

**独自スターター  
プロピオン酸菌利用**

**プロピオン酸菌を利用したヨーグルト**

# プロピオン酸菌利用ヨーグルト製造マニュアル

## 作業工程

## 写真

### ①原料乳の検査と計量

新鮮な牛乳を使用。  
ロット毎に風味等、良質な牛乳か確認。

### ②濾過

異物の除去。ストレーナー又は濾過布を使用。機器は必ず分解して洗浄、殺菌。場合によっては、クリームを一部除き、成分の標準化を行う。



### ③殺菌

病原菌を死滅させ、安全な製品をつくるために必要不可欠な作業。汚染菌を減らし、後で添加する乳酸菌の増殖を促す。バッチ式の場合は85℃15分間加熱処理を行う。



耐熱性菌等の残存している菌が増殖しないように、次の工程への移行を迅速に行う。発酵に適した温度になるように管理する。殺菌終了後、冷水で間接的に40℃まで冷却。

## 作業工程

## 写真

### ⑤スターターの添加 (微生物による発酵開始)

プロピオン酸菌培養マニュアルに従って  
バルクスターターを調整した場合  
液体バルクスターターを0.5～2%添加。

凍結乾燥粉末スターターを利用する場合  
0.01～0.1%添加する。

凍結乾燥粉末スターターを利用する場合  
粉末がダマにならないように注意しながら少量の牛乳に懸濁して使用する。  
また、牛乳の温度が低い状態、もしくは温度が高すぎる状態で乳酸菌を加えると発酵不良になる場合があるので注意する。

造粒タイプ(2mm)の凍結乾燥スターターは  
乳糖などを加えて溶解性を高めているが、  
粉末タイプに比べ菌数が1/10程度に減少している。

凍結乾燥スターターは保存状況によって発酵の遅れが生じることがある。

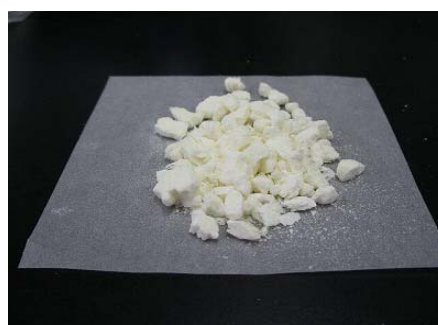
プロピオン酸菌は乳酸菌の様にヨーグルトフレーバーを作りません、このため、ヨーグルトのフレーバーが必要な場合、乳酸菌との混合培養が必要となります。

プロピオン酸菌の発酵温度は高温性の乳酸菌と同じです。任意の乳酸菌との混合培養が可能と考えられます。

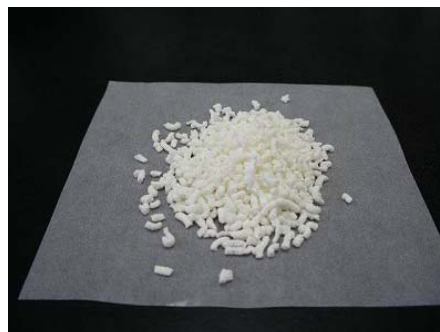
プロピオン酸菌は乳酸菌の作る乳酸を炭素源として速やかに増殖するため、乳酸菌と混合培養することで発酵時間が短縮されます。  
(プロピオン酸菌培養マニュアル参照)



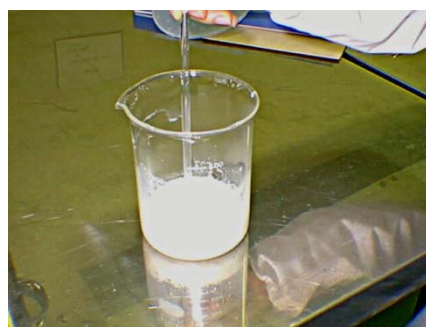
液体バルクスターター



凍結乾燥スターター  
(粉末タイプ)



凍結乾燥スターター  
(造粒タイプ)



## 作業工程

## 写真

### ⑥発酵

40～42℃で4～12時間培養する。



### ⑦pH確認、発酵停止

発酵が進んでくると、粘度が増加する。  
pHが4.5前後になったところで冷却して  
発酵を止める。



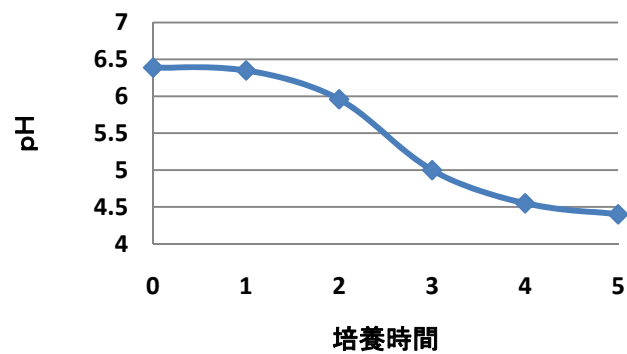
### ⑧充填

容器に定量充填、包装後冷蔵保管する。

### ⑨製品検査

出荷前の製品は外観や風味が良い状態であることを確認し、箱詰めする。  
定期的に有害菌などの微生物検査を行う。

発酵乳のpH変化



# フロピオン酸菌 スターター培養マニュアル

## 作業工程

## 写真

### ①菌株の準備

食品加工研究センターから提供されるPF-2株はGYP寒天培地にて生育状態や凍結乾燥状態で提供される。(要冷蔵保管)



### ②前培養準備 (マザースターター用)

フロピオン酸菌は脱脂粉乳培地でも培養可能であるが、冷凍、冷蔵で保管された菌株の生育は遅延する。このため下記に示す組成のGYP液体培地で前培養する。培地各成分を蒸留水100mlに加えて溶解する。オートクレーブにて121°C、15min.滅菌を行う。滅菌後、常温にて放冷する。



### ③菌株接種

GYP寒天培地から生育したPF-2株を1白金耳削りとり、GYP液体培地に無菌的に接種する。接種後、よく振って溶解混合する。35°Cにて培養する。培養後18~24時間で $10^7 \sim 10^8$ cfu/mlに達する。培養後、液体培地は濁りを生じる。



培養前

培養後

#### GYP液体培地組成 (100ml)

ブドウ糖	1.0g
酵母エキス	1.0g
ペプトン	0.5g
肉エキス	0.2g
酢酸ナトリウム	0.2g
salts solution*	0.5ml
Tween80溶液** (50mg/ml)	1.0ml

\* salts solutionの調製

下記の無機塩を加えて100mlにする。

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4.0g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.2g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2g
NaCl	0.2g

\*\* Tween80溶液の調製

Tween80 5gを100mlに希釈する。

## ④脱脂乳培地の準備（バルクスターター用）

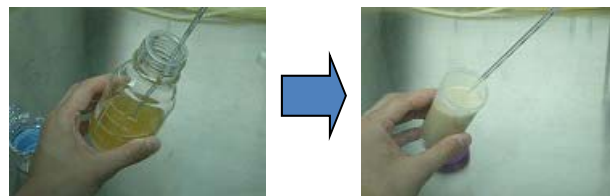
10%脱脂粉乳培地造るを調整する。  
調整量は使用する原料乳にあわせる。  
（原料乳に対して0.05～0.1%添加）

脱脂粉乳と蒸留水を1:9で混合、よく攪拌溶解する。  
オートクレーブにて121℃、15min.滅菌を行う。  
滅菌後、常温にて放冷する。



## ⑤菌株接種

GYP液体培地から生育したPF-2株を0.1%量ピペット  
でとり、脱脂乳培地に無菌的に接種する。  
接種後、よく振って溶解混合する。  
35℃にて培養する。培養後18時間で脱脂乳培地は  
凝固し、バルクスターターとして製造に利用可能な  
プロピオン酸菌が調製される。



## ⑥菌株の保管

製造に使用するバルクスターターは使用時に都度調製する。  
余剰のバルクスターターは、冷蔵保管（5℃が望ましい）  
で1週間程度保存でき、これをマザースターターとして利用できる。

スターターの継体培養は乳酸菌スターターの培養(p39)を参照する。

## 参考

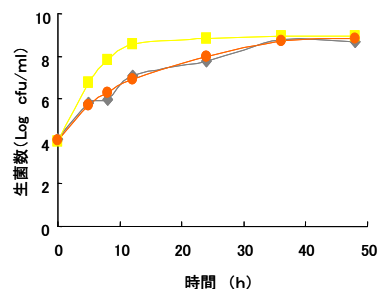
菌株を集菌保存する必要がある場合は③のGYP液体培地  
を用いて培養し遠心分離して集菌する。

菌数を測定する必要がある場合はGYP寒天培地に塗抹し  
形成したコロニーをカウントするか、分光光度計、プレート  
リーダーを用いて菌液の濁度を測定する。

プロピオン酸菌は脱脂乳培地で生育しますが炭素源として乳酸を使用する速やかに生育します。  
乳酸培地、ホエイ培地などが利用できません。



プレートリーダー



プロピオン酸菌の増殖

- ◆ グルコース
- ラクトース
- 乳酸



## II. 専用溶離液の作成

①A液：アセトニトリル：60mM酢酸ナトリウム緩衝液（6：94）＜最終 pH5.60＞

②B液：         "                 "                 "                 (60：40)＜最終 pH6.95＞

### 調製方法

- ・ 酢酸 Na 三水和物（1mol=136.08g）16.33g を蒸留水で 2 L にメスアップ
- ・ A 液は 2 L ビーカーにアセトニトリル 90ml と酢酸 Na 水溶液 1410ml を別々に加え、50%酢酸にて pH を 5.60 に調整する。
- ・ B 液は 1 L ビーカーにアセトニトリル 600ml と酢酸 Na 水溶液 400ml を別々に加え、50%酢酸にて pH を 6.95 に調整する。
- ・ 調製した各溶離液を容器ごと超音波洗浄機に浸し、水流アスピレーターにて 20 分間、脱気する。

注 1) 必要な試薬   ・アセトニトリル（HPLC 用）  
                          ・酢酸 Na 三水和物

注 2) PTC アミノ酸において、溶離液の pH はアミノ酸ピークの分離に大きく影響するので、シビアな調整が必要。

ピーク分離は pH 及び HPLC 流路長により変わるため、予備試験による条件確立が必要。

## III. PTC 誘導体化

①試料液およびアミノ酸混合標準液を必要量（注 2）エッペンドルフチューブに採取。



②真空乾燥機で減圧乾燥する。（45℃）





- ③ エタノール／精製水／トリエチルアミン (TEA) 混合溶液 (2:2:1) 20  $\mu$ l 加え、攪拌。
- ④ 減圧乾燥 (45°C)
- ⑤ エタノール／精製水／TEA／PITC 混合溶液 (7:1:1:1) 20  $\mu$ l 加え、攪拌。
- ⑥ 室温にて 20 分間反応させる。
- ⑦ 減圧乾燥 (45°C)
- ⑧ 分析まで冷凍保存 (-20°C)。一応 3 ヶ月使用可能であるが、できれば、用事作成。
- ⑨ 分析時に溶離液 A を 1ml 加え、溶解する。
- ⑩ 1 ml シリンジを利用して 0.2  $\mu$  m DISMIC フィルターにかけ、HPLC 用バイアルに移し HPLC に供する。



- 注 1) 必要な試薬
- ・ アミノ酸標準液 H 型、B 型、グルタミン、アスパラギン
  - ・ トリエチルアミン
  - ・ イソチオシアン酸フェニル
  - ・ エタノール

注 2) アミノ酸混合標準液は 2.5  $\mu$  mol/ml のものを各々 10  $\mu$ l ずつ加える。

H 型と B 型はそのまま、Gln、Asp は調製したものを 10  $\mu$ l、合計 40  $\mu$ l。

試料液は 50  $\mu$ l。(このとき、標準アミノ酸に対し、試料液は 5 倍投入されている。)

#### IV. HPLC 条件

- ①HPLC シマズ Prominence
- ②Column TOSO ODS-80T<sub>s</sub> 25cm+15cm
- ③Col.Temp. 40°C
- ④Flow Rate 1.0ml/min.
- ⑤Eluate Asol. CH<sub>3</sub>CN : 60mMAceticBuffer=6 : 94  
Bsol. CH<sub>3</sub>CN : 60mMAceticBuffer=60 : 40
- ⑥Detector UV254nm
- ⑦Gradient 0 - 7.5 - 25 - 50 - 50 - 70 - 70 - 90 min. 90min./cycle  
0 - 10 - 29 - 62 - 100 - 100 - 0 - 0 % (Bsol.)
- ⑧Inj.vol. 100 μl

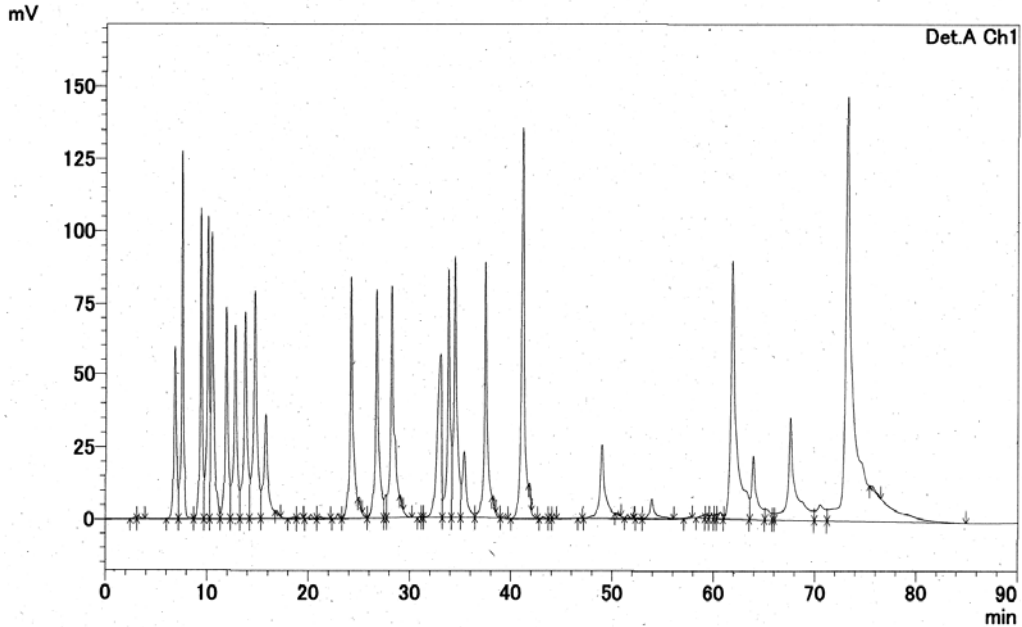
注 1) チーズ中のアミノ酸量は熟成初期は少ないため、標準液の 5 倍量投入。

注 2) 従って、PTC 誘導体化 5 倍×注入量 5 倍=25 倍投入のため、計算注意。

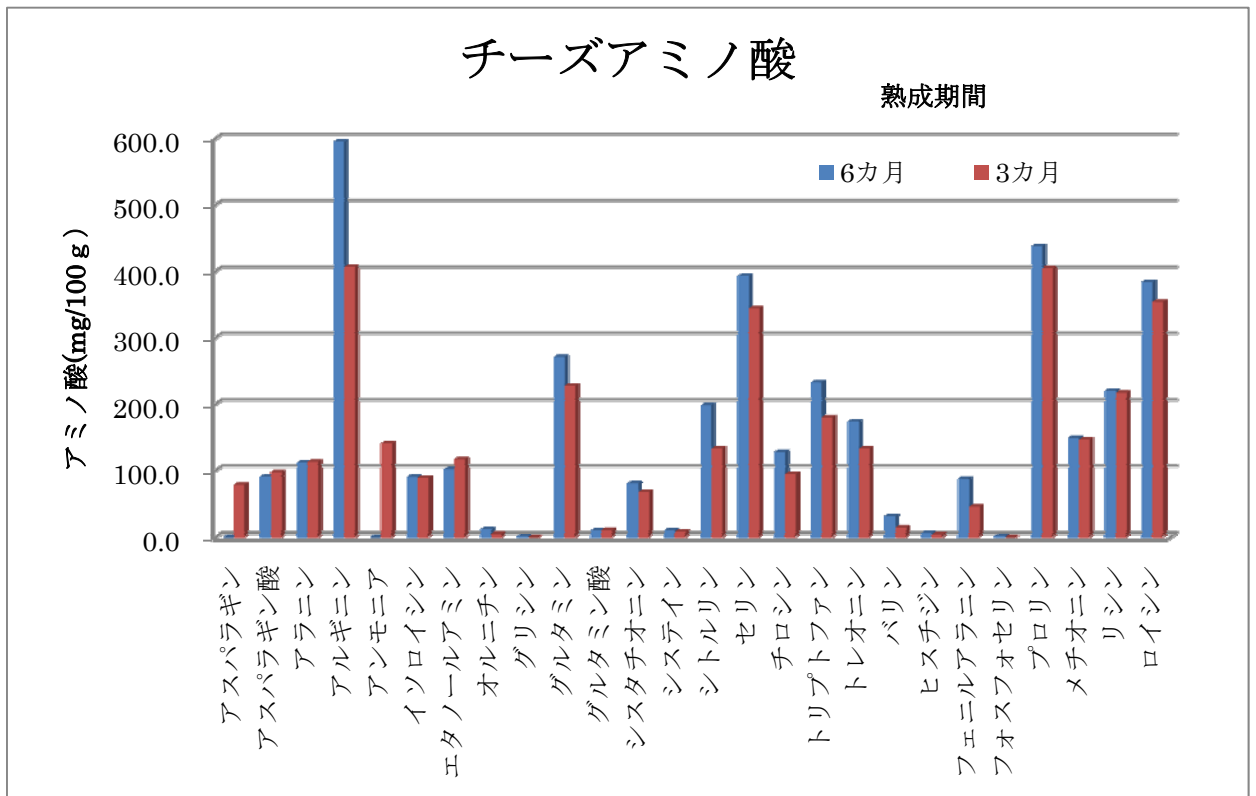
## V. HPLC の結果

HPLC の分析により各アミノ酸のクロマトグラムと定量結果が得られます。

チーズのアミノ酸のうちグルタミン酸は呈味性が高く、旨味に関連し、熟成によって大きく変化するため、チーズ熟成の大切な指標となります。



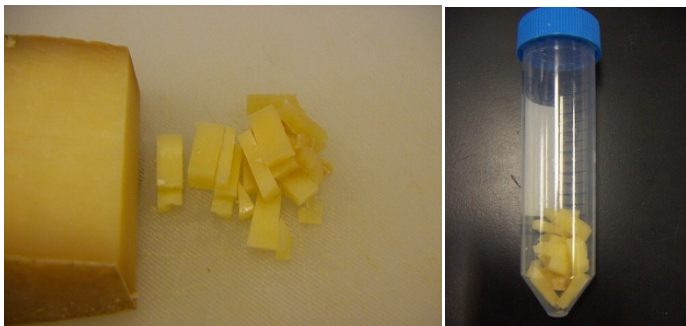
アミノ酸分析クロマトグラム



## チーズの糖分析

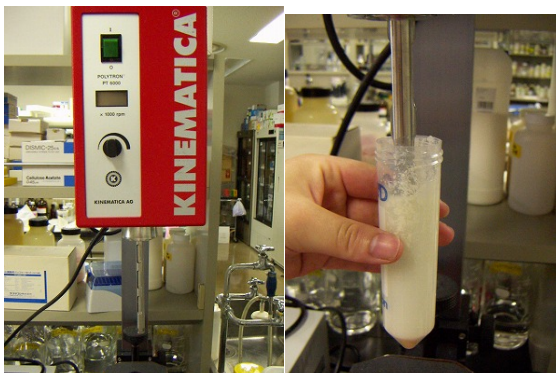
### I. チーズからのアミノ酸抽出

①チーズをナイフで3mm角に細断し、5gを秤量して50ml遠心管に投入する。



②80%エタノール45mlを加え、50mlとする。

③ポリトロンホモジナイザーで10,000rpm、1min.均質化する。



④そのまま、バランスをとり、遠心分離3,000rpm、15min.。

⑤冷凍庫に1晩放置。

⑥シリンジを利用して上澄み液を0.2μm DISMIC フィルターにかける。



⑦ろ液を試料液とする。(チーズの10倍抽出液となる。)

⑧試料液の残りは冷凍保管し、アミノ酸分析に使用する。

注1) 必要な試薬 ・エタノール

注2) 上記の方法はアミノ酸分析の前処理も兼ねることができる。

## II. HPLC 条件

- ①HPLC シマズ Prominence
- ②Column YMC-Pack Polyamine II 25cm
- ③Col.Temp. 40°C
- ④Flow Rate 1.0ml/min.
- ⑤Eluate 85%CH<sub>3</sub>CN
- ⑥Detector RI
- ⑧Inj.vol. 100 μ l

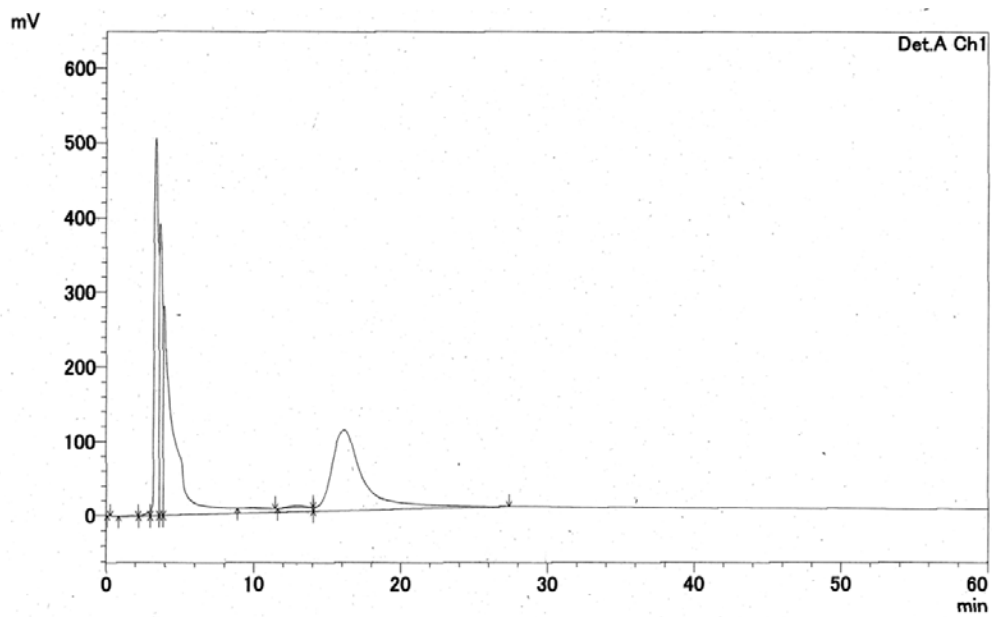


## III. V. HPLC の結果

HPLC の分析により糖のクロマトグラムと定量結果が得られます。

乳製品は乳糖を含み乳酸菌が利用することによって減衰していきます。

下記クロマトグラムでは 16min 付近に乳糖のピークが検出される。



糖分析クロマトグラム