

容器詰食品における加熱後の褐変

— 第1報 褐変原因菌の分離・同定 —

中尾 浩*, 遠田 昌人, 田口 憲人, 森 大蔵**

Browning Discoloration by Reheating of Foods in Container - I

Isolation and Identification of Causal Bacteria of Browning Discoloration of Natsudaidai

Hiroshi Nakao, Atsuhito Enda, Norihito Taguchi and Daizou Mori

Similarly to the well-known 'pink disease' of canned-pineapple, browning discoloration associated with bacteria has often occurred in canned Natsudaidai in syrup.

Isolation of causal bacteria from a canning plant and raw materials was attempted. Contamination by causal bacteria was found at raw materials and carrying containers. Based on the sequences of 16S rDNA gene, these strains were identified to *Tatumella ptyseos*, *Rahnella aquatilis* and *Enterobacter intermedium*.

AF1 agar, that is, modified PGG Agar added 5 ppm of Nystatin, constructed for the investigation of causal bacteria was effective for detection of causal bacteria.

Key words : Browning Discoloration, Natsudaidai, *Tatumella ptyseos*, *Rahnella aquatilis*, *Enterobacter intermedium*. Antifungal agent.

食品における褐変については一般にポリフェノールオキシダーゼ等による酵素的褐変反応, あるいはアミノカルボニル反応やカラメル化反応などの非酵素的褐変がよく知られている。本報告で取り上げたのは特に原料における微生物の増殖によってもたらされた褐変前駆物質が, 殺菌などの加熱工程により褐変物質へ変化する変色現象である。本報告においてはそのような機構で発生する食品の変色を便宜的に「加熱後褐変」と呼ぶ。

微生物による加熱後褐変の事例として, 最もよく知られているのはパイナップルピンク病¹⁾と呼ばれるものである。パイナップルピンク病は1915年, ハワイで初めて報告されて以降, 世界中のパイナップル産地で毎年のように発生しており, パイナップル加工産業においては非常に重要な問題となっている。

加熱後褐変の生成機構は, 食品中に増殖した褐変原因菌がグルコースを褐変前駆体である2,5-ジケトグルコン酸(2,5-DKG)へと代謝し, 蓄積された2,5-DKGが加熱工程で食品中のアミノ酸やタンパク質と反応し, メラノイジンを生ずることによるものと推定されている。このとき, グルコースから2,5-DKGへの経路には, グルコースデヒドロゲナーゼ, グルコン酸デヒドロゲナーゼ, 2-ケトグル

コン酸デヒドロゲナーゼの3つの酵素が関与しているものと考えられている²⁾。

加熱後褐変は, 加熱殺菌前の汚染果実の判別が困難で, また, 原因菌の耐熱性は通常著しく低く, 容器詰食品の場合, 殺菌工程で死滅してしまうため, 微生物起因であるかどうかを調査するのは困難であり, 原因不明とされている場合も多いと考えられる。夏ミカンシラップ漬缶詰においては果肉が赤褐色に変色する現象が知られているが, この現象が微生物起因の加熱後褐変である可能性が高く, 原料および加工工程について微生物学的な調査を行い, 原因菌の特定および汚染状態の調査を試みた。

実験材料および方法

1. 使用培地

(1) PGG培地³⁾

ペプトン10g, ビーフエキストラクト5g, ブドウ糖50g, グルタミン酸モノナトリウム50g, 塩化ナトリウム5g, 寒天15gを1lの脱イオン水に溶解し, オートクレーブ(121℃, 15分間)した。

(2) 改良PGG培地

PGG培地の成分のうち, ビーフエキスに代えて酵母エキ

* : 元東洋食品研究所 ** : 元東洋食品工業短期大学

ス5gを用いた。

2. 使用菌株

褐変菌検出培地の評価において、*Gluconobacter oxydans* NBRC 14819^Tおよびあらかじめ夏ミカン果実から分離した*Enterobacter intermedium* a1-1株を用いた。

また、果実を汚染している真菌のモデル菌株として、あらかじめ夏ミカン果実から分離した*Saccharomyces cerevisiae* Y-1株および*Penicillium* sp. M-1株を用いた。

3. 褐変原因菌検出培地の評価

真菌汚染の著しい果実製品の原料および製造工程からの褐変原因菌検出を行うための培地を開発するために抗真菌剤を添加することとし、その適切な添加濃度を調査した。抗真菌剤を添加した変法PGG培地に、*S. cerevisiae* Y-1および*Penicillium* sp. M-1株の菌液を接種し、その発育阻止濃度を調査した。また、褐変原因菌*G. oxydans* NBRC 14819および*E. intermedium* a1-1を用いて同様に発育に対する影響を調査した。

4. 検体からの褐変原因菌分離

(1) 果実

身割り後のじょうのうを滅菌生理食塩水で洗い出し、その生理食塩水を培地に混釈し、生菌数および褐変原因菌のスクリーニングを行なった。洗い出しの際はじょうのう10個につき50mlの生理食塩水を用いた。

外皮のついた夏みかん果実はピーカーに滅菌生理食塩水を100ml注ぎ、攪拌後、その1mlを培地に混釈し、35℃で7日間まで培養した。

(2) 洗浄水

内皮剥皮後の果実洗浄工程で循環されている用水を採取し、1mlを培地に混釈し、35℃で7日間まで培養した。

(3) コンテナの拭き取り

果実の身割り工程で使用されていたプラスチック製コンテナの拭き取り検査を行った。拭き取りはリン酸緩衝生理食塩水入りスワブ (Pro-media ST-25, Elmex) を用いた。コンテナは内面底部の約5cm×5cmの面積をスワブで拭き取り、容器中の緩衝生理食塩水10mlのうち1mlを培地に直接混釈し、35℃で7日間まで培養した。

5. 分離菌の同定

(1) 16S rDNA PCR-RFLP

1) DNAの抽出

分離菌の種培養をSMAに塗抹し、35℃で24時間培養して得られた細胞からDNAを抽出した。抽出にはDNeasy Tissue kit (Qiagen) を用い、操作は添付マニュアルに従った。抽出したDNA溶液をテンプレートとし、16S rDNAを増幅した。

2) PCR

PCRにはExTaq (TaKaRa) を用いた。プライマーはfDI; AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AGおよび

rP2; ACG-GCT-ACC-TTG-TTA-CGA-CTTを用いた。増幅反応は94℃ 1分→[94℃ 1分→52℃ 1分→72℃ 1.5分]×30サイクル→72℃ 2分とした。

3) RFLP

得られた増幅産物は制限酵素 (*Hae* III, *Hha* I, *Msp* I, *Afa* I) を用いて切断し、アガロース電気泳動により、切断パターンを得た。

(2) 塩基配列解析

分離菌の16S rDNAの増幅産物を用いて、その塩基配列を解析した。シーケンシング反応はDual CyDye Terminator Kit (VERITAS) を用い、プライマーはfDIを用いた。解析にはオートシーケンサーLong-Read Tower UBC (Amersham Biosciences) を用いた。得られた塩基配列はDDBJ (DNA Database of Japan) から類似した塩基配列データをBLAST検索して同定を行った。

結果

1. 褐変原因菌検出培地の開発

柑橘類の果実においては、カビ、酵母といった真菌の汚染が著しいが、カビは集落が大きく広がり、また、酵母は集落こそ小さいものの菌数が多く、ともに褐変原因菌検出の大きな障壁となる。そこで、効率よく褐変原因菌検査を行うために検出用培地の開発を行った。

褐変能検出については、PGG寒天培地³⁾と同様に多量に加えたグルタミン酸と褐変原因菌の産生する褐変前駆体物質とのアミノカルボニル反応により生じる変色を観察することとした。PGG寒天培地はビーフエキスを含まため、もともとの色が褐色に近く、変色を観察しにくいので、ビーフエキスを等量の酵母エキスを替えた、改良PGG寒天培地を基礎培地とした。この基礎培地に各種の抗真菌剤を添加し、真菌の生育を十分に抑制するとともに、褐変原因菌の増殖を妨害しない、適切な使用濃度を検索した。

真菌として、あらかじめ夏ミカン果実から分離した*Saccharomyces cerevisiae* Y-1株および*Penicillium* sp. M-1株を、褐変原因菌としては*Gluconobacter oxydans* NBRC 14819^Tおよびあらかじめ夏ミカン果実から分離した*Enterobacter intermedium* a1-1株を用いた。また、抗真菌剤に関してはAmphotericinB, Nystatin, Clotrimazole, Miconazole, ThiabendazoleおよびPentachloronitrobenzeneの6種類を評価した。結果をTable 1に示した。

ThiabendazoleおよびPentachloronitrobenzeneは酵母に対してと同様に褐変原因菌の増殖も抑制し、不適であった。また、Clotrimazoleでは40ppmでおよそ1桁の菌数低下が認められた。

これらの結果から、真菌の生育阻止濃度と褐変原因菌の増殖阻害濃度の間に幅があり、また水への溶解度も高く扱いやすいNystatinを採用することとした。また培地での使用濃度は最終濃度5ppmとした。以後、5ppmのNystatinを添加した改良PGG寒天をAF1寒天培地とした。

2. 夏みかんシラップ漬原料および製造工程での褐変原因菌検査

夏みかんシラップ漬缶詰を製造している工場において、各工程および器材についてAF1培地を用い、褐変原因菌を対象とした検査を行った (Table 2)。

調査した工場における夏みかん缶詰の製造工程は、果実を収穫後、いったん工場に集荷したものを冷蔵し、スコルダ (湯煮機) 処理後、近隣の農家を外注先として、そこで外果皮を人手により剥皮、一個ずつのホロに身割りされ、再び工場へ回収される。外注先へ配送した当日のうちに身割り作業が完了した場合は、翌日の製造まで工場内で冷蔵保管されるが、それ以外は翌日まで常温で保管される。その後、内果皮除去、肉詰め、巻締、殺菌、箱詰め後、出荷される。

褐変原因菌の調査は外皮つきの果実、外注先で身割りされたじょうのう、果実およびじょうのうの輸送に用いられたコンテナ、缶詰工場の内皮剥皮工程での洗浄水、肉詰め工程後のじょうのうに対して行った。それらのうち、外皮つきの果実からは褐変原因菌は検出されなかった。じょうのうおよびコンテナについては、いずれの外注先の試料にも汚染が認められた。また、汚染菌数においては外注先による違いが認められた。工場内の洗浄水および肉詰め後のじょうのうには褐変菌は見出されなかった。

3. 分離した褐変菌の同定試験

AF1培地での検査では、洗浄水および肉詰め後じょうのうを除き、検出された細菌のほとんどが褐変菌であった。褐変菌については、集落外観上でなるべく異なる菌株を選抜して43菌株を、また、わずかながら検出された非褐変菌についても30菌株を単離した。

これらの菌株についてRFLPによるグルーピングを行った。4種類の制限酵素全てにおいて同一断片パターンを示した菌株を同一のグループとして層別した。グルーピングに関しては、種内の多型も考慮し、マイナーな断片についてもその有無を区別して行った。その結果、褐変菌分離株は7パターンに収束した。これらについて、おのおの16S rDNAの塩基配列を解析した。得られた塩基配列をDDBJ (DNA Database of Japan) より、BLASTを用いて類似した塩基配列データを検索し、その結果から菌種を同定した (Table 2)。

同定試験の結果、褐変菌は *Tatumella ptyseos*, *Rahnella aquatilis* および *Enterobacter intermedium* の3種に限られた。一方で、これらの褐変菌の菌種のうち *Rahnella aquatilis* は非褐変菌の中にも認められた。その他の非褐変菌の菌種は *Klebsiella ornithiolytica*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Acinetobacter orientalis*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus warneri* および *Leucoostoc citreum* であった。

考 察

褐変菌検出培地AF1は果実の検査において、酵母エキスをを用いることでバックグラウンドの褐変を抑制したた

め、褐変菌の色素産生の検出が明瞭であった。また、果実等の農産原料の検査の際、真菌の生育により細菌の成育を妨害されるが、真菌を抑制し、確実に褐変菌を検出することができた。

夏ミカンシラップ漬缶詰の褐変現象は原因が不明であったが、パイナップルでのピンク病同様、原料果実における褐変菌の増殖により褐変原因物質が蓄積し、加熱殺菌により褐変が顕在化するという機構によって発生するものと推定された。

パイナップルピンク病の原因菌として推定されているのは酢酸菌である *Acetobacter* および *Gluconobacter*、酢酸菌以外では、*Erwinia herbicola*, *Enterobacter* および *Pantoea citrea* などである⁴⁻⁵⁾。夏ミカン缶詰の原料および工程から分離した褐変菌は *Tatumella ptyseos*, *Rahnella aquatilis* および *Enterobacter intermedium* の3種であった。これらの菌種のうち *T. ptyseos* および *R. aquatilis* は Bouvetら⁶⁾ が腸内細菌科111種、506菌株について、グルコースの酸化的代謝系について調査した結果、グルコースを2,5-ジケトグルコン酸へ代謝する能力があると報告した5菌種に含まれている。一方で、これらと同様に褐変の原因菌と考えられている *Acetobacter* 属あるいは *Gluconobacter* 属などの酢酸菌科の細菌は分離されず、夏ミカンシラップ漬缶詰における果肉の褐変は腸内細菌科の細菌によるものと推測された。

汚染経路については、外皮つきの果実からは褐変原因菌は見出されなかったものの、身割りじょうのう、コンテナに汚染が認められ、おそらく果実由来の褐変原因菌が時間とともに増殖し、褐変原因物質を蓄積していくものと推測された。

原因が明らかでない食品の褐変現象のうち、微生物起因ではないかと思われるものがいくつか存在する。そのなかには糖やアミノ酸の含量が少ない食品も含まれており、潜在的にはほとんどの食品において、加熱後褐変が起きる可能性があるものと考えられる。

加熱後褐変に関しては、褐変が見出された製品から直接原因菌を分離することが困難であるため、原料段階での検査が不可欠であるが、AF1培地は夏ミカン以外の原料においても褐変菌検査に有効なものと考えられた。

文 献

- 1) 徳元正和, 金城清朗, 林 龍治: 南方資源利用技術研究会誌, 4, 29 (1988).
- 2) Pujol, C. J., and Kado, C. I.: *J. Bacteriol.*, 182, 2230-2237 (2000).
- 3) 金山龍男, 藤田八東, 松田敏生: 日水誌, 39, 221-228 (1973).
- 4) Kontaxis, D. G., and Hayward, A. C.: *Plant Dis. Repr.* 62, 446-450 (1978).
- 5) Rohrbach, K. G., and Pfeiffer, J. B.: *Phytopathology*, 66, 396-399 (1976).
- 6) Bouvet O. M., Lenormand, P., Grimont, P. A.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 61-67 (1989).

Table 1 Antifungal activities and antibacterial effect of antifungal agents in modified PGG agar. Suspensions of each organism were inoculated to Petri dishes and mixed with PGG agar cooled under 55°C. *E. intermedium* and *G. oxydans* were incubated at 35°C for 7days. *S. cerevisiae* Y-1 and *Penicillium* sp. M-1 were incubated at 30°C for 7days. -; No growth, NT; Not tested. LA; Laboratory accident.

Antifungal agent	Final concentration (ppm)	<i>Enterobacter intermedium</i> a1-1	<i>Gluconobactor oxydans</i> NBRC 14819 ^T	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y-1	<i>Peicillium</i> sp. M-1
Amphotericin B	0	2.2×10 ⁷	1.8×10 ⁸	3.6×10 ⁸	2.3×10 ⁸
	1	NT	NT	9.8×10 ⁷	—
	2	NT	NT	1.1×10 ⁸	—
	3	NT	NT	2.3×10 ⁷	—
	4	NT	NT	—	—
	5	2.6×10 ⁸	1.8×10 ⁸	—	—
	10	1.6×10 ⁸	3.2×10 ⁸	—	—
	20	3.2×10 ⁸	1.9×10 ⁸	—	—
Nystatin	0	3.6×10 ⁸	2.3×10 ⁸	2.0×10 ⁸	2.4×10 ⁷
	1	NT	NT	4.0×10 ⁶	—
	2	NT	NT	—	—
	5	2.2×10 ⁸	3.7×10 ⁸	—	—
	10	3.4×10 ⁸	1.9×10 ⁸	—	—
	20	2.9×10 ⁸	2.0×10 ⁸	—	—
Clotrimazole	0	3.5×10 ⁸	2.4×10 ⁸	2.2×10 ⁸	2.7×10 ⁷
	5	NT	NT	1.6×10 ⁸	—
	10	3.5×10 ⁸	2.1×10 ⁸	—	—
	20	3.4×10 ⁸	1.9×10 ⁸	—	—
	40	6.6×10 ⁷	2.7×10 ⁷	—	—
Miconazole	0	3.6×10 ⁸	2.3×10 ⁸	2.7×10 ⁸	2.9×10 ⁷
	1	NT	NT	9.8×10 ⁷	—
	2	NT	NT	1.1×10 ⁸	—
	3	NT	NT	2.3×10 ⁷	—
	4	NT	NT	—	—
	5	2.6×10 ⁸	1.8×10 ⁸	—	—
	10	1.6×10 ⁸	3.3×10 ⁸	—	—
	20	3.2×10 ⁸	1.9×10 ⁸	—	—
Thiabendzole	0	3.6×10 ⁸	2.3×10 ⁸	2.2×10 ⁸	2.7×10 ⁷
	10	NT	NT	1.6×10 ⁸	3.3×10 ⁷
	20	NT	NT	1.7×10 ⁸	2.8×10 ⁷
	50	1.7×10 ⁷	1.3×10 ⁷	—	—
	100	—	—	—	—
Pentachloro-Nitrobenzene	0	3.6×10 ⁸	2.3×10 ⁸	1.8×10 ⁸	2.9×10 ⁷
	20	NT	NT	1.9×10 ⁸	—
	50	1.9×10 ⁷	3.0×10 ⁷	1.7×10 ⁸	—
	100	—	—	—	—

Table 2 Isolation and Identification of causal bacteria of browning discoloration at manufacture's canning plant. Viable counts with AF1 agar were obtained by incubation at 35°C for 48 hours.

*) A-E means each individual co-manufacture for peeling process. -; Not detected.

Sample		Viable count (cfu/ml)		Identified isolates	
		Pigment positives	Total	Pigment positives	Pigment negatives
Whole fruit (with outer peel)		-	-		
Segments with inner peel	A*)	8.3×10^4	8.5×10^4	<i>Tatumella pyseos</i> <i>Enterobacter intermedius</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Bacillus lichemiformis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	B	5.4×10^4	5.4×10^4	<i>Tatumella pyseos</i> <i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Staphylococcus warneri</i> , <i>Kocnria rhizophila</i> , <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
	C	3.2×10^5	5.3×10^5	<i>Tatumella pyseos</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
	D	2.4×10^7	2.4×10^7	<i>Tatumella pyseos</i>	
	E	2.6×10^7	2.6×10^7	<i>Tatumella pyseos</i>	
	A(chilled)	2.1×10^4	2.1×10^4	<i>Tatumella pyseos</i>	<i>Bacillus lichemiformis</i> , <i>Staphylococcus warneri</i> , <i>Kocnria rhizophila</i>
Carrying containers (Swab)	A	LA	2.6×10^2	<i>Tatumella pyseos</i>	
	B	2.6×10^2	2.0×10^3	<i>Tatumella pyseos</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
	C	3.0×10^5	6.0×10^5	<i>Tatumella pyseos</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>
	D	1.2×10^6	1.7×10^6	<i>Enterobacter intermedius</i> , <i>Tatumella pyseos</i>	<i>Klebsiella ornithiolytica</i> , <i>Acinetobacter orientalis</i>
	E	5.6×10^4	5.6×10^4	<i>Tatumella pyseos</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>
	A(chilled)	-	3.0×10^0		
Rinse water at inner peel removal process		-	1.5×10^5		<i>Enterobacter cloacae</i>
Segments (without inner peel)		-	3.8×10^2		<i>Leuconostoc citreum</i>