

短報

清涼飲料水原材料からのカビの分離 と分離カビの耐熱性について

相川勝弘, 浅井良夫, 尾上洋一

Heat resistance of mold isolated from raw materials for soft drink

Katsuhiro AIKAWA, Yoshio ASAI
and Yoichi ONOUE

はじめに

食品からの耐熱性カビの報告は、1930年代の果実の缶詰からの分離¹⁾が最初であり、当時はブルーベリー、イチゴなどの果実の缶詰による事故が主体であったが、食品製造技術の変遷等に伴い加熱工程のある加工食品全般から分離が報告されるようになってきた²⁾。

一般のカビは、湿熱条件では70℃、10分間で死滅するが、有性生殖器官として子嚢を形成する子嚢菌類、厚膜胞子や菌核などの耐久性細胞を形成するカビでは、耐熱性を示すことがある。カビの耐熱性の定義は明確に示されているわけではないが、80℃の湿熱による殺菌で生残する菌のほとんどは、耐熱性カビとみなしてよいとされている³⁾。

加熱加工食品にカビ発育の事故が起こるのは、加熱前の原材料や中間製品に子嚢胞子の汚染があった場合に加熱工程の熱により休眠していた子嚢胞子が活性化され、カビが発育してくることが原因となっている³⁾。

今回、清涼飲料水の原材料である濃縮果汁、濃縮野菜汁、紅茶葉および緑茶葉について、カビの汚染状況および耐熱性カビの分離を試みたところ、子嚢胞子を形成するカビが分離され、そのカビの耐熱性試験を実施したので報告する。

方法

1. 清涼飲料水の原材料

清涼飲料水の原材料として、清涼飲料水製造施設から提供を受けた果汁8検体、野菜汁5検体、紅茶葉4検体および緑茶葉2検体を用いた。果汁および野菜汁は、すべて濃縮、冷凍保存で種類はオレンジ、グレープフルー

ツ、リンゴ(2種類)、グレープ(2種類)、パインアップル、ミックス、ニンジン(2種類)、セロリ、アスパラガスおよびハウレンソウであった。ミックス果汁は、日本でブレンドしたもので、それ以外は、輸入品(ブラジル、アメリカ、中国、南アフリカ、フィリピン、ニュージーランドおよびオランダ)であった。紅茶葉の原産国は、スリランカまたはスリランカ、インドおよびインドネシアのブレンド品、緑茶葉の原産国はすべて日本と中国のブレンド品であった。

2. 原材料からのカビの分離

カビ数の算定では、粘稠度の高い果汁においては果汁1mlに0.1%ペプトン水9mlを加えたものを試料とし、茶葉においては、茶葉10gに0.1%ペプトン水90mlを加えたものを試料とした。試料0.1mlをクロラムフェニコール(100mg/培地1000ml,OXOID)加Potato Dextrose Agar(Merck)平板3枚ずつにコンラージ棒で塗抹し、25℃7日間培養後、計数した。発育したカビの同定は、常法にしたがって行った。

耐熱性カビの検出は、果汁および野菜汁では、果汁・野菜汁50gと0.1%ペプトン水50mlを組織培養用フラスコ(150ml容)に各検体2組ずつに入れ、80℃の恒温水槽中に30分間沈めた後、氷水中で急冷し、加熱処理液を径150mmのシャーレに10mlずつ入れ、2倍濃度のクロラムフェニコール加ポテトデキストロース寒天培地10mlと混釈し、ポリエチレン袋に入れ30℃、30日間培養した。発育してきたカビは、常法により同定するとともに子嚢胞子の形成の確認を行った。子嚢胞子を形成したカビについては、走査型電子顕微鏡を用いて子嚢胞子の表面構造の観察を行った。

3. 耐熱性試験

耐熱性試験に用いる子嚢胞子は、紅茶葉から分離した子嚢胞子形成カビ15-3株をMalt Extract Agar(Merck)平板上に塗抹し、30℃で32日間および50日間の二つの異なる期間で培養したものをを用いた。子嚢胞子液の調製は、各期間培養した平板に0.01%Tween80(和光純薬)加生理食塩水を加えコンラージ棒で集落をかきとり、ガラスビーズ(φ0.991~1.397mm)の入ったチューブに入れ、ポルテックスミキサーで攪拌後、セルストレイナー70μm(BD Falcon)およびナイロンネットフィルター11μm(MILLIPORE)でろ過し、生理食塩水で3回洗浄して行い、10⁶~10⁷CFU/mlにした。試験子嚢胞子液は、使用する直前に70℃、10分間の加熱処理により、分生子および菌糸を死滅させたものをを用いた。

耐熱性試験の加熱媒体の組成は、グルコース16g、酒石酸0.5g、蒸留水100ml(pH3.6, Brix.14%)とした。加熱媒体は、3.8mlをキャップ付のガラス管(内径

10mm, 高さ120mm) に分注し, 115℃, 10分間高圧蒸気滅菌して用いた. 加熱媒体の入ったガラス管の加熱には, サーモアルミバス (旭テクノグラス) を用いた. 加熱媒体を各所定の加熱温度 (80℃, 85℃および90℃) で保持した後, 調製した子嚢胞子液0.2mlを添加後所定の時間加熱した. 加熱時間は, 5, 10, 20, 30, 60および90分間のうちの3段階以上で行った. 加熱時間0分を初期子嚢胞子数とし, 所定の加熱時間経過後, 直ちに, 氷水中に入れ, 加熱処理後の加熱媒体を必要に応じて生理食塩水で10倍段階希釈したものを検液とし, 検液1mlずつをPotato Dextrose Agarで混釈, 30℃で7~10日間培養後, 発育してきた集落数から生残子嚢胞子数を算出した.

3段階の加熱温度における各加熱時間の生残子嚢胞子数から, 生残子嚢胞子数曲線を作成した. また, 方程式 $(\log_{10} N_0 - \log_{10} N)^\alpha = kt + C$ (3-4) により子嚢胞子の熱死滅率を計算した. N_0 および N は, 子嚢胞子の初期計数値および生残子嚢胞子数, t は加熱温度時の加熱時間 (分), 指数 α は $\log_{10} t$ に対する $\log_{10} (\log_{10} N_0 - \log_{10} N)$ で作図した曲線の傾きの逆数, k は死滅割合の定数で直線化した曲線の傾き, C は定数で直線化した曲線の切片とした.

結果および考察

清涼飲料水の原材料として提供を受けた果汁および野菜汁のカビ数と分離カビを表1に示した. 13検体中11検体は, 検出限界以下であった. リンゴ果汁2検体からは, *Aspergillus*属, *Penicillium*属のカビが分離された. また, 果汁および野菜汁13検体を80℃, 30分間加熱した場合にカビの発育は認めなかった. 今回の果汁および野菜汁のほとんどのものは, カビの検出が検出限界以下であり, 耐熱性カビの分離を認めず, 果実飲料の殺菌方法が, 93~95℃に加熱された熱間充填が普通であることから, 製品のカビによる変敗は防止できると思われる. しかしながら, 果実および野菜は, カビの汚染を受けやすいので果汁および野菜汁作製時の衛生管理が重要になるとと思われる. リンゴ果汁からマイコトキシンの一つであるパツリンの産生に関する*Aspergillus*属, *Penicillium*属の分離があったことは, カビの汚染防御だけでなくマイコトキシンの含有の有無の管理が必要と思われる. 食品から分離される耐熱性カビによる変敗の問題の主体が果実加工品であった²⁾が, 今回の調査では耐熱性カビは検出されなかった.

紅茶葉および緑茶葉からのカビの分離状況を表2に示した. 緑茶葉2検体のカビ数は, 検出限界以下であった. 紅茶葉4検体のカビ数は, 100未満~1100 CFU/mlであった. 80℃, 30分間の熱処理後に分離されたカビ

は9株で, このうち子嚢胞子の形成を認めたものは1株 (15-3株) であった. 15-3株は, Malt Extract Agar上の性状⁵⁾および走査型電子顕微鏡による子嚢胞子の表面構造 (図1) から *Talaromyces trachyspermus* と同定し

表1 果汁、野菜汁のカビ数と分離カビ

果汁・野菜汁	カビ数 (CFU*/ml)	分離カビ
濃縮混濁リンゴ果汁	20	<i>Aspergillus</i> 属
濃縮透明リンゴ果汁	40	<i>Aspergillus</i> 属, <i>Penicillium</i> 属
濃縮ホワイトグレープ果汁	10未満	—
濃縮オレンジ果汁	100未満	—
濃縮グレープフルーツ果汁	100未満	—
濃縮コンコトグレープ果汁	100未満	—
濃縮パインアップル果汁	100未満	—
濃縮ミックス果汁	100未満	—
濃縮ニンジン汁①	10未満	—
濃縮ニンジン汁②	10未満	—
濃縮セロリ汁	10未満	—
濃縮アスパラガス汁	10未満	—
濃縮ホウレンソウ汁	10未満	—

*CFU: Colony Forming Unit, **—: 分離カビなし

表2 茶葉のカビ数と熱処理後の分離カビ

茶葉	カビ数 (CFU*/g)	熱処理後の 分離株数	子嚢胞子 形成株数
紅茶葉①	1100	0	0
紅茶葉②	400	4	0
紅茶葉③	100	4	1
紅茶葉④	100未満	1	0
緑茶葉①	100未満	0	0
緑茶葉②	100未満	0	0

*CFU: Colony Forming Unit

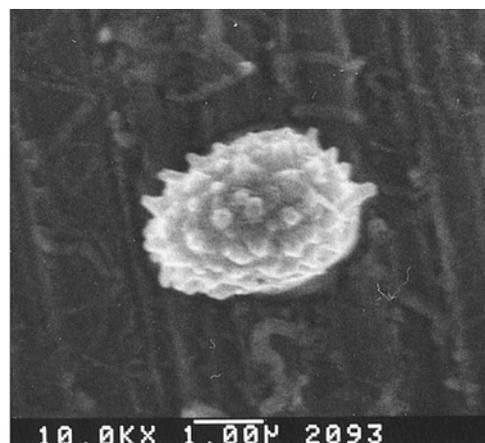


図1 紅茶葉から分離された *Talaromyces trachyspermus* (15-3株) の子嚢胞子 SEM像

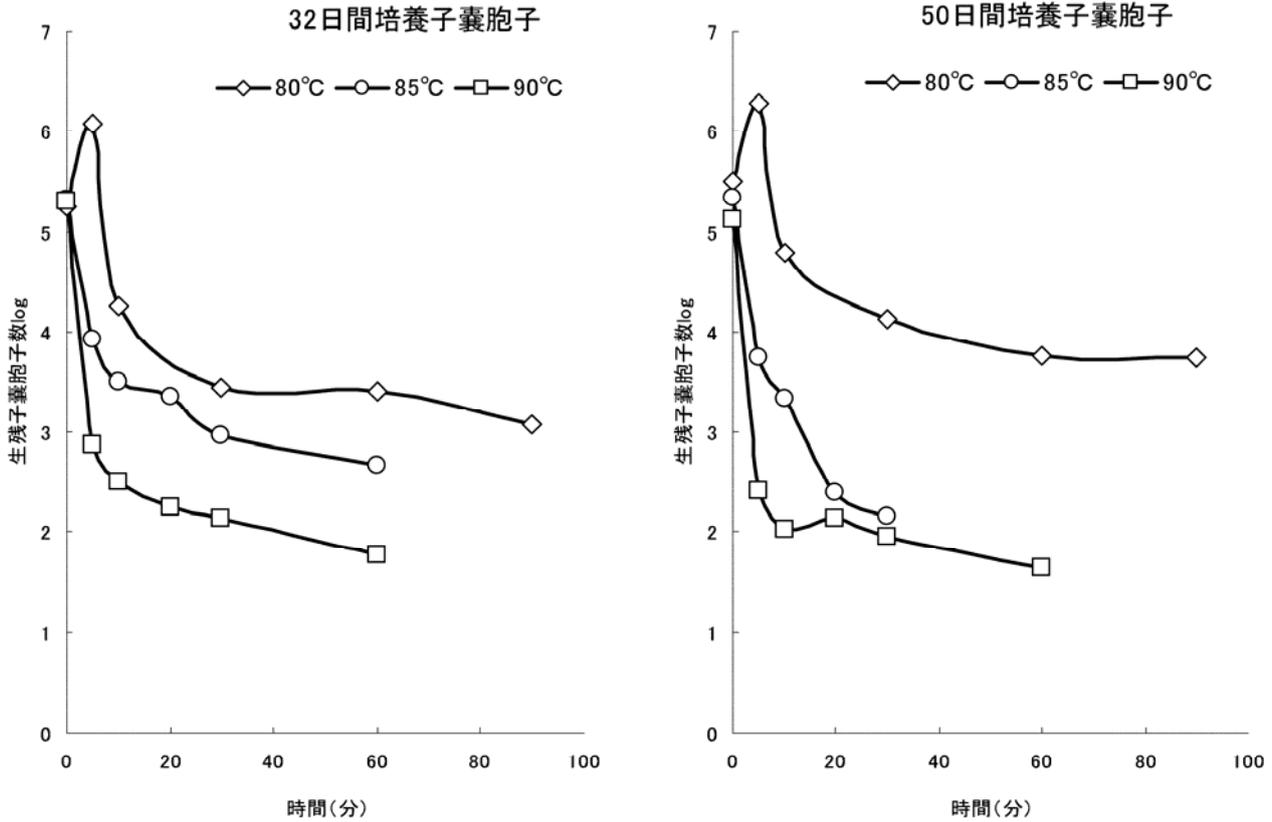


図2 紅茶葉から分離された *Talaromyces trachyspermus* (15-3株) の生残子囊胞子数曲線 (32日間および50日間培養子囊胞子)

た. 紅茶葉から分離された *T.trachyspermus*(15-3株)の耐熱性試験は, 32日間および50日間の培養期間で得られた子囊胞子を用いて行い, その生残子囊胞子数曲線を図2に示した. 子囊胞子の培養期間が32日と50日のいずれの場合も加熱温度80°Cでは, 加熱時間5分のときに子囊胞子の活性化に伴う生残子囊胞子数の増加が認められた. また, 実施したすべての加熱温度において加熱時間が経過するとともに, 生残子囊胞子数の減少率が緩やかとなり, 直線性のある対数減少は認められなかった. 耐熱性カビの耐熱性試験におけるこの2つの現象については, King and Halbrook⁶⁾によって報告されており, 生残子囊胞子数曲線が直線にならない場合は, 方程式 $(\log_{10} N_0 - \log_{10} N)^\alpha = kt + C$ が用いられている. この方程式のlog時間 (分) に対する $\log(\log_{10} N_0 - \log_{10} N)$ のグラフを作成し, その傾きから α を決定した. この α を用いて各時間に対する $(\log_{10} N_0 - \log_{10} N)^\alpha$ を求め, 加熱温度80°Cおよび85°Cにおける熱死滅率曲線を作成した (図3). 加熱温度が同じ場合, 子囊胞子の培養期間32日のほうが50日のものよりも直線の傾きが大きくなり, 死滅率が高くなることがわかった. また, 加熱媒体のpH, Brix., 有機酸および供試する子囊胞子の培養条件が子囊胞子の耐熱性に影響を与えるという King and

Whitehandの報告もある⁷⁾. したがって, 耐熱性の比較にあたっては, 耐熱性試験実施における条件を同一にすることが必要であり, 耐熱性試験の実施においては, 供試菌株は少なくとも3週間以上の培養による胞子形成とその成熟の確認, 加熱媒体の標準液としては今回用いたグルコース16g, 酒石酸0.5g, 水100ml(pH3.6)使用が必要条件とされている.

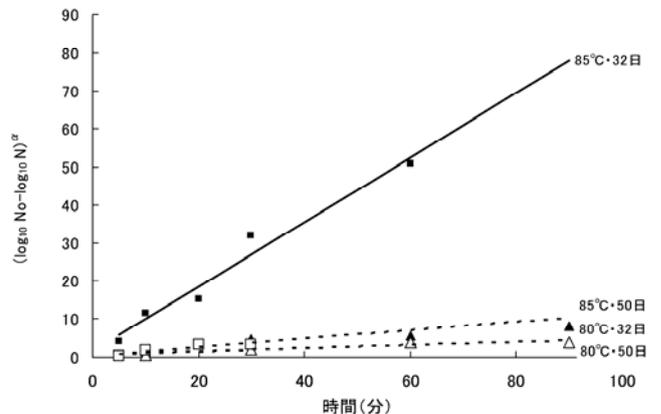


図3 紅茶葉から分離された *Talaromyces trachyspermus* (15-3株) の公式 $(\log_{10} N_0 - \log_{10} N)^\alpha = kt + C$ による生残子囊胞子数曲線の直線化

方程式($\log_{10} N_0 - \log_{10} N$)^a = $kt + C$ から各加熱温度における1/kを求めた結果および3logの子嚢胞子を死滅させる値から計算された時間を表3に示した. *T. trachyspermus* (15-3株)の1/k値および3logはそれぞれ, 80°Cで11.0~24.5分および239.6~299.3分, 85°Cで1.2~8.7分および69.1~126.3分, 90°Cで1分以内および8.5~18.5分であった. 1/k値は, 対数の死滅率を示すD値に相応する非対数の死滅率として用いられる. 食品から検出された*T. trachyspermus*のD値として, 85°C, 45分という報告がある²⁾. *T. flavus*の耐熱性とし

ては, 80°Cにおいて1/k値63~113分, 3log値97~236分, 85°Cにおいて1/k値20~26分, 3log値32~36分, 90°Cにおいて1/k値2~8分, 3log値5~12分で, 同じ菌株であっても耐熱性に違いが認められたという報告がある⁶⁾. 今回紅茶葉から分離された耐熱性カビの耐熱性の指標値からは, 現在一般的に採用されている高温あるいは超高温殺菌条件において, 子嚢胞子が残存することはないと思われるが, 殺菌時の管理および原材料の汚染以外の管理点としては, 殺菌後の充填時における環境中の子嚢胞子の汚染に注意が必要と思われる.

表3 紅茶葉から分離された*T. trachyspermus* (15-3株)の熱耐性値

培養日数	加熱温度 (°C)	α	C	k	r^2	1/k(分)	3log(分)
32日	80	2.8450	1.0194	0.0908	0.8764	11.0	239.6
	85	4.0241	1.5378	0.8491	0.9704	1.2	96.1
	90	6.9589	80.921	108.55	0.9949	<1	18.5
50日	80	2.3191	0.5365	0.0409	0.8514	24.5	299.3
	85	2.4396	0.1511	0.1143	0.8330	8.7	126.3
	90	11.5075	72140	27771	0.9173	<1	8.5

r^2 : Cとkを決めるための時間(分)と($\log_{10} N_0 - \log_{10} N$)^aの間の決定係数

3log : 生存胞子数3logを挿入して計算した時間

謝 辞

今回、清涼飲料水の原材料の果汁・野菜汁および茶葉を提供していただきましたキリンビバレッジ株式会社湘南工場および走査型電子顕微鏡の撮影に御協力いただきました神奈川県産業技術センターの今城敏専門研究員に深謝いたします。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- Olliver M. and Rendle T. : A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssoschlamys fulva* and its effect on tissues of processed fruit, J.Soc. Chem. Ind., **53**, 166-172(1934)
- 宇田川俊一 : 食品のカビ I 基礎編 食品のカビ汚染と危害, pp.175-187, 幸書房, 東京(2004)
- G.Alderton and N.Snell : Chemical states of bacterial spores: Heat resistance and its kinetics at intermediate water activity, Appl. Microbiol., **19**, 565-572(1970)
- D.King, Jr., H.G. Bayne and G. Alderton : Non-logarithmic death rate calculations for *Byssoschlamys fulva* and other microorganisms, Appl. Environ. Microbiol., **37**, 596-600 (1979)
- 宇田川俊一, 矢口貴志 : 耐熱性子の菌類の分類と同定, ソフトドリンク技術資料 別冊清涼飲料水の微生物管理2003年, pp.131-159, 社団法人全国清涼飲料工業会, 東京(2004)
- A.D.King, Jr. and W.U. Halbrook : Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate, J. Food Sci., **52**, 1252-1254 (1987)
- A.D.King, Jr. and L.C. Whitehand : Alteration *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heating medium composition, J. Food Sci., **55**, 830-832 (1990)