ピーナッツ, 香辛料および生コーヒー豆由来 *Aspergillus flavus*
菌群のカフェイン抵抗性, とくにカフェイン添加培地に
おけるアフラトキシン産生能について

坪内 春夫*¹, 山本 勝彦*¹, 寺田 久屋*¹
久田 和夫*¹, 坂部 美雄*¹

H. TSUBOUCHI*¹, K. YAMAMOTO*¹, H. TERADA*¹, K. HISADA*¹, Y. SAKABE*¹:
A survey of caffeine-resistant strains of *Aspergillus flavus* group
isolated from peanuts, spices and green coffee beans, with
special reference to their aflatoxin producibility
in caffeine-containing medium

Summary

In 0.5% caffeine-containing yeast extract-sucrose (YES) broth, the growth of 49 strains of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. toxicarius* which were isolated from peanuts, spices and green coffee beans was compared at 25°C after 7 days incubation. Although all strains from the peanuts and spices could not grow well on the caffeine-containing YES broth, the growth of three aflatoxigenic strains and one non-aflatoxigenic *A. flavus* from the green coffee beans was little affected (growth rate: 36.5–54.8%). These strains were confirmed as a caffeine-resistant, by further detailed experiments. Namely, the effects of caffeine on growth and aflatoxin production by the strains and residual caffeine in their culture filtrates were observed on the 0.5% caffeine-containing YES broth at intervals of 5 days in the period of 20 days. For the first 5 days, the growth of these strains was delayed by the addition of caffeine, but the growth was completely recovered after the 10 days. Aflatoxin production of one strain of *A. flavus* was inhibited by caffeine, but the two other strains produced a high level of aflatoxin B₁ in the 0.5% caffeine-containing YES broth, reaching about the same or more amounts as the control after the 15 days of incubation. The added caffeine in the culture of these caffeine-resistant strains was degraded in the range of 10–91%.

緒 言

生コーヒー豆のマイコトキシン汚染調査に関しては, 数多く報告^{1)~6)}されアフラトキシン (AF)⁵⁾, オクトキシン (OCT)^{4)~6)}およびステリグマトシチン⁸⁾の自然汚染が知られている。しかしながら, これらの汚染例は非常に少なく, かつ汚染濃度も非常に低い。

この原因として Buchanan^{7)~10)}らは生コーヒー豆の成分であるカフェインが菌の生育と毒素産生を抑制することと, AF 産生性 *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999株がカフェイン添加培地で形態の変化していること¹¹⁾を電子顕微鏡で観察している。

著者ら⁶⁾も最近輸入生コーヒー豆の汚染カビとマイコトキシン汚染調査を行い, AF は検出されなかったが, OCT-A の自然汚染を認めた。また, 分離した *A. ochraceus* をカフェイン添加 MY-20A で培養し, 菌の生育は遅延するが, 生育が一定に達すると OCT-A の産生量はカフェイン無添加の MY-20A で培養

*¹ 名古屋市衛生研究所 (〒467 名古屋市瑞穂区萩山町1-11) Nagoya City Health Research Institute (1-11, Hagiya-ma-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467)

した場合と変わらないことを報告した。さらにカフェイン添加 YES broth に生コーヒー豆ともち米より分離した2株の *A. ochraceus* を培養し、菌の生育と OCT-A 産生および添加したカフェイン量の消長を経時的に調べ比較したところ^{*2}、生コーヒー豆よりの分離株は、(1)生育は培養初期(5-10日)にはカフェインにより抑制されたが、その後カフェイン無添加 YES broth で培養した対照とほとんど同じ生育曲線を描いた。(2)OCT-A 産生は培養 10-20日でカフェイン無添加 YES broth での産生量と同じか、むしろそれよりも多かった。(3)broth 中のカフェインを培養 10-20日で完全に消失させた。これに対して、もち米より分離した株は、(1)Buchanan らの報告のように菌の生育と OCT-A の産生をカフェインにより強く抑制され、(2)添加したカフェインを減少させる能力のないことを知った。

そこで今回は、AF 産生性 *A. flavus* 群にもカフェインに抵抗する株が存在するかどうかを調べるために、0.5% カフェイン添加 YES broth を用いて、ピーナッツ、香辛料および生コーヒー豆より分離した株について実験した。その結果、生コーヒー豆より分離した AF 産生性 *A. flavus* 3 株と AF 非産生性 *A. flavus* 1 株がカフェインに抵抗性を示したので報告する。

材料および方法

1. 培地 (1)シヨ糖加酵母エキス液体培地(YES)⁽¹²⁾ 一2%の酵母エキス(Difco)と15%のシヨ糖を含む液体培地。(2)カフェイン添加 YES—YES にカフェイン(片山化学)を0.5%(w/v)の濃度に加えたものを用いた。それぞれの培養液 50 ml ずつを200 ml 容三角フラスコに分取、紙栓後 125°C、15分間高圧滅菌して培地とした。

2. 供試菌株 ピーナッツより分離された AF 産生性 *Aspergillus flavus* 15株と AF 非産生性 *A. flavus* 3 株、香辛料より分離された AF 産生性 *A. flavus* 16株と AF 非産生性 *A. flavus* 4 株および生コーヒー豆より分離された AF 産生性 *A. flavus* 7 株と *A. toxicarius* 2 株、および AF 非産生性 *A. flavus* 2 株の計49株を今回の検索に使用した。また、

AF 産生能を比較するための対照株としては、従来からピーナッツ、香辛料、生コーヒー豆分離菌株に対する AF 産生実験に用いた *A. parasiticus* ATCC 15517 株を使用した。供試菌株はそれぞれ PDA 斜面培地に 25°C、7-10日間培養したのち、前報⁽¹³⁾にしたがって滅菌した 0.05% “Tween 80” 水溶液で分生子浮遊液を作製した(分生子数 $1.0 \times 10^7/\text{ml}$)。

3. 培養 YES とカフェイン添加 YES とも、それぞれ2本の培養液に供試菌の分生子浮遊液を2白金耳ずつ接種、25°C、7日間静置培養し、菌体重量と培地中の AF 産生量を測定した。上記の方法でカフェイン添加 YES で比較的良好に生育した菌株(カフェイン抵抗性株)と、対照菌株 *A. parasiticus* ATCC 15517 株についての再実験は、YES とカフェイン添加 YESのそれぞれ2本の培養液に分生子浮遊液を0.1 ml 宛接種し、25°C で20日間培養、5日目ごとに菌体重量、AF 産生量および培地中のカフェイン残存量を測定した。

4. 菌体重量の測定 培養後、菌体をろ過(No. 5 A, 東洋ろ紙)によって分け、その菌体は約 100 ml の蒸留水で2回洗浄したのち、100°C の恒温器で24時間乾燥、デシケータで冷却後、重量を測定した。

5. AF の分析 上記のように分離した培養液 10 ml に 30 ml のクロロホルムを加えて振とうし、2回抽出を行った。クロロホルム層を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下で濃縮乾固した。抽出物にクロロホルム 1 ml を加えて溶解後、薄層クロマトグラフィーにより比色定量した。薄層プレートは DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (Merck, 20×20 cm, 厚さ 0.25 mm) を使用し、クロロホルム—アセトン(9:1, v/v) で展開し、デンシトメーターを用いて定量した。

6. 残存カフェインの分析 カフェイン添加 YES の培養液を一定量とり、高速液体クロマトグラフィー⁽¹⁴⁾によりカフェイン量を定量した。

結 果

I. ピーナッツ、香辛料および生コーヒー豆由来 *A. flavus* 群からのカフェイン抵抗性株の検出

Table 1 にピーナッツおよび香辛料より分離された *A. flavus* を、YES とカフェイン添加 YES で 25°C、7日間培養したときの生育と AF 産生状態を示した。供試した *A. flavus* 38株は、YES では菌体重量が 0.984—1.682 g となったが、カフェイン添加 YES で

*2 坪内春夫、寺田久屋、山本勝彦、久田和夫、坂部美雄：コーヒー豆より分離した *Aspergillus ochraceus* のカフェイン分解とオクラトキシン産生、第20回マイコトキシン研究会講演要旨(1984)

Table 1. Growth and aflatoxins production of *A. flavus* strains isolated from peanuts and spices on YES broth and YES broth containing 0.5% caffeine

Source	No. of strains tested	Mycelial dry weight (g)* ¹		Aflatoxins ($\mu\text{g/ml}$)* ¹			
		YES	YES+caffeine	YES		YES+caffeine	
				B ₁	B ₂	B ₁	B ₂
Peanuts	15 Tox.* ²	1.069-1.447	<0.001	0.166-4.86	0.005-0.522	nd.* ⁴	nd.
	3 Non.* ³	1.218-1.318	<0.001	nd.	nd.	nd.	nd.
Spices	16 Tox.	0.984-1.510	<0.001	0.009-41.2	0.00-5.75	nd.	nd.
	4 Non.	1.261-1.682	<0.001	nd.	nd.	nd.	nd.

*¹: Cultural condition; each isolate was grown on 50 ml of the medium at 25°C, 7 days.*²: Aflatoxigenic strain. *³: Non-aflatoxigenic strain. *⁴: Not detected.Table 2. Growth and aflatoxine production of *A. flavus* and *A. toxicarius* strains isolated from green coffee beans on YES broth and YES broth containing 0.5% caffeine

Organism	Mycelial dry weight (g)* ¹		Aflatoxins (μg/ml)* ¹			
	YES	YES+caffeine	YES		YES+caffeine	
			B ₁	B ₂	B ₁	B ₂
<i>A. flavus</i>						
82-C-1	1.192	0.653 (54.8)* ²	0.648	0.027	0.155	nd.* ³
C-177-5	1.058	0.529 (50.0)	nd.	nd.	nd.	nd.
C-177-7	1.174	0.429 (36.5)	0.254	0.010	nd.	nd.
C-191-103	1.272	0.603 (47.4)	2.28	0.068	nd.	nd.
C-167-24	1.506	<0.001 (0.0)	4.48	0.344	nd.	nd.
C-167-26	1.345	<0.001 (0.0)	0.192	0.023	nd.	nd.
C-167-27	1.227	<0.001 (0.0)	37.2	1.54	nd.	nd.
C-167-32	1.285	<0.001 (0.0)	nd.	nd.	nd.	nd.
C-173-18	1.336	<0.001 (0.0)	83.5	1.60	nd.	nd.
<i>A. toxicarius</i>						
C-167-25	1.735	<0.001 (0.0)	28.8	0.819	nd.	nd.
C-167-102	1.725	<0.001 (0.0)	3.84	0.131	nd.	nd.
Control						
<i>A. parasiticus</i>						
ATCC 15517	1.909	0.001 (0.0)	95.8	3.79	nd.	nd.

*¹: Cultural condition; each isolate was grown on 50 ml of the medium at 25°C, 7 days.*²: Parenthesis shows growth rate (%), calculated as follows; mycelial dry weight on YES broth containing 0.5% caffeine (g)/mycelial dry weight on YES broth (g)×100.*³: Not detected.

はいずれも 1 mg 未満と生育が非常に強く抑制された。また、YES で AF B₁ が産生された 31 株 (0.009-41.2 $\mu\text{g/ml}$) もカフェイン添加 YES ではいずれも AF B₁ は検出されなかった。

Table 2 には生コーヒー豆より分離された 9 株の *A. flavus*, 2 株の *A. toxicarius* と *A. parasiticus* ATCC 15517 株を YES およびカフェイン添加 YES

で 25°C, 7 日間培養したときの生育と AF 産生状態を示した。生コーヒー豆より分離された *A. flavus* 9 株のうち 4 株 (82-C-1, C-177-5, C-177-7, C-191-103) はカフェイン添加 YES でも生育し (生育率 36.5-54.8%), 分生子形成も正常に観察された。しかし、それ以外の 5 株と *A. toxicarius* 2 株, *A. parasiticus* ATCC 15517 株はカフェイン添加 YES

では生育が非常に強く抑制された。また、AF 産生はカフェイン添加 YES では *A. flavus* 82-C-1 株が弱く産生したのみで、他の株はいずれも産生しなかった。

II. カフェイン抵抗性株のカフェイン添加 YES での生育と AF 産生および残存カフェインについて

対照菌として用いた *A. parasiticus* ATCC 15517 株の実験結果を Fig. 1 に示した。YES での生育はよく、15-20日に最高値約 1.4 g となる生育曲線を示した。しかし、カフェイン添加 YES では20日目で 6 mg を示し、カフェインにより強く生育が抑制された。AF 産生は、YES では15日目に最高値 56.2 μg /

ml となる産生曲線を認めた。これに対してカフェイン添加 YES では AF は検出されなかった。さらに、カフェイン添加 YES 培養液中の残存カフェイン量には変化がみられなかった。生コーヒー豆より分離したカフェイン抵抗性 *A. flavus* での結果は Fig. 2~5 のようである。

AF 非産生性 *A. flavus* C-177-5 株についての結果は Fig. 2 に示した。菌の生育は、YES では15日目が最高値の約 1.1 g を示す生育曲線を得ている。これに対してカフェイン添加 YES では、培養5日目には YES より生育が悪かったが、10日目以後は YES での生育と同じかそれよりやや良い生育がみられた。残

A. parasiticus ATCC 15517

Fig. 1. Growth and aflatoxin production of *A. parasiticus* strain ATCC 15517 on YES broth containing caffeine and residual caffeine in the culture filtrates. A: Growth, B: Aflatoxin B₁ production, C: Residual caffeine. Caffeine in YES broth (w/v): —○— 0% (control), —●— 0.5%.

A. flavus C-177-5

Fig. 2. Growth of *A. flavus* strain C-177-5 on YES broth containing caffeine and residual caffeine in the culture filtrates. A: Growth, B: Residual caffeine. Caffeine in YES broth (w/v): See foot note of Fig. 1.

存カフェイン量は培養20日目で約 10% の減少を認めた。

Fig. 3 の AF 産生性 *A. flavus* C-177-7 株の生育は、YES では 15-20日に最高値約 1.3 g を示す生育曲線が得られた。カフェイン添加 YES では培養5日目では生育が抑制されたが、10日目以後は YES の生育と同じか、それよりやや良い生育がみられた。AF 産生は、YES では15日に最高値の 8.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を、カフェイン添加 YES では20日目に最高値の 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が検出された。残存カフェイン量は20日目で 25%が減少していた。

Fig. 4 の AF 産生性 *A. flavus* C-191-103株の生育は、YES では 15-20日目に最高値約 1.2 g を示す生育曲線が描かれた。カフェイン添加 YES では培養5-10日目には YES と類似したが、15日目以後では YES の生育よりやや良い生育がみられた。AF 産生は YES では10日目に最高値 0.70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を記録した。カフェイン添加 YES では10日目には YES より低い産生値を測定したが、15日目には最高値 1.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (YES での最高値より約 1.9 倍) を示した。残存カフェイン量は20日目で 62% の減少がみられた。

Fig. 5 の AF 産生性 *A. flavus* 82-C-1 株の生育

Fig. 3. Growth and aflatoxin production of *A. flavus* strain C-177-7 on YES broth containing caffeine and residual caffeine in the culture filtrates. A: Growth. B: Aflatoxin B₁ production. C: Residual caffeine. Caffeine in YES broth (w/v): See foot note of Fig. 1.

Fig. 4. Growth and aflatoxin production of *A. flavus* strain C-191-103 on YES broth containing caffeine and residual caffeine in the culture filtrates. A: Growth. B: Aflatoxin B₁ production. C: Residual caffeine. Caffeine in YES broth (w/v): See foot note of Fig. 1.

A. flavus 82-C-1

Fig. 5. Growth and aflatoxin production of *A. flavus* strain 82-C-1 on YES broth containing caffeine and residual caffeine in the culture filtrates. A: Growth. B: Aflatoxin B₁ production. C: Residual caffeine. Caffeine in YES broth (w/v): See foot note of Fig. 1.

は、YES では15-20日目に最高値 1.15 g を示したのに対して、カフェイン添加 YES では5日目には YES より生育が悪かったが、10日目以後はそれよりやや良い生育がみられた。AF 産生は、YES では10日目に最高値 8.6 μg/ml を、カフェイン添加 YES でも15日目に最高値 8.6 μg/ml を認めた。残存カフェイン量は20日目に 91% の減少がみられた。

考 察

以上のようにカフェイン添加培地上でのピーナツ、香辛料由来株と生コーヒー豆由来株の 25°C、7日間培養を比較すると、ピーナツおよび香辛料から分離された *A. flavus* 38 株はすべて生育が非常に強く抑制された（生育抑制率約 100%）のに対して、生コーヒー豆由来株では供試した *A. flavus*, *A. toxicarius* 11株中の *A. flavus* 4株にカフェイン抵抗性が認められたことは極めて注目されることである。これらの4株では、カフェイン無添加培地より生育がやや劣った（生育抑制率 45-64%）けれども、分生子形成は無添加培地と同様に正常に観察された。

さらに、これらのカフェイン抵抗性株について、カフェイン添加培地での長期間培養における菌体重量、AF 産生量、残存カフェイン量の消長を測定した結果では、培養初期での生育は遅れたが、後期ではカフェイン無添加条件と同等か、むしろやや良好な生育を示し、またカフェインの分解も最終的に10-90%となった。同時に、AF 産生性株の AF B₁ 産生についてみ

ると、カフェイン添加による影響は1株が抑制的であったけれども他の2株では培養15日目にはその産生量が同等またはより多く認められた。このような現象、すなわちカフェイン添加培地での毒素産生量がカフェイン無添加の場合より多くなったことは、生コーヒー豆より分離された毒素産生性 *A. ochraceus* の研究でも観察された^{*2}。この現象の機構の解明は今後の検討課題である。

前述したように Buchanan ら^{7),8)}はコーヒー豆の成分の1つであるカフェインが、種々のカビの生育阻害と毒素産生を抑制する効果があることを報告し、このことが生コーヒー豆におけるマイコトキシン汚染例の非常に少ない理由とされている。Levi⁹⁾の報告によれば、市販生コーヒー豆 1365 試料の分析によって AF が検出された試料は2検体 (0.15%) にすぎず、その量も 3 μg/kg と 12 μg/kg であって実態からも事実であることが伺われる。しかしながら、Buchanan らが実験に用いた *A. parasiticus* NRRL 2999 株はウガンダ産ピーナツから分離された株¹⁵⁾で、今回対照に用いた *A. parasiticus* ATCC 15517 株と出所は同じものと推定される^{16),17)}。これらの株はともにカフェインにより生育が非常に強く抑制され、今回著者らが実験に使用したピーナツ由来株も同様の性質を有していると考えられた。一方、Levi⁹⁾の報告にみられるアンゴラ産生コーヒー豆分離株 (21-2) のように米培養よりも生コーヒー豆培養の方が AF B₁ 産生量の高い系統もあり、今回の実験で発見されたカフェインに

抵抗性のある毒素産生性 *A. flavus* 菌群も同様に生コーヒー豆上に付着し、生育のための良い条件が整った場合には生育を開始し、AF 産生が起こる可能性は十分にありうるものと考えられる。

以上の事実は、少数ながらも生コーヒー豆における AF 自然汚染例が実際に存在することの根拠となるばかりでなく、カフェインのような自然基質の一部についてカビの生育に対する阻害効果あるいは毒素産生抑制効果を研究するに際しては、供試する菌株の由来を十分吟味する必要性のあることを示唆するものである。

終わりに本研究に際して、終始御指導賜わり、また供試菌株の一部を供与頂いた国立衛生試験所真菌室長宇田川俊一博士に深謝いたします。

引用文献

- 1) Levi, C. P., Borker, E.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **52**, 1300 (1969).
- 2) Scott, P. M.: *ibid.*, **51**, 609 (1968).
- 3) Purchase, I. F. M., Pretorius, M. E.: *ibid.*, **56**, 225 (1973).
- 4) Levi, C. P., Trenk, H. L., Mohr, H. K.: *ibid.*, **57**, 866 (1974).
- 5) Levi, C. P.: *ibid.*, **63**, 1282 (1980).
- 6) 坪内春夫, 山本勝彦, 久田和夫, 坂部美雄: マイコトキシン, **19**, 16 (1984).
- 7) Buchanan, R. L., Fletcher, A. M.: J. Food Sci., **43**, 654 (1978).
- 8) Nartowicz, V. B., Buchanan, R. L., Segall, S.: *ibid.*, **44**, 446 (1979).
- 9) Buchanan, R. L., Tice, G., Marino, D.: *ibid.*, **47**, 319 (1981).
- 10) Buchanan, R. L., Harry, M. A., Gealt, M. A.: *ibid.*, **48**, 1226 (1983).
- 11) Buchanan, R. L., Hoover, D. G., Lones, S. B.: Appl. Environ. Microbiol., **46**, 1193 (1983).
- 12) Davis, N. D., Diener, U. L., Eldridge, D. W.: *ibid.*, **14**, 378 (1966).
- 13) 坪内春夫, 山本勝彦, 久田和夫, 坂部美雄, 土平一義: 日菌報, **22**, 103 (1981).
- 14) Terada, H., Sakabe, Y.: J. Chromatogr., **291**, 453 (1984).
- 15) Shotwell, O., Hesseltine, C. W., Stubblefield, R. D., Sorenson, W. G.: Appl. Microbiol., **14**, 425 (1966).
- 16) Diener, U. L., Davis, N. D.: "Aflatoxin" Goldblatt, L. A. (Ed.), p. 14 (1969), Academic Press, New York and London.
- 17) Austwick, P. K. C., Ayerst, G.: Chemistry and Industry, Jan. 12, 55 (1963).