

## 2) 微生物を用いた機能性評価

### (1) 96 穴プレート使用による抗菌性評価

(独) 農研機構 東北農業研究センター 老田 茂

#### はじめに

農作物成分には、麦類のチオニンペプチド<sup>1)</sup>などの抗菌性物質が数多く見出されている<sup>2)</sup>。抗菌試験法には目的や対象素材により様々なものがあるが、ここでは食品細菌に対する農作物抽出物の抗菌性を評価する方法の一つとして、日本化学療法学会標準法<sup>3)</sup>を一部改変した、96 穴マイクロプレートと液体培地を用いる最少阻害濃度 (MIC) 判定法を紹介する。本法の特徴は、100 $\mu$ L の培養液量で抗菌性を評価できるため、農作物抽出物が微量で済む。なお、本法と希釈寒天平板培養と組み合わせることにより、最少阻害濃度と最少殺菌濃度 (MBC) の両方が分かる。

#### 準備するもの

1. 細菌株：独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部・生物遺伝資源部門 (NBRC) や独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター (JCM) などの機関から購入できる。
2. 培地：対象とする菌にあわせて様々な培地が市販されている。寒天培地と液体培地の両方が必要であるが、液体培地に寒天を 1.5% 添加して寒天培地とすることも可。
3. プラスチックシャーレ：滅菌済でコーティングされていないもの。市販の寒天平板生培地を用いる場合は不要。
4. 96 穴マイクロプレート：蓋付き滅菌済のポリスチレン製でコーティングされていないものであれば、丸底・平底どちらでも良い。
5. 0.9% 食塩水
6. 白金耳：先端がループ状で、滅菌済の使い捨てプラスチック製品でも可。
7. コンラージ棒 (スプレッター)：滅菌済の使い捨てプラスチック製品でも可。
8. ピペッター：10~200 $\mu$ L を分注できるもの。
9. プラスチックチップ：10~200 $\mu$ L 用で滅菌済またはオートクレーブ滅菌可。
10. プラスチックチューブ：キャップ付 1.5mL 容で、滅菌済またはオートクレーブ滅菌可。低濃度の試料を扱う場合は、低吸着タイプを使用する。
11. シリンジフィルター：ポアサイズ 0.2 $\mu$ m で滅菌済みのもの。
12. シリンジ
13. 試験管ミキサー

14. マイクロプレートミキサー：振とう強度調節可能な試験管ミキサーで代用可。
15. カウンター：コロニーをカウントする。
16. 卓上型微量遠心機：キャップ付 1.5mL 容チューブに対応したもの。
17. 安全キャビネット：安全性に問題がない菌であれば、ガスバーナーのみでも可。
18. 高圧蒸気滅菌器（オートクレーブ）
19. 恒温器：37℃または対象とする菌の増殖に適した温度に設定が可能なもので、振とう機能は特に必要ない。
20. 微量 pH メーター：測定可能最少液量が 100 $\mu$ L のもの。pH 試験紙で代用可。

### プロトコール

1. 培地と 0.9%食塩水をオートクレーブ滅菌する（通常は 121℃，15 分であるが，市販培地の場合は説明書に従う）。
2. オートクレーブから出した寒天培地を良く攪拌して約 60℃に保温後，約 10mL をプラスチックシャーレに分注する。市販の寒天平板生培地を用いる場合は省略。
3. 寒天が固まったら，保存菌株を白金耳に取り，寒天平板培地に画線塗抹して，37℃以下でその菌の増殖に適した温度で一晩培養する。
4. シリンジフィルターで除菌した農作物抽出物は，キャップ付チューブを用いて滅菌済 0.9%食塩水で希釈し，試験管ミキサーで攪拌後，卓上型微量遠心機で 1～2 秒遠心する（キャップ内側に付いた液を落とすため）。
5. 96 穴マイクロプレートの各ウェルに液体培地 80 $\mu$ L と希釈した農産物抽出物 10 $\mu$ L を添加し，マイクロプレートミキサーを用いて少し攪拌する。マイクロプレートミキサーがない場合は，試験管ミキサーの振とう強度を下げ，プレートを両手で持ち，慎重に攪拌する。振とう強度調節可能な試験管ミキサーもない場合は，ウェル中で混合した液の一部をピペッターで吸い取り，ウェルへ再添加することにより攪拌する。
6. 一晩培養した寒天平板培地上の 1 個のコロニーに白金耳の先端を付け，それを 1.5mL 容チューブ入りの滅菌済 0.9%食塩水 200 $\mu$ L に懸濁した後，試験管ミキサーで十分攪拌し，卓上型微量遠心機で 1～2 秒遠心する。
7. 0.9%食塩水で 10 倍希釈を 2～4 回繰り返した菌懸濁液 10 $\mu$ L を各ウェルに接種して，少し攪拌してから蓋をして一晩または数日間培養後，肉眼で菌の増殖が認められないウェルの農産物抽出物濃度を最少阻害濃度とする。
8. ウェルに接種した残りの菌懸濁液は，0.9%食塩水で 10 倍希釈をさらに 2～3 回繰り返してから，それらの 100 $\mu$ L ずつを寒天平板培地上にコンラージ棒で均一に塗抹し，一晩培養後のコロニーを計数することにより，接種菌数を計算する。
9. 菌の増殖が認められなかったウェルの培養液を 0.9%食塩水で 10 倍および 100 倍

希釈してから、それらの 100 $\mu$ L ずつを寒天平板培地に塗抹して培養し、コロニー数が接種時よりも著しく減少している農作物抽出物の濃度を最少殺菌濃度とする。

### 注意点等

1. 分注・接種等の操作はすべて無菌的に行う。
2. 食中毒原因菌等の取り扱いに注意を要する菌の場合は、所属する機関の規程等に従って実施する。
3. 安全性等に特に問題がない菌であっても、環境への無用な放出を避けるため、試験終了時には、使用済みの使い捨てプラスチック製品や培養液等は、すべてオートクレーブ滅菌してから廃棄する。
4. 本法は酵母や糸状菌<sup>1)</sup>にも応用可能で、パウチタイプの嫌気培養キット（アネロパックなど）を用いれば、嫌気性細菌にも応用可能。
5. 培養中にウェル中の液体培地の蒸発を抑えるため、水を張った蒸発皿を恒温器に入れる。また、96 穴プレートの周辺部のウェルは液体培地が蒸発し易いため、なるべく使わないようにする。培養温度が 37°C を超える場合は、マイクロプレートに蓋をしても液体培地が蒸発し易くなり、培地中の農作物抽出物の濃度変化が大きくなるため、本法は適さない。
6. 農作物抽出物に有機溶媒や酸が含まれる場合は、遠心濃縮機等でそれらを蒸発させた後、0.9%食塩水に再溶解してから、シリンジフィルターで除菌する。食塩水に再溶解し難い場合は、超音波細胞破碎機でミセル化したものを、フィルター除菌せずに液体培地へ添加する（混入細菌は超音波によってほとんど殺菌されているため）。やむを得ずメタノール等の溶媒を含む農作物抽出液を液体培地へ添加する場合は、同濃度の溶媒を含む液体培地をコントロールに設定する。
7. 濃度が高い農産物抽出物や、高速液体クロマトグラフ分画物で酸の除去が不十分なものを液体培地に添加すると、培地 pH が菌の増殖に適した範囲を外れる場合があるため、微量 pH メーターか pH 試験紙で培地 pH を確認する。
8. 液体培地の接種菌数は、 $1 \times 10^4 \sim 10^5$ /mL の範囲が適している。一晚培養後では菌の増殖が認められない場合でも、2~3 日培養後に増殖が認められる場合がある。また、液体培地に添加した抗菌成分がプレートに吸着されると、最少阻害濃度が実際より高くなる可能性もある。

### 参考文献

- 1) Oita, S., Ohnishi-Kameyama, M. and Nagata, T., Binding of barley and wheat  $\alpha$ -thionins to polysaccharide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 958-964 (2000).

- 2) 稲津康弘, 川本伸一, 天然物由来添加物による殺菌・静菌技術, 食科工, **54**, 425-435 (2007).
- 3) 微量液体希釈法による MIC 測定法(微量液体希釈法) -日本科学療法学会標準法-, *Chemotherapy*, **38**, 103-105 (1990).