

(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)

1. 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。

2. 研究の方法

イカ塩辛のモデル試料を作成して 16S リボソーム RNA 遺伝子 (16S rDNA) を標的とした T-RFLP 法による微生物相の解析を検討した。H21 年度では滅菌塩辛希釈液に *Escherichia coli* を添加して DNA 抽出法などを検討したが、本年度は *E. coli* の他、グラム陽性菌として *Staphylococcus epidermidis* を 106～107 個/g となるように添加した試料を用いた。昨年度と同様の方法で試料から DNA を抽出した後、蛍光標識プライマー (FAM 標識 5′-TGCCAGCAGCCGCGTA-3′ と 5′-GGTTACCTGTTACGACTT-3′) を用いた PCR により 16S rDNA 部分断片を増幅し、制限酵素 Sau3AI により消化した後、T-RFLP 法の解析を行った。また、当センターで調製したイカ塩辛及び市販イカ塩辛についても T-RFLP 法による微生物相解析の検討を行った。

3. 研究成果の概要

E. coli 及び *S. epidermidis* を添加した試料を T-RFLP 法で解析した結果、187.68bp 及び 257.6bp のメインピークが検出された。本試験で用いた *E. coli* 及び *S. epidermidis* の 16S rDNA の Sau3AI 消化断片はそれぞれ 189 bp 及び 260 bp であることから、検出されたピークは 1～2 塩基短く同定されることが分かった。

また、当センターで作成したイカ塩辛及び市販品について解析を行った結果、熟成期間やメーカーの異なる試料で検出されるピークに違いが確認された。ピークの本数は微生物の種類を反映していると考えられることから、塩辛中の微生物相の変化をモニタリングす

ることが可能であると考えられた。

さらに検出されたピークについて、H20～21 年度の結果及び文献を基に微生物種 (*Micrococcus* 属、*Staphylococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Tetragenococcus* 属、*Vagococcus* 属、*Achromobacter* 属、*Bacillus* 属、*Brevibacillus* 属、*Corynebacterium* 属、*Escherichia* 属、*Moraxella* 属、*Vibrio* 属) を限定して推定した結果、該当しないピークも一部見られたが、熟成 7 日目及び 14 日目に見られた約 258 bp のピークは *Staphylococcus* 属、市販品のメインピークである 188.82 bp は *Escherichia* 属及び *Vibrio* 属、842.66 bp は *Bacillus* 属、*Corynebacterium* 属、*Streptococcus* 属等のグラム陽性菌であると考えられた。

本研究では検出ピークが実際のサイズと異なっていたことから、詳細に微生物種を推定することは困難であった。サイズが異なる理由は、微生物検出とサイズマーカーに用いる蛍光色素（分子量）の種類の違いにより電気泳動度が異なるからである。T-RFLP 法では微生物とマーカーを区別するために複数種類の蛍光色素を用いる必要があるため、より正確にサイズを決定するには蛍光色素の泳動度を考慮した補正方法が今後の課題と考える。

担当者 清水健志、吉岡武也、大坪雅史、青木 央

