

## 研究論文

## 耐熱性かびによる食品変敗の防止に関する研究

日渡美世\*<sup>1</sup>、齋藤 恵\*<sup>2</sup>、近藤徹弥\*<sup>3</sup>

## Study on Prevention Method of Food Spoilage by Heat Resistant Molds

Miyo HIWATASHI\*<sup>1</sup>, Megumi SAITO\*<sup>2</sup> and Tetsuya KONDO\*<sup>3</sup>Food Research Center\*<sup>1-3</sup>

変敗ゼリー製品及び果実加工品から耐熱性かびを分離し、耐熱性試験を行った。分離された4属、18株のかびのうち10株について子嚢胞子の耐熱性試験を行った結果、8株で85℃以上の耐熱性を示した。このうち *Neosartorya pseudofischeri* HW003 株について、子嚢胞子の耐熱性及び発芽へ影響を及ぼす物質について検討した。その結果、12種類中3種類の添加物で耐熱性低下効果が認められ、7種類の添加物で発芽及び菌糸生長の抑制効果が認められた。

## 1. はじめに

果実加工品の一種であるゼリー製品では、耐熱性かびによる変敗が発生することがあり問題となっている。多くのかびは70℃、10分程度の加熱により死滅するが、耐熱性かび(*Neosartorya* 属、*Byssoschlamys* 属、*Talaromyces* 属)の子嚢胞子は75℃、30分以上の耐熱性を有する<sup>1)</sup>。これらの子嚢胞子は土壤中に存在し、果汁、茶葉などから分離され、その耐熱性が報告されている<sup>2)3)</sup>。ゼリー製造においては、果汁や果実由来の子嚢胞子が混入し、加熱殺菌工程がヒートショックとなり、子嚢胞子の休眠が打破されて発芽し、変敗を引き起こすと推測されている。特に果肉入りゼリーでは、ゼリーの物性、果肉の色調、食感を維持するため、子嚢胞子を殺菌するための十分な加熱は困難である。そのため、加熱のみによらない制御法の開発が求められている。しかしながら、耐熱性かびの制御法については知見が乏しいのが現状である。

そこで本研究では、まず、変敗ゼリー製品や果実加工品から耐熱性かびの分離を行い、得られた菌株の同定と耐熱性の評価を行った。次に、ゼリー製造における一般的な加熱条件(85℃、30分程度)での制御方法を見出すため、子嚢胞子の加熱時に添加して子嚢胞子の熱損傷を促進する添加物、及び加熱後の添加により発芽や菌糸生長を抑制する添加物について検討した。

## 2. 実験方法

## 2.1 実験材料

変敗ゼリー製品及び加工果実は、ゼリーメーカーから提供されたものを使用した。分譲株は(独)製品評価技

術基盤機構バイオテクノロジーセンター(NBRC)の株を使用した。使用した添加物は表1に示す。市販の製剤のうち、有効成分の組成と含量が明らかなものについては同時に表記した。

表1 使用した添加物

種類	名称	製剤の組成
保存料	ソルビン酸K	—
	安息香酸Na	—
	デヒドロ酢酸Na	—
	亜硫酸Na	—
	プロピオン酸Na	—
日持ち向上剤	チアミンラウリル硫酸塩*	チアミンラウリル硫酸塩3.7%/酢酸20.0%/エタノール25.0%
	酢酸	—
	ポリリジン*	ポリリジン8.4%/グリシン83%
	グリセリン脂肪酸エステル*	グリセリン脂肪酸エステル10%/エタノール27%
その他	キトサン*	キトサン4.0%、氷酢酸2.0%
	わさび抽出物*	不明
その他	フェニル乳酸	—

\*: 製剤

## 2.2 耐熱性かびの分離

変敗ゼリー製品の一部を採取し、0.01%(w/w)クロラムフェニコール添加ポテトデキストロース(CP 添加PDA)寒天培地に接種し30℃で培養してかびを分離した。加工果実は200g採取し、ホモジナイザーで摩砕後、恒温水槽中で75℃、30分間加熱処理後急冷した。これを等量の2倍濃度CP添加PDA寒天培地と混釈後、シャーレに分注し、30℃で培養した。かびの集落が発生したシャーレからかびを分離し、分離株とした。

\*1 食品工業技術センター 分析加工技術室 \*2 食品工業技術センター 分析加工技術室(現共同研究支援部 計測分析室) \*3 食品工業技術センター 分析加工技術室(現企画連携部 企画室)

### 2.3 28S rDNA D1/D2 領域の塩基配列によるかびの同定

28S rDNA D1/D2 領域の増幅は、プライマー-D1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')、及び D2(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')と、PCR 用酵素 QIAGEN Fast Cycling PCR Kit(QIAGEN 製)を用いて行った。PCR の温度条件は、95°C5 分、40 サイクルの 96°C5 秒 ; 55.5°C5 秒 ; 68°C27 秒、72°C1 分とした。得られた DNA 断片の塩基配列を決定し、National Center for Biotechnology Information(NCBI)から利用可能な BLAST プログラム(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)によりホモロジー検索を行い、かびを同定した。

### 2.4 子嚢胞子懸濁液の調製

各菌株を斜面培地から一白金耳の菌体を採取し、PDA 寒天培地に接種し、30°C、60 日間培養した。集落を形成したシャーレに 0.85%生理食塩水(0.05%Tween 含有)を 10mL 加え、コンラージ棒で掻き取り、子嚢胞子嚢を含む子嚢胞子懸濁液を得た。得られた子嚢胞子懸濁液から子嚢胞子を分離するために、ホモジナイザー(10,000rpm、15min)で処理した。遠心分離(3,000rpm、10min)により集菌後 0.85%生理食塩水に懸濁した。血球計算盤を用いて顕微鏡下で子嚢胞子数を計測し、生理食塩水で 10<sup>7</sup> 胞子/mL に調整したものを子嚢胞子懸濁液とした。

### 2.5 耐熱性試験

子嚢胞子懸濁液は試験直前に 60°C、10 分間の加熱処理により分生子と菌糸を殺菌した。恒温水槽内で所定温度に保持したグルコース・酒石酸緩衝液(pH3.5)10mL に 10<sup>7</sup> 胞子/mL に調製した子嚢胞子懸濁液を 100 μL 添加し、所定時間保持後氷冷した。これを段階希釈後 0.005%(w/v) ローズベンガルを添加した CP 添加 PDA 寒天培地に混釈し、30°C で 5~7 日間培養後のコロニー数を測定した。

### 2.6 子嚢胞子の熱損傷を促進する添加物の検討

菌株は分離株 *Neosartorya pseudofischeri* HW003 株を使用した。McIlvaine buffer(pH3.5) 800 μL に所定濃度(製剤については製剤としての濃度)の添加物と 10<sup>6</sup> 胞子/mL に調製した子嚢胞子懸濁液を各 100 μL 添加し、85°C、30 分間加熱処理後急冷した。マイクロプレート内の GP 培地(2%グルコース、0.5%ペプトン、0.2%酵母エキス、0.1%リン酸二水素カリウム、0.05%硫酸マグネシウム)750 μL に、加熱処理後の子嚢胞子懸濁液を 10<sup>4</sup>cfu/well となるように添加した。30°C で 7 日間培養後の菌糸生長及びコロニー形成の有無を、顕微鏡観察または目視により評価した。生育阻止効果が認められた物質については、所定 pH 及び所定温度で加熱条件下での最小生育阻止濃度を求めた。

### 2.7 菌糸生長を抑制する添加物の検討

McIlvaine buffer(pH3.5)に子嚢胞子懸濁液を添加し、85°C、30 分間加熱処理した。マイクロプレート内の GP 液体培地 750 μL に、所定濃度の添加物と 10<sup>4</sup> cfu/well となるよう加熱処理後の子嚢胞子懸濁液を添加した。30°C で 7 日間培養後の菌糸生長及びコロニー形成の有無により生育を評価した。生育阻止効果が認められた物質については所定温度で 30 分間加熱条件下での最小生育阻止濃度を求めた。

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 変敗ゼリー製品及び加工果実からの耐熱性かびの分離・同定

変敗ゼリー製品は、濁りや白色ゲル状物の生成、膨張、液化といった外観の異常が認められた。原因菌を分離した結果、変敗ゼリー製品から 13 株のかびが分離された。28S rDNA D1/D2 領域の塩基配列による種の同定試験を行った結果、変敗ゼリー製品から分離された株は、*Neo. pseudofischeri* 5 株、*Byssochlamys spectabilis* 2 株、*Bys. nivea* 2 株、*Talaromyces* sp. 1 株であった。また、一般的に耐熱性かびとして定義されていないが、子嚢菌類の一種である、*Trichocladium pyriforme* 1 株、*Monascus ruber* 2 株も分離された。次に、製品に使用された加工果実から耐熱性かびの分離を試みた。その結果、75°C、30 分間の加熱条件下で耐熱性を有するかびが 5 株分離され、*Neo. pseudofischeri* 3 株と *Talaromyces* sp. 2 株と同定された。なお、変敗ゼリー製品と加工果実のそれぞれから分離された *Neo. pseudofischeri* の 1 株については、100%の相同性が認められ、極めて類縁の株と推測された。

### 3.2 分離株の耐熱性試験

変敗ゼリー製品及び果実加工品から分離した株のうち 10 株について、70~90°C、30 分間の耐熱性試験を行った結果を図 1 に示す。その結果、*Bys. spectabilis* HW001、*Mon. ruber* No.3 を除く 8 株で、80°C、30 分以上の耐熱性が確認された。85°C 及び 90°C での耐熱性は株により差があり、90°C、30 分以上の耐熱性を有する株も認められた。最も多く分離された *Neo. pseudofischeri* はいずれも耐熱性が高かった。耐熱性かびとして報告されていない子嚢菌類のうち、*Mon. ruber* は耐熱性が確認されなかった。*Tri. pyriforme* では分離株、分譲株ともに、耐熱性が確認された。*Tri. pyriforme* は土壌からの分離菌として報告されているため、土壌を介して果実へ汚染する可能性が示唆された。分離株と分譲株の一部について D 値を求め、文献値<sup>1)</sup>と比較した(表 2)。分離株はいずれも分譲株や文献値と

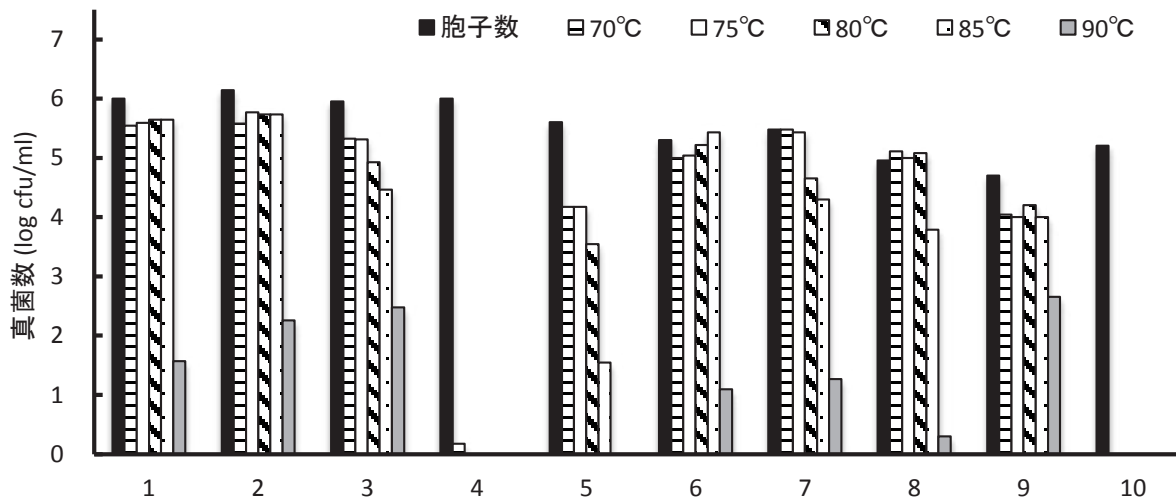


図1 分離株の耐熱性試験

1: *Neo. pseudofischeri* HW003, 2: *Neo. pseudofischeri* No. 9, 3: *Neo. pseudofischeri* 2-13, 4: *Bys. spectabilis* HW001, 5: *Bys. nivea* HW002, 6: *Talaromyces* sp. HW006, 7: *Talaromyces* sp. 6-17, 8: *Tal. bacillisporus* 3-11, 9: *Tri. pyriforme* HW007, 10: *Mon. ruber* No.3  
加熱時間はいずれも30分間とした。

表2 分離株及び分譲株の耐熱性

菌名	耐熱性		
	加熱媒体	加熱温度	D値
<i>Neo. pseudofischeri</i> HW003	グルコース酒石酸緩衝液	90℃	18分
<i>Neo. pseudofischeri</i> NBRC33244	グルコース酒石酸緩衝液	90℃	4分
<i>Neo. fischeri</i> *	リンゴ果汁	85℃	13分
<i>Bys. nivea</i> HW002	グルコース酒石酸緩衝液	85℃	14分
<i>Bys. nivea</i> *	ブドウ果汁	75℃	60分
<i>Talaromyces</i> sp. HW006	グルコース酒石酸緩衝液	90℃	14分
<i>Talaromyces</i> *	リンゴ果汁	88℃	8分
<i>Talaromyces</i> *	リンゴ果汁	90℃	3分
<i>Tri. pyriforme</i> HW007	グルコース酒石酸緩衝液	90℃	15分
<i>Tri. pyriforme</i> NBRC32553	グルコース酒石酸緩衝液	90℃	10分

\*: 文献値

同等の耐熱性を有していることが確認された。

### 3.3 子嚢胞子の加熱損傷を促進する添加物の探索

本研究で分離された株のうち、*Neo. pseudofischeri* HW003 株は原材料及び製品からの検出頻度が特に高く、耐熱性も高かった。そのため *Neo. pseudofischeri* HW003 株を対象として、子嚢胞子の加熱損傷を促進する添加物を検討した。かびの生育抑制を目的として使用され、飲料や果汁への添加が許可されている保存料、日持ち向上剤を中心に検討した。表3に85℃、30分間の加熱下での生育阻止効果を示す。多くの試験区では発芽の遅れがみられたが、培養に伴い加熱時の損傷から回復した。亜硫酸ナトリウム、酢酸、フェニル乳酸について、

加熱損傷を促進する効果が認められた。類縁菌である *Neo. fischeri* ATCC200957 子嚢胞子のブドウ果汁中での耐熱性が、ソルビン酸カリウム添加により低下すると報告されているが<sup>4)</sup>、本研究においては生育阻止効果は認められなかった。これは加熱媒体を始めとする試験条件の差異による可能性がある。

次に、亜硫酸ナトリウム、酢酸、フェニル乳酸について、作用 pH 域を確認した結果、酢酸は pH4.4 以下、亜硫酸ナトリウムとフェニル乳酸では pH3.6 以下で生育阻止効果が認められた。亜硫酸ナトリウムは SO<sub>2</sub>、酢酸、及びフェニル乳酸では解離型での作用が推測される。

表3 加熱との併用による生育阻止効果

添加物質	最小生育阻止濃度 (%) <sup>*</sup>	生育阻止 pH
ソルビン酸K	>0.4	
安息香酸Na	>0.2	
デヒドロ酢酸Na	>0.4	
亜硫酸Na	0.03	2.8~3.6
プロピオン酸Na	>0.4	
チアミンラウリル硫酸塩	>0.1 <sup>**</sup>	
エタノール	>30	
酢酸	1	2.8~4.4
ポリリジン	>1.0 <sup>**</sup>	
グリセリン脂肪酸エステル	>1.0 <sup>**</sup>	
キトサン	>4.0 <sup>**</sup>	
わさび抽出物	>1.0 <sup>**</sup>	
フェニル乳酸	0.2	2.8~3.6

\*: pH3.5、85℃、30分間加熱

\*\*：製剤としての添加量

次に、加熱温度(70~85℃)と添加濃度との関係について検討した。その結果、70℃では、フェニル乳酸では0.8%で生育阻止効果が認められた。一方、亜硫酸ナトリウムでは0.1%、酢酸では4.0%までの濃度では生育阻止効果が認められなかった。また、亜硫酸ナトリウムの80℃での生育阻止効果は85℃と同様だったが、フェニル乳酸では0.8%、酢酸では4.0%まで濃度を高める必要があった。

以上の結果から、亜硫酸ナトリウム、酢酸、フェニル乳酸の添加により、85℃以下での子嚢胞子の加熱殺菌が可能となった。食品添加物の使用基準及び風味への影響を考慮すると、最終製品へ添加は困難であるが、汚染可能性のある果実の殺菌や器具の洗浄への利用は可能であると考えられた。

### 3.4 菌糸生長を抑制する物質の探索

子嚢胞子のヒートショック後の発芽あるいは菌糸生長を抑制する添加物について検討した。表4に85℃、30分間加熱後の子嚢胞子の菌糸成長に対する添加物の抑制効果の結果を示す。保存料ではソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、日持ち向上剤ではチアミンラウリル硫酸塩製剤、酢酸、グリセリン脂肪酸エステル製剤、その他抗菌物質ではフェニル乳酸に生育阻止効果が認められた。子嚢胞子の加熱損傷促進効果が認められた物質のうち、酢酸とフェニル乳酸

では菌糸生長の抑制効果も認められた。

次に、子嚢胞子の加熱温度の影響(70℃~85℃)について検討した。ソルビン酸カリウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、チアミンラウリル硫酸塩製剤では、子嚢胞子の加熱温度70~80℃においても85℃と同様の生育阻止効果が確認された。一方、安息香酸ナトリウム、グリセリン脂肪酸エステル製剤、フェニル乳酸については、子嚢胞子の加熱条件が70~80℃では85℃と同様の生育阻止効果は認められなかった。したがって、これらの添加物の作用は、子嚢胞子の部分的な加熱損傷との相乗効果である可能性が示唆された。

以上の結果から、指定添加物については使用基準内の効果が認められたため、最終製品への使用が可能であることが確認された。しかしながら、一部の添加物では、果汁の種類による生育阻止効果の差異が認められた。果汁成分やpHの影響が示唆されたため、今後検討する必要がある。

## 4. 結び

耐熱性かびが原因と推測される変敗ゼリー製品、及び変敗原因となりうる果実加工品から18株のかびを分離・同定し、耐熱性を評価した。分離された株のほとんどが、ゼリー製品の加熱条件(85℃、30分)を上回る耐熱性を有していた。次に、*Neo. pseudofischeri* HW003株について、子嚢胞子の加熱損傷を促進、あるいは子嚢胞子からの発芽及び菌糸生長を抑制することにより、子嚢胞子の生育による変敗を防止可能な添加物を選定した。子嚢胞子の加熱殺菌については、今後、複数の添加物の併用効果等により、食品添加物の使用基準や風味への影響を考慮した制御方法を確立する必要がある。

## 文献

- 1) 宇田川俊一：食品のカビ汚染と危害，P175(2004)，幸書房
- 2) V. Tournas and R. W. Traxler : *J. Food Prot.*, **57**, 814(1994)
- 3) 相川勝弘，浅井良夫，尾上洋一：神奈川県衛生研究所研究報告，**37**，12(2007)
- 4) E. Rajashekhara, E. R. Suresh and S. Ethiraj : *J. Food Prot.*, **61**, 1358(1998)

表4 菌糸生長を抑制する添加物

添加物質	最小生育阻止濃度 (%)
ソルビン酸K	0.02
安息香酸Na	0.04
デヒドロ酢酸Na	0.01
亜硫酸Na	>0.3
プロピオン酸Na	>0.4
チアミンラウリル硫酸塩	0.2*
エタノール	>10
酢酸	0.2
ポリリジン	>1.0*
グリセリン脂肪酸エステル	0.1*
キトサン	>4.0*
わさび抽出物	>1.0*
フェニル乳酸	0.4

\*: 製剤としての添加量  
子嚢胞子は85℃、30分間加熱した。