

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5397991号
(P5397991)

(45) 発行日 平成26年1月22日(2014.1.22)

(24) 登録日 平成25年11月1日(2013.11.1)

(51) Int. Cl. F 1
C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02 Z N A
 C 1 2 N 1/20 (2006.01) C 1 2 N 1/20 A
 C 1 2 R 1/225 (2006.01) C 1 2 Q 1/02 Z N A
 C 1 2 R 1:225

請求項の数 3 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2009-89635 (P2009-89635)	(73) 特許権者	598096991
(22) 出願日	平成21年4月1日(2009.4.1)		学校法人東京農業大学
(65) 公開番号	特開2010-239874 (P2010-239874A)		東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号
(43) 公開日	平成22年10月28日(2010.10.28)	(74) 代理人	100122574
審査請求日	平成24年3月26日(2012.3.26)		弁理士 吉永 貴大
微生物の受託番号	NPMD NITE P-726	(72) 発明者	岡田 早苗
微生物の受託番号	NPMD NITE P-727		東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号 東京
微生物の受託番号	NPMD NITE P-728		農業大学内
微生物の受託番号	NPMD NITE P-729	(72) 発明者	田中 尚人
			東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号 東京
			農業大学内
		審査官	鶴 剛史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳酸菌を用いたビタミンB₁₂の定量方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

乳酸菌を使用して試料中のビタミンB₁₂を定量する方法において、
 前記乳酸菌として、ラクトバシルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ(Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii)を使用することを特徴とする、
 ビタミンB₁₂の定量方法。

【請求項2】

前記乳酸菌が、ラクトバシルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ(Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii) NRIC 0700株(受託番号:NITE P-726)、NRIC 0705株(受託番号:NITE P-727)、NRIC 0755株(受託番号:NITE P-728)、NRIC 0756株(受託番号:NITE P-729)からなる群から選択された1種の乳酸菌であることを特徴とする、

請求項1に記載のビタミンB₁₂の定量方法。

【請求項3】

前記試料を、水と、酢酸緩衝液、シアン化カリウム溶液で処理する工程を含む請求項1又は2に記載のビタミンB₁₂の定量方法であって、

前記酢酸緩衝液として、0.1mol/l酢酸緩衝液を使用することを特徴とする、請求項1又は2に記載のビタミンB₁₂の定量方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ビタミンB₁₂のバイオアッセイに適用可能な乳酸菌を用いたビタミンB₁₂の定量方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ビタミンB₁₂は、我々ヒトを含めたすべての動物や一部の細菌、藻類が必要とする必須栄養素であり、生体内においてビタミンB₁₂はメチル基の転位といった分子内転位反応の補酵素として重要な反応に関与している。供給源としては牛のレバー・貝類・青魚・乳製品・卵などの動物性食品が挙げられ、植物質中にはほとんど存在しないとされるため、菜食主義者にビタミンB₁₂の欠乏症が多く、欠乏症としては、悪性貧血が挙げられる。この悪性貧血は骨髄による血球細胞の生産が減少し、致命的になる可能性もあり、悪性貧血から神経疾患をも引き起こすこともある。このような欠乏症を防止するために、食品におけるビタミンB₁₂の含有量を知り、栄養管理に役立てることが非常に重要である。

10

【0003】

微量成分であるビタミンB₁₂の定量法は、乳酸菌による微生物定量法、いわゆるバイオアッセイが、公的に認められた定量法として利用されており、日本食品標準成分表分析マニュアルにも記載されている。そして、指示菌として指定されている乳酸菌は、ラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830 (分類学上は *L. delbrueckii* subsp. *lactis*) である (非特許文献1)。

20

【0004】

また、特表2008-507964号公報には、200~500mMトレハロース/スクロースを含有する凍結溶液中で-80℃で急速凍結され、それから凍結乾燥された微生物が入った微小滴定プレートを使用して、ビタミンB₁₂などの物質を微生物学的に定量する方法が開示されており、前記微生物として *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* が使用されている (特許文献1)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特表2008-507964号公報

30

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会編，「五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル」，国立印刷局，2005年3月22日

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

バイオアッセイに使用される他の定量用微生物としては原虫や大腸菌変異株などがあるが、それぞれ操作の煩雑さや低特異性等といった点で問題がある。機器分析が発達した現在ではHPLC法、放射性同位体希釈定量法、化学発光免疫測定法なども用いられるが、感度の不足や実験操作の難しさ、特殊な施設・設備を要するなどの問題点がある。

40

【0008】

しかし、バイオアッセイによるビタミンB₁₂の定量法は感度や簡便性に優れているが、検量線の安定性が十分でないという問題が以前から指摘されていた。この原因として、指示菌として指定されているラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830 (*L. delbrueckii* subsp. *lactis*) の生育がビタミンB₁₂ 制限下の合成培地中で安定せず、ビタミンB₁₂ 消費が菌の生育量へ正確に反映されていないことが考えられる。

【0009】

この問題を解決するために過去に様々検討されてきたが、いまだ解決には至っていない。乳酸菌の中にはまだビタミンB₁₂を要求するものが多くあるのでその中から新たな指示

50

菌を見つけるのも解決策のひとつではないかと考えられる。

【0010】

そこで本発明は、安定した検量線を作成するためにラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830株より優れた株を探索し、より安定したビタミンB₁₂定量法を確立することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、供試菌株としてラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830株に相当する乳酸菌を漬物から分離し、分離した乳酸菌についてビタミンB₁₂ 定量用培地とシアノコバラミンを用いる常法により要求性を調べたところ、分離した乳酸菌はビタミンB₁₂の要求性が高く、かつ生育がビタミンB₁₂濃度に依存的である乳酸菌であることが判明した。そこで、分離した乳酸菌の検量線の精度や再現性、さらに添加回収試験により確度を検討したところ、日本食品標準成分表分析マニュアルで指定されている濃度範囲でラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830株よりも検量線が安定しており、精度が高いとの知見を得た。

10

【0012】

本発明はかかる知見に基づくものであり、乳酸菌を使用してビタミンB₁₂を定量するためのビタミンB₁₂定量用乳酸菌であって、前記乳酸菌が、ラクトバチルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) であることを特徴とする、ビタミンB₁₂定量用乳酸菌を提供するものである。

20

【0013】

また、本発明は、乳酸菌を使用するビタミンB₁₂の定量方法において、前記乳酸菌として、ラクトバチルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) を使用することを特徴とする、ビタミンB₁₂の定量方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0014】

本発明のビタミンB₁₂の定量方法によれば、従来ビタミンB₁₂のバイオアッセイ法の指示菌として使用されているラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830株と比較して、検量線が安定して精度が高いビタミンB₁₂の定量が可能となる。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】ATCC 7830株(上段)とNRIC 0700株(受託番号:NITE_P-726)(下段)の対応する塩基配列を比較した結果を示す図である。

【図2】本実施形態のビタミンB₁₂の定量方法に供される試料の調製方法の概要を説明した図である。

【図3】本実施形態のビタミンB₁₂の定量方法に使用される検量線の作成手順と試料のビタミンB₁₂量を定量する方法を説明した図である。

【図4】各乳酸菌のビタミンB₁₂の検量線を示す図である。

【図5】NRIC 0700株とNRIC 0755株の最適回帰モデルを検討した結果を示す図である。

40

【図6】NRIC 0705株とNRIC 0756株の最適回帰モデルを検討した結果を示す図である。

【図7】酢酸緩衝液の濃度を0.1mol/lとしたときの試料のビタミンB₁₂の回収率を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

1. ビタミンB₁₂定量用乳酸菌

本実施形態のビタミンB₁₂定量用乳酸菌は、ラクトバチルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) である。

【0017】

50

ラクトバシルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) の中でも、特にラクトバシルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) NRIC 0700株 (受託番号: NITE_P-726)、ラクトバシルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) NRIC 0705株 (受託番号: NITE_P-727)、ラクトバシルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) NRIC 0755株 (受託番号: NITE_P-728)、ラクトバシルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) NRIC 0756株 (受託番号: NITE_P-729) のいずれかを選択することが好ましい。

10

【0018】

これらの乳酸菌は、従来ビタミンB₁₂のバイオアッセイ法の指定菌として知られているラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830株と比較して、適切な検量線が得られるため、精度の高いビタミンB₁₂の定量を行うことができる。特に、ラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830株 (受託番号: NITE_P-726) については、ビタミンB₁₂のバイオアッセイ法の指定菌としての適格性に優れているため好ましい。

【0019】

現在、ビタミンB₁₂の指示菌として使用されているラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830は、分類学上はラクトバチルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・ラクティス (*L. delbrueckii* subsp. *lactis*) に分類されている。従って、ラクトバチルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) とは多くの類似点を有している。

20

【0020】

NRIC 0700株 (受託番号: NITE_P-726)、NRIC 0705株 (受託番号: NITE_P-727)、NRIC 0755株 (受託番号: NITE_P-728) 及びNRIC 0756株 (受託番号: NITE_P-729) の4株は、ATCC 7830株と比較して、形態学的性質、培養的性質、化学分類学的性質に関しては特に差異は認められない。但し、表1に示すように、生理学的性質において、生育温度範囲とラクトース発酵能が異なる。ラクトース発酵能については、上記4株がラクトース発酵能がないのに対して、ATCC 7830株は発酵能を有している。

30

【0021】

【表1】

供試菌株	生育の範囲 (pH)	生育の範囲 (温度)	lactose
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> NRIC 0700	4.5-8.5	20-50°C	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> NRIC 0705	4.0-8.5	30-55°C	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> NRIC 0756	4.5-8.5	30-50°C	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> NRIC 0755	4.5-8.5	30-50°C	-
<i>Lactobacillus leichmannii</i> ATCC 7830	データなし	データなし	+

40

【0022】

また、NRIC 0700株 (受託番号: NITE_P-726)、NRIC 0705株 (受託番号: NITE_P-727)、NRIC 0755株 (受託番号: NITE_P-728) 及びNRIC 0756株 (受託番号: NITE_P-729) の4株は、16S rDNA配列は全く同じである (配列番号: 1)。ATCC 7830株の16S rDNA配列 (配列番号: 2) と比較した場合、前記4株とATCC 7830株相同性は99.1%である。

【0023】

図1は、ATCC 7830株 (上段) とNRIC 0700株 (受託番号: NITE_P-726) (下段) の対応する塩基配列を比較した結果を示す図である。図中、黒く反転させた箇所の塩基が相違し

50

ていることを意味している。

【0024】

NRIC 0700株（受託番号：NITE_P-726）、NRIC 0705株（受託番号：NITE_P-727）、NRIC 0755株（受託番号：NITE_P-728）及びNRIC 0756株（受託番号：NITE_P-729）の培地は、公知の乳酸菌培地を使用することができ、培養条件も、生育温度以外については一般のラクトバチルス・デルブリュッキ（*Lactobacillus delbrueckii*）と同じ条件で培養することができる。

【0025】

2. ビタミンB₁₂の定量方法

(1) 試料の調製

図2は、本実施形態のビタミンB₁₂の定量方法に供される試料の調製方法の概要を説明した図である。ビタミンB₁₂の定量に供される試料の調製方法は、日本食品標準成分表の分析マニュアルに基づき実施することができる。

【0026】

すなわち、ビタミンB₁₂の定量を行う食品等の試料を採取し、そこに水、酢酸緩衝液及びシアン化カリウム溶液を添加した後、所定時間、煮沸抽出を行う。

【0027】

ここで、日本食品標準成分表の分析マニュアルによれば、酢酸緩衝液は0.57mol/l酢酸緩衝液を使用するが、0.57mol/l酢酸緩衝液にかえて0.1mol/l酢酸緩衝液を使用することが好ましい。発明者らが検討した結果、0.57mol/l酢酸緩衝液が後述するビタミンB₁₂用培地に持ち込まれることによって、供試菌株のビタミンB₁₂に対する確度に影響を及ぼすことが判明した。かかる場合に、0.57mol/l酢酸緩衝液にかえて0.1mol/l酢酸緩衝液を使用することで、ビタミンB₁₂の確度を高めることができる。

【0028】

煮沸抽出後、冷却し、そこにメタリン酸溶液を添加する。定容し濾過した後、ろ液を分取し、ビタミンB₁₂定量用試料と、アルカリ耐性因子定量用試料を調製する。

【0029】

(2) ビタミンB₁₂量の定量

図3は、本実施形態のビタミンB₁₂の定量方法に使用される検量線の作成手順と上記(1)で調製した試料のビタミンB₁₂量を定量する方法を説明した図である。ビタミンB₁₂量の定量は、日本食品標準成分表の分析マニュアルに基づき実施することができる。

【0030】

検量線の作成は、まず濃度を変えたビタミンB₁₂の標準液を調製し、ビタミンB₁₂を定量するための培地に加える。次に、ビタミンB₁₂の定量用乳酸菌を接種し、所定の条件で乳酸菌を培養する。乳酸菌としては、上記1で説明したビタミンB₁₂定量用乳酸菌を使用する。

【0031】

上記1で説明したビタミンB₁₂定量用乳酸菌を使用することにより、従来ビタミンB₁₂のバイオアッセイ法の指示菌として使用されているラクトバチルス・ライヒマニ（*Lactobacillus leichmannii*）ATCC 7830株と比較して、検量線が安定して精度が高いビタミンB₁₂の定量が可能となる。

【0032】

乳酸菌の培養後、吸光度を測定し、生育濁度を測定する。そして、ビタミンB₁₂濃度とそれに対応する吸光度の値に基づいて検量線を作成する。

【0033】

検量線を作成した後、上記(1)で調製したビタミンB₁₂定量用試料をビタミンB₁₂を定量用培地に加え、ビタミンB₁₂定量用乳酸菌を添加して培養し、吸光度で生育濁度を測定する。同様にして、上記(1)で調製したアルカリ耐性因子定量用試料についても実施する。そして、先に作成した検量線から濁度に対応するビタミンB₁₂量とアルカリ耐性因子量を算出する。

10

20

30

40

50

【0034】

最後に、ビタミンB₁₂量からアルカリ耐性因子量を引けば、試料中に含まれるビタミンB₁₂含量を算出することができる。

【実施例】

【0035】

1. 検量線の作成

(1) 供試菌株

ビタミンB₁₂定量用乳酸菌として、ラクトバシルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) NRIC 0700株 (受託番号: NITE_P-726)、NRIC 0705株 (受託番号: NITE_P-727)、NRIC 0755株 (受託番号: NITE_P-728)、NRIC 0756株 (受託番号: NITE_P-729) 及び従来ビタミンB₁₂のバイオアッセイ法の指定菌として知られているラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830株を使用した。

10

【0036】

(2) 保存方法

供試菌株を表2に示すトマト寒天培地に接種し、37℃、24時間培養後、1~2週間低温で保存した。

【0037】

【表2】

20

保存用トマト寒天培地 (100 ml)

Glucose	1.1 %
Peptone	0.85 % (w/v)
Yeast Extract	0.85 % (w/v)
KH ₂ PO ₄	0.2 % (w/v)
Tween 80*	1 ml
トマトジュース**	25 ml
agar	1.5 % (w/v)
CaCO ₃	0.5 % (w/v)

30

pH 6.8 121℃ 15分加圧滅菌

*Tween 80 50 mg/ml

**トマトジュース カゴメ製のトマトジュース (食塩無添加)

を遠心分離し、得られた上澄みをろ紙でろ過したものを-20℃で保存し、使用時に解凍して用いた。

【0038】

40

(3) 前培養

トマト寒天培地に保存した供試菌株を表3に示すトマト培地に接種し、37℃、24時間培養した。これを2回行った。

【0039】

【表 3】

トマト液体培地 (100 ml)	
Glucose	1.1 %
Peptone	0.85 %
Yeast Extract	0.85 %
KH ₂ PO ₄	0.2 %
Tween 80	1 ml
トマトジュース (ろ過済み)	25 ml

pH 6.8 121°C 15 分加圧滅菌

【 0 0 4 0 】

(4) 接種菌液の調製

トマト培地にて培養後、0.85 %の滅菌生理食塩水を用いて、菌体洗浄を2回行い、菌体量を一定にするため600 nmにおける透過率が80~90 %となるように希釈し、接種菌液とした。

【 0 0 4 1 】

(5) 本培地の調製

表 4 に示す組成からなるビタミンB₁₂ 定量用基礎培地 (pH 6.0) 1.25 ml にビタミンB₁₂ 標準液を加えて、必要に応じて蒸留水でフィルアップし、全量2.5 mlとした。その後、121 °C、5分間オートクレーブで滅菌したものを本培地とした。なお、ビタミンB₁₂ 標準液は、シアノコバラミン標準品を25% (v/v) エタノール溶液に溶かし、10 µg/mlの水溶液の361 nmの吸光度0.207を用いて希釈し、調製したものを使用した。

【 0 0 4 2 】

30

【表4】

	Component	Concentration (/medium 100 ml)	Amount of extraction (/medium 100 ml)	Concentrate solution
Carbon source	Glucose	4 g	—	—
Buffer	NaAc · 3H ₂ O	2 g	—	—
Minerals	K ₂ HPO ₄	100 mg	Salts A	50 mg/ml
	KH ₂ PO ₄	100 mg	2 ml	50 mg/ml
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	40 mg	Salts B	40 mg/ml
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	2 mg		2 mg/ml
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	2 mg		2 mg/ml
	NaCl	2 mg		2 mg/ml
Fatty acids	Tween80	200 mg	4 ml	50 mg/ml
Vitamins	Thiamin · HCl	100 µg	100 µl	1 mg/ml
	Riboflavin	100 µg	100 µl	1 mg/ml
	Biotin	1 µg	100 µl	10 µg/ml
	Nicotinic acid	200 µg	80 µl	2.5 mg/ml
	PABA	200 µg	200 µl	1 mg/ml
	Ca-pantothenate	100 µg	100 µl	1 mg/ml
	Pridoxine	400 µg	40 µl	10 mg/ml
	Pridoxal	400 µg	40 µl	10 mg/ml
	Pridoxamine	80 µg	8 µl	10 mg/ml
	Folic acid	20 µg	200 µl	100 µg/ml
	Ascorbic acid	400 mg	4 ml	100 mg/ml
Amino acids	Casamino Acids	1.5 g	—	—
	L-Aspartic acid	20 mg	5 ml	4 mg/ml
	L-Cystine	40 mg	4 ml	10 mg/ml
	L-Tryptophane	40 mg	4 ml	10 mg/ml
Bases	Adenine · SO ₄	2 mg	1 ml	2 mg/ml
	Guanine · HCl	2 mg	1 ml	2 mg/ml
	Uracil	2 mg	1 ml	2 mg/ml
	Xanthine	2 mg	1 ml	2 mg/ml

【0043】

(6) 本培養

上記(4)で調製した接種菌液20 µlを上記(5)で調製したビタミンB₁₂ 定量用基礎培地に接種し、37、24時間培養した。

【0044】

(7) 生育濁度の測定

吸光度計(LKB社製のNOVASPEC II)を使用して、600 nmの波長で上記(6)で得られた培養液中の生育濁度を測定した。対照として無接種培地の測定値を差し引き、各濃度における吸光度を求めた。

【0045】

10

20

30

40

50

(8) 検量線の作成

図4は、各乳酸菌のビタミンB₁₂の検量線を示す図である。R²は決定係数を意味し、値が1に近づくほど理論値に近い検量線であることを示す。図4に示すとおり、ラクトバチルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) NRIC 0700株 (受託番号: NITE_P-726)、NRIC 0705株 (受託番号: NITE_P-727)、NRIC 0755株 (受託番号: NITE_P-728)、NRIC 0756株 (受託番号: NITE_P-729)の各乳酸菌は、従来ビタミンB₁₂のバイオアッセイ法の指定菌として知られているラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830株よりも決定係数 (R²) の値が高く、ビタミンB₁₂のバイオアッセイの指示菌としての適性が高いことが判明した。

10

【0046】

(9) 線形回帰モデルの選定

現在日本食品標準成分表の分析マニュアルにおいて選定されている線形回帰モデルは単回帰モデルである。しかし、線形回帰モデルは他にも対数容量モデルやロジスティック回帰モデルがあるため、供試菌株ごとに最も適した線形回帰モデルを選定することが望ましい。そこで、各供試菌株ごとに得られた検量線について、単回帰モデル、対数容量モデル、ロジスティック回帰モデルによる分析を行った。結果を表5に示す。

【0047】

その結果、ラクトバチルス・デルブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) NRIC 0700株 (受託番号: NITE_P-726) はロジスティック回帰モデル、NRIC 0705株 (受託番号: NITE_P-727) はロジスティック回帰モデル、NRIC 0755株 (受託番号: NITE_P-728) は単回帰モデル又はロジスティック回帰モデル、NRIC 0756株 (受託番号: NITE_P-729) ロジスティック回帰モデルがそれぞれ適していることが判明した (図5、図6参照)。なお、従来ビタミンB₁₂のバイオアッセイ法の指定菌として知られているラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830株は全線形回帰モデルにおいて「直線性」、「傾き」、「三連の誤差」のいずれの項目も安定性を示す変動係数が上記4株と比較して劣っていた。

20

【0048】

【表5】

	直線性 (決定係数 R ²)		傾き (回帰係数)	三連の誤差 (標準誤差)	
	平均	変動係数	変動係数	平均	変動係数
NRIC 0700					
単回帰	0.924	0.039	0.141	0.095	0.329
対数容量	0.963	0.019	0.141	0.056	0.292
ロジスティック	0.983	0.007	0.149	0.042	0.224
NRIC 0755					
単回帰	0.975	0.016	0.247	0.046	0.052
対数容量	0.918	0.042	0.251	0.070	0.208
ロジスティック	0.980	0.017	0.171	0.043	0.319
NRIC 0705					
単回帰	0.920	0.031	0.134	0.073	0.257
対数容量	0.957	0.018	0.138	0.046	0.185
ロジスティック	0.971	0.015	0.236	0.041	0.217
NRIC 0756					
単回帰	0.941	0.016	0.075	0.087	0.145
対数容量	0.944	0.020	0.083	0.077	0.236
ロジスティック	0.975	0.012	0.202	0.061	0.268
ATCC 7830					
単回帰	0.718	0.449	0.864	0.062	0.837
対数容量	0.779	0.421	0.656	0.030	0.634
ロジスティック	0.782	0.422	0.708	0.036	0.703

10

20

30

【0049】

2. KCN法によるビタミンB₁₂の抽出

(1) 試料抽出液の調製

試料として市販のプロイラー鶏もも肉及び市販の干し海苔を使用し、日本食品標準成分表分析マニュアルに従い、KCN法によるビタミンB₁₂の抽出を行った。試料2 gに水40 ml、0.57 mol/l 酢酸緩衝液10 mlと0.05% (w/v) シアン化カリウム溶液0.4 mlを加え、100℃、30分間煮沸抽出した。得られた抽出液を冷却した後、10% (w/v) メタリン酸溶液0.6 mlを加え、水で100 mlに定容し、ろ紙(アドバンテック社製、No.2)でろ過することにより試料抽出液を得た。

【0050】

なお、前記0.57 mol/l 酢酸緩衝液は、酢酸39.6 mlと酢酸ナトリウム三水和物77.12 gを水に溶かし、1 mol/l 塩酸溶液でpH 4.5に調製し、水を加えて1,000 mlとしたものを使用した。また、前記0.05% (w/v) シアン化カリウム溶液は、シアン化カリウム50 mgを0.2% (w/v) 水酸化ナトリウム溶液に溶かし、100 mlに定容したものを使用した。

40

【0051】

(2) ビタミンB₁₂定量用試料の調製

上記(1)で得られた試料抽出液から25 mlを分取し、pH 6.0に調整した後、水で50 mlに定容し、ろ紙(アドバンテック社製、No.2)でろ過することによりろ液を得た。ろ液を必要に応じて希釈したものを試料溶液Aとし、ビタミンB₁₂定量用の試料とした。

【0052】

50

(3) アルカリ耐性因子定量用試料の調製

上記(1)で得られた試料抽出液から25 mlを分取し、pH 11~12に調整した後、オートクレーブに121℃、30分間かけて滅菌した。冷却後、pH 6.0に調整し、水で50 mlに定容し、ろ紙(アドバンテック社製、No.2)でろ過することによりろ液を得た。ろ液を必要に応じて希釈したものを試料溶液Bとし、アルカリ耐性因子定量用の試料とした。

【0053】

3. 試料中のビタミンB₁₂量の定量

(1) 本培地への分注

上記1(5)で調製したビタミンB₁₂定量用基礎培地1.25 mlに、上記2(2)で調製した試料溶液Aを1 ml加え、蒸留水を加え、全量を2.5 mlとした。その後は上記1(6) (7)と同様の要領で培養し、生育濁度を測定した。また、試料溶液Aに代えて、上記2(3)で調製した試料溶液Bについても実施した。

【0054】

(2) ビタミンB₁₂量の算出

ビタミンB₁₂量は、検量線から求めたビタミンB₁₂濃度に基づき、下記数式(1)から算出した。また、アルカリ耐性因子含量は、検量線から求めたアルカリ耐性因子濃度に基づき、下記数式(2)から算出した。そして、下記数式(3)に示すように、試料溶液AのビタミンB₁₂量から、試料溶液Bのアルカリ耐性因子量を差し引くことにより、最終的に試料中のビタミンB₁₂含量を算出した。結果を表6に示す。

【0055】

【数1】

$$\text{ビタミン B}_{12}\text{量 (}\mu\text{g/100 g)} = \frac{A \times Na \times V \times \frac{50}{25}}{W \times 1000} \times 100 \quad \dots (1)$$

$$\text{アルカリ耐性因子含量 (}\mu\text{g/100 g)} = \frac{B \times Nb \times V \times \frac{50}{25}}{W \times 1000} \times 100 \quad \dots (2)$$

$$\text{ビタミン B}_{12}\text{含量 (}\mu\text{g/100 g)} = \text{ビタミン B}_{12}\text{量} - \text{アルカリ耐性因子含量} \quad \dots (3)$$

A: 検量線より求めた試料溶液 A 中のビタミン B₁₂濃度 (ng/ml)
 B: 検量線より求めた試料溶液 B 中のアルカリ耐性因子濃度 (ng/ml)
 V: 定容量 (ml)
 Na: 試料溶液 A 調製時の希釈倍数
 Nb: 試料溶液 B 調製時の希釈倍数
 W: 試料採取量 (g)

【0056】

【表6】

試料	定量値 (pg/tube)	試料中のビタミンB ₁₂ 含量 (μg/100g)
鶏肉 (もも)	38.1	0.381
干し海苔	31.4	68.3

【0057】

4. 試料抽出方法の検討

(1) 試料を処理するとき使用する試薬の影響

試料を処理するとき使用する試薬(KCN、酢酸、メタリン酸)によって確度が影響を受けるか調べた。すなわち、検量線用に調製した各濃度のシアノコバラミン含有培地に、処理したシアノコバラミン標準液を一定量加え、供試菌株として、ラクトバシルス・デル

ブリュッキ・サブスピーシーズ・デルブリュッキ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) NRIC 0700株 (受託番号: NITE_P-726) と、NRIC 0755株 (受託番号: NITE_P-728) を接種し、吸光度で生育濁度を測定し、その測定結果に基づいて添加回収率を算出し、確度が高い範囲を調べた。

【0058】

結果を表7に示す。NRIC 0700株 (受託番号: NITE_P-726) は、0から120 pg/tubeの広い範囲で確度が高かった。これに対し、NRIC 0755株 (受託番号: NITE_P-728) は確度の高い範囲は0から80 pg/tubeであった。

【0059】

この結果から、試料を抽出するときに使用する試薬 (KCN、酢酸、メタリン酸など) が確度に影響を与える可能性が示唆された。

【0060】

【表7】

供試菌株	安定した測定可能範囲 (pg/tube)
NRIC 0700	0-120
NRIC 0755	0-80

【0061】

(2) 試料を抽出する試薬の検討

上記(1)の結果に基づき、KCN法によるビタミンB₁₂の抽出方法に使用する試薬の改良を行った。酢酸緩衝液の影響を低減させるため、酢酸緩衝液の濃度を0.57 mol/lから0.1 mol/lとした。すなわち、ビタミンB₁₂の抽出に影響を与えず、かつ、検量線用の培地とビタミンB₁₂量定量用の培地との酢酸緩衝液の濃度差が少なくなるように酢酸緩衝液の濃度を調整した。

【0062】

図7に、供試菌株として、NRIC 0700株を使用したときの試料のビタミンB₁₂の回収率につき、理論値と実測値を比較した結果を示す。図7に示す通り、試料を抽出する際に使用する酢酸緩衝液の濃度を0.57 mol/lから0.1 mol/lにすることで、試料中のビタミンB₁₂の回収率が0から160pg/5mlまでの範囲で、ほぼ100%となることが判明した。

【0063】

また、上記(1)の測定可能範囲についても、培地条件の変更により0から120 pg/tubeであった測定可能範囲が、0から160 pg/tubeまで安定して測定できるようになった。これは、日本食品標準成分表の分析マニュアルで定めている150 pg/tubeよりも広い範囲である。

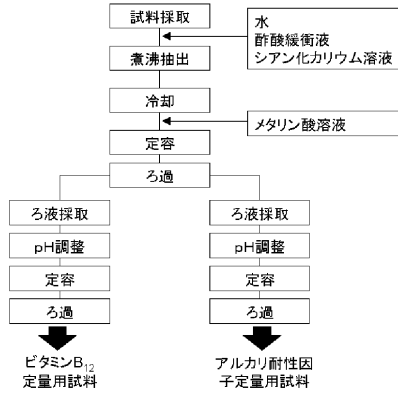
10

20

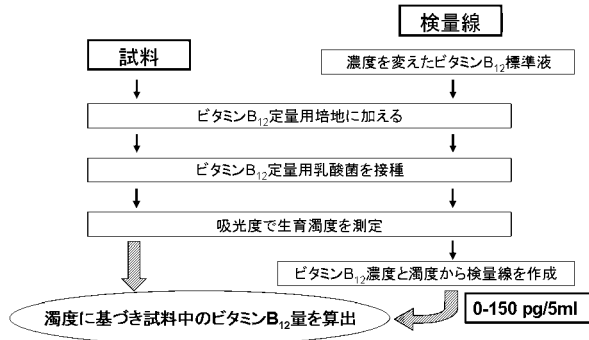
30

40

【 図 2 】



【 図 3 】



【 1 】

ATCC 7830 : 1 tagagttgatcatggctcaggacgaacgctggcgcgctgctaatacatgcaagtcgag 60
 |||
 NRIC 0700 : 1 tagagttgatcatggctcaggacgaacgctggcgcgctgctaatacatgcaagtcgag 60

ATCC 7830 : 61 cgaactgaattcaagatcccttcgggtgatggtggacgctaagcggatggatga 120
 |||
 NRIC 0700 : 61 cgaactgaattcaagatcccttcgggtgatggtggacgctaagcggatggatga 120

ATCC 7830 : 121 gtaaacagtgagcaatctgcctaaagactgggataccacttggaaacagtgctaatac 180
 |||
 NRIC 0700 : 121 gtaaacagtgagcaatctgcctaaagactgggataccacttggaaacagtgctaatac 180

ATCC 7830 : 181 cggataacaacatgaatcgatgattcaagttgaaagcggcgaagctgctactttag 240
 |||
 NRIC 0700 : 181 cggataacaacatgaatcgatgattcaagttgaaagcggcgaagctgctactttag 240

ATCC 7830 : 241 gatgaacccgacgcatgactgattggtgggtgaaagcctacaaagcaatgatgcg 300
 |||
 NRIC 0700 : 241 gatgaacccgacgcatgactgattggtgggtgaaagcctacaaagcaatgatgcg 300

ATCC 7830 : 301 tagccagttgagagactgacggccacatgggactgagacacggcccaactcctacg 360
 |||
 NRIC 0700 : 301 tagccagttgagagactgacggccacatgggactgagacacggcccaactcctacg 360

ATCC 7830 : 361 ggaagcagcagtagggaatctccacaatggacgaagctctgatggacacggccgctg 420
 |||
 NRIC 0700 : 361 ggaagcagcagtagggaatctccacaatggacgaagctctgatggacacggccgctg 420

ATCC 7830 : 421 agtgaagaagtttccgactgaaagcctctgttgggtgaaagagtagagcagta 480
 |||
 NRIC 0700 : 421 agtgaagaagtttccgactgaaagcctctgttgggtgaaagagtagagcagta 480

ATCC 7830 : 481 actggtctttattgacgtaatacaccagaagtcacgctaacctgcccagcagcc 540
 |||
 NRIC 0700 : 481 actggtctttattgacgtaatacaccagaagtcacgctaacctgcccagcagcc 540

ATCC 7830 : 541 ccgtaatacgtagtgccaagcgttgcggattattggcgtaaaagcagcagcagc 600
 |||
 NRIC 0700 : 541 ccgtaatacgtagtgccaagcgttgcggattattggcgtaaaagcagcagcagc 600

ATCC 7830 : 601 ggaatgataagctgatgtaaaagccacggctcaaccgtgaaatgcatcggaaactat 660
 |||
 NRIC 0700 : 601 ggaatgataagctgatgtaaaagccacggctcaaccgtgaaatgcatcggaaactat 660

ATCC 7830 : 661 catcttgagtcagaagagagagtgaaactccatgtagcagtggaatgctagata 720
 |||
 NRIC 0700 : 661 catcttgagtcagaagagagagtgaaactccatgtagcagtggaatgctagata 720

ATCC 7830 : 721 tatggaagaacaccagtgccaagcgcgctctgctgctgcaactgacgctgagcctcga 780
 |||
 NRIC 0700 : 721 tatggaagaacaccagtgccaagcgcgctctgctgctgcaactgacgctgagcctcga 780

ATCC 7830 : 781 aagcatggtagcgaacaggatagataccctggtagtcctgcccgtaaacgatgagcgc 840
 |||
 NRIC 0700 : 781 aagcatggtagcgaacaggatagataccctggtagtcctgcccgtaaacgatgagcgc 840

ATCC 7830 : 841 taggtgtgggacttccgctcctcagtgccgacgaacgcataaagcctccgctg 900
 |||
 NRIC 0700 : 841 taggtgtgggacttccgctcctcagtgccgacgaacgcataaagcctccgctg 900

ATCC 7830 : 901 gggagtagcaccgaaagtgaaactcaaaagatgacggggcaccgcaaacgggtgg 960
 |||
 NRIC 0700 : 901 gggagtagcaccgaaagtgaaactcaaaagatgacggggcaccgcaaacgggtgg 960

ATCC 7830 : 961 agcatggttttaattcgaagcaacgcaaaacactaccagcttgcacatcctgagc 1020
 |||
 NRIC 0700 : 961 agcatggttttaattcgaagcaacgcaaaacactaccagcttgcacatcctgagc 1020

ATCC 7830 : 1021 aaacttagagataagcttctccctcggggacgacagacagtgctgcatgctgct 1080
 |||
 NRIC 0700 : 1021 aaacttagagataagcttctccctcggggacgacagacagtgctgcatgctgct 1080

ATCC 7830 : 1081 cagctcgtgctgagatggtgggttaagtcggcaacgagcgaacccctgctttag 1140
 |||
 NRIC 0700 : 1081 cagctcgtgctgagatggtgggttaagtcggcaacgagcgaacccctgctttag 1140

ATCC 7830 : 1141 tccatcattaaagtggcactctgaaagactgcccgtgacaaccgaggaagtgag 1200
 |||
 NRIC 0700 : 1141 tccatcattaaagtggcactctgaaagactgcccgtgacaaccgaggaagtgag 1200

ATCC 7830 : 1201 gatgacgtcaagtcacatgccccttatgacctggctacacactgctacaatggcag 1260
 |||
 NRIC 0700 : 1201 gatgacgtcaagtcacatgccccttatgacctggctacacactgctacaatggcag 1260

ATCC 7830 : 1261 tacaacgagagcgaacccgagggatgaagcgtctctttaaagtcttctcagttcaga 1320
 |||
 NRIC 0700 : 1261 tacaacgagagcgaacccgagggatgaagcgtctctttaaagtcttctcagttcaga 1320

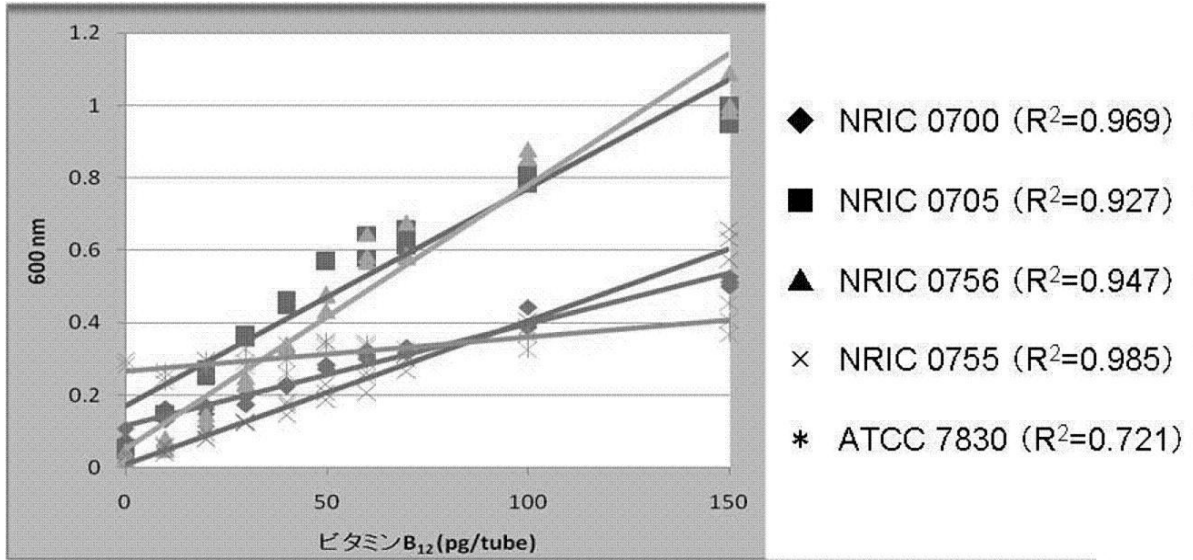
ATCC 7830 : 1321 ctgacgctgcaactgctgacgaagctggaatcgtatgaaatgagcagcagcagc 1380
 |||
 NRIC 0700 : 1321 ctgacgctgcaactgctgacgaagctggaatcgtatgaaatgagcagcagcagc 1380

ATCC 7830 : 1381 cgcggtgaatcgttcccggcctgtacacaccgcccgtcacaccatggaagctgcaa 1440
 |||
 NRIC 0700 : 1381 cgcggtgaatcgttcccggcctgtacacaccgcccgtcacaccatggaagctgcaa 1440

ATCC 7830 : 1441 tcccgaagtcggtggataaccttttagagtcagccgctaaagcagggcagatgac 1499
 |||
 NRIC 0700 : 1441 tcccgaagtcggtggataaccttttagagtcagccgctaaagcagggcagatgac 1500

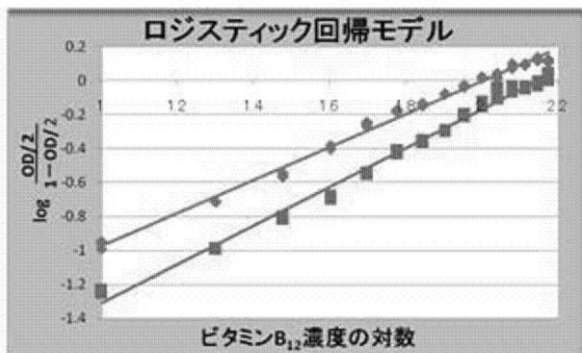
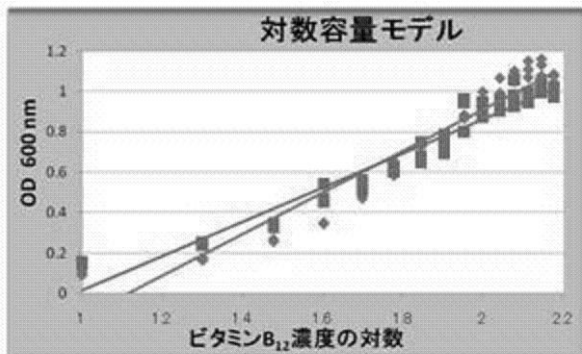
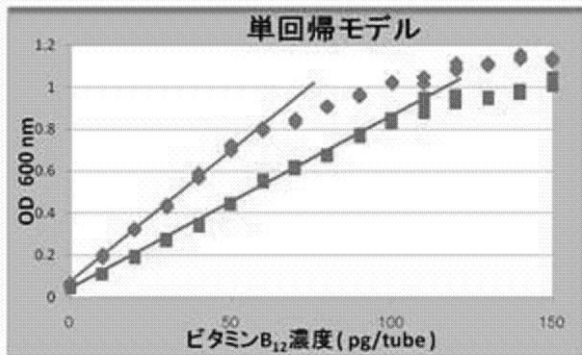
ATCC 7830 : 1500 tgggtgaaagtcgaaagtagccctgaggaacctgcggtggatcacctcctta 1557
 |||
 NRIC 0700 : 1501 tgggtgaaagtcgaaagtagccctgaggaacctgcggtggatcacctcctta 1558

【 図 4 】



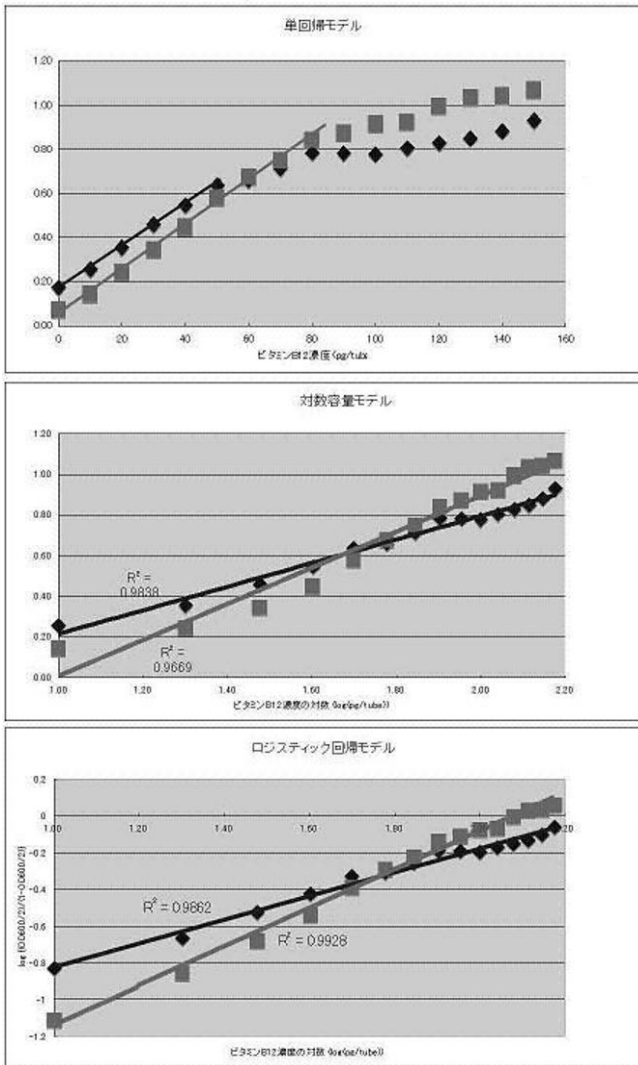
【 図 5 】

NRIC 0700 ◆ NRIC 0755 ■

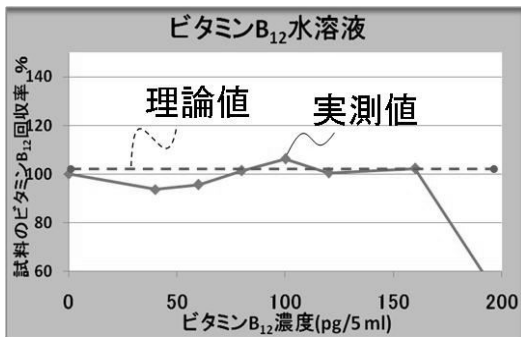


【 図 6 】

NRIC 0705 ◆ NRIC 0756 ■



【 図 7 】



【 配列表 】

0005397991000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特開2005-269968(JP,A)
特開2008-074768(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/02

C12N 1/20

C12R 1/225

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

W P I