



食品の真菌検査

東京都立衛生研究所 諸角 聖

真菌は、真核細胞をもつ高等微生物の総称であり、原核細胞を有する細菌や藍藻とは区別される。一般には真菌は、カビ(糸状菌)、酵母、キノコなどを指す。食品の真菌検査を行う場合、生えている真菌を定性的に調べるのか、真菌数の測定や菌叢を調査する定量的な検査を行うのか、どのような食品か、あるいは迅速性が要求されるか否かといった検査目的に応じて適切な方法を選ぶ必要がある。カビ・酵母の検査は一般に図1に示した手順で行われる。その手技は細菌検査とほぼ同様であるが、使用培地、試験材料の塗抹方法、培養温度・日数などに違いがみられる。以下に、真菌検査法の概略と検査時の留意点を述べる。

1. 真菌検査における一般的な留意事項

1) 培養条件

真菌の培養は特殊な菌を除き20～30℃で5～7日間、好氣的条件下で行う。なお、カビ胞子は取扱中に飛散しやすいため、培養後の菌の取り扱いは循環型クリーンベンチなどの内部で行う。

2) 分離培地の選択

カビ・酵母の分離培地としてポテトデキストロース寒天(PDA)、麦芽エキス寒天(MA)、コーンミール寒天、ツアペックドックス寒天、サブロー寒天、ローズベンガル・クロラムフェニコール寒天(RBC)、ジクロラン・ローズベンガル・クロラムフェニコール寒天(DRBC)およびジクロラン・グリセロール培地(DG18)などの粉末培地が市販されている。食品検査に使用する際は前記培地に細菌の発育を防止するためクロラムフェニコール(100mg/L)またはゲンタマイシン(50～60mg/L)などの熱に安定な抗生物質を添加する。また、乾燥食品や砂糖・食塩などを多量に含む食品ではやや乾燥した条件を好むカビや酵母(好乾菌)の汚染が問題となる。それらの分離にはPDAやMAにブドウ糖(20～25%)、蔗糖(20～40%)、グリセロール(18～20%)などを添加した培地を用いる。一方、ケカビなどの生育の速い菌が培地上に生育すると他の菌を覆ってしまい菌数の計測が困難となる。これを防ぐには食塩(5～7%)、ローズベンガル(20～50mg/L)、ジクロラン(2, 6-ジクロロ-4-ニトロアニリン; 2mg/L)など、菌の生育抑制効果のある薬剤の培地中への添加が有効である。

3) 試料の採取および取扱い

穀類などの粒状の試料の真菌汚染レベルが各粒ごとで異なることから、できるだけ多量の試料をサンプリングし粉砕機などで均一にしたのち、一定量を採取し、検査用試料とすることが再現性の高い成績につながる。加工食品のカビ汚染も通常均一ではないため、可能な限り多くの部分からサンプリングを行う必要がある。

2. 検査法

1) 定性的試験

(1) 直接鏡検法

カビや酵母集落の発生が食品などに認められる場合には、生育部分の一部を滅菌した白金鉤(図2)、白金耳、メスなどにより採取し、図2の方法で直接鏡検を行う。また、同時に平板培地に画線塗抹して分離培養を行い、純培養としたのち、同定試験に供する。

2) 定量試験

カビは細菌や酵母に較べて構造が複雑で、孢子、菌糸、菌核など形態や性質の異なる器官を形成する。これらはいずれも条件さえ良ければ生育し、集落を形成するため、培養検査を行った場合に生菌数の測定結果に誤差が生じやすいことが指摘されている。なお、カビの生えた原料の混入した液状食品などでは、白血球計算板などを用いて観察することによりカビ汚染を定量的に評価することができるが、この方法は一般的ではないため、ここでは培養による真菌検査法のうち以下の2法について述べる。

(1) 直接(湿室)培養法(図1)

本法は、食品そのものを底部に蒸留水や塩化バリウム(相対湿度90%/25℃)などの塩類飽和溶液を入れた密閉容器(デシケーターなど内径20cm以上のものが望ましい)の中に入れ、蓋をして20または25℃のふ卵器内で培養する方法である。観察は毎日行い、生育した真菌の種類、数および生育状態を調べる。本法により、その食品上に実際に生育可能な真菌とその増殖態度、それに伴う食品の変質状況が観察可能である。また、各種培地類には生育できない特殊な菌を植物の葉などの天然基質を用いて培養する際にも応用される。

(2) 希釈平板法(生菌数測定法)

本法は食品中の生菌数の計測や、集落を分離・同定し菌叢を調べる場合に行われる。

試料10gを無菌的に秤量し、90mLの滅菌希釈液(滅菌した0.05%寒天液、リン酸緩衝液、0.05%ツイーン80水溶液など)とともにワーリングブレンダーまたはストマッカーで2分程度ホモジナイズする。この溶液を必要に応じて10倍、100倍またはそれ以上に希釈し、その0.5または1.0mLを分離培地表面に均一に塗抹する。培地は各希釈段階毎に3枚以上使用する。

通常25℃で5~10日間培養する。出現した集落を数え、試料1gまたは1mL当たりの菌数に換算し、この値をcolony forming unit(cfu)/gとして表示する。菌の同定は、集落を分離し、純培養としたのち行う。

なお、カビの生菌数を測定する場合、乳剤とした試料を寒天表面に塗抹する方法と寒天培地と混釈する方法では出現菌数に差がみられ、一般に塗抹法において多数の菌が検出される。この様な両者における違いは、好気性であるカビに対する酸素分圧の影響か、または混釈時に寒天の熱による生菌の死滅に起因するかのいずれかの理由によるものと考えられている。

3) 迅速検査法

培養による真菌検査には数日から一週間を要し、迅速性が要求される品質管理になじまないことが指摘されている。β-グルカン、ATP、キチンなどの測定、免疫学的手法やPCRなどの分子生物学的手法を応用した迅速試験法もいくつか開発され、その一部は検査キットとして市販されている。しかし、いずれも使用条件が限定されるため、その特性を考慮して用いる必要がある。

図1 食品真菌検査の流れ

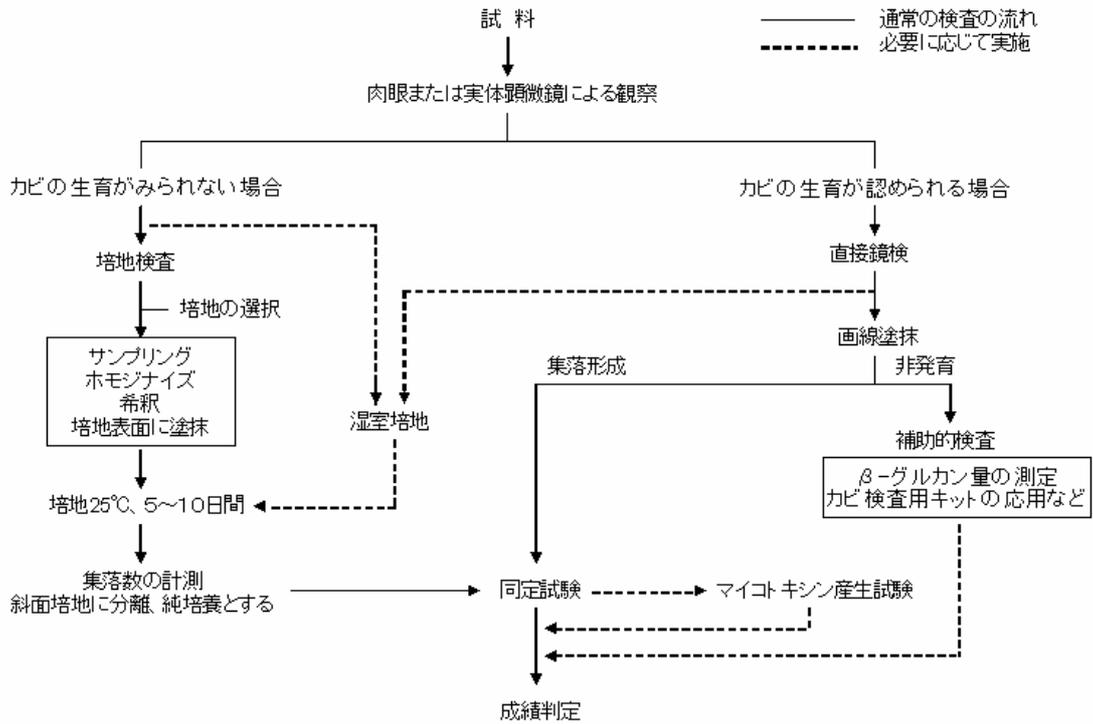


図2 観察用スライドの作成

