ノート

異臭苦情食品から検出されたトランス-1,3-ペンタジエン発生要因の検討

(平成26年4月24日受理)

今井浩一* 米田 葵 大坂郁恵 石井里枝 高野真理子

Formation of *trans*-1,3-Pentadiene in Off-Flavor Food

Koichi IMAI*, Aoi YONEDA, Ikue OSAKA, Rie ISHII and Mariko TAKANO

Saitama Prefectural Institute of Public Health:

410-1 Ewai, Yoshimimachi, Hiki-gun, Saitama 355-0133, Japan; * Corresponding author

The purpose of the present study is to investigate the production of *trans*-1,3-pentadiene in a sorbic acid-containing food which was the subject of a complaint that it was off-flavor. *Penicillium* sp. was isolated from the off-flavor food. The isolated *Penicillium* sp. was identified as *Penicillium chrysogenum* by DNA sequencing of the internal transcribed spacer region and the D1/D2 region of the 28S subunit. When *P. chrysogenum* was cultured in the presence of potassium sorbate, *trans*-1,3-pentadiene was produced and detected by GC-MS after solid-phase micro extraction. The production of *trans*-1,3-pentadiene by *P. chrysogenum* in the culture solution was pH-dependent. These results suggest that the production of *trans*-1,3-pentadiene in the off-flavor food was mainly due to the decomposition of sorbic acid by *P. chrysogenum*.

(Received April 24, 2014)

Key words: ソルビン酸 sorbic acid; トランス-1,3-ペンタジエン *trans*-1,3-pentadiene; 異臭 off-flavor; 苦情食品 complaint food; DNA塩基配列解析 DNA sequence analysis; *Penicillium chrysogenum*

緒言

県民より、和菓子を食べたら白あんから薬品のような異臭がしたと苦情があり、苦情残品が持ち込まれた。当所にて官能検査を行ったところ、検査員8人全員が石油臭やプラスチック臭のような異臭を感じた。当所での検査の結果、本異臭苦情食品からソルビン酸が0.9 g/kg検出された。さらに、固相マイクロファイバー抽出 (SPME) 法を用いて異臭苦情食品をGC-MSで測定した。その結果、苦情品から得られたピークの保持時間およびMSスペクトルは、トランス-1,3-ペンタジエン標準品と一致していたことから、異臭原因物質をトランス-1,3-ペンタジエンと同定した。

トランス-1,3-ペンタジエンは合成樹脂の原料あるいは有機合成の中間体として使用されている。一方、特定の真菌がソルビン酸を分解し、トランス-1,3-ペンタジエンが生成され、異臭の原因となることが報告されている^{1)~4)} (Fig. 1)。

2008年11月食品安全委員会添加物評価書「ソルビン酸カルシウム」⁵⁾によれば、*Penicillium*属真菌により食品中のソルビン酸が分解されトランス-1,3-ペンタジエンがチーズや大麦製品等で検出されるとされている。しかしな

がら、わが国において、トランス-1,3-ペンタジエンが検出された異臭苦情食品から真菌を分離し、トランス-1,3-ペンタジエン生成能について検討した報告はなく、その詳細については不明である。

今回、異臭原因物質であるトランス-1,3-ペンタジエン発生要因の究明を目的とし、ソルビン酸の使用が認められ、トランス-1,3-ペンタジエンが検出された異臭苦情食品から真菌を分離し、DNA塩基配列解析により同定を試みた。さらに、分離した真菌のトランス-1,3-ペンタジエン生成能について検討したので報告する。

Fig. 1. Decomposition of sorbic acid in food

実験方法

1. 試料および試薬

試料は埼玉県内で製造し販売された白あん苦情品を用いた。

標準品: トランス-1,3-ペンタジエンは東京化成工業(株)製を使用した。

* 連絡先: imai.koichi@pref.saitama.lg.jp

埼玉県衛生研究所: 〒355-0133 埼玉県比企郡吉見町江和井 410-1

標準溶液: 標準品 100 mg を精秤し, メタノールに溶解して 100 mL としたものを標準原液とした。

メタノール, アセトニトリルおよび蒸留水は液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業(株)製) を使用した。

ポテトデキストロース寒天培地: 栄研化学(株)製。クロラムフェニコール: 生化学用 (和光純薬工業(株)製)。硝酸ナトリウム, リン酸水素二カリウム, 塩化カリウム, 硫酸マグネシウム 7 水和物, 硫酸鉄 7 水和物, 硫酸亜鉛 7 水和物, 硫酸銅 5 水和物, スクロース: 特級品 (和光純薬工業(株)製)。酵母エキス: ベクトン・ディッキンソン社製。ソルビン酸カリウム: 特級品 (関東化学工業(株)製)。Tween80: 細胞培養用 (和光純薬工業(株)製)。

2. 装置

恒温槽: HL-2S-CP (ヒラサワ(株)製), ガスクロマトグラフ: 6890N (Agilent 社製), 質量分析装置: 5973 (Agilent 社製), 液体クロマトグラフ: 1200 Series (Agilent 社製)。

3. 真菌の分離⁶⁾

異臭苦情食品を 10 倍量の滅菌水に懸濁し, クロラムフェニコール (40 mg/L) を添加したポテトデキストロース寒天培地に塗抹し, 25℃ で 7 日間培養し, 試料からの真菌の分離を試みた。分離した真菌は, ツァベック酵母エキス寒天 (CYA) 平板培地 (硝酸ナトリウム 3 g, リン酸水素二カリウム 1 g, 塩化カリウム 0.5 g, 硫酸マグネシウム 7 水和物 0.5 g, 硫酸鉄 7 水和物 0.01 g, 硫酸亜鉛 7 水和物 0.01 g, 硫酸銅 5 水和物 0.005 g, スクロース 30 g, 酵母エキス 5 g, 寒天 15 g および蒸留水 1,000 mL, pH 7.4) を用いて 25℃ で 7 日間培養し, 純培養であることを確認した後, DNA の抽出に供した。さらに, 分離した真菌については, 光学顕微鏡下での形態観察を行った。

4. PCR 法による DNA 塩基配列解析

CYA 平板培地の表面から菌体をかき取り, Gen とるくん™ (酵母用) High Recovery (タカラバイオ(株)製) を用いて DNA を抽出した。PCR は, ITS 領域および D1/D2 領域を対象としたプライマー (グライナージャパン(株)製) を用いて行った (Table 1)。PCR Master Mix (Promega 社製) を用いて反応液を調製後, DNA サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems 社製) を用いて遺伝子増幅を行った。PCR 条件は, 95℃ で 3 分間熱変性した後, 95℃ 30 秒 (変性), 60℃ 30 秒 (アニーリング), 72℃ 30 秒 (伸長) を 35 回繰り返し, 最後に 72℃ で 5 分間伸長反応を行った。増幅した PCR 産物は, Experion™ DNA 1K 用分析キット (BIO-RAD 社製) による電気泳動により増幅断片長の確認と濃度を測定し

た。PCR 産物の精製は, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社製) を用いて行った。

精製した PCR 産物について, BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems 社製) を用いてシーケンシング反応を行った後, 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) を用いて塩基配列の決定を行った。決定した塩基配列を用いて, National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースを利用した BLAST 検索にて相同性検索を行った。

5. 胞子希釈液の調製

分離した真菌を CYA 平板培地に接種し, 25℃ で 7 日間培養し, 胞子を十分に形成させた。さらに, 0.1% Tween80 添加滅菌水 4 mL を注入し, パスツールピペットでゆっくりピペティングし, 胞子浮遊液を作製した。胞子遊浮液を 3,000 rpm, 5 分間遠心し, 上清を捨て, さらに 0.1% Tween80 添加滅菌水を加え, 細かくピペティングした。同様の操作を 2 回繰り返し, 胞子を洗浄した。最後に, 0.1% Tween80 添加滅菌水 3 mL に浮遊させた胞子をノイバウエルの血球計算盤を用いて, 10⁶/mL になるように 0.1% Tween80 添加滅菌水で希釈し, 胞子希釈液を作製した。

6. トランス-1,3-ペンタジエン生成試験

ツァベック酵母エキス液体培地 (CYA 培地から寒天を除いた組成, pH 7.4) 4.4 mL, ソルビン酸カリウム水溶液 0.5 mL および胞子希釈液 0.1 mL を 22 mL ヘッドスペース用バイアルに加えて, 密封した。25℃ にて 3 日間培養し, トランス-1,3-ペンタジエンの生成を SPME 法にて GC-MS により確認した。なお, ソルビン酸カリウムは, ソルビン酸として反応最終濃度 1,000 ppm になるように添加した。また, 胞子希釈液を添加しない対照には, 0.1% Tween80 添加滅菌水 0.1 mL を, ソルビン酸カリウムを添加しない対照には, 滅菌水 0.5 mL を添加した。

ツァベック酵母エキス液体培地の pH を塩酸にて pH 4.0, pH 5.0 および pH 6.0 に調整し, 同一条件下にて培養し, 1 日目, 2 日目または 3 日目のトランス-1,3-ペンタジエンの生成を確認した。なお, ツァベック酵母エキス液体培地, ソルビン酸カリウム溶液およびヘッドスペース用バイアル等の器具類は 121℃, 15 分間オートクレーブで滅菌した。

7. GC-MS 分析

SPME 法は, 密封したヘッドスペース用バイアルの上部ヘッドスペース部分に SPME ファイバー (Carboxen/PDMS, 膜厚 75 μm: Supelco 社製) を挿入し, 10 分間室温で放置した。SPME ファイバーを抜き取り GC-MS の注入口に挿入し, 10 分間熱脱離し分析した。GC-MS 条件は Table 2 に示した。

8. ソルビン酸の定量

GC-MS 分析が終了した培養液を 0.45 μm PTFE メンブランフィルターでろ過した。ろ液を 70% アセトニトリル溶液で 50 倍希釈して, HPLC に供し, 標準溶液のピーク面積からソルビン酸濃度を算出した。HPLC 条件は Table

Table 1. List of PCR primers

Primer name	Sequence (5'-3')
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG

Table 2. GC-MS operating conditions

Parameter	Settings
Column	DB-624 0.25 mm i.d.×60 m (film thickness 1.4 μm)
Oven temp.	30°C (3 min)→1°C/min→45°C (0 min)→30°C/min→240°C (6 min)
Inlet temp.	250°C
Interface temp.	250°C
Source temp.	230°C
Quadrupole temp.	150°C
Carrier gas	He, 1.0 mL/min
Ionization mode	EI, 70 eV
Split ratio	50 : 1
Data mode	SCAN (<i>m/z</i> : 33–550)

Table 3. HPLC operating conditions

Parameter	Settings
Column	TSK-GEL ODS-80Ts (5 μm, 4.6×150 mm)
Mobile phase	50 mM Potassium phosphate buffer : methanol : acetonitrile = 450 : 250 : 300 (v/v/v) contained 2 mM CTA
Flow rate	0.5 mL/min
Column temp.	40°C
Injection volume	20 μL
Detector	UV 230 nm

CTA: cetyltrimethylammonium chloride

3に示した。

結果および考察

1. 真菌の分離

異臭苦情食品から分離した真菌をCYA平板培地にて培養すると、青緑色の集落が確認され (Fig. 2A), 黄色の色素産生が認められた (Fig. 2B). さらに、その集落についてマイコパーム・ブルー染色により鏡検したところ、ペニシラスと呼ばれる筈状の構造が認められ、メトレ、フィアライドおよびその先端に分生子がついているのが確認された (Fig. 2C). これらの結果は、分離した真菌が*Penicillium*属真菌であることを示唆していた。

2. DNA塩基配列解析による同定

真菌のDNA塩基配列解析による同定において、18S rRNA遺伝子と5.8S rRNA遺伝子の間に存在するITS1領域、5.8S rRNA遺伝子と28S rRNA遺伝子の間に存在するITS2領域および28S rRNA遺伝子の5'末端のD1/D2領域が有効な領域として用いられている^{7),8)}. ITS領域は500~600 bp, D1/D2領域は約600 bp程度の長さがあるとされている. 本研究において、分離したペニシリウム属真菌のITS領域またはD1/D2領域をPCR法で増幅したところ、ITS領域 (593 bp) とD1/D2領域 (642 bp) に単一のバンドが確認された (Fig. 3). この結果は、ITS領域およびD1/D2領域が増幅されていることを示唆するものである. これらのPCR産物の塩基配列を決定し、DNA配列データベースのBLAST検索にて相同性検索を行ったところ、

Fig. 2. Isolation of fungi from the off-flavor food

(A) Colony on CYA at 25°C for 7 d.
(B) Colony on CYA at 25°C for 7 d (reverse).
(C) *Penicillus* (×400, MycoPerm-Blue).

Fig. 3. PCR amplification of the ITS and D1/D2 regions

M, 25 bp to 1,000 bp ladder size standard.

*Penicillium chrysogenum*と塩基配列が100%一致していた. 本研究において、分離された真菌の顕微鏡下での特徴は、フィアライドが8~10 μm, メトレが10~12 μm, 分生子が3 μmで球形から亜球形であり、黄色の色素産生が認められた. これらの特徴は、*P. chrysogenum*の形態学的記載⁶⁾と一致しており、同菌種と同定した. 本研究で明らかになったITS領域およびD1/D2領域のDNA塩基配列は、日本DNAデータベースに登録した (アクセッション番号, ITS領域: AB968039, D1/D2領域: AB968040).

3. トランス-1,3-ペンタジエン生成試験

分離した*P. chrysogenum*をソルビン酸カリウム存在下

で培養し、トランス-1,3-ペンタジエン生成の有無についてGC-MSにて測定した。最初に、食品安全委員会添加物評価書「ソルビン酸カルシウム」⁵⁾に記載された条件(25℃で7日間培養した真菌と3日間共存させた条件)にて検討した。本研究において、添加したソルビン酸カリウム濃度は、本異臭苦情食品中のソルビン酸検出濃度(0.9 g/kg)および、あん類のソルビン酸使用基準(1.0 g/kg)を考慮

Fig. 4. GC-MS chromatograms of *trans*-1,3-pentadiene standard and *trans*-1,3-pentadiene produced by *P. chrysogenum*

(A) *trans*-1,3-Pentadiene standard solution (1,000 ppm).

(B) *trans*-1,3-Pentadiene produced by *P. chrysogenum*.

After incubation at 25°C for 3 d, the needle of the SPME fiber holder was inserted through the septum-sealed SPME vial and *trans*-1,3-pentadiene was absorbed on the SPME fiber at room temperature for 10 min. *trans*-1,3-Pentadiene absorbed on the SPME fiber was desorbed in the GC injector port (250°C) for 10 min.

し、ソルビン酸として1,000 ppmになるように添加した。胞子希釈液およびソルビン酸カリウムをツァペック酵母エキス液体培地(pH 7.4)で3日間培養すると、トランス-1,3-ペンタジエンが検出された(Fig. 4)。この結果は、特定の真菌によりトランス-1,3-ペンタジエンが生成されるというこれまでの報告と一致しているが^{1)~4)}、いずれの報告も *P. chrysogenum* を用いた検討は行っていない。本研究により、*P. chrysogenum* においても同様に、トランス-1,3-ペンタジエンが生成されることが明らかとなった。本研究では、ツァペック酵母エキス液体培地(pH 7.4)、胞子希釈液またはソルビン酸カリウム溶液を25℃にて3日間培養しても、トランス-1,3-ペンタジエンの生成は認められなかった。本研究において、トランス-1,3-ペンタジエンの生成が認められたのは、ツァペック酵母エキス液体培地(pH 7.4)にソルビン酸カリウム存在下で胞子希釈液を添加した条件のみであった。この結果は、トランス-1,3-ペンタジエンの生成にはソルビン酸カリウムと真菌の存在が不可欠であることを示唆している。

ソルビン酸などの有機酸の抗菌作用は非解離分子に由来し、酸性になるほど効果を発揮し、アルカリ性に近づくにつれて効果は弱くなる⁹⁾。そこで、*P. chrysogenum* によるトランス-1,3-ペンタジエン生成能に対する培養液中のpHによる影響について検討した(Fig. 5A)。胞子希釈液およびソルビン酸カリウムをツァペック酵母エキス液体培地(pH 5.0, pH 6.0またはpH 7.4)で培養すると、いずれのpHにおいても培養後1日目からトランス-1,3-ペンタジエンの生成が認められ、そのピーク面積は経時的に増加していた。さらに、いずれのpHにおいても、培養1日目から真菌の発育が確認され、培養3日目には液体培地の液面に青緑色のマットの形成が認められた。しかしながら、ツァペック酵母エキス液体培地(pH 4.0)にて胞子希釈液およびソルビン酸カリウムを培養した場合、培養3日目でもトランス-1,3-ペンタジエンの生成および真菌の発育に伴う青緑色のマットの形成は認められなかった。この点に関し

Fig. 5. Effect of pH of the culture solution on *trans*-1,3-pentadiene production and decrease of sorbic acid by *P. chrysogenum*

(A) *trans*-1,3-Pentadiene production; (B) Sorbic acid content.

×, control; ◆, pH 4.0; ▲, pH 5.0; ●, pH 6.0; ■, pH 7.4.

では、ツァベック酵母エキス液体培地 (pH 4.0) に孢子希釈液のみを添加して培養すると培養3日目には、青緑色のマットの形成が認められたことから、酸性条件 (pH 4.0) が青緑色のマットの形成を抑制しているのではなく、ソルビン酸の非解離分子の割合が多いことによるソルビン酸の効力が影響していると考えられる。SkirdalとEklundは、*P. chrysogenum* に対するソルビン酸の効果について pH 4.1~7.6の範囲にて検討した結果、その最小発育阻止濃度は培地 pH に依存し、pH 4.1において最小であることを報告している¹⁰⁾。SkirdalとEklundの報告および本研究により、*P. chrysogenum* に対するソルビン酸の抗菌効果は、pH 4.0付近において有効であると推察される。ソルビン酸の pK_a は 4.76 であり¹¹⁾、ソルビン酸は pH 4.0 では 85% が、pH 5.0 では 37% が解離しない状態であるが、pH 6.0 では 6% に、pH 7.0 では 0.6% にまでソルビン酸の非解離分子割合は低下する¹²⁾。本研究において、真菌が発育しなければトランス-1,3-ペンタジエンの生成は認められなかったことから、ソルビン酸使用時の pH がトランス-1,3-ペンタジエンの生成に関与していると考えられる。ソルビン酸が使用された本異臭苦情食品の pH については不明であるが、本異臭苦情においてもソルビン酸の非解離分子の割合が多ければ、トランス-1,3-ペンタジエンの生成は認められなかった可能性が高いと推察される。

4. ソルビン酸の定量

トランス-1,3-ペンタジエンの生成に伴って、添加したソルビン酸カリウム含量が変動するか検討した (Fig. 5B)。孢子希釈液およびソルビン酸カリウムをツァベック酵母エキス液体培地 (pH 6.0 または pH 7.4) で培養した場合、培養3日目でのソルビン酸含量は約 75% まで減少していた。しかしながら、ツァベック酵母エキス液体培地 (pH 4.0) にて培養した場合、培養3日目でのソルビン酸含量の変化は認められなかった。本研究において、トランス-1,3-ペンタジエンの生成に伴って、ソルビン酸含量の低下が確認されたことから、ソルビン酸が分解されトランス-1,3-ペンタジエンが生成していると推察される。

これまででも、特定の真菌によりソルビン酸が分解されトランス-1,3-ペンタジエンが生成されることは検討されてきた。KinderlererとHattonは、ナッツ類から分離した *Penicillium* 属真菌をソルビン酸存在下に培養することにより、トランス-1,3-ペンタジエンが生成することを報告した¹⁾。また、小出らにより魚肉ねり製品から分離した *Aspergillus* 属真菌および *Penicillium* 属真菌がソルビン酸存在下に増殖し、トランス-1,3-ペンタジエンが生成されることが示された²⁾。さらに、Casasらは、耐浸透圧酵母をソルビン酸存在下に培養することによりトランス-1,3-ペンタジエンが生成することを報告した³⁾。最近になり、*Trichoderma* 属真菌においてもソルビン酸存在下に培養することにより、トランス-1,3-ペンタジエンが生成されることが報告されている⁴⁾。

食品安全委員会添加物評価書「ソルビン酸カルシウム」

においても、*Penicillium* 属真菌により食品中のソルビン酸が分解され、トランス-1,3-ペンタジエンが検出されることが報告されている⁵⁾。わが国においては、ソルビン酸の使用が認められた食品からトランス-1,3-ペンタジエンが検出された異臭苦情事例は、菓子パンのクリーム部分から検出された小泉らの報告¹³⁾ のみである。しかしながら、小泉らの報告では、異臭苦情食品中の真菌の有無については、試料が少量であったことから検討されていない。トランス-1,3-ペンタジエンが検出された異臭苦情食品から *Penicillium* 属真菌を分離・同定し、トランス-1,3-ペンタジエン生成試験について検討した報告は本研究が初めてである。

P. chrysogenum は、ペニシリンの産生菌として工業的に有用な真菌であるが、貯蔵穀類、低温流通中のチーズおよびハムやソーセージなどの加工肉より検出される頻度の高い真菌であり、しばしば食品中への混入事例が報告されている^{14),15)}。本真菌の混入経路については不明であるが、最も多くの種類の食品に使用される保存料がソルビン酸であることから、今後も同様の異臭苦情事例が起こる可能性については否定できない。

結 論

トランス-1,3-ペンタジエンが検出された異臭苦情食品から原因菌として *P. chrysogenum* を分離・同定した。本真菌をソルビン酸カリウム存在下に培養したところ、トランス-1,3-ペンタジエンの生成が認められた。本異臭苦情は、ソルビン酸が使用された白あん中で *P. chrysogenum* が混在し、ソルビン酸の分解生成物であるトランス-1,3-ペンタジエンが生成したことが要因である。

謝 辞

真菌の分離・同定に関して、有益なご助言ならびにご指導いただいた神戸市環境保健研究所の杉浦義紹博士に深謝いたします。さらに、本研究を実施する機会を与え、ご指導とご助言をいただいた埼玉県衛生研究所の戸谷和男前担当部長に深謝いたします。

文 献

- 1) Kinderlerer, J. L., Hatton, P. V. Fungal metabolites of sorbic acid. Food Addit. Contam., **7**, 657-669 (1990).
- 2) Koide, K., Yanagisawa, I., Fujita, T. Mycological studies on the 1,3-pentadiene producing molds. Nippon Suisan Gakkaishi, **58**, 101-106 (1992).
- 3) Casas, E., de Ancos, B., Valderrama, M. J., Cano, P., Peinado, J. M. Pentadiene production from potassium sorbate by osmotolerant yeasts. Int. J. Food Microbiol., **94**, 93-96 (2004).
- 4) Pinches, S. E., Apps, P. Production in food of 1,3-pentadiene and styrene by *Trichoderma* species. Int. J. Food Microbiol., **116**, 182-185 (2007).
- 5) 食品安全委員会, 添加物評価書「ソルビン酸カルシウム」,

- 2008年11月.
- 6) Pitt, J. I. A laboratory guide to common *Penicillium* species, 3rd ed. North Ryde, Australia, Food Science Australia, 2000, p. 114–115. (ISBN 0643048375)
 - 7) Sakai, A., Ozeki, Y., Sasaki, Y., Suzuki, C., Masui, Y., Aihara, M., Kikuchi, Y., Takatori, K. Identification of fungi using DNA sequences: an approach to identify *Fusarium* species isolated from domestic unpolished rice. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (Food Hyg. Saf. Sci.), **47**, 268–276 (2006).
 - 8) Goto, K. Identification method of molds and yeasts based on DNA sequence—application for taxa concerning with food contamination and spoilage—. *Jpn. J. Food Microbiol.*, **27**, 56–62 (2010).
 - 9) Eklund, T. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *J. Appl. Bacteriol.*, **54**, 383–389 (1983).
 - 10) Skirdal, I. M., Eklund, T. Microculture model studies on the effect of sorbic acid on *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporioides* and *Ulocladium atrum* at different pH levels. *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 191–195 (1993).
 - 11) The merck index; an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 13th ed. Whitehouse Station, N.J., U.S.A., Merck & Co., Inc., 2001, p. 1553–1554.
 - 12) 宇田川俊一, 松田良夫監訳. “第6章 食品保存料”. 食品菌類ハンドブック. 東京, 医歯薬出版, 1984, p. 253–257.
 - 13) Koizumi, M., Watanabe, K., Kobayashi, H. Food complaint case in Yamanashi. *Yamanashiken Eisei Kankyo Kenkyusho Nenpo* (Annual Report of Yamanashi Institute of Public Health and Environment), **53**, 37–41 (2009).
 - 14) Kurata, H. Mycotoxin-producing fungi and natural occurrence of mycotoxins in Japanese foodstuffs. *Jpn. J. Med. Mycol.*, **13**, 165–171 (1972).
 - 15) Udagawa, S. Food-borne fungi and biodeterioration. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (Food Hyg. Saf. Sci.), **28**, 219–229 (1987).