

## 温度変動条件における *Aspergillus niger* の菌糸マット径と分生子形成部径の成長予測

小出章二<sup>§</sup>, 八十川大輔\*

岩手大学農学部

\*北海道立食品加工研究センター

### Growth Prediction of Mycelial Mat and Fruiting Zone Diameters of *Aspergillus niger* subjected to Temperature Changes

Shoji Koide<sup>§</sup> and Daisuke Yasokawa\*

Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda 3-18-8 Morioka 020-8550

\*Hokkaido Food Processing Research Center, 589-4 Bunkiyodai Midori-Machi, Ebetsu, Hokkaido 069-0836

Mycelial mat diameter and germinated conidia zone (fruiting zone diameter) of *Aspergillus niger* during culture on potato dextrose agar (PDA) medium were analyzed under various temperature conditions. In this study, several growth prediction models (modified Logistic, Gompertz and Weibull models) were applied and compared to describe fungal growth curves. The Weibull model proved to be the most suitable fungal growth model, describing growth as a function of temperature. The new Weibull model best described the growth of mycelial mat and fruiting zone diameters between 18°C and 35°C. Measurements for mycelial mat and fruiting zone diameters of *A. niger* subjected to a temperature change between 20°C and 30°C closely matched values predicted with this new Weibull model. Since the growth prediction of fungal colonies under temperature changes has not yet been reported, the results of this study can be applied to fungal control and fungal fermentation. (Received Jan. 25, 2008 ; Accepted Apr. 11, 2008)

**Keywords** : temperature change, *Aspergillus niger*, mycelial mat diameter, Weibull model, fungal colony

**キーワード** : 温度変動, *Aspergillus niger*, 菌糸マット径, Weibull モデル, コロニー

近年、農産物・食品のカビ汚染やカビ毒汚染に関して大きな関心を集められており、防黴（防カビ）は食品衛生上重要な問題となっている<sup>1)~3)</sup>。この防黴にて、温湿度管理は必須であるが、貯蔵施設、加工施設、流通・販売時の温度は、出庫や荷受、陳列時に大きな温度変化を受けやすく、また日周性や年周性の影響も大きな問題といえる。従って、温度一定の培養条件で得られるカビの成長予測に関する知見は、温度が変動しやすい環境下でのカビの制御には応用しにくい。

これまでカビのコロニー成長と温度に関しては、数種類のハードル（pH や水分活性など）を組み合わせる固体培地や食品上にカビのコロニーを成長させ、その最大増殖速度および誘導期や、分生子や胞子の発芽の定量的測定からカビ制御を論じた報告がある<sup>4)~7)</sup>。また、微生物増殖の予測モデルは Logistic モデル、Gompertz モデル、Baranyi

モデル等を主流として発展してきており<sup>1)8)~12)</sup>、その中には温度変動時の動的予測モデルを提案した例も数例ある<sup>11)12)</sup>。しかし、カビのコロニー径（菌糸マット径<sup>13)</sup>と称す）と胞子部径（ここでは、分生子発芽円径で、既往の報告<sup>13)</sup>にならぬ分生子形成部径と称す）の温度変動条件における成長予測は報告例がない。

よって、本報でははじめに *Aspergillus niger* の分生子を用いて種々の温度条件下でコロニーを Potato Dextrose Agar (PDA) 培地上に成長させ、その菌糸マット径と分生子形成部径を、3つのパラメータを有する modified Logistic モデル<sup>14)</sup>、modified Gompertz モデル<sup>14)</sup>、Weibull モデル<sup>15)</sup>で近似した。その結果、Weibull モデルが測定値をより高い精度で近似できたため、そのパラメータを温度の関数式とした Weibull モデル（以下、新 Weibull モデルと称す）を構築した。これより、本報ではこの新 Weibull モデルを用いて温度変動条件（温度範囲 20°C~30°C）下で *A. niger* の菌糸マット径・分生子形成部径の経時変化を計測し、予測値と比較した。

〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8

\* 〒069-0836 北海道江別市文京台緑町 589-4

§ 連絡先 (Corresponding author), shojides@iwate-u.ac.jp

## 実験方法

### 1. 供試菌株および分生子懸濁液の調整

今回供試菌として、JIS かび抵抗性試験方法 (JIS Z 2911-2000) で使用される菌株である *Aspergillus niger* NBRC 6341 (分離源, leather) を用いた。これを PDA 斜面培地上にて、25°C で 1 週間培養し、形成した *A. niger* の分生子を 0.05% Tween 80 を加えたりん酸生理食塩水 (PBS) で分散させ、トーマ型血球計算盤を用いて検鏡し、およそ  $2 \times 10^6$  spores/mL となるように分生子懸濁液を調整した。

### 2. 実験条件及び実験方法

#### (1) 培養温度がコロニー成長に与える影響

はじめに温度 18, 22, 26, 30, 32, 35°C の条件下で *A. niger* の直径の経時変化を計測し、本研究の目的に適する培養温度について検討した。

測定は、無菌的に分生子懸濁液を PDA 培地 (栄研器材, ポテトデキストロース寒天培地 (顆粒) MB0400 より作成, クロラムフェニコール濃度 50 µg/mL<sup>16)</sup> を加え培地量 20 mL とした) の入ったシャーレの中心部に 5 µL 接種した。ここに、シャーレは各温度条件につき 4 枚用いた。PDA 培地の水分活性は、水分活性測定装置 (Novasina, AWC500, Switzerland) で計測した。培地の水分活性は温度 18°C のとき 0.986, 温度 30°C のとき 0.997 であったため、水分活性の温度依存性は本研究では無視できるものとした。また、温度 30°C で測定 8 日間のシャーレ内のガス濃度をガスクロマトグラフィー (Shimadzu, GC-8A, Japan) を用いて計測した結果、酸素濃度は 20.4% 以上、二酸化炭素濃度は 0.3% 以下であったため、本研究ではガスによる障害はないものと仮定した。

分生子懸濁液が接種されたシャーレはデシケーター内に入れ、デシケーターを各温度に設定したインキュベーター内に暗黒下で静置した。ここに、インキュベーター内の温度は温度計で確認するとともに、デシケーター内にカード式データロガー (Fujita, Co. Ltd., KT-200, 精度 0.5°C) を入れ測定中の温度と湿度を記録した。その結果、デシケーター内の温度は設定温度 ± 0.5°C 以内の精度を保ち相対湿度は 95% 以上であった。

測定は、デシケーターをインキュベーターに入れた時点から開始し、シャーレ内の菌糸マットと分生子形成部の直径を測定開始から 8 日間まで 24 時間毎に計測し、その後 1 週間をもって測定終了とした。計測後は、菌糸マット径と分生子形成部径の経時変化の値を以下のモデルに当てはめた。

はじめに modified Logistic モデルと modified Gompertz モデルは、それぞれ式(1)、式(2)で示される<sup>14)</sup>。

$$N(t) = \frac{A}{1 + \exp\left[\frac{4 \cdot \mu}{A} \cdot (\lambda - t) + 2\right]} \quad (1)$$

$$N(t) = A \cdot \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu \cdot \exp(1) \cdot (\lambda - t)}{A} + 1\right)\right) \quad (2)$$

ここに、 $N(t)$  は測定開始から時間  $t$  (day) 経過したときの菌糸マット径 (mm) あるいは分生子形成部径 (mm) であり、 $A$  は本来は定常期の菌糸マット径 (mm) あるいは分生子形成部径 (mm) であるが、本実験は比較的短い期間の測定であるため、ここではパラメータとして扱う。 $\mu$  は最大増殖速度 (mm/day),  $\lambda$  は誘導期 (day) で、ここでは菌糸マット径あるいは分生子形成部径の増加が見られない期間であり、それぞれパラメータである。上記のモデルは微生物増殖に良く用いられ、誘導期、増殖期、定常期等を予測微生物学的に推算出来る利点がある。一方、Weibull モデル<sup>15)</sup> は故障・亀裂の評価<sup>17)</sup> やリスク評価<sup>18)</sup>、近年は微生物予測モデルとして適用<sup>15)19)20)</sup> され、特に式(3)に示すような 3 変数を持つ Weibull モデルの適合性は高い<sup>21)</sup>。

$$N(t) = A \cdot \left[1 - \exp\left(-\left(\frac{t}{B}\right)^n\right)\right] \quad (3)$$

ここに、 $A, B, n$  はパラメータである。本研究では、式(1)、(2)、(3)のパラメータを、Mathcad2000 (MathSoft, Inc., U.S.) を用いて算出した。

#### (2) 温度変動条件下でのコロニー成長

測定方法は、上述した方法と同様である。測定温度は、後述するようにコロニーの成長の温度による影響を考慮して、上限を 30°C、下限を 20°C と設定した。

測定に用いた温度条件は、① 温度 30°C (1 日), 温度 20°C (1 日) の繰り返し (2 日周期), ② 温度 30°C (1 日), 温度 20°C (1 日), 温度 30°C (2 日) の繰り返し (4 日周期), ③ 温度 20°C (1 日), 温度 30°C (1 日), 温度 20°C (2 日) の繰り返し (4 日周期) とし、それぞれについて菌糸マットと分生子形成部の直径を計測した。これに加えて、条件 ① の平均温度である 25.0°C, 条件 ② の平均温度 27.5°C, 条件 ③ の平均温度 22.5°C について恒温条件で測定を行った。以上の測定は、測定開始から 8 日間まで 24 時間毎に計測し、その後 1 週間をもって終了とした。

菌糸マットと分生子形成部の直径の計測は、ノギス (KANON : KSM-15, 精度 0.05 mm) にて最低 2 箇所の直径を計測し、その平均値をデータとした。ここに、分生子形成部の直径は分生子発芽部分の直径とした。

## 実験結果および考察

### 1. 温度と菌糸マット径・分生子形成部径との関係

はじめに、*A. niger* の菌糸マットおよび分生子形成部、および分生子の発芽は、測定において分生子懸濁液が接種された点を中心として円形に形成された。また、この形成における菌糸マットおよび分生子形成部の形態の変化は既往の報告<sup>13)</sup> と同様であった。Fig. 1 には生育過程 (30°C, 3

目目) のコロニーの写真を示す. ここに示すように生育過程のコロニーは菌糸マット (密生部+伸長部) と, 分生子形成部および熟成部とに大別される<sup>13)</sup>.

Fig. 2 には, 温度 18, 22, 26, 30, 32, 35°C にて生育した *A. niger* の菌糸マット径と分生子形成部径の経時変化を示す. これを見ると, コロニーの成長速度は温度の増加とともに増加したが, 温度 32°C および 35°C の菌糸マット径・分生子形成部径の増殖は温度 30°C と比較し大差は見られなかった. これは高温による成長阻害によるものと考えられる.

次に, 温度 18, 22, 26, 30, 32, 35°C にて生育した *A. niger* の菌糸マット径と分生子形成部径の経時変化の測定

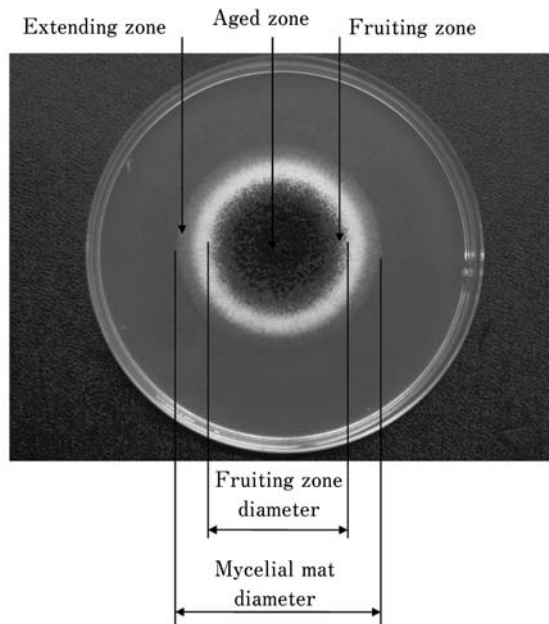


Fig. 1 Explanation for fungal colony of *Aspergillus niger*

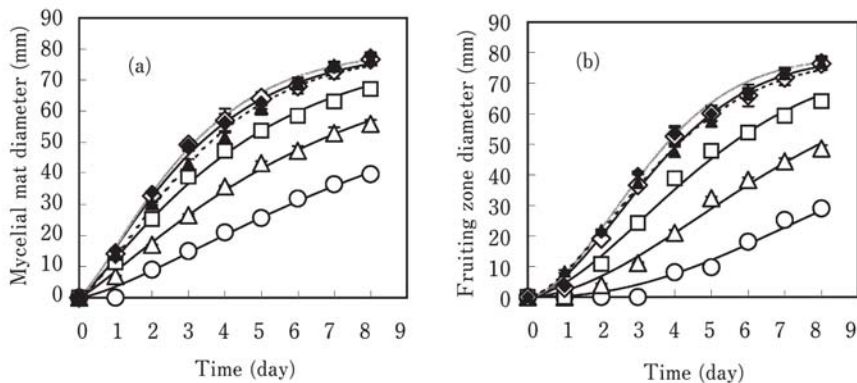


Fig. 2 Changes in mycelial mat diameter (a) and fruiting zone diameter (b) under various temperatures at 18 (○), 22 (△), 26 (□), 30 (◇), 32 (◆) and 35°C (▲)

The curves were simulated using a new Weibull equation (5). Gray colored curves indicate the calculation values at 32°C, and dotted curves indicate the calculation values at 35°C.

値を modified Logistic モデル, modified Gompertz モデル, Weibull モデルで近似した. その RMSE (Root mean squared error : 2 乗平均平方根誤差) を Table 1 に記す.

これを見ると, 今回用いたモデルでは, Weibull モデルが最も測定値を表現できることが示された. また, Weibull モデルは今回使用したモデルでは,  $N(0)=0$  となるため, 計算が複雑とされない利点がある. よって本研究では, Weibull モデルを精度が高く汎用性のあるモデルとして扱う.

次に, 本研究では式 (3) に示す Weibull モデルのパラメータ  $A$ ,  $B$ ,  $n$  をそれぞれ以下の 4 次関数の左辺に代入し温度依存性を求めた.

$$Y(T) = \alpha \cdot T^4 + b \cdot T^3 + c \cdot T^2 + d \cdot T + e \quad (4)$$

ここに,  $a, b, c, d, e$  はパラメータであり,  $T$  は温度 (°C) である. Fig. 3 に Weibull モデルのパラメータ  $A, B, n$  の温度依存性と, 式 (4) により得られた近似曲線を記す.

これより, 本研究では式 (3) の Weibull モデルを新 Weibull 式として式 (5) で表現する. 式 (5) の微分式は式 (6) であり, ここに時間  $t$  は式 (7) で表現される.

$$N(T, t) \Big|_{T=const} = A(T) \cdot \left[ 1 - \exp\left(-\left(\frac{t}{B(T)}\right)^{n(T)}\right) \right] \quad (5)$$

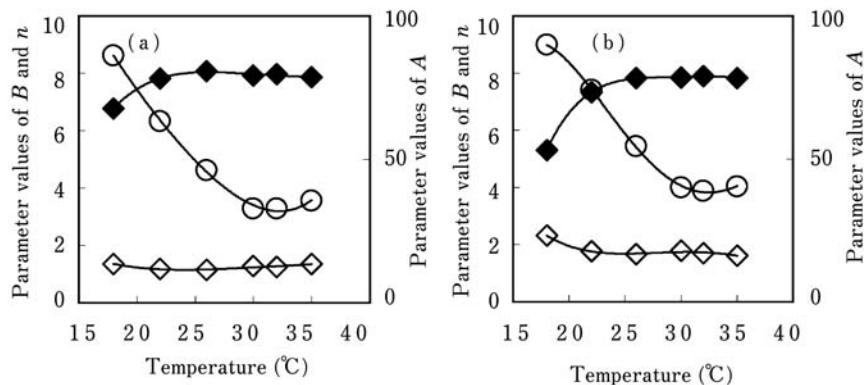
$$\frac{dN(T, t)}{dt} \Big|_{T=const} = A(T) \cdot \left(\frac{t}{B(T)}\right)^{n(T)} \cdot \left(\frac{n(T)}{t}\right) \cdot \exp\left(-\left(\frac{t}{B(T)}\right)^{n(T)}\right) \quad (6)$$

$$t \Big|_{T=const} = \left[ -\ln\left(\frac{-(-A(T) + N(T, t))}{A(T)}\right) \right]^{\frac{1}{n(T)}} \cdot B(T) \quad (7)$$

式 (5) より得られた計算値を Fig. 2 に実線で示す. 計算

**Table 1** Evaluations of the prediction of fungal colony growth of *Aspergillus niger* by modified Logistic model, modified Gompertz model and Weibull model

	Temperature	RMSE		
		Modified Logistic model	Modified Gompertz model	Weibull model
Mycelial mat diameter				
	18	2.789	1.849	1.170
	22	3.464	2.161	0.949
	26	3.934	2.519	1.143
	30	3.468	2.003	1.125
	32	3.554	2.168	1.231
	35	2.872	1.889	1.470
Fruiting zone diameter				
	18	2.479	1.748	1.925
	22	3.401	2.070	1.930
	26	3.904	2.314	2.121
	30	2.973	1.476	1.577
	32	3.369	1.918	1.861
	35	2.329	1.461	1.179
Average		3.211	1.965	1.473



**Fig. 3** Temperature dependencies of parameter values of  $A$  (◆),  $B$  (○) and  $n$  (◇) in Weibull model (3) for mycelial mat diameter (a) and fruiting zone diameter (b)

The curves were fitted by equations (4) using the parameter values at temperature between 18 and 35°C.

値は全ての温度条件で得られた測定値を精度良く一致した (菌糸マットに対して RMSE は 1.387, 分生子形成部径に対して RMSE は 2.045).

なお, 本実験では 18°C では分生子の発芽に時間 (4 日必要) を要すること, 30°C 以上で高温による成長阻害が表れることを考慮し, 温度変動条件の測定は設定温度を 20°C から 30°C とした.

## 2. 温度変動条件における菌糸マット径・分生子形成部径

温度変動条件における菌糸マット径・分生子形成部径の経時変化を Fig. 4 に示す. 図は, 温度変動条件①, ②, ③の測定値 (菌糸マット径と分生子形成部径) と, 式(5)~(7)に時間とそのときの温度を代入して推算<sup>12)</sup>した菌糸マット径と分生子形成部径との比較である. 図中の実線は, その計算結果であり, ○印は温度変動条件 (図中, 凹凸の点線

で示される温度変動条件) で得られた測定値である. 加えて, 図中◆印は温度変動条件の平均温度 (25°C, 27.5°C, 22.5°C) で培養した菌糸マット径・分生子形成部径の測定値で, 式(5)に各条件①, ②, ③の平均温度 (25°C, 27.5°C, 22.5°C) を代入して得られた計算値を曲線 (灰色) で記した.

Fig. 4 を見ると, 温度変動を与えた *A. niger* の菌糸マット径・分生子形成部径は, その平均温度 (25, 27.5, 22.5°C) で培養した測定値と比較 (条件①では 2, 4, 6, 8 日目, 条件②, ③では 4, 8 日目に該当) して Fig. 4 の B 図の 2 日目および F 図の 4 日目以外では, 有意な差 ( $P < 0.05$ ) は見られなかった. これは今回設定した温度変動条件が比較的狭かったこと (18°C では分生子の発芽に時間を要し, 30°C 以上で高温による成長阻害が表れることを考慮し, 20°C ~ 30°C としたこと) に因るものと思われる.

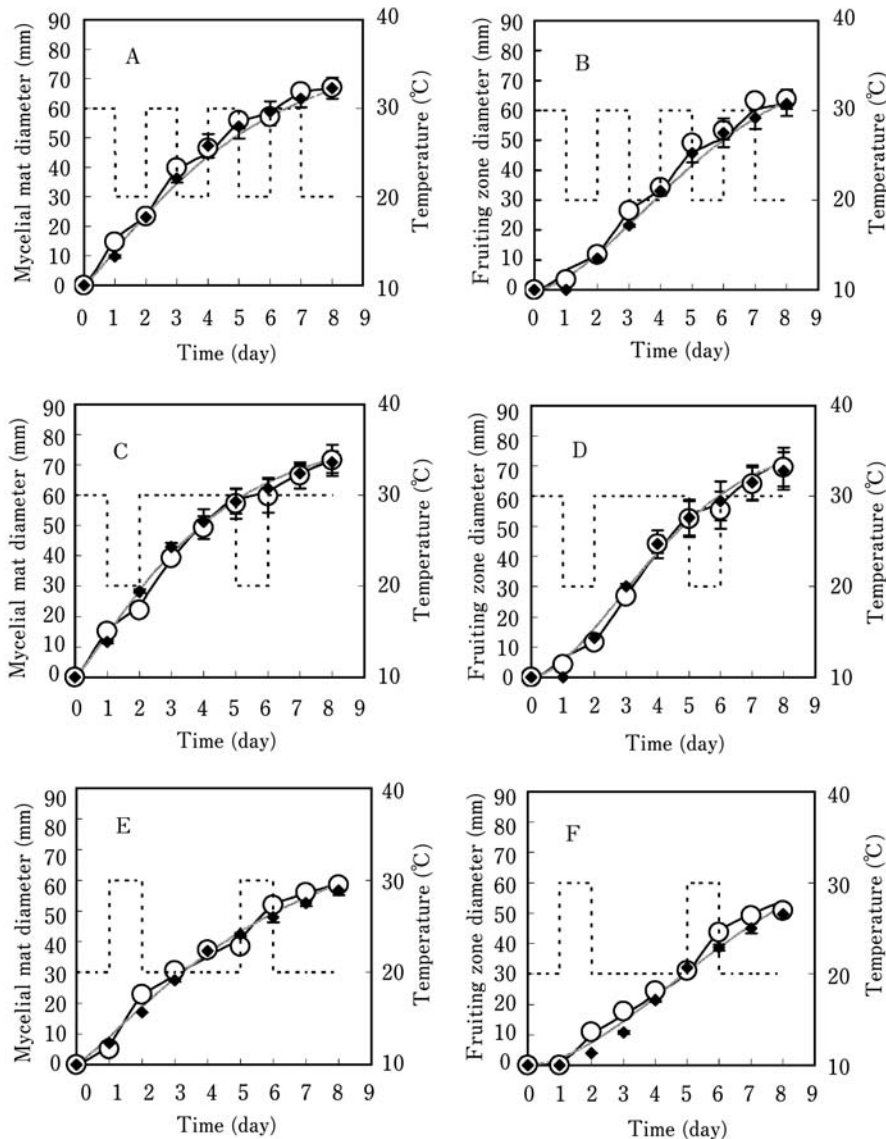


Fig. 4 Changes in mycelial mat diameters (A, C, E) and fruiting zone diameters (B, D, F) at temperature change conditions

○ indicates the mycelial mat or fruiting zone diameter under temperature change conditions. ◆ indicates the mycelial mat or fruiting zone diameter at constant temperatures of 25 (A, B), 27.5 (C, D) and 22.5°C (E, F). The curves were predicted by a new Weibull model with equations (6) and (7), gray line curves were predicted by equation (5) with giving average temperature for each condition. The temperature change conditions applied in those experiments were indicated with dotted lines.

Table 2 には、温度変動に対して式(5)~(7)を用いて得られた計算値、および式(5)に平均温度(25, 27.5, 22.5°C)を代入し得られた計算値と測定値(○印)とを比較し、得られたRMSEを示す。これより、温度変動に対して式(5)~(7)を用いて得られた計算値は、平均温度を式(5)に代入する方法より全ての温度変動条件にて高い精度で近似できた。よって、動的温度に対応するカビコロニーの予測モデルとして新 Weibull モデルは、十分に適用可能であると考えられる。

以上、本研究では温度変動条件でのカビコロニーの成長

予測を試みた結果、良い精度で近似出来た。今後は更に広い温度範囲条件(例えば温度範囲15-40°C)でカビを育成させ温度変動に応答するコロニー径を予測したい。また今回得られた Weibull モデルが食品にて育成するカビコロニーに応用できるか検討したい。

#### 要 約

*Aspergillus niger* を種々の温度条件(18°C~35°C)のもとPDA培地で成長させ、その菌糸マット径と分生子発芽部径(分生子形成部径)の経時変化を計測した。得られたそ

**Table 2** Evaluations of the prediction of fungal colony growth of *Aspergillus niger* under temperature change conditions by a new Weibull model (Eq. 5) and Eqs 6 and 7 with giving moving temperature (WM), and by the model with giving constant temperature at average value of each temperature change condition (WC)

Temperature conditions	Average temperature (°C)	RMSE	
		WM	WC
Mycelial mat diameter			
30°C (24 h), 20°C (24 h)*	25	0.915	2.851
30°C (24 h), 20°C (24 h), 30°C (48 h)*	27.5	1.138	2.775
20°C (24 h), 30°C (24 h), 20°C (48 h)*	22.5	1.233	2.796
Fruiting zone diameter			
30°C (24 h), 20°C (24 h)*	25	1.097	3.795
30°C (24 h), 20°C (24 h), 30°C (48 h)*	27.5	1.079	2.851
20°C (24 h), 30°C (24 h), 20°C (48 h)*	22.5	1.333	2.791
Average		1.133	2.977

\*The program was repeated during measurement

それぞれの測定温度での測定値を modified Logistic, modified Gompertz, Weibull モデルを用いて近似した結果, Weibull モデルが最良の結果を示した. 次に, Weibull モデルのパラメータを温度の関数とし, 温度変化に対応出来る新 Weibull モデルを構築した結果, 計算値は各温度での測定値 (18°C~35°C) を良く表現した. これより, 新 Weibull モデルを用いて温度変動条件 (温度範囲 20°C~30°C) 下での *A. niger* の菌糸マット径・分生子形成部径の経時変化を計測し, 測定値と計算値を比較したところ良好な近似を得た.

本報は, カビについては初めての知見であり, 今後更に広い温度範囲で測定を行い, 温度変動環境下でのカビの制御やカビを用いた発酵に応用したい.

本研究を遂行するにあたり, ご協力頂きました飯田知陽さん, 立石貴浩准教授 (岩手大学農学部), 並びに岩手大学附属動物医学食品安全教育研究センターの品川邦汎教授, 重茂克彦准教授をはじめとするセンターの皆様へ感謝いたします. また, 貴重なご助言を頂きました山口大学理工学研究科の栗山 憲教授に深く謝意を表します.

## 文 献

- 1) 清水 潮, 「食品微生物の科学」(幸書房, 東京), pp. 84-170 (2001).
- 2) 藤井健夫, 「食品の保全と微生物」(幸書房, 東京), (2001).
- 3) Leistner, L. and Gould, G. In "Hurdle Technologies", (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York), (2002).
- 4) Han, B.Z. and Nout, R.J.N., Effects of temperature, water activity and gas atmosphere on mycelial growth of tempeh fungi *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* and *R. microsporus* var. *oligosporus*. *World J. Microbiol. Biotech.*, **16**, 853-838 (2000).
- 5) Lopez, Diaz, T.M., Gonzalez, C.J., Moreno, B. and Otero, A., Effect of temperature, water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium olsonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. *Food Microbiol.*, **19**, 1-7 (2002).
- 6) Pardo, E., Marin, S., Solsona, A., Sanchis, V. and Ramos, A.J., Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. *Food Microbiol.*, **21**, 267-274 (2004).
- 7) Parra, R., Aldred, D., Archer, D.B. and Magan, N., Water activity, solute and temperature modify growth and spore production of wild type and genetically engineered *Aspergillus niger* strains. *Enz. Microbiol. Tech.*, **35**, 232-237 (2004).
- 8) Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J. and Roberts, T.A., Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 419-431 (1994).
- 9) Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M.M. and Shirai K., Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Micromol. Biosci.*, **3**, 582-586 (2003).
- 10) Marin, S., Cuevas, D., Ramos, A.J. and Sanchis, V., Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. *Int. J. Food Microbiol.*, **121**, 139-149 (2008).
- 11) Fujikawa, H. and Morozumi S., Modeling surface growth of *Escherichia coli* on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7920-7926 (2005).
- 12) Corradini, M.G. and Peleg, M., A Weibullian model for microbial injury and mortality. *Int. J. Food Microbiol.*, **119**, 319-328 (2007).
- 13) 柳田友道, 成長・増殖・増殖阻害, 「微生物科学 2」, (学会出版センター, 東京), pp. 277-352 (1980).
- 14) Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. and Riet, K.V., Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1875-1881 (1990).
- 15) Lopez, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoad, M.S. and France, J., Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *Int. J. Food Microbiol.*, **96**, 289-300 (2004).
- 16) 高鳥浩介, かび検査のための具体的操作マニュアル, 「かび検査マニュアルカラー図鑑」, 第1版 (エムエム企画, 東京), pp. 161-171 (2002).

- 
- 17) 小出章二, 田子雅則, 西山喜雄, 胴割れ米とひび割れ米の水浸裂傷, *食科工*, **48**, 69-72 (2001).
- 18) Armstrong, T.W. and Haas, C.N., A quantitative microbial risk assessment model for Legionnaires' disease : animal model selection and dose-response modeling. *Risk Anal.*, **27**, 1581-1596 (2007).
- 19) Yamamoto, K., Matsubara, M., Kawasaki, S., Bari, M.L. and Kawamoto, S., Modeling the pressure inactivation dynamics of *Escherichia coli*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **38**, 1253-1257 (2005).
- 20) Corradini, M.G. and Peleg, M., On modeling and simulating transitions between microbial growth and inactivation or vice versa. *Int. J. Food Microbiol.*, **108**, 22-35 (2006).
- 21) Tjorve, E., Shapes and functions of species-area curves : a review of possible models, *J. Biogeogr.*, **30**, 827-835 (2003).
- (平成 20 年 1 月 25 日受付, 平成 20 年 4 月 11 日受理)
-