

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

東京農業大学 農学研究科  
農芸化学専攻 博士後期課程  
微生物学研究室

熊谷 浩一

指導教授 岡田 早苗

## 目次

緒言		3
第1章	せんだんごの各地域における製造方法	
	序論	8
	第1節 せんだんご製造の現状	8
	第2節 各地区の製造方法の調査	10
	第3節 各製造工程の糊化特性	23
	第4節 第1章まとめ	26
第2章	せんだんご製造工程中の菌叢解析	
	序論	27
	第1節 せんだんご製造工程中の試料採取	28
	第2節 せんだんご製造工程中の微生物叢	
	第1項 各種微生物の生菌数	31
	第2項 各種微生物の分離・同定	37
	第3節 分離株のデンプン及び食物繊維分解能試験	
	第1項 デンプン分解株の選抜	51
	第2項 ペクチン分解株の選抜	55
	第3項 キシラン分解株の選抜	57
	第4項 <i>Mucor</i> 属及び <i>Penicillium</i> 属の種の同定	59
	第4節 第2章まとめ	65
第3章	せんだんご製造工程中に生息する糸状菌のサツマイモの発酵における役割	
	序論	67
	第1節 サツマイモとせんだんごに含まれるデンプン及び繊維質の 分子量比較	
	第1項 サツマイモとせんだんごのデンプンの分子量 分布解析	68
	第2項 サツマイモとせんだんごのペクチンの分子量 分布解析	70

	第 3 項	サツマイモとせんだんごのヘミセルロースの 分子量分布解析	73
	第 2 節	<i>Mucor</i> 属及び <i>Penicillium</i> 属により発酵させたデンプン及 び繊維質の分子量変化の検討	
	第 1 項	糸状菌により発酵させたデンプンの分子量 分布解析	75
	第 2 項	糸状菌により発酵させたペクチンの分子量 分布解析	78
	第 3 項	糸状菌により発酵させたキシランの分子量 分布解析	81
	第 3 節	<i>Penicillium</i> 属を用いたせんだんごの試作	
	第 1 項	試作せんだんごのデンプンの分子量分布解析	83
	第 2 項	試作せんだんごのペクチンの分子量分布解析	86
	第 3 項	試作せんだんごのヘミセルロースの 分子量分布解析	88
	第 4 節	試作せんだんごより調製した試作ろくべえ麺の物性評価	90
	第 5 節	第 3 章まとめ	95
第 4 章		せんだんごの安全性の評価	
		序論	97
	第 1 節	せんだんご中のパツリン濃度の検討	97
		総括	105
		謝辞	109
		参考文献	111
		英文要旨	114
研究業績		学術論文	115

## 緒言

日本各地には古来より伝承されてきた多くの発酵食品が存在し、日本人の食生活を支えてきた。日本は、温帯地域に位置し周囲が海で囲まれ、国土の7割が山地で森林に覆われ、農耕作地に適した土地に恵まれなかった。さらに冬季は寒さが厳しく、この時期の食糧確保は長い歴史の中で大きな課題であった。日本人は経験的に発酵させることで食料を長期間保存できることを知り、各地域で収穫される農作物と独自の方法を駆使することで、その地域独特の発酵食品を作り出してきた。このようなことから各地域特有の伝統発酵食品が存在し、今日まで伝承されてきた。

近年、わが国の食形態が欧米化し、さらに物流の発展に伴い食料の確保が容易となり、手間暇かけて作る伝統発酵食品の需要がどんどんなくなりつつある。そのようなことから、伝統的に培われてきた発酵食品を作る人も時代と共に減少し、その人々が亡くなると伝統そのものが消失する可能性が大きくなってきた。このように一部の地域で培われてきた伝統発酵食品が消えてしまうことは、発酵に関わる微生物の能力を知ることなく、さらには貴重な微生物資源（遺伝子資源）そのものも確保されることなく、地上から消えてしまうことになる、このようなことから、消滅の危機にある伝統発酵食品の微生物資源の調査及び確保は急務とされている。

そんな中、筆者が注目したのは、長崎県対馬地方で伝統的に作られてきた「せんだんご」(Fig. 1) がある。せんだんごはサツマイモ(農林一号)(Fig. 2) を原料とした保存食材であり、対馬の人々は「ろくべえ麺」(Fig. 3) などに加工して、非常食としてきた。

せんだんごについて解説する。せんだんごは秋口から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、長期間かけて野ざらしで微生物により発酵させた後、多量の水で洗浄しながら、サツマイモの皮などを取り除き、得られた白色の沈殿物をだんご状に成型し、乾燥させたものである。このせんだんごの製造には、11月下旬のサツマイモの収穫に始まり、全工程で約5ヶ月間もの時間が費やされる。

このような時間と労力を費やして、せんだんご製造が行われるようになった経緯には、次のような歴史がある。九州と朝鮮半島の間位置する対馬は、対馬暖流の影響を受けつつ、冬は大陸側から流れ込む季節風により寒さの厳しい地域である。また、対馬は周囲を海で囲まれ、島全体の約89%が標高200~300mの山地であり、そのほとんどが山林に覆われており(対馬市役所、市の概要)、天然記念物ツシマヤマネコの生息地としても知られている。このように、田畑などの耕作地に適した平地が少なく、主食となる米や麦の栽培は一部地域に限られており、幾度も食糧不足に見舞われ、飢饉の年にはドン

グリなどを食す他なかった(永留久恵、2009)。そこで、江戸中期の正徳5年(1715)、原田三郎右衛門は薩摩よりサツマイモの種芋を対馬に持ち帰り、山畑で栽培を始めた(『新対馬島誌』)。そして山地でも比較的栽培が容易であったサツマイモは、対馬の環境に適した農作物として島内で広く受け入れられ、栽培されるようになった。大型のサツマイモはそのまま食用とされ、食用とならないくずイモ(小型のサツマイモ)や傷イモを捨てずにせんだんごへと加工し、保存性の高い食品加工素材とした。地元では、せんだんごは2年以上も保存が可能であると言われている。このような地理的環境と歴史的背景から、対馬ではサツマイモの栽培とせんだんごの製造が行われるようになった。また、せんだんごとして保存することで、サツマイモを余すことなく利用できることから、食糧が乏しかった対馬の歴史の中でサツマイモは食生活に大きく貢献してきた。このことから、サツマイモは「孝行芋」とも呼ばれ、対馬の人々に長く愛されてきた農作物である。

保存食品としてのせんだんごは、サツマイモのデンプンや繊維質が主体の乾燥した団子状の塊である(岡ら、2011)。そのままでは食用とならないため、せんだんごを水で戻して捏ねることで生地とし、それを押出式で麺状に加工して茹でることで「ろくべえ麺」となる。ろくべえ麺を魚類のだし汁とともに食す「ろくべえ汁」(Fig. 3)やせんだんごを原料とした「せんちまき」(Fig. 4)や「せんぜんざい」(Fig. 5)などに調理され食されており、現在でも対馬の食生活に深く根付いている。

ろくべえ麺には原料であるサツマイモから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がある。長崎県島原市にもろくべえ麺というサツマイモを原料とした麺製品が存在するが、島原市のろくべえ麺の場合、原料のサツマイモは発酵工程を経ず、そのまま粉末化したサツマイモ粉を原料とする。そのため、サツマイモ粉のみでは麺形成が難しいことから、つなぎとして長芋などを用いて麺状に加工し茹でることで食されている。一方、対馬のろくべえ麺は、つなぎを加える必要が無く、サツマイモを発酵させて製造されるせんだんごのみで製麺が可能で、他には無い独特な食感を有する、という大変興味深い食品である。

そこで、これまでにせんだんごろくべえ麺に関する食品学的な研究が行われ、以下のように報告されている。

ろくべえ麺の独特な食感は、サツマイモ粉原料から調製した麺とは異なること、せんだんご構成成分の約90%を占めるデンプンや約6%を占める繊維質、主にペクチンやヘミセルロースが原料サツマイモのそれらと比べ、部分的に分解され低分子量化していること、また、繊維質の中でもペクチンの減少量が著しいことが報告されている(岡ら、

2011)。

せんだんご製造工程には、発酵工程があり、この工程では糸状菌のコロニーが観察される。この工程では経験的に黒色の糸状菌が繁殖した場合 (Fig. 6) は味が悪くなるという理由からその部分を破棄し、白色や青色系状菌が繁殖した場合 (Fig. 7) に製造が続行される。また、酸臭のような異臭を発生し、サツマイモ片に粘りが生じることから、糸状菌の他、酵母や細菌の繁殖も示唆される。これらのことから、何らかの微生物がサツマイモの性状変化に深く関与することでせんだんごとなり、さらにろくべえ麺特有の食感形成がもたらされると推察した。しかし、これまでせんだんご製造工程中の微生物叢を調査した報告はなく、その微生物がサツマイモのデンプンや繊維質に与える影響についても明らかとされていない。

そればかりでなく、十数年前まではせんだんごは対馬全土で製造されていたが、現在ではその製造農家は点在する程度にまでに減少している。その理由には次のようなことが考えられる。せんだんごの製造は手の込んだ作業が長期間にわたり継続し、作業が重労働であること、製造農家の高齢化が進んでいること、また、後継者不足が深刻となり、その製造法を引き継ぐ若い世代がいないこと (対馬市内であっても、せんだんごそのものを知らない人もいた) が挙げられる。さらに、現在では食品流通網が整い、食糧の入手が容易になったため、長時間の重労働をこなして製造される保存食品としてのせんだんごの必要性が薄れてきていると考えられる。今後もせんだんご製造農家は、減少し続けると予想され、せんだんご製造工程中に生息する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。このことから、他に類をみないせんだんごという興味深い発酵食品の製造に関与する微生物の特定、及びせんだんご製造工程中に生息する貴重な微生物資源の保全が急務であると考えられた。

また、微生物によるデンプン等の高分子物質に対する作用は、酒作りに代表される糖化のような分解 (小崎ら、1990) が主であり、分解産物としての糖を用いることや、さらにその糖を利用してその他の微生物を繁殖させ、その代謝産物を利用することが目的とされてきた。しかし、せんだんごは、デンプンや繊維質を部分的な分解に留め、それらを直接食品素材とすることで、これまでにない独特な食感を醸し出す珍しい発酵食品素材である。このことから、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繋がると考えられた。

筆者が行ってきた伝統発酵食品素材のせんだんごは原料がサツマイモであり、微生物が介在することによりデンプンや繊維質の構造変化が生じ、原料サツマイモとは異なる

食感を呈させることを明らかとした。せんだんご製造における微生物の役割はこれまでに解明されたことは無く、得られる知見は新規な食品開発につながるものと考えられた。

そこで、本研究では、4年間にわたりせんだんごの製造工程を詳細に調査した。そして、せんだんご製造工程中に生息する微生物の菌叢を解析すると共に、デンプンとペクチン、ヘミセルロースの構造変化に着目し、せんだんご製造に関与する微生物とその役割を明らかとすることを目的とした。



Fig. 1 せندانご



Fig. 2 サツマイモ



Fig. 3 ろくべえ汁



Fig. 4 せんちまき



Fig. 5 せんぜんざい



Fig. 6 黒色の糸状菌が繁殖した様子



Fig. 7 青色の糸状菌が繁殖した様子



## 第1章 せんだんごの各地域における製造方法

### 序論

せんだんごの製造工程には、浸漬や発酵工程がある。これら両工程には糸状菌の存在が確認され、酵母や細菌の繁殖が示唆される。このことから、せんだんご製造におけるサツマイモの発酵に重要な工程であると考えられる。そこで、はじめに島内各地区のせんだんご製造農家を訪問し、製造方法の詳細な調査を行うとともに、ろくべえ麵形成の鍵となるデンプンの糊化特性について検討した。

### 第1節 せんだんご製造の現状

#### 【方法】

調査を2008年から2011年の4年間、せんだんご製造が盛んに行われる12月頃から3月にかけて実施した。各農家で消費できる量だけの小規模生産を行う対馬市の豊玉町田及び千尋藻、厳原町阿連及び久根田舎、また、農業協同組合を通じて市販化できる程の大量生産を行う美津島町久須保 (Fig. 1-1) を中心に、せんだんごの製造工程の聞き取り調査 (豊玉町田及び厳原町阿連は4回、豊玉町千尋藻、厳原町久根田舎、美津島町久須保は2回) を行った。

#### 【結果】

数十年前までは、せんだんごの製造は対馬全土で行われていた。しかし現在は製造する農家は点在する程度にまで減少している。一部は島の料亭や食堂などに卸すことを目的に大量生産している農家も見られるが、親族の間で消費する程度の量を製造している農家が多く、なかにはお年寄りが自分で食べる程度の極少量を作っている高齢農家も見られた。せんだんごを製造する農家は今後も減少し続けると予測されている。その理由には、これまで考えられてきた様に、せんだんごの製造には長時間の重労働が必要であること、また、生産者の高齢化や食品流通網の整備に伴い、食糧入手が容易になったことが挙げられる。さらに近年では、対馬全島で野生のイノシシが増加し、サツマイモ畑や製造中のせんだんごが荒らされる獣害が多発するようになり、製造を中止する農家も見られるようになってきたことが、せんだんご製造という伝統の消失に拍車をかけていると考えられる。

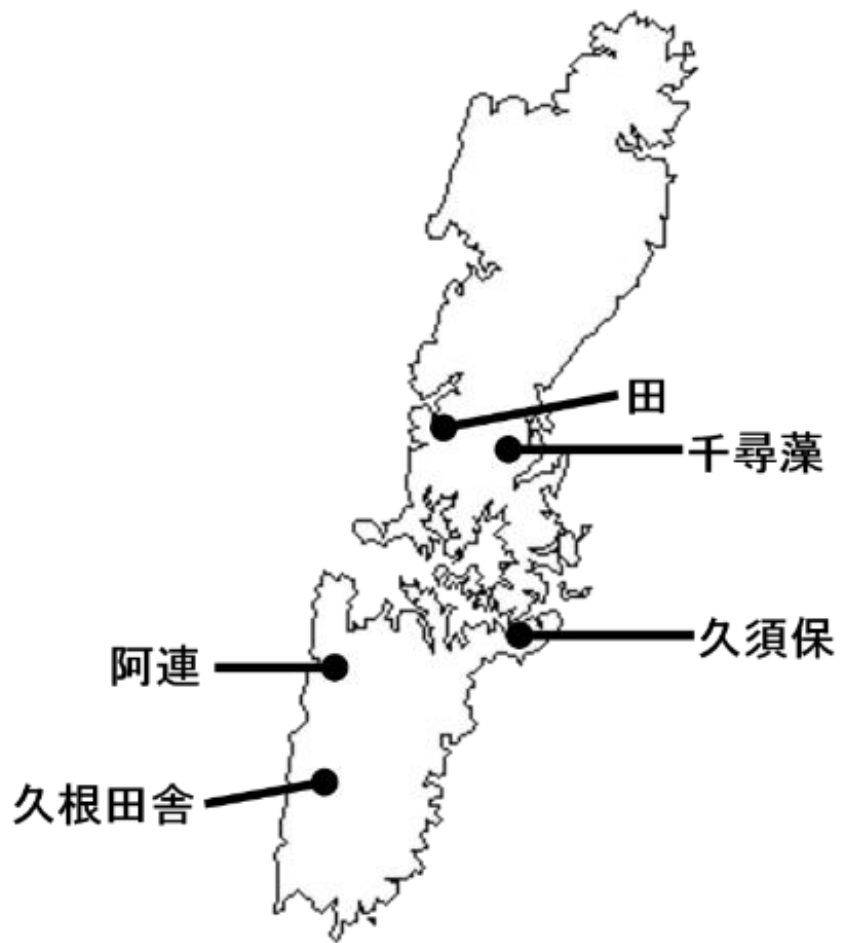


Fig. 1-1 調査対象地区

## 第2節 各地区の製造方法の調査

### 【方法】

せんだんごの製造に欠かせないと考えられる浸漬工程及び発酵工程を中心に目視による観察を行った。

### 【結果】

#### せんだんご製造工程

製造工程の概略は、既に報告されている (小崎ら、2005)。それによると、①スライスまたは破碎 (前処理) したサツマイモを1週間程度水に浸漬する工程 (浸漬工程)、②スライスまたは破碎したサツマイモを棚板に拵げるまたは板囲いの中に堆積するなどして寒風の吹く露天に晒す工程で、地元では“芋を腐らせる”と言われる工程 (発酵工程Ⅰ)、③発酵後にソフトボール大の塊にして、数ヶ月軒下で寒風にさらす工程、地元では“寒晒し”と言われる工程 (発酵工程Ⅱ)、及び④大量の水を使って発酵物を洗う作業を繰り返し、白色の沈殿物 (主要構成成分はデンプンや繊維質からなる) を回収し、それを鼻形に成型し乾燥させる工程 (洗浄・成型工程) を経て作られる。つまり、製造工程を大きく区分すると、発酵工程 (①~③) と洗浄・成型工程 (④) の2工程と4区分に分けられる。これらの製造工程の大きな流れはどの地区においても共通したが、一部の地区では浸漬工程や発酵工程Ⅰの工程がない地区も見られた。

以下に、収穫したサツマイモの前処理、浸漬工程、発酵工程 (Ⅰ及びⅡ)、洗浄・成型工程について調査した結果と所見を記載する。

### (1) 収穫したサツマイモの前処理

現在せんだんご作りに使われるサツマイモは、くずイモや傷イモではなく、食用となる大型のサツマイモが使われていた。収穫したサツマイモを小さく砕く方法として、サツマイモを破碎する方法とスライスする方法の2通りが見られた。伝統的には唐臼や足踏み式杵を用いた破碎法であった。一部の農家の庭の片隅に唐臼 (Fig. 1-2) や足踏み式杵 (Fig. 1-3) が今でも残されている。スライス法はサツマイモスライサー (Fig. 1-4) が使用されており、近年になって導入されたものと思われる。両方法とも後の発酵工程で微生物の繁殖を促進させるためにサツマイモの表面積を拡大させるための手段と考えられる。



Fig. 1-2 サツマイモを砕く唐臼



Fig. 1-3 足踏み式杵



Fig. 1-4 サツマイモスライサー

## (2) 地区ごとの発酵工程の比較

発酵工程を比較するために地区ごとにまとめると Fig. 1-5 ~ 1-8 のようになった。我々が最初に調査した豊玉町の農家において、せんだんご製造工程中に 3 段階の発酵工程 (浸漬工程、発酵工程 I、発酵工程 II) があることを確認した (Fig. 1-5)。これを基準とし、他の地区の製造工程図を作成した (巖原町阿連地区は Fig. 1-6 参照、巖原町久根田舎地区は Fig. 1-7 参照、美津島町久須保地区は Fig. 1-8 参照)。

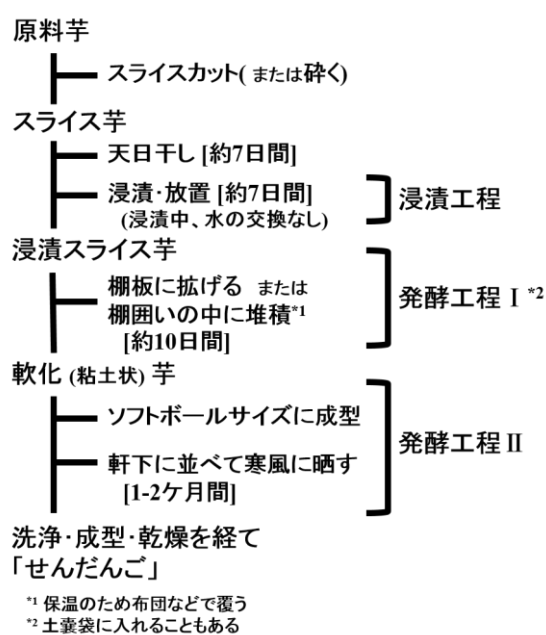


Fig. 1-5 豊玉町田・千尋藻地区の  
せんだんご製造方法

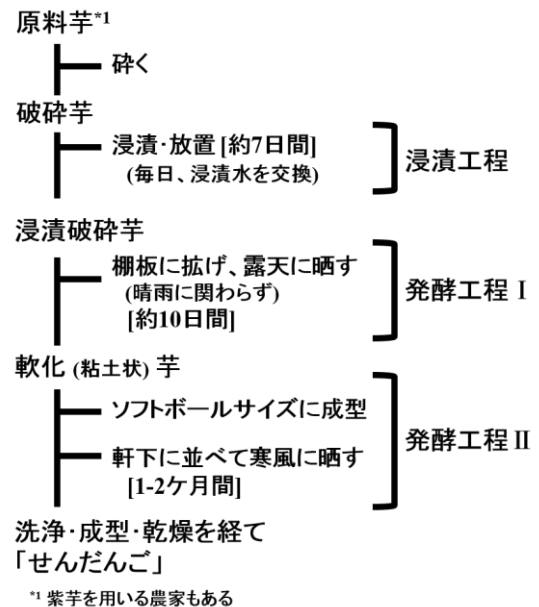


Fig. 1-6 巖原町阿連地区の  
せんだんご製造方法

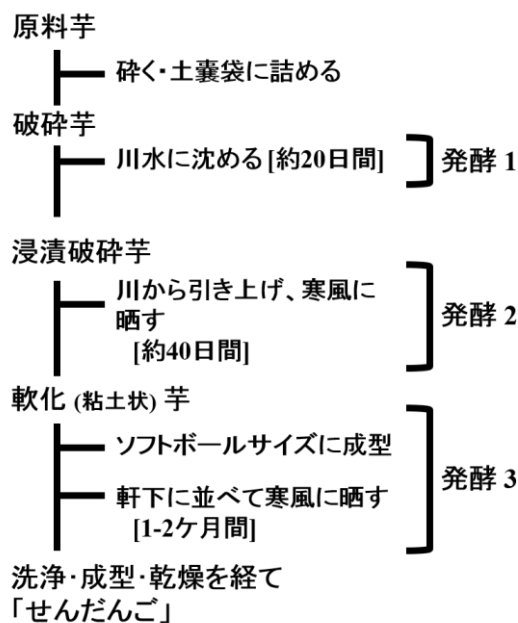


Fig. 1-7 巖原町久根田舎地区の  
せんだんご製造方法

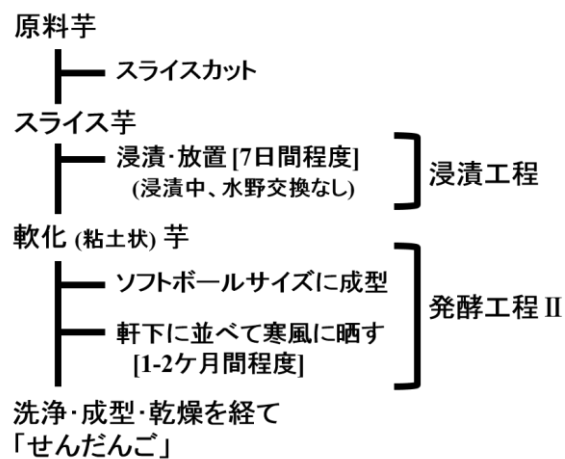


Fig. 1-8 美津島町久須保地区の  
せんだんご製造方法

## a) 豊玉町における発酵工程及び所見

### ・ 浸漬工程

サツマイモは洗浄後、スライサーで切片にする。サツマイモ切片は、天日干しにして一度乾燥させ (Fig. 1-9)、その後桶に移し、水を張り浸漬をする (Fig. 1-10)。浸漬中は水を交換することなく、そのままサツマイモ切片が柔らかくなるまで約 1 週間放置する。浸漬液表面には産膜酵母と思われる菌膜が観察され (Fig. 1-11)、さらに容器底部より気泡の発生が見られた (Fig. 1-12)。



Fig. 1-9 天日干しで乾燥中のサツマイモ切片



Fig. 1-10 浸漬中のサツマイモ切片



Fig. 1-11 浸漬液表面の菌膜



Fig. 1-12 容器底部より発生する気泡

## ・発酵工程 I

浸漬の終わったサツマイモ切片を板囲いの中に 20 cm 程度の厚さに積み重ね、布団で覆うことで保温しながら発酵を進める (Fig. 1-13)。堆積層の表面だけでなく、中層部においても隙間があるところには、青色の胞子を持った糸状菌 (Fig. 1-14)、接合菌の仲間と思われる糸状菌 (Fig. 1-15) のコロニーが観察された。また、サツマイモ片は酸臭のような独特な発酵臭が強く、粘りが生じていることから、糸状菌のみではなく、酵母や細菌など、様々な微生物が繁殖している可能性が考えられた。

なお、一部の地区では、発酵工程 I を土嚢袋に入れて行うところもあった (Fig. 1-16)。



Fig. 1-13 布団で覆い、保温しながら発酵させる様子



Fig. 1-14 青色の糸状菌が繁殖した様子



Fig. 1-15 接合菌の菌糸子



Fig. 1-16 土嚢袋に入れて発酵させる様子



## ・発酵工程Ⅱ

発酵工程Ⅰの後、10 cm 程度のソフトボール大の塊に丸められた白いサツマイモ塊 (Fig. 1-17) を軒下などに並べ、寒風にさらす。数日すると表面は乾燥が進むものの、内部は依然として湿っており、糸状菌が観察された。さらに時間が進むとサツマイモ切片自体が褐変するため、表面の一部は、茶褐色から黒色に変色するもの (Fig. 1-18,1-19) や、また接合菌の仲間と思われる糸状菌の菌糸が繁茂している様子が観察された。



Fig. 1-17 ソフトボール大の塊で  
発酵させる様子



Fig. 1-18 表面の一部が黒色に変色した  
発酵中のサツマイモ塊



Fig. 1-19 表面の一部が黒色に変色した発酵中のサツマイモ塊 (拡大写真)

## b) 巖原町における発酵工程及び所見

### ・ 浸漬工程

サツマイモを洗淨後、阿連地区ではサツマイモを破碎し浸漬を1週間ほど行う。その間、浸漬水の交換が毎日行われていた (Fig. 1-20)。浸漬中には豊玉町ほどではないが気泡の発生が確認された。

なお、久根田舎地区では、砕いたサツマイモを土嚢袋に詰め (Fig. 1-21)、川水の流れに沈めておき、20日間程度放置されていた (Fig. 1-22)。



Fig. 1-20 毎日水を交換しながら



Fig. 1-21 土嚢袋に詰めたサツマイモの様子



Fig. 1-22 川水を用いた浸漬の様子

### ・発酵工程 I

浸漬の終わった破碎サツマイモは、阿連棚板上に 5 cm 程度の厚さで積み上げられ、雨が降っても特に雨よけをすることもなく、そのままの状態に 1 週間程度露天に晒されていた (Fig. 1-23)。時間がたつと、粘りが生じていたサツマイモの表面は乾燥し、その表面には黒色や青色の胞子を持った糸状菌が観察され、その他にも接合菌の仲間と思われる菌糸が認められた (Fig. 1-24)。

また、久根田舎地区では、土嚢袋に入れたまま、川辺にあげ、40 日間程度発酵を続けた (Fig. 1-25)。



Fig. 1-23 露天に晒して発酵させる様子



Fig. 1-24 接合菌類の仲間と思われる菌糸



Fig. 1-25 土嚢袋に入れたまま発酵させる様子

・発酵工程Ⅱ

発酵工程Ⅰの後、豊玉町と同様にソフトボール大の塊に丸め、軒下などに並べられていた (Fig. 1-26)。表面は豊玉町のものと同様の見かけであった。

なおこの地区では紫芋を用いて製造している農家も存在した (Fig. 1-27)。



Fig. 1-26 露天の棚板に並べ発酵させる様子 Fig. 1-27 紫イモを用いたせんだんご製造

### c) 美津島町における製造方法および所見

この地区では対馬市中に出回っている商品としてのせんだんごを製造しており、比較的多くを生産していた。

#### ・ 浸漬工程

サツマイモを砕き、1週間程度浸漬される (Fig. 1-28)。浸漬中の水の交換は行われていなかった。

#### ・ 発酵工程 I

美津島町は、他の地区で行われている棚板上や板囲いの中に堆積させる「発酵工程 I」に相当する作業が行われていなかった。

#### ・ 発酵工程 II

浸漬の終わったサツマイモ切片は軟化しており、そのままソフトボール大の塊に丸められ、露天の棚板の上に並べられていた (Fig. 1-29)。塊の表面は時間がたつと、茶褐色から黒色に変色し、接合菌の仲間と思われる糸状菌の菌糸が繁茂している様子が観察された。



Fig. 1-28 浸漬中の様子



Fig. 1-29 露天の棚板に並べて発酵中の様子

### (3) 洗浄と成型の工程

発酵工程Ⅱの工程の後の作業手順はいずれの地区でも共通していた。

発酵の終わったソフトボール大の塊は表面および中心部とも乾燥して硬くなっている。手で割ることができ、また砕くと粉末にもなる程度である。この塊を大きな容器に入れ、水を加注することにより形状を崩し水となじませ、更に小さな塊もなくなるまで、攪拌をする。静置しておく、多くのものは沈殿物として容器の底にたまり、芋の皮や繊維質物質が水面に浮遊している。攪拌と水の交換を繰り返しながら上澄み液を捨てることで大きな浮遊物が除かれる。次に、攪拌した状態で目の粗いザルに通し、取り切れなかった芋の皮や繊維物質を取り除く。さらに、目の細かい篩に通すことによって、より細かい繊維などを取り除く。この段階で沈殿物は若干の灰色がかつた色をしており、攪拌と篩に通す作業を繰り返しながら、白色の沈殿物にする。静置し白色になった沈殿物を水底にため、上澄み液を取り除き、ある程度水がなくなったら、晒し布を敷いた器に沈殿物を取り出す。そのまま放置し、滴下させながら水分をできるだけ除く。一晩ほど水を切ると、粘土程度の堅さになる。この沈殿物の一部を手のひらに採り、それを丸めて団子状とし、棚板の上に並べる。棚板の上に置く際に親指と人差し指・中指で押さえつけ、4 cm 程度のヒトの鼻型に成型をする。全部並べ終わったら、寒風の中に放置し乾燥させる。鼻型にするのは乾燥を助けるためとのことである。このようにして乾燥しでできた鼻型の団子がせんだんごである。

沈殿物の浄化過程には、大量の水が必要で有料であることから、多量の水を使つてのせんだんご造りには費用がかかり、その生産農家の減少に拍車を掛けているとのことである。しかし、美津島町久須保地区においては、近くに上水として使うことができる湧き水が大量に得ることができることから、この地区ではせんだんごを町に卸す程多くの量を生産している。

## 【第2節まとめ】

対馬地方各地区におけるせんだんご製造農家を訪問し、製造方法の調査を行った。そして、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・発酵・洗浄し、得られた白色沈殿物を団子状に成型・乾燥するという工程を確認した。

しかし、浸漬の方法は農家ごとに異なり、浸漬水を毎日交換するか否か、また、サツマイモ片を土嚢袋に詰めて川に放置するなど様々であった。このことから、浸漬工程は、微生物を繁殖させるための水分供給や最終産物（せんだんご）の特徴と関連の少ない中低分子成分の除去などが目的であると考えられる。

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、地元では“芋を腐らせる”工程と言われていた。また、発酵中のサツマイモ切片や内部には多くの糸状菌が繁殖し、サツマイモ片には発酵臭や粘りが生じることから、糸状菌の他に、酵母や細菌の繁殖が示唆された。

このことから、発酵工程中に生息する何れかの微生物がろくべえ麺の独特な食感形成に寄与することが示唆された。そこで、浸漬工程や発酵工程を経ることがろくべえ麺形成の鍵となるサツマイモデンプンの糊化特性にどのような影響を与えるのかを検討することとした。

### 第3節 各製造工程の糊化特性

せんだんごの各製造工程がサツマイモデンプンの物性に与える影響を解析するために、サツマイモ、せんだんご及び各製造工程のサツマイモの糊化特性を検討した。

#### 【方法】

##### ・ 試料

対馬でせんだんご製造に用いる原料サツマイモを粉状に加工したもの（以下、サツマイモ粉末とする）、対馬産のせんだんご及び浸漬工程、発酵工程Ⅱのサツマイモ片を用いた。対照として試薬のサツマイモデンプン（松谷化学工業株式会社製）を用いた。

##### ・ デンプンの調製方法

サツマイモ粉末、サツマイモデンプンは粉末状のため、そのまま用いた。

せんだんごはミキサーを用いて粉末化したものを用いた。

浸漬工程及び発酵工程Ⅱのサツマイモ片は、細片化後、純水に懸濁し、篩（mesh No. 100 及び 300）に通した。その後、乾燥させ、ミキサーにて粉末化したものを用いた。

##### ・ 糊化特性試験

糊化特性の解析には、アルミニウム容器に、純水 25 ml と試料 9 g（無水物換算\*）を添加し、RVA (Rapid Visco Analyzer, NEWPORT 社製) にて解析した。昇温速度、保持時間及び降温速度を変化させた温度履歴（初期温度 50℃で 1 分間保持後、6℃/分で 95℃まで昇温し、95℃で 5 分保持後、6℃/分で 50℃まで降温し、50℃で 2 分保持）にて、糊化挙動（最大粘度、糊化開始温度；糊化しやすさ）を解析した（岡 2009）。

\*無水物換算：水分の定量は、試料 5 g を用いて、モイスチャーアナライザー（MX-50 エーアンド・デイ社製）により、設定温度 180℃にて水分量測定を行った。



### 【結果】

せんだんごは、サツマイモデンプンより最大粘度が低く、糊化しにくい特徴を有した。一方、発酵工程のサツマイモデンプンは、最大粘度がせんだんごに比べ若干低いものの、糊化挙動はせんだんごと同様の傾向を示した (Fig. 1-30)。

サツマイモ粉末、浸漬工程のサツマイモデンプンはデンプン以外の物質が多く含まれているためか、ほぼ糊化せず、粘度が低い特徴を有した。(Fig. 1-31)。

### 【第3節まとめ】

せんだんご製造工程における浸漬工程と発酵工程において、各工程を経ることがろくべえ麺形成の鍵となるサツマイモデンプンの糊化特性に与える影響を検討するために、各工程を経たサツマイモデンプンの糊化特性試験を行った。その結果、発酵工程を経ることで、サツマイモデンプンはせんだんごと同様の糊化特性を示すことが明らかとなった。このことから、発酵工程の重要性が裏付けられた。そこで、今後は、この発酵工程を中心に製造工程中に生息する微生物の菌叢解析を行うこととした。

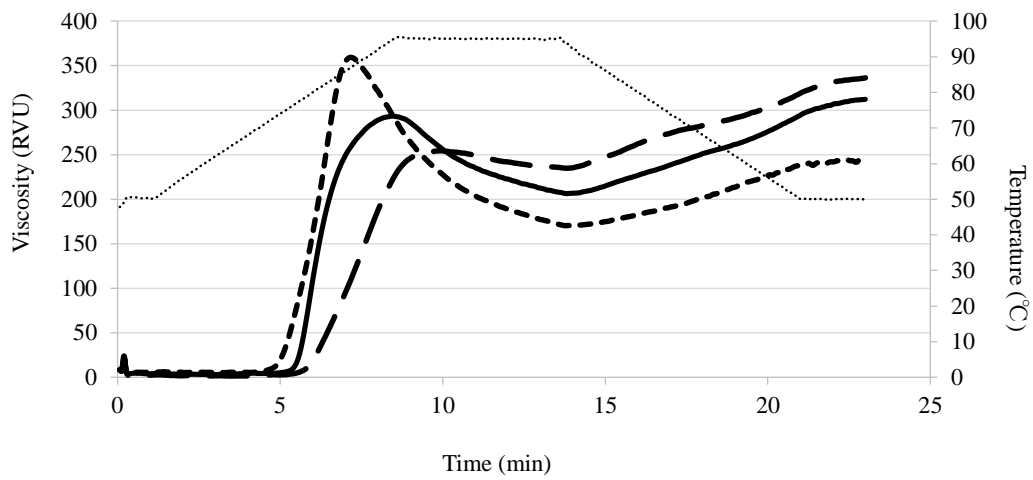


Fig. 1-30 RVA によるサツマイモデンプンと発酵工程サツマイモデンプンの物性評価

——— せんだんご                      - · - · - サツマイモデンプン  
 - - - 発酵工程サツマイモ            ······· 温度

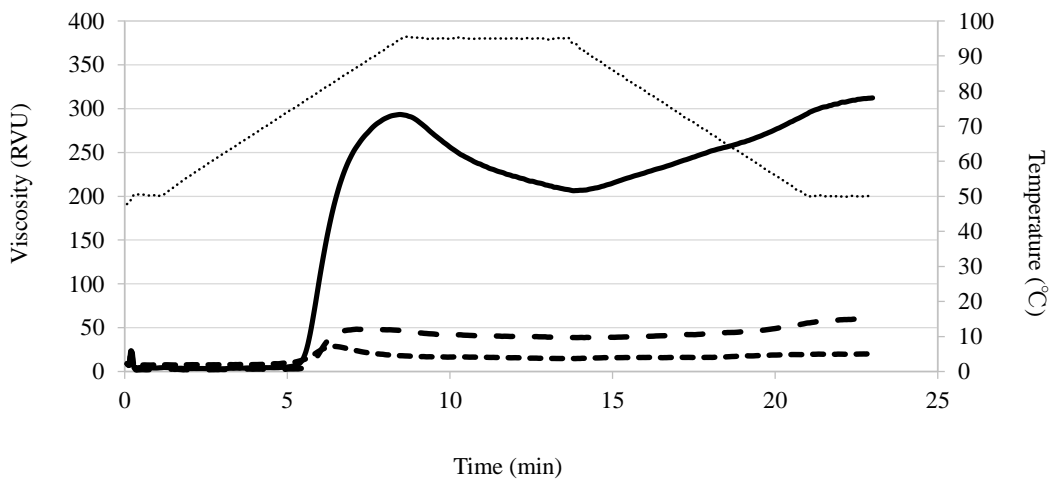


Fig. 1-31 RVA によるサツマイモ粉末と浸漬工程サツマイモデンプンの物性評価

——— せんだんご                      - - - 浸漬工程サツマイモ  
 - · - · - サツマイモ粉末            ······· 温度

#### 第4節 第1章 まとめ

せんだんごの製造は、本調査によって発酵工程と発酵工程に至るまでの工程において、地区ごとに、さらには農家ごとに相違点があることが確認された。発酵工程において、豊玉町と巖原町は3段階（浸漬工程、発酵工程Ⅰ、発酵工程Ⅱ）であったが、美津島町では2段階であり、豊玉町や巖原町での発酵工程Ⅰに相当する段階がなかった。

浸漬工程中の容器底部よりガス発生などの発酵の状況は確認できたが、強い発酵ではなかった。発酵工程Ⅰおよび発酵工程Ⅱでは糸状菌の旺盛な繁殖が認められ、糸状菌の重要性が示唆された。これは宮川らが報告している内容と一致する（宮川ら、1995）。

糸状菌の繁殖が認められる発酵工程が、2段階のところ（豊玉町と巖原町）と1段階のところ（美津島町）が存在した。

また、せんだんごを基に作られるろくべえ麺は独特の食感があり、この食感は発酵中に生息する微生物の作用に起因すると考えられている（岡ら、2011）。また、発酵工程Ⅰ、発酵工程Ⅱの工程では多くの糸状菌の存在が確認された。さらに、発酵工程のデンプンは、せんだんごデンプンと同様の糊化特性を示した。これらのことから、発酵工程Ⅰ、発酵工程Ⅱにおいて、微生物がサツマイモを発酵することにより、原料サツマイモからは想像し得ない独特な食感を有するろくべえ麺製造が可能になることが示唆された。すなわち、これらの発酵工程はせんだんご製造におけるろくべえ麺の食感形成に重要な工程であることが示唆された。これらのことから、発酵に関わる微生物の種類を調査し、またせんだんごを形成させる微生物の特定をすることは重要である。本調査結果を基に微生物の菌叢解析を実施する。

## 第2章 せんだんご製造工程中の菌叢解析

### 序論

せんだんご製造工程中、特に発酵工程（Ⅰ及びⅡ）では、糸状菌のコロニーが観察される。また、酸臭のような異臭を発生し、サツマイモ片に粘りが生じていることから、発酵工程中には糸状菌の他、酵母や細菌の繁殖も示唆された。これらのことから、何れかの微生物がせんだんごの性状形成、つまりろくべえ麺の食感形成に深く関与していると考えられる。

しかし、せんだんご製造工程中の微生物叢が調査された報告はこれまでに無く、どのような微生物が関わってろくべえ麺のような食感が形成されるかは不明のままである。

そこで、4年間にわたる現地調査を基に、せんだんご製造工程中の微生物の菌叢を解析することにした。

また、ろくべえ麺の独特な食感は、せんだんごに含まれるデンプン及び繊維質、主にペクチンとヘミセルロースが原料サツマイモに含まれるそれらと比べると部分的に分解され低分子量化することに起因すること、また繊維質の中でもペクチンの減少量が顕著である（岡ら、2009,2011）ことが報告されている。

そこで、これらの情報を基に、デンプン、ペクチン及びヘミセルロースの分解微生物に着目し、食感形成に関与する微生物を推定することにした。本調査は2008~2011年にかけて行ったが、糸状菌、酵母、一般細菌の全般について解析した2009~2010年のデータを中心に報告する。また、2008~2009年には乳酸菌の菌叢について検討したので、そのデータについても報告する。

## 第1節 せんだんご製造工程中の試料採取

せんだんごの試料採取を行うと共に、製造工程中のサツマイモの発酵状態を把握するために、pH や温度について調査した。

### 【方法】

#### ・ 試料採取

せんだんごを作る農家は近年減少しているが、本調査では長年にわたりせんだんごを作り続けている2軒の農家（豊玉町 A 宅、巖原町 B 宅）を対象にした（Fig. 2-1）。試料採取は2009~2010年にかけて行った。

両農家におけるせんだんごの製造工程の概略を Fig. 2-2 に示した。試料として、浸漬したサツマイモ切片とその浸漬液（Fig. 2-2 中の A）、発酵工程 I のサツマイモ切片（Fig. 2-2 中の B）、発酵工程 II のソフトボール状のサツマイモを（Fig. 2-2 中の C）を用いた。

また、試料採取の際に pH 及び温度の測定を行った。

試料の一部は、微生物の菌叢の変化を極力抑制するために、保存培地（Table 2-1）10 ml を入れた 15 ml チューブに入れ、-80℃で保存した。

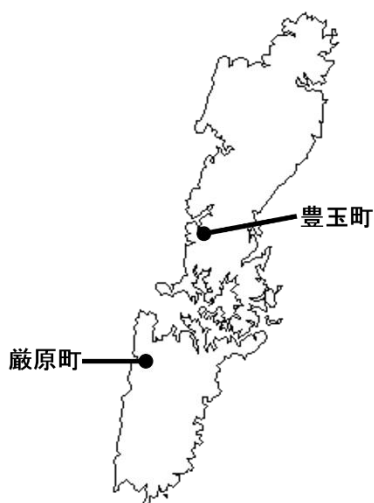


Fig. 2-1 試料採取地

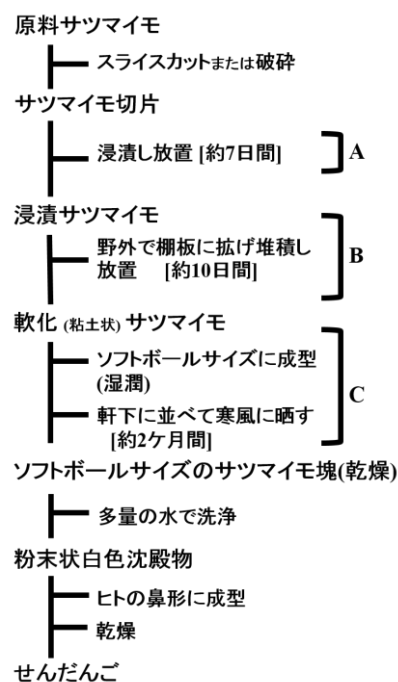


Fig. 2-2 せんだんご製造方法と採取試料

Table 2-1 保存培地組成

Yeast-extract <sup>*1</sup>	0.5 g
Polypeptone <sup>*2</sup>	1.0 g
LAB lemco <sup>*3</sup>	1.0 g
NaCl	0.5 g
DMSO <sup>*4</sup>	10 ml
Water	90 ml

Autoclaved at 121°C for 15 min

\*1:オリエンタル酵母株式会社

\*2:ミクニ化学産業株式会社

\*3:Oxoid 社製

\*4:Dimethyl sulfoxide

### 【結果】

- ・ **浸漬工程**：浸漬液の pH は 4 程度、温度は 7~10°Cであり対馬の平均気温（12 月：4~11°C）と同様で同工程期間中の変動は見られなかった。浸漬工程の状況は両農家とも大きな違いはなかった (Table 2-2)。
- ・ **発酵工程 I**：時間の経過と共に pH は上昇 (pH 5→pH 7) し、発酵熱によると思われる温度上昇 (10°C→15°C) があった (Table 2-2)。
- ・ **発酵工程 II**：この工程の試料の中心部の pH 変化や温度変化は測定できなかった。

Table 2-2 浸漬工程及び発酵工程 I の pH と温度

地域	年度	工程	経過時間	試料 pH	試料温度 (°C)
豊玉町	2009	浸漬	4 日目	4.2	9.0
				4.3	N.D.*
			7 日目	3.8	13.5
				3.7	13.1
			9 日目	3.8	12.0
		4.0		10.7	
		発酵 I	1 日目	3.7	11.3
				4.1	15.4
			4.1	14.5	
		2010	浸漬	11 日目	3.9
	3.9				10.3
	発酵 I		5 日目	5.9	13.3
				5.6	13.5
	厳原町	2009	浸漬	2 日目	5.3
4 日目					10.7
発酵 I			1 日目	4.2	10.8
				4.9	10.6
			4 日目	4.6	15.6
				6.5	15.6
7 日目			6.2	14.7	
			6.6	23.1	
		6.6	23.1		
2010		浸漬	4 日目	4.1	12.1
				4.1	12.1
		発酵 I	7 日目	5.2	13.7
				5.7	14.3
	5.5			13.9	

\*N.D. = no data

## 第2節 せんだんご製造工程中の微生物叢

せんだんご製造工程中に生息する微生物の菌叢を解析するために、製造工程中には様々な微生物の生息が想定されることから糸状菌、酵母、一般細菌、乳酸菌を対象とし、生菌数の測定及び分離・同定を行った。

### 第1項 各種微生物の生菌数

#### 【方法】

#### 1. 糸状菌の生菌数測定

##### ・培地

糸状菌の培養には、PDA 培地 (Table 2-3) を用い、細菌の生育を抑制するために、クロラムフェニコール (Table 2-4) を終濃度 50 ppm となるように添加した。

##### ・試料調製

試料 0.1 g を滅菌生理食塩水 (Table 2-5) 0.9 ml に懸濁し、 $10^1$ ~ $10^8$  倍の 8 段階の希釈液を調製した。

##### ・生菌数測定

調製した各希釈液を前述の培地に平板塗抹し、 $25^{\circ}\text{C}$ ・7 日間培養した。生菌数はコロニー計数法により求めた。

Table 2-3 PDA 培地組成

PDA 培地	
PDA <sup>*1</sup>	3.9 g
Water	100 ml

Autoclaved at  $121^{\circ}\text{C}$  for 15 min

\*1 : Difco 社製

Table 2-4 クロラムフェニコール溶液組成

クロラムフェニコール溶液 (50,000ppm)	
Chloramphenicol	2.5 g
99% Et-OH	50 ml

Table 2-5 生理食塩水組成

生理食塩水	
NaCl	0.85 g
Water	100 ml

Autoclaved at  $121^{\circ}\text{C}$  for 15 min



## 2. 酵母の生菌数測定

### ・ 培地

酵母の培養には、YM 培地 (Table 2-6) を用い、細菌の生育を抑制するために、クロラムフェニコールを終濃度 50 ppm となるように添加した。

### ・ 試料調製

試料調製は第 2 章 第 2 節 第 1 項-1 に準じた。

### ・ 生菌数測定

生菌数測定は第 2 章 第 2 節 第 1 項-1 に準じた。

Table 2-6 YM 培地組成

YM 培地			
Glucose	1.0 g	<sup>*4</sup> Tween 80	
Yeast-extract <sup>*1</sup>	0.3 g	Tween 80	500 mg
Polypeptone <sup>*2</sup>	0.5 g	Water	100ml
Malt-extract <sup>*3</sup>	0.3 g	<sup>*5</sup> Salt solution	
Tween 80 <sup>*4</sup>	0.5 ml	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	40 mg/ml
Salt solution <sup>*5</sup>	0.5 ml	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2 mg/ml
Water	100 ml	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 mg/ml
pH	5.0	NaCl	2 mg/ml
Agar	1.5 g	conc HCl	1 drop

Autoclaved at 121°C for 15 min

<sup>\*1</sup>: オリエンタル酵母株式会社製

<sup>\*2</sup>: ミクニ化学産業株式会社

<sup>\*3</sup>: Difco 社製

### 3. 一般細菌の生菌数測定

#### ・ 培地

一般細菌の培養には、NA 培地 (Table 2-7) を用い、糸状菌や酵母の生育を抑制するために、シクロヘキシミド (Table 2-8) を終濃度 50 ppm となるように添加した。

#### ・ 試料調製

試料調製は第 2 章 第 2 節 第 1 項-1 に準じた。

#### ・ 生菌数測定

上記の各希釈液を前述の培地に平板塗抹し、30℃・7 日間培養した。生菌数はコロニー計数法により求めた。

Table 2-7 NA 培地組成

NA 培地	
Nutrient Broth <sup>*1</sup>	0.8 g
Water	100 ml
Agar	1.5 g

Autoclaved at 121°C for 15 min

\*1 : Difco 社製

Table 2-8 シクロヘキシミド溶液組成

シクロヘキシミド溶液 (10,000 ppm)	
Cycloheximide	1.0 g
Water	100 ml

#### 4. 乳酸菌の生菌数測定

##### ・ 試料

2008 年に対馬市豊玉町のせんだんご製造農家より、浸漬及び発酵工程の試料を採取し、乳酸菌の菌叢解析に用いた。

##### ・ 培地

乳酸菌の培養には、MRS 培地 (Table 2-9) を用い、糸状菌や酵母の生育を抑制するために、アジ化ナトリウム (Table 2-10) 及びシクロヘキシミドを終濃度 50 ppm となるように添加した。

##### ・ 試料調製

試料調製は第 2 章 第 2 節 第 1 項-1 に準じた。

##### ・ 生菌数測定

上記の各希釈液を前述の培地に平板塗抹し、30°C・7 日間培養した。生菌数はコロニー計数法により求めた。

Table 2-9 MRS 培地組成

NA 培地	
MRS <sup>*1</sup>	2.6 g
Water	100 ml
Agar	1.5 g

Autoclaved at 121°C for 15 min

Table 2-10 アジ化ナトリウム溶液組成

アジ化ナトリウム溶液 (10,000 ppm)	
Sodium azide	1.0 g
Water	100 ml

\*1 : Oxoid 社製

## 【結果】

### 1. 糸状菌・酵母・一般細菌の生菌数

- ・浸漬工程：糸状菌は  $10^1$  CFU/g 以下と少なく、酵母は  $10^{2-7}$  CFU/g 程度であった（仕込み年によって、多少ばらつきが見られた）。
- ・発酵工程 I：糸状菌は  $10^{4-7}$  CFU/g 程度存在し、毎年両農家において共通していた。酵母は農家や年度における共通性はなかったが、本工程における生菌数として最も多かった。
- ・発酵工程 II：糸状菌は  $10^{5-7}$  CFU/g 程度存在し、酵母は  $10^{3-6}$  CFU/g 程度存在していた。一般細菌は全工程において、 $10^{6-9}$  CFU/g 程度認められた。

また、各工程における菌種毎の生菌数は、両農家において同様の傾向であった (Table 2-11)。

### 2. 乳酸菌の生菌数 (乳酸菌のみ 2008 年の結果となっている)

浸漬工程においては  $10^8$  CFU/g、発酵工程 I においては  $10^{5-7}$  CFU/g、発酵工程 II においては  $10^7$  CFU/g 程度と一般細菌と同様の生菌数で生息していた (Table 2-12)。

Table 2-11 せんだんご製造工程中に生息する各種微生物の生菌数 (CFU/g)

地域	年	工程	糸状菌	酵母	一般細菌
豊玉町	2009	浸漬	N. D.	$3.1 \times 10^2$	$2.5 \times 10^6$
		発酵 I	$1.4 \times 10^6$	$8.9 \times 10^6$	$4.4 \times 10^6$
		発酵 II	$1.3 \times 10^5$	$1.9 \times 10^4$	$1.1 \times 10^8$
	2010	浸漬	N.D.	$1.3 \times 10^3$	$3.1 \times 10^7$
		発酵 I	$7.0 \times 10^4$	$1.4 \times 10^4$	$2.5 \times 10^8$
		発酵 II	$6.7 \times 10^5$	$1.2 \times 10^3$	$2.2 \times 10^7$
蔽原町	2009	浸漬	$1.5 \times 10^1$	$3.9 \times 10^7$	$3.9 \times 10^9$
		発酵 I	$2.8 \times 10^7$	$7.9 \times 10^7$	$1.1 \times 10^9$
		発酵 II	$1.6 \times 10^7$	$7.0 \times 10^6$	$3.5 \times 10^7$
	2010	浸漬	N.D.	$6.3 \times 10^1$	$1.2 \times 10^8$
		発酵 I	$8.9 \times 10^6$	$3.5 \times 10^4$	$5.0 \times 10^7$
		発酵 II	$2.7 \times 10^6$	$1.7 \times 10^3$	$1.0 \times 10^8$

\*N. D. =not detected

Table 2-12 せんだんご製造工程中に生息する乳酸菌の生菌数 (CFU/g)

地域	年	工程	乳酸菌
豊玉町	2008	浸漬	$3.9 \times 10^8$
		発酵 I	$7.4 \times 10^7$
		発酵 II	$7.5 \times 10^7$
	2009	浸漬	$8.2 \times 10^8$
		発酵 I	$6.1 \times 10^6$
		発酵 II	$7.3 \times 10^7$

## 第2項 各種微生物の分離・同定

### 【方法】

#### 1. 糸状菌の分離と同定

##### ・分離方法

培養方法は第2章 第2節 第1項-1に準じた。

微生物の分離は、コロニー形態からグルーピングを行い、それぞれ異なるもの選抜し、さらに同組成 (Table 2-3) 寒天平板培地に接種し、それぞれ単コロニーを釣菌し純化分離株とした。

##### ・同定方法

28S rDNA D1/D2 領域塩基配列に基づき同定した。

28S rDNA D1/D2 領域塩基配列の決定方法を Fig. 2-3 に示した。

分離株より Benzyl Chloride 法 (Zhu *et al.*, 1993) (Fig. 2-4) により DNA を抽出し、10 µl/ml に調製した。この DNA 溶液を template DNA として、28S rDNA D1/D2 領域の約 550 bp を解析対象としたプライマー-NL1 と NL4 (O' Donnell, 1993) (Table 2-13) を用い PCR 反応 (Artur *et al.*, 2006) (Tables 2-14, 2-15) により増幅を行った。PCR 産物を 1.5% agarose gel にて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後、260 nm の紫外線を照射し、DNA の増幅を確認した。次に、Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega 社製) (Fig. 2-5) を用いて PCR 産物の精製を行った。その後のシーケンス反応はこの増幅断片について Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies 社製) を用いた PCR 反応 (Tables 2-16, 2-17) を行った。PCR 後、エタノール沈殿 (Fig. 2-6) により精製し、Hi-Di Formamide (Life Technologies 社製) を 12.5 µl 加え、シーケンス解析用試料とした。

試料をシーケンスチューブに移し、310 Genetic Analyzer (ABI PRISM<sup>™</sup>) にて塩基配列を決定した。

決定した塩基配列について NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST 機能を用いて相同性検索を行い、分離株の同定を行った。

1. 分離株より DNA を抽出
2. primer NL1 と NL4 を用いて 28S rDNA 塩基配列の増幅
3. 1.5% agarose gel にて電気泳動を行い、DNA の増幅を確認
4. Wizard SV Gel and PCR Clean-up system を用いて DNA を精製
5. Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 と primer NL1、NL4 を用いたサイクルシーケンス反応
6. エタノール沈殿
7. Genetic Analyzer を用いてシーケンス解析

Fig. 2-3 28S rDNA 塩基配列の決定方法

1. 培養液 (1 ml) をマイクロチューブに回収
2. 遠心分離後 (8000 rpm, 1 min)、上清を除去し、TE buffer<sup>\*1</sup>(1 ml)で菌体洗浄
3. 遠心分離後 (8000 rpm, 1 min)、上清を除去し、下記をマイクロチューブに加える

Extraction buffer <sup>*2</sup>	250 $\mu$ l
SDS <sup>*3</sup>	50 $\mu$ l
Benzyl Chloride	150 $\mu$ l
ガラスビーズ (乾熱滅菌済)	0.1 g

4. ボルテックスにて激しく攪拌する (50°C, 30 min)
5. フラッシュ遠心後、3 M Sodium acetate (150  $\mu$ l) を加え、ボルテックス
6. 氷中で静置 (15 min)
7. 遠心分離 (15000 rpm, 10 min, 4°C)
8. 上清 (400  $\mu$ l) を新しいマイクロチューブに移す
9. イソプロパノール (450  $\mu$ l) を加え、ボルテックスにて攪拌
10. 遠心分離 (15000 rpm, 15 min, 4°C)
11. 上清を除去
12. 70% エタノール (300  $\mu$ l) を加え、転倒混和
13. 遠心分離 (15000 rpm, 5 min, 4°C)
14. 上清をパスツールピペットを用いて完全に除去
15. 真空乾燥 (5~10 min) 後、TE buffer (50  $\mu$ l) に溶解
16. -20°Cで保存

Fig. 2-4 Benzyl Chloride 法



\*1 : TE buffer

---

Tris <sup>*4</sup>	10 mM
EDTA <sup>*5</sup>	1 mM
pH	8.0

---

Autoclaved at 121°C for 15 min

\*2 : Extraction buffer

---

Tris	100 mM
EDTA	40 mM
pH	9.0

---

Autoclaved at 121°C for 15 min

\*3 : 10% SDS 溶液

---

SDS	10 g
Water	100 ml

---

\*4 : 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

\*5 : Disodium Dihydrogen Ethylenediamine Tetraacetate Dihydrate

Fig. 2-4 Benzyl Chlorid 法 (続き)

Table 2-13 28S rDNA D1/D2 領域 PCR 用 primers

Primer	sequence (5'-3')
NL1 (F)	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
NL4 (R)	GGTCCGTGTTTCAAGACGG

Table 2-14 28S rDNA D1/D2 領域 PCR 反応液組成

10x EX Taq buffer	2.5 $\mu$ l
dNTP mixture	2.0 $\mu$ l
Each primer (100 pmol/ $\mu$ l)	each 0.1 $\mu$ l
Ex taq polymerase (5 U/ml)	0.125 $\mu$ l
template DNA	1.0 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	20.2 $\mu$ l

Table 2-15 28S rDNA D1/D2 領域 PCR 反応条件

1	95°C	5 min
2	94°C	30 sec
3	50°C	30 sec
4	72°C	60 sec
5	Go to 2, 30 cycles	
6	72°C	10 min

1. PCR 反応液に等量の Membrane binding solution を加える
2. カラムに負荷後静置 (1 min)
3. 遠心分離 (10000 g, 1 min)
4. カラムに Membrane washing solution (700  $\mu$ l) を加える
5. 遠心分離 (10000 g, 1 min)
6. カラム通過液を除去し、Membrane washing solution (500  $\mu$ l) を加える
7. 遠心分離 (10000 g, 5 min)
8. カラムを 1.5 ml マイクロチューブに移す
9. Nuclease free water (50  $\mu$ l) を加え、静置 (1 min)
10. 遠心分離 (10000 g, 1 min) 後、カラム溶出液を精製 DNA とする

Fig. 2-5 Wizard SV Gel and PCR Clean-up system

Table 2-16 Sequencing PCR 反応液組成

5 x sequencing buffer	2.0 $\mu$ l
Primer* (1.6 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
BigDye Terminator	1.0 $\mu$ l
Template DNA	1.0 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	5.0 $\mu$ l

\* : Table 2-13 参照

Table 2-17 Sequencing PCR 反応条件

1	96°C	10 sec
2	50°C	5 sec
3	60°C	4 min
4	Go to 1, 24 cycles	

1. PCR 産物の全量を 1.5 ml マイクロチューブに移す
2. 3 M 酢酸ナトリウム水溶液 (PCR products 全量の 1/10 量) を加える
3. 99% エタノール (25  $\mu$ l) を加え、ボルテックスにて攪拌
4. 静置 (15 min)
5. 遠心分離 (15000 rpm, 20 min)
6. 上清を除去
7. 70% Et-OH (125  $\mu$ l) を加え、ボルテックスにて攪拌
8. 遠心分離 (15000 rpm, 5 min)
9. 上清を除去後、減圧乾燥 (5~10 min)
10. 遮光して -20°C で保存

Fig. 2-6 エタノール沈殿

## 2. 酵母の分離と同定

### ・ 分離方法

培養方法は第2章 第2節 第1項-2に準じた。

微生物の分離は、コロニー形態からグルーピングを行い、それぞれ異なるもの選抜し、さらに同組成 (Table 2-6) 寒天平板培地に画線塗抹することにより、それぞれ単コロニーを釣菌し純化分離株とした。

### ・ 同定方法

第2章 第2節 第2項-1に準じた。

## 3. 一般細菌の分離と同定

### ・ 分離方法

培養方法は第2章 第2節 第1項-3に準じた。分離方法は第2章 第2節 第2項-2に準じた。ただし、寒天平板培地には NA 培地 (Table 2-7) を用いた。

### ・ 同定方法

16S rDNA 塩基配列に基づき同定した。

分離株からの DNA 抽出法、template DNA 調製法は第2章 第2節 第2項-1に準じた。16S rDNA を対象とした primer 8F と 15R を用い、PCR 反応により増幅を行った (入澤ら、2010) (Tables 2-18, 2-19, 2-20)。DNA 増幅の確認及び精製は第2章 第2節 第2項 1に準じた。シーケンス反応は、16S rDNA 塩基配列の前半約 500bp を解析対象とし、primer 8F と 520R を用いた PCR 反応を行った (入澤ら、2010) (Table 2-21)。PCR 反応とエタノール沈殿、塩基配列の決定は第2章 第2節 第2項-1に準じた。

決定した塩基配列について Ez Taxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) の BLAST 機能を用いて相同性検索を行い、分離株の同定を行った。

## 4. 乳酸菌の分離と同定

### ・ 分離方法

培養方法は第2章 第2節 第1項-4に準じた。分離方法は第2章 第2節 第2項-2に準じた。ただし、寒天平板培地には MRS 培地 (Table 2-9) を用いた。

### ・ 同定方法

同定方法は第2章 第2節 第2項-3 (一般細菌の同定) に準じた。

Table 2-18 16S rDNA PCR 用 primers

Primer	sequence (5'-3')
8F	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG
15R	AAG GAG GTG ATC CAA CCG CA

Table 2-19 16S rDNA PCR 反応液組成

10x EX Taq buffer	2.5 $\mu$ l
dNTP mixture	2.0 $\mu$ l
Each primer (100 pmol/ $\mu$ l)	each 0.1 $\mu$ l
Ex taq polymerase (5 U/ml)	0.125 $\mu$ l
template DNA	1.0 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	20.2 $\mu$ l

Table 2-20 16S rDNA PCR 反応条件

1	94°C	30 sec
2	55°C	30 sec
3	72°C	90 sec
4	Go to 1, 34 cycles	
5	72°C	2 sec

Table 2-21 Sequencing PCR 用 primers

primer	sequence (5'-3')
8F	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG
520R	ACC GCG GCT GCT GGC

## 【結果】

浸漬工程から糸状菌 1 株、酵母 42 株、細菌 93 株；発酵工程 I から糸状菌 56 株、酵母 18 株、一般細菌 49 株；発酵工程 II から糸状菌 43 株、酵母 14 株、一般細菌 58 株を分離した。

糸状菌は *Mucor* 属、*Penicillium* 属が主体であり、毎年両農家の発酵工程（I 及び II）に常に生息し、全体の約 9 割を占めた。また、一部の試料より *Aspergillus* 属が分離された（Table 2-22）。酵母は *Candida* 属が主体であり、年度によっては *Saccharomyces* 属や *Pichia* 属の生息も認められた（Table 2-23）。一般細菌は、17 属と多種多様な菌種が存在し、毎年両農家で共通して高頻度で分離されたのは *Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属であった（Tables 2-24, 2-25）。また、乳酸菌においては *Leuconostoc* 属が主要菌種であった（Table 2-26）。

Table 2-22 各せんだんご製造工程より分離した糸状菌の同定結果

年	工程	豊玉町	巖原町
2009	浸漬	—	<i>Mucor</i> sp. (1)
	発酵 I	<i>Mucor</i> sp.	(4) <i>Aspergillus</i> sp. (5)
		<i>Penicillium</i> sp.	(3) <i>Mucor</i> sp. (10)
			<i>Penicillium</i> sp. (7)
発酵 II	<i>Mucor</i> sp.	(3) <i>Mucor</i> sp. (6)	
	<i>Penicillium</i> sp.	(3) <i>Penicillium</i> sp. (7)	
2010	発酵 I	<i>Aspergillus</i> sp.	(5) <i>Mucor</i> sp. (7)
		<i>Penicillium</i> sp.	(2) <i>Penicillium</i> sp. (13)
	発酵 II	<i>Mucor</i> sp.	(4) <i>Mucor</i> sp. (11)
		<i>Penicillium</i> sp.	(3) <i>Penicillium</i> sp. (6)

\*( ) 内は株数

Table 2-23 各せんだんご製造工程より分離した酵母の同定結果

年	工程	豊玉町	巖原町	
2009	浸漬	<i>Candida</i> sp.	(10) <i>Candida</i> sp. (2)	
		<i>Pichia</i> sp.	(6)	
		<i>Saccharomyces</i> sp.	(3)	
	発酵 I	<i>Candida</i> sp.	(3) <i>Candida</i> sp. (2)	
		<i>Hanseniaspora</i> sp.	(1) <i>Pichia</i> sp. (2)	
		<i>Pichia</i> sp.	(2)	
		<i>Saccharomyces</i> sp.	(1)	
		<i>Williopsis</i> sp.	(1)	
	発酵 II	<i>Candida</i> sp.	(1) <i>Candida</i> sp. (1)	
		<i>Pichia</i> sp.	(2) <i>Pichia</i> sp. (2)	
	2010	浸漬	<i>Candida</i> sp.	(2) <i>Candida</i> sp. (1)
			<i>Pichia</i> sp.	(7) <i>Saccharomyces</i> sp. (4)
			<i>Saccharomyces</i> sp.	(7)
		発酵 I	<i>Candida</i> sp.	(1) <i>Saccharomyces</i> sp. (3)
			<i>Hanseniaspora</i> sp.	(2)
発酵 II		<i>Candida</i> sp.	(3) <i>Saccharomyces</i> sp. (2)	
		<i>Hanseniaspora</i> sp.	(2)	
		<i>Saccharomyces</i> sp.	(1)	

\*() 内は株数



Table 2-24 各せんだんご製造工程より分離した一般細菌の同定結果 (2009 年)

年	工程	豊玉町	巖原町	
2009	浸漬	<i>Bacillus</i> sp.	(2) <i>Bacillus</i> sp. (6)	
		<i>Paenibacillus</i> sp.	(6) <i>Brevundimonas</i> sp. (1)	
		<i>Pseudomonas</i> sp.	(3) <i>Exiguobacterium</i> sp. (1)	
		<i>Raoultella</i> sp.	(1) <i>Luteibacter</i> sp. (1)	
			<i>Paenibacillus</i> sp. (9)	
			<i>Pseudomonas</i> sp. (7)	
			<i>Raoultella</i> sp. (5)	
			<i>Staphylococcus</i> sp. (2)	
			<i>Stenotrophomonas</i> sp. (1)	
		発酵 I	<i>Bacillus</i> sp.	(1) <i>Bacillus</i> sp. (1)
			<i>Cellulomonas</i> sp.	(2) <i>Microbacterium</i> sp. (9)
			<i>Chryseobacterium</i> sp.	(2) <i>Paenibacillus</i> sp. (5)
			<i>Paenibacillus</i> sp.	(1) <i>Rhodococcus</i> sp. (2)
			<i>Pseudomonas</i> sp.	(4) <i>Sphingobacterium</i> sp. (2)
発酵 II	<i>Bacillus</i> sp.	(2) <i>Bacillus</i> sp. (1)		
	<i>Klebsiella</i> sp.	(1) <i>Microbacterium</i> sp. (4)		
	<i>Microbacterium</i> sp.	(2) <i>Oerskovia</i> sp. (23)		
	<i>Paenibacillus</i> sp.	(3) <i>Paenibacillus</i> sp. (3)		
	<i>Pseudomonas</i> sp.	(1) <i>Sphingobacterium</i> sp. (2)		
	<i>Sphingobacterium</i> sp.	(2)		
	<i>Staphylococcus</i> sp.	(1)		
	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	(1)		

\*( ) 内は株数

Table 2-25 各せんだんご製造工程より分離した一般細菌の同定結果 (2010 年)

年	工程	豊玉町		巖原町	
2010	浸漬	<i>Bacillus</i> sp.	(8)	<i>Bacillus</i> sp.	(7)
		<i>Microbacterium</i> sp.	(1)	<i>Chryseobacterium</i> sp.	(1)
		<i>Pseudomonas</i> sp.	(13)	<i>Paenibacillus</i> sp.	(1)
				<i>Pseudomonas</i> sp.	(10)
			<i>Staphylococcus</i> sp.	(7)	
	発酵 I	<i>Bacillus</i> spp.	(1)	<i>Cellulomonas</i> sp.	(2)
		<i>Paenibacillus</i> sp.	(1)	<i>Klebsiella</i> sp.	(1)
		<i>Pseudomonas</i> sp.	(2)	<i>Paenibacillus</i> sp.	(4)
				<i>Pseudomonas</i> sp.	(1)
				<i>Staphylococcus</i> sp.	(8)
	発酵 II	<i>Bacillus</i> sp.	(3)	<i>Bacillus</i> sp.	(1)
		<i>Paenibacillus</i> sp.	(1)	<i>Klebsiella</i> sp.	(1)
		<i>Staphylococcus</i> sp.	(3)	<i>Paenibacillus</i> sp.	(1)
				<i>Pseudomonas</i> sp.	(1)
				<i>Xanthomonas</i> sp.	(1)

\*( ) 内は株数

Table 2-26 各せんだんご製造工程より分離した乳酸菌の同定結果

年	工程	豊玉町	
2008	浸漬	<i>Leuconostoc</i> sp.	(9)
	発酵 I	<i>Leuconostoc</i> sp.	(19)
		<i>Lactobacillus</i> sp.	(1)
		<i>Lactococcus</i> sp.	(1)
	発酵 II	<i>Leuconostoc</i> sp.	(3)
		<i>Lactococcus</i> sp.	(1)
2009	浸漬	<i>Leuconostoc</i> sp.	(13)
	発酵 I	<i>Leuconostoc</i> sp.	(26)
		<i>Lactococcus</i> sp.	(2)
	発酵 II	<i>Leuconostoc</i> sp.	(4)
		<i>Lactococcus</i> sp.	(1)

\*( ) 内は株数

### 第3節 分離株のデンプン及び食物繊維分解能試験

ろくべえ麺の独特な食感形成は、サツマイモに含まれるデンプンや繊維質の低分子量化に起因する。そこで分離株より、デンプンや繊維質（ペクチンとヘミセルロースの主成分であるキシラン）の分解活性を有する微生物を選抜することとした。

#### 第1項 デンプン分解株の選抜

##### 【方法】

##### 1. 糸状菌のデンプン分解能

分離株をデンプン含有 LCA 培地 (Table 2-27) に接種し、25°C・7日間培養した。コロニーが形成した平板寒天培地上にヨウ素溶液 (Table 2-28) を添加した。そして、コロニー周辺のハロ形成の有無により、デンプン分解能を判定した。

また、主要なデンプン分解株は、せんだんご製造環境を考慮し、15°Cにおける酵素活性について検討した。主要デンプン分解株を前記の液体培地にて培養し、その培養液上清に含まれるデンプン分解酵素の活性を DNS 法 (Miller, 1959) (Fig. 2-7) にて測定し、活性の有無を判定した。

Table 2-27 LCA 培地組成

LCA 培地	
Yeast-extract*	0.02 g
NaNO <sub>3</sub>	0.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g
KCl	0.02 g
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.02 g
Water	100 ml
pH	4.0
Agar	1.5 g

Autoclaved at 121°C for 15 min

Table 2-28 0.05 M ヨウ素溶液組成

ヨウ素溶液	
KI	4.0 g
Iodine	1.4 g
Water	100 ml

\*: オリエンタル酵母株式会社製

1. 培養上清 (50  $\mu$ l) とデンプン溶液 (50  $\mu$ l) を 3 時間反応させる  
(ブランクには培養上清を加熱処理したものを使用)
2. 上記の反応液に DNS\*試薬 (200  $\mu$ l) を添加しボルテックスにより攪拌
3. 煮沸 (5min)
4. 流水にて冷却
5. 冷却後、200  $\mu$ l をマイクロプレートにうつす
6. 吸光度 (535 nm) を測定

Fig. 2-7 DNS 法 (還元糖量の測定)

\*DNS 試薬

3,5-dinitrosalicylic acid	0.5 g
2N NaOH	20 ml
Potassium Sodium (+)-Tartrate Tetrahydrate	30 g
Water	Up to 100 ml

## 2. 酵母のデンプン分解能

分離株をグルコースを含まないデンプン含有 YM 寒天培地に接種し、25°C・7 日間培養した。デンプン分解能の判定は第 2 章 第 3 節 第 1 項-1 に準じた。

## 3. 一般細菌のデンプン分解能

分離株をデンプン含有 NA 寒天培地に接種し、30°C・7 日間培養した。デンプン分解能の判定は第 2 章 第 3 節 第 1 項-1 に準じた。

### 【結果】

糸状菌では *Aspergillus* 属、*Mucor* 属、*Penicillium* 属の全ての分離株にデンプン分解能が認められ、両地域の発酵工程（Ⅰ及びⅡ）に毎年常に生息している主な糸状菌は *Mucor* 属、*Penicillium* 属であった (Table 2-29)。

酵母においては、デンプン分解能を有する分離株は確認されなかった。

一般細菌においてデンプン分解能を有する株 (52 株) が認められ、なかでも、*Bacillus* 属 (7 株)、*Paenibacillus* 属 (23 株) がその 6 割を占めた (Table 2-30)。

また、主体となるデンプン分解微生物であった *Mucor* 属 (46 株)、*Penicillium* 属 (44 株)、*Bacillus* 属 (7 株)、*Paenibacillus* 属 (23 株) において、せんだんご製造環境を反映させた 15°C で各種酵素活性を検討した。その結果、*Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属はわずかに生育が確認されるものの、デンプン分解酵素活性は認められなかった。一方、*Mucor* 属と *Penicillium* 属の全ての分離株において 15°C でもデンプン分解能が認められた。

Table 2-29 デンプン分解能を有する糸状菌

年	工程	豊玉町	巖原町		
2009	浸漬	—	<i>Mucor</i> sp.	(1)	
	発酵 I	<i>Mucor</i> sp.	(4)	<i>Aspergillus</i> sp.	(5)
		<i>Penicillium</i> sp.	(3)	<i>Mucor</i> sp.	(10)
				<i>Penicillium</i> sp.	(7)
	発酵 II	<i>Mucor</i> sp.	(3)	<i>Mucor</i> sp.	(6)
		<i>Penicillium</i> sp.	(3)	<i>Penicillium</i> sp.	(7)
2010	発酵 I	<i>Aspergillus</i> sp.	(5)	<i>Mucor</i> sp.	(7)
		<i>Penicillium</i> sp.	(2)	<i>Penicillium</i> sp.	(13)
	発酵 II	<i>Mucor</i> sp.	(4)	<i>Mucor</i> sp.	(11)
		<i>Penicillium</i> sp.	(3)	<i>Penicillium</i> sp.	(6)

\*( ) 内は株数

Table 2-30 デンプン分解能を有する一般細菌

年	工程	豊玉町	巖原町				
2009	浸漬	—	<i>Paenibacillus</i> sp.	(6)	<i>Bacillus</i> sp.	(5)	
					<i>Brevundimonas</i> sp.	(1)	
					<i>Exiguobacterium</i> sp.	(1)	
					<i>Luteibacter</i> sp.	(1)	
					<i>Paenibacillus</i> sp.	(9)	
					<i>Stenotrophomonas</i> sp.	(1)	
	発酵 I	—		<i>Microbacterium</i> sp.	(3)		
				<i>Paenibacillus</i> sp.	(2)		
	発酵 II			<i>Klebsiella</i> sp.	(1)	<i>Microbacterium</i> sp.	(2)
				<i>Microbacterium</i> sp.	(2)	<i>Oerskovia</i> sp.	(5)
				<i>Paenibacillus</i> sp.	(3)	<i>Paenibacillus</i> sp.	(3)
				<i>Pseudomonas</i> sp.	(1)		
				<i>Sphingobacterium</i> sp.	(2)		
<i>Staphylococcus</i> sp.				(1)			
<i>Stenotrophomonas</i> sp.				(1)			
2010			<i>Bacillus</i> sp.	(2)			

\*( ) 内は株数

## 第2項 ペクチン分解株の選抜

### 【方法】

#### 1. 糸状菌のペクチン分解能

分離株をペクチン含有 LCA 寒天培地に接種し、25℃・7日間培養した。コロニーが形成した平板寒天培地上にルテニウムレッド溶液 (Table 2-31) を添加した。そして、コロニー周辺のハロ形成の有無により、ペクチン分解能を判定した。

また、主要なペクチン分解株は、せんだんご製造環境を考慮し、15℃における酵素活性について検討した。主要ペクチン分解株を前記の液体培地にて培養し、その培養液上清に含まれるペクチン分解酵素活性を DNS 法 (Miller, 1959) にて測定し、活性の有無を判定した。

#### 2. 酵母のペクチン分解能

分離株をグルコースを含まないペクチン含有 YM 寒天培地に接種し、25℃・7日間培養した。ペクチン分解能の判定は第2章 第3節 第2項-1に準じた。

#### 3. 一般細菌のペクチン分解能

分離株をデンプン含有 NA 寒天培地に接種し、30℃・7日間培養した。ペクチン分解能の判定は第2章 第3節 第2項-1に準じた。

Table 2-31 ルテニウムレッド溶液組成

#### ルテニウムレッド溶液

Ruthenium Red	0.1 g
Water	100 ml



## 【結果】

糸状菌の *Aspergillus* 属、*Mucor* 属、*Penicillium* 属の全ての分離株にペクチン分解能が認められ、両地域の発酵工程（Ⅰ及びⅡ）に毎年常に生息している主な糸状菌は *Mucor* 属、*Penicillium* 属であった (Table 2-32)。

酵母においては、2009 年の浸漬工程のみから分離された *Saccharomyces* 属 7 株においてのみ、ペクチン分解能が確認された。

また、主体となるペクチン分解微生物であった *Mucor* 属 (46 株)、*Penicillium* 属 (44 株)において、せんだんご製造環境を反映させた 15°C で各種酵素活性を検討した。その結果、*Mucor* 属と *Penicillium* 属の全株において 15°C でもペクチン分解能が認められた。

Table 2-32 ペクチン分解能を有する糸状菌

年	工程	豊玉町	巖原町
2009	浸漬	—	<i>Mucor</i> sp. (1)
	発酵Ⅰ	<i>Mucor</i> sp.	(4) <i>Aspergillus</i> sp. (5)
		<i>Penicillium</i> sp.	(3) <i>Mucor</i> sp. (10)
			<i>Penicillium</i> sp. (7)
	発酵Ⅱ	<i>Mucor</i> sp.	(3) <i>Mucor</i> sp. (6)
		<i>Penicillium</i> sp.	(3) <i>Penicillium</i> sp. (7)
2010	発酵Ⅰ	<i>Aspergillus</i> sp.	(5) <i>Mucor</i> sp. (7)
		<i>Penicillium</i> sp.	(2) <i>Penicillium</i> sp. (13)
	発酵Ⅱ	<i>Mucor</i> sp.	(4) <i>Mucor</i> sp. (11)
		<i>Penicillium</i> sp.	(3) <i>Penicillium</i> sp. (6)

\* ( ) 内は株数

### 第3項 キシラン分解株の選抜

#### 【方法】

#### 1. 糸状菌のキシラン分解能

分離株をキシラン（ヘミセルロースの主成分）含有 LCA 寒天培地に接種し、25℃・7日間培養した。キシラン含有 LCA 寒天培地は白濁しているため、形成したコロニーの周囲にハロができたものをキシラン分解能有りと判断した。

また、主要なキシラン分解株は、せんだんご製造環境を考慮し、15℃における酵素活性について検討した。主要キシラン分解株を前記の液体培地にて培養し、その培養液上清に含まれるキシラン分解酵素活性を DNS 法 (Miller, 1959) にて測定し、活性の有無を判定した。

#### 2. 酵母のキシラン分解能

分離株をグルコースを含まないキシラン含有 YM 寒天培地に接種し、25℃・7日間培養した。キシラン分解能の判定は第2章 第3節 第2項-1に準じた。

#### 3. 一般細菌のキシラン分解能

分離株をキシラン含有 NA 寒天培地に接種し、30℃・7日間培養した。キシラン分解能の判定は第2章 第3節 第2項-1に準じた。

## 【結果】

糸状菌では *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属の全ての分離株にキシラン分解能が認められ、両地域の発酵工程（Ⅰ及びⅡ）に毎年常に生息している主な糸状菌は *Penicillium* 属であった (Table 2-33)。

酵母、一般細菌においては、キシラン分解能を有する分離株は確認されなかった。

また、主体となるキシラン分解微生物であった *Penicillium* 属 (44 株)において、せんだんご製造環境を反映させた 15°Cで各種酵素活性を検討した。その結果、*Penicillium* 属の全ての分離株において 15°Cでもキシラン分解能が認められた。

Table 2-33 キシラン分解能を有する糸状菌

年	工程	豊玉町	巖原町
2009	発酵Ⅰ	<i>Penicillium</i> sp.	(3) <i>Aspergillus</i> sp. (5) <i>Penicillium</i> sp. (7)
		<i>Penicillium</i> sp.	(3) <i>Penicillium</i> sp. (7)
	発酵Ⅱ	<i>Penicillium</i> sp.	(3) <i>Penicillium</i> sp. (7)
2010	発酵Ⅰ	<i>Aspergillus</i> sp.	(5) <i>Penicillium</i> sp. (13) <i>Penicillium</i> sp. (2)
		<i>Penicillium</i> sp.	(2)
	発酵Ⅱ	<i>Penicillium</i> sp.	(3) <i>Penicillium</i> sp. (6)

\*() 内は株数

#### 第4項 *Mucor* 属及び *Penicillium* 属の種の同定

全分離株について、デンプン、ペクチン及びキシランの分解能を検討したところ、一部の細菌や糸状菌の全株において、それらの分解能が確認された。これらのうち、せんだんご製造現場を考慮した 15°C という低温でも活性を有すること、さらには製造年度・農家に関わらず常にその生息が確認された菌種は、*Mucor* 属及び *Penicillium* 属の全分離株のみであった。

そこでこれらの菌株においては詳細に種の同定を行うこととした。

#### 【方法】

##### ・ ジャイアントコロニーの観察

分離株の孢子懸濁液 (Table 2-34) を調製し、PDA 培地にて 25°C・5 日間培養した。各コロニー形態にてグルーピング後、顕微鏡観察を行った。

##### ・ DNA 塩基配列の決定

28S rDNA D1/D2 領域塩基配列に加え、ITS 領域塩基配列及び  $\beta$ -チューブリン塩基配列に基づき同定することとした ( $\beta$ -チューブリン塩基配列は *Penicillium* 属のみ検討した)。

分離株からの DNA 抽出法、template DNA 調製法は第2章 第2節 第2項-1 に準じた。ITS 領域遺伝子の約 500 bp を解析対象とした primer ITS 5 と ITS 4 (White *et al.*, 1990) を用い、PCR 反応 (Xiaoyan *et al.*, 2011) により増幅を行った (Tables 2-35, 2-36, 2-37)。また、同様に  $\beta$ -チューブリン遺伝子の約 450 bp を解析対象とした primer Bt2a と Bt2b (Glass *et al.*, 1995) を用い、PCR 反応 (Robert *et al.*, 2004) により増幅を行った (Tables 2-38, 2-39, 2-40)。

DNA の増幅の確認及び精製、シーケンス反応、エタノール沈殿、塩基配列の決定、相同性検索については第2章 第2節 第2項 1 に準じた。

Table 2-34 孢子懸濁液組成

## 孢子懸濁用水溶液

Agar	0.2 g
Tween 80	0.1 g
NaCl	1.8 g
Water	100 ml

Table 2-35 ITS 領域塩基配列 PCR 用 primers

Primer	sequence (5'-3')
ITS 5 (F)	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G
ITS 4 (R)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

Table 2-36 ITS 領域塩基配列 PCR 反応液組成

10x EX Taq buffer	2.5 $\mu$ l
dNTP mixture	2.0 $\mu$ l
Each primer (100 pmol/ $\mu$ l)	each 0.1 $\mu$ l
Ex taq polymerase (5 U/ml)	0.125 $\mu$ l
template DNA	1.0 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	20.2 $\mu$ l

Table 2-37 ITS 領域塩基配列 PCR 反応条件

1	95°C	3 min
2	94°C	40 sec
3	52°C	50 sec
4	72°C	60 sec
5	Go to 2, 35 cycles	
6	72°C	10 min

Table 2-38  $\beta$ -チューブリン塩基配列 PCR 用 primers

Primer	sequence (5'-3')
Bt2a (F)	GGT AAC CAA ATC GGT GCT TTC
Bt2b (R)	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC

Table 2-39  $\beta$ -チューブリン塩基配列 PCR 反応液組成

10xEX Taq buffer	4.0 $\mu$ l
dNTP mixture	5.0 $\mu$ l
Each primer (5 pmol/ $\mu$ l)	each 2.0 $\mu$ l
Ex taq polymerase (5 U/ml)	0.25 $\mu$ l
template DNA	4.0 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	33.0 $\mu$ l

Table 2-40  $\beta$ -チューブリン塩基配列 PCR 反応条件

1	94°C	3 min
2	94°C	30 sec
3	60°C	40 sec
4	72°C	1 min
5	Go to 2, 35 cycles	
6	72°C	5 min

## 【結果】

せんだんご製造環境の温度である 15℃でも、デンプン及びペクチン分解能が認められた *Mucor* 属と *Penicillium* 属の種の同定を行った。その結果、*Mucor* 属は全ての分離株 *M. circinelloides* であり、*Penicillium* 属においては、*P. echinulatum*、*P. expansum*、*P. crustosum*、*P. roqueforti* の 4 菌種の存在が認められた (Table 2-41)。また、*Mucor* 属、*Penicillium* 属のコロニー観察と顕微鏡観察の結果を Fig. 2-8 ~ 2-17 に示した。

Table 2-41 *Penicillium* 属の同定結果

年	工程	豊玉町	巖原町
2009	発酵 I	<i>P. expansum</i>	(2) <i>P. expansum</i> (2)
		<i>P. roqueforti</i>	(2) <i>P. echinulatum</i> (1)
			<i>P. crustosum</i> (5)
	発酵 II	<i>P. expansum</i>	(1) <i>P. expansum</i> (5)
		<i>P. echinulatum</i>	(1) <i>P. echinulatum</i> (1)
		<i>P. roqueforti</i>	(2)
2010	発酵 I	<i>P. expansum</i>	(1) <i>P. expansum</i> (6)
		<i>P. echinulatum</i>	(1) <i>P. echinulatum</i> (4)
		<i>P. crustosum</i>	(1)
	発酵 II	<i>P. expansum</i>	(1) <i>P. expansum</i> (3)
		<i>P. echinulatum</i>	(1) <i>P. echinulatum</i> (6)

\*() 内は株数



Fig. 2-8 *M. circinelloides* 37-1 株  
コロニー観察

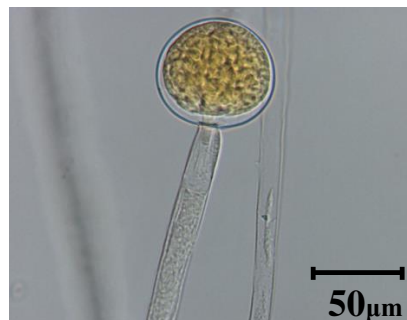


Fig. 2-9 *M. circinelloides* 37-1 株  
顕微鏡観察



Fig. 2-10 *P. expansum* 13-3 株  
コロニー観察

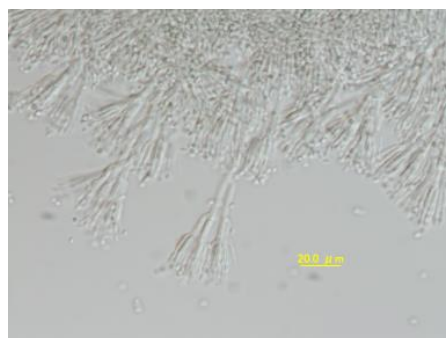


Fig. 2-11 *P. expansum* 13-3 株  
顕微鏡観察



Fig. 2-12 *P. echinulatum* 38-1 株  
コロニー観察



Fig. 2-13 *P. echinulatum* 38-1 株  
顕微鏡観察



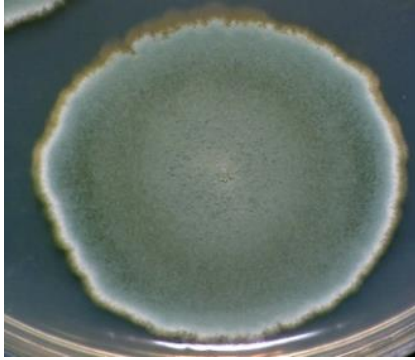


Fig. 2-14 *P. crustosum* 14-4 株  
コロニー観察

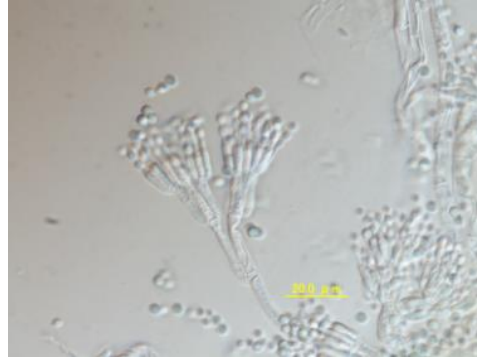


Fig. 2-15 *P. crustosum* 14-4 株  
顕微鏡観察

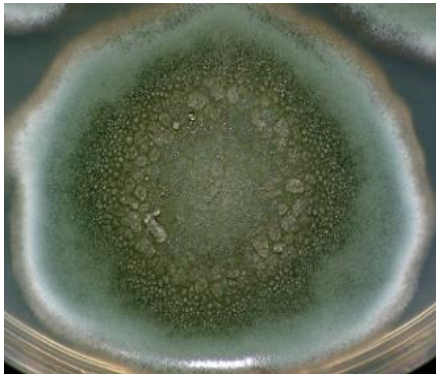


Fig. 2-16 *P. roqueforti* 40-6 株  
コロニー観察

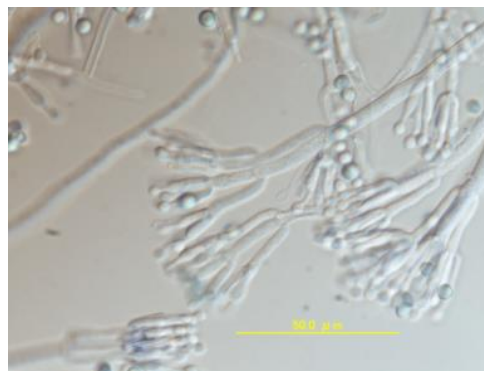


Fig. 2-17 *P. crustosum* 40-6 株  
顕微鏡観察

#### 第4節 第2章 まとめ

せんだんご製造工程中において微生物が関わっていると考えられる3工程（浸漬工程、発酵工程Ⅰ、発酵工程Ⅱ）に着目し、各工程の目視あるいは臭いから、糸状菌、酵母、細菌の存在が考えられた。そこで、各工程から試料を採取し、糸状菌、酵母、一般細菌の生菌数の測定及び分離・同定を行った。

生菌数においては、糸状菌は $10^4\sim 10^7$ 、酵母は $10^3\sim 10^7$ 、一般細菌では $10^6\sim 10^9$ CFU/g程度であり、各種微生物の分離・同定の結果、多種多様な微生物が分離された。一般に食品の腐敗菌と呼ばれる菌種をはじめとして、多種多様な微生物が分離されたのは、製造工程が管理された環境ではなく、野ざらしで行われているため、その地域の土壌由来の微生物がせんだんご製造工程中のサツマイモ片にて繁殖したものと考えられる。また、2つの農家において糸状菌は発酵工程（Ⅰ及びⅡ）において、また、酵母及び一般細菌は3工程を通じて、次のような菌叢で構成されていた。すなわち、主要な微生物群は糸状菌では *Mucor* 属、*Penicillium* 属が、酵母では *Candida* 属と *Saccharomyces* 属が、一般細菌では *Bacillus* 属、*Paenibacillus* 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、農家や年度が異なっても、製造工程中に見出される微生物が類似した菌叢で構成されていたのは、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。

上記のようにせんだんご製造工程中に生息する微生物の種類を全体像として把握することができた。さらにこれら微生物の中で、ろくべえ麺の独特な食感形成に欠かせない微生物を特定する必要がある。せんだんご及びろくべえ麺を食品学的に研究した報告（岡ら、2011）に基づき、せんだんご製造に欠かせない微生物を特定することとした。その報告によると、せんだんごに含まれるデンプンと繊維質が原料サツマイモに含まれるそれらと比べると部分的な分解が生じているとされており、繊維質の中でもペクチンの減少量が多い（岡ら、2011）とある。そこで、デンプン、ペクチン及びキシランの分解能を有する微生物の選抜を行った。

その結果、*Aspergillus* 属、*Mucor* 属、*Penicillium* 属の全ての分離株においてデンプン及びペクチン分解能が確認され、一部の浸漬工程のみより分離された *Saccharomyces* 属ではペクチン分解能、一部の *Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属にデンプン分解能が確認された。また、せんだんご製造環境を反映させた15°Cという低温条件では、一般細菌はわずかに生育するものの、デンプン分解酵素活性は検出限界以下であった。せんだんごの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。さらに、*Aspergillus* 属と *Penicillium* 属にはキシランの分解能も確認された。また、*Aspergillus*

属、*Mucor* 属、*Penicillium* 属はせんだんご製造環境を反映した 15°Cでの培養時にも、デンプン、ペクチン及びキシランの全ての分解能を示した。特に、*Mucor* 属、*Penicillium* 属の特徴を持つ同学名の糸状菌は、両農家の発酵工程（Ⅰ及びⅡ）において、どの年度においても生息していることが確認された。

以上の結果より、せんだんご製造において、発酵工程（Ⅰ及びⅡ）で主に生息している *Mucor* 属、*Penicillium* 属の糸状菌が重要な役割を果していると判断した。

そして、*Mucor* 属は全ての菌株が *M. circinelloides* であり、*Penicillium* 属においては、*P. echinulatum*、*P. expansum*、*P. crustosum*、*P. roqueforti* の 4 菌種が存在することを明らかとした。また、*Penicillium* 属のなかでも、*P. echinulatum*、*P. expansum* の 2 菌種が毎年・両農家にて高頻度で生息が確認された菌種であった。

本研究によって得られた結果は、せんだんご製造中に生息する微生物叢を明らかにした初めての報告となる。また、世界的に見て、デンプンを主原料とするサツマイモの発酵食品製造において、*Mucor* 属や *Penicillium* 属の糸状菌が主要微生物として関わっている例は稀であることから、せんだんごは非常に珍しい発酵食品であるといえる。

### 第3章 せんだんご製造工程中に生息する糸状菌のサツマイモの発酵における役割

#### 序論

ろくべえ麺の独特な食感は、原料サツマイモ粉からは得られず、せんだんごに含まれるデンプンや繊維質（ペクチン及びヘミセルロース）が原料サツマイモのそれらに比べ、部分的に分解され低分子量化していることに起因すると報告されている（岡ら、2009,2011）。そこで、デンプンとペクチン、ヘミセルロースの主要成分であるキシランの分解に着目してせんだんご製造工程中に生息する微生物を調査し、デンプン、ペクチン及びキシランの分解に関わる微生物は *Mucor* 属と *Penicillium* 属、キシランの分解に関わる微生物は *Penicillium* 属であると推定した。しかし、せんだんご製造工程中に生じるデンプン、ペクチン及びヘミセルロースの部分的な分解による構造変化について、また糸状菌がサツマイモのデンプン、ペクチン及びヘミセルロースに与える影響については不明のままである。

そこで、サツマイモとせんだんごのデンプン、ペクチン及びヘミセルロースの分子量変化を検討すると共に、*Mucor* 属や *Penicillium* 属がデンプン、ペクチン及びヘミセルロースの構造に与える影響を検討することで、せんだんご製造に関与する糸状菌を明らかとすることを目的とした。

## 第1節 サツマイモとせんだんごに含まれるデンプン及び繊維質の分子量比較

せんだんご製造工程を経たサツマイモのデンプン、ペクチン及びヘミセルロースは部分的に分解され低分子量化しているとされている。そこで、この部分的な分解において、詳細に検討するために、サツマイモとせんだんごに含まれる各種成分の分子量分布を検討した。

### 第1項 サツマイモとせんだんごのデンプンの分子量分布解析

#### 【方法】

##### ・ 試料

対馬でせんだんご製造に用いる原料サツマイモと対馬産せんだんごを用いた。

##### ・ デンプンの調製

サツマイモを細片化し、純水に懸濁後、遠心分離 (3500 rpm, 10 min, 4°C) した。その沈殿物に 0.1% 水酸化ナトリウム溶液を加え、篩 (mesh No. 100 及び 300) に通した。再び遠心分離を行い、沈殿物を回収した。その後、沈殿物を純水にて pH 7.0 になるまで洗浄し、再び遠心分離を行い、2 層に分かれた沈殿物上層の褐色部 (繊維画分) と沈殿物下層部の白色部 (デンプン画分) に掻き分け、デンプン画分を 85% メタノールにて脱脂後、自然乾燥させたものをサツマイモデンプンとした (Yadav *et al.*, 2006)。また、せんだんごデンプンにおいても同様に抽出した。

##### ・ デンプンの分子量分布解析

試料 2 mg に 100% メタノール 50 µl を加え懸濁後、6.25 M 水酸化ナトリウム溶液 300 µl、純水 200 µl を加え攪拌した。その後、沸騰水浴中にて加熱し完全に糊化させたものを試料とした (中村ら、1986)。分子量分布は TSKgel GMPWXL+G5000PWXL (TOSOH) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより解析した。溶出液には 0.01 M 水酸化ナトリウム溶液 (0.02% アジ化ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウムを含む) を用い、流速 0.2 ml/min にて溶出した。その溶出液を 0.4 ml ずつ分画し、全糖量をフェノール・硫酸法にて測定した (Dubois *et al.*, 1956)。溶出の分子量マーカーとして、Dextran (平均分子量 ~2,000,000、425,000~575,000、64,000~70,000、35,000~45,000 : SIGMA-ALDRICH 社製) を用い、上記の試料と同様の条件にて溶出させ、フェノール硫酸法にて検出した。

### 【結果】

サツマイモとせんだんごから調製したデンプンのゲル濾過クロマトグラムを Fig. 3-1 に示した。せんだんごはサツマイモに比べ、主要なデンプンのピークが低分子量化していることを確認した。このことから、せんだんごデンプンはサツマイモデンプンと比べ、低分子量化していると考えられる。

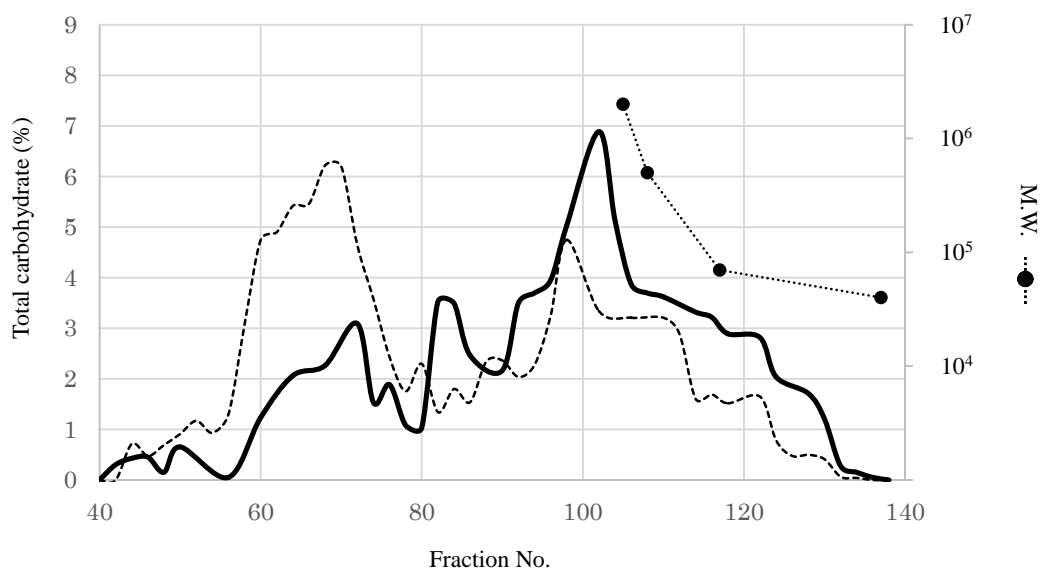


Fig. 3-1 せんだんごとサツマイモのデンプンの分子量分布

— せんだんご    - - - - サツマイモ    ···●··· 分子量マーカー

## 第2項 サツマイモとせんだんごのペクチンの分子量分布解析

### 【方法】

#### ・ 試料

試料は第3章 第1節 第1項に準じた。

#### ・ ペクチンの調製

前述で得られた繊維画分と篩に通らなかった繊維質を用いて、酵素法 (印南ら、1988) により粗繊維画分を抽出した (Fig. 3-2)。この粗繊維画分より、2.5% シュウ酸アンモニウムを用いてサツマイモペクチン画分を抽出した (辻井ら、2009) (Fig. 3-3)。抽出後の残渣はヘミセルロースの抽出に用いた。また、せんだんごペクチンにおいても同様に抽出した。

#### ・ ペクチンの分子量分布解析

試料 5 mg を 0.5 M 水酸化ナトリウム溶液 500  $\mu$ l に溶解し、フィルター (ADVANTEC Cellulose Acetate 0.45  $\mu$ m) に通したものを試料とした。分子量分布は TSKgel G5000PWXL+G3000PWXL (TOSOH) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより解析した。溶出液には 0.01 M 水酸化ナトリウム (0.02% アジ化ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウムを含む) を用い、流速 0.2 ml/min にて溶出した (辻井ら、2009)。その溶出液を 0.4 ml ずつ分画し、全糖量をフェノール・硫酸法にて測定した (Dubois *et al.*, 1956)。溶出の分子量マーカーとして、Dextran (平均分子量~2,000,000、425,000~575,000、64,000~70,000、4,000~6,000: SIGMA-ALDRICH 社製) を用い、上記と同様の条件にて溶出させ、フェノール硫酸法にて検出した (辻井ら、2009)。

### 【結果】

サツマイモとせんだんごから調製したペクチンのゲル濾過クロマトグラムを Fig. 3-4 に示した。せんだんごペクチンもデンプン同様に主要なピークが低分子量化していることを確認した。このことから、せんだんごペクチンはサツマイモペクチンに比べ、低分子量化していると考えられる。

1. 繊維画分 (25 g)
2. リン酸緩衝液 (0.05 M, pH 6.8, 80 ml)、超耐熱性  $\alpha$ -amylase<sup>\*1</sup> (0.5 ml) 添加
3. 室温で静置 (20 min)
4. 沸騰湯浴中にて酵素反応 (30 min)
5. 室温にて放冷
6. リン酸緩衝液 (0.05 M, pH 6.8, 30 ml)、塩化ナトリウム水溶液 (1 M, 1.3 ml)、  
パンクレアチン酵素液<sup>\*2</sup> (20 ml) を添加
7. 酵素反応 (37°C, 3 hr, 100 rpm)
8. ガラスフィルター (Fine 2G2 : 東京硝子器械社製) を用いて吸引濾過
9. 純水にて洗浄
10. アセトンにて洗浄・脱水
11. 自然乾燥

Fig. 3-2 酵素法による粗繊維画分の抽出

\*1 超耐熱性  $\alpha$ -amylase : ノボザイムズ社ターマミル 120L

\*2 パンクレアチン酵素液 : パンクレアチン (2.5 g) をリン酸緩衝液 (0.1M, pH 6.8, 50 ml) に溶解し、遠心分離 (3000 rpm, 20 min) 後、回収した上清を酵素液とした。

1. 粗繊維画分(5 g)
2. シュウ酸アンモニウム水溶液 (2.5%, 250 ml) 添加し振とう抽出 (70°C, 8 hr)
3. ガラスフィルター (Fine 2G2 : 東京硝子器械社製) を用いて、吸引濾過
4. 上清液を回収 (沈澱画分はヘミセルロースの抽出に使用)
5. 純水にて透析<sup>\*</sup>後、凍結乾燥したものをペクチン画分とした

Fig. 3-3 ペクチンの抽出

\*透析膜 : スペクトラ/ポア 6, MWCO 2,000 (フナコシ株式会社製)



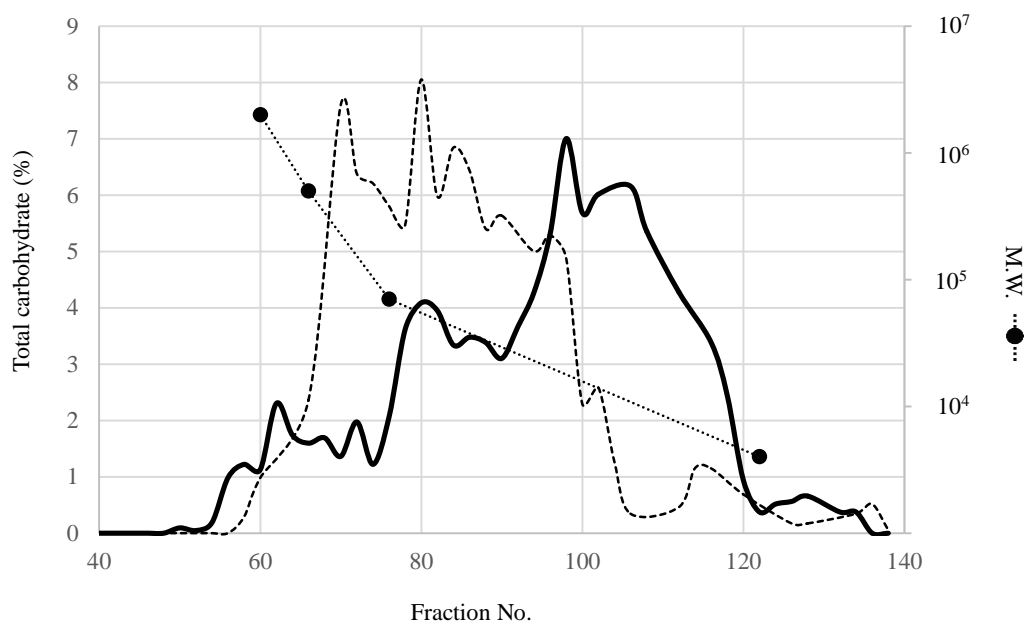


Fig. 3-4 せんだんごとサツマイモのペクチンの分子量分布  
 — せんだんご    - - - - サツマイモ    ·····●···· 分子量マーカー

### 第3項 サツマイモとせんだんごのヘミセルロースの分子量分布解析

#### 【方法】

##### ・ 試料

試料は第3章 第1節 第1項に準じた。

##### ・ ヘミセルロースの調製

ペクチン抽出の際に残った粗繊維画分より、1 M 水酸化カリウム溶液を用いてサツマイモヘミセルロース画分を抽出した (辻井ら、2009) (Fig. 3-5)。また、せんだんごヘミセルロースにおいても同様に抽出した。

##### ・ ヘミセルロースの分子量分布解析

分子量分布解析は第3章 第1節 第2項に準じた。

#### 【結果】

サツマイモとせんだんごから調製したヘミセルロースのゲル濾過クロマトグラムを Fig. 3-6 に示した。せんだんごヘミセルロースもデンプン同様に主要なピークが低分子量化していることを確認した。このことから、せんだんごヘミセルロースはサツマイモヘミセルロースに比べ、低分子量化していると考えられる。

#### 【第1節まとめ】

せんだんごとサツマイモに含まれるデンプン、ペクチン、ヘミセルロースの分子量分布について検討した。そして、これら成分全てはサツマイモに含まれるそれらと比べ、低分子量化していることが確認された。

これら各種成分はせんだんご製造工程中における発酵により低分子量化したものと考えられ、その低分子量化には、せんだんご製造工程中に生息しており、デンプンやペクチンの分解能を有する *Mucor* 属、各種成分の全分解能を有する *Penicillium* 属が関与していると考えられる。

1. 粗繊維画分 (5 g)
2. シュウ酸アンモニウム (2.5%, 250 ml) 添加し振とう抽出 (70°C, 8 hr)
3. ガラスフィルター (Fine 2G2 : 東京硝子器械社製) にて濾過
4. 沈殿物を回収 (上清液はペクチンの抽出に使用)
5. 水酸化カリウム溶液(1 M, 250 ml) 添加し、振とう抽出 (20°C, 8 hr)
6. ガラスフィルター (Fine 2G2 : 東京硝子器械社製) にて濾過
7. 上清液を回収
8. 純水にて透析\*後、凍結乾燥したものをヘミセルロース画分とした

Fig. 3-5 ヘミセルロースの抽出

\*透析膜 : スペクトラ/ポア 6, MWCO 2,000 (フナコシ株式会社製)

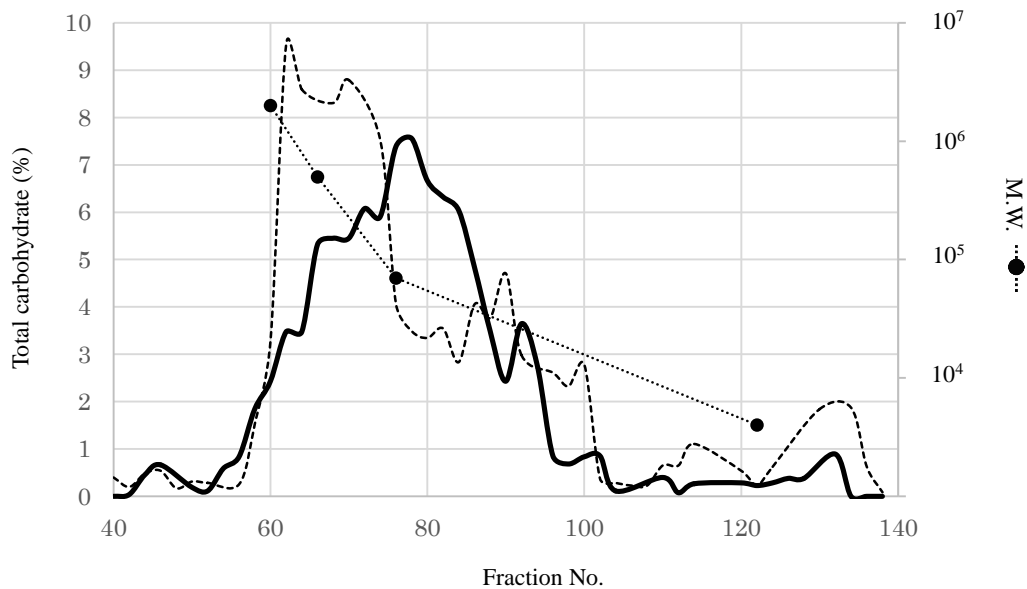


Fig. 3-6 せんだんごとサツマイモのヘミセルロースの分子量分布

—せんだんご    - - - - -サツマイモ    ·····●····分子量マーカー

## 第2節 *Mucor* 属及び *Penicillium* 属により発酵させたデンプン及び繊維質の分子量比較

せんだんご製造工程中に生息する *Mucor* 属や *Penicillium* 属は発酵工程においてデンプン、ペクチン及びヘミセルロースの低分子量化に関与していると考えられる。そこで、*Mucor* 属や *Penicillium* 属の発酵におけるデンプン、ペクチン及びキシラン（ヘミセルロースの主成分）の低分子量化について検討することとした。

### 第1項 糸状菌により発酵させたデンプンの分子量分布解析

#### 【方法】

##### ・供試菌株

せんだんご製造工程中より分離した *M. circinelloides* 37-1 株、*P. crustosum* 14-4 株、*P. echinulatum* 38-1 株、*P. expansum* 13-3 株、*P. roqueforti* 40-6 株を用いた。

##### ・培養及び培養後のデンプン回収の方法

デンプン（松谷化学工業株式会社製）を 1% 加えた LCA 培地に供試菌株を接種後、15°C・14 日間培養した。

その後、デンプン含有 LCA 培地に残留するデンプンは、培養液を遠心分離後の沈殿物として回収した。そして 85%メタノールにて洗浄し、自然乾燥させたものをデンプン試料とした。そのデンプンの分子量分布を第3章 第1節 第1項に準じて検討した。また、対照には供試菌株未接種のデンプン（以下、未接種デンプンとする）を用いた。

#### 【結果】

供試菌株をデンプン含有培地で培養し、残留したデンプンのゲル濾過クロマトグラムを Fig. 3-7、3-8、3-9 に示した。*M. circinelloides* 37-1 株、*P. crustosum* 14-4 株、*P. roqueforti* 40-6 株により発酵させたデンプンにおいては、未接種デンプンと同様の分子量分布を示し、高分子量側のデンプンが残存していた。一方、*P. echinulatum* 38-1 株と *P. expansum* 13-3 株により発酵させたデンプンにおいては、未接種デンプンに比べ、高分子量側のデンプンの主要なピークが低分子化していることを確認した。このことから、*P. echinulatum* 38-1 株と *P. expansum* 13-3 株はデンプンを低分子量化することが可能であると考えられる。

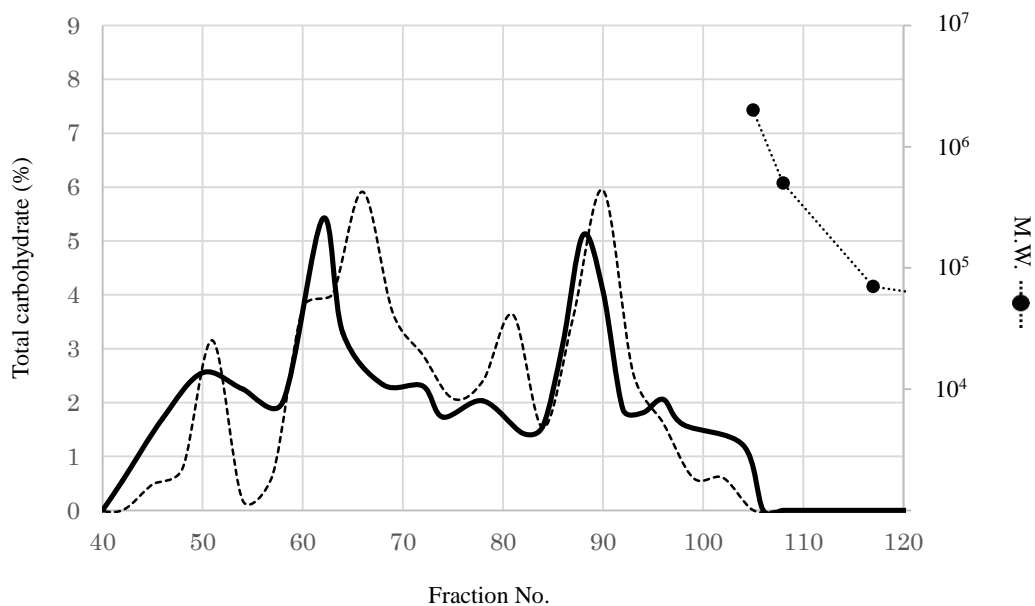


Fig. 3-7 *Mucor* 属により発酵させたサツマイモデンプンの分子量分布

— *M. circineroides* 37-1 株    ---- 未接種デンプン    ...●... 分子量マーカー

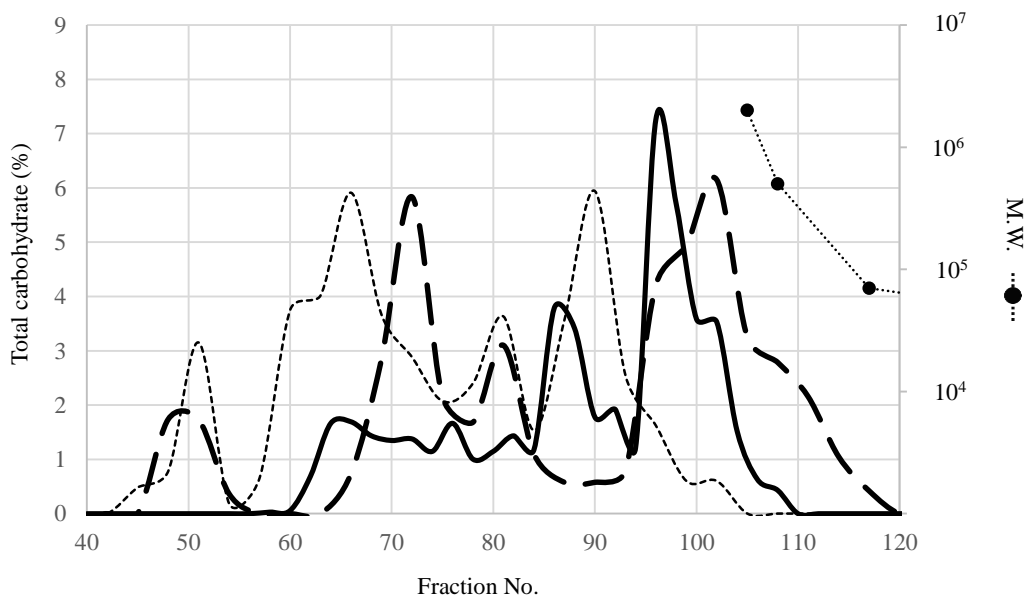


Fig. 3-8 *Penicillium* 属により発酵させたサツマイモデンプンの分子量分布

— *P. echinulatum* 38-1 株    - - - *P. expansum* 13-3 株    ---- 未接種デンプン  
...●... 分子量マーカー

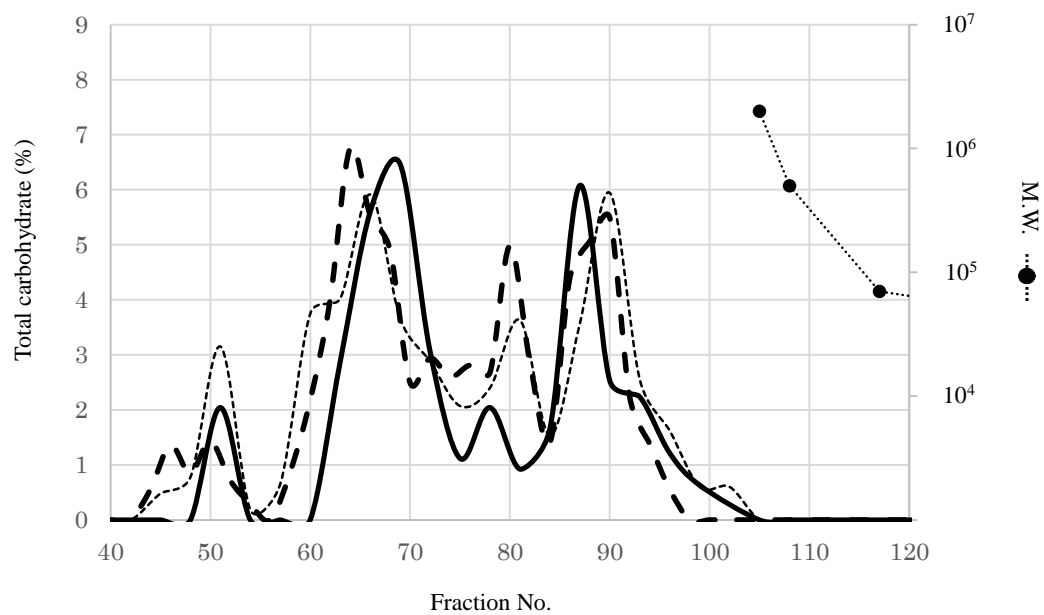


Fig. 3-9 *Penicillium* 属により発酵させたサツマイモデンプンの分子量分布  
 — *P. crustosum* 14-4 株    - - *P. roqueforti* 40-6 株    ..... 未接種デンプン  
 ●..... 分子量マーカー

## 第2項 糸状菌により発酵させたペクチンの分子量分布解析

### 【方法】

#### ・供試菌株

第3章 第2節 第1項に準じた。

#### ・培養方法

ペクチン（和光純薬工業株式会社製）を1%加えたLCA培地に供試菌株を接種後、15°C・14日間培養した。

その後、ペクチンは可溶性のため、培養液を回収し、フィルター（ADVANTEC Cellulose Acetate 0.45μm）を通したものをペクチン試料とした。また、分子量分布を第3章 第1節 第2項に準じて検討した。また、対照には供試菌株未接種のペクチン（以下、未接種ペクチンとする）を用いた。

### 【結果】

供試菌株をペクチン含有LCA培地で培養し、残留したペクチンのゲル濾過クロマトグラムをFig. 3-10、3-11、3-12に示した。*M. circinelloides* 37-1株、*P. crustosum* 14-4株、*P. roqueforti* 40-6株においては、未接種ペクチンと同様の分子量分布を示した。一方、*P. echinulatum* 38-1株と*P. expansum* 13-3株においては、未接種ペクチンに比べ、主要なピークが低分子量化していることを確認した。このことから、*P. echinulatum* 38-1株と*P. expansum* 13-3株はペクチンを低分子量化することが可能であると考えられる。

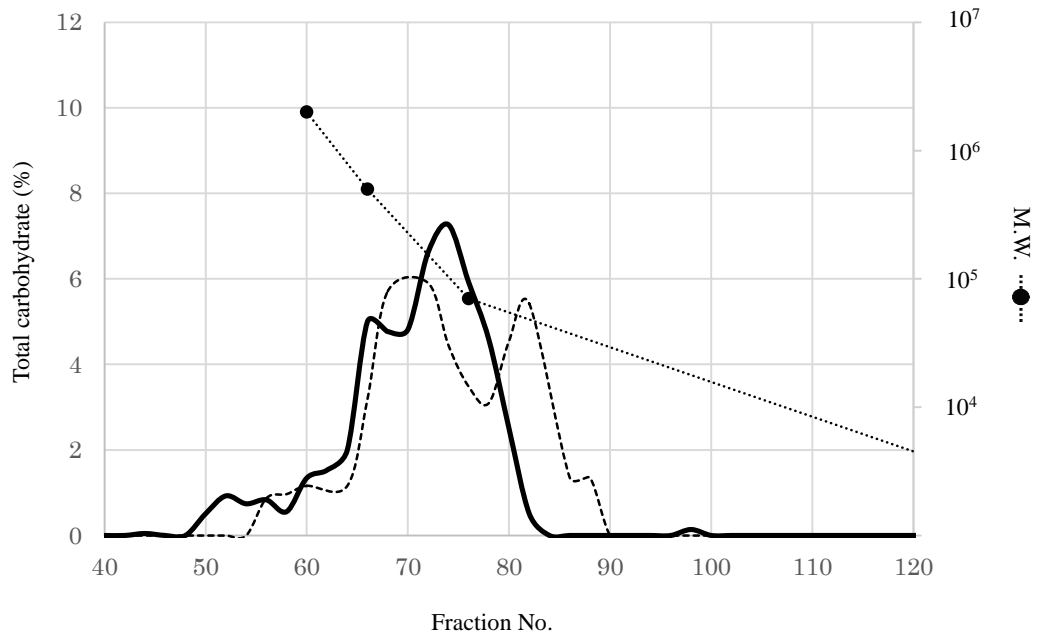


Fig. 3-10 *Mucor* 属により発酵させたサツマイモペクチンの分子量分布

— *M. circinerosides* 37-1 株      - - - 未接種ペクチン      ●···· 分子量マーカー

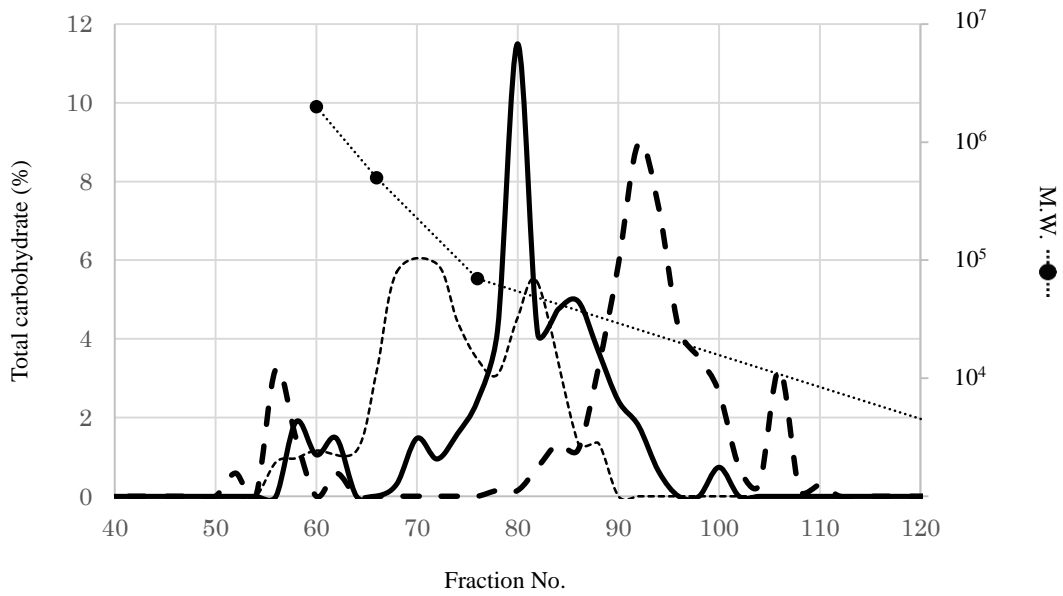


Fig. 3-11 *Penicillium* 属により発酵させたサツマイモペクチンの分子量分布

— *P. echinulatum* 38-1 株      - - - *P. expansum* 13-3 株      ····· 未接種ペクチン  
 ●···· 分子量マーカー



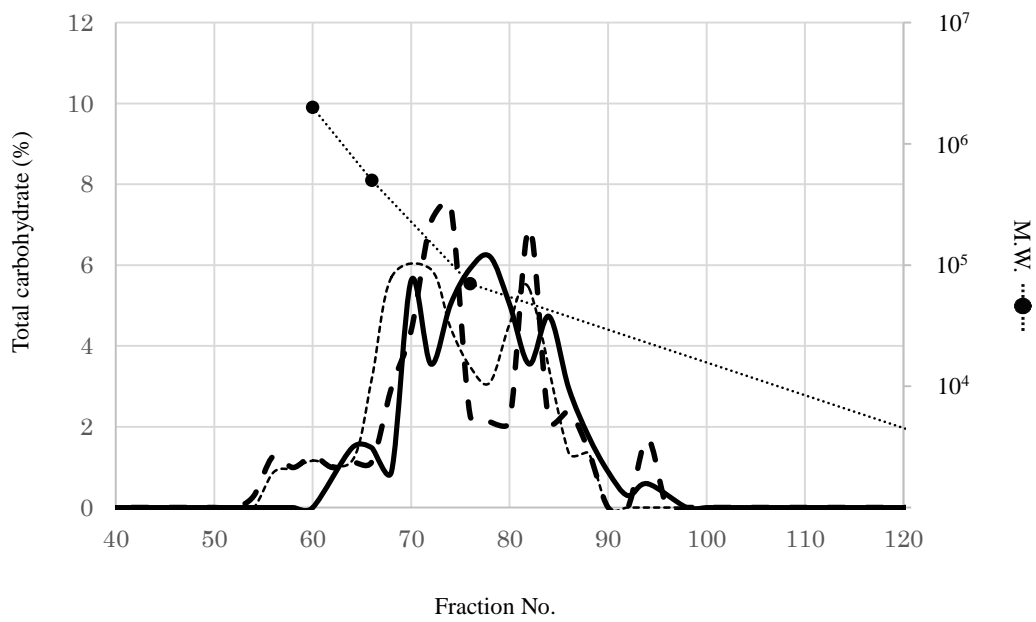


Fig. 3-12 *Penicillium* 属により発酵させたサツマイモペクチンの分子量分布  
 — *P. crustosum* 14-4 株    - - *P. roqueforti* 40-6 株    ..... 未接種ペクチン  
 ...●... 分子量マーカー

### 第3項 糸状菌により発酵させたキシランの分子量解析

#### 【方法】

##### ・供試菌株

第3章 第2節 第1項に準じた。(キシランの分解能を有さない *M. circinelloides* 37-1 株を除く)

##### ・培養方法

キシラン (SIGMA-ALDRICH 社製) を1%加えた LCA 培地に供試菌株を接種後、15°C・14 日間培養した。その後、キシラン含有培養液を回収し、フィルター (ADVANTEC Cellulose Acetate 0.45 μm) を通したものをキシラン試料とした。また、分子量分布を第3章 第1節 第2項に準じて検討した。

また、対照には供試菌株未接種のキシラン (以下、未接種キシランとする) を用いた。

#### 【結果】

供試菌株をキシラン含有 LCA 培地で培養し、残留したキシランのゲル濾過クロマトグラムを Fig. 3-13、3-14 に示した。*P. roqueforti* 40-6 株においては、未接種キシランと同様の分子量分布を示した。一方、*P. echinulatum* 38-1 株、*P. expansum* 13-3 株及び *P. crustosum* 14-4 株においては、未接種キシランに比べ、主要なピークが低分子量化していることを確認した。このことから、*P. echinulatum* 38-1 株と *P. expansum* 13-3 株はキシランを低分子量化することが可能であると考えられる。

#### 【第2節まとめ】

*Mucor* 属と *Penicillium* 属におけるデンプン、ペクチン及びキシランへの作用を解析するために、各種成分を発酵させ、その分子量分布について検討した。そして、*P. echinulatum* 38-1 株、*P. expansum* 13-3 株において、各種成分の低分子量化が確認された。

これらのことから、この2菌種が発酵工程中においてサツマイモのデンプン、ペクチン、キシランを分解することで低分子量化をもたらし、この低分子量化により、ろくべえ麺のような独特な食感が導かれると推察された。

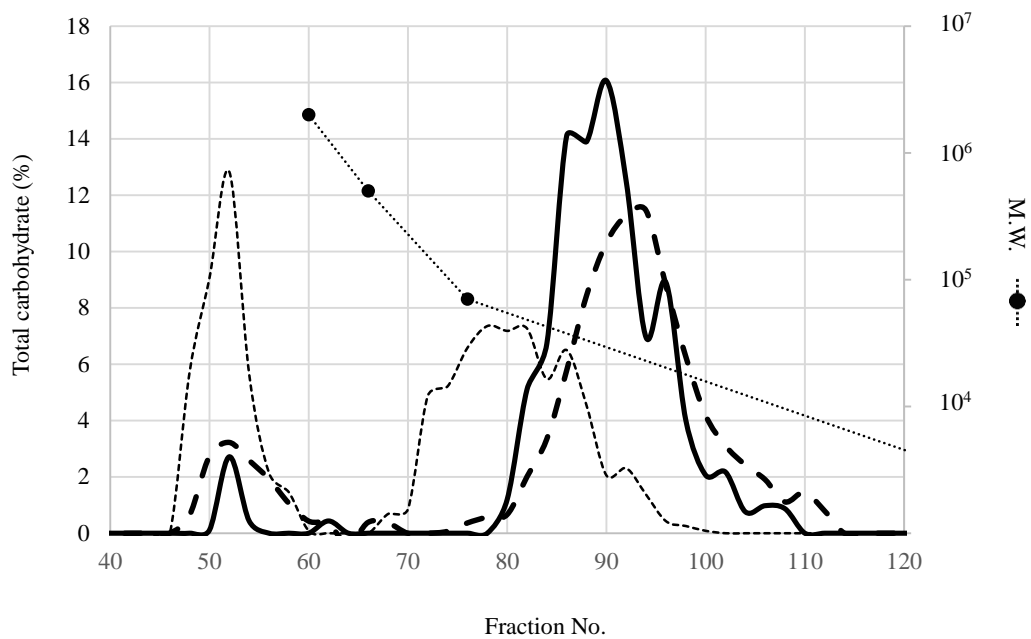


Fig. 3-13 *Penicillium* 属により発酵させたサツマイモキシランの分子量分布  
 — *P. echinulatum* 38-1 株    - - *P. expansum* 13-3 株    ..... 未接種キシラン  
 ...●... 分子量マーカー

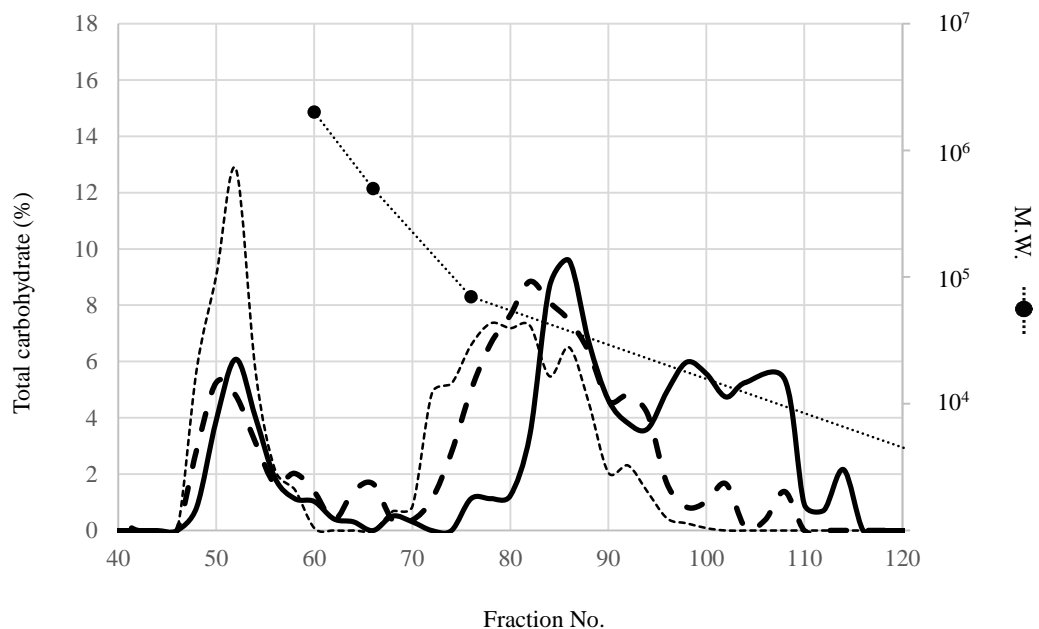


Fig. 3-14 *Penicillium* 属により発酵させたサツマイモキシランの分子量分布  
 — *P. crustosum* 14-4 株    - - *P. roqueforti* 40-6 株    ..... 未接種キシラン  
 ...●... 分子量マーカー

### 第3節 *Penicillium* 属を用いたせんだんごの試作

せんだんご製造工程中より分離した *Penicillium* 属の中には、デンプン、ペクチン及びキシランを分解し、低分子量化する菌種が存在した。そこで、これら菌種を用いてサツマイモを発酵させてせんだんごを試作し、デンプンや繊維質の分子量分布について解析することとした。

#### 第1項 試作せんだんごのデンプンの分子量分布解析

##### 【方法】

##### ・ 供試菌株

せんだんご製造工程中より分離した *P. crustosum* 14-4 株、*P. echinulatum* 38-1 株、*P. expansum* 13-3 株、*P. roqueforti* 40-6 株を用いた。

##### ・ せんだんごの試作

実際の製造工程に沿って行った (小崎ら、2005)。つまり、サツマイモをスライス(サツマイモ切片) し 15°C・7 日間の浸漬後、浸漬液を除去した。その後、サツマイモ切片に供試菌株を接種し、15°C・10 日間発酵させた。その後、ソフトボール状に成型し、さらに 30 日間発酵させた。最後に多量の水で洗浄し、団子状に成型後、乾燥させたものを試作せんだんごとした。また、対照として供試菌株を未接種で同様の作業工程を経た試作せんだんごを調製した。

以下、各試作せんだんごを *P. echinulatum* 38-1 株せんだんご、*P. expansum* 13-3 株せんだんご、*P. crustosum* 14-4 株せんだんご、*P. roqueforti* 40-6 株せんだんご、未接種せんだんごとした。

##### ・ デンプンの調製

第3章 第1節 第1項に準じた。

##### ・ デンプンの分子量分布解析

第3章 第1節 第1項に準じた。

##### 【結果】

*P. echinulatum* 38-1 株せんだんご、*P. expansum* 13-3 株せんだんご、*P. crustosum* 14-4 株せんだんご、*P. roqueforti* 40-6 株せんだんご、未接種せんだんごから抽出したデンプン

のゲル濾過クロマトグラムを Fig. 3-15、3-16 に示した。

*P. crustosum* 14-4 株せんだんごと *P. roqueforti* 40-6 株せんだんごのデンプンの分子量分布は未接種せんだんごのもの同様の傾向を示した。

一方、*P. echinulatum* 38-1 株せんだんご、*P. expansum* 13-3 株せんだんごのデンプンはせんだんご同様に低分子量化していることを確認した。

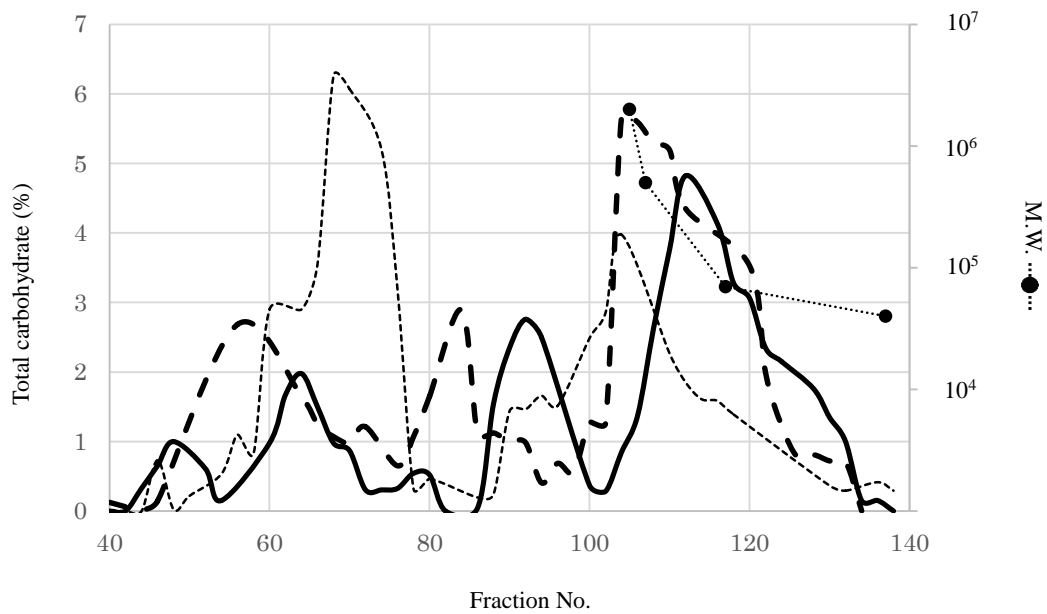


Fig. 3-15 *Penicillium* 属により発酵させたサツマイモのデンプンの分子量分布

— *P. echinulatum* 38-1 株    - - *P. expansum* 13-3 株    ..... 未接種  
 ...●... 分子量マーカー

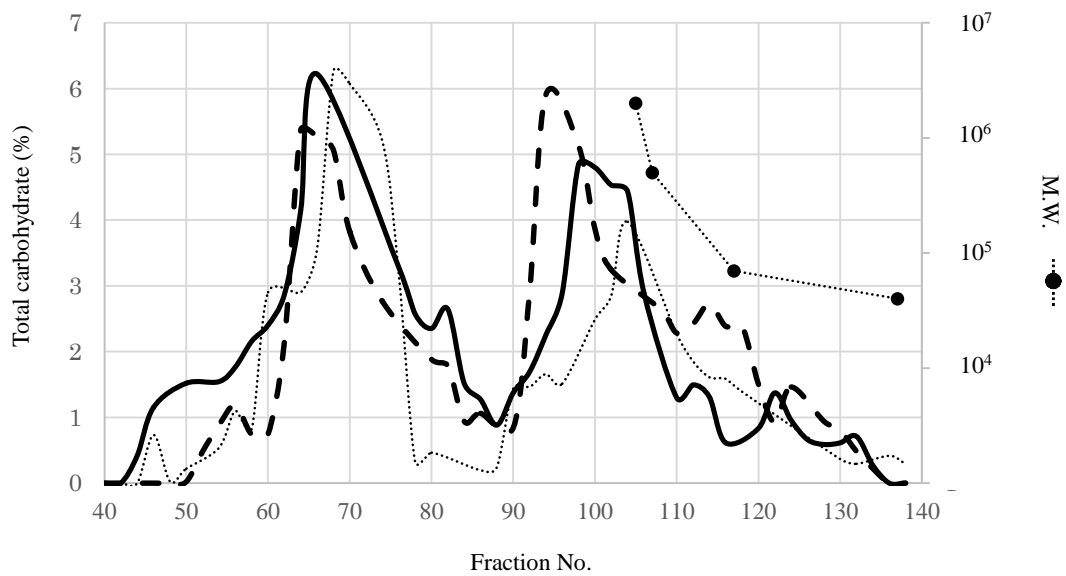


Fig. 3-16 *Penicillium* 属により発酵させたサツマイモのデンプンの分子量分布

— *P. crustosum* 14-4 株    - - *P. roqueforti* 40-6 株    ..... 未接種  
 ...●... 分子量マーカー

## 第2項 試作せんだんごのペクチンの分子量分布解析

### 【方法】

#### ・ 試料

第3章 第3節 第2項に準じた。

#### ・ ペクチンの調製

第3章 第1節 第2項に準じた。

#### ・ ペクチンの分子量分布解析

第3章 第1節 第2項に準じた。

### 【結果】

*P. echinulatum* 38-1 株せんだんご、*P. expansum*13-3 株せんだんご、*P. crustosum* 14-4 株せんだんご、*P. roqueforti* 40-6 株せんだんご、未接種せんだんごから抽出したペクチンのゲル濾過クロマトグラムを Fig. 3-17、3-18 に示した。

*P. crustosum* 14-4 株せんだんごと *P. roqueforti* 40-6 株せんだんごのペクチンの分子量分布は未接種せんだんごのもの同様の傾向を示した。

一方、*P. echinulatum* 38-1 株せんだんご、*P. expansum* 13-3 株せんだんごのペクチンはせんだんご同様に低分子量化していることを確認した。

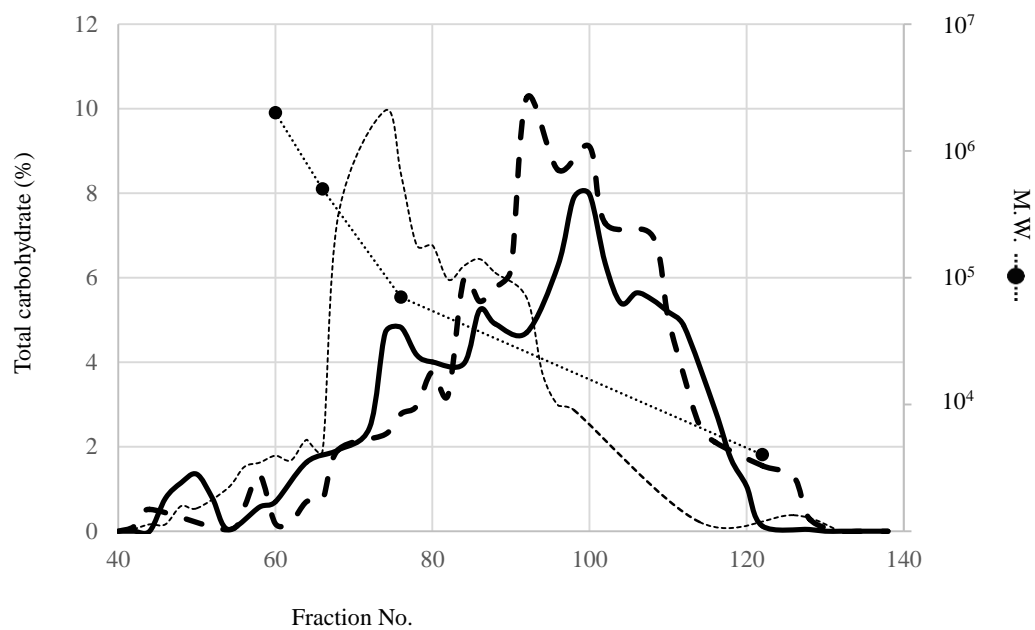


Fig. 3-17 *Penicillium* 属により発酵させたサツマイモのペクチンの分子量分布

— *P. echinulatum* 38-1 株    - - *P. expansum* 13-3 株    ..... 未接種  
 ...●... 分子量マーカー

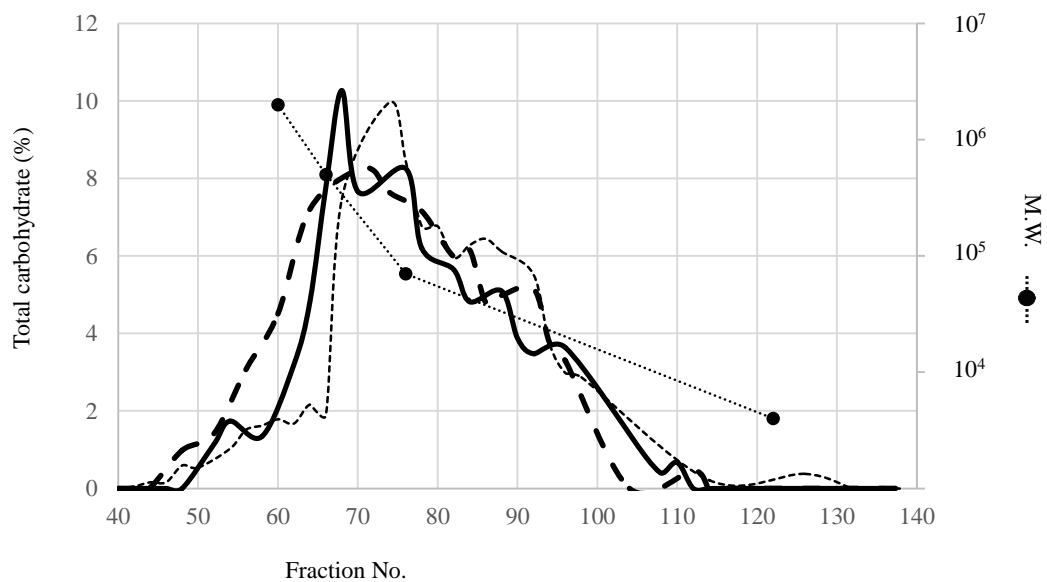


Fig. 3-18 *Penicillium* 属により発酵させたサツマイモのペクチンの分子量分布

— *P. crustosum* 14-4 株    - - *P. roqueforti* 40-6 株    ..... 未接種  
 ...●... 分子量マーカー



### 第3項 試作せんだんごのヘミセルロースの分子量分布解析

#### 【方法】

##### ・ 試料

第3章 第3節 第2項に準じた。

##### ・ キシランの調製

第3章 第1節 第2項に準じた。

##### ・ キシランの分子量分布解析

第3章 第1節 第2項に準じた。

#### 【結果】

*P. echinulatum* 38-1 株せんだんご、*P. expansum*13-3 株せんだんご、*P. crustosum* 14-4 株せんだんご、*P. roqueforti* 40-6 株せんだんご、未接種せんだんごから抽出したキシランのゲル濾過クロマトグラムを Fig. 3-19、3-20 に示した。

*P. crustosum* 14-4 株せんだんごと *P. roqueforti* 40-6 株せんだんごのキシランの分子量分布は未接種せんだんごのもの同様の傾向を示した。

一方、*P. echinulatum* 38-1 株せんだんご、*P. expansum* 13-3 株せんだんごのキシランはせんだんご同様に低分子量化していることを確認した。

#### 【第4節まとめ】

デンプン、ペクチン及びキシランを分解し、低分子量化することが可能なせんだんご製造工程中より分離した *Penicillium* 属 (*P. echinulatum* 38-1 株、*P. expansum*13-3 株、*P. crustosum* 14-4 株、*P. roqueforti* 40-6 株) を用いて、試作したせんだんごの各種成分の分子量分布について検討した。そして、各種試作せんだんごより調製したせんだんごのうち、ろくべえ麺の物性の再現が可能であった2菌種 (*P. echinulatum*、*P. expansum*) を用いて試作したせんだんごでは、各種成分の低分子量化が確認された。

以上のことから、せんだんご製造工程中に生息する *P. echinulatum* 及び *P. expansum* は発酵中においてサツマイモのデンプン、ペクチン及びキシランを低分子量化し、そのせんだんごから作ら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。

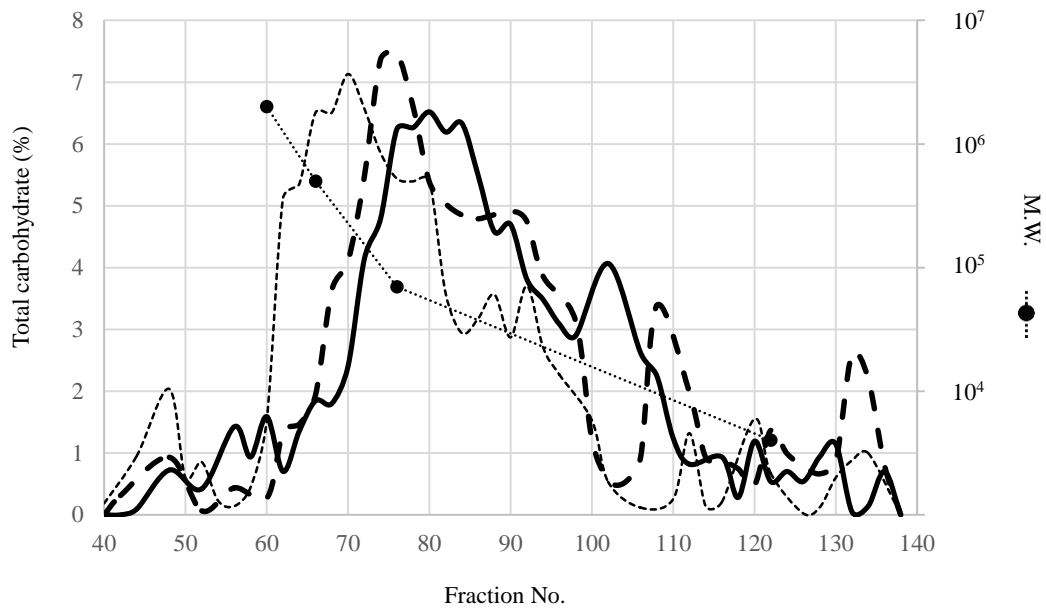


Fig. 3-19 *Penicillium* 属により発酵させたサツマイモのキシランの分子量分布

— *P. echinulatum* 38-1 株    - - *P. expansum* 13-3 株    ..... 未接種  
 ...●... 分子量マーカー

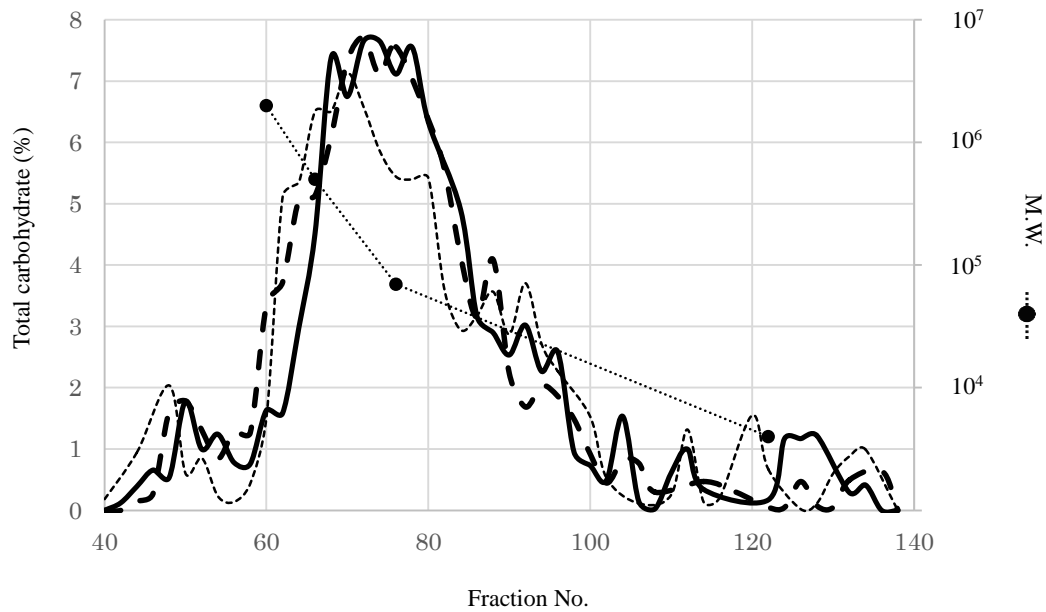


Fig. 3-20 *Penicillium* 属により発酵させたサツマイモのキシランの分子量分布

— *P. crustosum* 14-4 株    - - *P. roqueforti* 40-6 株    ..... 未接種  
 ...●... 分子量マーカー

#### 第4節 試作せんだんごより調製した試作ろくべえ麺の物性評価

せんだんご製造工程中より分離した *Penicillium* 属によりサツマイモを発酵させ、せんだんごを試作した場合に、デンプンや繊維質が低分子量化することが確認された。このことから、実際のせんだんご製造と同様の発酵が進行していると考えられる。そこで、試作したせんだんごよりろくべえ麺を調整し、その物性について検討することとした。

#### 第1項 試作せんだんごのデンプンの分子量分布解析

##### 【方法】

##### ・試料

各試作せんだんご(*P. echinulatum* 38-1 株せんだんご、*P. expansum*13-3 株せんだんご、*P. crustosum* 14-4 株せんだんご、*P. roqueforti* 40-6 株せんだんご、未接種せんだんご)を用いた。

##### ・ろくべえ麺の試作

試料には各種試作せんだんごを用いた。せんだんご 20 g (無水物換算\*) に水 16 ml を加え、混捏後、だんご状に丸め 1 分間茹で表面を糊化させた。再度、混捏し、生地を調製した。ろくべえせぎでは均一で長い麺形成が困難であるため、ろくべえ麺と同じ麺径となるよう口径を  $\phi 3$  mm に調製したシリンジに生地を入れ、沸騰湯浴中に押し出し、麺を 2 分間茹でた後、流水で 1 分間洗浄したものをろくべえ麺とした。

以下、各試作ろくべえ麺を *P. echinulatum* 38-1 株麺、*P. expansum*13-3 株麺、*P. crustosum* 14-4 株麺、*P. roqueforti* 40-6 株麺、未接種麺とした。

また、同時に対馬産せんだんごより同様にろくべえ麺を試作し、以下、対馬産ろくべえ麺とした。

\*無水物換算：水分の定量は、試料 5 g を用いて、モイスチャーアナライザー (MX-50 エーアンド・デイ社製) により、設定温度 180°Cにて水分量測定を行った。

#### ・ろくべえ麺の食感値解析

圧縮型物性測定機テンシプレスーMyBoy II（タケモト電機社製）により、低高圧縮測定を行い、各種麺の物性（低圧縮硬さ、高圧縮硬さ、低圧縮付着性、高圧縮付着性、こし）を解析した。楔型プランジャー（幅 1 mm×長さ 20 mm）を用い、Table 3-1 に示す条件にて、室温 23℃にて各試料 20 本測定した。そして、対馬産ろくべえ麺の物性値を 100 とした場合の相対値として、各種麺の物性値を検討した。

Table 3-1 低高圧縮測定条件

Distance (mm)	30.0	Plunger area (cm <sup>2</sup> )	1.0
2nd Distance (mm)	3.0	Deformation (%)	30.0
Clearance (mm)	0.1	2nd Deformation (%)	95.0
Thickness 1	10.0	Static time (sec)	0
Thickness 2	13.0	2nd Static time (sec)	0.5
Bite speed (mm/sec)	2.0	Loadcell (kg)	5.0

## 【結果】

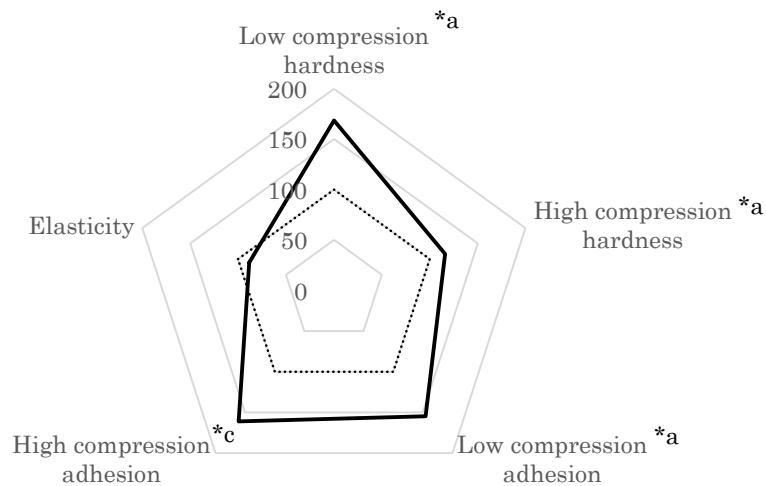
*P. echinulatum* 38-1 株せんだんご、*P. expansum* 13-3 株せんだんご、*P. crustosum* 14-4 株せんだんご、*P. roqueforti* 40-6 株せんだんご未接種せんだんごを用いて、各種麺を調製し、その物性について検討した結果を Fig. 3-21 に示した。

未接種麺、*P. crustosum* 14-4 株麺及び *P. roqueforti* 40-6 株麺は、対馬産ろくべえ麺と比較して硬さ、付着性が有意に高く、対馬産ろくべえ麺とは大きく異なる物性値を示した。

一方、*P. echinulatum* 38-1 株せんだんご、*P. expansum* 13-3 株せんだんごから調製した試作ろくべえ麺は、対馬産ろくべえ麺と比較して、硬さに若干の相違が確認されるが、その物性値においては対馬産ろくべえ麺と同様の傾向を示した。

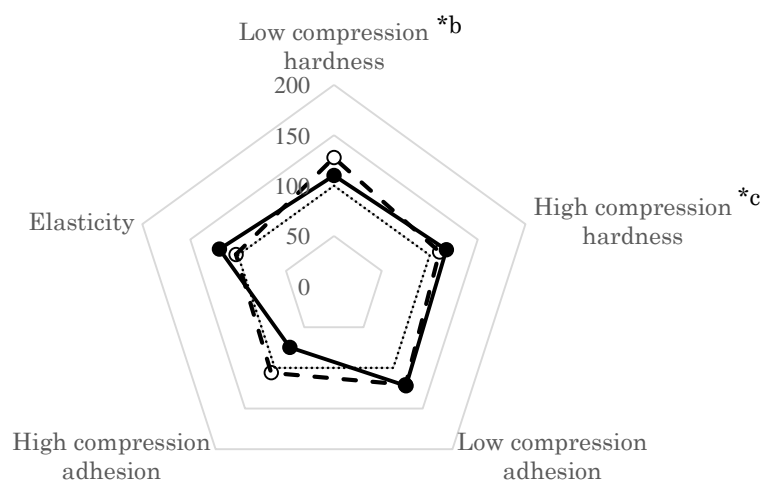
## 【第3節まとめ】

せんだんご製造工程中より分離した *Mucor* 属及び *Penicillium* 属の菌株を用いて、サツマイモを発酵させ、せんだんごの試作及びろくべえ麺の評価を行った。そして、*P. echinulatum* 38-1 株及び *P. expansum* 13-3 株を用いてサツマイモを発酵させ、せんだんごの製造し、ろくべえ麺の調製を行った場合にろくべえ麺と同様の物性を再現することができることが明らかとなった。



— 未接種麺    ..... 対馬産ろくべえ麺

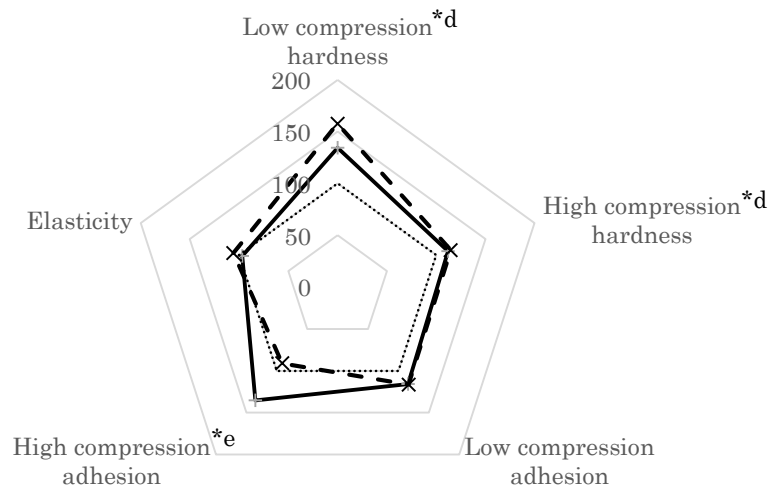
(対馬産ろくべえ麺の数値を 100 としたときの相対値、\* :  $p < 0.05$ , Tukey 法、\*a : 対馬産ろくべえ麺と未接種ろくべえ麺との間に有意差あり)



—●— *P. echinulatum* 38-1 株麺    -○- *P. expansum* 13-3 株麺    ..... ろくべえ麺

(対馬産ろくべえ麺の数値を 100 としたときの相対値、\* :  $p < 0.05$ , Tukey 法、\*b : 対馬産ろくべえ麺と *P. expansum* 13-3 株麺との間に有意差あり、\*c : 対馬産ろくべえ麺と *P. echinulatum* 38-1 株麺・*P. expansum* 13-3 株麺の間に有意差あり)

Fig. 3-21 *Penicillium* 属を用いて製造したろくべえ麺の物性値



—*P. crustosum* 14-4 株麺    -×- *P. roqueforti* 40-6 株麺    ..... 対馬産ろくべえ麺  
 (対馬産ろくべえ麺の数値を 100 とした時の相対値、\*:  $p < 0.05$ 、Tukey の方法、\*d: 対馬産ろくべえ麺と *P. crustosum* 14-4 株麺及び *P. roqueforti* 40-6 株麺間で対馬産ろくべえ麺間で有意差あり、\*e: 対馬産ろくべえ麺と *P. crustosum* 14-4 株麺間で有意差あり)

Fig. 3-21 *Penicillium* 属を用いて製造したろくべえ麺の物性値 (続き)

## 第5節 第3章まとめ

せんだんごから作られるろくべえ麺は、原料サツマイモ粉からは得られないコンニャクのような独特な食感を有する。穀物質食品の食感には、デンプンや食物繊維が影響(遠藤ら、1997; 武山ら、2002)すると報告されており、ろくべえ麺の独特な食感も、サツマイモのデンプンや各種繊維質(ペクチンとヘミセルロース)が部分的に分解されていることに起因し、さらに繊維質の中では、ペクチンの減少量が多いことがせんだんごの特徴として報告されている(岡ら、2011)。

これらのことから、サツマイモとせんだんごとの間でのデンプン、ペクチン及びヘミセルロースの分子量分布を調べ、せんだんごに含まれるそれらは、原料サツマイモに含まれるそれらと比較して、低分子量化していることを明らかとした。

また、筆者らはせんだんご製造において、せんだんご製造農家や年度に関わらず発酵工程に生息しており、デンプン、ペクチン及びキシラン(ヘミセルロースの主成分)の分解能を有することから、*Mucor* 属や *Penicillium* 属の糸状菌が重要な役割を果たしていると考えてきた。そこでこれら糸状菌がもたらすデンプン、ペクチン及びキシランの分子量変化を培養法により検討し、*P. echinulatum*38-1 株と *P. expansum*13-3 株において、それぞれがデンプンや各種繊維質の低分子量化する能力を有していることを見出した。また *Penicillium* 属の分離株を用いて、せんだんごの試作を試作し、デンプンや繊維質の分子量分布を解析し、*P. echinulatum*38-1 株と *P. expansum*13-3 株においては、サツマイモというデンプンや各種繊維質が複合的に存在する環境の中でも、それぞれを低分子量化できることを確認した。さらに、*P. echinulatum*38-1 株と *P. expansum*13-3 株を用いて、試作したせんだんごよりろくべえ麺を調製することで、対馬産せんだんごから調製したろくべえ麺と同様の物性値を示すことが明らかとなった。

以上のことから、せんだんご製造工程中においてサツマイモのデンプン、ペクチン及びヘミセルロースを低分子量化し、ろくべえ麺の独特な食感に寄与する微生物は、せんだんご製造中に生息し、デンプン、ペクチン及びキシラン分解活性を有する *P. echinulatum* と *P. expansum* であると考えられた。また、本実験に用いた *P. echinulatum*38-1 株と *P. expansum*13-3 株ばかりでなく、同時に分離された同種の糸状菌全株においても同様の活性が見られた。

本研究によって得られた結果は、せんだんご製造に関与する微生物を特定した初めての報告となる。さらに本研究で明らかにしたように、せんだんご製造に不可欠な微生物は *Penicillium* 属であった。*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 (川端、2010) であるが、せんだんご製造では、デンプン、ペクチン及びヘミセルロース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 (小崎ら、1990) 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。

しかし、*Penicillium* 属の一部の菌種にはカビ毒産生菌として報告されている菌種が存在するため、せんだんごのカビ毒汚染が懸念される。そこで、次に、せんだんごの安全性を評価する必要があると考えられた。

## 第4章 せんだんごの安全性の評価

### 序論

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・農家を問わず、常に生息していることが明らかとなった。*Penicillium* 属は多くの土壤中に生息する菌種であることから、農作物からも頻りに分離される (中川、2009)。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。なかでもせんだんご製造工程中より分離された *P. expansum* はリンゴやその加工食品におけるパツリン汚染菌として報告がある (小西、2010)。日本では2003年に食品衛生法に基づく清涼飲料水の規格としてリンゴジュース及びリンゴ果汁についてパツリンの基準値 (50 ppb ; 50 µl/kg に相当) が定められている。また、せんだんご製造工程中より分離された *P. expansum* 13-3 株はサツマイモデンプン含有 LCA 培地を用いて 15°C にて培養した際には、パツリンの産生能が認められている。このことから、伝統的な発酵食品の安全性を評価するために、せんだんご中にパツリンが含まれるか否かを検討する必要がある。そこで、せんだんご中に含まれるパツリンの濃度を検討することを目的とした。

### 第1節 せんだんご中のパツリン濃度の検討

#### 【方法】

##### ・ 試料

対馬市での主要なせんだんご製造地域である豊玉町田、美津島町久須保、厳原町阿連及び久根田舎の5軒の農家を調査対象とし、試料は完成品であるせんだんご及び発酵工程中のサツマイモ片を用いた (Table4-1)。

##### ・ パツリンの分析方法

せんだんご及び発酵工程中のサツマイモ片をミキサーで破碎後、凍結乾燥した。その後、各試料 10 g に試料中からのパツリンの回収率を算出するために、内部標準として、<sup>13</sup>C にてラベリングされた <sup>13</sup>C-パツリンを終濃度 40 ppb となるように添加した。冷暗所にて12時間以上保存後、2% (w/v) クエン酸 + 84% (w/v) アセトニトリル溶液 25 ml を添加し、ホモジナイザーにてパツリンを抽出した。その後、AffiniMIP カラムにて精製し乾固後、5% (w/v) アセトニトリル溶液に再溶解させたものを試料とした (Fig.4-1)。

各試料のパツリンの濃度は高速液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) により測定を行った (Fig. 4-2)。

Table 4-1 パツリン分析用試料一覧

年度	工程	製造農家
2013	せんだんご	豊玉町田 (1)
		美津島町久須保 a (1)
		美津島町久須保 b (1)
		美津島町久須保 c (1)
		巖原町阿連 a (1)
		巖原町阿連 b (1)
2014	発酵工程中サツマイモ片	豊玉町田 (3)
		美津島町久須保 a (2)
		美津島町久須保 c (2)
		美津島町久須保 d (1)
		美津島町久須保 e (1)
		巖原町阿連 a (1)
	巖原町阿連 c (1)	
	せんだんご	豊玉町田 (1)
		美津島町久須保 a (2)
		巖原町阿連 a (1)
		巖原町阿連 c (1)
		巖原町久根田舎 (1)

\* ( ) 内は試料数を示し、アルファベットの違いはせんだんご製造農家の違いを示す

1. 試料をミキサーで破碎後、凍結乾燥する
2. 試料 (10 g) に  $^{13}\text{C}$ -パツリン (400 ppb) をスパイク (終濃度 40 ppb)
3. 冷暗所にて保存 (12 時間以上)
4. 抽出溶媒<sup>\*1</sup> (25 ml) にて懸濁し、ホモジナイザー (7000 prm, 5 min) にて抽出
5. 遠心分離 (3000 rpm, 10 min) 後、上清液を回収  
(2~5 の工程を再度行い、最終的に上清液を 50 ml 回収する)
6. 上清液 (3 ml) を窒素通気下で乾固
7. 純水 (3 ml) に再溶解
8. 純水に再溶解した試料 (2 ml) を AffiniMIP カラム<sup>\*2</sup> にて精製
9. 精製した試料を乾固
10. アセトニトリル溶液 (1 % (v/v) 酢酸を含む 5 % (v/v) アセトニトリル溶液、200  $\mu\text{l}$ ) に再溶解
11. LC-MS/MS 分析に供した (10  $\mu\text{l}$ )

Fig. 4-1 パツリンの分析方法

\*1 抽出溶媒 : 2 % (w/v) クエン酸 + 84 % (v/v) アセトニトリル溶液

\*2 AffiniMIP カラム : AFFINIMIP<sup>®</sup> SEP Patulin cartridge (polyintell 社製)

LC: Agilent 1100 series

Flow rate: 300  $\mu$ l / min

Column: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 x 250 mm, 5  $\mu$ m) Solvent saver

Column Temp: 40°C

Solvent A: 0.5 mM ammonium acetate + 0.1 % (v / v) acetic acid (Water)

Solvent B: 0.1 % (v / v) acetic acid (Acetonitrile)

Elution program

		Time (min)					
		0	3	17	20	20.2	29
Solvent (%)	A	90	90	10	10	90	90
	B	10	10	90	90	10	10

MS: AB Sciex 4000QTRAP

Ionization : Electrospray ionization – Negative polarity

Curtain Gas flow: 15

Collision Gas flow: 8

Ion Spray Voltage: 4.5 kv

Temperature: 550°C

Ion Source Gas 1: 60

Ion Source Gas 2: 80

MS/MS parameter settings:

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell Time (msec)	ID	Declustering potential	Entrance potential	Collision Energy	Collision Cell Exit Potential
152.819	108.9	75	PAT-1	-40	-10	-10	-5
152.819	82.9	80	PAT-2	-40	-10	-16	-5
152.819	81.1	80	PAT-3	-40	-10	-14	-5

Fig. 4-2 パツリン分析時の LC-MS/MS 条件

## 【結果・考察】

LC-MS/MS によるパツリン分析によく使用されるパツリンの 2 つのモニターイオン (152.8/108.9 及び 152.8/81.1) とそれに相当する <sup>13</sup>C-パツリンのモニターイオンによる試料のクロマトグラムを Fig. 4-3、4-4 に示した (試料の全てが同様の傾向を示したので、その 1 つを示す)。また、本研究の中でパツリン検出用の MS/MS パラメーターを設定した際に 152.8/82.9 というパツリンのモニターイオンが確認された。このモニターイオンに相当する <sup>13</sup>C-パツリンのモニターイオンによる試料のクロマトグラムを Fig. 4-5 に示した (試料の全てが同様の傾向を示したので、その 1 つを示す)。

パツリンの「せんだんご」からの分析には、まずパツリン検査の公定法で用いられる酢酸エチルを使用した。しかし、「せんだんご」からのパツリン回収率が著しく低かったため、抽出溶媒の検討を行った。その結果、2 % (w/v) クエン酸 + 84 % (v/v) アセトニトリル溶液により比較的、効率良く抽出できたためこちらを採用した。

パツリンの LC-MS/MS 分析に一般的に使用されている 152.8/108.9 のモニターイオンに加え、152.8/81.1 および 152.8/82.9 を加え分析を行った。その結果、152.8/108.9 および 152.8/81.1 においては「せんだんご」中にパツリンが存在することを示唆する。しかし、内部標準物質の溶出時間から 8 秒程早い段階でクロマトグラムが最大値に到達 (Fig. 4-3~4-4) しており、また 152.8/82.9 のモニターイオンにおいては検出されていない試料が存在したことから、152.8/108.9 および 152.8/81.1 のモニターイオンは「せんだんご」試料から抽出された夾雑成分を検出してしまっていることが考えられた。以上のことから、パツリンの定量には 152.8/82.9 のモニターイオンを用いた。

パツリンの定量分析結果、および <sup>13</sup>C ラベルされたパツリンの試料中からの回収効率は Table 4-2 に示す。全ての試料においてパツリンは検出されなかった。<sup>13</sup>C ラベルされたパツリンの回収率が低い試料が多かった。パツリンを試料に添加し回収試験を行い <sup>13</sup>C ラベルされたパツリンとの比較を行ったが、ほとんど同じ結果となった。以上のことから「せんだんご」中にはパツリンは存在しない、あるいは仮に存在しても、パツリンの基準値である 50 ppb 未満であることが明らかとなった。

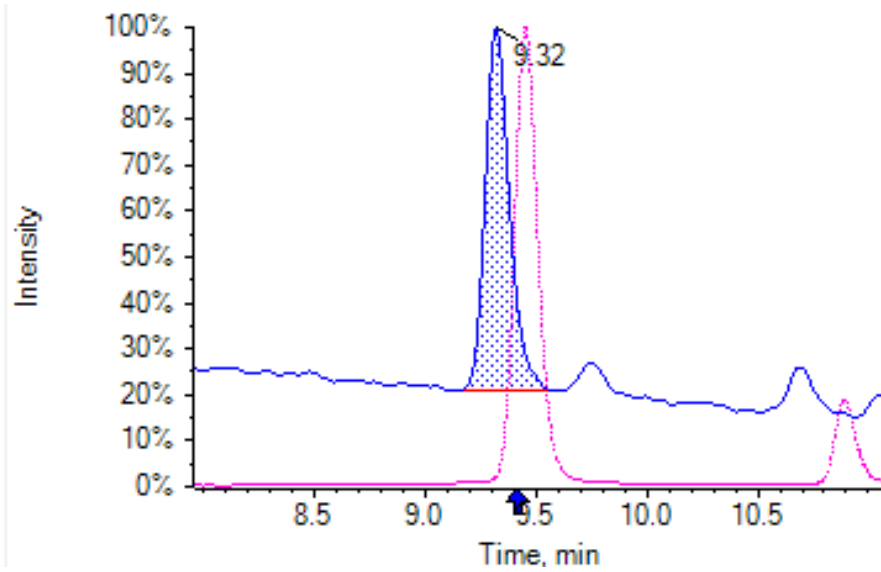


Fig. 4-3 モニターイオン 152.8/108.9 におけるクロマトグラム

— せんだんご試料    - - -  $^{13}\text{C}$ -パツリン

(\*せんだんご試料；美津島町久須保 c)

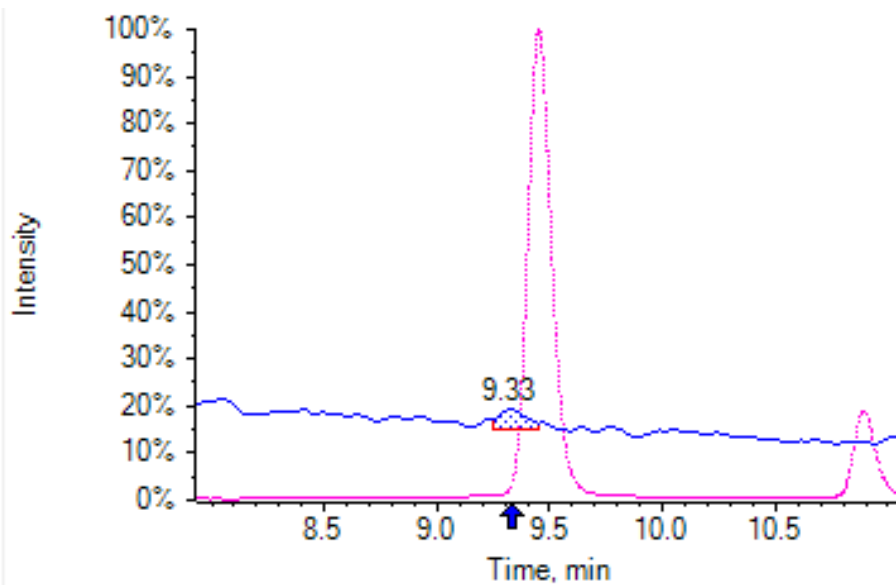


Fig. 4-4 モニターイオン 152.8/81.1 におけるクロマトグラム

— せんだんご試料    - - -  $^{13}\text{C}$ -パツリン

(\*せんだんご試料；美津島町久須保 c)

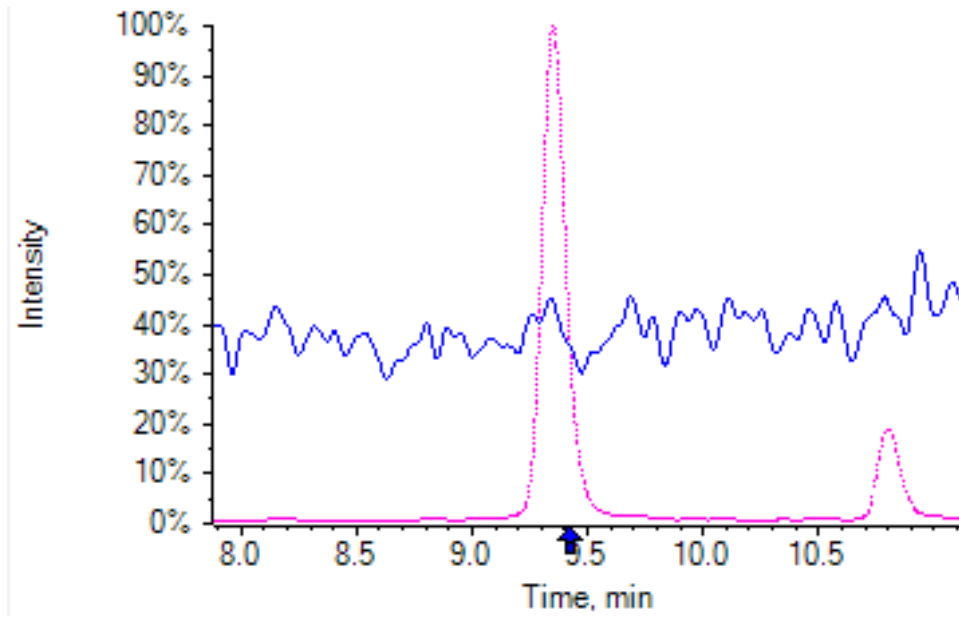


Fig. 4-5 モニターイオン 152.8/82.9 におけるクロマトグラム

— せんだんご試料    - - -  $^{13}\text{C}$ -パツリン

(\*せんだんご試料；美津島町久須保 c)



Table 4-1 <sup>13</sup>C-パツリンの回収率

年度	工程	製造農家	<sup>13</sup> C-パツリン 回収率(%)
2013	せんだんご	豊玉町田	48.68
		美津島町久須保 a	29.27
		美津島町久須保 b	46.80
		美津島町久須保 c	41.45
		巖原町阿連 a	42.39
		巖原町阿連 b	38.60
		2014	発酵工程中
サツマイモ片	美津島町久須保 a	3.38~28.31 (n=2)	
	美津島町久須保 c	28.49~29.79 (n=2)	
	美津島町久須保 d	28.31	
	美津島町久須保 e	23.99	
	巖原町阿連 a	39.50	
せんだんご	巖原町阿連 c	42.08	
	豊玉町田	54.97	
	美津島町久須保 a	45.62~50.90 (n=2)	
	巖原町阿連 a	57.26	
	巖原町阿連 c	N.D.*	
		巖原町久根田舎	43.01

(アルファベットの違いはせんだんご製造農家の違いを示す) \*N. D. : no data

#### 【第4章まとめ】

せんだんご製造における発酵工程中には、製造農家・年度によらず、*P. expansum* が生息している。*P. expansum* はリンゴやその加工食品のパツリン汚染の原因菌としても報告されている菌種であり、せんだんご製造工程中より分離した *P. expansum* 13-3 株においてもパツリンの産生能が確認されている。このことから、せんだんご中に含まれるパツリンの濃度について検討した。その結果、せんだんごのパツリン汚染は確認されず、せんだんごにはパツリンが含まれていないか、含まれていたとしても基準値レベル未満であることが明らかとなった。

## 【総括】

長崎県対馬地方には、サツマイモを原料として製造される固有の伝統発酵食品素材せんだんごがある。せんだんごとは、冬季に収穫したサツマイモを浸漬し、長期間かけて微生物により発酵させた後、多量の水で洗浄すると共に、サツマイモの皮などを取り除き、得られた白色の沈殿物をだんご状に成型し乾燥させたものである。このせんだんごの製造は11月下旬頃から始まり、全工程で5ヶ月間もの時間が費やされている。

このような時間と労力を費やして、せんだんご製造が行われるのは、対馬は島全体の約89%が山地であり、そのほとんどを山林に覆われ、田畑などの耕作地が少なかったため、幾度も食糧不足に見舞われてきた歴史があるためである。そこで、山地でも比較的栽培が容易であったサツマイモが島内で広く受け入れられ、食用に適さないくず芋をせんだんごへと加工し保存用の食品素材としてきた。せんだんごはそのままでは食用とならないため、それを水でもどし捏ねることで生地とし、押出式で麺状に加工し茹でて食される。ろくべえ麺は、原料であるサツマイモからでは想像し得ない高い粘性と弾力のあるコンニャクに似た独特な食感を有する。長崎県島原市にもろくべえ麺というサツマイモを原料とする麺製品が存在する。しかし、島原市のろくべえ麺は、原料となるサツマイモを発酵工程を経ずにそのまま粉末化したものを用い、サツマイモ粉のみでは麺形成が難しいことから、つなぎとして長芋などを用いて麺状に加工し食されている。対馬のろくべえ麺はつなぎを加える必要も無く、サツマイモを発酵させて製造されるせんだんごのみで製麺が可能であり、これまでに無い独特な食感を有する大変興味深い食品である。

他にはないせんだんごろくべえ麺に関する食品学的な研究が行われた。その結果、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、せんだんごはその成分の構成成分の約90%をデンプン、約6%を繊維質が占めること、繊維質のなかでも原料サツマイモと比べ、主にペクチンやヘミセルロースが部分的に分解され、低分子量化していること、また、繊維質の中でも、ペクチンの減少量が著しいことが報告された。せんだんごが微生物による発酵工程を経て製造されることを考慮すると、ろくべえ麺の食感形成に寄与するデンプンや繊維質（ペクチンやヘミセルロース）の低分子量化には、せんだんご製造工程中に生息する何れかの微生物の発酵が寄与していると考えた。しかし、せんだんご製造工程中に生息する微生物の菌叢が調査された報告はこれまでに無く、その微生物がサツマイモのデンプンや繊維質に与える影響についても明らかとされていない。そればかりか、十数年前まで、せんだんごは対馬全土で製造されてい

たが、現在ではその製造農家は点在する程度にまでに減少している。この理由には、せんだんごの製造は長い時間と多大な労力が必要なこと、生産者の高齢化、また、食品流通網の発展に伴う、保存食品としてのせんだんごの必要性の低下が考えられる。今後もせんだんご製造農家は減少していくと予想され、せんだんご製造工程中に生息する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。

そのため、他に類をみない、せんだんごという興味深い発酵食品素材の製造に関与する微生物の特定、及びせんだんご製造工程中に生息する微生物資源の保全は急務と考えられた。そこで、本研究は、これまでにほとんど調査のされてこなかったせんだんごの製造に関与する微生物とその役割を明らかとすることを目的として実施した。

はじめに、せんだんご製造においてろくべえ麺の食感形成に重要な工程を明らかとするため、せんだんご製造工程を調査した。その結果、農家ごとに製造方法は一部異なるが、基本的にはサツマイモを浸漬、発酵させた後、洗浄、だんご状に成型し、乾燥させる工程を経てせんだんごは製造されていることが確認された。しかし、浸漬工程においては、浸漬水を毎日交換するか否か、さらには土嚢袋に入れて川に放置するなど、農家によって様々な方法で行われていた。このことから、浸漬工程は微生物を繁殖させるための水分の供給や最終産物（せんだんご）としての特長には関連の少ない中低分子成分の除去が目的であると推察された。一方、発酵工程は全農家で共通し、地元では“芋を腐らせる”工程と言われる。発酵工程中の温度は14℃全前後と外気温(7~10℃)よりも高く、時間の経過と共に上昇する傾向が認められたことから、発酵熱が発生していると考えられた。また、サツマイモの表面や内部には、糸状菌がコロニーを形成し、発酵臭が強く、サツマイモに粘りが生じていることから、糸状菌のみではなく、酵母や細菌が繁殖していることが推察された。このことから、発酵工程中に生息する何れかの微生物がコンニャクのような独特な食感形成に寄与していることが示唆された。また、発酵工程の終盤では、サツマイモ片の乾燥も起こるため、水分活性が低下し、微生物の繁殖が抑制され、微生物が産生した酵素の活性も低下することから、サツマイモ片は完全に分解されず、デンプンや繊維質の部分的な分解に留められると推察された。

ろくべえ麺の独特な食感形成に寄与する微生物を特定するために、発酵工程を中心に2軒の農家のせんだんご製造工程中に生息する微生物の菌叢を解析した。発酵工程中には様々な微生物の生息が想定されたことから、一般細菌、酵母、糸状菌を対象として検討し、一般細菌では *Bacillus* 属をはじめとする計18属、酵母では *Candida* 属をはじめとする計5属、糸状菌では *Penicillium* 属など3属が確認された。発酵工程中においては一般に食品の腐敗菌と呼ばれる菌種をはじめとして、多種多様な菌種が分離されたのは、

発酵工程が管理された環境ではなく、野ざらしで行われているため、その地域の土壌由来の微生物がサツマイモ片に繁殖したためであると考えられた。また、検討した2軒の農家の発酵工程中に生息する微生物の菌叢には共通性が認められ、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。このように製造農家が異なっても微生物の菌叢に共通性が認められたのは、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り続けられてきた結果であると考えられる。

ろくべえ麺の食感形成には、サツマイモに含まれるデンプンや繊維質の分解が寄与すると考えられたことから、各種分離株において、デンプンや繊維質分解能について検討し、デンプンとペクチンの分解能を有する *Mucor* 属やデンプン、ペクチン、キシランの全ての分解能を有する *Penicillium* 属の糸状菌を見出した。また、15℃という低温でも各種分解酵素活性が確認された。これら2属は発酵工程中に常に生息が確認される菌種であった。そこで、その種を同定し *Mucor* 属は全て *M. circinelloides*、*Penicillium* 属は *P. expansum*、*P. echinulatum*、*P. crustosum*、*P. roqueforti* の4菌種が確認された。特に *Penicillium* 属の中では、*P. expansum* と *P. echinulatum* が製造年度、農家によらず高頻度でその生息が確認された。そこで、ろくべえ麺の食感形成に寄与するデンプンや繊維質の低分子量化について検討し、*P. expansum*、*P. echinulatum* はそれらの低分子量化が可能な菌種であることを確認した。そこで *P. expansum* と *P. echinulatum* を用いて、サツマイモの発酵試験を行い、サツマイモというデンプンや繊維質が複合的に存在する原料の中でも、*P. expansum* と *P. echinulatum* はデンプンやペクチン、ヘミセルロースを低分子量化することを見出した (Fig. 5-1)。さらに、*P. expansum* と *P. echinulatum* を用いて試作したせんだんごから調製したろくべえ麺は対馬産ろくべえ麺の物性と同様の特徴を示した。

以上のことから、コンニャクのような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、*P. expansum* と *P. echinulatum* が関与していると結論付けた。これらの知見は、本研究により初めて明らかとされた。

一方、食品製造における *Penicillium* 属の利用には安全性の問題がある。せんだんご製造工程中にはその製造年度や農家によらず、ろくべえ麺の食感形成に重要な役割を果す *Penicillium* 属が常に生息しているが、*Penicillium* 属のなかにはカビ毒産生菌として報告されている菌種も存在する。せんだんご製造に関与している *P. expansum* はリンゴのパツリン汚染菌として多数報告されている菌種であり、分離株の *P. expansum* 13-3 株もサツマイモデンプン含有 LCA 培地を用いて 15℃で培養した際には、パツリンの産生能が確認された。このことから、せんだんご中にもパツリンが含まれている可能性が懸念さ

れた。

そこで完成品であるせんだんごと *Penicillium* 属の繁殖が確認される発酵工程中の試料中に含まれるパツリン濃度を検討し、全試料中にはパツリンは検出されないことを確認した。このことから、分離株である *P. expansum* は、せんだんご製造工程中という野ざらしの環境では、パツリンを産生しない、もしくは産生しても極めて微量であるため、せんだんご中のパツリンは検出されないと推察された。また、ろくべえ麺の食感形成はせんだんご製造工程中に生息する *P. echinulatum* でも可能なため、今後、せんだんご製造を管理した環境で行う際には、パツリンの産生が懸念されない *P. echinulatum* を用いて行うことが推奨される。

*Penicillium* 属が発酵食品製造に関与する例やせんだんごのように低温環境下で発酵食品が製造されることは珍しい。*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が、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。本研究ではデンプンやペクチンの低分子量化という食品製造において従来報告例のない *Penicillium* 属の役割を見出した。*Penicillium* 属がサツマイモを発酵することで、独特な食感を有する発酵食品ができることから、*Penicillium* 属を用いたデンプンや繊維質の低分子量化には、新たな食感を有する食品素材の開発への応用が期待される。また、低温環境で発酵食品の製造を行うことは、多くの食品腐敗菌を抑制しつつ発酵を進めることができるため、低温環境下でも生育が良好な *Penicillium* 属の利用は有意義であると考えられる。さらに、本研究によって新たな利用価値が見出された *Penicillium* 属の菌株を保存することは、貴重な微生物資源の保全に貢献すると考えられる。

本研究の成果が、発酵食品における *Penicillium* 属の新たな利用法の確立に繋がることに期待する。

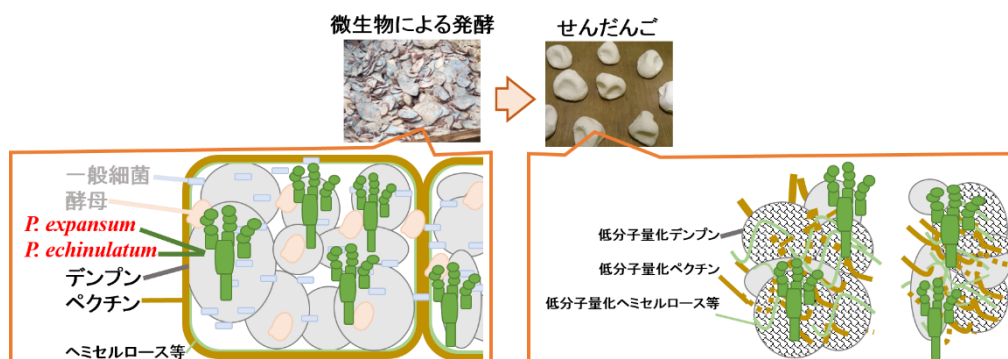


Fig. 5-1 微生物によるサツマイモの発酵の様子

(*P. expansum* や *P. echinulatum* がサツマイモに含まれるデンプンや繊維質を低分子量化する)

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東京農業大学微生物学研究室教授 岡田早苗先生に深く感謝致します。

また、本研究の遂行に大変貴重な御指導、御助言を賜りました本学微生物学研究室元教授、現名誉教授 内村泰先生に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、たくさんの御助言を賜りました本学微生物学研究室助教 梶川揚申先生、同客員教授 小玉健太郎先生、元教授 駒形和男先生、小原直弘先生、元同助手 中野美佳先生に深く感謝致します。

せんだんごの調査ならびにせんだんごやサツマイモの分析を行うにあたり、御指導、御助言を賜りました本学食糧資源理化学研究室教授 高野克己先生、内野昌孝先生、同准教授 辻井良政先生、本学食品加工センター准教授 野口智弘先生に深く感謝致します。

せんだんごの調査、せんだんごやサツマイモの分析ならびに論文投稿の際に御指導、御助言を賜りました本学食品加工センター助教 岡大貴先生に深く感謝致します。

せんだんごのデンプンや繊維質の電子顕微鏡観察にあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました本学電子顕微鏡室教授 矢口行雄先生、同准教授本橋慶一先生に深く感謝致します。

糸状菌の同定にあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部の小西良子先生（現・麻布大学教授）、高橋治男先生、渡辺麻衣子先生に深く感謝致します。

せんだんご中に含まれるパツリンの分析にあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品安全領域 化学ハザードユニット 中川博之先生、久城真代先生、松尾洋輔先生に深く感謝致します。

せんだんごの調査及び試料採取を行うにあたり、試料を提供していただいた豊玉町齊藤幸枝さん、巖原町橘広子さんに深く感謝致します。

また、製造工程の詳細を御丁寧に教えていただいた長崎県対馬市上県町、峰町、豊玉

町、美津島町、巖原町の方々に深く感謝致します。

8年間の研究生生活にわたり、励まし、御協力頂きました入澤友啓博士、冨田理博士をはじめとする同学微生物学研究室の諸先輩、同輩、後輩諸氏、また、両親、友人に深く感謝致します。

特に最終年度に本研究を共に行っていただいた 2014 年度卒業生 屋比久廉さんに深く感謝致します。

最後に本研究の遂行にあたって、直接御指導、御鞭撻を賜りました本学菌株保存室准教授 田中尚人先生に篤く御礼申し上げます。

平成 27 年 3 月 20 日

### 【参考文献】

- Artur, A., Alan, J. L. P., Isabel, H. & Antonio, C. 2006. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. FEMS Microbiology Letters **245**:221-229
- Dubois, M. Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry **28**:350-356
- Glass, N. L. & Donaldson, G. C. 1995. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. **61**:1323-1330
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry **31**:426-428
- O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. The fungal holomorph: mitotic, meiotic, and pleomorphic speciation in fungal systematics. Wallingford, CAB International. p. 225-233.
- Robert, A. S., Keith, A. S., Angelina F. A. K., Jens A. M. P. C. H. & Jens, C. F. 2004. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial  $\beta$ -tubulin sequences. Studies in mycology **49**:175-200
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, New York, USA p315-322
- Xiaoyan, H., Liyan X., Hongyun L., Jiawang F., Sa, L., Changing, L. & Jiufeng S. 2011. Phylogenetic analysis of dematiaceous fungi isolated from the soil of Guangdong, China. African Journal of Microbiology Research **5**:3310-3316
- Yadav, A. R., Guha, M., Tharanathan, R. N. & Ramteke, R. S. 2006. Changes in characteristics of sweet potato flour prepared by different drying techniques. LWT-Food Science and Technology **39**:20-26



Zhu, H., Qu, F. & Zhu, L. H. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Research* **21**:5279-5280

入澤友啓, 田中尚人, 高野克己, 岡田早苗 2010. かぶらずしに生息する乳酸菌の分離と同定. *日本食品保蔵学会* **36**:83-87

印南敏, 池上幸江, 中村カホル, 土橋文江, 綾野雄幸, 菅原龍幸, 森文平, 中村尚夫, 石原英子, 手島節三, 米川智, 金田よしみ, 金谷健一郎, 山田浩平, 吉岡敏夫 1988. 食物繊維定量法の検討. *日本栄養・食糧学会誌* **41**:43-49

岡大貴 2009. 東京農業大学 修士論文

岡大貴, 入澤友啓, 野口智弘, 内野昌孝, 岡田早苗, 高野克己 2011. サツマイモを原料とする対馬の伝統食品『せんだんご』より調整する麺帯「ろくべえ」のテクスチャー. *日本食品保蔵学会* **37**:17-21

川端史郎 2010. 白カビチーズに特徴的な香り成分とその生成経路. *Milk Science* **59**:303-307

小崎道夫, 内村泰 1990. フィリピン産餅麴ブホッドおよび米酒の微生物相. *Journal of the brewing society of Japan* **85**:818-824

小崎道雄, 岡田早苗 2005. 対馬の保存食品“せん”. *日本食品保蔵学会* **31**:29-34

小西良子 2010. 食品を汚染するカビ毒の現状と対応. *食品衛生学会誌* **54**:285-297

武山進一, 笹島正彦, 関村照吉, 遠山良 2002. 冷麺の茹で伸び防止の検討. *岩手県工業技術センター研究報告* **9**:177-180

対馬市役所 HP 第 1 章 市の概要.

[http://www.city.tsushima.nagasaki.jp/policy/images/haikibutsu\\_pdf/haiki01.pdf](http://www.city.tsushima.nagasaki.jp/policy/images/haikibutsu_pdf/haiki01.pdf)

(最終アクセス 2014 年 11 月 11 日)

- 辻井良政, 清瀬紀子, 立田奈緒美, 矢口行雄, 内野昌孝, 高野克己 2009. 米飯食味形成に関わる炊飯中の胚乳細胞壁の変化. 日本食品保蔵学会誌 35 :127-134
- 遠山良, 三浦靖, 種谷真一 1997. 冷麺の食味特性に及ぼすでんぷん原料の影響. 日本調理科学会誌 30:213-225
- 中川博之 2009. カビ毒の多種同時検出技術. 食品工業 52(14):39-47
- 中村道徳, 貝沼圭二 1986. 澱粉・関連糖質実験法. 学会出版センター 19:211-212
- 永留久恵 2009. 対馬国志 原始・古代編 ヤマトとカラの狭間で活きた対馬. 「対馬国志」刊行委員会. 1:85-88
- 宮川金次郎, 難波敦子 1995. 対馬の腐敗法によるくずサツマイモの加工「せんだんご」のルーツ. 日本食生活文化調査研究報告書 (日本食生活文化財団) 12:1-9

### **【Summary】**

*Sendango* is a traditional delicacy food material made by the fermentation of sweet potato and is exclusively produced in Tsushima, Nagasaki, Japan. A noodle-type derivative of *Sendango*, *Rokube*, has a unique texture this is somewhat similar to konjac, which is not an expected product derived from sweet potato. A previous study demonstrated that the partial degradation of starch and fibers contributes to the unique texture of *Rokube*. Since mold is propagated during the fermentation phase of *Sendango*, the specific texture of *Rokube* is considered to result from the activity of fungi or other microbes. However, it has not been determined whether these microbes contribute to the partial degradation that results in the unique texture of *Rokube*. In this study, we identified the culturable microbes in the process of *Sendango* preparation, and attempted to reproduce *Sendango* by fermentation with the selected microbes. Overall, the predominant microbes were *Mucor* sp., *Penicillium* spp., *Candida* spp., *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp.. Microbes that presented amylolytic, pectolytic, and/or xylanolytic activities were identified to determine their contribution to the partial degradation of starch and fibers that determine the texture of *Rokube*. Among the isolated fungi and bacteria, some strains of *Penicillium* spp. were found to be capable of degradation, and thus these microbes were suggested to contribute to fermentation. Furthermore, when either *Penicillium echinulatum* 38-1 or *P. expansum* 13-3 was propagated on sweet potato, partial degradation of starch, pectin, and hemicellulose was observed. In addition, the texture profile showed that the simulated *Rokube* made from this fermented sweet potato presented similar physical properties to the original *Rokube* of Tsushima. These results suggest that the unique texture of *Rokube* is attributed to specific strains of *P. echinulatum* and *P. expansum*. Moreover, some *Penicillium* spp. are considered as potential sources of food contamination by production of the mycotoxin patulin. We therefore examined the patulin concentration in *Sendango*, and demonstrated that it did not contain any patulin.

## 研究業績

### [学術論文]

#### 〈原著論文〉

1. 「せんだんご」製造工程中の菌叢解析  
熊谷浩一、渡辺麻衣子、高橋治男、梶川揚申、佐藤英一、田中尚人、岡田早苗  
日本微生物資源学会誌 第31巻第1号 (印刷中)
2. 「せんだんご」製造工程中に生息する糸状菌のサツマイモの発酵における役割  
熊谷浩一、岡大貴、梶川揚申、佐藤英一、田中尚人、岡田早苗  
日本微生物資源学会誌 第31巻第1号 (印刷中)

#### 〈資料〉

1. 対馬伝統発酵食品「せんだんご」の各地域における製造方法  
熊谷浩一、田中尚人、佐藤英一、岡田早苗  
東京農業大学農学集報 第60巻第1号 (印刷中)

### [学会口頭発表]

1. 対馬伝統発酵食品せんだんごに生息する微生物の菌叢解析  
○熊谷浩一，田中尚人，佐藤英一，内村泰，岡田早苗  
平成22年度 日本農芸化学会 (2010年3月 東京)  
大会講演要旨集 p63
2. せんだんご製造工程中におけるデンプン分解微生物の解析  
○熊谷浩一，岡大貴，田中尚人，佐藤英一，岡田早苗  
平成24年度 日本農芸化学会 (2012年3月 京都)  
要旨 Web only 4C22a04
3. 対馬のせんだんご製造工程における微生物叢  
○熊谷浩一，田中尚人，佐藤英一，岡田早苗  
平成24年 日本微生物資源学会第19回大会 (2012年6月 千葉)  
日本微生物資源学会誌 p63 (第28巻1号)

4. せんだんごに生息する食物繊維分解微生物

○熊谷浩一，田中尚人，渡辺麻衣子，梶川揚申，佐藤英一，小西良子，岡田早苗  
平成 25 年度 日本微生物資源学会 (2013 年 6 月 茨城)  
日本微生物資源学会誌 p47 (第 29 卷 1 号)

**[学会ポスター発表]**

1. 対馬伝統発酵食品「せんだんご」に関する微生物学的研究

○熊谷浩一，田中尚人，梶川揚申，佐藤英一，岡田早苗  
平成 26 年度 日本食品科学工学会 (2014 年 3 月 東京)  
(公社)日本食品科学工学会平成 26 年度関東支部大会  
講演要旨集 p26