

イランにおけるピスタチオナッツ生産の現状

高橋治男*¹, 岡野清志*², 一戸正勝*³

*¹千葉県衛生研究所

(260-8715 千葉市中央区仁戸名町666-2)

*² (財) マイコトキシン検査協会

(230-0054 横浜市鶴見区大黒ふ頭15)

*³東京家政大学

(173-8602 板橋区加賀1-18-1)

要 約

イランのヤズド、ケルマンにて、ピスタチオナッツの収穫から製造工程における *Aspergillus flavus* と *A. parasiticus* のアフラトキシン産生菌の分布について調査を行った。その結果、畑土壌からは検出されなかったが、畑で収集された開裂果実、虫害果実、あるいは製造工程の洗浄水、製品貯蔵庫内空気の内いずれからも *A. flavus* が検出された。このことは、アフラトキシン汚染を防ぐには、栽培から最終製品の貯蔵に至るまでの全体を通じた微生物管理、衛生管理が必要であることを示した。

水による洗浄・選別工程で除外された1区分 (floating nuts, 閉殻粒を除く) と目視により選別除外された5区分、計6区分について、菌学的検査とアフラトキシンの分析を行った。Floating nuts 区分と目視により除外された dark stained 区分では全粒から *A. flavus* 検出されたが、閉殻 (closed mouth) 群からはほとんど検出されなかった。アフラトキシンは dark stained 区分のみから検出された。このことは、目視による選別が有効である可能性を示したが完全な減毒法ではないことから、更に今後の検討が必要である。

キーワード: ピスタチオナッツ, アフラトキシン, *Aspergillus flavus*

(Received, May 25, 2001)

諸 言

ピスタチオナッツ、落花生などのナッツ類は *Aspergillus flavus* などが産生するアフラトキシン (以下AF) に汚染を受けやすいことが知られている。中でも近年、イラン産ピスタチオナッツによる汚染がしばしば報告されている¹⁾。著者らは2000年9月に、イランのピスタチオナッツの主要生産地域であるヤズド (Yazd) とケルマン (Kerman) をその収穫期に訪れ、農園、生産工場を視察するとともに、いくつかの調査を行った。これまでのピスタチオナッツのAF汚染に関する報告は米国におけるものが多く、イランにおけるものは数少ないが、これまでの両国からの報告と今回の調査結果からイランにおけるピスタチオナッツのAF汚染とその制御の可能性について検討を加えた。

まずはじめに、イランピスタチオナッツのAFの制御には、

1) *A. flavus* (*A. parasiticus*を含む) がいつどこでピスタチオナッツに着生(感染)し, AFを産生, 蓄積するか. すなわち, AF汚染のメカニズムの解明.

2) ピスタチオナッツは, 現在, フローテーション(水洗・選別)や目視によって選別されているが, これらによりAFを減毒できるか.

を知ることが重要である.

まず1)の問題ではイランにおけるピスタチオナッツの栽培から最終製品までの過程における*A. flavus*の分布など, 主として菌学的な面から検討することが必要である.

イランピスタチオナッツは概ね下記の工程で製造される.

栽培→収穫→剥皮(hulling)→フローテーション(floatation, 閉殻粒などの選別)→1次乾燥→2次乾燥→目視選別→サイズ選別→製品

これまでの報告によると, イラン²⁻⁵⁾, 米国(California)⁶⁻⁸⁾のいずれの国でも収穫以前のピスタチオナッツに*A. flavus*とAF汚染が存在するとしている. その汚染の主要因として, 1) early split 2) 虫害, などが主としてあげられている. ピスタチオナッツは通常, 収穫期になると樹上で果皮(hull)内部にある殻(shell)が開裂するが, その時, 果皮と殻が完全に分離していないと, 果皮もそれに沿って同時に開裂する. この様な粒がearly splitと呼ばれる. 果皮はバリアの役割も果たしているため, 可食部である実(kernel)が*A. flavus*などのカビや害虫に暴露し, このためearly splitがAF汚染との相関性が高いとされている. 米国ではこのearly splitが1~4%存在するとの報告^{7,9)}があるが, 農園, 樹木などによる変動が激しい⁷⁾. この他, 殻が開裂した後, 殻の開裂部に沿わない箇所でも果皮が開裂する場合(cracked hull)もあるとされる⁸⁾.

2)の問題ではフローテーションや目視選別による除去(粒)区分における菌学およびAF分析上の評価が問題となる. ピスタチオナッツの*A. flavus*などによるAF汚染は, 落花生¹⁰⁾と同様に大量の非汚染粒の中に極めて少数の汚染粒が局在する不均一汚染とされている⁷⁾. したがって, フローテーションや目視による選別除去粒にAF汚染粒が含まれれば効果的に減毒できる可能性を有している.

調査結果

圃場調査結果 著者らはイラン国内でヤズドの農園を2カ所を視察した. いずれも砂漠の中にあり, 地下水を汲み上げ農園まで導水し灌漑していた. 畑土壌の表面には塩の析出が見られた. 収穫は樹の下にシートを敷き土壌と果実の接触を防いでいた. Early splitの他, 果皮のみの開裂粒(cracked hull)が多数認められ, その開裂部に沿って甘い粘性のある樹液がしみ出していた. これが土壌を付着したり, あるいは昆虫を誘引し, *A. flavus*の着生を引き起こす可能性があると考えられた. 実際, 農園の畑から収集した10粒ほどのうち3粒に, 1日後, 開裂部に沿って黄緑色の*A. flavus*の集落が認められたので, それをPDA斜面に分離した. また, *A. flavus*の分生子が充満する虫害果実(3粒)も収集され, これも同様に分離した(Table 1). この2農園の畑土壌から*A. flavus*の分離¹¹⁾を試みたところ, *A. niger*は数多く検出されたものの*A. flavus*は全く認められなかった.

処理加工場調査結果 収穫された果実は果皮が除去(hulling)され, さらにフローテーションにより水洗・選別される. フローテーションは選別除去の最初のステップで, 水に浮いた粒が除去される(floating nuts). この区分では, 閉殻(closed mouth)とやや開裂気味で果皮の断片を付着した小粒が多く見受けられた. この水を使った工程では, *A. flavus*の汚染果実からその分生子が洗

浄水中に拡散する危険性が指摘されてきた^{3,4)}。著者らは、工場の洗浄流水や静水を滅菌ピペット用い1 ml採り、YM medium agar strip (グンゼ) に塗布した後、培養を行った。その結果、いずれの試料からも *A. flavus* が検出され、特に静水試料からは多数の株が分離された (Table 1)。従って、この洗浄水による *A. flavus* の2次汚染を防ぐため、循環水ではなく流水 (fresh water) を使うことが奨励されている。しかし、Kerman州では地下水位の低下から、十分な水の確保ができにくくなってきているのが現状である。最終製品での *A. flavus* による着生率は高く、約60%前後に達するが^{3,4,12)}、それはこの工程に由来するものと考えられる。水洗・選別を終えると直ちに乾燥される。1次乾燥は火力乾燥により、収穫時の水分量約35%を12~13%程度までに低下させる。2次乾燥は天日乾燥によることが多い。これにより5%まで低下させ最終製品となる。従来は、コンクリート上で乾燥されるが、現在では土壌との接触をできるだけ少なくするためパンチングボード状の金属製で、しかも日照不足の場合は強制乾燥させることができるバーナー付きの乾燥台が開発されていた。この様にして乾燥された製品は選別工程を経て船積みまで貯蔵される。この選別場、製品貯蔵庫内の空気についてエア・サンプララー (RCS, Biotest) で4分間 (160 L) 吸引を行い、前述のYM mediumを用いカビの検索を行った。その結果、いずれの環境からも *A. flavus* が分離された。これまで得られた分離株を5% YES培地に接種し培養を行った後TLCで分析を行いAF産生性について検討したところ、落下虫害果実から得られた3株を除くとすべて非産生であった (Table 1)。

Table 1 Isolation of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin by the isolates in orchards and a processing facility in Iranian pistachio nuts

Sampling points and pistachio nuts sample	No. of isolates	No. of Aflatoxin positive strain /Teted strains
Field soil (2)*	0	
Dropped fruits		
split fruits (3)*	4	0/4
insect damaged fruits (3)*	3	3/3 **
Washing water		
running water	9	0/5
still (sink tank) water	43	0/3
Air		
hand picking area	12	0/2
warehouse	6	0/1
Subtotal		0/15
Pistachio nuts		
Dark stained	10	2/10 **
Light stained	10	4/10 **
Subtotal		6/20 (30%)

* No. of soil sample or dropped fruits tested. ** All of the isolates were positive only for production of B aflatoxin.

選別試験調査結果 フローテーション (floating nuts, 閉殻粒を除く) や目視による選別除去品 (区分, Table 2) について, 殻 (shell) と実 (kernel) に分け, 着生カビの検査¹³⁾ およびAF分析¹⁴⁾ を行った. 目視は概ね次の基準で行われる. ① 殻の汚れ, シミ (stained) ② 閉殻 ③ サイズ ④ 異形 (deformed) ⑤ その他 (空殻, 虫害粒, など) である. 着生カビの結果はイランにおけるこれまでの結果とほぼ一致した. すなわち一般に *A. niger* は閉殻区分の実を除くとほとんどの粒から検出され, 次いで *A. flavus* が高く, *Penicillium* 属の検出率は一般に低かった. また, *A. niger* は殻から

Table 2 Mycological evaluation in the samples rejected by floating process and sorted by hand picking on basis of appearance in Iranian pistachio nuts.

Sample	Percentage of fungus-infected kernels				
	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
Floating nuts *					
Shell	44	96	—	20	4
Kernel	100	96	—	8	4
Dark stained					
Shell	36	96	4	36	—
Kernel	100	100	—	16	—
Light stained					
Shell	40	100	—	20	4
Kernel	76	100	—	4	4
Slightly opened					
Shell	28	96	—	20	—
Kernel	52	76	12	8	—
Closed mouth					
Shell	12	76	—	8	—
Kernel	—	4	—	—	—
Deformed nuts					
Shell	28	88	—	20	4
Kernel	48	100	4	8	8
Damaged kernel (no shell)					
	68	100	—	16	4

* Examined only slightly opened nuts.

も実からも極めて高い頻度で検出され, 殻と実の両方に親和性を示した. これに対し, *A. flavus* は殻よりも実に対して親和性を示し, 特に floating nuts と dark stained の両区分ではほぼ全粒から検出された. これに対し, 閉殻粒の実からは *A. flavus* がほとんど検出されなかった. これらの結果は, ピスタチオナッツ果実の開裂による *A. flavus* の着生や水洗時における2次的な着生とを関連づけた.

一方, AF分析では dark stained 区分からのみAFが認められ, しかも, B₁(373 ppb), B₂(33 ppb), G₁(1427 ppb), G₂(108 ppb)の4種が検出された. ピスタチオナッツを含め食品や食品原料からのG群AFの検出例は比較的少ない. また, 今回のピスタチオナッツ果実や製造工程における菌学的



① Pistachio fruits with cracked hull in a tree at harvest in an orchard in Yazd, Iran.



② Dropped fruits of pistachio on the field. A bundle of yellow conidial heads were found on the damaged portion of the fruits (upper) and in a cavity inside the fruit (bottom).

Some *A. flavus* isolates were obtained from the yellow bundle.



③ After harvest, fresh pistachio fruits were immediately carried to processing facility by a new model truck with a cold room.



④ Pistachio nuts after dehulling were forced-dried by heating on a conveyor moved in a wormlike manner (Primary step for drying).



⑤ After primary drying, the nuts were sun-dried on a long screen racks which were equipped with shakers. The drying machine also used forced-drier by heating when the weather was not good (Final step for drying).



⑥ After drying, the nuts were sorted on belt conveyer by hand-picking on basis of appearance by Iranian women.

調査でも *A. parasiticus* や G 群 AF 産生株は見出されていない。そこで、dark stained と light stained の両群から得られた分離株を同定するとともに、前述した方法で AF 産生性を調べた。その結果、分離株は *A. flavus* のみで *A. parasiticus* は認められず、また、G 群 AF を産生する株も認められなかった (Table 1)。

考 察

A. flavus などの AF 汚染カビがどの時期にピスタチオ果実へ感染するかという問題について、*A. flavus* などのカビによる感染を収穫前から経時的に調べたイラン、米国の報告がある。これによると、イラン⁵⁾ では *A. flavus* が収穫60日前には認められないが、収穫直前には約8%に達している。米国でも同様な結果が得られ、収穫1ヶ月前は *A. flavus* の着生率が0.3%であったが収穫時には約12%上昇するとの報告⁶⁾ がある。開裂粒や虫害粒の増加がこの原因とされている。米国での early split 粒における *A. flavus* による着生率は、これまで0.7%との報告¹⁵⁾ がある。*A. flavus* のピスタチオナッツへの着生は、気象条件など種々の要因が関与していると見られ、経年変動、地域的な差異が激しい。例えば、12%着生率が翌年には1.3%に減少したり、同じ年でも農園により1~33%まで変動が認められている⁶⁾。また、イランピスタチオナッツの汚染には、8月~11月にかけての雨量や風のない穏やかな日の日数と相関性があるとの報告がある¹⁶⁾。イランピスタチオナッツの AF 汚染が最も激しかった1997~1998年産品は、霜害や収穫時期の遅れが原因とされている¹⁾。収穫が遅くなると霜害によるだけでなく、果皮の劣化による損傷粒が増加するため *A. flavus* や害虫の侵入を受けやすくなり、AF 汚染が増加する可能性があるとされている⁷⁾。これらは、これまでの報告の様に果皮に損傷があれば *A. flavus* の着生率が高いことを示した。このことは *A. flavus* のピスタチオ果実への着生 (感染) は日和見的であり、このカビのピスタチオへの病原性は弱いものと考えられる。

一方、虫害と *A. flavus* の感染や AF 汚染との関連については、虫害粒における *A. flavus* の着生率は非虫害粒の3倍近く⁶⁾、AF 汚染率は約1.5倍⁷⁾ に達するとの報告がある。しかし、影響はわずかととの報告もある¹⁷⁾。この差異はこの害虫が単に媒介の役割を果たしているに過ぎないことを示しているためと考えられる。これまでの結果は、収穫時にはできるだけ短期間に収穫果実を処理・加工しなければならないことを示している。2000年からヤズドでは最終製品だけでなくの収穫物の搬送から保存までの低温保存設備が稼働した。この設備は収穫果実の *A. flavus* による感染防止に有効と考えられる。

著者らはピスタチオナッツ畑の土壌から *A. flavus* を分離できなかったが、落下開裂果実から *A. flavus* を分離した。このことは、それらの果実が *A. flavus* の汚染源になっている可能性を示している。ピスタチオナッツ畑における *A. flavus* の生態について調べた米国研究者の報告¹⁷⁾ によると、農園の畑で収集したピスタチオ果実の約7%から (表面殺菌後は0.3%)、同じく雄花の27%から *A. flavus* が分離され、それらが汚染源である可能性を示唆した。また、収穫されずに樹上に残る果実中で *A. flavus* が越冬する可能性もあると指摘している。これらのことは、ピスタチオナッツの AF 汚染防止には、年間を通して圃場の清掃などの衛生管理につとめる必要があることを示した。*A. flavus* は圃場だけでなく、洗浄・選別に用いられている水や選別場、製品貯蔵庫内空気からも分離された。これらの結果は、いずれの工程でもピスタチオナッツがあれば *A. flavus* が存在することを示した。*A. flavus* による AF 産生は、環境条件さえ整えば AF 産生が開始されることが知られていることから³⁾、2次汚染による乾燥、貯蔵、輸送での品質管理に十分な注意が必要である。

今回得られた *A. flavus* の分離株の AF 産生性は比較的 low かった (Table 1) が、これまでの報告では、分離株の 80~90% 近くが産生すると^{4, 11, 12)}され、今回の結果と多少差異が認められた。また、今回、B, G 両 AF が検出された選別品 (dark stained) からは、B, G 両 AF を産生する株が分離されなかった。これは原因菌がすでに死滅したか、菌分離の検査対象粒にその AF 汚染粒が入らなかったものと考えられる。*A. parasiticus* はほとんどの株が高い AFB および G の産生性を有することで知られ¹⁸⁾ている。イラン⁴⁾ や米国⁸⁾ のピスタチオナッツやアフリカ大陸では *A. parasiticus* が時おり分離されるのに対し、モンスーン地域の東南アジア地域では一般に極めて希である¹⁹⁾。これらのことから *A. parasiticus* は比較的乾燥地帯を好んで生息している可能性もある。

今回の目視選別により dark stained の区分から高濃度の AF が検出された。この汚れについては、果皮の損傷部からしみ出したタンニンが殻の表面に付着し変色したり、あるいはそれによって果皮の一部を接着し、*A. flavus* などのカビが着生するため生じる可能性がある¹⁵⁾とされている。一方、米国の報告でも color sorting や hand picking などにより選別除去した低品質の画分 (重量では 4.6%) に 90% の AF が集中し、この選別によりこのロットの AF の濃度は 1.2 ppb から 0.12 ppb まで低下したとされている¹⁵⁾。しかしながら、著者ら¹²⁾は以前、イランからの輸入品で汚れのない通常の形のピスタチオナッツ粒から AF を検出している。また、今回、floating nuts 区分は AF が検出されなかったが dark stained 区分と同様、全粒に *A. flavus* の着生が認められた。従って、この区分の AF 汚染の可能性は高いと言える。米国の報告¹⁵⁾によれば、このフローテーションで選別される小粒には比較的高い濃度の AF が含まれるとされているが、なぜこの nuts 区分に AF 濃度が高いのかは明らかにされていない。この区分の殻も実も比較的小さいことから、未熟粒や病害粒を多く含んでいる可能性が高い。一般に未熟粒は抵抗性が弱いとされることから、*A. flavus* などのカビによる感染を受けやすいものと考えられる。

以上の結果は、色彩、サイズなどの外観による目視選別はピスタチオナッツの AF を減毒する上で完全な方法ではないが、簡便な方法として有効である可能性を示唆している。今後、落花生の選別に効果的であった近赤外を²⁰⁾用いるなど、より有効な選別法を開発する必要があると言える。

この度のイラン国内における農園視察や試料収集などに多大な御協力を頂きました小林桂 (株) 森本浩一氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 岡野清志: マイコトキシン, **49**, 49-50 (1999)
- 2) Emami, A., Suzangar, M., Barnett, R.: Zeszyty Problemowe Postewo Nauk Rolniczych, **189**, 135-140 (1977)
- 3) Mojtahedi, H., Danesh, D., Haghghi, B., Barnett, R.: Mycopathologia, **68**, 1800-1804 (1978)
- 4) Mojtahedi, H., Rabie, C. J., Lubben, A., Steyn, M., Danesh, D.: Mycopathologia, **67**, 123-127 (1979)
- 5) Rice, R. E.: J. Econ. Entomol., **71**, 822-824 (1978)
- 6) Thomson, S. V., Mehdy, M. C.: Phytopathology, **68**, 1112-1114 (1978)
- 7) Sommer, N. F., Buchanan, J. R., Forlage, R. J.: Phytopathology, **76**, 692-694 (1986)
- 8) Doster, M. A., Michailides, T. J.: Phytopathology, **84**, 583-590 (1994)
- 9) Doster, M. A., Michailides, T. J., Goldhamer, D. A.: "California Pistachio Industry", Annual Report, Crop

- Year 1992-1993, pp. 82-84 (1993)
- 10) Cucullu, A. F., Lee, L. S., Mayne, R.Y., Goldblatt, L. A.: J. Am. Oil Chem. Soc., **43**, 89-92 (1966)
 - 11) Takahashi, H., Kamimura, H., Ichinoe, M.: Mycotoxins, **49**, 39-43 (1999)
 - 12) 道口直樹, 杉山美樹, 川田 誠, 藤原一也, 鈴木宏, 高橋治男: 第66回日本食品衛生学会講演要旨集, pp.87 (1993)
 - 13) 一戸正勝, 佐藤朋子, 岡野清志: Mycotoxins, **51**, 109-114 (2001)
 - 14) 厚生省通達環食128号: 食品衛生研究, **21**, 564-567 (1971)
 - 15) Schatzki, T. F., Pan, J. L.: J. Agric. Food Chem., **44**, 1076-1084 (1996)
 - 16) Danesh, D., Mojtahedi, H., Barnett, R., Cambell, A.: Phytopathology, **69**, 715-716 (1979)
 - 17) Doster, M. A., Themis, J.: "California Pistachio Industry", Annual Report, Crop Year 1991-1992, pp. 101-104 (1993)
 - 18) Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L., Smith, M., Ellis, J. J., Vandegraft, E., Shannon, G.: Pro. 1st U.S.-Japan Conference, pp. 202-210 (1970)
 - 19) Pitt, J. I., Hocking, A. D.: "Fungi and Food Spoilage", 2nd ed. (eds., Pitt, J. I., Hocking, A. D.) pp. 397 (1997) Blackie Academic & Professional.
 - 20) Hirano, S., Okawara, N., Narazaki, S.: Proc. Int. Symp. Mycotoxici. '99, pp. 74-80 (1999)

Present situation for production of pistachio nuts in Iran

Haruo TAKAHASHI : Public Health Laboratory of Chiba Prefecture (666-2 Nitona-cho Chuo-ku, Chiba 260-8715, Japan)

Susumu OKANO : Mycotoxin Research Association (15 Daikoku-futou Tsurumi-ku, Yokohama 230-0054, Japan)

Masakatsu ICHINOE : Tokyo Kasei University (1-18-1 Kaga Itabashi-ku, Tokyo 173-8602, Japan)

Distribution of *A. flavus* and *A. parasiticus* were examined in the steps from harvest to air of warehouse for final products after processing in Yazd and Kerman, Iran in 2000. *A. flavus* was isolated from the some of split fruits and insect-damaged fruits dropped on the growing field of the nuts, and running water and still water for washing and sorting of the nuts as well as air in the warehouse although none from the field soil. These results indicated that fungus control throughout the steps from growing to storage of the nuts was important to prevent aflatoxin contamination in Iranian pistachio nuts. One sample separated by floating process and 5 samples sorted by hand picking on basis of appearance were examined for mycological study and also for aflatoxin analysis. *A. flavus* were detected in both samples of all the kernels tested in the floating nuts separated by the floating and dark stained nuts sorted by hand picking. B and G aflatoxins were detected only in the sample of stained nuts in this study. These results suggested that the hand picking by appearance is useful for sorting to detoxify aflatoxin contamination lots of the nuts although further study is needed.

Key words : pistachio nuts, aflatoxins, *Aspergillus flavus*