

製菓製品およびペットフードの微生物学的品質管理について

Microbiological quality control on confectionery products and pet foods

杉野 恵子

Keiko SUGINO

はじめに

近年、病原性大腸菌O157による食中毒や、加工乳の黄色ブドウ球菌毒素による食中毒など大規模な食中毒の多発を背景として、消費者の食品にたいする漠然とした不安感から衛生面に強い関心がもたれている。最近では食品中に混入した異物に気がついた消費者が、保健所や食品メーカーに「苦情」を訴える例が増えて、新聞にメーカーの謝罪広告が掲載されたりしている。食品等の微生物による加害のなかで、真菌類(カビ・酵母)による加害は肉眼的に検知できるために、「苦情品」の対象になりやすいものである。したがって、各メーカーは昆虫類の混入とともにカビをはじめとする真菌類汚染対策を含めた品質管理には苦慮しているのが実状である。

そこで、食品やペットフードの品質管理に関係する真菌類の検査技術について習得することを目的に本学生生活科学研究所で研修を受けてきた。特に、カビ類の識別・同定は参考書だけでは難しいため、標準菌株を使って勉強した。また、本学の図書館を利用してカビ及びカビ毒に関する情報収集も行ってきた。

I. 実習項目

食品(製菓製品)、動物用固形飼料(ペットフード)よりの真菌類の検出法

直接培養法…培地上における増菌培養法

観察に当たり、純培養菌株をシャーレーの平

板培地に培養して観察する。種のランクの同定の際には同定用の基準培地がそれぞれ定められている場合があるが、不完全菌類全般としてはPDA培地、MEA培地が常用されることが多い。平板培地あるいは斜面培地に接種した供試菌は一定の培養期間(通常は1週間から10日間、菌種によっては3週間ぐらいまで)培養しなければ分生子の形成がよくなる場合がある。集落の生育速度(温度別)、表面および裏面の色調、表面組織の性状、分生子、分生子殻、分生子層などの形成の多少を観察、記録する。この場合、低倍率の顕微鏡(実体顕微鏡)あるいはルーペによる観察は有効であり、分生子の連鎖、集塊の確認も可能である。カビの発生苦情食品などの例ではシャーレ内にろ紙を敷いて、滅菌水を含ませて湿室状態にした中に保存することにより、新しい分生子が形成されるようになる。

1. 培地の種類と対象物による選択

カビ・酵母の分離用の培地

DRBC培地(Oxoid社):一般的なカビやカビ毒生産菌の検出用

DG-18培地(Oxoid社):好乾性のカビ・酵母の検出用

2%MEA培地(自家製):一般的なカビ・酵母の同定用

PDA培地(栄研):菌株保存用培地

CZA培地(Difco社):アオカビ、コウジカビ類を同定する時の基準培地

2. 分離培地上の出現菌類の識別と同定

直接検鏡法…実体顕微鏡および生物顕微鏡による直接観察

マスターフーズリミテッド品質管理部

- ① 実体顕微鏡による観察、異物との識別
- ② 真菌類発生試料からの釣菌標本の作製と生物顕微鏡による確認

③真菌類発生試料からの分離培養法

1) 菌株保存用培地：PDA（ポテト・デキストロース）斜面培地・綿栓付

- ・左手で試験管を持ち、右手で綿栓をとる。
- ・殺菌した白金鉤を斜面培地に一度つける。
- ・実体顕微鏡を覗きながら、試料に発生したカビの先端部分を少量とる。
- ・斜面培地の中央部分に鉤先をつける。
- ・試験管の口部分をバーナーで殺菌した後、綿栓をする。

2) スライド培養

カビの孢子の着生状態を観察するのに適している。孢子はくっついているもののなかに離れてしか見えないため、これを用いる。

器具：

シャーレ（ガラス製、90mm × 20mm）

白金鉤（通常はニクロム線で代用する）

UまたはV字形ガラス棒（7～8mm径）

スライドガラス（76mm × 26mm）

カバーガラス（24mm × 32mm）

ミクロスパーテル、菌科用ピンセット

滅菌ピペット（容量 1ml）、滅菌水（少量）

寒天培地（通常は、PDA培地平板）

スライド培養用のシャーレ中にろ紙を敷き、その上にガラス棒、スライドガラスおよびカバーガラス各1枚を入れ、乾熱滅菌しておく。一方PDAなどの適当な培地を選定し、別の滅菌シャーレに厚さ約2～3mmとなるように流し込み、平板に固化しておく。

スライドガラスの中央に培地平板から滅菌スパーテルで約5mm角に切り取った培地片を載せ、その各辺に白金鉤を用いて試験菌を接種し、カバーガラスを載せ、軽く押し付ける。乾燥を防止するために、シャーレ内のろ紙を滅菌水で潤し湿室状態として25℃、4～5日間培養する。顕微鏡でそのまま鏡検し、培地面からカビがガラス面に十分生育していることを確認したのち、

静かにカバーガラスをはがす。顕微鏡用の標本作成は新しいスライドガラスに封入液を滴下し、その上に培養後のカバーガラスを載せる。また、培養後の寒天培地を取り除いたスライドガラスにも封入液を滴下し、新しいカバーガラスをかけて標本とする。

3) 純粋培養菌の検査方法

純粋分離菌株の同定用基準培地への接種

接種しようとするカビは、あらかじめ子実体をよく形成する培地に斜面培養しておく。

<手順>

- ① 観察、同定に適した培地を選択し、湯煎の状態で融かして、滅菌シャーレに約20ml分注し、固化して平板を作る。
- ② 蓋の上には、培地の種類・試料名・うえつけた日付をマジックで記入し、シャーレは逆さまに置いておく。
- ③ バーナーで針を殺菌後、寒天培地の隅に針の先端をつけてさます。
- ④ 針の先に寒天が少し付着した状態で試験管の中のカビをかきとる。
- ⑤ シャーレは逆さまの状態、そのまま下から静かに培地の3箇所にて間隔をとって接種する。
- ⑥ 針、試験管の順で、バーナーで殺菌。
- ⑦ 接種した平板は倒置したまま、25℃の環境下で保温を行ない、7日、10日、14日またはそれ以上の期間後に観察する。

3. 生物顕微鏡での観察標本の作製

食品からの直接検査では、カビと思われる部位を周辺部とともに切り取り、実体顕微鏡下に置いて、10～40倍で観察しながら針の先端でカビと思われるものをかき取り、スライドガラス上に載せた封入液中に移す。

培養からの検査では、まず同定用培地に試験菌を培養し、観察に最も適した時期を選んで鏡検材料とする。

集落の周縁部で孢子形成の始まっている部分から菌糸を針の先端でかき取る。生育が薄い場合は寒天培地ごとナイフ（小型カッター、カミ

ソリ替刃、メスなど)で薄く削り取る。この操作は実体顕微鏡下で行うと容易である。

かき取った菌糸はスライドガラス上に滴下した封入液に移す。液中に浮遊した菌体を2本の解剖用針を使ってよく広げる。

最後にカバーガラスを静かに気泡の入らないようにかぶせる。余分な封入液をろ紙片で吸い取り、このプレバラー特標本を簡単に鏡検し仕上りを点検する。よくできていれば、カバーガラスの四辺をネイルエナメルで封じ、封入したプレバラー特が乾燥しないようにする。

封入液の種類：

一時用と半永久標本用のものがある。

<一時用>

滅菌水＋湿潤剤

メルツァー液

<半永久用>

ラクトフェノール液

ラクトフェノール・ポアリエブルー染色液

4. 研修対象とした真菌類

空中浮遊菌類：

—*Aspergillus*

(アスペルギルス；コウジカビの仲間)

A. flavus, *A. niger*, *A. versicolor*

—*Cladosporium*

(クラドスポリウム；クロカビの仲間)

C. cladosporioides, *C. sphaerospermum*

—*Penicillium*

(ペニシリウム；アオカビの仲間)

P. islandicum, *P. citrinum*

—*Paecilomyces*

(ペジロマイセス)

P. varioti

好乾性菌類(貯蔵性菌類)

—*Eurotium*類

(ユーロチウム；カワキコウジカビの仲間)

—*Xeromyces bisporus*

(ゼロマイセス・ビスポラス)

—*Wallemia sebi*

(ワレミア・セビ)

好湿性菌類：

—*Mucor*

(ムーコル；ケカビの仲間)

—*Syncephalastrum*

(シンセファラストラム；ハリサシケカビの仲間)

—*Rhizopus*

(リゾプス；クモノスカビの仲間)

—*Ulocladium*

(ウロクラヂウム；黒色のカビ)

II. 製菓製品およびペットフードのカビ類

1. 錠剤状のチョコレート菓子のカビ類

a. 実験材料：

m & m'sチョコレートキャンディ(M & M-1)

マーブルチョコ(M-1), わなげチョコ(W-1)

m & m'sピーナッツ(M & MP-1, 2, 3)

チョコボール(CB-1, 2)ベアーズチョコ(B-1)

b. 実験方法：

市販の包装製品の表面を消毒用アルコールで滅菌してから開封し、滅菌シャーレ内に移した。あらかじめ固化した培地(DG-18)の平板上にチョコレート菓子を3個ずつ、5枚のシャーレに滅菌ピンセットを用いて並べた。

この平板を25℃のフラン器内で7日間培養して、出現したカビ類の一部を白金鉤を用いて封入液を1滴たらしたスライドガラスにとり、カバーガラスをかけて顕微鏡観察用の標本とした。

また、代表的な出現菌株についてはポテト・デキストロース寒天(PDA)の斜面培地に移植して保存菌株とした。

c. 実験結果と考察：

調査対象とした6種類、9検体のチョコレート菓子それぞれ15粒におけるカビ出現率を表1に示した。

実験の対象としたすべての試料からカビが検出されている点が注目されたが、これらは培養によって初めて検出されるものであり、肉眼的にカビ発生が認められた場合とは分けて考える必要がある。

表1 市販チョコレート菓子の直接培養法による真菌検査の結果

検体番号	カビ出現率	<i>Eurotium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>	その他
M&M-1	26.7%	—	1	1	—	2
M-1	66.7%	1	4	—	1	4
W-1	60.0%	4	3	1	—	1
M&MP-1*	100%	8	1	—	—	6
M&MP-2	55.6%	1	2	2	—	—
M&MP-3	40.0%	—	1	2	—	3
CB-1	77.8%	—	6	1	—	3
CB-2	60.0%	—	5	1	—	3
B-1	40.0%	4	—	—	—	2

*苦情品

表にみられるように、苦情品として異物発生が肉眼的に認められた1検体からはすべての検査粒からカビが出現するという結果になった。しかし、それ以外の外見上正常な製品からもカビが培養条件下でみられるという意外な結果であった。

出現菌の種類としては、糖濃度の高い食品によくみられる好乾性の*Eurotium*が検出されたのは当然といえるが、*Aspergillus*類が各種の製品から分離されている他、*Penicillium*, *Cladosporium*など空中浮遊菌として知られるカビ類も分離されたので、無菌的な状態で包装されたとは考えにくい。

2. ドッグ及びキャットフードのカビ類

a. 実験材料：

今回調査の対象としたペットフードはドッグフード3銘柄、キャットフード3銘柄であるが、いずれも包装内には主成分の異なる粒が混合されているものであったので、それぞれ分けて培養検査することとした。

表2には試供試料の銘柄、主成分別の粒を示した略号を一覧表として示した。

b. 実験方法：

ペットフードという検査対象物を考慮して、分離培地にはDG-18培地の他、広範囲のカビの検出に適したDRBC培地を加えて、2種類の平

表2 供試したドッグフードおよびキャットフードの主成分別の粒（ペレット）

ワンプチ（国産）	ペディグリーミキサー（U S）	ペディグリーミキサー（Australia）
WP-1 若どり粒	PMU-1 ビーフ粒	PMA-1 ビーフ粒
WP-2 フィッシュ粒	PMU-2 ささみ粒	PMA-2 歯ごたえビーフ粒
WP-3 カボチャ粒	PMU-3 緑黄色野菜粒	PMA-3 緑黄色野菜粒
WP-4 ほね粒	PMU-4 チーズ粒	PMA-4 骨カルシウム粒
WP-5 ほうれん草粒	PMU-5 骨カルシウム粒	
モンプチ（国産）	シーバドライ	フリスキーグルメ
MP-1 まぐろ	SD-1 まぐろ	FR-1 まぐろ味
MP-2 かつお	SD-2 かつお	FR-2 かに味
MP-3 白身魚	SD-3 チーズ	FR-3 えび味
MP-4 サーディン	SD-4 海藻	FR-4 野菜味
		FR-5 骨カルシウム入り

板培地を併用した。成分別にそれぞれ5粒ずつ2枚の培地上にならべて、計20粒を25℃で、7日間培養することとした。

カビの出現した粒については実体顕微鏡（倍率20倍）で観察して主なカビ類を識別し、記録したが、必要に応じて、スライドグラス上に顕微鏡標本を作成して生物顕微鏡（倍率400倍）で観察して菌名を決定した。

c. 実験結果と考察：

表3には市販のドッグフード3銘柄の各成分毎の粒を分けて直接培養した結果を分離培地別にカビ出現率、おもな分離カビの種類を示した。

試料WPにおいては、主成分の違いにかかわらず、同様なカビが検出されるものも多く、湿条件を好んで生育するケカビ類の*Mucor*属が共通して分離された。

表3 市販ドッグフードの直接培養法による真菌検査の結果

検体番号	(培地)	カビ検出率	<i>Eurotium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Mucor</i>	その他の菌類
WP-1	DG-18	40%	—	—	2	2
	DRBC	80%	—	5 (<i>A.flavus</i>)	3	—
WP-2	DG-18	50%	1	—	2	2
	DRBC	90%	—	1 (<i>A.flavus</i>)	6	2
WP-3	DG-18	40%	—	—	3	1
	DRBC	30%	—	—	3	—
WP-4	DG-18	50%	—	—	4	<i>Cladosporium</i> 1
	DRBC	80%	—	2 (<i>A.flavus</i>)	5	1
WP-5	DG-18	40%	—	—	2	<i>Penicillium</i> 1
	DRBC	60%	—	—	3	<i>P.island.</i> 1
PMU-1	DG-18	10%	—	1 (<i>A.flavus</i>)	—	—
	DRBC	ND*	—	—	—	—
PMU-2	DG-18	ND	—	—	—	—
	DRBC	ND	—	—	—	—
PMU-3	DG-18	ND	—	—	—	—
	DRBC	ND	—	—	—	—
PMU-4	DG-18	ND	—	—	—	—
	DRBC	20%	—	1 (<i>A.versicolor</i>)	—	<i>Paecilomyces</i> 1
PMU-5	DG-18	20%	—	1 (<i>A.flavus</i>)	—	<i>Penicillium</i> 1
	DRBC	ND	—	—	—	—
PMA-1	DG-18	ND	—	—	—	—
	DRBC	20%	—	—	—	yeasts 2
PMA-2	DG-18	ND	—	—	—	—
	DRBC	90%	—	—	—	yeasts 9
PMA-3	DG-18	10%	1	—	—	—
	DRBC	30%	—	—	—	yeasts 3
PMA-4	DG-18	ND	—	—	—	—
	DRBC	ND	—	—	—	—

*ND：真菌類 不検出

表4 市販キャットフードの直接培養法による真菌検査の結果

検体番号	(培地)	カビ検出率	<i>Eurotium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Mucor</i>	その他の菌類
MP-1	DG-18	10%	—	—	—	1
	DRBC	10%	—	—	—	1
MP-2	DG-18	ND*				
	DRBC	10%	—	1 (<i>A.niger</i>)	—	—
MP-3	DG-18	20%	—	1 (<i>A.flavus</i>)	1	—
	DRBC	10%	—	—	—	1(<i>Penicillium</i>)
MP-4	DG-18	10%	—	1 (<i>A.flavus</i>)	—	—
	DRBC	10%	—	—	—	1
SD-1	DG-18	ND				
	DRBC	ND				
SD-2	DG-18	ND				
	DRBC	ND				
SD-3	DG-18	10%	1	—	—	—
	DRBC	ND				
SD-4	DG-18	ND				
	DRBC	10%	—	—	—	1
FR-1	DG-18	10%	—	1 (<i>A.flavus</i>)	—	—
	DRBC	10%	—	—	—	1(<i>Penicillium</i>)
FR-2	DG-18	10%	1	—	—	—
	DRBC	10%	—	1 (<i>A.flavus</i>)	—	—
FR-3	DG-18	ND				
	DRBC	10%	1	—	—	—
FR-4	DG-18	10%	—	1 (<i>A.flavus</i>)	—	—
	DRBC	10%	1	—	—	—
FR-5	DG-18	ND				
	DRBC	10%	1	—	—	—

*ND: 真菌類 不検出

また、DRBC培地を用いるとコウジカビに近い菌類の *Aspergillus flavus* が検出される粒があった。その他、胞子ができないために識別できなかったカビ類や空中浮遊菌由来と思われる *Cladosporium*, *Penicillium* もわずかにみられた。

試料PMUにおいてはカビが検出される粒が

少なく、2種類の粒からはカビが検出されていない。出現菌の種類は特定の傾向はみられず、*Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium* がみられたに過ぎなかったもので、空中浮遊菌である。

試料PMAからは粒上に酵母の発生がみられるものが多かったが、カビは1種類の粒に好乾性の *Eurotium* のみがみられた。

表4には、市販のキャットフード3銘柄の各成分毎の粒を分けて、先のドッグフードの場合と同様にとりまとめた。

試供した3銘柄のキャットフードでは、いずれの成分の粒でも、カビが発生するものは少なく、不検出から20%の検出率であった。主成分ごとの差はほとんど認めることはできない。

試料MPでは*Aspergillus*を検出したものが3粒あった他、*Mucor*, *Penicillium*が1粒づつであり、その他の識別不能のカビも含めて、空中浮遊菌由来と推測された。

試料SDでは、ほとんどカビが検出されず、わずか1粒に*Eurotium*が検出されたにすぎなかった。

試料FRでは好乾性カビの*Eurotium*が各成分の粒から分離された他、*Aspergillus flavus*が3粒から、*Penicillium*が1粒から検出された。

Ⅲ. 情報収集と考察

① ペットフード苦情例(生協連ユーコープ事業連合2000年品質管理レポート)

消費者からの苦情例に対して、どのように対応しているかが参考になった。

② Buenoら(2001)によると、アルゼンチンで市販されているペットフード21点のカビ類について調査したところ*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*等が優先的に検出され、*A. flavus*なども検出している。

製造管理の水分の管理は重要で、水分含量は5.6-10.0%であったとしている。この点は今回の調査試料ではドッグフードのワンパチ(WP)の各粒に共通して*Mucor*が検出されたことと関係があるかも知れない。

おわりに

実験を通じてわかったことは、市販されている未開封の製品でも、条件を整えて培養することにより、菌の検出が見られることであった。通常、菓子やペットフードを無菌の環境下で製造することは非常に難しいことであるが、細心

の注意を払い、製造工程での管理を充実させることで、菌の付着を最小限に押さえることが出来るであろう。実験の結果からは幸い危険を伴う菌は検出されなかったが、これに甘んじることなく、製造元での工程管理も含めて今後注意を払っていきたい。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、ご多忙中にも関わらず、懇切丁寧なご指導をいただきました戸正勝教授に心から感謝し、御礼申し上げます。

Ⅳ. 参考文献

- 1) 厚生省生活衛生局編 食品衛生検査指針・微生物編(1990)日本食品衛生協会、東京
- 2) R. A. Samson他: Introduction of Food- and Air-borne Fungi, Sixth Edition (2000). CBS-Utrecht.
- 3) D. J. Bueno, J. O. Silva and G. Oliver: Mycoflora in commercial pet foods. J. Food Protection, **64**: 741-743 (2001)
- 4) K. A. Scudamore, M. T. Hetmanski: S. Nawaz, J. Naylor and S. Rainbird: Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using Linked-column immuno-assay clean up and HPLC. Food Addit. Contam., **14**: 175-186 (1997)