

トマトジュースの商業的無菌性を
確保する新たな加熱殺菌条件に関する研究

長田隆

新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程

生命・食料科学専攻

2015

目次

第 1 章 諸言

- 1.1. トマトジュースの分類 5
 - 1.1.1. 野菜飲料の種類
 - 1.1.2. トマトジュース
 - 1.1.3. 野菜飲料の殺菌基準
- 1.2. 加熱殺菌の理論 10
- 1.3. トマトジュースの誕生 12
- 1.4. 耐熱性細菌について 13
 - 1.4.1. 食品衛生上問題となる主要な耐熱性細菌
 - 1.4.2. *Bacillus coagulans*
- 1.5. トマトジュースの生産量の推移 23
- 1.6. トマトジュースの微生物的安全性 26
 - 1.6.1. 先行研究 1 (トマトジュース変敗事例) 26
 - 1.6.1.1. 国産トマトジュース
 - 1.6.1.2. 海外産トマトジュース
 - 1.6.2. 先行研究 2 (トマトジュース加熱殺菌条件の設定) 27
 - 1.6.3. 先行研究 3 (トマトジュースの pH, 芽胞汚染量と変敗の関係) 28
 - 1.6.4. 先行研究 4 (国産トマト原料の耐熱性細菌芽胞汚染) 28
 - 1.6.4.1. 好気性耐熱細菌芽胞数とその種
 - 1.6.4.2. 嫌気性耐熱細菌芽胞数とその種
- 1.7. 研究の目的 35

第 2 章 *Bacillus coagulans* のトマトジュース中での発育

- 2.1. 諸言 36

2.2.	実験方法	36
2.2.1.	試料および試料の調製方法	36
2.2.1.1.	供試菌株	
2.2.1.2.	トマトジュースの調製	
2.2.1.3.	培地の調製	
2.2.1.4.	供試菌株の芽胞調製	
2.2.2.	供試菌株芽胞のトマトジュース中における発育	38
2.3.	結果および考察	39
2.4.	結論	41

第3章 原料トマトにおける耐熱性細菌芽胞の汚染

3.1.	諸言	42
3.2.	実験方法	42
3.2.1.	試料および試料の調製方法	42
3.2.1.1.	トマト原料	
3.2.1.2.	培地の調製	
3.2.2.	原料トマトの細菌芽胞数，分離と同定	44
3.2.2.1.	原料トマトの細菌芽胞数	
3.2.2.2.	細菌の分離	
3.2.2.3.	菌株の同定	
3.3.	結果および考察	46
3.3.1.	原料トマトの細菌芽胞汚染	46
3.3.1.1.	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	
3.3.1.2.	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

3.3.1.3. 殺菌指標菌である *B. coagulans* の妥当性

3.4. 結論	51
---------	----

第4章 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

4.1. 諸言	53
4.2. 実験方法	53
4.2.1. 試料および試料の調製方法	53
4.2.1.1. 供試菌株	
4.2.1.2. 培地の調製	
4.2.1.3. 供試菌株の芽胞調製	
4.2.2. 供試菌株芽胞のトマトジュース中での発育	55
4.2.3. 供試菌株芽胞のトマトジュース中での耐熱性	56
4.3. 結果および考察	57
4.3.1. 供試菌株芽胞の pH に調整したトマトジュース中での発育	57
4.3.2. 供試菌株芽胞のトマトジュース中での耐熱性	58
4.3.2.1. 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中での耐熱性	
4.3.2.2. トマトジュース (pH 4.6) 中での耐熱性	
4.4. 結論	66

第5章 トマトジュース製造における pH 管理が及ぼす商業的無菌性への効果

5.1. 諸言	67
5.2. 実験方法	67
5.2.1. 試料および試料の調製方法	67

5.2.1.1.	供試菌株	
5.2.1.2.	培地の調製	
5.2.1.3.	供試菌株の芽胞調製	
5.2.2.	<i>B. subtilis</i> group の菌株選定	70
5.2.2.1.	pH 4.4 および 4.6 トマトジュース寒天培地上での発育	
5.2.2.2.	GB (pH 7.0) 中での耐熱性	
5.2.3.	供試菌株芽胞の pH 4.4 および 4.6 のトマトジュース中での発育	71
5.2.4.	供試菌株芽胞の pH 4.4 のトマトジュース中での耐熱性	72
5.3.	結果および考察	72
5.3.1.	<i>B. subtilis</i> group の菌株選定	72
5.3.2.	pH 4.4 トマトジュース中での発育	73
5.3.3.	pH 4.4 トマトジュース中での耐熱性	74
5.3.3.1.	0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中での耐熱性	
5.3.3.2.	トマトジュース (pH 4.4) 中での耐熱性	
5.4.	結論	86
第 6 章 総括		87
謝辞		91
参考文献		92

第 1 章 諸言

1.1. トマトジュースの分類

1.1.1. 野菜飲料の種類

野菜飲料には明確な定義はなく，野菜が含まれる飲料という意味で使用されている。

その種類は，単一の野菜 100%で製造されるトマトジュース，にんじんジュースや，複数の野菜を組み合わせた野菜ジュース，野菜と果実を組み合わせた野菜・果実ミックスジュース（果汁 50%以上のものは果実・野菜ミックスジュース）などがある。

1.1.2. トマトジュース

トマト飲料には，「トマトジュース（シーズンパック）・（濃縮トマト還元）」，「トマトミックスジュース」がある。

トマトジュースについては，日本農林規格（JAS）で，「トマトを破砕して搾汁し，又は裏ごしし，皮，種子等を除去したもの」または「濃縮トマト（食塩以外のものを加えていないものに限る）を希釈して搾汁の状態に戻したもの又はこれに食塩を加えたもの」とされている。

トマトジュースの製造方法を図 1-1 に示す。トマトジュースには，生トマトを搾汁しジュースを製造するシーズンパック，真空や逆浸透濃縮法で製造したトマトペーストを，水で希釈混合しジュースを製造する濃縮トマト還元の 2 タイプがある。充填方法には，内容物を殺菌し，金属缶や PET ボトルに熱間充填し，容器や製造環境からの混入微生物を殺菌するために，充填後に製品の転倒や熱水シャワ

一による後殺菌を実施するホットパック製法がある他、紙容器等へ無菌環境下で低温充填する無菌パック製法がある。

1.1.3. 野菜飲料の殺菌基準

野菜飲料は食品衛生法（第 11 条関連「食品，添加物等の規格基準」清涼飲料水の部）における pH 4.0 以上 4.6 未満の清涼飲料水に区分されるものが主体となり，85℃，30 分の加熱，またはそれと同等以上の効果を有する方法で殺菌することが，表 1-1 の清涼飲料水の製造基準で義務付けられている。また，85℃，30 分を基準に z 値（1.2. 加熱殺菌の理論で解説）8℃で換算し，加熱温度を 85℃以外に設定することもできる。表 1-2 に pH 4.0 未満は z 値が 5℃，pH 4.0～4.6 未満は z 値が 8℃，pH 4.6 以上は z 値が 10℃として，それぞれ加熱殺菌条件換算表を示す。しかし，野菜飲料は原料が農産物であるため，土壌に由来する微生物の混入が生じやすいこと，混濁飲料が多くと過減菌ができないことから，殺菌基準より比較的強めの加熱殺菌が行われているのが実情である。また，常温で流通する野菜飲料の多くの pH 域は，4.0～4.5 であり，その範囲においては pH の変化により発育する微生物種は変わるため，pH の制御による静菌と加熱殺菌のバランスが製品の安全性と品質に重要な影響を与える。

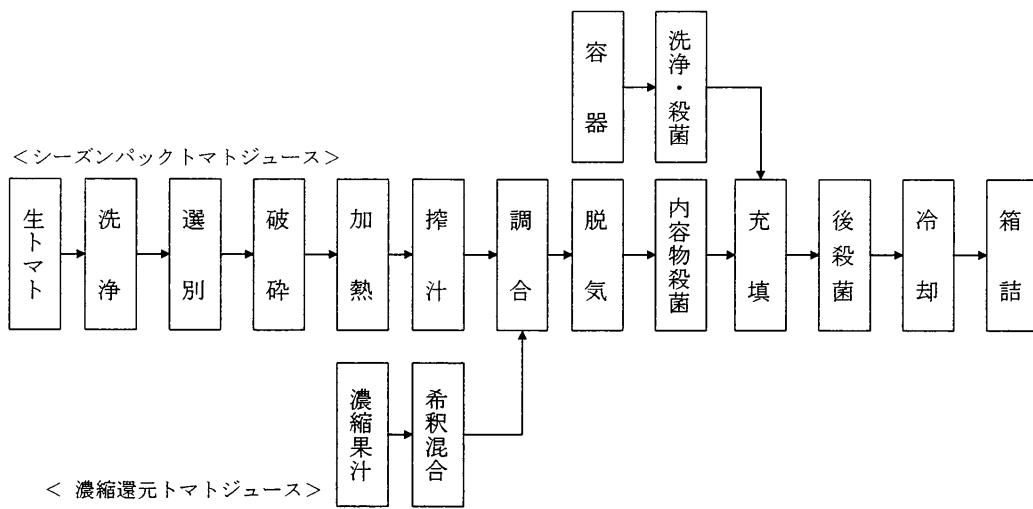


図 1-1 トマトジュースの製造工程（シーズンパック・濃縮還元）

表 1-1 清涼飲料水の製造（殺菌）基準

製造基準		保存基準	
殺菌を要しないもの	二酸化炭素圧力が 20°C 1.0 kgf / cm ² 以上で、植物又は動物の組織成分を含まないもの	なし	
殺菌を要するもの	pH 4.0 未満	中心温度を 65°C で 10 分間、又は同等以上	なし
	pH 4.0～4.6 未満	中心温度を 85°C で 30 分間、又は同等以上	
	pH 4.6 以上で水分活性が 0.94 を超えるもの	中心温度を 85°C で 30 分間、又は同等以上 120°C, 4 分間、又は同等以上 発育しうる微生物を死滅させるのに十分な効力を有する方法	10°C 以下 なし

出典：食品衛生法 厚生省告示第 213 号 （1986 年）

表 1-2 清涼飲料水の pH 毎加熱殺菌条件の換算表

pH 4.0 未満		pH 4.0~4.6 未満		pH 4.6 以上	
基準殺菌条件		基準殺菌条件		基準殺菌条件	
65°C, 10 分		85°C, 30 分		120°C, 4 分	
(z 値 5°C)		(z 値 8°C)		(z 値 10°C)	
温度 (°C)	時間 (分)	温度 (°C)	時間 (分)	温度 (°C)	時間 (分)
60	100.0	80	126.5	112	25.2
61	63.1	81	94.9	114	15.9
62	39.8	82	71.1	116	10.0
63	25.1	83	53.3	118	6.3
64	15.8	84	40.0	120	4.0
65	10.0	85	30.0	122	2.5
66	6.3	86	22.5	124	1.6
67	4.0	87	16.9	126	1.0
68	2.5	88	12.7	128	0.6
69	1.6	89	9.5	130	0.4
70	1.0	90	7.1		
71	0.6	91	5.3		
72	0.4	92	4.0		
		91	3.0		

1.2. 加熱殺菌の理論

トマトジュースの pH 域での製造基準としての加熱殺菌条件は、85°Cで 30 分が基本であるが、実際には、安全性の面からもっと厳しい加熱殺菌が行われている。

食品によって、どのような加熱殺菌処理方法を選択するかは、その食品の性質、加熱処理による品質劣化の程度、容器の種類、その他商業的要因によって決まる。

ある微生物を加熱殺菌するのに、110°C、30 分と 115°C、5 分間のどちらの殺菌効果が大きいかを比較することは困難である。もし、加熱温度が同じであれば、時間が長いほうが大きいことは容易に判断できる。そこで、殺菌効果を比較するために基準となる温度を決める必要がある。100°C以上で加熱殺菌する場合には、基準温度を 121°C (F 値) とすることが一般的である。

この F 値を決めるには、いくつかの特性値を知る必要がある。すなわち、当該食品の主要な原因微生物の耐熱性と容器中における食品の加熱殺菌処理時における熱伝達性である。

i (°C) における変敗原因微生物の必要加熱殺菌時間 F (分) は、

$$F = (\log a - \log b) \times D_i \quad (1)$$

で求められる[1]。ここで D_i は任意の温度 i (°C) における 90%死滅時間 (分) である。a 値は容器中の加熱殺菌前の初発菌数 (CFU) であり、b 値は加熱殺菌後の生残菌数 (CFU) である。基本的には、a 値は用いる原材料に含まれる微生物数を実際測定して決定される。b 値は通常「製品 10 万個中の 1 個に、微生物 1 個が生残する程度であれば許容できる」とされ、 $b = 10^{-5}$ 、すなわち $F = 5 \times D$ が採用され

る。しかし、*Clostridium botulinum* などの毒素を産生し公衆衛生的に問題となる食中毒菌種が指標となる場合は、より厳しく $b = 10^{-12}$ ，すなわち $F = 12 \times D$ が採用される[2].

具体的に食品の加熱殺菌条件を算出する場合は、任意の温度 i (°C) における変敗原因微生物の 90 % 死滅時間 D_i 値 (分) は、

$$D_i = t / (\log a - \log b) \quad (2)$$

で求められる。 t 値は加熱時間 (分) である。 a 値は容器中の加熱殺菌前の初発菌数 (CFU) であり、 b 値は加熱殺菌後の生残菌数 (CFU) である。そして、得られた D_i 値 (5 データ以上が望ましい) の対数を縦軸に、加熱処理温度を横軸に近似曲線 (以下、加熱致死時間曲線と示す) を引き、 D_i 値の 10 倍の変化に対応する温度変化である z 値 (°C) を算出する。

本来であれば、上記のように、個々の製品について、耐熱性細菌芽胞がどの程度汚染しているかを調査して、加熱殺菌条件を算出することが望ましいが、現在の加熱殺菌食品の種類およびその原材料は多岐にわたることから、正確なデータを把握することは極めて難しくなっている。そのため、実用的には指標菌を用いて、その取扱いを定量的に行い、適正な加熱殺菌条件が決定されている[3,4].

食品の加熱殺菌処理時における熱伝達性は、

$$F_0 = \int_0^t 10^{(T-121.1)/z} dt \quad (3)$$

で求められる[5]. t は加熱時間 (分), T は経時的に変化する冷点温度 ($^{\circ}\text{C}$) である. F_0 値は温度 T を 121°C における加熱殺菌時間に換算したものである. z 値は 10°C が用いられる.

なお, F_0 値は, 上記 (1) の F 値と同等またはそれ以上の加熱になるように適性な加熱殺菌条件を決定する.

1.3. トマトジュースの誕生

食品の殺菌は, 1804 年にフランスのニコラ・アッペールが, ガラス瓶入り食品を加熱して, 保存することに成功[6,7]したのが始まりとされている. その後, 1810 年にイギリスでブリキ容器が使用され, 1897 年からは現在の二重巻締め缶が使用されるようになったが, まだ, 100°C 以下の低温殺菌[8]のみであった. その後, 1917 年に 100°C 以上の加圧殺菌[9]が可能なレトルト殺菌機がフランスで開発された.

トマトジュースは, 缶詰として 1923 年に米国の McNeill & Libby (マクニール & リビー社) が開発した. しかしこの時のトマトジュースは色が茶色く, 消費者に受け入れられなかった. 1929 年に同社がトマトジュースの圧縮製法を開発し, 真っ赤なトマトジュースが発売されると消費者に受け入れられ米国内で普及した.

しかし 1931 年に最初のフラットサワー型変敗が発生した後は, 数年にわたりほぼ毎年, 同様な変敗が発生し, 缶詰業者に多くの経済的損失をもたらした[10]. その後, Sognefeat ら (1947 年) [11]により, トマトジュースの加熱殺菌条件が 121°C , 42 秒間とされ, Becker ら (1950 年) [12]が変敗原因菌種を *Bacillus coagulans* と同定し, 現在まで世界に広く普及している.

国内では 1933 年に愛知トマト（現在のカゴメ社）が最初にトマトジュースを発売した。国産第 1 号のトマトジュースは、糖分を加え甘くしたものであった。しかし、日本ではあまり普及せず、1941 年に製造は中止された。1949 年に愛知トマトが製造を再開すると、日本の欧米風食文化の浸透もあり徐々に普及した。

1.4. 耐熱性細菌について

1.4.1. 食品衛生上問題となる主要な耐熱性細菌

食品を腐敗・変敗させる微生物にはカビ、酵母および細菌がある。カビには孢子を形成するものがあり、その孢子は耐熱性がある。また細菌には、その細胞内に芽胞を形成する芽胞形成細菌と芽胞を形成しない無芽胞細菌があり、一般に細菌芽胞の耐熱性はカビの孢子の耐熱性よりも強いとされている。

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2 [13]では、芽胞を形成する細菌には、数十年前までは、好気性または通性嫌気性の *Bacillus*、偏性嫌気性の *Clostridium* のほか数属のみであった。しかし、生化学的性状による同定方法から遺伝子解析による方法が採用されるようになり、1990 年以降は、16 SrDNA 解析による系統解析により、従来の属や種が新たな属や種に再編されている。

Bacillus からは、*Alicyclobacillus*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus* など 5 属が分割され、現在の *Bacillus* は、*B. subtilis* を基準株として、*B. subtilis*, *B. coagulans*, 食中毒菌である *B. cereus* など約 160 種が登録されている。しかし、図 1-2~3 に示すように、16 SrDNA にもとづく系統樹では、*Bacillus* が複数の分類群に分散しており、今もなお、再分類作業の途上にあることを示している。*Clostridium* からは、*Moorella*, *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium* な

ど3属が分割され、現在の *Clostridium* は、*C. butyricum* を基準株として *C. butyricum* , *C. pasteurianum* , 食中毒菌である *C. botulinum* (ボツリヌス菌) , *C. perfringens* (ウェルシュ菌) など 約 160 種が登録されている。 *Moorella* は、*M. thermoacetica* を基準株として4種が報告されている。松田ら (1982 年) [14]は、*M. thermoacetica* の芽胞は耐熱性が極めて強く、主に加温販売される‘しるこ’や‘ミルクコーヒー’の缶詰飲料の変敗菌として非常に重要な菌種としている。 *Thermoanaerobacter* は、*T. ethanolicus* を基準株として20種が登録されている。遠田ら (2005 年) [15]は、その中では、*T. thermohydrosulfuricus* が、*M. thermoacetica* ほどの耐熱性はないが、主に加温販売される低酸性の缶詰飲料の変敗菌として関わりがあるとされている。また、*Thermoanaerobacterium* は、*T. thermosulfurigenes* を基準株として10種が登録されている。なお、本菌種は、*Thermoanaerobacter* との鑑別は遺伝子解析に基づかなければ難しく、その中では、*T. thermosaccharolyticum* が、清涼飲料水において関わりを持ち、遠田ら (2005 年) [15]や著者ら (2008 年) [16]は、緑茶や野菜飲料缶詰で、激しいガスの発生による容器の膨張を起こす変敗菌としている。しかし、これらの属も *Bacillus* と同様、図 1-4~6 に示すように 16 SrDNA にもとづく系統樹では、複数の分類群に分散しており、再分類作業の途上にあることを示している。なお、図 1-4~6 の系統樹は、各標準菌株の 16 SrDNA データを国際 DNA データベース (DDBJ / EMBL / GenBank database) で検索し、進化距離を Kimura (1980 年) [17]の2パラメーター法より算出し、Saitou ら (1987 年) [18]の近隣結合法 (NJ 法) により作成した。

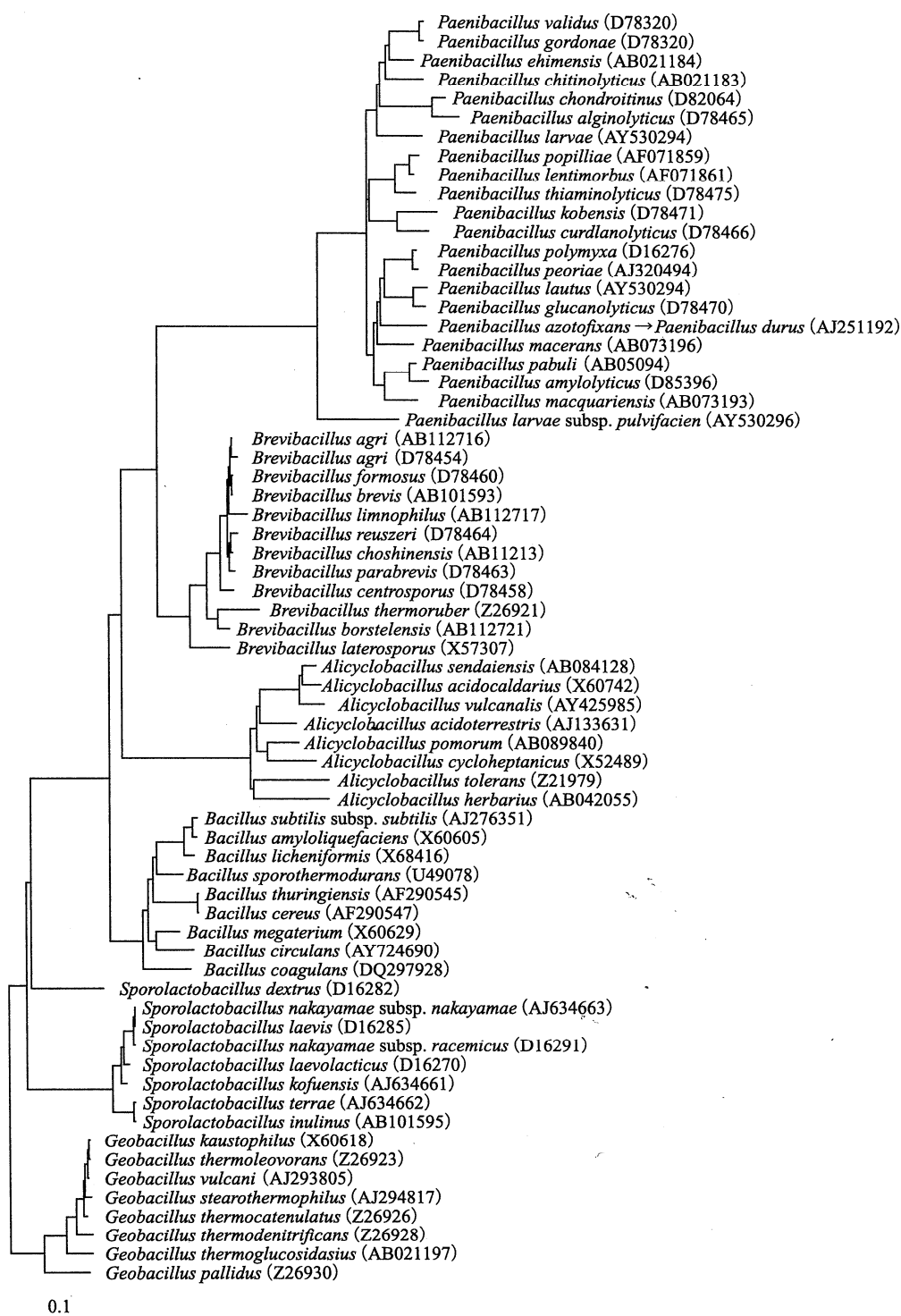


図 1-2 *Bacillus* 属関連細菌の系統樹

出典：新しいレトルト食品開発・製造ハンドブック

(サイエンスフォーラム) p. 234

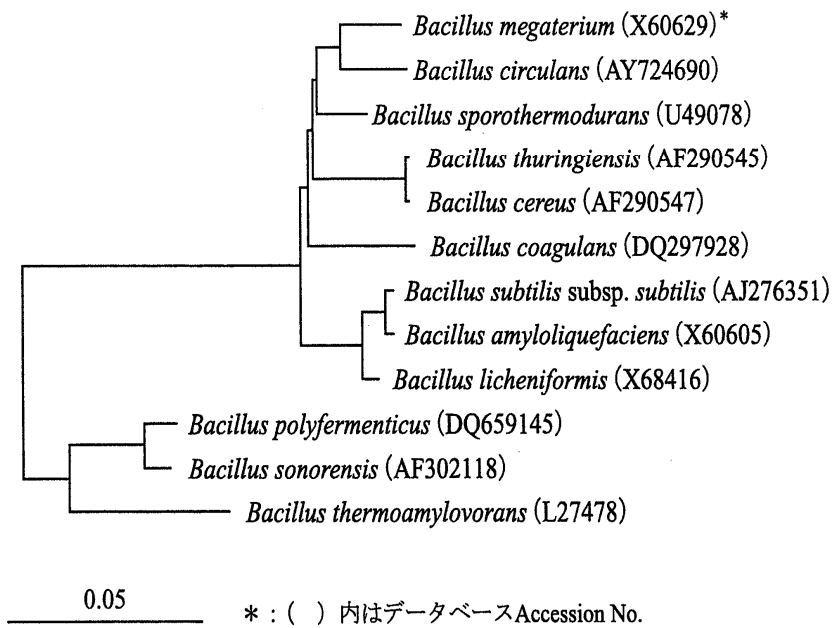
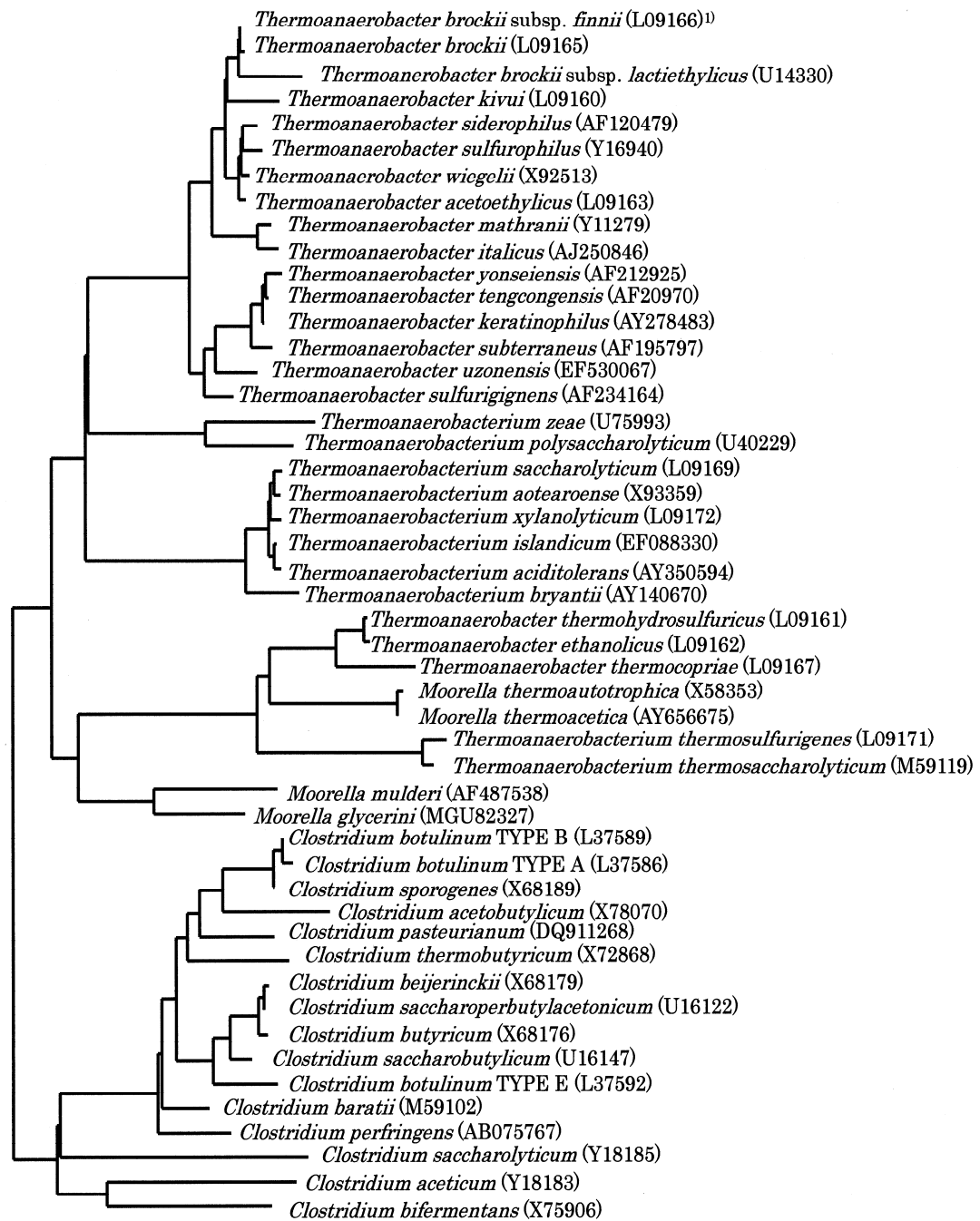


図 1-3 *Bacillus* 属細菌の系統樹

出典：新しいレトルト食品開発・製造ハンドブック

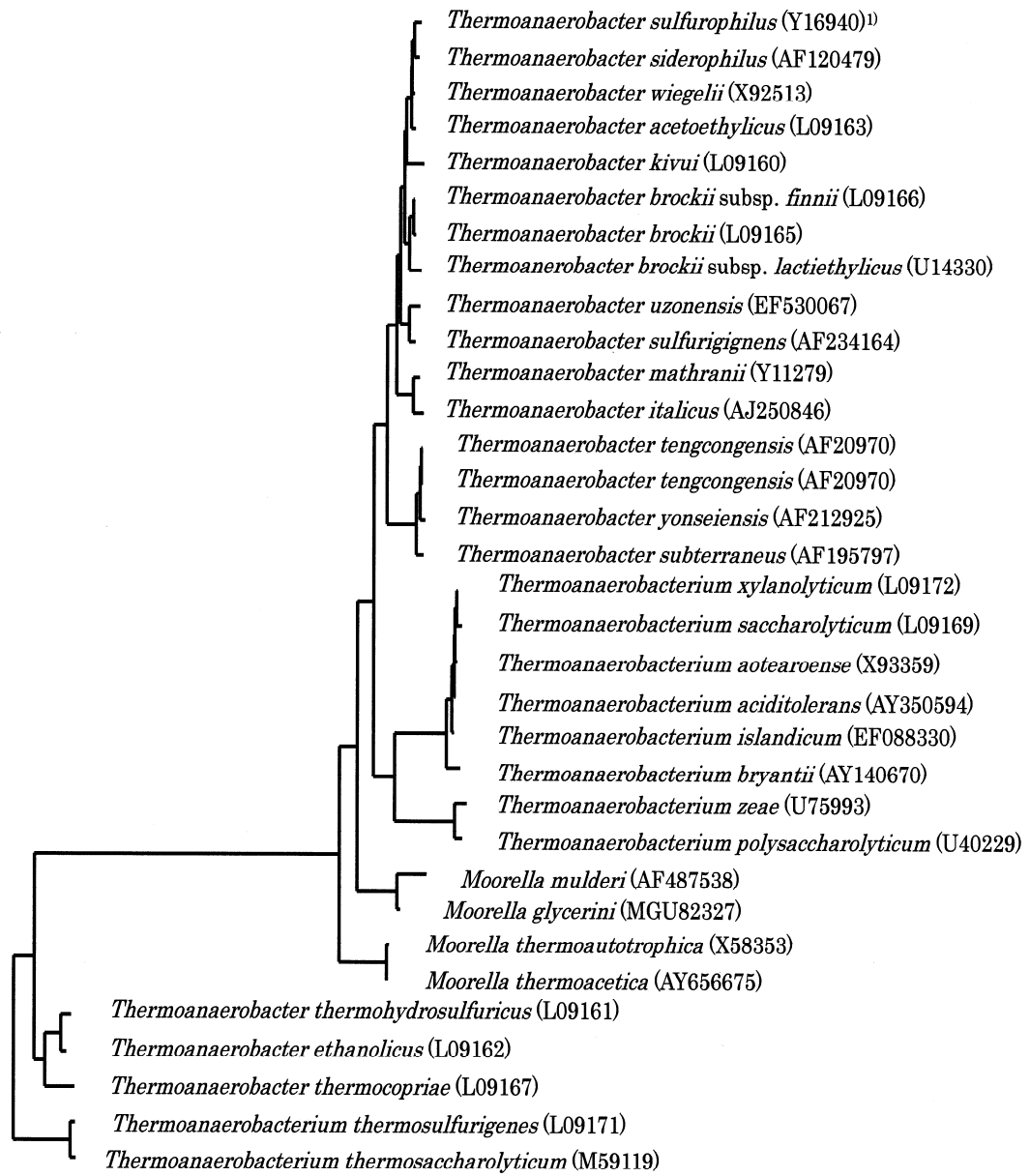
(サイエンスフォーラム) p. 234



0.02

1) ()内はデータベース Accession no.

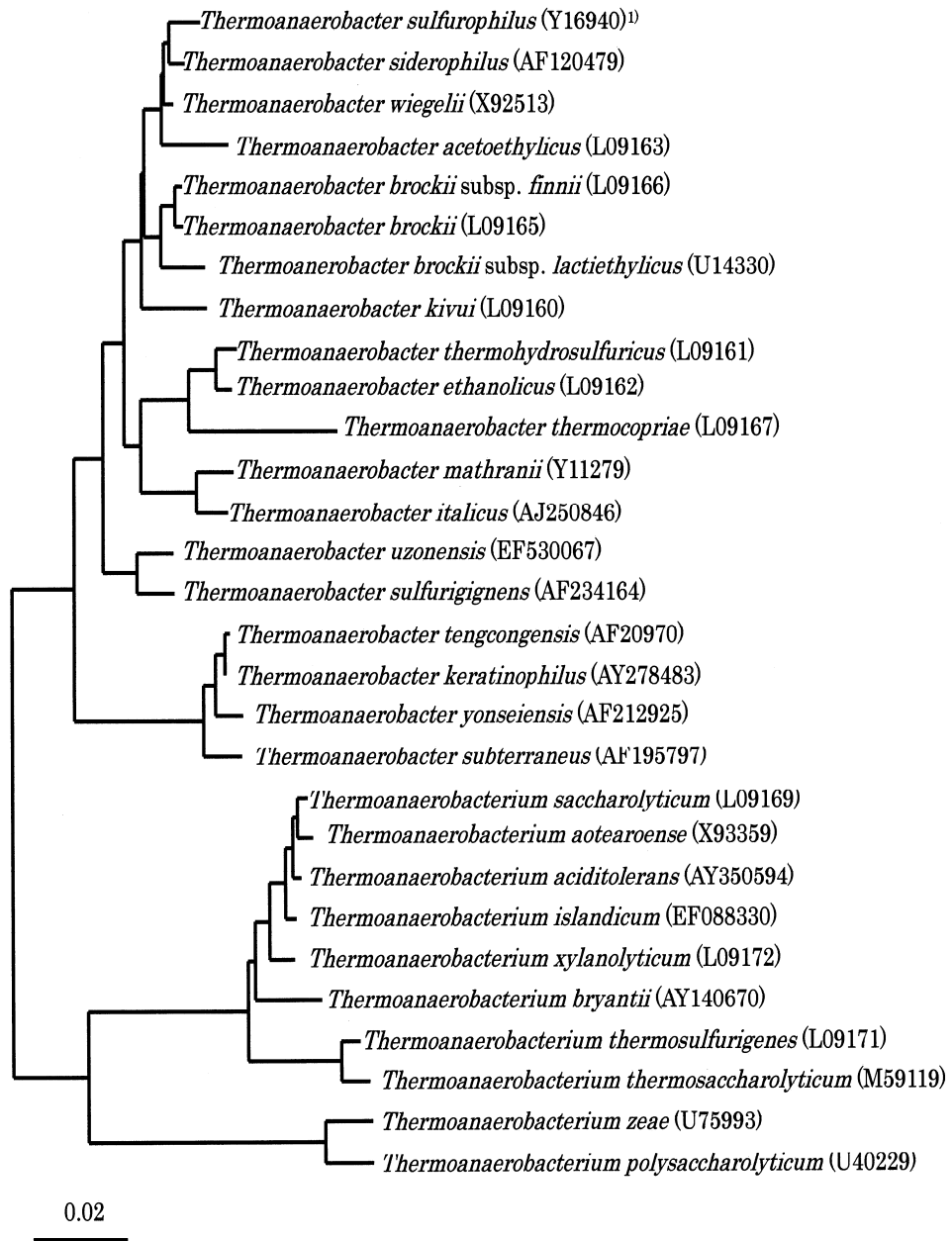
図 1-4 *Clostridium* 属細菌の系統樹



0.05

1) ()内はデータベース Accession no.

図 1-5 *Moorella*, *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium* 属細菌の系統樹



1) ()内はデータベース Accession no.

図 1-6 *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium* 属細菌の系統樹

1.4.2. *Bacillus coagulans*

本菌種は *Bacillus* 属に属する芽胞形成細菌である。生理学的性状は、発育温度域が 15~60°C で至適は 45~50°C、発育最低 pH は 4.3、発育最低水分活性は 0.97 とされている。また、形態学的性状は、桿菌であり、図 1-7 の顕微鏡観察写真に示すように、細胞の端部に白く楕円形の芽胞を形成する特徴がある。

耐熱性質は、この芽胞形成によって獲得し、得られた耐熱性は強く、Stumbo (1973 年) [19] は、低酸性食品では 121°C で 10~15 分間、酸性食品 (pH 4.0~4.5) では 121 °C で 0.05~0.35 分、 z 値は 7.8~10.0°C であったとしている。著者ら (2008 年) [16] は、ニンジンジュース (pH 4.6) では 121°C で 0.3 分、 z 値は 9.1°C と報告している。また、Peng ら (2012 年) [20] は、基準株である ATCC 8038, 185 A について、トマトジュース (pH 4.3) 中での耐熱性を調べ、ATCC 8038 は、 $D_{110^{\circ}\text{C}}$ 値は 0.27 分、 z 値は 8.3°C、185 A は、 $D_{110^{\circ}\text{C}}$ 値は 0.14 分、 z 値は 10.2°C であったとし、 $D_{110^{\circ}\text{C}}$ 値での耐熱性は、ATCC 8038 が約 2 倍強いものであったが、 z 値の影響で、 $D_{120^{\circ}\text{C}}$ 値では 0.7~0.8 秒と、2 株ともほぼ同等な耐熱性を示したと報告しており、過去トマトジュースの変敗原因となった *B. coagulans* 芽胞の耐熱性と比べて、約 1/10 以下と弱い結果であった。なお、中條ら (1991 年) [21] は、変敗した低酸性食品缶詰から分離した本菌種 44 株の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中での耐熱性の分布を調べ、110°C における D 値は最小 1.1 分、最大 92 分、大半は 29~42 分であり、 z 値は最小 6.8°C、最大 9.6°C、大半は 7.8~8.2°C であったこと。この他にも、犬飼ら (1980 年) [22~24]、中條ら (1993 年) [25] による、耐熱性に関して pH と A_w の影響について調べた報告がある。

トマトジュースの変敗事故が発生して以降、本菌種は米国で酸性食品、主にトマト加工品のフラットソーワ変敗の原因菌とされてきた。松田（1983年）[26]は、過去の文献に報告されている、*Bacillus dextralacticus*, *B. thermoacidurans* および *Lactobacillus cereale* は本菌種と同一種とみなすことができると報告している。Walker（1976年）[27]は、本菌種は、トマト加工品や野菜類の缶詰など、pHが比較的低い食品（pH 4.2~5.0）において特に重視され、Stumbo（1973年）[19]も、本菌種を pH 4.0~4.5 の食品の加熱殺菌指標菌としてのみ示し、これ以上の pH の食品では問題にしていない。しかし、国内では、松田ら（1985年）[28, 29]が、1968年から1980年の13年間にわたり、変敗缶詰の変敗原因菌種と食品の関係調査をし、トマト加工品や野菜類の缶詰から本菌種はまったく分離されなかったが、変敗した調理食品缶詰、魚貝類缶詰から分離されたこと、中條ら（1985年）[30]も、低酸性のコーンスープ、コンビーフ、牛肉すき焼きおよび濃厚流動食などの調理食品缶詰での本菌種による変敗事例を報告しており、本菌種は pH 4.2（特に pH 5.0）以上のあらゆる食品の加熱殺菌指標菌として重視すべきであると指摘している。



図 1-7 *B. coagulans* 芽胞形成状態の位相差顕微鏡写真

1.5. トマトジュースの生産量の推移

1949年の愛知トマトによるトマトジュース製造再開以降、1960年代には国産メーカーが相次いでトマトジュースを発売し、1960年後半から1970年前半にかけて、健康、自然志向を背景に急速に市場が拡大した。しかし、それ以降はやや市場は縮小し、1980年以降の生産量は、ほぼ横ばい状態であった。しかし、2012年に京都大学河田教授の研究グループによって、トマトに含まれる物質に中性脂肪を低下させる効果があることが発見され、図1-8に示す新聞報道がされると、トマトジュースの需要が急激に拡大し、表1-3の全国清涼飲料工業会の清涼飲料水関係統計資料に示されるように、2012年のトマトジュースの生産量は、前年比178.8%の77,600klへ拡大した。しかし、2013年は前年比99.1%の76,900klとほぼ横ばいであった。今後もトマト人気に牽引され、トマトジュースの市場の拡大傾向は続くと考えられる。

中性脂肪減らす トマト成分特定

京大、マウスで確認

肝臓内の脂肪を燃やして
中性脂肪を減らすトマトの
成分を京都大の河田照雄教
授が見つけ、マウスで効
果を確かめた。トマトです
で知られている成分には
なかった効果だという。健

	トマト成分 なしのえさ	トマト成分 ありのえさ
血液中の 中性脂肪	142.22mg/dℓ	97.04mg/dℓ
肝臓中の 中性脂肪 (肝臓1g中)	80.06mg	56.93mg
血糖値	391.8mg/dℓ	302.8mg/dℓ

康食品などへの応用が期待
される。米科学誌「プロスワ
ン」で10日発表された。
トマトを食べると中性脂
肪が下がることは動物実験
でわかっていた。だが、そ

の効果はリコピンなどトマ
トの健康成分にはなく、何
が効いているのかは不明だ
った。

河田教授らはトマトの成
分を細かく分け、脂肪を燃
やす酵素をつくる遺伝子に
かわる物質を探した。そ
の結果、脂肪酸の一種「13
Ioxo-ODA」がその
遺伝子のスイッチになって
いることを突きとめた。ト
マトの中でリノール酸から
できるらしい。
肥満になりやすいマウス
8匹に、この脂肪酸を1日
あたりのえさ4gに0.05

%混ぜ、4週間与えた。その
結果、血液1デリットル中
の中性脂肪は平均97mgラ
ム。混ぜていないえさのマ
ウス8匹の142.2mgラム
に比べ、3割以上低かつ
た。肝臓中の中性脂肪は29
%、血糖値は23%低かった。
この量を人間に当てはめ
ると、トマトジュースを毎
日コップ3杯(約600ml)
リットル)飲んだぐらいと
いう。河田教授は「脂肪肝
がよくなることで肝臓の機
能が高まり、結果的に血糖
値も下がるのだろう」とみ
ている。(緩治信太郎)

図 1-8 トマトに含まれる物質の中性脂肪低下効果発見の報道

出典：朝日新聞 2012年2月10日(夕刊)4版 14

表 1-3 野菜系飲料の生産量の推移

	2008 年		2009 年		2010 年		2011 年		2012 年		2013 年	
	生産量	前年比	生産量	前年比	生産量	前年比	生産量	前年比	生産量	前年比	生産量	前年比
トマトジュース	43,300	90.2	44,400	102.5	46,300	104.3	43,400	93.7	77,600	178.8	76,900	99.1
トマトミックスジュース	25,100	78.4	23,500	93.6	41,500	176.6	21,700	52.3	39,200	180.6	47,300	120.7
トマト果汁飲料	800	80.0	1,000	125.0	3,200	320.0	2,200	68.8	3,900	177.3	5,100	130.8
にんじんジュース	2,600	86.7	3,100	119.2	2,700	87.1	1,900	70.4	2,200	115.8	2,100	95.5
にんじんミックスジュース	15,300	90.0	14,900	97.4	9,300	62.4	4,300	46.2	13,100	304.7	19,700	150.4
野菜ジュース	72,400	144.8	79,700	110.1	96,100	120.6	114,200	118.8	129,500	113.4	136,700	105.6
野菜・果汁ミックスジュース	306,200	102.1	281,300	91.9	289,500	102.9	295,000	101.9	288,100	97.7	269,300	93.5
野菜ドリンク	18,500	925.0	14,600	78.9	17,500	119.9	25,900	148.0	10,500	40.5	19,200	182.9
合計	484,200	106.9	462,500	95.5	506,100	109.4	508,600	100.5	564,100	113.6	576,300	102.2

生産量：kℓ

出典：全国清涼飲料工業会 清涼飲料水関係統計資料（2014 年）

1.6. トマトジュースの微生物的安全性

1.6.1. 先行研究 1 (トマトジュース変敗事例)

1.6.1.1. 国産トマトジュース

著者は国産トマトジュースにおける変敗をたびたび経験してきた。しかし、変敗は市場でクレームとして発生するため、2次汚染することなく現物を入手できず、変敗菌を特定できなかった。しかし、1997、1998 および 2000 年に容器が膨張した未開封変敗品 (3 缶) を入手できたことから、変敗原因菌を調べたところ、*Clostridium butyricum*、*Clostridium sporosphaeroides*、*Thermonaerobacterium thermosaccharolyticum* 類似の 3 菌種であったこと、何れも変敗したトマトジュースは変敗前の pH が 4.4 を超えていたことを報告した[31]。また、以前より発生していた変敗品も、容器の膨張による変形が見られたことから、*B. coagulans* の変敗様式とは明らかに異なる細菌種と考えられた。このことから、トマトジュースを製造する上で *B. coagulans* だけでなく、*Clostridium* や *Thermoanaerobacterium* 菌種も指標とし、管理すべきであると考えた。

1.6.1.2. 海外産トマトジュース

海外のトマトジュースの変敗事例については、缶詰食品[32]や Gould (1992 年) [10]により、トマトジュース、トマト缶詰およびペーストといったトマト加工品の変敗事例が報告されている。

米国では、缶 (容器) がガス膨張する変敗として、Townsend (1939 年) [33]は、嫌気性耐熱芽胞細菌である *Clostridium pasteurianum* を、Clark ら (1947 年) [34]は、*C. butyricum* に極めて類縁の嫌気性耐熱芽胞細菌が変敗原因菌であったことを報

告している。一方、フラットサワー変敗として、Tresslar ら（1961 年）[35]は、1931 年以降、米国で発生した多くの変敗事故について、Knock ら（1959 年）[37]は、南アフリカで製造されたトマトジュースの変敗事例を報告した。また、変敗原因菌種については、現在では *B. coagulans* として一般的に扱われているが、当初、Berry（1933 年）[36]は、フラットサワー変敗の原因菌は *Bacillus thermoacidurans* と報告した。その後、Becker ら（1950 年）[12]により、*B. thermoacidurans* とは異なる *B. coagulans* であると修正報告された。

以上のことから、トマトジュースの変敗は容器のガス膨張を伴う変敗と、容器外観は変化せず、内容物が酸敗するフラットサワー変敗があり、重要なのは耐熱性が強い *B. coagulans* による変敗であった。

1.6.2. 先行研究 2（トマトジュース加熱殺菌条件の設定）

トマトジュースの加熱殺菌条件の算出は、Berry（1933 年）[36]が、pH 4.5 に調整したトマトジュースに $10^6/\text{ml}$ の *B. coagulans* 芽胞を接種して耐熱性を測定し、 121°C 、0.33 分であることを最初に報告した。しかし、この結果については実験上問題な部分があった。そこで Wessel ら（1941 年）[38]は、その問題点を改善し、トマトジュースに $2 \times 10^4/\text{ml}$ の新鮮なトマトジュース由来の *B. coagulans* 芽胞を用いて耐熱性を測定し、 121°C の瞬間殺菌時間であれば 0.73 分、完全な殺菌を行うには 1.1 分が必要であることを報告した。

最終的には、Sognefest ら（1947 年）[11]が、トマトジュースの品質要因を考慮し、高温短時間殺菌条件として F_0 値（ 121°C における殺菌時間で、 z 値は 10°C を用

いる)は0.7分が妥当であることを報告し、この条件が世界的に広く採用されている。

1.6.3. 先行研究3 (トマトジュースのpH, 芽胞汚染量と変敗の関係)

White (1951年) [39]は、pH 4.4のトマトジュースを変敗させる *B. coagulans* の芽胞数が1~3ヶ/mlであったことを報告した。また、Riceら(1954年) [40]は、トマトジュースを変敗させるpHと *B. coagulans* 芽胞数との関係を調べ、芽胞による汚染度が高いと、低いpHでも変敗が起こることを報告した。この内容を表1-4に示す。

1.6.4. 先行研究4 (国産トマト原料の耐熱性細菌芽胞汚染)

著者ら(2009年) [41]は、微生物学的な安全性を考慮した加熱殺菌条件を検討するため、基礎データとなる、製造工程より採取した未殺菌のトマト破碎液中の好気、嫌気性耐熱細菌芽胞数とその種を調べた。

1.6.4.1. 好気性耐熱細菌芽胞数とその種

トマト破碎液の好気性耐熱細菌芽胞数を表1-5に示す。中温性が $300\sim 5.6\times 10^3$ CFU/ml、高温性が10未満CFU/mlであった。これらを実験室に28株釣菌し、松田ら(1985年) [42]の方法で同定した結果を表1-6に示す。分離菌株は全て *Bacillus* で、28株中13株が *B. subtilis*、9株が *B. licheniformis*、5株が *B. pumilus* および1株が *B. cereus* であった。しかし、トマトジュースの加熱殺菌指標菌である *B. coagulans* は分離されなかった。なお、*B. licheniformis*、*B. pumilus* は、*B. subtilis*

の仲間で *B. subtilis* group として扱われており、トマト破碎液にはこれらが高頻度に存在していた。

1.6.4.2. 嫌気性耐熱細菌芽胞数とその種

トマト破碎液の耐熱性嫌気性細菌芽胞数を表 1-7 に示す、クロストリジア培地を用いたパウチ法での中温性が 20~800 CFU/ml, 高温性が 10 未満 CFU/ml で、PE - 2 半流動培地を用いた MPN 法での中温性が 10 未満~980/ml, 高温性が 10 未満/ml であった。これらが無作為に 14 株釣菌し、松田ら（1985 年）[43]の方法で同定した結果を表 1-8 に示す。分離菌株は全て *Clostridium* 細菌で、35°C培養から分離した 12 株は *C. butyricum* であった。また、2 菌株は種不明としたが、*C. butyricum* に非常に類似していた。

国産および海外産トマトジュースの変敗事例にある *C. butyricum* がトマト破碎液に高頻度に存在していた。

表 1-4 トマトジュースで発育する *B. coagulans* 芽胞汚染度と pH の関係

<i>B. coagulans</i>		
菌株番号	芽胞の汚染度 (CFU/ml)	発育 pH
710	65,000,000	4.24
	650,000	4.31
	6,500	4.37
	650	4.41
43P	22,000,000	4.19
	22,000	4.24
	220	4.31
	22	4.37

(Rice ら 1954 年)

表 1-5 製造工程から採取したトマト破碎液の耐熱性好気性細菌芽胞数

試料 番号	耐熱性好気性芽胞数 (CFU/ml)					
	培養温度 (°C)					
	35			55		
	加熱処理条件 (分 / °C)					
	20 / 80	10 / 100	30 / 100	20 / 80	10 / 100	30 / 100
1	5.6×10^3	<10	<10	10	<10	<10
2	500	<10	<10	<10	<10	<10
3	600	<10	<10	<10	<10	<10
4	1.5×10^3	<10	<10	<10	<10	<10
5	300	<10	<10	<10	<10	<10
6	1.2×10^3	<10	<10	<10	<10	<10
7	1.4×10^3	<10	<10	<10	<10	<10
8	300	<10	<10	<10	<10	<10
9	300	<10	<10	<10	<10	<10
平均	1.3×10^3	<10	<10	<10	<10	<10

(著者ら 2008 年)

表 1-6 製造工程から採取したトマト破碎液の *Bacillus* 属細菌の種の分布

加熱処理条件 (分 / °C)	培養温度 (°C)	菌 種	分離菌株数
20 / 80	35	<i>B. subtilis</i>	13
		<i>B. licheniformis</i>	8
		<i>B. pumilus</i>	5
		<i>B. cereus</i>	1
	55	<i>B. licheniformis</i>	1

(著者ら 2008 年)

表 1-7 製造工程から採取したトマト破碎液の耐熱性嫌気性細菌芽胞数

試料 番号	耐熱性嫌気性芽胞数 (CFU/ml または /ml)																	
	培養温度 (°C)																	
	30						35						55					
	加熱処理条件 (分 / °C)																	
	20 / 80		10 / 100		30 / 100		20 / 80		10 / 100		30 / 100		20 / 80		10 / 100		30 / 100	
供試培地																		
	CM ¹⁾	PE-2 ²⁾	CM	PE-2	CM	PE-2	CM	PE-2	CM	PE-2	CM	PE-2	CM	PE-2	CM	PE-2	CM	PE-2
1	800	860	<10	<2	<10	<2	600	700	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2
2	80	41	<10	<2	<10	<2	480	98	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2
3	100	158	<10	<2	<10	<2	100	158	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2
4	20	440	<10	<2	<10	<2	50	480	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2
5	60	80	<10	<2	<10	<2	40	80	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2
6	170	340	<10	<2	<10	<2	400	126	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2
7	40	126	<10	<2	<10	<2	50	126	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2
8	170	80	<10	<2	<10	<2	30	80	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2
9	50	<2	<10	<2	<10	<2	30	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2
平均	166	236	<10	<2	<10	<2	198	206	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2	<10	<2

1) クロストリデア測定用培地を用いたパウチ法による菌数 (CFU/ml)

2) PE-2 培地を用いた MPN 法による菌数 (/ml)

(著者ら 2008 年)

表 1-8 製造工程から採取したトマト破碎液の *Clostridium* 属細菌種の分布

加熱処理条件 (分 / °C)	培養温度 (°C)	菌 種	分離菌株数
20 / 80	30 および 35	<i>C. butyricum</i>	12
	35	Unidentified	2

(著者ら 2008 年)

1.7. 研究の目的

Sognefest ら（1947 年）[11]や Becker ら（1950 年）[12]が、トマトジュースの加熱殺菌条件をフラットサワー変敗菌である *B. coagulans* を指標に F_0 値は 0.7 分であると報告後、この条件が世界的に広く採用されている。しかし著者らは、トマトジュース缶で *B. coagulans* による変敗とは明らかに異なる、缶が膨張する変敗をたびたび経験していること、原料トマトにおける *B. coagulans* 芽胞による汚染が少ないこと、から *B. coagulans* 以外に管理すべき重要な菌種があるのではないかと考えた。

また、トマトジュースは、JAS 規格上では、食塩以外の添加物使用が認められておらず、酸味料を添加して酸度調整ができないため、トマトジュースの pH はトマト原料の pH に左右される。さらに最近では、JAS 規格にリコピン規格が追加されたことで、リコピン量のコントロールのため完熟した原料を使用したトマトジュースの製造が進んでいる。また、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されるなど、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。

そこで、本研究は、今後ますます健康指向を背景に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、世界的に広く普及している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およびそれを対象とする新たな加熱殺菌条件を算出することによって、商業的無菌性を確保する技術を開発することを目的とした。

第 2 章 *Bacillus coagulans* のトマトジュース中での発育

2.1. 諸言

Tresslar ら（1961 年）[35]は、米国で発生したトマトジュースの変敗原因について、数点の問題点を指摘している。その 1 つとして、トマトジュースの pH 上昇をあげ、トマトジュースに使用された原料トマトが複数年にわたり pH が 4.5 を超えていたことを報告している。また、Pederson ら（1949 年）[44]は、変敗を起こしたトマトジュースのほとんどが pH 4.35 以上で、いくつかの芽胞は pH 4.1 でも発育したと報告している。また、Knock ら（1959 年）[37]は、南アフリカでの変敗トマトジュースの pH は 4.28 だったと報告している。

pH 4.1 や 4.28 のトマトジュースの変敗については、変敗トマトジュースの芽胞による汚染度は不明であるが、White（1951 年）[39]や Rice ら（1954 年）[40]によると、芽胞による汚染度が高いと低い pH のトマトジュースでも変敗が起こる実験データを示していることから、かなり高かったと考えられる。

そこで本章では、トマトジュースにおける *B. coagulans* の危害性を検討する意味から、酸性環境下で発育可能な *B. coagulans* を用い、各 pH に調整したトマトジュース中での発育性を調べた。

2.2. 実験方法

2.2.1. 試料および試料の調製方法

2.2.1.1. 供試菌株

当社保存株の *B. coagulans* 6 株（整理番号 1022~1027, 1022 は IAM 1194）である。何れも日本缶詰びん詰レトルト食品協会研究所からの分譲株で、標準株以

外は変敗した缶詰食品から分離同定した菌株を用いた。なお、予め pH 4.5 のブドウ糖ブイヨン培地で発育可能な菌株であった。

2.2.1.2. トマトジュースの調製

トマトジュース（ゴールドパック ブランド、トマト 100%ストレート、160 g 缶）を pH 4.4, 4.6 および 6.5 になるように 3N 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°C 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 4.35 であった。

2.2.1.3. 培地の調製

本研究に用いた培地を以下に示す。

1) ブドウ糖ブイヨン培地および寒天培地（以下、GB および GA と略す）

ポリペプトン（Difico 社製）10 g, 肉エキス 2 g, 酵母エキス 3 g, 塩化ナトリウム 5 g, ブドウ糖 5 g に脱イオン水 1 L を加え加温溶解し、pH 7.0 に調整後、121°C, 20 分間高圧殺菌した。なお、GA は、上記 GB の組成に寒天 20 g を加えた。

2) 土壌エキス加酵母エキス寒天培地（以下、SEA と略す）

滅菌土壌：市販の園芸用「赤玉土」をアルミ製トレイ上に厚さ約 1 cm に拡げ、160°C, 6 時間乾熱滅菌し、これを 5 回繰り返した。

土壌エキス：滅菌土壌 400 g に脱イオン水 960 ml を加え、121°C, 60 分間高圧殺菌し、1 晩静置した。これをろ紙（東洋ろ紙, No.101）でろ過し、ろ液を 121°C, 30 分間高圧殺菌した。

ポリペプトン 10 g, 肉エキス 2 g, 酵母エキス 3 g, 塩化ナトリウム 5 g, 寒天 20

g, 土壌エキス 250 ml と脱イオン水 750 ml を加え加温溶解し, pH 7.0 に調整後, 121°C, 20 分間高圧殺菌した.

2.2.1.4. 供試菌株の芽胞調製

供試菌株の保存芽胞液 0.5 ml を GB に接種し, 80°C, 20 分加熱処理した後, 45°C で前培養した. この培養液を適量 SEA に接種し, 45°C, 5 日間培養した. 培地に形成したコロニーを集菌し, 洗浄のため, 3 回遠心分離 (6°C, 3,000 rpm, 10 分間) したものを滅菌バイアルに移し, 試験に用いるまで -30°C で保存した.

芽胞数の測定は, 芽胞液 1 ml を GA による混釈法により芽胞数を測定した. 芽胞の活性化の加熱条件は, 80°C, 20 分間とし, 培養条件は 35°C, 5 日間とした.

2.2.2. 供試菌株芽胞のトマトジュース中における発育

pH 4.4, 4.6 および 6.5 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調べた.

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) 10 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 6 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 分間加熱処理した.

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について測定した。芽胞数の測定は、上記 2.2.1.4.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

45°C、90 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。

2.3. 結果および考察

pH 4.4, 4.6 および 6.5 に調整したトマトジュース中における供試菌株の発育結果を表 2-1 に示す。コントロールとして用いた供試菌株芽胞を接種していないトマトジュースは、pH 6.5 が加熱処理後は 6.2, 恒温放置 3 ヶ月後では 5.9 まで低下したが、pH 4.4, 4.6 は、恒温放置 3 ヶ月後でも pH は変化せず安定していた。供試菌株芽胞を接種したトマトジュースは、pH 6.5 では、全て pH 4.3~4.5 まで低下し、発育がみられた。しかし、pH 4.6 以下では発育はみられなかった。

著者ら（2009 年）[16]は、これら供試菌株を各 pH に調整したニンジンジュースに接種し、同様な調査を行っており、pH 4.4 のニンジンジュースでは発育がみられなかったが、4.6 では 6 株全て発育したことを報告した。また、犬飼ら（1991 年）[45]は、*B. coagulans* の発育に及ぼす pH の影響を培地中で調べ、pH 4.56 で 10 株中 8 株に発育がみられ、pH 4.08 では全て発育しなかったことを報告している。

以上の結果より、トマトジュースで発育可能な *B. coagulans* 菌株は限定されることから、トマトジュースの加熱殺菌指標菌には、*B. coagulans* よりも管理すべき重要な細菌種を設定すべきであると考えた。

表 2-1 pH が異なるトマトジュース中における *B. coagulans* の発育状況

菌種	菌株番号	恒温放置 (月 / °C)	pH		
			4.4 ^{a)}	4.6	6.5
			4.4 ^{b)}	4.6	6.2
			4.4 ^{c)}	4.6	5.9
<i>B. coagulans</i>	1022		— ^{d)}	—	+(4.4) ^{e)}
	1023		—	—	+(4.4)
	1024		—	—	+(4.4)
	1025	3 / 45	—	—	+(4.5)
	1026		—	—	+(4.3)
	1027		—	—	+(4.3)

TDT チューブ 1 本中の芽胞数は, $2.7 \times 10^3 \sim 5.1 \times 10^3$ CFU/ml

a) 加熱殺菌前

b) 加熱殺菌後

c) 45°C, 3 ヶ月間の恒温放置後

d) —, 発育陰性; +, 発育陽性

e) 変敗したトマトジュースの pH

2.4. 結論

トマトジュースにおける *B. coagulans* の危害性を検討するため、酸性環境下で発育可能な *B. coagulans* を用い、各 pH に調整したトマトジュース中での発育性を調べた。

B. coagulans 6 株を用い、pH 4.4, 4.6 および 6.5 に調整したトマトジュースでの発育試験を行った結果、pH 6.5 に調整したトマトジュースではジュースが分離する外観変化をともなう発育変敗がみられたが、pH 4.6 以下では発育はみられなかった。

このことから、酸性域で発育可能である *B. coagulans* であっても、トマトジュース中では発育が不安定で、発育可能な株は限定される。

したがって、トマトジュースの加熱殺菌指標菌には、*B. coagulans* よりも管理すべき重要な細菌種を検討すべきと考えた。

第3章 原料トマトにおける耐熱性細菌芽胞の汚染

3.1. 緒言

食品の加熱殺菌には、食品の香味を一定レベルに維持しつつ、病原菌や発育しうる微生物を殺滅する必要があるため、商業的無菌性[46]という考え方があり、広く世界中で認められている。この商業的無菌性を達成するための加熱殺菌条件は、①微生物の耐熱性、②微生物の汚染量、③食品性状（たとえば pH）、④食品保存条件、⑤熱伝達性に大きく依存している。その中でも、②微生物の汚染量の把握は最初に必要である。

トマトジュースの加熱殺菌条件を検討する上で、原料トマト（ここでは、洗浄工程を通過したもの）の耐熱性細菌芽胞汚染を明らかにすることが重要である。

しかし、原料トマトの耐熱性細菌芽胞汚染については、国産トマトで、著者ら（2009年）[41]の報告があるだけで、海外産トマトではみあたらない。仮に、トマトジュースの変敗が発生した1930～40年代に調査されたデータがあっても、当時とは製造工程での原料洗浄、衛生管理の手法や技術も進歩しており、過去データはあまり参考にならない。

そこで本章では、原料として用いられるトマトの耐熱性細菌芽胞汚染について、海外産のトマトペーストの細菌芽胞汚染状況と、国産原料で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。

3.2. 実験方法

3.2.1. 試料および試料の調製方法

3.2.1.1 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、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、計7ヶ国、9サプライヤーより、2012と2013年の2年間に製造された、各年の4~6試料を使用した。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300g~2kg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6,000kg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、pH4.4および4.6になるように調整した後、 $108 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、60秒間の加熱殺菌処理を行い、900gPETボトルに90°Cで充填した。なお、同ボトルの製造本数はpH4.4が3,240本、pH4.6が3,288本であった。

3.2.1.2. 培地の調製

本研究に用いた培地を以下に示す。

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, ブロムクレゾールパープル 0.004 g を加え, 121°C, 20 分間高圧殺菌した.

3) 変法 TGC 寒天培地（以下, m TGC 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）

トリプトン（Difco 社製）10 g, 酵母エキス（Difco 社製）5 g, 可溶性デンプン 1 g, チオグチコール酸ナトリウム 0.5 g, L-システイン塩酸塩 0.5 g, 炭酸カルシウム 10 g, 寒天 1.5 g, 脱イオン水 1 L を加え加温溶解した. 試験管（スクリュウキャップ付）に乾燥エンドウ豆（アラスカ種）3~4 個を投入し, 上記の液 10 ml を加え, 121°C, 20 分間高圧殺菌した.

3.2.2. 原料トマトの細菌芽胞数, 分離と同定

3.2.2.1. 原料トマトの細菌芽胞数

1) 海外産トマト原料の細菌芽胞数

(1) 好気性細菌芽胞数

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°C, 残りは 55°C で 3~5 日間培養し, 形成したコロニー数を数え, 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

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°C, 残りは 55°C 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

試作したトマトジュースを 35°C 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°C で 7 日間培養した. 各平板培地に形成したコロニーを全て分離した.

3.2.2.2. 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, コロニーの形態が異なるものを選抜した.

3.2.2.3. 分離株の同定

分離株の同定は, PCR 法[47]により 16 SrRNA 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ズ社製) 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 16 SrRNA 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°C で 1 分, 50°C で 1 分, 72°C 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ズ社製）によりシーケンス反応を行った。反応条件は 95°Cで 10 秒，50°Cで 5 秒，60°Cで 4 分，25 サイクルで増幅し，得られたシーケンス反応物を Centri-Sep Spin columns（ライフテクノロジーズ社製）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ズ社製）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，それ未満は属とした。

3.3. 結果および考察

3.3.1. 原料トマトの細菌芽胞汚染

3.3.1.1. 海外産トマトペーストの細菌芽胞数

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，表 3-1 および 3-2 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，中温菌で分離されなかったのは 61 検体（73%），1 ～10 CFU 未満は 9 検体（11%），10 ～10⁴ CFU 未満が 14 検体（17%）で，高温菌で分離されなかったのは 66 検体（79%），1 ～10 CFU 未満は 11 検体（13%）および 10 ～10² CFU 未満が 7 検体（8%）であった。国別では，イタリア産が中温，高温菌がともに多く，インド産は中温菌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、中温菌で 0.2 未満が 70 検体（83%）で、0.2~1 未満が 7 検体（8%）、 $1\sim 10^2$ 未満が 7 検体（8%）であった。また、高温菌は 0.2 未満が 43 検体（51%）、0.2~1 未満が 23 検体（27%）、 $1\sim 10$ 未満が 15 検体（18%）および $10\sim 10^2$ 未満が 3 検体（4%）であった。国別では、イタリア産が中温、高温菌ともに多く、オーストラリア産は高温菌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 10 CFU 未満であったのは中温菌が 70 検体（83%）、高温菌が 77 検体（91%）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菌が 77 検体（91%）、高温菌が 66 検体（79%）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細菌 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、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Paenibacillus 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、嫌氣的に分離した菌株 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（2008 年）[48]は、変敗

缶詰食品から分離した *T. thermosaccharolyticum*, *T. aotearoense* および *T. aciditolerans* の3種の耐熱性は同様であり、加熱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群として扱えば、海外のトマトペーストにはいずれの国の試料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られる。すなわち、PE-2培地5本にトマトペースト10gずつ接種し、55°C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。

3.3.1.2. 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°C、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した菌種は、16株全て *B. 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* と種不明の *Bacillus* であった。駒木（2007年）[49]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一群として捉えるべきと報告している。今回の結果は、著者ら（2009年）[41]の報告と同様にトマト原料の主体汚染菌種は *B. subtilis* group であり、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。

表 3-1 海外産トマトペースト中の耐熱性細菌芽胞数

原産国	試料数	pH	耐熱性好気芽胞数 (CFU / 10g) ¹⁾						耐熱性嫌気芽胞数 (/ 10g) ²⁾									
			中温菌			高温菌			中温菌			高温菌						
			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
トルコ	21	4.23- 4.30				3 ³⁾	18	1	20				21	1	4	16		
イタリア	10	4.25- 4.41		6	4			5	4	1	2	4	4	2	4	1	3	
スペイン	10	4.25- 4.32					10		10				10	3	3	4		
中国	20	4.17- 4.22				2	18	2	18			1	19			5	15	
アメリカ	8	4.22- 4.39			1	3	4		4	4			3	5	2	6		
オーストラリア	10	4.31- 4.37					10		2	8		1	2	7	1	5	3	1
インド	5	4.21- 4.34	1	2		1	1			5			1	4		1	4	
	84	4.17- 4.41	1	8	5	9	61	7	11	66	2	5	7	70	3	15	23	43

1) DTA 培地を使用した好気平板法による細菌芽胞数 (CFU/10g)

2) PE-2 培地を使用した MPN 法による細菌芽胞数 (/10g)

3) 芽胞数レベルを示した試

表 3-2 海外産トマトペースト中の耐熱性芽胞細菌種

耐熱性好気細菌				耐熱性嫌気細菌			
中温菌		高温菌		中温菌		高温菌	
細菌種 / (分離株数)							
<u>Bacillus</u>		<u>Bacillus</u>		<u>Clostridium</u>		<u>Thermoanaerobacterium</u>	
<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)	<u>Thermoanaerobacterium</u>		<i>aciditolerans</i>	(10)
<i>aerius</i>	(2)	<i>licheniformis</i>	(2)	<i>aciditolerans</i>	(2)	<i>thermosaccharolyticum</i>	(3)
<i>fumarioli</i>	(1)	<u>Geobacillus</u>				<i>sp</i>	(5)
<i>megaterium</i>	(1)	<i>kaustophilus</i>	(5)				
<i>sonorensis</i>	(1)	<i>thermoleovorans</i>	(4)				
<i>sp</i>	(1)	<u>Paenibacillus</u>					
<u>Paenibacillus</u>		<i>cookie</i>	(4)				
<i>azoreducens</i>	(14)	<i>phoenicis</i>	(1)				
<i>cookie</i>	(3)	<i>sp</i>	(1)				
<i>konsidensis</i>	(2)	<u>Brevibacillus</u>					
<i>dendritiformis</i>	(1)	<i>borstelensis</i>	(1)				
<i>phoenicis</i>	(1)	<i>sp</i>	(1)				
<i>sp</i>	(5)	<u>Tuberibacillus</u>					
<u>Brevibacillus</u>		<i>sp</i>	(5)				
<i>choshinensis</i>	(1)						

3.3.1.3. 殺菌指標菌である *B. coagulans* の妥当性

国産トマト 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* は分離されなかった. このことから, トマトジュースにおける *B. coagulans* 芽胞による変敗リスクは低いと考えるが, さらに補足すれば, 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, White [39]は 1~3 芽胞/ml, Rice ら [40]は 22~650 CFU/ml の芽胞汚染が必要であると報告している. このことから, トマトジュースの pH をなるべく低く管理することで, さらに *B. coagulans* 芽胞による変敗リスクは低下するため, 今後は原料汚染度の高い *B. subtilis* group や変敗事例のある *Thermoanaerobacterium* 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と考えた.

3.4. 結論

原料として用いられるトマトの耐熱性細菌芽胞汚染について, 海外産のトマトペースト, 国産原料で試作したトマトジュースにおけるの細菌芽胞汚染状況を調べた.

- 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種では, *B. subtilis* group である *B. amyloliquefaciens* が 17/18 株分離されたが, *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) の汚染細菌では, 好気性中温細菌数は $0\sim 10^3$ CFU レベルで, 細菌種は *Bacillus* (特に *B. subtilis* group) や *Paenibacillus*, 高温細菌数は $0\sim 10$ CFU レベルで, 細菌種は *Geobacillus*, *Bacillus* (特に *B. subtilis*

group) , *Paenibacillus* が多く分離された。しかし, *B. coagulans* は分離されなかった。嫌気性細菌数は中温, 高温菌ともに<0.2~10 個レベルで, 細菌種は *Thermoanaerobacterium* が多く分離された。

以上のことから, トマトジュースを製造する上で, *B. coagulans* の原料汚染度は低く, 変敗リスクは少ないと考える。実際, 原料汚染度の高い *B. subtilis* group や変敗事例のある *Thermoanaerobacterium* をトマトジュースの加熱殺菌指標として管理するべきと考えた。

第4章 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

4.1. 緒言

第3章で、トマトジュースの *B. coagulans* による変敗リスクは少なく、原料汚染度の高い *B. subtilis* group や変敗事例のある *Thermoanaerobacterium* を加熱殺菌指標として管理するべきと考察した。

しかし、*B. subtilis* group は、トマト原料の主体汚染菌でありながら、これまでトマトジュースでの変敗事例は報告されていない。そこで、*Thermoanaerobacterium* を指標に検討することとした。なお、本菌種芽胞は強い耐熱性質から、これまで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菌種である。

本章では、*Thermoanaerobacterium* 芽胞を指標に、トマトジュースでの耐熱性を測定し、加熱殺菌条件を算出した。

4.2. 実験方法

4.2.1. 試料および試料の調製方法

4.2.1.1. 供試菌株

カゴメ株式会社保存の *Thermoanaerobacterium* 属3株（菌株番号 PH 1, FDA 3, FDA 6）、*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* 1株（菌株番号 20）の計4

株を用いた。これら 4 菌株は何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。

4.2.1.2. 培地の調製

本研究に用いた培地を以下に示す。

1) PE - 2 培地（以下，PE - 2 と略す）

第 3 章と同様に調製した。

2) 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）

第 3 章と同様に調製した。

3) GC ブロス A 培地（以下，GCA と略す）

滅菌土壌：市販の園芸用「赤玉土」をアルミ製トレイの上に厚さ約 1 cm に広げ、160°C、6 時間乾熱滅菌し、これを 5 回繰り返した。

炭酸カルシウム加滅菌土壌：上記滅菌土壌に炭酸カルシウムを重量比 9 : 1 の割合で混合した。

塩類溶液：塩化カルシウム 2 水塩 1 g, 硫酸アンモニウム 10 g, 硫酸マグネシウム 1 g, 硫酸マンガン 1 水塩 1 g, 硫酸亜鉛 7 水塩 0.05 g, 硫酸銅 5 水塩 0.05 g, 硫酸第 1 鉄 7 水塩 0.005 g を脱イオン水 1 L に溶解した。

ペプトン（Difco 社製）5 g, 酵母エキス 5 g, L-システイン塩酸塩 0.5 g, L-アラビノース 10 g を脱イオン水 900 ml に加温溶解し、塩類溶液 100 ml を加え、pH 7.0 に調整した。耐熱ネジロビン（DURAN 社製，500 ml）に炭酸カルシウム加滅菌土壌 40 g を投入し、上記の液 400 ml を加え、121°C、20 分間高圧殺菌した。

4.2.1.3. 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、沸騰水中で 10 分間加熱処理した後、55°C で培養した。ガス産生による発育が見られたら、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°C、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°C、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°C で保存した。

芽胞数の測定は、調製した芽胞液 1 ml を PIA によるアナエロビック・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、沸騰水中で 10 分間とし、培養条件は 55°C、5 日間とした。

4.2.2. 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 3N 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°C 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分間加熱処理した。

(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、上記4.2.1.3.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。

4.2.3. 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：サーモバ 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後した。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°C、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 (1980 年) [50]の補正表より、加熱処理時間から 1.5 分を減じた。

4.3. 結果および考察

4.3.1. 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

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結果を表 4-1 に示す。供試菌株 4 株すべて pH 4.6 で発育し、pH 4.5 では菌株番号 20 のみ発育したが、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* 芽胞による変敗を防止することができると考えられた。なお、犬飼ら (1991 年) [51]は、*Clostridium* 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 と考えられる。

4.3.2. 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、 $D_{115^{\circ}\text{C}}$ 値（115°C加熱時における 90%致死時間）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。

4.3.2.1. 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）における生残曲線を図 4-1 に、加熱致死時間曲線を図 4-2 に示す。

この結果から菌株番号 20 の $D_{121^{\circ}\text{C}}$ 値および 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。

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（1950 年）[52]は 10^4 の芽胞を殺滅するのに 120°C で 3.5 ~8 分、池上ら（1974 年）[53]は 120°C で 5 分を要したこと。田中（1991 年）[54]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[52]は 9.27~9.71°C、池上ら[53]は 10°C、田中[54]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。

4.3.2.2. 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表 4-2 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図 4-3 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、 $D_{111^\circ\text{C}} \text{値} = 25 / (\log (2.1 \times 10^5) - \log 4) = 5.3 \text{ 分}$ 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 (5.8~14.2°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表 4-3 に示す。リン酸緩衝液では、トマトジュースより約 2 倍強い耐熱性を示していた。

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、1.5 分の加熱殺菌が必要であった (殺菌値は $F_{121^\circ\text{C}}$ 値 1.5 分と示すことができる)。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。しかし、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、品質低下が予想される。今後は、pH 4.4 以下のトマトジュースであれば *Thermoanaerobacterium* 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。

表 4-1 pH が異なるトマトジュース中における

Thermoanaerobacterium 芽胞の発育状況

菌 種	菌株 番号	恒温放置 (月/°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		- ⁴⁾	-	-	+
<i>Thermoanaerobacterium</i> <i>thermosaccharolyticum</i>	FDA3	1/55	-	-	-	+
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp	FDA6		-	-	-	+
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp	20		-	-	+	+

1) 加熱殺菌前

2) 加熱殺菌後

3) 55°C, 1ヶ月間の恒温放置後

4) -, 発育陰性 ; +, 発育陽性

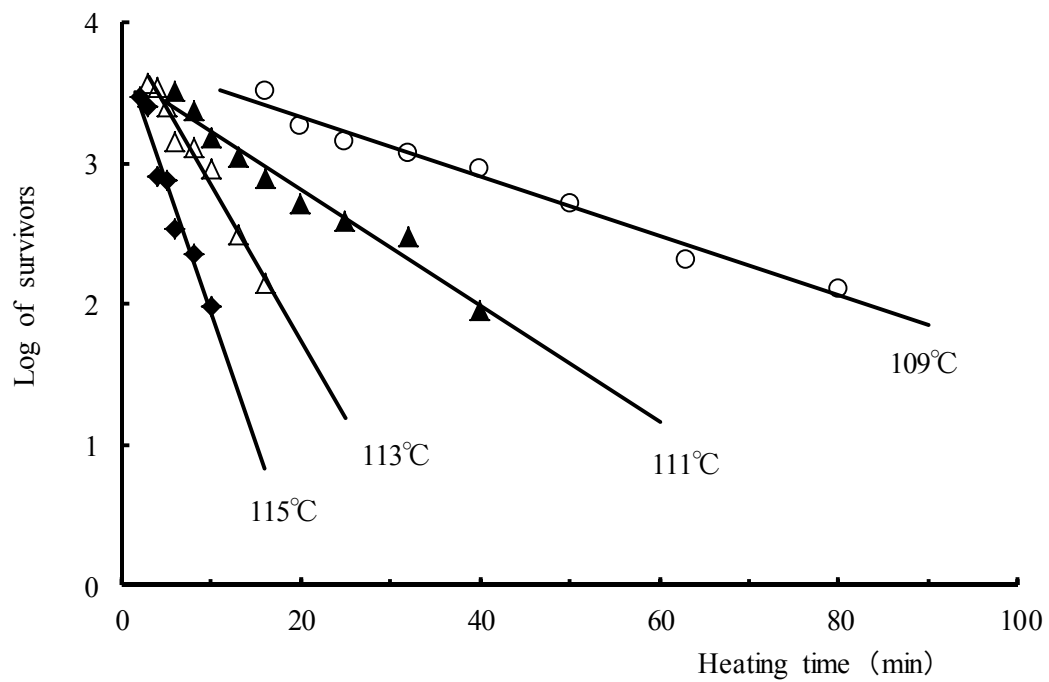


図 4-1 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中における
Thermoanaerobacterium No. 20 株芽胞の生残曲線

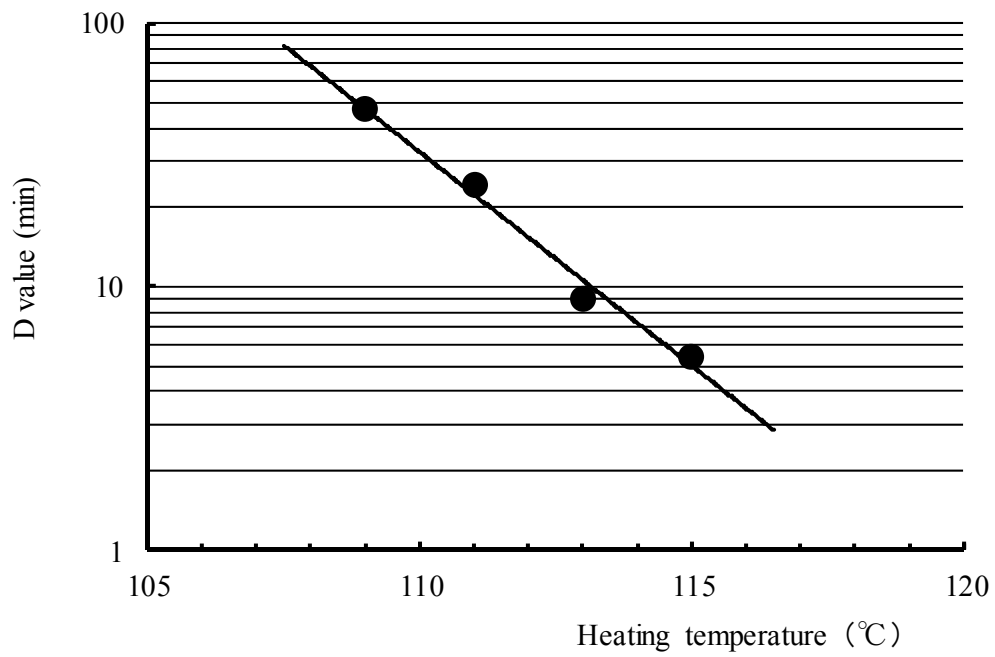


図 4-2 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中における
Thermoanaerobacterium No. 20 株芽胞の加熱致死時間曲線

表 4-2 トマトジュース (pH 4.6) 中における

Thermoanaerobacterium No. 20 株芽胞の耐熱性

補正後の加熱時間 (分)	加熱温度 (°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	—	—	—

チューブ 1 本 (トマトジュース 3ml) 中の芽胞数は 4.2×10^4 CFU, 55°C, 1 ヶ月培養後の結果

1) 発育しなかった

2) 供試チューブ 5 本中の発育陽性チューブ数

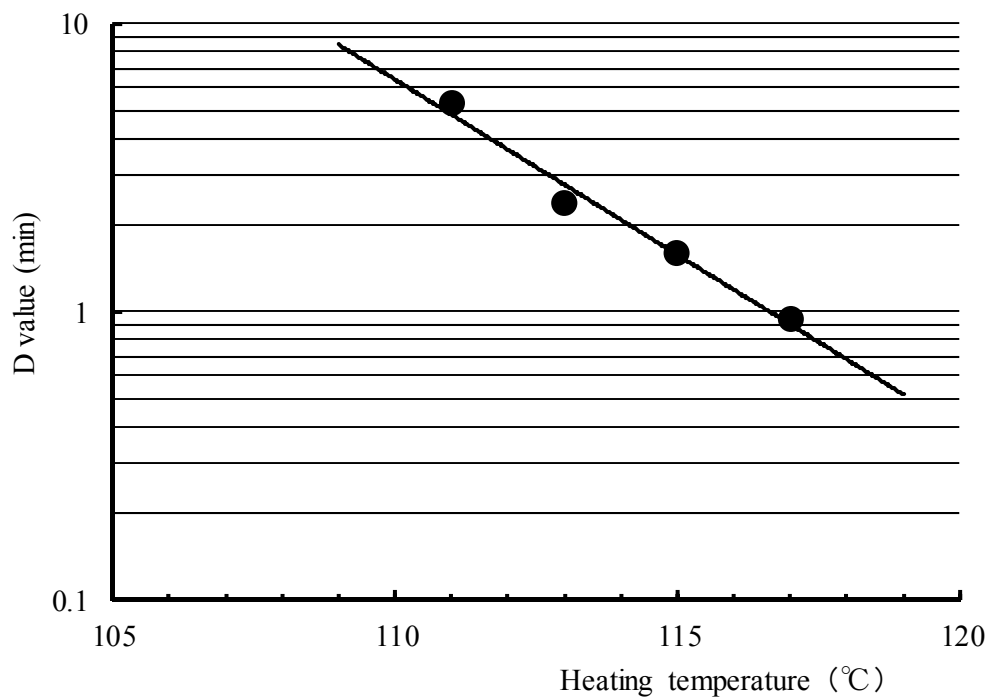


図 4-3 トマトジュース (pH 4.6) 中における

Thermoanaerobacterium No. 20 芽胞の加熱致死時間曲線

表 4-3 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) およびトマトジュース
(pH 4.6) 中における *Thermoanaerobacterium* No. 20 芽胞の耐熱性

加熱媒体	D 値 (分)			z 値 (°C)
	115°C	120°C	121°C	
0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)	5.0	0.8	0.5	6.2 (4.6~9.5) ¹⁾
トマトジュース (pH 4.6)	1.6	0.4	0.3	8.2 (5.8~14.2)

1) () 内は 95% 信頼限界

4.4. 結論

変敗事例のある *Thermoanaerobacterium* をトマトジュースの加熱殺菌指標とし、変敗したトマト缶詰より分離した *Thermoanaerobacterium* を用いて、トマトジュース (pH 4.6) 中での耐熱性を測定し加熱殺菌条件を算出した。

- 1) *Thermoanaerobacterium* 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。
- 2) *Thermoanaerobacterium* 菌株番号 20 芽胞のトマトジュース (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 $5.8\sim 14.2^{\circ}\text{C}$) であった。これより、 $F_{121^{\circ}\text{C}}$ 値 1.5 分の加熱殺菌処理が必要であった。

Thermoanaerobacterium をトマトジュースの加熱殺菌指標として加熱殺菌条件を算出した場合、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 $F_{121^{\circ}\text{C}}$ 値 0.7 分と比較するとかなり必要加熱殺菌時間が不足していた。しかし、この加熱殺菌処理をトマトジュースに施した場合、加熱による品質ダメージがあり、条件緩和が必要と考えた。

第5章 トマトジュース製造における pH 管理が及ぼす

商業的無菌性への効果

5.1. 緒言

4章では、トマトジュース (pH 4.6) での *Thermoanaerobacterium* 芽胞の耐熱性を測定し、121°C、1.5 分の加熱殺菌処理が必要であるとした。しかし、この加熱殺菌処理をトマトジュースに施した場合、加熱による品質ダメージがあり、条件緩和が必要と考察した。

この問題の解決方法として、*Thermoanaerobacterium* 芽胞による汚染度の低い原料トマト (トマトペースト) を選定し、使用することも一つであるが、トマトペーストを希釈する濃縮還元ジュースを製造する場合には有効でも、生原料を搾汁しジュースに加工するシーズンパックジュースでは、原料の細菌芽胞の汚染状況をリアルタイムに管理できないため適さない。

そこで、本章では、*Thermoanaerobacterium* 芽胞が発育しない pH 4.4 以下にトマトジュースの pH を管理し、新たな加熱殺菌指標菌種を設定することとした。新たな加熱殺菌指標菌種には、原料トマトの汚染度の高い *Bacillus subtilis* group や、原料トマトの汚染度も高く、過去変敗事例もある *Clostridium pasteurianum* [33] や *C. butyricum* [34] の中から、トマトジュース (pH 4.4) において発育可能であり、最も強い耐熱性を示す菌種を選定し、加熱殺菌条件を算出した。

5.2. 実験方法

5.2.1. 試料および試料の調製方法

5.2.1.1. 供試菌株

1) *Bacillus subtilis* group

3章で国産および海外産トマト原料より分離した27株を用いた。内訳は、国産（菌株番号101～113, 117, 119, 008）16株、海外産（菌株番号24, 25, 49～52, 63～67）11株である。

2) *Clostridium pasteurianum*[55]

広島県立総合技術研究所 食品工業技術センター分譲株1株（菌株番号TR-3）を用いた。菌株の由来は、変敗した酸性野菜缶詰より分離した酸性下で強い耐熱性を有する株である。

5.2.1.2. 培地の調製

本研究に用いた培地を以下に示す。

1) ブドウ糖ブイヨン培地および寒天培地（以下、GBおよびGAと略す）

第2章と同様に調製した。

2) 土壌エキス加酵母エキス寒天培地（以下、SEAと略す）

第2章と同様に調製した。

3) pH 4.4 および 4.6 のトマトジュース寒天培地

トマトペースト（Bx 28°）160 g に脱イオン水 340 ml を加え、3 N 水酸化ナトリウム溶液を加え、各 pH に調整した後、耐熱ネジロビンに分注し、105°C、5 分間高圧殺菌した。一方で脱イオン水 500 ml に寒天 15 g を加え耐熱ネジロビンに分注し、加熱溶解した後、121°C、20 分間高圧殺菌した。殺菌後、それぞれをよく混和して適量をシャーレに分注し、平板にした。なお、嫌気培養用には、同時にチオ

グリコール酸ナトリウム 0.5 g を加え、調製した平板培地は用いるまで嫌氣的に保管した。

4) 標準ブイオン培地（以下、SPB と略す）

標準寒天培地（日水製薬社製）に規定通り脱イオン水を加え、ろ紙でろ過し、121°C、20 分間高圧殺菌した。

5) PE - 2 培地（以下、PE - 2 と略す）

第 3 章と同様に調製した。

6) ピーインフュージョン寒天培地（以下、PIA と略す）

第 4 章と同様に調製した。

5.2.1.3. 供試菌の芽胞調製

1) *B. subtilis* group

供試菌株の保存芽胞液 0.5 ml を GB に接種し、80°C、20 分加熱処理した後、35°C で前培養した。この培養液を適量 SEA に接種し、35°C、5 日間培養した。培地に形成した集落を集菌し、洗浄のため、3 回遠心分離（6°C、3,000 rpm、10 分間）したものを滅菌バイアルに移し、試験に用いるまで -30°C で保存した。

芽胞数の測定は調製した芽胞液 1 ml を GA による混釈法により芽胞数を測定した。芽胞の活性化の加熱条件は、80°C、20 分間とし、培養条件は 35°C、5 日間とした。

2) *C. pasteurianum*

供試菌株の保存芽胞液 0.5 ml を PE - 2 に接種し、80°C、20 分加熱処理した後、30°C で培養した。旺盛なガス産生による発育が見られたら、SPB に 1 ml 接種し、

嫌氣的に（アネロパック角型ジャー 三菱ガス化学社製）30℃，7日間培養した。培養液を滅菌ガーゼでろ過し，ろ液を6℃，3,000 rpm，10分間遠心分離した。以下，*B. subtilis* group 同様に行った。

芽胞数の測定は調製した芽胞液1 mlをPIAによるアナエロビック・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，80℃，20分間とし，培養条件は30℃，7日間とした。

5.2.2. *B. subtilis* group の菌株選定

5.2.2.1. pH 4.4 および 4.6 のトマトジュース寒天培地上での発育

供試菌株27株の中から，pH 4.4 トマトジュースで発育可能な菌株を選抜するため，調製した芽胞液を80℃，20分間加熱処理し，1白金耳をトマトジュース寒天培地上（pH 4.4，4.6）に接種し，好気および嫌氣的に培養した。培養条件は，35℃で14日間とし，発育の有無をコロニーの形成で判定した。

5.2.2.2. GB（pH 7.0）中での耐熱性

上記5.2.1.1.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GB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）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：サーモバ OH-16，油は日本油脂社製：ポリエチレングリコール 400）を用い，所定の条件で加熱処理した後，35℃，14日間培養し，外観の変化により発育判定した。このとき，1加熱温度・時間条件にチューブ1本を供した。

5.2.3. 供試菌株の pH 4.4 および 4.6 トマトジュース中での発育

上記 5.2.2.2. で選定した *B. subtilis* group 供試菌株や *C. pasteurianum* 菌株番号 TR-3 芽胞が熱間充填した pH 4.4 および 4.6 のトマトジュース中での発育能を確認するために行った。

1) トマトジュースの調製

4 章と同様に殺菌後 pH 4.4 または 4.6 になるように 3N 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°C で 5 分間高圧殺菌した。

2) トマトジュース中における発育

(1) 供試菌株の接種

供試菌株の芽胞液を滅菌脱イオン水で希釈し、各 pH の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、チューブ 15 本に 3 ml ずつ分注した。この時、菌を接種しないトマトジュースも、それぞれ 5 本に 3 ml ずつ分注し、酸素で溶封し、80°C、20 分間加熱処理した。

(2) 初発芽胞数、pH の測定

加熱処理後の無接種試料 1 本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、上記 5.2.1.3. 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) 恒温保管および発育判定

加熱処理後の無接種試料 4 本、芽胞液接種試料 12 本を、35°C、28 日間放置し、外観、pH の変化および菌数の増加がみられたものを発育陽性とした。

5.2.4. 供試菌株芽胞の pH 4.4 トマトジュース中での耐熱性

1) 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 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, *B. subtilis* group 供試菌株は GA による混釈法で 35°C, 5 日間, *C. pasteurianum* 菌株番号 TR-3 芽胞は PIA によるアナエロビック・パウチ法で, 30°C, 7 日間培養し生残菌数を測定した. このとき, 1 加熱温度・時間条件にチューブ 1 本を供した.

2) pH 4.4 のトマトジュース中における耐熱性

供試菌株の芽胞液 1 ml を, トマトジュース (pH 4.4) 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. チューブは恒温油槽を用い, 所定の条件で加熱処理後した. このとき, 1 加熱温度・時間条件に TDT チューブ 5 本を供し, その 5 本から 1 ml 採取し, 上記 5.2.1.3. と同様の方法で生残菌数を測定し, 5 本の平均で示した. なお, 加熱処理時間の補正は, 松田ら (1980 年) [50] の補正表より, 加熱処理時間から 1.5 分を減じた.

5.3. 結果および考察

5.3.1. *B. subtilis* group 菌株の選定

供試菌株 27 株について, pH 4.4 および 4.6 のトマトジュース寒天培地上での発育を調べた結果を表 5-1 に示す. 熱間充填されるトマトジュースの容器内は脱気され, 嫌気的環境下にあるため, 通性嫌気性の菌種を選定する必要がある. そこで, ここでは pH に関係なく嫌気的な発育が認められた菌株を選抜した.

その結果、供試菌株は pH 4.4 では発育がみられなかったが、pH 4.6 では嫌氣的に 3 株（菌株番号 103, 105 および 25）に発育がみられた。これらは何れも *B. amyloliquefaciens* であった。

5.3.2. pH 4.4 トマトジュース中での発育

菌株番号 25 および菌株番号 TR-3 芽胞の pH 4.4 のトマトジュース中における発育を調べた結果を表 5-2 および 5-3 に示す。

菌株番号 25 芽胞は、初発芽胞数は 10^4 CFU/ml であったが、芽胞接種後 2 日目には生菌数が 10^6 CFU/ml まで増加し、5 日目以降は 10^3 CFU/ml に減少していた。但し、pH や外観の変化は全く示さず、菌数の変化のみであったが、嫌氣的な pH 4.4 のトマトジュースでの発育が確認された。Rodriguez ら（1993 年）[56]は、トマトジュースでの *B. subtilis* や *B. licheniformis* の発育について調査し、*B. subtilis* は、1 CFU/ml、*B. licheniformis* は、104 CFU/ml あれば、好氣的な pH 4.4 のトマトジュースで発育し、トマトジュースの pH を 4.8 まで上昇させたが、嫌氣的な pH 4.4 のトマトジュースでは発育を示さなかったと報告している。

これまで *B. subtilis* group 芽胞によるトマトジュースでの変敗事例が報告されなかったのは、pH や外観の変化を全く示さず、菌数の変化のみであったため、変敗に気が付かなかった可能性も考えられる。

また、菌株番号 TR-3 芽胞は、初発芽胞数は 10^3 CFU/ml であったが、芽胞接種後 7 日目にチューブ 12 本中 1 本がガス発生による発育がみられ、生菌数は 10^6 CFU/ml まで増加し、pH も 4.1 まで低下した。しかし、28 日後もその他のチューブは発育がみられなかったが、菌株番号 TR-3 芽胞も嫌氣的な pH 4.4 のトマトジュ

一スで発育し、危害菌種になり得ることが分かった。

これまで、*B. subtilis* group 菌株は、pH 4.6 未満のトマトジュースで変敗事例もなく、トマトジュース中での発育性について曖昧であったが、本研究によって、発育することが明らかになった。

5.3.3. pH 4.4 トマトジュース中での耐熱性

5.3.3.1. 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中での耐熱性

1) *B. subtilis* group 菌株番号 25

0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) における生残曲線を図 5-1 に、加熱致死時間曲線を図 5-2 に示す。D_{108°C} 値は 12.6 分 (95%信頼限界 10.0~17.0 分), D_{110°C} 値は 9.6 分 (8.4~11.1 分), D_{112°C} 値は 4.7 分 (3.6~6.7 分), D_{114°C} 値は 2.2 分 (1.8~2.7 分), D_{116°C} 値は 0.9 分 (0.6~1.5 分) で z 値は 6.8°C (5.2~9.9°C) であった。この結果から、D_{121°C} 値は 0.2 分であった。なお、過去の研究における本菌種の 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) での耐熱性である D_{121°C} 値は、0.04~0.48 分[57]と報告があり、菌株番号 25 は中間的な耐熱性を有していた。

2) *C. pasteurianum* 菌株番号 TR-3

0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) における生残曲線を図 5-3 に、加熱致死時間曲線を図 5-4 に示す。D_{94°C} 値は 21.1 分 (19.1~23.6 分), D_{96°C} 値は 12.8 分 (11.6~14.2 分), D_{98°C} 値は 7.0 分 (6.4~7.7 分), D_{100°C} 値は 3.4 分 (3.1~3.9 分) で z 値は 7.6°C (6.1~10.1°C) であった。この結果から、D_{121°C} 値を求めると 0.006 分であった。菌株番号 TR-3 芽胞の耐熱性は、菌株番号 25 芽胞と比較すると、明らかに低く、以降の試験の必要性はないと判断した。

5.3.3.2. トマトジュース (pH 4.4) での耐熱性

B. subtilis group 菌株番号 25 のトマトジュース (pH 4.4) における生残曲線を図 5-5 に、加熱致死時間曲線を図 5-6 に示す。D_{100°C}は 9.4 分 (8.7~10.2 分), D_{102°C}は 6.2 分 (5.9~6.5 分), D_{104°C}は 3.6 分 (3.2~4.2 分), D_{106°C}は 2.5 分 (2.3~2.7 分), D_{108°C}は 1.9 分 (1.6~2.3 分) で z 値は 11.2°C (9.3~14.2°C) であった。この結果から、D_{121°C}値は 0.12 分であった。Rodriguez ら (1993 年) [56]は、トマトジュース (pH 4.4) 中での *B. subtilis* と *B. licheniformis* 芽胞の耐熱性を調べ、*B. subtilis* の D_{90°C}は 29.5 分, D_{95°C}は 15.8 分, D_{100°C}は 5.7 分で z 値は 14.0°C。 *B. licheniformis* の D_{90°C}は 29.9 分, D_{95°C}は 12.2 分, D_{100°C}は 5.9 分で z 値は 14.2°Cであったことを報告している。本研究で得られた *B. subtilis* group 菌株番号 25 の D_{100°C}値 9.4 分, z 値 11.2°Cの耐熱性はそれらと比べると、約 2/3 程度であり、z 値の違いが影響していた。ただし、これらの結果は、嫌気的な pH 4.4 のトマトジュースで発育を示さなかった株の耐熱性であるため、あくまでも参考値として考えるべきである。

これより、菌株番号 25 芽胞の耐熱性を基に、トマトジュース (pH 4.4) での 121°C における加熱殺菌条件を算出すると、0.6 分 (D_{121°C}値 0.12 分 × 5 倍) に相当する加熱処理が必要であった。これは、トマトジュースの加熱殺菌条件として現在採用されている 121°C, 0.7 分と比較するとほぼ同程度であり、3 章で得られた *Thermoanaerobacterium* 菌株番号 20 芽胞を指標に算出した加熱殺菌条件である 121°C, 1.5 分を緩和できた。

なお、菌株番号 25 芽胞のリン酸緩衝液、トマトジュースにおける D_{108°C}値はそれぞれ 12.6 分, 1.9 分であり、リン酸緩衝液では、トマトジュースより約 6 倍の耐熱性を示していた。しかし、トマトジュースでは z 値が 11.2°Cと比較的高いため、

$D_{121^{\circ}\text{C}}$ 値では約 2 倍の耐熱性を示していた。

以上の結果より、常温流通するトマトジュース (pH 4.6) の商業的無菌性を確保した殺菌条件については、pH 4.4 以下に管理することで、*B. subtilis* group 菌株番号 25 芽胞を加熱殺菌指標菌とし、 121°C 、0.6 分相当の加熱殺菌条件を提案する。

なお、本研究は、原料トマトより分離した *B. subtilis* group 27 株からトマトジュースで発育する株を選抜して加熱殺菌条件を検討した。今後、さらに菌株を増やして詳細に検討することができれば、より信頼できるデータが構築できると考える。

表 5-1 トマト原料より分離した *B. subtilis* group 株の選抜のための発育試験

菌株番号	好気培養		嫌気培養		菌種
	pH 4.4	pH 4.6	pH 4.4	pH 4.6	
101~102	+ ¹⁾	+	-	-	<i>B. amyloliquefaciens</i>
103	+	+	-	+	<i>B. amyloliquefaciens</i>
104	+	+	-	-	<i>B. amyloliquefaciens</i>
105	+	+	-	+	<i>B. amyloliquefaciens</i>
106~113	+	+	-	-	<i>B. amyloliquefaciens</i>
117	+	+	-	-	<i>B. amyloliquefaciens</i>
119	+	+	-	-	<i>B. amyloliquefaciens</i>
008	+	+	-	-	<i>B. amyloliquefaciens</i>
24	-	-	-	-	<i>B. licheniformis</i>
25	+	+	-	+	<i>B. amyloliquefaciens</i>
49	-	+	-	-	<i>B. sonorensis</i>
50~51	-	-	-	-	<i>B. licheniformis</i>
52	-	+	-	-	<i>B. licheniformis</i>
63~64	-	+	-	-	<i>B. amyloliquefaciens</i>
65	+	+	-	-	<i>B. amyloliquefaciens</i>
66	-	+	-	-	<i>B. amyloliquefaciens</i>
67	+	+	-	-	<i>B. amyloliquefaciens</i>

トマトジュース寒天培地で 35°C, 14 日間培養した結果

1) +,発育陽性 - ,発育陰性

表 5-2 トマトジュース (pH 4.4) 中における

B. subtilis group No. 25 芽胞の発育

試料	培養条件 (日 / 35°C)	外観変化	pH	生菌数 (CFU / ml)
芽胞 無接種区 (ブランク)	0	— ¹⁾	4.4	<10
	1	—	4.4	<10
	2	—	4.4	<10
	5	—	4.4	<10
	7	—	4.4	<10
芽胞 接種区	0	—	4.4	1.6×10^4
		—	4.4	1.5×10^4
		—	4.4	2.0×10^4
	1	—	4.4	7.5×10^3
		—	4.4	9.1×10^3
		—	4.4	7.2×10^3
		—	4.4	1.1×10^6
	2	—	4.4	4.4×10^5
		—	4.4	1.1×10^6
		—	4.5	5.4×10^3
	5	—	4.5	3.3×10^4
		—	4.4	5.5×10^3
	7	—	4.4	3.6×10^4
		—	4.4	4.1×10^3
—		4.4	2.2×10^3	

チューブ 1 本中の芽胞数は 10^4 CFU, 35°C, 7 日間後の結果

1) 外観変化なし

表 5-3 トマトジュース (pH 4.4) 中における

C.pasteurianum No. TR-3 芽胞の発育

試料	培養条件 (日 / 35°C)	外観変化	pH	生菌数 (CFU / ml)
芽胞 無接種区 (ブランク)	0	— ¹⁾	4.4	<10
	7	—	4.4	<10
	14	—	4.4	<10
	21	—	4.4	<10
	28	—	4.5	<10
芽胞 接種区	0	—	4.4	5.8×10^3
		—	4.4	7.1×10^3
		—	4.4	7.3×10^3
	7	+ ²⁾	4.1	4.8×10^6
		—	4.4	3.1×10^3
		—	4.4	7.9×10^3
	14	—	4.4	3.0×10^3
		—	4.4	3.9×10^3
		—	4.4	2.5×10^3
	21	—	4.4	5.7×10^3
		—	4.4	4.6×10^3
		—	4.4	5.5×10^3
	28	—	4.4	2.4×10^3
—		4.4	2.7×10^3	
—		4.4	2.1×10^3	

チューブ 1 本中の芽胞数は 10^3 CFU, 35°C, 28 日間後の結果

- 1) 外観変化なし
- 2) 外観変化あり (ガス発生)

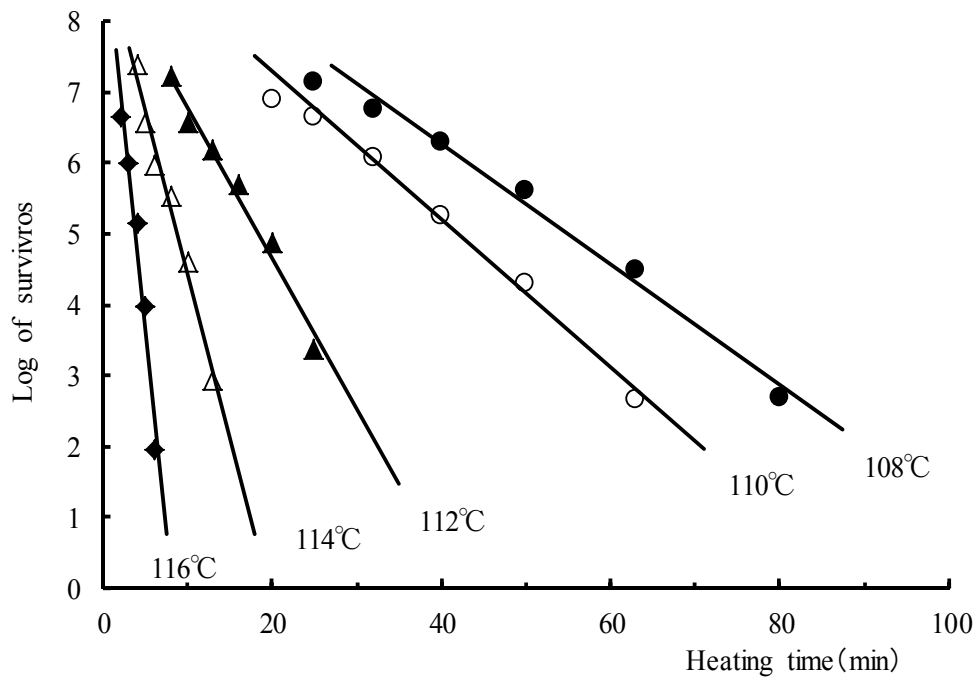


図 5-1 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中における
B. subtilis group No. 25 株芽胞の生残曲線

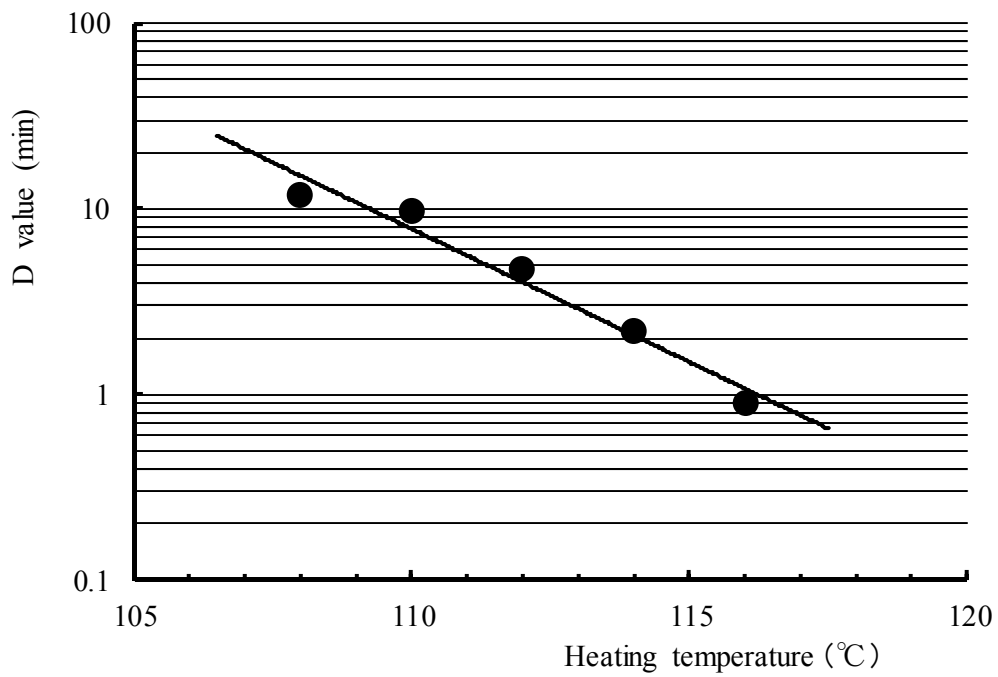


図 5-2 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中における

B. subtilis group No. 25 株芽胞の加熱致死時間曲線

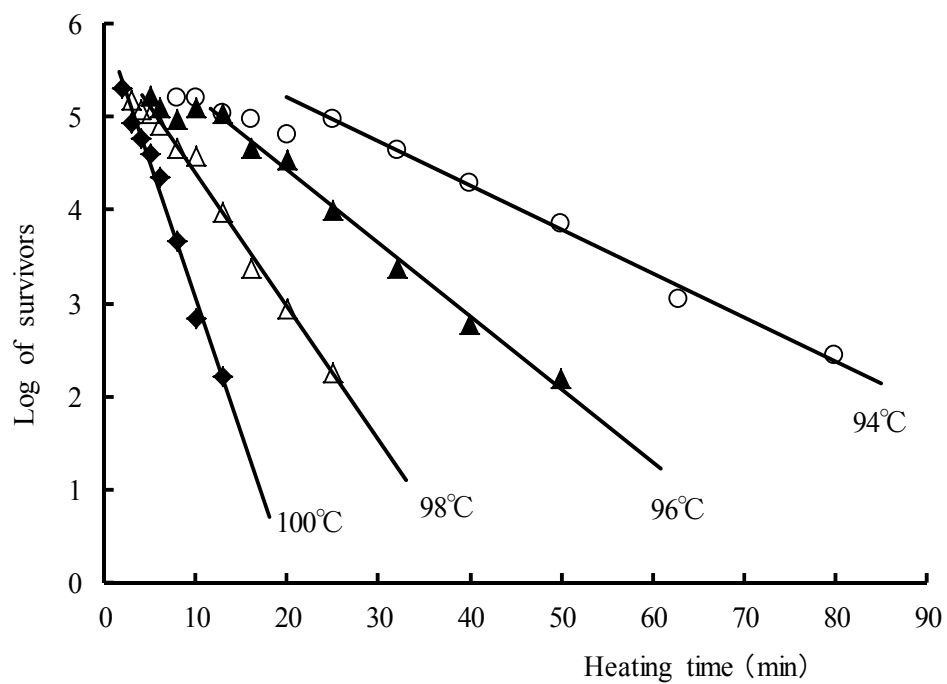


図 5-3 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中における

C. pasturianum No. TR-3 株芽胞の生残曲線

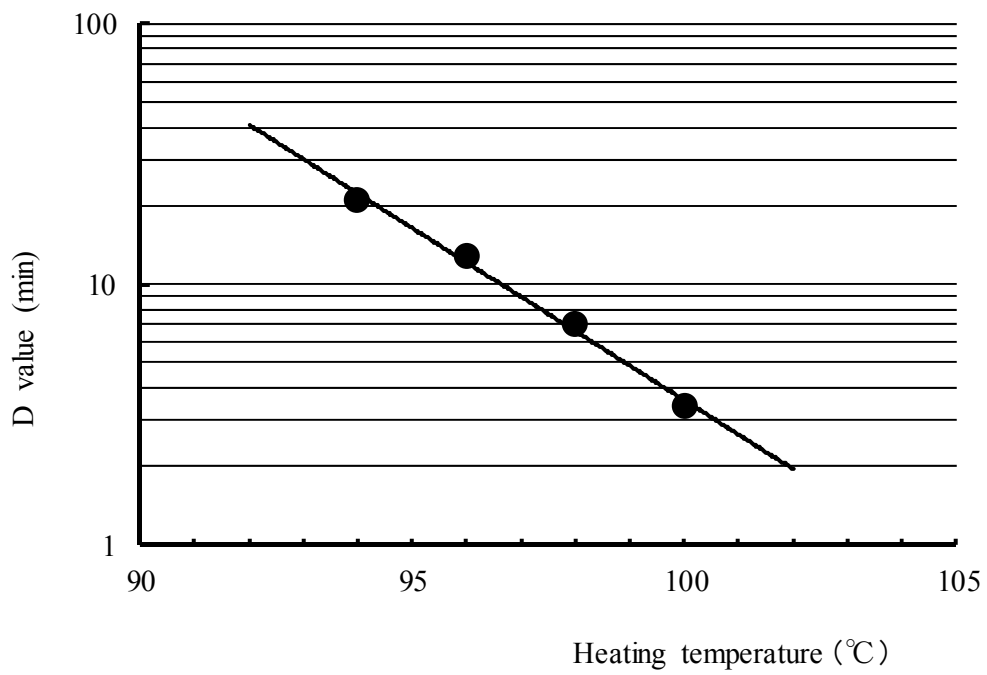


図 5-4 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中における
C. pasturianum No. TR-3 株芽胞の生残曲線

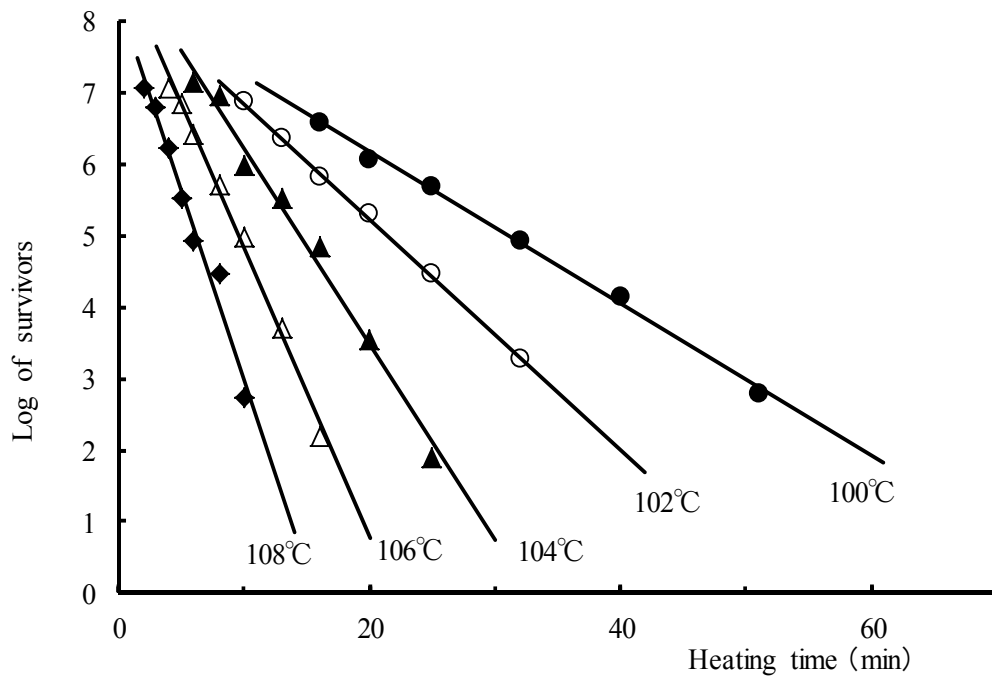


図 5-5 トマトジュース (pH 4.4) 中における

B. subtilis group No. 25 株芽胞の生残曲線

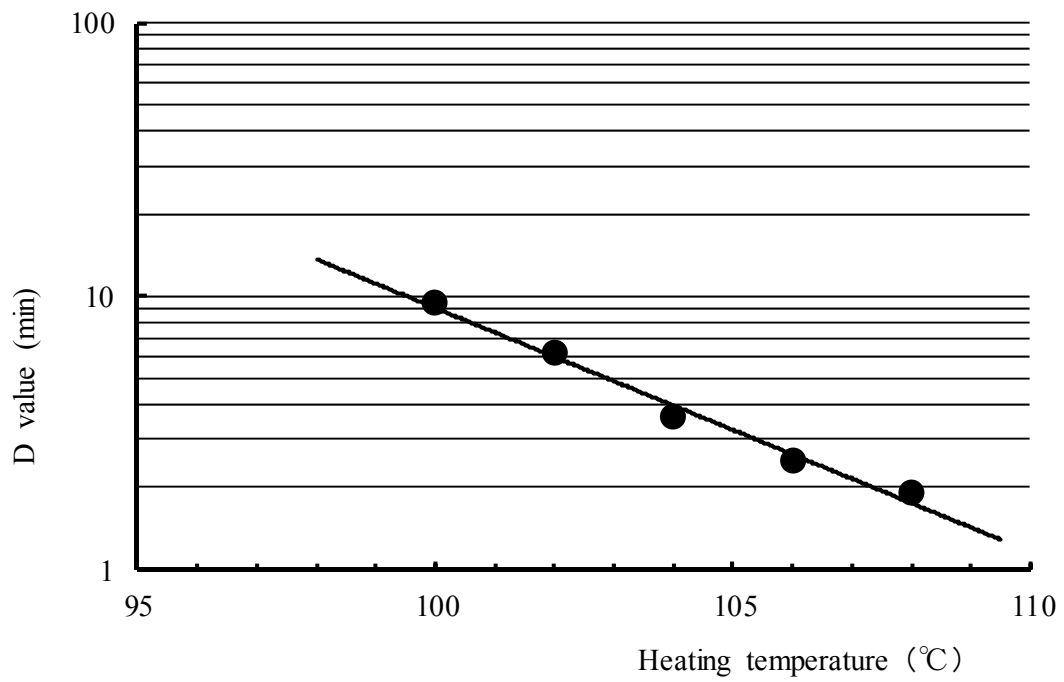


図 5-6 トマトジュース (pH 4.4) 中における

B. subtilis group No. 25 株芽胞の加熱致死時間曲線

5.4 結論

4章では、*Thermoanaerobacterium* をトマトジュースの加熱殺菌指標とした場合、121°C、1.5 分の加熱殺菌が必要であった。しかし、加熱によるトマトジュースの品質ダメージが考えられるため、加熱殺菌条件緩和が必要であった。

そこで、*Thermoanaerobacterium* 芽胞が発育しない pH 4.4 以下にトマトジュースを管理し、新たな加熱殺菌指標菌を選定し、加熱殺菌条件を算出した。

- 1) トマト原料由来の *B. subtilis* group 27 株の中で、トマトジュース (pH 4.4) で発育可能で、耐熱性の最も強い菌株番号 25 を選定した。
- 2) *B. subtilis* group 菌株番号 25 と *C. pasteurianum* 菌株番号 TR-3 のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中の耐熱性を比較した。菌株番号 25 の $D_{121^{\circ}\text{C}}$ 値は 0.2 分、 z 値は 6.8°C であった。菌株番号 TR-3 の $D_{121^{\circ}\text{C}}$ 値は 0.006 分、 z 値は 7.6°C であった。これより加熱殺菌指標菌は耐熱性の強い *B. subtilis* group 菌株番号 25 とした。
- 3) *B. subtilis* group 菌株番号 25 のトマトジュース (pH 4.4) 中での耐熱性を測定した結果、耐熱性は $D_{121^{\circ}\text{C}}$ 値が 0.12 分、 z 値が 11.2°C であり、これらの値から殺菌値である $F_{121^{\circ}\text{C}}$ 値 0.6 (D 値×5 倍) 分を算出した。

このことより、pH 4.4 以下にトマトジュースを管理することで、トマトジュースの高品質を維持しながら、安全性を確保することが可能になった。すなわち、*B. subtilis* group を加熱殺菌指標に 121°C、0.6 分の加熱殺菌条件を提案する。

第 6 章 総括

本論文は、常温流通するトマトジュース（pH 4.6）の加熱殺菌条件として、*B. coagulans* を加熱殺菌指標に世界で採用されてきた 121°C、0.7 分について、原料トマトの耐熱性細菌芽胞による汚染状況を把握することで、適切な殺菌指標菌を選定し、商業的無菌性を確保したトマトジュースの加熱殺菌条件の算出を目的にしたものである。

論文は以下の5章で構成されている。

第 1 章では、トマトジュースの定義やトマトジュース誕生から現在の市場動向をまとめ、トマトジュースの変敗事例、加熱殺菌条件設定および変敗原因、国産トマト原料の耐熱性細菌芽胞による汚染状況、既往の研究などをレビューし、近年の変敗事例では、*B. coagulans* とは明らかに異なる菌種による変敗が発生していること、原料トマトにおける *B. coagulans* 芽胞の汚染がみられないことを述べ、*B. coagulans* 以外に管理すべき重要な菌種が考えられることを示した。また今後の市場傾向からトマトジュースの pH 上昇による微生物的安全性の低下が懸念されることも指摘し、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必要があることを示した。

第 2 章では、トマトジュースにおける *B. coagulans* の危害性を検討するため、pH 4.5 の培地と pH 4.6 のニンジンジュースで発育可能で、過去食品変敗に関わった *B.*

coagulans を用いて、各 pH に調整したトマトジュース中での発育性を調べ、pH 4.6 以下のトマトジュースでは発育しないことを確認した。以上の結果より、*B. coagulans* はトマトジュースで発育は不安定で、発育する株は限定されることが考えられることから、加熱殺菌指標菌には、*B. coagulans* よりも管理すべき重要な細菌種を設定すべきであるとした。

第 3 章では、トマトジュースの加熱殺菌条件を検討する上では、原料トマトの耐熱性細菌芽胞汚染を明らかにすることが重要である。しかし、原料トマトの耐熱性細菌芽胞汚染については、データが不足していた。そこで、原料として用いられるトマトの耐熱性細菌芽胞汚染について、海外産のトマトペーストの細菌芽胞汚染状況と、国産原料で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、国産原料では、*B. subtilis* group である *B. amyloliquefaciens* が汚染の主体菌種であることを確認した。また、海外原料（トマトペースト 10 g）では、好気性中温細菌は 0~10³ レベル CFU で *B. subtilis* group や *Paenibacillus*、高温細菌は 0~10 レベル CFU で *Geobacillus*、*Bacillus*、*Paenibacillus*、嫌気性細菌は中温、高温ともに < 0.2~10 レベル個で *Thermoanaerobacterium* が多く分離された。しかし、国産、海外産原料いずれからも *B. coagulans* は分離されなかったことを確認した。その結果 *B. coagulans* は原料汚染度が低く、変敗リスクはないと考えられ、実際、原料汚染度の高い *B. subtilis* group や変敗事例のある *Thermoanaerobacterium* をトマトジュースの加熱殺菌指標として管理すべきとした。

第4章では、変敗事例が報告されている *Thermoanaerobacterium* を指標に、変敗したトマト缶詰から分離した *Thermoanaerobacterium* 4株の中で最も耐熱性の強い株を用いてトマトジュース (pH 4.6) 中での耐熱性を測定し、加熱殺菌条件を算出したところ、 $D_{121^{\circ}\text{C}}$ 値は 0.3 分、 z 値は 8.2°C 、 121°C における加熱殺菌条件は、1.5 分の加熱処理が必要であった。また *Thermoanaerobacterium* 芽胞は、pH 4.4 に調整したトマトジュースでは発育がみられなかった。この結果、従来の加熱殺菌条件では *Thermoanaerobacterium* 芽胞を加熱殺菌指標にした場合、必要加熱殺菌時間を満たしていなかった。また、トマトジュースの pH を 4.4 以下に管理することが重要であるとした。

第5章では、*Thermoanaerobacterium* 芽胞が発育しない pH 4.4 以下に管理することによって、新たな加熱殺菌指標菌による加熱殺菌条件を検討した。加熱殺菌指標には、原料トマトの汚染度の高い *Bacillus subtilis* group、原料トマトの汚染度も高く、過去変敗事例もある *Clostridium pasteurianum* とし、pH 4.4 のトマトジュース中で発育し、耐熱性の強い株であった *Bacillus subtilis* group を選び、pH 4.4 のトマトジュース中での耐熱性を測定し加熱殺菌条件を算出したところ、 $D_{121^{\circ}\text{C}}$ 値は 0.12 分、 z 値は 11.2°C ($9.3\sim 14.2^{\circ}\text{C}$) で、 121°C における加熱殺菌条件は、0.6 ($D_{121^{\circ}\text{C}}=0.12\text{分}\times 5\text{倍}$) 分の加熱処理が必要であることを確認した。これより、pH 4.4 以下にトマトジュースを管理し、*B. subtilis* group を加熱殺菌指標に 121°C 、0.6 分の加熱殺菌条件を提案した。これは、トマトジュースの加熱殺菌条件として現在行っている 121°C 、0.7 分とほぼ同程度であり、3章で得られた *Thermoanaerobacterium* 芽胞を指標に算出した加熱殺菌時間である 121°C 、1.5 分を緩和できる有効な手段

であった。

本研究により、従来、トマトジュースの加熱殺菌指標菌として用いられてきた *B. coagulans* について、実用的な評価を行い、指標菌としては不適當であることを示した。ついで、新たな加熱殺菌指標菌を検索した結果、*Thermoanaerobacterium* および *B. subtilis* group を選定し、これらに対する適正な加熱殺菌条件を算出した。これによって、最終的に、トマトジュースの品質を維持しながら、安全性を確保する殺菌技術を開発することができた。また、トマトジュースの低酸度化など微生物安全性の低下の懸念があったが、pH 管理の指針も示すことができた。

今後、ますます健康指向の高まりから需要が期待されるトマトジュースの微生物的安全性の向上が図られると考える。

謝辞

本研究の遂行，および論文作成にあたりご指導，ご鞭撻をいただきました新潟大学大学院自然科学研究科 大坪研一 教授に厚くお礼申し上げます。

本研究論文作成にあたりご指導，ご鞭撻をいただきました新潟大学大学院自然科学研究科 門脇基二 教授，同研究科 西海理之 准教授に厚くお礼申し上げます。

本研究論文をご校閲いただきました新潟大学大学院自然科学研究科 児島清秀 教授，同研究科 城斗志夫 准教授に厚くお礼申し上げます。

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，大久保良子氏には，調査の手法や考察の方法など細部にわたりご指導をいただきました。厚くお礼申し上げます。

共同研究者である，カゴメ株式会社 研究開発本部 カスタマーソリューションセンター 商品開発部 東京ソリューションラボ 中野千紗氏には，調査の手法や考察方法の検討，100株を超える細菌のPCR法による同定作業を担当していただきました。また，精神的にも支えられました。厚くお礼申し上げます。

トーアス株式会社 品質統括グループ 中西直之氏には，大変な労力を要するトマトペースト中の細菌芽胞数の測定作業を快くサポートいただきました。厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 里見弘次；有害微生物管理技術 2 巻，芝崎勲，フジ・テクノシステム，p 110 - 114 (2000).
- 2) 駒木勝；新しいレトルト食品 開発・製造ハンドブック，横山理雄，田中要，サイエンスフォーラム，p. 229 - 236 (2007).
- 3) 松田典彦，駒木勝；缶・びん詰・レトルト食品・飲料製造講義総論編，(社)日本缶詰協会編，(社)日本缶詰協会，p. 653 - 657 (2002).
- 4) 缶・びん詰，レトルト食品 製造流通基準 (GMP) マニュアル，(社)日本缶詰協会編，(社)日本缶詰協会，p. 176 - 179 (1992).
- 5) 山口尹通；レトルト食品，岸本昭監修，光琳，p. 36 - 57 (1996).
- 6) レトルト食品を知る，社団法人日本缶詰協会，丸善，(1996).
- 7) 戸塚英夫；マーケット創出の決着力を持つパッケージングを求めて安全と安心を確立する食品マーケット密封容器詰め食品の加熱殺菌を支える周辺技術と理論豊かな社会を支えてきた先人の知恵の技術，Packpia, 48 (1), 26 - 31 (2004).
- 8) 市原伸一，ほか；食品の包装・缶びん詰，光琳書院，(1963).
- 9) 横山理雄；食品の静菌・除菌・殺菌システムとその周辺技術，食品と容器，33 (10), 555 - 562 (1992).
- 10) Gould, W. A. ; Tomato Production, Processing and Technology Third Edition, 1992, p. 420.
- 11) Sognefest, R., Jackson, J. M. ; Presterilization of canned tomato juice, Food Technology, 1, 78 - 84 (1947).

- 12) Becker, E. M., Pederson, C. S. ; The physiological characters of *Bacillus coagulans* (*Bacillus thermoacidurans*), *Journal Bacteriol*, 59, 717 - 725 (1950).
- 13) Sneath, P. H. A. ; Section 13 Endospore-forming Gram-positive rods and cocci, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2 (Sneath, P. H. A., et al.), The Williams and Wilkins, p.1104 - 1207 (1986) .
- 14) 松田典彦, 増田寛行, 駒木勝, 松本直紀 ; しるこ及びミルクコーヒー缶詰から分離した高温性偏性嫌気性有芽胞細菌, *日本食品衛生学会誌*, 23, 480 - 486 (1982) .
- 15) 遠田昌人 ; 第2節 清涼飲料, *微生物殺菌実用データ集*, 山本茂貴 監修, *サイエンスフォーラム*, p. 59 - 69 (2005) .
- 16) 長田隆, 花岡昌史, 山本大吾, 駒木勝 ; ニンジンジュース (pH 4.6) における *Bacillus coagulans* および *Clostridium thermosaccharolyticum* 芽胞の耐熱性, *缶詰時報*, 87, 265 - 275 (2008).
- 17) Kimura, M. ; A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111 - 120 (1980) .
- 18) Saitou, N., Nei, M. ; The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Journal of Molecular Evolution*, 4, 406 - 425 (1987).
- 19) Stumbo, C. R. ; *Thermobacteriology in Food Processing* 2nd ed, Academic Press, New York, p. 113 (1973).

- 20) Peng, Jing. , Mah, Jae-Hyung. , Somavat, Romel. , Mohamed, Hussein. , Sastry, Sudhir. , Tang, Juming. ; Thermal Inactivation Kinetics of *Bacillus coagulans* Spores in Tomato Juice, Journal of Food Protection, 75, 1236 - 1242 (2012).
- 21) 中條均紀, 森山裕子 ; *Bacillus coagulans* 胞子の耐熱性値の分布, 日本食品工業学会誌, 38, 211 - 213 (1991).
- 22) 犬飼進, 松田典彦 ; 細菌胞子の耐熱性に及ぼす各種要因に関する研究 第 1 報 培地中における *Bacillus* 属胞子の耐熱性に及ぼす pH の影響, 缶詰時報, 59, 219 - 224 (1980).
- 23) 犬飼進, 松田典彦 ; 水分活性が *Bacillus* 属細菌胞子の耐熱性に及ぼす影響 (塩化ナトリウム), 缶詰時報, 59, 525 - 528 (1980).
- 24) 犬飼進, 松田典彦 ; 水分活性が *Bacillus* 属細菌胞子の耐熱性に及ぼす影響 (蔗糖), 缶詰時報, 59, 529 - 532 (1980).
- 25) 中條均紀, 森山裕子 ; *Bacillus coagulans* 胞子の耐熱性におよぼす pH および水分活性, 日本食品工業学会誌, 40, 268 - 271 (1993).
- 26) 松田典彦 ; 低酸性飲料の加熱殺菌条件に関する考察 1, 缶詰時報, 62, 65 - 73 (1983).
- 27) Walker, H. W. ; "Food Microbiology public health and spoilage aspects" ed. by Defigueiredo, M. P., Splittstoesser, D. F., The AVI Pub. Co., Westport, Connecticut, p. 356 - 386 (1976).
- 28) 松田典彦, 駒木勝, 市川良子, 後藤幸恵 ; 缶詰食品の微生物による変敗原因 (1968-1980), 日本食品工業学会誌, 32, 444 - 449 (1985).

- 29) 松田典彦, 駒木勝, 市川良子, 後藤幸恵 ; 缶詰食品の変敗原因有芽胞細菌の種と食品の種類との関係, 日本食品工業学会誌, 32, 444 - 449 (1985).
- 30) 中條均紀, 石津弥生 ; 変敗した低酸性食品缶詰より分離した *Bacillus coagulans* 孢子の耐熱性, 日本食品工業学会誌, 32, 725 - 730 (1985).
- 31) 長田隆 ; シーズンパックにより製造したトマトジュース缶詰の膨張缶から分離した耐熱性芽胞細菌, 缶詰時報, 88, 727 - 732 (2009).
- 32) Herson, A. C., Hulland, E. D. 著, 高尾彰一監修, 田中光幸訳 ; 缶詰食品 - その微生物学入門 -, 建帛社, p. 123 - 125 (1974).
- 33) Townsend, C. T. ; Spore-forming anaerobes causing spoilage in acid canned foods, Food Research, 4, 231 - 237 (1939).
- 34) Clark, F. M., and Dehr, A. ; A study of butyric acid producing anaerobes isolated from spoiled canned tomatoes, Food Research, 12, 122 - 128 (1947).
- 35) Tressler, D. K. and Joslyn, M. A. ; Fruit and Vegetable Processing Technology. 1st edition, AVI Publishing Co, Westport, CT, (1961).
- 36) Berry, R. N. ; Some new heat - resistant acid-tolerant organisms causing spoilage in tomato juice, Journal Bacteriol, 25, 72 - 73 (1933).
- 37) Knock, G. C., Lambrechts, M. S., Hunter, R. C. and Riley, F. R. ; Souring of South African tomato juice by *Bacillus coagulans*, Journal Science Food Agriculture, 10 (6) 337 (1959).
- 38) Wessel, D. J. and Benjamin, H. A. ; Process control of heat resistant spoilage organisms, Fruit Prod. J, 20, 178 - 180 (1941).

- 39) White, L. S. ; Spoilage bacteria in tomato products. Food Research, 16, 422 - 428 (1951).
- 40) Rice, A. C. and Pederson, C. S. ; Factors influencing growth of *Bacillus coagulans* in canned tomato juice. 1. Size of inoculum and oxygen concentration, Food Research, 19, 115 - 123 (1954).
- 41) 長田隆, 武居みどり ; シーズンパックによるトマトジュース缶詰の製造工程における耐熱性細菌芽胞の汚染状況, 缶詰時報, 88, 733 - 743 (2009).
- 42) 松田典彦, 駒木勝, 市川良子, 後藤幸恵 ; 変敗缶詰食品から分離した好気性および通性嫌気性有芽胞細菌の簡易法による同定, 日本食品工業学会誌, 32, 399 - 406 (1985).
- 43) 松田典彦, 駒木勝, 市川良子, 後藤幸恵 ; 変敗缶詰食品から分離した偏性嫌気性有芽胞細菌の簡易法による同定, 日本食品工業学会誌, 32, 391 - 398 (1985).
- 44) Pederson, C. S. and Becker, M. E. ; Flat sour spoilage of tomato juice, N. Y. State Agric. Exp. Stn. Teac. Bull. 287 (1954).
- 45) 犬飼進, 木村守, 久富道江 ; 細菌芽胞の耐熱性に及ぼす芽胞形成用培地の pH の影響, 缶詰時報, 1195 - 1198 (1991).
- 46) 山口尹通 ; レトルト食品, 岸本昭監修, 光琳, p. 36 - 57 (1996).
- 47) 高橋秀夫 ; 新版微生物学実験法, 杉山純多, 渡辺信, 大和田紘一, 黒岩常祥, 高橋秀夫, 徳田元 編, 講談社サイエンティフィック, p. 189 - 193 (1999).
- 48) 山口敏季 ; 日本缶詰協会 57 回技術大会講演要旨集, p. 11 (2008)).

- 49) 駒木勝;新しいレトルト食品 開発・製造ハンドブック, 横山理雄, 田中要, サイエンスフォーラム, p. 229-236 (2007).
- 50) 松田典彦, 駒木勝, 松縄佳子;芽胞の耐熱性測定実験における加熱処理時間の補正, 缶詰時報, 59, 785-790 (1980).
- 51) 犬飼進, 木村守, 久富道江; pH, 塩化ナトリウムおよびショ糖が *Clostridium thermosacchariolyticum* および *Clostridium sporogenes* の芽胞の耐熱性に及ぼす影響, 缶詰時報, 70, 998-1008 (1991).
- 52) 遠山祐三, 中島善次;缶詰膨張原因となる好熱細菌に関する研究 第二報 缶詰製造に関係ある二, 三の性質に就て, 日本水産学会誌, 16, 60-64 (1950).
- 53) 池上義昭, 森大蔵;たけのこ缶詰の研究—V たけのこ大型缶詰の膨張原因菌について, 東洋食品短期大学・東洋食品研究所研究報告, 11, 170-174 (1974).
- 54) 田中昭二;アサリ水煮缶詰の黒変並びに膨張原因菌に関する研究 (第1報) —変敗原因菌の性状および製造試験結果について—, 缶詰時報, 70, 998-1008 (1991).
- 55) 石原理子, 渡邊弥生, 青山康司, 缶入り酸性食品からの変敗原因菌の分離とその性状, 広島県立総合技術研究所 食品工業技術センター研究報告, 25, 33-36 (2009).
- 56) Rodriguez, J. H., Cousin, M. A., Nelson, P. E.; Thermal Resistance and Growth of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in Tomato Juice, J. Food Protection, 56, 165-168 (1993).
- 57) 林弘通, 三橋重之;無菌化技術便覧, ビジネスセンター社, p. 50-63 (1983).