

## (9) 分子生物学的手法を利用した水産食品等の品質評価技術に関する研究開発

(平成20年度～平成22年度)

### 研究のねらい

食品に対する消費者の価値観は多様化しており、安価だけでなく品質の確かで安全なものも求められている。このような消費者ニーズに対応していくことは、水産食品製造業が主産業である函館地域において、常に重要な課題となっている。特に、「イカ塩辛」を代表とした熟成期間を要する食品では、品質の変化に微生物が関与することが良く知られている。しかしながら、従来の培養法では微生物種の同定や微生物相の変化などの評価に多大な労力と時間を要するため、より迅速に評価できる新たな技術の開発が求められている。近年の分子生物学の発展により、食品分野においても関連微生物の同定に DNA 情報を用いた分子生物学的な分析手法が用いられている。そのひとつである T-RFLP 法 (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) は、培養を伴わず複数の微生物種を同時に解析可能な手法であり、環境微生物や腸内フローラの集団解析などに利用されている。

そこで本研究では、イカ塩辛を中心とした地域水産食品を対象に、関連する微生物種の把握と微生物相の変化等のモニタリング技術の開発を目的に T-RFLP 法の利用を検討した。

### 研究の方法

イカ塩辛中に存在する微生物を調べるため、まず、地域加工業者が製造している熟成タイプの塩辛製品(食塩濃度約9%)について、熟成5日目、12日目、14日目を試料とし、NaCl無添加および3% NaCl添加標準寒天培地を用いた塗抹培養法により生菌数の測定を行った。次に、培地上に検出された微生物について、コロニーの性状観察から、形態、大きさ、色調を指標に分類した後、異なる性状のものをそれぞれ分離培地で培養し、DNA分析による簡易同定を行った。DNAの抽出は、溶菌酵素であるアクロモペプチダーゼ(和光純薬株)とDNA抽出試薬である InstaGene Matrix( BIORAD 社)を用い、16S rDNA の前半(約500bp)を増幅可能なユニバーサルプライマーによる PCR 増幅を行った。得られたそれぞれの増幅産物の塩基配列の解読は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いたダイレクトシーケンス法により行った。解読終了後の塩基配列情報を用いて、公共の DNA データベースである GenBank 内のデータとのホモロジー検索 (BLAST) から微生物種の簡易同定を行った。

また、T-RFLP 法の基礎的条件の確立を目的に、菌体からの DNA 抽出に関する検討を行った。グラム陽性菌である *Staphylococcus epidermidis* を約  $10^8$  個添加した滅菌リン酸緩衝生理食塩水 1ml を試料とし、シリカビーズによる菌体破碎時間(振倒速度 2600 回転/分で 30 秒間、10 分間、30 分間)や抽出法 (FastDNA SPIN Kit for Soil( QBiogene 社)および塩化ベンジル法)における抽出 DNA 量を比較した。

### 研究成果の概要

イカ塩辛製品中の生菌数は 1g あたり約  $10^5$  個～ $10^7$  個であり、熟成 14 日目の試料が  $1.2 \times 10^7$  と最も多く検出された。また、3% NaCl 添加培地では無添加培地に比べてコロニー数が多く検出される傾向が見られ、14 日目の試料では約 8 倍の差が認められた。この結果から、塩辛中には好塩微生物が多く存在しており、培地への NaCl の添加は多くの微生物種を分離するのに有効と考えられた。そこで、3% NaCl 添加標準寒天培地からコロニーの性状が異なる微生物を分離し、DNA 分析による簡易同定を行った結果、その多くは *Staphylococcus* 属、*Micrococcus* 属に分類される微生物であった。その他、乳酸菌である *Tetragenococcus* 属や *Vagococcus* 属も検出された。

DNA の抽出について菌体破碎時間および抽出法を検討した結果、いずれの抽出法も 10 分間の振倒処理条件で DNA 量が最も多くなり、また、市販キットに比べ塩化ベンジル法による抽出 DNA は夾雑物の混入が少ないことが分かった。

本年度で得られた微生物種に関する知見と DNA 抽出条件を基本に、今後、T-RFLP 法による塩辛中の微生物種のモニタリングについて検討していく予定である。

担当者 清水健志、吉岡武也、大坪雅史