

醸造工場に発生する黒色カビ

山下 勝・竹内良和・神谷直方・辻本 誠・和久 豊

日本醸造協会誌（醸協）第99巻第11号 816～821 頁別刷（2004）

日 本 醸 造 学 会

醸造工場に発生する黒色カビ

山下 勝・竹内良和・神谷直方・辻本 誠・和久 豊
(株)ビオック)

平成16年7月13日受理

Black Fungi Multiplying in a Brewery

Masaru YAMASHITA, Yoshikazu TAKEUCHI, Naokata KAMIYA, Makoto TSUJIMOTO, Yutaka WAKU
(Bioc Co. Ltd., 1-111 Uchida-Muromachi, Toyohashi, Aichi, Japan, 44-8087)

Three black fungi multiplying in a brewery were identified. These were *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobacidium pullulans*, and *Aspergillus niger*. The same numbers of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus awamori* were found as that of *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobacidium pullulans*, and *Aspergillus niger*. The growth nutrients of these fungi were volatile carbohydrates such as the ethanol and ester of brewing material and aerial N, and vapor condensations containing aerial dust and product of other fungi autolysis. Germicides such as Thiabendazol and 2-Methylthiazol were effective for a shortterm prevention of black fungi growth.

Key words : Black fungi, Brewery.

醸造工場に多く発生する黒色カビの増殖防止を目的とし、醸造工場黒色カビ増殖部分からサンプルを取り、カビを分離培養し、分類を行い、カビ増殖要因、防止法等の検討を行ったので報告を行う。

実験方法

カビ類の培養は合成培地（ポリペプトン0.1%、グルコース2%、酵母エキス0.1%、寒天1.5%、pH6.0）を用いた。分離した菌株の分類は、*Cladosporium sp.*は箕浦の方法^{1,2)}、*Aspergillus sp.*は村上³⁾、菅間等⁴⁾の方法、*Aureobacidium sp.*は森永の方法⁵⁾に従い、孢子形態、生理的性質等を検討し、決定した。その他にDam等⁶⁾の18s Ribosomal DNAの部分領域（primers：NS1~NS8）の増幅、塩基配列の決定を行い、既知データベースとの比較を行った。黒色カビの増殖要因の検討は、綿栓三角フラスコを用い、殺菌水にエタノール、酢酸エチル、グルコース、アミノ酸、殺菌ゴミ（クーラーのゴミ）、カビの自己融解物等を加え、黒色カビを接種し、25°C、30

日保存し、増殖を肉眼判定した。殺菌剤による黒色カビ類の増殖阻害試験は液体培地（寒天を除いた増殖試験培地）に殺菌剤を加え、カビ孢子を接種し、25°C、30日後の増殖を肉眼判定した。 α -アミラーゼ生成量⁷⁾、酸生成量⁸⁾は国税庁所定分析法に従った。

実験結果

1. 黒色カビ分離培地の検討

ポテトデキストロース培地、麴エキス培地、YM培地を用い黒色カビを分離したところ、培地によってカビの黒色発生に違いがあることを認めた。そこで合成培地を用い、黒色発生の検討を行ったところ、窒素源が多く、炭素源が少ないと黒色発色が少なく、逆に窒素源が少なく、炭素源が多いと黒色発色が良いことが分かった（Table 1）。特に *Aureobacidium sp.* は発色の変化が大きく、培地の窒素源が多く、炭素源が少ないと酵母型増殖が多くなり、黒色発生も悪くなった。培地のpHの影響は少なく、pH4.5~8.0の間は黒色発生にあまり差は認められなかった。最終的には、ポ

Table 1 Effect of medium composition on the growth and coloring of *Aureobacidium* sp., *Aspergillus* sp. and *Cladosporium* sp.

Medium*	(%)	<i>Aureobacidium</i> sp. growth color	<i>Aspergillus</i> sp. growth color	<i>Cladosporium</i> sp. growth color
Polypepton Glucose	1 1	++ brown	++ brown	+ brownish black
Polypepton Glucose	0.1 1	+ brownish black	+ brownish black	+ brownish black
Polypepton Glucose Yeast ex.	0.1 1 0.1	++ brownish black	++ brownish black	++ black
Polypepton Glucose Yeast ex.	0.1 2 0.1	++ black	++ black	++ black

*: Agar 1.5%, pH 6.0

リペプトン0.1%, グルコース2%, 酵母エキス0.1%, 寒天1.5%, pH 6.0を用い希釈培養法でカビ数の決定を行った。

2. 醸造工場サンプルから分離された黒色カビの分類

醸造工場の黒色サンプルから黒色カビとして *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Aureobacidium* sp. の3種が分離された。(Table 2) *Cladosporium* sp. は, Fig. 1に見られるように, その独特の分生子形成構造から *Clado. cladosporioides* と推定した^{1,2)}。*Aspergillus* sp. は, Fig. 2のような頭部構造であり, 梗子頭部は円形, 杓文字型で, 胞子径が2-5 μ , 分生子に突起構造が見られることから *Asp. niger* と推定した^{3,4)}。*Aureobacidium* sp. は, Fig. 3, 4に見られるように好氣的培養菌糸には出芽型分生子, 液体培養では酵母型細胞が見られたので, *Aureoba. pullulans* と推定した⁵⁾。更に, これらの分類の確認の為に, Dam等の18s Ribosomal DNAの部分領域 (primers: NS1~NS8)の増幅, 塩基配列の決定を行い, 既知データベースとの比較を行った⁶⁾。その結果は, Table 3にあるように, これら3種の菌株は, 推定の既知規準株DNA塩基配列との一致度が97~100%と高く, これらの3種のカビ類は *Clado. cladosporioides*, *Asp. niger*, *Aureoba. pullulans* であると認定された。

3. 醸造工場における黒色カビの種類と数

従来の報告^{9,10,11,12)}では, 醸造工場の黒色カビは主

として *Aureoba. pullulans* と記載されており, 他のカビ類についての記載は比較的少ない。しかし, 全国の醸造工場の黒色サンプルからカビの分離を行ったところ, Table 2にあるように, *Aureoba. pullulans* のみの工場はなく, 殆どの工場から上記3種類の黒色カビが検出された。カビ類の存在場所に特徴があり, *Aureoba. pullulans* は湿気が多い場所 (圧搾室, 醱酵室, 調合室の壁等で水分が多く, じめじめした場所), *Asp. niger* は建物の外壁, 工場の塀, アルコール貯蔵タンク表面等外気に接し, 比較的乾燥している場所に多く検出された。これらの菌株と異なり, *Clado. cladosporioides* は検出場所に特別の傾向がなく, 多くの場所から検出された。これら菌株の増殖適温を調べたところ, *Clado. cladosporioides* の増殖適温は20°C前後と低かったが, 他の2菌株の増殖適温は30°C前後であった。又, サンプルを採取したどの工場も6月頃以後夏には黒色カビの増殖が多くなり, 黒色の増加が特に気にかかるようになるという意見であったが, この頃になると *Aureoba. pullulans*, *Asp. niger* の増殖が顕著になる為と推定された。又, 何時何処を調べた時もこれら3種類の黒色カビの他に, 殆ど全てのサンプルから黄緑~緑色の *Aspergillus* sp., 褐色の *Aspergillus* sp.が *Clado. cladosporioides*, *Asp. niger*, *Aureoba. pullulans* 等とほぼ同数検出された (Table 2)。この2種のカビ類も死後は褐黒色になり, 且つ死骸が黒色カビの栄養物になるので, 醸造工場の黒色化

Table 2 The types and numbers of fungi isolated at breweries

Sample	Species <i>Cladosporium</i> sp. (cfu./g)	<i>Asp. niger</i> (cfu./g)	<i>Aureobacidium</i> sp. (cfu./g)	<i>Asp. oryzae</i> and <i>Asp. awamori</i> (cfu./g)
Press room of soy factory I*	9×10^6	—	—	19×10^5
Wall of soy factory I*	25×10^6	—	—	45×10^4 penicillium ++
Wall of soy factory II*	—	56×10^4	—	6×10^3
Mixing room of soy factory II*	23×10^4	—	38×10^5	25×10^4
Alcohol tank of Shochu distillery I*	—	65×10^4	—	3×10^4
Wall of Shochu distillery II**	7×10^4	3×10^3	—	32×10^4
Brewing tank of sake brewery I**	6×10^6	—	25×10^5	yeast and bacteria ++
Wall of steaming room of sake brewery I**	5×10^4	2×10^4	2×10^3	6×10^4
Press room of mirin factory I**	6×10^6	—	—	25×10^4
Mixing room of mirin factory I**	—	2×10^4	5×10^5	9×10^5

* : Sample at March and April, ** : Sample at June and July.



Fig. 1 Botryoblastospores of *Cladosporium cladosporioides*



Fig. 2 Conidial heads of *Aspergillus niger*

に關与していると推察された。黄緑～綠色カビは、胞子頭は globose～radiate 型、梗子頭部は円形乃至杓文字型、 α -アミラーゼ活性が比較的高く、酸生成が少ない特性を有しているので、*Asp. oryzae* 類似菌と推定した³⁾。後者は、胞子頭は globose～radiate 型、梗子頭部は円形乃至杓文字型、 α -アミラーゼ活性が前者に比べ弱く、酸生成が多く、亜硝酸資化性が－という特性を有しているので、*Asp. awamori* 類似菌と推定した^{3,4)}。

4. 黒色カビの増殖因子の検討

黒色カビの発生が特に多いのは压榨室、発酵室の窓の外側、調合室、アルコール貯蔵タンク等のアルコール類の揮発が多いと推定される場所であることから考えると、黒色カビの主栄養源となっている物質は、醸

造物の揮発性成分例えばエタノール、エステル類であろうと推定されたが、それ以外にも、これらの成分を殆ど含まず、水分主体と考えられる原料蒸煮工場、瓶詰工場等の水蒸気排出口周辺も黒色カビの増殖が顕著であることから、どのような成分が存在すれば、黒色カビが増殖するのか検討を行った。殺菌水に種々の成分を加え、3種の黒カビを接種し、その後25°C、30日に保存し、カビの増殖を肉眼判定したところ、Table 4にあるように *Clado. cladosporioides*, *Aureoba. pullulans* は水にエタノール、酢酸エチルやグルコース等の炭素源を単独に加えただけのものに良く増殖した。数回実験を繰り返したが、アミノ酸、ポリペプトン等の窒素源を加えなくとも十分増殖が認められたことから、この2菌は文献¹⁰⁾にあるように空中窒

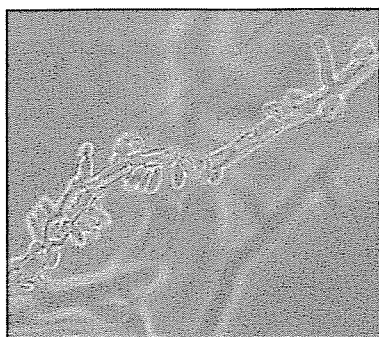


Fig. 3 Phialospores of *Aureobasidium pullulans*

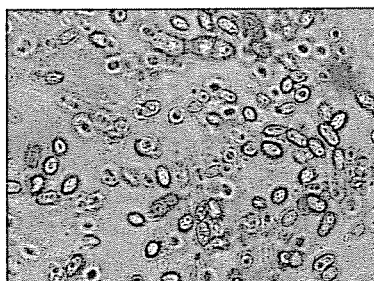


Fig. 4 Yeast like growth of *Aureobasidium pullulans*

Table 3 Similarity of ribosomal DNA sequence of isolated fungi to known species

Species	Known species	Similarity
<i>Cladosporium</i> sp. No. 1	CCU 202381 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	99%
<i>Cladosporium</i> sp. No. 3	CCU 202381 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	99%
<i>Aureobasidium</i> sp. No. 1	AYO 30322.1 <i>Aureobasidium pullulans</i>	97%
<i>Aureobasidium</i> sp. No. 3	AYO 30322.1 <i>Aureobasidium pullulans</i>	100%
<i>Aspergillus</i> sp. No. 1	D 63697.1 <i>Aspergillus niger</i>	97%
<i>Aspergillus</i> sp. No. 2	D 63697.1 <i>Aspergillus niger</i>	97%
r RNA Gene/primer	Product size (bp)	
NS 1 GTAGTCATATGCTTGTCTC	555	
NS 2 GGCTGCTGGCACCAGACTTGC		
NS 3 GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	597	
NS 4 CTTCGTC AATTCC TTTAAG		
NS 5 AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	310	
NS 6 GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC		
NS 7 GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	377	
NS 8 TCCGCAGGTTACCTACGGA		

Table 4 The effect of medium composition on the growth of *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobacidium pullulans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*

Medium	Species	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Aureobacidium pullulans</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
water		—	—	—	—
Water+ethylalcohol	(1%)	++	++	—	—
Water+ethylacetate	(1%)	++	++	—	—
Water+glucose	(1%)	++	++	—	—
Water+ethylalcohol +amino acid*	(1%)	+++	+++	++	++
Water+ethylacetate +amino acid*	(1%)	+++	+++	++	++
Water+glucose +amino acid*	(1%)	+++	+++	+++	+++
Water+air dust	(1%)	+	+	+	+
Water+fungus autolysate	(1%)	+	+	+	+

* : glutamic acid 30 mg, aspartic acid 25 mg, proline 20 mg, phenylalanine 10 mg, lysine 10 mg, methionine 5 mg/100 ml, pH 6.0.

素を利用している可能性があると考えられた。*Asp. niger*, *Asp. oryzae*, *Asp. awamori*等はアミノ酸、ポリペプトン等の窒素源がないと増殖が出来なかった。水蒸気排出口周辺の炭素源、窒素源供給の非常に少ない部分でのカビ類増殖を考えると何処からの炭素源、窒素源の供給がおきていると考えられるので、凝集水滴へのごみ類の付着、他の空中窒素利用微生物の死後分解物等の供給の可能性があると考えて、殺菌水に殺菌ずみのゴミ、他のカビ類の死後分解物を加えてこれらのカビの増殖可能性を調べたところ、Table 4にあるように増殖が可能であると推定される結果となった。

5. 殺カビ剤 Thiabendazol, 2 Methylisothiazol による黒色カビの増殖阻害

Table 5にあるように、Thiabendazolはどの菌株に対しても5~10 ppm位の少ない濃度で増殖阻害がおきているが、2 Methylisothiazolは100~200 ppmが必要であった。これらの数値は既知殺菌剤濃度とほぼ同じ濃度値である¹¹⁾。醸造工場では、殺菌剤で年1, 2回殺菌しているところが多いが、現場では完全殺菌が困難であり、なお且つ一旦殺菌されても後から水分、栄養分、黒カビの孢子等も絶えず供給されているので、少ない回数の殺菌により黒カビの増殖を完全に妨げる

ことは困難であると思われた。

結 論

(1) 醸造工場に発生する黒色カビは *Asp. niger*, *Clado. cladosporioides*, *Aureoba. pullulans* の3種類が存在し、従来から言われていたような *Aureo. pullulans* のみではなかった。

(2) 醸造工場の黒色カビ増殖部分には、*Asp. niger*, *Clado. cladosporioides*, *Aureoba. pullulans* の3種類の黒色カビ類の他に、緑色や褐色の *Asp. oryzae*, *Asp. awamori* 等もほぼ同数存在しており、これらのカビ類も醸造工場黒色化に関与している可能性があると考えられた。

(3) これらの黒色カビが工場の建物周辺に増殖する原因は工場から発生する醸造揮発物が建物壁に凝縮し、これを栄養分としてカビ類が増殖する場合と、工場の建物壁に水蒸気が凝縮し、これに付着するゴミやここで先に増殖した空中窒素固定菌の遺体分解物等を栄養分としてカビ類が増殖する場合の2種類が存在すると推定された。

(4) *Clado. cladosporioides*, *Aureoba. pullulans* の2カビは栄養物がエタノール、エステル等の炭水化物の

Table 5 The growth inhibition of *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobasidium pullulans* and *Aspergillus niger* by Tiabendazol and 2-Methylthiazol

Chemical concentration (ppm)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> no. 1	<i>Aureobasidium pullulans</i> no. 1	<i>Aspergillus niger</i> no. 1
Tiabendazol	100	—	—
	50	—	—
	25	—	—
	10	—	—
	5	±	±
	0	+++	+++
2-Methylthiazol	200	—	—
	150	—	+
	100	—	+
	50	+	++
	25	+	++
	10	++	++
	5	++	+++
	0	+++	+++

みであっても空中塵素を利用して増殖している可能性があると推定された。

(5) 殺カビ剤はこれらのカビの殺菌、増殖阻害には有効であるが、殺菌後も、水分、醸造揮発物、ゴミ、カビ孢子等の供給が続くので、殺カビ剤消失後には、これらのカビ類の再増殖が始まり、黒色カビの増殖防止の根本対策とは成り得ないと考えられた。

文 献

- 1) 箕浦久兵衛, 発工誌, 41, 401-412, (1963)
- 2) 箕浦久兵衛, 発工誌, 42, 723-738, (1964)
- 3) 村上英也, 醸協, 66, 966-969, (1971)
- 4) 菅間誠之助, 西谷尚道, 大場俊輝, 河内邦英, 照屋比呂子, 原昌道, 村上英也, 醸協, 70, 595-598, (1975)
- 5) 森永力, 防菌防黴誌, 18, No. 6, 295-297, (1990)
- 6) Dams, E., L. Vandembemt, Y. VandePeer, J.-M. Neefs, G. Smits, I. vandembemt, and R. DeWachter, Nucleic Acids Res., 16, (Sup) : r 87-r 173, (1988)
- 7) 国税庁所定分析法注解, p. 218-221, 日本醸造協会, 昭和 62 年
- 8) 国税庁所定分析法注解, p. 221-222, 日本醸造協会, 昭和 62 年
- 9) 井上真由美, 『建物のカビ』, 38-62, 日本建築士会連合会発行, (1979)
- 10) 那須野精一, 醫研, 3, 212-216, (1977)
- 11) 井上真由美, 『食品工場のカビ』, 127-153, 三書房, 昭和 57 年
- 12) 井上真由美, 『建物のカビ』, 125-148, 日本建築士会連合会発行, (1979)