琉球大学学術リポジトリ

[報文]パイナップル缶詰の褐変化に関する研究：パイナップルピンク病果実から分離された細菌とその同定(第1報)

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 徳元, 正和, 金城, 清郎, 林, 隆治, TOKUMOTO, Masakazu, KINJO, Seiro, HAYASHI, Takaharu メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016524

報 文

パイナップル缶詰の褐変化に関する研究
パイナップルピンク病果実から分離された細菌とその同定(第1報)

徳元正和*, 金城清郎*, 林 隆治**

*沖縄県農業試験場, **農林水産省九州農業試験場

Studies on the Browning of Canned Pineapple
Isolation of Bacteria of Pineapple Pink Disease from Pineapple Fruits and its Identification (Part I)

Masakazu TOKUMOTO*, Seiro KINJO* and Takaharu HAYASHI**

*Okinawa Prefectural Agricultural Experiment Station, Naha 903,
**Kyushu National Agricultural Experiment Station, Chikugo, Fukuoka 833,

The bacteria causing pink disease of pineapple was isolated from the fresh fruits collected in a pineapple can factory and identified. The results obtained were as follows:

1) GPYP medium and pineapple juice medium induced browning by heating them after the cultivation of the isolated strain.
2) The induction of browning symptom by artificial inoculation of the isolated strain to pineapple fruits was 93 percent.
3) The isolated strain could be classified as a genus of *Gluconobacter* by Bergey's manual (8ed) and Asai's report. Furthermore, from its biochemical characteristics as compared with type strains and J. J. Cho's report, the tested bacteria was identified as *Gluconobacter oxydans* sub-species.

緒 言

農産缶詰の変色現象はいろいろな缶詰でみられ，その原因も多種多様である．缶詰内変色を大別すると酵素的なものと非酵素的なものがあるが[1]，いずれも単に変色だけにとどまらず，香味の劣化等を伴う場合も多く，食品加工上の重要な問題点のひとつとなっている．国内唯一のパイナップル生産地である沖縄においても，パイナップル缶詰の褐変化現象は毎年のように発生し，沖縄県産缶詰の販路拡大のひとつの障害となり，解決すべき重要な課題となっている[2]．

パイナップルの褐変化現象は一般的にピンク病と呼ばれ[3]，パイナップル缶詰内の果肉が褐色もしくはピンク色に変色し(Fig.1)，病徴の進

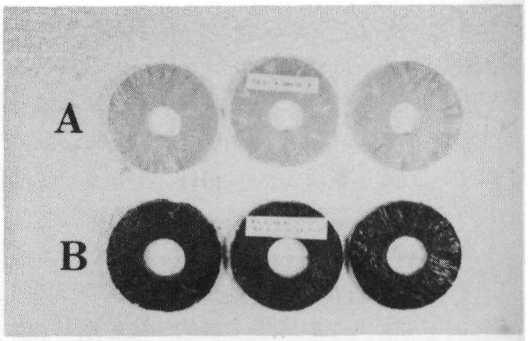

Fig.1 The browning of canned Pineapple
A : Normal B : Pink disease

んだものは異臭を放つのもある．ピンク病に汚染されたパイナップル果実の果肉は，生のままでは正常な果実との判別がつきにくく，汚染果肉は缶詰にパックされたのち，殺菌のための加熱工程で発色するため，その防止対策は極めて困難となっている．

このようなパイナップルの褐変缶詰は，毎年2～4月頃の春実製造缶に集中的に発生し，他の時期の発生は殆んど見られない[2]．また，沖縄本島北部の製品に多く発生し，八重山地域での発生はあまりみられない．パイナップルピンク病による缶詰の褐変化現象は，オーストラリア，ハワイ，フィリピンのパイナップル生産地で確認され[4]，さらに1978年には Kontaxisら[5] がフィリピンにおいて *Gluconobacter oxydans* と *Acetobacter aceti* の2種の細菌をピンク病の原因菌として分離，同定し，ついで1980年にはハワイにおいて，Choら[6]が *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti* および *Erwinia herbicola* の3種を分離，同定した．

本報では，沖縄本島内パイナップル缶詰工場の製造工程で見い出されたパイナップルピンク病様果実より，褐変化の原因となる細菌を分離，同定したので報告する．

実験方法

1）褐変化原因菌の分離および培地

パイナップル缶詰工場の果肉サイジング工程で見い出されたピンク病様果実から，果肉を無菌的に切り出し，その果汁を原液として，PGG寒天培地（グルコース5％，グルタミン酸ソーダ5％，ポリペプトン1％，酵母エキス0.5％，NaCl 0.1％，寒天1.5％，pH 7.0～7.2），GPYP寒天培地（グルコース0.5％，グリセロール2％，ペプトン1％，酵母エキス1％，ポテトエキス20％，寒天2％，pH 6.4～6.6），変法ドリガルスキー寒天培地（肉エキス0.5％，ペプトン1％，NaCl0.5％，乳糖1％，クリスタルバイオレット5ppm，BTB0.004％，寒天1.5％，pH7.0～7.2）のプレート上に均一に拡散し，28℃，2～7日間培養して分離した．また，褐変反応試験は，GPYP液体培地およびパイナップルジュース培地を用いて，分離した菌株を接種し，28℃で7日間培養したのち約100℃で15分間加熱して褐変化の有無を調べた．

2）病原性の確認

8月上旬および中旬に開花促進剤の処理を行なったパイナップル（*Ananas comosus*）を25株ずつの3群に分け，分離した褐変化原因菌を開花時のパイナップル花腔と収穫前の果実に接種した．接種液の生菌数は10^8～10^9cell/mℓで，1株当たり0.3mℓを注射器で注入した．花腔に接種した2群および収穫前果実に接種した1群はそれぞれ適熟の段階で収穫し，オートクレーブで100℃，15分間の加熱処理を行なって，褐変化の有無を調べた．

3）供試菌株

同定のための比較対照菌株としては，東京大学応用微生物研究所の *Acetobacter aceti* IAM 1802，*Gluconobacter melanogenus* IAM 1818 および *Gluconobacter oxydans* IAM1823，(財)発酵研究所の *Gluconobacter oxydans* IFO 3189およびIFO 3287の5株を用いた．

4）同定

分離菌の形態学的，培養学的および生化学的性状検査は主として新細菌培地学講座[7]，微生物の分類と同定[8]，実験農芸化学[9]および Shimwell[10] らの方法に基づいて行ない，得られた結果はBergey's Manual（8 ed）[11]，Asai ら[12] および Choら[6] の報告と比較対照して，本分離菌株の分類上の位置について検討を行なった．

結果および考察

各種の分離用培地を用いて128株の菌を分離し，そのうち，GPYP液体培地およびパイナップルジュース培地に培養したのち，加熱処理により培地の褐変化を示す菌7株が得られた(Table 1)．これらの菌株は，いずれも加熱前の培養培地では褐変化はみられなかった．GPYP液体培地における褐変化原因菌の培養では，培養後に培地pHが著しく低下することが認められ，パイナップルジュース培地においても同じようなpHの低下がみられた．以上のことから，褐変化原因菌は，培養培地において褐変物質の前駆

Table 1 Degrees of browning in the culture medium by bacteria isolated from pink desease of pineapple

medium		Isolated strain	Incubation period	pH initial	pH after incubation	Degree of brownig before heat	Degree of brownig after heat
GPYP		a		7.0	2.9	−	++
Glucose	2.0%	b		7.0	2.9	−	++
Peptone	0.5%	c		7.0	3.1	−	++
Yeast ext	0.5%	d	7days	7.0	3.0	−	++
NaCl	0.5%	e		7.0	3.0	−	++
Pine Juice	25.0%	f		7.0	3.1	−	++
(pH 7.0)		g		7.0	3.0	−	++
		control		7.0	6.7	−	−
		a		3.7	2.9	−	+
		b		3.7	2.9	−	+
		c		3.7	3.0	−	+
Pineapple		d	7days	3.7	2.9	−	+
Juice(100%)		e		3.7	2.9	−	+
		f		3.7	3.0	−	+
		g		3.7	3.0	−	+
		control		3.7	3.7	−	−

Key to symbols ; −, negative ; +, positive ; ++, strongly positive

体（加熱後に褐変化）および酸性物質を生成することが推察され，また，パイナップルジュースのような低いpHでも十分に繁殖することが明らかになった．

一方，これらの分離菌の病原性を確認するため，開花時のパイナップルへの接種および収穫約2週間前の未熟果への接種を行なった．分離菌は開花時での接種においては発病がみられなかったが，収穫前の未熟果実への接種では93%の発病率を示した(Table 2)．接種による発病の有無はいずれも加熱後の褐変化によって確認された（Fig.2）．

Table 2 Percentage of pink disease symptom of pineapple inoculated with the isolated strain

Stage	Concentration	Inoculation day	Harvest period	pH (average)	Percent disease fruit(%)
	Cells/ml	1984	1985		
I Flower	$5\times10^7\sim3\times10^8$	10/5	3/1～3/20	3.3	0
II Pre-Flower	$5\times10^7\sim3\times10^8$	11/4	4/1～4/22	3.2	0
		1985			
III Maturation fruit	$3\times10^7\sim9\times10^8$	4/2	4/16～4/19	3.5	93

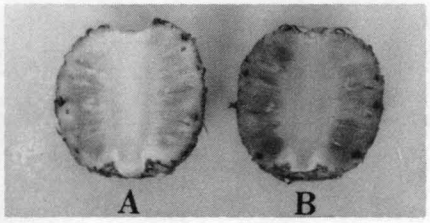

Fig.2 The symptom of pineapple fruit inoculated with the isolated bacteria.
A：Before heat　B：After heat

本分離菌株はpH 3前後という強い酸性下でも生育しうるということ，および果実より分離されたことから，*Gluconobacter* 属もしくは*Acetobacter* 属であることが予想された[8)13)]．そこで，その形態学的および生化学的性状を Bergey's Manual の Family I Pseudomonadacea Genus Ⅳと比較したところ（Table 3），本分離菌株は形状が短桿（Fig.3）で大きさは0.6～0.9×1.5～2.0μm，べん毛はなくグラム染色は陰性，運動性がみられず，pH 4.5でも生育する．大きさやpH 4.5での生育テストから，分離菌は*Pseudomonas*には属さず*Acetobacter*属もしくは*Gluconobacter*属に近いことが示された．しかし，*Acetobacter*属は酢酸および酪酸を酸化してCO_2の発生を示すものの．*Gluconobacter*属はそれらの酸化能がみられない．分離菌は*Gluconobacter*属同様に，酢酸および酪酸の酸化能がみられなかった．以上の特性から，本分離菌株はBer-

Table 3 Characteristics of the genus *Gluconobacter, Acetobacter Pseudomonas* and isolated strain

	Gluconobacter	Acetobacter	Pseudomonas	Isolated strain a	b	c	d	e	f	g
Morphology	rod	rod	Straight curved rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod
Size(μm)	0.6～0.8 ×1.5～2.0	0.6～0.8 ×1.3～3.0	0.5～1.0 ×1.5～4.0	0.6～0.9 ×1.5～1.8	0.7～0.9 ×1.7～2.0	0.7～0.9 ×1.6～1.9	0.7～0.9 ×1.6～2.0	0.7～0.8 ×1.6～1.9	0.7～0.9 ×1.6～1.8	0.7～0.9 ×1.5～1.9
Flagellation	Polar or none	Peritrichous or non	Polar or none	none	none	none	none	none	none	none
Gram stain	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Motility	+or−	+or−	+or−	−	−	−	−	−	−	−
Growth at pH 4.5	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+
Ethanol at acetic acid	+/M	+/S	−	+/W	+/W	+/W	+/W	+/W	+/W	+/W
Oxidation of acetate to CO_2	−	+	d	−	−	−	−	−	−	−
Oxidation of lactate to CO_2	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−
Production of 2-ketogluconate	+	d	−	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of starch	−	−	d	−	−	−	−	−	−	−
Gelatin	−	−	d	−	−	−	−	−	−	−

Key to symbols ; +, positive ; −, negative ; m, moderate ; s, strong ; w, weak ; d, different

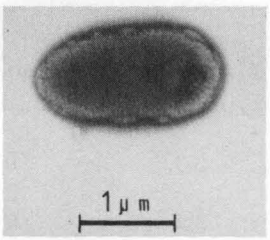

Fig.3 Electron micrograph of the isolated bacteria
(negatively stained with phosphotungstic acid)

gey's Manual (8 ed)の記載に従うと*Gluconobacter*に属することが示された.

さらに, Asaiらの記載に従って, 分離菌株を比較した結果 (Table 4), 同様に*Acetobacter*属

Table4 Physiological and biochemical characteristics of strains of genus *Gluconobacter*

	Pigmentation	Growth on		Reaction in		Oxydation of lactate to carbonate	DHA from glycerol
		Glutamate agar	Mannitol agar	Acetate	Lactate		
Isolated strain	—	—	+	acid	acid	—	+
Gluconobacter							
roseus	pink	—	+	unchanged	acid	—	+
suboxydans	pink	—	+	unchanged	acid or unchanged	—	+
cerinus	pink or-	—	+	unchanged	acid	—	+
gluconicus	—	—	+	unchanged	acid	—	+
dioxyacetonicus	—	—	+	acid	acid	—	+
ribiginosus	brown	—	+	acid	acid	—	+
melanogenus	brown	—	+	acid	acid	—	+
oxydans	—	—	+	acid	acid	—	+
Acetobacter							
aceti		—	±	alk	alk	+	—or+
albuminosus		—	±	alk	alk	+	—
acetosus		—	±	alk	alk	+	—
xylinus		—	±	alk	alk	+	+

Key to symbols ; +, positive ; —, negative

ではなく*Gluconobacter*属によく一致することが確認された.

そこで, 供試対照の*Acetobacter aceti* IAM 1802, *Gluconobacter melanogenus* IAM 1818, *Gluconobacter oxydans* IAM1823および Cho[6]らの報告とを比較すると(Table 5), 本分

Table 5 Physiological and biochemical characteristics of isolated strain

Characters	Isolated strain	Type Strain			J.J cho (1980)	
		Acetobacter aceti IAM 1802	*Gluconobacter melanogenus* IAM 1818	*Gluconobacter oxydans* IAM 1823	*Gluconobacter oxydans* 303 D	*Gluconobacter oxydans* 180
DNase Production	—	—	NT	NT	—	—
Growth in 5% NaCl	+	—	—	—	+	+
DHA from Glycerol	+	+	+	+	+	+
Urease	—	—	—	—	—	—
Thornley's arginine dehydrolase	—	—	—	—	—	—
Falkow's ornithine decarboxylase	—	+	—	—	—	—
Falkow's lysine decarboxylase	—	+	—	—	—	—
kovacs'oxidase	—	—	—	—	+	+
Utilization of acetate as sole carbon source	—	—	—	—	—	—
Indol production	—	—	—	—	—	—
Lipase production	—	+	—	—	—	—
Catalase	+	+	+	+	+	+
$CaCO_3$ from Ca-lactate	—	+	—	—	—	—
$FeCl_3$ reaction in glucose	—	—	+	—	NT	NT
β-Galactosidase production	—	—	—	—	—	—

Key to symbols ; —, negative ; +, positive ; NT, not test

離菌株はkovac's oxidase以外はすべて Choらの報告した*Gluconobacter oxydans*と一致することが示された. しかし, kovac's oxidase活性はIAM 1823では陰性となっているため,

*Gluconobacter oxydans*において，かならずしも同一反応を示すものではないと考えられる．また，各種糖からの酸生成能でも(Table6)，*Gluconobacter oxydan* の各供試菌株とほぼ一致し，

Table 6 Physiological and biochemical characteristics of isolated strain

Characters	Isolated Strain	Gluconobacter oxydans Type strain IAM1823	IFO 3189	IFO 3287	cho(1980) 303D	180
Acid from						
Adonitol	−	−	−	−	−	−
Arabinose	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	−	−	−	−	−	−
Dulcitol	−	−	−	−	−	−
Fructose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+
Inositol	−	−	−	−	−	−
Lactose	−	−	−	−	−	−
Maltose	−	−	−	NT	−	−
Mannose	+	+	+	NT	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+
Rhaffinose	+/W	+/W	−	+/W	+	+
Rhamnose	−	−	−	−	−	−
Salicin	+	+	+/W	+	+	+
Sucrose	+	+	+/W	+/W	+	+
Trehalose	+	−	−	+/W	+	+

Key to symbols; −, negative; +, positive; NT, not test; W, weak

Choらの報告とすべて一致することが認められた．

以上のことから，本分離菌株は*Gluconobacter oxydans*のSub-speciesであると同定された．

要 約

パイナップル缶詰工場で採取した果実より，パイナップル缶詰の褐変化原因菌を分離し，分類学的な検討を行なった．

1）分離した褐変化原因菌はGPYP液体培地およびパイナップルジュース培地に培養すると，加熱後に培地が褐変化した．

2）褐変化原因菌をパイナップル果実に接種すると93%の発病率を示した．

3）褐変化原因菌は Bergey's Manual (8 ed) およびAsaiらの記載に基づく分類では，*Gluconobacter*に属していることが示された．さらに，生化学的性状について供試対照菌株およびChoらの報告と比較したところ，褐変化原因菌は*Glucnobacter oxydans* sp と同定した．

謝 辞

本研究の遂行にあたり，有益な示唆をいただいた，元九州大学農学部教授の芥田三郎博士，農林水産省食品総合研究所の森勝美博士，沖縄県農林水産部専門技術員の上原勝江氏，さらに，材料の提供をいただいた，沖縄県農業試験場名護支場パイン研究室および 南西食品(株) に感謝します．

なお，本研究の費用の一部は，昭和60年度農林水産省地域食品振興対策事業によったものである．

文　献

1）平野考三郎，森光国（1968）：農産缶詰の生産技術の現状と問題点，日食工誌，15，pp 162～165

2）沖縄県農業試験場流通加工研究室（1986）：パイナップル缶詰における褐変缶の除去技術の開発に関する報告，（農林水産省地域食品振興対策事業報告書），pp 1～5

3）渡辺正一（1961），パイナップルの栽培と加工，琉球パイナップル缶詰組合，pp 334～335

4）J. L. Collins (1960)：The Pineapple, World Crops Books　p 198

5）D. G. Kontaxis et al (1978)：The Pathogen and Symptomatology of Pink Disease of Pineapple Fruit in the Philippines, *Plant. Dis. Repter.* **62**, 446

6）J. J. Cho et al (1980)：Nutritional Requirements and Biochemical Activities of Pineapple Pink Disease Bacterial strain from Hawaii, Antonie van Leeuwenhoek **46**, 197

7）坂崎利一（1980）：新細菌培地学講座・（上）近代出版，pp279～399

8）長谷川武治編（1985）：微生物の分類と同定・（下），学会出版センター，pp 100～151

9）東京大学農学部農芸化学教室編：（1960），実験農芸化学，朝倉書店，pp 240～244

10）J. L. Shimwell et al (1960)：Differentiation of Acetomonas and Pseudomonas *J. Gen. Microbiol,* **23**, 283

11）R. E. Buchanan et al (1975)：Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins Co., Baltimore pp 251

12）T. Asai et al (1964)：The Flagellation and Taxonomy of Genera Gluconobacter and Acetobacter with Reference to the Existence of Intermediate. Strains, *J. Gen. Appl. Microbiol* **10**, 104

13）朝井勇宣（1924）：果実に存する酢酸菌ならびに酢酸菌に近縁する酸化細菌の分類学的研究，農化，**10**，621