（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）

1.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、従来のカビや酵母の検査は、5 日以上を要し、時間がかかるのが問題であった。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）測定法を開発してきた。平成 22 年度は、これまで構築した培養併用 FISH 法の簡易化を検討した。

2.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が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）供試真菌株

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

３）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℃、5 日間行い、生じた真菌コロニーを計数した。

４）真菌用メンブレンフィルターデバイスの試作

親水性ポリプロピレンを素材とする円形メンブレンフィルター(直径 47mm、ポアサイズ 0.45μm)を高さのあるリング形状ポリプロピレン（直径 47mm）に貼り付けた構造のデバイスを試作し、真菌用メンブレンフィルターデバイスとした。

3.研究成果の概要

（１）FISHFC による真菌数測定の簡易化の検討

簡易化 FISHFC を構築し手順を次の通りとした。食品試料懸濁液を真菌用メンブレンフィルターデバイスで吸引ろ過し、真菌用メンブレンフィルターデバイスを PYD 培地に置き、25℃で貼付培養を 24 時間行った。次に、その真菌用メンブレンフィルターデバイスを、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。真菌用メンブレンフィルターデバイス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]）1.5ml と 5μM の EUK516 を 20μl を添加した。46℃で 1 時間ハイブリダイゼーション反応させた。次に 46℃にて洗浄液

（0.9M NaCl、20mM Tris-HCl、0.02% SDS、 0.05M EDTA）10ml を真菌用メンブレンフィルターデバイスをに添加し 20 分間浸して洗浄した。その後、DW ですすぎ、乾燥させた。次に真菌用メンブレンフィルターデバイス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）下にて観察計数した（1 時間)。または、同デバイスをすでに試作した FISHFC 信号自動計数装置に供しマイクロコロニーを自動計数した（3 分)。本法は、培養法より迅速となった。また、真菌用メンブレンフィルターデバイスを用いることで、FISHFC の全工程が大幅に簡易化できた。

（２）真菌数測定における簡易化 FISHFC と培養法の比較

調製した供試真菌試料懸濁液について、簡易化 FISHFC 法（蛍光顕微鏡目視計数、自動計数）並びに培養法による真菌数測定をそれぞれ行った。試験を 2 回実施した結果、培養法と簡易化 FISHFC 法（蛍光顕微鏡目視計数）の計数値は、ほぼ同じだったが、簡易化 FISHFC 法（自動計数）の値は、これらの約 1/10 の値だった。以上より、簡易化 FISHFC 法において、蛍光顕微鏡目視計数法は、正確で 27 時間で迅速に結果が得られたが、計数に手間がかかった。一方、自動計数は手間なく 26 時間に結果が得られたが、値は低く不正確だった。理由は、自動計数プログラムの真菌認識条件が不充分なためで、今後、その条件の再検討が課題となる。

担当者　大坪雅史、斉藤美帆、鳥海　滋