

氏名	熊谷浩一
学位(専攻分野の名称)	博士(農芸化学)
学位記番号	甲第689号
学位授与の日付	平成27年3月20日
学位論文題目	対馬伝統発酵食品素材「せんだんご」の製造工程中の微生物学的研究
論文審査委員	主査 教授・農学博士 岡田早苗 教授・博士(農芸化学) 内野昌孝 准教授・博士(農芸化学) 田中尚人 博士(工学) 中川博之* 名誉教授・農学博士 内村泰

## 論文内容の要旨

日本には古来より伝承されてきた発酵食品が存在し、なかでも、独特な食感を呈する珍しい発酵食品「せんだんご」がある。せんだんごとは、長崎県対馬地方固有の伝統発酵食品であり、サツマイモを自然発酵（現地では芋を腐らせる工程という）させ、多量の水で洗浄し、沈殿物をだんご状に成型後、乾燥させたものである。食用には、せんだんごを水でもどし麺状にして茹でて食されており、サツマイモからとは想像し得ない独特な食感を呈している。

対馬は、島全体の約89%が山地であり、そのほとんどが山林で覆われており、田畑などに適した耕作地が少なく、幾度も飢饉に見舞われてきた歴史がある。そのため、山地でも比較的栽培が容易なサツマイモは広く受け入れられ食用とされ、食用に適さないく芋がせんだんごに加工され、保存食品とされてきた。しかし近年では、食品流通も整い、せんだんごの必要性が薄らいでいる。さらに、せんだんごの生産者の高齢化に伴い、生産農家は激減し、微生物の役割が明らかとされないまま、その伝統が途絶えようとしている発酵食品である。

せんだんごは水でもどし捏ね、押し出し式で麺状にし茹でることで、原料のサツマイモからでは想像し得ない高い粘性と弾力を有するコンニャクに似た独特な食感の「ろくべえ麺」となる。せんだんごとろくべえ麺を食品学的に研究した岡らは、次のように報告している。

ろくべえ麺の食感はサツマイモ粉原料から調製した麺とは異なること、また、せんだんご構成成分の約90%を占めるデンプンと約6%を占める繊維質、特にペクチンが、原料サツマイモに含まれるそれと比べ、部分的に分解され低分子量化しており、これらがろくべえ麺の食

感形成に寄与している。

岡らの報告を受け、このような低分子量化は、製造工程中に生息する微生物による発酵により生じると考えた。

せんだんご製造工程中に生息する微生物についての研究報告がこれまでに無く、その微生物がサツマイモのデンプンやペクチンに与える影響についても明らかとされていない。デンプン等の高分子物質に対して微生物が作用し、部分的な分解に留めることで物性を变化させた発酵食品の例は少なく、せんだんご製造工程中に生息する微生物の特性と発酵に関して知見を得ることは、新たな微生物利用法を開拓することにつながると考えられる。

そこで本研究では、これまでに調査がなされてこなかったせんだんご製造に関与する微生物とその機能を明らかとすることで新たな知見を得ることを目的とした。

### I. せんだんご製造工程の調査

せんだんご製造における重要な工程を明らかとするために、2008~12年の4年間にわたり各農家の製造方法を調査した。調査は、主要なせんだんご製造地域である対馬市の豊玉町田、千尋藻、美津島町久須保、巖原町阿連、久根田舎の5軒の農家を対象とした。

その結果、農家ごとに製造方法は一部異なるが、基本的には冬季に収穫したサツマイモをスライスまたは破碎後浸漬し、数ヶ月間かけて発酵させる。その後、多量の水で洗浄するとともに笹でこし、サツマイモの皮などの浮遊物や着色物質を取り除き、得られた白色の沈殿物をだんご状に成型し、乾燥させる工程を経てせんだんごが製造されていた。しかし、浸漬の方法は農家間で違いが

\* 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品安全研究領域 主任研究員（分析化学）

あった。一方、発酵は3ヶ月以上の時間をかけ、その方法は全ての地域で共通し、発酵中のサツマイモ切片の表面や内部には多くのカビが繁殖していた。これらのことから、せんだんご製造には、発酵工程が重要であると考えられた。また、発酵工程の温度は14℃前後と低い温度であった。

## II. せんだんご製造工程中に生息する微生物の菌叢

### 1. せんだんご製造工程中に生息する微生物

せんだんご製造に関与する微生物を明らかとするために、発酵工程に生息する微生物の菌叢解析を行った。試料は2008~12年にかけて、長年にわたりせんだんごを作り続けている豊玉町・巖原町の農家の発酵工程のサツマイモ切片を採取し、各種微生物の生菌数測定、及び分離・同定を行った。

その結果、生菌数において一般細菌は $10^6\sim 10^9$ 、酵母は $10^3\sim 10^7$ 、糸状菌は $10^4\sim 10^7$  CFU/g程度が生息しており、その菌叢は多種多様な微生物により構成されていることを明らかとした。また、2つの農家の菌叢を比較した結果、主要な微生物群は一般細菌では *Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属、酵母では *Candida* 属、*Saccharomyces* 属、糸状菌では *Mucor* 属、*Penicillium* 属であり、生息している微生物の菌種に共通性が確認された。このように農家、年度が異なっても、製造工程に見出される微生物が類似した菌叢で構成されているのは、せんだんご製造が栄養成分や温度など比較的限られた範囲内で、継続して長年にわたり作られてきた結果であると考えられる。

### 2. デンプン分解能を有する微生物

分離株を糖源をデンプンとした各種寒天培地（一般細菌：NA培地、酵母：YM培地、糸状菌：LCA培地）にて培養後、ヨウ素溶液を添加し、コロニー周辺のハロ形成の有無により、せんだんご製造に重要なデンプンの分解株を選抜した。その結果、主なデンプン分解微生物は *Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属、*Mucor* 属全株及び *Penicillium* 属全株であった。分離株のデンプン分解能について検討するために、一般細菌をデンプン含有NA液体培地（15℃・14日間）にて培養した。しかし、一般細菌においては、15℃での培養液中のデンプン分解酵素活性が検出限界以下であったことから、せんだんご製造環境を考慮すると一般細菌のデンプン分解能は大きな影響は無いと考えられた。

そこで、15℃でもデンプンの分解が可能な *Mucor* 属及び *Penicillium* 属において詳細な種の同定を行った。その結果、*Mucor* 属においては、全て *M. circinelloides*

であり、*Penicillium* 属においては、*P. expansum*、*P. echinulatum*、*P. crustosum*、*P. roqueforti* の4菌種であった。なかでも、*P. expansum*、*P. echinulatum* の2菌種が毎年両農家にて生息していた。

次に糸状菌のデンプン分解能を検討するために、供試菌株として、*M. circinelloides* 37-1株、*P. expansum* 13-3株、*P. echinulatum* 37-1株を用い、デンプン含有LCA培地（15℃・16日間）にて培養後、デンプンの分子量分布を解析した。その結果、*M. circinelloides* 37-1株においてはデンプンの分解は確認されたが、低分子量化は認められず、*P. expansum* 13-3株と *P. echinulatum* 37-1株においては、デンプンの低分子量化が確認された。

これらのことから、せんだんご製造に重要なデンプンの低分子量化には *P. expansum* と *P. echinulatum* が関与していることが推察された。

### 3. ペクチン分解能を有する微生物

分離株を糖源をペクチンとした各種寒天培地（一般細菌：NA培地、酵母：YM培地、糸状菌：LCA培地）にて培養後、ルテニウムレッド溶液を添加し、コロニー周辺のハロ形成の有無により、せんだんご製造に重要なペクチンの分解株を選抜した。その結果、ペクチン分解微生物は *Mucor* 属及び *Penicillium* 属の全株であった。

次に分離株のペクチン分解能について検討するために、供試菌株として *M. circinelloides* 37-1株、*P. expansum* 13-3株、*P. echinulatum* 37-1株を用い、ペクチン含有LCA培地（15℃・14日間）にて培養後、ペクチンの分子量分布を解析した。その結果、*M. circinelloides* 37-1株においては、ペクチンの低分子量化は認められなかったが、*P. expansum* 13-3株、*P. echinulatum* 37-1株においては、ペクチンの低分子量化が確認された。これらのことから、せんだんご製造に重要なペクチンの低分子量化には *P. expansum* と *P. echinulatum* が関与していることが推察された。

以上より、せんだんご製造に重要なデンプンやペクチンの分解には、せんだんご製造工程中に生息する *P. expansum*、*P. echinulatum* が重要な役割を果たしていることが推察された。

## III. *Penicillium* 属を用いて試作したせんだんごより調製したろくべえ麺の評価

### 1. せんだんご及びろくべえ麺の試作

*Penicillium* 属を用いて試作したせんだんごより調製したろくべえ麺の物性を評価するために、供試菌株として *P. expansum* 13-3株と *P. echinulatum* 38-1株を用い

てせんだんごを試作（以下、*P. expansum* 13-3株せんだんご、*P. echinulatum* 38-1株せんだんごとする）し、各せんだんごよりろくべえ麺を調製（以下、*P. expansum* 13-3株麺、*P. echinulatum* 38-1株麺とする）した。また対照として供試菌株未接種にて同様にせんだんごを試作（未接種せんだんごとする）及びろくべえ麺を調製（以下、未接種麺とする）した。そして、各ろくべえ麺の物性（高圧縮硬さ、低圧縮硬さ、高圧縮付着性、低圧縮付着性、こし）を解析した。同時に対馬産せんだんごを用いてろくべえ麺を調製（以下、対馬産ろくべえ麺とする）し、各試作ろくべえ麺と物性を比較した。

その結果、未接種麺は硬さ、付着性が対馬産ろくべえ麺と大きく異なったが、*P. expansum* 13-3株麺、*P. echinulatum* 38-1株麺において、硬さに若干の相違が確認されたものの、その物性は対馬産ろくべえ麺と同様の傾向を示した。

このことから、独特な食感を有するろくべえ麺製造のためのサツマイモの発酵は、発酵工程に生息する *P. expansum*、*P. echinulatum* により可能であることが明らかとなった。

## 2. 試作せんだんごのデンプンの解析

せんだんご製造工程中に生息する *P. expansum* と *P. echinulatum* がサツマイモデンプンの低分子量化に関与しているかを検討するために、*P. expansum* 13-3株せんだんご、*P. echinulatum* 38-1株せんだんご、未接種せんだんごよりデンプンを抽出し、その分子量分布を解析した。

その結果、*P. expansum* 13-3株せんだんご、*P. echinulatum* 38-1株せんだんごのいずれにおいても、対馬産せんだんごデンプンと同様に、デンプンの低分子量化が確認された。

## 3. 試作せんだんごのペクチンの解析

せんだんご製造工程中に生息する *P. expansum* と *P. echinulatum* がサツマイモペクチンを低分子量化しているかを確認するために、前述のデンプンの解析と同様にペクチンの分子量分布を解析した。

その結果、*P. expansum* 13-3株せんだんご、*P. echinulatum* 38-1株せんだんごのペクチンは未接種せんだんごのペクチンと比較していずれにおいても、対馬産せんだんごペクチンと同様に、ペクチンの低分子量化が確認された。

以上より、*P. expansum*、*P. echinulatum* はせんだんご製造工程中で、サツマイモのデンプンやペクチンを低分子量化し、そのせんだんごから製造されるろくべえ麺の独特な食感形成に関与していることが明らかとなった。

## IV. せんだんごの安全性の評価

せんだんご製造工程中にはその製造に重要な役割を果たす *Penicillium* 属が製造年度・農家問わず、常に生息していることが明らかとなった。しかし、*Penicillium* 属の中には、食品のカビ毒汚染菌として報告されているパツリン産生菌が存在する。このことから、完成品であるせんだんご及び *Penicillium* 属の繁殖が確認される発酵工程のサツマイモ片に含まれるパツリン濃度を検討した。

その結果、せんだんご及び発酵工程のサツマイモ片に含まれるパツリン濃度は検出限界以下であった。以上より、せんだんごのパツリン汚染は確認されなかった。

## 総括

現在、食品原料を加工し、新規食感を有する食品を製造するために、微生物や酵素を用いた方法の開発が望まれている。そこで、サツマイモを発酵させてできるせんだんごを原料としたろくべえ麺の独特な食感に着目した。

せんだんごはサツマイモと比較してデンプンやペクチンが微生物の作用により低分子量化していると考えられていた。そこで、はじめにせんだんご発酵工程中に生息する微生物の菌叢を解析し、一般細菌、酵母、糸状菌と多種多様な菌種で菌叢が構成され、なかでも、*Bacillus* 属、*Candida* 属、*Mucor* 属及び *Penicillium* 属が主体となる微生物であることを明らかとした。また、農家、年度が異なっても、製造工程に見出される微生物が類似した菌叢で構成されていることを明らかとした。さらに発酵工程中に生息する *P. expansum*、*P. echinulatum* がサツマイモのデンプンやペクチンを低分子量化することで、ろくべえ麺の独特な食感が生じることを見出した。

*Penicillium* 属が発酵食品に関与していることは珍しく、発酵食品に *Penicillium* 属を用いることで新たな食感を有する食品が製造できる可能性を見出した。*Penicillium* 属が発酵に関与する食品としてはブルーチーズやロックフォールチーズがある。チーズ製造における *Penicillium* の役割はタンパクや脂肪の分解であるが、せんだんご製造では、デンプンやペクチンの分解に関与していた。また、*Penicillium* 属の役割は、デンプンの糖化やペクチンの分解であるが、せんだんごのように部分的な分解に留めることで物性を変化させる発酵食品の例は少ない。これらのことから、*Penicillium* 属によるデンプンやペクチンなどの繊維質の低分子量化による新食感創造という新たな研究の発展に繋がると考えら

れる。

本研究の成果が、発酵食品における *Penicillium* 属の

新たな利用方法を確立に繋がることに期待する。

### 審査報告概要

対馬で伝統的に作られているサツマイモを原料とした「せんだんご」（ろくべえ麺などの素材）は、製造工程で発酵過程（現地では「芋が腐る」という）を経る。同過程に関与する微生物は複雑であり、それらを4年間に亘り分離同定を繰り返し、物性変化などを調べ、ろくべえ麺独特の食感形成に関わる微生物 *Penicillium* 属菌種2種 (*P. expansum* と *P. echinulatum*) を特定した。さらに申請者はそれらを使い実験室レベルで「せんだんご」を作成し、その組成や作成した麺の物性を調べたところ、現地産のものとはほぼ同等であることを確認した。

また *P. expansum* が主要微生物であったことから、パツリン（カビ毒）の存在が危惧されたが、現地で生産されている製品を分析し、パツリンが検出されないことも確認している。以上より、本研究は伝統発酵食品に利用されながらもこれまでに把握されていなかった貴重な微生物資源を分離・特定し、食品加工等への新たな応用性を解明したものである。

よって、審査員一同は博士（農芸化学）の学位を授与する価値があると判断した。