◇◇◇ 技術論文 ◇◇◇

トマトジュースの商業的無菌性を確保する加熱殺菌条件の検討

長田 隆^{1,3,†}, 中野千紗², 大坪研一³

¹トース株式会社, ²カゴメ株式会社, ³新潟大学大学院自然科学研究科

Heat Sterilization Conditions to Ensure Commercial Sterility of Hot-Filling Tomato Juice

Takashi OSADA^{1,3,†}, Chisa NAKANO², Kenichi OHTSUBO³

¹Toasu Corporation, 58 Miyanotsubo, Oosakicho, Toyokawashi, Aiti 442-8516, Japan

²Kagome Corporation, 17 Nishitomiya, Nasushiobara, Tochigi 329-2762, Japan

³Graduate School of Science and Technology, Niigata University, 2-8050 Ikarashi, Niigata, Niigata 950-2181, Japan

In the production of hot-filling tomato juice products, which pH value are below 4.6 and distributed at normal temperature, the heat sterilization condition is setting at 121°C for 0.7 min with *Bacillus coagulans* as an indicator, and it is widely used throughout the world. This study covered the three studies, 1) investigate bacterial spore contamination level of raw tomato material, 2) discover the best heat sterilization indicator, and 3) set the heat sterilization conditions in order to determine the ensured commercial sterility. In the production of hot-filling tomato juice products, which pH value are below 4.6, *B. coagulans* is unlikely to cause deterioration. Tainted tomatoes are often contaminated by *Bacillus subtilis* group and Genus *Thermoanaerobacterium*. In this report, spores of Genus *Thermoanaerobacterium*, which is identified from spoiled tomato juice and have been known to cause deterioration, should be used as a heat sterilization indicator for hot-filling tomato juice products. We used the heat resistance of hot-filling tomato juice (pH 4.6) with Genus *Thermoanaerobacterium* as an indicator. The required heat treatment conditions for proper sterilization were a $D_{121^\circ\text{C}}$ -value of 0.3 min, a z -value of 8.2°C, and an $F_{121^\circ\text{C}}$ -value of 1.5 min (D value $\times 5$). As a result of the above findings, the current heat sterilization conditions with 121°C for 0.7min are not sufficient for proper sterilization.

Keywords: tomato juice, commercial sterility, *Bacillus*, *Thermoanaerobacterium*, spore

1. 緒 言

トマトジュース缶詰は1923年マクニール&リビー社が商品化し、1929年ころから米国内で普及したが、1931年に、最初のフラットサワー型変敗が発生し、缶詰業者に多くの経済的損失をもたらした[1]。その後、1947年にSognefeatら[2]がトマトジュースの加熱殺菌条件(121°C・42秒間)を、1950年にBecker and Pedersonら[3]が変敗原因菌種を*Bacillus coagulans*であると報告し、現在まで世界に広く普及している。

我々は、これまで国産トマトジュース缶詰において、

フラットサワー変敗とは異なる膨張変敗をしばしば経験しており、トマトジュースの加熱殺菌条件について、再検討する必要があると考えた。そこで変敗したトマトジュース缶詰の原因菌種を調べ*Clostridium*属や*Thermoanaerobacterium*属であったこと、また、変敗したトマトジュースのpHは4.4以上であったこと[4]。さらに、原料トマトにおける細菌芽胞汚染状況を調べ、高頻度に分離されたのは、*Bacillus subtilis* groupや*Clostridium butyricum*であり、*B. coagulans*は分離されなかったこと[5]を報告した。

全国清涼飲料工業会によれば、健康志向を背景に2012年のトマトジュースの生産量は、急激に拡大し77,600 kl(前年比179%)であった。2013年は76,900 kl(前年比99%)とほぼ横ばいであった。なお、トマトジュースには、シーズンパックと濃縮還元の種類2の製法がある。前者はトマトを収穫後加工工場で搾汁しジュースにするタイプであり、後者はペーストにし

(受付2015年1月6日, 受理2015年3月13日)

[†]〒442-8516 愛知県豊川市大崎町宮の坪58番地

²〒329-2762 栃木県那須塩原市西富士17番地

³〒950-2181 新潟県新潟市五十嵐2の町8050

Fax: 0533-65-9910, E-mail: osada@toasu.co.jp

公益社団法人 日本缶詰びん詰レトルト食品協会

第63回技術大会(新潟)発表論文

た後希釈してジュースにするタイプである。いずれの製法もトマトジュースにはJAS規格上食塩以外の添加が認められておらず、酸味料を添加し酸度調整はできないため、トマトジュースのpHはトマト原料のpHに左右される。近年では、JASへのリコピン規格追加により完熟した原料を使用したトマトジュースの製造がされていることや、消費者の嗜好変化を背景に、甘く酸味の少ないトマト原料を使用したトマトジュースの商品開発が行われているなど、トマトジュースのpH上昇による微生物的安全性の低下が懸念される状況である。

本研究は、今後ますます需要が高まる常温流通するトマトジュースについて、微生物的安全性の向上のため、加熱殺菌指標菌である*B. coagulans*の妥当性を評価し、適切な加熱殺菌指標菌の選定と商業的無菌性が確保された加熱殺菌条件を算出することを目的とした。

具体的には、原料として用いられる国産や海外産原料トマトの細菌芽胞汚染を調べ、その汚染状況を把握するとともに、殺菌指標菌としての*B. coagulans*の妥当性を評価し、過去に変敗事例がある*Thermoanaerobacterium*属を指標に、商業的無菌性を確保するための加熱殺菌条件を算出した。なお、国産原料については著者ら[5]の報告があるため、ここでは海外産の原料トマトの細菌芽胞汚染状況と、国産原料については試作したトマトジュース中における*B. coagulans*の汚染状況を調べた。

2. 実験方法

2.1 試料および試料の調製

2.1.1 トマト原料

1) 海外産トマト原料

海外産トマト原料は、ジュース原料であるペーストを用いた。主な輸入先であるトルコ、イタリア、スペイン、北米、中国の5ヶ国と今後輸入量が増加すると考えられるオーストラリア、インドの2ヶ国の計7ヶ国9サプライヤーより、2012、2013年の2年間に製造されたものから、各年の4~6試料を、ただし、インドについては2013年のみを使用した。なお、ペーストは300 g~2 kg 無菌バックに採取されたものを常温輸送した。

2) 国産トマト原料によるPETボトル詰トマトジュースの試作と恒温試験

栃木県那須塩原地方で収穫したトマト約6,000 kgを、収穫後、常温で試験室へ運搬し、洗浄、加熱搾汁および25%水酸化ナトリウム溶液で、pH 4.4および4.6になるように調整した後、 $108 \pm 2^\circ\text{C} \cdot 60$ 秒間の加熱殺菌処理を行い、900 g PETボトルに90℃で充填した。なお、同ボトルの製造本数はpH 4.4が3240本、pH 4.6が3288本であった。

2.1.2 培地の調製

本研究に用いた培地を以下に示す。なお、4)~6)は駒木ら[6]の方法で調製した。

1) 標準寒天培地

日水製薬社製を用い、常法により調製した。

2) デキストローストリプトンアガー (以下、DTAと略す)

バクトトリプトン (Difco 社製) 10 g, グルコース 5 g, 寒天 20 g, 脱イオン水 1 Lを加え、加温溶解し、pH 7.3~7.5に調整後、プロムクレゾールパープル 0.004 gを加え、121℃, 20分間高圧殺菌した。

3) 変法TGC寒天培地 (以下、mTGCと略す)

日水製薬社製を用い、常法により調製した。ただし、市販品は寒天が0.7 g/Lであるため、2%になるように添加した。

4) PE-2培地 (以下、PE-2と略す) [6]

5) ピーインフュージョン半流動培地および寒天培地 (以下、PIS, PIAと略す) [6]

6) GCプロスA培地 (以下、GCAと略す) [6]

2.2 原料トマトの細菌芽胞数、分離と同定

2.2.1 原料トマトの細菌芽胞数とトマトジュースからの細菌の分離

1) 海外産トマト原料の細菌芽胞数

(1) 好気性細菌芽胞数

前記2.1.1のトマトペーストを滅菌したポリエチレン袋に25 g採取し、滅菌脱イオン水75 mL加え、良く混和した後、2 mLずつ、40枚のシャーレに分注後DTAに混釈し、20枚は35℃、残りは55℃で3~5日間培養し、形成した集落数を数え、トマトペースト10 g中の中温および高温細菌芽胞数とした。

(2) 嫌気性ガス産生菌芽胞数

前記2.1.1のトマトペーストを0.1 g, 1 gおよび10 gを、それぞれPE-2 (トマトペーストに対し10~20倍量) 10本に分注した。このうち5本は35℃、残りは55℃で3~5日間培養し、ガス発生の有無を確認し、最確数表 (5管法) より、トマトペースト10 g中の中温および高温細菌芽胞数とした。

2) 国産原料トマトで試作したPETボトル詰トマトジュースからの細菌分離

2.1.1で試作したトマトジュースを35℃で14日間恒温放置した後、全試料から1 mLを標準寒天培地に混釈し、35℃で7日間培養した。各平板培地に形成した集落を全て分離した。

2.2.2 細菌の分離

分離された菌株は、好気性細菌種は標準寒天培地、嫌気性細菌種はPE-2とmTGCへ植え継ぎ純粋分離した。なお、分離菌株が多数の場合は、集落の形態が異なるものを選抜した。

2.2.3 分離株の同定

分離株の同定は、PCR法により16SrRNAの遺伝子を解析し、データベースと照合した。

DNAはPrepman Ultra Reagent（ライフテクノロジー社製）を用い、プロトコールに従って操作した。なお、抽出したDNAの16SrRNAの塩基配列領域は、ユニバーサルプライマー（27f, r1L）を用い、PCR反応95℃で1分、50℃で1分、72℃で1.5分、35サイクルで増幅し、得られたPCR産物をMinElute PCR Purification Kit（キアゲン社製）によって精製した。

塩基配列はBig Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（ライフテクノロジー社製）によりシーケンシング反応を行った。反応条件は95℃で10秒、50℃で5秒、60℃で4分、25サイクルで増幅し、得られたシーケンシング反応物をCentri-Sep Spin columns（ライフテクノロジー社製）により精製した。塩基配列はDNAシーケンサーABI-3130（ライフテクノロジー社製）を用いて決定した。決定した塩基配列をNCBI BLASTにより相同検索し、相同性99%以上は種、99%未満は属までとした。

2.3 供試菌株芽胞の各pHに調整したトマトジュース中での発育

2.3.1 供試菌株

カゴメ（株）保存の*Thermoanaerobacterium*属3株（菌株番号PH1, FDA3, FDA6）、*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* 1株（菌株番号20）の計4株を用いた。これら4菌株はいずれもトマト缶詰の膨張変敗品から分離し同定した菌株である。

2.3.2 供試菌株の芽胞調製

供試菌株4株の保存芽胞液0.5 mLをPE-2に接種し、沸騰水中10分加熱処理した後、55℃で培養した。ガス産生による発育がみられたら、GCAに1 mL接種し、嫌氣的（アネロパック角型ジャー 三菱ガス化学社製）に55℃、5日間培養した。培養液を滅菌ガーゼでろ過し、ろ液を洗浄のため3回遠心分離（6℃、3,000 rpm、10分間）したものを滅菌バイアルに移し、試験まで-30℃で保存した。

2.3.3 芽胞数の測定

上記2.3.2で調製した芽胞液1 mLをPIAによるアナエロビク・パウチ法により測定した。なお、芽胞の活性化の加熱処理条件は、沸騰水中、10分間とし、培養条件は55℃、5日間とした。

2.3.4 供試菌株芽胞のトマトジュース中での発育

各pHに調整したトマトジュース中における供試菌株の発育を測定した。

1) トマトジュースの調製

加熱殺菌したトマトジュース（カゴメブランド、トマト100%ストレート、160 g缶）をpH 4.3、4.4、4.5

および4.6になるように3 N水酸化ナトリウム溶液を加え、耐熱ネジロビン（100 mL容）に80 mL分注し、これを105℃で5分間高圧殺菌した。

なお、用いたトマトジュースのpHは4.32であった。

2) トマトジュース中における発育

(1) 芽胞液の接種

供試菌株の芽胞液を滅菌脱イオン水で希釈し、各pHに調整したトマトジュースにそれぞれ芽胞数が約 10^3 CFU/mLになるように加え、硬質ガラス管（内径7 mm、外径9 mm、長さ15 cm：以下チューブとする）13本に3 mLずつ分注し、菌を接種しないトマトジュースも、それぞれ9本に3 mLずつ分注し、酸素炎で溶封した。これらを沸騰水中で、10分加熱処理した。

(2) 初発芽胞数、pHの測定

加熱処理後の無接種試料と芽胞液接種試料の各3本について測定した。芽胞数の測定は、2.3.3と同様に行った。なお、残りの液を使用しpH計（東和電波工業製HM-50V）でpHを測定した。

(3) 恒温放置および発育判定

加熱処理後の無接種試料6本、芽胞液接種試料10本を、55℃、30日間恒温放置し、外観およびpHの変化が認められたものを発育陽性とした。

2.4 供試菌株芽胞のトマトジュースでの耐熱性

1) 菌株の選定

供試菌株の中から、最も耐熱性が強い株を選定した。

供試菌株の芽胞液を滅菌脱イオン水で希釈し、芽胞数が約 10^5 CFU/mLになるようにPISに加え、チューブに2 mLずつ分注後、酸素炎で溶封した。これらを恒温油槽（タイテック社製：サーモパ OH-16、油は日本油脂社製：ポリエチレングリコール400）で、所定の条件で加熱処理した後、55℃、14日間培養し、外観の変化により発育陽性とした。このとき、1加熱温度・時間条件にチューブ1本を供した。

2) 0.067 M リン酸緩衝液（pH 7.0）における耐熱性

供試菌株の芽胞液1 mLを、0.067 M リン酸緩衝液（pH 7.0）に芽胞数が約 10^5 CFU/mLになるように加え、チューブに2 mLずつ分注し酸素炎で溶封した。これらを恒温油槽で、所定の条件で加熱処理後、PIAによるアナエロビク・パウチ法により測定した。このとき、1加熱温度・時間条件にチューブ1本を供した。

3) トマトジュース（pH 4.6）中における耐熱性

供試菌株の芽胞液1 mLを、トマトジュース（pH 4.6）に芽胞数が約 10^5 CFU/mLになるように加え、チューブに3 mLずつ分注し酸素炎で溶封した。チューブは恒温油槽を用い、所定の条件で加熱処理した。このとき、1加熱温度・時間条件にチューブ5本を供した。また、培養条件は55℃、30日間とし、外観およびpHの変化により発育の有無を判定した。

なお、加熱処理時間の補正は、松田ら [7] の補正表より、加熱処理時間から 1.5 分を減じた。

3. 結果および考察

3.1 原料トマトの細菌芽胞汚染

3.1.1 海外産トマトペーストの細菌芽胞数および分離菌の同定

供試試料の細菌芽胞数およびその種について調べた結果を、Table 1 および 2 に示す。

1) 好気性細菌芽胞数

供試 84 検体の 10 g 当たりの好気性細菌芽胞数は、中温性で分離されなかったのは 61 検体 (73%)、1CFU～10CFU 未満は 9 検体 (10%)、10CFU～10⁴CFU 未満が 14 検体 (17%) で、高温性で分離されなかったのは 65 検体 (77%)、1CFU～10CFU 未満は 11 検体 (13%) および 10CFU～10²CFU 未満が 7 検体 (8%) であった。国別では、イタリア産が中温、高温性ともに多く、インド産は中温性の汚染が比較的高かった。

2) 嫌気性ガス産生菌芽胞数

供試 84 検体の 10 g 当たりの嫌気性ガス産生菌芽胞数は、中温性で 0.2 未満が 70 検体 (83%) で、0.2～1 未満が 7 検体 (8%)、1～10² 未満が 7 検体 (8%) であった。また、高温性は 0.2 未満が 42 検体 (50%)、0.2～1 未満が 23 検体 (27%)、1～10 未満が 15 検体 (18%) および 10～10² 未満が 3 検体 (4%) であった。国別では、イタリア産が中温、高温性ともに多く、オーストラリ

ア産は高温性の汚染が比較的高かった。

よって、海外 7 カ国のトマトペースト 84 検体について、10 g 当たりの好気性芽胞および嫌気性ガス産生菌芽胞の汚染状況を調べた結果、好気性芽胞数が 10CFU 未満であったのは中温性が 70 検体 (83%)、高温性が 76 検体 (90%) で、また、嫌気性ガス産生菌芽胞数が 1 未満であったのは中温性が 77 検体 (92%)、高温性が 65 検体 (77%) であった。

3) 分離菌株の同定結果

海外産トマトペーストから分離した好気性の菌株 82 株の同定結果は、中温菌種は *Bacillus* が 21 株、*Paenibacillus* が 26 株、*Brevibacillus* が 1 株であり、*B. amyloliquefaciens*, *P. azoreducens* が多かった。高温菌種は *Bacillus* が 12 株、*Geobacillus* が 9 株、*Paenibacillus* が 6 株、*Tuberibacillus* が 5 株、*Brevibacillus* が 2 株であった。なお、国産トマト同様、トマトジュースの殺菌指標菌である *B. coagulans* は分離されなかった。一方、嫌気的に分離した菌株 34 株の同定結果は、中温菌種は *Clostridium* と、*Thermoanaerobacterium* が同様に 2 株、高温菌種は 30 株全て *Thermoanaerobacterium* であり、*T. aciditolerans* が 10 株、*T. aotearoense* が 9 株、*T. thermosaccharolyticum* が 3 株の順であった。山口ら [9] は、変敗缶詰食品から分離した *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *T. aotearoense* および *T. aciditolerans* の 3 種の耐熱性は同様であり、殺菌試験などの指標菌選定には種による区別が不要であると報告している。このことから 3 群を 1 群として扱うと、海外のトマトペーストにはいずれの国

Table 1 The number of heat resistant bacterial spores in tomato paste produced in seven different countries.

Country of manufacture	Number of samples examined	pH range	Heat resistant aerobic spore (CFU/10 g) ¹⁾						Heat resistant anaerobic spore (/10 g) ²⁾									
			Mesophilic				Thermophilic		Mesophilic			Thermophilic						
			10 ³ ~<10 ⁴	10 ² ~<10 ³	10~<10 ²	1~<10	0	10~<10 ²	1~<10	0	10~<10 ²	1~<10	0.2~<1	<0.2	10~<10 ²	1~<10	0.2~<1	<0.2
Turkey	21	4.23 -4.30				3 ³⁾	18		1	20			21		1	4	15	
Italy	10	4.25 -4.41		6	4			5	4			2	4	4	2	4	1	3
Spain	10	4.25 -4.32					10			10			10		3	3	4	
China	20	4.17 -4.22				2	18	2		18		1	19				5	15
America	8	4.22 -4.39			1	3	4		4	4		3	5		2	6		
Australia	10	4.31 -4.37					10		2	8		1	2	7	1	5	3	1
India	5	4.21 -4.34	1	2		1	1			5		1	4				1	4
Total	84		1	8	5	9	61	7	11	65	2	5	7	70	3	15	23	42

1) The number of bacterial spores by aerobic plate method using DTA medium (CFU/10 g)

2) The number of bacterial spores by MPN method using PE-2 medium (/10 g)

3) Number of samples

Table 2 Microflora isolated from tomato paste made in seven different countries.

Aerobic bacterial				Anaerobic bacterial			
Mesophilic		Thermophilic		Mesophilic		Thermophilic	
Species/ (Isolated strains)		Species/ (Isolated strains)		Species/ (Isolated strains)		Species/ (Isolated strains)	
<i>Bacillus</i>		<i>Bacillus</i>		<i>Clostridium</i>		<i>Thermoanaerobacterium</i>	
<i>amyloliquefaciens</i>	(7)	<i>smithii</i>	(5)	<i>nitrophenolicum</i>	(1)	<i>saccharolyticum</i>	(3)
<i>cereus</i>	(4)	<i>gelatini</i>	(3)	<i>aciditolerans</i>	(1)	<i>aotearoense</i>	(9)
<i>licheniformis</i>	(4)	<i>shackletonii</i>	(2)	<i>Thermoanaerobacterium</i>		<i>aciditolerans</i>	(10)
<i>aerius</i>	(2)	<i>licheniformis</i>	(2)	<i>aciditolerans</i>	(2)	<i>thermosaccharolyticum</i>	(3)
<i>fumarioli</i>	(1)	<i>Geobacillus</i>				<i>sp</i>	(5)
<i>megaterium</i>	(1)	<i>kaustophilus</i>	(5)				
<i>sonorensis</i>	(1)	<i>thermoleovorans</i>	(4)				
<i>sp</i>	(1)	<i>Paenibacillus</i>					
<i>Paenibacillus</i>		<i>cookie</i>	(4)				
<i>azoreducens</i>	(14)	<i>phoenicis</i>	(1)				
<i>cookie</i>	(3)	<i>sp</i>	(1)				
<i>konsidensis</i>	(2)	<i>Brevibacillus</i>					
<i>dendritiformis</i>	(1)	<i>borstelensis</i>	(1)				
<i>phoenicis</i>	(1)	<i>sp</i>	(1)				
<i>sp</i>	(5)	<i>Tuberibacillus</i>					
<i>Brevibacillus</i>		<i>sp</i>	(5)				
<i>choshinensis</i>	(1)						

のものからも比較的高頻度に分離されており、トマトジュースの変敗防止対策には *Thermoanaerobacterium* 芽胞の少ない原料を受入れ使用することが重要と考える。すなわち、PE-2 培地 5 本にトマトペースト 10 g ずつ接種し、55℃で 5 日間培養後、ガス発生がない原料を選定することである。

3.1.2 国産原料トマトで試作した PET ボトル詰トマトジュースからの細菌分離

1) 好気性中温細菌芽胞数

国産原料トマトで試作した PET ボトル詰トマトジュースを 35℃、2 週間恒温放置した後、pH 4.4 は 3,240 本の内 16 本、pH 4.6 は 3,288 本の内 2 本、から細菌が分離された。

2) 分離菌の同定結果

pH 4.4 の試作トマトジュースより分離された菌種 16 株は全て *Bacillus amyloliquefaciens* で、また、pH 4.6 の試作トマトジュースより分離した 2 菌株は *B. amyloliquefaciens* と *Bacillus* 属であった。駒木ら [8] は、*B. amyloliquefaciens* は、*B. subtilis*、*B. licheniformis* の近縁種であり、加熱殺菌の対象としては一群として捉えるべきと報告している。このことから、過去の報告 [5] 同様にトマト原料の主体汚染菌種は、*B. subtilis* group であった。また、トマトジュースの殺菌指標菌である *B. coagulans* は分離されなかった。

3.1.3 殺菌指標菌である *B. coagulans* の妥当性

国産トマトでは 6,000 kg、海外産トマトペースト 10

g (トマトジュース 40 mL 相当) から、*B. coagulans* 芽胞は分離されなかった。Rice ら [10] は、トマトジュースを変敗させる pH と *B. coagulans* 芽胞数の関係を調べ、pH 4.4 のトマトジュースを変敗させるのに 22~650 CFU/mL、White [11] は 1~3 CFU/mL が必要であると報告している。これより、トマト原料の *B. coagulans* 芽胞の汚染度はトマトジュースを変敗させるリスクは低いと考えられる。実質的には原料汚染度の高い *B. subtilis* group や *Thermoanaerobacterium* 属を考えるべきであり、とくに変敗事例のある *Thermoanaerobacterium* 属芽胞をトマトジュースの加熱殺菌指標として管理するべきである。これまで、*Thermoanaerobacterium* 属芽胞については、耐熱性が強いいため、加熱殺菌で殺滅するのは困難とされ、もっぱら製造工程に持ち込まない除菌対応の菌種として取り扱われており、酸性食品での本菌種芽胞の耐熱性はあまり調べられてこなかった。

3.2 供試菌芽胞の各 pH に調整したトマトジュース中での発育

供試菌芽胞の各 pH に調整したトマトジュース中での発育結果を Table 3 に示す。供試菌株 4 株すべて pH 4.6 で発育し、pH 4.5 では 1 株 (菌株番号 20) が発育したが、pH 4.4 以下では発育がみられなかった。このことから、トマトジュースの pH を 4.4 以下に管理すれば *Thermoanaerobacterium* 属芽胞による変敗を防止することができると思われる。なお、犬飼ら [12] は、

Table 3 Growth of selected strains of *Thermoanaerobacterium* sp in tomato juice at various pH levels.

Species	Strain No.	Incubation (month/°C)	pH			
			4.3 ¹⁾	4.4	4.5	4.6
			4.3 ²⁾	4.4	4.5	4.6
			4.2 ³⁾	4.2~4.3	4.3~4.4	4.4
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp	PH1	1/55	— ⁴⁾	—	—	+
<i>Thermoanaerobacterium</i> <i>thermosaccharolyticum</i>	FDA3		—	—	—	+
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp	FDA6		—	—	—	+
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp	20		—	—	+	+

1) Before sterilization 2) After sterilization 3) After incubation for 1 month at 55°C 4) —, No growth; +, Positive growth

Clostridium 属細菌芽胞の発育に及ぼす pH の影響を培地中で調べ, *C. thermosaccharolyticum* は pH 4.73 で 10 株中 5 株に発育がみられ, pH 4.51 では発育しなかったと報告した. このことから, 本種芽胞の発育下限 pH は 4.4~4.5 のあたりと推定させる.

3.3 供試菌芽胞のトマトジュース中での耐熱性

供試菌株の中より最も強い耐熱性を有している菌株を選抜するために, PIS での耐熱性について, 加熱温度 (110, 115, 120 および 125°C) で 10, 20 および 30 分間処理し, $D_{115^\circ\text{C}}$ を求めた. 菌株番号 PH1 は 1 分未満, FDA3 は 1.9 分, FDA6 は 5.0 分, 20 が最も強く 6.7 分であった. よって, 以下の試験には菌株番号 20 を用いることとした.

3.3.1 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中での耐熱性

菌株番号 20 の 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) における生存曲線を Fig. 1 に示し, 加熱致死時間曲線を Fig. 2 に示す.

この結果から菌株番号 20 の $D_{121^\circ\text{C}}$ 値 (121°C 加熱時における 90% 致死時間) および z 値 (加熱致死時間曲線の勾配, D 値の 10 倍の変化に対応する温度変化) は, 0.5 分および 6.2°C (95% 信頼限界 4.6~9.5°C) であった.

Fig. 1 Survival curves for spores of *Thermoanaerobacterium* strain No.20 heated in 0.067 M-phosphate buffer (pH 7.0).

過去, 容器包装詰食品で変敗原因となった本種の 0.067 M リン酸緩衝液での耐熱性については, 遠山ら [13] は 10^4 の芽胞を殺滅するのに 120°C で 3.5~8 分, 池上ら [14] は 120°C で 5 分を要したこと. 田中 [15] は $D_{121.1^\circ\text{C}}$ 値が 1.6 分と報告した. また, z 値は遠山ら [13] は 9.27~9.71°C, 池上ら [14] は 10°C, 田中 [15] は 10.9°C と報告している. よって, 菌株番号 20 の $D_{121^\circ\text{C}}$ 値 0.5 分はそれらと比べると約 1/2~1/3 であった.

3.3.2 トマトジュース (pH 4.6) 中での耐熱性

菌株番号 20 のトマトジュース (pH 4.6) の加熱温度 (111~117°C) における耐熱性測定結果を Table 4 に示し, 次式より各加熱温度の D 値を算出した. 得られた D 値より加熱致死時間曲線を Fig. 3 に示す.

$$D = t / (\log a - \log b)$$

(t =補正後の加熱時間 a =初発芽胞数 b =加熱時間 t のときの生残芽胞数)

上式を使用し, 111°C の D 値を算出する例を以下に示した.

補正後の加熱時間 (t) 25 分のとき, $a = (1.4 \times 10^4) \times 3 \text{ mL} \times 5 \text{ 本} = 2.1 \times 10^5$, $b = 4$ であり, $D_{111^\circ\text{C}} = 25 / (\log(2.1 \times 10^5) - \log 4) = 5.3$ 分となる. 同様に $D_{113^\circ\text{C}}$ 値が 2.4 分, $D_{115^\circ\text{C}}$ 値が 1.6 分, $D_{117^\circ\text{C}}$ 値が 0.9 分で, z 値は 8.2°C (5.8

Fig. 2 Thermal death time curves for spores of *Thermoanaerobacterium* strain No.20 heated in 0.067 M-phosphate buffer (pH 7.0).

Table 4 Heat resistance of *Thermoanaerobacterium* strain No.20 spores heated and subcultured in tomato juice (pH 4.6).

Corrected heating time (min)	Heating temperature (°C)			
	111	113	115	117
2	— ¹⁾	—	—	5 ²⁾
3	—	—	—	5
4	—	—	—	5
5	—	—	5	1
6	—	—	5	0
8	—	—	2	0
10	—	5	0	—
13	—	1	0	—
16	—	0	0	—
20	5	0	0	—
25	4	0	—	—
32	0	0	—	—
40	0	0	—	—
50	0	—	—	—
63	0	—	—	—
80	0	—	—	—

The spores amounting 4.2×10^4 CFU was incubated to each samples tube, and they were incubated for 1 month at 55°C after heating. 1) Not tested 2) Number of positive growth tubes in the five samples examined

Fig. 3 Thermal death time curves for spores of *Thermoanaerobacterium* strain No.20 heated in tomato juice (pH 4.6).

～14.2°C)であった。この結果から $D_{121^\circ\text{C}}$ 値を換算すると、0.3分であった。

菌株番号20のリン酸緩衝液およびトマトジュースにおける耐熱性値をTable 5に示す。リン酸緩衝液がトマトジュースより約2倍の耐熱性を示していた。

以上のことから、トマト原料から *B. coagulans* は分離されず、トマトジュースの変敗原因である *Thermoanaerobacterium* 属が高い頻度で分離されたことから、常温流通する pH 4.6 未満のトマトジュースの加熱殺菌の指標菌は、*B. coagulans* よりも *Thermoanaerobacterium* 属にすべきである。また、加熱殺菌条件は、一般的には $D_{121^\circ\text{C}}$ 値の5倍とし算出することから、121°Cにおける殺菌値は1.5分であった。現在、トマトジュースの加熱殺菌条件として採用されている121°C、0.7分と比較すると不足していた。

121°C、1.5分の加熱殺菌処理がトマトジュースの品質に及ぼす影響については、確認はできていないが、品質低下が十分予想される。今後の検討として、pH 4.4以下のトマトジュースであれば *Thermoanaerobacterium* 属芽胞は発育しないことから、トマトジュースのpH管理を強化し、加熱殺菌条件をより緩和する研究が必要である。

4. 結 論

常温流通する pH 4.6 未満のトマトジュースの製造において、原料トマトの細菌芽胞汚染状況を調べ、現在、加熱殺菌の指標として広く用いられている *B. coagulans* の妥当性について評価し、商業的無菌性を確保する加熱殺菌条件を算出した。

- 1) 国産トマト原料約6,000 kgを使用し試作したトマトジュースの好気性中温細菌では、*B. amyloliquefaciens* が17/18株分離され、*B. subtilis* group が汚染菌の主体であり、*B. coagulans* は分離されなかった。
- 2) 海外トマト原料（トマトペースト10 g）の汚染細菌種では、好気性中温菌は *B. subtilis* group や *Paenibacillus* sp, 高温菌は *Geobacillus* sp, *Bacillus* sp, *Paenibacillus* sp が多く分離されたが、*B. coagulans* は分離されなかった。嫌気性菌では、幅広く *Thermoanaerobacterium* 属が分離された。
- 3) *Thermoanaerobacterium* 属は、供試菌株4株の中で菌株番号20だけがpH 4.5のトマトジュースで発育した。しかし、pH 4.4以下では発育しなかった。
- 4) *Thermoanaerobacterium* 属菌株番号20のトマトジュース（pH 4.6）での $D_{121^\circ\text{C}}$ 値は0.3分、 z 値は8.2°C（95%信頼限界は5.8～14.2°C）であった。これより、

Table 5 K Parametric value of heat resistance for *Thermoanaerobacterium* strain No.20 spores suspended in 0.067-M phosphate buffer (pH 7.0) and tomato juice (pH 4.6).

Heating medium	D value (min)			z value (°C)
	115°C	120°C	121°C	
0.067-M Phosphate buffer (pH 7.0)	5.0	0.8	0.5	6.2 (4.6～9.5) ¹⁾
Tomato juice (pH 4.6)	1.6	0.4	0.3	8.2 (5.8～14.2)

1) (95% confidence limits)

F_{121℃} 値 1.5 分に相当の加熱殺菌処理が必要であった。

以上のことから、トマトジュースを製造する上では、原料由来の *B. coagulans* による変敗の危害性は低く、実質的には原料汚染度の高い、*B. subtilis* group や *Thermoanaerobacterium* 属を考えるべきであり、とくに変敗事例のある *Thermoanaerobacterium* 属芽胞をトマトジュースの加熱殺菌指標として管理するべきである。しかしながら、現在、トマトジュースの加熱殺菌条件として一般に採用されている F_{121℃} 値 0.7 分と比較すると不足していた。

謝 辞

本研究をまとめるにあたり、ご助言を賜りました公益社団法人日本缶詰びん詰レトルト食品協会 駒木勝氏 大久保良子氏に深く感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) W. A. Gould; "Tomato Production, Processing and Technology" Third Edition, 1992, p.420.
- 2) R. Sognefest, J. M. Jackson.; Presterilization of canned tomato juice Food Technol, **1** 78-84 (1947).
- 3) E. M. Becker, C. S. Pederson; The physiological characters of *Bcillus coagulans* (*Bacillus thermoacidurans*). J. Bacteriol. **59**, 717-725 (1950).
- 4) T. Osada; "Thermal resistant spore forming bacteria isolated from spoiled canned tomato juice manufactured by the of fresh-squeezed packing" (in Japanese). The Kanzume Jiho. **88**, 727-732 (2009).
- 5) T. Osada, M. Takei; "Contamination by heat resistant bacterial spores during manufacturing process of fresh-squeezed canned tomato juice" (in Japanese). The Kanzume Jiho, **88**, 733-743 (2009).
- 6) M. Komaki, R. Ichikawa, N. Matsuda; "Sporulation medium for *Clostridium thermosaccharolyticum*" (in Japanese). The Kanzume Jiho, **70**, 990-997 (1991).
- 7) N. Matsuda, M. Komaki, K. Matsunawa; "Heating and cooling lag correction in heat treatment for determination of heat resistance of bacterial spores" (in Japanese). The Kanzume Jiho, **59**, 785-790 (1980).
- 8) M. Komaki; "ATARASHII RETORTOSHOKUHI KAIHATSU・SEIZOU HANDOBUKKU" (in Japanese); M. Yokoyama, K. Tanaka, Science Forum, 2007, pp.229-236.
- 9) T. Yamaguchi; Japan canned Association, 57 times technology convention program, p.11 (2008).
- 10) A. C. Rice, C. S. Pederson; "Factors influencing growth of *Bacillus coagulans* in canned tomato juice. 1. Size of inoculum and oxygen concentration" Food Res. **19**, 115-123 (1954).
- 11) L. S. White; Spoilage bacteria in tomato product. Food Res. **16**, 442-428 (1951).
- 12) S. Inukai, M. Kimura, M. Hisatomi; "Effect of pH, Sodium chloride and sucrose on heat resistance of spores of *Clostridium thermosaccharolyticum* and *Clostridium sporogenes*" (in Japanese). The Kanzume Jiho, **70**, 998-1008 (1991).
- 13) Y. Toyama, Z. Nakajima; "Studies on the thermophilic bacteria causing 'swells' of canned food. (2) Some characters that have relation to production of canned food" (in Japanese). J. Fish Dis, **16**, 60-64 (1950).
- 14) Y. Ikegami, D. Mori; "Studies on canned bamboo shoots -V. Spoilage bacteria on bamboo shoots packed in large cans" (in Japanese). Report of Toyo institute of Food Technology, **11**, 170-174 (1974).
- 15) S. Tanaka; "Bacteriological studies on the spoilage of canned baby clem, (1). The physiological characteristics of isolated organisms of the sulphide and gaseous spoilage and results of the experimental packs" (in Japanese). The Kanzume Jiho, **70**, 998-1008 (1991).

要 旨

常温流通する pH 4.6 未満のトマトジュースの製造において、*B.coagulans* を指標に 121℃、0.7 分の加熱殺菌条件が世界で広く採用されている。本研究は原料トマトの細菌芽胞汚染を調べ、適切な指標菌を検討し、商業的無菌性を確保する加熱殺菌条件の算出を行った。

pH 4.6 未満のトマトジュースを製造する上では、*B.coagulans* による変敗の危害性は低く、原料汚染度の高い、*B.subtilis* group や *Thermoanaerobacterium* 属が重要で、とくに変敗事例のある *Thermoanaerobacterium* 属芽胞をトマトジュースの加熱殺菌指標に管理するべきと結論した。本属芽胞を指標菌に、トマトジュース (pH 4.6) における耐熱性を測定した結果、D_{121℃} 値は 0.3 分、z 値は 8.2℃で、これらの値から殺菌値を算出すると、F_{121℃} 値は D_{121℃} 値の 5 倍から 1.5 分となる。現在の加熱殺菌条件は、これを下回っている。