

紫外線照射による農産物の貯蔵に関する研究

III. 2, 3 の微生物に対する紫外線殺菌

団野皓文・宮里 満・石黒悦爾

(農業物理学研究室)

昭和57年8月10日 受理

Studies on the Preservation Effect of Agricultural Products by the Irradiation of Ultraviolet Ray

III. Ultraviolet Sterilization of Several Microorganisms

Akibumi DANNŌ, Mitsuru MIYAZATO and Etsuji ISHIGURO

(Laboratory of Agricultural Physics)

緒 言

前報で紫外線照射装置を試作し、改良を加えた紫外線照射装置(2号機)を用いて酵母菌に対する紫外線殺菌について報告した。

今回は、多くの農産物を腐敗させる緑カビ、青カビ、軟腐病菌などの微生物に対して紫外線照射を行い紫外線殺菌の基礎データとなる生存曲線ならびに D_{10} 値を求めた。

同時に、 γ 線を用いての照射を行い、紫外線と γ 線による生存曲線および D_{10} 値を比較した。

本研究は文部省科学研究費、エネルギー特別研究の研究補助金を受けて行った。

実 験 方 法

1. 微生物

緑カビ、青カビなど実験に用いた微生物は東京大学応用微生物研究所および財団法人発酵研究所より分譲を受けた IAM, IFO の登録番号がついた素姓正しい菌である。これらの菌を斜面培地上で1~2週間培養後、滅菌水を加えて菌懸濁液を作成した。この懸濁液

を用いて10分間かくはんし、菌が十分に分離するようにした。さらに $20\sim 30\mu\text{m}$ のガラスフィルター (G_3) でろ過し、胞子のみの懸濁液となるようにした。

使用菌株とその主な被害農産物を Table 1 に示す⁵⁾。

2. 照射方法

紫外線照射は、紫外線照射装置(2号機)を用いて行った。2号機は上下両方向から同時にしかも均一に照射できるように設計し、上下光源には45Wの紫外線灯(ウシオ電機社製, UL1-45DL₂)をそれぞれ5本ずつ取りつけたものである。上部の紫外線灯5本を点灯した時の線量率は15~50cmの距離で6.66~2.31 mW/cm²である^{1, 2)}。

紫外線灯の線量率は点灯後時間の経過とともに変化する。点灯後120分経過して安定な出力状態となってから照射を開始した。

照射する微生物に応じて、上部の紫外線灯を5本または1本点灯し、試料台を紫外線灯から33~41cmの適当な距離に固定した。懸濁液の入ったシャーレを試料台の中心に置き、照射時間を変えて照射した。

水による紫外線の減衰を考慮して、懸濁液30mlをシャーレ(9cm ϕ)に注ぎ、水深を0.5cm以内で照射

Table 1. Several microorganisms spoiling vegetables and fruits

Microorganism	Irradiated strain	Vegetables and fruits
Gray mould	<i>Botrytis cinerea</i> (IAM 5126)	Strawberry, Grape, Tomato
Soft rot	<i>Rhizopus nigricans</i> (IAM 6021)	Strawberry, (Bread)
Common green mould	<i>Penicillium digitatum</i> (IFO 7876)	Citrus fruit
Blue mould	<i>Penicillium italicum</i> (IFO 8958)	Citrus fruit
Blue mould	<i>Penicillium expansum</i> (IFO 7100)	Fruit, (Bread)
Bacteria	<i>Escherichia coli</i> (IAM 1264, IAM 1016)	(Milk)

した^{3,4)}.

試料の照射直前と直後に紫外線照度計（ウシオ電機社，UIT-110）を用いて線量率を測定し，照射時の線量を正確に求めた。

γ 線照射は鹿児島大学学内共同利用 RI 実験室のガンマセル，GC-40 を用いた。GC-40 は Cs-137, 3690Ci 線源である。照射は懸濁液 50ml を三角フラスコに入れ，照射時間を変えて行った。

3. 希釈，培養および生存率

照射した懸濁液は，紫外線照射および γ 線照射のいずれの場合も，照射後直ちに10進法で数段階に希釈を行った。

各段階に希釈した懸濁液 1ml をシャーレに滴下し，45°C に保った PDA 培地またはペプトン培地をシャーレに注ぎ，25°C の定温器内で一定時間培養した。

30~300個のコロニーが発生したシャーレについて計数を行い，これに希釈倍数を乗じて検体 1ml あたりの生菌数を測定した。

未照射の生菌数と照射後の生菌数の割合を生存率として求めた。

4. 生存曲線および D_{10} 値

生存曲線は縦軸に生存率を対数目盛りでとり，横軸に照射線量をとったものである。このようにして図示される生存曲線は一般に直線または肩を持つ直線で表わされる。

この生存曲線の直線部分より，90%を殺菌するに必要な線量を D_{10} 値と定義した。

実験結果および考察

1. 生存曲線

(1) 灰色カビ (*Botrytis cinerea* IAM 5126)

Fig. 1 に灰色カビを紫外線で照射したときの生存曲線を示す。照射は紫外線灯を5本点灯し 33cm の距離で行った。この時の線量率は 2.9 mW/cm² であった。

生存率は照射線量が増加するにつれて指数関数的に減少した。しかし，低い線量区で肩を持つ直線，すなわちシグモイド型となった。

これは微生物の紫外線殺菌でみられる標準的な曲線である。この生存曲線の直線部分より D_{10} 値を求めると 15.0 mW·sec/cm² となった。

Fig. 2 は γ 線照射したときの生存曲線を示す。照射時の線量率は 7.3 krad/h であった。生存率は紫外線照射の場合と同様に照射線量が増加するにつれて指

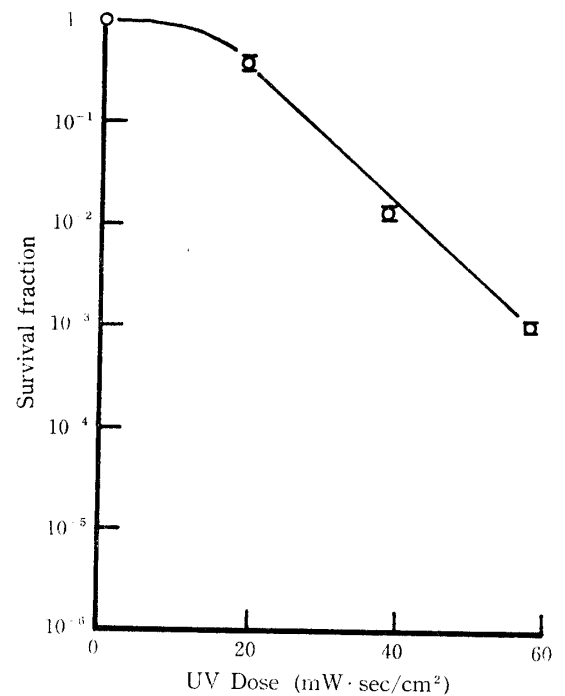


Fig. 1. Survival curve of *Botrytis cinerea* (IAM 5126) irradiated with ultraviolet with 5 lamps at 33 cm. (UV intensity: 2.9 mW/cm²)

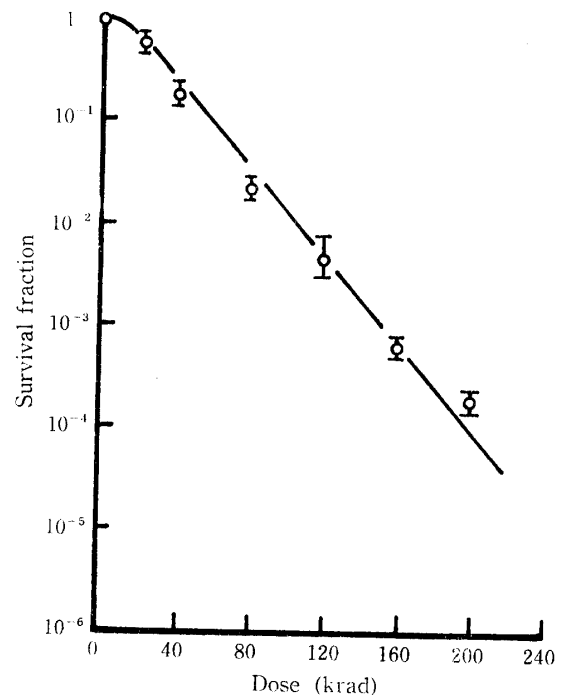


Fig. 2. Survival curve of *Botrytis cinerea* (IAM 5126) irradiated with gamma ray from Cs-137 of 3690 Ci. (Dose rate: 7.3 krad/h)

数関数的に減少し、生存曲線はシグモイド型となった。この生存曲線の直線部分から D_{10} 値を求めると、50 krad となった。

(2) 軟腐病菌 (*Rhizopus nigricans* IAM 6021)

Fig. 3 は軟腐病菌を紫外線照射したときの生存曲線を示す。照射は紫外線灯を5本点灯し、33 cm の距離で行った。線量率が 2.25 mW/cm^2 と 2.70 mW/cm^2 の2回の結果を示す。生存率は灰色カビ病と同様に照射線量が増加すると指数関数的に減少した。しかし生存曲線は低い線量区で直線的に減少する部分と高い線量区で直線的に減少する部分に分けられた。最初の低線量区の生存曲線から D_{10} 値を求めると $19.6 \text{ mW}\cdot\text{sec/cm}^2$ となった。

Fig. 4 は γ 線照射したときの生存曲線を示す。照射時の線量率は 7.1 krad/h であった。生存曲線は紫外線の生存曲線と異なり肩を持つ1本の直線、シグモイド型となった。

この生存曲線から D_{10} 値を求めると 27.0 krad となった。

(3) 緑カビ (*Penicillium digitatum* IFO 7876) と 青カビ (*Penicillium italicum* IFO 8958, *Penicillium expansum* IFO 7100)

Fig. 5 に緑カビと青カビを紫外線照射したときの生

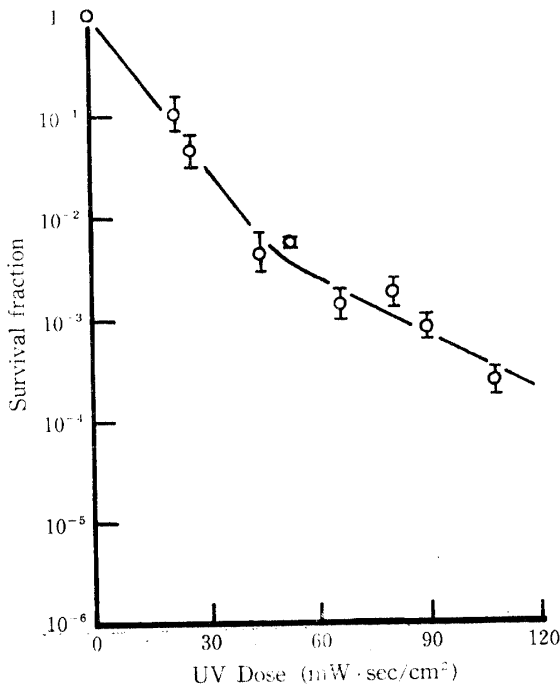


Fig. 3. Survival curve of *Rhizopus nigricans* (IAM 6021) irradiated with ultraviolet with 5 lamps at 33 cm. (UV intensity: $2.25\text{--}2.7 \text{ mW/cm}^2$)

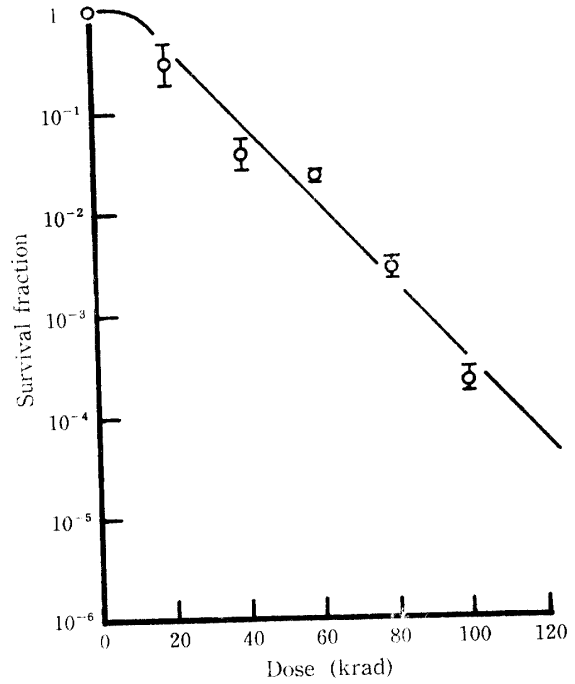


Fig. 4. Survival curve of *Rhizopus nigricans* (IAM 6021) irradiated with gamma ray from Cs-137 of 3690 Ci. (Dose rate: 7.1 krad/h)

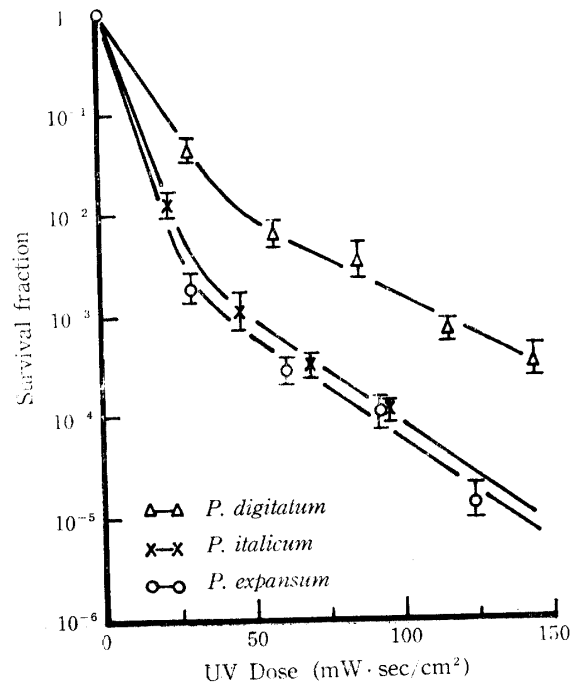


Fig. 5. Survival curves of *Penicillium* (IFO 7876, IFO 8958, IFO 7100) irradiated with ultraviolet with 5 lamps at 33 cm. (UV intensity: $2.34\text{--}2.9 \text{ mW/cm}^2$)

生存曲線を示す。照射は紫外線灯を5本点灯し、33 cmの距離で行った。この時の線量率は青カビ (IFO 8958 と IFO 7100) および緑カビに対してそれぞれ 2.45, 2.34 および 2.90 mW/cm² であった。いずれのカビも照射線量が増加すると生存率は指数関数的に減少した。緑カビは2つの青カビ (IFO 8958 および IFO 7100) よりも紫外線感受性が低い、すなわち紫外線に対する抵抗性が強いことが示された。また、Fig. 3 の軟腐病菌の紫外線照射と同様に生存曲線は2本の直線に分けられることを示している。これらの低線量区の部分の生存曲線から D_{10} 値を求めると、緑カビは 21.3 mW·sec/cm², 青カビ (IFO 8958) は 12.3 mW·sec/cm², 青カビ (IFO 7100) は 11.0 mW·sec/cm² となった。

P. expansum の懸濁液を顕鏡すると、孢子と菌体がほぼ100対1の割合で混在していた。したがって生存曲線で低線量区の部分には孢子に対応するものと考えられる。

Fig. 6 に青カビ (IFO 7100) を γ 線照射したときの生存曲線を示す。この時の線量率は 7.1 krad/h であった。生存曲線は指数関数的に減少する1本の直線となった。この生存曲線から D_{10} 値を求めると 9.8 krad となった。

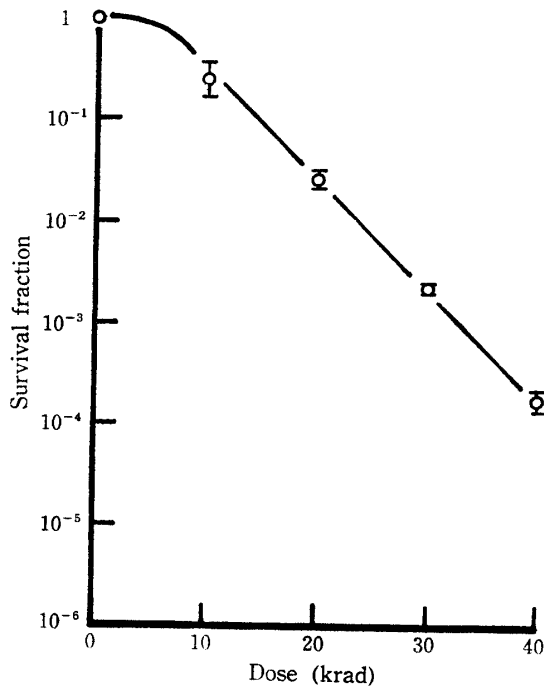


Fig. 6. Survival curve of *Penicillium expansum* (IFO 7100) irradiated with gamma ray from Cs-137 of 3690 Ci. (Dose rate: 7.1 krad/h)

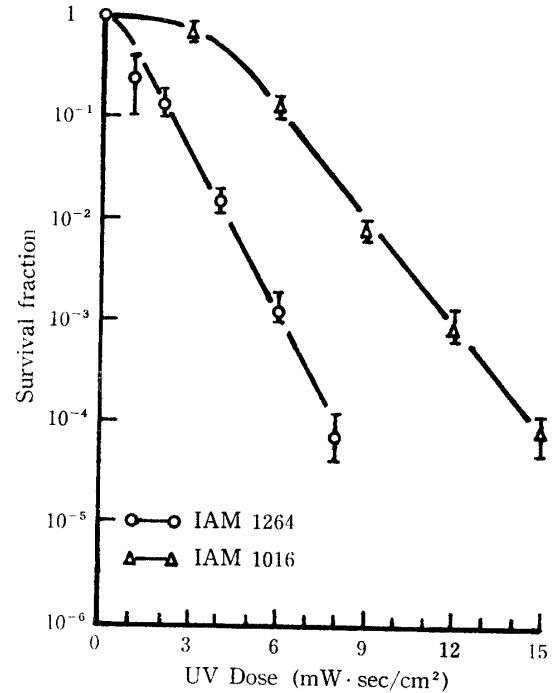


Fig. 7. Survival curves of *Escherichia coli* (IAM 1264 and IAM 1016) irradiated with ultraviolet with 1 lamp at 41 cm. (UV intensity: 1.00 mW/cm²)

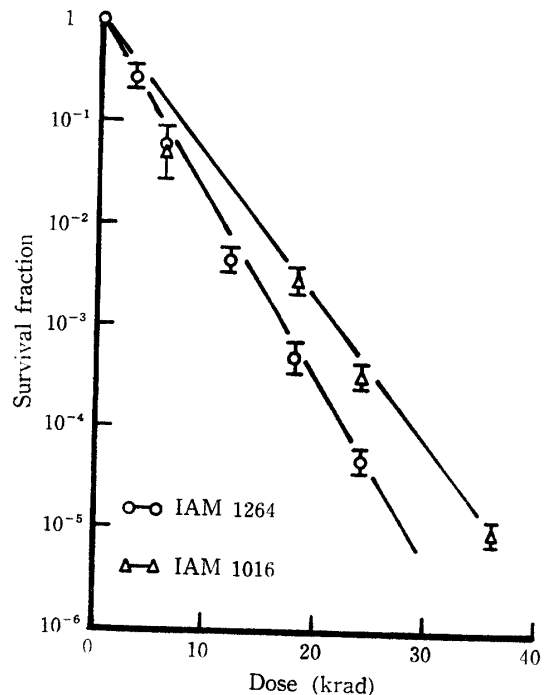


Fig. 8. Survival curves of *Escherichia coli* (IAM 1264 and IAM 1016) irradiated with gamma ray from Cs-137 of 3690 Ci. (Dose rate: 7.3 krad/h)

(4) 大腸菌群 (*Escherichia coli* IAM 1264, IAM 1016)

Fig. 7 に大腸菌群の *E. coli* 属の 2 菌株 IAM 1264 と IAM 1016 を紫外線照射したときの生存曲線を示す。照射は紫外線灯を 1 本だけ点灯し、距離を 41 cm と離して行った。この時の線量率は 2 菌株ともに 1.00 mW/cm² であった。2 菌株ともに照射線量が増加すると生存率は指数関数的に減少し、低線量区で肩を持つ直線となった。この D₁₀ 値は *E. coli* IAM 1264 および IAM 1016 ではそれぞれ 2.0 および、3.1 mW・sec/cm² となった。

Fig. 8 に γ 線照射したときの生存曲線を示す。この時の線量率は 7.3 krad/h であった。生存率は照射線量が増加すると指数関数的に減少した。生存曲線は紫外線照射と同じシグモイド型となった。これらの生存曲線より D₁₀ 値を求めると、IAM 1264 では 5.56 krad, IAM 1012 では 7.25 krad となった。

2. D₁₀ 値および D_{0.1} 値

今回実験に用いた 6 種類の微生物の紫外線殺菌および γ 線殺菌の D₁₀ 値を Tables 2, 3 に示す。D₁₀ 値は生存曲線の直線部分で生存率が 10% に減少するに要する線量である。紫外線照射の場合は、微生物の紫外線に対する抵抗力に応じて紫外線の灯数および照射距離を調節したので、実験に用いた線量率を Table 2

の第 2 列に、さらにこの線量率で D₁₀ 値を達成するに要する照射時間を 3 列目に示した。

γ 線照射の場合は Cs-137, γ 線源を使用したので、線源の減衰により線量率は 7.1~7.3 krad/h であった。また、Tables 2, 3 に、前報で報告した *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* の D₁₀ 値および D_{0.1} 値を併記した。

一般に生存率は、照射線量の増加とともに指数関数的に減少する単一曲線で示される。しかし、今回の紫外線照射に用いた微生物のなかで、軟腐病菌、緑カビおよび青カビの 3 種の菌では、これらの生存曲線は低線量区で急激に減少する部分と高線量区で次第に減少する部分からなっている。これは傾斜の異なる 2 つの直線に分けることができる。低線量区で直線的に減少する部分から求めた D₁₀ 値と高線量区で直線的に減少する部分から求めた D₁₀ 値を Table 2 の 4 列目に併記した。

また、紫外線殺菌による微生物の殺菌線量は、これまでの文献によると生存率が 1/1000 になる線量、すなわち D_{0.1} 値を用いている。この値を Table 2 の 5 列目に示した。またこれまで発表されている D_{0.1} 値を Table 2 の 6 列目に示した。

Table 2 の結果より、緑カビ (IFO 7876) は紫外線に対する抵抗力が最も強い。また、*E. coli* (IAM 1264)

Table 2. D₁₀ value and D_{0.1} value of several microorganisms induced by the irradiation of ultraviolet ray

Microorganism	UV intensity (mW/cm ²)	Irrad. time (sec.)	D ₁₀ value (mW sec./cm ²)	D _{0.1} value (mW sec./cm ²)	Published D _{0.1} value (mW sec./cm ²)
<i>Botrytis cinerea</i> (IAM 5126)	2.90	5.17	15.0	45.0	—
<i>Rhizopus nigricans</i> (IAM 6021)	2.70	7.26, 20.67	19.6, 55.8	58.8, 167.4	333* ¹ , 222* ²
<i>Penicillium digitatum</i> (IFO 7876)	2.90	7.34, 24.66	21.3, 71.5	63.9, 214.5	132* ¹ , 88.2* ²
<i>Penicillium italicum</i> (IFO 8958)	2.34	5.26, 17.74	12.3, 41.5	36.9, 124.5	—
<i>Penicillium expansum</i> (IFO 7100)	2.45	4.49, 18.36	11.0, 45.0	33.0, 135.0	39* ¹ , 22.2* ²
<i>Escherichia coli</i> (IAM 1264)	1.00	1.97	2.0	5.9	5.4* ²
<i>Escherichia coli</i> (IAM 1016)	1.00	3.07	3.1	9.2	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (IFO 2193)* ³	2.31	4.90	11.3	33.9	18.0* ¹ , 18.84* ²
<i>Candida utilis</i> (IAM)* ³	2.31	5.70	13.2	39.5	—

*¹: IES Lighting Hand Book, 2nd. ed. (1952)

*²: IES Lighting Hand Book, 4th. ed. (1964)

*³: A. Danno, M. Miyazato and E. Ishiguro; Bulletin Fac. Agr. Kagoshima Univ., No. 32 183-187 (1982)

Table 3. D_{10} value and $D_{0.1}$ value of several microorganisms induced by the irradiation of gamma ray

Microorganism	Dose rate (krad)	Irrad. time (h)	D_{10} value (krad)	$D_{0.1}$ value (krad)	Published $D_{0.1}$ value (rep)
<i>Botrytis cinerea</i> (IAM 5126)	7.3	6.85	50.0	150.0	—
<i>Rhizopus nigricans</i> (IAM 6021)	7.1	3.80	27.0	81.0	—
<i>Penicillium expansum</i> (IFO 7100)	7.1	1.38	9.8	29.4	275.000* ¹
<i>Escherichia coli</i> (IAM 1264)	7.3	0.76	5.56	16.68	100.000* ¹
<i>Escherichia coli</i> (IAM 1016)	7.3	0.99	7.25	21.75	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (IFO 2193)* ²	7.3	3.08	22.5	67.5	550.000* ¹
<i>Candida utilis</i> (IAM 4215)* ²	7.3	7.71	56.3	168.9	—

*¹: Moriarty, J. H., (1950)*²: A. Danno, M. Miyazato and E. Ishiguro; Bulletin Fac. Agr. Kagoshima Univ., No. 32 183-187 (1982)

は最も弱いことが示された。この傾向は Table 3 に示すように γ 線照射で求められた D_{10} 値の大きさの傾向と一致している。さらに、*E. coli* および *P. expansum* の $D_{0.1}$ 値はこれまで発表された $D_{0.1}$ 値とほぼ一致した。しかし、*R. nigricans*, *P. digitatum* のように2つの $D_{0.1}$ 値が得られる微生物では、文献値とはかなり相異した値となった。

今後はこれらの点に注意して実験を行い、この原因の解明に努めたい。

要 約

農産物を腐敗させる種々の微生物に対して紫外線照射装置(2号機)と γ 線照射装置(Cs-137, GC-40)を用いて照射を行い、生存曲線ならびに D_{10} 値を測定した。

実験に用いた微生物は、灰色カビ(*B. cinerea* IAM 5126)、軟腐病菌(*R. nigricans* IAM 6021)、緑カビ(*P. digitatum* IFO 7876)、青カビ(*P. italicum* IFO 8958)と *P. expansum* IFO 7100) および大腸菌群(*E. coli* の IAM 1264 と IAM 1016)である。

これらの微生物では、緑カビが紫外線に対する抵抗性が最も強く、 D_{10} 値は $21.3 \text{ mW} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ となり大腸菌群(*E. coli* IAM 1264)が最も弱く $2.0 \text{ mW} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ となった。

灰色カビと大腸菌群を紫外線と γ 線で照射したと

きの生存曲線はシグモイド型となった。しかし、軟腐病菌、緑カビ、青カビを紫外線照射したときの生存曲線は指数的に減衰する2つの部分として示されたが、 γ 線を照射したときの生存曲線は指数関数的に減少する1本の直線となった。

今後、紫外線と γ 線照射によるこれらの差異について原因の解明を行う必要がある。

謝辞 本研究を行うにあたり、菌を分譲していただいた東京大学応用微生物研究所および御教示いただいた本学農学部大西 博教授、小林武一助手に深甚の謝意を表します。また、 γ 線照射に尽力していただいた本学学内共同利用 RI 実験室の西山安夫技官、および実験に協力してくれた本研究室の大迫義政、寺川雄二の各氏に感謝します。

文 献

- 1) 岡野皓文・宮里 満・石黒悦爾・中山高秀：紫外線照射による農産物の貯蔵に関する研究。I. 紫外線照射装置の試作について。鹿大農学術報告, No. 31, 157-162 (1981)
- 2) 岡野皓文・宮里 満・石黒悦爾：紫外線照射による農産物の貯蔵に関する研究。II. 紫外線照射装置(2号機)の試作と酵母菌の紫外線照射。鹿大農学術報告, No. 32, 183-187 (1982)
- 3) 河本康太郎：紫外線による 空気殺菌法とその効果。食品工業, 13, 33-40 (1970)
- 4) 齊藤民雄：紫外線による 水殺菌装置の現状と問題点。食品工業, 17, 36-42 (1974)
- 5) 好井久雄・金子安之・山口和夫：食品微生物学, 229-425, 技報堂出版, 東京 (1976)

Summary

Several kinds of microorganisms spoiling fruits and vegetables were irradiated both with an ultraviolet irradiation apparatus (No. 2) and with gamma ray from Cs-137, GC-40 type irradiator. Survival curves and D_{10} values of these microorganisms were measured.

Microorganisms tested in the present experiment were *Botrytis cinerea* (IAM 5126), *Rhizopus nigricans* (IAM 5126), *Penicillium digitatum* (IFO 7876), *Penicillium italicum* (IFO 8958), *Penicillium expansum* (IFO 7100) and *Escherichia coli* (IAM 1264 and IAM 1016). In these microorganisms, *P. digitatum* (IFO 7876) showed the strongest resistance to ultraviolet ray and the D_{10} value of it was $21.3 \text{ mW}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$. On the other hand, *E. coli* (IAM 1264) showed the weakest resistance to ultraviolet ray and the D_{10} value of it was $2.0 \text{ mW}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$.

Survival curves for *B. cinerea* and *E. coli* irradiated with ultraviolet ray and with gamma ray were indicated by a single exponential decay curve with shoulder. On the other hand, survival curves for *R. nigricans*, *P. digitatum*, *P. italicum* and *P. expansum* irradiated with ultraviolet ray were expressed by two components of exponential decay curves, while the curves for these irradiated with gamma ray were indicated by a single component. Further experiments are considered to be necessary before the elucidation of the difference between the ultraviolet ray irradiation and the gamma ray irradiation.