



本研究は、日本農芸化学会2020年度大会（福岡）における「ジュニア農芸化学会」（発表は新型コロナウイルス感染症対策のため中止）に応募された研究のうち、本誌編集委員会が優れた研究として選定した6題の発表のうちの一つです。

エメンタールタイプチーズ製造時の牧草添加が チーズアイ形成とプロピオン酸菌の生育に及ぼす影響

北海道岩見沢農業高等学校

大山穂華，霞 璃桜，高杉伊吹，古川そら，松本華成，木口紗弥夏，近藤恋果（指導教諭：渡部哲哉）

本校では、エメンタールタイプチーズの製造においてチーズアイの形成不良が生じている。本実験では牧草粉末の添加量が、チーズアイ形成、微細構造、プロピオン酸菌量、ならびに有機酸量に及ぼす影響を、各熟成期間の形態を走査型電子顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡による観察、および有機酸とプロピオン酸菌量はHPLCと定量的PCRにて測定した。結果、牧草粉末の添加はプロピオン酸菌の増殖にはあまり影響しないが、チーズアイの形成を促進することが明らかとなった。また、チーズアイの個数とサイズをコントロールできる可能性が示唆された。

本研究の目的、方法および結果と考察

【目的】

エメンタールチーズはスイス原産の特徴的なチーズアイと呼ばれる直径1-3cm程度の穴が存在するチーズで、その巨大な外観から『チーズの王様』とも呼ばれている。製造時に添加するスターター（乳酸菌など）、あるいは乳由来のプロピオン酸菌が、熟成初期に生成される乳酸塩を高温熟成時に嫌氣的に分解し、プロピオン酸、酢酸、二酸化炭素、水を生成することでチーズアイが形成されるとされている⁽¹⁾。

近年、本校農場において、チーズアイの形成不良が目立つようになった。原産地スイスにおいても同様の問題が発生し、同国のアグロスコープ研究所では「牛舎内の浮遊物が乳に入るとチーズアイができる」という仮説のもとで研究が進められ、牛舎の近代化によって清潔な環境となり、牧草の粉が舞わず生乳に混入しなくなったためと結論付けていた⁽¹⁾。本校においても牛舎の改築や、牛舎内の清潔化により、チーズアイの形成不良に至って

いると考えた。

われわれはこれまでに、乳量90Lあたり、牧草を2mg添加して製造したエメンタールタイプチーズのチーズアイ形成が良好であることを明らかにした⁽²⁾。また、牧草添加量を2mg/90Lを標準値とした製造実験を実施し、高温熟成の温度を23-26℃、あるいは段階的に26℃に上昇させたチーズの有機酸量、乳酸菌、ならびにプロピオン酸菌量を測定した。乳酸値は熟成14日目まで上昇したが、その後低下が認められた。一方、プロピオン酸値は熟成35日目まで上昇を続けた。乳酸菌量は熟成14日目をピークに低下し、プロピオン酸菌量は35日目以降も上昇した。その後、高温熟成中の過剰なプロピオン酸発酵を抑制するため、熟成温度を23-24.5℃に設定することで、均一なチーズアイを形成し、牧草添加の効果を確認することができた。しかしながら、熟成0, 14, 35, 84日目の走査型電子顕微鏡（SEM）によるチーズ構造の顕微観察では熟成に大きな影響を与えていた乳酸菌やプロピオン酸菌は発見できたが、牧草片の存在は発見できなかった⁽³⁾。

本研究では先行実験で発見できていない牧草片に注目し、仮説を「チーズアイは、添加した牧草を起点に形成される、また熟成に必須であるプロピオン酸菌は組織内の牧草が存在することで増殖する」とし、牧草添加量によるチーズアイ形成とプロピオン酸菌の生育への影響について調査を行った。

【方法】

エメンタールタイプチーズの製造には、本校の農場で飼養しているホルスタイン種とジャージー種から搾乳し

た生乳を混合した混合乳を使用した。クリーム分離した後、乳脂肪分を3.0%に調整し65°C、30分間の殺菌を行った。

製造工程は乳を34°Cまで冷却後、クリスチャン・ハンセン製R-700シリーズ (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*)、高温菌スターターLH-B02 (*Lactobacillus helveticus*)、ST-36 (*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*)、プロピオン酸菌PR-1 (*Propionibacterium freudenreichii* ssp. *globosum*) を添加した。また、粉末牧草の添加は、チーズバット全体に行き渡るようにするため、レンネット(凝乳酵素)添加直前の攪拌工程で添加し、レンネット添加後カード形成を確認し、カッティングした(カードとはチーズとなる部分のこと)。その後、攪拌しホエーを1/3排除し、85°Cの加湯で48°Cになるように25分間で加温した。30分間48°Cでクッキング後、予備圧搾でチーズの形を整え、12h、0.1MPa/cm²で本圧搾をした。その後の塩漬はpH 5.5、Bh(比重の計量単位)22-23のブライン(飽和食塩水)を用い、1kgあたり80分の塩漬を行った。塩漬終了後に乾燥し、熟成中は1週間の内、月、水、金曜日の3日間をKONDO ヴィンヤードで製造された地元岩見沢産ワインの残渣活用ワインと食塩水の混合液を用いてチーズをウォッシュした(熟成中のチーズの表面に悪影響を与える菌の増殖を防ぐため)。

低温熟成は12-13°Cで14日間、高温熟成は先行実験の結果から相対温度23-24.5°Cで21日間、再度低温熟成

表1 ■ SEMおよび共焦点レーザー顕微鏡による計測結果 (nm)

[a] SEMによるタンパク質マトリックス線維の幅の計測結果 (nm)

	0日目	14日目	35日目	84日目
試験区8	5.45	5.07	2.85	2.53
試験区9	5.29	4.47	3.30	1.63

[b] SEMによる脂肪球の直径の計測結果 (nm)

	0日目	14日目	35日目	84日目
試験区8	2.55	2.51	2.52	2.41
試験区9	2.47	2.43	2.38	2.42

[c] 共焦点レーザー顕微鏡によるタンパク質マトリックス線維の幅の計測結果 (nm)

	0日目	14日目	35日目	84日目
試験区8	5.26	5.24	3.98	1.42
試験区9	4.69	4.01	2.50	1.60

[d] 共焦点レーザー顕微鏡による脂肪球の直径の計測結果 (nm)

	0日目	14日目	35日目	84日目
試験区8	2.90	3.03	3.10	2.76
試験区9	2.76	2.87	2.99	2.40

12-13°Cで管理し84日目まで熟成した。なお、牧草添加量は100Lあたりの原料に対し、それぞれ100, 1, 0.1gで製造し、試験区7, 8, 9とした³⁾。

有機酸、および微生物の菌量定量実験の前処理としてチーズの中央部を細断し、滅菌生理食塩水270mLと細断したチーズ30gをサニスバックテストバックに入れ、3分間ストマッキング処理(粉碎・攪拌装置を用いた均質化)をした。有機酸の測定は紫外検出-逆相吸着高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で行い、ストマッキング処理をしたろ液25mLを遠心分離し(1,000rpm, 10min, 25°C)、デカンテーションにより得られた上清を測定試料とした。定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)ではチーズ試料から抽出したDNAを用い、絶対検量線法によりプロピオン酸菌量を定量した。チーズ沈査から抽出したDNA溶液を20倍に希釈し、プロピオン酸菌特異的プライマーを使用してDNA量に基づくプロピオン酸菌の菌量を測定した。

各試験区のチーズ断面図を熟成毎にフリーソフトウェアのImage Jを用いて画像解析を行い、チーズアイの個数、あるいはスケール面積を解析した。

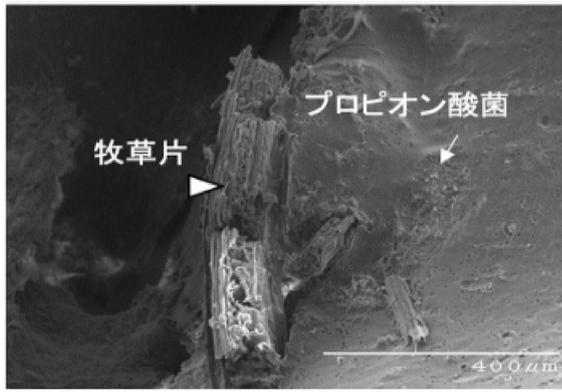
SEMによる観察では、各試験区の熟成0, 14, 35あるいは56, 84日目でサンプリングし、添加したスターターである乳酸菌・プロピオン酸菌や、タンパク質、脂肪球の形態を観察した。

共焦点レーザー顕微鏡観察では先行研究⁴⁻⁶⁾を参考に、タンパク質マトリックスや脂肪球を染色し観察を行った。チーズ組織中のタンパク質成分(主にカゼイン)はフルオレセインイソチオシアネート、脂肪はナイルレッドにて染色して検鏡した。

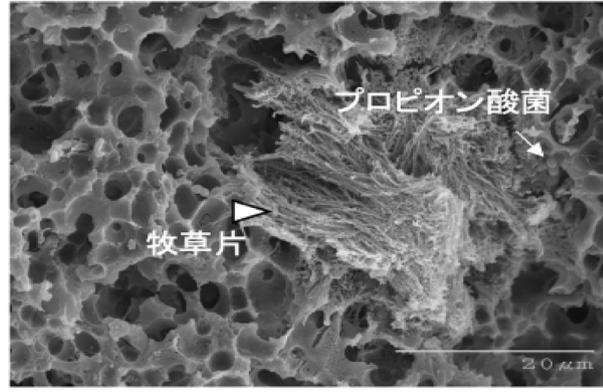
【結果】

SEM像にあるタンパク質マトリックス部分をランダムに20箇所選択し、マトリックス線維の幅を測定した。熟成に伴いマトリックス線維の幅は狭くなり、脂肪球が存在したと考えられる組織上の球状の凹みに大きな変化はなかった(表1[a], [b])。さらに、試験区7の試料、ならびに試験区8の熟成35日目の試料に、粉末牧草とプロピオン酸菌群が共存している領域を確認した(図1)。

共焦点レーザー顕微鏡での観察では、SEM同様、画面上でフルオレセインイソチオシアネートにより緑色に染色されたタンパク質マトリックス線維の幅を測定したところ熟成初期に比べ、熟成が進むほど幅は小さくなった。(表1[c], 図2) ナイルレッドで赤色に染色された脂肪球は熟成に伴い大きくなった(表1[d], 図2)。チーズ組織の構成成分であるタンパク質マトリックス線維は熟成とともに減少した。試験区8は35日目であった



[a]



[b]

図1 ■ SEMで観察した各試験区の牧草片とプロピオン酸菌の画像

[a] 試験区7の牧草片とプロピオン酸菌. [b] 試験区8の牧草片とプロピオン酸菌.

ん減少し84日目では増加した. 試験区9は熟成とともに増加減少を繰り返した.

脂肪球の構造については, 14日目でいったん増加後に減少した. HPLCによる有機酸含有量の測定では, 熟成84日目において, 酪酸値は先行実験と同様にControlより大きく減少した. 同様に, 乳酸量は減少, プロピオン酸は増加した (図3[b], [c]).

熟成84日目のチーズにおいては, 牧草添加量が多い方が単位面積当たりのチーズアイの個数が多かったが, そのサイズは小さくなる傾向にあった (図4[a]).

菌叢解析の結果, *P. freudenreichii* ssp. *globosum* のプロピオン酸菌量は熟成35と56日目から急激に増加したが, 84日目には大きな変動は見られなかった. 試験区7の菌量が最も高かったが, プロピオン酸菌の増殖には大きな影響は与えないようである (図3[d]).

【考察】

SEMの観察より, 試験区7と8でチーズ組織内に牧草片が発見され, その周囲にプロピオン酸菌の細菌群が存在するのが確認された. このことから牧草片が存在することでプロピオン酸菌がより多く生育し, 乳酸菌により生成された乳酸をより多く代謝したことで二酸化炭素の放出量が多くなり, チーズアイが形成されると考えられた (図1).

タンパク質マトリックス線維の構造が熟成とともに小さくなっていったことが共焦点レーザー顕微鏡による観察から明らかになったが, このことは熟成によって乳中の水分が抜け細くなったためと考えられた. 風味としては, 水分の蒸散とともに, タンパク質の濃度は高くなり, かつ微生物, あるいは微生物由来のタンパク質分解酵素により, 分解が進みペプチドとなり, アミノ酸にな

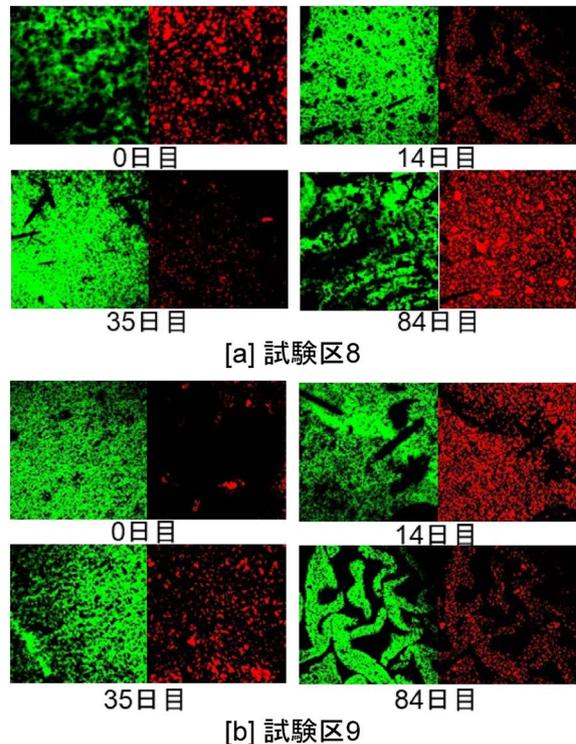


図2 ■ 各熟成日数の共焦点レーザー顕微鏡の画像

[左] フルオレセインイソチオシアネート染色.

[右] ナイルレッド染色.

るため美味しくなると推察された⁽⁷⁾ (表1, 図2).

HPLCの有機酸含有量の測定では, 酪酸値は先行実験と同様にControl値より大きく下回っていることから, ワインと混合した食塩水でウォッシュすることで, その生成を抑制できたと考えられた (図3[a]). 熟成が進むとともに, 乳酸は減少し, プロピオン酸は増加していることから, プロピオン酸菌に代謝された乳酸が減少し, プロピオン酸菌がプロピオン酸を生成したためであろう

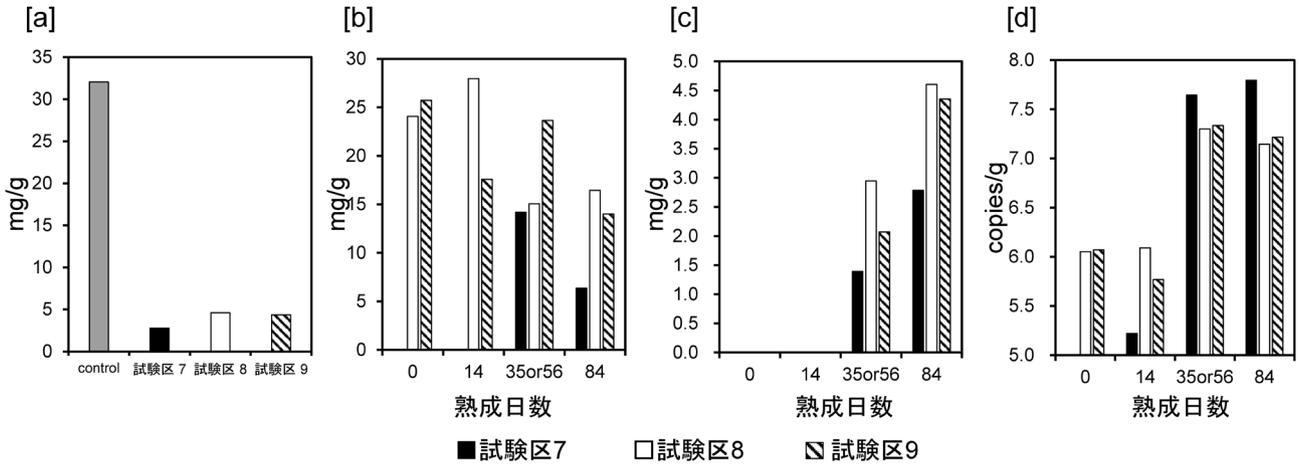
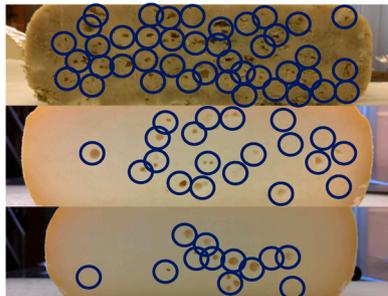


図3 ■ [a] HPLCによる熟成84日目の酪酸値, [b] HPLCによる各試験区の熟成期間中の乳酸値, [c] 各試験区の熟成期間中プロピオン酸値, [d] qPCRによる*P. freudenreichii* ssp. *globosum*の菌量

[a] 各試験区のチーズアイの個数・面積・割合(表)と断面図(左下)

	チーズアイ個数	チーズアイ面積 (mm ²)	チーズアイの全体に 対する割合 (%)
試験区7	74	363.52	3.04
試験区8	21	217.80	1.39
試験区9	15	99.13	1.35



上から試験区7, 8, 9の断面図



[b] 標準区(90 Lあたり2 mgの牧草添加)におけるチーズアイの形成と断面図

図4 ■ 各試験区のチーズアイの個数・面積・割合

(図3[b], [c]).

qPCRでは*P. freudenreichii* ssp. *globosum*は高温熟成の終了時,あるいは低温熟成に移行した35と56日目に増加したことから,先行実験^(2,3)同様,プロピオン酸菌が,乳酸を代謝しプロピオン酸産生が増大したと考えられる(図3[d]).

熟成84日目のチーズアイは,牧草添加量が多いと個数が多くなり,そのサイズは小さかったことから,牧草があるところにプロピオン酸菌が増殖したためと推察した(図4[a]).



本研究の意義と展望

本研究においてチーズアイ中に牧草片とプロピオン酸菌を観察することができたことから,スイスのアグロスコープ研究所の報告にあるように⁽⁴⁾,牧草片由来のセルロースがプロピオン酸菌の増殖,およびチーズアイ形成に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆された.チーズ構造中のタンパク質マトリックスについては熟成が進むとともに細くなるが,脂肪球のサイズは大きくなる可能性がある.本実験の結果は,本校でチーズアイが美しく形成されたエメンタルタイプチーズの製造が永劫的に標準化され,品質の高いチーズの製造を行っていくための重要な基礎データとなる.また,食塩水と混合

した残渣ワインによるウォッシュによって、酪酸生成を抑制できたことも、地域の産物を活用した他製品も含めた特色あるチーズ製造に貢献できうる基礎データであると考えられる (図4[b])。

謝辞：この研究について御助言いただきました酪農学園大学・岩崎智仁教授、山口昭弘教授、長谷川靖洋助教に深く感謝いたします。

文献

- 1) D. Guggisberg, P. Schuetz, H. Winkler, R. Amrein, E. Jakob, M. Fröhlich-Wyder, S. Irmeler, W. Bisig, I. Jerjen, M. Plamondon *et al.*: *Int. Dairy J.*, **47**, 118 (2015).
- 2) 渡部哲哉, 山口昭弘, 近藤良介, 山崎昭宏, 川本あすか, 菅井理央, 壽崎未由生, 小川恵人, 佐藤礼奈, 山田智子: 平成25年度指定スーパーサイエンスハイスクール研究収録【第5年次】平成30年3月北海道岩見沢農業高等学校, pp. 18-21, pp. 23-28.
- 3) 渡部哲哉, 山口昭弘, 岩崎智仁, 近藤良介, 手塚 圭, 山崎昭宏, 小川恵人, 佐藤礼奈, 山田智子, 大山穂華, 霞 璃桜, 高杉伊吹, 古川そら, 松本華成: 平成25年度指定スーパーサイエンスハイスクール研究収録【経過措置第1年次】平成30年3月北海道岩見沢農業高等学校, pp. 18-23, pp. 25-30.
- 4) C. Lopez, B. Camier & J.-Y. Gassi: *Int. Dairy J.*, **17**, 240 (2007).
- 5) C. D. Hickey, J. J. Sheehan, M. G. Wilkinson & M. A. E. Auty: *Front. Microbiol.*, **6**, 99 (2015).
- 6) C. Lopez, M. Maillard, V. Briard-Bion, B. Camier & J. Hannon: *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5861 (2006).
- 7) NPO法人チーズプロフェッショナル協会: “チーズを科学する,” 初版第1刷, 幸工房, pp. 38-39, pp. 97-114, 2016.

Copyright © 2020 公益社団法人日本農芸化学会
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.58.589