

カマンベールチーズの熟成中における 軟化と塩類の動態

片岡 啓・額田 和敬^{a)}・木村 玉青^{b)}・米屋 武文^{c)}・宮本 拓
(生産物利用学講座)

Softening and Salts Movement in the Ripening Process of Camembert Cheese

Kei Kataoka, Kazutaka Nukada^{a)}, Tamao Kimura^{b)}
Takefumi Yoneya^{c)} and Taku Miyamoto
(Department of Agricultural Products Technology)

Experimental Camembert cheese softened from the surface to the center portion after 3-4 weeks of ripening. As ripening progressed, pH value rose from 4.5 to 7.8, lactic acid content decreased from 1.0% to 0.1%, ammonia content increased from 0.04 g to 0.063 g/100 g, calcium content decreased from 0.3 g to 0.048 g/100 g and phosphorus content decreased from 0.25 g to 0.12 g/100 g in the center portion of cheese. The changes in these values were considered as criteria leading to softening of mold surface-ripened cheeses.

Mold starter *Penicillium candidum* AM used for the cheese manufacture possesses the abilities of metabolizing lactic acid, producing ammonia and lowering pH when supplemented with lactic acid and peptone Czapek Dox solution. However, normal softening was not observed by incubation of green cheese under ammonia atmosphere conditions. Also, lactic acid free cheese did not soften in spite of mold growth. It is proposed that the primary factor of softening in mold surface-ripened cheese is a rise of casein solubility caused by the lowering of calcium crosslinking due to a decrease of the calcium level in the cheese texture. The results suggested that lactic acid metabolism and pH rise play a main part in inducement, and that insoluble calcium phosphate accumulates in the cheese surface.

Key words : Camembert cheese, Cheese ripening, Cheese softening, Salts distribution

緒 言

代表的かび表面熟成の軟質チーズであるカマンベールチーズは滑らかな組織と温和な風味を有し、我々日本人の嗜好に適し、製造法も簡便なために全国各地で特産品として製造され、その生産量も順調な伸びを続けている。熟成期間はおよそ4週間と短く、その間チーズは表面から中心部に向かって急速に軟化が進み特有の滑らかな組織が形成される。そのために製品寿命は短く、品質に差が生ずることにもなる。

かび表面熟成チーズの熟成中における軟化の主因は、旧来かびスターター *Penicillium candidum* や酵母などの^{1,2)}、また原料乳由来のプラスミン³⁾あるいは凝乳酵素レンネット⁴⁾などの蛋白分解酵素によるチーズ中カゼインの加水分解によってもたらされると考えられていた。しかし近年、本チーズの軟化要因

Received Octobre 1, 1998

a) 現在, 岡山県真庭地方振興局

b) 現在, ケンコーマヨネーズ株式会社

c) 静岡県立大学短期大学部

としてかび・酵母などの表面微生物による乳酸の代謝^{5,6)}とアンモニアの生成に伴うpHのアルカリ側への移行^{7,8)}, それに連動したカルシウムおよびリン酸のチーズ表面への移行・蓄積⁹⁾が報告されており, これらが軟化の主因であるとの説が有力視されている⁸⁾. かかる観点から, 本研究はカマンベールチーズにおいてそれらの現象を再確認するとともに, 熟成軟化に至る成分的变化を明確にし, 本チーズ製造法あるいは保蔵法の改善に資することを期待して行ったものである.

材料と方法

チーズの製造法

チーズは岡山県畜産センターの施設で製造した. 乳酸菌スターターは Hansen 社の CH Normal-01 (*Lc.lactis* subsp.*lactis*, *Lc.lactis* subsp.*cremoris*, *Lc.lactis* subsp.*lactis* var. *diacetylactis*, *Leuc.lactis* subsp.*cremoris*), かびスターターは Wiesby 社の *Penicillium candidum* AM を用いた. 熟成開始1週間後にかびの過剰増殖を抑制するためにアルミ箔で包装し, 15°C で計4週間熟成させた. 比較のため乳酸菌スターターを用いず, グルコノ- δ -ラクトン(0.08%)とペニシリンGカリウム(2,000 U/kg牛乳)を用いて同一製造法による乳酸を含まないチーズを調製した.

チーズ試料の採取法

チーズの部位別成分組成を比較するために, Fig. 1 に示すように, チーズの中心部を1cm幅で垂直に切断し, 更にそれを上下左右に3等分し, 角, 表面および中心部の3ヶ所を採取して分析に供した. 分析

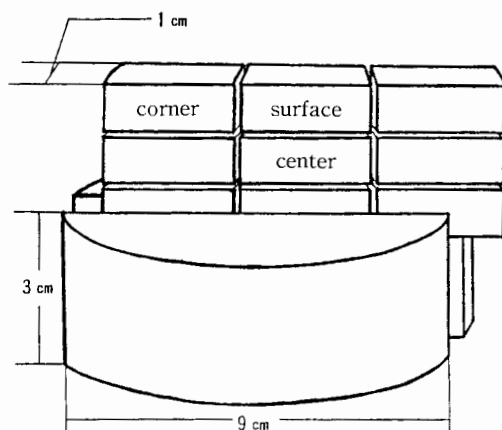


Fig. 1 Sampling method of cheese.

はフープに充填した直後のグリーンチーズと熟成後1, 2, 3および4週目のチーズで行った.

pHの測定法

チーズ2 gを秤取し, 少量の温湯を加えて十分に乳化分散させ放冷後20mlに定容し, ガラス電極pHメーターで測定した¹⁰⁾.

乳酸の測定法

酵素法(ベーリンガーマンハイム山之内株式会社)により測定した. 上記供試液10mlを100mlメスフラスコに取り, 80mlの蒸留水を加え60°Cで攪拌乳化し, 室温に冷却し浮上する脂肪層を除去して定容の後, ろ液を希釈して分析に供した.

アンモニアの測定法

酵素法(ベーリンガーマンハイム山之内製薬株式会社)により測定した. 上記と同じろ過試料1mlに0.3M TCA 4mlを混和し, 5分後遠心分離(4,000 rpm, 3 min)し, 上澄液4mlを10M KOHで中和し希釈して分析に供した.

カルシウムおよびリンの測定法

チーズ試料を550°Cで乾式灰化後, 希塩酸で溶解希釈してカルシウムは原子吸光法¹¹⁾, リンはモリブデンブルー比色法¹²⁾により測定した.

チーズの熟成状態表示法

チーズの中央部を垂直に切断し, その断面における状態から非熟成層, 熟成層および両者の中間に位置する半熟成層(黄変・軟膏様)に区分し, 各層の面積比(%)で表示した.

チーズ硬度の測定法

熟成0~4週目のチーズ試料(角, 表面, 中心の3部位)の硬度をレオメーター(サン科学CR-200-D)で測定した. 測定条件は試料温度15°C, 直径5mmの円盤状アダプターが試料に侵入するときの最大荷重(g)として表した.

Pen.candidum培養試験

DL-乳酸1.30%とペプトン1.00%を添加したショ糖含有および不含 Czapek-Dox 液体培地に *Pen.candidum* AM を接種し25°Cで10日培養し, その間経時的にpH, L-乳酸およびアンモニア含量の測定法を行った. 各々の測定法は前項のチーズに準じて行った.

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-PAGE は Lammel¹²⁾ならびに O'Farrel¹³⁾の方法に準じてスラブ法で実施した. アクリルアミド濃度は分離ゲル12.5%, 濃縮ゲル4.75%, 泳動はト

リスーグリシン緩衝液によった. チーズ0.1gに試料用緩衝液 (SDS および 2-mercapto-ethanol 含有) 10mlを混合磨砕し湯浴中に3分間保持した後, サンプルウェルに注入した. 30mVで6時間泳動後Coomassie Brilliant Blueで染色した.

結果と考察

1. 熟成層の形成

熟成前のグリーンチーズは全体が白っぽく硬く熟成してない (非熟成層) が, 1~2週目には組織の軟化 (熟成層) が周辺から中心部に向かって進行し, 3~4週目には全体的に熟成が完了した. 更に詳細に観察すると熟成1~2週目のチーズには非熟成層と熟成層の間に黄色を帯びた軟膏様の層 (半熟成層と呼ぶ) がみられた.

これら3層の断面積比の経時的变化を示したのがFig. 2である. すなわち, チーズ表面のかびの生育十分となる1週目以降急速に熟成が進行している. 半熟成層は3週目にはほぼ消失し, 中心部まで熟成層に移行した. 嫌気条件ではまったく軟化が起きなかったもので, 本チーズの熟成にはかびの生育が必須であることは間違いない.

2. 熟成に伴うチーズのpH変化と乳酸およびアンモニアの動態

上記のように本チーズの熟成は表面から中心部に向かって進行するので, Fig. 1に示すように角, 表面および中心の3部分を試料として, それぞれの熟成中におけるpH, 乳酸およびアンモニア含量の変化を追跡した. 結果はFig. 3に示す.

pH約4.5のグリーンチーズは熟成期間の延長に伴って上昇するが, その上昇は角および表面部はすでに1週目から始まるのに対し, 中心部では2週目頃から上昇を始めている. 熟成軟化が完了する4週目には3部分ともpHは7.5から8.0近くにまで達した.

3部位における乳酸含量の推移をみると, 中心部に比べて角と表面部の低下は急速であり, 熟成が完了する3~4週目にはほとんどの乳酸は消失し, 中心部でもその含量は0.1g/100g, 熟成前の約1/10に減少した. アンモニア含量はグリーンチーズ0.04g/100gに対し, 熟成4週目の中心部は0.06g/100gにとどまり, 表面部よりもかなり低い値を示した.

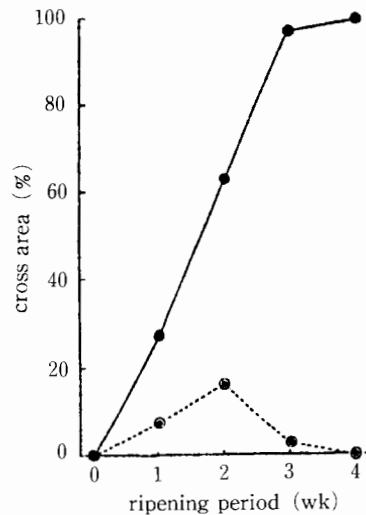


Fig. 2 Formation of ripening layer in Camembert Cheese during ripening.
● : ripening layer ● : semi-ripening layer ○ : non-ripening layer

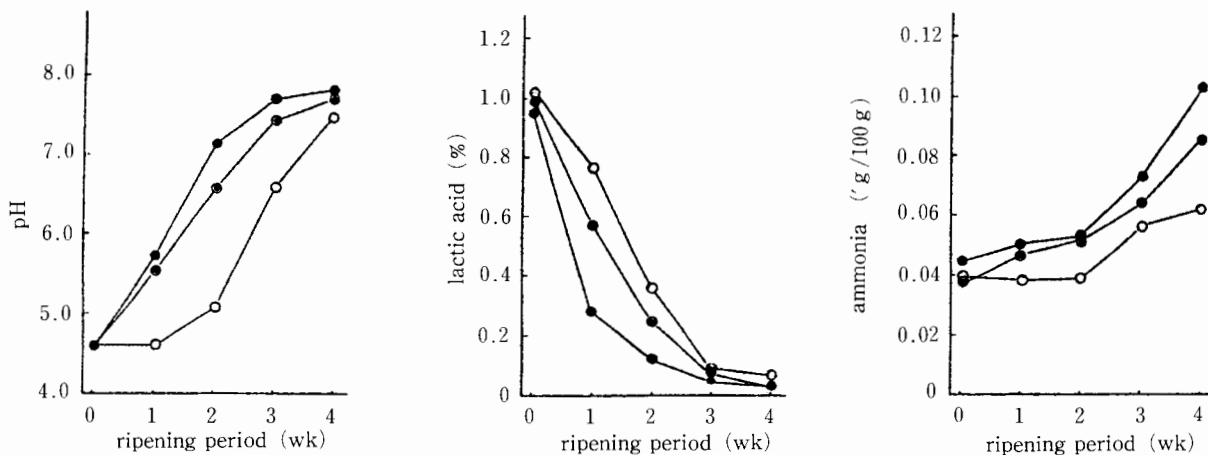


Fig. 3 Changes of pH, lactic acid and ammonia content in the corner (●), surface (●) and center (○) portions during cheese ripening.

しかもその増加速度は乳酸の減少ほど顕著ではなく、熟成2週目まで停滞した後に上昇に転じた。

熟成中におけるチーズ表面から中心部へ向けてのpHの上昇は, Lenoir⁵⁾およびGreenberg and Ledford⁷⁾らが指摘しているように, 表面に生育するかびによる乳酸の代謝とアンモニアの生成によるものと考えられる。

3. *Pen. candidum* 純粋培養によるpH, 乳酸およびアンモニア含量の変化

本チーズの製造に使用したかびスターター*Pen. candidum* AMを蔗糖添加および無添加の乳酸・ペプトン含有 Czapek 液で振盪培養し, 培地pHの変化, 乳酸の消失およびアンモニアの生成を調べた結果を Fig. 4 に示した。

pHは, 蔗糖を含む培地では上昇しないが, 蔗糖を含まない培地ではかびの生育とともに急上した。これに対して, 乳酸含量は蔗糖無添加糖培地で培養1日目以降低下し始めたが, 蔗糖添加培地では10日目に至るまで低下しなかった。*Pen. candidum* は乳酸よりも蔗糖を優先的に代謝するためであろう。アンモニア含量は蔗糖の有無にかかわらずコンスタントに上昇した。

チーズカード中に残存した乳糖は乳酸菌によって短期間で乳酸に変換されるので, かびによる乳酸の消費とアンモニアの生成が相まってpHが表面から中心部に向かって上昇するとみられる。表層部に存在するかびプロテアーゼによって生成されるアミノ酸はアンモニア生成のための基質となり, pHのアルカ

リ側への移行はチーズカゼインの水和性を高めチーズ軟化要因の1つとなりうると考えられる。

4. 熟成に伴うチーズ中のカルシウムおよびリンの動態

グリーンチーズのカルシウム含量は約0.3 g/100 gであるが, 中心部では1週目からすでに減少が始まり, ほぼ熟成が完了した3~4週日には約1/10の0.05 g/100 gまでに低下した。これに対し角および周辺部では上昇した (Fig. 5)。すなわち中心部のカルシウムがチーズの表面に移行したと理解される。なお本実験では表面部のカルシウム含量が4週目に低下しているがその原因は不明であった。リン含量もカルシウムと類似の経過をたどるが (Fig. 5), その変化はカルシウムほど顕著ではなく, 熟成チーズにおける中心部の含量は約 0.12 g/100 g でグリーンチーズの約1/2に減少したにすぎなかった。この理由はカゼインやリン脂質に結合した有機性リン酸基が存在することも1因であろう。同様な現象はGraet and Brule¹⁴⁾もカマンベールチーズで報告している。

Karahadian and Lindsay⁸⁾は, ブリーチーズでカルシウムおよびリン酸が表層厚さ3 mm以内に蓄積することを観察し, その理由として, かびによる乳酸の代謝とアンモニアの生成が可溶性乳酸カルシウムあるいは可溶性リン酸カルシウムのチーズ表面への移行をもたらす, アルカリ条件下で不溶性の第2および第3リン酸カルシウムとして蓄積するためであろうと報告している。その結果, チーズ中でのカルシウムの低減がカゼイン間のカルシウム架橋結合を

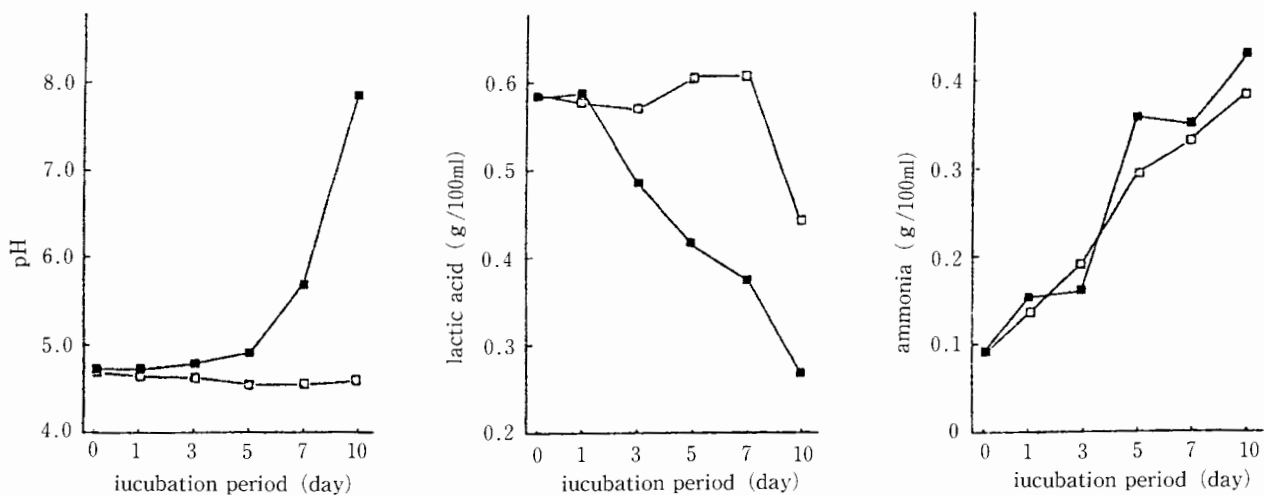


Fig. 4 Changes of pH, lactic acid and ammonia content in sucrose added (●) and non-added (□) Czapek-Dox medium during pure-incubation of *Pen. candidum* AM.

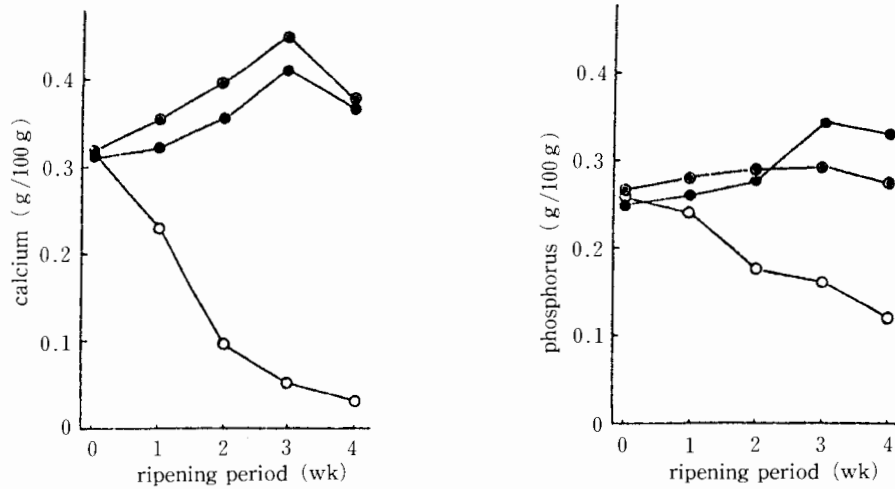


Fig. 5 Changes of calcium and phosphorus content in the corner (●), surface (◐) and center (○) portions during cheese ripening.

Table 1 Contents of Lactic acid and ammonia and hardness in modified Camembert cheese

Cheese sample	Sampling portion	pH	Lactic acid (g/100g)	Ammonia (g/100g)	Hardness (g)
[Control cheese]					
Green cheese		4.6	0.775	0.039	306
Ripened cheese	corner	7.8	0.045	0.104	5
	surface	7.7	0.040	0.085	5
	center	7.5	0.084	0.063	19
Green cheese + NH ₃ ^{a)}		9.5	0.789	0.235	310
[Glucono-δ-lactone cheese ^{b)}]					
Green cheese		5.8	0.025	0.036	175
Ripened cheese	corner	7.7	0.023	0.193	74
	surface	7.7	0.023	0.184	101
	center	7.5	0.025	0.182	168

a): Green cheese was incubated in an ammonia atmosphere for 4 weeks. The values were indicated by center portion.
 b): This cheese was made by addition of 0.08% glucono-δ-lactone and penicillin G potassium instead of lactic culture

低減して溶解性を高め、軟化をもたらす重要な要因であろうと提言している。

5. カマンベールチーズの軟化現象とpH, 乳酸, アンモニア

Table 1 は通常の製造法で作る 4 週間熟成したチーズと、嫌気条件下でアンモニア処理し 4 週間保持したグリーンチーズの pH, 乳酸, およびアンモニア含量と硬度の関係を表した結果である。

対照熟成チーズでは前述の通り、pHの上昇、乳酸の消失、アンモニアの生成が起こり、著しい硬度の低下が認められる。これに対しアンモニア処理したグリーンチーズは対照熟成チーズよりもアンモニア

含量と pH はむしろ高かった。しかし、乳酸の含量に変化はなく、表面部の硬度はやや低いものの、中心部の硬度はグリーンチーズと同等の 310 g を示し黄色のゴム様組織になった。グリーンチーズを 24 時間処理したのも同様であった。Vessal ら¹⁵⁾ は pH の上昇がカマンベールチーズの軟化に最も重要な因子であると述べているが、我々の結果はアンモニアによる pH の上昇のみでは正常な軟化を伴わないことを示した。

乳酸菌 starter を使用せず、ペニシリン添加牛乳をグルコノ-δ-ラクトンで凝固したカードで製造したチーズ (乳酸を含まないチーズ) は Table 1 に示

すごとく、4週間の熟成期間後のpHの上昇とアンモニアの生成は十分であった。しかし乳酸は終始対照熟成チーズの水準以下であった。このチーズはかびの生育も十分であったが、ややかび臭を呈した。また当初から水分含量がやや高かったために、グリーンチーズそのものの硬度も低かったが、中心部に比べ表面部の硬度はやや低下していた。このことは熟成前のカード中に適度の乳酸が存在することが正常な軟化により重要であることを示唆しているのかもしれない。

以上の結果は、Karahadian and Lindsay⁹⁾が提案しているように、基本的にはチーズカードあるいは熟成初期に生成された乳酸のかびによる代謝、あるいはアンモニア生成によるpHの上昇と連動した可溶性の乳酸およびリン酸カルシウムのチーズ表面への移行、そしてアルカリ条件下で不溶性リン酸カルシウムとして濃縮が本チーズの軟化の基本的誘因であると考えられる。

6. 熟成中におけるチーズカゼインの分解

Fig. 6はカマンベールチーズの角と中心部における蛋白分解の経時変化を電気泳動図で示したものである。中心部に比べ角部の方がより速く分解が進んでいる。これはpHのアルカリ側への移行がより速く起こる角部でチーズ中に存在するプラスミンや微生物由来プロテアーゼの活性が高まるのが原因であるかもしれない。しかしこの変化はカルシウム含量の

変化には及ばないが、カゼインの分解はチーズの親水性を高める1因となりうると考えられ、本チーズの組織形成にいかなる関与をするのか解明が望まれる。またチーズ熟成の今1つの重要因子である風味成分の形成にも寄与するものといえる。

要 約

本研究はカマンベールチーズの熟成における軟化の主因と考えられているチーズ内でのpHや塩類の動態を追跡したものである。

熟成開始前のグリーンチーズに比べて熟成が完了した4週目のチーズ中心部では、pHは4.5から7.8に上昇、乳酸は1.0%から0.1%で約1/10に低下、アンモニアは100g当たり0.04gから0.063gで約1.5倍に上昇、カルシウムは100g当たり0.3gから0.04gで約1/10のに減少、リンは100g当たり0.25gから0.12gで約1/2に減少した。これらの変化が本チーズの熟成軟化の要件と推察される。培養試験から、本チーズに使用したかびスターター *Pen. candidum* に乳酸の代謝能とアンモニアの生成能を有すること、その結果pHが上昇することが確認された。しかし、未熟成のグリーンチーズをアンモニア蒸気にさらした場合も、乳酸を含まないチーズを熟成させた場合も正常な軟化は生じなかった。最も顕著な変化はpH、乳酸、カルシウムに認められたが、これらのチーズ内での動態が主導的な役割を果たすものと推察された。

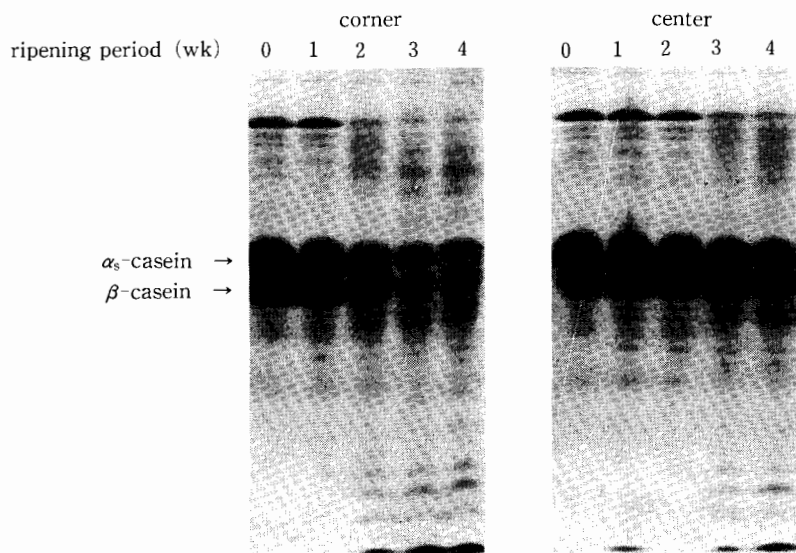


Fig. 6 Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of protein breakdown in the corner and center portions during cheese ripening.

文 献

- 1) Gripon, J. C., M. J. Desmazeaud, D. Le Bars, and J. L. Bergere : Role of proteolytic enzymes of *Streptococcus lactis*, *Penicillium roqueforti*, and *Penicillium caseicolum* during cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, **60**(10), 1532-1538 (1977)
- 2) Knop, A. M., and K. H. Peters : Submikroskopische strukturveränderungen im Camembert-kase während der reifung. *Milchwissenschaft*, **26**(4), 193-198 (1971)
- 3) Richardson, B. C., and P. D. Elstone : Plasmin activity in commercial caseins and caseinates. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **19**(1), 63-67 (1984)
- 4) Jong, L. de : Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistence. 2. The influence of the rennet concentration. *Neth. Milk Dairy J.*, **31**(4), 314-327 (1977)
- 5) Lenoir, J. : The surface flora and its role in the ripening of cheese. *Int. Dairy Fed. Bull.*, **171**, 3-20 (1984)
- 6) Purko, M., W. O. Nelson, and W. A. Wood. : The asociative action between certain yeasts and *Brevibacterium linens*, *J. Dairy Sci.*, **34**(7), 699-705 (1951)
- 7) Greenberg, R. S., and R. A. Ledford. : Deamination of glutamic and aspartic acids by *Geotrium candidum*. *J. Dairy Sci.*, **62**(3), 368-372 (1979)
- 8) Karahadian, C. and R. C. Lindsay : Integrated roles of lactate, ammonia. and calcium in texture development of mold surface-ripened cheese, *J. Dairy Sci.*, **70**(5), 909-918 (1987)
- 9) Graet, Y. Le., A. Lepienne, G. Brule, and P. Ducruet. : Migration du calcium et des phosphates inorganiques dans les fromages a pate molle de type Camembert au cours de l'affinage. *Lait*, **63**(629/630), 317-332 (1983)
- 10) 山内邦男・横山健吉 : ミルク総合事典, pp. 462-463, 朝倉書店, 東京 (1992)
- 11) 小原哲二郎・鈴木隆雄・岩尾裕之 : 食品分析ハンドブック, pp. 279-283, 建帛社, 東京 (1982)
- 12) Laemmli U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1971)
- 13) O'Farrell P. H. : High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021 (1975)
- 14) Graet, Y. Le. and Brule, G. : Mineral migration in Camembert cheese during ripening. *Lait*, **68**(2), 219-234 (1988)
- 15) Vassal, L., Monnet, V., Bars, D. Le., Roux, C. and Gripon, J. C. : Relation between pH, chemical composition and texture of Camembert cheese. : *Lait*, **66**(4), 341-351 (1986)