

最近のみかん缶詰の膨脹変敗について*¹

中山 昭彦・新屋理恵子

Recent Spoilage of Canned Mandarin Oranges Resulting in Swells

Akihiko Nakayama and Rieko Shinya

The principal characteristics of two strains isolated from swollen canned mandarin oranges, i. e., gram-positive, rod-shaped, spore-forming, facultative-anaerobic, and catalase-negative, indicate that they are identified as a member of the genus *Sporolactobacillus*.

Thermal death times at 90 °C of the spores of the strains ranged from 35 min. to 55 min. The amounts of lactic acid in the swollen cans were ten times greater than those in the normal cans. And also when grown in PE-2GC, the strains produced over ten times more lactic acid than that in the medium. Therefore, the strains are causative of the spoilage.

The strains could grow in 0.4 % of citric acid with pH 2.5 or higher, the conditions in which commercial canned mandarin oranges fall. However, the germination and/or outgrowth of the spores did not occur below pH 3.5.

Therefore, one possible approach to prevent the spoilage is as follows : pH values of canned mandarin oranges are adjusted under 3.5 to inhibit the germination and/or outgrowth of the spores, thus the commercial sterility of the canned mandarin oranges is maintained.

みかん缶詰の膨脹変敗原因菌には、酵母 (*Saccharomyces* 属)¹⁾、酪酸菌 (*Clostridium pasteurianum*)²⁾ および、乳酸菌 (*Lactobacillus brevis*)²⁾ の以上 3 種類がよく知られている。

しかし、以上の原因菌とは異なり、胞子を形成し、クエン酸よりガスを産生する一種の乳酸菌と思われる細菌によるみかん缶詰の膨脹変敗が、ここ 7・8 年程の間に時々みられている。^{*2} 著者らは、1978 年製造の市販みかん缶詰の膨脹缶より、類似の細菌を分離し、この膨脹変敗原因菌に対する対策の確立を目的に、当変敗を微生物学的に検討した。

実験材料および方法

1. 供試みかん缶詰

Table 1 に示した K 社みかん缶詰 (4 号缶)、正常缶 4 缶、膨脹缶 4 缶の計 8 缶を用いた。

2. 細菌の検出および分離

正常缶および変敗缶からの細菌の検出には、TGC 培地³⁾ および PE-2GC 培地を用い、35°C で培養した。なお、PE-2GC 培地は、PE-2 培地⁴⁾ にグルコースとクエン酸をそれぞれ 1 % ずつ添加した培地 (pH5.0) である。次に、細菌の純粋分離は、PE-2GC 培地を増菌培地として用い、35°C 1 ~ 2 日培養液をポテトデキストロース寒天培地 (PDA)⁵⁾ に接種してコロニーを形成させることにより行った。分離菌株は、PE-2GC 培地中で保存した。

*¹ 本論文の概要は日本缶詰協会第27回技術大会 (昭和53年11月16日東京) にて発表。

*² 池上: 私信, 未発表。

Table 1. Normal and swollen canned mandarin oranges

Sample No.	Contents			Note
1	Mandarin oranges in syrup	540 g	8203*	Normal can
2	Mandarin oranges in syrup	534	8203	
3	Mandarin oranges in syrup	536	8204	
4	Mandarin oranges in syrup	543	8204	
5	Mandarin oranges in syrup	536	8203	Swollen can
6	Mandarin oranges in syrup	535	8203	
7	Mandarin oranges in syrup	545	8204	
8	Mandarin oranges in syrup	536	8204	

* Japanese code for the date of production: First, second, and third and fourth numbers show the year, month, and day, respectively.

3. 孢子形成および耐熱性の側定

孢子形成用培地には、MRS培地⁶⁾、TM培地⁷⁾、Glucose-yeast extract - CaCO₃ - MnSO₄培地 (GY - CaMn培地)⁸⁾、Nutrient Broth(Difco)、および、そのpHを6.4と5.5にした培地を用いた。孢子形成は35°Cで10日間とした。なお、MRSで35°C 2日培養後、集菌し、3種類のNutrient Brothへ移す方法による孢子形成の検討も行った。

孢子数の測定は、培養液を80°C10分加熱処理したものを孢子懸濁液とし、PE-2GCを用いMPN法で行った。耐熱性測定は、この孢子懸濁液を用い、TDTチューブ法(90°C)で行った。なお、後培養はPE-2GC培地を用いた。

4. 分離菌株の検査

グラム染色、カタラーゼ、運動性、Hugh & Leifson試験、アルギニンからのアンモニアの生成、硝酸塩の還元、および糖からの酸の生成は、HarriganとMcCanceの方法⁹⁾により行った。孢子の確認は培養液を80°C10分加熱処理後PE-2GCへ接種し、その後の増殖の有無により行った。45°Cおよび15°Cでの増殖の有無はPE-2GC培地で行った。グルコースからのガスの産生はPE-2培地にグルコースを、クエン酸からのガスの産生はPE-2培地にクエン酸をそれぞれ1%添加した培地で行った。エスクリンの加水分解は、坂崎の方法¹⁰⁾により行った。

5. 乳酸の定量

BarkerとSummersonの方法¹¹⁾で行った。

6. PE-2培地中で増殖と発芽および発芽後成育におよぼすpHとクエン酸の影響

pHを約0.5間隔で2.5から5.0まで5段階とり、その各々のpHについてクエン酸の濃度を0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5および2.0%の8段階にした計40種類のPE-2培地を調整した。なお、すべての培地にはグルコースを1%添加した。

増殖におよぼす影響は、増殖の対数期と思われる培養液を、また発芽および発芽後成育におよぼす影響は、10²~10³/mlの孢子懸濁液を、それぞれ1.0mlずつ接種し、ガス産生までの時間を比較することにより行った。

7. 缶詰みかん中での増殖と発芽および発芽後成育におよぼすpHの影響

缶詰みかんを使用した培地の調製法はFig. 1に示した。即ち、みかん缶詰の正常缶を無菌的に開缶し、pHを3.3, 4.5, および5.5に調整し、滅菌試験管に分注する。これを100°Cで15分の加熱処理後、直ちに滅菌流動パラフィンを重ねし、冷却する。なお、加熱処理後のpHはそれぞれpH3.3, 4.0, および4.4であった。細菌の接種は前述のPE-2培地を使った場合と同様に行った。

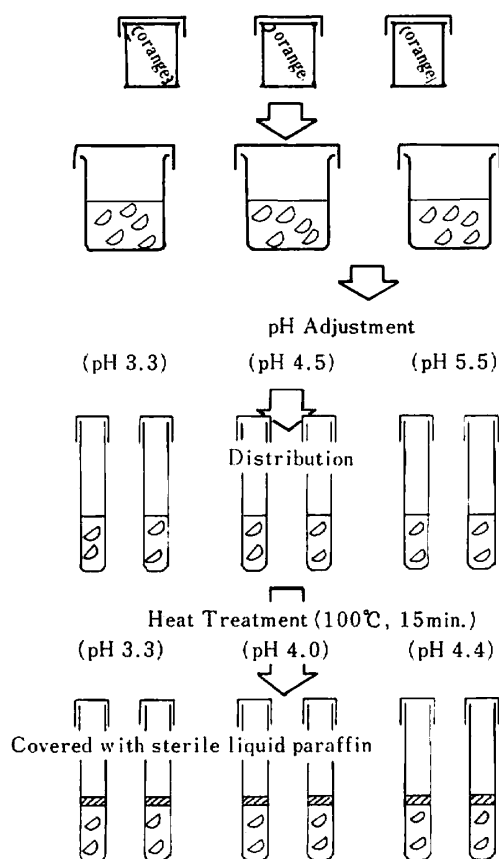


Fig.1. Preparation of media with canned oranges

Table 2. PH values of normal and swollen cans

Sample No.	pH	Note
1	3.5	Normal
2	3.6	
3	3.6	
4	3.6	
5	4.0	Swollen
6	4.0	
7	3.8	
8	4.1	

Table 3. Determination of lactic acid in normal and swollen cans

Sample No.	Lactic acid	Note
1	15.0 mg%	Normal
2	7.5	
7	157.5	Swollen
8	232.5	

結 果

1. 供試みかん缶詰の官能的観察, pH, および乳酸量

正常および膨脹缶の pH を Table 2 に示した。当膨脹変敗は、このように、正常に比較して pH が約 0.5 程度上がる。変敗缶内容物はアルコール臭および酪酸臭もなく正常缶のものと大きな差は認められなかった。

正常缶と膨脹缶の液汁中の乳酸量を Table 3 に示した。膨脹缶の乳酸量は正常缶のそれと比較して 10~30 倍増加していた。

2. 細菌の検出および分離

Table 4 に、細菌の検出結果を示した。サンプル No. 1 ~ 4 の正常缶からはいずれの培地とも細菌は検出されず、サンプル No. 5 ~ 8 の膨脹缶からはいずれの培地でも細菌が検出され、PE-2GC の場合、ガスの産生がみられた。

この PE-2GC を PDA に接種し、得られたコロニーを PE-2GC に釣菌し、純粋分離菌株とした。純粋分離菌株はサンプル No. 7 および 8 から得られ、それぞれ、Strain A と Strain B とした。

3. 孢子形成条件の検討

孢子形成条件の比較は 6 種類の培地を使用し、9 条件により行った。その結果を Table 5 に示した。TM 培地以外の培地では Strain A および Strain B は増殖したが、MRS 培地、GY-CaMn

培地および Nutrient Broth (pH5.5) では孢子は形成されなかった。Nutrient Broth および Nutrient Broth (pH6.4) でそれぞれ $10\sim 10^3/\text{ml}$ 程度孢子形成がみられ, MRS 培地から3種類の pHの異なる Nutrient Broth へ移した場合も $10\sim 10^2/\text{ml}$ 程度の孢子形成がみられた。

以上の結果から, 孢子形成は pH6.4の Nutrient Broth を用い, 35°C 10日培養を孢子形成条件とした。

Table 4. Detection of microorganisms from normal and swollen cans *¹


Sample No.	PE-2GC		TGC		Note
1	—	—	* ²	—	Normal
2	—	—	—	—	
3	—	—	—	—	
4	—	—	—	—	
5	+* ³	+* ³	+	+	Swollen
6	+* ³	+* ³	+	+	
7	+* ³	+* ³	+	+	
8	+* ³	+* ³	+	+	

*¹ Duplicate examinations.

*² + : growth of microorganisms was indicated by the turbidity of the media, — : no growth.

*³ Gas was formed.

Table 5. Sporulation of Strain A and Strain B in several media

Medium	Strain A	Strain B
MRS medium * ¹	—	—
TM medium * ²	No growth	No growth
GY-CaMn medium * ³	—	—
Nutrient broth	3.3×10^2	4.9×10^2
Nutrient broth (pH: 6.4)	3.3×10^2	1.3×10^3
Nutrient broth (pH: 5.5)	—	—
MRS medium	1.7×10^2	7.9×10^2
(incubated for 2 days) 	Nutrient broth (pH: 6.4)	4.9×10^2
	Nutrient broth (pH: 5.5)	7.0×10^2

*¹ J.C.de Man et al.(See reference 6).

*² K.Kitahara and C.Lai(See reference 7).

*³ K.Kitahara and J.Suzuki(See reference 8).

4. 孢子の耐熱性

前述の条件で孢子形成を行い, 80°C 10分加熱処理された培養液を孢子懸濁液として, 90°C で耐熱性を測定した結果を Table 6 に示した。この場合の Strain A と Strain B の加熱致死時間は35分と55分であった。

5. 分離菌株の性状

主な生物性状は Table 7 に示した。Strain A および Strain B ともグラム陽性, カタラーゼ陰性の孢子形成菌で, グルコースからはガスは産生せず, クエン酸よりガスを産生する。なお, サリシンとメリビオースからの酸の生成で, Strain A と Strain B で相異がみられた。

Table 6. Heat resistance of spores of Strain A and Strain B

Time(minutes) at 90°C	Strain A	Strain B
20	+ +	+ +
25	+ +	+ +
30	+ —	+ +
35	— —	+ +
40	— —	+ +
45	— —	+ —
50	— —	+ —
55	— —	— —
60	— —	— —

Concentration of spores: Strain A; $3.3\times 10^2/\text{ml}$, Strain B; $1.3\times 10^3/\text{ml}$.

Strain Aおよび Strain Bをそれぞれ35°Cで8日および5日培養したPE-2GC培地中の乳酸量を Table 8 に示した。いずれの場合も, PE-2GC培地に比較して10倍以上の乳酸の生成がみられた。

Table 7. Characteristics of Strain A and Strain B

Character & reaction	Strain A	Strain B
Gram stain	+	+
Catalase	-	-
Spore	+	+
Motility	-	-
Growth (in PE-2GC)		
at 45°C	-	-
at 15°C	-	-
Hugh & Leifson (glucose)	F*	F*
Gas from		
glucose	-	-
citrate	+	+
Hydrolysis of esculin	+	+
NH ₃ from arginin	-	-
Nitrite from nitrate	-	-
Acid from		
arabinose	-	-
galactose	+	+
lactose	-	-
maltose	+	+
mannitol	+	+
melezitose	+	+
melibiose	-	+
raffinose	+	+
salicin	-	+
sorbitol	-	-
trehalose	+	+

* Fermentation.

Table 8. Lactic acid produced by Strain A and Strain B

Strain	Lactic acid
A	1300 mg%
B	1475
PE-2GC*	115

* Control (without inoculation).

6. 増殖におよぼす pH およびクエン酸の影響

増殖におよぼす pH およびクエン酸の影響は Fig. 2 および Fig. 3 に, それぞれ Strain A および Strain B の結果を示した。両菌株とも, クエン酸濃度 0.4% 以上では, 実験を行った pH 約 2.5 以上で, ガス産生の増殖を示した。ガス産生の至適クエン酸濃度は 0.4~0.6%, その至適 pH は 3.5~4.0 附近にあった。

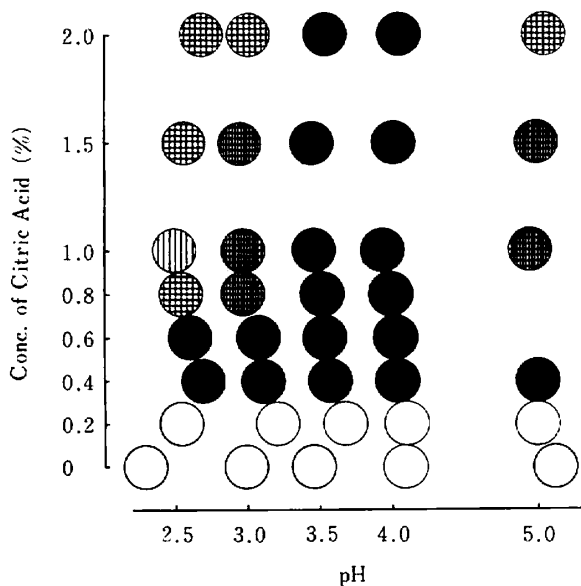


Fig. 2. Effects of pH and the concentration of citric acid on growth of Strain A in PE-2 with 1% glucose added

- : gas produced during the first half-day's incubation.
- ⊗ : gas produced during the second half-day's incubation.
- ▣ : gas produced during the second day's incubation.
- ▤ : gas produced after the second day's incubation.
- : no gas produced.

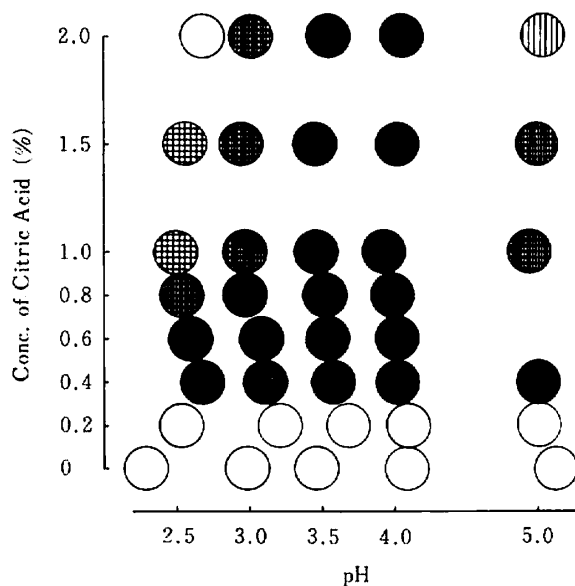


Fig. 3. Effects of pH and the concentration of citric acid on growth of Strain B in PE-2 with 1% glucose added

- : gas produced during the first half-day's incubation.
- ⊗ : gas produced during the second half-day's incubation.
- ▣ : gas produced during the second day's incubation.
- ▤ : gas produced after the second day's incubation.
- : no gas produced.

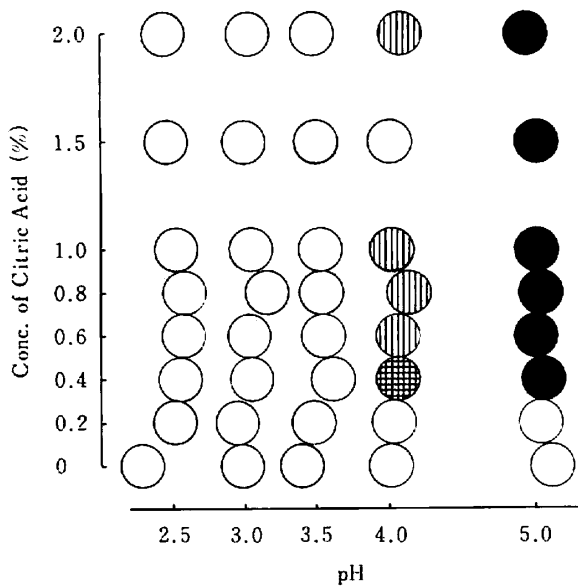


Fig. 4. Effects of pH and the concentration of citric acid on germination and/or outgrowth of Strain A in PE-2 with 1% glucose added

- : gas produced before the fifth day's incubation.
- ⊗ : gas produced during the fifth and sixth day's incubation.
- ▤ : gas produced after the sixth day's incubation.
- : no gas produced.

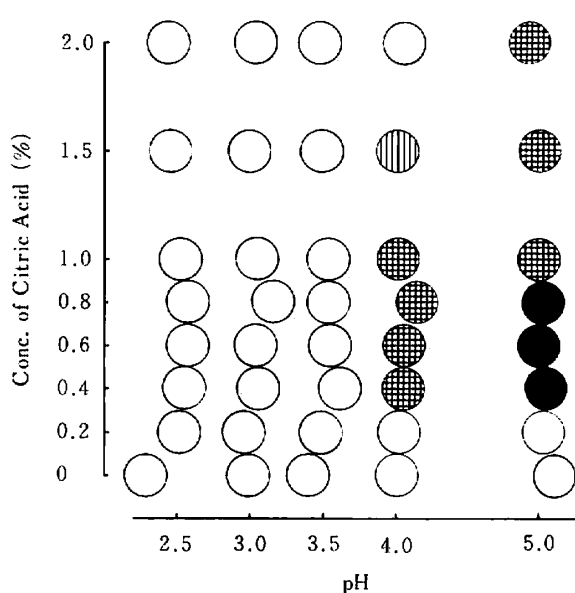


Fig. 5. Effects of pH and the concentration of citric acid on germination and/or outgrowth of Strain B in PE-2 with 1% glucose added

- : gas produced before the fifth day's incubation.
- ⊗ : gas produced during the fifth and sixth day's incubation.
- ▤ : gas produced after the sixth day's incubation.
- : no gas produced.

7. 発芽および発芽後成育におよぼす pH およびクエン酸の影響

Strain A および Strain B の結果をそれぞれ Fig. 4 および Fig. 5 に示した。両菌株とも pH 5.0 付近で発芽および発芽後成育はよく、pH 4.0 になると発芽および発芽後成育までの lag が長くなり、pH 3.5 以下では発芽または発芽後成育がみられなくなった。クエン酸の濃度の影響は実験した濃度範囲では、ほとんどみられないが、濃度が高くなるほど lag が長くなった。

8. 缶詰みかん中での増殖と発芽および発芽後成育におよぼす pH の影響

各々の pH に調整した缶詰みかん中で、2 週間培養した Strain A の結果を Table 9 に示した。無接種のコントロールは全て - であり、当培地の調製には問題がなかった。

Table 9. Effect of pH on growth and germination and/or outgrowth of Strain A in canned oranges

Inoculation	pH of canned oranges		
	3.3	4.0	4.4
Vegetative cells inoculated	+++++	+++++	+++++
Spores inoculated	-----	-+-+-	-++++
Control (without inoculation)	-----	-----	-----

* +: growth of the bacteria was indicated by the turbidity and gas formed of the media, -: no growth.

増殖においては、即ち栄養細胞接種では、いずれの pH でも 5 本とも培養 1 週間でガスの産生が確認された。発芽および発芽後成育の場合、pH 4.4 で 4 本、pH 4.0 で 2 本、ガスの産生がみられたが、pH 3.3 ではすべてガスの産生はみられなかった。また増殖、発芽および発芽後成育ともいずれの場合も、pH が低いほどガス産生までの lag が長くなっていた。

考 察

分離菌株 (Strain A および Strain B) の胞子の耐熱性 (90°C での加熱致死時間が 35~55 分) (Table 6) は、通常のみかん缶詰の殺菌 (82~84°C で 11~13 分) には十分耐えるものと思われた。また、膨脹缶中の乳酸量は正常缶のその 10~30 倍に増加し、また Strain A および Strain B を PE-2 GC 培地中で培養した場合も、これら菌株は培地中の乳酸を 10 倍以上に増加した。したがって、Strain A および Strain B は明らかに、当膨脹変敗原因菌であると考えられる。

これら分離菌株の主な性状は、グラム陽性、桿菌、孢子形成、通性嫌気性、カタラーゼ陰性、および、乳酸生成である。Bergey's manual^{12,13)}によれば、孢子形成の通性嫌気性細菌の桿菌は *Bacillus* 属と *Sporolactobacillus* 属である。このうちカタラーゼ陰性は *Sporolactobacillus* 属である。したがって、分離菌株は *Sporolactobacillus* 属に属するものと思われる。*Sporolactobacillus* 属の唯一の種 *Sporolactobacillus inulinus* は、ホモ乳酸酸酵を行い、また分離菌株も乳酸を生成する (Table 8)。したがって、分離菌株は *Sporolactobacillus inulinus* に近い乳酸菌の一種と考えるのが妥当であろうが、以上の実験結果だけでは完全な同定はできない。

PE-2 GC 培地での増殖と発芽および発芽後成育におよぼす pH およびクエン酸の影響に関する実験結果から、原因菌株は、通常のみかん缶詰の pH 3.3~3.6、クエン酸濃度 0.6~0.7% の範囲内では、ガスを産生し増殖する。しかし、発芽および発芽後成育の最低 pH は 3.5 と 4.0 の間にあり、pH 3.5 以下では発芽または発芽後成育が阻害された (Figs. 1, 2, 3 そして 4)。また、缶詰みか

んを培地として用いた場合でも同様の結果が観察された (Table 9)。

したがって、通常のみかん缶詰の殺菌では当変敗原因菌の胞子は生残しうるが、製品のpHを3.5以下に調整し、その発芽または発芽後成育を阻害することにより商業的無菌性を保持するという変敗防止策が考えられる。しかし、実際には、菌株および製品内容組成の相異が胞子の発芽または発芽後成育の阻止 pHに影響するものと考えられるため、その pHにはある程度幅があると思われる。また、pHが低いほどガス産生までの lagが長いという今回の実験結果からも、製品の pHは低い方がより安全である。いずれにしても、今後みかん缶詰の製造にあたっては、今まで以上に適正に pHを調整することが肝要であろう。

文 献

- 1) 河端俊治・内藤正一：缶詰時報，27，(10)，59 - 45 (1948).
- 2) 熊倉 悟・田中昭二・茂木幸夫：缶詰時報，37，(12)，98 - 62 (1958).
- 3) Burnett,G.W.,Pelczar,M.J.Jr.,and Conn,H.J.:1957. "Manual of Microbiological Methods" (ed.by Conn,H.J.), p. 37 - 63 ,McGraw-Hill Book Co.,Inc.,New York.
- 4) Folinazzo,J.F.and Troy,V.S.:Food Technol.,8, 280 - 281 (1954)
- 5) Harrigan,W.F.and McCance,M.E.:1976. "Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology", p. 360 ,Academic Press,London.
- 6) de Man,J.C.,Rogosa,M.,and Sharpe,M.E.:J.appl.Bact.,23, 130 - 135 (1960).
- 7) Kitahara,K.and Lai,C.:J.Gen.Appl.Microbiol.,13, 197 - 203 (1967).
- 8) Kitahara,K.and Suzuki,J.:J.Gen.Appl.Microbiol.,9, 59 - 71 (1963).
- 9) Harrigan,W.F.and McCance,M.E.:1976. "Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology", p.10, 12, 68 - 69, 71 - 73, 78 - 79, Academic Press,London.
- 10) 坂崎利一：新細菌培地学講座 上，近代出版，東京，p. 354 - 355 (1978).
- 11) Barker,S.B.and Summerson,W.H.:J.Biol.Chem.,138, 535 - 554 (1941).
- 12) Gibson,T.and Gordon,R.E.:1974. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed." (ed.by Buchanan,R.E.and Gibbons,N.E.), p. 529 - 550, The Williams & Wilkins Co.,Baltimore.
- 13) Kitahara,K.:1974. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed." (ed.by Buchanan,R.E.and Gibbons,N.E.), p. 550-551, The Williams& Wilkins Co.,Baltimore.