

トマト製品におけるThermoanaerobacterium属の増殖リスク評価

誌名	日本食品工学会誌 = Japan journal of food engineering
ISSN	13457942
著者名	藤池,春奈 小林,昌生
発行元	日本食品工学会
巻/号	23巻2号
掲載ページ	p. 55-62
発行年月	2022年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



◇◇◇◇ 技術論文 ◇◇◇◇

トマト製品における *Thermoanaerobacterium* 属の増殖リスク評価藤池 春奈[†], 小林 昌生

カゴメ株式会社

The Growth Risk of the *Thermoanaerobacterium* sp. in Tomato ProductsHaruna FUJIIKE[†], Masao KOBAYASHI

Kagome Co. Ltd., 17 Nishitomiya, Nasushiobara, Tochigi 329-2762, Japan

In this study, we investigated the growth risk of *Thermoanaerobacterium* sp. in tomato products which has not been clarified in previous study excepted for tomato juice. As a result, the growth of *Thermoanaerobacterium* sp. was not observed in various tomato products with refractive index (RI, index for soluble solid content concentration) 8.0 or more, and pH 4.2 – 4.6. On the other hand, the growth of *Thermoanaerobacterium* sp. in modified TGC media of pH 4.2 – 4.6 was observed in the range of RI 8.0 but was not observed in the range of RI 19.5 or more. These results suggested that there were other growth inhibitors of *Thermoanaerobacterium* sp. in tomato products besides RI. Therefore, we investigated the growth risk of *Thermoanaerobacterium* sp. by adding organic acids contained in tomato products, citric acid, malic acid, and pyroglutamic acid, to a modified TGC medium. As a result, when citric acid alone contained more than 0.52 %, no growth was observed, and the coexistence effect of organic acids was not confirmed. These results suggested that citric acid contributes to the growth inhibition of *Thermoanaerobacterium* sp. in tomato products.

Keywords: *Thermoanaerobacterium*, tomato, tomato products, citric acid, growth regulator

1. 緒 言

トマト (*Solanum lycopersicum*) は、世界における2020年の生産量がおおよそ1億8600万トンと、世界で最も多く生産されている農作物の1つである [1]。生食用としても消費されているが、トマトペースト、トマトピューレー、トマトジュースなどのトマト加工品のかたちでも流通している。これらの多くは常温流通であり、これまでにその長期保存のための微生物制御面での研究が進められてきた。例えば、トマトジュースの殺菌条件に関しては、1950年にBecker and Pedersonによって、pHが4.4未満であれば、*Bacillus coagulans* が変敗原因菌種であり [1]、121°C、0.7分が殺菌価であることが提唱されていた [2]。それ以降、pHの影響などに関する研究も進められており、2015年に長田らによって、pHが4.4を超える領域では、高温性芽胞菌である *Thermoanaerobacterium* 属を殺菌対象菌種とする提言が行われた [3]。 *Thermoanaero-*
bacterium 属の加熱殺菌条件は121°C、1.5分相当となっ

ており [3]、*Bacillus coagulans* と比較すると、強い殺菌価である。また、原料トマトの細菌芽胞汚染を調べた研究によると、海外トマト原料では好気性中温菌の *Bacillus subtilis* group や *Paenibacillus* sp.、高温菌の *Geobacillus* sp. や *Bacillus* sp. や *Paenibacillus* sp.、嫌気性菌の *Thermoanaerobacterium* 属が数多く分離され、国内トマト原料では *Bacillus subtilis* group や *Clostridium butyricum* が高頻度で分離されている [3,4]。さらに、これらの分離菌の中でも、*Thermoanaerobacterium* 属は、国産トマトジュース缶詰の膨脹変敗の原因菌種として特定されおり、また、その変敗したトマトジュースのpHは4.4以上であったことが報告されている [5]。すなわち、pH 4.4以上のトマトジュースでは、*Thermoanaerobacterium* 属は増殖リスクがあり、とくに注意すべき微生物として特定されている。一方で、トマトジュース以外のトマト加工品（トマトペースト、トマトピューレーなど）がpH 4.4以上の領域で、トマトジュースと同じような *Thermoanaerobacterium* 属の増殖挙動を示すかは不明である。トマト加工品の中でも屈折計示度（Refractive Index：以下、RIと記す）が高い製品は、RIに比例してトマト由来成分濃度も高くなるため、*Thermoanaerobacterium* 属がトマトジュース中とは異なった生育挙動を示すことも予想される。

(受付2022年2月15日, 受理2022年5月12日)

〒329-2762 栃木県那須塩原市西富山17番地

Fax: 0287-39-1038, E-mail: Haruna_Fujiike@kagome.co.jp

そこで、本報では、トマトジュース以外のトマト製品における *Thermoanaerobacterium* 属の増殖リスクを明らかにすることを目的とし、RI の異なるトマト製品を対象として、*Thermoanaerobacterium* 属の増殖評価を行った。そして、その結果を基に、増殖制御因子の存在を考察し、検証した。

2. 実験方法

2.1 試料および試料の作製

2.1.1 供試菌株

1) *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*

公益財団法人日本缶詰びん詰レトルト食品協会分譲株 2 株 (5609[6], 5616), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (以下, DSMZ と記す) 分譲株 1 株 (DSM571), カゴメ株式会社 (以下, カゴメ (株) と記す) がホワイトソースより分離した 1 株 (B305), カゴメ (株) がホールトマト原料より分離した 6 株 (B532, B533, B534, B535, B536, B537) の計 10 株。

2) *Thermoanaerobacterium aciditolerans*

DSMZ 分譲株 1 株 (DSM16487T), カゴメ (株) がホールトマト原料より分離した 1 株 (B640) の計 2 株。

3) *Thermoanaerobacterium* sp.

カゴメ (株) がトマトピューレー原料より分離した 10 株 (T2, T4, T5, T7, T9, T10, T11, T12, T14,

T15). 16S rDNA の全長約 1.5 kbp うちの 5' 側の約 500 bp の領域の DNA シーケンスを実施したが、いずれも種名は未同定。

1)~3) の計 22 菌株を Table 1 にまとめて示す。

2.1.2 pH 調整トマト製品の作製

1) トマト製品の種類

本研究で供試したトマト製品は、RI の異なる 4 種類を選定した。種類は、市販の家庭用商品からは、“カゴメトマトジュース食塩無添加 720 mL PET” (以下, トマトジュースと記す), トマトピューレーの一種である“濃厚あらごしトマト 295 g 缶” (以下, 濃厚あらごしトマトと記す) の 2 種類。業務用商品からは、トマトピューレーの一種である“カゴメパサータグラノローザ イタリア産 2.5 kg 缶” (以下, トマトパサータと記す), “カゴメトマトペースト CB (コールドブレイク製法) トルコ産 4.5 kg 缶” (以下, トマトペーストと記す) を使用した。

2) トマトペースト希釈液の作製

1) で示したトマトペーストを滅菌水で希釈し、RI を 6.5, 8.0, 19.5, 24.0 に調整したトマトペースト希釈液 4 種類を作製した。トマトペースト希釈液 4 種類は、RI 6.5 はダイストマト, RI 8.0 はトマトピューレー (JAS 規格での下限値), RI 19.5 はトマトピューレー, RI 24 はトマトペースト (JAS 規格での下限値) を想定しており、本報ではトマト製品として表記する。

Table 1 List of 22 strains used in this study.

Strain	Strain No.	Source
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	5609	Canned asparagus
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	5616	-
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	DSM 571T	-
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	B305	Canned white sauce (expanded)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	B532	Canned whole tomatoes (expanded)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	B533	Canned whole tomatoes (expanded)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	B534	Canned whole tomatoes (expanded)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	B535	Canned whole tomatoes (expanded)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	B536	Canned whole tomatoes (expanded)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	B537	Canned whole tomatoes (expanded)
<i>Thermoanaerobacterium aciditolerans</i>	DSM 16487 T	-
<i>Thermoanaerobacterium aciditolerans</i>	B640	Canned whole tomatoes (expanded)
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	T2	Pouched Tomato puree
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	T4	Pouched Tomato puree
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	T5	Pouched Tomato puree
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	T7	Pouched Tomato puree
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	T9	Pouched Tomato puree
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	T10	Pouched Tomato puree
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	T11	Pouched Tomato puree
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	T12	Pouched Tomato puree
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	T14	Pouched Tomato puree
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	T15	Pouched Tomato puree

3) pH 調整トマト製品の作製

1) 2) のトマト製品, 計 8 種類をそれぞれストマッカー用袋 (061-11200, アテクト) に適量分注し, 6.0 M 水酸化ナトリウム (198-18865, 富士フィルム和光純薬) を用いて pH を 4.2~4.6 の範囲で調整した (以下, pH 調整トマト製品と記す). トマト製品の pH を均一化させる方法として, トマト製品を入れたストマッカー用袋を細菌検査用ホモジナイザー (EXNIZER400, オルガノ) に設置し, 条件を 260 rpm, 1 分にして混合した. 各 pH 調整トマト製品を 50 mL 遠沈管 (2345-050, IWAKI) 2 本に 40 g ずつ分注し, 滅菌済み流動パラフィン (128-04375, 関東化学) を適量添加した.

2.1.3 RI・pH 調整培地の作製

1) 使用培地

変法 TGC 培地 (以下, mTGC と記す) …日本製菓社製 (05629) を用い, 常法により調整, 滅菌した.

2) RI・pH 調整培地の作製

mTGC の RI を調整するために異性化液糖 (果糖ぶどう糖液糖 F-55, サナス) を用いた. 異性化液糖 (以下, 液糖と記す) は, ストマッカー用袋に適量分注した. 小分けした液糖をウォーターバス (TR-3, アズワン) に投入し, 加温殺菌 (80°C, 10 分) した. オートクレーブ (LSX-500, トミー精工) で滅菌 (121°C, 15 分) した容器に mTGC を適量加え, さらに液糖を添加し, RI を 3.6 (未調整), 6.5, 8.0, 19.5, 28.0 の 5 種類に調整した (以下, RI 調整培地と記す). RI 調整培地 5 種類の pH を 2.1.2 で実施した pH 調整と同一の方法で, pH 4.2, 4.4, 4.6 に調整した (以下, RI・pH 調整培地と記す). 各 RI・pH 調整培地を 50 mL 遠沈管 2 本に 40 g ずつ分注し, 滅菌済み流動パラフィンを適量添加した.

2.1.4 有機酸添加 RI 8.0・pH 4.6 調整培地の作製

1) 使用培地

2.1.3 と同様の培地を使用した.

2) 有機酸添加 RI 8.0・pH 4.6 調整培地の作製

2.1.3 で実施した RI 調整と同一の方法で, mTGC に

液糖を添加して RI を 8.0 に調整した (以下, RI 8.0 調整培地と記す). さらに, RI 8.0 調整培地の pH を 2.1.2 で実施した pH 調整と同一の方法で, pH 4.6 に調整した (以下, RI 8.0・pH 4.6 調整培地と記す). RI 8.0・pH 4.6 調整培地に, クエン酸 (038-06925, 富士フィルム和光純薬), リンゴ酸 (136-05215, 富士フィルム和光純薬), ピログルタミン酸 (P0573, 東京化成工業) の 3 種類の有機酸を単独で, トマトペースト (RI 28.0) とトマトペースト希釈液 (RI 6.5, 8.0, 19.5) の各有機酸含有量と同等量になるように添加した. さらに, RI 8.0・pH 4.6 調整培地に, クエン酸+リンゴ酸, クエン酸+ピログルタミン酸, リンゴ酸+ピログルタミン酸の 2 種類ずつの組み合わせで, トマトペースト (RI 28.0) とトマトペースト希釈液 (RI 6.5, 8.0, 19.5) の有機酸含有量と同等量になるように添加した. RI 8.0・pH 4.6 調整培地への有機酸添加率を Table 2 にまとめて示す (以下, 有機酸添加 RI 8.0・pH 4.6 調整培地と記す). 単独 3 区分と 2 種類ずつの組み合わせ 3 区分, 計 6 区分の有機酸添加 RI 8.0・pH 4.6 調整培地を 50 mL 遠沈管へ 40 g ずつ分注し, 滅菌済み流動パラフィンを適量添加した.

2.2 供試菌株の菌液調製

1) 使用培地

改変 PE-2 半流動培地 …トリプトン (211705, Becton, Dickinson and Company) 5.0 g, 酵母エキス 5.0 g (8344948, Becton, Dickinson and Company), L-システイン塩酸塩一水和物 (039-05274, 富士フィルム和光純薬) 0.5 g, 寒天 (010-08725, 富士フィルム和光純薬) 1.5 g, 炭酸カルシウム (07050-00, 関東化学) 10.0 g を蒸留水 1 L に溶解し, ニューージーランド産アラゴングリーンピース (カーギルジャパン) 3~4 個を入れたねじ口試験管 (直径 16 mm) に 10 mL ずつ分注し, これを 121°C で 15 分間殺菌した [7].

2) 菌液の調製

2.1.1 の 22 菌株を改変 PE-2 半流動培地に復元し,

Table 2 Addition rates of organic acids.

RI		6.5	8.0	19.5	28.0	
Addition rate (%)	Single addition	Citric acid	0.42	0.52	1.27	1.83
		Malic acid	0.07	0.09	0.21	0.30
		Pyroglutamic acid	0.23	0.29	0.70	1.00
	Mixed addition	Citric acid	0.42	0.52	1.27	1.83
		Malic acid	0.07	0.09	0.21	0.30
		Citric acid	0.42	0.52	1.27	1.83
Pyroglutamic acid		0.23	0.29	0.70	1.00	
		Malic acid	0.07	0.09	0.21	0.30
		Pyroglutamic acid	0.23	0.29	0.70	1.00

55℃で2日間、嫌気培養した。供試菌株22菌株を復元後、菌液を滅菌済みガーゼで濾し、50 mL遠沈管へ回収し、遠心分離(10,000 rpm, 5分)した。遠心分離後、上清を除去し、生理食塩水(0.85%)10 mL添加した。作製した菌液を均一にするために、ボルテックスミキサーを用いて良く混合し、試験まで-20℃で保管した。

2.3 供試菌株の菌液接種

1) 使用培地

mTGC寒天培地…mTGCに寒天を濃度が1.50%になるように添加、常法により調製、滅菌した。

2) 菌液の接種

2.2で調製した22菌株の菌液をmTGC寒天培地による混釈法により各菌液の菌数を測定した。培養条件は、嫌気下で55℃、2日間である。各22菌株の菌数を算出後、生理食塩水(0.85%)を用いて各22菌株の菌液濃度を $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ cfu/mLとなる様に調整した。調整した各22菌株を2 mLずつ採取し、100 mL遠沈管に回収、*Thermoanaerobacterium*属の混合菌液を作製した。次に、50 mL遠沈管に40 gずつ分注してある各サンプル(pH調整トマト製品、RI・pH調整培地、有機酸添加RI 8.0・pH 4.6調整培地)にそれぞれ100 μ Lずつ混合菌液を接種し、嫌気下で55℃、約1週間~1ヵ月間培養した。各菌株の接種濃度は $2.5 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^3$ cfu/gであった。

2.4 増殖確認のための菌数測定

混合菌液接種済みの各サンプル(pH調整トマト製品、RI・pH調整培地、有機酸添加RI 8.0・pH 4.6調整培地)から、培養期間1週間~1ヵ月間のうち、2~4日程にわたり、1 mLを採取し、mTGC寒天培地による混釈法を実施した。希釈倍率は $1 \sim 10^3$ 倍とし、培養条件は、嫌気下で55℃、2日間である。培養後、平板1枚当たりのコロニーが30~300個の範囲にある平板を選択し、平板上に形成されたコロニーを目視で計測した。同検体かつ同希釈倍率の2枚の平板のコロニー数の平均値を算出し、そこに希釈倍率を乗じて、食品1gあたりのコロニー数を算出した。

2.5 有機酸分析

トマトペーストを超純水にて10倍希釈した(以下、10倍希釈トマトペーストと記す)。遠沈管に10倍希釈トマトペーストを10mL採取し、10mLのジエチルエーテル(14134-73, 関東化学)を加え、2分間振盪した後、遠心分離した下層を分析に使用した。水系ディスポーザブルシリンジフィルター0.45 μ m(25CS045AN, ADVANTEC TOYO)にて濾過し、ディスポーザブルシリンジカップII A, (501-004, SHIMADZU GLC)に分注し、分析装置にセットした。分析装置は、カラム

(C610H-S, GL Science)を装着した日立ハイテック社製の高速液体クロマトグラフ(HPLC)L-7000型を用いた。測定条件は、移動相に3 mM過塩素酸(160-05755, SHIMADZU GLC)、反応液に0.1 mMプロモチモールブルー(027-03052, 富士フィルム和光純薬)、15 mMリン酸水素二ナトリウム(197-02865, 富士フィルム和光純薬)、2 mM水酸化ナトリウムを使用し、流量は移動相、反応液ともに0.5 ml/min、測定波長440 nm、カラム温度50℃、試料注入量10~30 μ Lとした。

3. 結果および考察

3.1 pH調整トマト製品における

*Thermoanaerobacterium*属の増殖リスク

2.1.2で記したpH調整トマト製品8種類(トマトジュース、トマトパサータ、濃厚あらごしトマト、トマトペースト、トマトペースト希釈液RI 6.5, 8.0, 19.5, 24.0)について、*Thermoanaerobacterium*属の混合菌液($7.8 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^3$ cfu/g)を接種し、嫌気下で55℃、約1ヵ月間培養した。培養中、約1週間ごとに計4回、増殖を確認するために菌数測定を実施した。その結果をTable 3に示す。トマトジュース(RI 5.7)では、pH 4.50, 4.55, 4.60の区分で 1.0×10^3 cfu/g以上の菌が検出され、接種した菌数よりも増加しており、増殖が確認された。また、トマトペースト希釈液においてもRI 6.5のものでは、pH 4.55で 1.0×10^3 cfu/g以上の菌が検出され、増殖が確認された。一方、興味深いことにRI 8.0以上のトマト製品は、pH 4.2~4.6で菌が検出されておらず、増殖が確認されなかった。

RI 8.0以上かつpH 4.2~4.6のトマト製品で増殖が確認されなかった要因として、1)高いRI環境条件による増殖制御、2)トマト由来成分による増殖制御、の2つが考えられる。これらを検証するために、トマト製品の代わりに、*Thermoanaerobacterium*属が増殖可能である嫌気性菌用の培地であるmTGCを用いて、同様の試験を実施し、トマト製品の結果と比較した。

3.2 RI・pH調整培地における

*Thermoanaerobacterium*属の増殖リスク

2.1.3で記したRI・pH調整培地について、*Thermoanaerobacterium*属の混合菌液(4.0×10^2 cfu/g)を接種し、嫌気下で55℃、約1ヵ月間培養した。培養中、約1週間ごとに計4回、増殖を確認するために菌数測定を実施した。その結果をTable 4に示す。RI・pH調整培地において、RI 3.6~8.0かつpH 4.2~4.6の範囲で、 1.0×10^3 cfu/g以上の菌が検出され、接種した菌数よりも増加しており、増殖が確認された。一方、RI 19.5~28.0かつpH 4.20~4.60の範囲では、接種した菌数以上の菌は検出されず、増殖が確認されなかった。

Table 3 The bacterial counts (cfu/g) in pH- and RI-adjusted tomato products inoculated with mixed *Thermoanaerobacterium* suspensions

Sample	tomato juice	tomato paste dilution		tomato passata	noukou aragoshi tomato	tomato paste dilution		tomato paste
RI	5.7	6.5	8.0	9.0	15.1	19.5	24.0	28.0
4.20	N.D.	—	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—	—
4.30	N.D.	N.D.	—	N.D.	—	N.D.	N.D.	N.D.
4.40	5.8×10	N.D.	—	—	—	—	—	—
pH 4.45	—	N.D.	—	—	—	N.D.	N.D.	N.D.
4.50	>1.0×10 ^{3*}	—	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—	N.D.
4.55	>1.0×10 ^{3*}	>1.0×10 ^{3*}	—	—	—	N.D.	N.D.	N.D.
4.60	>1.0×10 ^{3*}	7.1×10	N.D.	N.D.	—	N.D.	—	N.D.

The bacterial counts are the maximum values during one-month incubation.

N.D.: not detected (less than detection limit, 30 cfu/g), — : not tested, *: classified as proliferated in test

Table 4 The bacterial counts (cfu/g) in RI-adjusted medium inoculated with mixed *Thermoanaerobacterium* suspensions

Sample	RI adjusted medium					
	RI	3.6	6.5	8.0	19.5	28.0
4.20	4.20	7.7×10 ^{3*}	3.9×10 ^{5*}	5.9×10 ^{5*}	8.2×10	8.7×10
pH 4.40	4.40	3.2×10 ^{5*}	7.4×10 ^{5*}	>1.0×10 ^{3*}	4.9×10	6.5×10
4.60	4.60	8.3×10 ^{4*}	2.1×10 ^{5*}	3.7×10 ^{4*}	4.2×10	3.5×10

The bacterial counts are the maximum values during one-month incubation.

*: classified as proliferated in test

培地条件下の RI 19.5~28.0 かつ pH 4.20~4.60 の範囲で増殖が確認されていないことから、RI の高さと同定 pH 領域が *Thermoanaerobacterium* 属の増殖制御の一因であることが示唆された。

また、本結果と 3.1 で実施したトマト製品における増殖リスクの結果を比較すると、RI 8.0 の RI・pH 調整培地で増殖が確認されたのに対して、同じ RI 8.0 でもトマトペースト希釈液では増殖が確認されなかった。これは、トマト製品中に含まれている何らかのトマト由来成分が増殖制御因子として関わっていることを示唆している。

3.3 トマト製品の有機酸分析

Thermoanaerobacterium 属の増殖を制御しているトマト由来成分を特定する上で、従来から、有機酸が抗菌性を示すことが知られているため [8]、トマト原料に含まれている有機酸に着目した。赤色トマトに含まれている有機酸はクエン酸とリンゴ酸の2種類である [9]。また、トマトに含まれているグルタミンは加熱を受けると環化され、有機酸であるピログルタミン酸へ変化することが知られており、加熱したトマト加工品に含まれる [10]。そこで、本研究で使用したトマトペースト (RI 28.0) のクエン酸、リンゴ酸、ピログルタミン

酸の含有量を測定した。その結果、トマトペーストの各有機酸含有量は、クエン酸 1.83%、リンゴ酸 0.30%、ピログルタミン酸 1.00% であった。また、RI 6.5, 8.0, 19.5 に調整したトマトペースト希釈液の各有機酸含有量の計算値を Table 5 に示す。

トマト製品に含まれているこれらの有機酸が増殖制御因子であると仮定すると、1) 有機酸のいずれかが単独で増殖制御因子として機能している場合、2) 有機酸が共存することで増殖制御因子として機能している場合、の2つの可能性が考えられる。これらを検証するために、RI 8.0・pH 4.6 調整培地に各有機酸を単独、または2種類同時に添加して 3.1 と 3.2 と同一の増殖確認試験を実施した。なお、RI を 8.0 に調整した理由は、トマト製品では増殖が認められなかったが、mTGC では増殖が認められた条件であるため、トマト製品中の有機酸のいずれが増殖制御因子として機能しているかを確認する上で最適の条件と考えられたからである。

3.4 有機酸添加 RI 8.0・pH 4.6 調整培地に対する *Thermoanaerobacterium* 属の増殖リスク

2.1.4 で記した有機酸添加 RI 8.0・pH 4.6 調整培地について、*Thermoanaerobacterium* 属の混合菌液 (混合菌液濃度: 1.1×10² cfu/g) を接種し、嫌気下で 55℃、

Table 5 Contents of organic acids in tomato paste and its dilutions.

Sample	RI	Content (%)		
		Citric acid	Malic acid	Pyroglutamic acid
tomato paste dilution	6.5	0.42	0.07	0.23
tomato paste dilution	8.0	0.52	0.09	0.29
tomato paste dilution	19.5	1.27	0.21	0.70
tomato paste	28.0	1.83	0.30	1.00

The contents in the tomato paste are analytical values while those in the dilutions are the calculated ones based on those of the tomato paste.

Table 6 The bacterial counts in the organic acid-added media inoculated with mixed *Thermoanaerobacterium* suspensions.

Organic acid	Content (%)	Bacterial count(cfu/g)		Content (%)	Bacterial count(cfu/g)		Content (%)	Bacterial count(cfu/g)	
		>1.0×10 ³ *	0.52		>1.0×10 ³ *	0.21		>1.0×10 ³ *	1.00
Single addition	Citric acid	0.42	>1.0×10 ³ *	0.52	7.0×10 ⁻¹	1.27	1.1×10	1.83	4.0×10 ⁻¹
	Malic acid	0.07	>1.0×10 ³ *	0.09	>1.0×10 ³ *	0.21	>1.0×10 ³ *	0.30	7.0×10 ⁻¹
	Pyroglutamic acid	0.23	>1.0×10 ³ *	0.29	>1.0×10 ³ *	0.70	>1.0×10 ³ *	1.00	1.2×10 ⁵ *
Mixed addition	Citric acid	0.42	1.6×10 ⁴ *	0.52	1.1×10	1.27	4.5×10 ⁻¹	1.83	4.5×10 ⁻¹
	Malic acid	0.07	1.6×10 ⁴ *	0.09	1.1×10	0.21	4.5×10 ⁻¹	0.30	4.5×10 ⁻¹
	Citric acid	0.42	>1.0×10 ³ *	0.52	6.0×10 ⁻¹	1.27	7.5×10 ⁻¹	1.83	1.5×10
	Pyroglutamic acid	0.23	>1.0×10 ³ *	0.29	6.0×10 ⁻¹	0.70	7.5×10 ⁻¹	1.00	1.5×10
	Malic acid	0.07	>1.0×10 ⁴ *	0.09	>1.0×10 ⁴ *	0.21	1.4×10 ³ *	0.30	6.6×10
	Pyroglutamic acid	0.23	>1.0×10 ⁴ *	0.29	>1.0×10 ⁴ *	0.70	1.4×10 ³ *	1.00	6.6×10

The bacterial counts are the maximum values during one-week incubation.

*: classified as proliferated in test.

約1週間培養した。培養中、約3日ごとに計2回、増殖を確認するために菌数測定を実施した。その結果をTable 6に示す。有機酸添加 RI 8.0・pH 4.6調整培地において、単独での添加では、クエン酸0.42%、リンゴ酸0.07~0.21%、ピログルタミン酸0.23~1.00%の範囲で、1.0×10³ cfu/g以上の菌が検出され、接種した菌数よりも増加しており、増殖が確認された。また、2種類同時の添加では、クエン酸0.42%+リンゴ酸0.07%、クエン酸0.42%+ピログルタミン酸0.23%、リンゴ酸0.07~0.21%+ピログルタミン酸0.23~0.70%の範囲で、1.0×10³ cfu/g以上の菌が検出され、接種した菌数よりも増加しており、増殖が確認された。一方、有機酸の単独と2種類同時添加のいずれも、クエン酸が0.52%以上含有されている場合は、接種した菌数以上の菌は検出されず、増殖が確認されなかった。また、単独でリンゴ酸を0.30%添加した場合も、接種した菌数以上の菌は検出されず、増殖が確認されなかった。

RI 8.0・pH 4.6調整培地にトマトペースト希釈液 (RI 8.0) に含まれているクエン酸 (0.52%, Table 5) と等量以上のクエン酸を添加することで増殖が制御されたことから、クエン酸は単独制御因子として機能することがわかった。よって、クエン酸0.52%以上含有されている製品であれば、トマト製品でなくとも *Thermoanaero-*

bacterium 属が増殖しないことが示唆された。

また、RI 8.0・pH 4.6調整培地に、トマトペースト希釈液 (RI 8.0) に含まれているリンゴ酸 (0.09%, Table 5) およびピログルタミン酸 (0.29%, Table 5) をそれぞれ単独で等量添加しても、増殖が制御できていないことから、リンゴ酸とピログルタミン酸は単独制御因子ではないことがわかった。ただし、リンゴ酸に関してはトマト製品における単独制御因子ではないものの、培地中の含有量が0.30%以上であれば、増殖が制御されていることから、リンゴ酸0.30%以上含有されている製品であれば、*Thermoanaerobacterium* 属が増殖しないことが示唆された。

次に、有機酸が共存することで増殖を制御しているかについて検討を行った。クエン酸に関しては、0.52%以上存在する場合は単独制御因子として機能するため、0.52%未満の領域で共存効果を確認した。その結果、クエン酸0.42%+リンゴ酸0.07%、クエン酸0.42%+ピログルタミン酸0.23%のどちらも増殖が確認されたため、共存効果はないことがわかった。また、リンゴ酸とピログルタミン酸の共存効果に関しては、リンゴ酸が0.30%以上で増殖制御機能をもつことから、0.30%未満の領域で共存効果を確認した。その結果、リンゴ酸0.21%+ピログルタミン酸0.70%で増殖が確認され

たため、共存効果はないことがわかった。

4. 結 論

RIの異なるトマト製品8種類を対象に、pH 4.2~4.6の範囲で *Thermoanaerobacterium* 属の増殖リスクを調べたところ、RI 8.0以上かつpH 4.6以下のトマト製品では、増殖しなかった。その要因として、1) 高いRI環境条件による増殖制御、2) トマト由来成分による増殖制御、の2つの仮説を立てた。

この仮説を検証するために、トマト製品の代わりに *Thermoanaerobacterium* 属で汎用される培地であるmTGCのRIとpHを調整し、*Thermoanaerobacterium* 属の増殖リスクを調べたところ、RI 19.5以上かつpH 4.6以下の培地条件では増殖しなかった。すなわち、RIは本菌の生育に大きな影響を及ぼす因子のひとつであり、RI 19.5以上かつpH 4.6以下の製品条件であれば、トマト由来の製品でなくても *Thermoanaerobacterium* 属の増殖リスクは低いことが示唆された。また、RI 8.0のmTGCで増殖が確認されたのに対して、同じRI 8.0でもトマト製品では増殖が確認されていない。これは、RIは単独では必ずしも十分な増殖制御因子ではなく、トマト由来成分が *Thermoanaerobacterium* 属の増殖を制御していることを示唆している。

トマト由来の増殖制御因子を特定する上で、抗菌性のある有機酸に着目し、トマトペーストに含まれている3種類の有機酸分析を実施したところ、トマトペースト希釈液(RI 8.0)の有機酸含有率(%)は、クエン酸0.52%、リンゴ酸0.09%、ピログルタミン酸0.29%であった。この結果を基に、RI 8.0・pH 4.6調整培地に各有機酸を単独または2種類同時に添加し、*Thermoanaerobacterium* 属の増殖リスクを調べたところ、クエン酸が0.52%以上含まれていると、増殖が制御されており、クエン酸が単独制御因子として機能していることがわかった。これは、クエン酸0.52%以上含有されている製品であれば、トマト製品でなくても *Thermoanaerobacterium* 属の増殖リスクが低いことを示唆している。リンゴ酸とピログルタミン酸は単独制御因子ではなかったが、リンゴ酸が0.30%以上含まれていると、増殖がみられなかったことから、リンゴ酸0.30%以上含有されている製品であれば、*Thermoanaerobacterium* 属の増殖リスクが低いことが示唆された。また、3種類の有機酸に共存効果は確認されなかった。

今回、トマト製品における *Thermoanaerobacterium* 属の増殖リスクを調査し、同時に、クエン酸が *Thermoanaerobacterium* 属の単独制御因子として機能している可能性を明らかにした。今後、トマト製品以外の原料や製品に関しても *Thermoanaerobacterium* 属の増殖リスクを調査し、RIや有機酸以外の増殖制御因

子を探索することで、*Thermoanaerobacterium* 属の制御方法の知見がより深まっていくと考えられる。

References

- 1) E. M. Becker, C. S. Pederson; The physiological characters of *Bacillus coagulans* (*Bacillus thermoacidurans*). J. Bacteriol., **59**, 717-725 (1950).
- 2) W. A. Gould; "Tomato production, processing and quality evaluation, second edition", Avi Pub. Co., 1983, p. 159.
- 3) T. Osada, C. Nakano, K. Ohtsubo; "Heat Sterilization Conditions to Ensure Commercial Sterility of Hot-Filling Tomato Juice" (in Japanese). Jpn. J. Food Eng., **16**, 145-152 (2015).
- 4) T. Osada, M. Takei; "Contamination by heat resistant bacterial spores during manufacturing process of fresh-squeezed canned tomato juice" (in Japanese). The Canners Journal, **88**, 733-743 (2009).
- 5) T. Osada; "Thermal resistant spore forming bacteria isolated from spoiled canned tomato juice manufactured by the of fresh-squeezed packing" (in Japanese). The Canners Journal, **88**, 727-732 (2009).
- 6) N. Matsuda, M. Komaki, R. Ichikawa, S. Gotoh; "Minimum growth temperature of *Clostridium thermosaccharolyticum*" (in Japanese). Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, **32**, 565-567 (1985).
- 7) M. Komaki, R. Ichikawa, N. Matsuda; "Sporulation medium for *Clostridium thermosaccharolyticum*" (in Japanese). The Canners Journal, **70**, 990-997 (1991).
- 8) Y. Yamamoto, K. Higashi, H. Yoshi; "Inhibitory activity of organic acids on food spoilage bacteria" (in Japanese). Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, **31**, 525-530 (1984).
- 9) The Subdivision on Resources, The Council for Science and Technology, Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan; "Standard Tables of Food Composition in Japan-2020-(Eighth Revised Edition)" (in Japanese), Tokyo, Japan, 2020.
- 10) I. Schröder, K. Eichner; "Changes in chemical composition of tomatoes during processing" (in German). Eur. Food Res. Technol., **202**, 474-480 (1996).

URLs cited

- i) <https://www.fao.org/faostat/en/>

要 旨

本報では、これまでの研究で明らかにされていない、トマトジュース以外のトマト製品における *Thermoanaero-*

bacterium 属の増殖リスクを調査した。その結果、トマト製品の RI (可溶性固形分濃度の指標としての屈折率) が 8.0 以上かつ pH 4.2 以上 4.6 以下の範囲では増殖しなかった。そのため、RI および pH を調整した変法 TGC 培地を用いて、pH 4.2 以上 4.6 以下の範囲における *Thermoanaerobacterium* 属の増殖リスクを調査したところ、RI 8.0 では増殖し、RI 19.5 以上であれば増殖しなかった。これらの結果より、トマト製品における *Thermoanaerobacterium* 属の増殖制御因子は RI 以外に

も存在することが示唆されたため、トマト製品に含有する有機酸であるクエン酸、リンゴ酸、ピログルタミン酸を変法 TGC 培地に添加して、*Thermoanaerobacterium* 属の増殖リスクを調査した。その結果、クエン酸が単独で 0.52% 以上含有されると増殖せず、また有機酸同士の共存効果は確認されなかった。以上の結果から、トマト製品中においては、クエン酸が *Thermoanaerobacterium* 属の増殖制御に寄与していることが示唆された。