

食品の有害カビによる汚染に関する研究 (第2報) 調理冷凍食品について

Studies on the Toxigenic Mold Contamination of Foodstuffs (Part 2) Mycoflora and Frequency of Toxigenic Mold in Precooked Frozen Foods

小笠原和夫, 砂川 紘之, 赤城 幾代, 森 量夫

Kazuo Ogasawara, Hiroyuki Sunagawa, Ikuyo Sekijo, Kazuo Mori

結 言

食生活の合理化に伴い、冷凍食品の普及は誠にめざましく、多種多様の品質形態のものが市販されているが、なかでも調理冷凍食品の占める割合は極めて高い。

市販冷凍食品の微生物汚染について、最近 Surkiewicz ら^{1)~4)}、駒形ら^{5)~10)}、横山ら^{11)~12)}による詳細な報告もあるが、カビによる汚染を中心としたものは誠に少なく、わずかに Kuchn ら¹³⁾による Psychrophilic および Mesophilic Mold に関するもののみである。

今回、著者らは札幌市内から採集した市販の調理冷凍食品について、特に発ガン性の Mycotoxin 産生に関連する有害カビの汚染分布検索を行ない、これらの検出状況、分離頻度等を検討し、同時に大腸菌、腸球菌、低温細菌、コアグラセ陽性ブドウ球菌、サルモネラ菌、酵母等の食品微生物汚染指標についても併せて試験したので報告する。

実 験 方 法

1. 試料

1972年8月、札幌市内のデパート、スーパー・マーケット等から購入した市販のもので、ハンバーグ8、コロケ19、フライ6、ギョーザ8、シューマイ12、ミートボール4の総計57検体である。

2. 汚染微生物検索

食品衛生検査指針¹⁴⁾に準拠して行なった。すなわち各試料の包装の取り出し口を70%エタノールで清拭した後封を切り、無菌的操作の下に各試料10gを100ml容滅菌ホモジナイザー・カップに細切砕取し、滅菌生理食塩水50mlを加えてホモジナイズし(1,000回転、約3分間)、十分振盪混和後、画線付三角フラスコにあげて100mlとし、この10倍稀釈の試料懸濁液を原液として、更に10進法によって 10^{-2} 稀釈、 10^{-3} 稀釈液を調製した。

(1) カビ、酵母

原液および各稀釈液各1mlを100ppmクロラムフェニコール添加 Potato Dextrose agar (PDA) を使用して混釈培養し、25°C、7~10日後の発生集落を実体顕微鏡で観察、区分し、夫々カビ数、酵母数とした。培養期間中、連日観察しつつ、上記培地上に発育したカビ集落をPDA斜面培地に移植保存した。カビの同定は前報¹⁵⁾記載のとおりである。

(2) 一般細菌

原液および各稀釈液につき、標準寒天培地を使用する常法により、37°C、48時間培養後の集落数を算定した。

(3) 低温細菌

原液および各稀釈液につき、標準寒天培地を使用し、7°C、10日間培養後、肉眼的集落を算定した。

(4) 大腸菌

原液および各稀釈液につき、デスオキシコーレイト培地を使用し、37°C、20時間培養後、大腸菌群の定型的集落を釣菌して、夫々1白金耳ずつEC培地に移植し、44.5°Cの循環式恒温水槽内に48時間静置培養し、ガス産生の認められたものを陽性として集落数を算定し大腸菌数とした。

(5) 腸球菌

米国における調理冷凍食品の細菌学的検査法 (AFDOUS法)¹⁶⁾に準拠し、原液および各稀釈液につきKF-Streptococcus agar (Bacto) を使用し、37°C、48~72時間培養後の集落数を算定した。

(6) コアグラセ陽性ブドウ球菌

原液を10%食塩加トリプトソイブイオンにて37°C、48時間増菌培養後、スタヒロコッカス No. 110 培地にて常法による生物学的性状試験を行なった。

(7) サルモネラ菌

細切した試料5gをEEMブイオン培地で37°C、24時間前培養した後、その5mlをハーナーテトラチオン酸塩培地50mlに投入し、43°Cの恒温槽中に24時間培養し、その1白金耳をDHL、MLCB、SS-SB寒天培地にて分離

表1 調理冷凍食品の微生物検出状況

() 内は各々の試料数に対する分離頻度 (%)

試料区分 試料数	ハンバーグ	コロッケ	フライ	ギョーザ	シューマイ	ミート・ボール	総 計
	8	19	6	8	12	4	57
一般生菌数 (/g)	25~80,000,000	7,400~3,200,000	2,500~12,000,000	400~10,000	10~500	20~7,700	
低温細菌 検出試料数 (/g)	4 (50) 20~140,000	19 (100) 140~550,000	6 (100) 700~160,000	7 (87.5) 0~500	8 (66.7) 0~300	3 (75.0) 0~50	47 (82.5)
大腸菌 検出試料数 (/g)	0	2 (10.5) 30~170	3 (50.0) 15~800,000	0	0	0	5 (8.8)
腸球菌 検出試料数 (/g)	7 (87.5) 5~150	19 (100) 200~42,000	6 (100) 15~11,000	1 (12.5) 5	1 (8.3) 10	1 (25.0) 5	35(61.4)
コアグラセ陽性ブドウ球菌検出試料数	0	3(15.8)	0	0	0	0	3 (5.3)
サルモネラ菌検出試料数	0	0	0	0	0	0	0
か び 検出試料数 (/g)	8 (100) 25~75	16(84.2) 0~5,000	5 (83.3) 0~210	5 (62.5) 0~200	6 (50.0) 0~100	1 (25.0) 15	41(71.9)
酵 母 検出試料数 (/g)	2 (25.0) 60~335	18(94.7) 35~14,000	6 (100) 55~2,000	7 (87.5) 0~325	4 (33.3) 5~25	2 (50.0) 45~90	39(68.4)

表2 調理冷凍食品の分離カビの種類および優先種

() 内は各々の試料数に対する分離頻度 (%)

試料区分 試料数		ハンバーグ	コロッケ	フライ	ギョーザ	シューマイ	ミート・ボール	総 計
分離カビの種類		8	19	6	8	12	4	57
<i>Aspergillus</i> : (Group)	<i>Asp. flavus</i>	2(25.0)	2(10.5)		2(25.0)			6(10.5)
	<i>Asp. oryzae</i>				1(12.5)			1 (1.8)
	<i>Asp. glaucus</i>			1(16.7)		3(25.0)		4 (7.0)
	<i>Asp. nidulans</i>		1 (5.3)	1(16.7)				2 (3.5)
	<i>Asp. restrictus</i>			2(33.3)				2
	<i>Asp. fumigatus</i>		1 (5.3)	1				2
	<i>Asp. versicolor</i>		3(15.8)	1(16.7)				4 (7.0)
	<i>Asp. ustus</i>			1				1
	<i>Asp. candidus</i>		1	2				3 (5.3)
	<i>Asp. niger</i>		1	2				3
<i>Penicillium</i> : (Series)	<i>Ramigena</i>	1(12.5)		2(33.3)				3 (5.3)
	<i>Pen. raistrickii</i>			2				2 (3.5)
	<i>Pen. citrinum</i>			3(50.0)		1 (8.3)		4 (7.0)
	<i>Pen. chrysogenum</i>	1						1 (1.8)
	<i>Pen. brevis-compactum</i>	1						1
	<i>Pen. cyclopium</i>			2			1(25.0)	3
	<i>Pen. funiculosum</i>		1					1
	<i>Pen. purpurogenum</i>	1		1(16.7)				2
	<i>Pen. sp.</i>					1		1
	<i>Mucor sp.</i>		3(15.8)					3 (5.3)
	<i>Rhizopus sp.</i>		1 (5.3)					1 (1.8)
	<i>Syncephalastrum sp.</i>		2(10.5)					2 (3.5)
	<i>Geotrichum sp.</i>		1					2
	<i>Monilia sp.</i>	1(12.5)		1(16.7)	1(12.5)	1 (8.3)		3
	<i>Botrytis sp.</i>	1						1
	<i>Cephalosporium sp.</i>					1		1
	<i>Trichoderma sp.</i>		5(26.3)	1	1	1		8(14.0)
	<i>Paecilomyces sp.</i>		1					1
	<i>Verticillium sp.</i>			1				1
	<i>Nigrospora sp.</i>					1		1
	<i>Cladosporium sp.</i>	5(62.5)	1	4(66.7)	1	1		12(21.1)
	<i>Alternaria sp.</i>		1	1	1			3
	<i>Aureobasidium sp.</i>		1					1
	<i>Fusarium sp.</i>		2					2
	<i>Epicoccum sp.</i>					1		1
	<i>Phoma sp.</i>	1	4(21.1)	1				6(10.5)
	<i>Coniothyrium sp.</i>	1	1					2
	<i>Chaetomium sp.</i>		1					1

培養を行なった。疑わしい集落について常法により確認培養を行ない、生物学的性状をしらべた。

3. Aflatoxin, Sterigmatocystin 産生能の検定 前報¹⁹⁾記載のとおりである。

実験結果および考察

1. カビ検出状況および優先菌種

カビ検出率の最も高かったのは表1に示す如く、ハンバーグで100% (8/8), 続いてコロッケ84.2% (16/19), フライ83.3% (5/6), ギョーザ62.5% (5/8), シューマイ50% (6/12) の順で、ミートボールの25% (1/4) を除き、それぞれが過半数以上を占め、調理冷凍食品全体としての検出率は71.9% (41/57) であった。

検出カビ数はハンバーグ25~75/g, コロッケ 0~5,000/g, フライ0~210/g, ギョーザ0~200/g, シューマイ0~100/gの範囲で、コロッケに菌数の高いものが多かった。

分離検出カビの種類数は *Fungi Imperfecti* に属するもの15, *Aspergillus* 属10, *Penicillium* 属9, *Mucorales* 3, *Ascomycetes* 1 の計38種類で、この中 *Aspergillus* 属と *Penicillium* 属で半数を占めた。

分離検出カビの優先種については表2に示す如く、*Cladosporium* 属が最も分離頻度が高く、21.1% (12/57), 内訳はハンバーグ8試料中5件 (62.5%), フライ6試料中4件 (66.7%) で、特にこのカビによる汚染が著しかった。続いて *Trichoderma* 属が14.0% (8/57), 内訳はコロッケ19試料中5件 (26.3%) で、特にこのカビによ

る汚染が著しかった。その他 *Asp. flavus*, *Phoma* 属がいずれも10.5% (6/57), *Asp. versicolor*, *Pen. citrinum*, *Asp. glaucus* がいずれも7.0% (4/57) 等の順であった。

Asp. flavus の内訳はハンバーグ8試料中2件 (25.0%), コロッケ19試料中2件 (10.5%), ギョーザ8試料中2件 (25%) で、カビ検出率の高いもの程、このカビによる汚染が著しい傾向を示した。総カビ数に対する *Asp. flavus* の比率はハンバーグがいずれも33.3% (10/30), コロッケ12.5% (5/40), 33.3% (10/30) であったが、ギョーザでは66.7% (10/15), 50% (100/200) とそれぞれ過半数を占める高い検出率を示した。

Asp. flavus Group の9菌株について発ガン性 Mycotoxin の一種、Aflatoxin B₁ の産生能を検定した結果、ギョーザ由来の1菌株は米培養で12ppm の Aflatoxin B₁ 産生能が確認された。

Asp. parasiticus がコロッケから1株分離 検出されたが、Aflatoxin B₁ 産生能は認められなかった。

Asp. versicolor の内訳はコロッケ19試料中3件 (15.8%), フライ6試料中1件 (16.7%) で、分離4株全部が発ガン性 Mycotoxin の一種、Sterigmatocystin 産生能を示した。

その他フライ、コロッケ等から検出 分離された *Asp. nidulans* 2株の Sterigmatocystin 産生能も確認された。

市販冷凍食品の微生物汚染に関するこれまでの報告例の中で、カビによる汚染等の問題を扱ったものは誠に少な

表3 調理冷凍食品、コロッケからの検出カビの試料数に対する分離頻度

検出カビの種類	試料番号																			合計() 内は%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
<i>Aspergillus</i> : (group)																				
◎ <i>A. flavus</i>						◎													◎	2(10.5)
○ <i>A. fumigatus</i>						◎														1 (5.3)
○ <i>A. versicolor</i>									●		●		●							3(15.8)
○ <i>A. nidulans</i>												◎								1
○ <i>A. candidus</i>																◎				1
<i>A. niger</i>																				1
<i>Penicillium</i> : (series)																				
<i>P. funiculosum</i>			◎																	1 (5.3)
<i>Mucor</i> sp.				◎					◎									◎		3(15.8)
<i>Rhizopus</i> sp.							◎													1 (5.3)
<i>Syncephalastrum</i> sp.							◎									◎				2(10.5)
<i>Chaetomium</i> sp.					◎															1
<i>Geotrichum</i> sp.			◎																	1
<i>Trichoderma</i> sp.	◎		◎				◎	◎	◎											5(26.3)
<i>Paecilomyces</i> sp.																◎				1
<i>Cladosporium</i> sp.																			◎	1
<i>Alternaria</i> sp.																		◎		1
<i>Pullularia</i> sp.								◎										◎		1
○ <i>Fusarium</i> sp.					◎	◎														2
<i>Coniothyrium</i> sp.	◎																			1
<i>Phoma</i> sp.									◎	◎			◎		◎					4(21.1)
検出カビの菌数 (/g)	250	0	5	30	300	40	700	150	160	50	10	80	40	0	100	5000	0	55	30	

● : ステリグマトシステイン産生株

表4 調理冷凍食品、フライからの検出カビの試料数に対する分離頻度

検出カビの種類	試料番号	1	2	3	4	5	6	合	計
								()	内は%
<i>Aspergillus</i> : (group)									
<i>A. glaucus</i>		◎					◎	1	(16.7)
○ <i>A. fumigatus</i>							●	1	
○ <i>A. versicolor</i>								1	
○ <i>A. nidulans</i>						●		1	
<i>A. restrictus</i>					◎		◎	2	(33.3)
<i>A. ustus</i>							◎	1	
○ <i>A. candidus</i>			◎		◎		◎	2	
<i>A. niger</i>			◎				◎	2	
<i>Penicillium</i> : (series)									
<i>Ramigena</i>			◎			◎		2	(33.3)
<i>P. raistrickii</i>		◎	◎					2	
○ <i>P. citrinum</i>			◎		◎	◎		3	(50.0)
○ <i>P. cyclopium</i>		◎	◎					2	
○ <i>P. purpurogenum</i>						◎		1	(16.7)
<i>Monilia</i> sp.							◎	1	(16.7)
<i>Trichoderma</i> sp.			◎			◎		1	
<i>Verticillium</i> sp.			◎					1	
<i>Cladosporium</i> sp.		◎	◎		◎		◎	4	(66.7)
<i>Alternaria</i> sp.			◎					1	
<i>Phoma</i> sp.		◎						1	
検出カビの菌数 (/g)		35	170	0	65	210	160		

● : ステリグマトシステイン産出株

表5 調理冷凍食品、ギョーザからの検出カビの試料数に対する分離ヒン度

検出カビの種類	試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	合	計
										()	内は%
<i>Aspergillus</i> : (group)											
◎ <i>A. flavus</i>							◎	◎	●	3	(37.5)
<i>Monilia</i> sp.						◎				1	(12.5)
<i>Trichoderma</i> sp.		◎								1	
<i>Cladosporium</i> sp.									◎	1	
<i>Alternaria</i> sp.		◎								1	
検出カビの菌数 (/g)		15	0	0	0	100	50	15	200		

● : アフラトキシン B₁ 産生株試料6の *A. flavus* は *A. oryzae*

い。

駒形ら⁹⁾の報告の中では、カビの出現割合は全試料の検出微生物中わずか0.6%となっており、その後、横山ら¹¹⁾が21種の市販冷凍食品の微生物分布についてしらべた結果、カビは10³/g程度、開きイカ、キヌサヤエンドウ、ソラマメ等に認められただけで非常に少なく、その際、ソラマメから *Phoma* 属、キヌサヤエンドウからは *Phoma* 属、*Fusarium* 属、*Alternaria* 属、*Cephalosporium* 属、*Penicillium* 属等のカビを分離同定している。

アメリカの Campbell Soup Company の Kuehn ら¹²⁾は調理冷凍食品の一種である Pastry と Chicken pie について、10℃および20℃培養により Mesophilic fungi、0℃および5℃培養により Psychrophilic fungi のそれぞれ発生数とその種類をしらべ、約100種類、2,000菌株を分離同定したが、全体として分離頻度の最も高かったカビは *Aureobasidium pullulans* であったという。

いずれにしても、フライ、コロッケ、ギョーザ等市販の調理冷凍食品中から Mycotoxin 産生能を有するカビが検出分離された報告例はこれまで全くない様である。

2. 汚染細菌

(1) 大腸菌

大腸菌の検出率は8.8% (5/57) で、内訳はフライ6試料中3件 (50.0%)、検出数15~800,000/g、コロッケ19試料中2件 (10.5%)、検出数30~170/gであった。食品衛生上の汚染指標としての意義から考えて、誠に芳しくない。

(2) 腸球菌

腸球菌はギョーザ、シューマイ、ミートボール等からは殆ど検出されなかったが、ハンバーグ87.5% (7/8)、コロッケ、フライがいずれも100%の高率で検出が認められ、調理冷凍食品全体としては61.4% (35/57) の検出率であった。

検出数はコロッケ200~42,000/g, フライ 15~11,000/g, ハンバーグ 5~150/gの範囲であった。

腸球菌は大腸菌に比較して冷凍処理および冷凍貯蔵中に殆ど死滅しないので製品からの検出状況は凍結前の汚染の状態をそのまま反映している。前述の大腸菌の検出状況とも照らし合わせ、原料類の処理、配合、成形、包装から凍結に至る製造上の各段階における汚染によるものであろう。

(3) サルモネラ菌, コアグラセ陽性ブドウ球菌

サルモネラ菌は全試料から全く検出されなかったが, コアグラセ陽性ブドウ球菌がコロッケ19試料中3件(15.8%)から検出された。

(4) 一般生菌数

一般生菌数は調理冷凍食品の品種別, 同一品種の試料別にかかなりの数の相違が認められ, 最低10/g, 最高80,000,000/gであった。ハンバーグ, コロッケ, フライ等カビ検出率の高いものが, ギョーザ, シューマイ等に比べて生菌数も明らかに高い傾向を示した。Microflora はコロッケフライ等では *Micrococcus*, *Streptococcus* 等の Gram 陽性球菌類と *Bacillus* 等が優勢であり, ギョーザ, シューマイ, ミートボールおよびハンバーグ等ではいずれも *Bacillus* が圧倒的に優勢であった。生菌数および Microflora の相違は, 製造上, 凍結直前の最終段階における加熱操作の有無によるものであろう。

(5) 低温細菌

低温細菌は一般生菌と同様に, コロッケ, フライ等の汚染度が著しく高く, Microflora も *Micrococcus*, *Bacillus* 等に代って *Streptococcus*, *Pseudomonas* 等が, 又, シューマイ, ギョーザ, ミートボール, ハンバーグ等では *Bacillus* が減少し, *Streptococcus* 等の Gram 陽性球菌類が優勢であった。

3. 酵母

酵母の検出率の最も高かったのはフライで, 100% (6/6), 次いでコロッケ94.7% (18/19), ギョーザ87.5% (7/8)であったが, コロッケに菌数の高いものが多く, 最高14,000/gであった。

調理冷凍食品全体として, *Candida*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* 等が優勢的に検出された。

調理冷凍食品は製造上, 凍結直前の最終段階における加熱操作の有無により, 製品の微生物汚染の程度や, そのもつ衛生的意義も当然異なっており, 現行の食品衛生法でも無加熱摂取冷凍食品, 加熱後摂取(未加熱)および加熱後摂取(加熱済)冷凍食品の三区分による細菌学的成分規格が設定されている¹⁷⁾。

ギョーザ, シューマイ等の場合, 通常皮の部分と中身の部分とに分けて配合, 調製し, 成型後90℃, 3分程度蒸煮し, 風冷してそのまま急速凍結されるから加熱後摂取(加熱済)の範ちゅうに入るが, 熱処理による滅菌効果等は殆

ど期待すべきものでない。

又, フライ, コロッケ, ハンバーグ等の場合, 加熱後摂取(未加熱)の範ちゅうに入り, 衣づけ工程で未加熱原料として衣用小麦粉, 衣用コーティングパン粉等が使用されるが, これらの微生物学的点検も必ずしも十分ではない。

調理冷凍食品の微生物汚染防止のためには, ①原料の良質化, 微生物学的点検。②素材類の調理加工処理における加熱殺菌条件の安定化。③製造工程上, 調理機械, 器具, 容器等の清潔保持。④人, 服装, 空気等の汚染要因からの混入, 持ち込み, 接触による二次汚染の防止等が考慮すべきポイントであろう。

要 約

市販の調理冷凍食品57検体(ハンバーグ8, コロッケ19, フライ6, ギョーザ8, シューマイ12, ミートボール4)について, 特に発ガン性の *Mycotoxin* 産生に関連する有害カビの汚染分布検索を行ない, これらの検出状況, 分離頻度等を検討した。同時に大腸菌, 腸球菌, 低温細菌, コアグラセ陽性ブドウ球菌, サルモネラ菌, 一般生菌, 酵母等の食品微生物汚染指標についても併せて試験を行なった。

1. カビ検出率は71.9%で, 特にハンバーグ, コロッケフライ等に検出率が高かった。

2. 分離検出したカビの種類は38種類で, この中 *Penicillium* 属と *Aspergillus* 属が優先種を占めていた。

3. 検出カビの分離頻度の最も高いのは *Cladosporium* 属であった。(21.1%)

4. *Asp. flavus* の検出頻度は10.53%で, ハンバーグコロッケ, ギョーザ等から夫々検出分離されたが, ギョーザ由来の1菌株が米培養で12ppmのAflatoxin B₁産生能が確認された。

5. *Asp. versicolor*, *Asp. nidulans* がフライ, コロッケ等から夫々検出分離されたが, 分離株全部が *Sterigmatocystin* 産生能を示した。

6. 大腸菌が8.8%, コアグラセ陽性ブドウ球菌が5.3%検出された。サルモネラ菌は全く検出されなかった。

本報告の要旨は第27回北海道公衆衛生学会(1975年, 室蘭市)および第31回日本食品衛生学会(1976年, 東京都)で発表した。

文 献

- 1) Surkiewicz, B. F.: Appl. Microbiol., **14**, 21 (1966)
- 2) Surkiewicz, B. F. et al.: Appl. Microbiol., **15**, 1 (1967)
- 3) Surkiewicz, B. F. et al.: Appl. Microbiol., **15**, 1324 (1967)
- 4) Surkiewicz, B. F. et al.: Appl. Microbiol., **16**, 147

- (1968)
- 5) 駒形和男, 小川博望 : 食衛誌, **5**, 441 (1964)
 - 6) 駒形和男, 小川博望 : 食衛誌, **7**, 234 (1966)
 - 7) 駒形和男, 小川博望 : 食衛誌, **7**, 239 (1966)
 - 8) 駒形和男, 小川博望 : 食衛誌, **7**, 248 (1966)
 - 9) 駒形和男, 中瀬 崇 : 食衛誌, **8**, 53 (1967)
 - 10) 駒形和男, 中瀬 崇 : 食衛誌, **8**, 58 (1967)
 - 11) 横山真佐子, 柴崎一雄 : 食品工誌, **14**, 49 (1967)
 - 12) 横山真佐子, 柴崎一雄 : 食品工誌, **14**, 247 (1967)
 - 13) Kuehn, H. H. et al. : Appl. Microbiol., **11**, 352 (1963)
 - 14) 厚生省環境衛生局監修 : 食品衛生検査指針 I , (1973)
 - 15) 小笠原和夫, 外 : 道衛研所報, **25**, 10 (1975)
 - 16) 河端俊治 : 食品衛生研究, **20** (7), 20 (1970)
 - 17) 厚生省環境衛生局食品衛生課編 : 食品衛生関係法規集