

テクニカルレター

カタラーゼ活性の過シュウ酸エステル化学発光検出に基づく 食品の細菌汚染評価に関する基礎的検討

和田 光弘*, 梶島 力*, 黒田 直敬*, 芳本 忠*, 加藤 秀男**,
林田真二郎**, 中島憲一郎^{®***}

A basic investigation for the discrimination of bacterial pollution on
food based on a measurement of the catalase activity with
peroxyoxalate chemiluminescence detection

Mitsuhiro WADA, Tsutomu KABASHIMA, Naotaka KURODA,
Tadashi YOSHIMOTO*, Hideo KATOH, Shinjiro HAYASHIDA**
and Kenichiro NAKASHIMA***

* School of Pharmaceutical Sciences and *** Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University,
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521

** Choko Shoyu Miso Corporation, 815 Mizooka-machi, Nagasaki 856-0844

(Received 8 November 2001, Accepted 12 December 2001)

A simple and rapid discrimination method for bacterial pollution on food is described. This method is based on a measurement of the catalase activity for bacterium on foods by a flow injection analysis (FIA) system with peroxyoxalate chemiluminescence detection. The calibration curves for five bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtilis*) showed good linearities between OD₆₀₀ and the chemiluminescence intensity ($r \geq 0.951$). Bacteria could be detected as low as the range of 0.02-0.12 (OD₆₀₀) at 5 σ of the blank peak. The proposed method is applicable to measuring the catalase activity in soup samples.

Keywords : flow injection analysis (FIA); peroxyoxalate chemiluminescence; catalase activity; food; bacterium.

1 緒 言

食品の品質管理において微生物による汚染は深刻な問題であり、迅速かつ簡便にその判定結果が得られなければならない。

食品の微生物汚染測定法として、衛生試験法では平板培養法¹⁾が定められており、このほか、生物発光法²⁾やカタラーゼ法³⁾⁴⁾が報告されている。平板培養法は、培養後発

生したコロニー数を肉眼で計測し、試料中の生菌数を算出する方法であり、結果の判定に数日の時間を要する。生物発光法は、ルシフェリン/アデノシン-3リン酸 (ATP)/ルシフェラーゼを用いた測定系であり、高感度である。しかし試料の pH, ATP 分解酵素あるいは食品成分により、その測定値及び感度が大きな影響を受ける²⁾。一方、カタラーゼ法は、菌の持つカタラーゼ活性を測定するもので、酸素分圧計³⁾あるいは溶存酸素計⁴⁾を用いるものがあり、その簡便性から注目を集めている。しかし酸素分圧計は測定精度に劣り、溶存酸素計は検液の溶存酸素の影響を受けるなどの問題点も有している。

著者らは、これまでにシュウ酸誘導体、過酸化水素及び

* 長崎大学薬学部: 852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

** 長工醤油味噌協同組合: 856-0844 長崎県大村市溝陸町 815

*** 長崎大学大学院薬学研究科: 852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

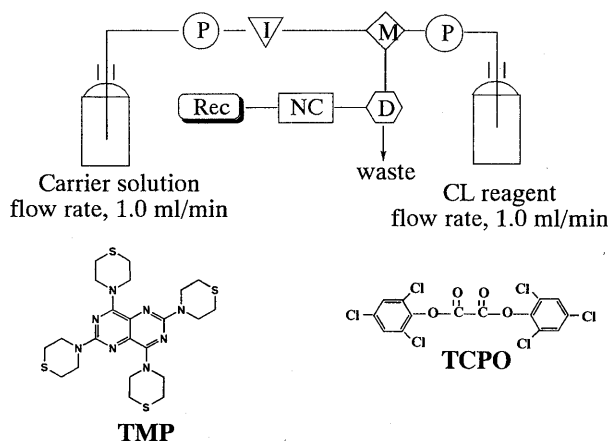


Fig. 1 FIA system for the measurement of catalase activity

P: pump; I: injector; M: mixing tee; D: chemiluminescence detector; NC: noise cleaner; Rec: recorder. FIA conditions: carrier solution, 20 mM imidazole/HNO₃ buffer (pH 7.0); flow rate, 1.0 ml/min; CL reagent: 0.125 mM TCPO and 0.75 μM TMP in CH₃CN; flow rate, 1.0 ml/min.

蛍光物質から成る、過シュウ酸エステル化学発光 (PO-CL) を検出系としたフローインジェクション分析 (FIA) システムを用い、過酸化水素及び過酸化水素生成を伴う酸化酵素基質の高感度かつ簡便・迅速な測定法を開発してきている^{5)~7)}。そこで本測定系を用いることで、高感度かつ迅速な食品中の菌評価法が構築できると考えた。つまり本研究では、FIA-PO-CL システムによる添加過酸化水素濃度の計測に基づいた、食品中菌由来のカタラーゼ活性測定法を開発し、またその食品の微生物汚染の簡便かつ迅速な評価に適用した。

2 実験

2.1 試薬

ビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキサレート (TCPO) 及びイミダゾールは東京化成製を用いた。30% 過酸化水素水溶液は和光純薬製を使用した。2,4,6,8-テトラチオモルホリノピリミド[5,4-d]ピリミジン (TMP) は既報に従って調製した⁸⁾。実験に使用した水はヤマト科学製の Autostill WG220 で処理したものをを用いた。アセトニトリル (和光純薬) は高速液体クロマトグラフ分析用を使用し、その他の試薬は特級を用いた。

2.2 FIA システム

カタラーゼ活性の測定に用いた FIA システム及び化学発光試薬として用いた TCPO 及び TMP の構造式を Fig. 1 に示す。FIA システムは LC-9A 型ポンプ (島津製作所)、7125 型インジェクター (試料注入量: 20 μl, Rheodyne),

CLD-10A 型化学発光検出器 (島津製作所)、Uni-1 型ノイズクリーナー (ユニオン) 及び FBR-1 型記録計 (東ソー) から成る。キャリアー溶液として 20 mM イミダゾール-硝酸緩衝液 (pH 7.0) 及び、化学発光試薬として 0.125 mM TCPO 及び 0.75 μM TMP を含むアセトニトリル溶液を用い、それぞれ流量 1.0 ml/min で送液した。

2.3 細菌培養

菌試料には食品に含まれる可能性のある *Escherichia coli* (E 菌, 大腸菌), *Staphylococcus aureus* (S 菌, 黄色ブドウ球菌), *Aeromonas sobria* (A 菌, エロモナス菌), *Pseudomonas putida* (P 菌, シュードモナス菌) 及び *Bacillus subtilis* (B 菌, 枯草菌) の 5 種類を選択した。菌の培養条件は、S 菌については 1% Polypepton, 0.2% Bacto Yeast Ex. 及び 0.1% MgSO₄·7H₂O を含む培地を NaOH で pH 7.0 に調整したものをを用いた。その他の菌は 1% Bacto Trpton, 0.5% Bacto Yeast Ex. 及び 1% NaCl を含む培地を用いて 30℃, 14 時間培養を行い、実験に供した。

菌数は、OD₆₀₀ = 1.0 を与える各培養液 1.0 ml を 10³~10⁵ 倍希釈し、これをプレートに塗布し、一晚培養した後、発現したコロニー数から算出した。各菌の OD₆₀₀ = 1.0 を与える菌体数は以下のとおりである。E, 1.1 × 10⁷; S, 2.5 × 10⁸; A, 2.0 × 10⁶; P, 2.1 × 10⁷; B, 7.8 × 10⁷ 個/ml。

2.4 カタラーゼ活性測定操作法

試料溶液のカタラーゼ活性測定は以下のとおり行った。食品あるいは菌試料溶液 100 μl を採り、1 mM 過酸化水素を含む培地溶液 900 μl に添加し、室温で一定時間インキュベートする。この溶液 20 μl をアセトニトリル 100 μl に加えて酵素反応を停止し、これを FIA システムに注入する。食品試料として用いた乾燥スプーンは市販品を用い、調製は製品表示に従った。つまり本品 1 袋を 300 ml 容量の三角フラスコに入れ、150 ml の熱湯で溶解した。試料は、室温中で容器のふたを解放した状態で放置した。経時的に試料の一部を採り、添加した過酸化水素濃度の変化を測定した。

3 結果及び考察

菌のカタラーゼ活性は残存している過酸化水素濃度を用いて表した。菌体数は、培養液を蒸留水で 20 倍希釈したときの OD₆₀₀ で表している。

1 mM 過酸化水素溶液とのインキュベート時間を 5 分に設定した場合の、5 種類の菌について検量線を作成した (Table 1)。過酸化水素濃度は菌数に応じて減少していき、検量線はいずれの菌においても良好な直線関係を示した ($r \geq 0.951$)。検出下限を、菌を加えていない空試験値応

Table 1 Calibration curves and detection limits for bacteria

Bacterium	Calibration range (OD ₆₀₀)	Equation* (linearity)	Detection limit	
			OD ₆₀₀ **	X 10 ⁵ of bacteria/ml
E	0.08 ~ 0.80	y = -941x + 983 (0.986)	0.07	7.7
S	0.22 ~ 0.44	y = -700x + 329 (1.000)	0.02	4.2
A	0.48 ~ 4.78	y = -45x + 731 (0.951)	0.11	86
P	0.15 ~ 1.50	y = -127x + 633 (0.978)	0.09	1.8
B	0.20 ~ 2.01	y = -307x + 620 (1.000)	0.12	300

* x, OD₆₀₀; y, H₂O₂ mM; ** detection limit = 5σ of blank peak.

Table 2 Rate equations and specific activities for bacteria

Bacterium (OD ₆₀₀)	Equation*	Specific activity**
E (0.18)	y = -0.036x + 2.61	0.20
S (0.22)	y = -0.033x + 2.47	0.15
A (4.78)	y = -0.031x + 2.89	6.49 × 10 ⁻³
P (1.50)	y = -0.045x + 2.88	0.03
B (0.42)	y = -0.017x + 2.79	0.04

* x, incubation time, min; y, log[H₂O₂ μM]; ** Specific activity; rate constant/OD₆₀₀.

答のピーク高さの標準偏差の5倍に相当する発光量を減少させる OD₆₀₀ と定義した場合、OD₆₀₀ で 0.02 ~ 0.12 に相当する菌体が検出可能であり、それらは 1.8 ~ 300 × 10⁵ 個/ml の菌体数に相当した。本法の感度は生物発光法²⁾には及ばないものの、従来のカタラーゼ法³⁾と同程度であった。

検量線の範囲内の菌の希釈培養液を用いて、インキュベート時間に対する過酸化水素濃度の減少を観察した。過酸化水素濃度を対数プロットし、得られた直線の傾き（速度定数）及びこれを菌数で除した比活性を求めた (Table 2)。最も比活性が強かった E 菌と最も弱かった A 菌の間では 30 倍の差が見られ、カタラーゼ活性は菌種により異なることが明らかとなった。

次に、E 菌を用いてその培養時間に対するカタラーゼ活性の変化を観察した (Fig. 2)。図にはカタラーゼ活性及び菌体数の経時変化を示しているが、菌のカタラーゼ活性は、菌体増殖の進行に従って増大する傾向を示した。カタラーゼ活性を溶液の OD₆₀₀ 値で除した比活性を比較したところ、培養時間 270 分以後、すなわち菌増殖の活発な指数増殖期でカタラーゼ活性が発現し始めることが明らかとなった。実験に供した菌の培養時間は、カタラーゼ活性が発現するのに十分であると考えられた。また、カタラーゼ活性を利用する方法は、菌の指数増殖期を把握する指標となり得ることが分かった。

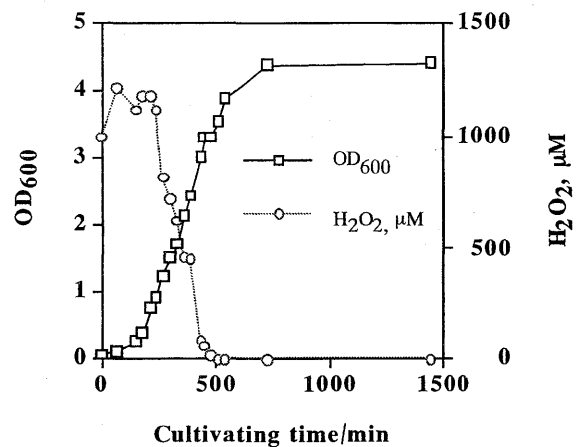


Fig. 2 Time courses of cell growth and catalase activity of *Escherichia coli*

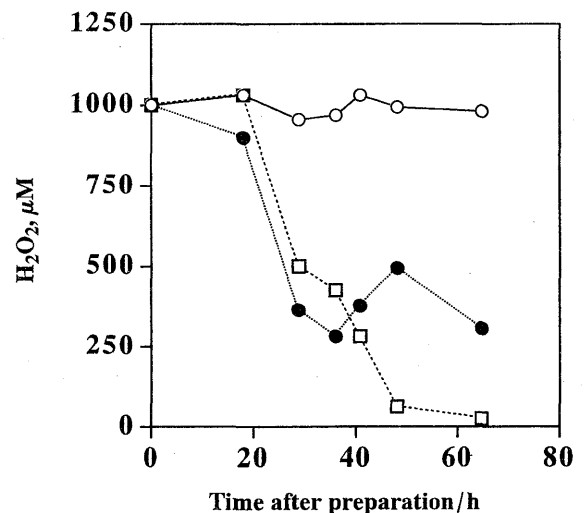


Fig. 3 Time courses of catalase activity in soups
○: consommé; ●: corn soup; □: potage soup.

本法の応用性を確認する目的で、市販の即席スープ 3 種類 (コンソメスープ、コーンスープ、ポタージュスープ)

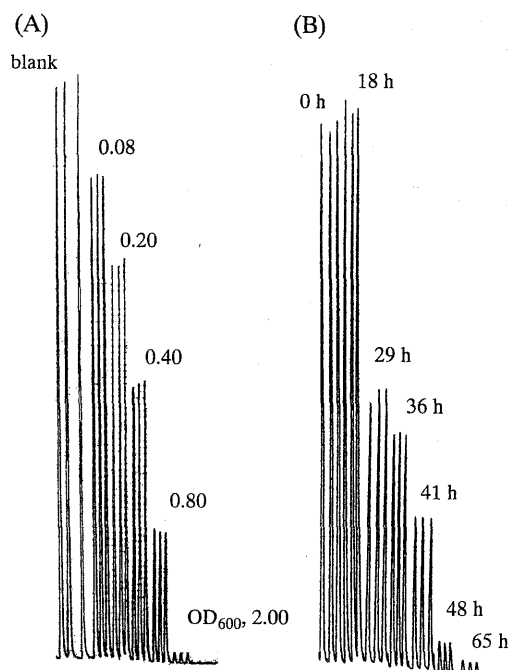


Fig. 4 Recorder responses of hydrogen peroxide obtained with *Escherichia coli* (A) and soup (B)

Incubation time, 5 min; (A) The numbers above the peaks show optical density of *Escherichia coli*, (B) The numbers above the peaks were the time after preparation of soup.

を調製後、これらを室温に放置し、その時間経過に伴うカタラーゼ活性の変化を観察した (Fig. 3)。コンソメスープについては、調製後 62 時間でもカタラーゼ活性の変化は観察されなかった。一方、コーンスープ及びポタージュスープについては、調製後 29 時間からカタラーゼ活性が発現した。このことは微生物による食品汚染の可能性を示唆している。今回検討で用いたスープの種類により、微生

物汚染の有無に差が見られたことについて、理由は明らかにできていないが、コンソメスープ成分がカタラーゼ活性を持つ種類の微生物の増殖に適さなかったことが一因とも考えられる。ポタージュスープを用いて経時変化を測定した際の記録計応答を Fig. 4 に示す。

4 結 語

今回の検討により菌のカタラーゼ活性を利用して、菌の定量を簡便かつ迅速に行うことが可能であることが明らかとなった、また、今回検討したすべての菌種がカタラーゼ活性を有しており、その比活性は菌種により異なることが判明した。今回検討した FIA 法により、菌種を特定することは不可能であるが、カタラーゼ活性の増減を測定することにより、食品の経時変化に伴う菌汚染の簡便・迅速な評価等に本法は有用であると考えられる。

(2000 年 9 月, 日本分析化学会第 49 年会にて一部発表)

文 献

- 1) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解”, (1990), (金原出版).
- 2) 小野晴寛: 食品工業, **38**, 32 (1995).
- 3) 大橋 実, 押谷五月, 大塚 恵, 荒川信彦: 食品衛生学雑誌, **32**, 71 (1991).
- 4) 大橋 実: 食品と開発, **27**, 18 (1992).
- 5) K. Nakashima, K. Maki, S. Akiyama: *Biomed. Chromatogr.*, **4**, 105 (1990).
- 6) K. Nakashima, N. Hayashida, S. Kawaguchi, S. Akiyama, Y. Tsukamoto, K. Imai: *Anal. Sci.*, **7**, 715 (1991).
- 7) M. Wada, N. Kuroda, S. Akiyama, K. Nakashima: *Anal. Sci.*, **13**, 945 (1997).
- 8) K. Nakashima, S. Akiyama, Y. Tsukamoto, K. Imai: *Dyes Pigm.*, **12**, 21 (1990).