

(7) 生物情報の有効活用と地域バイオマス資源の高付加価値化に関する研究開発 (平成 20 年度～平成 22 年度)

研究のねらい

北海道において食品製造は重要な産業であるが、近年、消費者から食の安心・安全が強く求められるようになった。食の安心・安全を確保することは地域のバイオマス資源を活用した北海道の食品の信頼性を高め、付加価値を高めることとなる。食品製造業では、微生物危害を防止するために、迅速な微生物の検査法を求めているが、様々な食品において、カビや酵母の繁殖による消費者からのクレームの発生事例が多く、これらの迅速な検査を求めている。しかし、従来の微生物の検査は培養法により行われ、数日間の時間を要するが、カビや酵母の検査では一週間を要し、時間がかかるのが問題である。そこで、本研究では、生物情報を有効活用して設計された DNA プローブを用いた培養併用 FISH 法による迅速な真菌（カビ・酵母）測定法を開発する。平成 21 年度は、これまで構築した手法の食品試料への応用を検討した。

研究の方法

1) プローブデザイン

rRNA を標的とする真菌の特異検出の可能性のある蛍光オリゴヌクレオチドプローブとして、Goncalves らの報告 (Rev. Iberoam. Micol. 23, 194-198 (2006)) を参考に、5'末端を TAMRA 標識した EUK516 (5' - ACC AGA CTT GCC CTC C -3') を合成した。

2) 供試真菌菌株

真菌としてカビ *Aspergillus niger* ATCC16404 を用い、その孢子懸濁液を調製した。

3) 食品試料懸濁液の調製

食品として食パンを用いた。食パン 10g を 90ml の PYD 培地でホモジェネートした後 (1g/ml)、1ml を 9mlPYD 培地で希釈 (0.1g/ml) した。これに *Aspergillus niger* ATCC 16404 孢子懸濁液を添加して食品試料懸濁液とした。

4) FISHFC による真菌の検出

食品試料懸濁液を PP フィルターで吸引ろ過し乾燥させた。PP メンブレンフィルター (直径 47mm、ポアサイズ 0.45 μ m、GH Polypro、Life Sciences 社) で吸引ろ過し乾燥させた。フィルターを PYD 培地に置き、25°C で貼付培養を 24 時間行った。次に、固定としてエタノールに 30 分浸した後乾燥した。ハイブリダイゼーションを次の通り行った。PP フィルターにハイブリダイゼーションバッファー (0.9M NaCl、20% ホルムアミド、20mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.01% SDS) 160 μ l を加え、5 μ M の EUK516 を 20 μ l 添加した。46°C で 1 時間ハイブリダイゼーション反応させた。次に洗浄を次の通り行った。46°C にて洗浄液 (0.9M NaCl、20mM Tris-HCl、0.02% SDS、0.05M EDTA)

に上記フィルターを移し 20 分間浸して洗浄した。その後、DW ですすぎ、ろ紙にのせ暗所で乾燥させた。次に同フィルター中の蛍光マイクロコロニーを蛍光顕微鏡（対物レンズ×4 または×40、CCD カメラ）下にて観察した。

5) 培養法による真菌数測定

PDA 平板培地を用い塗沫培養を 25°C、5 日間行い、生じた真菌コロニーを計数した。

研究成果の概要

同一調製試料について、FISHFC 法並びに培養法による真菌数測定をそれぞれ 3 回繰り返した。その結果、FISHFC の蛍光顕微鏡観察では、くもの巣や曲線上構造が観察され、これは供試菌株であるカビ (*Aspergillus niger* ATCC16404) に特長的なマイクロコロニーの形態と推定した。FISHFC 計数値(CFU/g)は、それぞれ 1.5×10^3 、 1.6×10^3 、 1.7×10^3 だった。平均値と標準偏差は $(16 \pm 1.0) \times 10^2$ だった。培養法計数値は、それぞれ 1.6×10^3 、 1.6×10^3 、 1.9×10^3 だった。平均値と標準偏差は $(17 \pm 1.8) \times 10^2$ だった。両手法の値について統計解析を T 検定により実施したところ、危険率 5%以上で有意な差は認められなかった。以上より、FISHFC による真菌数測定は、培養法より迅速に正確に計数でき、食品として食パンにも適応できた。今後、様々な食品試料への適応性について検討したい。

担当者 大坪雅史、齊藤美帆、鳥海滋

