

レサズリン還元試験紙による原料乳の 汚染度判定法の検討

中 江 利 孝・片 岡 啓

An Evaluation of the Resazurin Test Paper Method for Determining the Sanitary Quality of Raw Milk

Toshitaka NAKAE and Kei KATAOKA

A new reduction method for determining the sanitary quality of raw milk, which is called the resazurin test paper method, was evaluated comparing with the conventional resazurin test tube method.

The experimental results of the standard plate count method and two types of the resazurin reduction test using sixty samples of raw milk showed a high correlation between standard plate counts and grade number of resazurin test paper.

The regression formula was obtained to estimate the standard plate counts from the grade number of resazurin paper.

It may be concluded that the resazurin test paper method is very convenient and as good as the conventional test tube method.

緒 言

牛乳中の細菌数を推定する簡易法としてのレサズリン還元試験管法は諸外国¹⁻²⁾、並びにわが国³⁻⁵⁾においても多数研究が行なわれ、世界各国で広く実用化されている。更に最近、従来のレサズリン還元試験管法を一層簡易化する目的でレサズリン試験紙が開発された。これに関しては大塚⁶⁾の研究報告がある。

したがって著者等はレサズリン還元試験紙による方法の適否を更に検討する目的で同一生乳の生菌数(標準寒天平板法)に対して、このレサズリン試験紙法による乳質判定の結果と従来のレサズリン還元試験法による結果を比較検討した。以下その結果を報告する。

I. 実 験 方 法

1. 供 試 牛 乳

岡山県下のO工場の受入原料乳中酪農家単位の混合乳試料を選び、昭和42年12月21日より昭和43年1月18日にわたり60個の試料を採取した。

2. レサズリン還元試験

レサズリン試薬は和光純薬工業株式会社製ラクテスターA錠を用い、その1錠を滅菌水40mlに溶解した。試料10mlを採取した滅菌試験管中に上記色素液1mlを加え混和後、 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の湯浴中に保ち、10~120分後、色調表(同社製)と比較し0~4までの5段階に判定した。

3. レサズリン還元試験紙による還元試験

レサズリン還元試験紙は富士環境衛生科学株式会社製（販売元：安積濾紙株式会社）のものを使用した。前記試験と平行して、レサズリン還元試験紙（レサズリンを含浸させ滅菌密封した製品）に試料を浸し、ビニール袋に再び挿入後余分の牛乳および空気を押出し、袋の切断口を火焰で封じた。直ちに $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の孵卵器に納め前記試験と同様に10~120分後に色調表（製作：日本色彩研究所。販売：富士環境衛生科学株式会社）と比較し6~1までの6段階に判定した。

4. 生菌数測定

標準寒天培地を用い常法に従って行なった。

第1表 レサズリン還元色度と生菌数の度数分布表

測定時間	測定法	レサズリン試験管法					レサズリン試験紙法					
	色調 生菌数	0	1	2	3	4	6	5	4	3	2	1
10分	-9.9×10^2											
	$1.0 \times 10^3 - 5.9 \times 10^3$	###					###					
	$6.0 \times 10^3 - 3.9 \times 10^4$	###### ###					###### 					
	$4.0 \times 10^4 - 2.4 \times 10^5$	###### 					###					
	$2.5 \times 10^5 - 1.4 \times 10^6$	###										
	$1.5 \times 10^6 - 9.9 \times 10^6$											
	$1.0 \times 10^7 -$											
30分	-9.9×10^2											
	$1.0 \times 10^3 - 5.9 \times 10^3$	###					### 					
	$6.0 \times 10^3 - 3.9 \times 10^4$	###### ###					### ###					
	$4.0 \times 10^4 - 2.4 \times 10^5$	###### 					 ###					
	$2.5 \times 10^5 - 1.4 \times 10^6$	###										
	$1.5 \times 10^6 - 9.9 \times 10^6$											
	$1.0 \times 10^7 -$											
60分	-9.9×10^2											
	$1.0 \times 10^3 - 5.9 \times 10^3$	###						###				
	$6.0 \times 10^3 - 3.9 \times 10^4$	###### ###						###### 				
	$4.0 \times 10^4 - 2.4 \times 10^5$	###							###			
	$2.5 \times 10^5 - 1.4 \times 10^6$		###							###		
	$1.5 \times 10^6 - 9.9 \times 10^6$					###						###
	$1.0 \times 10^7 -$											
120分	-9.9×10^2											
	$1.0 \times 10^3 - 5.9 \times 10^3$	###							###			
	$6.0 \times 10^3 - 3.9 \times 10^4$	###### 							###	###		
	$4.0 \times 10^4 - 2.4 \times 10^5$		###							###		
	$2.5 \times 10^5 - 1.4 \times 10^6$			###								
	$1.5 \times 10^6 - 9.9 \times 10^6$					###						###
	$1.0 \times 10^7 -$											

試料の希釈はレサズリン還元試験の初期の段階より判定して $10^2 \sim 15^5$ 希釈のもの 1 ml を用い、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、 48 ± 2 時間培養後コロニーを測定し試料 1 ml 中の生菌数として表わした。

II. 実験結果および考察

前記60試料について、従来のレサズリン還元法およびレサズリン還元試験紙法による10分、30分、60分、120分後に還元された色調番号、並びにこれらに対応する生菌数を測定した。第1表はその関係を示す度数分布表である（第1表参照）。この表は下段方向に生菌数が多く、右方向に還元度の強いことを示すものである。実験に供した試料において従来の試験管法では60分までのものは変色度が少なく、まったく変色しない色調番号（0）の方に分布がかたよっていた。しかし試験紙法によるものでは60分では大体均等な分布を示した。この供試原料乳は冬期の細菌数の少ない試料であるが、この実験範囲では試験紙法の方が迅速に結果を推定できるものと考えられる。

この分布表より見れば、色調番号と生菌数の間に最も相関性が高いと思われるものは濾紙法の60分と30分および試験管の120分の場合と思われる。したがってこの両者の関係を一層明確にする目的で相関係数および生菌数の対数（Y）の色調度（X）に対する回帰直線とその標準誤差範囲を求めた（第2表）。その結果全般的にかなり高い相関が認められるが、60分までの

第2表 レサズリン還元色度（試験管法および試験紙法）と生菌数間の相関係数および回帰直線

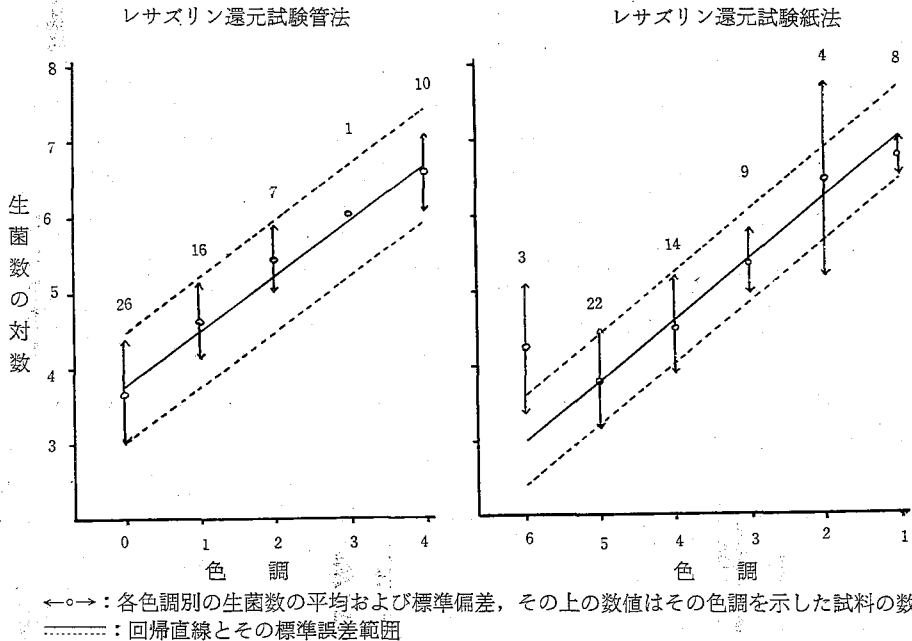
測定法	各時間後の色調 — 生菌数	r ($P < 0.001$)	回 帰 式 *	回 帰 式 から 求 め た 推 定 値 の 標 準 誤 差
レ試験 管 法	10分 — 生菌数	0.616	$Y = 4.407 + 0.953 X$	1.049
	30分 — "	0.673	$Y = 4.338 + 0.805 X$	0.984
	60分 — "	0.773	$Y = 4.107 + 0.731 X$	0.844
	120分 — "	0.821	$Y = 3.795 + 0.735 X$	0.760
レ試験 紙 法	10分 — "	-0.644	$Y = 8.970 - 0.786 X$	1.018
	30分 — "	-0.719	$Y = 7.963 - 0.711 X$	0.925
	60分 — "	-0.885	$Y = 7.765 - 0.799 X$	0.620
	120分 — "	-0.603	$Y = 6.648 - 0.658 X$	1.061

* Y: 生菌数の対数 X: 色調

場合は試験紙法の相関が高く、120分では試験管法が高い相関を示した。これは第1表の分布表での推定と一致し、試験紙法による60分の判定が生菌数の推定に最も適することがわかった。

次に両法で最適と思われる試験紙法による60分および試験管法による120分の場合について、それぞれの回帰直線とその標準誤差範囲並びにそれぞれの色調における実測生菌数の平均および標準偏差を示すと第1図のごとくである。（第1図参照）各色調における生菌数は全般に回帰式より求めた標準誤差範囲に入るが、試験紙法の色調6および4のものは該当する試料数が少ないためもあるが回帰直線からかなりはずれていた。第1表および第2表より試験管法による60分および120分の判定で色調4を示すものは大体生菌数100万個/ml以上であり、伊藤⁴⁾の結果と一致した。しかし120分でまったく変色しなかったもの（色調0）はほとんど20万個/ml以下であり、かなり異なるようであった。更に各色調別に時間に対して求めた大塚⁵⁾の回帰直線の結果と比較すると、還元度の高い水準では同様な結果が得られたが、還元度の低い水準では著者等の結果がかなり低い菌数であった。これはHARRIS⁷⁾等が冬期の良質乳において同様な

第1図 色調別生菌数の平均および標準偏差並びに回帰直線とその標準誤差範囲



結果を報告しているように本実験が冬期の試料に限られたことに原因があることも考えられる。

これに対して試験紙法では60分の判定で色調1のものはほとんど生菌数100万個/ml以上であり, 色調5~6のものは20万個/ml以下であり, 試験管法と同様な傾向が認められた。

両法とも各色調に対する推定菌数は従来の試験結果と同様にかかなり広い範囲を示す結果となったが, 生菌数(対数)の色調に対する回帰直線を求めることの妥当性の面より考え, 伊藤等^{2,4-6)}のように特定または全色調に達するまでの所要時間に対して菌数を推定する方法をとるならば, 色調番号判定のための感覚の誤差, および色調表の色調段階そのものの影響が少なくなり, より正確な推定ができるものと考えられる。

III. 総括

乳質判定法としての試験管を用いる従来のレサズリン還元法は, 総菌数測定および生菌数測定法に較べ簡易法として広く普及しているとはいえ, その試験準備のために相当の時間と労力を要している現状である。新しく開発されたレサズリン還元試験紙法は簡便で全く準備操作の必要はなく, また, 生菌数との間の相関も高く, 色調番号から生菌数を推定する回帰式が得られた。これらの結果から, レサズリン還元試験紙法は従来の試験管法に較べ遜色のないものと思われる。

文 献

- 1) DABBAH, R. and OLSON, J. C. JR. (1965); Statistical relationships among four bacteriological tests used in grading raw milk intended for manufacturing purposes. *J. Dairy Sci.* 48(6), 770.

- 2) DABBAH, R. TATINI, S. R. and OLSON, J. C. JR. (1967); Comparison of methods for grading milk intended for manufacturing purposes. *J. Milk and Food Technol.* 30(3). 71—76.
- 3) 横山健吉(1961); 夏期原料乳のレサズリン還元検査法による汚染度判定基準の検討. 酪農科学の研究. 10(3). A・101—114.
- 4) 伊藤利平(1962); 原料乳質の統計的解析. 同誌 11(3). A・199—226.
- 5) 高野玉吉・吉浜文雄・加田正敏. (1961); 生乳細菌検査の直接鏡検法とレサズリンテストとの関係. 食品衛生学雑誌. 2(2). 40—43.
- 6) 大塚義一. (1967); 生乳細菌検査の標準寒天平板培養法とレサズリンテストとの関係. 日本獣医師会雑誌. 20(11). 471—474.
- 7) HARRIS, E. K. THOMAS, R. C. and BLACK, L. A (1956); A statistical analysis of reduction time in relation to plate counts. *J. Milk and Food Technol.* 19(9). 243—47.