



食品の大腸菌群および *E. coli* 検査 における発色酵素基質法

株式会社 ファルコライフサイエンス 寺本 忠司

食品細菌検査に合成酵素基質の理論と技術を導入することによって大腸菌群および *E. coli* 検査を簡易および迅速化できる発色酵素基質法は1996年にわが国ではじめて公定法に採用された¹⁾。

1. 発色酵素基質法における大腸菌群の定義

食品細菌検査における発色酵素基質法の大腸菌群は、従来法の定義「乳糖を発酵して酸とガスを産生するグラム陰性通性嫌気性ないし好気性桿菌」と異なり、特異酵素 β -Galactosidase を産生するグラム陰性桿菌と再定義される。また β -Galactosidase は乳糖分解に関与する酵素であり、大腸菌群に含まれるすべての菌種で産生される。

2. 大腸菌群と乳糖分解酵素

乳糖分解には乳糖分解酵素とともに細胞膜透過酵素の関与が必要であり、細胞膜透過酵素が欠けると乳糖分解酵素が存在しても乳糖は分解されない。したがって、乳糖非分解菌であっても β -Galactosidase 産生する菌は細胞膜透過酵素を欠くので潜在的な乳糖分解菌となり、本質的には乳糖分解からのガス産生による従来法と β -Galactosidase 産生による発色酵素基質法の大腸菌群は100%は一致しない。むしろ発色酵素基質法のほうがより確実に潜在的な乳糖分解菌まで検出できるため、従来法に比べて大腸菌群陽性率は当然高くなる。しかし、食品から潜在的な乳糖分解菌が分離される頻度は実際上どのくらいか不明である。

3. 発色酵素基質法における大腸菌群菌種

発色酵素基質法における β -Galactosidase 産生のグラム陰性桿菌の大腸菌群は表1のとおりである。

4. 酵素基質の種類

1) 大腸菌群検出

大腸菌群検出に利用される酵素基質は6種類すなわち、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-GAL)、6-bromo-5-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Magenta-GAL)、6-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Salmon-GAL)、p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (PNPG)、o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) および 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (M-GAL) である。

2) *E. coli* 検出

特異酵素 β -glucuronidase を産生する腸内細菌は *E. coli* の98%であり、そのほかに *S. sonnei* および一部の *Salmonella* である²⁾。*E. coli* 検出に利用される発色酵素基質は4種類すなわち、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC)、6-bromo-5-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (Magenta-GLUC)、6-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (Salmon-GLUC) および 4-methylumbelliferyl-

β -D-glucuronide(MUG)である。

3)発色酵素基質の反応

大腸菌群検出に使用される酵素基質X-GALは、大腸菌群の産生する特異酵素 β -Galactosidaseによって結合部が切られ、 β -D-galactoseと5-bromo-4-chloro-3-indoline(青色)に分けられる。また*E. coli*検出に最も多く使用される合成発色酵素基質MUGは、*E. coli*の産生する特異酵素 β -Glucuronidaseによって結合部が切断され、glucuronic acidと4-umbelliferone(蛍光色)に分けられ、紫外線照射下で発光する。(図1)

5. 発色酵素基質培地

食品、水質および環境材料からの大腸菌群および*E. coli*検出は各種の発色酵素基質培地でいずれも35℃、24時間培養後、同時に判定される。

1)大腸菌群数測定-ESコリフォーム寒天培地

食品および環境材料などの大腸菌群数測定用培地である。本培地に含まれるラウリル硫酸ナトリウムはグラム陰性菌の選択剤として用いられる。また発色酵素基質X-GALを含むので大腸菌群は薄い緑～緑青色集落となる。

2)大腸菌群および*E. coli*検出-ESコリブルー培地

食品および水質からの大腸菌群および*E. coli*検出用の液体培地である。発色酵素基質X-GALおよびMUGを含むので大腸菌群は緑～青色、*E. coli*は紫外線照射下で蛍光色を呈する。とくに、食肉や生鮮魚介類の検査では偽陽性反応に注意を要する。

3)大腸菌群および*E. coli*数測定-ESコリマーク寒天増地、ぺたんチェック-ESコリマーク寒天培地

食品およびまな板、包丁など環境材料の拭取りからの大腸菌群および*E. coli*数測定用培地である。ラウリル硫酸ナトリウムをグラム陰性菌の選択剤として用い、発色酵素基質X-GLUCおよびMagenta-GALを添加したものである。*E. coli*は青～青紫色集落、大腸菌群はピンク～赤紫色集落を形成する。

6. 従来法と発色酵素基質法による大腸菌群検出

表2に示したように、食品178例からの従来法のデソキシコレート寒天培地と発色酵素基質法のESコリマーク寒天培地による大腸菌群検出数は69例であり、デソキシコレート寒天培地およびESコリマーク寒天培地による大腸菌群陽性数はそれぞれ48および69例であった。大腸菌群陽性例の内訳は、ESコリマーク寒天培地およびデソキシコレート寒天培地ともに大腸菌群陽性数は48例、ESコリマーク寒天培地による大腸菌群陽性でデソキシコレート寒天培地による大腸菌群陰性数は21例であった。一方、デソキシコレート寒天培地で大腸菌群陽性かつESコリマーク寒天培地で大腸菌群陰性例はなかった。これらの結果から、食品からの大腸菌群陽性数は発色酵素基質法が従来法より多かったのは乳糖非分解菌の存在であった。また食品からの大腸菌群および*E. coli*検出はESコリマーク寒天培地の使用によって1日で判定された。しかも、大腸菌群および*E. coli*はESコリマーク寒天培地上に発育した集落の色調によって簡単に区別してカウントできた。

7. 発色酵素基質法の利点と問題点

食品からの大腸菌群および*E. coli*検出は特殊な自動機器によらない限り、数時間では判定できないが、発色酵素基質法は24時間以内に判定できるので簡易・迅速性に優れた方法である。さらに、その検査手技は従来法と同じであることから精度管理や培地の標準化は容易で

ある。

発色酵素基質法の問題点は検査培地が高価であり、食肉や生鮮魚介類の検査に使用される液体培地では疑陽性反応に注意することである。また発色酵素基質寒天培地上に発育した集落の色調は培養時間によって不明瞭となり、大腸菌群数のカウントに影響を及ぼした。

文献

- 1) 仲西寿男、寺本忠司：大腸菌群および糞便系大腸菌の迅速検査法、食品衛生検査指針、p. 28-34、日本食品衛生協会、1996
- 2) 寺本忠司：食品細菌検査の簡易化・迅速化 大腸菌群および大腸菌、食品と微生物、9(4)：211-216、1993

表1 従来法および酵素法による大腸菌群の菌種

大腸菌群に該当する菌種			
<i>Budvicia aquatica</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia fonticola</i>
<i>Buttiauxella agrestis</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Klebsiella terrigena</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Cedecea davisae</i>	<i>Enterobacter intermedius</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Serratia odorifera</i>
<i>Cedecea lapagei</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	<i>Serratia plymuthica</i>
<i>Cedecea neteri</i>	<i>Enterobacter taylorae</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Serratia rubidae</i>
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Yersinia frederiksenii</i>
<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Escherichia hermannii</i>	<i>Pantoea dispersa</i>	<i>Yersinia intermedia</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Yersinia kristensenii</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	<i>Ewingella</i> spp.
<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Klebsiella plahticola</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>indica</i>	<i>Aeromonas sobria</i>
β-Galactosidaseを指標とした場合追加される菌種			
<i>Enterobacter dissolvens</i>	<i>Moellerella wisconsinensis</i>	<i>Trabulsiella guamensis</i>	<i>Yokenella regensburgi</i>
<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	<i>Salmonella bongori</i>	<i>Yersinia bercovieri</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Yersinia mollaretii</i>	<i>Vibrio</i> spp.
<i>Ewingella americana</i>	<i>Serratia entomophila</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	

図1 発色酵素基質

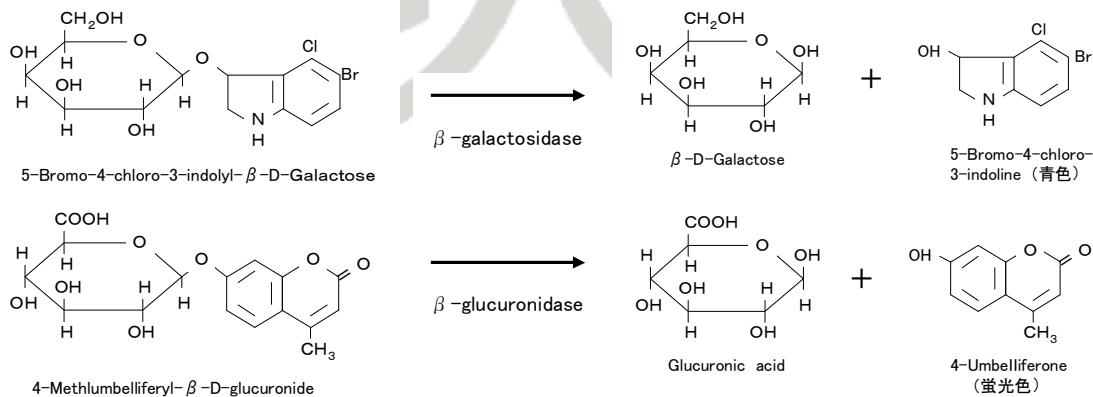


表2 食品からの従来法および発色酵素基質法による大腸菌群検出

大腸菌群	デゾキシコレート寒天培地		計	
	陽性数	陰性数		
ESコリマーク寒天培地	陽性数	48	21	69
	陰性数	0	109	109
計		48	130	178