

# 研究成果情報

平成 30 年度

## 定量 PCR による乳酸菌ウオヌマ株菌数の迅速測定法

[要約] ウオヌマ株利用製品の菌数は、*tuf* 遺伝子(タンパク質伸長因子 TU の遺伝子)を検出対象とする定量 PCR により1日以内で測定できる。また、ウオヌマ株定量用プライマーを用いて、ウオヌマ1～3株を株ごとに測定できる。

新潟県農業総合研究所食品研究センター 園芸特産食品科

連絡先

TEL 0256-52-3240

FAX 0256-52-6634

### [背景・ねらい]

発酵乳や乳酸菌飲料は、製品中の乳酸菌数が省令で規定されている。また、乳製品以外の発酵食品においても製品中の菌数を自社規格としている場合が多い。しかし、乳酸菌数は主に平板培養法により測定されているが、2～3日を要することから、製品出荷の律速となっている。

そこで、迅速、特異的に定量できる技術として定量 PCR によるウオヌマ株菌数の測定方法を開発し、製品品質の維持・管理を行う。

### [内容]

- 1 乳酸菌ウオヌマ株の総菌数は、酵素剤及び DNA 抽出キットを用いてウオヌマ株菌体から DNA を抽出し、*tuf*(タンパク質伸長因子 TU) 遺伝子を検出対象とするプライマー(*tuf* プライマー、表)を用いて定量 PCR を実施することにより1日以内で測定できる(図1、2)。
- 2 検量線作成用スタンダードは、*Lactobacillus sakei* JCM1157<sup>T</sup> の DNA を *tuf* プライマーによる PCR で増幅し、市販の PCR 産物精製キットを用いて調製する。
- 3 *tuf* 遺伝子コピー数(菌数相当)は、吸光度(260nm)測定を行い、次式により算出する。  
スタンダード1μlあたりの *tuf* 遺伝子コピー数(菌数相当) = 吸光度(260nm) × (2.88 × 10<sup>11</sup>)
- 4 ウオヌマ1～3株ごとの定量は、上記1～3の方法で定量したウオヌマ株の DNA 溶液を検量線作成用スタンダードとし、ウオヌマ株プライマー(表)を用いて実施する(図1～3)。

### [導入効果]

ウオヌマ株利用製品の菌数測定が迅速に行えるため、品質管理や出荷調整が容易となり、生産コストの低減に貢献できる。

### [導入対象]

ウオヌマ株を利用した製品を製造する食品企業

### [留意点]

- 1 リアルタイム PCR 装置が必要である。
- 2 利用する試薬や酵素によって定量 PCR 条件が異なる。
- 3 DNA を検出対象とし、死菌も検出されるため、培養法と比較した検証が必要である。

[具体的データ]

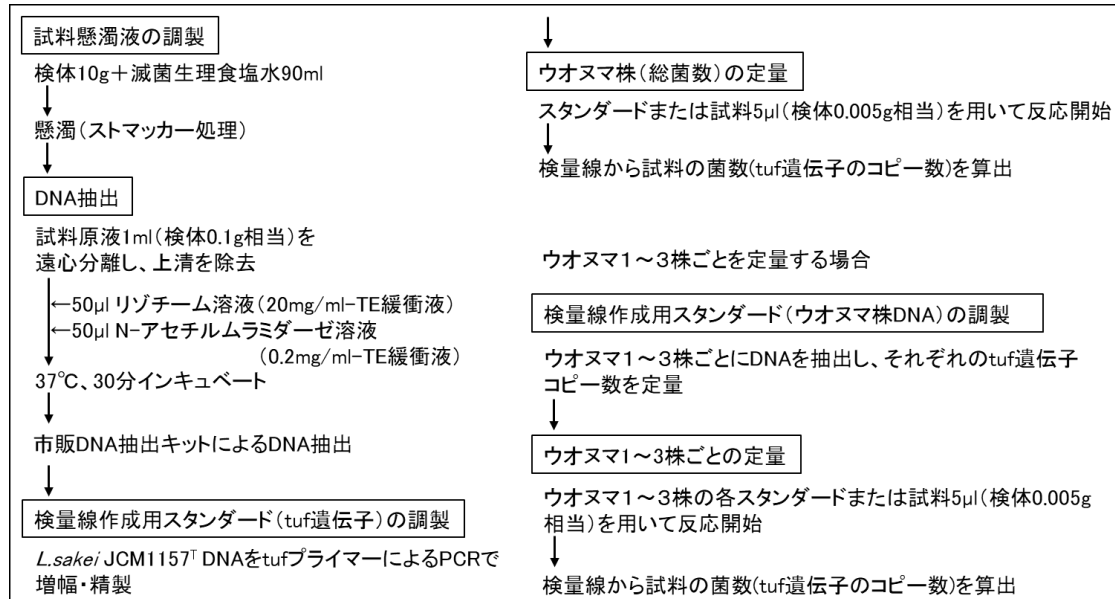


図1 菌数測定方法

表 tuf プライマー及びウオヌマ株プライマー

用途	対象	プライマー名	配列 (5'→3')										増副産物のサイズ
総菌数 定量	tuf遺伝子	tuf-F	TCG	AAC	GTG	GCC	AAG	TTT	TAG	C	96		
		tuf-R	GAC	CAC	CTT	CAT	CCT	TGC	TCA	AG			
株ごとの 定量	ウオヌマ-1株	qU1-F	TCA	GCA	GGT	GAA	GAA	ACA	GTG	G	95		
		qU1-R	ACT	CAC	CTG	CCT	TTG	TGG	TTA	C			
	ウオヌマ-2株	qU2-F	TTG	CCG	ACG	AGT	CAA	ATT	GG	132			
		qU2-R	TTA	ACG	CTG	GCG	GTT	GAT	TG				
	ウオヌマ-3株	qU3-F	GCC	TGC	TTT	ACA	GGC	TGT	TTT	AAC	AAC	138	
		qU3-R	GCA	GCT	GAT	AAA	GTC	AAA	CCG	TCC			

【反応液組成】	
THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)	10.0μl
50x ROX reference dye	0.4μl
Primer F (10μM)	0.6μl
Primer R (10μM)	0.6μl
D.W.	3.4μl
DNA 試料	5.0μl
【PCR 条件】	
tuf 遺伝子の場合	ウオヌマ株の場合
95°C、1min	95°C、1min
↓	↓
60°C、15s	60°C、15s
60°C、1min	62°C、1min
(40 サイクル)	(40 サイクル)

図2 定量 PCR 条件

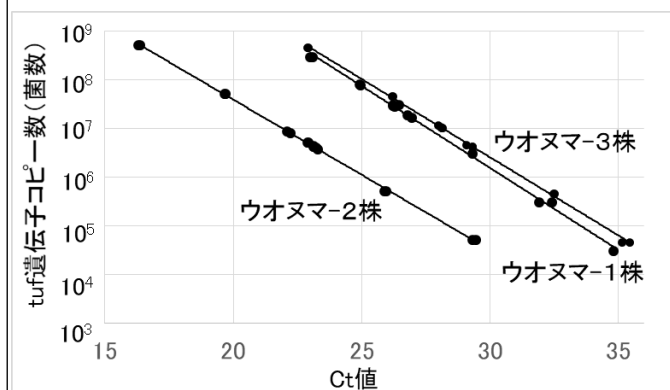


図3 ウオヌマ株菌数の検量線

[その他]

研究課題名: 米の麹菌と乳酸菌による複合・連続発酵の最適化  
 予算区分: 事業(新市場創出・米加工技術等開発事業)  
 研究期間: 平成 28~30 年度  
 発表論文等: なし