

水産物由来耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* の食品機能性に関する研究

永瀬 光俊¹, 會見 忠則²

¹島根県産業技術センター, ²鳥取大学農学部

概要 耐塩性乳酸菌である *Tetragenococcus halophilus* は、魚醤油、醤油や味噌においてもその存在が知られているが、近年では、抗アレルギー作用等の機能性も報告されるなど有望な細菌といえる。一方、塩辛類においては、微生物の働きは風味の付与など限定的なものとして、今まで注目されてこなかった。我々はこれまでの塩辛類他の水産発酵食品に関する研究において、高塩濃度のためにほぼ無菌であると思われてきた塩辛類に *T. halophilus* が多数存在することを確認した。そこで、本研究ではプロバイオティクス効果を有する新しい水産発酵食品の開発を最終目標として、水産物由来の *T. halophilus* について諸性質を明らかにすることを目的とした。

市販サバ塩辛 12 サンプル中 9 サンプル、サバ 15 個体中 11 個体の内臓から 15% NaCl 耐性細菌を分離することができた。分離菌株のうち、30 菌株について 15% NaCl 加ヒスチジンプロスで 10 日間培養したときのヒスタミン生産量を測定した。その結果、28 菌株が 1,100~2,300 ppm のヒスタミンを生産し、これらをヒスタミン生産菌とした。他の 2 菌株は著しくヒスタミン生産量が少ないため、これらをヒスタミン非生産菌とした。また、この 30 菌株について生理学的性質を調べたところ、全てがグラム陽性球菌、カタラーゼ陰性で 18% NaCl 加 MRS 寒天培地上で生育して炭酸カルシウムを溶解した。これらの結果から、分離菌株は全て *Tetragenococcus* 属に属する細菌であると推定した。

ヒスタミン生産菌 A 124 と非生産菌 A 114 は、それぞれ *T. halophilus* の 16S rDNA アミノ酸配列と 99% 以上の相同性を示した。ヒスタミン生産菌 A 124 について pH と増殖の関係を調べたところ、15% NaCl 加 BPG 液体培地での増殖可能な pH の閾値は 5.0~5.5 の間にあることが分かった。

サバ 5 個体すべての内臓から *T. halophilus* の 16S rDNA を検出できた。このことから、サバ内臓に普遍的に *T. halophilus* が存在していることが示唆された。また、5 個体中 3 個体から *hdcA* を検出できた。このことから、サバ内臓に存在する *T. halophilus* の中に *hdcA* をもっているものが存在する可能性が示唆された。

ヒスチジン脱炭酸酵素の発現調節について調べた。各 pH における *hdcA* の発現量は pH 5.5 のときに最も小さく、次いで pH 5.0 のときに pH 5.5 のときの約 1.6 倍で 2 番目に小さかった。pH 4.0、6.0 では pH 5.5 のときのそれぞれ約 8.5、4.1 倍に増加した。これらのことから、サバ塩辛中で分離菌株 A 124 の *hdcA* 遺伝子発現を抑えるにはサバ塩辛の pH を 5.0~5.5 の範囲に保つことが有効であると考えられた。

1. 研究目的

塩辛類は、魚介類および内臓に、約 10% から飽和量の食塩を加えて熟成させた水産発酵食品である。全国各地で様々な魚介類から作られ、有名なものとして、イカ、ウニ、酒盗(カツオ)、うるか(アユ)、このわた(ナマコ)、めふん(サケ)などが挙げられる。世界的には、アミ類の塩辛が東アジア各地に見られるが、このように多様な塩辛が存在

するのは日本と韓国くらいである。同様に発酵過程に食塩を用いる味噌や醤油は、麹菌、酵母菌、乳酸菌など様々な微生物の働きが知られているが、塩辛類については自己消化酵素の働きが主体とされ、微生物の働きは風味の付与など限定的なものとしてきた。

しかしながら、我々はこれまでの塩辛類他の水産発酵食品に関する研究において、高塩濃度のためにほぼ無菌

であると思われてきた塩辛類にも耐塩性乳酸菌である *Tetragenococcus halophilus* が多数存在し、また魚の内臓からも分離されることを見いだした。*T. halophilus* は、魚醤油(引用 1, 2, 3)、醤油や味噌においてもその存在が知られているが、近年では、抗アレルギー作用等(引用 4, 5)の機能性も報告されるなど有望な細菌といえる。

そこで、本研究ではプロバイオティクス効果を有する新しい水産発酵食品の開発を最終目標として、水産物由来の *T. halophilus* について諸性質を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 細菌の分離

2.1.1 市販サバ塩辛の 15% NaCl 存在下で増殖可能な細菌数と分離

15% NaCl 加 BPG 寒天培地に 200 μ l/枚ずつ塗布してコーンラージ棒で塗り広げた。培地表面を乾燥後、プレートにフタをしてパラフィルムを巻き、30°C で 10~14 日間培養した。

2.1.2 サバ塩辛の塩濃度測定

塩濃度計 (APAL-ES1, アズワン) で測定し、サバ塩辛の塩濃度とした。

2.1.3 サバ塩辛の pH 測定

pH 計 (ラコムテスター pH 計防水型, アズワン) で測定した。

2.1.4 サバ内臓からの 15% NaCl 存在下で増殖可能な細菌の分離

15% NaCl 加 BPG 平板培地に原液および希釈液を 200 μ l/枚ずつ塗布してコーンラージ棒で塗り広げた。培地表面を乾燥後、プレートにフタをしてパラフィルムを巻き、30°C で 14 日間培養した。

2.2 ヒスタミン生産試験

2.2.1 培養方法

2.1.1 で出現したコロニーを 30°C で 7 日間静置培養した後、ねじ口試験管において 30°C で 10 日間静置培養した。

2.2.2 ヒスタミンの定量

チェックカラー Histamine (キッコーマン) を用いて定量した。

2.3 分離菌株の生理学的性質

2.3.1 グラム染色

グラム染色はフェイバーG「ニッスイ」(日本製薬)を用いて行った。

2.3.2 カタラーゼ試験

培養液に 3% 過酸化水素水を滴下して直ちに気泡が確認されたものを陽性とし、そうでないものを陰性とした。

2.3.3 18% NaCl 存在下での増殖能および乳酸生成

分離菌株を 15% NaCl 加 BPG 液体培地で培養後、滅菌した爪楊枝で培養液に触れて菌をとり、 ϕ 90 mm のシャーレ 1 枚当たり 15 ml 注いで調製した 1.5% CaCO₃、18% NaCl 加 MRS 寒天培地に爪楊枝を刺して植菌した。植菌後シャーレにフタをしてパラフィルムを巻いて 30°C で 30 日間培養し、生育およびクリアゾーンの有無を確認した。

2.3.4 *hdcA* 遺伝子、および *Tetragenococcus halophilus* の 16S rDNA に特異的な領域の PCR による検出

hdcA の増幅は、Table 1 に示したプライマーを使用し、1 反応当たり 10 μ l の系で行った。PCR 反応は初期変性 94°C、5 分間を 1 サイクル、続いて変性 94°C、30 秒とアニーリング 55°C、30 秒と伸長 72°C、30 秒を 30 サイクル行い、最終伸長反応 72°C、10 分間で行った。

Tetragenococcus halophilus の 16S rDNA 特異的配列の増幅は、1 反応当たり 10 μ l の系で行った。PCR 反応は初期変性 95°C、2 分間を 1 サイクル、続いて変性 95°C、15

Table 1. 使用した Primer

Primer	配列 (5'-3')	引用
193f	AGCTCAAAGGCGCTTTAC	引用①Annelies Juste (2007)
480r	TTCTGGTCAGCTACCGTC	引用①Annelies Juste (2007)
Hm-R	CACCATTTTCGCCGGCAGTG	引用③Satmiら (2008)
Hm-F	TGTTTCGTATGACCGTGCGG	引用③Satmiら (2008)

秒とアニーリング・伸長 62°C、30 秒を 30 サイクルで行った。

2. 4 16S rDNA 配列の決定と帰属分類群の推定

2. 4. 1 16S rDNA の増幅

16S rDNA の増幅はコロニーダイレクト PCR 法により行った。用いたプライマーは Table 2 に示した 27f および 1525f である。15% NaCl 加 BPG 寒天培地上に生育させた分離菌株 A 124、および 116 のシングルコロニーを滅菌した爪楊枝でとり、PCR 反応液に懸濁した。PCR 条件は、初期変性 94°C、2 分間を 1 サイクル、続いて変性 94°C、60 秒とアニーリング 50°C、30 秒と伸長 72°C、90 秒を 30 サイクル行い、最終伸長反応 72°C、10 分間で行った。

2. 4. 2 16S rDNA の PCR 産物の精製と濃度推定

2. 4. 1 で得られた PCR 産物の精製は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いた。濃度推定は、マーカーのバンドの明るさと比較することにより行った。サイズマーカーは Gene Ladder Wide 1 (ニッポン・ジーン) を使用した。

2. 4. 3 シークエンシング反応と帰属分類群の推定

濃度推定後、Big Dye[®] Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ) を用いてシークエンシング反応を行った。

得られた塩基配列は Genetyx-SV/RC Ver.9 (ジェネティクス) で編集し、Blast プログラム (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) により相同性検索を行った。

2. 5 リアルタイム PCR によるサバ塩辛中の *hdcA* 遺伝子と *T. halophilus* の 16S rDNA の定量

2. 5. 1 Template DNA の調製

2. 5. 1. 1 サバ塩辛からの DNA 抽出

DNA 抽出は DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて行った。

2. 5. 1. 2 菌懸濁液からの DNA 抽出

15% NaCl 加 BPG 寒天培地上の分離菌株 A 124 のシングルコロニーを、液体培地 (pH 7.0) に移植して 30°C で 2 日間培養した。2 日後、新たな培地に培養液を移植し、さらに 30°C で 3 日間培養した。培養後、10⁴ 希釈液まで調製したサンプルから DNA を抽出した。DNA 抽出は DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて行った。

2. 5. 1. 3 検量線用の既知濃度 DNA 溶液の調製

16S rRNA 遺伝子溶液は次のように調製した。*Tetragenococcus halophilus* と同定した菌株から回収した DNA を Template として Primer 27f と 1525r を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅し、精製、濃度推定後、5 × 10³ ng ~ 5 × 10⁷ ng/2μl まで 10 倍ずつ滅菌水で段階希釈し、濃度既知 DNA 溶液とした。

hdcA の template DNA 溶液は次のように調製した。分離菌株 A 124 から DNA を抽出し、Primer "1-" と "ARF2" を用いて PCR を行い、精製、濃度推定後、5 × 10³ ~ 5 × 10⁷ ng/2μl まで 10 倍ごとに滅菌水で希釈して調製した。

2. 5. 2 リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は THUNDERBIRD[™] SYBR[®] qPCR Mix を用いて行った。プライマーは Table 3 に示した。PCR 反応は初期変性 95°C、2 分間を 1 サイクルおこない、続いて変性 95°C、15 秒とアニーリング・伸長 62°C、30 秒を 40 サイクル行った。

Table 2. 使用した Primer

Primer	配列 (5'→3')	方向	由来
27f	AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG	forward	
1525r	AAAGGAGGTGATCCAGCC	reverse	
1-	GCTTCATATCTGCATCGTTC	reverse	pHDCの17915-17896
ARF2	AGACCTATTACTGCCATGCT	forward	pHDCの15242-15261

Table 3. 使用した Primer

Primer	配列 (5'→3')	引用
193f	AGCTCAAAGGCGCTTTAC	引用⑥Annelies Juste (200
480r	TTCTGGTCAGCTACCGTC	引用⑥Annelies Juste (200
Hdc1	TTGACCGTATCTCAGTGAGTCCAT	引用⑦M. Fernandez (2006
Hdc2	ACGGTGATACGAAACAATACCATC	引用⑦M. Fernandez (2006

2. 5. 3 吸光度と生菌数の関係(検量線)

15% NaCl 加 BPG 寒天培地上の分離菌株 A 124 のシングルコロニーを、液体培地(pH 7.0)に移植して30°Cで2日間培養した。2日後、新たな培地に培養液を移植し、さらに30°Cで3日間培養した。培養後、菌体を洗浄し、波長600 nmにおける吸光度が0.562、0.300、0.124のものをそれぞれ原液として、10倍ずつ段階希釈し、希釈液30°Cで培養した。1週間後、出現したコロニー数を測定し、検量線を作成した。

2. 6 pHと増殖の関係

分離菌株 A 124 について、その増殖と pH の関係について調べた。

2. 7 サバ内臓からの *T. halophilus* の 16S rDNA と *hdcA* 遺伝子の検出

2. 7. 1 DNA 抽出

DNA 抽出は DNeasy Tissue Kit(QIAGEN)を用いて行った。

2. 7. 2 *Tetragenococcus halophilus* の 16S rDNA の増幅

PCR 反応は初期変性 94°C、5 分間を 1 サイクルおこない、続いて変性 94°C、30 秒とアニーリング 55°C、30 秒と伸長 72°C、30 秒を 40 サイクル行い、最終伸長反応を 72°C、7 分間で行った。使用した Primer は、193f と 486r である。

2. 7. 3 *hdcA* の増幅

PCR 反応は初期変性 95°C、2 分間を 1 サイクルおこない、続いて変性 95°C、15 秒とアニーリング・伸長 62°C、30 秒を 40 サイクル行い、最終伸長反応を 72°C、7 分間で行った。使用した Primer は、HDC1 と HDC2 である。

2. 7. 4 アガロースゲル電気泳動による特異的バンドの検出

アガロースゲル電気泳動法を用いて、特異的なバンドがあるかどうか調べた。

2. 8 ヒスチジン脱炭酸酵素の発現調節

2. 8. 1 RNA 抽出

RNAProtect Bacteria Reagent(QIAGEN)を用いて RNA の抽出を行い、抽出した RNA は RNeasy Mini Kit を用いて精製した。

2. 8. 2 逆転写反応

RNA 溶液の逆転写反応は PrimeScript[®] RT reagent Kit

(TAKARA)を用いて行った。

2. 8. 3 リアルタイム PCR

2. 5. 2 に示した方法に従ってリアルタイム PCR を行った。

2. 8. 4 リアルタイム PCR のデータ解析

データ解析には Line gene Fluorescent Quantitative Detection System(Bio Flux)を使用した。リアルタイム PCR 反応後、*hdcA*、*T. halophilus* の 16S rDNA のコピー数をそれぞれコピー数既知のサンプルから作成した検量線を用いて算出した。PrimeScript RT Enzyme Mix I ありの逆転写反応液を鋳型にしてリアルタイム PCR により求めた *hdcA* のコピー数から、PrimeScript RT Enzyme Mix I なしの逆転写反応液を鋳型にしてリアルタイム PCR により求めた *hdcA* のコピー数を引いた値を *hdcA* の発現量とした。また、PrimeScript RT Enzyme Mix I ありの逆転写反応液を鋳型にしてリアルタイム PCR により求めた *T. halophilus* の 16S rDNA のコピー数から、PrimeScript RT Enzyme Mix I なしの逆転写反応液を鋳型にしてリアルタイム PCR により求めた *T. halophilus* の 16S rDNA のコピー数を引いた値を *T. halophilus* の 16S rDNA の発現量とした。求めた *hdcA* の発現量を、*T. halophilus* の 16S rDNA のコピー数で割ることにより、*hdcA* の発現量を *T. halophilus* の 16S rDNA の発現量で補正した相対定量値を算出した。

3. 研究結果

3. 1 細菌の分離

3. 1. 1 市販サバ塩辛中の 15% NaCl 存在下で増殖可能な細菌数と分離

市販サバ塩辛 12 サンプルのうち 9 サンプルから 15% NaCl 耐性細菌を検出することができた。また、全ての製造者のサバ塩辛から 15% NaCl 存在下で増殖可能な細菌が検出された。また、賞味期限内であっても 15% NaCl 存在下で増殖可能な細菌が、 $10^5 \sim 10^7$ cfu/g 程度存在しているサンプルもあった。

3. 1. 2 サバ内臓中の 15% NaCl 存在下で増殖可能な細菌の生菌数

サバ 15 個体のうち 11 個体の内臓から 15% NaCl 存在下で増殖可能な細菌を分離することが出来た。また、腸と腸以外を比較すると、腸以外の方が 15% NaCl 存在下で増殖可能な細菌の生菌数が $\sim 1,000$ 倍程度多いことが分

かり、さらに内臓を5つの部位に分けて調べた結果では(個体 10, 15)、胃に最も多く 15% NaCl 存在下で増殖可能な細菌が存在していた。

3. 2 ヒスタミン生産試験

分離菌株を 15% NaCl 加ヒスチジンプロスで 10 日間培養したときのヒスタミン生産量を **Table 4** に示した。実験に供試した 30 菌株のうち 28 菌株が 1,100~2,300 ppm のヒスタミンを生産し、これらをヒスタミン生産菌とした。また、2 菌株はそれぞれ 16, 5 ppm であり、他の 28 菌株と比較してヒスタミン生産量が少ないため、これらをヒスタミン非生産菌とした。

3. 3 分離菌株の生理学的性質

菌株 A 111~140 の計 30 菌株について実験を行った結

果、全てがグラム陽性球菌、カタラーゼ陰性で 18% NaCl 加 MRS 寒天培地上で生育して炭酸カルシウムを溶解した。これらの結果から、分離菌株は全て *Tetragenococcus* 属に属する細菌であると推定した。さらに、30 菌株のうち、ヒスタミン非生産菌の A 115, 116 と生産菌の A 114, 117, 124, 127, 128, 134, について *hdcA* の増幅を行ったところ、非生産菌からはバンドは検出されず、生産菌からはバンドが検出された。

3. 4 16S rDNA 配列の決定と帰属分類群の推定

A 124 と A 114 について 16S rDNA 配列の決定と帰属分類群の推定を行ったところ、A 124, 114 はそれぞれ *T. halophilus* の 16S rDNA アミノ酸配列と 99%以上の相同性を示した。

Table 4. 15% NaCl 加ヒスチジンプロスで 10 日間培養したときのヒスタミン生産量

菌株名	分離源のサバ塩辛	培養終了後の		
		ヒスタミン (ppm)	pH	OD ₆₀₀
A 111	A(賞味期限 H19/5/11)	2041	5.80	0.702
A 112	A(賞味期限 H19/5/11)	1759	5.65	0.776
A 113	A(賞味期限 H19/5/11)	2085	5.67	0.676
A 114	A(賞味期限 H19/5/11)	1966	5.72	0.717
A 115	A(賞味期限 H19/5/11)	16	5.62	0.475
A 116	A(賞味期限 H19/5/11)	5	5.71	0.619
A 117	A(賞味期限 H19/5/11)	1530	5.94	0.755
A 118	A(賞味期限 H19/5/11)	2046	5.98	0.720
A 119	A(賞味期限 H19/5/11)	1785	5.85	0.680
A 120	A(賞味期限 H19/5/11)	1106	5.90	0.645
A 121	A(賞味期限 H19/5/11)	2073	6.01	0.656
A 122	A(賞味期限 H19/5/11)	1628	6.06	0.648
A 123	A(賞味期限 H19/5/11)	1684	5.78	0.738
A 124	A(賞味期限 H19/5/11)	1780	5.99	0.645
A 125	A(賞味期限 H19/5/11)	1998	5.93	0.683
A 126	A(賞味期限 H19/5/11)	1475	5.90	0.712
A 127	A(賞味期限 H19/5/11)	2025	5.85	0.758
A 128	A(賞味期限 H19/5/11)	1694	6.30	0.719
A 129	A(賞味期限 H19/5/11)	1537	5.91	0.684
A 130	A(賞味期限 H19/5/11)	2274	5.99	0.700
A 131	A(賞味期限 H19/5/11)	2011	6.07	0.631
A 132	A(賞味期限 H19/5/11)	1628	6.11	0.631
A 133	A(賞味期限 H19/5/11)	1855	5.98	0.659
A 134	A(賞味期限 H19/5/11)	1557	6.15	0.660
A 135	A(賞味期限 H19/5/11)	1846	5.94	0.730
A 136	A(賞味期限 H19/5/11)	1845	6.12	0.661
A 137	A(賞味期限 H19/5/11)	1623	6.07	0.646
A 138	A(賞味期限 H19/5/11)	1546	5.84	0.766
A 139	A(賞味期限 H19/5/11)	1864	5.79	0.725
A 140	A(賞味期限 H19/5/11)	1837	5.85	0.731

3. 5 リアルタイム PCR によるサバ塩辛中の *hdcA* 遺伝子と *T. halophilus* の 16S rDNA の定量

既知濃度の DNA 溶液を用いてリアルタイム PCR を行い、検量線 (16S rDNA: $y=-3.379+29.588x$, $R^2=1.000$, $HDC: y=-3.538+29.117x$, $R^2=1.000$) を作成した。作成した検量線をもとにして、サバ塩辛中の *T. halophilus* の 16S rDNA と *hdcA* 遺伝子のコピー数を算出した (Table 5)。

また、分離菌株 A 124 の 600 nm における吸光度と生菌数の関係から、検量線 ($y=5.62E+07x-4.20E+06$) を作成した。作成した検量線をもとにして、2. 5. 1. 2 で用いた菌

懸濁液の菌数を算出した。その結果、菌懸濁液の原液、100 倍希釈液、10,000 倍希釈液にはそれぞれ 4.93×10^6 、 4.93×10^4 、 4.93×10^4 cfu/ 180 μ l の細菌が存在することが分かった。得られた菌数の対数と、リアルタイム PCR を行って得られたコピー数の対数の関係から得られた式 ($y=1.010x-0.350$, $R^2=0.998$) に、リアルタイム PCR により求めたサバ塩辛の 16S rDNA のコピー数を対数に直した値を代入してサバ塩辛 1 g あたりの *T. halophilus* の数を求めると、Table 6 のようになった。

Table 5. サバ塩辛から抽出した DNA から、リアルタイム PCR で検出した *T. halophilus* の 16S rDNA、および *hdcA* のコピー数

サバ塩辛			<i>T. halophilus</i> の 16S rDNA		<i>hdcA</i>	
製造者	賞味期限	ヒスタミン (mg/kg)	Ct	コピー数 (サバ塩辛 1g あたり)	Ct	コピー数 (サバ塩辛 1g あたり)
A	H.19/5/11	680	13.75	4.84×10^4	13.56	2.50×10^4
A	H.19/6/25	<1	34.65	<1	34.94	<1
A	H.21/4/8	<1	29.65	<1	30.59	<1
A	H.21/4/23	<1	30.68	<1	31.61	<1
A	H.21/6/10	<1	28	2.96	32.03	<1
A	H.21/8/20	<1	32.94	<1	33.53	<1
A	H.21/12/28	<1	32.49	<1	34.2	<1
A	H.22/2/26	<1	32.69	<1	33.16	<1
B	H.21/9/8	76	16.15	9.45×10^2	34.26	<1
C	H.21/4/10	<1	17.37	4.11×10^2	32.76	<1
C	H.21/5/15	<1	22.75	1.06×10	増幅せず	0
D	H.21/9/8	<1	13.48	5.81×10^3	33.97	<1

Table 6. リアルタイム PCR により算出したサバ塩辛中の *Tetragenococcus halophilus* の菌数と、培養法による 15% NaCl 存在下で増殖可能な細菌の生菌数との比較

製造者	サンプル名	菌数/塩辛 1 g	
		リアルタイム PCR	15% NaCl 加 BPG 寒天培地
A	A190511	2.45×10^6	2.25×10^7
A	A190625	-	0
A	A210408	-	2.34×10^3
A	A210423	-	1.86×10^3
A	A210610	13	1.62×10^3
A	A210820	-	5
A	A211228	-	0
A	A220226	-	0
B	B210908	2.39×10^3	3.67×10^7
C	C210410	1.04×10^3	5.72×10^5
C	C210515	3.2×10	1.55×10^5
D	D210908	1.47×10^3	1.77×10^5

3. 6 pHと増殖の関係

pH 5.5~7.0 に調整した 15% NaCl 加 BPG 液体培地では OD₆₀₀ の値が増加しており、分離菌株 A 124 は増殖可能であることが分かったが、pH 5.0 未満に調整した培地では OD₆₀₀ の値はほとんど増加せず、増殖は確認できなかった。これにより、増殖可能な pH の閾値は 5.0~5.5 の間にあることが分かった。

3. 7 サバ内臓からの *hdcA* 遺伝子と *T. halophilus* の 16S rDNA の検出

PCR 産物の電気泳動写真を Fig. 1、2 に示した。実験の結果、Fig. 1 に示すように、サバ 5 個体すべての内臓から *T. halophilus* の 16S rDNA を検出できた。このことから、サバ内臓に普遍的に *T. halophilus* が存在していることが示唆された。

また、5 個体中 3 個体から *hdcA* を検出できた。このことから、サバ内臓に存在する *T. halophilus* の中に *hdcA* をもっているものが存在する可能性が示唆された。

3. 8 ヒスチジン脱炭酸酵素の発現調節

まず、各 pH における *hdcA*、および 16S rDNA の発現量を求め、*hdcA* の発現量を 16S rDNA の発現量で割ることにより、*hdcA* の発現量を補正し、培養液 A、B、C それぞれの pH 5.5 における *hdcA* の発現量の補正值を 100 としたときの相対定量値を求めた。結果を Fig. 3 に示す。この

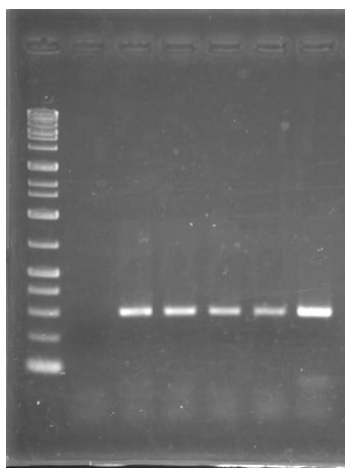


Fig. 1. 電気泳動写真(*T. halophilus* の 16S rDNA, Primer: 193f-480r)。レーン左からマーカーを 2 μ l、滅菌水(ネガティブコントロール)、サバ個体 11、サバ個体 12、サバ個体 13、サバ個体 14、サバ個体 15 の内臓から抽出した DNA を鋳型にした PCR 産物をそれぞれ 5 μ l 電気泳動した。

グラフから、*hdcA* の発現量は pH 5.5 のときが最も小さく、次いで pH 5.0 のときが pH 5.5 のときの約 1.6 倍で 2 番目に小さかった。pH 4.0、6.0 では pH 5.5 のときのそれぞれ約 8.5、4.1 倍に増加した。これらのことから、サバ塩辛中で分離菌株 A 124 の *hdcA* 遺伝子発現を抑えるにはサバ塩辛の pH を 5.0~5.5 の範囲に保つことが有効であると考えられた。

4. 考 察

市販サバ塩辛あるいはサバ内臓から 15% NaCl 耐性細菌を分離することができた。そのうち、30 菌株について 15% NaCl 加ヒスチジンプロスをを用いることにより、ヒスタミン生菌および非生産菌を得ることができた。30 菌株は全

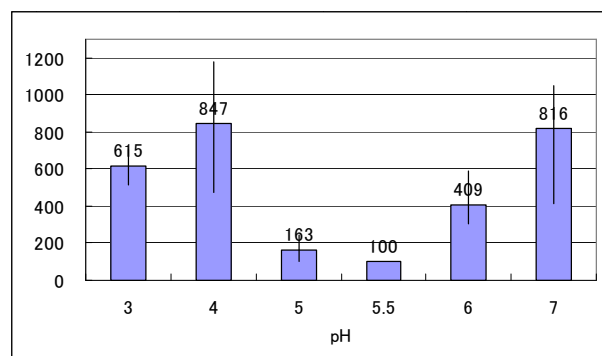


Fig. 3. 各 pH における *hdcA* の発現量の相対定量値

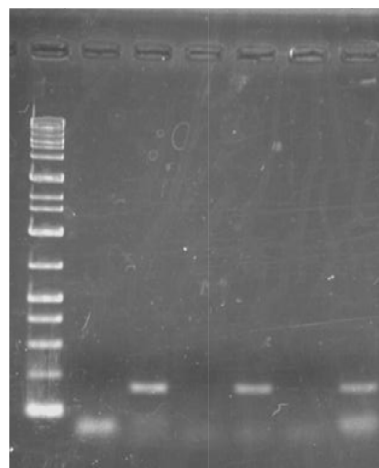


Fig. 2. 電気泳動写真(*hdcA*, Primer: *Hdc1-Hdc2*)。レーン左からマーカーを 2 μ l、滅菌水(ネガティブコントロール)、サバ個体 11、サバ個体 12、サバ個体 13、サバ個体 14、サバ個体 15 の内臓から抽出した DNA を鋳型にした PCR 産物をそれぞれ 5 μ l 電気泳動した。

て *Tetragenococcus* 属であった。また、新鮮なサバ内臓から *T. halophilus* の 16S rDNA が検出されることから、サバ内臓にも普遍的に *T. halophilus* が存在する可能性が強く示唆された。Table 6 にリアルタイム PCR、15% NaCl 加 BPG 寒天培地それぞれから算出したサバ塩辛の生菌数を示したが、A190511 を除いて他のサバ塩辛ではリアルタイム PCR により算出した菌数が 10~100 倍程度少なくなっている。この原因は不明であるが、製造ロットあるいは製造方法の違いと *T. halophilus* の出現がどういう関係にあるのかは、さらに検討する必要がある。

T. halophilus は食中毒の原因になるヒスタミン生成能を有する場合とそうでない場合がある。そこで、*T. halophilus* と同定したヒスタミン生産菌 A124 を用いて、ヒスチジン脱炭酸酵素の発現調節を *ndcA* 遺伝子を用いることにより調べた。その結果、サバ塩辛中で *ndcA* 遺伝子の発現を抑えるにはサバ塩辛の pH を 5.0~5.5 の範囲に保つことが有効であると考えられた。

5. 今後の課題

今回の研究で、水産物由来 *T. halophilus* について、ヒスチジン脱炭酸酵素の発現調節を明らかにできた。このことを、サバ塩辛の製造方法に応用することで、製品の高品質化、安定化を目指したい。今後の課題としては、*T. halophilus* について抗アレルギー作用等の機能性を高めた菌株の選抜、優良な発酵スターターの開発などを考えている。

文献

- 1) Satomi. 1997. *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce. International Journal of Systematic Bacteriology 47: 832-836
- 2) Kimura *et al.* 2001. Histamine formation by *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce Source. International Journal of Food Microbiology 70: 71-77
- 3) Satomi. 2008. Analysis of a 30 kbp plasmid encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce. International Journal of Food Microbiology 126: 202-209
- 4) 西村 郁子他 2009. しょうゆ諸味由来乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* KK221 (Th221 株) の抗アレルギー作用 New Food Industry 51, 35-41
- 5) Nishimura *et al.* 2009. Clinical Efficacy of Halophilic Lactic Acid Bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from Soy Sauce Moromi for Perennial Allergic Rhinitis: Allergology International. 58: (2) 1-7
- 6) Annelies Juste. 2007. Predominance of *Tetragenococcus halophilus* as the cause of sugar thick juice degradation. Food Microbiology 25: 413-421
- 7) M. Fernandez. 2006. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria: Use in Cheese Production Journal of Dairy Science. 89: 3763-3769

Studies on Food Functionality of Halotolerant Lactic Acid Bacterium *Tetragenococcus halophilus* from Marine Products

Mitsutoshi Nagase¹, Tadanori Aimi²

¹ Shimane Institute for Industrial Technology, ² Faculty of Agriculture, Tottori University

Summary

It is well known that the halotolerant lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* exists in fish sauce, soy sauce, miso. Recently, some studies as for the functionality of the antiallergic effect of *T. halophilus* from soy sauce were reported. On the other hand, the working of the microorganism in *shiokara* has been assumed to be smaller compared with the digestion enzyme. In a current study, we confirmed a lot of *T. halophilus* existed in *saba-shiokara* which had seemed aseptic because of its high salt level. Therefore, it is important to study the working of the microorganism in order to develop the new fishery fermented food that have the effect of probiotics. The purpose of this study is to clarify various characteristics about *T. halophilus* from marine products. 9 samples and 11 samples of 15% NaCl tolerant bacteria were isolated from 12 commercial *saba-shiokara* and 15 internal organs of mackerel, respectively. Histamine production of 30 isolated bacteria which were cultured in histidine broth for 10 days was analyzed. As a result, 28 strains produced the histamine of 1,100-2,300 ppm, and these were defined as histamine-producing strains. The other two strains were defined as non-histamine-producing strains because of low histamine concentration. The physiological property of 30 strains was also estimated. All strains showed Gram positive cocci, catalase negative. In addition, they could grow on 18% NaCl-MRS agar and dissolved calcium carbonate. From these results, 30 strains were decided their belonging to the *Tetragenococcus* genus. Based on Blast analysis, both strains A124 (histamine-producing strain) and A114 (non-histamine-producing strain) showed significant identity (99%) with *T. halophilus* respectively. According to the relation between pH and the growth of the A124 strains on 15% NaCl-BPG liquid, there was the threshold for pH that the A124 strains could grow between 5.0-5.5. The 16S rDNA of *T. halophilus* could be amplified from internal organs of all 5 mackerels. Therefore it was suggested that *T. halophilus* exists universally in the internal organ of mackerel. Besides the *hdcA* gene was detected in 3 samples out of 5 internal organs of mackerel. Therefore it was suggested the *hdcA* gene exists in *T. halophilus* in the internal organ of mackerel. Regulation of the histidine decarboxylase gene *hdcA* in *T. halophilus* was investigated. The level of expression of *hdcA* under various pH conditions was the smallest in pH 5.5, and pH 5.0 was secondly smallest. The level under pH 5.0 was approximately 1.6 times pH 5.5. The level under pH 4.0, pH 6.0 was approximately 8.5, 4.1 times respectively pH 5.5. Therefore it was concluded that keeping the pH of *saba-shiokara* within the range of 5.0-5.5 is effective in order to suppress the *hdcA* gene expression of A 124.