

チーズ中硝酸塩と亜硝酸塩の還元およびかびスターター  
*Penicillium candidum* の硝酸還元活性

有賀 秀子\*・大塚 勉\*・服部 聡\*・大西 拓弥\*・祐川 金次郎\*

Reduction of Nitrate and Nitrite in Cheese and Nitrate Reducibility  
of *Penicillium candidum* as Fungal Starter

Hideko ARIGA\*, Tsutomu OHTSUKA\*, Satoshi HATTORI\*,  
Takumi OHNISHI\* and Kinjiro SUKEGAWA\*

\* Laboratory of Dairy Chemistry, Department of Animal Science, Obihiro University  
of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada, Obihiro, Hokkaido, 080

This work was undertaken to determine the degree of retention in green cheese of nitrate added at the initiation of the cheese making process, and to observe the reduction of nitrate and the formation of nitrite in cheese during the ripening process. Furthermore, in order to understand whether *Penicillium candidum* inoculated in the manufacturing process as fungal starter are related to the reduction, the effects of microorganisms on the reduction of nitrate and formation of nitrite during ripening in cheese were evaluated. The results were as follows; (1) The retention ratio of nitrate added in the manufacturing process to the green cheese was approximately 7~8% for Gouda cheese and 13~15% for Camembert cheese. There was a close relation between the degree of retention of nitrate added and moisture contents in green Camembert and Gouda cheese. (2) It was found that nitrate reduction and nitrite formation or disappearance in Camembert cheese are more remarkable than those in Gouda and Blue cheese. In general, the maximum nitrite-forming time in Camembert cheese coincided with the time suitable to eat. (3) As a result of comparative experiments with *P. candidum* culture, it was ascertained that notable reduction of nitrate and nitrite in Camembert cheese during the ripening process may depend on nitrate and nitrite reducibilities derived from *P. candidum* starter inoculated at the initiation of ripening process. (Received Apr. 2, 1984)

自然界に広く分布する硝酸塩は化学的活性が低いと考えられているが、植物組織中で、あるいは動物体内で主として微生物によって亜硝酸塩に還元される。この亜硝酸塩は、人をはじめとする多くの動物種に対して、急性あるいは長期にわたり生理的に影響を与えることが報告されている。主に幼若動物で観察されるメトヘモグロビン血症の発症と、アミン、アミドなどとの反応により形成されるニトロソ化合物の発癌性はその代表的な例である。

人の体内に摂取される硝酸塩は、その約96%が野菜、穀類、いも類などから供給され<sup>1)</sup>、これらの食品を多く摂取する日本人は、諸外国に比べ硝酸塩の摂取量が多く、

最近の報告値<sup>2)</sup>と比較してみると、欧米の2~9倍<sup>3)~6)</sup>にも達している。

一方、硝酸塩および亜硝酸塩は、一部の食品について食品加工の際に食品添加物としての使用が許可されており、チーズでは、原料乳1lに対し硝酸塩として200mgまでの使用が、発酵調整剤として認められている。原料乳中の硝酸塩濃度は、一般にあまり高くない<sup>7)8)</sup>。チーズについては、著者らが既に報告した結果によると、ナチュラルチーズ30試料中、硝酸態窒素1μg/g未満が70%を占め、亜硝酸態窒素も、カマンベールをはじめとした数種を除き、他はいずれも0.1μg/g程度もしくはそれ以下と、概して低い傾向にあった。しかし一

\* 帯広畜産大学家畜生産科学科酪農化学研究室 (〒080 北海道帯広市稲田町)

部には、明らかに硝酸塩の添加による、あるいは原料乳以外の副材料に由来すると思われる高濃度の硝酸塩が検出されたものもあった<sup>9)</sup>。亜硝酸塩は主に硝酸塩の還元により生成されるので、硝酸塩の多いチーズでは亜硝酸塩も多く検出されるのが一般的な傾向であるが、かびチーズ、特に白かびチーズでは、硝酸塩は少ないが亜硝酸塩は相対的に高い傾向にあることが確認された<sup>9)</sup>。

白かびチーズには、*Penicillium camembertii*, *Penicillium caseicola* など *Penicillium camembertii* 群<sup>10)</sup> のかびが用いられてきたが、最近では同群の *Penicillium candidum* も多く用いられるようになってきた。

*Penicillium candidum* は *Penicillium camembertii* に比べ、タンパク分解酵素活性、脂肪分解酵素活性がともに高く<sup>11)</sup>、*Penicillium candidum* から抽出したプロテアーゼの凍結乾燥粉末と、乳酸菌スターターとして用いられる *Streptococcus lactis* あるいは *Lactobacillus casei* からの抽出酵素の乾燥粉末を混合してチーズの製造に用いると、熟成期間を半減し、良い風味と組織のものが得られるという報告がある<sup>12)</sup>。しかし、*Penicillium candidum* についての亜硝酸の生成に関与する硝酸還元酵素の報告はみあたらない。

硝酸還元酵素については、従来から大腸菌<sup>13)~15)</sup>をはじめ、アカバシカビ<sup>16)</sup>、*Aspergillus nidulans*<sup>17)</sup>、ケイ藻<sup>18)</sup>、うず鞭毛藻<sup>19)</sup>、*Chlorella vulgaris*<sup>20)21)</sup>などについて研究が進められているが、*Penicillium* 属については RENOSTO ら<sup>22)23)</sup> の *P. chrysogenum* からの硝酸還元酵素についての報告の他、ほとんどみられない。

これらのことから、本試験は、白かびチーズであるカマンベールにおける硝酸還元傾向およびカマンベールに用いられる *P. candidum* の硝酸還元性についての知見を得ることを目的として実施された。

## 実験方法

### 1. 試料チーズ

(1) 硝酸塩添加カマンベール、ブルー、ゴータチーズの調製

本学農場生産のホルスタイン混合乳を原料とし、乳酸菌スターターは Hansen 社 (デンマーク) の混合粉末スターター 01、かびスターターも同社のもので、カマンベールでは *P. candidum* 粉末、ブルーには *P. roquefortii* 粉末を用い、ともに常法<sup>24)</sup>により調製した。

*P. candidum* 粉末は、ポテトデキストロース寒天培地 (ポテト A 培地, 栄研化学) で  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 、5 日間混釈平板培養したのち集菌し、滅菌緩衝生理食塩水 (pH 7.2)

に懸濁しその濾液を噴霧接種した。ブルーでは、*P. roquefortii* 粉末を食パンに接種培養したのち凍結乾燥し、粉碎してかびスターター粉末を作成し、カードに混合した。熟成は、カマンベール、ブルーでは湿度 90% 前後、温度  $13 \sim 15^\circ\text{C}$  で行ない、ゴータは湿度 85% 前後、温度  $13 \sim 15^\circ\text{C}$  で行った。3 種の試料ともに、硝酸塩の消長の観察を容易にするために、原料乳 100 kg に対し硝酸ナトリウムを 20 g 添加した。

カマンベールの一部については、かびスターターの硝酸塩の消長に対する影響をみるため、グリーンチーズを 2 群に分け、対照試料はかびスターター無接種群とし、加塩後直ちにアルミホイルで包装した。試験試料は、加塩後かびスターターを噴霧接種し、表面にかびが一様に着生してからホイルで包装し、ともに常法<sup>24)</sup>によって熟成させた。

### (2) 硝酸塩無添加市販カマンベールチーズ

市販用に製造されたカマンベールチーズの、かびつけ直後および包装後の試料それぞれ 2 種を A, B の 2 製造所から入手し、 $5^\circ\text{C}$  に保存して熟成させ試験に供した。この 2 種の試料はともに本試験で調製した硝酸塩添加試料と同種の、Hansen 社の *P. candidum* の粉末をかびスターターとして用いて製造したものである。

## 2. 添加硝酸塩のグリーンチーズ中での保留

### (1) グリーンチーズ中の硝酸塩の保留率

硝酸塩を添加した原料乳の重量および、次に述べる方法によって測定したその硝酸塩濃度と、グリーンチーズの収量およびその硝酸塩濃度から、グリーンチーズ中の硝酸塩の保留率を算出して求めた。

### (2) 硝酸態窒素、亜硝酸態窒素量の測定

チーズは等量の温水 ( $50^\circ\text{C}$ ) で均質化したのち 20 g を秤取し、加水して約 2 倍に希釈してから 100 ml のメスフラスコに洗い入れ、 $50^\circ\text{C}$  で 15 分間振とう抽出した。これに除タンパク剤として 12% 硫酸亜鉛水溶液 10 ml, 0.5N 水酸化ナトリウム溶液 5 ml, 塩化アンモニウム緩衝液<sup>2)</sup> 10 ml を順次加え、 $50^\circ\text{C}$ 、15 分間加温し、冷却のち加水して 100 ml にメスアップし、東洋濾紙 No. 5C で濾過して試料液を得た。

硝酸塩、亜硝酸塩量は、前報<sup>8)</sup> に準じて 0.5% スルファニルアミド 6N 塩酸溶液と、0.5% N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩水溶液 (NEDA 溶液) を用いたジアゾカップリング法によって測定した。硝酸塩は、カドミウムカラムにより亜硝酸塩に還元したのち測定した。値は、別に求めた固形分量をもとに、乾物当たり重量を算出し、窒素量をもって表した。

### (3) pHの測定

試料に加水して10倍に希釈し、均質化したのちその濾液をガラス電極pHメーターで測定した。

### 3. チーズからの微生物の分離

チーズは滅菌緩衝生理食塩水(pH 7.2)で10倍に希釈、均質化した。これをさらに滅菌緩衝生理食塩水で $10^{-7}$ まで段階希釈し、接種した。

細菌は、トリプトソイ寒天培地(TA培地, 栄研化学), ブレインハートインフュージョン寒天培地(BHI-A培地, 栄研化学のBHI-B培地に寒天1.5%を添加したもの), GAM寒天培地(GA培地, 日水)の3種類の培地を用い、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で $48 \pm 2$ 時間、混釈平板培養によって分離した。GA培地では、ガスバック法<sup>25)</sup>により、二酸化炭素と水素ガスを発生させ、嫌気状態で培養した。

かびはpH 3.5に調整したポテトA培地を用い、混釈平板培養により、 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ で5日間培養し分離した。

平板上の集落は、形状、大きさ、色調、隆起、周縁、表面などの状態により分類し、それぞれの集落ごとに計数した。

### 4. チーズ中微生物の硝酸還元活性の検定

チーズから分離された細菌とかびについて、その硝酸還元活性を検定した。また、対照として乳酸菌スターターおよびかびスターターについても、同様に硝酸還元活性を検定した。

#### (1) 培地と培養方法

細菌は、ブレインハートインフュージョンブイヨン培地(BHI-B培地, 栄研化学)に0.3%の寒天を加えた半流動培地で、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $48 \pm 2$ 時間、かびはポテトデキストロース培地(ポテト培地, ジャガイモ200g, デキストロース20g, 水1000ml)に0.3%の寒天を加えた半流動培地で、 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 、5日間それぞれ前培養ののち、硝酸還元試験に供した。

前培養後、細菌はBHI・硝酸塩培地(BHI-NO<sub>3</sub>培地, BHI-B培地に硝酸カリウム0.1%, 寒天0.3%添加)5mlに、菌液0.1mlを接種し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養して7日後まで硝酸還元活性を観察した。

かびは、ポテトデキストロース硝酸塩培地(ポテト・NO<sub>3</sub>培地, ポテト培地に0.1%の硝酸カリウムと0.3%の寒天を添加)5mlに、菌液0.1mlを接種し、 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養し、15日後まで硝酸還元活性を観察した。なお対照の乳酸菌スターターとかびスターターは、それぞれ分離細菌およびかびと同様の方法で培養し、判定に供した。

### (2) 硝酸還元活性の判定

培養後の培地に、スルファニルアミド溶液(0.5%スルファニルアミド6N塩酸溶液)0.1mlとNEDA溶液0.05mlを滴下し混合してその呈色を観察した。

桃紅色を呈したものは、亜硝酸イオンの存在を示すので還元活性(+)とした。発色が認められなかったもの、あるいは呈色がきわめて薄い場合には亜鉛末を少量加えた。亜鉛末により発色した場合には、硝酸塩が残存していたことを示すので還元活性(-)と判定した。また亜鉛末を添加しても発色しなかった場合は、硝酸イオン、亜硝酸イオンがともに存在しなかったと考えられるので、硝酸還元活性、亜硝酸還元活性がともに認められたと判断し、(++)と表現した。

### 5. チーズから分離した硝酸還元細菌およびかびの同定

#### (1) 硝酸還元細菌の同定

チーズから分離した硝酸還元活性を有する細菌は、TA斜面培地とGA培地を用い、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $48 \pm 2$ 時間培養してから同定のための試験に供した。GA培地はガスバック法により嫌気的条件下で培養した。

同定は、好気性培地と嫌気性培地による発育の比較、グラム染色性、形態、運動性、カタラーゼ試験、OF試験、オキシダーゼ試験などの結果について、COWANらの鑑別表<sup>26)</sup>、駒形<sup>27)</sup>、須藤<sup>28)</sup>、光岡の方法<sup>29)</sup>およびBERGEYのmanual第8版<sup>30)</sup>にもとづいて行った。

発育の比較は、TA斜面とGA斜面培地にそれぞれ画線と穿刺により接種し、GA培地ではガスバックを用い、それぞれ $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養し、24時間と48時間後に培地表面と穿刺した内部での発育状態を観察することにより行った。グラム染色性はHUCKERの変法に準ずる方法<sup>31)</sup>により染色し、検鏡した。対照には*Staphylococcus aureus*と、*Escherichia coli*を用いた。形態は、固定染色した菌体の検鏡により判断し、同時にマイクロメーターにより大きさを計測した。運動性は、懸滴標本と半流動培地中での増殖状態により判定した。懸滴標本は、TA培地とGA培地で24時間、48時間、 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ および $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養した菌体を用いて判定した。半流動培地は好気性運動性試験用として、1l中にゼラチン80g、ペプトン10g、肉エキス3g、塩化ナトリウム5g、寒天4gからなる組成の培地を、嫌気性菌用にはTEP糖分解用培地(TEP培地, 栄研化学)をそれぞれ用い、高層培地に5mm程度穿刺して接種し、後者はガスバックにセットし、 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ と $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養した。増殖状態の判定は2日目と3日目に行った。カタラーゼ試験は、TA培地

にデキストロースを1%加えたものを好気性菌用培地として、TEP培地1lに寒天1g, リン酸水素二カリ2.5g, デキストロース10gを加えたものを嫌気性培地として用い、この両斜面培地で $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養し、24, 48時間後に3%過酸化水素水を滴下して、直後と5分後の発泡状態により判定した。OF試験は、糖分解用半流動培地(BSA培地, 栄研化学)1lに、デキストロース10g, リン酸水素二カリ0.3gを加え高層培地を調製し、各6本に穿刺接種した。うち3本は流動パラフィンで重層し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養して4日目と14日目に判定した。オキソダーゼ試験は、TA斜面培地で $36 \pm 1^\circ\text{C}$ , 24時間培養したあと、1%-ジメチル-P-フェニルジアミン二塩酸塩溶液と、1% $\alpha$ -ナフトール95%エタノール溶液の等量混液を培地に直接加え判定した。

## (2) かびの同定

ポテトA斜面培地に $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , 48 $\pm$ 2時間分離培養した菌体をポテトA平板およびツアベックドックス寒天(ツアベックA培地, 栄研化学)平板培地に一点穿刺接種し、 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , 7日間培養して巨大集落を形成させ、同定に供した。

同定は肉眼的観察による生育速度、色調、気生菌系および基底菌系の状態などの集落表面の形質と集落表面の色調、顕微鏡観察によるペニシリの大きさ、色、分枝の状態、分生子連鎖の形状や長さ、分生子柄の発生部位、長さ、直径、壁の性質、分枝の有無、数、配列の状況、分生子の大きさ、色、形などから、椿<sup>33)</sup>, 宇田川ら<sup>33)</sup>, Pitt<sup>34)</sup>, Abe<sup>35)</sup>およびRAPERとTHOM<sup>36)</sup>などの分類にもとづいて行なった。なお対照として、*P. candidum*と*P. roquefortii*を同条件で培養し、比較検討した。

## 実験結果及び考察

### 1. 添加硝酸塩の製造時におけるグリーンチーズ中への保留

グリーンチーズ中への保留率をカマンベールとゴーダについて算出した。Table 1に示したように、添加した

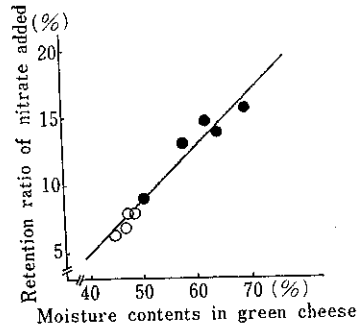


Fig. 1 Correlation between moisture contents and retention of nitrate added at the making process into green cheese of Gouda (○) and Camembert cheese (●)  
 $Y = 0.349X - 10.775$ ,  $r = 0.972^{**}$ ,  $n = 9$   
 $^{**} p < 0.01$

硝酸塩のうちゴーダでは7~8%が、カマンベールでは試料5を除き13~15%がグリーンチーズ中に保留された。カマンベールとゴーダの間の保留率の差は、製造法の違いによることも考えられるが、カマンベールの試料5では保留率が他に比べ著しく低く、同時に水分も他に比べて低かったため、水分含量と硝酸塩保留率との関連性について検討した。この結果、Fig. 1にみられるように両者間には試料数9点で、 $r = 0.972^{**}$ ,  $y = 0.39x - 10.775$  ( $^{**}P < 0.01$ )の相関が認められた。このことから、ゴーダで保留率が低いのは、添加硝酸塩の大部分がチーズホエーに移行し、このホエーの排出率が、ゴーダではカマンベールに比べて高いことによるためと考えられる。

一般に硝酸塩の添加はゴーダのみで、ソフトタイプのチーズではみられないといわれているが、我々が1980年に調査したカマンベールチーズの市販品7点のうち、輸入品の3点に1.8, 4.5, 14.2  $\mu\text{g/g}$ の硝酸態窒素が検出されており、これまでの原料乳中で検出された硝酸塩濃度<sup>7)38)</sup>から類推すると、この3試料については硝酸塩添加の可能性は十分考えられる。これらのことから、添加

Table 1 Retention of nitrate added at the making process in green cheese of Gouda and Camembert cheese

Sample No.	Gouda				Camembert				
	1	2	3	4	1	2	3	4	5
Retention ratio of nitrate (%)	6.9	7.9	7.2	8.0	14.0	15.5	14.7	13.1	8.9
Yield of green cheese (%)	12.1	11.1	11.7	12.9	14.6	15.9	16.8	17.4	12.5
Moisture in green cheese (%)	45.8	47.5	47.4	47.5	64.0	69.5	61.3	57.3	50.0

硝酸塩の保留率が高かったカマンベールでのその後の熟成過程における硝酸塩の消長は、特に興味がある。

## 2. チーズ熟成中の硝酸塩、亜硝酸塩の消長

(1) 硝酸塩添加カマンベール、ブルー、ゴードチーズの硝酸態、亜硝酸態窒素の消長

グリーンチーズ中の硝酸態および亜硝酸態窒素量は13~16  $\mu\text{g/g}$  であり、固形分当たりの含量は3種とも約30  $\mu\text{g/g}$  であった。熟成中の消長は Fig. 2 に示した。

ゴードでは、最初の2週間で固形分当たり約20  $\mu\text{g/g}$

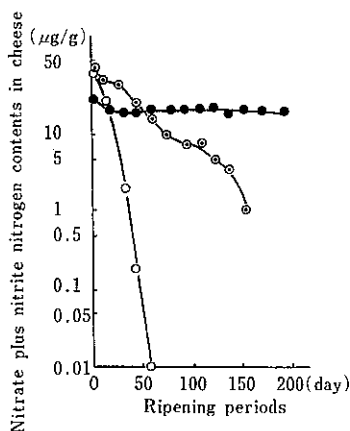


Fig. 2 Changes of nitrate plus nitrite nitrogen contents of Camembert (○), Blue (◊) and Gouda cheese (●) during ripening process

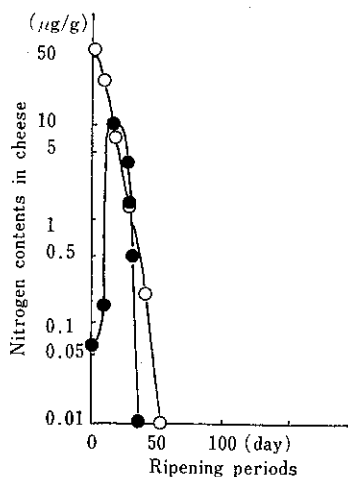


Fig. 3 Changes of nitrate (○) and nitrite (●) nitrogen contents of Camembert cheese during ripening process

程度にまで減少し、その後熟成190日までの観察ではほとんど変化がなかった。一方カマンベールでは、経目的に急速に減少し、50日前後ですべて消失した。またブルーでは、150日で1  $\mu\text{g/g}$  程度にまで減少した。このようにゴードとかびチーズではまったく異なった消長がみられ、特にカマンベールでの還元傾向は顕著であった。

次に硝酸塩と亜硝酸塩の消長の相互関係をみると、カマンベールでは硝酸塩の急激な減少に伴ない亜硝酸塩の生成が観察され、2~3週目頃をピークとしてその後急速に減少し、40日目頃にはまったく消失した。硝酸塩はこれよりやや遅れ50日目頃に検出されなくなった (Fig. 3)。ブルーでは150日目には硝酸塩はまったく検出されなくなったが、亜硝酸塩は1.5  $\mu\text{g/g}$  程度残存していた (Fig. 4)。一方ゴードでは硝酸塩は2週間後に約20% 減少したが以後ほとんど変化なく、亜硝酸態窒素も0.2  $\mu\text{g/g}$  程度までの生成がみられたが、それを除いては全期間を通してあまり変動がなく、0.1  $\mu\text{g/g}$  以下であった (Fig. 5)。

このように、カマンベールでは硝酸塩、亜硝酸塩の還元傾向がともに顕著で、特に食用適期が比較的亜硝酸塩が多く生成される時期に相当するので、前報<sup>9)</sup>で述べたように、他のチーズに比べ硝酸塩含量の割に亜硝酸塩が比較的多く検出されるという現象が観察されたものと考えられる。またブルーでも硝酸塩、亜硝酸塩の還元は認められたが、還元速度はカマンベールに比べて緩慢であった。一方ゴードでは食用適期においても、保留された硝酸塩の約80% が残存しており、その結果、亜硝酸塩の生成は少なかった。

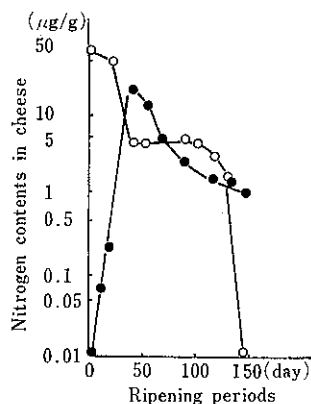


Fig. 4 Changes of nitrate (○) and nitrite (●) nitrogen contents of Blue cheese during ripening process

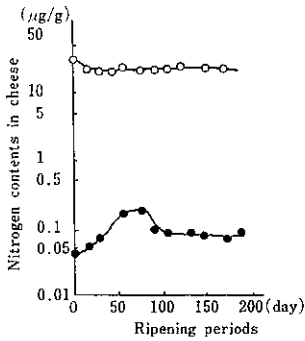


Fig. 5 Changes of nitrate (○) and nitrite (●) nitrogen contents of Gouda during ripening process

本試験に用いた乳酸菌スターターは *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus diacetylactis* の3種の *Streptococcus* と *Leuconostoc cremoris* をあわせたものである。*Streptococcus* 属の菌株の中には、LANGSTON らにより報告されている Lancefield のD群に属する *Streptococcus faecium* の変異株のように、硝酸塩還元活性をもつ菌株もみだされてはいる<sup>27)</sup>が、通常 *Streptococcus* 属および *Leuconostoc* 属はともに硝酸塩還元活性をもたない。また本試験のゴーダ、ブルー、カマンベールの3種のチーズとともに同じ乳酸菌スターターを用いているので、これら3種のチーズ間の硝酸塩、亜硝酸塩の還元傾向の相違は、おそらくかびスターターに依存するものと考えられる。

### (2) 硝酸塩無添加、市販用カマンベールチーズの熟成過程における亜硝酸塩の生成

硝酸塩添加カマンベールチーズで顕著な硝酸塩、亜硝酸塩還元傾向が認められたので、硝酸塩無添加の市販用カマンベールチーズの2種についても同様に亜硝酸塩の消長を観察した。その結果 Fig. 6 にみられるように、2種の試料はそれぞれかびつけ直後の亜硝酸態窒素量  $0.01 \mu\text{g/g}$  (試料1),  $0.03 \mu\text{g/g}$  (試料2) に対し熟成25日前後では  $0.1 \mu\text{g/g}$  (試料1),  $0.07 \mu\text{g/g}$  (試料2) とともに増加し、添加試料に比べて生成量は少なかったが、亜硝酸塩の生成傾向はおそらく類似しているものと思われる。硝酸態窒素量は、試料1は熟成2日目で  $0.8 \mu\text{g/g}$ 、試料2では3日目で  $0.4 \mu\text{g/g}$  であったが、試料1では30日以後、試料2では20日以後にいずれも完全に消失した。このように、無添加のカマンベールチーズにおいても、添加試料と類似した還元傾向にあることが推察された。

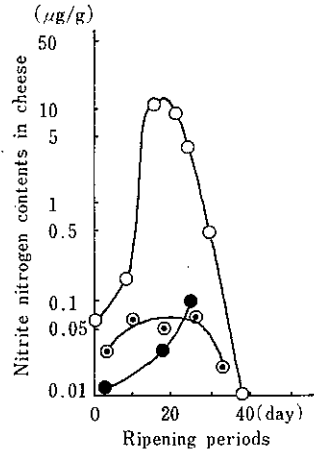


Fig. 6 Changes of nitrite nitrogen contents of test Camembert cheese (○) and commercial camembert cheese (sample 1 ●, sample 2○) during ripening process

### (3) カマンベールチーズかびスターターの硝酸還元活性

これまでの結果において観察されたカマンベールチーズでの顕著な硝酸塩、亜硝酸塩の還元と、かびスターターとの関わりを確認するため、カマンベールのグリーンチーズを2群に分け、かびスターター接種試料と無接種試料を作成し、両群間の硝酸塩、亜硝酸塩の消長の相違を観察した。

かびスターター無接種試料では2週間後までpHはほとんど変化なく、27日目でpHはやや上昇したが亜硝酸塩は検出されず、硝酸塩もほとんど変化は認められなかった (Fig. 7)。これに対してかびスターター接種群では製造時のpHは4.6であったが、1週間後には5.5まで上昇し、さらに20日目には7.1に達した。硝酸塩はスターター接種後急速に減少し、2週間後には消失した。一方、亜硝酸塩の生成は1週間後に最大値に達し、2週目以降には  $0.2 \mu\text{g/g}$  以下と、僅かに残存するのみであった (Fig. 7)。本試料は、スターター接種後の予備熟成を  $20\sim 22^\circ\text{C}$  と、高温下で行ったためこれまでの試料に比べ熟成が促進されたが、無接種の対照試料では、このような条件下でも熟成がほとんど進まず、硝酸塩の還元もまったく認められなかった。

これらの結果から、カマンベールチーズでの硝酸塩の還元には、白かびスターターが大きく関与していることが確認された。

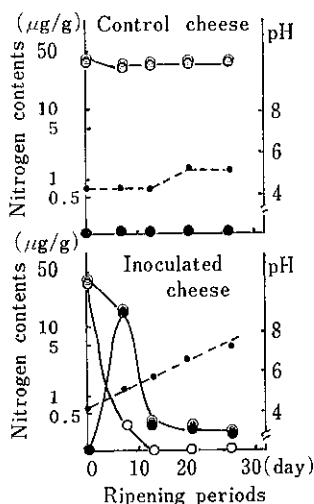


Fig. 7 Effects of *P. candidum* inoculated in green cheese on the reduction of nitrate, formation and decomposition of nitrite and changes of pH during ripening process

- : Nitrate plus nitrite nitrogen
- : Nitrate nitrogen
- : Nitrite nitrogen
- - : pH

### 3. チーズから分離した微生物の硝酸還元活性と乳酸菌スターターおよびかびスターターの硝酸還元活性

熟成の全期間を通してカマンベールおよびゴードチーズから分離された主な細菌は球菌3種と桿菌2種で、これらについて硝酸還元活性を判定した。その結果、Table 2 にみられるように、球菌の No. 3 と桿菌の No. 4, 5 に硝酸還元活性が認められ、特に No. 4 では亜硝酸の還元活性も顕著であった。一方、乳酸菌スターターには還元活性は認められなかった。

かびは、カマンベール、ブルー、ゴードから3種が分離された (Table 3)。この中で、カマンベールから分離された No. 1 とブルーから分離された No. 2 の2種に硝酸還元活性が認められ、7~8日後からは、亜硝酸還元活性も認められた。青かびスターターの *P. roquefortii* および白かびスターターの *P. candidum* はともに硝酸還元活性が認められ、No. 1 および2の分離かびとほぼ同様に7日後付近から亜硝酸還元活性も認められた。

このように乳酸菌スターターは活性が認められないので、今回チーズから分離された硝酸還元活性を有する細

Table 2 Nitrate reduction activity of some bacterial strains isolated from Camembert and Gouda cheese and lactic culture

Bacterial strain No.	Nitrate reduction activity					
	Incubation periods (h)					
	20	44	66	89	112	164
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	++
4	+	++	++	++	++	++
5	+	+	+	+	++	++
Lactic culture	-	-	-	-	-	-

Bacterial strain 1, 2 and 3 are spherical cells and 4 and 5 are rod-shaped cells

- : Nitrate reduction activity is negative

+: Nitrate reduction activity is positive

++: Nitrate and nitrite reduction activity is positive

菌は、スターターとは別の細菌と考えられるが、分離かびの No. 1 と2は、ともにかびスターターに由来する可能性が大きい。硝酸還元活性を有する細菌叢は、カマンベールとゴードで相違が認められなかったので、カマンベールにおいて観察された顕著な硝酸塩の還元と亜硝酸塩の生成および消失は、製造時に接種されたかびスターターに依存するところが大いと考えられる。

### 4. チーズから分離した硝酸還元細菌およびかびの同定

#### (1) 硝酸還元細菌の同定

Table 4 に示したように、No. 3 はグラム陽性の房状に配列した球菌で、非運動性、通性嫌気性でカタラーゼテスト陽性、OF テストは発酵型であるところから、*Staphylococcus* 属と同定した。No. 4, 5 はともにグラム陽性の桿菌で芽胞を形成し、嫌気条件下および好気条件下でともに発育し、運動性があり、カタラーゼテスト陽性、OF テストが発酵型であったので、*Bacillus* 属と同定した。

#### (2) 硝酸還元かびの同定

集落および菌糸体の顕微鏡的観察の結果、No. 1 のかびは、白色羊毛状の円形の集落で、隔壁を有する分生子柄とペニシリを形成し、その他 Table 5 に示した特性から *P. camembertii* 群と同定された。No. 2 のかびは、緑色のビロード状の不規則な周縁からなる集落で、隔壁

Table 3 Nitrate reduction activity of some fungal strains isolated from Camembert, Blue and Gouda cheese and culture of *P. candidum* and *P. roquefortii*

Fungal strain No.	Nitrate reduction activity									
	Incubation periods (day)									
	1	2	3	4	5	7	8	10	16	
1	-	+	+	+	+	+	++	++	++	++
2	-	+	+	+	+	++	++	++	++	++
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Culture of <i>P. candidum</i>	-	+	+	+	+	+	++	++	++	++
Culture of <i>P. roquefortii</i>	-	+	+	+	+	+	++	++	++	++

Fungal strain 1, 2 and 3 were isolated from Camembert, Blue and Gouda cheese, respectively

- : Nitrate reduction activity is negative

+ : Nitrate reduction activity is positive

++ : Nitrate and nitrite reduction activity is positive

Table 4 Characteristics of nitrate reducible bacteria isolated from Camembert and Gouda cheese

	Strain No.		
	3	4	5
Motile*	-	+	+
Growth condition*			
Aerobic	+	+	+
Anaerobic	+	+	+
Catalase test	+	+	+
OF test	F	F	F
Endospore formation**	-	+	+
Cell characteristics			
Gram stain	+	+	+
Shape	S	R	R
Size (μm)	0.6~0.7	1.0× 2.0~4.0	0.4~0.6× 1.5~1.8

\* At 22°C and 37°C

\*\* In anaerobic condition

S: Spherical, R: Rod.

のある分生子柄とベニシリを有し、その他 Table 6 に示した特性がみられたので *P. roquefortii* 群に属するものと判断された。さらにスターターから純粋分離された *P. candidum* および *P. roquefortii* を対照として比較観察した結果、No. 1 は *P. candidum* と、また No. 2 は *P. roquefortii* とそれぞれ同一のものであると判定された。

これらのことから、これまでに観察されたカマンベ

Table 5 Microscopic and colony characteristics of isolated fungi from Camembert cheese-strain No. 1

Conidiophore:	Borne from aerial hyphae, septate
Stipes	: 130~300×4.0 μm, with roughened walls
Penicilli	: Asymmetrical terverticillate or quarterverticillate
Rami	: Verticils of 2~3
Metulae	: 3~5 per ramus, 10~12×3~4 μm
Phialide	: Divergant verticils of 3~5, ampulliform 10~15×2~4 μm
Conidia	: Subspheroidal to spheroidal, smooth walled 4~5 μm, borne in short disordered chains
Colonies	: Plane, convex, deeply floccose, margins entire, white mycelium

ルチーズでの顕著な硝酸還元傾向は、かびスターターとして用いられた *P. candidum* の硝酸および亜硝酸還元活性によるものであることが確認された。

以上の知見が得られたので、現在、*P. candidum* からの硝酸還元酵素の抽出と精製を試みており、初期の精製段階で硝酸還元活性を有する画分が回収されている。

## 要 約

製造時に添加された硝酸塩のグリーンチーズ中への保留と熟成過程における硝酸塩の還元ならびに亜硝酸塩の生成、さらにチーズの微生物、特にかびスターターとし



Table 6 Microscopic and colony characteristics of isolated fungi from Blue cheese-strain No. 2

Conidiophore:	Borne from subsurface hyphae, septate
Stipes	: 100~130×4.0~6.0 μm, walls thin and characteristically tuberculate
Penicilli	: Asymmetrical terverticillate, rarely biverticillate
Rami	: One per penicilli, 20×4.0 μm, walls tuberculate
Metulae	: 1~2 per ramus, 10×3.0~4.0 μm, walls tuberculate
Phialide	: Verticils of 7~10, ampulliform, 10×3.0~4.0 μm
Conidia	: Subspherical to spherical, 3.5~4.0 μm, smooth walls, dark green, borne in long disordered columns
Colonies	: Plane, velutinous, margins low, irregular, inconspicuous white mycelium, reverse brown green to blue green

て用いられる *P. candidum* のチーズ中硝酸塩の還元に対する関与を確認するために、硝酸塩添加チーズ (0.2 g/原料乳 1 kg) を作成し、カマンベールとブルーおよびゴダチーズとの比較試験をした結果、以下の知見を得た。

(1) 製造時に添加した硝酸塩は、ゴダで7~8%、カマンベールでは13~15%がグリーンチーズ中に保留され、グリーンチーズ中の硝酸態窒素含量は、ともに約15 μg/g程度で、固形分中含量は約30 μg/gであった。

硝酸塩保留率とグリーンチーズ中水分含量との間には有意の相関が認められた。

(2) 熟成期間中、ゴダでは硝酸塩の還元はほとんどみられなかったが、カマンベールでは硝酸塩の還元が顕著で、それに伴ない亜硝酸塩の生成が観察され、2~3週目頃をピークとしてその後亜硝酸塩も還元され消失した。ブルーではカマンベールに比べ緩慢ではあったが硝酸塩および亜硝酸塩の還元が認められた。

カマンベールの亜硝酸塩の最大生成期と食用適期とはほぼ一致していた。

(3) カマンベールのかびスターター無接種群では、熟成がほとんど進まず硝酸塩の還元および亜硝酸塩の生成も観察されなかったが、同一のグリーンチーズにかびス

ターターを接種すると、著しい硝酸塩および亜硝酸塩の還元が認められた。

(4) チーズから分離された細菌叢は、カマンベール、ブルー、ゴダの3種チーズの間で相違はなく、一方分離された硝酸還元活性を有するかびは、同定の結果白かびスターターに由来する *P. candidum* と、青かびスターターに由来する *P. roquefortii* であった。

(5) 以上の結果から、カマンベールチーズで観察された顕著な硝酸塩および亜硝酸塩の還元傾向は、*P. candidum* の硝酸および亜硝酸還元酵素活性に依存するものと考えられる。

## 文 献

- 1) 石綿 肇・谷村 顕雄: 衛生化学, 28, 171 (1982).
- 2) KAWABATA, T., OESHIMA, H., UIBU, J., NAKAMURA, M., MATSUI, M. and HAMANO, M.: Naturally Occuring Carcinogens-Mutagens and Modulators of Carcinogenesis, MILLER, E. C., MILLER, L. A., HORONO, I., SUGIMURA, T. and TAKAYAMA, S. eds., (University Park Press, Baltimore), p. 195 (1979).
- 3) TUREK, B., IAVSOVA, D. H., TUČEK, J., WALDMAN, J. and ČERNÁ, J.: IARC Sci. Publ., No. 31, International Agency for Research on Cancer (Lyon), p. 625 (1980).
- 4) TREMP, E.: Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 71, 182 (1980).
- 5) HARTMAN, P. E.: Chemical Mutagens, Vol. 7, DE SERRES, F. J., HOLLANDER, A. eds. (Plenum Press, New York), p. 211 (1982).
- 6) GISLASON, J. and DAHLE, H. K.: Norsk Vet., 92, 557 (1980).
- 7) 祐川金次郎・松本多計治: 栄養と食糧, 28, 389 (1975).
- 8) 祐川金次郎・有賀秀子・西村勝美・龍富美男・林友子: 栄養と食糧, 31, 215 (1978).
- 9) 有賀秀子・林友子・永田信一・祐川金次郎: 帯畜大学術研究報告, 11, 177 (1978).
- 10) PITT, J. I.: The Genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces (Academic Press, London), p. 536 (1979).
- 11) STEPANIAK, L., KORNACKI, K., GRABSKA, J., RYMASZEWSKI, J. and CICHOSZ, G.: Acta Alim. Polonica, 6, 155 (1980).
- 12) KALINOWSKI, L., FRACKIEWICZ, E., JANISZEWSKA, L., PAWLIC, A., KIKOLSKA, D., PISAREK, J., SZADKOWSKA, M. and SWITACZ-TOMASZEWSKA, J.: United State Patent, 4158607 (1979).
- 13) MACGREGAR, C. M., SCHNAITMAN, C. A., NORMANSELL, D. E. and HODGINS, M. G.: J. Biol.

- Chem.*, 249, 5321 (1974).
- 14) ENOCH, H. G. and LESTER, R. L.: *J. Biol. Chem.*, 250, 6693 (1975).
  - 15) FORGET, D. and DUBOURDIEU, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 105, 450 (1982).
  - 16) GARRETT, R. H. and NASON, A.: *J. Biol. Chem.*, 244, 2870 (1969).
  - 17) DOWNEY, R. J.: *J. Bacteriol.*, 105, 759 (1971).
  - 18) AMY, N. K. and GARRETT, R. H.: *Plant Physiol.*, 54, 629 (1974).
  - 19) HOCHMAN, A.: *Arch. Microbiol.*, 133, 62 (1982).
  - 20) SOLOMONSON, L. P., LORIMER, G. H., HALL, R. H., RORCHERE, R. and LEGETT, J.: *J. Biol. Chem.*, 250, 4120 (1975).
  - 21) RIGANO, V. D., VONA, V., FUGGI, A., DIMARTINO, C. and RIGANO, C.: *Plant Sci. Letters*, 28, 265 (1982).
  - 22) RENOSTO, F., ORNITZ, D. M., PETERSON, D. and SEGEL, I. H.: *J. Biol. Chem.*, 256, 8616 (1981).
  - 23) RENOSTO, F., SCHMIDT, N. D. and SEGEL, I. H.: *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 107, 12 (1982).
  - 24) 祐川金次郎：乳業技術便覧，下巻（酪農技術普及会，東京），p. 75 (1976).
  - 25) 光岡知足：腸内菌の世界，嫌気性菌の分離と同定（叢文社，東京），p. 47 (1980).
  - 26) COWAN, S. T.: 医学細菌同定の手びき，第2版（近代出版社，東京），p. 63, 66, 106 (1974).
  - 27) 駒形和男：微生物の分類と同定，長谷川武治編（東大出版会，東京），p. 203 (1975).
  - 28) 須藤恒二：微生物の分類と同定，長谷川武治編（東大出版会，東京），p. 247 (1975).
  - 29) 光岡知足：腸内菌の世界，嫌気性菌の分離と同定（叢文社，東京），p. 104 (1980).
  - 30) BUCHANAN, R. E. *et al.*: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th ed. (Williams & Wilkins Co., Baltimore), p. 478 (1974).
  - 31) 京都大学農学部食品工学教室編：食品工学実験書，下巻（養賢堂，東京），p. 84 (1970).
  - 32) 椿 啓介：微生物の分類と同定，長谷川武治編（東大出版会，東京），p. 9 (1975).
  - 33) 宇田川俊一・椿 啓介：菌類図鑑，下巻（講談社，東京），p. 1076 (1978).
  - 34) PITT, J. I.: *The Genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces* (Academic Press, London), p. 316 (1979).
  - 35) ABE, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2, 1 (1949).
  - 36) RAPER, K. B., THOM, C. and FENNELL, D. I.: *A Manual of the Penicilla* (Williams & Wilkins, Baltimore), 1 (1949).
  - 37) LANGSTON, C. W. and WILLIAMS, P. P.: *J. Bacteriol.*, 84, 603 (1962).

(昭和59年4月2日受理)