

## ビオチン

## 微生物学的定量法

## ① 装置及び器具

- ・分光光度計

## ② 試薬

- ・ビオチン標準溶液：D-ビオチン標準品<sup>注1)</sup> 20 mg を 25 v/v%エタノール溶液に溶かし、正確に 200 mL とする。さらに、水で希釈して 0.5 ng/mL となるようにする。

- ・使用菌株：*Lactobacillus plantarum*<sup>注2)</sup> ATCC 8014 (NBRC 3070)

- ・ビオチン測定用培地（1 L 中、pH6.8±0.1）

カザミノ酸	14 g
L-シスチン	400 mg
DL-トリプトファン	200 mg
硫酸アデニン	20 mg
塩酸グアニン	20 mg
ウラシル	20 mg
塩酸チアミン	200 µg
リボフラビン	400 µg
パラアミノ安息香酸	200 µg
パントテン酸カルシウム	400 µg
ニコチン酸	1 mg
塩酸ピリドキシン	800 µg
リン酸二水素カリウム	1 g
リン酸一水素カリウム	1 g

硫酸マグネシウム	400 mg
硫酸第一鉄	20 mg
硫酸マンガン	20 mg
酢酸ナトリウム（無水）	20 g
グルコース	40 g

- ・乳酸菌保存用培地（1 L 中、pH6.8±0.1）

酵母エキス	5.5 g
ペプトン	12.5 g
ブドウ糖	11.0 g
リン酸一水素カリウム	0.25 g
硫酸第一鉄	5.0 mg
リン酸二水素カリウム	0.25 g
酢酸ナトリウム（無水）	10 g
硫酸マグネシウム	0.1 g
硫酸マンガン	5.0 mg
粉末寒天	20.0 g

- ・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。  
なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている<sup>注3)</sup>。
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③ 接種菌液の調製

*Lactobacillus plantarum* の保存菌株を前培養培地に接種し、35 °Cで20時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、600 nmにおける透過率が80～90%になるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

④ 試験溶液の調製<sup>注4)</sup>

試料2gを精秤し(Wg)、2mol/L又は3mol/L硫酸25mLを加え、121°Cで1時間オートクレーブで加圧分解する。冷却後、5mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH4.5に調整後、水を加えて100mLに定容し(V<sub>1</sub>mL)、ろ過する。ろ液25mLを分取して(V<sub>2</sub>mL)、1mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH6.8に調整後、50mLに定容し(V<sub>3</sub>mL)、さらに最終溶液中のビオチン濃度が検量線の範囲内に入るように水で希釈して(希釈倍数:D)、ろ過して試験溶液とする。

⑤ 測定

試験管2本ずつに試験溶液0.5、1.0及び2.0mLを正確に加え、次に各試験管に測定用培地2.5mL及び水を加えて全量を5mLとする。別に検量線作成のため、ビオチン標準溶液(0～0.75ng相当量)を試験管2本ずつに取り、それぞれに測定用培地2.5mL及び水を加えて全量を5mLとする。121°Cで5分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌溶液1滴(約30μL)ずつを無菌的に接種し、37°Cで18時間程度恒温槽又は恒温水槽に入れて培養する。

培養後、増殖度を600nmの濁度を用いて測定する<sup>注5)</sup>。標準溶液の濁度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のビオチンの濃度(Cng/mL)を求め、試料中のビオチン含量を算出する。

⑥ 計算

$$\text{試料中のビオチン含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{C \times V_1 \times D \times V_3}{V_2 \times W \times 10}$$

C：検量線から求めたビオチンの濃度 (ng/mL)

V<sub>1</sub>～V<sub>3</sub>：定容量 (mL) 又は分取量 (mL)

D：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

[注]

- 1) 関東化学 特級、又は同等品を用いる。
- 2) 旧名称は、*Lactobacillus arabinosus* である。
- 3) ビオチン定量用基礎培地「ニッスイ」：日水製薬  
一般乳酸菌保存検出用培地「ニッスイ」：日水製薬  
一般乳酸菌接種用培地「ニッスイ」：日水製薬（前培養培地に同じ）
- 4) ビオチン含量の高い食品については、水で振とう抽出し、ろ過して得られたろ液を 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整し、試験溶液とすることもできる。また、この場合、ビオチンを紫外部吸収又は蛍光を有する誘導体に導いた後、勾配溶出液体クロマトグラフ法で定量する方法も適用できる（詳細は下記の文献に譲る）が、食品表示基準における分析方法は、微生物学的定量法とする。
- 5) マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー（例えば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型等）で濁度を測定することもできる。

[参考文献]

- 1) Desbene, P.L., Coustal, S. and Frappier, F.: Anal. Biochem., 128, 359 (1983)
- 2) 金沢良昭、中野貴彦、田中英樹：日本化学会誌, 434 (1984)
- 3) Yoshida, T., Uetake, A., Nakai, C. Nimura, N. and Kinoshita, T.: J. Chromatogr., 456, 421 (1988)