

有芽胞乳酸菌によるみかん缶詰の変敗について

池上 義昭・橋本 京子・大田 智子

Spoilage of Canned Mandarin Oranges by Spore-forming Lactic Acid Bacteria

Yoshiaki Ikegami, Kyoko Hashimoto and Tomoko Ohta

The spoilage of canned mandarin oranges was described as caused by *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Clostridium pasteurianum* about 20 years ago. However, in our laboratory, spore-forming lactic acid bacteria were isolated from spoiled canned mandarin oranges.

For the purpose of preventing the spoilage of canned mandarin oranges, the characteristics, heat resistance and effect of pH and temperature on the growth of the causative bacteria were investigated.

There are two types (swelling and no swelling of cans), i. e., the gas-forming spoiled products rose the pH values of the contents as a result of the fermentation of citric acid, on the other hand, the non-gas-forming spoiled products reduced slightly the pH values of the contents, as a result of the production of lactic acid.

Six isolates (SL-1, SL-2, SL-3, SL-4, and SL-5) found in our laboratory were identified as *Sporolactobacillus inulinus*. The optimum growth temperatures of the isolates were about 30°C. The D values (decimal reduction time) at 90°C were from 0.6 to 12.0 minutes, the Z values (the slope index of the thermal death time curve) were from 7.2°C to 10.6°C.

みかん缶詰の微生物による変敗については、従来は主に酵母による場合が多く、その他乳酸菌、酪酸菌による変敗も報告されている。¹⁾²⁾³⁾ 酵母による変敗は *Saccharomyces cerevisiae*、乳酸菌では *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*、酪酸菌では *Clostridium pasteurianum* などがその原因菌としてよく知られている。

最近、これらの微生物以外に有芽胞乳酸菌による変敗が多発している⁴⁾。この細菌による変敗はほとんどが膨脹であるが、2、3件は膨脹しないで変敗する例もある。

この有芽胞乳酸菌によるみかん缶詰の変敗を防止する目的で、この細菌の諸性状、耐熱性などを検討したので以下その結果を報告する。

実験方法

1. 供試菌株

変敗みかん缶詰より分離したSL-1、2、3、フルーツプリン缶詰より分離したSL-4、そしてクリームソーダ缶詰より分離したSL-5の5株を使用した。

2. 細菌の分離

試料缶詰よりPE-2培地及びPE-2培地にクエン酸を加えpH4.0にした培地(PE-2C)、及びポテトデキストロース寒天培地(PDA)にみかん缶詰の液汁を2.5%加えた培地(PDAO)

を使用して30°Cで15日間培養した。PDA培地に形成したコロニーはPY培地（ポリペプトン1%、酵母エキス0.2%、pH6.0）に移植して純粋培養した。

3. 形態学的、生理学的性状試験

前培養は特に記さない限りPY培地（pH6.0）で2、3日培養したものを使用した。

1) グラム染色、運動性の試験

成書に従って行った。

2) 芽胞の位置及び形態

PY培地に15日培養し顕微鏡によって観察した。

3) ゼラチンの液化

PY培地にゼラチン末を10g/100mlになるように加えた培地を用い、20日間培養した。

4) 硝酸塩の還元

PY培地に硝酸カリウムを0.1%加えた培地を用い10日間培養して行った。

5) アセトインの産生

MP-V P用培地（日水製薬）を使用した。

6) 牛乳の凝固

10%のSkim milk(Difco)を用いて行った。

7) クエン酸からのガス産生能

PY培地にクエン酸1%を加えた培地（PYC）をpH4.0に調整し、ダーラム管を入れた培地を用いて行った。

8) ブドウ糖からのガス産生能

PY培地にブドウ糖を1%を加え、ダーラム管を入れた培地（pH6.0）を用いて行った。

9) デキストランの産生

PDA培地にシュークロースを5%を加えた培地に菌を塗抹し、粘着性物質の産生を観察した。デキストランの確認は粘着性物質を水に溶解し、遠心分離して菌体等を分離する。上清にエチルアルコールを50%以上になるように加え、粘着性物質の析出によって判定した。

10) 糖の分解

PY培地を基礎培地として、これに各種の糖を加え、更に指示薬して0.2%のBCPを100mlに対し1.2ml加えた培地を用いた。

4. 発育温度域

PYG培地（PY培地にグルコースを1%加えた）に菌を接種し、15°Cより5°C間隔に45°Cまでの各温度で30日間培養し、その増殖の有無を肉眼的に観察した。

5. 発育pH域

pHを3.25より0.25間隔に調整したPYG、PYC培地に菌を接種し、30°Cで20日間培養し、その増殖の有無を肉眼的に観察すると同時に培養後のpHを測定した。各2本ずつ行ない、2本増殖の場合にはその平均値、1本増殖の場合には陽性のpHを測定した。PYC培地の場合にはダーラム管を入れ、ガス産生能も試験した。

6. 生成酸の組成分析

PYG、PYC培地（pH4.0）に菌を接種し、30°Cで20日間培養、その培養液を液体クロマトグラフィーにより乳酸、クエン酸、酢酸の分析を行った。

7. 芽胞の形成及び懸濁液の調整

PY培地（pH6.0）にMnSO₄を10ppm加えた培地に菌を接種し、30°Cで15日培養し、鏡検によって芽胞形成を確認後、その培地を遠心分離を行ない、滅菌水で洗浄、遠心分離を3回繰り返す、

生理食塩水またはみかん液汁 (pH 3.5) に懸濁し、冷蔵保存した。

8. 芽胞の発芽発育 pH 域

SL-2、SL-3の2株について、菌の発育 pH 域の試験と同じ方法で、PYG、PYC培地を使って行った。接種した芽胞数は10mlの培地に 10^3 個である。

9. 芽胞の耐熱性測定

みかん液汁 (pH 3.5) の芽胞懸濁液をTDT管 (70×150mm) に1mlずつ分注し、火炎で密封後、各温度で加熱し、残存芽胞数をPDAO培地で30°C15日培養した。

実験結果と考察

1. みかん缶詰の変敗例

過去20年間のみかん缶詰における有芽胞乳酸菌による変敗例を Table 1 に示した。ほとんどは膨脹缶であるが、2、3の試料缶は外観的に正常であるが内容物は異臭を呈していた。試料缶のPHは膨脹缶ではやや高くなっているが、外観の正常のもののは pH がやや低下し、pH 3.0 以下になっているのもあった。

これらの試料缶から菌を分離することが出来なかったものもあるが、ヘッドスペース中のガス組成 (主に炭酸ガスである) 及び内容物の有機酸組成 (膨脹缶は乳酸と酢酸の生成が認められ、外観の正常のもののは乳酸の生成が認められる) で判定した。この細菌は変敗後6ヶ月以上経過すると死滅して菌の分離が出来ない場合が多い。

Table 1. Samples of canned mandarin oranges spoiled by spore-forming lactic acid bacteria.

Month and year produced	Can size	pH	Appearance
'64.12	No. 2	3.77 ~ 4.07	Swell
'65.1	No. 5	3.62 ~ 3.88	Swell
'65.12	No. 2	3.66 ~ 3.67	Swell
'66.2	No. 5	3.73 ~ 3.79	Swell
'71.12	No. 5	3.83 ~ 4.17	Swell
'72.3	No. 5	3.82 ~ 3.83	Swell
'72.3	No. 5	4.04 ~ 4.06	Swell
'72.12	No. 5	3.70 ~ 3.75	Swell
'74.3	No. 5	3.25 ~ 3.43	Flat
'75.2	No. 1	2.90 ~ 3.08	Flat
'78.2	No. 4	3.81 ~ 4.07	Swell
'78.3	No. 2	4.25	Swell
'81.1	No. 5	3.12 ~ 3.18	Flat
'81.3	No. 2	3.94	Swell
'81.12	No. 4	3.65	Swell
'82.2	No. 4	3.78 ~ 3.85	Swell

2. 培地の検討

この細菌の増殖はPE-2培地中では下部より増殖し、濁ってくる。固形培地では、ブリックス寒天培地 (日水製薬)、BCP加プレートカウントアガール (日水製薬) でもコロニーを形成するが増殖は悪く、PDA培地が最も良い培地である。しかし、PDA培地にみかん液汁を入れたPDAO培地の方が更に良くなることが認められた。また、この菌は通性嫌気性菌であるが、好気培養より嫌気培養の方が増殖は良い。

3. 形態学的、生理学的性状

5株の諸性状は Table 2 に示した。糖の分解で2、3相異するところがあり、また、クエン酸からのガス産生能と牛乳の凝固において2群に分けられ、SL-1、2、4はこれらが陽性で、SL-3、5は陰性である。5株ともにシュークロースより粘着性物質であるデキストランを産生する。有芽胞乳酸菌として *Bacillus* 属と *Sporolactobacillus* 属の細菌があるが、*Sporolactobacillus* 属の細菌に近いと思われる。Bergey, s. manual⁵⁾によれば *Sporolactobacillus* 属には一種しかなく、

Table 2. Characteristics of isolates

Reaction	SL-1	SL-2	SL-3	SL-4	SL-5	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
Gram stain	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+
Spore						
Location	T	T	T	T	T	T
Shape	O	O	O	O	O	O
Gelatin	-	-	-	-	-	-
NO ₂ from NO ₃	-	-	-	-	-	-
Production of acetoin	+	+	+	+	+	+
Coagulation of milk	+	+	-	+	-	-
Gas from citrate	+	+	-	+	-	-
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-
Acid from						
arabinose	-	-	-	-	-	-
xylose	-	-	-	-	-	-
rhamnose	-	-	-	-	-	-
glucose	+	+	+	+	+	+
mannose	+	+	+	+	+	+
sucrose	+	+	+	+	+	+
lactose	+	-	-	+	+	-
maltose	+	+	+	+	+	+
trehalose	+	+	-	+	+	+
melibiose	+	-	-	+	-	-
raffinose	+	+	+	+	+	+
inulin	+	+	+	+	+	+
mannitol	+	+	+	-	+	+
sorbitol	-	-	+	-	-	+
salicin	+	+	-	-	+	-

T; Terminal O; Oval

これら5株菌は *Sporolactobacillus inulinus* に近い菌と考えられるが、以上の試験結果だけからは完全な同定は出来ない。

4. 発育温度域

5株の菌の発育増殖に及ぼす温度の影響を Table 3 に示した。5株においては僅かながら差は認められるが、平均して30°Cが最っとも良い培養温度と思われる。

5. 発育pH域

PYG培地においては、Table 4 に示すように SL-3を除いた4株は pH3.25まで増殖可能である。増殖後の pHは最初の pHが高い程その低下は大きく、ガスの産生は認められない。しかし、PYC培地においては、Table 5 に示すように SL-3を除いた4株は pH3.5まで増殖可能である。SL-1、2、4はガスを産生し、増殖後の pHは上昇している。ガス非産生株である S

SL-3,5においては pH の変化は認められなかった。ガス産生株は増殖 pH 域内において pH が低い方がガス産生能は強い。またガスを産生せずに pH が上昇しているのは肉眼では観察されないが僅かにガスを産生していると思われる。また、PYC 培地においては pH が高くなると増殖し難くなる。

Table 3. Effect of temperature on the growth in PYG medium

Temperature (°C)	SL-1	SL-2	SL-3	SL-4	SL-5
15	-	-	+	+	-
20	+	-	+	+	+
25	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+
40	-	-	-	+	+
45	-	-	-	-	+

Table 4. Effect of pH values on the growth in PYG medium

pH a)	SL-1 pH	SL-2 pH	SL-3 pH	SL-4 pH	SL-5 pH b)
3.25	++ 3.14	++ 3.15	--	++ 3.19	++ 3.13
3.50	++ 3.25	++ 3.31	++ 3.15	++ 3.23	++ 3.19
3.75	++ 3.40	++ 3.35	++ 3.28	++ 3.35	++ 3.29
4.00	++ 3.50	++ 3.42	++ 3.39	++ 3.43	++ 3.37
4.25	++ 3.54	++ 3.48	++ 3.50	++ 3.56	++ 3.44
4.50	++ 3.52	++ 3.53	++ 3.58	++ 3.59	++ 3.50
4.75	++ 3.54	++ 3.56	++ 3.61	++ 3.65	++ 3.56
5.00	++ 3.58	++ 3.60	++ 3.62	++ 3.68	++ 3.60
5.25	++ 3.61	++ 3.64	++ 3.66	++ 3.74	++ 3.62
5.50	++ 3.65	++ 3.64	++ 3.74	++ 3.76	++ 3.65
6.00	++ 3.72	++ 3.70	++ 3.90	++ 3.78	++ 3.69
6.50	++ 3.76	++ 3.70	++ 3.72	++ 3.86	++ 3.74

a) Before incubation b) After incubation for 20 days at 30°C

Table 5. Effect of pH values on the growth in PYC medium

pH a)	SL-1 pH	SL-2 pH	SL-3 pH	SL-4 pH	SL-5 pH b)
3.25	--	--	--	--	--
3.50	(+)- 4.66	(++) 4.46	--	(++) 3.54	+- 3.51
3.75	(++) 4.70	(++) 4.98	+ - 3.84	(++) 4.57	++ 3.82
4.00	(++) 4.70	(++) 5.05	++ 4.04	(++) 5.40	++ 4.07
4.25	++ 4.72	(++) 5.04	++ 4.30	(++) 6.02	++ 4.32
4.50	++ 4.70	(++) 5.02	++ 4.55	(++) 6.67	++ 4.53
4.75	++ 4.79	++ 4.89	++ 4.78	(++) 5.57	++ 4.73
5.00	++ 5.01	++ 5.03	++ 5.04	++ 5.55	++ 5.00
5.25	--	++ 5.28	++ 5.30	--	++ 5.26
5.50	--	++ 5.54	--	--	--
6.00	--	--	--	--	--

a) Before incubation b) After incubation for 20 days at 30°C

(+); Gas production

6. 生成酸

Table 6 に示すように PYG 培地においては、5 株ともに乳酸の生成が認められる。また、PYC 培地ではガス産生株である SL-1、2、4 はクエン酸の減少とともに酢酸の生成が認められる。

Table 6. Analysis of organic acids in PYG and PYC media

Strains	PYG (pH 4.0)		PYC (pH 4.0)	
	Lactic acid (mg %)	Acetic acid (mg %)	Citric acid (mg %)	Acetic acid (mg %)
SL-1	333.2	6.7	391.8	166.8
SL-2	546.1	7.1	189.7	258.7
SL-3	359.9	4.4	867.1	3.5
SL-4	382.0	5.3	Trace	345.6
SL-5	495.9	10.0	885.8	Trace

乳酸菌のホモ醸酵形成は Fig. 1 に示す如く、グルコースから EMP 経路を経てピルビン酸に分解され、ピルビン酸が乳酸脱水素酵素の作用によって乳酸に還元される。ピルビン酸の生成過程で補酵素である NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide) が還元され NADH₂ となるが、生成したピルビン酸は NADH₂ → NAD の水素受容体となって最終的に乳酸を生成する。NAD は再利用されるわけである。

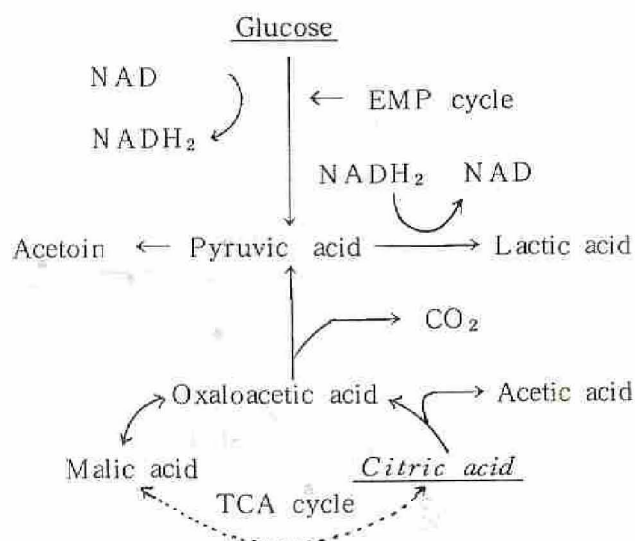
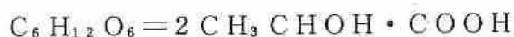


Fig. 1 Metabolic pathways on fermentation of spore-forming lactic acid bacteria



しかし、クエン酸からガスを産生する菌は、クエン酸を含んだ培地でクエン酸からオキザロ酢酸と酢酸を生成し、オキザロ酢酸は更にピルビン酸と炭酸ガスに分離される。この代謝経路では NADH₂ の生成がないので、ピルビン酸を乳酸に変えることなく、過剰のピルビン酸は細胞物質の合成に使われるとともにアセトインの生成に使用される。このピルビン酸は炭水化物、タンパク質、脂肪の各代謝の中心となる重要な物質である。従って、クエン酸が存在しない培地ではガスを産生しないが、クエン酸を多量に含んでいるみかん缶詰は膨脹する。



7. 芽胞の形成条件

芽胞は端部または準端部に形成するが、その形成能は悪く、炭素源のない PY 培地で多くないが形成する。菌株によって 10ppm の Mn⁺⁺ を加えると良くなる場合もある。一般に芽胞の形成において、培地の pH は中性付近が良いが炭素源がないと増殖が悪いので弱酸性 (pH 6.0) にすると良くなる。

Table 7. Effect of pH values on the germination and outgrowth of spores in PYG and PYC media

pH	SL-2		SL-3	
	PYG	PYC	PTG	PYC
3.50	-	-	-	-
3.75	-	-	-	-
4.00	+	(+)	-	-
4.25	+	(+)	-	-
4.50	+	(+)	+	-
4.75	+	+	+	-
5.00	+	+	+	-
5.25	+	+	+	-
5.50	+	-	+	-
6.00	+	-	+	-
6.50	+	-	+	-

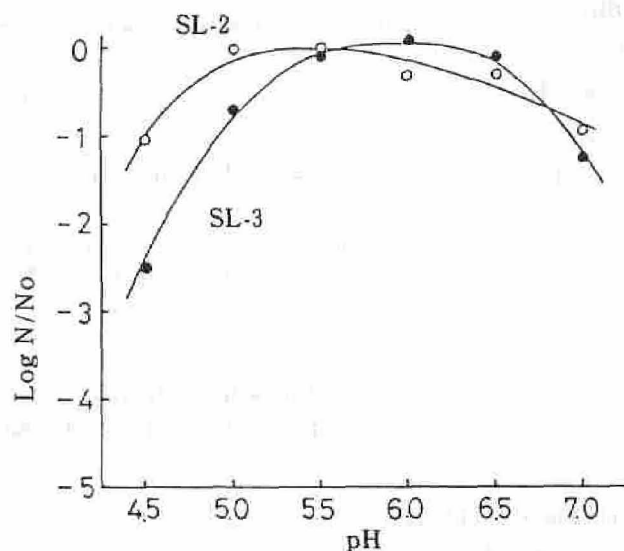


Fig.2 Relationship between pH values and germination and/or outgrowth of spores in TYG media

8. 発芽及び発芽後の増殖に及ぼす pH の影響

クエン酸からのガス産生株 SL-2、ガス非産生株 SL-3 について PYG、PYC 培地で pH と発芽及び発芽後の増殖との関係を Table 7 に示した。Table 4、5 に示した菌の増殖と同じようなパターンであるが、pH 域は狭まり、PYG 培地においては、SL-2 は pH 4.0 以下、SL-3 は pH 4.5 以下で発芽、増殖が認められた。また、Fig.2 に示すように発芽、増殖の至適 pH は 5.0 から 6.5 付近である。

PYC 培地においては、Table 7 に示す如く SL-3 は発芽、増殖が認められないが、これはクエン酸が発芽、増殖に抑制的に働いていると思われる。

Table 8 に示す如く、SL-2 はクエン酸が 1.5% 以上、SL-3 は 0.6% 以上で発芽、増殖し

Table 8. Effect of citric acid on the germination and outgrowth of spores in PYG (pH 5.5) medium

Strains	Citric acid	Growth (n=5)
SL-2	0 %	5
	0.5	5
	1.0	5
	1.5	0
SL-3	0	5
	0.2	5
	0.4	1
	0.6	0

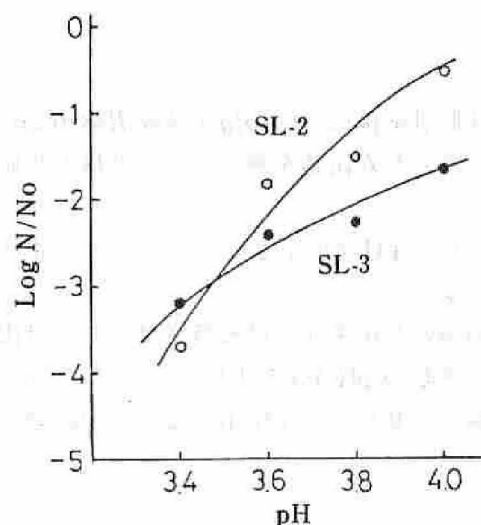


Fig.3 Relationship between pH values and germination and/or outgrowth of spores in syrups of mandarin orange

ない。このことからクエン酸1%のPYG培地ではSL-3は発芽、増殖しないことがわかる。

みかん液汁中におけるSL-2、3の発芽、増殖とpHの関係をFig.3に示した。pHの低下とともに発芽、増殖は低下するが、pH3.5でも最初の芽胞数が 10^3 以上存在すると変敗を起すことがわかる。従って、pHの調整でみかん缶詰の変敗を防止するためには最初の芽胞数を減少させることが必要である。

9. 芽胞の耐熱性

みかん液汁(pH3.5)中における5株の芽胞の耐熱性をTable9に示した。90°CにおけるD値は0.6分から12分までの差があるので、みかん缶詰の殺菌条件では死滅させることは出来ない。殺菌でこの菌の芽胞を死滅させるには100°Cの殺菌が必要である。

10. 有芽胞乳酸菌によるみかん缶詰の変敗防止に関する考察

この有芽胞乳酸菌によるみかん缶詰の変敗は約20年前より起り始めた。その原因には製造方法が変わった事が挙げられる。昔はシラップを100°Cで加熱したものを使用していたが、現在は

異性化糖などの使用や、白濁防止の酵素の使用などの関係で加熱せず使用する場合が多い。この菌の汚染源は現在のところシラップ(砂糖、異性

化糖)と思われるので、このシラップ中に有芽胞乳酸菌が多数生存していると、通常の殺菌では死滅せず変敗を起す。みかん缶詰の pH 調整を行って、pH を低下させれば変敗は少なくなると思わ

れるが、商品価値の面から限度がある。従って、この菌によるみかん缶詰の変敗を防止するには、シラップを一度 100°C 近くまで加熱したり、紫外線殺菌などで菌を減少させたシラップを使用することが必要である。

Table 9. D and Z values of spores

Strains	D values (minutes)					Z values (°C)
	80 °C	85 °C	90 °C	95 °C	100 °C	
SL-1	30.0	8.0	2.0			8.6
SL-2		15.0	5.0	1.5		10.1
SL-3	13.0	4.2	1.3			9.4
SL-4	15.0	2.8	0.6			7.2
SL-5			12.0	4.5	1.5	10.6

要 約

変敗したみかん缶詰から分離した有芽胞乳酸菌は *Sporolactobacillus inulinus* の類似菌で、クエン酸を分解して酢酸と炭酸ガスを産生してみかん缶詰を膨脹させる菌株と膨脹させないで変敗させる菌株の 2 群に分けられる。

糖を添加した培地中では、乳酸を産生して pH を低下させるが、クエン酸だけ添加した培地中ではガスを産生すると同時に pH は上昇する。

芽胞の耐熱性は強く、通常のみかん缶詰の殺菌条件では死滅させることは出来い。従って、この菌による変敗を防止させるには、みかん缶詰の pH を 3.5 以下に調整し、しかもシラップを 100°C で加熱するか紫外線殺菌して、この菌を減少させたものを使用することが必要である。

文 献

- 1) 河端俊治・内藤正一：缶詰時報，27，(10)，59 (1948)。
- 2) 熊倉悟・田中昭二・茂木幸夫：缶詰時報，37，(12)，98 (1958)。
- 3) 池上義昭・岡屋忠治・沢山善二郎・下田吉夫・森大蔵・奥正和：缶詰時報，49，993 (1970)。
- 4) 中山昭彦・新屋理恵子：本誌，15，112 (1983)。
- 5) Gibson, T., Gordon, R.E.: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed (1974)。