

「せんだんご」製造工程中の菌叢解析

熊谷浩一¹⁾, 渡辺麻衣子⁴⁾, 高橋治男⁴⁾, 梶川揚申²⁾,
佐藤英一²⁾, 田中尚人^{3)*}, 岡田早苗^{2,3)}

¹⁾ 東京農業大学大学院農学研究科農芸化学専攻, ²⁾ 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科,
³⁾ 同菌株保存室 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1
⁴⁾ 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

「せんだんご」はサツマイモを原料とした長崎県対馬地方固有の伝統発酵食品である。せんだんごはスライスまたは破碎したサツマイモを数ヶ月間発酵させた後、多量の水で洗浄して浮遊物や着色物質が除かれた白色沈殿物を丸め団子状とし、ヒトの鼻形に成型し、乾燥させたものである。せんだんごを基に作られる「ろくべえ麺」は、原料であるサツマイモからは想像し得ないコンニャクに似た独特な食感を有し、この食感は原料サツマイモ粉からは得られないとされている。せんだんご製造工程中には糸状菌などの繁殖が見られ、これらの微生物はデンプンや繊維質を部分的に分解することでろくべえ麺の食感形成に関与していると考えられる。しかし、せんだんご製造に関わる微生物について、研究報告がこれまでに無いのが現状である。

そこで、本研究では4年間にわたり現地を調査し、培養法によりせんだんご製造工程中の微生物叢を調べた。その結果、せんだんご製造工程から多くの微生物が分離され、主要微生物群は、糸状菌では *Mucor* 属, *Penicillium* 属, 酵母では *Candida* 属, 一般細菌では *Bacillus* 属, *Paenibacillus* 属であった。

せんだんごに含まれるデンプン及び繊維質は、原料サツマイモに含まれるそれらと比べ、部分的に分解されており、繊維質の中でも減少量が多いペクチンに着目した。これを指標に、分離株の中からデンプン及びペクチン双方の分解能を持つ微生物を選抜した。その結果、*Mucor* 属及び *Penicillium* 属において両分解能を確認した。これらの糸状菌は生産農家や年度に関わらず見出せることから、せんだんごの発酵に欠かせない微生物であることが示唆された。

キーワード: *Sendango*, amylolytic microbes, pectolytic microbes, fermentation food, Sweet potato

序文

サツマイモを原料とした「せんだんご」は、九州と朝鮮半島の間に位置する対馬（長崎県対馬市）で長年にわたり作られてきた伝統発酵食品である。歴史的に見て、せんだんごは島民にとって貴重な保存食品であった（永留, 2009）。近年、島民の高齢化とともに生産する農家は減少し、現在生産する農家は島内各所に点在している。

せんだんごの製造工程の概要は次のようである。サツマイモ→サツマイモ片→浸漬工程→発酵工程Ⅰ（サツマイモ片を堆積し発酵させる工程）→発酵工程Ⅱ（柔らかくなったサツマイモ片をソフトボール状に成型し、発酵を続ける工程）→多量の水により洗浄→ヒトの鼻形に成型→天日乾燥の順で作られる。製造工程の期間は長く、11月中旬頃のサツマイモ収穫に始まり、年を越えて、3月末頃までの約5ヶ月間が費やされる

（小崎ら, 2005）。

せんだんごを加工して作られる「ろくべえ麺」は、原料であるサツマイモからは想像し得ないコンニャクに似た独特な食感を有する。この食感は原料サツマイモ粉からは作り得ず、数ヶ月間に及ぶ発酵工程を経なければならぬ（岡ら, 2011）。この製造工程中、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、酸臭のような独特の異臭を発生し、サツマイモ片に粘りが生じることから、発酵工程中には糸状菌の他、酵母や細菌の繁殖が推定できる。これらのことから、何ら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わっていると考えられる。

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無く、どのような微生物が関わってサツマイモがろくべえ麺のような食感になるかは不明のままである。

そこで本研究では4年間にわたり現地を調査し、せんだんご製造に関わる微生物叢を明らかにすることを目的とした。

*Corresponding author

E-mail: n3tanaka@nodai.ac.jp

Accepted: January 5, 2015

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てい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多いことが報告されている（岡ら、2011）。そこで、デンプン及びペクチンの分解微生物に着目した。本調査は2008～2011年にかけて行い、本報では、カビ、酵母、一般細菌の全般について解析した2009～2010年のデータを基に報告する。

材料と方法

1) 供試試料

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S宅、巖原町T宅）を対象にした（Fig. 1）。試料採取は2009～2010年にかけて行った。

両農家の製造工程の概略をFig. 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（A）、発酵工程Iのサツマイモ切片（B）、発酵工程IIのソフトボール状のサツマイモ（C）を用いた。

また、試料採取の際に、目視による状態観察と温度及びpHの測定を行った。

2) 微生物の分離培地

糸状菌の分離にはPDA培地（Difco社製）、酵母の分離にはYM寒天培地〔glucose 1 g, yeast extract（オリエンタル酵母社製）0.3 g, peptone（ミクニ化学産業社製）0.5 g, Malt Extract（Difco社製）0.3 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 4 mg, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.2 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 mg, NaCl 0.2 mg, Tween 80 25 mg, water 100 ml, agar 1.2 g, pH 5.5〕、一般細菌の分離にはNA培地（Difco社製）を用いた。また、PDA培地およびYM培地には細菌の生育を抑制するためにクロラムフェニコール 50 ppm, NA培地には酵母、カビの生育を抑制するためにシクロヘキシミド 50 ppmとなるよう添加した。

3) 生菌数測定及び分離

試料0.1 gを滅菌生理食塩水0.9 mlに懸濁し、引き続いて $10^1 \sim 10^8$ 倍の8段階の希釈液を作った。各希釈液を前記の3通りの培地に平板塗抹した。糸状菌と酵母は25℃、一般細菌は30℃でそれぞれ7日間培養した。生菌数はコロニー計数法により求めた。

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、さらに同組成寒天

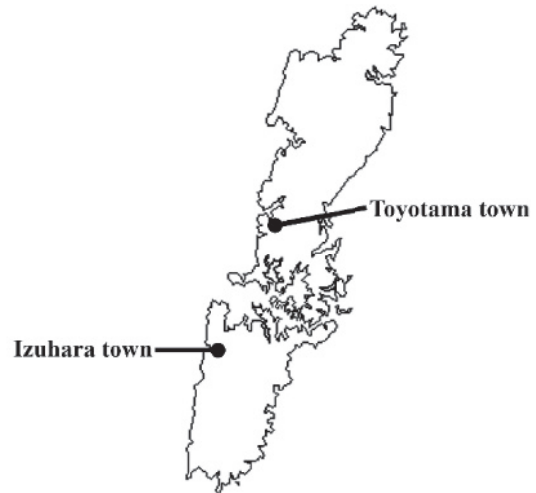


Fig. 1 Sampling point

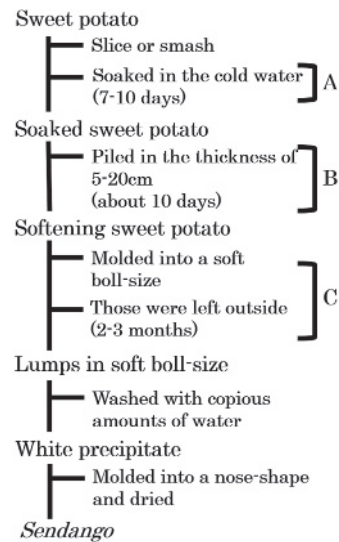


Fig. 2 Method of the preparation of Sendango

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。

4) 分離株の同定

微生物群ごとに特定のDNA塩基配列を基に分離株の同定を行った。分離株からのDNA抽出はZhuらの方法（Zhu *et al.*, 1993）に従った。

糸状菌・酵母：28S rDNA D1/D2領域の遺伝子の約550 bpを解析対象とし、プライマーNL1とNL4（O'Donnell, 1993）を用い、PCR反応（Artur *et al.*, 2006）を行った。なお、TaqポリメラーゼはTaKaRa

Ex Taq™ (タカラバイオ社製) を用い、以下の実験も同様とした。糸状菌の種の同定には、 β -チューブリン遺伝子の約 450 bp を解析対象としたプライマー Bt2a と Bt2b (Glass & Donaldson, 1995) も用い、PCR 反応 (Samson *et al.*, 2004) を行った。また、糸状菌においては、必要に応じて顕微鏡を用いた形態鏡観察も行った。

一般細菌: 16S rRNA 遺伝子を対象とし、プライマー 8F と 15R (入澤ら, 2010) を用い、PCR 反応を行った (入澤ら, 2010)。なお、16S rRNA 遺伝子は前半約 500 bp を解析対象とし、プライマー 8F と 520R (入澤ら, 2010) を用いた。

上記の条件により得られた PCR 産物を Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega 社製) にて精製した。シーケンス反応は BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製) を用いた。なお、各種遺伝子の増幅反応及びシーケンス反応には、PCT-0200 DNA Engine (BIO-RAD 社製) を用いた。

シーケンス反応後、310 Genetic Analyser (ABI PRISM™) にて塩基配列を決定後、Auto assembler (ABI PRISM™) を用いて解析した。得られた塩基配列の相同性検索は糸状菌及び酵母は National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、一般細菌は EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) で行い、属の同定を行った。

5) 分離株のデンプン及び食物繊維分解能試験 (簡易判定試験)

分離株の糸状菌は LCA 培地 [yeast extract (オリエンタル酵母社製) 0.02 g, NaNO₃ 0.2 g, KH₂PO₄ 0.1 g, KCl 0.02 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.02 g, water 100 ml, agar 1.2 g, pH 4.0], 酵母は glucose を含まない YM 培地、一般細菌は NA 培地を基礎培地とし、それぞれにデンプンまたはペクチンを 1% 加えた寒天平板培地に接種した。

そして、糸状菌と酵母は 25℃、一般細菌は 30℃ でそれぞれ 7 日間培養した。コロニーを形成した平板培地上に、ヨウ素ヨウ化カリウム溶液またはルテニウムレッド溶液を加注した。そして、コロニー周辺のハロ形成の有無により、それぞれデンプン分解能とペクチン分解能として判定した。

また、主要なデンプンまたはペクチン分解株については、せんだんご製造環境を考慮した 15℃ における酵素活性について検討した。各種微生物の培養には前

記と同組成の液体培地を用い、酵素活性の検出には DNS 法 (Miller, 1959) により、活性の有無について検討した。

結果

1) 製造工程の観察

試料採取したせんだんご生産農家 (S 宅と T 宅) の製造過程の概略を Fig. 2 に示した。両農家とも、製造工程の大きな流れ (サツマイモ→浸漬工程→発酵工程 I →発酵工程 II →多量の水により洗浄→成型→天日乾燥) は共通していた。

原材料のサツマイモ処理: S 宅ではスライスし、T 宅では破碎していた。

浸漬工程 (7 日程度): 両農家ともにプラスチック製の大容量を用い、浸漬後 1~2 日経過すると、浸漬液表面に産膜酵母による菌膜が見られ、また、容器深部より気泡の発生が観察された。浸漬液の pH は 4~5 程度であり、温度は 7~10℃ であり対馬の平均気温 (12 月: 4~11℃) と同様で同工程期間中の変動は見られなかった。浸漬中のサツマイモ断片は特に柔らかくなることもなく、目的には大きな変化はなかった。浸漬工程の状況は両農家とも大きな違いはなかった。

発酵工程 I (10 日程度): S 宅においては、高さ 20~30 cm の板囲いの中にサツマイモ切片を堆積させるのに対し、T 宅では破碎したサツマイモを棚板上に 3~4 cm の厚さに堆積させていた。同工程中、時間の経過とともに、堆積したサツマイモ片の表面に糸状菌の繁殖が見られるようになり、さらに pH は上昇し (pH 4 → pH 7)、温度も発酵熱によると考えられる温度上昇があった (10℃ → 15℃)。本発酵工程終盤となると、サツマイモ片は手でひねると形状が失われる粘土状になった。

発酵工程 II (2~3 ヶ月程度): 粘土状になったサツマイモ片をソフトボールサイズの球形に成型し、棚板に並べ、野外に放置された。1 日経つと表面は硬くなり、さらに時間が経過すると乾燥が進み、表面は黒味を帯び、糸状菌の繁殖も観察できる。また、中盤より、小さなひび割れも現れる。この間の組織の中心部の pH 変化や温度変化は測定できなかった。

2) 微生物の生菌数

各試料の生菌数を測定した。

浸漬工程: 糸状菌は 10¹ CFU/g 以下と少なく、酵母は 10²⁻⁷ 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る)。

発酵工程 I：糸状菌は 10^{4-7} CFU/g で存在し、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、本工程において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 で存在し、酵母は 10^{3-6} CFU/g 程度で存在していた。一般細菌は本工程において、 10^{6-9} CFU/g で認められた。

各工程における各生菌数は、両農家において同様の傾向であった (Table 1)。

3) 微生物の分離株数

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。

4) 微生物の分離株数

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)。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 3)。一般細菌は、17 属と多種多様な菌種が存在し、高頻度で共通して分離されたのは *Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属であった (Table 4)。

5) 分離株のデンプン及びペクチン分解能試験

全分離株について、デンプン及びペクチン分解能を検討した。その結果、糸状菌の *Aspergillus* 属、

Mucor 属、*Penicillium* 属の全株に両分解能が認められ、毎年両地域の発酵工程 (I 及び II) に常に生息している主な糸状菌は *Mucor* 属、*Penicillium* 属であった (Table 5, 6)。

また、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 (Table 6)。

一般細菌においても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) がデンプン分解能を有する一般細菌の 6 割を占めた (Table 5)。

また、主体となるデンプンまたはペクチン分解能を有する微生物であった *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、わずかに生育は確認されるものの、デンプン分解酵素活性が認められなかった。一方、*Mucor* 属と *Penicillium* 属の全株においては 15°C でもデンプン及びペクチンの分解能が認められた。

6) *Mucor* 属と *Penicillium* 属の種の同定

せんだんご製造環境の温度である 15°C 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 7)。

Table 1 Count of viable microorganisms in the process of Sendango production (CFU/g)

Area	Year	Process	Fungi	Yeasts	Bacteria
Toyotama	2009	Soak	N.D.	3.1×10^2	2.5×10^6
		Fermentation I	1.4×10^6	8.9×10^6	4.4×10^6
		Fermentation II	1.3×10^5	1.9×10^4	1.1×10^8
	2010	Soak	N.D.	1.3×10^3	3.1×10^7
		Fermentation I	7.0×10^4	1.4×10^4	2.5×10^8
		Fermentation II	6.7×10^5	1.2×10^3	2.2×10^7
Izuhara	2009	Soak	1.5×10^1	3.9×10^7	3.9×10^9
		Fermentation I	2.8×10^7	7.9×10^7	1.1×10^9
		Fermentation II	1.6×10^7	7.0×10^6	3.5×10^7
	2010	Soak	N.D.	6.3×10^1	1.2×10^8
		Fermentation I	8.9×10^6	3.5×10^4	5.0×10^7
		Fermentation II	2.7×10^6	1.7×10^3	1.0×10^8

*N.D. = not detected

Table 2 The number of isolates of fungi isolated from the each process of *Sendango* production

Year	Process	Toyotama		Izuhara	
2009	Soak	-		<i>Mucor</i> sp.	(1)
	Fermentation 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)
	Fermentation II	<i>Mucor</i> sp.	(3)	<i>Mucor</i> sp.	(6)
		<i>Penicillium</i> sp.	(3)	<i>Penicillium</i> sp.	(7)
2010	Fermentation I	<i>Aspergillus</i> sp.	(5)	<i>Mucor</i> sp.	(7)
		<i>Penicillium</i> sp.	(2)	<i>Penicillium</i> sp.	(13)
	Fermentation II	<i>Mucor</i> sp.	(4)	<i>Mucor</i> sp.	(11)
		<i>Penicillium</i> sp.	(3)	<i>Penicillium</i> sp.	(6)

() : Number of strains

Table 3 The number of isolates of Yeasts isolated from the each process of *Sendango* production

Year	Process	Toyotama		Izuhara	
2009	Soak	<i>Candida</i> sp.	(10)	<i>Candida</i> sp.	(2)
		<i>Pichia</i> sp.	(6)		
		<i>Saccharomyces</i> sp.	(3)		
	Fermentation 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)		
	Fermentation II	<i>Candida</i> sp.	(1)	<i>Candida</i> sp.	(1)
		<i>Pichia</i> sp.	(2)	<i>Pichia</i> sp.	(2)
2010	Soak	<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)		
	Fermentation I	<i>Candida</i> sp.	(1)	<i>Saccharomyces</i> sp.	(3)
		<i>Hanseniaspora</i> sp.	(2)		
	Fermentation II	<i>Candida</i> sp.	(3)	<i>Saccharomyces</i> sp.	(2)
		<i>Hanseniaspora</i> sp.	(2)		
		<i>Saccharomyces</i> sp.	(1)		

() : Number of strains

考 察

せんだんご製造工程中、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）にしぼった。各工程の目視あるいは臭いから、糸状菌、酵母、細菌類の存在が考えられ、各工程から試料を採取し、糸状菌、酵母、一般細菌に分けて分離と同定を行った。

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、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、農家、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ことより、せんだんご製造が対馬という比較的狭い環境の中で、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、ろくべえ麵の独特な食感に導くの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麵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

Table 4 The number of isolates of bacteria isolated from the each process of Sendango production

Year	Process	Toyotama		Izuhara		
2009	Soak	<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)	
	Fermentation I				<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)
			<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)
	Fermentation II		<i>Paenibacillus</i> sp.	(1)	<i>Rhodococcus</i> sp.	(2)
			<i>Pseudomonas</i> sp.	(4)	<i>Sphingobacterium</i> sp.	(2)
			<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)		
2010	Soak					
		<i>Bacillus</i> sp.	(8)	<i>Bacillus</i> sp.	(7)	
		<i>Microbacterium</i> sp.	(1)	<i>Chryseobacterium</i> sp.	(1)	
	Fermentation I		<i>Pseudomonas</i> sp.	(13)	<i>Paenibacillus</i> sp.	(1)
					<i>Pseudomonas</i> sp.	(10)
					<i>Staphylococcus</i> sp.	(7)
			<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)
	Fermentation 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)	

() : Number of strains

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とある(岡ら, 2011)。そこで、デンプンとペクチ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* 属の全株、一部の *Saccharomyces* 属の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 *Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属にデンプン分解能が確認された。特に、*Mucor* 属、*Penicillium* 属はせんだんご製造環境を反映した 15℃での培養時にも、デンプ

ンとペクチンの両方の分解能を示し、これら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る。

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たしていることが判断した。

そして、*Mucor* 属は全株 *M.circinelloides* であり、*Penicillium* 属においては、*P.echinulatum*、*P.*

Table 5 The number of amylolytic microbes isolated from the each process of *Sendango* production

Microbes	Year	Process	Toyotama		Izuhara	
Fungi	2009	Soak	-		<i>Mucor</i> sp.	(1)
		Fermentation I	<i>Mucor</i> sp.	(4)	<i>Aspergillus</i> sp.	(5)
			<i>Penicillium</i> sp.	(3)	<i>Mucor</i> sp.	(10)
		Fermentation II	<i>Mucor</i> sp.	(3)	<i>Penicillium</i> sp.	(7)
			<i>Penicillium</i> sp.	(3)	<i>Mucor</i> sp.	(6)
		2010	Fermentation I	<i>Aspergillus</i> sp.	(5)	<i>Mucor</i> sp.
	<i>Penicillium</i> sp.			(2)	<i>Penicillium</i> sp.	(13)
	Fermentation II		<i>Mucor</i> sp.	(4)	<i>Mucor</i> sp.	(11)
			<i>Penicillium</i> sp.	(3)	<i>Penicillium</i> sp.	(6)
	Bacteria	2009	Soak	<i>Paenibacillus</i> sp.	(6)	<i>Bacillus</i> sp.
<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)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	(1)
<i>Microbacterium</i> sp.				(3)	<i>Microbacterium</i> sp.	(3)
<i>Paenibacillus</i> sp.				(2)	<i>Paenibacillus</i> sp.	(2)
<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		Fermentation I	<i>Bacillus</i> sp.	(2)		

() : Number of strains

Table 6 The number of pectololytic microbes isolated from the each process of *Sendango* production

Microbes	Year	Process	Toyotama		Izuhara	
Fungi	2009	Soak	-		<i>Mucor</i> sp.	(1)
		Fermentation I	<i>Mucor</i> sp.	(4)	<i>Aspergillus</i> sp.	(5)
			<i>Penicillium</i> sp.	(3)	<i>Mucor</i> sp.	(10)
		Fermentation II	<i>Mucor</i> sp.	(3)	<i>Penicillium</i> sp.	(7)
			<i>Penicillium</i> sp.	(3)	<i>Mucor</i> sp.	(6)
		2010	Fermentation I	<i>Aspergillus</i> sp.	(5)	<i>Mucor</i> sp.
	<i>Penicillium</i> sp.			(2)	<i>Penicillium</i> sp.	(13)
	Fermentation II		<i>Mucor</i> sp.	(4)	<i>Mucor</i> sp.	(11)
			<i>Penicillium</i> sp.	(3)	<i>Penicillium</i> sp.	(6)
	Yeasts	2009	Soak	<i>Saccharomyces</i> sp.	(7)	-

() : Number of strains

expansum, *P. crustosum*, *P. roqueforti* の4菌種が存在することを明らかとした。

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こと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。今後、両属の糸状菌がろくべえ麺の独特な食感形成にどのように関わってい

Table 7 List of each identification of *Penicillium* sp. isolated from the each process of *Sendango* production

Year	Process	Toyotama		Izuhara	
2009	Fermentation 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)
	Fermentation 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	Fermentation 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)		
	Fermentation II	<i>P. expansum</i>	(1)	<i>P. expansum</i>	(3)
		<i>P. echinulatum</i>	(1)	<i>P. echinulatum</i>	(6)

() : Number of strains

るか，明らかにすることが望まれる。

謝 辞

本研究を行うにあたり，現地調査や試料提供にご協力してくださいました対馬市豊玉町 齊藤幸枝氏，厳原町 橋 広子氏をはじめとする対馬市の方々に深く感謝いたします。また，カビの同定にご助言いただき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に深く感謝いたします。

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 Microbiol. Let.* **245**: 221-229.
- Glass, N.L. & Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (4): 1323-1330.
- 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.

- 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.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- 永留久恵 2009. ヤマトとカラの狭間で活きた対馬(対馬国志 第1巻 原始・古代編), p. 85-88, 「対馬国志」刊行委員会, 長崎.
- O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives, The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic, and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics, p. 225-233, CAB International, Wallingford.
- 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』より調製する麵帯「ろくべえ」のテクスチャー. *日本食品保蔵学会* **37** : 17-21.
- Samson, R.A., Seifert, K.A., Kuijpers, A.F.A., Houbraken, J.A.M.P. & Frisvad, J.C. 2004. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Stud. Mycol.* **49**: 175-200.
- Zhu, H., Qu, F. & Zhu, L.H. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5279-5280.

Microbial diversity the process of *Sendango* production

Koichi Kumagai¹⁾, Maiko Watanabe⁴⁾, Haruo Takahashi⁴⁾, Akinobu Kajikawa²⁾,
Eiichi Satoh²⁾, Naoto Tanaka³⁾ and Sanae Okada^{2, 3)}

¹⁾ Department of Agricultural Chemistry, ²⁾ Department of Applied Biology and Chemistry,
³⁾ NRIC, Tokyo University of Agriculture, ⁴⁾ Division of Microbiology, National Institute of Health Science

Sendango is a traditional delicacy this is made from fermented ground sweet potato and is produced exclusively in Tsushima, Nagasaki, Japan. Unexpectedly for a sweet potato product, a noodle prepared from *sendango*, *rokube*, has a unique texture somewhat similar to that of konnyaku. The fungi or other microbes that cause mold to form during *sendango* fermentation are considered likely to be involved in creating the specific texture of *rokube*, but this is yet to be determined. Here, we tracked culturable microbes occurring during the process of *sendango* formation over a 4-year period. Overall, the predominant microbes were *Mucor* sp., *Penicillium* spp., *Candida* sp., *Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp. Because previous studies have demonstrated that the unique texture of *rokube* is attributable to the partial degradation of starch and fiber, microorganisms with amylolytic or pectolytic activity, or both, were identified. Among the fungi and bacteria isolated, some strains of *Penicillium* spp. and *Mucor* sp. were capable of this degradation and were thus likely contributors to the fermentation.