環境真菌，耐熱性カビの分類と制御

Heat-resistant Fungi in Environments, and Their Classification and Control

上田 成一

(長崎県立大学シーボルト校)

Seiichi UEDA

(University of Nagasaki, Siebold, Nishisonogi-gun, Nagasaki 851-2130)

1995年(平成7年)のPL法(製造物責任法)施行によって食品関連の事故についても、製造責任が厳しく問われるようになり、行政機関への食品の苦情届け数から消費段階での事故についてある程度把握できるようになった。東京都がまとめた平成19年度の食品の要因別苦情件数は6,348件であり、カビの発生によるものは166件で全体の3.0%を占める。食品別にみると、農産食品とその加工品(10.6%)が水産食品とその加工品(8.0%)や畜産食品とその加工品(7.0%)より件数が高く、カビの発生による苦情は農産食品とその加工品に多いことがわかる。農産物は圃場で栽培しているときからカビの侵入や付着を受けるが、製造段階で加熱調理または殺菌される加熱加工食品の場合は耐熱性カビの孢子(分生子)や菌糸、酵母の栄養細胞などは低温60~70℃、10分加熱で死滅するため制御は比較的容易である。しかしながら、近年レトルト食品や、ペット詰め飲料などを変敗する耐熱性カビによる加工食品の変敗が増加している。本稿では、加熱加工食品に生残して変敗を起こす耐熱性カビの分類と制御について紹介する。

1. 耐熱性カビとは？

耐熱性カビによる最初の食品事故は、今から80年前の1930年代にイギリスにおいて*Byssoschlamys*による果実加工品の瓶詰・缶詰の変敗にさかのぼる。それ以来、世界各地へ拡大し、現在も加熱殺菌された果汁、果実加工品などでの被害が繰り返し発生しており、原因菌の種類とともに対象食品の品目も増加している⁴⁾。多くの細菌芽胞は100℃以上の強い耐熱性をもつが、カビの場合は75℃、30分の加熱(湿熱)にも生残するカビを耐熱性カビとしている。耐熱性カビの食品からの主な検出事例としては、穀類とその加工品、香辛料、イチゴ果実、ブルーベリー果実、茶葉、野菜の水煮、果実飲料、

茶系飲料、スポーツドリンク、トマトジュース、ジャム、マーマレードなど農産物やその加工品、さらに調味料、ゼリー、プリンほかデザート類などが挙げられる。耐熱性カビの多くは土壌菌のため原材料が土と接触することによって汚染は生じる。*Neosartorya*などの土壌子囊菌類の生活環を例に挙げると、温度・湿度、栄養など生育条件が好適なときは無性時代のサイクルを循環するが、生育環境が悪化すると有性時代に入り耐久型細胞を形成する。耐熱性カビの子囊孢子は通常休眠しており、加熱によって休眠が打破され、発芽する⁶⁾。食品加工段階においては、調理や殺菌工程の加熱処理で休眠が打破されることになる。加熱処理後の二次汚染において、これらのカビが子囊孢子を形成し、耐熱性を獲得するまでの発育は通常考えられないので、耐熱性カビによる食品の汚染は原材料由来の一次汚染か加熱前の製造工程中における製造環境、あるいは加熱殺菌前の包材の汚れなどが原因とみなされる。変敗加工食品から検出される耐熱性カビの種類はユウロチウム菌綱に所属する*Byssoschlamys*, *Eupenicillium*, *Hamigera*, *Monascus*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Xeromyces*などの子囊菌類とそれらのアナモルフ、およびその他の不完全菌類として*Arthrimum*, *Devriesia*, *Paecilomyces*などがある。こうした耐熱性カビは耐熱性細胞を形成する。子囊菌類の場合は、閉子囊殻と子囊内に形成される子囊孢子である。一方、子囊菌類のアナモルフ(無性時代)と不完全菌類の場合は菌核、厚膜孢子、厚壁菌糸、厚壁分生子などがある。加熱加工食品から分離される主要子囊菌の検索表を表1に示す。

2. 耐熱性カビの生態と分布

耐熱性カビは、穀類、香辛料、果実、野菜、茶葉、原糖、ペクチンなどの食品や飲料の原材料から分離される。環境では畑、水田などの農耕地や果樹園の土壌に多く、森林土壌は比較的少ない。作物や果樹などの残渣の

表 1. 食品から検出される耐熱性子囊菌類の検索

1. 閉子嚢殻を作らず、子嚢を菌糸上に裸出して形成；アナモルフは <i>Paecilomyces</i>	<i>Byssoschlamys</i>
1. 閉子嚢殻を作り、子嚢を内生する	2
2. 閉子嚢殻は菌糸のネットからなり柔らか	3
2. 閉子嚢殻は多角形細胞からなる	4
3. コロニーは黄茶～白色、子嚢胞子は $6.5\ \mu\text{m}$ 以上、表面は鱗片状または筋状隆起；アナモルフは <i>Merimbla</i> , <i>Penicillium</i>	<i>Hamigera</i>
3. コロニーは黄色から白色、子嚢胞子は長径 $6.5\ \mu\text{m}$ 以下、表面は刺状または微粗面；アナモルフは <i>Penicillium</i> , <i>Geosmithia</i> , <i>Paecilomyces</i>	<i>Talaromyces</i>
4. 閉子嚢殻は堅く菌核状、中心から徐々に成熟；アナモルフは <i>Penicillium</i>	<i>Eupenicillium</i>
4. 閉子嚢殻は薄い殻壁からなり、菌核状にならない。全体に速く子嚢を形成	5
5. 閉子嚢殻は白～クリーム色、 $20\sim 25^\circ\text{C}$ でよく発育；アナモルフは <i>Aspergillus</i>	<i>Neosartorya</i>
5. 閉子嚢殻は橙黄～橙褐色、 40°C 以上でよく発育 25°C で劣る；アナモルフは <i>Paecilomyces</i>	<i>Thermoascus</i>

図 1. 耐熱性カビの分離法

ある地表に多く、また土壌の付着した農作業の道具や倉庫からも検出される。陸上に限らず低酸素環境の海泥からも検出される。さらに生活環境中のハウスダストにも常在しているが、空中浮遊菌には少ない。日本に限らず世界中に広く分布しているため、今日のように、食料や原材料の多くを海外に依存している現状では、外国から耐熱性カビが国内に持ち込まれる可能性も高い。耐熱性カビの分離には試料を加熱し、子嚢胞子の休眠を打破させる必要がある。これまで、加熱容器としてガラス瓶が用いられてきたが、最近 Houbraeken ら²⁾ は図 1 のようにガラス瓶と比較すると熱の伝導に優れているストマッカー用滅菌ポリ袋をそのまま加熱処理まで用いる方法を提案している。一般に食品材料では耐熱性カビの汚染度が低いので、サンプル量は少なくとも 100 g は必要であり、逆に土壌試料のような高濃度の場合は少量でよい。

3. 耐熱性カビの活性化と耐熱性

耐熱性子囊菌類の子嚢胞子は通常休眠しているが、*Neosartorya fischeri* や *Talaromyces macrosporus* について成熟度の異なる子嚢胞子の微細構造や成分変化が調べられている。内部構造では発芽管となる部分に差が認められ、成分では成熟した胞子に若い胞子にはみられないマンニトールやトレハロースが検出されたことから、休眠状態の胞子における耐久性には多価アルコールや二

図 2. 加熱処理によって発芽した *Neosartorya hiratsukae* の子嚢胞子

糖類による胞子内部の水分活性の低下、膜の安定性などが関与しているものと考えられている。そのため、休眠の打破には加熱処理による活性化が必要であり、処理後に胞子が図 2 のように発芽する。筆者らは種々の耐熱性カビの子嚢胞子の加熱による活性化（発芽）を調べ、菌種や菌株によって活性化のパターンが異なることを観察している。標準的な活性化パターンは図 3 に示すように、低い温度では大部分の子嚢胞子は活性化を受けない休眠期、温度が上がるにつれ活性化が起き発芽率も上昇

図3. 子嚢胞子の加熱による活性化パターン

し始める活性化期，大部分の子嚢胞子が発芽する活性安定期，加熱による傷害が生じ始める不活化期，すべての子嚢胞子が死滅する死滅期の5段階に分けられる．この活性化パターンは子嚢胞子を加熱するときに用いる加熱媒体の種類によっても，また子嚢胞子の成熟度（前培養期間）によっても異なる．

製造加工時の加熱殺菌に用いられる殺菌温度の設定は，子嚢胞子の D 値と z 値を基準にして定められる． D 値を測定する場合の注意点として少なくとも 80°C を含めた3段階の温度で加熱する必要があるが，前述の不活化期の温度を参考にすると D 値が求めやすい．また，子嚢胞子の接種は少なくとも 10^5 cfu/ml 量を用いる． D 値の測定において生残菌数を計測するには，寒天平板培養法（コロニー数測定法）が一般的であるが，発芽した子嚢胞子がコロニーを形成するまでに数日を要するので，迅速性に問題があった．筆者ら⁷⁾は迅速化するため，加熱処理後の子嚢胞子を液体培地でマイクロプレートを用いて培養し，子嚢胞子が発芽する段階で生残を評価する発芽率測定法を考案し，コロニー数測定法と比較したところ有意差は認められず，新規の D 値測定法として提案した（日本食品微生物学会学術講演会第29回要旨集，p. 73, 2008）．

これまで耐熱性カビの子嚢胞子の耐熱性に関する研究は，主として耐熱性試験に供試する菌株の前培養の培地と前培養の期間（供試する子嚢胞子の成熟度）や耐熱性を測定するときに使用する加熱媒体に関するものが多い．これらのパラメーターは試験結果に大きな影響を及ぼす．一般に培養期間が長くなり子嚢胞子の成熟度が増すと耐熱性も高まることが知られている．耐熱性試験に用いる子嚢胞子は，カビの種類によって成熟の速度も異なるが，培養期間は1カ月ほどが求められる．加熱媒体についての報告は糖，pH，有機酸に関するものが中心で，糖は加熱中に子嚢胞子に対して保護的に作用し，耐熱性を増大する．有機酸は耐熱性を増大させるものだけでなく，フマル酸，安息香酸，ソルビン酸は耐熱性を減少させ，その作用は低い pH で効果が増す．このように耐熱性は胞子および環境要因によって変化するが，食品汚染主要子嚢菌類の子嚢胞子の耐熱性は $80\sim 90^{\circ}\text{C}$ の

温度範囲で示されており， D 値の温度と時間は属，菌種などによって異なる^{1, 5, 6)}．

4. 耐熱性カビの制御

耐熱性カビによる加熱加工食品の変敗は前述したように主として土と接触した原材料の一次汚染に起因することから，良質の原材料を用いること，可能なら加工前に原材料を次亜塩素酸ナトリウム液あるいは電解水などで洗浄することが勧められる．この処理より付着している耐熱性カビの菌数は減少し，製造工程における加熱殺菌の効果は上がる．また，最近，加熱に代わる殺菌の手段として超高压処理による耐熱性カビの不活化の研究もみられる．カビの菌糸は超高压の $200\sim 300$ MPa（メガパスカル）で処理すると不活化するが，子嚢胞子を不活化するには 600 MPa の超高压に加えて 60°C の高温環境が必要とされている¹⁾．しかしながら，温度を上げると食品の味覚・臭覚・視覚などのテクスチャーが損なわれるため，これをできるだけ最小限にとどめる条件設定が必要となる．

静菌的な制御方法としては，亜硫酸，安息香酸ナトリウム，ソルビン酸カリウム，乳化剤などの食品添加物の使用も効果が認められている．各種乳化剤の耐熱性カビ *Neosartorya quadricincta*, *Talaromyces macrosporus*, *Byssoschlamys nivea* に対する抑制作用が市販飲料を用いて調べられているが，ショ糖脂肪酸エステルが強い抑制作用を示し，その抑制作用はショ糖脂肪酸エステルの構成脂肪酸種によって異なりパルミチン酸の効果が大きく，かつモノエステル含量が高いほど強い効果を示している³⁾．筆者らもショ糖パルミチン酸エステルの各種耐熱性カビに対する抑制効果を調べているが，その効果は菌種，菌株によって異なる知見を得ている．

また，加熱加工食品のカビ制御に静菌的な方法であるガス置換包装 (modified atmosphere packaging; MAP) がある．MAP はガスバリア性の高い包剤を使用し，容器中の空気を脱気後， CO_2 , N_2 などのガスを使用して気相を調整してカビの生育を抑制する方法である．普通 CO_2 濃度が高いほど抑制効果がある．しかしながら耐熱性カビの *Byssoschlamys* を含む *Fusarium* spp., *Geotrichum candidum*, *Mucor* spp., *Penicillium requieforti*, *Xeromyces bisporus* は CO_2 ガスが高濃度であっても生育に影響を受けにくいという．筆者らは CO_2 と N_2 混合ガスの *Neosartorya glabra*, *N. hiratsukae*, *N. spinosa*, *Talaromyces macrosporus*, *T. bacillisporus*, *Hamigera avellanea* など耐熱性カビの子嚢胞子に与える発芽阻害を調べたところ，1カ月後， CO_2 濃度 10% で寒天平板培地上のすべての菌種の子嚢胞子の発芽は阻害できるが，液体培地中では菌種によって発芽阻害を受ける CO_2 濃度は異なり，70% でも発芽阻害を受けない菌もみられた．

以上のように良質な原材料を用いることが，耐熱性カ

ビのリスクを軽減させるのに最も重要であり、低酸素環境や高温環境でも生残する耐熱性カビの制御については食品の品質を含めてさらに検討すべきであり、今後の課題といえる。

文 献

- 1) Dijksterhuis, J.: Heat-resistant ascospores: Food Mycology. Dijksterhuis, J. and Samson, R. A. (eds.), p. 101-117. CRC Press, New York (2007).
- 2) Houbroken, J. and Samson R. A.: Standardization of methods for detecting heat resistant fungi: Advances in food mycology. Hocking, A. D., Pitt, J. I., Samson, R. A. and Thrane, U. (eds.), p. 107-111. Springer, New York (2006).
- 3) 松本直子, 諏訪信行, 鍛冶 孝, 富田晶暁: 清涼飲料におけるショ糖脂肪酸エステルの子嚢胞子抑制効果. 缶詰時報, **82**, 169-178 (2003).
- 4) 宇田川俊一: 加熱加工食品での耐熱性カビの汚染. 食品のカビ汚染と危害. 宇田川俊一(編), p. 175-187. 幸書房, 東京 (2004).
- 5) 宇田川俊一: 耐熱性真菌. 食品のストレス環境と微生物. その挙動・制御と検出. 伊藤 武, 森地敏樹(編), p. 97-109. サイエンスフォーラム, 東京 (2004).
- 6) 宇田川俊一, 矢口貴志: 耐熱性子嚢菌類の分類と同定. ソフト・ドリンク技術資料, **135**, 295-323 (2001).
- 7) 上田成一, 川良 希, 矢口貴志, 宇田川俊一: 変敗果実加工品から分離された耐熱性カビ *Neosartorya paulistensis* の生育性状と耐熱性. 日菌報, **50**, 104-113 (2009).