かん詰食品への抗生物質の利用

第2報 ナイシンの微生物学的定量法

(昭和42年9月16日受理)

田 中 昭 二* 小 野 輝 昭*
松 田 典 彦* 宮 井 久 子*

Application of Antibiotics to Canned Food

II. Microbiological Assay of Nisin

Shoji TANAKA, Teruaki ONO, Norihiko MATSUDA and Hisako MIYAI

(Laboratory of the Canners Association of Japan:
460 Kariba-cho, Hodogaya-ku, Yokohama)

A vertical diffusion method for quantitative analysis of Nisin in canned food was discussed. *Bacillus stearothermophilus* IAM 1035 was used as test organisms for this study.

Results obtained may be summarized as follows:

1. Dispense 9 ml of nutrient agar (meat extract 0.5%, Polypeptone 1.0%, NaCl 0.5%, Agar-agar 1.5%, pH 7.0) in sterile 16 mm×160 mm cotton-stoppered tubes. Sterilize in an autoclave for 15 minutes at 121°C.
2. Spore suspensions of *B. stearothermophilus* are prepared in nutrient agar slants with incubation at 55°C for five to seven days until 80 per cent or more cells are in the spore state. Spores are suspended in sterile saline to give the desired concentration ($6 \times 10^6 \sim 6 \times 10^5$ /ml), and heat-shocked for 10 minutes at 80°C before putting them into the test media.
3. An one ml portion of spore suspension is added to the test media which have been melted in water bath. After thoroughly mixing, the media are dispensed in sterile 5 mm×75 mm cotton-stoppered tubes and solidified at vertical position in cold water.
4. The sample adjusted to pH 6.0 was stratified on the agar media and stored for 120 minutes at 30°C.
5. After incubation for 18 hours at 55°C, the length of inhibited zone is measured through a projector (×20) and read at the level of 0.01 mm. The concentration of Nisin is obtained from the standard curve.

(Received September 16, 1967)

日常における抗生物質の定量法としては、実用的な立場からみると感度がよく、回収率が高くかつ誤差のすくない方法であると同時に分析手段としての簡便さが要求される。ナイシン (Nisin) の定量法に関しては従来ペーパークロマトグラフ法¹⁾、レサズリン法²⁾、その他希釈拡散法³⁾⁴⁾などが提唱されているが、それぞれ一長一短があり目的に応じて使い分けられなければならない。本実験においてはかん詰食品からの回収を目的とした定量法と

* 社団法人 日本缶詰協会研究所：横浜市保土ヶ谷区狩場町 460

して *Bacillus stearothermophilus* を用いた垂直拡散法 (重層法) について、その測定条件の検討を行なったのでここに報告する。

実験および結果

[予備実験] 検定菌と定量法の選択

まず検定菌を選択するために、当研究所保存菌株中 *Clostridium* 属10株、*Bacillus* 属30株について孢子の発芽能力やナイシン感受性について検討したところ孢子の発芽率がよく、またナイシンに対して敏感に反応する *Bacillus stearothermophilus* IAM 1035 を検定菌として

採用した。なお、検定菌としての *B. stearothermophilus* の利点は、本菌胞子が 80~100° 程度の熱処理ではほとんど影響されず、発育適温が 55° 付近にあるところから操作中に混入した雑菌によるスポイルを防止できることにある。

つぎに、定量法を選定するために本菌株を用いて円筒平板法、口紙平板法ならびに重層法について比較試験を行なった結果、操作が簡便で、検定用培地や試料が少量で済み、感度が良好な重層法をナイシンの定量法として採用することにした。

重層法の測定要領はつぎのごとくである。

1. あらかじめ検定用寒天培地を 9 ml ずつ中試験管に分注し、121°, 15分間高压滅菌しておく。
2. 測定に当たってこの培地を水浴で溶かし、これに滅菌生理食塩水に懸濁させた検定菌胞子液 1 ml を加え、十分攪拌したのち 5φ×75 mm の滅菌小試験管に分注し、冷水中で垂直状態に固化させる。
3. この凝固した検定用寒天培地上に試料を重層し、一定時間放置したのち 55°, 18~24 時間培養し、その阻止帯の長さを透影機で 20 倍に拡大し、0.01 mm の点まで測定する。

[実験 1] 検定用培地の寒天濃度の検討

条 件

基礎培地: 普通ブイヨン (肉エキス 0.5%, ペプトン 1.0%, 食塩 0.5%, pH 7.0)

寒天濃度: 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0%

胞子濃度: 2.3×10^6 /ml

ナイシン液: 100 u/ml のナイシンを含む Sørensen リン酸緩衝液 (pH 6.0)。

結 果

一元配置法による変量分析の結果、寒天濃度の違いが

第 1-a 表 検定用培地中の寒天濃度が阻止帯の長さに及ぼす影響

寒 天 濃 度 (%)				
1.00	1.25	1.50	1.75	2.00
595*	582	651	589	514
638	698	620	538	571
601	620	626	566	591
674	603	612	591	566
592	619	657	562	542
731	677	588	605	490
724	643	606	608	590
690	685	597	652	633
699	568	635	610	610
687	620	653	636	605

* 単位は 1/100 mm, 同一試料につき 12 個の測定値を得、最大値と最小値は捨て、10 個の測定値をとった。

第 1-b 表 寒天濃度の変量分析結果

要 因	変 動	自 由 度	不偏分散	分 散 比
寒天濃度	49428.4	4	12357.1	7.287**
誤 差	76301.6	45	1695.6	
全 体	125730.0	49	$F_{45}^4 = \frac{2.58 \cdots *}{3.77 \cdots **}$	

第 1-c 表 寒天濃度間の有意差の検定

寒天濃度	2.00%	1.75%	1.50%	1.25%
1.00%	**	**	—	—
1.25%	*	—	—	—
1.50%	*	—	—	—
1.75%	—	—	—	—

* 危険率 5% で有意差があると認められるもの

** 危険率 1% で有意差があると認められるもの

— 有意差が認められないもの

阻止帯の長さに影響していることがわかった (第 1-a, 1-b 表)。そこで各濃度間の有意差を検定したところ第 1-c 表に示すように 1.75% と 1.0%, 2.0% と 1.5%, 1.25%, 1.0% の間に有意差が認められた。

以上の結果から検定用培地の寒天濃度としては影響を及ぼさない濃度範囲として 1.5% を採用することとした。

[実験 2] 胞子濃度の検討

条 件

胞子の形成: *B. stearothermophilus* IAM 1035 を保存斜面から普通ブイヨン (肉エキス 0.5%, ポリペプトン 1.0%, 食塩 0.5%, pH 7.0) に植え継ぎ、100°, 2~3 分加熱急冷後 55° で 18 時間培養した新鮮培養液を胞子形成寒天培地 (0.05% グルコースと 30 ppm $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を含む pH 7.0 の普通寒天斜面) に移し、55°, 7 日間培養した。

胞子濃度: 6.0×10^6 , 3.0×10^6 , 1.2×10^6 , 6.0×10^5 /ml (滅菌生理食塩水に懸濁)

ナイシン液: 10 u/ml のナイシンを含む pH 6.0 の Sørensen リン酸緩衝液。

結 果

一元配置法による変量分析の結果 $6 \times 10^6 \sim 6 \times 10^5$ /ml の濃度範囲では 10 u/ml 濃度のナイシンの定量値に影響が認められなかった (第 2-a, 2-b 表)。

[実験 3] 被検液の pH の検討

条 件

被検液: 100 u/ml のナイシンを含む pH 5.0, 5.5, 6.0, 7.0 の Sørensen リン酸緩衝液

胞子濃度: 2.4×10^6 /ml

第2-a表 検定用孢子懸濁液の孢子濃度が阻止帯の長さ
に及ぼす影響

孢子濃度 (個/ml)			
6.0×10^6	3.0×10^6	1.2×10^6	6.0×10^5
639*	636	632	648
619	638	618	634
644	616	648	635
616	628	642	636
611	627	636	619
619	621	621	638
629	638	630	621
622	634	623	629
627	611	625	630
638	627	619	627

* 単位は 1/100 mm

第2-b表 孢子濃度の変量分析結果

要 因	変 動	自 由 度	不偏分散	分 散 比
孢子濃度	174.6	3	58.2	0.60
誤 差	3491.8	36	97.0	
全 体	3666.4	39	$F_{30}^3 = \frac{2.86 \dots *}{4.38 \dots **}$	

第3-a表 ナイシン被検液の pH が阻止帯の長さ
に及ぼす影響

pH			
5.0	5.5	6.0	7.0
722*	675	708	633
711	666	702	666
749	669	666	679
723	694	709	670
308	685	649	684
772	697	666	665
724	668	662	675
730	684	680	656
721	696	655	663
722	710	649	656

* 単位は 1/100 mm

結 果

一元配置法による要因分析の結果 pH 5.0~7.0 の範囲で pH 値の相違が阻止帯の長さに影響していることがわかった。そこで pH 値間の差を検定したところ、5.5, 5.0, 7.0 の間に有意差が認められた。なお、pH 5.0 の場合 pH 値そのものの影響と思われるが、5.5~7.0 に比べ阻止帯の長さは長い。輪かくが不明りょうで測定が困難であった (第 3-a, 3-b, 3-c 表)。

第3-b表 pH 値の変量分析結果

要 因	変 動	自 由 度	不偏分散	分 散 比
pH 値	23514.5	3	7838.2	23.21**
誤 差	12158.5	36	337.7	
全 体	35673.0	39	$F_{30}^3 = \frac{2.86 \dots *}{4.38 \dots **}$	

第3-c表 pH 値間の有意差の検定

pH	7.0	6.0	5.5
5.0	**	**	**
5.5	—	—	
6.0	—	—	

以上の結果から被検液の pH 値として、ナイシンの安定性を考慮し、比較的 pH の修正が施しやすい 6.0 を採用することにした。

【実験 4】 ナイシン溶媒の検討

ナイシンは中性からアルカリ性の溶液では溶けにくい (pH 5.6 で 1,000 $\mu\text{g/ml}$, pH 4.2 で 12,000 $\mu\text{g/ml}$)、pH 2.0~4.0 で最も安定といわれている。この意味から通常ナイシンの溶媒としては 0.02 N の塩酸溶液が推奨されているが、本溶媒では定量時における pH の修正がむずかしく、操作上不便を感じる場合が多い。したがって、本実験では溶媒として 0.02 N 塩酸溶液を使った場合と、pH 6.0 の Sørensen リン酸緩衝液を使った場合の阻止帯の長さならびにロ紙ろ過による回収率について検討してみた。

方 法

第 1 図に示すように滅菌蒸留水 (pH 6.0) で 10,000 u/ml 濃度のナイシン原液を調製し、これを 0.02 N 塩酸溶液と Sørensen リン酸緩衝液でそれぞれ 100 u/ml 濃度にて 10 倍希釈し、最終 pH を 6.0 に修正してナイシンの定量を行なった。なお、定量試験に当たって被検液を 2 区に分け、一方はそのまま他方はろ液 (東洋ロ紙 No. 2) を使用した。

結 果

要因分析の結果、非ろ過、ろ過とも溶媒の相違による有意差はなかったが、非ろ過とろ過については両者間に有意差があることがわかった。そこで、0.02 N 塩酸溶液のみで調製しろ過しないもの、pH 修正後ろ過したものおよびろ過後 pH を修正したものについて因子間の差を検定してみると、それぞれの間に有意差が認められた。すなわち、溶媒の違いは阻止帯の長さにはほとんど影響を及ぼさないが、ロ紙によるろ過は回収率を著しく低下させ、またろ過前に pH を修正したものは、ろ過後 pH を修正したものにくらべ回収率がよかった (第 4-a, 4-b, 4-c, 4-d, 4-e 表)。

* pH は 6.0 に修正

** 東洋ロ紙製 No. 2 でろ過

第 1 図 ナイシン被検液の調製法

第 4-a 表 ナイシン被検液の調製方法が阻止帯の長さに及ぼす影響

ナイシン被検液の調製方法						
A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	C-1	C-2
750*	566	587	719	534	720	526
762	539	625	708	584	807	545
743	561	614	760	560	775	536
685	557	534	734	536	749	557
691	571	562	772	590	761	558
732	523	625	747	499	718	490
682	560	636	734	572	733	548
741	506	622	748	597	740	521
742	484	529	741	558	779	532
741	558	643	774	595	763	514

* 単位は 1/100 mm

第 4-b 表 非ろ過区の溶媒の要因分析結果

要 因	変 動	自 由 度	不偏分散	分 散 比
希 釈 液	3868.8	2	1934.4	2.76
誤 差	18947.5	27	701.8	
全 体	22816.3	29	$F_{27}^2 = \frac{3.35 \cdots *}{5.49 \cdots **}$	

第 4-c 表 ろ過区の溶媒の要因分析

要 因	変 動	自 由 度	不偏分散	分 散 比
希 釈 液	4613.6	2	2306.8	3.01
誤 差	20721.1	27	767.5	
全 体	25334.7	29		

第 4-d 表 ろ過区・非ろ過区間の要因分析結果

要 因	変 動	自 由 度	不偏分散	分 散 比
ろ 過	179143.5	2	89571.7	77.07**
誤 差	31379.5	27	1162.2	
全 体	210523.0	29		

第 4-e 表 ろ過・非ろ過区間の有意差の検定

ろ 過 法	非 ろ 過	pH 修正後ろ過
ろ過後 pH 修正	* *	* *
pH 修正後ろ過	* *	

[実験 5] 放置条件の検討

検定用培地に試料を重層し、これを 55° に培養するまでの放置条件とナイシンの回収率の関係をみるために下記の条件にしたがって実験した。なお放置温度を 30° だけにしたのは検定菌の発育に影響せずかつ夏季に調節可能な温度だからである。

条 件

ナイシン液: 100 u/ml のナイシンを含む pH 6.0 の Sørensen リン酸緩衝液

孢子濃度: 2.4×10^6 /ml

放置温度: 30°

放置時間: 30, 60, 90, 120, 150分

放置方法: 30° に所定時間放置したのち、一方はそのまま 55° に培養し(常法区)、他方は放置後ナイシン液を取り除き、すばやく滅菌水を表面に流して洗い、代りに滅菌流動パラフィンを重層し 55° に培養した。

結 果

一元配置法による変量分析の結果、常法区において放

第5-a表 検定用培地に被検液を重層したのちの放置時間が阻止帯の長さに及ぼす影響

放 置 時 間 (分)

30	60	90	120	150
531*(486)	525(534)	552(569)	553(552)	564(543)
549(476)	529(517)	528(541)	532(558)	554(579)
552(497)	523(557)	552(553)	556(552)	584(610)
548(508)	556(509)	516(578)	588(546)	590(578)
559(458)	549(525)	559(523)	531(559)	573(573)
546(489)	564(485)	533(519)	562(583)	581(520)
515(484)	530(526)	555(554)	558(555)	548(595)
550(467)	559(516)	563(519)	580(570)	580(559)
535(459)	562(521)	524(552)	581(534)	564(533)
524(468)	519(529)	555(548)	557(555)	566(603)

() はパラフィンを重層したときの阻止帯の長さ

* 単位は 1/100 mm

第5-b表 放置時間の変量分析結果

要 因	変 動	自 由 度	不偏分散	分 散 比
放置時間	6970.7	4	1742.7	6.44**
誤 差	12173.4	45	270.5	
全 体	19144.1	49	$F_{45}^4 = \frac{2.58}{3.77}$	

第5-c表 放置時間間の有意差の検定

放置時間	150 分	120 分	90 分	60 分
30 分	* *	—	—	—
60 分	* *	—	—	—
90 分	* *	—	—	—
120 分	—	—	—	—

第5-d表 流動パラフィンを重層するものとの間の有意差の検定

放置時間	30 分	60 分	90 分	120 分	150 分
F_0	1228.03**	106.035**	0.9704	3.50	0.2585

$$F_{18}^{-1}(0.05) = 4.41 \quad F_{18}^{-1}(0.01) = 8.28$$

置時間の違いによる影響が認められたので、各時間ごとの有意差を検定した結果30分と150分、60分と150分、90分と150分の間に有意差が認められた。

つぎにナイシン液を重層してそのまま培養する常法区と流動パラフィンを代りに重層する方法については30分と60分放置区で両者間に有意差が認められた。すなわち、30分や60分の放置区ではナイシン液を取り除き流動パラフィンを重層したものに比べナイシン液を重層した

まま培養した方が回収率が高かった。

以上の結果から、放置条件としては他の時間との間に有意差が認められず、かつ年間を通じて気温にほとんど左右されない30°, 120分を採用することとした。

摘 要

かん詰食品中のナイシンの微生物学的定量法として垂直拡散法について検討した結果、つぎのごとき定量手順を確立した。

1. 検定用培地として普通寒天培地 (肉エキス 0.5%, ポリペプトン 1.0%, NaCl 0.5%, 寒天 1.5%, pH 7.0) を使用し, 9 ml ずつ中試験管に分注, 121°, 15 分間高圧滅菌する。
2. 検定用培地を加温溶解し, あらかじめ調製した *B. stearothermophilus* IAM 1035 の孢子懸濁液 ($6 \times 10^6 \sim 6 \times 10^5$ /ml) 1 ml を加え, 十分攪拌したのち 5 φ

第2図 ナイシンの標準曲線

× 75 mm の滅菌小試験管にすばやく分注し(約 0.7 ml), 冷水中で高層にかためる。

3. 高層にかためた検定用培地上にあらかじめ pH を 6.0に修正した試料約 0.3 ml を重層し, 30°, 120 分間放置したのち, 55°, 18~24時間培養する。
4. 培養終了後形成された阻止帯の長さを透影機にかけ, 20倍の倍率で 0.01 mm まで読みとる。
5. 読みとった測定値(10本の平均値)から標準曲線を利用して未知濃度を算出する。

なお, 以上の手順にしたがって pH 6.0 の Sørensen リン酸緩衝液を用いて求めたナイシンの標準曲線を第 2

図に示した。

終わりに本研究に当たってナイシンの提供をいただいた日本オルガノ商会に深謝する。

文 献

- 1) N. Snell et al.: J. Appl. Microbiol. 4, 13 (1956).
- 2) Friedmann, C. Epstein: J. Gen. Microbiol. 5, 830 (1951).
- 3) C.R. Stumbo et al.: J. Food Sci. 29, 6 (1964).
- 4) J. Tramer, G. G. Fowler: J. Sci. Food Agric. 15, 8 (1964).