

平成23年度戦略的基盤技術高度化支援事業（平成23年度第3次補正予算事業）

「健康志向型植物性チーズ様食品素材の効率的発酵製造技術の開発」

研究開発成果等報告書

平成25年2月

委託者 東北経済産業局

委託元 株式会社インテリジェント・コスモス研究機構

目 次

第1章 研究開発の概要	1
1.1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1) 研究の目的	1
2) 研究の概要	1
1.2 研究体制	1
1.3 成果概要	1
1.4 当該研究開発の連絡窓口	2
第2章 本論	3
2.1 低脂肪豆乳の原料としての適性	3
2.1.1 豆乳の成分分析	3
2.1.1.1 タンパク質含量の測定法の確立とその応用	3
2.1.1.2 脂質含量の測定法の確立とその応用	3
2.1.2 豆乳成分の状態分析	6
2.1.2.1 豆乳タンパク質の状態分析	6
2.2 高圧処理による熟成高速化に適した菌株の選抜	10
2.2.1 熟成高速化に適した菌株の選抜	10
2.2.1.1 乳酸菌の生理特性に基づいた選抜	10
2.2.1.2 乳酸発酵産物の有する香気特性に基づいた選抜	13
2.2.1.3 乳酸菌の高圧感受性に基づいた選抜	15
2.2.1.4 遺伝子解析による乳酸菌の属種の同定とその評価	16
2.2.2 熟成高速化に適した熟成条件の検討	22
2.2.2.1 乳酸菌プロテアーゼの活性測定法の確立	22
2.2.2.2 乳酸菌プロテアーゼの触媒特性	23
2.3 高圧処理による発酵効率化技術の開発	25
2.3.1 高圧処理条件の選定	25
2.3.1.1 事業化を見据えた上での高圧処理条件の選定	25
2.3.2 高圧処理後の温度条件の選定	28
2.3.2.1 実証試験の方法	29
2.3.2.2 実証試験の結果	30
最終章 全体総括	38
1. カード調製条件	38
2. 乳酸菌と高圧条件	38
3. 熟成条件	38

第1章 研究開発の概要

1.1 研究開発の背景・研究目的及び目標

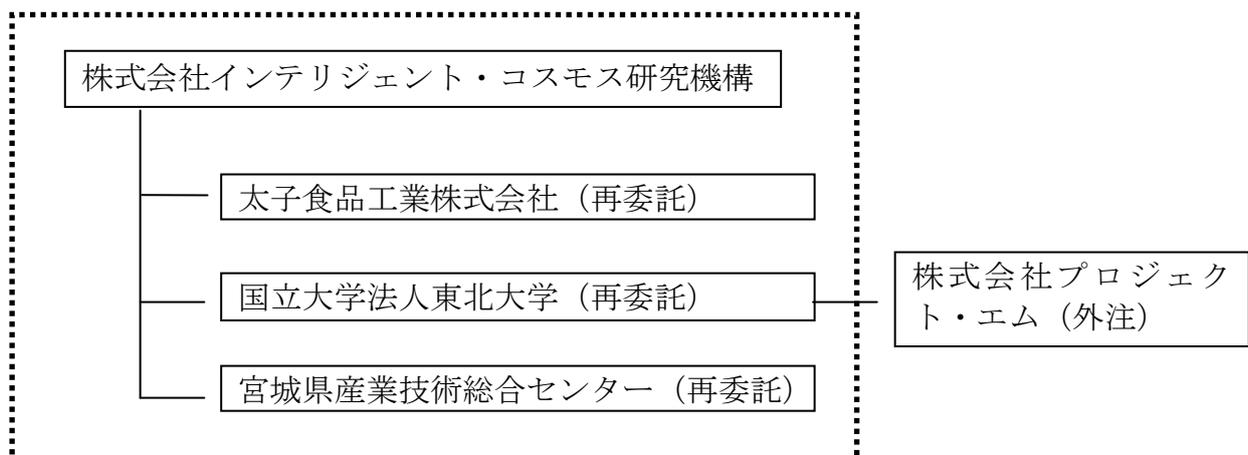
1) 研究の目的

健康志向の高まりから植物性タンパク食品として人気の大豆食品だが、デザート、発酵製品分野での食品素材としての利用は少ない。植物性、ヘルシーを志向する消費者をターゲットとした商品開発に応用できる健康志向型食品素材を求める川下製造業者のニーズに応えることを目的とする。

2) 研究の概要

植物性チーズ様食品（発酵豆乳チーズ）素材は、豆乳カードの熟成工程の非効率性がネックとなり実用化されていない。豆乳の脂肪含量コントロール技術によって調製した低脂肪豆乳を原料とすることにより、ヘルシー志向の川下ニーズに応えると同時に、豆乳カードへの高圧処理による熟成の高速化、当法に適した菌株の選抜による発酵効率化を要素技術とする効率的発酵技術を開発する。

1.2 研究体制



1.3 成果概要

ヘルシー志向の川下ニーズに応えるため、低脂肪豆乳を原料にした新規発酵技術を確立して、植物性チーズ様食品（発酵豆乳チーズ）を製造する開発研究に取り組んだ。大豆を原料にしたチーズ様食品として、中国の腐乳や沖縄の豆腐よう等が知られているが、これらはいずれも硬く絞って乾燥させた豆腐の外表面に発酵微生物（カビ）を塗布して熟成させたものである。また、カビを外表面に塗布したナチュラルチーズではカマンベールチーズが有名である。カビはプロテアーゼを菌体外に旺盛に分泌するため、乳酸菌のみを用いて熟成させるゴーダチーズやチェダーチーズ等よりは熟成期間が短い。しかしそれでも1ヵ月程度を要する。これは、プロテアーゼが外表面から内部へ浸透していかなければならないためである。このように、

チーズやチーズ様食品では、熟成を速めるために菌体外に酵素を分泌する発酵微生物を、外表面に塗布して熟成させる方法が広く行われている。しかしそれでも酵素の拡散浸透という過程が伴うため、熟成に長期間を要することになる。そこで、本事業においては高圧による発酵加速化技術の確立を目的に取り組んだ。すなわち、高圧処理を活用して、菌体内酵素を分泌させ、豆乳カードの内部から酵素を作用させて熟成を加速することを狙ったものである。なお、カビの使用は外観上万人受けするものではないこと、エンドプロテアーゼが主体のため、発酵加速化による食感の調整・管理が難しいこと、苦みペプチドが生じやすい等の難点があるため、乳酸菌ストックから使用菌株を選抜することとした。

原料に低脂肪豆乳を選定したのはヘルシー志向対応のためであったが、これを濃縮した濃縮低脂肪豆乳を用いることで、酸凝固させずに、乳酸菌を均一に分散させ高圧ゲル化させることができることを実証した。

使用菌株の選抜は、宮城県産業技術総合センター保有乳酸菌ストックの中から、プロテアーゼ分解活性、低脂肪豆乳での発酵風味（好ましい熟成臭）、高圧感受性を指標に選抜、絞り込みを行った。発酵風味を指標にした理由は、好ましい風味をもつことが商品として売れる前提であること、単なるさわやかなヨーグルト臭ではなく、チーズを認識できる熟成臭を生成できることが重要であるためである。日本では、ナチュラルチーズの中でゴーダチーズが最も好まれているため、当チーズの風味を好ましい熟成臭の参考とした。高圧感受性株は、350MPa、25℃での死滅速度定数を算出して選抜した。最終的に2菌株を候補株として絞り込んだ。

高圧処理試験は東北大学の試験機で基礎データを得て、実証試験は越後製菓株式会社のご協力で10Lまたは130L装置を借用して行った。高圧条件は産業上無理のない条件である350MPa、25℃、60分を設定、実証試験で上記2菌株を用いた試作を行った。熟成は、両菌株のプロテアーゼの触媒特性をあらかじめ検証した結果を反映させた条件で行い、味・香り評価装置での評価で、ゴーダチーズに風味に近い試作品を得ることができた。

以上、低脂肪豆乳、乳酸菌、高圧処理の組合せでのチーズ様食品の製法を確立することができた。また、製法に関して1件の特許出願を行った。

1.4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社インテリジェント・コスモス研究機構
産学官連携・インキュベーション事業部 プロジェクト・マネージャー
澁谷 俊昌
E-mail : shibuya@icr-eq.co.jp
TEL : 022-343-0461
FAX : 022-279-8880

第2章 本論

2.1 低脂肪豆乳の原料としての適性

2.1.1 豆乳の成分分析

本事業の計画は、豆乳から、高脂肪豆乳と低脂肪豆乳を調製し、得られた低脂肪豆乳を原料として、新規発酵技術を開発することである。豆乳は、タンパク質、脂質、炭水化物が主成分であるが、これらの成分組成が発酵、熟成後の味や香りに影響を及ぼすことは言うまでもない。そこで、原料として用いる低脂肪豆乳の成分含量を安全かつ迅速に測定するため、燃焼法全窒素測定装置およびマルチ成分分析計を購入（太子食品工業株式会社に設置）し、前者でタンパク質含量、後者で固形分含量と脂質含量を測定するシステムを構築した。これにより、原料豆乳の上記成分値を30分以内に測定することができるようになった他、後述する低脂肪豆乳の濃縮操作を行なった際にも、固形分測定により濃縮度を即座に把握することができたため、試験効率の大幅アップに貢献した。

生大豆には約20%の油脂を含んでおり、この油脂は、大豆中に含まれる蛋白質「オレオシン」により、小胞体（オイルボディ）を形成している。高脂肪豆乳と低脂肪豆乳では、単に量的に脂質含量が異なるのみならず、質的に脂質組成が異なると考えられる。そこで、遠心分離法を用いて、豆乳を低密度画分と中密度画分、高密度画分に分離し、それぞれの脂質含量を求めた。水より密度が低い脂質は低密度画分に移行するため、低密度画分が多い豆乳が高脂肪豆乳であり、高密度画分が多い豆乳が低密度豆乳であると考えられる。

2.1.1.1 タンパク質含量の測定法の確立とその応用

タンパク質含量分析は、従来「ケルダール法」での全窒素測定により行われてきたが、強酸や強アルカリを用いる等危険を伴う上、時間と手間がかかる。そこで効率的で安全かつ信頼性の高い分析を行うため、燃焼法全窒素測定装置（株住化分析センター製、スミグラフ NC-220F）を購入した。検量線作成は測定の都度メーカーのマニュアル通りに行い、タンパク質量は全窒素量からの換算係数5.71を用いて算出した。

2.1.1.2 脂質含量の測定法の確立とその応用

1) マルチ成分分析計での簡易分析法の確立

大豆関連食品の脂質含量分析は、リン脂質のような極性脂質を多く含むためクロロホルム-メタノール系溶媒抽出（Folch法）による定量が行われるが、クロロホルムは毒性が高いため扱いには十分な注意が必要なこと、溶媒による脂質抽出にオペレーターの技量が影響しやすく測定値の再現性が懸念されることから、マルチ成分分析計（CEMジャパン(株)製、SMART Trac II）を購入した。当装置は、核磁気共

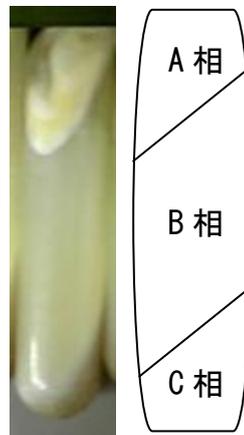
鳴 (=NMR) を用いて、脂質に特有の分子構造部分の応答をみることで脂質含量を再現性よく測定できる分析装置であるが、脂質の種類によって固有シグナル強度が異なるため、豆乳の種類（通常豆乳、低脂肪豆乳、高脂肪豆乳）ごとに検量線を検討して測定法を定めた。

2) 遠心分離法で分画した豆乳中の脂質組成の解析

1) 実験方法

①遠心分離試料の調製と総脂質分析

豆乳を超遠心分離（10,000rpm）によって分画した A 相、B 相、C 相（第 2.1.1-1 図）の各相について、その構成比、固形分を求めるとともに、総脂質を抽出した。



第2.1.1-1図 豆乳の超遠心分離による分画

固形分については、各相の試料を 110℃で乾燥することによって求めた。

脂質抽出については、各相を分取後、Folch 法に準じ、容量比で 2 倍のクロロホルム：メタノール=2：1（v/v）混合液で脂質を抽出した。抽出操作については 2 回実施した。抽出した脂質（総脂質）については、無水硫酸ナトリウムで一晩脱水後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、総脂質の重量を測定し、脂質含量を算出した。

②リン脂質の分析

総脂質中のリン脂質については、G. Lauser らの方法に従い、定量を行った。各相の総脂質を試験管に入れ、窒素気流下で溶媒を留去した。次に 250uL の 70%過塩素酸を加えて 150℃、90 分間加熱した。灰化終了後、蒸留水を 1.25mL、2.5%のモリブデン酸アンモニウム溶液を 250uL、10%のアスコルビン酸溶液を 250uL、蒸留水を 500uL 加え、95℃で 10 分間加熱した。冷却後、820nm の吸光度を測定し、無機リンの定量を行った。標準品には、リン酸二水素カリウムを用いた。

2) 結果と考察

各相の遠心分離（10,000rpm、10分）の分離結果を第2.1.1-1表に示す。また、各相の脂質含量及び総脂質100mg中のリン脂質量、リン脂質含量を第2.1.1-2表に示す。

第2.1.1-1表 各相の分離結果

	分画相			
	A相	B相	C相	合計
総量	1.035 g 2.34%	42.420 g 95.87%	0.791 g 1.79%	44.246 g 100.00%
各相の固形分含量	41.6%	10.3%	14.7%	11.1%

第2.1.1-2表 各相の総脂質量とリン脂質量

	分画相			
	A相	B相	C相	合計
各相の脂質含量	32.3%	3.87%	0.235%	4.34%
総脂質100mg当たりの リン脂質量	1.61mg	15.15mg	63.38mg	80.14mg
各相のリン脂質量	0.520%	0.586%	0.149%	3.478%

A相の脂質抽出については、エマルジョンの発生など脂質抽出に弊害となる事象は無かったが、B相、C相については、エマルジョンの発生が認められ、特にB相にエマルジョンが多く認められた。B相、C相には、何らかの両親媒性の物質があり、これがエマルジョンの発生につながったと推定される。

豆乳は10,000rpmの遠心分離によって、脂質を主成分としたA相（低密度画分）と脂質がほとんど含まれないC相（高密度画分）と溶液状態のB相に分かれ、その構成比はA相が2.34%、B相が95.87%、C相が1.79%であった。A相に着目すると、それは固形分が41.6%の半固体物であり、脂質が32.3%であった。従って、固形分の77%が脂質であることが明らかとなった。大豆の脂質組成から推定すると、A相の脂質の大半は中性脂質と推定された。また、C相に着目すると、それは固形分が14.7%の半固体物であり、脂質が0.235%であった。

総脂質100mg当たりのリン脂質量の結果を基に、各相の脂質含量から各相のリン脂質含量を換算した。A相とB相については、リン脂質含量がほぼ同じであった。C相にはリン脂質が0.149%とほとんど含まれなかったことから、リン脂質は低分子であるため沈降せずA相とB相に均一に分布したものと考えられた。

以上の結果から、オイルボディは浮上して大部分が低脂肪画分に移行する一方、リン脂質はオイルボディと独立に存在していて高脂肪画分にも低脂肪画分にも分布すると考えられえた。そして、相対的に低脂肪豆乳には低分子のリン脂質が多く含まれ、高脂肪豆乳には中性脂質が多く含まれることが示唆された。

豆乳中には大豆リポタンパクなどの両親媒性の物質が存在することも報告されている。脂質の詳細な解析のためには、総脂質の抽出方法を改善する必要がある。

2. 1. 2 豆乳成分の状態分析

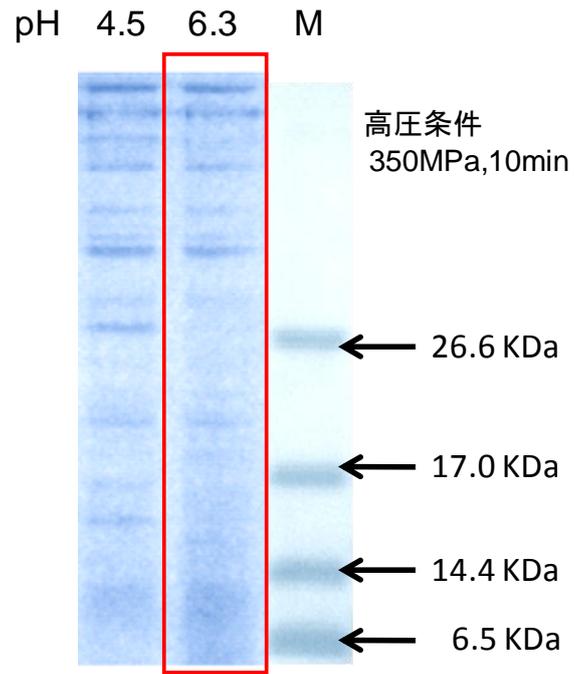
2. 1. 2. 1 豆乳タンパク質の状態分析

1) 豆乳タンパク質pHと乳酸菌プロテアーゼ活性

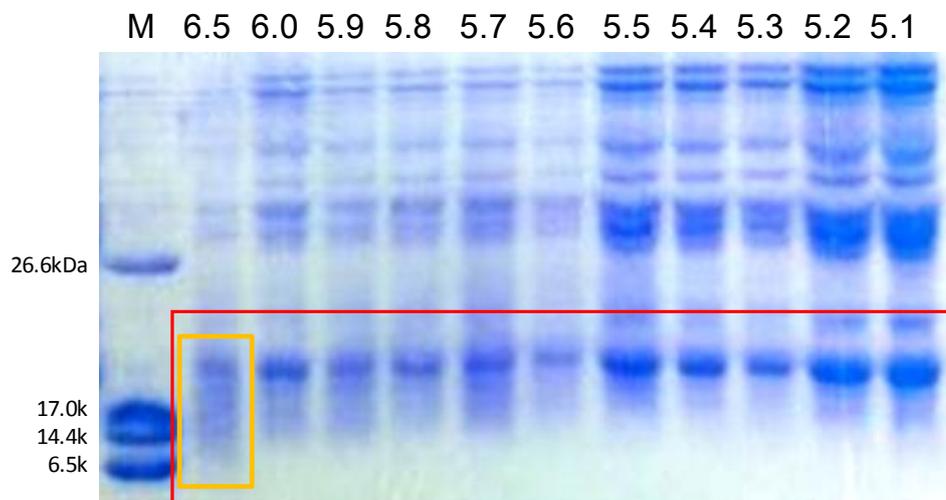
豆乳カードの熟成工程の非効率性を解決するために、乳酸菌を均一に分散させた豆乳カードを調製して用いることを考えた。太子食品工業株式会社保有の乳酸菌 (*Streptococcus sojilactis* SY1) を用いて豆乳カード作製を検討する中、高圧をかけた後のプロテアーゼ活性を、カード pH を変えて電気泳動 (SDS-PAGE) で確認したところ、pH4.5 ではタンパク質分解が観察されず、pH6.3 では分解が確認された (第 2.1.2-1 図)。そこで、他菌株 (宮城県産業技術総合センター保有 No.98 株) について菌体破碎液を調製し、豆乳タンパク質に対するプロテアーゼ作用の pH 依存性を SDS-PAGE で確認したところ、同様に pH6.0 以下ではタンパク質の分解が確認できず pH6.5 で分解が確認された (第 2.1.2-2 図)。

そこで、後者についてタンパク質分解性の pH 挙動を遊離アミノ酸生成量 (TNBS 法、方法は後述) で追跡する (第 2.1.2-3 図 上) 一方、プロテアーゼの反応性が豆乳タンパク質の二次構造と関連している可能性を推定し、豆乳タンパク質二次構造と pH との関係を FT-IR (フーリエ変換赤外分光光度計) で解析し、遊離アミノ酸生成パターンとの関連性を検討した。第 2.1.2-3 図 (下) は、低脂肪豆乳の pH を 1N HCl で調整し、各 pH での豆乳タンパク質の各種二次構造の割合をプロットしたものである。その結果、特に β -シート構造の割合とプロテアーゼ活性との連動が観察され、タンパク質二次構造が乳酸菌プロテアーゼ活性の pH 依存性に影響している可能性が示唆された。

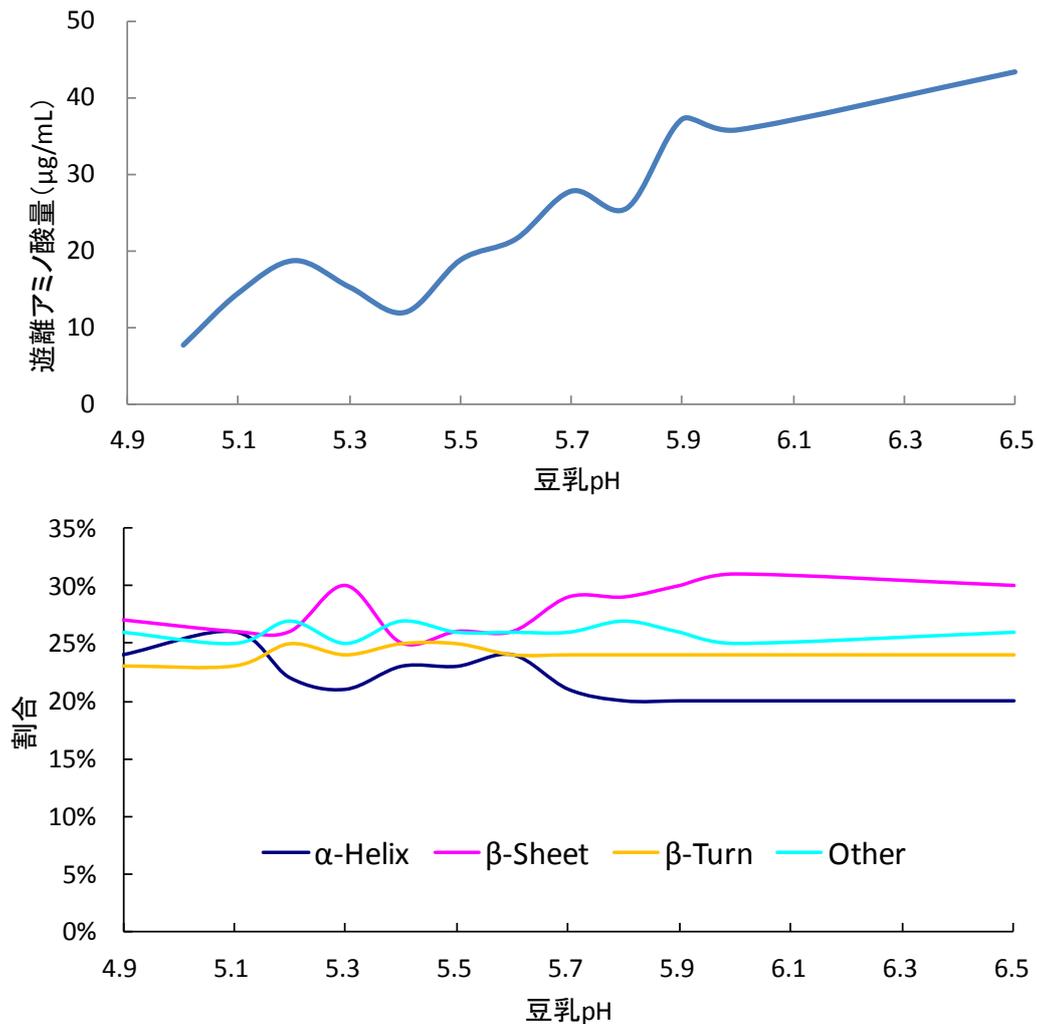
上記結果により、乳酸菌発酵による酸凝固での豆乳カード調製は、乳酸菌プロテアーゼ活性を引き出させない可能性があることが示された。そのため pH を下げないで豆乳カードを調製する方法の検討を行った。



第 2. 1. 2-1 図 *S.sojilactis* SY1 株プロテアーゼの pH 依存性



第 2. 1. 2-2 図 No.98 株菌体破碎液プロテアーゼ活性の pH 挙動



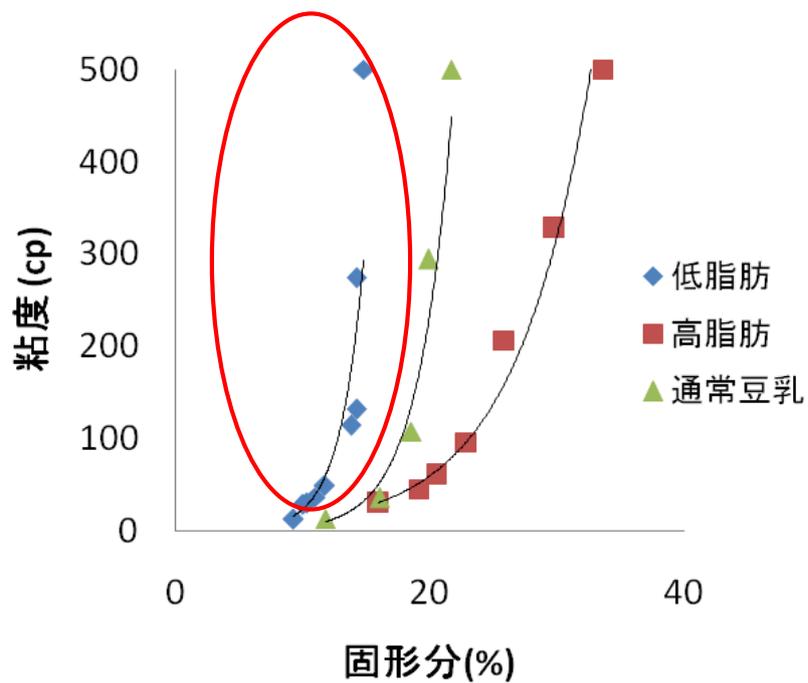
第 2.1.2-3 図 No.98 株菌体破砕液プロテアーゼ活性の pH 挙動（上）と FT-IR による豆乳タンパク質二次構造解析（下）

2) 豆乳カード調製方法の検討

pH を下げないで豆乳カードを調製する方法（豆乳凝固方法）として、①凝固剤（にがり）凝固、②濃縮凝固の 2 種類を検討した。

凝固剤を用いる方法は、豆腐と同じ原理であり、凝固剤添加後加熱してゲル化させるやり方である。一方、濃縮凝固は、豆乳を減圧濃縮し固形分量を上げて凝固状態を作り出すやり方である。この方法によれば、加熱をしなくても凝固させることが可能である。特に低脂肪豆乳の場合通常豆乳より凝固しやすい性質が確認された（第 2.1.2-4 図）。また、濃縮後ゾル状のため、乳酸菌スターターを均一に混合しやすいというメリットがあるほか、風味的には、味が濃く甘味が強い、物性的には、ゲルが加熱で溶けるというチーズ類似の特長もある。

両者の比較表を第 2.1.2-1 表にまとめた。これら両者の性状については、越後製菓株式会社ご協力による実証試験において確認した。



第 2.1.2-4 図 各種豆乳の固形分と粘度の関係

第 2.1.2-1 表 低脂肪豆乳の凝固法と性状比較

	凝固剤凝固	濃縮凝固
凝固方法	凝固剤を添加し、80°C加熱する	濃縮装置で豆乳の水分をとばす
凝固原理	ニガリを介したタンパク質の結合	タンパク質同士の結合
カードの物性	かたくもろい、豆腐様	弾力あり、ゲル、ゴム様
水拡散性	なし	あり
熱溶解性	なし	あり

2.2 高圧処理による熟成高速化に適した菌株の選抜

2.2.1 熟成高速化に適した菌株の選抜

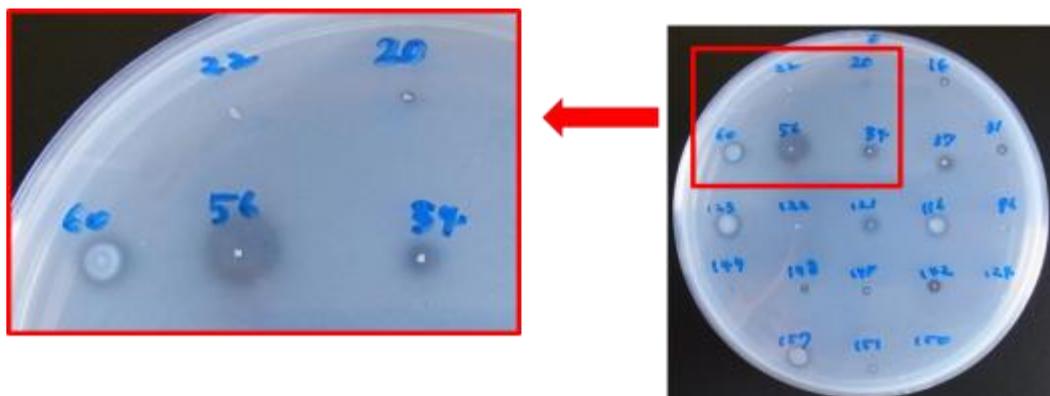
2.2.1.1 乳酸菌の生理特性に基づいた選抜

1) 発酵形式およびプロテアーゼ活性による選抜

宮城県産業技術総合センターが保有する乳酸菌 377 菌株から選抜した。これらの分離源を第 2.2.1-1 表に示す。乳酸菌の 40%以上が、野菜を原料とする発酵食品（キムチ・チャンジャ、漬物）から分離されていた。

短期間で効率的に熟成を進めるためには、プロテアーゼ活性が高い乳酸菌を使用することが望ましい。そこで、各菌株のプロテアーゼ活性を以下のように評価した。すなわち、スキムミルク寒天培地（0.5% スキムミルク、0.5% グルコース、1.2% 寒天）に乳酸菌を植菌し、30℃で 24 時間培養した。スキムミルク培地は白濁しており、乳酸菌のプロテアーゼがスキムミルクを分解すれば、クリアゾーンが形成される（第 2.2.1-1 図）。クリアゾーンが形成されたものを「++」、完全に透明ではないものの周囲の濁度が低下したものを「+」、確認できなかったものを「-」とした。2 回分の実験結果を合わせ「++++」「+++」「++」「+」「-」の 5 段階で評価した。

発酵形式とプロテアーゼ活性を合わせて第 2.2.1-2 表に示した。発酵時に炭酸ガスを産生すると、製造・流通過程で容器の膨張などが懸念されることから、発酵形式ホモ型の乳酸菌を使用することにし、377 株から、発酵形式がホモ型で、かつプロテアーゼ活性が「++++」または「+++」であった 112 菌株を選抜した。



第 2.2.1-1 図 スキムミルク培地でのクリアゾーン形成

第 2.2.1-1 表 保有乳酸菌の分離源

由来	株数	割合 (%)
キムチ・チャンジャ	70	22
漬物	75	20
野菜・果物	41	11
野菜加工品	15	4
水産加工品	61	16
日本酒・酒造蔵	60	16
植物	24	6
その他	19	5
合計	377	100

第 2.2.1-2 表 保有乳酸菌の特性

377 株	発酵形式		プロテアーゼ活性	
	ホモ	269 株 (71%)	++++	36 株
+++			76 株	
++			138 株	
+			4 株	
-			15 株	
ヘテロ	108 株 (29%)	++++	2 株	
		+++	7 株	
		++	95 株	
		+	1 株	
		-	3 株	

2) 低脂肪豆乳での増殖性による選抜

宮城県産業技術総合センターでの選抜試験で選抜された 112 菌株に、MRS 培地での生育不良により除かれた 9 菌株を加えた 121 菌株を用いて、太子食品工業株式会社において更に以下のような選抜を行なった。

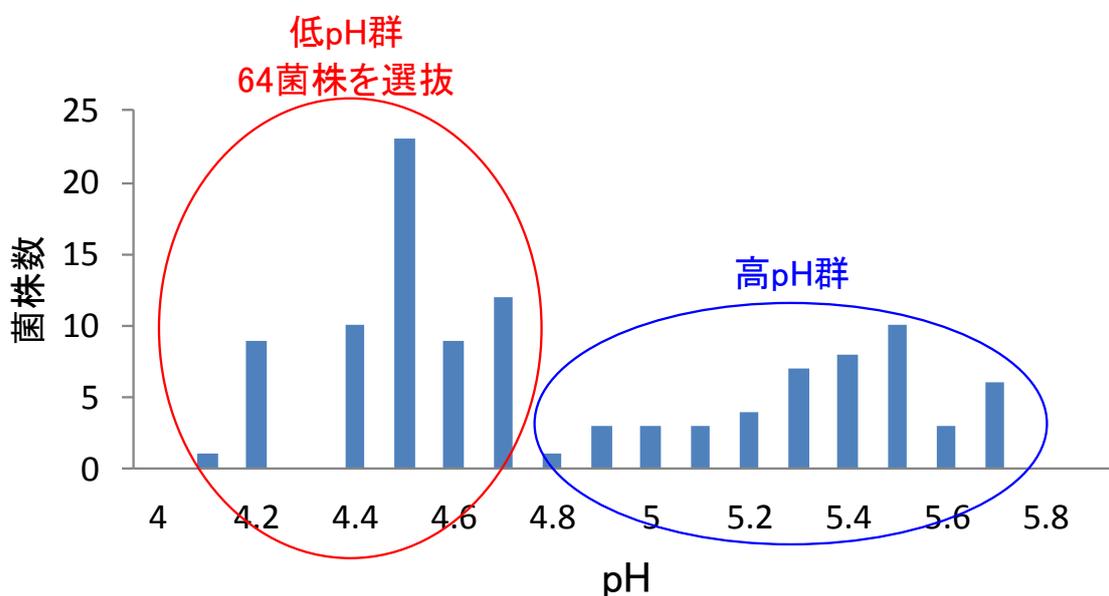
121 菌株を、乳酸菌用培地である MRS 培地で再培養し、生育した 119 菌株について、スターターとして使用できる条件である低脂肪豆乳での増殖性を調べた。

1) 方法

カナダ産大豆を原料に太子食品工業(株)古川清水工場で製造された低脂肪豆乳（1回目：固形分 9.25%、脂質 0.66%、2回目：固形分 9.43%、脂質 0.74%）5ml に、MRS 液体培地で 30℃、2 晩培養した前培養液を 0.5ml 添加して 30℃で静置培養した。

2) 結果

発酵による pH 低下が大きい菌株が低脂肪豆乳での増殖性が高いと考えられるため、36 時間培養後の pH を測定したところ、低 pH 群と高 pH 群に分けることができた（第 2.2.1-2 図）。よって、低脂肪豆乳での増殖性が高いと推定される低 pH 群となった 64 菌株を選抜した。



第 2.2.1-2 図 低脂肪豆乳での増殖性による選抜

2.2.1.2 乳酸発酵産物の有する香気特性に基づいた選抜

低脂肪豆乳で生育した 64 菌株について、低脂肪豆乳での発酵後の風味評価による選抜を行った。

1) 方法

MRS 液体培地で 30°C、2 晩静置培養した各菌株の前培養液 1ml を低脂肪豆乳 10ml に添加し、30°C で 5 日間発酵させた。この発酵液の風味の官能評価を太子食品工業株式会社のパネリスト 5 名で 2 回行った。

<官能評価方法>

太子食品工業株式会社のパネリストが発酵液の香りを嗅いだ時に、好ましい熟成臭（乳、大豆の発酵食品の香り）を感じるものを選抜するため以下のような手順で官能評価した。

パネリスト 5 名が同じサンプルを評価する際に、共通のキーワードを得られるように、全員ですりあわせを行った。まず、各パネリストに自社菌株 2 株で発酵させた豆乳と低脂肪豆乳を嗅いでもらい、発酵により新たに付加された香りの単語およびその強さをシートに記入してもらった。パネリスト全員で集まって記入された単語について整理、統一を行い、単語をキーワードにした。各菌株で挙げられたキーワードをカテゴリに分類した（第 2.2.1-3 表）。分類する際は、チーズの官能評価や発酵食品の文献、資料を参考にした。

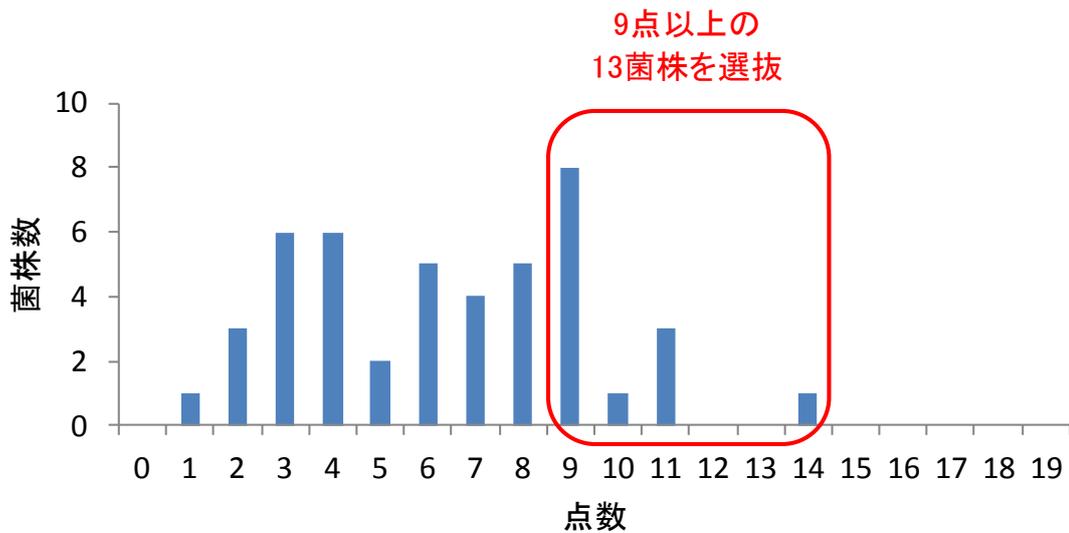
次にパネリストに選抜株の発酵サンプルを嗅いでもらい、キーワードを用いて評価してもらった。各キーワードの香りの強さについて、まったく感じない場合は無記入、評点は 1~5 の 5 段階で評価してもらった。パネリストによる 10 回分の評価を、それぞれのカテゴリごとに合計した。キーワード数 3 のグループを 1 としたときの、各グループのキーワード数の倍数を係数とし、各グループの得点に係数をかけて算出した。

第2.2.1-3表 官能評価におけるキーワードとカテゴリの整理

カテゴリ	キーワード	資料
熟成臭	まろやか	大豆発酵食品である味噌、官能評価項目に該当。チーズ、酒、食肉など熟成食品において表現に使われている。
	チーズ臭	清酒文献：ジアセチル
	バター臭	清酒文献：ジアセチル
	ヨーグルト臭	清酒文献：ジアセチル
	脂質様臭	
芳香	発酵臭	
	納豆臭	
甘臭	甘味	清酒文献
酸臭	酸味	清酒文献
	さわやか	有機酸による酸味と芳香
焦げ臭	苦い	清酒文献
酸化臭	ムレ	清酒文献：イソバレルアルデヒド
	酸化臭	清酒文献
	きなこ臭	豆腐製造工程で用いられる。パネリストは酸化した豆のかおりという認識。
	豆臭	ヘキサナール（脂質酸化生成物）
腐敗臭	異臭	本パネリストにとって食品には適さない香りという認識。
	変敗臭	本パネリストにとって食品には適さない香りという認識。
	刺激臭	本パネリストにとって食品には適さない香りという認識。

2) 結果

64 菌株の発酵液について官能評価を行い、腐敗臭点数が 9 点以上の 19 菌株を除いた残り 45 菌株の中から、熟成臭の点数が 9 点以上の 13 菌株を選抜した(第 2.2.1-3 図)。



第2.2.1-3図 官能評価による熟成臭の評価（45菌株）

2.2.1.3 乳酸菌の高圧感受性に基づいた選抜

選抜試験において、乳酸発酵産物の有する香気特性に基づいて選抜、絞り込んだ13菌株について、低脂肪豆乳での高圧感受性試験（350MPa）を実施し、高圧に対する耐性が低い菌株の選抜を行った。

1) 方法

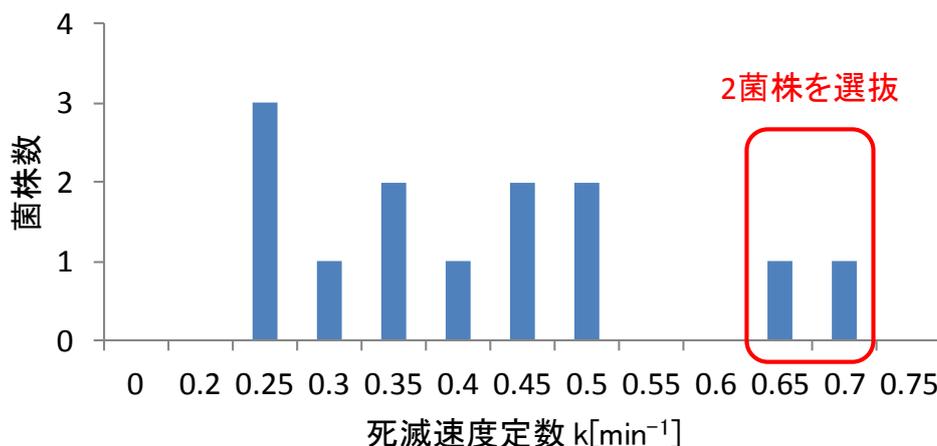
各菌株をMRS液体培地で30℃、2晩静置培養した後、低脂肪豆乳に菌液を1/10量添加して、30℃、12時間培養した。培養後の菌液（発酵凝固物）を1/10量となるように低脂肪豆乳に懸濁し、高圧処理サンプル（プラスチック袋に密封）とした。

作製したサンプルについて、高圧試験装置で350MPa、25℃の条件で、0、15、30分の高圧処理を施した。生菌数検査は、高圧処理後サンプルを生理食塩水で段階希釈した後、1mlをMRS寒天培地にプレーティングし、30℃、3日間培養後生育コロニーをカウントした。高圧死滅挙動が下記の一次反応式に従うと仮定し、菌数測定結果から高圧死滅曲線を作成し、死滅速度定数を求めた。

$$N = N_0 e^{-kt} \quad (N: \text{時間 } t \text{ での生菌数、} N_0: \text{初期生菌数、} k: \text{死滅速度定数})$$

2) 結果

第2.2.1-4図に13菌株の高圧死滅速度定数の分布を示した。この結果から、死滅速度定数の高い2菌株（No.261、No.494）を選抜した。この2菌株を、越後製菓株式会社ご協力による実証試験に用いた。



第2.2.1-4図 13菌株の高圧死滅速度定数の分布

2.2.1.4 遺伝子解析による乳酸菌の属種の同定とその評価

1) DNAの抽出・精製

各供試菌株を MRS 培地にて 30℃、24 時間培養し、十分な増殖を確認した後、3000×g、10 分間の遠心分離により集菌した。上清を除去した後、1.5ml 容量のマイクロ遠沈管に菌体を採取し、150 μl の抽出バッファー (100 mM Tris-HCl、pH 9.0、40 mM EDTA と 10% SDS を 1 : 5 の容量比で混合したもの)、75 μl 塩化ベンジルを加え、50℃で 30 分間インキュベートした。75 μl の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.3) を加え、氷中に 15 分間放置後、遠心分離 (22,000×g、4℃、10 分) し、上清を新たなマイクロ遠沈管に移した。定法に従いエタノール沈殿、エタノール洗浄を行い、得られた DNA を 50 μl の TE バッファー (pH8.0) に溶解し、精製 DNA とした。

2) 16S rDNA 領域の増幅とシーケンスサンプルの取得

精製したゲノム DNA から 16S rDNA 領域の増幅を行うために PCR 法に供した。Taq DNA ポリメラーゼ、dNTP 溶液、Taq 緩衝液は ExTaq キット (タカラバイオ製) を規定量用い、容量を 50 μl スケールとした。プライマー (日本遺伝子研究所製) は第 2.2.1-4 表に示したものをを用いた。

増幅反応はサーマルサイクラー (タカラバイオ製および BIOER 製) を用いて、94 °C (2 分) 加熱後、94 °C (30 秒)、55.5 °C (1 分)、72 °C (1 分 40 秒) を 30 サイクル行い 72 °C (10 分) 加熱で終了し、PCR 産物を得た。PCR 産物を Microspin S-400 (GE ヘルスケア製) を用い、735×g、2 分の遠心分離により精製した。

精製した PCR 産物をシーケンス反応に供した。プライマーは 8F を使用し、ダイターミネーター、反応緩衝液はシーケンス反応キット (ベックマン・コールター製) を規定量使用した。サーマルサイクラーを用いて 96 °C (20 秒)、50 °C (20

秒)、60 °C (3 分) を 30 サイクル行い、反応生成物を得た。反応生成物に規定量の反応停止液を添加し、定法に従いエタノール沈殿、エタノール洗浄を行い、サンプルローディングソリューション (ベックマン・コールター製) に溶解させてシーケンスサンプルを得た。

第 2.2.1-4 表 増幅反応に用いたプライマー

プライマー	塩基配列 (5'-3')
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1540R	AAGGAGGTGATCCAGCC

3) DNA シークエンスと BLAST サーチによる相同性解析

DNA シークエンスを行うため、各株のシーケンスサンプルを DNA シークエンサー GeXP (ベックマン・コールター製) に供し、ダイターミネーターを使用したキャピラリー電気泳動法により、16S rDNA の 8F プライマーで増幅される Forward 側に 300bp 程度 (可変領域の VI~VIII 程度) までの配列を決定した。得られた配列について、日本 DNA データバンク (DDBJ) の BLAST サーチに供し、相同性の解析を行った。

4) 解析結果

太子食品工業株式会社により 112 株から 13 株が選抜された。これらについて遺伝子解析を行い、属種を推定した。13 株中、結果が得られた 10 株について、推定属種と相同性を第 2.2.1-5 表に示した。

10 株中 8 株が *Lactobacillus sakei* と高い相同性を示した。残りの 2 株はそれぞれ *Lactobacillus plantarum*、*Enterococcus sp.* と高い相同性を示した。

第 2.2.1-5 表 候補株 10 株の属種推定結果

株番号	推定属種	相同性
98	<i>Lactobacillus sakei</i>	100%
120	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%
261	<i>Lactobacillus sakei</i>	100%
262	<i>Lactobacillus sakei</i>	98%
355	<i>Lactobacillus sakei</i>	100%
433	<i>Enterococcus sp.</i>	97%
487	<i>Lactobacillus sakei</i>	97%
494	<i>Lactobacillus sakei</i>	100%
513	<i>Lactobacillus sakei</i>	97%
523	<i>Lactobacillus sakei</i>	98%

5) 味・香り評価装置による実証試験試作品の評価

1) 実験方法

太子食品工業株式会社による実証試験（後述）試作品 4 種類（第 2.2.1-6 表）を、味評価装置および香り評価装置を用いて評価した。2 種類の原料をそれぞれ対照区とし、高圧処理およびその後の熟成による味・香りの変化を調べた。比較のため、チーズの代表として、市販ゴータチーズを同時に測定した。

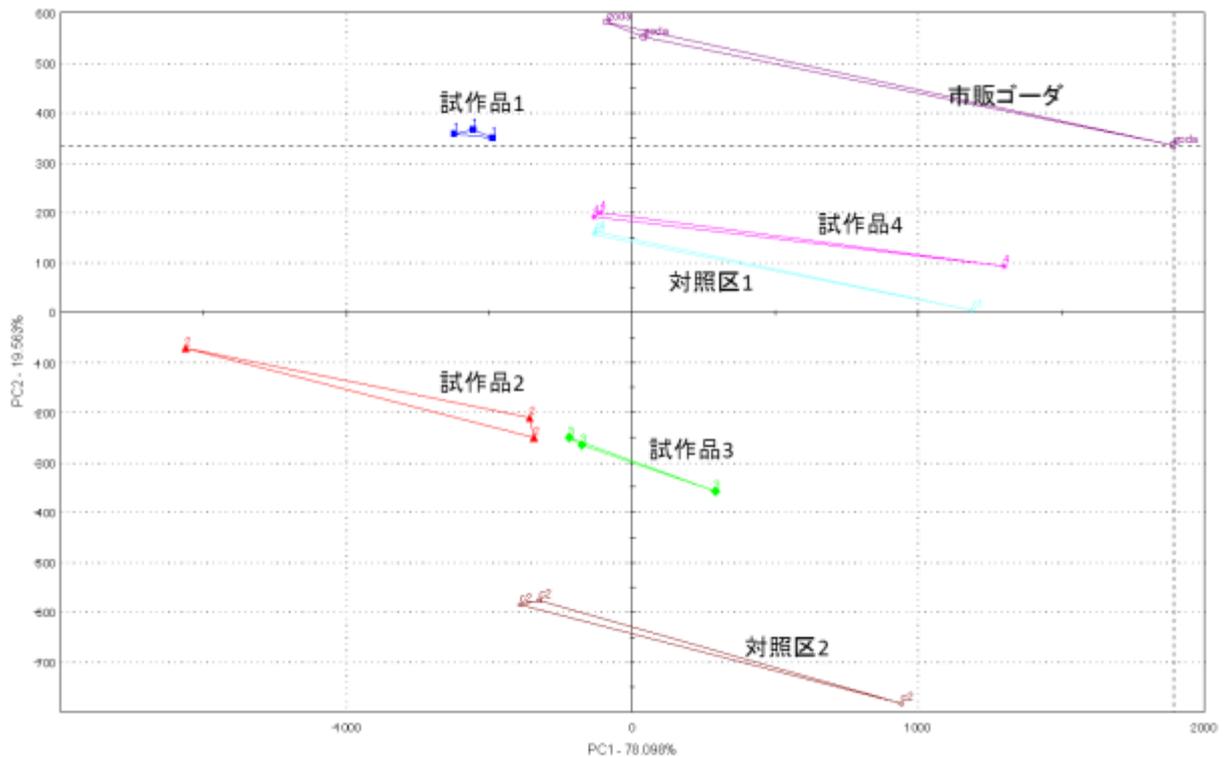
味の評価には、試料に 9 倍量の蒸留水を加えて（10 倍希釈）破碎し、コーヒーフィルターでろ過した液を用いた。測定は 6 回行い、4、5、6 回目の結果を採用した。香りの評価は、細切した試料を 2 g ずつ入れたバイアル瓶を 4 本準備し、それぞれ 1 回ずつ、計 4 回の測定を行った。

第 2.2.1-6 表 評価した実証試験試作品一覧

サンプル	乳酸菌	原料の調製方法	高圧処理条件	熟成温度、熟成期間
試作品 1	261 株	乳酸発酵による酸凝固	350MPa、 25℃、60 分	50℃、7 日間
試作品 2	261 株	濃縮豆乳に乳酸菌添加		50℃、7 日間
試作品 3	494 株			45℃、7 日間
試作品 4	494 株			60℃、7 日間
対照区 1	261 株	乳酸発酵による酸凝固	—	—
対照区 2	—	濃縮豆乳	—	—
市販ゴータ	—	—	—	—

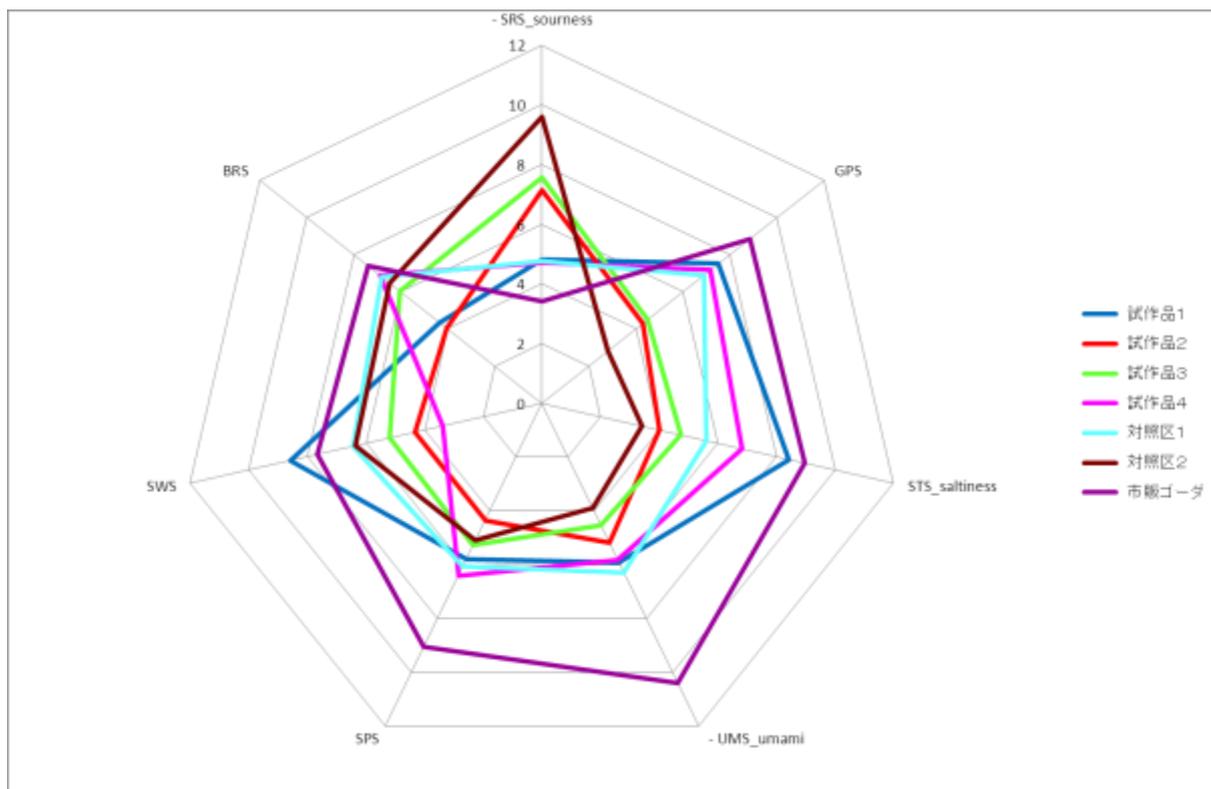
2) 結果

主成分分析により作製した味のマップを第 2.2.1-5 図に示した。全ての試料がマップ上で分かれて分布し、味の違いを表現することができた。



第 2.2.1-5 図 実証試験試作品の味のマップ

次に、レーダーチャートを作製し、味のバランスを比較した (第 2.2.1-6 図)。マップの下部に分布した試作品 2、試作品 3、対照区 2 は SRS センサーの応答が強かった。マップの上部に分布した試作品 1、試作品 4、対照区 1、市販ゴードはその他のセンサーの応答が強かった。市販ゴードは、SPS センサーおよび UMS センサーの応答が極めて強かった。

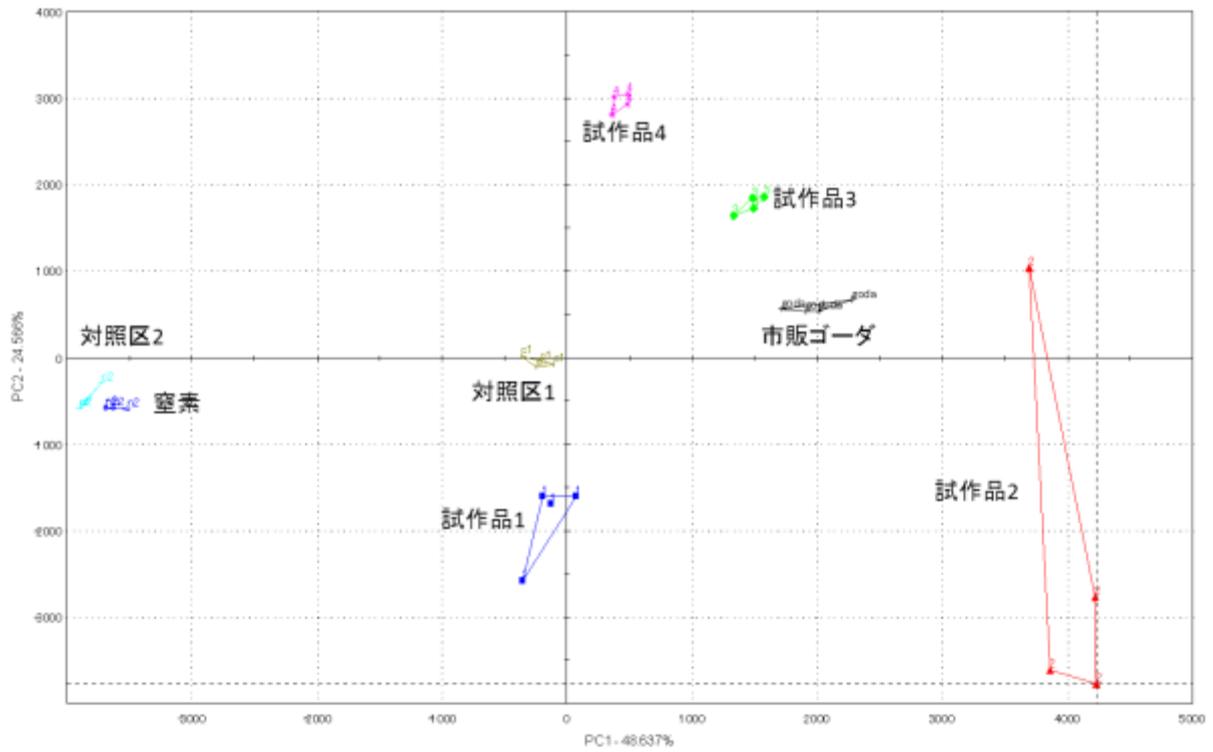


第 2.2.1-6 図 実証試験試作品の味のバランス

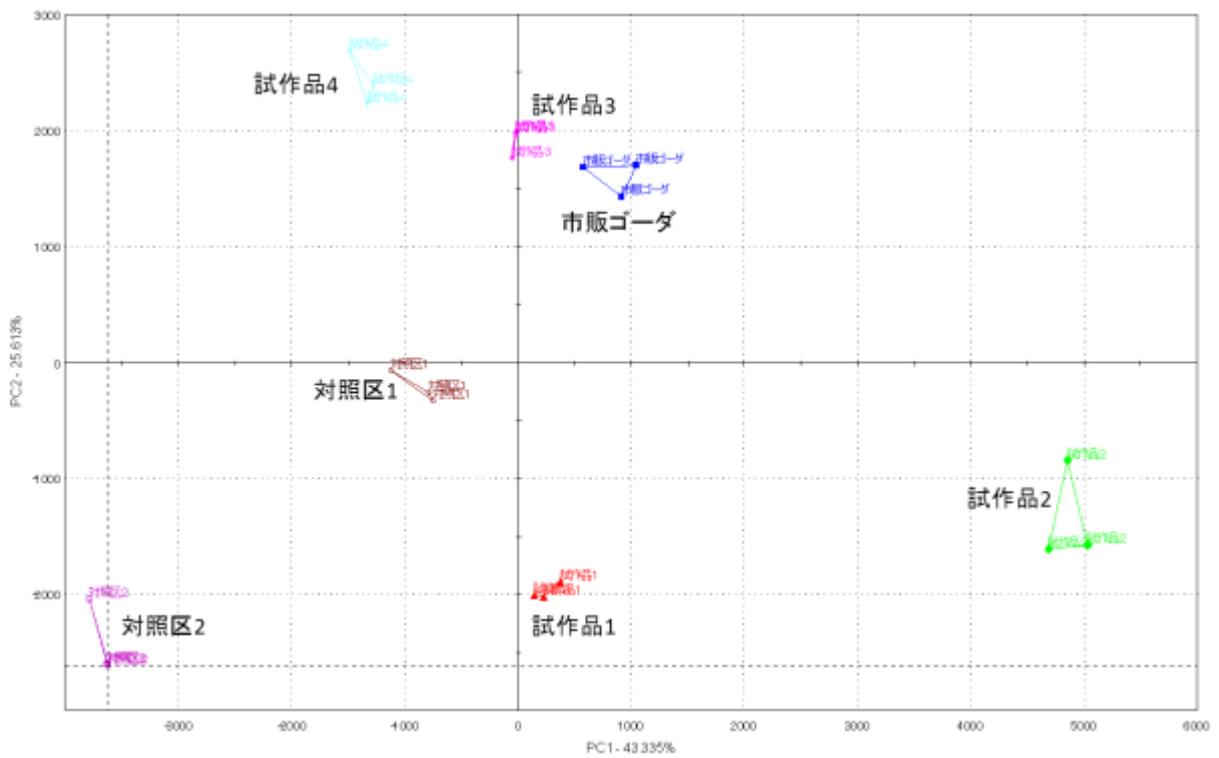
主成分分析により作製した香りのマップを第 2.2.1-7 図に示した。全ての試料がマップ上で分かれて分布し、香りの違いを表現することができた。また、味のマップよりも試料間の距離が遠く、違いがはっきりしていることも示された。

比較のために窒素（無臭）を一緒に測定した。対照区 2 は窒素の近くに分布し、香りが弱いことがわかった。しかし、対照区 2 を原料とした試作品 2、試作品 3、試作品 4 は、窒素から遠く、それぞれ別の方向に分かれて分布した。熟成条件によって、特徴的な香りが形成されたことが示された。

人が食品を口に入れると、味と同時に香りも感じる。香りだけでも味を感じることがあるため、味と香りは合わせて評価する必要がある。そこで、味と香りの統合解析の結果をマップに示した（第 2.2.1-8 図）。太子食品工業株式会社により行われた官能評価の結果、試作品 3 は市販ゴードに味・香りが似ていた。これは味と香りの統合解析、香りの主成分分析の結果と一致していた。このことから、チーズや植物性チーズ様食品素材の風味には味よりも香りが影響し、それぞれの特徴は香りによって形成される可能性が考えられた。



第 2.2.1-7 図 実証試験試作品の香りのマップ



第 2.2.1-8 図 第 3 回実証試験試作品の味と香りの総合解析マップ

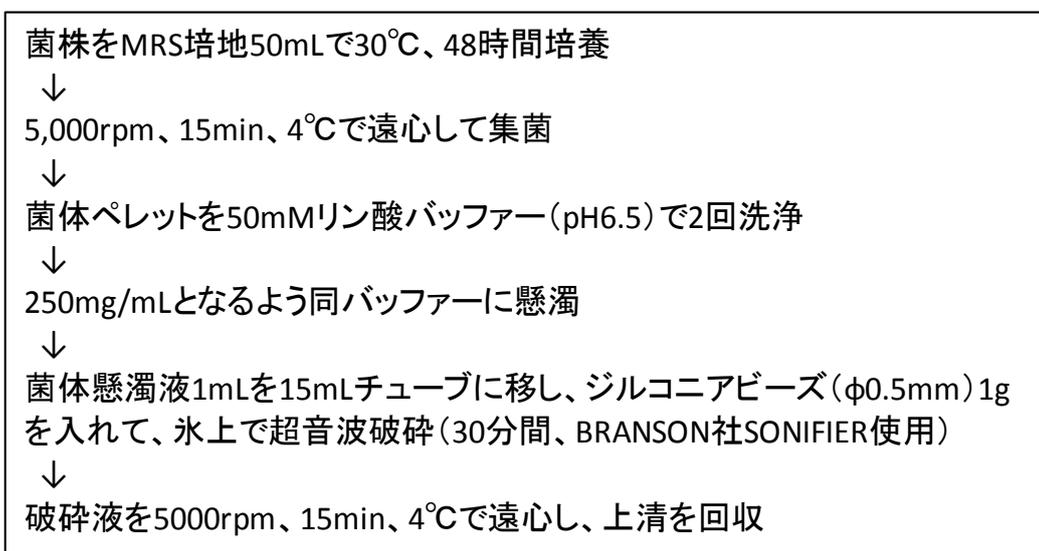
2. 2. 2 熟成高速化に適した熟成条件の検討

2. 2. 2. 1 乳酸菌プロテアーゼの活性測定法の確立

熟成高速化に適した熟成条件を見出すため、熟成に重要な役割を果たすと考えられるプロテアーゼに着目し、選抜乳酸菌が有する菌体内プロテアーゼを抽出し、プロテアーゼの特性を検証するための試験系を検討した。

1) 菌体からのプロテアーゼの抽出方法

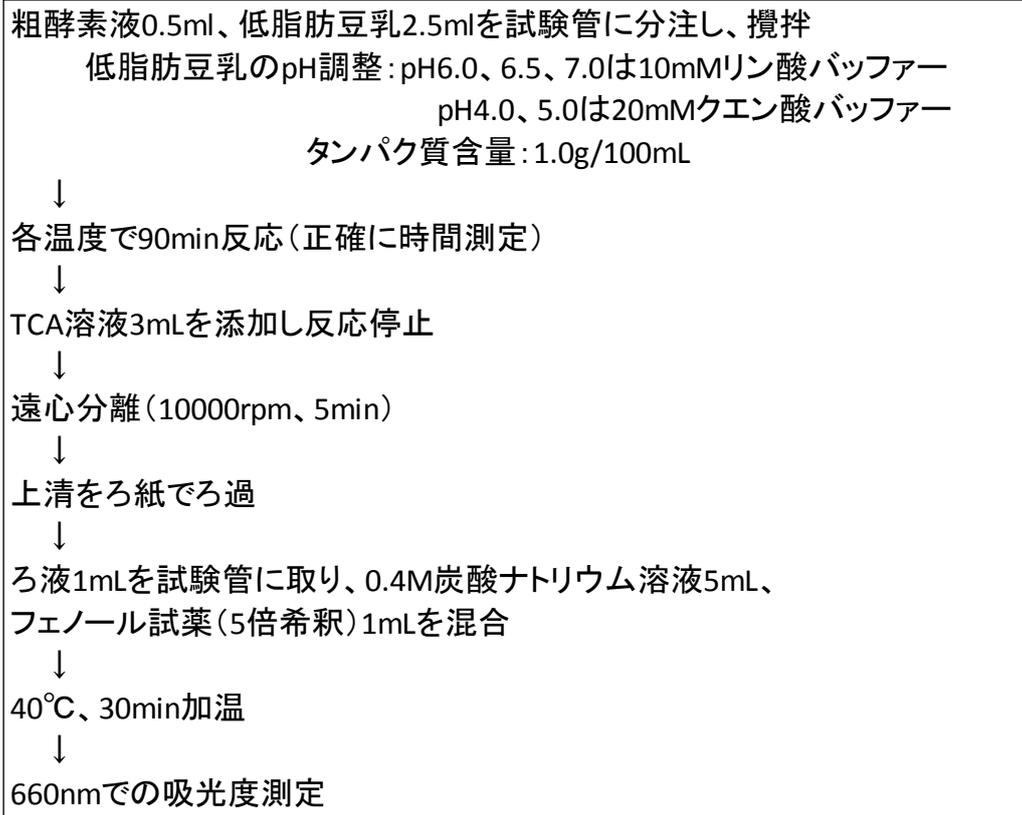
菌体からのプロテアーゼの抽出には溶菌が必要である。そのため、物理的破碎、溶菌酵素（市販品）使用等の方法が考えられたが、後者の場合、粗酵素中にプロテアーゼが残存している可能性が高いため、物理的破碎による抽出法を検討し、超音波による菌体破碎でプロテアーゼを抽出する方法を以下のように構築した（第2.2.2-1図）。



第2. 2. 2-1図 超音波破碎による菌体内プロテアーゼの抽出

2) プロテアーゼ活性の測定方法

プロテアーゼ活性は、フェノール試薬 (Folin試薬) を用いて測定した (第2.2.2-2図)。プロテアーゼの基質として低脂肪豆乳を用い (タンパク質含量1.0g/100mLとなるよう各pHのバッファーで調製)、菌体破碎して得られた粗酵素液を反応させた。チロシンを用いて検量線を作成し、1分間に1 μg のチロシンを生成する活性を1unit (1PU) としてプロテアーゼ活性を表した。



第2.2.2-2図 粗酵素液のプロテアーゼ活性測定法

2.2.2.2 乳酸菌プロテアーゼの触媒特性

2.2.1.3に記載した選抜試験の高圧感受性試験で最終選抜した2菌株（No.261、No.494）のプロテアーゼの触媒特性（至適pHおよび温度）を、2.2.2.1のプロテアーゼ活性測定法を用いて調べた。

1) プロテアーゼ活性の温度に対する挙動

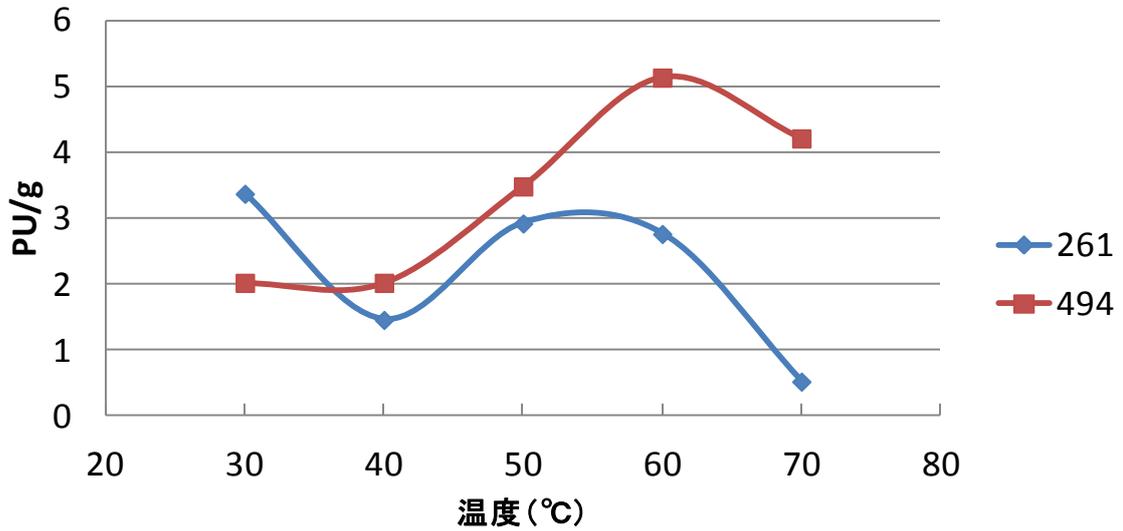
両菌株を超音波破碎して粗酵素液を調製し、基質となる低脂肪豆乳をリン酸バッファーでpH6.5に調整して混合し、30°C、40°C、50°C、60°C、70°Cで各々反応させ、プロテアーゼ活性を測定した。結果を第2.2.2-3図に示した。No.261株は、55°C付近と30°C付近にツインピークを持っていた。No.494株は、60°C付近にシングルピークを持っていた。

2) プロテアーゼ活性のpHに対する挙動

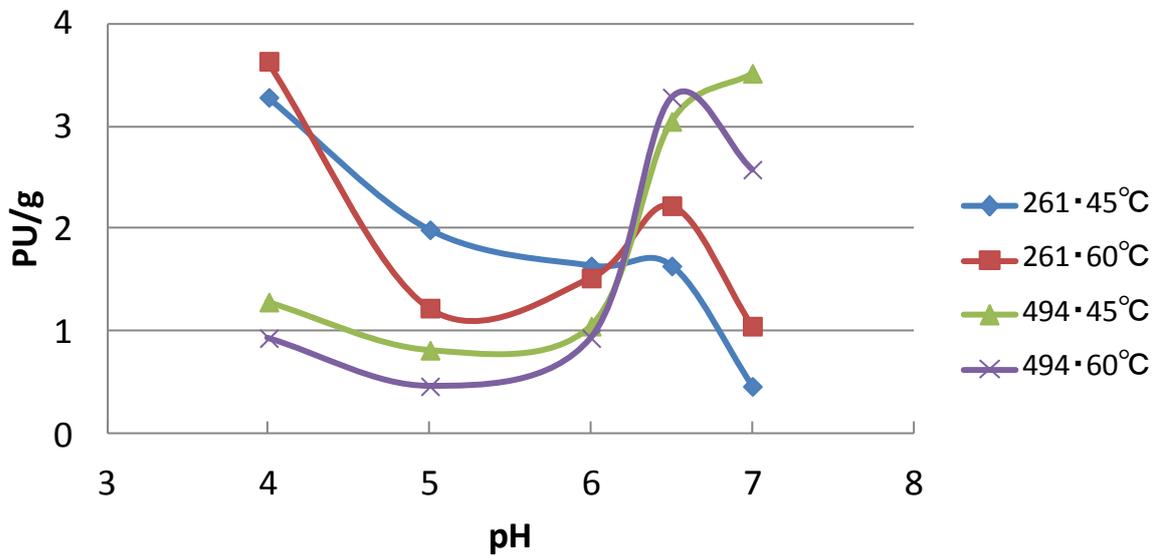
1)と同様に両菌株を超音波破碎して粗酵素液を調製し、基質となる低脂肪豆乳のpHをリン酸バッファー（pH6.0、6.5、7.0）またはクエン酸バッファー（pH4.0、5.0）で調整して混合し、各々45°Cと60°Cで反応させた後プロテアーゼ活性を測定した。結果を第2.2.2-4図に示した。これにより、No.261株は、酸性プロテアーゼと中性プロテアーゼ活性を有し、No.494株は中性プロテアーゼ活性を有することが判

明した。

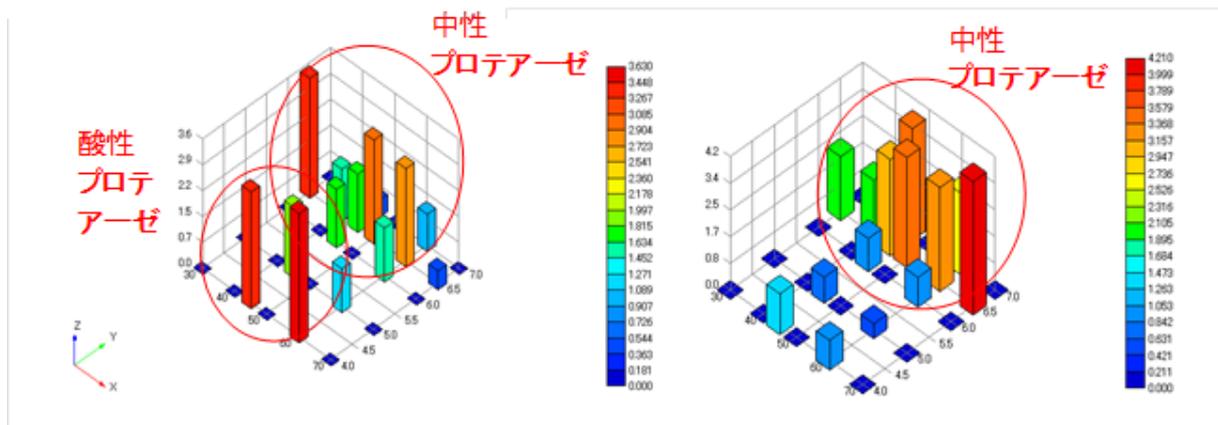
第2.2.2-5図に1)、2)の結果を統合した3次元グラフを示した。これらの結果を、両菌株を用いた実証試験の熟成条件設定に反映させた。



第2.2.2-3図 選抜菌プロテアーゼ活性の温度依存性 (pH)



第2.2.2-4図 選抜菌プロテアーゼ活性のpH依存性 (45°C、60°C)



第2.2.2-5図 No. 261株とNo. 494株のプロテアーゼ活性

2.3 高圧処理による発酵効率化技術の開発

人類は長年の間、食品の調理・加工・殺菌に熱を利用してきた。しかし、加熱処理では大量のエネルギーを消費するのみならず、栄養素の破壊や有害物質の生成など、食品の品質においても多くの問題を含んでいる。高圧処理では、加熱処理では得られない多くの利点が見出されており、新しい食品加工技術として期待されている。例えば、高圧処理により食材の形質転換を誘引し、その後に他の物理的、生物的、生化学的効果を組み合わせることにより、食材中に含まれる組成（薬理成分）を増加させるなど、新しい機能性食材を開発することが可能になりつつある。

高圧の食品加工技術としての良さは、圧力の伝播が瞬時であることである。130Lのタンクに高圧をかける場合でもほぼ一瞬にしてタンク内全部が所定圧力に達するため、タンク内の位置による圧力の偏りが少なく、ほぼ均一な質的变化が実現できる。例えば、マグロを解凍あるいは加熱するとき、中心部と外表面との質的变化を均一にしようとするのが困難を伴う。しかし、圧力の場合比較的容易に均一な質的变化を実現できる。「加熱」では殺菌が完了するまでに中心部と表面部に温度差が生じて調理にむらが出てしまうのに対し、「加圧」では圧力は極めて速やかに伝わるため調理むらがほとんど生じない。高圧処理のこのような特徴は、特に固体食品を対象にした場合には有利である。

2.3.1 高圧処理条件の選定

2.3.1.1 事業化を見据えた上での高圧処理条件の選定

1) 食品分野における高圧処理利用の現状

アジア、欧米など世界各国では、既に高圧処理の実用化が盛んに行われている。一例として、アメリカの Avomex 社では、国内で流通しているカットアボガドの1/3を高圧処理によって加工している。一方、越後製菓では2000年から高圧処理を利用した無菌化包装米飯の製造を行っており、韓国への技術移転を含めてこれま

でに 4 拠点で大型の高圧処理装置が稼働している。しかしながら、諸外国と比べて日本国内では、高圧処理の実用化は遅れていると言わざるを得ない。日本と海外との実用化の差は、高圧処理装置の開発の差によることが大きい。海外では数百 L で最大圧力 600~800MPa の装置が汎用されているが、日本の大手メーカーの高圧処理装置は、130L で最大圧力 400MPa である。しかし、高圧処理の利用範囲は、殺菌、物性変換、機能性成分の富化、酵素反応の制御、低アレルギー化など幅広い用途開発が行われて

高圧利用食品の例



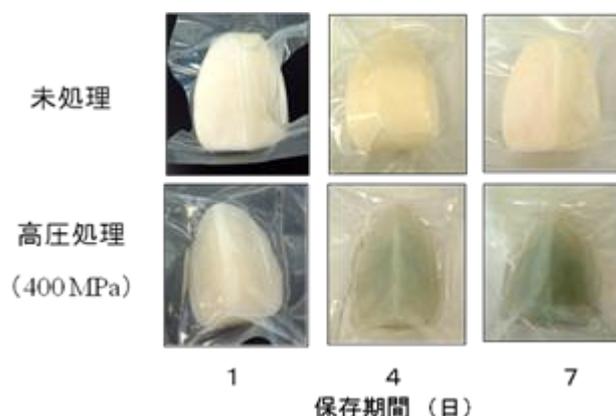
アボカドピューレ

きており、盛んになっている。このような背景を受けて、企業約 80 社と大学研究者が参画した H・P 未来産業創造研究会が平成 11 年に発足し、高圧処理を利用した製品開発、学術研究、実用化を行っており、多くの高圧処理製品が開発されている。本研究会では、会員企業が高圧処理を利用した製品開発を行うにあたり、無償で試験機（約 10 台保有）を自由に使用することができ、実際に製品を製造する際は、大型の高圧処理装置（越後製菓㈱保有、高圧処理装置の仕様（最大圧力：400MPa、温度範囲：RT~80℃、容積：130L））を利用することができる。装置の導入にはある程度の初期投資が必要であり、これにより将来的に事業として成立することを確認してから、装置導入を行うことができる。これにより、現在までに雑穀味噌、無菌米飯、ジャム、蜂蜜、水産加工品など数多くの高圧処理商品が開発されている。

2) 高圧による細胞内酵素反応の制御

紅茶は、茶葉に撚れを与えて、茶葉の細胞組織を破壊し、葉の中の酸化酵素を含んだ成分を外部に絞り出し、室温 25~26 度、湿度 90% の発酵室に、厚み 4~5cm 程度に広げ 2~3 時間放置することによって、空気に触れさせて酸化発酵を促して形を整えて製造される。この段階で、緑色だった葉が鮮やかな赤銅色になり、紅茶としての芳香を漂わせ始める。この酸化発酵こそが、紅茶の香り、味、コク、水色のベースをつくる重大なカギを握っている。

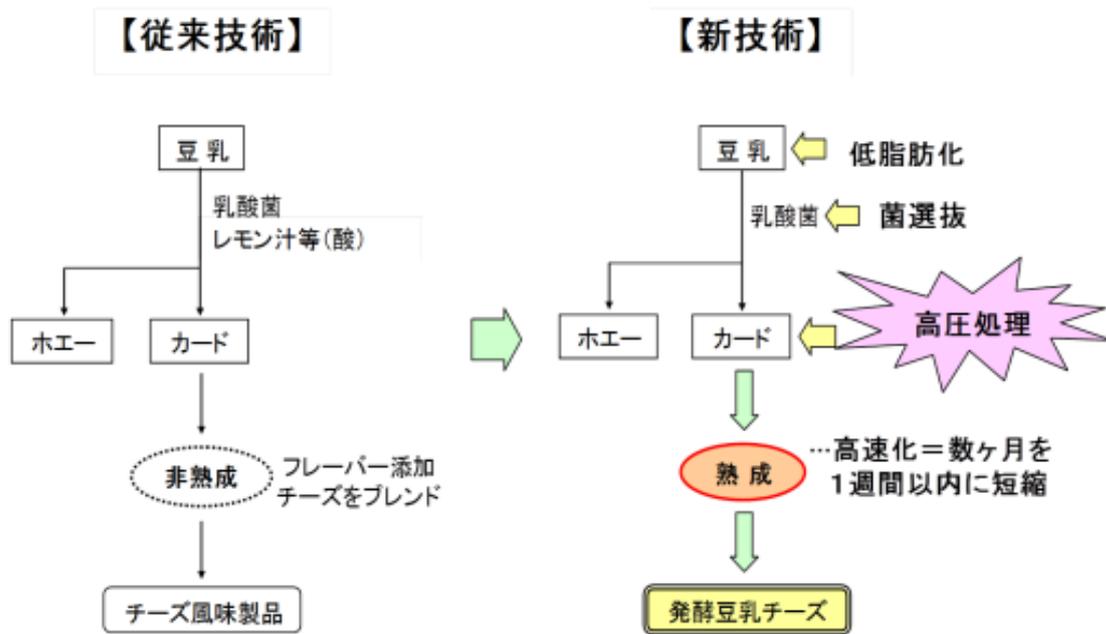
植物は様々な代謝系を持っているが、高度に制御されており、実際に働いているのは一部である。高圧処理という簡便で実用性の高い技術で植物の持つ顕在化していない酵素系を活性化することができれば、高品質な食品素材を取得するための設計基盤の確立につながるであろう。玄米に高圧処理を施した後適度な温度条件で保持すると酵素反応が進行して γ -アミノ酪酸 (GABA) が増えるという結果が報告されている（笹川秋彦ら、圧力処理を利用した GABA 富化玄米の製造とその特徴、日本応用糖質科学会誌, 53, 27-33 (2006)）。研究責任者の藤井は高圧利用の研究を進めていく中で、高圧処理を施したカブを数日間保存すると内部に未知の青色



第 2.3.1-1 図 高圧処理による色素生成（カブ）

色素が生成することを見出した(第2.3.1-1図、S. Ueno, M. Hayashi, T. Shigematsu and T. Fujii, Formation of Green-Blue Compounds in *Brassica rapa* Root by High Pressure Processing and Subsequent Storage, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73(4), 943(2009))。生物素材内では、高圧処理によって細胞組織の損傷と酵素タンパク質の状態変化が起こる。細胞組織の損傷は、生物組織内部の物質移動を促進する。従って、細胞組織は損傷するが酵素タンパク質はそれほど変性しない圧力処理条件を選べば、例えばタンパク質分解酵素によるアミノ酸生成反応が加速されることが期待される。このような考え方は、豆乳カードへの高圧処理による熟成の高速化へも充分応用可能である。

発酵微生物をスターターとして豆乳カードの外表面に塗布して熟成させる方法が広く行われている。しかし、この方法では、発酵微生物由来のプロテアーゼが外表面から内部へ浸透していかなければならないために、熟成が長期間となる。豆乳カード内に発酵微生物を分散させ、分散させた微生物を高圧死滅させることによって、カード内部からプロテアーゼを働かせるプロセスが、本事業で検討した新技術である(第2.3.1-2図)。



第2.3.1-2図 従来技術と新技術

3) 本事業での高圧処理条件

本事業では、高圧処理条件として、350MPa、25°Cを選んだ。この条件は、産業上十分に利用できる条件である。350MPaの圧力処理に要する時間は、昇圧と減圧にそれぞれ約2分であり、これに圧力保持時間を加えた時間となる。1バッチ処理量は固形物で約60kg、液状物ではそれ以上の処理量が望める。一例として米を高圧処理して無菌化包装米飯とする場合には、200MPaで圧力保持2分の設定としており、1サイクルの処理が約6分で60kgの処理を行っている。すなわち、1時間で600kgであり、これから製造される120gの包装米飯は10000食分である。350MPaの圧力設定とした場合での処理効率は変わらない。また、圧力は密閉容器内では半永久的に維持されるため、一度昇圧すれば、その後は特に動力を必要とせずに加圧し続けることができる。よって、高圧処理装置の稼働にかかる電力は、昇圧時に増圧ポンプを稼働する電力のみであり、これから製造される米飯1パックあたりにかかる費用を算出すると1円以下であり、高圧処理は、生産量、製造コストともに十分に採算が取れる範囲の条件である。

2.3.2 高圧処理後の温度条件の選定

ラボレベルでの試験結果をもとに、一連の製造条件を検証し熟成条件を設定するため、大型の高圧装置による実証試験を越後製菓株式会社のご協力により以下の通り実施した。

2.3.2.1 実証試験の方法

以下のポイントを確認するための実証試験をデザインした。

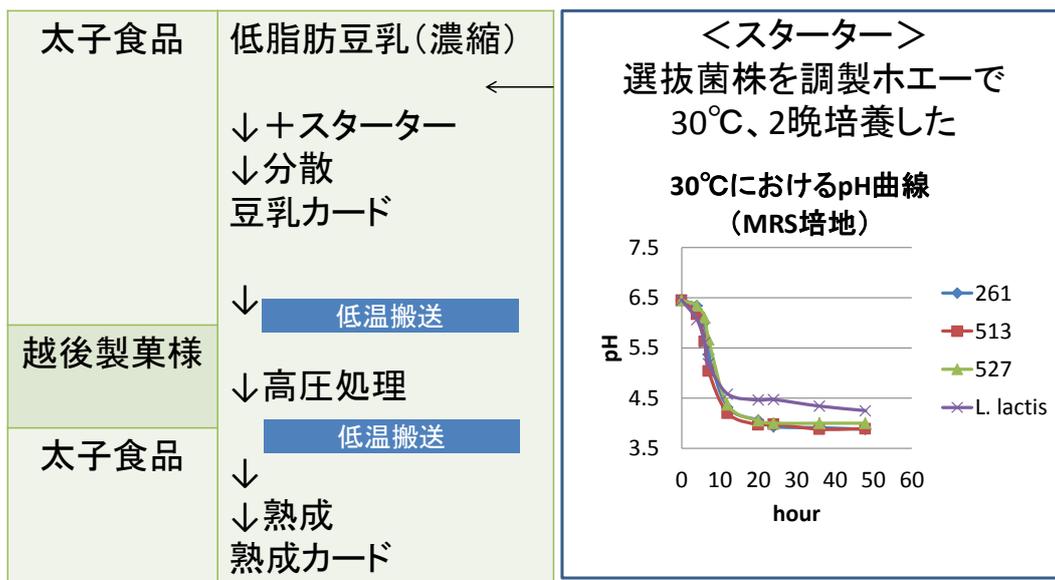
1) 豆乳カード調製法について

乳酸菌を均一に分散させた濃縮低脂肪豆乳を原料として用いることの有効性を検討するために、にがり凝固豆乳カードを対照として試験を行った。

2) 製造プロセス（搬送含む）について

事業化の際、高圧処理を越後製菓株式会社へ委託することを想定し、サンプル搬送を含めた製造プロセスを以下の通りデザインし、試験を行った。

太子食品工業株式会社 古川清水工場（宮城県大崎市）でスターターを接種したサンプルを、赤帽便（冷蔵）で越後製菓株式会社 宮内工場（新潟県長岡市）に搬送し、高圧処理を実施した後宅配便で太子食品工業株式会社へ返送するという一連の製造プロセスの検証を行った（第 2.3.2-1 図）。



第 2.3.2-1 図 製造プロセスのデザイン

3) 熟成の温度条件について

最終選抜した 2 菌株（No.261、No.494）について、高圧処理試験と熟成試験を計画した。2.2.2.2で明らかにした選抜乳酸菌プロテアーゼの触媒特性によれば、No.261 株は中性プロテアーゼ活性と酸性プロテアーゼ活性の双方を有し、No.494 株は中性プロテアーゼ活性を有すると考えられた。そこで、No.261 株は濃縮低脂肪豆乳（pH6.5）での高圧処理に加え、濃縮せず当菌を接種して酸凝固（pH4.5）させた低脂肪豆乳カードへの高圧処理を計画した。No.494 株は濃縮低脂肪豆乳

(pH6.5) での高圧処理のみを計画した。そして熟成温度は、予備試験で圧力処理後菌の再生育が予想されたことと、各プロテアーゼの至適温度を考慮し、No.261 サンプルはいずれも 50℃、No.494 サンプルは 45℃と 60℃で行うこととした（第 2.3.2-1 図）。そして熟成後の評価を行った。

①乳酸菌 No.261

低脂肪豆乳+乳酸菌



濃縮低脂肪豆乳

pH6.5 (red box)

+

乳酸菌



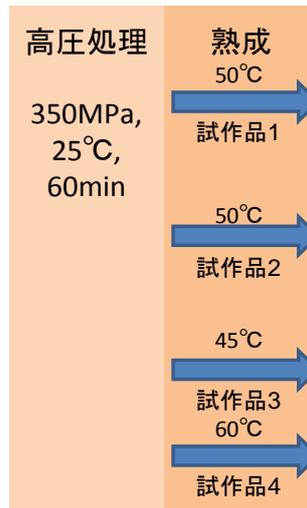
②乳酸菌 No.494

濃縮低脂肪豆乳

pH6.5 (red box)

+

乳酸菌



第 2.3.2-1 図 実証試験（熟成温度条件）の概要

2.3.2.2 実証試験の結果

1) 豆乳カード調製法について

濃縮低脂肪豆乳とにがり凝固豆乳カードに 400MPa、25℃、60 分の高圧処理を施し、20℃、30℃、45℃の 3 温度帯で熟成させた。高圧処理により、ゾル状であった濃縮低脂肪豆乳は弾力のあるゲル状に変化していた（第 2.3.2-2 図）。また、いずれの温度帯においても、にがり凝固より濃縮凝固の豆乳カードの方が、アミノ酸生成量が多いことが確認され、乳酸菌を均一に分散させた濃縮低脂肪豆乳使用の有効性が確認された。



第 2.3.2-2 図 濃縮低脂肪豆乳の高圧処理前後の物性（左：処理前、右：処理後）

2) 製造プロセスについて

搬送中のサンプル温度履歴を、ボタン電池型のデータロガーをセットして記録した。その結果、往復の搬送中のサンプル温度はほぼ 10℃以下が確保され、懸念されたサンプルの pH 低下はほとんどなく、越後製菓株式会社への高圧処理委託の製造プロセスを構築できることが実証された。

3) 熟成の温度条件について

1) 熟成

350MPa、25℃、60 分の条件で高圧処理した後、

試作品 1 : No.261、酸凝固、50℃熟成

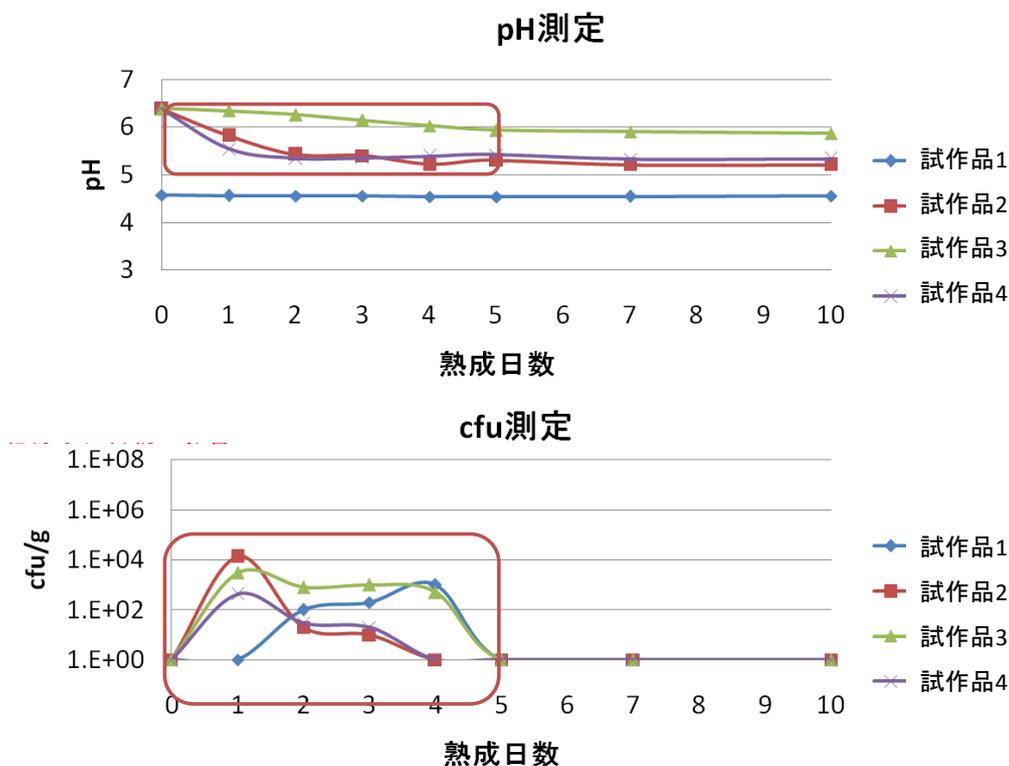
試作品 2 : No.261、濃縮豆乳、50℃熟成

試作品 3 : No.494、濃縮豆乳、45℃熟成

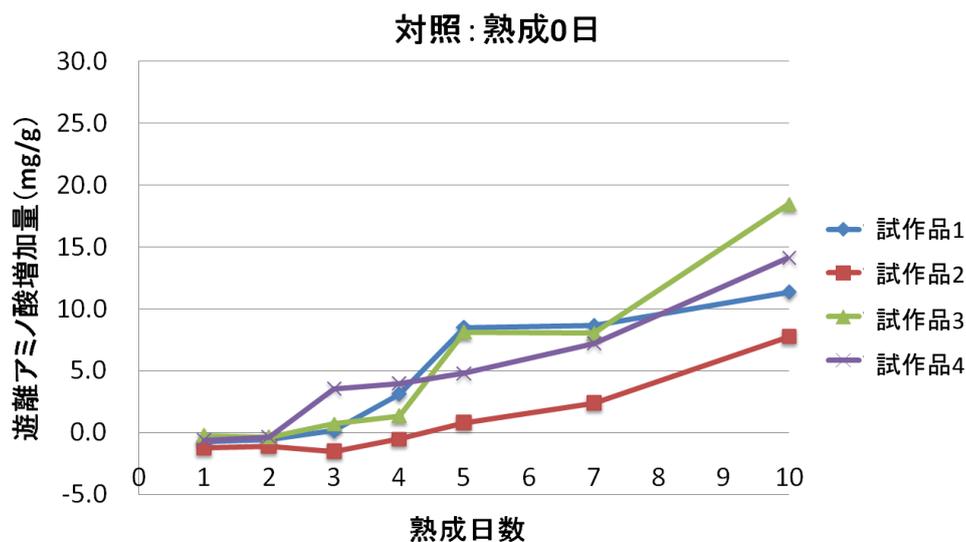
試作品 4 : No.494、濃縮豆乳、60℃熟成

という条件で、pH と菌数の経日変化を追跡した。

若干の菌数増加が観察され、pH 低下も見られた。原因は不明だが、菌数は不安定な挙動を示し、2 日目以降 pH の低下も緩慢であった (第 2.3.2-3 図)。一方、遊離アミノ酸はいずれの試作品も順調に増加した (第 2.3.2-4 図)。



第 2.3.2-3 図 熟成中の pH、菌数 (cfu)

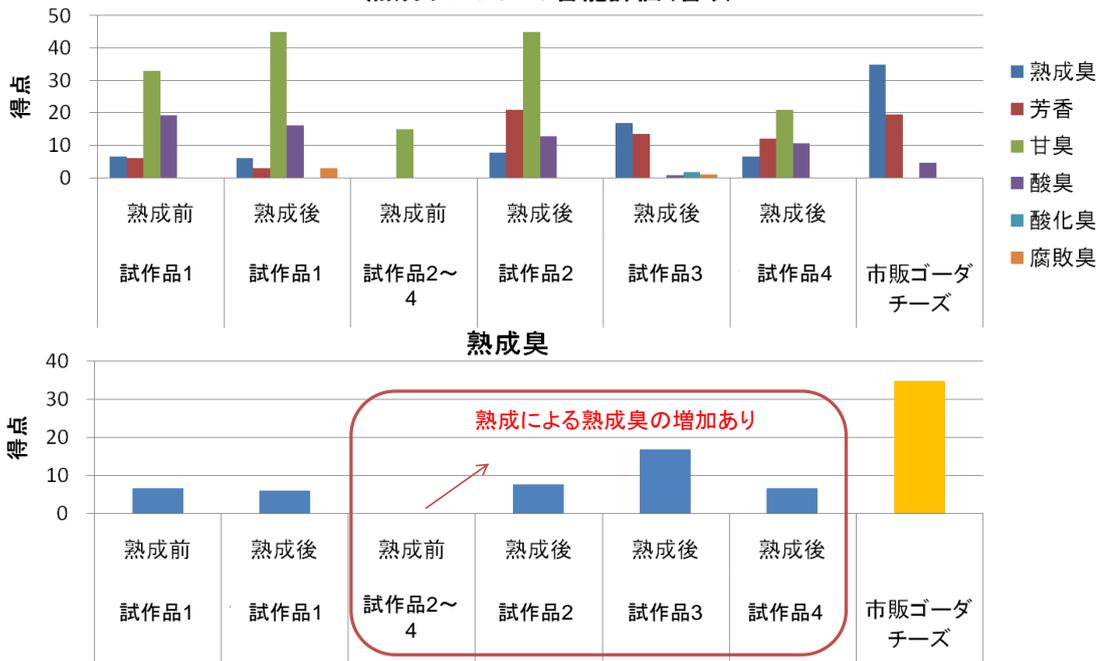


第 2.3.2-4 図 遊離アミノ酸量の変化 (TNBS 法)

2) 官能評価

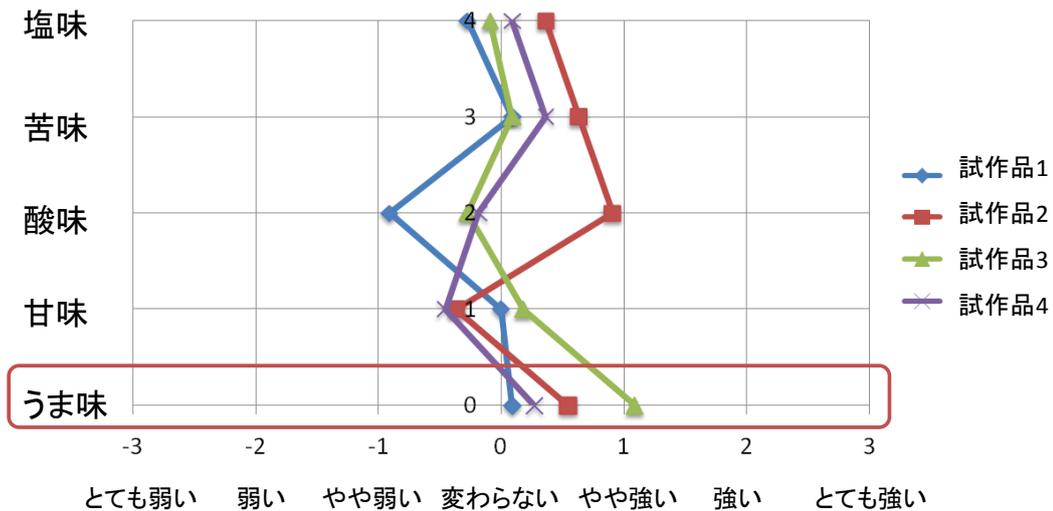
熟成 7 日目の試作品 1~4 の自社スタッフ (n=11) による官能評価を実施した。香りの評価は、2.2.1.2 で記述した方法と同様に行った。結果を第 2.3.2-5 図に示した。また味の評価は、塩味、苦味、酸味、甘味、うま味について熟成前サンプルを対照にしてその強弱を点数化してもらった。結果を第 2.3.2-6 図に示した。以上を総合すると、試作品 3 が、熟成臭が比較的強く、うま味も他試作品より強いという結果となった。また、宮城県産業技術総合センターでの味・香り評価装置を用いた香り評価において、試作品 3 が市販ゴータチーズの香りに近いことが判明した(第 2.3.2-7 図)。

弊社スタッフ(熟練されたパネリスト)で評価、N=11
 熟成サンプルの官能評価(香り)

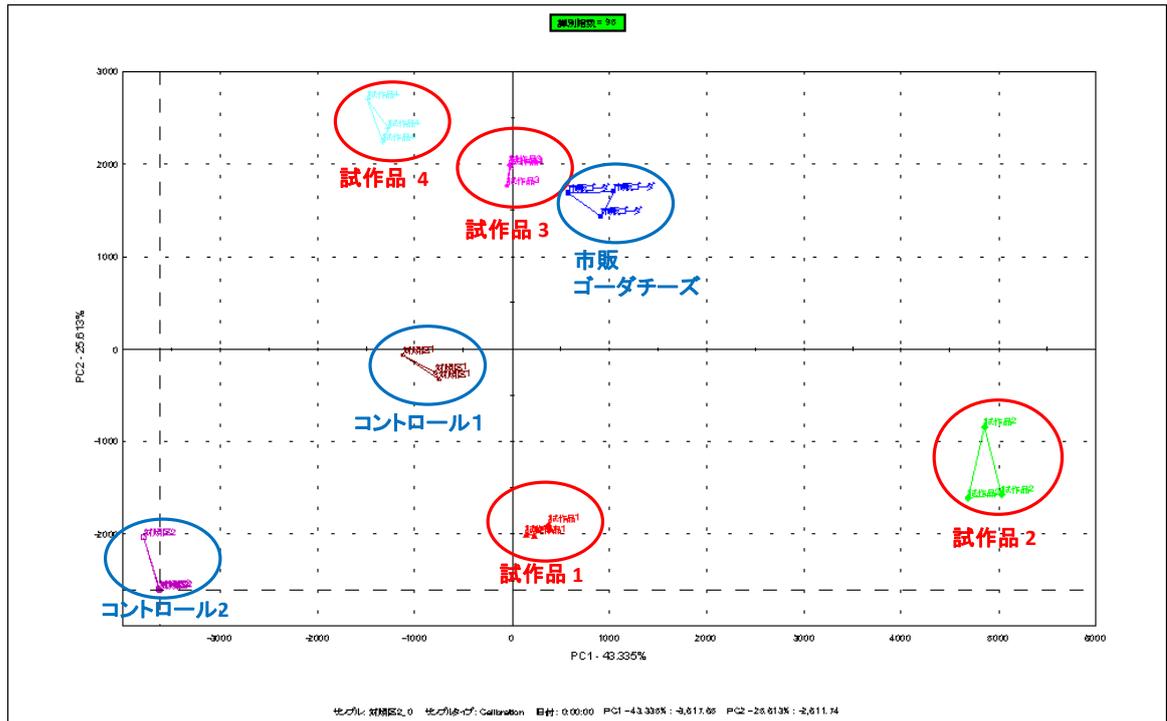


第 2.3.2-5 図 香りの官能評価結果

コントロール(熟成前)のサンプルと比べて、味の強弱を点数化してもらった。
 パネリスト: 弊社スタッフ(熟練されたパネリスト) N=11
 集計: 一人あたりの平均点を算出した



第 2.3.2-6 図 香りの官能評価結果



第 2.3.2-7 図 味・香り評価装置（宮城県産業技術総合センター）による評価

3) 試作品の熟成中の物性変化

a) 実験方法

①試作豆乳チーズの成形

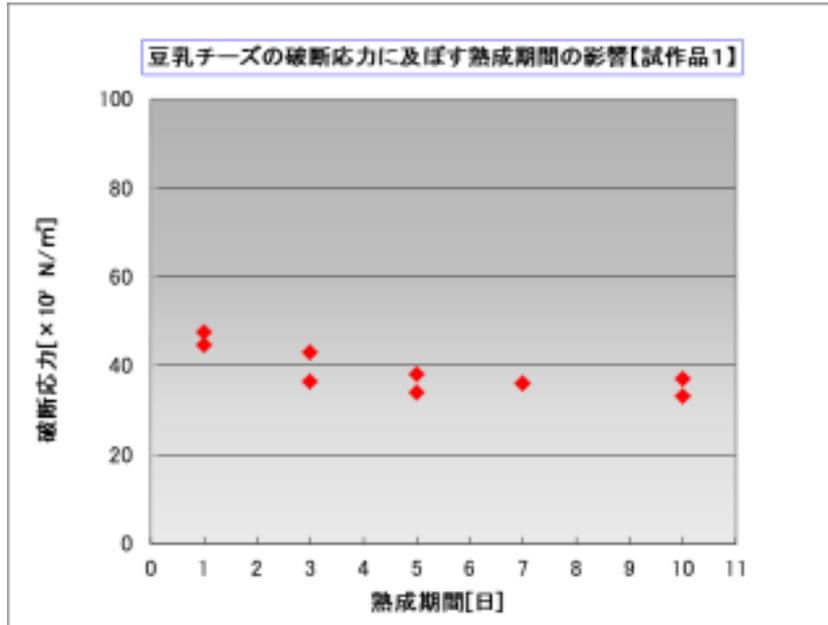
高圧処理後、1、3、5、7、10 日目の試料について、カッターナイフの刃で 10mm の立方体に切断（ただし、上下を切り落として 10mm に達しないものはその厚みを測定）して成形した。

② 圧縮試験

成形した試料を、クリープメーター（山電製、RHEONER II）を用いて、 $\phi 50\text{mm}$ シャーレ中央のせ、圧縮試験を行った。測定温度は 25°C とした。ロードセルは 200N、プランジャーは No.3（16mm ϕ ）を用いた。プランジャーの移動速度を 1 mm/s とし、歪 90%まで圧縮して、応力-歪曲線を測定し、得られた曲線から破断応力、初期弾性率を算出した。

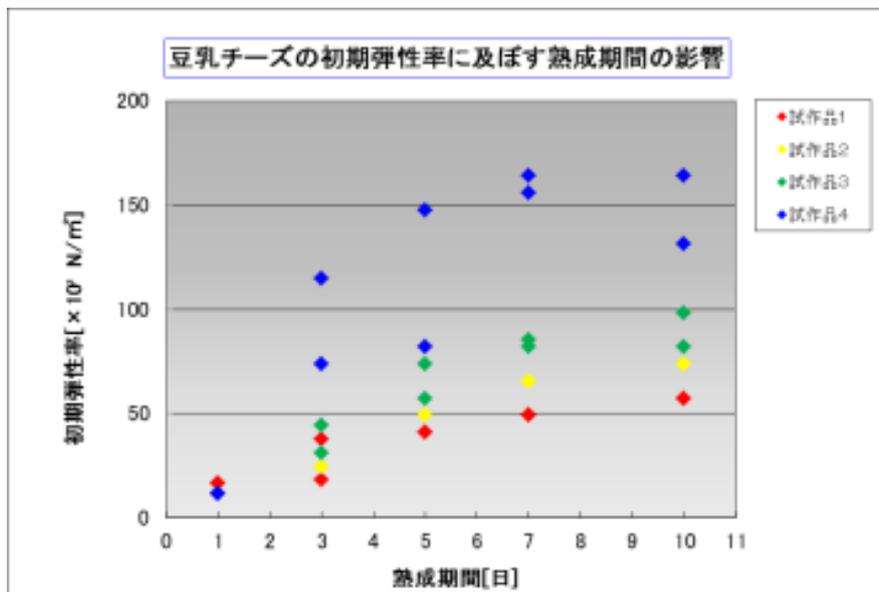
b) 実験結果

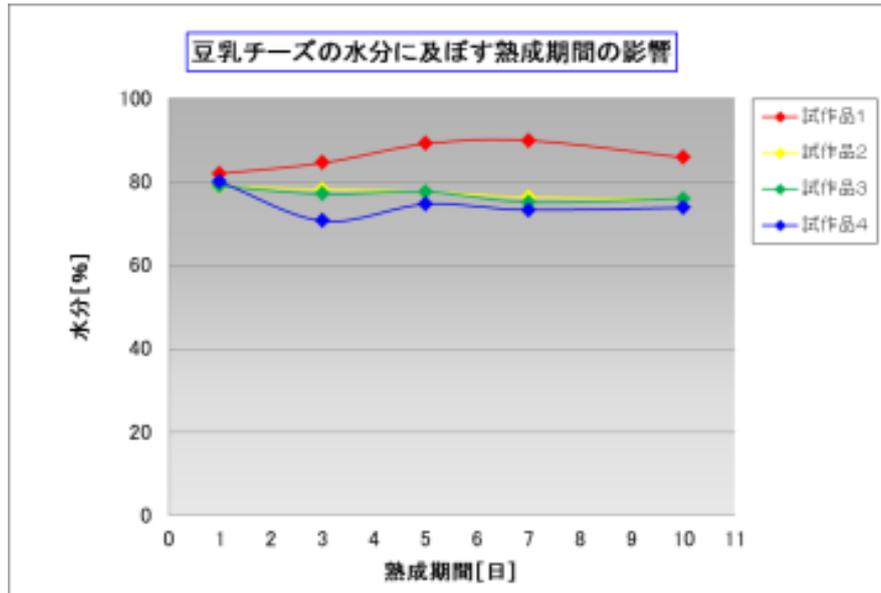
実証試験では、試作したチーズが軟らかく、応力-歪曲線に破断点が認められたのは試作品 1 のみであった。試作品 1 の破断応力は第 2.3.2-8 図に示すように、熟成期間が長くなるにつれて少しずつ減少する傾向が認められ、7 日後以降安定になった。



第 2.3.2-8 図 豆乳チーズの破断応力に及ぼす熟成期間の影響（試作品 1）

試作品 1～4 について、初期弾性率について熟成時間依存性について検討した。いずれの試作品においても、熟成期間が長くなるにつれて初期弾性率は増加した（第 2.3.2-9 図上）。併せて、各試作品の水分の結果を示した（第 2.3.2-9 図下）。水分はほとんど変化していないため、初期弾性率の増加は熟成中にタンパク質間に架橋が生じたためと考えられた。また、7 日後以降はそれほど変化しない傾向が認められた。





第 2.3.2-9 図 豆乳チーズの初期弾性率、水分に及ぼす熟成期間の影響

6) 色の変化

4つの試作品のうち2~4は、熟成温度が高いほど褐変が進行した。試作品1は熟成前と色の変化はなく、pHが低いためと推定された。

7) 試作品評価のまとめと考察

評価結果を以下の表にまとめた。

第 2.3.2-1 表 試作品評価のまとめ

試作品	菌株	カード pH	熟成温度	狙い	結 果	狙いに対する評価
1	No.261	4.5	50℃	酸性プロテアーゼの活性が見込まれる	熟成による遊離アミノ酸増加は有るが、うまみ増加は感じられず。	△
2				中性プロテアーゼの活性が見込まれる	熟成臭在り。pHが低下し、やや酸味強い。中性プロテアーゼ活性が低かった可能性有り。	△
3	No.494	6.5	45℃	中性プロテアーゼの活性が見込まれる	熟成臭在り。遊離アミノ酸、うま味が増加した。ややpH低下有り。	○
4			60℃	中性プロテアーゼの活性が見込まれる	熟成臭在り。pHが低下し、酸味強い。中性プロテアーゼ活性が低かった可能性有り。	△

試作品 1 の酸凝固カードは、熟成臭、うま味の増加が少なかった。遊離アミノ酸量は増加していたことから、酸性プロテアーゼが作用したと考えられるが、風味に影響するに至らなかったと考えられる。

一方、試作品 2~4 の濃縮低脂肪豆乳カードは、熟成臭、うま味が増加した。特に試作品 3 では、pH 低下が小さかったため、中性プロテアーゼが作用し熟成が進んだものと考えられた。

これにより、高圧処理により豆乳カードの熟成高速化が可能であることが確認された。

最終章 全体総括

本事業において、低脂肪豆乳を原料にして高圧処理を行い、7日間で発酵食品を製造するプロセスを確立した。そして、この製造プロセスに適した乳酸菌を選抜して当菌のプロテアーゼをカード内部から作用させることにより、熟成を高速化し、チーズ様風味をもつ製品を試作することができた。製造プロセス上のポイントを以下に要約した。

1. カード調製条件

スターターを分散させやすいカード調製法として、酸凝固法の他に豆乳濃縮法を開発した。濃縮低脂肪豆乳は、pH を下げることなく高圧処理でゲル化することが判明し、チーズらしい弾力のある食感を得ることができた。これにより乳酸菌中性プロテアーゼの作用を発揮させることができた。

2. 乳酸菌と高圧条件

好ましい熟成臭を生成し、高圧処理で死滅しやすい菌株のスクリーニング法を確立し、宮城県産業技術総合センター乳酸菌ストックの中から使用する菌株を選抜した。その結果、350MPa、25℃、60分という実機で対応可能な条件で使用できる菌株を選抜できた。

3. 熟成条件

選抜乳酸菌のプロテアーゼの性質（至適温度、至適 pH）を菌体から超音波破碎抽出して調べ、熟成条件へ反映させた。これにより、熟成中の菌の再増殖の影響がなくプロテアーゼが作用する pH と温度条件を設定することで、熟成を高速化できることを実証した。なお、味・香り評価装置による評価により、試作品の一つが市販ゴータチーズに近い風味を持つことが判明し、熟成臭を指標にした菌株選抜が有効であったことが確認された。

今後の課題として以下のことが上げられる。

1. 事業化に向けての製造プロセスの最適化
 - ・プロテアーゼ活性を活かせる、より効率的な熟成条件の検討
 - ・低脂肪濃縮豆乳の効率的調製方法の検討
 - ・豆乳品種およびその製造条件の影響把握
2. 確立した開発手法を用いてさらなる有効な微生物の取得
 - ・消費者が求める風味の豆乳チーズの開発

本事業終了後2年間程度（平成25～26年度）は上記課題を解決するための補完研究に取り組む。また、並行して事業化に向けた検討を進める。商品の構成としては、業務用・外食用商品および一般消費者向け商品を想定しており、チーズの市場価格を参考に事業性を検証していく。業務用・外食用商品については株式会社菓匠三全等県内の川下企業のアドバイスを受けながら商品設計・評価を進める。事業化当初は越後製菓株式会社への高圧処理委託、熟成は太子食品工業株式会社の納豆の発酵室と温度帯が近いいため、これをベースにコスト試算を行う。

市場規模と生産高から推定したナチュラルチーズの販売価格が平均900円/kg程度であることを考慮すれば、決して事業化が不可能ではないコスト構造になると期待されるが、いずれにしてもテスト販売により販売価格の妥当性と採算性を検証していく予定である。