

不良食品からの酵母様真菌類の分離と同定

Isolation and Identification of Yeast-like Fungi Associated with Deterioration of Foods

有田 富和 宮崎 麻由 植木 洋
加藤 浩之 那須 務 渡邊 節
沖村 容子 御代田恭子

Tomikazu ARITA, Mayu MIYAZAKI, Yo UEKI
Hiroyuki KATO, Tsutomu NASU, Setsu WATANABE
Yoko OKIMURA, Yasuko MIYOTA

シンナー臭を主訴とする食品苦情のあった食パンについて細菌学的検査を実施したところ、多数の酵母様真菌類が分離された。それらの菌は全て産膜酵母の性状を示し、ランダム増幅多型 DNA (RAPD) 法による分析から、分離された菌は全て同一種・同一株であることが示唆された。ITS 領域の塩基配列を調べた結果全てハンゼヌラ酵母であった。検体からは仕込みに用いたパン酵母は検出されなかったことから、加熱後にハンゼヌラ酵母による汚染が生じたものと考えられた。

キーワード：酵母様真菌類；変敗；パン；ハンゼヌラ

Key words : yeast-like fungi ; deterioration ; bread ; *Hansenula*

1 はじめに

食品を変敗させる微生物には様々なものがあるが、特にアルコール臭やシンナー臭（酢酸エチル臭）を伴う場合には酵母菌や酵母様真菌類の関与が疑われる。

今回、異臭（シンナー臭）がするとの苦情があった食パンから、異臭を発生させた原因と思われる酵母様真菌類の分離と同定を試みたので報告する。

2 対象及び検査方法

2.1 対象材料

県内の業者が製造し、県外の消費者から異臭苦情のあった食パン（開封済み 1 件及び未開封 1 件）を試料とした。

2.2 細菌学的検査

一般細菌数の測定は、当センターで実施している食品収去検査の標準作業書記載の方法で実施した。検体を PBS で段階希釈し、一般細菌数は標準寒天培地（栄研化学）を用いた混積平板培養法で出現集落数を計測した。

酵母菌数は同様に NaCl、クロラムフェニコール及びプロピオン酸を加えたポテトデキストロース培地（メルク）を用いた混積平板培養法で集落数を計測した。

液体培地上での発育性状は、自家調整した Yeast-Extract Polypeptone Dextrose (YPD) 培地を用い、静置培養法で実施した。

比較対照として市販のドライイースト（パン酵母）2 種を使用した。

2.3 分子生物学的解析

DNA の抽出には Isoplant（日本ジーン）を用いた。RAPD 法による解析は Akopyanz らのプライマー¹⁾

(1247 5'-AAGAGCCCGT—3' 1254
5'-CCGCAGCCAA—3'1281
5'-AACGCGCAAC—3'1283
5'-GCGATCCCCA—3'1290
5'-GTGGATGCGA—3'D14307
5'-GGTTGGGTGAGAATTGCACG—3'D11344
5'-AGTGAATTTCGCGGTGAGATGCCA—3'D8635
5'-GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC—3'D9355
5'-CCGGATCCGTGATGCGGTGCG—3'D14126
5'-NNNAACAGCTATGACCATG—3') を用いて実施した。

ITS 領域の PCR は White らのプライマー²⁾ (ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS2 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' ITS3 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' ITS4 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3') で実施した。

ITS 領域の塩基配列は、PCR 産物のダイレクトシーケンス法で決定し、Genbank に登録された真菌類のデータと比較した。

3 結果

3.1 一般細菌数と酵母菌数

はじめに、開封済み、未開封それぞれの検体について一般細菌数と酵母菌数の計測をおこなった。開封済みの検体からは 1g あたり一般細菌数 41 万個・酵母菌数 2,400 万個が、未開封の検体からは同じく一般細菌数 3 万個・酵母菌数 3 万個と多数の菌が検出された。一般的な食パンの汚染状況と比較するため市販の食パン 2 種について同様の検査を実施したところ、両者とも一般細菌数は

3,000 個以下であった。

つぎに標準寒天培地及びポテト・デキストロース培地に発育した集落 20 個を分離してグラム染色・鏡検した。その結果、全てパン酵母よりやや小型の出芽酵母様形態を示す酵母様真菌類であった (図 1)。

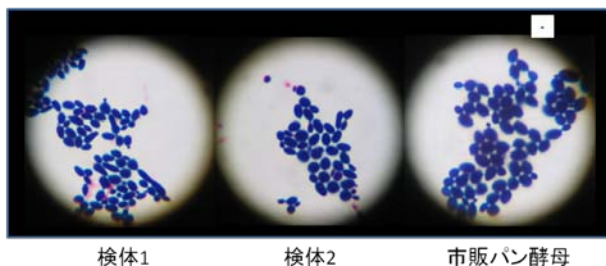


図 1 検体から分離された菌のグラム染色像

この酵母様真菌類 (異臭酵母) の種を推定するため、液体培地中での発育性状を市販のパン酵母

(*Saccharomyces cerevisiae*) 2 種と比較した。市販パン酵母はどちらも静置培養では沈殿したが、異臭酵母は培地表面に膜状に浮遊して発育した。

3.2 分子生物学的解析

RAPD 法による分析をおこなった結果、分離した異臭酵母は全て類似のパターンを示した。また、パン酵母とはバンドの数、サイズとも大きく異なっていた (図 2)。

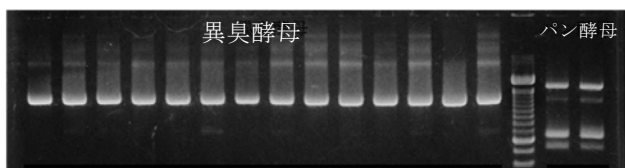


図 2 RAPD 解析の結果

また、異臭酵母の rRNA 遺伝子の間に存在する ITS 領域を PCR 法で増幅したところ、増幅産物のサイズは比較対象としたパン酵母とは明確に異なっていた (図 3)。

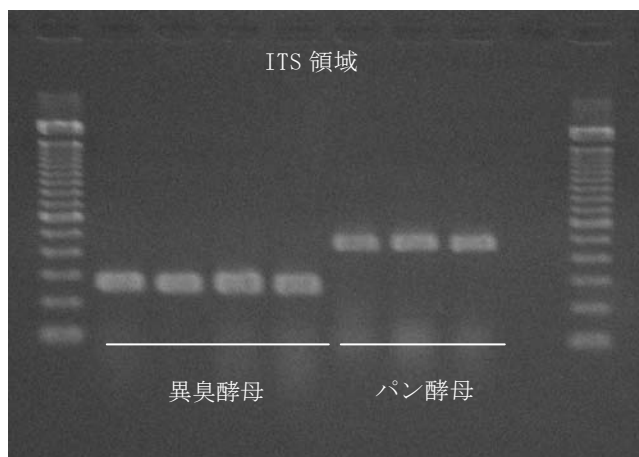


図 3 ITS 領域の PCR

この ITS 領域 PCR 産物の塩基配列を決定し、DNA 配列データベース (Genbank) に登録されている真菌類の

塩基配列データと比較したところ、ハンゼヌラ酵母として知られる *Wickerhamomyces anomalus* (別名 *Hansenula anomala*, *Pichia anomala*) と完全に一致した³⁾。

4 考察

今回の食パンからは多数の酵母様真菌類が検出された。これらの菌は全てグラム染色陽性の出芽酵母様の形態を示した。その大きさは市販のパン酵母よりやや小さかった。また、液体培地を用いた静置培養試験でこの菌は培地表面に膜状に発育するという、いわゆる産膜酵母の性状を示した。これらのことから異臭酵母は、パン酵母とは異なる種であることが強く示唆された。さらに、RAPD 解析でも異臭酵母とパン酵母では大きくパターンが異なっており、このことから異臭酵母がパン酵母とは異なる菌種であることを裏付けられた。また、RAPD 解析に用いた異臭酵母全てでそのパターンがほぼ一致していたことから、比較的少数の菌が食品に付着し、その後、クローン的に増殖したものであることが推定された。さらに、ITS 領域を PCR 法で増幅した結果、そのサイズからこの菌はパン酵母とは別種であることが確実となった。この PCR 産物のダイレクトシーケンスの結果から、この菌はいわゆるハンゼヌラ酵母であると同定された。

ハンゼヌラ酵母はエタノールから酢酸エチルを産生する性質があり、シンナー臭を呈する食品苦情の原因として代表的な微生物である。

今回の食パンから検出された酵母様真菌は全てハンゼヌラ菌であり、仕込みに用いたパン酵母は全く検出されなかった。このことは製造時の加熱が充分であったことを示している。これらのことから今回の事例は加熱後の放冷中にハンゼヌラ酵母が付着し、包装後 (輸送中) に増殖して酢酸エチルを産生したものと考えられた。

ハンゼヌラ菌を含む酵母様真菌類は、環境中に広く存在している。今回の事件での発生源を推定する参考として、市販果物からの酵母様真菌類の検出を試みた。その結果約半数から酵母菌が分離された。このように酵母様真菌類は果実などの食品表面にも存在していることから、汚染源を根絶することは極めて困難である。そのため、酵母様真菌類の製造現場への侵入を防ぐためには、製造場の清掃と外部からの気流の制御だけでなく、同じ場所で傷んだ果実や素性不明の天然酵母などを使用しないなどの対策も必要であると思われた。また、ハンゼヌラ酵母はアルコールがなければ酢酸エチルを生成しないため、殺菌・消毒目的での食品へのアルコール噴霧などを中止することも短期的対策としては有効であるといわれている⁴⁾。

酵母菌を含む真菌類のなかには胞子を作る種が多く、その取り扱いには実験室汚染の危険が付きまとう。特に培養検査は危険度が高く、培養器や実験室が汚染された場合には、長期間にわたって通常の微生物検査業務に深

刻な影響を及ぼす可能性がある。真菌類による不良食品事件は今後も発生することが予想されることから、培養なしに直接遺伝子レベルで検査する等、非培養的検出方法の導入についても検討を行う必要性を感じた。また、製造施設の真菌類汚染状況についても興味を持たれるところである。

5 まとめ

シンナー臭をともなう食パンについて細菌学的解析を実施した結果、多数の酵母様真菌類が検出された。液体培地での発育性状や RAPD 解析、ITS 領域のサイズと遺伝子配列解析の結果から、この菌はいわゆるハンゼヌラ酵母であることが判明した。仕込みに用いたパン酵母は分離されなかったことから、加熱行程は充分であり、加

熱後の放冷から袋詰めまで間に附着し、輸送中に増殖してシンナー臭を発生したものと考えられた。

6 参考文献

- 1) Akopyanz N., Bukanov N.O., Westblom T.U., Kresovich S. and Berg D.E., *Nucleic Acids Res.*, **20**, 5137-5142 (1992).
- 2) White T.J., Bruns T., Lee S., and Taylor J., *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, Calif., 315-322 (1990).
- 3) Kurtzman C.P., Robnett C.J., Basehoar-Powers E., *FEMS Yeast Res.*, **6**, 939-954 (2008)
- 4) 内藤茂三 酵母による食品の変敗と防止技術
<http://www.mac.or.jp/mail/090201/03.shtml>