混合後スピンドウンする。
- ⑩ サーマルサイクラーに PCR チューブを乗せ、以下のプログラムで PCR を実行する。

96 $^{\circ}\text{C}$	1 分	25 サイクル
96 $^{\circ}\text{C}$	10 秒	
50 $^{\circ}\text{C}$	5 秒	
60 $^{\circ}\text{C}$	4 分	
4 $^{\circ}\text{C}$	ホールド	

- ⑪ シーケンス反応後の試料 20  $\mu\text{L}$  をメーカーのプロトコールに従いスピнкаラム等（ゲルろ過）や BigDye XTerminator Purification Kit を用いてシーケンシング反応産物を精製する。
- ⑫ DNA シーケンサーの機種に応じ Hi-Di ホルムアミドと前項で精製したシーケンシング反

応産物を混合し、サーマルサイクラーで 96℃、2 分 → 4℃、ホールドのプログラムにより前処理を行い、DNA シーケンサーにかける。

SeqStudio Genetic Analyzer や 3130 Genetic Analyzer（いずれも 4 本キャピラリー）の場合は 96 穴 PCR プレートに Hi-Di ホルムアミド 20 μL と混合したシーケンシング反応産物を分注して耐熱性シールで蓋をして 96℃、2 分 → 4℃、ホールドのプログラム後 DNA シーケンサーにかける。

- ⑬ 解析データを Sequence Analysis Software7 などの解析ソフトで編集し、BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で相同性検索を行う (BLAST >> blastn suite)。
- ⑭ 分析株が、検索結果リスト上で相同性が最も高い菌種と「同一あるいはその近縁種」と推定する。分析株がチーズを製造する際に使用したメインスターターに含まれる菌種が相同性最上位であった場合は、メインスターター由来の乳酸菌と推定し、添加した補助スターターと一致した場合は補助スターター由来と推定する。

## (5) 用語説明

BCP 加寒天培地：乳等省令に定められた乳酸菌数の測定方法で公定培地として採用されている培地

BCP 加プレートカウントアガール「ニスイ」（日水製薬（株））、

BCP 加プレートカウント寒天培地「栄研」（栄研化学（株））

酵母エキス                    0.25% (w/v)

ペプトン                        0.5% (w/v)

ブドウ糖                        0.1% (w/v)

Tween 80                        0.1% (w/v)

L-システイン	0.01% (w/v)
ブロモクレゾールパープル	0.004~0.006% (w/v)
粉末寒天	1.5% (w/v)
pH6.8~7.0	

## (6) 参考文献

長島浩二、八十川大輔、中川良二、池田隆幸、塩基配列に基づく細菌同定法の食品  
マイクロフロー解析への応用、日本食品科学工学会誌、45(1) 58-65(1998).

(八十川大輔)



### 3. アミノ酸組成分析

#### (1) 目的

分離乳酸菌を用いて製造したチーズについて、熟成度合いの指標の一つとなるアミノ酸組成の分析を行う。

#### (2) 準備するもの

##### ・試薬・消耗品

- アミノ酸移動相キット Li 型
- アミノ酸分析キット OPA 試薬（以上、島津社）  
標準液：アミノ酸混合標準液 B 型および AN-II 型、L-アスパラギン標準液、L(+)-グルタミン標準液（富士フィルム和光純薬（株））

##### ・装置・器具

- 高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC）（Prominence アミノ酸分析システム、（株）島津製作所）
- 精密天秤
- スパーテル
- カッター（市販カッターの替刃、刃幅 20 mm 前後が望ましい）
- ホモジナイザー
- マイクロピペット
- 遠心分離機
- pH メーターもしくは pH 試験紙
- 分析カラム（Shim-pack Amino-Li 6.0 mmΦ x 100 mm）
- アンモニアトラップカラム（Shim-pack ISC-30/S0505Li 4.0 mmΦ x 50

mm)

- サンプル破碎用チューブ
- 1.5 mL マイクロチューブ
- 15 mL および 50 mL 遠沈管
- 50 mL メスフラスコ
- 10 mL もしくは 25 mL メスピペット

### (3) 手順

- ① チーズ塊中央部を起点として扇状に切り分けたチーズ片（約 200 g）の、中央部に相当する辺より 20 mm 内を試料として用いる。硬化した外皮は 5 mm 以上内側まで除去する。
- ② ①で作製した切片より 5 g を精密に秤量し、水:0.5 N TCA=2:1 の破碎溶液 20 mL に添加する。ホモジナイザーにて 8,000 rpm、3 分間磨砕し、上清をメスフラスコに回収後、沈殿を再び前述破碎溶液 25 mL に懸濁し 8,000 rpm、2 分間磨砕後に上清を回収、50 mL にメスアップする。
- ③ ②で調製した液の一部（数 mL）を分取し、等量のヘキサンを添加混合して脱脂を行う。
- ④ ③の上清 120  $\mu$ L と 0.3 M 水酸化リチウム 40  $\mu$ L を混合し、pH を 2~3 に調整する。クエン酸リチウム緩衝液 pH 2.2 で 10 倍に希釈後、0.2  $\mu$ m フィルターでろ過する。これを分析サンプルとして HPLC に供する。
- ⑤ HPLC 分析は以下の条件で行う：  
移動相流量：0.6 mL / min.  
移動相グラジエント：Li 型グラジエントプログラム

カラム温度 : 39℃

サンプル注入量 : 10  $\mu$ L

反応液流量 : 0.2 mL / min.

反応温度 : 39℃

検出器 : 蛍光検出器 (励起波長 350 nm、蛍光波長 450 nm)

(住佐 太)

## 4. 香り成分分析

### (1) 目的

チーズ製造における乳酸菌を評価および選抜する上で、乳酸菌を添加して製造したチーズの香り成分の確認は、重要なポイントとなる。ここでは、乳酸菌を添加して製造したチーズの香り成分の測定について述べる。

### (2) 準備するもの

#### ・試薬・消耗品

- 使い捨てゴム手袋
- 純空気 (G3 太陽日酸 (株) など)
- 純水素 (G2 太陽日酸社 (株) など)
- 20 mL 試料バイアル瓶 (アルファ・モス・ジャパン社)
- バイアル瓶キャップ (アルファ・モス・ジャパン社)

#### ・装置・器具

- 臭い識別装置 (フラッシュG Cノーズ HERACLES II アルファ・モス・ジャパン社)
- まな板
- 包丁
- キャッパー (アルファ・モス・ジャパン社)
- 天秤
- 試験管立て

### (3) 手順

- ① チーズを、ゴム手袋を手に装着しまな板と包丁を用い、カットする。ゴム手袋、まな板と包

丁はチーズ試料毎に交換する。

- ② カットしたチーズ 2.00 ± 0.05 g を 20 mL バイアル瓶に採集し、キャッパーを用いてバイアル瓶キャップで密栓し献体とする。
- ③ 分析手順は、上記「Ⅱ. 分離乳酸菌の特性評価 9. 乳製品香り成分分析」と同様に行う。
- ④ 各種香り成分のピーク面積値をチーズ製造における乳酸菌の評価および選抜の参考とする。

#### (4) 注意点等

- ① 臭い識別装置（フラッシュGCノーズ HERACLES II アルファ・モス・ジャパン社）は純空気と純水素がセットアップされていること。

#### (参考) 実施例

##### ご当地乳酸菌の選抜例とチーズの評価

**目的** チーズスターター用ご当地乳酸菌の複数候補株から最優秀株を選抜するため、各候補株スターターを用いてゴーダチーズを試作し、試作チーズの香り成分について臭い識別装置を用いて分析解析し、その結果から最優秀株を評価した。

**結果および考察** ご当地乳酸菌候補は、*L. curvatus* 33-5 株と *L. paracasei* OUT0010 株とし、それぞれのスターターを調製した。対照は市販スターターとした。これらのスターターを用いてゴーダチーズを試作し3か月熟成後のチーズの香り成分を分析した。表に結果を示した。ご当地乳酸菌候補を添加したチーズは、概して市販スターターチーズよりも香り分量が多く、優れていた。ご当地乳酸菌候補2株の比較においては *L. paracasei* OUT0010 株が優れ、これを最優秀株とした。

表 3 か月熟成期における市販スターターチーズ（ゴータチーズ）とご当地乳酸菌チーズ  
スターター添加チーズの香り成分量の比較(n=3)

試料	香り成分 フラッシュ GC ノーズ計測ピーク面積							
	アセトアルデヒド	ジアセチル	ブタン-2-オン	アセトイン	プロピオン酸	ブチルアセテート	酢酸	テトラメチルピラジン
	エーテル臭	バター臭	バター臭	バター臭	チーズ臭	バナナ臭	酢	ココア臭
	フレッシュ	キャラメル臭	チーズ臭	コーヒー臭	フルーティ	青草臭	刺激臭	コーヒー臭
	フルーティ	フルーティ	チョコレート臭	クリーム臭	刺激臭	洋梨臭	酸っぱい	ナッツ臭
	刺激臭							ロースト臭
市販スターターチーズ	1183±351	3821±2470	834±527	trace	trace	818±228	trace	6011±2081
<i>L. curvatus</i> 33-5 株添加チーズ	1337±245	6629±2823	969±366	trace	trace	530±134	trace	7998±3762
<i>L. paracasei</i> OUT0010 株添加チーズ	1468±437	8329±2239	1679±505	trace	trace	630±143	trace	9171±2587

結果は平均値±標準偏差

(大坪雅史)

## 5. テクスチャー分析

### (1) 目的

分離乳酸菌を用いて製造したチーズについて、熟成度合いの指標の一つとなるテクスチャー分析を行う。

### (2) 準備するもの

#### ・消耗品・器具

- テクスチャーアナライザー（EZ-SX 島津社）
- 治具：圧縮治具上圧盤 Φ20 mm
- カッター（市販カッターの替刃、刃幅 20 mm 前後が望ましい）
- 保冷庫（5℃、霜取り機能はオフに設定）
- ディスポーザブルシャーレ（厚さ 15 mm 以上）
- 市販ラップ
- アルミホイル
- 70～80%エタノール（スプレー容器にて準備）

### (3) 手順

- ① 供試サンプルのチーズは凍結させず、必ず冷蔵保存したものをを用いる。
- ② チーズ塊中央部を起点として扇状に切り分けたチーズ片（約 200 g）の、中央部に相当する辺より約 20 mm 以内は、後述の試験片に必要な寸法が足りないので除去し、前項 3.アミノ酸分析用サンプルとして用いる。硬化した外皮も 5 mm 以上内側まで除去する。
- ③ ②でトリミングしたチーズ片を幅 20 mm x 奥行 20 mm x 高さ 10 mm の直方体

に切り出す。各切片は 5 分以内で切り出し、シャーレに入れてラップ等で密閉し、直ちに 5℃にて一時保管し乾燥および温度上昇を防ぐ。試験片全てを調製後、3 時間以上 5℃にて保冷する。

④ テクスチャーアナライザーでの分析は以下の条件で行う：

試験条件：上下 2 回ストローク（咀嚼試験）、速度 1 mm/sec.、侵入距離 3 mm、試験片高さ 10 mm

取得データ項目：硬さ・付着力・付着性・凝集性・弾力性・ガム性・咀嚼性（7 項目）

⑤ 測定の際、保冷庫から取り出して測定開始するまでは 15 秒以内に行う。シャーレごと取り出さず、各試験片 1 片ずつ取扱う。

⑥ 各試験片の測定終了毎に、治具および下板をエタノールで拭き取り清掃し、乾燥させてから次の試験片を分析する。

（住佐 太）



## 6. 味覚センサーによる評価

### (1) 目的

味覚センサーは食品の持つ味を数値化して表す装置である。ご当地乳酸菌の使用によるチーズの味質の変化を評価するため、ここでは味覚センサーによる熟成チーズの評価方法について述べる。

### (2) 準備するもの

#### ・試薬

- 蒸留水
- ろ紙 (TOYO 5A)
- 味認識装置基準液 (30 mM 塩化カリウム、0.3 mM 酒石酸)
- 味認識装置 1/30 濃度基準液

#### ・装置・器具

- まな板
- 包丁
- スパチュラ
- 天秤
- ミルサー (ホモジナイザー、ジューサー代用可)
- メスシリンダー
- 遠沈管
- ろうと
- ろうと台
- サンプル溶液保存容器

- 味認識装置 TS-5000Z（株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー）
- 高速遠心分離機（18,000 rpm (38,900 x g) 以上回転可能なもの）

### （3） 手順

- ① セミハードタイプなどにあるリンド（表皮）は、通常、摂食しないため、まな板の上で、包丁でリンドを切り分ける。切り分けた可食部を 5~10 mm 角程度に細かくカットして、スパチュラでおよそ 6 g を秤量して、重量を記録する。
- ② ミルサーのカップに秤量したチーズを入れて、チーズ重量の 4 倍量の 1/30 濃度基準液もしくは蒸留水を加えて、20 秒間連続粉碎を 3 回繰り返し、ペーストにする。なお、このときチャージングにより生じたバター粒が浮遊するが、測定に影響はしない。また、1/30 濃度基準液によるサンプル懸濁液の調製は旨味測定用分析検体、蒸留水による調製は旨味以外の味質評価用分析検体となる。
- ③ 遠沈管に調製したサンプル懸濁液を移す。予め 5℃に冷却した高速遠心分離機に遠沈管をセットし、18,000 rpm (38,900 x g)、20 分間の遠心分離を行う。遠心分離後、懸濁液は上層に脂肪分、中間層に清澄液、下層に不溶性固形分に分離し、この中間の清澄液をサンプル溶液保存容器にろ過して回収する。サンプルを保存する場合は冷凍する。
- ④ 旨味測定用の分析検体は 1/30 濃度基準液でさらに 200 倍希釈（最終 1,000 倍希釈）し、旨味以外の分析検体は蒸留水でさらに 10 倍希釈（最終 50 倍希釈）して、味覚センサーで分析する。

### （4） 注意点等

- ① 旨味測定用センサー（AAE）はカルシウムイオンにより影響されることがメーカーから報告されているため、必ず旨味以外測定用とは別に分析検体を調製する。

② チーズの旨味測定用分析検体の希釈倍率は、メーカーの推奨は最終 1,000 倍であるが、チーズの種類などサンプルの違いによって至適な希釈倍率が変わる可能性があるため、各自で検討することが望ましい（図 1）。

**(参考) 実施例**

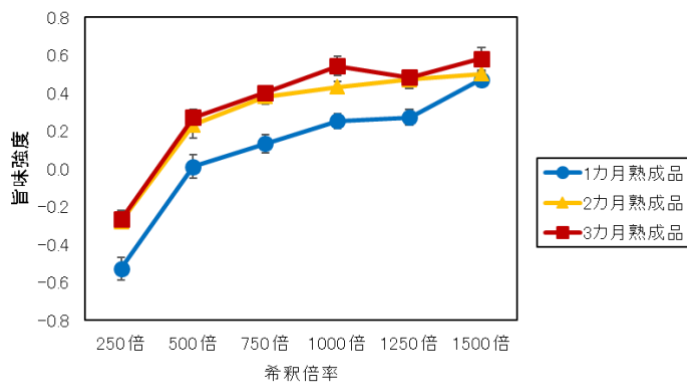


図 1. 熟成チーズの各希釈倍率における旨味強度

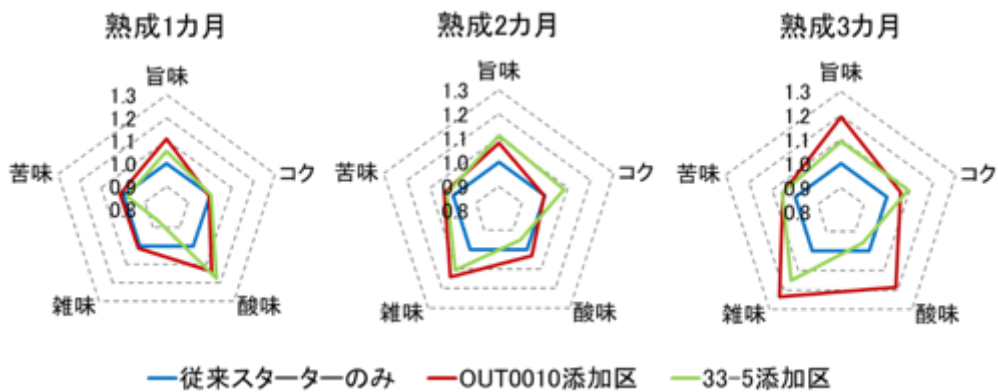


図 2. 各熟成期における味質の相对比较

(高谷政宏)

## 7. 官能評価

### (1) 目的

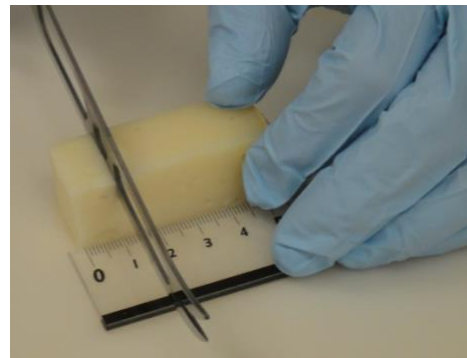
本プロジェクトで開発したご当地乳酸菌チーズスターターを用いて製造したゴーダチーズについて、消費者による嗜好を調査することを目的とする。本マニュアルではチーズの官能評価における一般的な留意事項について述べるとともに、J チーズプロジェクトで実施した嗜好型官能評価を実施例として紹介する。

### (2) 官能評価の一般的な留意点

官能評価においては、サンプルは全て同一形態、同一条件で提示する。また、サンプルには3桁の乱数からなるコードを付し、被験者ごとに異なる順序でサンプルを提示する。サンプルの提示順序は、被験者が200名以下の場合にはラテン方格を用いて設計するのがデータ解析上は有利である。これらの留意点は、全て官能評価におけるサンプル以外の要因（交絡因子、バイアス）が評価結果に影響を及ぼさないために必要なことである。

### (3) 試料調製

- ① 評価に用いるチーズは、定規を用いて全て同じ形態、同じサイズにカットする。チーズの場合は外皮と内部で品質が異なるため、外皮は除去するか、あるいは全てのサンプルに



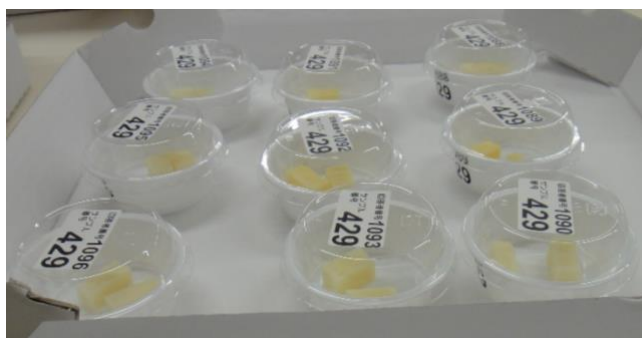
において外皮が同じように含まれるようカットする。本事例においては、評価前日に、外皮を除いた部分を 1 cm x 1 cm x 2 cm の立柱状に定規を使用して正確にカットし、パネリスト 1 人あたり 2 個提供できるように準備した。調製したチーズ片はブロック状に積み重ね、試験時間まで乾燥しないように冷蔵保存した。

## ② 評価試料の提示方法と提示順序

各々の試料チーズを 2 片ずつ、3 桁の乱数を付した個別の蓋付き容器に入れ、ラテン方格で設計した提示順で 1 試料ずつパネリストに提供して評価させる。この際、試料と試料の間に 1 分間の休憩を設定し、その間に純水で口をすすがせるなど、疲労効果やキャリーオーバー効果が生じないように注意する。口中をクリアするために純水の他に塩味の無いクラッカーなどを提供してもよいが、休憩時間以外に使用させないように注意する。なお、農研機構において多くの一般消費者を対象に行う場合は、会場の全ての被験者が 1 つの試料の評価が終了したことを確認してから 1 分間の休憩を取り、次の試料を配布する方法を採用している。

また、試料の温度条件についても同一に揃えるべきであり、室温で評価させるのであれば、早い段階から室温に戻しておくなど工夫する必要がある。

## (参考) 実施例



## 国産スターターを用いたチーズの消費者型官能評価（札幌市）

### （1）本実施例における試料

J チーズスターター（どさんこチーズスターター-OUT0010, あるいは 33-5, とちぎスターター-OY-57）のいずれかを補助スターターとして添加して製造した2か月間および3か月間熟成したゴーダチーズ、ならびに、補助スターターなしで製造した2か月間および3か月間熟成した標準ゴーダチーズを準備した。

### （2）消費者パネルおよび官能評価会場の準備

嗜好型官能評価を実施するための消費者パネルの選定および会場の準備は、以下の様な条件、およびその他必要な要望を提示し、専門業者に委託した。

#### パネリストの選定要件例

- 会場に自力で来所可能な、日本語を母語とする日本人の男女とする。
- 年齢および性別構成は以下の内容を基本とし、最低合計100名が本試験を完了し、有効回答が得られるようにすること。
- いずれの年齢層についても、可能な限り男女比がそろうようにすること。
- アレルギーや宗教上の事情による問題が無く牛乳を原料とする食品が試食可能であり、かつチーズの試食および評価に意欲があると同時に、官能評価および付帯アンケートにおいて、全ての設問に回答可能な者であることを事前に十分説明の上確認し、本人の同意を得ること。

20歳代 20名

30歳代 20名

40歳代 20名

50歳代 20名

60歳以上 20名

## 会場の要件例

### ① 立地

- リクルーティングしたパネリストが公共交通機関で来場できること
- 気象条件等による来場条件の変化ができるだけ少ない立地が望ましい

### ② 評価室

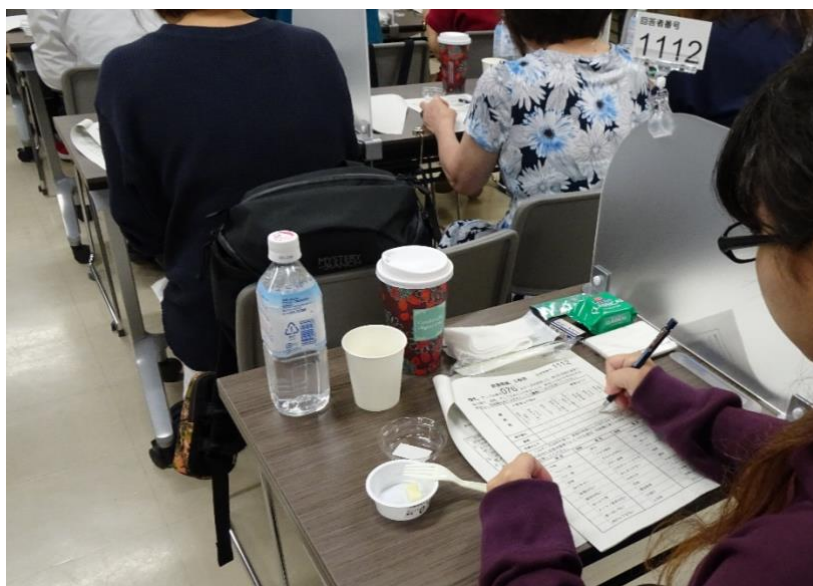
- 少なくとも60名を収容可能な机と椅子を備えていること
- サンプルの喫食が可能であること
- 22℃に空調を設定可能であること
- 蛍光灯による照明を備えていること
- 液晶プロジェクターとスクリーン、もしくはこれに準ずる説明用の設備を備えていること

### ③ 調理室

- ②評価室と同一の建物内にあること
- 調理器具や手指の洗浄が可能な衛生的な流し台等を有すること
- 前日よりサンプルの保存が可能でかつ4℃に設定可能な冷蔵庫を有すること

## (3) 評価

1 試料ずつパネリストに提示したチーズの「味や香り」「食感」「全体として」の3項目について、“非常に好ましくない”から“非常に好ましい”を8段階に分け、当てはまるスケールを回答させた。



#### (4) 参考文献

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門. 令和元年度食肉・鶏卵・乳製品の官能評価ワークショップ 入門編テキスト. 畜産研究部門資料令1-2. 2019

International Organization of Standardization. ISO22935-2:2009. Milk and milk products -Sensory analysis- Part 2: Recommended methods for sensory evaluation. 2009.

(小林美穂、佐々木啓介)



## IV. スターターカルチャーの製造と保存

### 1. スターターカルチャーの製造

開発チーズ用スターターをチーズ製造の現場で使う際、スターターカルチャー（凍結乾燥菌体、凍結菌体など）の形態で利用されることが多い。本項では、スターターカルチャー製造の実施例を紹介する。

#### （参考）実施例

##### ① 予備検討（3 L 容ジャーファーマンター）

食品として利用可能な培地成分（表 1）で乳酸菌を培養し、遠心分離して得られた菌体（*L. paracasei* OUT0010 の場合）に保護剤（乳糖 10%(w/v)、グルタミン酸水素ナトリウム 1%(w/v)溶液）を加えて凍結乾燥（0℃、48 時間⇒20℃、24 時間）した結果を表 2 に示す。

表 1 3 L 容ジャーファーマンター培養試験における培地組成（1 L 中）

ブドウ糖	20 g
酵母エキス	10 g
カゼインペプトン	10 g
硫酸マグネシウム	0.2 g
硫酸第一鉄	0.01 g
マンガン入り酵母	0.6 g
Tween 80	0.5 g

表 2 乳酸菌株の培養条件、乳酸菌数（3 L 容ジャーファメンター）

	培養温度	培養 pH	培養時間	培養液 (CFU/mL)	凍結乾燥粉末 (CFU/g)
<i>L. paracasei</i> OUT0010	30℃	pH 6.0	17 時間	4.4×10 <sup>9</sup>	1.5×10 <sup>11</sup>

② 実規模試作（2 トン培養タンク）

*L. paracasei* OUT0010 について、ブドウ糖、酵母エキス、カゼインペプトン、ミネラル（マグネシウム、マンガン、鉄）を加えた培地を調製し（1,600 L）、30℃、pH6.0 の条件で培養を行った（表 3）。また、培養液を遠心分離して得られた菌体に保護剤（トレハロース 10%(w/v)、グルタミン酸水素ナトリウム 1%溶液）を加えて凍結乾燥（一次乾燥：0℃、二次乾燥：32℃）を行い、得られた粉末（18.5 kg）の生菌数を調査した。培養条件と培養液、凍結乾燥粉末の菌数を表 4 に示す。使用した培地成分、凍結乾燥保護剤は、食品あるいは食品添加物として使用可能なものを選択した。

表 3 スターター用乳酸菌培養用培地（1 L 中）

含水結晶ブドウ糖	21.9 g
酵母エキス	21.9 g
カゼインペプトン	10 g
硫酸マグネシウム	0.2 g
硫酸第一鉄	0.01 g
マンガン入り酵母	0.6 g

表 4 スターター乳酸菌の培養条件、乳酸菌数（実規模試作）

	培養温度	培養 pH	培養時間	培養液 (CFU/mL)	凍結乾燥粉末 (CFU/g)
<i>L. paracasei</i> OUT0010	30℃	pH 6.0	19 時間	$1.0 \times 10^{10}$	$1.1 \times 10^{11}$

### (1) 注意点等

- ① 最適な培地組成、培養条件、保護剤の種類は、菌株により異なる可能性がある。
- ② スターターカルチャーの品質基準は、国際酪農連盟（IDF）から示されている基準などを参考とする（IDF149:2010）。

（北村 享）

## 2. 保存性評価

### (1) 目的

開発チーズ用スターターカルチャーの使用の際、スターターカルチャーの保存性を知ることは重要である。今回、保存性の評価は残存乳酸菌生菌数とし、その測定法について述べる。

### (2) 準備するもの

#### ・試薬・消耗品

- スターターカルチャー
- 滅菌ピペット
- アルコール綿
- 滅菌シャーレ
- 乳酸菌測定寒天培地：乳酸桿菌は MRS 培地（BD 社、Merck 社など）、球菌は M17 培地（BD 社、Merck 社など）を用いることとし、それぞれの液体培地に寒天 1.5%を添加し滅菌（121℃、15 分間）後、50℃に保温して用いる。
- 滅菌リン酸緩衝液（9 mL、45 mL 日本細菌検査（株）など）
- 試験管

#### ・装置・器具

- インキュベーター
- 天秤
- スパーテル
- オートクレーブ
- 試験管立て

- ガスバーナー
- ウォーターバス

### **(3) 手順**

- ① スターターカルチャーを任意の条件（保存温度など）にて保管する。
- ② 保管期間中、経時的にスターターカルチャーを取り出し乳酸菌菌数を測定する。
- ③ 乳酸菌数測定法は次の通り行う。スターターカルチャーに 10 倍量の滅菌リン酸緩衝液を加え混和し、これを 10 倍希釈液とする。10 倍希釈液 1 mL を 9 mL の滅菌リン酸緩衝液に加え 100 倍希釈液とする。必要に応じ同様の操作を続け高次希釈液を調製する。各段階希釈液 1 mL を滅菌シャーレに入れ、次いで 50℃に保温した乳酸菌寒天培地約 20 mL を注ぎ希釈液と混和させ固化させる。固化後、30℃で 2 日間培養し、出現したコロニーを計数し乳酸菌数（CFU/g）を求め、保存性を評価する。

### **(4) 注意点等**

使用するスターターカルチャーは一度限りとし、次の試験に用いない。

(大坪雅史)

### 3. 推奨保存方法

チーズ製造において、スターターカルチャーの長期保存性は、コスト削減の点で有用である。保存に関わる要因として、温度、湿度、酸素、光等が考えられるが、長期保存のために、次の条件を推奨する。

スターター形態：凍結乾燥菌体

凍結乾燥菌体の包装形態：ガスバリア性アルミ蒸着フィルム包装（湿度、酸素、光等の影響を抑える）

凍結乾燥菌体の保存温度：低温（冷凍が望ましい）

#### （参考） 実施例

##### ご当地乳酸菌 DVS の冷蔵と冷凍における保存性の違いの評価

**目的** ご当地乳酸菌（*L. paracasei* OUT0010）の DVS（アルミ蒸着袋密閉）試料の冷蔵と冷凍において保存性に違いがあるかを調査した。冷蔵は 9℃、冷凍は -20℃とした。保存性は乳酸菌数で評価した。

**結果および考察** 表より、冷凍と冷蔵の間に保存期間に伴う乳酸菌数の違いがあり、前者が後者より保存性が高いことが示唆された。よって、スターターカルチャー DVS（アルミ蒸着袋密閉）の保存は冷凍保存を推奨する。

表 ご当地乳酸菌 (*L. paracasei* OUT0010) DVS の保存期間における乳酸菌数

保存期間	乳酸菌数 (CFU/g)	
	冷凍 (-20℃)	冷蔵 (9℃)
1 か月目	$1.1 \times 10^{11}$	$1.1 \times 10^{11}$
3 か月目	$1.7 \times 10^{11}$	$1.7 \times 10^{11}$
5 か月目	$1.0 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{11}$
7 か月目	$5.5 \times 10^{10}$	$6.2 \times 10^9$ 褐変化+
10 か月目	$1.1 \times 10^{10}$	$4.0 \times 10^6$ 褐変化++ 飴状固化
12 か月目	$1.1 \times 10^{10}$	実施せず

(大坪雅史)

## 参考資料

1. 成果情報：ご当地乳酸菌チーズスターターと地域ブランドチーズ  
(農研機構 普及成果情報 畜産・草地 2019年)  
<http://www.naro.affrc.go.jp> からダウンロード可能
2. Jチーズ乳酸菌カタログ (農研機構畜産研究部門刊、2020年)  
<http://www.naro.affrc.go.jp> からダウンロード可能

## 担当窓口、連絡先

外部からの受付窓口：

農研機構 畜産研究部門 研究推進部 研究推進室

お問い合わせフォーム <http://www.naro.affrc.go.jp/inquiry/index.html>



## 執筆者一覧

小林美穂、守谷直子、木元広実、佐々木啓介、鈴木チセ（農研機構）

八十川大輔（北海道立総合研究機構食品加工研究センター）

高谷政宏（とちぎ財団北海道立十勝圏地域食品加工技術センター）

住佐 太（オホーツク財団北海道立オホーツク圏地域食品加工技術センター）

大坪雅史（函館地域産業振興財団北海道立工業技術センター）

中村 正（帯広畜産大学生命食料科学研究部門）

高屋朋彰（国立高等専門学校機構小山工業高等専門学校）

北村 享（雪印種苗株式会社）

## **ご当地乳酸菌チーズスターターカルチャー開発マニュアル**

2021年（令和3年）3月5日 初版発行（WEB版）

編集・発行 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

畜産研究部門

〒305-0901 茨城県つくば市池の台2

本マニュアルは、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」による「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」（J チーズプロジェクト）において実施した研究成果に基づき作成しました。本資料は「私的利用」または「引用」など著作権法上認められた場合を除き、無断で転載、複製、放送、販売などの利用をすることはできません。

「農研機構」は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構のコミュニケーションネーム（通称）です。