

# 食品製造工場におけるカビ汚染 I

## 菓子製造工場におけるカビ汚染

高橋 治男<sup>1)</sup> 矢崎 廣久<sup>1)</sup> 七山 悠三<sup>1)</sup> 松本 邦昭<sup>2)</sup>  
 太田 洋子<sup>2)</sup> 小林 崇則<sup>3)</sup> 木内 良春<sup>4)</sup> 穴倉 忠夫<sup>5)</sup>

### Fungal Contamination of Food Factory. I Fungal Contamination of Confectionery Factory

Haruo TAKAHASHI, Hirohisa YAZAKI, Yuuso NANAYAMA, Kuniaki MATSUMOTO,  
 Yooko OTA, Takanori KOBAYASHI, Yoshiharu KIUCHI and Tadao SHISHIKURA

#### I 緒言

近年、食品汚染カビの一種である *Aspergillus flavus* の産生するアフラトキシン(Aflatoxin)が きわめて高い毒性ならびに発癌性を有することが明らかにされて以来、この種のカビの二次代謝産物に対する食品衛生的関心は、飛躍的に高まった。その結果、これまで100種をこえるカビ毒(Mycotoxin)とその産生カビがみつめられている。また、カビは、酒、味噌、医薬品などの製造に欠かせない有用な役割を果している反面、空気中や土壌中に普遍的に存在するため、多くの食品工場においては、その汚染微生物であることが多い。従ってそれらカビによる製品の汚染防止は、食品衛生のみならず品質管理の上でも大きな課題となっている。

著者らは、カビの発生がみつめられた菓子を製造する工場内において、落下菌をはじめ原料、工場内の塵埃及び製品からカビの分離・同定を行ない、その汚染実態から汚染源を明らかにした。更に、*Aspergillus* ならびに *Penicillium* 属に属する毒素産生カビについては、培養によりその分離株の毒素産生性についても検討を加えたので報告する。

#### II 方法

菌分離：落下菌の場合は、細菌の増殖を抑えるためクロラムフェニコール(100mg/ℓ)を添加したジャガイモ・ブドウ糖寒天平板培地を、工場内の5ヶ所(図1)に置き就業前あるいは就業中について、それぞれ40分間開放し、採

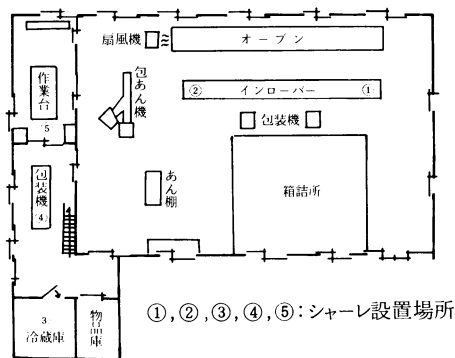


図1. 工場内平面図(縮尺度 1:200)

取を行なった。その後、それらの平板を25°Cで5~7日間培養を行ない、検出される菌の計数と分離を行なった。また、塵埃、原料(小麦粉)及び製品については、その1gを滅菌生理食塩水に懸濁した後、その上澄液の一定量を取り、前述の抗生物質添加ジャガイモ・ブドウ糖寒天培地にて、25°C 5~7日間混釈培養を行ない菌の計数と分離を行なった。菌分離は、すべて、それらの集落をジャガイモ・ブドウ糖寒天斜面に鈎菌して行なった。

菌同定：常法通りジャガイモ・ブドウ糖寒天、コーンミール寒天、麦芽エキス寒天の所定の培地上にて、それら分離株の巨大集落あるいはスライド・カルチャーを作成し、集落の色調及び性状ならびに菌の形態観察により成書<sup>1-3)</sup>に従い同定を行なった。

毒素産生能の検討：検討の対象とした菌種とその産生毒素及び供試株数を表5に示した。まず *A. flavus* によるアフラトキシン、*A. versicolor* あるいは *A. nidulans* によるステリグマトシスチン(*Sterigmatocystin*)の産生能の検討の場合には、常法通り<sup>4)</sup>分離株の斜面培養より一白金鈎胞子を蒸米に接種し、前者の場合には28°Cで7日間、後者の場合には25°Cで15日間培養を行なった。培養終了後、いずれもクロロホルムにより毒素の抽出を行ない、抽出液を濃縮した。次に、その一部をプレコート薄

1) 千葉県衛生研究所  
 2) 千葉県勝浦保健所  
 3) 千葉県勝浦保健所(現在,千葉県木更津保健所)  
 4) 千葉県勝浦保健所(現在,千葉県館山保健所)  
 5) 千葉県勝浦保健所(現在,千葉県南総食肉検査所)  
 (1982年10月1日受理)

層クロマトプレート(Merck社製, Type 60)上にスポットした。それらのプレートを、アフラトキシンの検索の場合には、クロロホルム：アセトン：n-ヘキサン，85：15：20(V/V/V)，ステリグマトシステンの場合には、ベンゼン：メタノール：酢酸，90：5：5(V/V/V)の溶媒系で展開した。展開後，プレートにアフラトキシンの場合には365nmの紫外線を照射し，またステリグマトシステンの場合には20%塩化アルミニウムアルコール溶液を噴霧した後，80°Cで15分間加熱し，同様に365nmの紫外線照射下でそれら毒素の検索を行なった。一方，ペニシリン酸は，Ciegler(5)らの方法にほぼ準じて行なった。すなわち，加湿滅菌トウモロコシ30gに同様に菌を接種し，20°Cで14日間培養を行なった。次にこの培養物にクロロホルム：メタノール(9:1, V/V)125mlを加えた後，ワーリングブレンダーを用い3分間破砕抽出を行ない，ろ紙ろ過によりその抽出液を得た。この抽出液を減圧濃縮後，メタノール：水(2:1, V/V)100mlで洗い込み，n-ヘキサン100mlで2回脱脂を行なった。このn-ヘキサン区分は，更にメタノール水50mlと振り混ぜ，移行したペニシリン酸を回収し，さきの抽出液と併せさせた。次に，この抽出液に，蒸留水50mlを加え，更にクロロホルム100mlを加え振りまぜ転溶させた後，このクロロホルムを減圧濃縮した。その一定量をプレコート薄層クロマトプレートにスポットし，酢酸エチル：クロロホルム：ギ酸(60:40:1, V/V/V)の溶媒系を用いて展開した。展開後，プレートにp-アニスアルデヒド溶液を噴霧し，110°Cで10分間加熱呈色させ，365nmの紫外線下での蛍光の有無と併せて毒素の検索を行なった。

### Ⅲ 結果及び考察

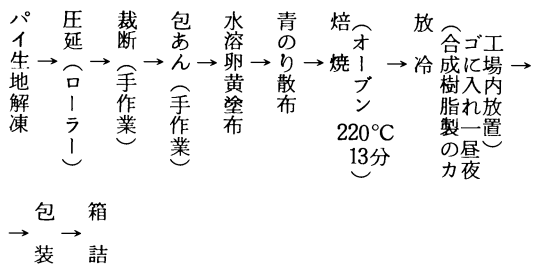
工場内5ヶ所における就業前，就業中における落下菌数を表1に示した。③および④の場所を除けば作業開始

表1 工場内における落下菌数

時刻 場所	作業前 (午前8時)	作業中 (午前10時)
①	9	39
②	12	250
③	11	0
④	77	60
⑤	31	55
計	140	404

と共に菌数は増加し，特に小麦粉を使用している包あん機近くの②では，就業前の20倍と著しい増加を示した。表2の製造工程で示したように，オープンで焼き上げられた製品は，合成樹脂製のカゴに入れられ，インローパ

表2 製造工程



ーの右端やオープンと石壁との空間に積まれ，一昼夜放冷される。

従って，本工場内における製品のカビによる主たる汚染は，さきの落下真菌の結果と併せ考えると，焙焼後の放冷の工程時におこるものと推定された。

落下真菌および検査材料におけるカビの検出数ならびにその属分布を表3に示した。まず落下菌では，*Clados-*

表3 検出カビの属分布

属名	落下菌		小麦粉		塵埃		製品	
	菌数	比率(%)	菌数	比率(%)	菌数	比率(%)	菌数	比率(%)
<i>Cladosporium</i>	450	82.7	23	2.7				
<i>Penicillium</i>	41	7.5	196	23.5			8	30.8
<i>Aspergillus</i>	16	2.9	616	73.8	2611	62.4	1	3.8
<i>Oldiodendron</i>	14	2.6					12	46.2
<i>Alternaria</i>	3	0.6						
<i>Aureobasidium</i>	2	0.4						
<i>Aschochyta</i>	2	0.4					5	19.2
<i>Acremonium</i>	2	0.4						
<i>Phoma</i>	1	0.2						
<i>Mucor</i>					1494	34.8		
<i>Rhizopus</i>					80	1.9		
Yeasts	13	2.4						
計	544	100.1	835	100.0	4185	100.0	26	100.0

*porium*が最も多く大半を占め，以下 *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*などがこれに次いだ。このような結果は，他の食品工場における落下真菌の結果<sup>6)</sup>とほぼ一致した。これは，それらが，食品工場における主要な汚染カビであることを示している。原料の小麦粉では，カビ汚染の指標となるグラム当りの菌数が薄力粉では203，

強力粉では632であった。この成績は、市販小麦粉中におけるグラム当りのカビ数にはかなりの変動があるとされているものの、これまでの報告<sup>7)</sup>からみるとほぼ平均的な値とみなされた。その属の構成においては、*Aspergillus*が圧倒的優位を占め、それに *Penicillium* を加えるとはほぼ全体を占めた。それらが占める比率に若干差はあるものの、それら二属が粉状食品の主要汚染カビであるというこれまでの報告<sup>7,8)</sup>と一致した。一方、塵埃においては、そのグラム当りの菌数が扇風機土のその場合2745、また包あん機のそれは1440と非常に多くのカビが検出された。それらのホコリは、通常みられるような塵埃と異なり、白色粉末状を呈し、このことは、空中へ飛散した原料の小麦粉が長期間の内に落下・堆積し、形成されたものと推定された。また、製品においては、グラム当りの菌数は26で、*Oidiodendron* と *Penicillium* で大半を占めた。この菓子の水分含量は22.8%で、糖分を含むとは言え比較的カビの増殖は起こりやすい条件下にあると言える。

カビ毒産生菌の多くは、*Aspergillus*あるいは *Penicillium* 属に含まれることから<sup>9)</sup>、今回検出されたそれら二属のカビについては、更に詳細な同定を行なった。その結果を表4に示した。まず、*Penicillium*についてみると、比較的菌種は少なくペニシリン酸などを産生する *P. verrucosum var. cyclopium* が全体として優位を占めた。一方、*Aspergillus*は、*A. oryzae*を除けば、*A. flavus*をはじめ *A. versicolor*、*A. nidulans*、*A. ochraceus*、*A. fumigatus*、*A. clavatus* の分離されたいずれもが、カビ毒産生能を有するとされている菌種であり、食品衛生上注意を要するカビであった。落下菌や塵埃から検出された *A. flavus*、*A. clavatus* ならびに *A. fumigatus* などは、一般住居からは分離されることは少なく<sup>10)</sup>、むしろ原料として用いられている小麦粉中には多く存在している<sup>7,8)</sup>。今回の試験において *A. flavus* や *A. fumigatus* が原料粉や製品の菓子から分離されなかったのは、それら検査材料の検体数が少なかったためと考えられる。

以上の結果は、本工場内におけるカビの汚染が、飛散した原料の小麦粉が放冷中の製品に落下・付着することにより生じる二次汚染であることを、強く示唆した。

次に、分離株の毒素産性についての検討結果を表5に示した。供試の *A. flavus* にアフラトキシン産生はみとめられなかった。アフラトキシン産生能を有する *A. flavus* には地理的分布があり、沖縄を除く日本列島の土壌には生息しにくいとされている<sup>12)</sup>。しかしながら、森らは<sup>8)</sup> 弱いながらもアフラトキシン B<sub>1</sub> および B<sub>2</sub> を産生する小麦粉由来の分離株を得ており、今後とも品質管理の面で充

表4 *Aspergillus* および *Penicillium* 属の種分布

菌種名	落下菌		小麦粉		塵埃		製品	
	菌数	比率(%)	菌数	比率(%)	菌数	比率(%)	菌数	比率(%)
<i>A. flavus</i>	5	31.3			258	9.9		
<i>A. oryzae</i>					2222	85.1		
<i>A. versicolor</i>	8	50.0					1	100
<i>A. nidulans</i>			228	37.0	131	5.0		
<i>A. ochraceus</i>	1	6.2						
<i>A. fumigatus</i>								
<i>A. clavatus</i>	2	12.5	388	63.0				
小計	16	100.1	616	100.0	2611	100.1	1	100
<i>P. verrucosum var. cyclopium</i>	33	80.6					196	100
<i>P. frequentans</i>	8	19.4						
<i>P. decumbense</i>			8	100				
小計	41	100.0	8	100	0	0	196	100
総計	57		624		2611		197	

表5 分離カビの毒素産生能

菌種	検査対照毒素	供試株数	産生株数
<i>Aspergillus flavus</i>	アフラトキシン	4	0
<i>Aspergillus nidulans</i>	ステリグマトシスチン	2	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	ステリグマトシスチン	2	2
<i>Penicillium verrucosum var. cyclopium</i>	ペニシリン酸	5	0

分な注意が必要と言える。ステリグマトシステンの産生は、*A. nidulans* にはみとめられなかったが、*A. versicolor* においては供試の2株ともに顕著な産生を示した。そのうちの1株は、製品から分離されたものであった。一言ら<sup>11)</sup> 空気中より本毒素を産生する *A. versicolor* を得ており、この産生菌は普遍的に存在するものとみられる。一方、ペニシリン酸は、小麦粉由来の1株に強い産生能がみとめられた。その外、2株に薄層クロマトプレート上で、やや発色の色調は異なるがRf値がほぼ一致するスポットがみとめられた。この物質は疑似物質の可能性もあり、今後の検討を要すると思われる。

このように、食品工場内においてはカビ毒産生菌が常在しており、原料や製品を汚染する機会を常にうかがっているといえ注意を要する。

一般に、食品工場においてはカビの増殖に適した温度や湿度条件が与えられるため、工場内全体が汚染源となる危険性を有している。その上、カビの胞子は空気中に浮遊しいかなる場所へも移動するため、その完全な汚染防止は困難であることが多い。工場内の定期的な洗浄、防霉剤の噴霧なども行なわれているが<sup>13)</sup>、著者らは簡単な施設改善や脱酸素剤(エージレス F-200, 三菱瓦斯化学会社製)の添加にもその効果をもとめた。

#### IV 文献

- 1) Barnett, H. L. and Hunter, B. B. (1972): Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 3rd edition. Burges Publishing Company, Minneapolis.
- 2) Pitt, J. I. (1979): The Genus *Penicillium*, Academic Press (Tokyo).
- 3) Raper, K. E. and Fennel, D. I. (1965): The Genus *Aspergillus*, The Williams and Williams and Wilkins Co., (Baltimore).
- 4) Schroeder, H. W. (1970): Aflatoxins in Rice in the United States, Proceedings of the First U. S.—Japan Conference on Toxic Micro—Organisms, 56—61.
- 5) Ciegler, A. and Kurtzman, C. P. (1979): Penicillic Production by Blue—eye Fungi on Various Agricultural Commodities, Appl. Microbiol., 20, 761—764.
- 6) 山崎晶男(1981) パン, 和洋菓子メーカーにおける衛生対策とカビ汚染予防面からみた問題点について, 食品衛生微生物研究会, 第2回学術講演会要旨集, 26~27.
- 7) 倉田浩, 一戸正勝(1967): 食品中における有毒糸状菌に関する研究, (I)粉状食品, 主として穀粉類の糸状菌分布, 食衛誌, 8, 247~252.
- 8) 森實, 他(1974): 穀類ならびにその加工食品の糸状菌汚染と分離糸状菌のアフラトキシン産生能について, 食衛誌, 15, 95~99.
- 9) 一戸正勝, 倉田浩(1976): マイコトキシン産生糸状菌の汚染の現状とその問題点, 食衛誌, 17, 337~344.
- 10) 市川栄一, 他(1979): 住居を汚染するカビ被害の実態について, 第6回日本防菌防霉学会年次大会講演.
- 11) 一言広, 他(1978): 大気中の毒性カビ分布について, 都衛研報, 29, 86~94.
- 12) 真鍋勝, 他(1977): 本邦土壤中のアフラトキシン生産菌群の分布, 日菌報, 17, 436~444.
- 13) 池田安之助(1979): 食品工場における空中菌対策, 無菌包装食品の技術, 衛生技術会(東京), 157~169.
- 14) 松本邦昭, 他(1981): 菓子の真菌汚染源の追求及びその対策について, 昭和56年度千葉県食品衛生関係職員研修会発表抄録, 5~6.