

千葉県産農家保有玄米における糸状菌分布

高橋 治男, 矢崎 廣久

Mycoflora of Farmer's Stock Brown Rice in Chiba Prefecture

Haruo TAKAHASHI and Hirohisa YAZAKI

Summary

The fungal populations of 81 samples of farmer's stock brown rice stored 1-3 years under natural conditions were studied. The moisture content of the sample was mostly in the range of 14.0-15.4%. 0-10 of colonies were found in about 44% of the samples whereas more than 31 colonies of the samples reached to 30%. Fungal invasion was mostly observed on rice sample at moisture content exceeding 14.0-15.0%.

The molds of *Aspergillus* and *Penicillium* were predominantly present on the samples. In the *Aspergilli*, *A. glaucus* group and *A. restrictus*, xerophilous fungi, were frequently detected. And *A. versicolor* and *A. ochraceus* were also found. *P. implicatum*, *P. adametzii* and *P. verrucosum* series were prominent in the penicillia.

6 of 15 strains of *A. versicolor* were producer of sterigmatocystin, but none of 13 strains of *A. ochraceus* produced ochratoxin.

1 緒言

日本人の主食である米は、貯蔵中の菌類による汚染を防ぐため、収穫後政府買入時の水分規格値である15%まで通常乾燥されている。貯蔵菌類 (storage fungi) の米への侵入を完全に防除するには、それ以下の水分含量が望ましいが、逆に低水分では飯米にした折の食味が低下するため、一般的には15%程度にとどめられている。

しかしながら、実際には玄米の水分含量は生産農家により多少変動を生じるうえ、貯蔵菌類は比較的low水分の条件下でも増殖が可能であり、15%程度の乾燥では活動できる領域内にあると言われる¹⁾。このため常温倉庫貯蔵米においても、時により明らかな変質米を生じることが報告されている²⁾。

菌類の貯蔵穀物への侵入は、遊離脂肪酸の急激な上昇やカビ臭³⁾および酸敗臭の発生などの生化学的変化をひきおこし、種々の品質低下を招くことが知られている³⁾。

ことに、真鍋ら⁴⁾杉本ら⁵⁾の報告の様に、カビ毒産生能を有する糸状菌により著しく汚染をうけた場合には、食品衛生上その安全性に問題を生じる。

常温食倉庫貯蔵米^{1,8)}あるいは農家保有米⁹⁾の着生糸状菌のフローラに関しては、これまでも報告があるが、貯蔵条件が劣悪とみられる農家保有米については、ひきつづき調査を行ないその安全性に注意を払う必要がある。

そこで、著者らは、千葉県における1-3年貯蔵の農家保有玄米81試料について、着生糸状菌の分布を調べるとともに、発癌性を有することが知られているオクラトキシン¹¹⁾ならびにステリグマトシスチン¹²⁾のカビ毒産生菌種の毒素産生能についても検討を加え、本報にまとめた。

2 実験方法

1) 試料玄米

千葉県内24市町村から、1977年産米(3年貯蔵)1検体、1978年産米(2年貯蔵)13検体ならびに1979年産米(1年貯蔵)67検体の計81検体について、それぞれ0.3~1.5kg採取した。

2) 水分含量測定

米の水分含量は、永原ら¹³⁾の方法により135℃で17時間乾燥を行ない、その水分含量を求めた。

3) 着生糸状菌検索

試料米約20gを1%次亜塩素酸ソーダ溶液中で1分間表面殺菌を行なった後、滅菌水でくり返し洗浄を行なった。次に、乳酸酸性ブドウ糖バレイショ寒天(PDA)平板および20%ショ糖添加ツァベックドックス寒天(20% CDA)平板のそれぞれに、水切りした試料米を1平板当たり5粒ずつならべた5平板(25粒)を作成し、25℃で7日間培養を行なった後、生育してくる集落を計数した。各菌の集落については、更に適当な斜面培地に鈎菌保存し、*Aspergillus*、*Penicillium*属には20% CDAならびにCDAを、その他の不完全菌にはPDA、コーンミール寒天培地を用いて同定した。また、*Aspergillus*属の同定にはRaperとFennel¹⁴⁾、*Penicillium*属の同定にはRaperとThom¹⁵⁾、更にはSamson¹⁶⁾を、また不完全菌の同定にはBarnett¹⁷⁾のマニュアルを参考にした。

4) カビ毒産生能の検索

オクラトキシン産生：3試料より分離した*A. ochraceus*13株について検索を行なった。200ml容エルレンマイヤーフラスコに20gの小麦をとり10mlの水を吸水させ、加湿殺菌を行なった。次いで、PDA斜面より得た供試株の胞子を接種し、25℃で10日間培養した。培養終了後、矢崎ら¹⁸⁾の方法に準じ、酢酸エチル抽出を行ない、薄層クロマトグラフィーにより検出を試みた。

ステリグマトシスチン産生能：4試料より分離した*A. versicolor*15株について検索した。オクラトキシンの場合に準じて調製した加湿滅菌玄米に、供試株の胞子を接種し、25℃で30日間培養を行なった。培養終了後、ワーキングブレンダーを用い200mlの酢酸エチルで5分間抽出を行ない、ろ紙ろ過により抽出液を得た。抽出液の溶媒を留去した後の乾固物を前報¹⁹⁾に準じ検出を行なった。

3 実験結果及び考察

1) 水分含量

供試貯蔵米の水分含量を12.5-17.5%の間の10段階に分け、貯蔵年数毎に表したがTable 1である。試料のほとんど(約74%)が14.0-15.4%の範囲内にあり、12.5%以下の試料はみとめられず、また15.5%以上のものもまれであった。さらに農家保有米について調べた宮木ら⁹⁾の結果では、そのほとんどが13.5-16.9%の間にあり、16%を越える試料も数多くみとめていることから、

今回採取した試料は一般に低水分の傾向にあることを示した。

2) 検出コロニー数

各試料米から検出したコロニー数をTable 2の様に7段階に分けて示した。結果はやや分散したが、1-10段階のものが約27%で最も多く、次いで不検出のものが17%を占めた。不検出の試料は、2年貯蔵の試料にも少なからずみとめられた。

一方、検査粒(50粒)の半数以上に菌が着生していたとみなすことができる。31以上のコロニーを検出した試料は全体の約30%に達し、そのうち全粒汚染とも言える51以上のコロニーを数えた試料も10%近かった。

以上の結果は、農家保有米の貯蔵環境条件が農家によりかなり相違のあることを示唆している。

Table 1 Moisture content of farmer's stock brown rice in Chiba prefecture

Moisture Content	No. of Sample			
	Stock period (year)			Total (%)
	3	2	1	
12.5-12.9			2	2 2.5
13.0-13.4		3	4	7 8.6
13.5-13.9		4	6	10 12.4
14.0-14.4		2	20	22 27.2
14.5-14.9		3	17	20 24.7
15.0-15.4	1	1	16	18 22.2
15.5-15.9			1	1 1.2
16.0-16.4				
16.5-16.9				
17.0-17.4			1	1 1.2
	1	13	67	81

Table 2 No. of fungus colony detected in farmer's stock brown rice in Chiba prefecture.

No. of colony	No. of Sample			
	Stock period (year)			Total (%)
	3	2	1	
0		6	8	14 17.3
1 - 10		3	19	22 27.2
11 - 20			13	13 16.1
21 - 30		1	7	8 9.9
31 - 40			8	8 9.9
41 - 50	1	1	6	8 9.9
51 -		2	6	8 9.9
	1	13	67	81

3) 検出コロニー数と水分含量との関係

Fig. 1に示した結果かや明らかな様に、多少の変動はみられるものの、貯蔵米の水分含量が14.0-14.5%を越えると明らかに出現コロニー数は増加の傾向を示し、14.5%以上では急増する例が多くみられた。この結果は、

貯蔵米の水分含量が13.7-14.0%に達すると、菌類の侵入が一般にみとめられるとの鶴田ら¹⁾の報告とほぼ一致した。

一方、その水分含量を越えてもコロニー数が0-10の低い段階にある試料も多少みとめられた。糸状菌が検出されなかった14試料のうち、6試料は14.0-14.4%の水分含量を有していた。この値はFig. 1や鶴田ら¹⁾の結果から、貯蔵菌が着生できると考えられる条件であり、菌類の侵入を防ぐには乾燥だけでなく、貯蔵中の管理が重要であることを示唆している。

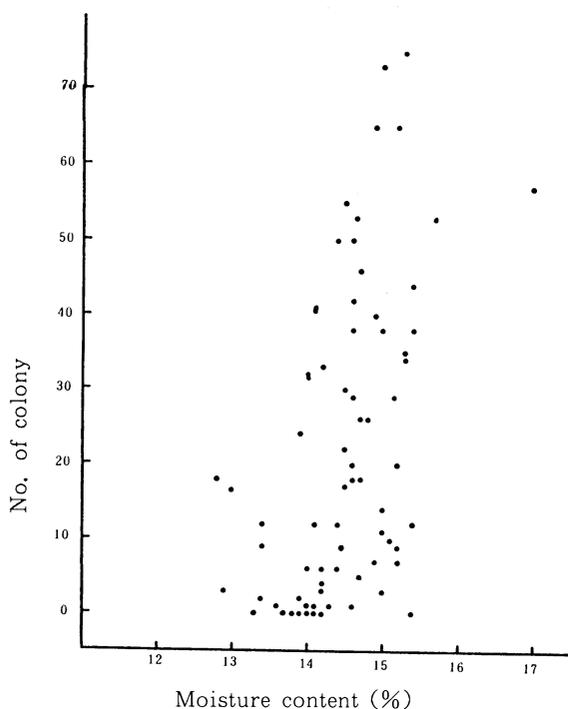


Fig. 1 No. of colony in relation to moisture content in farmer's stock brown rice in Chiba prefecture.

4) 検出糸状菌の属種分布

20%CDAならびにPDA培地より検出された糸状菌の属分布をTable 3に示した。いずれの培地でもAspergillus属が多数を占め、特に貯蔵菌類の検出に適した培地とされる20%CDAでは、検出菌数全体の73%にも達した。

一方、Penicillium属はPDA培地でやや検出率が高くなるものの、全体としてはAspergillus属のほぼ1/3の検出菌数であった。

全検査粒数に対するAspergillus属の出現率をみると20%CDA培地では35.9%、PDA培地では14.6%であり、

Penicillium属ではそれぞれ8.2%ならびに6.6%であった。このことは、宮木¹⁰⁾らのAspergillus属が8.9%、Penicillium属が17.0%という結果は、著者らの場合とは逆にPenicillium属が高い出現率を示していた。

Table 3 Genus of fungus detected in farmer's stock brown rice in Chiba prefecture.

Genus	No. of fungus (%)	
	20%CDAMedium	PDAmedium
<i>Aspergillus</i>	736 (73.0)	300 (51.5)
<i>Penicillium</i>	167 (16.5)	135 (23.1)
<i>Alternaria</i>	94 (9.3)	139 (23.8)
<i>Acremonium</i>	5 (0.5)	
<i>Thielavia</i>	4 (0.4)	
<i>Paecilomyces</i>	1 (0.1)	1 (0.2)
<i>Phoma</i>	1 (0.1)	2 (0.4)
<i>Cheatomium</i>	1 (0.1)	1 (0.2)
Unidentified	1 (0.1)	5 (0.9)
	1010	583

検出されたAspergillus属を種別にみると(Table 4) A.glaucus群とA.restrictusの出現率が非常に高く両者で約88%を占め、次いでA.versicolorならびにA.ochraceusなどが検出され、宮木ら¹⁰⁾の報告とほぼ一致した。貯蔵玄米の水分活性(Aw)は25℃において、吸湿の場合水分含量が13.1%であれば0.60であり、同じく14.6%であれば0.70とされている²⁰⁾。A.glaucus群やA.restrictusは貯蔵菌類の中でも好乾性であり、A.glaucus群の生育に必要な最低水分活性は0.70-0.72とされ²¹⁾、A.resrictusもそれとほぼ同じかあるいはそれよりも低い水分活性でも生育が可能とみられている²²⁾。今回の供試貯蔵米の水分含量は、さきに述べた様にその大部分が14.0-15.4%の間にあり、A.glaucus群やA.rest rictusのほぼ生育可能な水分含量を有している。従って、それらの好乾性糸状菌は、相対湿度が80%(=Aw0.8)を越えることの多い梅雨時には米粒への着生が可能と言える。事実、米の収穫直後から年間における糸状菌の経時的変遷を調べた宮木ら¹⁰⁾によれば、7月以降Aspergillus、Penicillium属の出現が急激に増加すると報告している。

前述の様に、A.glaucus群やA.restrictusに代表されるAspergillus属は他属の菌が容易に生育できない様な乾燥した条件下でも、生育可能なものが比較的多い²¹⁾。今回、宮木ら¹⁰⁾の結果に比してAspergillus属の出現率が高かった。この要因として、着生菌検索用培地が異なることによる可能性もありうるが、供試貯蔵米の水分含量が全体的に宮木らの場合より低かったことと密接な相関があると考えられる。

Table 4 Distribution of mold found on farmer's stock brown rice in Chiba prefecture.

Stock period (year)	3		2		1	
No. of samples	1		13		67	
No. of grains	50		650		3400	
	S*	K**	S	K	S	K
<i>Aspergillus</i>						
<i>glaucus</i>	1	18	4	98	40	469
<i>restrictus</i>			3	53	32	274
<i>versicolor</i>	1	2	1	8	9	34
<i>ochraceus</i>			2	2	7	38
<i>candidus</i>	1	5	1	1	5	19
<i>oryzae</i>			1	8	3	4
<i>flavus</i>					1	1
<i>terrus</i>					2	2
Total	1	25	4	170	46	843
<i>Penicillium</i>						
<i>implicatum</i>	1	19	2	20	10	56
<i>verrucosum</i>			1	23	6	63
<i>adametzii</i>					4	59
<i>citrinum</i>			2	3	7	43
<i>oxalicum</i>			2	4	3	3
<i>decumbense</i>					2	3
<i>chrysogenum</i>			1	1	1	1
<i>frequentans</i>			1	1	1	1
<i>expansum</i>					1	1
<i>variabile</i>					1	1
	1	19	5	51	37	232
<i>Alternaria</i>			1	2	33	231
<i>Acremonium</i>			1	1	3	4
<i>Thielavia</i>					2	4
<i>Phoma</i>					3	3
<i>Paecilomyces</i>					1	1
<i>Cheatomium</i>					1	1

S* = No. of fungus-infested sample

K** = No. of fungus-infested kernel

一方、*Penicillium*属においては*P. implicatum*, *P. azametzii*などのmonoverticillataの出現率が高く、その他*P. citrinum*や*P. verrucosum*系の菌も比較的多数検出された。*P. verrucosum*系にはシトリニンやオクラトキシン産生菌種²⁹⁾も含まれていることから、更に詳細な同定を行ったところ、産生菌種の*P. verrucosum* var. *verrucosum*(=*P. viridicatum*)ではなく、*P. verrucosum* var. *cyclopium*(=*P. cyclopium*)であった。*P. citrinum*, *P. cyclopium*は宮木ら¹⁰⁾も検出しているが、同時に多数分離したとしている*P. islandicum*や*P. phoeniceum*などは今回全く検出されず、*Penicillium*属の出現菌種の分布はやや相違がみられた。

5) カビ毒産生菌種とカビ毒産生能

カビ毒産生菌種としては、オクラトキシン産生菌種の*A. ochraceus*, ステリグマトシスチン産生菌種の*A. versicolor*ならびにシトリニン産生菌種の*P. citrinum*, *P. implicatum*²⁹⁾などが主として検出された。アフラトキシン産生菌種として著名な*A. flavus*も検出されたが、わずかに1株のみであった。これらの産生菌種は、いくつかの試料米では高い着生率がみられたが、全体としては低かった。

*A. ochraceus*の分離13株についてオクラトキシン産生能の化学検索を行なったところ、いずれも非産生株であった。宮木ら¹⁰⁾は、分離した457株中2株にその産生能をみとめている。以上のことから、オクラトキシン産生性*A. ochraceus*の出現頻度は低いものと思われる。しかしながら、今回の結果や宮木ら¹⁰⁾の報告でも明らかのように、農家保有米からの*A. ochraceus*の出現頻度は高く、また最近市販食品であるけずりぶしのオクラトキシンによる自然汚染例も報告されていることから²⁵⁾、今後も農家保有米におけるオクラトキシン産生性*A. ochraceus*の分布には十分な注意が必要である。

*A. versicolor*の分離15株におけるステリグマトシスチン産生株は、6株みとめられた。著者らは、菓子製造工場より分離した2株のいずれもが、著量のステリグマトシスチンを産生することを以前に報告した²⁶⁾。また一言ら²⁷⁾も、大気中より多数の産生株を得ており、本菌の産生株の出現率は比較的高いと言える。更に、最近著者らは、この産生株が28℃、相対湿度84%の比較的乾燥した条件下でも数ppmのステリグマトシスチンを玄米に産生することをみとめている²⁸⁾。

従って、劣悪な条件下や2-3年あるいはそれ以上の長期にわたる貯蔵の場合には、本菌によるステリグマトシスチンの汚染は、現実性ある問題としてとらえる必要がある。

5 要約

1) 1-3年貯蔵千葉県産農家保有玄米81試料について着生糸状菌の分布の検索を行なった。

2) 試料米の水分含量は大部分が14.0-15.4の間であった。

3) 試料の検出コロニー数は0-10のものが約44%を占めたが、31以上のコロニーが検出された試料も約30%に達した。

4) 水分含量と検出コロニー数との関係は、水分含量が14%前後からコロニー数は増加し、15%では急増する

傾向を示した。

5) 出現糸状菌は *Aspergillus*, *Penicillium* 属が多数を占め、一般に *Aspergillus* 属の出現率は *Penicillium* 属のそれよりも数倍高かった。 *Aspergillus* 属の中では *A. glaucus* 群と *A. restrictus* の出現率が特に高く、全検出株数の過半数に達した。

6) *A. ochraceus* 分離13株のオクラトキシン産生能、ならびに *A. versicolor* 15株のステリグマトシスチン産生能について化学検索を行なった結果、前者はすべてが非産株であり、後者は6株にその産生能をみとめた。

謝辞

試料米の採取に当り、御協力を頂いた県内19保健所をはじめ関係各位に深謝致します。

文献

- 1) 鶴田理, 斉藤道彦 (1980): 国内産玄米常温貯蔵庫中に発生する菌類の加害について (第3報), 貯蔵中における菌類の推移, 日菌報, 21, 121-125.
- 2) 鶴田理, 真鍋勝 (1974): 同上 (第一報), 長期貯蔵玄米に認めた菌類の加害について, 日菌報, 15, 401-411.
- 3) 斉藤道彦, 山西貞, 鶴田理 (1974): カビの臭気成分に関する研究 (第一報), 合成培地上で生成されるカビ臭成分の同定, 食総研報, 34, 67-69.
- 4) Kaminski, E., Stawicki, S. and Wasowicz, E. (1974): Volatile flavor compound by mold of *Aspergillus*, *Penicillium*, and fungi imperfecti, Appl. Microbiol., 6, 1001-1004.
- 5) Christensen, C. M., and Kaufmann, H. H. (1965): Deterioration of stored grains by fungi, Annu. Rev. Phytopathol., 3, 69-84.
- 6) 真鍋勝, 鶴田理 (1975): 国内産玄米の常温倉庫貯蔵中に発生する菌類の加害について (第2報), 長期貯蔵米中に認めたステリグマトシスチンについて, 日菌報, 16, 399-405.
- 7) 杉本貞三, 南沢正敏, 高野和子, 笹村靖子, 鶴田理 (1977): *Penicillium viridicatum* と *Aspergillus versicolor* による貯蔵米のオクラトキシンA, シトリニンおよびステリグマトシスチンの自然汚染について, 食衛誌, 18, 176-181.
- 8) 倉田浩, 坂部フミ, 宇田川俊一, 一戸正勝, 鈴木明子, 高橋紀子 (1968): 昭和29-42年における貯蔵米の菌学成績, 衛試報告, 86, 183-188.
- 9) 宮木高明, 山崎幹夫, 川崎洋介, 倉田浩 (1969): 千葉県産米に分布する有害糸状菌に関する研究 (第一報), 千葉県大腐研報, 21, 133-137, 1968. 同 (第二報), 同22: 41-45.
- 10) 宮木高明, 山崎幹夫, 堀江義一, 宇田川俊一 (1970): 米に着生する有害糸状菌の検索と分布について, 食衛誌, 11, 373-380.
- 11) Kanisawa, M., Suzuki, S. (1978): Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin, Gann, 69, 599-600.
- 12) Purchase, I. F. H., and van der Watt, J. J. (1970): Carcinogenicity of sterigmatocystin, Food Cosmet. Toxicol., 8, 289-295.
- 13) 永原太郎, 提忠一 (1962): 小麦, 小麦粉および他の穀類の水分含量測定, 食糧研報, 16, 1-4.
- 14) Raper, K. B., and Fennel, D. I. (1965): The Genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins Co., (Baltimore). pp101.
- 15) Raper, K. B., and Thol, C., (1949): A Manual of the Penicillia, Williams and Wilkins Co., (Baltimore). pp489.
- 16) Samson, R. A., and Stolk, America, C., and Hadlock, R. (1976): Revision of the subsection Fasciculata of *Penicillium* and some allied species, Studies in Mycology, 11, 1-46.
- 17) Barnett, H. L., and Hunter, B. B. (1972): Illustrated genera of imperfect fungi, Burgess Publishing Com. (Minneapolis).
- 18) 矢崎廣久, 高橋治男, 七山悠三 (1978): オクラトキシンの抽出と分析について, 千葉衛研報, 2, 1-6.
- 19) Takahashi, H., Yazaki, h., Nanayama, Y., Manabe, Y., Manabe, M., and Matsuura, S. (1984): Distribution of sterigmatocystin and fungal mycelium in individual brown rice kernels naturally infected by *Aspergillus versicolor*, Cereal Chem., 61, 48-52.
- 20) 提忠一, 小泉英夫, 谷達雄 (1969): 日本産粳, 玄米及び精白米の平衡水分値の比較, 食糧研報, 24, 1-8.
- 21) 宇田川俊一, 松田良夫, (1984): 食品菌類ハンドブック, 医歯薬出版 (東京), P288.
- 22) Christensen, C. M., and Kaufmann, H. H.

- (1974): Microflora, Storage of Cereal Grains and Their Product, American Association of Cereal Chemists, Inc., (St. Paul). P 158-192.
- 23) Walbeek, W., Scott, P. M., Harwig, J., and Lawrence, J. W. (1969): *Penicillium viridicatum* Westling: A new source of ochratoxin A, Can. J. Microbiol., 15, 1281-1285.
- 24) Pallock, A. V. (1949): Production of citrinin by five species of *Penicillium*, Nature, 160, 331-332.
- 25) 森悦男, 小川時彦, 山本順昭, 田中幸生, 小野勝美, 頭本藤男, 一戸正勝, 倉田浩 (1981): 市販かつおぶし中のマイコトキシンの分析, 日本食品衛生学会第42回学術講演会要旨集, P20, (大阪)
- 26) 高橋治男, 矢崎廣久, 七山悠三, 松本邦昭, 大田洋子, 小林崇則, 木内良春, 宍倉忠夫 (1982): 食品製造工場におけるカビ汚染 (I), 菓子製造工場におけるカビ汚染, 千葉衛研報, 6, 37-40.
- 27) 一言広, 諸角聖, 和宇慶朝昭, 坂井千三 (1978): 大気中の毒性カビの分布について, 都衛研報, 29-1, 86-94.
- 28) 高橋治男, 矢崎広久: 未発表
- 29) 宇田川俊一, 橋本賢範, 平山重勝 (1956): *Penicillium citrinum* Thomの分離系統とcitrinin生産力に就いて, 衛試報, 74, 299-303.