

(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

16S リボソーム RNA 遺伝子を標的とした T-RFLP 法によるイカ塩辛中の微生物相の解析を検討するにあたり、塩辛中に含まれる様々な微生物種の DNA を増幅するため、公共の DNA データベースである Ribosomal Database Project (RDP) を用いたコンピュータシミュレーションによるユニバーサルプライマー配列および T-RFLP 法による微生物種の識別に有効な制限酵素の探索を行った。また実際の塩辛試料を用いた微生物 DNA の解析を検討するため、函館地域のイカ塩辛のモデル試料を調製した。まず地域加工業者が製造している製品を参考に、イカ肝臓添加量をイカ肉重量に対し 8%、食塩添加量を塩辛全量に対し 5.8%とした塩辛を作成した。複数種の微生物が混在する通常の塩辛では解析が複雑になることから、本試験では単純なモデル系として、さらに塩辛をオートクレーブ滅菌後に人工的に *Escherichia coli* を 1g あたり約 $10^2 \sim 10^6$ を接種した試料を調製した。このモデル試料を等量の滅菌リン酸緩衝生理食塩水で懸濁した後、シリカビーズおよび塩化ベンジル抽出法による微生物 DNA の抽出・PCR 増幅および蛍光標識プライマー・制限酵素を用いた T-RFLP 法による解析を行った。

研究成果の概要

様々な微生物の DNA 増幅に有効なプライマー配列として *E. coli* の 16S リボソーム RNA 遺伝子上の 5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3' (10 番目～25 番目)、5'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-3' (516 番目～532 番目)、5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3' (1392 番目～1406 番目)、5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (1492 番目～1510 番目) などが知られている。RDP を用いたコンピュータシミュレーションの結果、5'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-3' と 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' の組み合わせが最も多くの微生物種を増幅できると考えられた。また、昨年度の研究で塩辛中に検出された *Micrococcus* 属、*Staphylococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Tetragenococcus* 属、*Vagococcus* 属および文献等で分離の報告があった *Achromobacter* 属、*Bacillus* 属、*Brevibacillus* 属、*Corynebacterium* 属、*Escherichia* 属、*Moraxella* 属、*Vibrio* 属の標

的遺伝子について、56 種類の制限酵素を用いた消化シュミレーションを行った結果、比較的良好に識別できる制限酵素が Sau3AI であることが分かった。

E. coli 添加塩辛試料を用いて微生物 DNA の抽出および PCR 増幅を検討した結果、予想されるサイズの増幅 DNA が確認されたのは約 10^6 個/g 添加した試料のみであった。また、Sau3AI を用いた T-RFLP 法による解析の結果、シュミレーションでの *E. coli* の主な消化断片 (189bp) とほぼ一致する 188bp の消化断片を検出することができた。

熟成期間の長い伝統的な製造法による塩辛では一般細菌数として 10^8 程度含まれており、本研究での抽出条件により発酵過程における主要な微生物種の検出は十分可能と考えられたが、近年の短期熟成型塩辛では 10^6 以下のものが多いため、T-RFLP 法の利用には今後さらに検出感度を高めていくことが課題である。

担当者 清水健志、吉岡武也、大坪雅史、青木 央