

(9) 地域伝統食品の品質向上に関する研究開発

(平成 23 年度～平成 25 年度)

1. 研究のねらい

消費者の食品に対するニーズは時代と共に変化するが、品質については常に高いものが求められている。函館地域の特産品はイカや昆布などの地域食材を利用した伝統食品が多く、今後も売れる商品を開発するためには、消費者ニーズに対応した新たな設計が必要である。しかしながら新たに開発される商品では原料の配合比や加工方法の変更により、品質の低下を招く恐れもあることから、品質向上に関わる知見を集積していくことは重要と考える。そのため消費者ニーズの変化に迅速に対応可能な品質評価手法や従来の加工方法の利点を把握することは、新たな商品を開発する上で有益と考えるが、地域の伝統食品について、これらに関する新規な科学的知見は乏しい。

これまでに DNA 分析を用いたイカ塩辛中の菌叢解析手法の開発を検討してきたが、1g 当たり百万個以上の菌数濃度が解析には必要であり、検出感度が低いことが課題であった。食品における DNA 分析の難しさの 1 つとして、各食品に含まれる様々な成分（調味料等）が分析を阻害することが知られている。近年、環境中の有用菌や新規微生物の探索が精力的に行われており、特に阻害物質が多く含まれている土壌からの微生物 DNA の抽出法の改良が進んでいる。

そこで本研究では、イカ・昆布を主原料とした地域伝統食品について、それぞれに適した迅速な微生物学的品質評価法を開発するため、DNA 抽出などの試料調製法について検討し、原料比率や熟成期間等と微生物学的品質との関連について DNA 分析法を用いて調べることにした。

2. 研究の方法

平成 23 年度は塩辛等に含まれる微生物の検出感度の向上を目的に、土壌試料中の微生物 DNA 抽出法を参考とした DNA 分析法の検討を行った。試験にはオートクレーブ処理したイカ塩辛 1/2 希釈液にグラム陰性菌として *Escherichia coli*、グラム陽性菌として *Staphylococcus epidermidis* をそれぞれ 1ml 当たり数十～数千万個となるように濃度調製した試料を用いた。DNA 抽出法は、土壌からの微生物 DNA 抽出法として一般的に利用されているビーズによる物理破砕と溶媒抽出を組み合わせた方法を用いた。検出感度は、16S rDNA の部分断片を増幅可能なユニバーサルプライマー（5´-TGCCAGCAGCCGCGGTA-3´と 5´-GGTTACCTTGTTACGACTT-3´）を蛍光標識して用いた PCR 法による DNA 増幅で評価した。さらに増幅 DNA を制限酵素 Sau3AI で消化し、菌叢解析手法の一つである T-RFLP 法への利用を検討した。

3.研究成果の概要

本微生物 DNA 抽出法を用いた結果、全ての試料から PCR 法による DNA 断片の増幅が確認できた。また、アガロースゲル電気泳動による断片の増幅サイズの測定から目的の DNA 領域を増幅されていることが確認できた。

また T-RFLP 法による菌叢解析の結果、数十個/ml を除く全ての試料で *E. coli* 及び *S. epidermidis*由来と推定される 189塩基及び260塩基のサイズの蛍光ピークを検出できた。

また、各試料間のピークについて蛍光強度を比較したところ、数百個/ml 以下の試料では蛍光強度が急激に減少し、解析精度が低下することが分かった。

これら結果から、本 DNA 抽出法を用いた塩辛中の微生物種の検出感度は、DNA 分析による菌叢解析精度を考慮すると数千個/ml と考えられた。これまでの抽出法では検出感度が数百万個/ml であり、検出感度が約千倍に向上されたことから、菌数の少ないイカ塩辛を試料とした DNA 分析にも利用可能な方法と期待できる。

担当者 清水健志、木下康宣、大坪雅史、青木央、鳥海滋、吉岡武也