苦情食品ミニドーナツから分離された *Trichosporonoides nigrescens* の生育性状

坪内 春夫・加藤 陽康

(名古屋市衛生研究所)

(受付 平成 13 年 11 月 23 日)

(受理 平成 14 年 6 月 1 日)

Growth Characteristics of *Trichosporonoides nigrescens* Isolated from Spoiled Mini-doughnut

Haruo TSUBOUCHI and Haruyasu KATO

(Nagoya City Public Health Research Institute, 1-11 Hagiya-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8615)

A xerophilic fungal strain S-1430 isolated from a spoiled mini-doughnut (a_w 0.81) was identified as *Trichosporonoides nigrescens* morphologically and physiologically. This isolate grew well on MY50G agar (a_w 0.89) at 25°C, and grew in YES and YEG broth containing 5% (w/v) ethanol, but not 6% (w/v).

This was the first isolation of this fungus from processed foods on the market.

Key words: *Trichosporonoides nigrescens*, Growth characteristics, Food spoilage

緒 言

平成 12 年 6 月に発生した低脂肪牛乳による食中毒事件以降、消費者が今まで抱いていた「衛生管理が行き届いた大企業製の食品は安全である」という神話は崩れ去った。そのため、今までは比較的無感であった人々までが食品に対して厳しい目で見向き合い、苦情食品は毎日のように行政機関に届けられ、一部は大きくマスコミに取り上げられた。この傾向は当名古屋市においても例外ではなく、この年の苦情件数は例年の 2 倍以上に達した。このような苦情食品では異物混入によるものが最も多く、カビに起因するものもかなり多く含まれていた。そしてカビによる苦情の原因食品では菓子類が最も多かった。菓子類は包装技術の改良、乾燥剤、脱酸素剤、アルコール保存剤の使用などにより保存期間が一層延長された。しかし、最近菓子類から新たなカビによる汚染が報告されている^{12, 15~17, 19}。特に好乾菌による汚染^{17~19}が注目されている。

今回、油菓子に白いカビが発生しているとして持ち込まれた苦情食品から *Trichosporonoides nigrescens*⁵⁾ が分離された。この菌は 1977 年に Hocking らがオーストラリアで、腐敗した自家製ジャム（マーマレード）か

ら分離・同定し、新種として報告した好乾性菌である。しかし、その後 *T. nigrescens* の分離例はなく、しかも市販製品から分離した例は今回が初めてである。

材料および方法

1. 苦情食品の概要

平成 12 年 12 月 9 日に F 県で名古屋市内の女性が姉（F 県に在住）と油菓子（ミニドーナツ）を購入し、翌 10 日喫食した。そのときカビが発生していることに気づき近くの保健所に苦情食品として届け出た。また、姉が購入した製品にも白いカビが生えていたことを確認した。

この苦情品の、賞味期限は平成 12 年 12 月 10 日で、製造日は 60 日前であることがわかった。製品の原材料は小麦粉、砂糖、植物性油脂、鶏卵、蜂蜜、ショートニング、ソルビトール、ココアパウダー、脱脂粉乳、ココナッツ、食塩、膨張剤でアルコール保存剤が使用され、他の保存料は使用されていない。

2. 苦情食品の性状試験

苦情食品となったミニドーナツと同じ商品を購入し（対照）、25°C での水分活性値 (a_w) を水分活性計（G. Luftt 社製, Model 5803）で、エタノール濃度 (w/w) をガスクロマトグラフィー¹¹⁾ で、Brix 糖濃度をアッペ屈折計（アタゴ光学器械(株)製, No. 301）でそれぞれ測定した。

3. 菌の分離と同定

30% グルコース加麦芽エキスイ寒天培地 (MY30A; ペプトン 5 g, 酵母エキス 5 g, 麦芽エキス 20 g, グルコース 300 g, 寒天 20 g, 水 1,000 ml) を用いて, 苦情食品のミニドーナツから白いカビ (S-1430 株) を分離した。そして, ジャガイモ・ブドウ糖寒天培地 (PDA), MY30A, オートミール寒天培地 (OA), MY50GA¹³⁾, M70GFA¹³⁾ に 25°C, 21 日間培養し, さらに, PDA と MY30A では 5°C と 37°C でも培養し観察した。

4. S-1430 株の分生子浮遊液

S-1430 株を MY30A に 25°C, 7 日間培養後, 分生子を 0.05% ツィーン 80 水溶液に浮遊させ, $10^4 \sim 10^5/\text{ml}$ になるよう調製した。

5. エタノール添加液状培地における S-1430 株の生育と培地中エタノールの消長

滅菌した 15% スクロース加酵母エキス液状培地 (YES; 麦芽エキス 10 g, 酵母エキス 20 g, スクロース 150 g, 水 1,000 ml) と 15% グルコース加酵母エキス液状培地 (YEG; 麦芽エキス 10 g, 酵母エキス 20 g, グルコース 150 g, 水 1,000 ml) 50 ml を 100 ml の滅菌三角フラスコに採り, エタノール (特級, 片山化学製) を 0 (無添加) から 7% (w/v) になるよう添加した。そこに, S-1430 株の分生子浮遊液を 1 白金耳接種し, 14~21 日間, 25°C で培養し, 50 ml の遠沈管に移し遠沈, 水洗後, 100°C で乾燥し重量を測定した。さらに, 培地中のエタノール濃度 (% w/v) をガスクロマトグラフィー¹²⁾ により測定した。

6. 糖類の発酵試験

発酵試験用培地⁶⁾ 9 ml をダーラム管の入った試験管に入れ, スクロース, グルコース, ラクトース, マルトース, ガラクトース, トレハロース, メレチトースの 20% 水溶液 1 ml を各々加えた後, S-1430 株の分生子浮遊液を 1 白金耳量接種し, 25°C で 3 週間培養した。培養後, ガスの発生の有無を観察した。

7. 炭素化合物同化試験

10 倍濃度の Wickerham 炭素化合物同化試験用培地を用いる方法²⁾ で行った。なお, スクロース, グルコース, トレハロース, マルトース, ガラクトース, ラクトース, ラフィノース, ガラクチトール, メルビオース, セ

レビオース, ソルビトール, イノシトール, リビトール, メレチトース, キシロース, キシリトール, メチルグルコサイド, アラビノース, グルコサミン, 2-ケトグルコネート, エタノール, グリセリン, パラチノースは 0.5~1% 水溶液を, スクロース, メルビオースおよびメレチトースは 2% 水溶液を用いた。

以上の形態学的観察と生化学的な試験により Hocking ら⁵⁾ の記載と Inglis ら⁷⁾ の報告に従い S-1430 株を同定した。

結 果

1. 苦情食品となったミニドーナツの性状

対照として用いたミニドーナツの a_w は 0.81, Brix 糖度は 37.2%, エタノール濃度は 0.66% (w/w) であった。

2. S-1430 株の寒天培地における生育

S-1430 株を PDA, MY30A, MY50GA, OA, MY70GFA で培養した結果を Table 1 に示した。S-1430 株は MY70GFA では 25°C, 21 日間では生育しなかったが 40~50 日間培養したところ, 2~3 mm 程度の生育が認められた。25°C では S-1430 株は MY30A で最も良く生育し, MY50GA や PDA でも比較的良く生育した。OA での生育は良くなかった。また, 5°C および 37°C では PDA, MY30A とも生育しなかった。

3. S-1430 株の 25°C での寒天培地上の形態と同定

S-1430 株を PDA, MY30A に 25°C, 7~21 日間培養後に形態を観察した。

PDA, 7 日後のコロニー表面は菌糸が薄く皺が多いいわゆる脳状 (cerebriform) で中心部は隆起 (3~5 mm) していた。コロニーの色は灰黄色~マスタード黄色 (3B6~4B6)⁹⁾ で培養日数が長くなるに伴い濃くなり, 14 日後では灰黄色 (4C6), 21 日後にはオリーブ褐色 (4E5) からスモーク褐色 (4F2) となった。

MY30A, 7 日後のコロニー表面は菌糸が密に覆い比較的滑らかで皺は見られず, 全体に隆起 (2~3 mm) していた。コロニーの色はコーン黄色 (4B5) で周辺部は白色であった。培養日数が長くなると皺が多くなり, 色も濃くなった。14 日後にはオレンジ褐色 (5C5), 21 日後にはコーヒー色 (5F7) となった。

MY30A で 25°C, 7 日間培養したコロニーを顕微鏡観

Table 1. Growth of *Trichosporonoides nigrescens* S-1430 on various agar media

Medium	Dia. of colony (mm)				
	5°C		25°C		37°C
	21 days	7 days	14 days	21 days	21 days
PDA	—*1	8- 9	12-14	17-18	—
MY30A	—	15-17	23-25	30-32	—
MY50GA	/ *2	10-11	13-15	18-20	/
OA	/	2- 3	4- 5	7- 8	/
MY70GFA	/	—	—	—*3	/

*1: No growth. *2: Not examined. *3: After 40-50days, colonies were 2-3 mm diam.

察した (Fig. 1). 出芽胞子は培養初期には透明, 2 週間以上経つと茶褐色を呈した. 出芽胞子は滑面, 垂球形~楕円形で偽菌糸から出芽し求頂的に連鎖した. 出芽胞子の大きさは $4.5 \sim 7.0 (\sim 8.0) \times 4.0 \sim 6.5 (\sim 7.5) \mu\text{m}$ であった. 分節胞子は 7 日間以上の培養で観察され, 透明で滑面, 長円形~たる形, 大きさは $7.0 \sim 9.5 \times 2.5 \sim 4.0 \mu\text{m}$ であった. なお, PDA では分節胞子は観察されなかった.

以上の形態学的特徴と PDA, 37°C では生育しないことから, S-1430 株は *Trichosporonoides nigrescens* Hocking et Pitt, sp. nov. と同定した.

4. エタノール添加液状培地における S-1430 株の生育とエタノール残量

YEG および YES 液状培地にエタノールを添加し, 菌体重量と培地中のエタノール量を測定した (Table 2).

S-1430 株は YES よりも YEG で良く生育した. YEG

Fig. 1. *Trichosporonoides nigrescens* S-1430. Blastoconidia (A) and arthroconidia (B) in slide culture on MY30A. Scale bars: $10 \mu\text{m}$.

Table 2. Growth of *Trichosporonoides nigrescens* S-1430 and residue of ethanol in the broth

Ethanol (%) ^{*1} added to the broth	Residue of ethanol (%)			Mycelial dry weight (g)		
	Incubation time (days)			Incubation time (days)		
	7	14	21	7	14	21
YEG Broth						
0.0	1.1	1.1	0.0	0.23	1.10	1.78
4.5	3.6	5.4	3.0	0.03	0.45	1.35
5.0	4.3	4.4	5.6	0.02	0.17	0.42
6.4	5.3	4.3	4.3	<0.01	0.03	0.17
6.8	5.8	4.7	3.9	— ^{*2}	<0.01	0.01
YES Broth						
0.0	0.1	0.0	/ ^{*3}	0.07	0.13	/
1.8	1.7	1.4	/	0.04	0.17	/
3.3	3.2	3.3	/	0.02	0.07	/
5.1	5.0	4.9	/	0.02	0.02	/
6.6	6.7	6.6	/	—	—	/

The strain was incubated in the YEG and YES broth at 25°C .

^{*1}: w/v. ^{*2}: No growth. ^{*3}: Not examined.

Table 3. Physiological characteristics of *Trichosporonoides nigrescens* S-1430

Compounds	Fermentation or growth
Fermentation	
Glucose	+
Galactose	+
Sucrose	—
Maltose	+
Lactose	—
Trehalose	—
Melezitose	—
Growth on carbon compounds	
Glucose	+
Galactose	+
D-Glucosamine	—
D-Xylose	—
L-Arabinose	—
Sucrose	—
Maltose	+
Trehalose	—
Methyl-D-glucoside	—
Cellobiose	+
Melibiose	—
Lactose	—
Raffinose	—
Melezitose	—
Glycerol	+
Erythritol	+
Ribitol	—
Xylitol	—
Galactitol	—
Sorbitol	+
Inositol	—
Palatinose	+
2-Keto-D-gluconate	—
Ethanol	+

培地ではエタノールを 6.4% 添加した場合、7 日後（培地中のエタノール濃度；5.3%）に生育が認められ、6.8% 添加した場合は（培地中のエタノール濃度；5.8%）生育は認められず、14 日後（培地中エタノール濃度；4.7%）では生育が認められた。YES 培地ではエタノールを 5.1% 添加した場合 7 日後（培地中のエタノール濃度；5.0%）に生育が認められ、6.6% 添加した場合には生育は認められなかった。また、いずれの培地でも菌の生育期間を長くしても、エタノール濃度が上昇することはない。

5. S-1430 株の糖類発酵性と炭素化合物の同化性

Table 3 に S-1430 株の糖類発酵性と炭素化合物の同化性の結果を示した。

S-1430 株の発酵性を 7 種類の糖で行い、グルコース、ガラクトース、マルトースを添加した培地で発酵性が認められた。

炭素化合物同化性試験では、検査した 24 種類の物質のうち、グルコース、ガラクトース、マルトース、セロビオース、グリセリン、エリスリトール、ソルビトール、パラチノース、エタノールで S-1430 株は生育が認めら

れた。

考 察

Trichosporonoides nigrescens は 1977 年に Hocking らがオーストラリアで自家製の腐敗したジャムから分離し、 a_w 0.75 でも生育する好乾菌の新種として記載⁵⁾した。また、Inglis ら⁷⁾は *Trichosporonoides spathulata*¹⁾, *T. oedocephalis*³⁾, *T. nigrescens*⁵⁾, *T. megachiliensis*⁷⁾, *T. madida*¹⁾, *T. australiense*¹⁴⁾ について、糖の発酵性と炭素化合物同化性の違いにより *Trichosporonoides* と *Moniliella* の分類キーを提示した。これらの文献を参考にし、苦情食品のミニドーナツから分離した白いカビ (S-1430 株) を *Trichosporonoides nigrescens* と同定した。*T. nigrescens* S-1430 株は MY50GA (a_w 0.89) で良く生育し、MY70GF (a_w 0.76) でも 40～50 日後には 2～3 mm まで生育する好乾菌であった。そのため、苦情食品となったミニドーナツの a_w は 0.81 と低かったが、菌の生育は十分可能であったと考えられる。

しかし、苦情食品は揮発アルコールを利用したエタノール保存剤が使用されていた。Kanai ら⁸⁾は一部の細菌や酵母では揮発エタノールがろ紙へ約 30% 以上吸着されると死滅作用が見られたと報告している。また、細菌と真菌を用いた山下ら^{20, 21)}は揮発エタノールが微生物に直接作用しているのではなく、寒天培地（食品）に吸収されるエタノール (6～10%) が微生物の増殖を阻害すると報告している。

T. nigrescens S-1430 株はエタノール濃度 5 % の液状培地では生育し、6% では生育できなかった (Table 2)。このためミニドーナツのエタノール吸着濃度が 6% 以上であれば *T. nigrescens* の生育を抑制することができることになる。しかしミニドーナツのエタノール吸着量が 0.66% であったため生育したと考えられる。この原因として一般に、市販食品とりわけ低 a_w 食品では実験室とは異なり製品の大きさや形態、表面構造、硬さ、水分含量などによりエタノールの吸着量は変わると考えられる。さらに、保存時の温度や湿度の変化に伴い、包装内に結露が生じ部分的にエタノール吸着濃度が低下し、カビに対する保存効果が失われるおそれもある。そのため、食品への吸着エタノール濃度は液状培地で得られた菌抑制濃度より高くする必要がある。さらに、*T. nigrescens* のような好乾菌の生育を抑制するには長期間の保存期間中に、食品に吸着されたエタノールが抑制濃度以下にならないような包装をすることも重要なことである。

今回の苦情の原因は①吸着エタノールが製造直後には保存効果を示す濃度であったが、製造後 60 日間という長期間、保存・販売されていたため減少し菌が生育した。②製造時に使用されたエタノール保存剤の容量が少なく、吸着エタノールが保存効果を示す濃度に達していなかった。のいずれかが推測された。

平成7年、厚生省生活衛生局長通知「食品衛生法に基づく表示について」¹⁰⁾により、それまでの製造年月日表示に変わり消費期限、品質保持期限（賞味期限）表示になった。しかし、大部分の食品では品質保持（賞味）期限は食中毒菌などの細菌や中湿性のカビを使用した実験結果を基に定めているのが現状である。このため、中湿菌では生育できない低 a_w の食品では品質保持（賞味）期限が長く設定され、好乾菌が発育し苦情食品となることがある。事実、苦情食品の調査^{4, 15)}や食品汚染カビの調査^{12, 16, 17, 19)}では低 a_w の菓子類に好乾菌が発育した事例が大半を占める。今後は好乾菌をも対象にした品質管理をするとともに、安心できる品質保持期限（賞味期限）の設定をし、苦情食品の発生を予防する必要がある。

要 約

苦情食品として持ち込まれたアルコール保存剤が入った油菓子（ミニドーナツ、 a_w 0.81）を汚染していた白いカビは分離した菌株の培地における生育性状および生化学的試験の結果から *T. nigrescens* と同定された。本菌が市販食品から分離されたのは今回が初めてである。

本菌はアルコールの発酵能力は弱く、液状培地を用いたアルコール耐性試験ではエタノール濃度が5%では生育するが、6%では生育できなかった。

また、*T. richosporonoides* は MY50GA (a_w 0.89) に良く生育し、MY70GFA (a_w 0.76) にも生育する好乾菌である。

本論文の要旨は第22回日本食品微生物学会学術総会（平成13年10月、大阪市）で発表した。

文 献

- De Hoog, G. S.: Taxonomic review of *Moniliella*, *Trichosporonoides* and *Hyalodendron*. The black yeasts, II: *Moniliella* and allied genera, Studies in Mycology, No. 19, De Hoog, G. S. (ed.), p. 1-36, Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn (1979).
- 後藤昭二: 酵母の分類と同定試験法。微生物の分類と同定。長谷川武治編。p. 179-181, 学会出版センター, 東京 (1984).
- Haskins, R. H. and Spencer, J. F. T.: *Trichosporonoides oedocephalis* n. gen., n. sp. I. Morphology, development, and taxonomic position. *Canad. J. Bot.*, **45**, 515-523 (1967).
- 一言 広, 諸角 聖, 和宇慶朝昭: 苦情食品における真菌の食品損傷と喫食事故。食品と微生物, **42**, 149-155 (1987).
- Hocking, A. D. and Pitt, J. I.: *Trichosporonoides nigrescens* sp. nov., a new xerophilic yeast-like fungus. *Antonie van Leeuwenhoek*, **47**, 411-421 (1981).
- 堀江義一, 宇田川俊一: 処方集。菌類図鑑下, 宇田川俊一, 椿 啓介, 堀江義一, 三浦宏一郎, 箕浦久兵衛, 山崎幹夫, 横山竜夫, 渡辺昌平編, p. 1278, 講談社, 東京 (1997).
- Inglis, D. G. and Sigler, L.: *Trichosporonoides megachiliensis*, a new hyphomycete associated with alfalfa leafcutter bees, with notes on *Trichosporonoides* and *Moniliella*, *Mycologia*, **84**, 555-570 (1992).
- Kanai, M., Koike, Y., Kuribayashi, H. and Miyazawa, F.: Bacterial effect of evaporated ethanol. *J. Antibact. Antifung. Agents*, **22**, 23-27 (1994).
- Kornerup, A. and Wanscher, J. H.: *Methuen handbook of colour*, 3rd ed., Methuen, London (1989).
- 厚生省生活衛生局長: 食品衛生法施行規則等の一部改正について。平成7年2月17日, 衛食第31号 (1995).
- 宮崎仁志, 加藤陽康, 宮部正樹: 果実飲料中のアルコール濃度について。名古屋市衛研報, **45**, 31-32 (1999).
- 内藤茂三, 関 啓数, 水野龍二: 食パンから分離したエタノール耐性カビの生育性状と汚染源。日食微誌, **17**, 181-187 (2000).
- Pitt, J. I. and Hocking, A. D.: *Fungi and food spoilage*, p. 42, Academic Press, Sydney (1985).
- Ramirez, C.: A new species of *Trichosporonoides* isolated from sweetened orange/mango drink in Australia. *Mycopathologia*, **108**, 25-30 (1989).
- 坪内春夫: カビによる苦情食品。名古屋市衛研報, **41**, 40-44 (1995).
- 坪内春夫, 加藤陽康, 宮部正樹: ブランデーケーキから分離した *Moniliella suaveolens* の生育性状。日食微誌, **14**, 29-33 (1997).
- 坪内春夫, 宇田川俊一, 宮部正樹: 輸入イチゴジャムの汚染菌として分離された *Eurotium halophilicum* の生育性状。日食微誌, **16**, 231-236 (1999).
- 宇田川俊一: 生活環境中の食品菌類, その危害。日食微誌, **13**, 151-157 (1997).
- 宇田川俊一, 戸矢崎紀紘: 輸入チョコレートから分離した好乾性糸状菌 *Chrysosporium farinicola* の生育性状。日食微誌, **17**, 163-169 (2000).
- 山下 勝, 伊藤竜也, 村瀬 浩: 揮発エタノールによる微生物の増殖阻害。発酵工誌, **70**, 101-107 (1992).
- 山下 勝: アルコール類の微生物に対する作用。防菌防黴, **24**, 195-219 (1996).