

細菌由来凝乳酵素の開発

宮下 周平 [株式会社まほろば／代表取締役社長]
 岡本 明治 [帯広畜産大学地域共同研究センター／センター長]
 高山 泰義 [株式会社アース技研]
 八十川大輔 [北海道立食品加工研究センター／科長]
 中川 良二 [北海道立食品加工研究センター／研究職員]
 長島 浩二 [北海道立食品加工研究センター／部長]

はじめに

チーズ製造用凝乳酵素は元来仔牛の第4胃から抽出されたもの(カーフ・レンネット)を用いるが、チーズ消費の拡大に伴い供給が不足するようになり、代替酵素の開発が進められてきた。最近では、BSEの発生でカーフ・レンネットの供給は益々不安定になってきており、代替酵素の需要は増大している。現在、代替酵素としては、遺伝子組み換えカーフ・レンネット及び微生物レンネットとしてカビ由来のものが用いられている。しかし、遺伝子組み換えカーフ・レンネットは、天然のものと遜色のない活性を示すが、遺伝子組み換え物に対して抵抗感を抱く製造者や消費者も多い。また、微生物レンネットは苦みを生じやすいという欠点指摘されている。このような中で、北海道のナチュラルチーズ製造者の間では新しい天然凝乳酵素開発への期待が大きい。我々は、新規に分離した*Paenibacillus*属細菌が凝乳酵素を生産することを見出し、その酵素学的特性を明らかにすると共に、チーズを試作し良好な結果を得た。本研究では、細菌由来凝乳酵素の実用化を目指し、本酵素の大量生産技術とチーズ製造技術の確立を行うことを目的としている。

内容・方法・結果・成果

第一章 凝乳酵素生産菌の同定

1. はじめに

本研究で用いられている凝乳酵素生産菌は今までに*Paenibacillus polymyxa*と推定されている。*P. polymyxa*は、厚生労働省の既存添加物名簿収載品目リストにβ-アミラーゼ生産菌として挙げられており、安全性の高い菌種であるが、当該酵素生産菌についてさらに詳細な同定試験を実施することとした。

2. 実験方法

生理生化学試験及び細胞壁アミノ酸、菌体脂肪酸組成、DNA塩基組成分析は(株)エヌシーアイエムビー・ジャパン(静岡市)に依頼した。16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列解析は長島らの方法¹⁾に従って行った。

3. 実験結果

1. 生理生化学試験

表1に示されている様に、本菌は好氣的条件下で生育

を示す有芽胞桿菌であり、また、糖資化性等の生理性状(表2)から、*Paenibacillus polymyxa*の近縁菌であることが示唆された。しかし、硝酸塩還元能及びグラム染色性について*P. polymyxa*の定型性状と相異を見せた。

表1 形態、グラム染色性、孢子形成等試験

細胞形態	桿菌 (0.8×2.0-3.0 μm)
グラム染色性	不定
孢子形成	+
運動性	+
コロニー形態	円形 全縁滑らか 低凸状 光沢有り クリーム色
カタラーゼ	+
オキシダーゼ	-
O/F試験	+

表2 糖資化性等試験

炭化水素からの産生		ラフィノース	+
グリセロール	+	澱粉	+
エリスリトール	-	グリコーゲン	+
D-アラビノース	-	キシリトール	-
L-アラビノース	+	ゲンチオビオース	+
リボース	+	D-ツラノース	+
D-キシロース	+	D-リキソース	-
L-キシロース	-	D-タガトース	-
アドニトール	-	D-フコース	-
β-メチル-D-キシロース	+	L-フコース	-
ガラクトース	+	D-アラビトール	-
グルコース	+	L-アラビトール	-
フラクトース	+	グルコネート	-
マンノース	+	2-ケトグルコン酸	-
ソルボース	-	5-ケトグルコン酸	-
ラムノース	-		
ズルシトール	-	β-ガラクトシダーゼ	+
イノシトール	-	アルギニンヒドロゲナーゼ	-
マンニトール	+	リシンデカルボキシラーゼ	-
ソルビトール	-	オルニチンデカルボキシラーゼ	-
α-メチル-D-マンノース	-	クエン酸の利用	+
α-メチル-D-グルコース	+	硫化水素の産生	-
N-アセチルグルコサミン	-	ウレアーゼ	-
アミグダリン	+	トリプトファンデアミナーゼ	-
アルブチン	+	インドール産生	-
エスクリン	+	アセトイン産生	+
サリシン	+	ゼラチナーゼ	+
セロビオース	+	硝酸塩還元	-
マルトース	+	生育性	+
乳糖	+	嫌気	+
メリビオース	+	50℃	-
白糖	+	10%食塩	-
トレハロース	+	加水分解性	-
イヌリン	-	カゼイン	+
メレチトース	-	馬尿酸塩	-

2. 細胞壁アミノ酸、菌体脂肪酸組成、DNA塩基組成分析

本菌の脂肪酸組成は、C15:0 anteiso (61.85%)、C16:0 (9.32%)、C16:0 iso (8.41%)であり、*P. polymyxa*と最も高い類似度(全く同一の場合の1.000に対して0.794であった)を示した。

本菌のDNA塩基組成(GC含量)は43.5%であり、これは*Paenibacillus*属細菌の中では*P. polymyxa*の範疇に入る。因みに、*P. jamilae*、*P. polymyxa*、*P. azotofixans*、*P. peoriae*のGC含量(%)は、それぞれ、41、43-46、48-53、45-47である¹⁾。

本菌は細胞壁ペプチドグリカン中のアミノ酸としてグリシンを持つと考えられた。①の生理生化学試験で推定された*P. polymyxa*は同アミノ酸としてmeso-ジアミノピリニン酸を持つことが知られている²⁾。しかし、*Paenibacillus*属は細

胞壁の薄さからmeso-ジアミノピリン酸の検出が困難な例も報告されており³⁾、より慎重な分析が必要と考えられる。

3. 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列に基づく同定
本菌の16SリボソームRNA遺伝子のほぼ全長について塩基配列(1477塩基)を決定した(図1)。この配列をDNAデータベースと照合した結果、*P. polymyxa* DSM 36 (Type strain)と最も高い相同性(99.66%)を示した。

GACGAACGCTGGCGGCTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGGTTA/TTAGAAGCTTG
CTTCTAACTAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCACAAGA
CAGGGATAACTACCGAAACGGTAGCTAATACCGGATACATCTTTCTGTCATGGGAG
AAGGAGGAAAGCGGAGCAATCTGTCTACTTGTGGATGGGCTGCGGCGCATAGCTAG
TTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCT
TCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCGAGCAACGCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGA
TCGTAAAGCTCTGTTCGAGGGAAGAAGCGGTTTCTGCTACTTGAAGTGACG
GTACCTGAGAAGAAAGCCCGGCTAATACGTGCGCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGG
GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGCGGCTCTTAAGTCT
GGTGTTTAATCCCGAGGCTCAACTTCGGGTGCGACTGGAACTGGGGAGCTTGAGTGC
AGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAATTCGTAGAGATGTGGAGGAAC
ACCAATGGGCGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGG
GGAGCAACAGGATTAGATACCTGTGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATGTAGGTGT
TAGGGGTTTCGATACCTTGGTGGCGAAGTTAACACATTAAGCAATTCGCGCTGGGAGT
ACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAGGAATTGACGGGACCGCACAAAGCAGTGGAGTA
TGTGGTTTAATTCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTTGTACCG
GTCTAGAGATAGAGCTTTCTTCCTTCGGGACAGAGGAGCAGGTGGTGATGGTTGTCGTGA
GCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATGCTTAGTT
GCCAGCAGGTCAAGCTGGGCACTCTAAGCAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACAATG
GCCGGTACAACGGGAAGCGAAGGsmGCGAkGTGGAGCCAATCTAGAAAAGCCGGTCTC
AGTTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATTGTCTAGTAATCGCGGA
TCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCTCTGTACACACCGCCGTCACACCAAG
AGAGTTTACAACACCGAAGTCGGTGAGGTAACCGCAAGGAGCCAGCGCGCAAGGTG
GGGTAGATGATTGGGGTG

図1 凝乳酵素生産菌の16SリボソームRNA遺伝子塩基配列
k: G or T, m: A or C, r: A or G, s: C or G

4. 同定試験の結論

生理生化学性状の硝酸塩還元能とグラム染色性及び細胞壁ペプチドグリカンアミノ酸分析の結果以外のデータは、本菌が*P. polymyxa*であることを強く示唆している。従って、本菌は*P. polymyxa*に極めて近縁の菌種であると結論される。*Paenibacillus polymyxa*は、厚生労働省の既存添加物名簿収載品目リストにβ-アミラーゼ生産菌として挙げられており、安全性の高い菌種であることから、本凝乳酵素生産菌の安全性も高いと考えられる。

5. 参考文献

- 1) 食品科学工学会誌、45、58-65、1998。
- 2) Int J Syst Evol Microbiol 53、295-301、2003。
- 3) Int J Syst Evol Microbiol 47、289-298、1997。
- 4) Int J Syst Evol Microbiol 53、1051-1057、2003。

第二章 細菌凝乳酵素大量生産方法の検討

I. はじめに

本プロジェクトは共同研究者が単離した*Paenibacillus*属

細菌由来凝乳酵素を用いて新しいタイプのチーズを開発することを目的とするものである。

本分担研究では、この凝乳酵素の大量生産方法の検討を目的とした。

II. 固体培養法を用いた大量生産方法の検討

比較的安価で安全性の高い小麦ふすまを用いた発泡スチロール箱を使用した固体培養による凝乳酵素の生産方法の検討を行った。

1. 実験方法

単離した*Paenibacillus sp.*を標準寒天培地で35℃、48hr培養した。この菌を100mLの滅菌精製水に懸濁した。あらかじめ125℃、60minで高圧蒸気滅菌した小麦ふすまを発泡スチロール箱に入れ、そこに菌懸濁液を加えよく攪拌した後、35℃で培養を開始した。培養時間及び初期水分を変えて行った。培養終了後、3.3mM酢酸Na・5mM CaCl₂緩衝液で培養物より酵素の抽出を行った。培養物500gに緩衝液2000mLを加え、スターラーで約30min攪拌後、遠心分離を行った(8000rpm、30min)。上清をNo. 5Cのろ紙で吸引ろ過し、このろ液を粗酵素液として、凝乳活性を測定した。凝乳酵素活性は、あらかじめ35℃に保温した10mM CaCl₂・10%スキムミルク液1mLに粗酵素液100μLを加えた時の凝乳開始時間を測定して比較した。

2. 実験結果及び考察

結果は以下のようになった。

培養時間		水分(%)	<i>Paenibacillus</i> 菌数 (log10cfu/dry g)
24時間	開始時	43.1	5.63
	終了時	41.8	5.54
137時間	開始時	37.1	5.65
	終了時	29.3	5.66
24時間	開始時	61.1	4.71
	終了時	58.5	9.05

通常、*Bacillus*属の固体培養では、10⁹レベルまで菌数が増加することが知られている。

今回、培養開始時の水分が低いと、培養時間に関係なく菌数の増加は見られず、粗酵素液の凝乳活性も24hr以上かかる非常に低いものだった。そのため、初期水分を高くして培養を行った時、菌数及び温度の上昇が観察された。しかし、粗酵素液における凝乳活性は、低水分時のものより短時間で凝乳するが、凝乳開始までに数時間を必要とした。

これらのことより、凝乳酵素は増菌時に産生されるものと思われる。しかし、抽出時の緩衝液の使用量も多く、凝乳活性が低いことから、酵素の大量生産方法としては、不適

と考えられた。

Ⅲ. 液体培養法を用いた大量生産方法の検討

先の実験で、固体培養法では凝乳活性の低い酵素液が得られることがわかった。そこで、活性の高い酵素液を得るために、半固体培養を中心とした液体培養を試みた。

実験1

(1) 実験方法

ふすま20gに対して10mM CaCl_2 水溶液150mLを加えスターで約10min攪拌し、その後ガーゼでろ過し、そのろ液をふすま抽出液とした。これを基礎培地にして、 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0mgと可溶性デンプン3.0gをそれぞれ加えた培地と両方を加えた培地の合計4種類の培地を調製した。調製した培地は、121℃、15minで高圧蒸気滅菌し、種培養液1mL(菌数: $8.44 \log 10 \text{cfu/ml}$)を接種し120rpm、37℃で24時間培養した。培養終了後、8000rpm、30minで遠心分離を行い、その上清を粗酵素液とした。凝乳活性は、上述と同様の方法で測定した。

(2) 実験結果及び考察

以下のとおりであった。

培地	凝乳開始時間
基礎培地	1分30秒
基礎培地+ $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2分30秒
基礎培地+可溶性デンプン	2分30秒
基礎培地+ $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +可溶性デンプン	3分

以上より、基礎培地のみの培地のほうが凝乳活性の高い酵素を産生することが出来た。

実験2

(1) 実験方法

実験1よりふすま抽出液培地で培養することにより凝乳活性の高い酵素を産生することがわかった。このことから、ふすま抽出液培地でのジャーフェーマンターを利用した大量培養を試みた。

実験1と同じ方法でふすま抽出液を4L調製し、120hrまで培養した。経時的にサンプリングし、その凝乳開始時間を測定した。

(2) 実験結果及び考察

以下のとおりであった。

培養時間	凝乳時間
48hr	20分
72hr	5～6分
120hr	3分30秒

以上のように、ジャーフェーマンターを利用した大量培養では、振とう培養と同じ結果にならなかった。このように、

同じ培地を使用しても培養方法により凝乳活性が異なることが示唆された。

尚、72hr培養上清を細菌凝乳酵素A、120hr培養上清を細菌凝乳酵素Bとしてチーズの試作に用いた。また、酵素Bを凍結乾燥法により3.5倍に濃縮したものを細菌凝乳酵素Cとしてチーズ試作に用いた。

実験3

(1) 実験方法

実験2より培養方法が異なると凝乳活性が異なる可能性が示唆されたので、安定した酵素液を得るために、実験1と培養条件を変えず、培養量のみを多く(500mL)して実験を行った。また同時に、ふすま抽出液を調製する際にろ過操作を省略した培地も調製し、酵素産生を試みた。

(2) 実験結果及び考察

ろ過操作を省略した培地では、培養時間にかかわらず凝乳活性は見られなかった。ふすま抽出液培地では以下のとおりとなった。

培養時間	凝乳時間
24hr	2～3分
48hr	2分30秒以内

48hr培養上清を細菌凝乳酵素Dとした。

実験4

(1) 実験方法

実験3より振とう培養であればスケールアップしても凝乳活性のある酵素が産生できると判断し、培容量を4Lに増量し振とう培養(培養時間: 48時間)を行った。

(2) 実験結果及び考察

凝乳開始時間は、約3時間後であった。このことからスケールアップをすることにより凝乳活性が弱くなることが示唆された。

この培養上清を細菌凝乳酵素Eとした。

実験5

(1) 実験方法

今までの実験から長時間培養するほうが、活性の高い酵素が産生されることがわかったので、小麦ふすま抽出液培地で長時間の培養を行った。

(2) 実験結果及び考察

培養時間	凝乳時間
48hr	3分
96hr	1分30秒以内

今回の実験により長時間培養の方が活性が高い酵素液を得られることがわかった。尚、48hr培養上清を細菌凝乳酵素F、96hr培養上清を酵素Gとしてチーズの試作に供した。

実験6

(1) 実験方法

今回の実験では、すべて培養上清を酵素液として使用してきた。しかし、酵素活性があまり高くない酵素液であった。そこで、培養上清を陽イオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、0~200mM NaCl濃度勾配で分画した(図1、2)。活性画分は、280nmの吸光度とスキムミルクを用いた凝乳活性を測定することにより決定した。また、培養上清を凍結乾燥法により3倍に濃縮した粗酵素液も分画した。

(2) 実験結果

図1、2のように吸光度による測定では、ピークが数箇所観察された。しかし、凝乳活性の測定では、濃縮に関係なく前方のピークに現れた。後方のピークでは、凝乳活性は見られなかった。また、タンパクのピークと凝乳活性のピークが若干ずれていた。

凝乳活性の高い画分(凝乳開始時間が10分以内)を集めて、精製酵素液とし、培養上清を分画したものを細菌凝乳酵素H、濃縮培養上清を分画したものを細菌凝乳酵素Iとした。

これら精製酵素液には、着色があり、特に酵素Iは非常に濃い色となった。この着色は培地より移行したものであるが、色素も排除できる濃縮・精製方法を開発する必要性が示唆された。

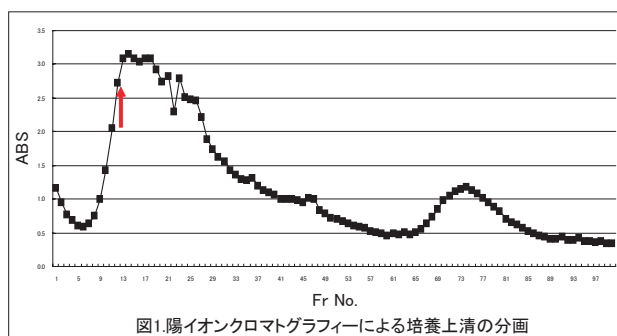


図1.陽イオンクロマトグラフィーによる培養上清の分画

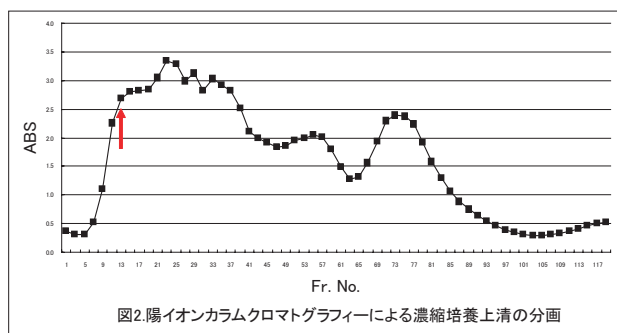


図2.陽イオンカラムクロマトグラフィーによる濃縮培養上清の分画

矢印は、凝乳活性画分

実験7

(1) 実験方法

実験6より精製しても色素が排除されないことがわかつ

た。飢餓状態で培養しても凝乳酵素が産生することが報告されていることより、10mM CaCl₂を基礎液体培地にして、そこに可溶性デンプンを0.5%及び1.0%の濃度を溶解し、振とう培養を48hr行った(35℃、120rpm)。

(2) 実験結果及び考察

今回の実験では、ほとんど微生物の増殖が見られなかった。しかし、0.5%可溶性デンプン培地では凝乳活性が見られなかったものの、1.0%可溶性デンプン培地では、約2時間後に凝乳活性が観察された。そこで、上清を凍結乾燥法により2.5倍に濃縮し、細菌凝乳酵素Jとした。

この酵素液は、着色しておらず、この方法を用いることによって無着色の酵素液が製造できる可能性が示唆された。

IV. 要約

*Peanibacillus*属由来凝乳酵素の大量生産方法について検討を行った。小麦ふすまを利用した培養では、凝乳活性の低い酵素しか抽出できなかった。そのため、固体培養を断念し、液体培養を行った。

凝乳活性の高かった小麦ふすま抽出液培地による振とう培養で、大量生産方法の検討を行った。スケールアップをすることにより、凝乳活性が若干弱くなるものの凝乳が確認された。

これらより、工業的に生産するには、固体培養よりも小麦ふすま抽出液による液体培養が適していることがわかった。しかし、それらを濃縮工程なしで使用するには、凝乳活性が弱いこともわかった。

また、長時間の培養の方が活性が高くなること、貧栄養条件において凝乳活性が現れることから、凝乳酵素発現と孢子形成との関連が再度示唆された。

今後、酵素力価を高くするために、培養条件や培地の開発、濃縮方法の検討及び単離した*Peanibacillus*属細菌の酵素発現能力の強化(変異株の単離など)が必要であると思われる。

第三章 細菌凝乳酵素によるチーズの試作と評価

I. 細菌凝乳酵素を用いたチーズの試作について

1. はじめに

培養条件の違う*Peanibacillus*属細菌由来凝乳酵素を使用した数種類のチーズの試作を目的とした。また、細菌由来凝乳酵素と同様の方法で生産したカーフレンネット及びProtease from *Bacillus polymyxa* (EC3.4.24.32)のチーズと比較して、細菌由来凝乳酵素がどのようなタイプのチーズに適しているのかを検討した。

2. 試作種類と製造方法

試作を行ったチーズのタイプと製造方法(図1~3参照)

は以下のとおりである。

- (1) 長期熟成型モールドタイプ・・・コバン(図1.)
- (2) 酸凝固を主体とした白カビモールドタイプ・・・サクラ(図2)
- (3) 酸凝固を主体としたフレッシュタイプ・・・フロマージュブラン(図3)

3. 使用酵素液の種類

- ①-a カーフレンネット(Naturen Standard)
- ①-b カーフレンネット(BEAUGEL 520)
- ②Protease from *Bacillus polymyxa* (EC3.4.24.32)
- ③細菌凝乳酵素A・・・ジャーファーマンター72hr培養上清
- ④細菌凝乳酵素B・・・ジャーファーマンター120hr培養上清
- ⑤細菌凝乳酵素C・・・ジャーファーマンター120hr培養上清濃縮物(3.5倍濃縮)
- ⑥細菌凝乳酵素D・・・振とう培養48hr培養上清
- ⑦細菌凝乳酵素E・・・大量振とう培養48hr培養上清
- ⑧細菌凝乳酵素F・・・振とう培養48hr培養上清
- ⑨細菌凝乳酵素G・・・振とう培養96hr培養上清
- ⑩細菌凝乳酵素H・・・細菌凝乳酵素Bを精製したもの
- ⑪細菌凝乳酵素I・・・細菌凝乳酵素Bを濃縮後、精製したもの
- ⑫細菌凝乳酵素J・・・飢餓状態で培養した上清を濃縮したもの

4. 試作実験1

長期熟成型モールドタイプであるコバンで試作実験を行った。

(1) 試作実験1-1

各レンネットのプリーズ時間を測るため小規模(100mL)で試験を行った。各レンネットを添加しプリーズ時間を比較した。試験結果は以下のようになった。

レンネットの種類	乳量	添加量	添加時間	プリーズ確認時間	経過時間
①Naturen Standard	100mL	0.1mL	9:46'00	9:48'45	2'45
②EC 3.4.24.32	100mL	1.0mL	9:41'00	9:49'00	8'00
③細菌凝乳酵素A	100mL	1.0mL	9:42'00	10:59'00	1:17'00
④細菌凝乳酵素B	100mL	1.0mL	9:43'00	10:59'00	1:16'00
⑤細菌凝乳酵素C	100mL	1.0mL	9:44'00	10:20'00	36'00
⑥細菌凝乳酵素D	100mL	1.0mL	9:45'00	10:20'00	35'00

②Protease from *Bacillus polymyxa* (EC 3.4.24.32)

この結果から、サンプルの凝乳酵素は全て一般的に

使われているレンネットに比べ凝乳力が弱い事がわかる。もっとも時間が短かったのは②で次に④⑤である。③④については明らかに時間がかかり過ぎていて、今後の試験ではレンネットの添加料を増やさなければならない事がわかる。①②⑤⑥は凝固しカットする事が出来たが③、④においてはカットするまでに凝固の確認をする事が出来なかった。③④⑤⑥は凝乳変化にとほしい事がわかった。

(2) 試作実験1-2

試作実験1-1の結果より明らかに各レンネットの添加量を増やさなければならない事が分かった。②はきちんとプリーズが来たのでそれ以外の③④⑤⑥を添加量10倍にして試験を行った。結果は以下の通りである。

レンネットの種類	乳量	添加量	添加時間	プリーズ確認時間	経過時間
③細菌凝乳酵素A	100mL	10.0mL	10:07'00	10:17'00	10'00
④細菌凝乳酵素B	100mL	10.0mL	10:08'00	10:19'00	11'00
⑤細菌凝乳酵素C	100mL	10.0mL	10:09'00	10:12'00	3'00
⑥細菌凝乳酵素D	100mL	10.0mL	10:10'00	10:16'00	6'00

③④は適度にプリーズが来たので添加量の目安を確認する事が出来た。⑤は添加量を増やした為にプリーズの経過時間は短縮されたが逆に早すぎた。もう一度添加量を考え直す必要がある。また、サンプルを多く添加したために凝乳酵素C溶液の持つ色と風味が強くなってしまいチーズ又は食品の添加物としては向いていない事が分かった。濃縮倍率を変えるか風味を減らす方法を考えなければならない。⑥はやや凝乳力が強い事が分かった。

(3) 試作実験1-3

試作実験1-2の実験結果を元に各レンネットを10Lの生乳に添加した。生乳は殺菌、冷却を行いスターター(TA052 50L/0.1g)を添加した。ただし⑤についてはサンプル量が少なかった為300mLの小規模実験を行いプリーズの時間の再確認を行った。結果は以下の通りである。

条件: 乳温 39℃ TA052 1.0g/50L

レンネットの種類	乳量	添加量	添加時間	プリーズ確認時間	経過時間	カット時間	モールドイングの時間
①Naturen Standard	10L	10.0mL	11:28'00	11:38'00	10'00	11:42	14:00
②EC 3.4.24.32	10L	10.0mL	11:29'00	12:06'00	37'00	13:40	14:35
③細菌凝乳酵素A	10L	100.0mL	11:30'30	12:16'00	45'30	13:48	14:40

④細菌凝乳酵素B	10L	100.0mL	11:32'00	12:15'00	43'00	13:43	14:20
⑤細菌凝乳酵素C	0.3L	8.0mL	10:46'00	10:59'00	13'00	11:16	なし
⑥細菌凝乳酵素D	10L	100.0mL	11:34'00	12:05'00	31'00	13:45	15:15

時間はかかったが凝固したのでカッティングしモールドイングを行った。全体的にブリーズの時間が遅く、それに伴いカッティング、モールドイングまで大幅に遅れた。この原因として添加量が少なかったこととレンネットの凝乳力が弱かった事が考えられた。モールドイングの際に目安としているpH6.45～6.40に至るまでに非常に時間がかかってしまった。通常であればカッティングからモールドイングまでおよそ30分前後で目標pH (pH6.43)に達しモールドイングが出来る。全体的に酵母を入れなかったためかpHが下がりにくかった。⑥においては凝乳の状態が他のサンプルに比べてよかった。しかしpHが6.47から下がらず一番時間がかかってしまった。⑥はpH6.47から下がりづらい特徴があることが分かった。pH6.45を待たずpH6.47でモールドイングを行った。



＜試作実験 1-3 熟成七日目の様子＞

一日後の経過

レンネットの種類	型抜き時のpH	カードの状態
①Naturen Standard	5.21	沈み具合・柔らかさはちょうど良い
②EC 3.4.24.32	4.93	沈みは一番良い・柔らかさは平均的
③細菌凝乳酵素A	4.98	沈みは2番目に良い・一番柔らかかった
④細菌凝乳酵素B	4.92	沈みは一番悪い・柔らかい
⑤細菌凝乳酵素C	なし	なし
⑥細菌凝乳酵素D	4.93	沈みは2番目に悪く柔らかい

①は目標pH5.20の近くで止まった。②⑥は大幅に下がってpH4.92～4.93であった。pHが低くカードの状態も柔らかい目であるがしっかりとしたものだった。④にいたっては沈みが一番悪く厚みのある物になった。③は他のサンプルに比べpHが高く維持され良いが、カードの状態が一番柔らかかった。塩付け後は変形していた。⑥はモールドイング時間が他のサンプルに比べ一時間も遅かった為、大きな違いが出るかと思ったがさほど大きな違いは見られな

かった。

(4) 試作実験1-4

今回の実験は①Naturen Standard、②Protease from *Bacillus polymyxa* (EC 3.4.24.32)、③細菌凝乳酵素B、④細菌凝乳酵素Eを用いて小規模 (1.0L) な実験を行い詳しい数値を出した。結果は以下のとおりである。

乳温 39℃ 乳量 8L pH6.50

スターター：(TA052 0.16g)

酵母：(Cum0.02g, Geo17 0.017g, クリベロ0.23g)

レンネットの種類	乳量	添加量	添加時間	ブリーズ確認時間	経過時間	カット時間	モールドイングまでの時間
①Naturen Standard	1L	0.26ml	11:37	11:45	8'	12:12	45'
②EC 3.4.24.32	1L	26ml	11:38	11:41	3'	11:52	2:08
③細菌凝乳酵素B	1L	260ml	11:39	11:43	4'	12:03	2:15
④細菌凝乳酵素E	1L	260ml	11:40	凝固せず			

この結果から、②③はレンネットを添加しブリーズまでの時間は短いですがモールドイングまでの時間がかかり過ぎていた。カットする直前のカードの硬さはやや柔らかいぐらいでほとんど問題はないが、カッティングを行い自然にホエーを抜いているとカードが崩れやすい状態になっていた。モールドイングの際にはかなり細かい状態にまで崩れホエー抜けの為に穴から少し流れ落ちるカードもあった。③の方が特にカードが崩れやすかった。

酵母の入っていない試作実験1-1には見られなかったが前回 (試作実験1-3) と今回 (試作実験1-4) の酵母を添加してあるタイプでは同じような現象が見られた。酵母とこのサンプルのレンネットが何かしらの関係があるとも考えられる。③は今までと同様で臭い (刺激臭) と色 (コーヒート牛乳のような感じ) が大変きつかった。④細菌凝乳酵素Eは前回の酵素Dと同じ製造法であったが全く凝乳を見せず4時間放置したがブリーズを確認する事が出来なかった為、実験を途中で中止した。レンネット自信に何かしらの問題があったと考えられた。

レンネットの種類	型抜き時のpH	カードの厚さ	カードの重さ	歩留まり
①Naturen Standard	5.29	2.3cm	160g	16%
②EC 3.4.24.32	5.37	1.0cm	70g	7%
③細菌凝乳酵素B	5.36	2.0cm	100g	10%

②はモールドイングの際にカードが崩れ流れ出てしまった為、厚みも重さも極端に減ってしまった。②③ともに歩留まりが①に比べ少なかった。凝入力が弱い為にチーズとして残る量も少なくなってしまった。

歩留まり (%) = 乳量 (ml) ÷ 残ったカードの重さ (g) × 100

(5) 実験結果および考察

細菌凝乳酵素は、ブリーズまでの時間は短いがモールドディングまでの時間がかかり過ぎている。カットする直前のカードの硬さはやや柔らかいぐらいでさほど問題はないが、カッティングを行い、自然にホエーを抜いているとカードが崩れやすい状態になっていた。モールドディングの際にはかなり細かい状態にまで崩れホエー抜けの為の穴から少し流れ落ちるカードもあった。酵母(cum、Geo17、クリベロ)のっていない試作実験1-1には見られなかったが試作実験1-3と試作実験1-4の酵母を添加したタイプではカードが崩れた。酵母によって凝乳力が弱まる特徴が見られた。

これらの実験から細菌凝乳酵素は、凝固力が弱いいため長時間かけて酸凝固させるタイプのチーズに適していると考えられる。

5. 試作実験2

酸凝固を主体とした白カビモールドタイプであるサクラで試作実験を行った。

(1) 試作実験2-1

今回の実験は①BEAUGEL 520、②Protease from *Bacillus polymyxa* (EC 3.4.24.32) ③細菌凝乳酵素A、④細菌凝乳酵素Bを用いて小規模(500mL)な実験を行い詳しい数値を出した。サンプル全ての凝入力が弱いいため酸凝固を主体としたサクラのようなタイプでのチーズでどのような凝固変化が見られるか観察した。実験結果は以下のとおりである。

レンネットの種類	乳量	添加量	モールドディング時のpH	型抜き時のpH	型抜き時の厚み	型抜き時の重さ
①BEAUGEL 520	55L	3.0ml	4.55	4.42	3.2cm	150g
②EC 3.4.24.32	500mL	1.5ml	4.60	4.36	2.4cm	115g
③細菌凝乳酵素A	500mL	15ml	4.76	4.35	2.5cm	110g
④細菌凝乳酵素B	500mL	15ml	4.53	4.37	2.5cm	105g

レンネットを添加し凝乳時間が長い為しっかりとしたカードを形成する事が出来た。②③④ともサクラに比べやや柔らかいカードとなった。③のモールドディング時のpHは他のサンプルに比べやや高いが翌日の型抜き時のpHではあまり差は出なかった。他のサンプルもサクラのpHに近い値となり厚みや重さは差が出たがカード事態の質は良い物が出来たと思う。

(2) 試作実験2-2について

今回の実験は熟成期間中に減少する水分量を量るために①BEAUGEL520、②Protease from *Bacillus polymyxa* (EC 3.4.24.32) ③細菌凝乳酵素Bを用いて

小規模(500mL)実験を行い詳しい数値を出した。結果は以下の通りである。

スターター：Yミックス

レンネットの種類	乳量	添加量	モールドディング時のpH	型抜き時のpH	型抜き時の厚み	型抜き時の重さ
①BEAUGEL 520	55L	3.0ml	4.53	4.36	3.4cm	145g
②EC 3.4.24.32	500mL	15ml	4.48	4.30	3.0cm	130g
③細菌凝乳酵素B	500mL	15ml	5.46		cm	g

③は凝固することができず液状のままだったのでモールドディングすることが出来なかった為、実験を中止した。酵素事態の凝入力が弱かった為と考えられる。②はきちんと凝固しモールドディングをする事が出来た。①②を比較すると②の方が触った感じが柔らかくぬるりとしていて保水性があることが明らかに分かった。

レンネットの種類	型抜きの重さ	熟成後の重さ*1	水分減少量*2
①BEAUGEL 520	145g	92g	53g
②EC 3.4.24.32	130g	74g	66g

*1：熟成後の重さ：型抜き時より2週間後

*2：(水分減少量)=(型抜き時の重さ)-(熟成後の重さ)

①に比べ②の方が、水分減少量が大きい。この事から熟成期間中に水分(ホエー)が多く抜け出ていることが分かった。

(3) 試作実験2-3

今回の実験は①BEAUGEL 520、②細菌凝乳酵素I、③細菌凝乳酵素H、④細菌凝乳酵素Jの実験を行い詳しい数値を出した。結果は以下のとおりである。

スターター：Yミックス

レンネットの種類	乳量	添加量	モールドディング時のpH	型抜き時のpH	型抜き時の重さ
①BEAUGEL 520	55L	2.0ml	6.37	4.51	135g
②細菌凝乳酵素I	500mL	1.5ml	6.37	4.41	165g
③細菌凝乳酵素H	500mL	15ml	6.37	4.40	143g
④細菌凝乳酵素J	500mL	15ml	6.37	4.36	158g

②は小規模実験より他のサンプルより凝乳力が強いことを確認することができたため添加量を減らしたが、サクラの実験においては一番凝乳力が弱かった。凝乳力が弱いためどろどろとして型抜き時も最も重かった。③は他のサンプルに比べて最も良くできた。④は凝乳しない可能性もあったが酸凝固にも助けられたようで翌日には柔らかいながらも凝固しモールドディングすることができた。

レンネットの種類	型抜き の重さ	熟成後 の重さ	水分減 少量
①BEAUGEL 520	135g	89g	46g
②細菌凝乳酵素I	165g	84g	81g
③細菌凝乳酵素H	143g	82g	61g
④細菌凝乳酵素J	158g	94g	64g

②は凝乳力が弱かったため水分を他のサンプルに比べてもかなり多くの水分を含んでいたことが分かる。③④はだいたい同量のホエーが熟成に抜けたことが見受けられる。①と比較しても分かるように今回のサンプルも保水性が高く、酸凝固によって助けられるものに適していることが分かった。

今までに行ったサクラ試作実験2-1、2-2と比較すると凝乳力自体に大きい変化を見ることができなかった。しかし、今まで強く感じられた匂い(刺激臭のようなもの)と珈琲牛乳のような色になってしまう現象はかなり抑えられた。すなわち、培地成分を排除することにより製品として食べやすくなるのが今回の実験で示唆された。

(4) 実験結果及び考察

この結果からサンプルの凝乳酵素は、コバンの様に酵母(cum、Geo17、クリペロ)が入りカットを行うチーズより、サクラのように長時間かけ凝固させ、なるべくカードを崩さない様にモールドングするタイプに適していると考えられる。

レンネットを添加し酸凝固の働きにも助けられたためサクラはコバンに比べしっかりとカードを形成する事が出来た。しかし製品のサクラに比べ全体的に柔らかいカードとなった。つまり、細菌凝乳酵素は保水性がある(離水作用が弱い)ことが明らかに分かる。サクラと言うチーズに適している事も同時に分かったが製品にした時に残るカードの量が少なかった。これらの事からこの細菌凝乳酵素は酸凝固を主体とし、かつ保水性のあるチーズに適していることが分かった。これらの結果から、次の実験ではフロマージュブランに添加し実験を行おうと考えた。

6. 試作実験3

酸凝固を主体としたフレッシュタイプであるフロマージュブランで試作実験を行った。

(1) 試作実験3-1

今回の実験は①BEAUGEL 520、②Protease from *Bacillus polymyxa*(EC 3.4.24.32)③細菌凝乳酵素F、④細菌凝乳酵素Gを用いてフロマージュブランに添加し小規模(1000mL)実験を行い詳しい数値を出した。

スターター：ALPHA-3(0.75g/40L)pH6.24

レンネットの種類	乳量	添加量	カットイン 時のpH
①BEAUGEL 520	40L	1.3mL	4.38
②EC 3.4.24.32	1L	1.5mL	4.41
③細菌凝乳酵素F	1L	15mL	4.40
④細菌凝乳酵素G	1L	15mL	4.40

レンネットの種類	製造量	歩留まり
①BEAUGEL 520	20000g	25.0%
②EC 3.4.24.32	258g	25.8%
③細菌凝乳酵素F	296g	29.6%
④細菌凝乳酵素G	306g	30.6%

この結果より①に比較すると全体的に歩留まりが高いこと、及び細菌凝乳酵素は保水性が高いことが分かった。保水性が高いことでやや製品が柔らかかった。

(2) 試作実験3-2

今回の実験は①BEAUGEL 520、②細菌凝乳酵素I、③細菌凝乳酵素H、④細菌凝乳酵素Jを用いてフロマージュブランに添加し、小規模(1000mL)な実験を行い詳しい数値を出した。結果は以下のとおりである。

スターター：ALPHA-3(0.75g/40L)pH6.37

レンネットの種類	乳量	添加量	カットイン のpH
①BEAUGEL 520	40L	1.3mL	4.32
②細菌凝乳酵素I	1L	0.75mL	4.34
③細菌凝乳酵素H	1L	7.5mL	4.33
④細菌凝乳酵素J	1L	7.5mL	4.33

②は凝固が弱かったためホエー抜きをしたときに多くホエーが排出したため残った残量が一番少なかった。サクラ試作実験3-2と同様③④は同じような特徴を得られた。凝乳能力、保水力などがあまりかわらなかった。サンプルとして用いた②③④のどれもpHもほとんどムラが無く安定していた。

レンネットの種類	製造量	歩留まり
①BEAUGEL 520	40000g	25%
②細菌凝乳酵素I	200g	20%
③細菌凝乳酵素H	250g	25%
④細菌凝乳酵素J	250g	25%

これらの試験結果より、酸凝固させかつ保水性の求められるフロマージュブランに最も適していることが明らかになった。凝乳面においてはどれも失敗することなく凝固することができた。

7. 総括

3種のチーズを用いてチーズの製造試作を行った。それぞれ長期熟成型モールドタイプ(コバン)、酸凝固を主体とした白カビモールドタイプ(サクラ)、酸凝固を主体としたフレッシュタイプ(フロマージュブラン)である。これらの実験結果から3種の中では最もフロマージュブランに最も適していることが分かった。

販売製品と同様の製造方法であっても同じような風味を作り出すことが難しいのは、タンパク質の切断個所が異なるためとも考えられる。(動物性レンネットは105と106番目のアミノ酸の間でカッパ-カゼインが切断する。それに対し*Peanibacillus*属細菌由凝乳酵素は94番と95番目のアミノ酸の間で切断される。)従来の製品や製造方法に当てはめるのではなく、*Peanibacillus*属細菌由凝乳酵素に適しているチーズ製造法を開発する必要性が示唆された。

<試作実験から分かった*Peanibacillus*属細菌由凝乳酵素の特徴>

- ①凝乳力が弱い (凝固時間が長い)
- ②添加量が多い (一般的に使用されているカーフレネットのおよそ100倍添加しないと凝固しない)
- ③酵母との相性が悪い (酵母を添加したものは(コバン)凝固はするもののカット後に崩れやすいカードとなった)
- ④pHが下がりにくい (カット後のpHが下がりにくい)
- ⑤刺激臭がある
- ⑥色が濃い
- ⑦保水性がある

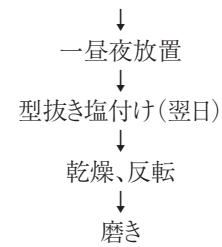


図1.長期熟成型モールドタイプ(コバン)の製造方法

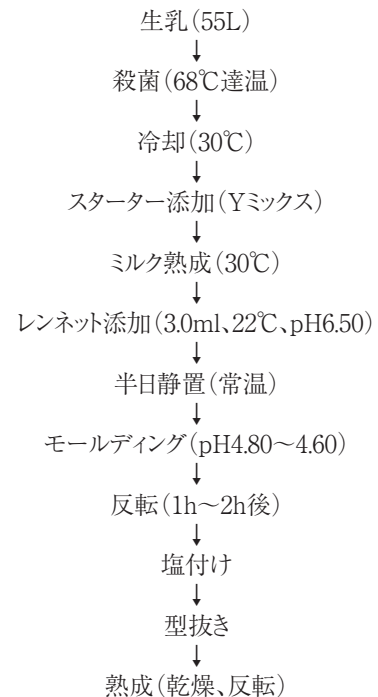


図2.酸凝固を主体とした白カビモールドタイプ(サクラ)の製造方法

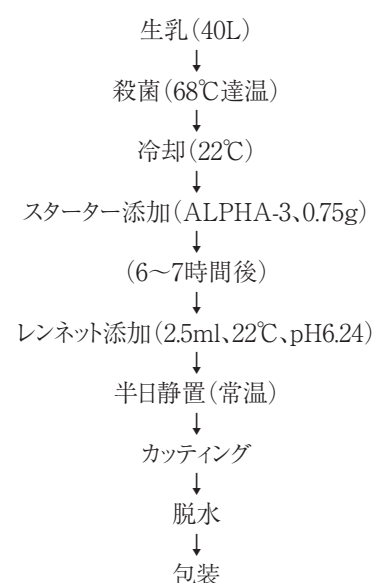
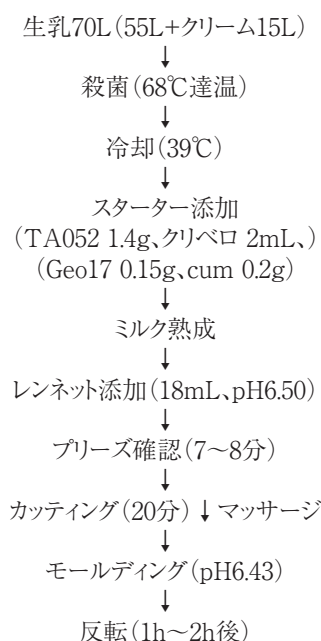


図3.酸凝固を主体としたフレッシュタイプ(フロマージュブラン)の製造方法

II. 細菌凝乳酵素を用いた試作チーズの評価について

1. はじめに

*Peanibacillus*属細菌由来凝乳酵素とカーフレンネットを用いて試作した酸凝固を主体とした白カビモールドタイプ及び酸凝固を主体としたフレッシュタイプの2つのタイプのチーズにおいて、どのような違いがあるのか、ペプチド量及びアミノ酸量を分析し比較することを目的とした。

2. 実験方法

チーズから均一になるように試料を採取して、3倍量の蒸留水を加えてホモジナイズし、3000rpmで20分間遠心分離を行った。遠心分離後に、上澄液を20ml容のメスフラスコにNo.5cの濾紙で濾過をして、得られたろ液で20mlに定容した。これより5mlを採取して、等量の4% トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液を加え、混合した後に、37℃で30分間インキュベートする。その後、No.5cの濾紙で再び、ろ過を行い、得られた上澄液を10ml容のメスフラスコへ定容して、2%TCA可溶性画分を得る。これをペプチドおよびアミノ酸分析用試料とした。

ペプチド分析は、ビュレット法を用いて行い、標準品として牛血清アルブミン (Albumin Bovine Fraction V, A-4503, Sigma)を用いた。

アミノ酸分析は、得られた2%TCA可溶性画分を1mL、ニンヒドリン試薬 (ニンヒドリン試薬-L8500セット (和光)) 及び緩衝液をそれぞれ2mL加え、5分間沸騰水浴中で加熱し、冷却してから570nmで吸光度を測定した。

2種類のチーズの比較は、スチューデントのt検定 ($p<0.05$)でおこなった。

3. 実験結果

(1) ペプチド含有量

結果は以下のとおりであった。

表1酸凝固を主体とした白カビモールドタイプのペプチド含有量

レンネット	9.571±1.004*
細菌凝乳酵素	6.264±1.297

*: $p<0.05$, 単位: mg/wet g

表2酸凝固を主体としたフレッシュタイプのペプチド含有量

レンネット	8.531±1.491*
細菌凝乳酵素	1.492±0.332

*: $p<0.05$, 単位: mg/wet g

表のように、モールドタイプ、フレッシュタイプの両方で、細菌凝乳酵素を使用したチーズのほうが、有意に少なかった。

(2) アミノ酸量

結果は以下のとおりであった。

表3酸凝固を主体とした白カビモールドタイプのアミノ酸含有量

レンネット	1.907±0.138
細菌凝乳酵素	4.041±0.295*

*: $p<0.05$, 単位: mg/wet g

表4酸凝固を主体としたフレッシュタイプのアミノ酸含有量

レンネット	1.045±0.007
細菌凝乳酵素	0.781±0.017

単位: mg/wet g

表のように、モールドタイプとフレッシュタイプでは、まったく逆の傾向を示した。また、モールドタイプでは、細菌凝乳酵素のほうが、有意に増加していた。

4. 考察

カーフレンネットと*Peanibacillus*属細菌由来凝乳酵素で製造されたチーズの評価を、ペプチド量及びアミノ酸量を比較することによって試みた。

白カビモールドタイプの場合、細菌凝乳酵素を使用した時、ペプチド量は少なく、アミノ酸量は多かった。このことより、カーフレンネットより、ペプチドからアミノ酸への分解が早いことが考えられる。

フレッシュタイプの場合、細菌凝乳酵素を使用したとき、ペプチド及びアミノ酸量ともに、カーフレンネットより少なかった。このことより、ペプチド及びアミノ酸の産生が抑制されているのかもしれない。

これらの結果は、細菌凝乳酵素のκ-カゼイン切断部位が異なることに起因しているのかもしれない。またカーフレンネットとは熟成速度が異なっているのかも知れない。

どちらのタイプのチーズであっても、カーフレンネットを用いたチーズとは違うタイプのチーズであることが示唆された。

今後、これらレンネットの違いにおける熟成過程でのペプチド及びアミノ酸量の変化や、官能検査等を行い、この違いが実際に味に影響を与えているかどうかを調べる必要がと思われる。

III. 結語

*Peanibacillus*属細菌由来凝乳酵素を使用したチーズを試作し、その評価を行った。

試作製造において、その凝乳酵素の特徴は凝乳力が弱い、保水性が高いことが確認され、酸凝固を主体としたタイプのチーズに適していることも示唆された。

また、その評価においては、カーフレンネットとの熟成過程が異なる可能性が発見された。

以上より、*Peanibacillus*属細菌由来凝乳酵素を使用したチーズは、従来のカーフレンネットを用いたチーズとは異なり、新しい食品になる可能性が明らかとなった。そのためにも、

熟成過程における経時的な変化を詳細に分析し、従来のチーズ製造法ではなく、本酵素に適したチーズ製造法を開発する必要があると思われる。

第四章 急性経口毒性試験

1. 試験目的

*Paenibacillus polymixa*が生産する凝乳酵素を用いて製造したチーズの雌雄ラットにおける急性経口毒性を調べる。

2. 試験方法

(1) 試験液の調整

約1cm角に切断した検体を約-80℃に冷却し凍結させた後、粉碎機を用いて粉状にした。これを注射用水に懸濁させ、250mg/mlの試験液を調整した。

(2) 試験動物

5週令の雌雄ラット[BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)]を日本クレア株式会社から購入し、約1週間の予備飼育を行って一般状態に異常のないことを確認後、試験に使用した。試験動物はポリカーボネート製ゲージに各2匹収容し、室温23℃±2℃、照明時間12時間/日に設定した飼育室において飼育した。資料は「マウス・ラット・ハムスター用ガンマ線照射飼料:CRF-1、オリエンタル酵母工業(株)」及び飲料水(水道水)は自由に摂取させた。

(3) 試料の投与

検体投与群及び対照群を設定し、各群の動物数は雌雄それぞれ5匹とした。投与前に約17時間試験動物を絶食させた。体重を測定した後、検体投与群には検体投与量が5,000mg/kgとなるように試験液を胃ゾンデを用いて強制単回経口投与した(試験液の投与容量として20ml/kg)。対照群には、投与容量として20mg/kgの注射用水を同様に投与した。観察期間は14日間とし、投与日は頻回、翌日から1日1回観察を行った。投与後7及び14日に体重を測定した。各群の体重値について分散比のF-検定を行い、等分散の場合はt-検定、不等分散の場合はWelchの検定により有意水準5%で群間の比較を行った。観察終了時にすべての試験動物を剖検した。

3. 試験結果

(1) 死亡例

雌雄とも観察期間中に死亡例は認められなかった。

(2) 一般状態

雌雄とも観察期間中に異常は認められなかった。

(3) 体重変化(表-1及び2)

投与後7及び14日の体重では、雌雄ともに対照群と比較して差は認められなかった。

(4) 剖検所見

観察期間終了時の剖検では、すべての試験動物で異常は認められなかった。

4. 考察

5,000mg/kgの用量の検体をラットに単回経口投与した結果、観察期間中に異常及び死亡例は認められなかった。したがって、検体のラットにおける単回経口投与によるLD50値は、雌雄ともに5,000mg/kgであるものと考えられた。

5. 参考文献

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 420 (2001)。

表-1 体重変化(雄)

群	投与前	投与後(日)	
		7	14
検体投与群	162.9±2.3(5)	227.1±5.9(5)	260.5±4.4(5)
対 照 群	161.3±4.3(5)	222.8±7.1(5)	263.4±6.6(5)

体重は平均値±標準偏差で表した(単位:g)。
括弧内に動物数を示した。

表-2 体重変化(雌)

群	投与前	投与後(日)	
		7	14
検体投与群	118.5±4.0(5)	152.9±2.8(5)	166.4±2.5(5)
対 照 群	119.1±5.5(5)	153.2±10.3(5)	170.1±11.6(5)

体重は平均値±標準偏差で表した(単位:g)。
括弧内に動物数を示した。