報 文

はちみつ中の菌類分布について

(昭和 49 年 7 月 11 日受理)

山崎 幹夫^{*1} 堀江 義一^{*1} 宇田川俊一^{*1}
越後多嘉志^{*2} 君 政子^{*2}

Mycoflora of Honey

Mikio YAMAZAKI^{*1}, Yoshikazu HORIE^{*1}, Shun-ichi UDAGAWA^{*1},
Takashi ECHIGO^{*2} and Masako KIMI^{*2}(*¹Research Institute for Chemobiodynamics, Chiba University: Izumi-cho,
Narashino, Chiba; *²Department of Agricultural Chemistry, Tamagawa
University: Tamagawa-Gakuen, Machida, Tokyo)

Mycological survey of honey, 23 samples of domestic and imported, was carried out and *Chaetomium*, *Eurotium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* and others were found and isolated less than a great dominant of the yeast. In media added with several concentrations of glucose or sucrose and even in honey itself, growth of the isolates, for example *E. repens*, *E. rubrum*, *A. awamori*, *C. cladosporioides* and *P. waksmani*, was recognized. In conclusion, "inhibitory effect" of honey for the fungal growth is thought to be due not only to the high concentration of sugar and low pH but also to the prior dominant growth of the yeast in honey.

(Received July 11, 1974)

はちみつ中の微生物分布については、すでに二、三の報告があるが、それらの大部分は *Saccharomyces*, *Candida* 属などを主とする酵母に関するものであり¹⁾、酵母を除く他の菌類に関する研究はほとんどみられないのが現状である。

著者らは、はちみつより菌類の分離を試み、それら菌類のはちみつ中における菌類フローラの特性およびはちみつの菌類による汚染の実態と、はちみつより分離した主な菌類の高糖濃度における生育につき検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 試料の採集

実験に供したはちみつはすべて玉川大学農学部食品製

造研究室を通じて入手した。1972年産はちみつ10試料、1973年産はちみつ7試料、合計17試料の国内産のはちみつ (Table 1) と、比較のため1973年に入手した外国産の輸入はちみつ6試料 (Table 2)、合計23試料を実験に供した。

すなわち1972年国内産はちみつの採集地は秋田県、鳥取県、北海道、青森県、長野県、東京都、みつ源植物はトチ、レンゲソウ、アカシア、シナノキ、アブラナ、糖濃度は73.4~80.1%であった。1973年国内産はちみつの採集地は東京都、長野県、鳥取県、岡山県、秋田県、みつ源植物はレンゲソウ、アカシア、糖濃度は73.6~79.4%であった。

外国産はちみつは、中国、カナダ、アルゼンチン、スペインなどより輸入されたもので、みつ源植物はレンゲソウ、クローバー、オレンジ、その他、糖濃度は72.5~81.4%であった。

^{*1} 千葉大学生物活性研究所: 千葉県習志野市京町 3-9-1

^{*2} 玉川大学農学部: 東京都町田市玉川学園 6-1-1

Table 1. List of Samples (Domestic Honey)

Sample no.	Date of collection	Locality	Origin	Sugar concentration (%)
2	1972. 5. 27	Akita	Horse chesnut	80.1
41	5. 4	Tottori	Chinese milk vetch	—
42	6. 99	Akita	Acacia	76.7
43	6. 29	Hokkaido	Linden	77.2
44	5. 27	Aomori	Rapeseed	73.4
45	5. 4	Tottori	Chinese milk vetch	78.5
46	5. 4	Tottori	Chinese milk vetch	79.4
47	5. —	Nagano	—	—
49	5. 13	Tokyo	—	79.0
50	1973. 5. 11	Tokyo	—	78.4
51	4. —	Nagasaki	Chinese milk vetch	76.0
60	4. 29	Nagasaki	—	74.4
61	5. 5	Tottori	Chinese milk vetch	79.2
62	5. 17	Okayama	Chinese milk vetch	79.4
63	6. 27	Akita	Acacia	73.6
64	6. —	Akita	Acacia	73.1

Table 2. List of Samples (Imported Honey)

Sample no.	Date of collection	Locality	Origin	Sugar concentration (%)
53	1973. 6.	China	Chinese milk vetch	79.1
54	6.	Canada	Clover	72.5
55	—	—	—	81.4
56	6.	Argentina	—	79.5
57	—	—	—	79.6
58	—	Spain	Orange	80.6

2. 菌の分離法

はちみつよりの菌類の分離培地は、はちみつ中の主要な有機酸とされるグルコン酸を用いて、はちみつの pH に近い pH 3.8 前後に調整した M70Y (ショ糖 700 g, 麦芽エキス 20 g, 酵母エキス 5 g, 寒天 20 g, 水 1000 ml) および pH 無調整の M70Y, M40Y (ショ糖 400 g, 麦芽エキス 20 g, 酵母エキス 5 g, 寒天 20 g, 水 1000 ml), クロラムフェニコール添加 バレイショ・グルコース寒天 (バレイショ 300 g の煮汁, グルコース 20 g, 寒天 20 g, 水 1000 ml, クロラムフェニコール 100 mg) の 4 種類を用いはちみつ試料につき各 5 枚ずつの滅菌ペトリザラに流し、固めて平板とした後、はちみつ 1 滴 (約 50 mg) を滴下し、滅菌ガラス棒で平板上に均一に広げ、25° で 2 週間培養を行い、出現したコロニーより、麦芽エキス寒天 (麦芽エキス 20 g, グルコース 20 g, ペプトン 1 g, 寒天 20 g, 水 1000 ml), M40Y, ショ糖添加 Czapek 寒天 (ショ糖 200 g, NaNO₃ 3 g, K₂HPO₄

1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, 寒天 15 g, 水 1000 ml), クロラムフェニコール添加 バレイショ・グルコース寒天, クロラムフェニコール添加 バレイショ・ニンジン寒天 (PCA と略, バレイショ 15 g, ニンジン 15 g の煮汁, 水 1000 ml, クロラムフェニコール 100 mg) の各斜面培地を適宜に用いて釣菌分離し、以後の同定に供した。

3. 菌の同定

分離した菌類の同定は、*Aspergillus*, *Penicillium* 属に関しては標準 Czapek 寒天および標準麦芽エキス寒天の平板に接種し、巨大コロニーを形成させ、*Aspergillus* 属の菌は Raper と Fennell²⁾, *Penicillium* 属の菌は Raper と Thom らの成書³⁾を参考として同定を行い、その他の不完全菌類は、バレイショ・ニンジン寒天, バレイショ・グルコース寒天を主として用い、Barnett⁴⁾, Barron⁵⁾, Arx⁶⁾ および Subramanian⁷⁾ らの成書を参考として同定を行った。また、子のう菌類の同定

Table 3. Frequency of Molds Isolated from Domestic Samples

Year Sample no	1972						1973				
	2	41	42	45	46	47	50	60	61	62	63
Genera and species											
Ascomycetes											
<i>Ascosphaera apis</i>					+						+
<i>Eurotium amstelodami</i>					+						
Deuteromycetes											
<i>Aspergillus</i>			+		+						
<i>Cladosporium</i>	+	+		+	+	+					
<i>Paecilomyces</i>			+		+		+				
<i>Penicillium</i>					+		卅	卅	卅	卅	卅
<i>Scopulariopsis</i>					+	+					

卅, 卅, very abundant; 卅, abundant; +, common.

は, *Eurotium* 属の場合20% ショ糖添加 Czapek 寒天, 20% ショ糖添加麦芽エキスを寒天を主として用い, Raper と Fennell の成書⁹⁾を参考とし, また, *Chaetomium* 属の菌はセルロース寒天, バレイショ・ニンジン寒天, オートミール寒天を主として用い, Ames⁸⁾, Seth ら⁹⁾の成書および Udagawa¹⁰⁾ その他の文献¹¹⁾を参考とし, その他の子う菌は, バレイショ・ニンジン寒天, オートミール寒天などを適宜に用いて子う殻を形成させ, 二, 三の文献^{12)~13)}を参考に同定を行った.

4. 分離菌の各糖濃度における生育の影響

はちみつより分離された主要菌類の生育における糖濃度の影響と限界, 生育の状態などを知るため, 下記の実験を行った.

方法としては, 基本培地として麦芽・酵母エキスを寒天 (麦芽エキス 20 g, 酵母エキス 5 g, 寒天 20 g, 水 1000 ml) にグルコースおよびショ糖を各 0, 20, 40, 60, 80, 100%* (w/v) 加えた pH 無調整の培地と, グルコン酸で, pH 3.8 前後に調整した培地の平板に主要な菌を接種し, 25° で2週間培養を行い, コロニーの直径を測定し, また, そのときのコロニーの状態を観察した. 測定には各ペトリザラ5枚を使用し, その平均を示した.

結 果

1. 菌類の分布

国内産のはちみつよりの菌類の出現頻度は Table 3 に示したように比較的低かった. 1972年産の国内産はちみつよりは10試料中6試料より菌類の出現を見た. 出現した菌類は子う菌では *Ascosphaera apis*, *Eurotium amstelodami* の2種, 不完全菌では, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* 属であった. この内 *Cladosporium* は,

* 糖 1000 g に培地を加え 1000 ml に調整したものを便宜的に 100% とした.

Table 4. Frequency of Molds Isolated from Imported Samples

Sample no.						
	53	54	55	56	57	58
Genera and species						
Zygomycetes						
<i>Rhizopus</i>						+
Ascomycetes						
<i>Ascosphaera apis</i>		+				
<i>Chaetomium globosum</i>		+				+
<i>Eurotium herbariorum</i>	+					+
<i>E. repens</i>	+	卅				+
<i>E. rubrum</i>		卅			+	
Deuteromycetes						
<i>Aspergillus</i>	+		卅	+	卅	卅
<i>Chrysosporium</i>	+					
<i>Cladosporium</i>				卅	卅	卅
<i>Paecilomyces</i>	卅				卅	
<i>Penicillium</i>	卅	+	+	卅	卅	
<i>Scopulariopsis</i>						+
<i>Mycelia sterilia</i>						+

卅, 卅, very abundant; 卅, abundant; +, common.

量的には少ないが, 5試料にわたって出現した. 1973年産の国内産はちみつ7試料中5試料より菌類の出現を見たが, 出現した菌類は *Paecilomyces*, *Penicillium* の2属の菌のみであった. ただし, *Penicillium* 属の菌は量的にも, また, 試料数も比較的多く出現した.

今回 *Ascosphaera apis* が少数であったが出現したことは興味深い. この菌は, Mossen¹⁴⁾ によってヨーロッパ, Baker ら¹⁵⁾によって北米において, はちみつの幼虫を“Chalk broad” (いわゆる“ミイラ化”) させるはちみつの病原菌として報告されており, この菌の生

Table 5. Aspergilli Isolated from Honey Samples

Species	Sample no.		Imported					
	Domestic							
	42	46	53	54	55	56	57	58
<i>Aspergillus awamori</i>	+	+			++		+++	++
<i>A. flavus</i>							+	
<i>A. foetidus</i>					+		++	+
<i>A. niger</i>	+							
<i>A. terreus</i>			+					
<i>A. versicolor</i>				+		+		

+++ , very abundant; ++ , abundant; + , common.

Table 6. Penicillia Isolated from Domestic Honey

Species	Sample no.		1973				
	1972						
	46	47	50	60	61	62	63
<i>Penicillium cyclopium</i>							+
<i>P. oxalicum</i>	+		+++				
<i>P. waksmani</i>	+	+		++	+++	+++	+++

+++ , very abundant; ++ , abundant; + , common.

Table 7. Penicillia Isolated from Imported Honey

Species	Sample no.				
	53	54	55	56	57
<i>Penicillium cyclopium</i>	+	+	+	+	++
<i>P. implicatum</i>	+				
<i>P. lividum</i>				+	
<i>P. rugulosum</i>				+	
<i>P. waksmani</i>	+	+		+++	

+++ , very abundant; ++ , abundant; + , common.

理, 生態に関しては多くの研究が報告されている。この菌はこれまで我が国での分離の報告は無く, 今回の分離が最初であろうと思われる。

1973年に入手した輸入はちみつは Table 4 に示したように 6 試料全部より菌類が出現し, その頻度は国内産はちみつと比較して高く, 分離された菌類は Zygomycetes では *Rhizopus* 属, Ascomycetes では *Ascosphaera apis*, *Chaetomium globosum*, *Eurotium herbariorum*, *E. repens*, *E. rubrum* の 3 属 5 種, 不完全菌は *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* の 6 属であった。そのうち比較的出現の頻度の高かった菌としては, *Eurotium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* 属の菌であった。また, 国内

産, 輸入品ともに全試料より *Saccharomyces* を主とした酵母が多数出現し, これら酵母の出現した量と比較して, 他の菌類の出現頻度は非常に低かった。

Table 3, 4 において比較的出現頻度の高かった菌類は *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* の 3 属に属する菌で, このうち *Cladosporium* 属に属する菌はすべて *Cladosporium cladosporioides* であった。*Aspergillus* 属では Table 5 に示したように *Aspergillus awamori*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. versicolor* の 6 種が出現した。そのうち国内産はちみつより 1972 年産はちみつに *A. awamori*, *A. niger* の 2 種, 輸入はちみつよりは *A. awamori*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. terreus*, *A. versicolor* の 5 種が分離された。傾向としては, いわゆる “*Aspergillus niger* グループ” の菌の出現が目立った。なお, *Aspergillus flavus* は aflatoxin A, *versicolor* は sterigmatocystin を生産することで知られているが, 今回分離された菌株には薄層クロマトグラフィーを使用した検索の結果, 両マイコトキシンの生産性は見られなかった。

Penicillium 属に関しては Table 6, 7 に示したように, 国内産はちみつよりは, *P. cyclopium*, *P. oxalicum*, *P. waksmani* の 3 種が分離され, 特に *P. waksmani* の出現が目立った。この菌は, これまで主としてしょう油, みそなど塩濃度の高い食品よりの分離が報告されている。輸入みつよりは *P. cyclopium*, *P.*

Table 8. Effect of Glucose Concentration for Linear Growth of Isolated Molds

Glucose concentration (% w/v)		0	20	40	60	80	100
Species	Acid*	Diameter of colonies (cm)					
<i>Eurotium repens</i>	added	0.5	7.4	8.5	7.6	0.9	nil
	no	2.7	7.7	8.5	8.5	5.5	±
<i>Eurotium rubrum</i>	added	0.1	3.9	8.5	7.6	+	nil
	no	1.8	8.3	8.5	8.5	6.7	±
<i>Aspergillus awamori</i>	added	8.0	8.5	8.5	7.2	±	nil
	no	6.9	8.5	8.5	8.5	2.2	nil
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	added	1.7	1.2	0.9	0.3	±	nil
	no	3.4	6.1	6.6	5.0	±	nil
<i>Penicillium waksmani</i>	added	7.5	7.3	4.7	2.3	±	±
	no	7.8	8.5	5.6	3.1	0.8	nil

* Gluconic acid (pH 3.8).

implicatum, *P. lividum*, *P. rugulosum*, *P. waksmani* の5種が分離された。このうちでは *P. cyclopium* と *P. waksmani* の出現が比較的確著であった。

2. 各糖濃度における菌類の生育

1) グルコースの各濃度における生育

はちみつより分離した菌類の中で、比較的出现頻度の高かった *Eurotium repens*, *E. rubrum*, *Aspergillus awamori*, *Penicillium waksmani*, *Cladosporium cladosporioides* の5種の菌類を各濃度のグルコースを添加した麦芽エキス・酵母エキス寒天に接種生育させた。その結果80%グルコース、pH 無調整の培地では *C. cladosporioides* 以外はわずかに生育したが、グルコン酸で pH 3.8 に調整した培地では、*E. repens* を除き明確な生育を示さなかった。また、*C. cladosporioides* はグルコン酸で pH 3.8 の寒天上と無調整の寒天上で生育に著しい差異を示した。結果はまとめて Table 8 に示した。

これらの菌類が80%グルコースを添加し、pH 3.8 に調整した寒天上においては明確な生育を示さなかったのので、スライドカルチャーの手法を利用し、菌の分生子および閉子のう殻の形成および形態を調べた。その結果はいずれの菌も分生子および閉子のう殻を十分形成し、形態的には普通の培地上で生育したときと変化が認められなかった。

2) ショ糖の各濃度における生育

次に *Eurotium repens*, *E. rubrum*, *Aspergillus awamori*, *Penicillium waksmani*, *P. cyclopium*, *Cladosporium cladosporioides* などの菌類および *Ascosphaera apis* を用い、グルコースと同様の実験をショ糖について実施した。

その結果は、*Ascosphaera apis* を除く他の菌類はいずれも60%ショ糖を加えた培地でも十分な生育を示し、結果はグルコースに比べやや高い生育限界濃度を示した。*Eurotium repens*, *E. rubrum*, *Aspergillus awamori* は80%ショ糖を加えた培地でも生育し、*Penicillium cyclopium*, *P. waksmani* はわずかにあるが生育を示した。しかし *Cladosporium cladosporioides* は pH 無調整の培地では生育を示したが、pH 3.8 の培地では生育を示さなかった。100%ショ糖を添加した培地では *Eurotium repens*, *E. rubrum* が生育を示したに過ぎない。

3) はちみつ中での生育状態

次に、分離したこれら菌類が、はちみつ上で正常に生育できるかどうかにつき、*Eurotium repens*, *E. rubrum*, *Aspergillus awamori* の3種の菌を使用し、スライドカルチャーの手法を用いて調べた。その結果、*Eurotium* 2種は分生子および閉子のう殻の両方とも形態的にも正常に生育、形成され、また *Aspergillus awamori* も正常の形態の分生子を形成した。この結果より、これら菌類はある程度の湿地があればはちみつ中でも十分生育することが推測された。

考 察

以上の結果より、はちみつ中にも酵母以外の菌類がかなり多種にわたって存在していることが確認された。これら出現菌類の傾向としては、はちみつの性質上高張性の菌類および、高張性の傾向を持った性質の菌類の存在が予測されたが、今回ははちみつ中より分離された菌類は、*Eurotium repens*, *E. rubrum* など *Eurotium* 属、*Aspergillus awamori*, *A. foetidus*, *A. niger* などのいわゆる *Aspergillus niger* group のほか、

Penicillium cyclopium, *P. waksmani*, *Cladosporium cladosporioides* などであり, *Eurotium* 属, *Aspergillus niger* グループが比較的多く出現したことで菌類の存在を確認した. しかし今回の分離でみつ源となる花樹に着生および寄生すると思われる植物病原菌などの菌類がほとんど出現しなかったことは興味ある現象である.

これらの菌類がはちみつの生産過程のどの段階で汚染, 混入したかについて, 酵母についてはこれまでに花みつよりの遷移などの調査結果が報告されている. 今回分離された菌類の生態と考え併せると, 明確なことはいえないにしても, *Ascosphaera apis* の様な病原菌は巣箱などで汚染混入したものと考えられ, *Eurotium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* 属などの菌類は, 巣箱および, それ以後の製品化の過程で二次的に汚染したものと考えられる.

はちみつは一般には貯蔵性がよく, 普通の状態では変質することはないと言われている. ごくまれに発酵や混入微生物の増殖が見られることもあるが, これは主として水分の増加による. 例えば高湿度環境中での放置などによって表面の吸湿による糖濃度の低下の結果, 微生物の増殖が認められることはあるとされる.

今回分離された菌について, グルコース, ショ糖の各濃度における生育状態を調べた結果は, はちみつより分離された主要な菌類の多くが, はちみつとほぼ同様の濃度および pH においても生育出来, またはちみつ自体中でも発芽, 生育の可能なことを示した. 高張性菌である *Eurotium* 属の菌類は当然としても, *Penicillium waksmani* を除く他の菌も, 糖無添加の培地より 20, 40% にショ糖を加えた培地でよい生育を示した. ただし *Cladosporium cladosporioides* では pH をグルコン酸で調整 (pH 3.8) した培地での生育が著しく悪かった. 以上の現象はグルコース添加培地上でも同じように観察された. pH 無調整の培地と pH 3.8 に調整した培地では, 一般に前者においてはるかに生育は良好であったが, グルコース培地に比較してショ糖培地ではその差がそれほど顕著でなかったことは興味深い.

以上の結果から考察すると, はちみつが一般に発黴しにくいのは, 単に高糖濃度, 低 pH であることが原因であるばかりでなく, このような条件下では酵母による安定した優先型環境がつくられ, 他の菌類の侵入生育を妨げていることが考えられるが, このことはさらに検討を要する問題であろう.

謝 辞

本研究に終始御指導を賜わった故宮木高明博士に感謝

します. はちみつの試料入手, 研究の推進に御協力頂いた玉川大学農学部竹中哲夫氏, マイコトキシンの検索に御協力頂いた千葉大学生物活性研究所前林行雄氏に感謝します.

文 献

- 1) Rose, A. H., Harrison, J. S.: "The Yeast" Vol. 3 (1970), Academic Press, London and N. Y.
- 2) Raper, K. B., Fennel, D. I.: "The Genera Aspergillus" (1965), The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 3) Raper, K. B., Thom, C.: "A Manual of the Penicillia" (1949), The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 4) Barnett, H. L.: "Illustrated Genera of Imperfect Fungi" (1960), Burgess Publ. Co., Minnesota.
- 5) Barron, G. L.: "The Genera of Hyphomycetes from Soil" (1968), The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 6) von Arx, J. A.: "The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture" (1970), J. Cramer, Germany.
- 7) Subramanian, C. V.: "Hyphomycetes" (1971), Indian Council of Agricultural Res., New Delhi.
- 8) Ames, L. M.: "A Monograph of the Chaetomiaceae" (1968), U. S. Army Res. & Development Ser. 2.
- 9) Seth, H. K.: "A Monograph of the Genus Chaetomium" (1970), J. Cramer, Germany.
- 10) Udagawa, S.: J. gen. appl. Microbiol., Tokyo, 6, 223 (1960).
- 11) Zopf, W.: Nova Acta ksl. Leop. Carol. Deuten Akademie der Naturforscher XLII, 199 (1881).
- 12) Spiltoir, C. F., Olive, L. S.: Mycologia, 47, 238 (1955).
- 13) Malloch, D., Cain, R. F.: Can. J. Bot., 50, 2613 (1972).
- 14) Maassen, A.: Mitt. Biol. Anst. Land-Forts., 16, 51 (1916).
- 15) Baker, G. M., Torchio, P. F.: Mycologia, 60, 189 (1968).