

## *Talaromyces* および *Neosartorya* 子嚢胞子の耐熱性に与える pH および培養期間の影響

遠田 昌人, 池上 義昭, 松井 智江, 中川 薫

### Influence of pH and Incubation Period on Heat-resistance of Ascospores of *Talaromyces* and *Neosartorya*

Atsuhito Enda, Yoshiaki Ikegami,  
Tomoe Matsui and Kaoru Nakagawa

*Talaromyces* and *Neosartorya* are heat resistant molds which cause spoilage of canned or bottled acid foods and drinks. Heat-resistance of ascospores of a strain of *Talaromyces* and two strains of *Neosartorya* was examined.

All of three strains showed obvious lag time in heat survival curves as well as *Byssochlamys*. While there was no influence of pH between 3.5 and 6.8 on *Talaromyces*, decrease in heat-resistance in pH 3.5 was observed on two strains of *Neosartorya*.

Heat-resistance of *Neosartorya* increased with longer incubation period for the ascospores. In the case of *Neosartorya* sp. TIF6201, the survival curve of the ascospores at 85°C for 31-days in pH 3.5 was logarithmic, however, the corresponding curve for 70-days was non-logarithmic and a plateau was observed for 115-days. The reason of this higher heat-resistance was generation and increased lag time.

Key words : *Talaromyces*, *Neosartorya*, heat-resistant mold, ascospore, heat-resistance, incubation period, pH.

*Byssochlamys* 属カビが酸性食品・飲料の缶詰および瓶詰の変敗を引き起こすことはかなり以前からよく知られていた<sup>1)</sup>が、その後 *Byssochlamys* のみならず、*Byssochlamys* の属する不整子嚢菌綱に分類される *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Eupenicillium* 属なども高い耐熱性を有し、*Byssochlamys* と同様の危険性があることが明らかにされてきた<sup>2)</sup>。

日本国内の食品工業においてもこれら耐熱性カビによる変敗事故の危険性が指摘されてから久しいが、未だに耐熱性カビの性質について十分に明らかになったとは言い難い。最も重要と考えられるその耐熱性についても、細菌とは異なり対数的な生残曲線にならないこと<sup>3-6)</sup>、子嚢胞子の成熟によって耐熱性が増加すること<sup>7)</sup>などが報告されているが、その詳細は不明である。そのため現在のところ耐熱性カビの死滅様式を統一的に説明するモデルは確立されていない。

現状では耐熱性カビの耐熱性評価や、さらにこれらを殺菌の対象にする場合に必要な殺菌条件を算出する際に大きな不都合がある。そこで筆者らは、カビの死滅モデルの立案に必要なデータの収集を試み、*Talaromyces* および *Neosartorya* 属のカビについて耐熱性を試験し、加熱時の pH や培養期間が与える影響について調査した。

## 実験方法

### 1. 使用菌株

*Talaromyces* sp. TIF6301, *Neosartorya* sp. TIF6203 および TIF6201 を使用した。TIF6301 および TIF6203 は PET ボトル詰清涼飲料, TIF6201 はチェリーシラップ漬缶詰の変敗品から分離されたものである。

### 2. 孢子懸濁液の調製

種懸濁液0.1mlを pH 無調整のポテトデキスロース寒天培地 (PDA; 日水製薬) 平板に塗抹し、25℃で所定期間培養した。有柄針で平板上の菌叢の子嚢果を潰しながら、子嚢胞子を掻き取り、滅菌した0.005%エーロゾル OT (Di-iso-octyl Sodium Sulfosuccinate) 添加生理食塩水に懸濁した。この食塩水にはあらかじめガラスビーズを入れておき、試験管ミキサーを用いて30分間攪拌して懸濁した。さらに氷水中で冷却しつつ20分間超音波処理し、遠心分離 (3,000g, 20分間) によりペレットを集め、再び懸濁して、洗浄した。この洗浄操作を2回行った。最終的にエーロゾル添加生理食塩水に懸濁し、滅菌ガラスウールで無菌的に濾過して、4℃の低温庫にて保存した。

### 3. 耐熱性

保存しておいた孢子懸濁液の1mlを1.5ml容滅菌マイクロチューブに採取し、遠心分離 (2,000g, 10分間) 後上清を取り除き、0.005%エーロゾル OT を添加した滅菌クエン酸リン酸緩衝液 (クエン酸0.1M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.2M; pH 3.5 または 6.8) 1ml に懸濁した。懸濁液は TDT 管 (7mmφ×105mm) に移し、ガスバーナーで熔封した。これを恒温水槽中で一定時間加熱した後、流水中で冷却した。冷却後、TDT 管を開封して生理食塩水にて適宜希釈し、PDA に混釈した。平板は25℃で培養し、*Talaromyces* は15日後、*Neosartorya* は10日後まで形成された菌叢を計数した。TIF6201 については菌叢の拡散が著しく、滅菌後 PDA に最終濃度  $8.4\mu\text{g}/\ell$  となるように滅菌ローズベンガル水溶液を添加した。

## 結果

### 1. *Talaromyces* sp. TIF6301 の耐熱性

*Talaromyces* sp. TIF6301 の子嚢胞子の懸濁液を調製し、耐熱性を測定した。懸濁液調製の際の培養期間は60日間行った。結果を Fig. 1 に示した。生残曲線において明瞭な遅滞が認められ、*Bysochlamys* と同様の様式を示した。従って細菌の場合のように単純に D 値を計算しても意味がないため、池上<sup>8)</sup>の方法に従い、対数的な減少を示す部分において生残曲線をとって D 値を求め、さらにその曲線を延長し、初期菌数との交点の加熱時間を遅滞時間 (Lt) として計算した。計算結果を Table 1 に示した。TIF6301 の生残曲線においては pH 3.5 および 6.8 との間で全く差が認められず、加熱時の pH が耐熱性に影響しないことが示された。

### 2. *Neosartorya* sp. TIF6203 の耐熱性

*Neosartorya* sp. TIF6203 の子嚢胞子の懸濁液を調製し、耐熱性を測定した。60日間培養して調製した子嚢胞子懸濁液を用いて得られた結果を Fig. 2 に示した。さらに、培養期間を93日間として得られた孢子懸濁液を用いた82.5℃での生残曲線を Fig. 3 に示した。またこれらの結果から D 値および Lt を計算し、Table 2 に示した。いずれの結果も TIF6301 とは異なり、明らかに加熱時の pH の影響を強く受けていることを示した。pH による生残曲線の変化は D 値および

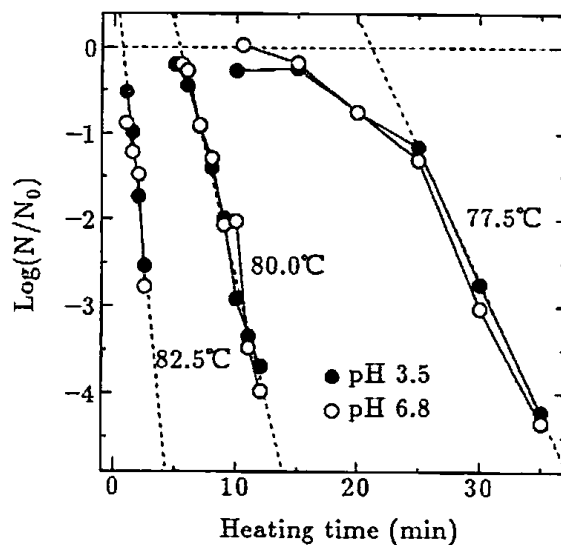


Fig. 1. Heat-survival curves for ascospores of *Talaromyces* sp. TIF6301. Ascospores were obtained by incubation on PDA at 25°C for 60 days. They were heated in Citrate-phosphate buffer solution.

Table 1. Heat resistance of ascospores of *Talaromyces* sp. TIF6301.

Temp. (°C)	pH			
	3.5		6.8	
	D (min)	Lt (min)	D (min)	Lt (min)
77.5	3.3	21.0	3.4	20
80.0	1.8	5.1	1.8	5.6
82.5	0.92	0.3	0.86	0.3
Z (°C)	8.8	2.6	8.8	2.6

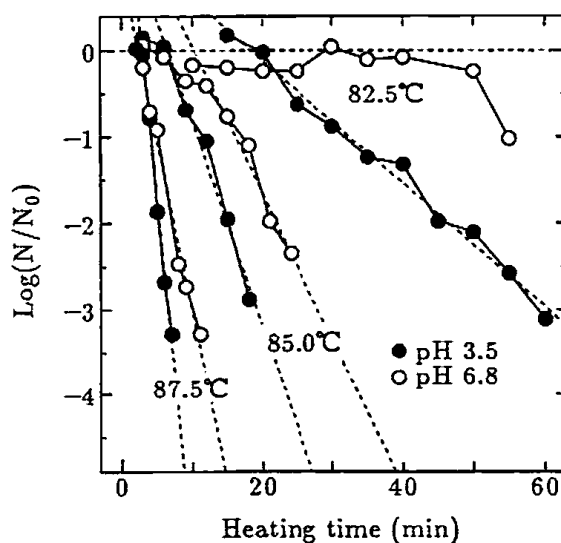


Fig. 2. Heat-survival curves for ascospores of *Neosartorya* sp. TIF6203. Ascospores were obtained by incubation on PDA at 25°C for 93 days. They were heated in Citrate-phosphate buffer solution.

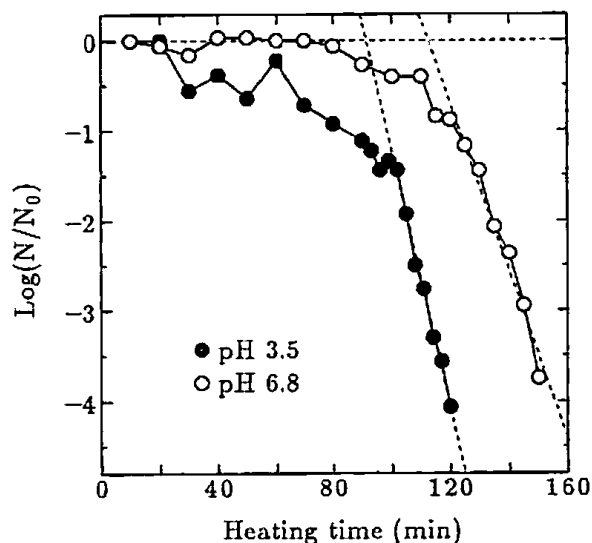


Fig. 3. Heat-survival curves for ascospores of *Neosartorya* sp. TIF6203. Ascospores were obtained by incubation on PDA at 25°C for 93 days. They were heated of 82.5°C in Citrate-phosphate buffer solution.

Table 2. Heat resistance of ascospores of *Neosartorya* sp. TIF6203.

Incubation period (days)	Temp. (°C)	pH			
		3.5		6.8	
		D (min)	Lt (min)	D (min)	Lt (min)
60	82.5	11.8	16.0	NA	50
	85.0	4.0	6.4	5.9	8.9
	87.5	1.4	2.9	2.5	2.3
	Z (°C)	5.4	7.7	NA	3.8
93	82.5	7.0	91	11	113

Ltの両方の点において認められ、pH 3.5の場合に耐熱性が減少した。

93日間培養の子嚢胞子を60日間培養での結果と比較すると、Ltが非常に増大した反面pH 3.5ではD値はむしろやや小さくなった。また93日間培養では、pHによる耐熱性の差異は明瞭ではなくなったが、pH 3.5の場合遅滞部分においても緩やかな生残菌数の減少が見られる一方で、pH 6.8ではこのような傾向は認められなかった。

### 3. *Neosartorya* sp. TIF6201 の耐熱性

*Neosartorya* sp. TIF6201の子嚢胞子の懸濁液を調製し、85°Cおよび87.5°Cでの耐熱性を測定した。31、70および115日間培養して調製した子嚢胞子懸濁液を用いて得られた生残曲線をFig. 4に示した。またその分析結果をTable 3に示した。

TIF6203と同様に一般にpH 3.5で耐熱性の減少が認められた。子嚢胞子を得るための培養期間の影響は85°Cでの生残曲線に明瞭に現れた。特にpH 3.5において、31日間培養では対数的な減少を示したが、70日間培養では緩やかな生残菌数減少を伴う遅滞が発生し、さらに115日間培養ではpH 6.8と同様の平坦な遅滞へと変化した。一方pH 6.8では31日間培養においても平坦な遅滞が認められた。培養期間はD値にはほとんど変化を与えず、Ltが増加した。

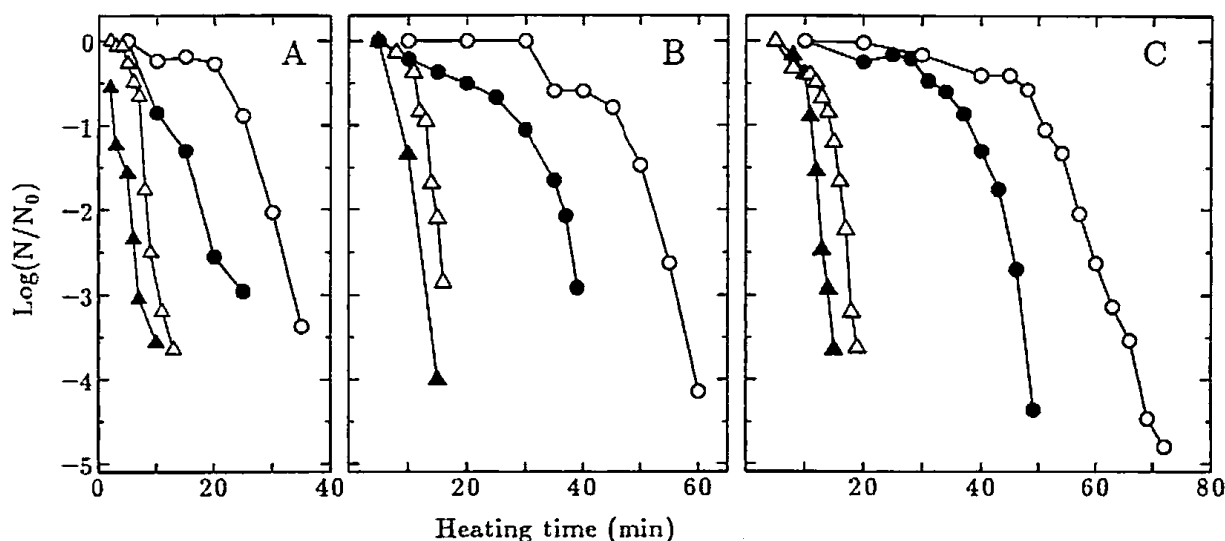


Fig. 4. Heat-survival curves for ascospores of *Neosartorya* sp. TIF6201. Ascospores were obtained by incubation at 25°C in various period (A; 31, B; 70, C; 115 days). They were heated at 85.0°C (●○) and 87.5°C (▲△) in Citrate-phosphate buffer solution (pH 3.5; ●▲, 6.8; ○△).

Table 3. Heat resistance of ascospores of *Neosartorya* sp. TIF6201.

Incubation period (days)	Temp. (°C)	pH			
		3.5		6.8	
		D (min)	Lt (min)	D (min)	Lt (min)
31	85.0	6.7	5.1	4.0	22
	87.5	2.6	0.2	2.1	4.6
70	85.0	2.8	31	3.8	45
	87.5	2.5	5.5	2.1	10
115	85.0	3.1	36	5.0	48
	87.5	1.5	9.5	1.7	13

### 考 察

*Talaromyces* 1株と *Neosartorya* 2株について、子嚢胞子懸濁液を得るための培養期間、さらに加熱温度、加熱時の pH を変えた様々な条件下での生残曲線が得られた。*Byssochlamys* や、*Aspergillus* の有性世代などのいわゆる耐熱性カビの子嚢胞子については、以前から細菌のような対数的な生残曲線を示さないことが報告されている<sup>3-6)</sup>。その特徴は対数的死滅に至るまでの長い遅滞時間や生残菌数が少なくなつてからのテーリングである。筆者らの得た結果においても3菌株全てで明らかな遅滞が観察された。

従来は、広い範囲の pH でカビが生育可能であることから、加熱時の条件としても pH の影響は大きくないのではないかという、漠然とした認識があった。ところがクエン酸リン酸緩衝溶液での pH 3.5と6.8との比較において、*Talaromyces* では全く pH の影響を受けなかったのに対し、より高い耐熱性を示した *Neosartorya* 2株では Lt と D 値の両方において大きく影響を受けた。このことから耐熱性カビが問題となるような食品において、pH の管理は重要であると考えられる。

TIF6203 および TIF6201 では培養期間を延長することで遅滞時間が増加した。特に TIF6201 では pH 3.5 での加熱で、培養31日間ではほぼ対数的な生残曲線を示したのに対し、70日間では緩やかな生残菌数減少を示しながらも明らかな遅滞が存在し、さらに115日間培養では平坦な遅滞を示すようになった。このときD値はむしろ減少する傾向にあり、遅滞の増大と同時にその後の急速な死滅を示すようになった。このように長いLtを示すようになった子嚢胞子でも、多くの場合加熱温度に敏感であり、このことは殺菌温度を上げることでかなりLtを短くできることを示唆する反面、殺菌における温度管理の重要性をも意味する。

Tournasら<sup>7)</sup>は *Neosartorya fischeri* において培養期間が1カ月間の子嚢胞子と6カ月間のそれとの耐熱性を比較し、 $D_{90}$ が7.4分から15.5分にまで増加したと述べている。しかし筆者らの得た結果では、培養期間の延長、すなわち子嚢胞子の成熟によって起こる耐熱性の増大は単純にD値において比較できるようなものではなく、生残曲線の様式が大きく変化することが示された。

いわゆる耐熱性カビにおいてはたとえ未成熟な子嚢胞子においても危険な水準の耐熱性を備えているが、培養期間の延長により、生残曲線が長い遅滞時間をもつように質的に変化することが示された。耐熱性カビの耐熱性を評価する場合、十分な培養期間を与え、加熱の温度、pHなどの条件を慎重に考慮しないと、その評価を誤る危険性があると考えられる。

## 要 約

耐熱性カビ *Talaromyces* sp. TIF6301, *Neosartorya* sp. TIF6203 および TIF6201 の子嚢胞子の耐熱性を測定した。全ての菌株において *Byssochlamys* と同様の遅滞時間をもつ生残曲線が得られた。

*Talaromyces* は加熱時の pH の影響を殆ど受けなかったが、*Neosartorya* は2株とも低い pH での耐熱性の減少が観察された。

*Neosartorya* では子嚢胞子調製時の培養期間の延長により、対数的な生残曲線から明瞭な遅滞時間をもつように変化した。このとき耐熱性は増加したが、Ltの発生と増加が主な要因であり、単純なD値の増加によるものではなかった。

## 文 献

- 1) King, Jr., A. D., Mincher, H. D. and Ito, K. A.: *Appl. Microbiol.*, 18, 166-173 (1969).
- 2) 宇田川俊一: 食品と微生物, 8, 121-130 (1991).
- 3) Splittstoesser, D. F. and Splittstoesser, C. M.: *J. Food Sci.*, 42, 685-688 (1977).
- 4) Banner, M. J., Mattick, L. R. and Splittstoesser, D. F.: *J. Food Sci.*, 44, 545-548 (1979).
- 5) Bayne, H. G. and Michener, H. D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 449-453 (1979).
- 6) Splittstoesser, D. F., Lammers, J. M., Downing, D. L. and Churey, J. J.: *J. Food Sci.*, 54, 683-685 (1979).
- 7) Tournas, V. and Traxler, R. W.: *J. Food Prot.*, 57, 814-816 (1994).
- 8) 池上義昭, 遠田昌人, 松井智江, 中川 薫: 東洋食品工業短大・東洋食品研究所研究報告書, 20, 161-167 (1994).