

*Byssochlamys* の耐熱性および耐UV性

池上 義昭, 遠田 昌人, 松井 智江, 中川 薫

Heat and UV Resistance of *Byssochlamys*

Yoshiaki Ikegami, Atsuhito Enda, Tomoe Matsui and Kaoru Nakagawa

Methods for ascospores production and recovery counts of *Byssochlamys* spp. (BYS-1 and BYS-2) were found. Subsequently, heat and UV resistance of ascospores of *Byssochlamys* were investigated.

The ascospores of *Byssochlamys* were produced in potato dextrose agar (PDA) after an incubation of 20 days at 30°C. The heat activation 10 minutes at 70~77.5°C was required for maximal germination.

The values of Z (the slope index of a thermal death time curve) and D (decimal reduction time) at 80°C were 5.3°C and 1.6 minutes for the ascospores of strain BYS-1, and 5.1°C and 1.0 minutes for those of strain BYS-2, respectively. A slight reduction in the viable counts occurred during the first heat treatment, and following this period a more rapid death rate was obtained. Lt values (the heating time in minutes measured until theoretical initial ascospores concentration exhibited a logarithmic order of death) were 6- to 7-fold higher than D values.

The D values irradiated with UV for *Byssochlamys* spp. ranged from 150 to 185  $\mu\text{W}\cdot\text{min}/\text{cm}^2$ .

**Key words:** mould, *Byssochlamys*, ascospore, heat resistance, UV resistance, heat activation, D value, Z value, Lt value.

カビは一般的に好気性であり, 耐熱性もそれほど強くないと言われている. 従って, 缶詰のように脱気, 密封後, 加熱殺菌され, また酸素の透過もないような容器詰食品では比較的酸素が少なく, カビは生育し難いと考えられる. しかし, 最近, PETボトル詰の酸性飲料が多く販売されるようになり, これらの容器は僅かではあるが酸素透過性があり, 透過性のない缶詰と比較してカビは生育し易い.

カビの中には子嚢胞子や菌核, 厚膜胞子を形成する菌種があり, これらは比較的高い耐熱性を持っているので, 殺菌条件が80°C前後の加熱で製造される容器詰の酸性食品や飲料中では生き残る可能性が高い.

耐熱性カビと言われている *Byssochlamys* 属は, 僅かの酸素の存在で生育し<sup>1) 2)</sup>, その上この子嚢胞子は耐熱性でもある<sup>1) 3-5)</sup>. 従って, 容器詰酸性食品や飲料の変敗原因菌として最も重要なカビとなる. このような食品では容器内で *Byssochlamys* の生育を抑制する必要がある.

そこで, *Byssochlamys* の子嚢胞子形成条件および菌数測定における培養条件などを検討し, 次いで子嚢胞子の耐熱性および紫外線に対する抵抗性などについて試験した.

## 実験方法

### 1. 使用菌株

乳酸菌飲料缶詰より分離したカビ (BYS-1) およびミカンシラップ漬袋詰より分離したカビ (BYS-2) の2株を使用した。

### 2. カビの同定

BYS-1 およびBYS-2 をポテトデキストロース寒天培地 (日水製薬, PDA) を使用して, 30°Cで培養後, 形成したコロニーの形態, 色調およびスライドカルチャー法での分生子および子嚢胞子形成能や形態を観察した。

### 3. 分生子の懸濁液調製

BYS-1 およびBYS-2 をPDAの平板上で30°C, 7日間培養し, そのコロニーをかき集め, 0.005%エーロゾルOT添加滅菌水中に懸濁した。懸濁液は超音波洗浄器で処理後, 東洋濾紙No.5Aで無菌濾過し, 4°Cで保存した。

### 4. 分生子の耐熱性

この分生子懸濁液をTDT管に1mlずつ分注し, 密封後, 55°Cで加熱し, 各時間ごとに残存菌数をPDAによる混釈培養法で測定した。培養条件は30°C 7日間行った。

### 5. 子嚢胞子形成条件

BYS-1 およびBYS-2 をPDAの平板上で30°C, 10日から40日間まで10日間隔で培養し, そのコロニーを分生子のときと同じように懸濁し調製した。この懸濁液を生理食塩水で希釈し, その希釈液および70°C, 10分間加熱の希釈液をPDAによる混釈培養法で菌数を測定した。培養条件は30°C, 20日間行った。

### 6. 子嚢胞子の懸濁液調製

BYS-1 およびBYS-2 をPDAの平板上で30°C, 30日間培養し, そのコロニーを上記と同じように懸濁調製した。

### 7. 子嚢胞子の加熱活性

この子嚢胞子懸濁液を生理食塩水で希釈し, TDT管 (外径7mm, 長さ120mm) に1mlずつ分注し, ミクロバーナーで熔封した。これを70°C, 75°Cおよび77.5°Cに保持した恒温水槽中で, それぞれ5分, 10分および15分加熱し, 残存菌数をPDAを使用して混釈培養法で測定した。培養条件は30°C 20日間行った。

### 8. 菌数測定の方法

分生子および加熱活性した子嚢胞子の懸濁液を生理食塩水で希釈する場合, 希釈倍率を小さくし, PDAで混釈培養法および塗抹培養法で菌数測定した。塗抹培養法は平板上に希釈液を0.05ml滴下し, コンラージ棒で全面に広げ, 表面を乾燥後30°Cで培養した。

### 9. 子嚢胞子の耐熱性

子嚢胞子懸濁液を生理食塩水で希釈し, TDT管に1mlずつ分注し, ミクロバーナーで熔封した。これを77.5°C, 80°Cおよび82.5°Cで加熱し, 各時間ごとに残存菌数をPDAを使用して混釈培養法で測定し, 生残曲線よりD値およびZ値を算出した。培養条件は30°C, 20日間行った。

### 10. 子嚢胞子の耐UV性

子嚢胞子懸濁液を生理食塩水で希釈し, 約10mlをガラスシャーレに入れ, 殺菌ランプ (GL15) を使用して100 $\mu$ W $\cdot$ min/cm<sup>2</sup>の線量で照射し, 各時間ごとに残存菌数を無加熱および加熱 (BYS-1は77.5°C, 10分間, BYS-2は70°C, 10分) したのについてPDAを使用して混釈培養法で測定し, D値を算出した。培養条件は30°C, 20日間行った。なお照射線量はTOPCONの紫外線強度計 (UVR-254形) を使用して測定した。

## 結果と考察

### 1. 菌の同定

PDA上で30℃、7日間培養したコロニーは2株ともほとんど同じで、白色の子嚢果を乗せた基底菌糸からなっていた。顕微鏡での観察では、分生子は円筒形であり、2～3本のフィアライドを群生していた。30日培養では子嚢が見られ、子嚢胞子は楕円形に近く、*Byssochlamys* と思われた。BYS-1の30日培養では裏面が黄色であるが、BYS-2は黄褐色であった。従って、2株とも *Byssochlamys* と考えられるが菌種までは確認出来なかった。(Fig.1.2.3.4)



Fig.1. Conidia and phialide of *Byssochlamys* (BYS-2). (×500)

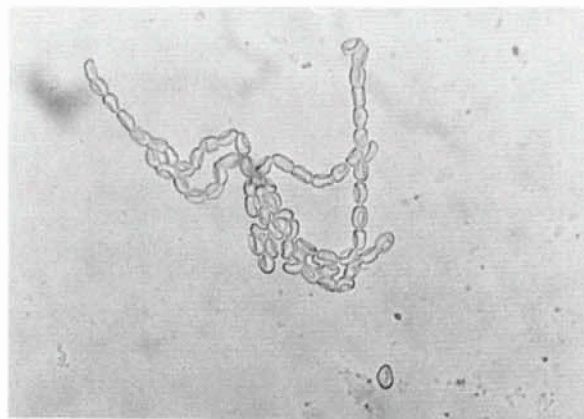


Fig.2. Conidia of *Byssochlamys* (BYS-2). (×500)

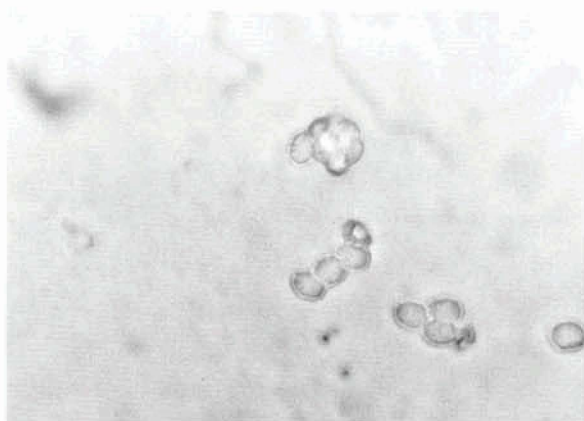


Fig.3. Ascospores and ascus of *Byssochlamys* (BYS-2). (×500)

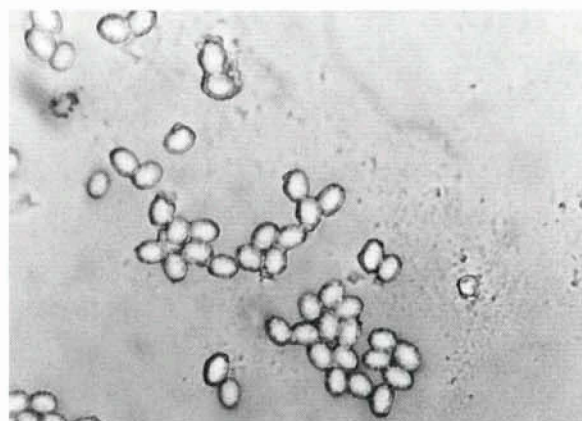


Fig.4. Ascospores of *Byssochlamys* (BYS-2). (×500)

### 2. 菌数測定の場合

BYS-2の分生子について菌数測定する場合、混釈培養法と塗抹培養法の比較および平板上に形成したコロニー数と予想される菌数の関係について検討した。その結果、Table 1に示すように塗抹培養法より混釈培養法の方が菌数が多くコロニーを形成し、ややよい結果を示した。*Byssochlamys* は酸素がある程度少なくとも発育するので、寒天内部でも十分に生育しこのような結果になったと考えられる。

またカビの平板上に形成するコロニーは大きく成長するので、平板上にコロニーが多くなると菌数が少なくなる傾向がある。従って、コロニー数は少ない方がよいが、あまり少ないと正確性に欠け、20個から30個が適当だと考えられる。希釈倍率を変えて測定した結果、混釈培養法の場

**Table 1.** Recovery count of conidia of *Byssochlamys*(BYS-2) on various dilution

Dilution	Pour plates						Spread plates					
	Colony counts				A *1	B *2	Colony counts				A	B
×1.0	63	75	79	89	76.5	136.8	51	55	59	59	55.0	123.0
×1.2	63	72	74	74	70.8	114.0	54	63	65	73	63.3	102.5
×1.5	48	52	64	64	57.0	91.2	54	55	66	71	61.5	82.0
×3.0	26	30	32	39	31.8	45.6	16	21	21	31	22.3	41.0
×4.5	21	25	27	31	26.0	30.4	20	21	24	27	23.0	27.3
×6.0	21	22	23	25	22.8	22.8	18	19	20	25	20.5	20.5

\* 1 ; Mean count of 4 plates \* 2 ; Estimated colony counts (  $B = 2A - 20$  )

**Table 2.** Recovery count of ascospores of *Byssochlamys*(BYS-2) on various dilution.

Dilution	Colony counts				A *1	B *2
×1.0	114	114	127	138	118.0	174.0
×1.2	96	106	115	115	108.5	145.0
×1.5	71	83	81	80	78.8	116.0
×2.0	64	64	69	73	65.0	87.0
×3.0	38	45	42	53	44.5	58.0
×6.0	18	17	22	19	19.0	29.0
×12.0	11	11	16	17	14.5	14.5

\* 1 ; Mean count of 4 plates

\* 2 ; Estimated colony counts (  $B = 1.5A$  )

合、形成したコロニー数をAとし、予想される菌数（平板の20個程度形成したコロニーを基本に希釈倍率から算出した）をBとすると、 $B = 2A - 20$ の式が成り立つ。

子嚢胞子の場合も **Table 2** に示すように分生子と同じで、平板上に形成するコロニーは少ない方がよく、予想される菌数は  $B = 1.5A$  であった。

### 3. 分生子の耐熱性

生理食塩水に懸濁させた分生子の55℃における耐熱性は **Fig.5** に示すように加熱によって対数的に減少し、BYS-1とBYS-2のD値は1.5分で、同じ値を示した。

### 4. 子嚢胞子の形成条件

子嚢胞子の形成条件は培地の種類、培養温度および培養時間などで大きく異なると考えられるが、培養時間だけで検討した。PDAの平板上での30℃培養における日数と子嚢胞子形成能を **Table 3** に示した。10日培養ではどちらもまだ子嚢胞子は形成せず、20日間以上の培養が必要であった。

### 5. 子嚢胞子の加熱活性

子嚢胞子が発芽する場合、加熱により活性化されることが報告されている<sup>3) 4) 5)</sup>。そこで活性化の条件として、加熱温度および時間でどのように変わるかを試験した結果、**Table 4** に示すようにBYS-2は70℃で10分加熱すれば、ほぼ100%発芽すると考えられる。BYS-1は70℃で10分間の加熱では不十分で、77.5℃で10分必要であった。

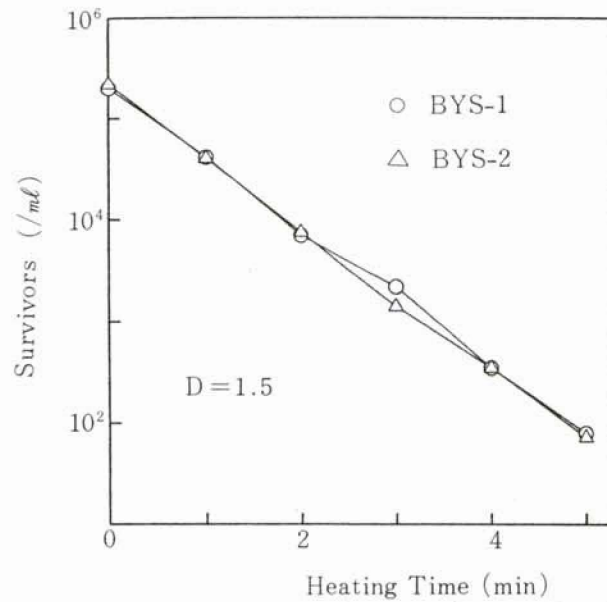


Fig.5. Heat-survival curves for conidia of *Byssoschlamys* (BYS-1,2).

Table 3. Effect of incubation period on ascospores production of *Byssoschlamys*(BYS-1, 2)

Incubation period (days)	BYS-1		BYS-2	
	No heat	Heat* <sup>1</sup>	No heat	Heat* <sup>2</sup>
10	$1.9 \times 10^6$	$4.3 \times 10^4$	$4.2 \times 10^5$	$8.8 \times 10^5$
20	$3.6 \times 10^4$	$2.0 \times 10^6$	$1.8 \times 10^4$	$1.8 \times 10^6$
30	$1.2 \times 10^6$	$1.9 \times 10^6$	$7.9 \times 10^5$	$2.2 \times 10^6$
40	$1.3 \times 10^6$		$1.4 \times 10^6$	

\* 1; 77.5°C, 10 minutes \* 2; 70°C, 10 minutes

Table 4. Heat activation of ascospores of *Byssoschlamys*(BYS-1, 2).

Temp. (°C)	Time(min)	Surviving ascospores	
		BYS-1	BYS-2
70	5	$2.3 \times 10^5$	$8.0 \times 10^5$
	10	$3.0 \times 10^5$	$1.8 \times 10^6$
	15	$2.4 \times 10^5$	$2.0 \times 10^6$
75	5	$6.4 \times 10^5$	$1.2 \times 10^6$
	10	$8.7 \times 10^5$	$1.7 \times 10^6$
	15	$1.4 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$
77.5	5	$1.9 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$
	10	$2.0 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$
	15	$1.8 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$

## 6. 子嚢胞子の耐熱性

子嚢胞子の加熱による生残曲線を, BYS-1をFig.6にBYS-2をFig.7に示した。*Byssoschlamys*の子嚢胞子は加熱初期の段階では胞子の減少がほとんど認められず, ある時間後より対数的に減少

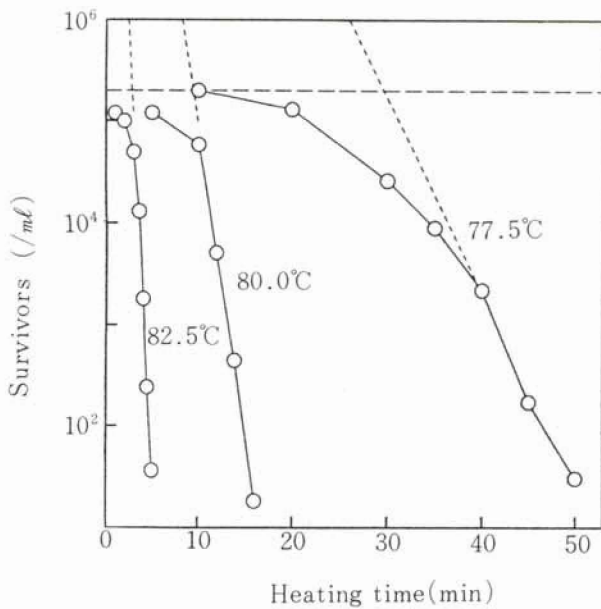


Fig. 6. Heat-survival curves for ascospores of *Byssochlamys* (BYS-1).

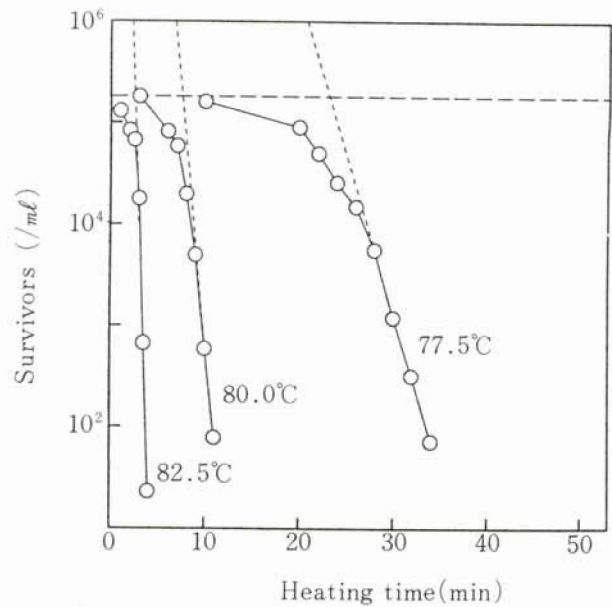


Fig. 7. Heat-survival curves for ascospores of *Byssochlamys* (BYS-2).

Table 5. Heat resistance of ascospores of *Byssochlamys*(BYS-1, 2).

Temp, (°C)	BYS-1		BYS-2	
	D(min)	Lt(min) *D(min)	D(min)	Lt(min)
77.5	5.2	30.0	3.2	22.5
80.0	1.6	9.5	1.0	7.5
82.5	0.55	3.0	0.36	2.6
Z	5.3°C	5.3°C	5.1°C	5.0°C

※;Lag time

する傾向がある<sup>4)5)</sup>。BYS-1とBYS-2の子嚢胞子もその傾向が非常に大きかった。従って、初期胞子数(最高の胞子数を示した値)と対数的に減少する曲線の交点を遅滞時間(Ltと呼ぶ)とし、これらの図からD値およびLt値を算出するとTable 5に示すようになり、耐熱性はそれほど大きい差はなかったが、BYS-2でやや強い傾向を示した。またLt値は各温度においてもD値の約6~7倍あった。このLt値が大きいのは子嚢胞子が発芽するとき、加熱などの処理が必要であるためと考えられる。各温度におけるD値より求めたZ値とLt値より求めたZ値にはそれほど大きい差がなく、BYS-1は5.3°Cで同じ値であった。BYS-2も5.1°Cおよび5.0°Cでほとんど差がなかった。

なお子嚢胞子の耐熱性はその胞子の成熟度に関係すると言われ<sup>7)</sup>、BYS-2の場合、30°Cで20日間の培養で子嚢胞子は形成するが、耐熱性は非常に弱く、75°CにおけるD値が4分程度であった。40日間の培養で形成した子嚢胞子は30日間培養したものと同一程度であった。

### 7. 子嚢胞子のUV性

子嚢胞子の紫外線照射による生残曲線をBYS-1をFig. 8にBYS-2をFig. 9に示した。BYS-1では照射後、無加熱で測定した場合のD値(胞子数を90%死滅させるに要する照射量)は75 $\mu$ W $\cdot$ min/cm<sup>2</sup>であ

った。加熱活性して測定した場合のD値は約2倍の $150\mu\text{W}\cdot\text{min}/\text{cm}^2$ であった。BYS-1では照射後、無加熱で測定した場合のD値は $95\mu\text{W}\cdot\text{min}/\text{cm}^2$ であったが、照射後、加熱活性して測定した場合のD値は約2倍の $185\mu\text{W}\cdot\text{min}/\text{cm}^2$ であった。なお加熱活性した胞子を照射して測定した場合も同じ結果であった。

一般的にカビは紫外線に対して抵抗力があると言われており、強い場合はD値が $4,000\mu\text{W}\cdot\text{min}/\text{cm}^2$ 以上のものもある。しかし、*Byssochlamys*の子嚢胞子はこれより非常に弱く、 $200\mu\text{W}\cdot\text{min}/\text{cm}^2$ 以下であった。

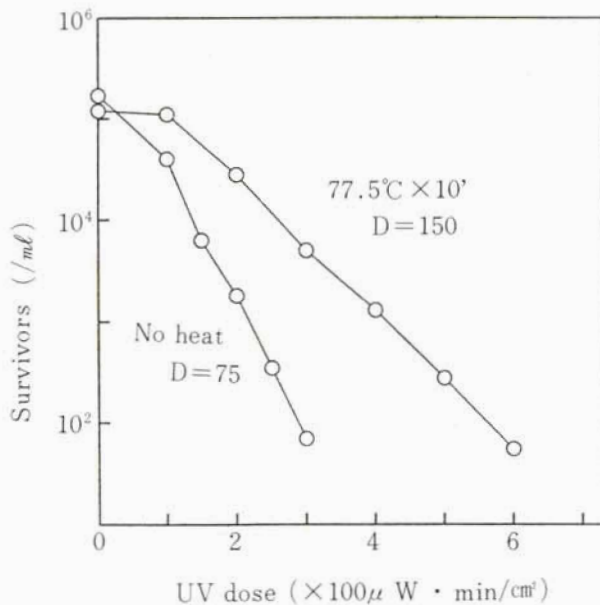


Fig.8. UV survival curves for ascospores of *Byssochlamys* (BYS-1).

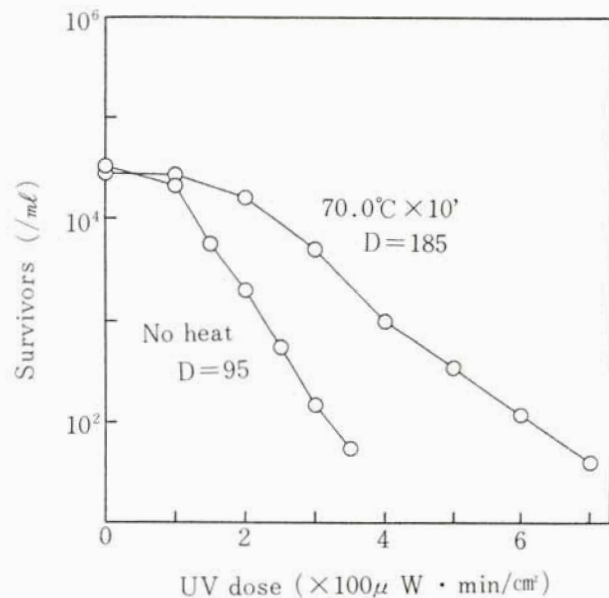


Fig.9. UV survival curves for ascospores of *Byssochlamys* (BYS-2).

## 要 約

*Byssochlamys* spp. BYS-1および BYS-2の子嚢胞子はPDAで $30^\circ\text{C}$ 、20日間以上の培養で形成が認められた。その耐熱性は強く、 $80^\circ\text{C}$ のD値が1分と1.6分であるが、加熱による死滅において、胞子に対数的に減少するまでの時間、すなわち遅滞時間が非常に長く、D値の約6~7倍程度あった。Z値は $5^\circ\text{C}$ と $5.3^\circ\text{C}$ であった。尚分生子の耐熱性は弱く、 $55^\circ\text{C}$ のD値がどちらも1.5分であった。耐UV性はD値が150と $185\mu\text{W}\cdot\text{min}/\text{cm}^2$ であった。

## 文 献

- 1) King, Jr., A. D., Michener, H. D. and Ito, K. A. : *Appl. Microbiol.*, **18**, 166-173 (1969).
- 2) Roland, J. O., Beuchat, L. R. and Heaton, E. K. : *J. Food Prot.*, **47**, 685-687 (1984).
- 3) Splittstoesser, D. F. and Splittstoesser, C. M. : *J. of Food Sci.*, **42**, 685-688 (1977).
- 4) Splittstoesser, D. F., Cadwell, M. C. and Martin, M. : *J. of Food Sci.*, **34**, 248-250 (1969).
- 5) Bayne, H. G. and Michener, H. D. : *Appl. Environm. Microbiol.*, **37**, 449-453 (1979).
- 6) Splittstoesser, D. F., Kuss, F. R. and Harrison, W. : *Appl. Microbiol.*, **20**, 393-397 (1970).
- 7) 宇田川俊一 : 食品と微生物, **8**, 121-130 (1991).