

## MALDI-TOF MSを利用した苦情品から分離したシンナー臭発生酵母の解析

吉原 祥子<sup>a</sup>, 上原 さとみ<sup>a</sup>, 高橋 由美<sup>a</sup>, 千葉 隆司<sup>b</sup>, 鈴木 淳<sup>a</sup>, 貞升 健志<sup>c</sup>

異臭が継続的に発生した食パンの苦情品から分離した酵母を対象として、原因の究明と汚染経路の推定を目的にMALDI-TOF MS法とDNA塩基配列解析法により原因菌の同定を行った。開封済の苦情品から複数の酵母を分離しMALDI-TOF MSで同定した結果、3種類の酵母が同定された。各々の株を25°Cで培養し、臭気試験を行ったところ、*Wickerhamomyces anomalus*のみが培養1日後から強いシンナー臭を発生した。この結果から、異臭の原因菌は*W. anomalus*であり、異臭が続いた要因は多量の*W. anomalus*が付着した食パンを低温下で保管したことにより発育が鈍化し、臭気の原因物質である酢酸エチルが発生し続けたことによるものと推測された。本菌は同時期に購入した同一工場の別ロット参考品からも検出され、シンナー臭も確認したことから、工場は*W. anomalus*に汚染されていたと推測された。苦情品由来及び参考品由来*W. anomalus*分離株について系統樹を作成した結果、苦情品を汚染していた*W. anomalus*は参考品の株と同一由来とは判定できず、苦情品の汚染源特定には至らなかった。

キーワード：食品苦情、食パン、シンナー臭、MALDI-TOF MS、塩基配列解析、分子系統樹解析、*Wickerhamomyces anomalus*

### はじめに

食品は酵母により変敗しても酵母の代謝産物には毒性がないため、食中毒の原因になることはほとんどない<sup>1)</sup>。しかしながら、シンナー臭は薬品の混入を想起させるため、消費者は健康被害を心配して保健所に届け出ることから、シンナー臭発生酵母の苦情事例は多く見られる<sup>2)</sup>。シンナー臭に代表される異臭を要因とする食品苦情の検査は、検体から分離した菌の臭気試験を行い、異臭を発生した株についてDNA塩基配列解析法により菌種の同定を行う必要がある<sup>3, 4)</sup>。

2017年10月に都内小売店で販売していた食パンの購入者より、購入日当日の開封時から異臭発生との食品苦情の届け出があり、苦情品は冷蔵保存中に異臭の発生が強くなったという事例を経験した。本事例のように苦情品が開封されている場合は、原因菌を特定するために複数の分離株について調査を行う必要があるが、DNA塩基配列解析法により多数の分離株を検査するには、検査の迅速性に課題がある。そこで、本研究では苦情原因の究明と汚染経路の推定を目的として、2017年10月の苦情事例の食パンと同一工場で作られた食パンから分離した菌株を対象に、MALDI-TOF MSによる感染経路の推定を行い、DNA塩基配列解析による結果と比較検討した。

### 実験方法

#### 1. 試料

2017年10月に検査依頼されたシンナー臭を発生する苦情品（食パン）及び同時期に購入した同一工場の別ロットの

食パンを検査試料とした。

苦情品の原因菌の同定に関しては、目視により苦情残品から分離したコロニー性状の異なる酵母11株を検査対象とした。

汚染源の特定に関しては、残品より12株、別ロット品より8株のシンナー臭発生酵母に、苦情原因の究明で分離したシンナー臭発生酵母3株を加えた合計23株を供試菌株とした。

また、培養方法は苦情品残品及び別ロット品の10倍乳剤をCP加Potato Dextrose Agar (PDA) 培地で25°C、2日間培養を行った。

#### 2. 苦情原因の究明

##### 1) MALDI-TOF MS

(1) エタノール・ギ酸抽出法 供試菌株についてエタノール・ギ酸抽出法の前処理により試料の調整を行った。すなわち、1.5 mLチューブに入れた蒸留水 300 µLに少量の分離菌株を懸濁後、エタノール 900 µLを加えて攪拌した。13,980×gで2分間遠心後、上清を除去して乾燥させた。沈渣に70%ギ酸 20 µLを加えて攪拌した後、アセトニトリル 20 µLを加えて攪拌した。13,980×gで2分間遠心した上清 1 µLをターゲットプレートに添加して乾燥させた後、 $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) (Bruker Japan) を1 µL添加して乾燥させた。

(2) 原因菌の同定 MALDI-TOF MSにより得られた菌株の各スペクトルデータは、Microflex LT (Bruker Japan) を使用し、MBT Compass ver.4.1を用いて菌種同定を行った。

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

<sup>c</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部

ライブラリー未登録のため同定不能であった株については、ITS1/2領域の塩基配列解析法を用いて同定した。

## 2) 臭気試験

MALDI-TOF MSによるマススペクトルデータで作成した系統樹で分かれた各クラスターの代表株3株を食パンに添加して25°Cで10日間培養し、毎日臭気を確認した。シンナー臭を発生した株は冷蔵庫での保存を想定し、4°Cでも培養し、同様に試験を行った。

## 3) 塩基配列解析

(1) DNA抽出 DNAの抽出は熱アルカリ抽出法で行った。すなわち、0.5 mLチューブに蒸留水 20 µLを加えてコロニーを懸濁した後、50 mM NaOH 20 µLを加えて100°C 10分間加熱した。1 M HCl (pH 7.5) を 40 µL加えて中和させて遠心分離し、上清をDNA抽出物（テンプレート）とした。

(2) PCR及びシーケンス PCRは、既報のITS1/2領域<sup>5)</sup> (約500 bp) 及び26S rDNAのD1D2領域<sup>6)</sup> (約550 bp) を対象としたプライマーを用い、94°C 30秒、55°C 30秒、72°C 30秒、30サイクルで増幅させた。得られたPCR増幅産物は、常法によりダイレクトシーケンスを行いそれぞれ塩基配列を決定した。得られた塩基配列についてはGenBank/DDBJ/EMBLのデータを用いたBLASTの相同性検索を行い菌種名を決定した。

## 4) 系統樹解析

MALDI-TOF MSで得られたスペクトルデータから、解析ソフトウェアCompass Explorer ver.4.1を用いて系統樹を作成した。また、菌株のシーケンス解析より得られた塩基配列は、MEGA ver.6にデータを取り込み、アライメント解析の後、NJ法により系統樹解析を行った。

## 結果及び考察

### 1. 苦情原因の究明

#### 1) MALDI-TOF MS

苦情品残品から $8.6 \times 10^7$  cfu/g の酵母を検出し、分離した11株をMALDI-TOF MSで同定した。その結果、*Wickerhamomyces anomalus* 3株、*Candida guilliermondii* 5株、ライブラリー未登録菌種3株であり、未登録菌種はITS1/2領域の塩基配列解析の結果、*Candida etchellsii* であった。これらの株についてMALDI-TOF MSで系統樹を作成したところ、大きく3つのクラスター (*W. anomalus*, *C. guilliermondii*及び*C. etchellsii*) に分類された (図1)。

#### 2) 臭気試験

3つのクラスターの代表株3株 (630-2, 630-3, 630-7) について25°Cで培養し臭気試験を行った結果、*W. anomalus*のみが添加1日後から強いシンナー臭を発生した。シンナー臭は3日後まで続き、4日後には消失した。また、臭気が発生した食パンを冷蔵庫で保管すると9日後まで臭気発生が継続し10日後には消失した (表1)。一般的にシンナー臭発生酵母は発育により酢酸エチルを産生することが知られている<sup>7)</sup>。したがって、異臭が強くなった要因は、

多量の*W. anomalus*が付着した食パンを低温下で保管したことにより*W. anomalus*の発育が鈍化し、酢酸エチルが発生し続けたことによるものと推測された。さらに、本菌は同時期に製造された同一工場の別ロット参考品からも $10^3$  cfu/gオーダーで検出され、異臭についても確認されたことから工場内の汚染が疑われた。

MALDI-TOF MSを苦情品解析に利用することにより、原因菌の特定から臭気確認に至るまでの期間が従来のDNA塩基配列解析法と比べて約2日間短縮可能であった。しかし、ライブラリーに登録されていない菌が存在することから迅速に同定するためにはライブラリーを充実させる必要があると考えられた。

## 2. 菌株の解析

苦情品残品由来及び参考品由来*W. anomalus*分離株についてMALDI-TOF MSで系統樹解析を行った結果、G1及びG2 (G2-A及びG2-B) の2つのクラスターを形成した (図2)。苦情品残品由来株では、G1, G2-B, 参考品由来株はG2-Aに分類された。また、ITS1/2領域及び26S rDNAのD1D2領域の塩基配列解析においては、D1D2領域はいずれも同一配列であったが、ITS1/2領域は苦情品由来株と参考品由来株でG3とG4の2つの異なるクラスターを形成した (図2)。酵母の同定には、ITS1/2領域及び26S rDNAのD1D2領域の塩基配列解析が多く行われており、同一種の菌株間ではITS1/2領域の塩基配列の相同性が99%以上であることが示され、同定の目安になっている<sup>7)</sup>。今回、苦情品を汚染していた*W. anomalus*と別ロット品から分離された菌株の塩基配列は、98.3% (465/473)の一致で同一由来とは言え切れず、工場は複数種類の*W. anomalus*に汚染されていると推測されたが、苦情品の汚染源特定には至らなかった。

これまでシンナー臭発生酵母としてよく知られる*W. anomalus*は、2012年から2016年に東京都内に流通した食品から分離した酵母106株のうち26株を占めていた<sup>8)</sup>。また、2018年4月から2019年3月の調査では食品から分離した酵母84株のうち5株を占め、シンナー臭を産生する酵母は身の回りに高頻度で存在している。

従来、食パン製造工場でのパンの変敗は*Bacillus*属によるローブ現象、*Aspergillus*属や*Penicillium*属の斑点の発生が主体であったため、これらの微生物危害に対しエタノールの散布を中心に工場の衛生管理を行ってきた。しかし、*W. anomalus*はエタノール資化性が極めて強く、パン製造工場の空中浮遊菌から二次汚染することでシンナー臭の原因となることが多い<sup>9)</sup>とされる。工場で発生するシンナー臭発生酵母に対する応急措置として清掃時のエタノールの使用を停止すればシンナー臭の産生は起きないともされている<sup>10)</sup>。しかしながら、その場合、細菌やカビが増殖する可能性が高くなり、別の方法が必要である。その一つとして、オゾン処理を行うと*W. anomalus*が死滅し、比較的水分が多い状態で行った方がより殺菌効果大きいことが認

表1. 臭気試験における培養温度と日数

代表株No.	菌名	培養温度	添加後の日数										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
630-2	<i>C. guilliermondii</i>	25°C	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
		25°C	○	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×
630-3	<i>W. anomalus</i>	4°C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×
		25°C	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
630-7	<i>C. etchellsii</i>	25°C	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
コントロール		25°C	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

○ : 臭気あり × : 臭気なし

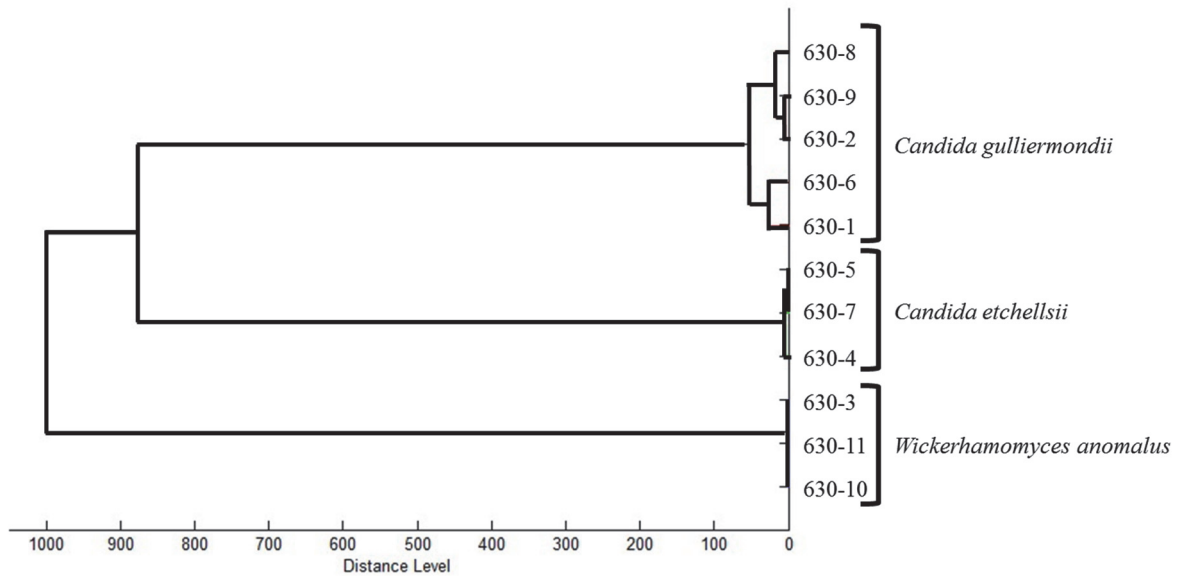


図1. 苦情品から分離した酵母のMALDI-TOF MSによる同定

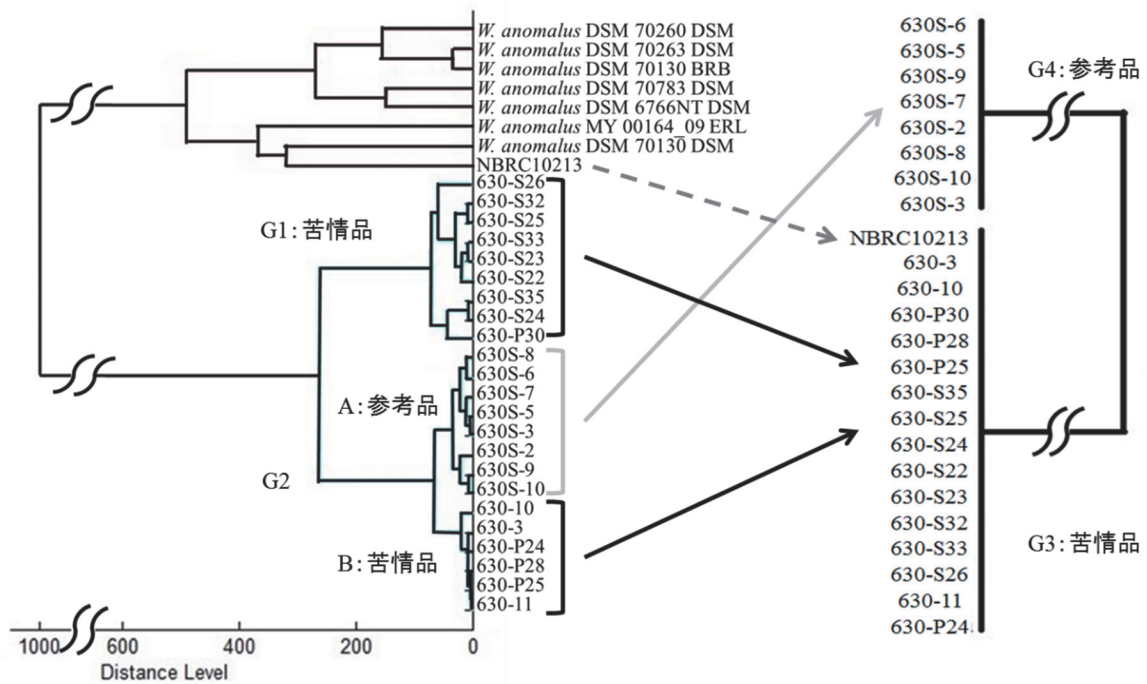


図2. MALDI TOF-MSによる苦情品及び参考品由来の*W. anomalus*の系統樹 (左) と ITS1/2領域のNJ法による系統樹 (右)

められている<sup>11)</sup>。その他、脱酸素剤等による包装時の酸素濃度をコントロールする方法がある。しかし、酸素濃度の低下あるいは炭酸ガス濃度の増加に伴って*W. anomalous*の増殖は抑制されるが、完全に生育を抑制できないことが報告されている<sup>12)</sup>。

したがって、*W. anomalous*による汚染が認められている工場の製造ラインにおいては、他の細菌やカビを抑制しつつ*W. anomalous*を食品製造環境から完全に抑えることが困難である。製造時に二次汚染させないようにする必要があり、そのためには焼成後のコンタミネーションの防止や、包装を無菌状態に保つこと、そして従業員の衛生管理教育を徹底的に行うことが重要であると考えられた。

### ま と め

2017年に都内で異臭による食品苦情の事例が発生した。そこで苦情原因の究明と汚染経路の推定を目的として、多数の菌株を迅速に同定できるMALDI-TOF MSを利用して、苦情品の解析を行った。

その結果、MALDI-TOF MSで苦情品から3種類の酵母が検出され、異臭の原因菌はシンナー臭産生酵母である*W. anomalous*であった。異臭が強くなった要因は多量の*W. anomalous*が付着した食パンを低温下で保管したことにより*W. anomalous*の発育が鈍化し、酢酸エチルが発生し続けたことによるものと推測された。本菌は同時期に製造された同一工場の別ロット参考品からも検出され、異臭を確認したことから工場内の汚染が疑われた。

苦情品残品由来及び参考品由来*W. anomalous*分離株について解析を行った結果、苦情品を汚染していた*W. anomalous*は参考品の株と同一由来とは言えず、工場は少なくとも1種類の*W. anomalous*に汚染されていると推測されたが、苦情品の汚染源特定には至らなかった。

### 文 献

- 1) Naito, S., Bokin Bobai (J. Antibact. Antifung. Agents), **49**, J-1-J-8, 2008.
- 2) 田口信夫, 下井俊子, 観 公子, 他: 東京健安研七年年報, **63**, 193-199, 2012.
- 3) 高橋由美, 千葉隆司, 猪又明子, 他: 東京健安研七年年報, **59**, 161-165, 2008.
- 4) 千葉隆司, 高橋由美, 木下輝昭, 他: 東京健安研七年年報, **65**, 107-112, 2014.
- 5) White, T. J., Bruns, T., Lee, S. *et al.*: PCR protocols, a guide to methods and applications., 315-322, 1990.
- 6) Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J.: *J. Clin. Microb*, **35**, 1216-1223, 1997.
- 7) 後藤慶一: モダンメディア, **55**, 237-242, 2009.
- 8) 上原さとみ, 高橋由美, 小林真紀子, 他: 東京健安研七年年報, **68**, 101-108, 2017.
- 9) 内藤茂三: 防菌防黴, **46**, 265-274, 2018.
- 10) 内藤茂三: 防菌防黴, **28**, 473-484, 2000.

11) 内藤茂三: 防菌防黴, **27**, 821-832, 1999.

12) 石谷孝佑: 日食工誌, **28**, 221-234, 1981.

**Analysis of Off-flavor-producing Yeast Isolated from Food Samples with Complaint Using MALDI-TOF MS**

Shoko YOSHIWARA<sup>a</sup>, Satomi UEHARA<sup>a</sup>, Yumi TAKAHASHI<sup>a</sup>, Takashi CHIBA<sup>a</sup>  
Jun SUZUKI<sup>a</sup>, and Kenji SADAMASU<sup>a</sup>

The yeast-producing off-flavor strains were isolated from sliced bread with complaint. The yeasts were identified by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and DNA sequencing to investigate the possible cause and estimate the route of contamination. Based on the results of the analyses, three species of yeasts were identified as *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida guilliermondii*, and *Candida etchellsii* by MALDI-TOF MS. Thereafter, three yeast species were added to each slice of bread for the odor test and incubated at 25°C. The results showed that only *W. anomalus* developed a strong off-flavor after a day. *W. anomalus* was also isolated from different batch of bread produced in the same factory. In order to identify the source of the contamination, phylogenetic trees based on ribosomal DNA internal transcribed spacer regions were created for the *W. anomalus* isolates from the bread batch associated with complaint and other batch of bread that was not associated with complaint isolates of *W. anomalus* was not found to be the same strain. It was suggested the factory was contaminated by at least one type of *W. anomalus*.

**Keywords:** food complaints, plain bread, thinner odor, MALDI-TOF MS, DNA sequence analysis, molecular phylogenetic tree analysis, *Wickerhamomyces anomalus*

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

