

## ノート

## 細菌学的方法によるプロセスチーズとナチュラルチーズの判別について

宮崎 千秋\*

## 1. 緒 言

わが国におけるチーズの需要量は近年著しく伸びており、国内生産量をはるかに超過している。乳製品の生産量が低いわが国では、この不足分をヨーロッパ諸国、アメリカ、オーストラリア、ニュージーランドなどから輸入しているのが実情である。

ところで、関税率表 04・04 に分類される輸入チーズは「1 プロセスチーズ、2 その他のもの」となっており、プロセスチーズとその他のチーズとでは、関税率及び輸入公表上の取扱いを異にする。したがって、プロセスチーズとその他のチーズのうちいわゆるナチュラルチーズとの判別が必要とされ、この判別については主として化学分析による方法が行なわれてきたが、商品によっては両者の化学的組成が類似しており、これのみでは判別が充分ではない。そこで近年ようやく細菌学的方法<sup>1)</sup>が応用されるようになったが、いまだに充分な細菌学的判別法は確立されておらず、検討の余地が多い。

一般にナチュラルチーズでは製造行程において殺菌乳に乳酸菌スターターを加えたのち熟成過程を終えて市販される<sup>2)</sup>のに対し、プロセスチーズは2種以上のナチュラルチーズを68～71℃に加熱溶融し、乳化剤を加え、成形し、衛生的に包装し、市販されている<sup>2)</sup>。したがって、両チーズの製造工程の相違が製品中のマイクロフローラに差異を生ずるものと予測されるので、この点に着目し、本研究では細菌学的判別法を確立するための一助として、種々の乳酸菌測定用の培地を用いて各種チーズ中の乳酸菌の存在数を測定し、最適な乳酸菌の計数法を確立するとともにマイクロフローラについて検討した。

## 2. 実験方法

## 2・1 試料

実験に用いた材料は、プロセスチーズ5種（オーストラリア産チェダーチーズ、アメリカ産スモークチーズ、クラフトチーズ、国産エンメンタルチーズ、チェダーチーズ）及びナチュラルチーズ7種（オーストラリア産ゴーダチーズ、ファターチーズ、オランダ産ルゴソンチーズ、エダムチーズ、デンマーク産マリボフィレットチーズ、カマンベルチーズ、国産エダムチーズ）である。

## 2・2 乳酸菌の計数、分離

乳酸菌の分離、計数用培地としては既往の培地<sup>3)~6)</sup>及び一部それを改変して用いた。それらの培地組成を Tab - le 1 に示す。

オーストラリア産ゴーダチーズ 10g を 90ml の滅菌生理的食塩水に入れ、よく振り混ぜて均一に懸濁させ、これを順次 10 倍希釈する。各希釈液 1 ml ずつを上記各培地に注入してよく混和しペトリ皿を用いて平板培養し、30℃で3日間保った後、発生した集落でハローを持つもの（ハローが現れない培地においては紡錘形黄白色の集落）を計数し、試料 1g 当たりの乳酸菌数を算出した。更に、集落の回りに発生したハローの大きさを測定し、ハローが明りょうか、不明りょうであるか（ハローの現れない培地においては集落の大きさ）を観察し、乳酸菌の判定の難易を比較した。

なお、後述の結果から最適と考えられる No.4 の培地を用いて、各種チーズ中の乳酸菌数を測定した。

## 2・3 乳酸菌の菌学的諸性質

## 2・3・1 形態的性質

分離菌株をブリックス寒天培地に 35℃で一定日数培養した後、常法により細菌の大きさ、形状、孢子形成の有無、グラム染色性及び運動性の有無を観察した。

## 2・3・2 培養的性質

分離菌株をブリックス寒天高層培地に穿刺し、35℃で

\* 門司税関分析室 北九州市門司区西海岸 1 丁目

Table 1 The composition of culture media tested for isolation and enumeration of lactic acid bacteria in cheese

| Medium No. | Composition of medium  | Remarks   |
|------------|--|---|
| 1.         | Yeast extract 2.5g, peptone 5g, dextrose 1g, agar 15g, distilled water 1000ml, pH 6.8-7.0  | B.C.P. plate count <sup>3)</sup> agar   |
| 2.         | B.C.P. plate count agar + CaCO <sub>3</sub> 0.5-1.0%   | Modified B.C.P. plate count agar  |
| 3.         | Tomato juice 400ml, neopeptone 15g, dextrose 20g, NaCl 5g, Tween80 1g, yeast extract 6g, soluble starch 0.5g, agar 15g, distilled water 1000ml, pH 6.0 ±0.1  | Brigg's tomato juice <sup>4)</sup> agar   |
| 4.         | Brigg's tomato juice agar + CaCO <sub>3</sub> 0.5-1.0%, brom-cresol purple (1.6% alcohol soln.) 2ml, distilled water 1000ml, pH 6.0  | Modified Brigg's tomato juice agar  |
| 5.         | V <sub>8</sub> -vegetable juice 500ml, sorbitose or biosate 10g, lactose 5g, beef extract 3g, agar 15g, bromcresol green 0.1g, distilled water 1000ml, pH 5.7  | V <sub>8</sub> -vegetable juice <sup>5)</sup> agar                                |
| 6.         | V <sub>8</sub> -vegetable juice agar + CaCO <sub>3</sub> 0.5-1.0%  | Modified V <sub>8</sub> -vegetable juice agar                                     |
| 7.         | Tomato juice 300ml, yeast extract 5g, dextrose 0.5g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5g, distilled water 1000ml, CaCO <sub>3</sub> 5-10g, agar 15g, bromcresol purple (1.6% alcohol soln.) 2ml, pH 7.0 | Wade's medium (tomato <sup>6)</sup> juice-yeast extract calcium carbonate medium) |

3日間保った後、発育の状態を観察した。更に、分離菌株の主な10菌株をゼラチン培地（ペプトン10g、酵母エキス5g、ゼラチン100g、蒸留水1000ml pH7.0）に穿刺し、20℃で7日間保った後、培養の状態を観察した。

### 2・3・3 生理的性質

供試菌株について硝酸塩の還元性の有無、インドール生成の有無、オキシダーゼ試験、V-Pテスト、リジン分解性の有無、ウレアーゼ試験及び発酵の形式について、それぞれ定法により調べた。

### 2・4 発育に及ぼす温度の影響

液体培地（グルコース5g、ペプトン10g、酵母エキス5g、りん酸2水素カリウム0.5g、りん酸水素カリウム0.5g、蒸留水1000ml、pH6.8）5mlに各菌株の1白金耳量を取り均一に懸濁させ、その1滴を5mlの同培地に接種し10、20、35及び45℃の各温度に5日間保ったのち細菌の発育状態を観察した。

### 2・5 耐塩性試験

トリプトース（Difco）1%及び酵母エキス0.5%に塩化ナトリウムを加えて、それぞれ2%、4%、及び6.5%の食塩濃度になるように調製した液体培地を用いて、2・4の方法と同様にして発育に及ぼす食塩濃度の影響について観察した。

なお、供試細菌の分類は上述の菌学的諸性質を観察し、Bergey's Manual 7th ed. <sup>7)</sup>によって行なった。

## 3. 実験結果及び考察

### 3・1 各培地組成による乳酸菌の出現状態

Table 2 Numbers of lactic acid bacteria by the pour plate method using various media from 1g of the same sample(Goda cheese)

| Medium No. | Number of lactic acid bacteria cells/g | Diameter of halo mm. | Difficulty of easy in detecting halo |
|------------|--|----------------------|--------------------------------------|
| 1          | 2.8X10 <sup>7</sup>                    | 2-5                  | slightly difficult                   |
| 2          | 6.2X10 <sup>6</sup>                    | 2-5                  | slightly difficult                   |
| 3          | 1.2X10 <sup>7</sup>                    | none                 | ————                                 |
| 4          | 2.7X10 <sup>7</sup>                    | 2-10                 | easy                                 |
| 5          | 2.2X10 <sup>6</sup>                    | 5-10                 | slightly difficult                   |
| 6          | 6.0X10 <sup>6</sup>                    | 2-8                  | slightly difficult                   |
| 7          | 1.7X10 <sup>6</sup>                    | 5-10                 | easy                                 |

各種培地組成による乳酸菌の出現状態をTable 2に示す。Table 2から試料中の乳酸菌の存在数は10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>であり、このうち比較的出現数が多い培地はNo.1、3、4及び7である。そのうちNo.4及びNo.7は炭酸カルシウムの溶解環あるいは指示薬変色域が大であり、特にNo.4は市販のブリックス寒天培地から調製できるので、手数もかからずチーズ中の乳酸菌の計数用の培地として最適であると考えられる。したがって、各種チーズ中の乳酸菌の分離、計数には本培地を使用した。

### 3・2 各種チーズ中の乳酸菌数

上記No.4の培地を用いて各種チーズの乳酸菌数を測定した結果をTable 3に示す。

Table 3からナチュラルチーズではかびにより熟成され、かん詰にされたカマンベルチーズを除いて10<sup>4</sup>~10<sup>7</sup> cells/gの乳酸菌が存在し、大半が10<sup>6</sup> cells/g以上であるのに対して、プロセスチーズでは、10<sup>3</sup> cells/g以下であり、両者の乳酸菌数に明らかな相違がみられた。

したがって、この方法による乳酸菌数の測定は、両者

Table 3 Numbers of lactic acid bacteria in processed and natural cheese

|                  | Commercial name of cheese (origin)   |                   |
|------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Processed cheese | Cheddar cheese processed (Australia) | $1.0 \times 10^3$ |
|                  | Process cheese kraft (U.S.A.)        | $4.9 \times 10^3$ |
|                  | Smoked process cheese (U.S.A.)       | $3.0 \times 10^2$ |
|                  | Emmental cheese (Japan)              | 0                 |
|                  | Cheddar cheese (Japan)               | $2.0 \times 10^2$ |
| Natural cheese   | Natural Gouda cheese (Australia)     | $1.7 \times 10^7$ |
|                  | Fatta cheese (Australia)             | $3.0 \times 10^6$ |
|                  | Lugozon cheese (Netherlands)         | $7.0 \times 10^6$ |
|                  | Natural Edam cheese (Netherlands)    | $4.5 \times 10^6$ |
|                  | Maribo Fillet cheese (Denmark)       | $1.6 \times 10^6$ |
|                  | Natural Edam cheese (Japan)          | $4.3 \times 10^4$ |
|                  | Camembert cheese (canned) (Denmark)  | 0                 |

の判別にきわめて有効であると考えられる。

### 3・3 チーズ中のマイクロフローラについて

オーストラリア産ゴダチーズ、オランダ産ルゴゾンチーズ、デンマーク産マリボフィレットチーズからそれぞれ14菌株、21菌株、36菌株の計71菌株を純粋分離し、菌学的諸性質の差異により、3グループに分けた。その結果をTable4に示す。Table4からBergey's Manual 7th ed.によれば、これらはすべて *Lactobacteriae* 科に属し、そのうちグループ1は *Lactobacillus* 属、グループ2は *Streptococcus* 属、グループ3は *Diprococcus* 属あるいは *Pediococcus* 属と認められる。

Table4 Grouping of the isolates basing upon the difference in the morphological characteristics

|                      | Group 1                             | Group 2                           | Group 3                           |
|----------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Form and arrangement | rods singly, in pairs and in chains | streptococci short or long chains | diprococci in pairs often tetrads |
| Size ( $\mu$ )       | (2-5) x (0.8-1.0)                   | 0.8-1.5                           | 0.5-1.0                           |
| Gram stain           | positive                            | positive                          | positive                          |
| Spore                | none                                | none                              | none                              |
| Motility             | none motile                         | none motile                       | none motile                       |
| Catalase             | negative                            | negative                          | negative                          |
| Agar stroke          |                                     |                                   |                                   |
| Form of growth       | filiform or moderate                | beaded                            | beaded                            |
| Pigment              | white or slightly yellowish         |                                   | white                             |
| Agar colonies        | spindle                             | or punctiform                     |                                   |
| Agar stab            |                                     | papillate                         |                                   |

また、それぞれ代表菌株としてグループ1から4菌株、グループ2から2菌株、グループ3から4菌株を選び、種名を同定した。その結果をTable5に示す。供試菌株はすべてグルコースを発酵するが、いずれもガスを発生しないことからホモ発酵型乳酸菌と認められる。

Bergey's Manual 7th ed.<sup>7)</sup>によれば、分離菌株No.1、3及び4は、グルコース、マルトース、マンニトールから酸を生成するが、シュクロースからは生成しない。また、発育温度は適温が30前後で最高発育温度が37~40であることなどから、*Lactobacillus casei*又はこれと近縁種であると思われる。No.2は、適温が40前後であること、グルコース、マルトース、ラクトース及びシュクロースから酸を生成することなどから、*Lactobacillus Lactis*であると考えられる。No.5は、10でも発育するが45では発育しない。更に、塩化ナトリウムでは発育が認められないこと及びシュクロースを発酵しないことなどから、*Streptococcus cremoris*と考えられる。No.6は発育適温が30前後であり、40及び10では発育が認められないこと、4%塩化ナトリウムの存在下では発育するが6.5%塩化ナトリウムの存在下では発育が認められないことなどから、*Streptococcus agalactiae*、又はこれと近縁種と考えられる。No.7は *Pediococcus* 属のある菌種と推定され、No.8及び9は、*Pediococcus acidilactici* 又はこれの近縁種と考えられる。また、No.10は発酵性が強く、シュクロースを発酵し、発育適温が35~45であることなどから *Diprococcus penumoniae* か、又はその近縁種であろう。

各チーズから分離した乳酸菌を3グループに分け、グループ別の存在割合を示せばTable6のとおりである。

ナチュラルチーズの熟成に関与する乳酸菌については必ずしも最初スターターとして加えられた乳酸菌が熟成を終えても存在し続けるとは限らず、むしろ熟成過程においては、場合によっては数種の乳酸菌が作用することが知られている。<sup>8)</sup>したがって、上記菌種がスターターと同種であるか否かは判定できないが、いずれかの形で熟成に関与していると考えられる。しかも、チーズによってそれぞれ乳酸菌種又はその存在割合を異にすることは興味深い。

プロセスチーズにおいては、乳酸菌計数の際、いずれのチーズからも培養的性質を酷似するたんぱく質分解細菌(運動性を有し、カタラーゼを有するかん菌)が乳酸菌と同オーダーないし1桁低次のオーダーで認められた。これはいずれのナチュラルチーズにも認められなかった。このことはプロセスチーズ中のたんぱく分解細菌の乳酸菌に対する存在比率がナチュラルチーズに比べて非常に高いことを示唆している。

Table 5 Morphological and biochemical characteristics of isolates  
(Cram : positive , catalase : negative , none spore forming)

| Number of Group | Source         | Number of isolates | V-P test | Growth from sodium citrate | Indole production | Nitrite production | Urease | (Acid) Glucose (Gas) fermentation | (Acid) Lactose (Gas) fermentation | Sucrose fermentation | Maltose fermentation | Mannitol fermentation | IPA test | Lysine fermentation | Gelatine liquefaction | Growth at 10℃ | Growth at 20℃ | Growth at 35℃ | Growth at 45℃ | Growth in 2 % NaCl | Growth in 4 % NaCl | Growth in 6.5% NaCl |
|-----------------|----------------|--------------------|----------|----------------------------|-------------------|--------------------|--------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------|---------------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Group 1         | Maribo Fillet  | 1                  | -        | -                          | -                 | +                  | -      | +                                 | -                                 | +                    | -                    | ±                     | ±        | -                   | -                     | none          | -             | +             | #             | -                  | +                  | -                   |
|                 | "              | 2                  | +        | -                          | -                 | ±                  | -      | +                                 | -                                 | +                    | +                    | ±                     | ±        | -                   | -                     | none          | -             | -             | #             | ±                  | ±                  | -                   |
|                 | Gouda cheese   | 3                  | -        | -                          | -                 | ±                  | +      | +                                 | -                                 | +                    | -                    | ±                     | ±        | -                   | -                     | none          | -             | +             | #             | -                  | +                  | -                   |
|                 | "              | 4                  | +        | -                          | -                 | ±                  | -      | +                                 | -                                 | +                    | -                    | +                     | +        | -                   | -                     | none          | -             | +             | #             | -                  | -                  | -                   |
| Group 2         | "              | 5                  | +        | -                          | -                 | ±                  | -      | +                                 | -                                 | +                    | -                    | ±                     | +        | -                   | -                     | none          | +             | +             | #             | -                  | ±                  | -                   |
|                 | Maribo Fillet  | 6                  | -        | -                          | -                 | ±                  | -      | +                                 | -                                 | +                    | +                    | ±                     | -        | -                   | -                     | none          | -             | #             | #             | ±                  | +                  | -                   |
|                 | "              | 7                  | +        | -                          | -                 | ±                  | -      | +                                 | -                                 | +                    | -                    | ±                     | ±        | -                   | -                     | none          | ±             | +             | #             | -                  | ±                  | -                   |
| Group 3         | Lugozon cheese | 8                  | -        | -                          | -                 | ±                  | -      | +                                 | -                                 | +                    | -                    | -                     | -        | -                   | -                     | none          | ±             | ±             | #             | #                  | #                  | ±                   |
|                 | "              | 9                  | -        | -                          | -                 | ±                  | -      | +                                 | -                                 | +                    | -                    | -                     | -        | -                   | -                     | none          | -             | -             | #             | #                  | #                  | ±                   |
|                 | "              | 10                 | -        | -                          | -                 | +                  | -      | +                                 | -                                 | +                    | +                    | ±                     | -        | -                   | -                     | none          | -             | ±             | #             | #                  | #                  | ±                   |

Table6 Cheese occurrence of each group in natural

| Name of cheese       | Total | Group 1  | Group 2 | Group 3   |
|----------------------|-------|----------|---------|-----------|
| Gouda cheese         | 14    | 11 (80%) | 3 (20%) | 0         |
| Lugozon cheese       | 21    | 0        | 0       | 21 (100%) |
| Maribo Fillet cheese | 36    | 20 (56%) | 5 (14%) | 11 (40%)  |

以上により両チーズのマイクロフローラの構成には明らかな差異が認められ、また、ナチュラルチーズ間においてもその構成に差異があることが判明した。更に、数種のチーズ中のマイクロフローラは、構成菌種が異なっており、このことからチーズの種類又は産地の判別に応用できると考えられる。

しかしながら、実験に供した材料が少ないので明らかな結論を得るためには更に多くの材料について検討する必要がある。なお、ナチュラルチーズは、プロセスチーズに比べて香りが強いことなどから、香氣成分の分析から両者の判別も可能と考えられるので、この点からも検討を加えてみたい。

#### 4. 総 括

プロセスチーズとナチュラルチーズの細菌学的判別法について検討し、次の結果を得た。

1. チーズ中の乳酸菌の計数、分離法としては、ブリックス寒天改変培地を用いる混和平板法が最適である。

2. プロセスチーズとナチュラルチーズ中の乳酸菌数には明らかに差異が認められるので、乳酸菌数の測定は両者の判別にきわめて有効であると考えられる。

3. 数種のチーズ中のマイクロフローラは、構成菌種が異なっておりこのことからチーズの種類又は産地の判別に応用できると考えられる。

終りに、本稿のご校閲を賜った水産大学校藤沢浩明教授に謹んで感謝の意を表します。実験にあたり、有益などご教示をいただいた同校村上正忠講師及び関税中央分析所出来三男主任分析官に深謝します。

(本研究は昭和 46 年 3 月、第 7 回税関分析研究所発表会において講演した。)

## 文 献

- 1) 出来三男：本誌 7, 25 (1968) .
- 2) 佐々木林治郎：“乳製品ハンドブック”，P. 376～388，朝倉書店 (1970) .
- 3) 春田三佐夫：日獣会誌，**12**，60 (1959) .
- 4) Briggs： *J. Gen. Microbiol.*，**9**，234 (1953) .
- 5) Fabian，Fulde，Merrick： *Food Reserch*，**18**，280 (1953) .
- 6) Wade，Smiley，Boruff.： *J. Bact.*，**51**，787 (1946) .
- 7) D. H. Bergey et. al.： “Manual of Determinative Bacteriology” 7th ed. Baltimore (1957) .
- 8) “微生物学ハンドブック” P，705，技報堂 (1957) .

**Distinction between Processed Cheese and Natural Cheese by Microbiological Method**

Chiaki MIYAZAKI

Moji Customs Laboratory，1-14，Nishikaigan，Kitakyusyu-shi，Fukuoka-ken，Japan

Received Sept. 29, 1972