

# フルーツ缶詰の酪酸菌による膨張防止に関する研究— I

みかん缶詰について

池上 義昭・岡屋 忠治・沢山 善二郎

下田 吉夫・森 大蔵・奥 正和

## Prevention of Gaseous Spoilage by Butyric Acid Anaerobes in Canned Fruits— I

### In Canned Mandarin Orange

Yoshiaki Ikegami • Chuji Okaya • Zenjiro Sawayama

Yoshio Shimoda • Daizo Mori • Masakazu Oku

Gaseous spoilage in commercially manufactured canned mandarin orange have been known to be caused by yeasts (including *Saccharomyces cerevisiae*), lactic bacteria (*Lactobacillus brevis*) and butyric anaerobes (*Clostridium pasteurianum*).

Spoilage by yeasts and lactic bacteria could be prevented by practising adequate processing. However, it is impossible to destroy the spores of *C. pasteurianum* with the standard commercial process (Fig. 1).

The spoilage is characterized by the formation of large amounts of gases including hydrogen and carbon dioxide. The contents of the can have strong butyric odor (Table. 3).

No spoilage took place in samples buffered to pH below 3.50, even when underprocessed. The spores preferably decreased during storage at 28°C (Fig. 2).

Results obtained from the study on the effect of variation in pH on the growth of *C. pasteurianum* in processed mandarin orange indicated that no spoilage occurred in samples buffered to 3.67 to 3.75. Thirty three percent spoilage was observed at pH 3.90 to 3.97, 92% at pH 4.12 to 4.24 and 100% at pH 4.40 to 4.42 (Table. 5).

In consideration of the safety factor, canned mandarin orange should be adjusted to pH below 3.5, and good sanitary practices in the factory are recommended as possible means of preventing spoilage by *C. pasteurianum*.

## 緒 言

果実の如き酸性缶詰の微生物による膨張変敗について酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>1)</sup>, 乳酸菌 (*Lactobacillus brevis*)<sup>2)</sup>, 酪酸菌 (*Clostridium pasteurianum*)<sup>3)4)</sup>がよく知られている。みかん缶詰においては主に酵母による膨張が多くみられるが、酪酸菌による膨張もわずかながら認められ

る<sup>2)</sup>。

酵母、乳酸菌は比較的耐熱性が弱いので殺菌を十分に行なえば問題がないと思われるが、酪酸菌である *C. pasteurianum* は孢子形成菌であり、しかもみかん缶詰の副原料である砂糖中に存在することが認められているので<sup>2)</sup>、みかん缶詰変敗原因菌として大いに考慮されなければならない。そこで我々はこれによる膨張変敗を防止するための一助として2、3の検討を行なった。

## 実験材料および方法

### 1. 供試菌株

桃缶詰の変敗缶より分離した菌株 (F-1) を使用した。

### 2. 細菌同定法

形態学的、生理学的性状につき主として成書の方法にしたがって実施した。

### 3. 孢子懸濁液調整法<sup>5)</sup>

含糖肉汁寒天 (肉エキス 1.0%, ポリペプトン 1.0%, グルコース 0.3%, 食塩 0.1%, 寒天 2.3%) 平板上に 10日間 28°C で嫌気培養して孢子を形成せしめ、その孢子を白金耳でかき集め、みかん搾汁液 (pH3.5) に懸濁、次に孢子塊をできるだけこわすために振とうし、東洋ろ紙 No. 5 B でろ過、85°C、10分加熱後冷蔵保存した。

### 4. 孢子数測定法

PE-2 培地 (ポリペプトン 2%, グルコース 0.3%, ピースを培地 10ml に 5~6 個) を使用して最確数算出 (MPN) により測定した。

### 5. 孢子的耐熱性測定法

孢子懸濁液を小試験管に 1 ml ずつ分注し、先端をバーナーで密封、次に各温度の湯浴中で各加熱時間につき 4 本ずつ一緒に加熱する。一定時間加熱後 4 本同時に取り出して流水中で急冷、この 4 本を一緒に混ぜ合せ最確数算出方法により孢子数を測定し孢子の減少をみた。(なお加熱の lag period を各加熱温度とも一応 30 秒と決め、それ以後の時間を加熱時間とした)

### 6. みかん缶詰製造法

常法に従いみかん原料を 90°C 1分湯通し、剥皮、風乾、身割後 0.7% 塩酸で 32°C 50分処理、水洗後更に 0.5% カセイソーダで 32°C 15分処理、1時間水晒後 5号缶に 240g 肉詰し、36% シラップ 80g 注入後巻締し、80°C 10分 20rpm で殺菌。

### 7. 有機酸分析法

ホモゲナイズした試料 100g を硫酸で pH 2.0 に調節し、ソックスレー液体抽出器にてエーテルで 120時間連続抽出を行ない、エーテル除去後定容 (10ml) とする。そのサンプル 2ml をシリカゲルカラムを用いてパーティションクロマトグラフィーで分別定量した。展開剤はクロロホルム、*n*-ブタノールである。

### 8. ガス分析法

島津ガスクロマトグラフ GC-1 B を使用し、カラムはシリカゲル、モレキュラーシーブ 5 A を

Table. 1 Number of butyric anaerobes in canned mandarin orange samples on the market.

Samples	Net wt (g)	pH	Brix	Butyric anaerobes /100ml	Bacteria /100ml
A-1	327	3.24	19.5	<20	<20
-2	325	3.20	18.5	<20	<20
B-1	327	3.43	18.0	<20	<20
-2	322	3.40	18.0	<20	<20
C-1	316	3.43	18.0	<20	20
-2	321	3.42	18.0	<20	<20
D-1	327	3.33	18.0	45	170
-2	328	3.33	17.5	20	78
E-1	322	3.28	18.0	<20	1700
-2	325	3.30	18.0	40	2200

Table. 2 Morphological and cultural characteristics.

		<i>C. pasteurianum</i>	D-1-3	E-1	F-1
Cell	Form Size	Rods 0.9~1.7x 3.5~4.7 $\mu$	Rods 0.7x3.0 ~4.0 $\mu$	Rods 0.6~0.7 x3.5 $\mu$	Rods 0.6~0.7x 3.0~4.5 $\mu$
Spore	Shape Position	Ovoid Subterminal	Ovoid Subterminal	Ovoid Subterminal	Ovoid Subterminal
Motility		+	+	+	+
Gram stain		+	+	+	+
Gelatin liquefaction		-	-	-	-
Iron milk		±	-	-	-
Indol production		-	-	-	-
Hydrogen sulfide production		-	-	-	-
Action on nitrate		-	-	-	-
Glucose		A+ G+	A+ G+	A+ G+	A+ G+
Fructose		+ +	+ +	+ +	+ +
Galactose		+ +	+ +	+ +	+ +
Mannose		+ +	+ +	+ +	+ +
Arabinose		+ +	- -	- -	- -
Xylose		+ +	- -	- -	- -
Rhamnose		- -	- -	- -	- -
Maltose		+ +	+ +	+ +	+ +
Lactose		- -	- -	- -	- -
Sucrose		+ +	+ +	+ +	+ +
Raffinose		+ +	+ +	- -	+ +
Starch		+ +	+ +	+ +	+ +
Inulin		+ +	+ +	+ +	- -
Glycogen		- -	- -	+ +	- -
Mannitol		+ +	+ +	+ +	+ +
Relation to free oxygen		Strictly anaerobes	Strictly anaerobes	Strictly anaerobes	Strictly anaerobes
Optimum temperature		25°C	28°C	28°C	28°C

使用, カラム温度 40°C, キャリアーガスはアルゴン (25ml/min) で行なった。

## 実験結果および考察

### 1. 市販みかん缶詰中の酪酸菌

製造後1~2カ月経過した市販みかん缶詰を5社の製品について各2缶ずつ調べた結果表1に示すごとくD社, E社の製品より酪酸菌がわずかながら生存していた。これらの缶詰中には他の一般生菌数も多い。これらのことから酪酸菌がみかん缶詰の変敗原因となりうる事がわかる。

D社の製品から分離したD-1-3, E社から分離したE-1および供試菌株のF-1について形態学的, 生理学的性状を調べた結果, 表2に示すごとく *C. pasteurianum* と一致する。

### 2. 有機酸とガスの生成

この細菌による炭水化物の代謝を調べるために有機酸とガス組成を培養基 (ポリペプトン2%, グルコース0.5%, チオグリコール酸ソーダ0.05%) とみかん缶詰 (クエン酸ソーダを添加してpHを上げた) について測定した結果は表3のとおりである。

主に酪酸の増加が認められその他酢酸, 乳酸が多い。ガスは水素ガスが約70%で炭酸ガスは30%である。

### 3. 耐熱性

孢子濃度  $10^5$ /ml の孢子懸濁液を使用して, 82°C, 90°C, 95°C における死滅速度を測定した結果は図1に示すとおりである。

この結果よりみかん缶詰の殺菌 (80°C~82°C, 10分) ではほとんど死滅せず, これを完全に死滅させるには100°C, 数10分の殺菌が必要

Table 3 Production of organic acid and gas.  
(Culture and canned mandarin orange)

Organic acid and gas	Culture medium* mg %	Canned mandarin orange	
		Normal mg %	Fermented mg %
Butyric	114.5	—	57.7
Propionic	5.1	4.9	5.0
Acetic	35.3	13.9	31.5
Fumaric	18.5	2.7	7.6
$\alpha$ -Ketoglutaric	4.1	10.7	4.4
Lactic	23.5	4.0	14.2
Pyroglutamic	12.1	19.8	23.0
Malic	—	33.1	26.7
Citric	—	424.0	404.8
Hydrogen	71%	—	72%
Carbon dioxide	29%	—	19%

\* Polypeptone 2%  
Glucose 0.5%  
Sodium thioglycollate 0.05%

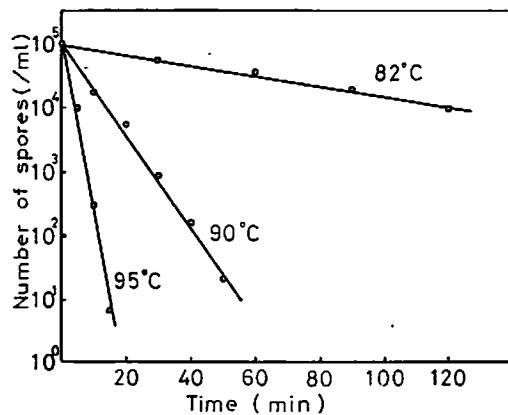


Fig. 1 Survival curves of butyric spores at various temperature.  
(Spores suspended in orange juice, pH 3.5)

になってくる。これは実際的に不可能である。

#### 4. 発育と pH の関係

死滅しないで生き残っている胞子を発育させないためにはいかにすべきか。これには pH を下げる以外はないと思われる。みかん搾汁液を培地として pH と発芽の関係をみると表 4 に示す如く、胞子濃度  $10^5$ /ml の時は pH 4.2,  $10^3$  の時は pH 4.4,  $10^1$  の時は 4.6 以下では発芽しない。しかしこれは培地としてみかん搾汁液を使用したので実際のみかん缶詰の場合と異なる。

表 5 はみかん缶詰の pH と膨張の関係を調べた結果である。この場合のみかん缶詰はシラップ中にクエン酸ソーダを添加し

て、また胞子  $10^5$  個加えて常法により製造した。シラップと果肉の pH を平衡にさせるために製造後  $5^\circ\text{C}$  に 1 カ月冷蔵した。冷蔵後各 pH 区 3 缶ずつ pH を調べるとだいたい平衡に達していたのでこれから  $28^\circ\text{C}$  に貯蔵し各区 12 缶ずつ行なった結果である。これより pH 4.40 ~ 4.42 では 8 日目まで全部、pH 4.12 ~ 4.24 では 15 日目までに 11 缶膨張し、pH 3.90 ~ 3.97 では膨張が遅れ、25 日目から膨張し始め 200 日目に膨張するものもあった。pH 3.75 以下では膨張しなかったが、安全率をみて pH 3.5 以下にすべきではなからうか。

図 2 に示すごとくみかん缶詰の pH を 3.5 以下に調整すれば生き残っていた胞子は貯蔵中に減少する。

Table 4 Effect of pH on germination of butyric spores of various concentration.

pH	Spore concentration		
	$10^5$ /ml	$10^3$ /ml	$10^1$ /ml
4.2	- - - -	- - - -	- - - -
4.4	+ - - -	- - - -	- - - -
4.6	+ + + -	+ + - -	- - - -
4.8	+ + + +	+ + + -	+ - - -

Table 5 Effect of pH on growth of *C. pasteurianum* in canned mandarin orange

pH	Storage period (days)										Fermented (%)
	4	6	8	10	12	15	25	30	70	200	
3.67~3.75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.90~3.97	0	0	0	0	0	0	1	2	3	4	33
4.12~4.24	0	0	2	6	10	11					92
4.40~4.42	6	11	12								100

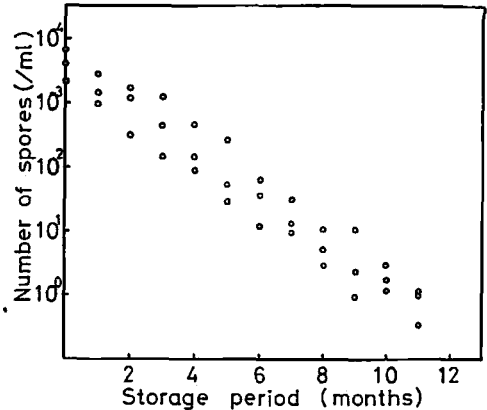


Fig. 2 Decrease of spores in canned mandarin orange during storage at  $28^\circ\text{C}$ .

## 要 旨

*C. pasteurianum* は胞子形成の偏性嫌気性菌で  $28^\circ\text{C}$  の至適温度を持ち、低い pH 域においても発育可能である。その胞子の耐熱性し比較的強く従来の殺菌加熱では死滅させることはできず、

pH を 3.5 以下に調整することによってその発育を抑えることができる。しかしそれより重要なことは工場内の衛生管理を十分に行ない、原料および副原料の酪酸菌による汚染をなくすことである。

#### 文 献

- 1) 河端・内藤：缶詰時報, 27 (10) 45—59, 1948.
- 2) 熊倉・皿中・茂木：缶詰時報, 37 (11) 62—98, 1959.
- 3) C. H. Spiegelberg : Food Research, 5 115—129, 1940.
- 4) J. F. Bowen; C. C. Strachan and W. Moys : Food Technol, 8, 239—241, 1954.
- 5) 天羽・坂口：日農化誌, 25 (7) 104—108, 1951.