手延べ乾麺の空隙形成に参与する耐塩性酵母

大久長範^{1*}, 鈴木直樹¹, 三浦みどり¹, 遠藤耕介¹, 藤田康弘²

¹ 宮城大学食産業学部

² キリンビバレッジ株式会社

Halotolerant Yeast Participates in the Cavity Formation of Hand-pulled Dry Noodles

Naganori Ohisa^{1*}, Naoki Suzuki¹, Midori Miura¹, Kosuke Endo¹ and Yasuhiro Fujita²

¹ Miyagi University, School of Food, Agricultural and Environmental Sciences,
2-2-1 Hatatate, Taihaku, Sendai, Miyagi 982-0215

² Kirin Beverage, 1-17-1 Namamugi, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-8628

SEM observation showed the presence of cavities in hand-pulled dry noodles such as Inaniwa-udon, Himi-udon and Shiroishi-umen. Wheat flour (100 g) dough containing 8% (w/v) salt solution (55 ml) was matured for 24 hours, and dried noodles were made from the matured dough by hand-stretching and drying. The cavities of the hand-pulled noodles were formed by such an operation, and increased in size as the maturation temperature rose to 23°C or 30°C. We isolated several yeast samples from the Inaniwa-udon dough, and obtained pure M1 and M2 strains. These produced gas from glucose, sucrose, trehalose, galactose and maltose, utilized soluble starch, and showed tolerance to 10% (w/v) salt solution. Cultures were identified as *Hyphopichia burtonii* by the base sequence of ITS region and sugar utilization. With the addition of *H. burtonii* M1 and M2 to wheat flour dough, and incubation at 30°C, the dough volumes noticeably increased after 10 hours. Without *H. burtonii* M1 and M2, there was no volume increase in the dough for 36 hours. Thus, halotolerant *H. burtonii* appears to participate in the cavity formation of hand-pulled noodles such as Inaniwa-udon.

(Received Mar. 7, 2012; Accepted Jun. 5, 2012)

Keywords : hand-pulled dry noodles, matured dough, cavity, halotolerance, *Hyphopichia burtonii*

キーワード : 手延べ乾麺, 熟成生地, 空隙, 耐塩性, *Hyphopichia burtonii*

稲庭うどんは伝統的な手延べ技術により製造されてきている¹⁾²⁾。原料は小麦粉、塩そして水という至って単純である。しかし他の手延べ麺類とは異なるのは、生地の熟成時間を十二分に確保している点である。製造工程は以下の通りである²⁾¹⁾ⁱⁱⁱ⁾。(i) 小麦粉に塩水が十分に混ざるように練り上げ生地を丸め、丸めたものを一旦平らにし再度練り丸める。丸めたものを平らにつぶし一晚熟成させる。(ii) 生地を細く切った後に丸いひも状にし、渦巻状にたらいの中に巻き、ビニールをかぶせ熟成させる。(iii) 2本の棒に“8”の字になるように綾掛けをし、竿に掛け少しずつ延ばし、屋内で乾燥する。小麦粉に塩水を加えてから3日目に完成品となる。手延べ麺は延ばし工程により、グルテン繊維が一方方向に伸びていることが報告されている³⁾。稲庭うどんは手延べ麺に分類されるが、特異的なのは、肉眼でも判別できる100 μm程度の空隙が存在することである。乾燥状態の稲庭うどんをX線CTにより観察したところ、直径が10 μmから90 μm以上の空隙があり圧延方向に伸びてい

ることが確認された⁴⁾。稲庭うどんの空隙は茹でても水が浸透せずに、空隙のまま十数時間にわたり残っていることが、プロトンNMRイメージングにより分かった⁵⁾。手打ちうどんに認められる小さな空隙は、小麦粉と塩水を混合攪拌する際に生地に混入した空気と考えられている⁶⁾ⁱⁱⁱ⁾。稲庭うどんの場合は、微生物の発酵に関係していると著者らは推定している⁷⁾。この論文では、手延べうどんの空隙形成には発酵が関与していることを明らかにする為に、ガスを発生する酵母の単離を試みた。

実験方法

1. 試料

手延べ乾麺として、稲庭うどん(秋田県、稲庭吉左衛門、寛文五年堂、熊谷麺業)、氷見うどん(富山県、万葉物産)、白石手延べうどん(宮城県、はたけなか製麺所)を使用した。また機械製麺した乾麺として竹打ちうどん(群馬県、有限会社粕谷製麺所)を使用した。

稲庭うどんのメーカーである熊谷麺業(秋田県湯沢市)から、稲庭うどんの生地の提供を受けた。

標準菌株の *Hyphopichia burtonii* (*Pichia burtonii*) NBRC

¹ 〒982-0215 宮城県仙台市太白区旗立 2-2-1

² 〒230-8628 神奈川県横浜市鶴見区生麦 1-17-1

* 連絡先 (Corresponding author), oohisa@myu.ac.jp

10837 は NITE biological resource center から分譲を受けた。

2. 手延べ乾麺の試作

実験室で小麦粉と食塩水から手延べうどんを試作した。強力粉（日清カメリア）200g と薄力粉（日清フラワー）200g を混合したものに 8% (w/v) 食塩水を 220ml 添加した。これを捏ね生地とした。この生地を 4 分割し、熟成温度の影響を把握するために 4 種類の温度（4, 10, 23, 30℃）で 24 時間保温した。熟成した生地を手で長く伸ばし製麺した。麺線の内部構造を固定するために、麺線を -80℃ の冷凍庫で凍結し、次に 2℃ の冷蔵庫に移し乾燥させた。

3. 走査電子顕微鏡観察

稲庭うどんの空隙の比率により歯ごたえが変わるという先の報告がある⁸⁾。手延べ乾麺や試作乾麺の空隙を確認するために、これらの麺を切断し横断面を走査型電子顕微鏡（日立 S-2380N 型）により観察した（加速電圧 15kV、倍率 80-100）。得られた断面画像から空隙の直径を測定した。空隙を真の円と仮定し、直径から空隙の面積を求めた。麺の断面 1mm 平方の全ての空隙の面積を積算し、空隙率（%）を算出した。1 種類の試料から 10 箇所の断面画像を得て、それらを平均した。

4. 小麦粉、生地、麺線中の微生物

小麦粉、生地、麺線を滅菌水で段階希釈し、ペトリフィルム（3M ヘルスケア社）に重層し、30℃ で 3~5 日間培養した。得られたコロニー数から酵母と好気性細菌を求めた。酵母はカビ・酵母測定用 YM プレート、好気性細菌は生菌数測定用 AC プレートを使用した。

5. 稲庭うどん生地から酵母の分離

稲庭うどんの生地（湯沢市、熊谷麺業）の希釈液をダーラム管入り酵母用液体培地（GPY）で培養した。ガスの発生を認めた最大希釈液から酵母を分離した。GPY の組成は、蒸留水 100ml、グルコース 2g、ポリペプトン 0.5g、酵母エキス 0.2g、リン酸カリウム 0.1g、硫酸マグネシウム 0.05g とした。

The Yeasts の記載を参考にして栄養細胞の形態、糖の資化性、発酵性、生育温度、食塩耐性を調査した⁹⁾。糖類の利用については培養同定・真菌キット（ID32C アピ）を利用した。生育温度と耐塩性も前述の酵母用液体培地で実施

した。食塩耐性は所定の濃度になるように GPY 培地に添加し使用した。

胞子の確認は、PDA 斜面培地で培養した菌を 15% (w/v) の食塩を含む 0.5% 酢酸ナトリウム溶液に移し替え 5 日間室温で培養したもので行った。

6. PCR

単離した酵母の同定を目的として、単離酵母から Takara Gen とるくん（酵母用）を用いて DNA を抽出した。次に、リボゾーム RNA 遺伝子の ITS 領域を GeneAmp[®] PCR System 9700 を用いて増幅し、シーケンス反応を行った後、ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer を用いて塩基配列を決定した。プライマーは ITS4（5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'）と ITS5（GGAAGTAAAAGTCGTAAC-AAGG-3'）を用いた¹⁰⁾。

決定した ITS 領域の塩基配列は NCBI BLAST の DNA データベース（DDBJ/EMBL/GenBank=INSD）（<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>）で相同性検索を実施し、分離酵母の種段階の同定を行った。

7. *Hyphopichia* を添加した生地の作製

酵母のガス発生能を確認するために以下の実験を行った。単離酵母（M1, M2）および標準菌株 *Hyphopichia burtonii* NBRC10837 を 9% の食塩を含む YPD 液体培地（酵母エキス 0.5%, ペプトン 0.5%, グルコース 1%）で 3 日間培養した。この培養液 12ml と小麦粉（中力粉）20g を混合し生地を作製した。この生地を 100ml のメスシリンダーに詰めた（32ml）。このメスシリンダーを 30℃ で保温し、体積の経時変化を測定した。対照となる生地には 9% 食塩水を用いた。

実験結果

1. 乾麺の走査電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡で乾麺類を観察した。その 1 例を Fig. 1 に示す。稲庭うどんには空隙が観察されたが、機械製麺した竹打ちうどんには空隙が見られなかった。Table 1 にそれぞれ手延べ麺の断面 1m² 当りに存在する空隙数、空隙の平均直径および空隙率（%）を示す。空隙直径が 70 μm と一番大きかったのは熊谷麺業の稲庭うどんであっ

Fig. 1 SEM photograph of dry noodles (×80)

A, Inaniwa udon (kannbunn-gonenndou); B, Takeuchi-udon.

Fig. 2 SEM photograph of dry noodles made from the dough pre-incubated for 24h ($\times 80$)
A, 4°C ; B, 10°C ; C, 23°C ; D, 30°C.

Table 1 Cavity found in hand-pulled dry noodles

Sample	Cavity (%)	Cavity number ($\times 10^6/\text{m}^2$)	Mean diameter (μm)
Inaniwa (kannbunn-gonenndou)	2.77	30.5	31.8
Inaniwa (kichizaemonn)	4.03	11.4	48.8
Inaniwa (kumagai-menngyou)	2.14	5.3	70.8
Himi-udon (mannyoubussann)	3.01	63.7	23.8
Shiroisi-tenobe-umen	4.01	114.7	20.9

た。氷見うどんと白石手延べうどんには $20\mu\text{m}$ 前後の細かい空隙が多くみられた。手延べうどん類の空隙率を計算したところ 2~4% となった。

直径 $5\mu\text{m}$ 以下の微細な穴は、白石温麺、三輪素麺、ナンバーワン素麺にも認められているが¹¹⁾、平均直径が $30\mu\text{m}$ 以上の大きな空隙の存在は、稲庭うどんに特有なものと考えられた。

2. 手延べ乾麺の試作

生地を熟成温度を変化させ手延べ法で乾麺を試作し、SEM で観察した麺の断面像を Fig. 2 に示す。稲庭うどんその他に認められている空隙を実験室で再現することができた。熟成温度を 10°C 、 23°C 、 30°C と高くすることによってより空隙が大きくなる傾向がみられた。

生地を 23°C と 30°C で 24 時間熟成した場合の微生物数の変化を Table 2 に示す。一般生菌数は 23°C と 30°C で増加の程度が異なったが、酵母は両温度で $10^2/\text{g}$ から約 100 倍に増加した。

Table 2 Viable cells of the wheat flour dough containing 8% salt solution

Incubation Time (h)	Incubation Temp ($^\circ\text{C}$)	Viable cells (cfu/g)	
		Aerobic bacteria*	Yeast*
0		2.3×10^2	1.8×10^2
24	23	4.0×10^2	4.3×10^4
24	30	8.1×10^4	3.4×10^4

* counted by 3M Petri film (AC plate and YM plate)

Table 3 Aerobic bacteria and yeast in the dough of Inaniwa udon

Sample*	Viable cells (cfu/g)	
	Aerobic bacteria	Yeast
flour	3.2×10^3	1.9×10^3
dough (5h)	4.9×10^3	2.2×10^3
dough (16h)	3.4×10^4	2.8×10^3
dough (48h)	6.0×10^7	2.8×10^5 (1.1×10^5)**

* obtained from Inaniwa noodles maker (Kumagai-mengyou)

** Gas forming yeasts was counted by MPN method

3. 稲庭うどんの生地から酵母の分離

稲庭うどんの製造工程から原料の小麦粉と生地をサンプリングし、微生物の生菌数を調べた結果を Table 3 に示す。小麦粉の中には好氣的微生物と酵母が 1g 当たり千個程度存在した。食塩水を加えて生地を作製し 48 時間熟成すると好氣的微生物が $10^7/\text{g}$ 、酵母が $10^5/\text{g}$ オーダーに増加した。48 時間熟成した生地を MPN 法で調べたところ、生地の中にはガスを発生するものが $1.1 \times 10^5/\text{g}$ 存在することが

Table 4 Characteristics of isolated yeast M1 and M2

Item	Characteristics
Vegetative cells	ovoidal
Pseudohyphae	saw around a colony on PDA medium
Ascospore	hat-shaped
Fermentation of	glucose, sucrose, trehalose, galactose, maltose
Assimilation of	Soluble starch, glucose, galactose, sucrose, maltose, trehalose, raffinose, N-acetyl-D-glucosamine, glycerol, D-mannitol, palatinose, erythritol, 2-keto-D-gluconate,
No growth	lactone, lactate, inositol, D-xylose, L-rhamnose, esculin, 5-keto-D-gluconate,
Growth at 37°C	week
10% NaCl	+

分かった。

ガスを発生した最大希釈の試験管から平板培養により酵母を15菌株単離した。代表的な単離株をM1とM2と名付け、諸性質を調べた結果をTable 4に示す。栄養細胞は卵形で、PDA培地に生育したコロニーの周辺部から偽菌糸が伸び、胞子は帽子形であった。食塩濃度が濃くなるに従い増殖は抑制されたが、10%以上20%程度までの食塩にも耐性が認められた (Fig. 3)。

グルコースをはじめ5種類の単糖、二糖類を発酵しガスを発生し、可溶性デンプンを資化したことから、M1とM2は*Hyphopichia*属の酵母に属すると考えられた⁹⁾。リボゾームRNA遺伝子のITS領域の配列を決定し相同性検索を行った結果、*Hyphopichia burtonii*と一致した。

4. *Hyphopichia burtonii* の添加試験

単離株M1, M2を小麦粉に添加し生地を30°Cに保温したところ、10時間以降に生地体積の増加が観察され、18時間で体積が約2倍になった (Fig. 4)。図には示していないが、酵母の添加量を1/2, 1/4に減少させたところ体積増加の程度も緩やかになった。対照 (9%食塩区) および標準菌株である*Hyphopichia burtonii* NBRC 10837を添加した生地では、36時間にわたりこのような生地の膨れは認められなかった。

考 察

今回稲庭うどんの生地から単離した耐塩性酵母*Hyphopichia burtonii*は、ドライ塩漬けハムや塩漬け肉製品の中からも分離されている¹²⁾¹³⁾。また、ネパールのお酒の伝統的なスターターからアミラーゼ活性のある*H. burtonii*が分離された¹⁴⁾¹⁵⁾。本研究で分離したM1もM2も可溶性デンプンを資化できることから (Table 4) アミラーゼを保有していると思われる。可溶性デンプンの資化性は菌株同定のキーワードになっており、他の発酵性酵母と異なる点である。異臭を発生した半生手延べうどんからも本菌が分離されている¹⁵⁾。米等の穀類から*H. burtonii*

Fig. 3 Salt tolerance of the isolated strain M1 and M2

M1 (■) and M2 (□) were cultivated in PD medium at 30°C for 5 days.

Fig. 4 Chang of the dough volumes with or without *Hyphopichia burtonii*

Dough made from wheat flour (30 g) and culture of *Hyphopichia burtonii* (16 ml) were incubated at 30°C. ●, control (9% salt solution); △, *Hyphopichia burtonii* M1; □, *Hyphopichia burtonii* M2; ×, *Hyphopichia burtonii* NBRC 10837.

は多数分離されているので⁹⁾、食塩の有無に関わらず世界中で広範囲に分布しているものと考えられる。

稲庭うどん等の手延べ乾麺では、小麦粉に食塩水溶液を添加し長時間熟成させることにより、小麦粉に混入した*H. burtonii*等の耐塩性酵母が発酵して炭酸ガスを発生し、空隙ができると考えられた。稲庭うどんと機械製麺した乾麺の空隙率と歯ごたえの関係を調査した先の報告では、空隙のない機械製造乾麺と稲庭うどんでは硬さと歯ごたえが異なり、空隙率が高くなると歯ごたえが大きくなる傾向があった⁸⁾¹⁶⁾。しかし、空隙率が10%を超えると歯ごたえが低下する傾向が認められるので、炭酸ガスの発生量を制御する必要がある。

冬と夏で麺の生地に加える食塩量を加減することにより、製めん性を制御するという方法が昔から採られてきた¹⁸⁾。Fig. 3から、食塩水の濃度を変化させ*H. burtonii*の

増殖を制御することが可能である。製造現場でも i) 生地
の食塩濃度を変える, ii) 熟成温度と時間を変える等の工
夫がなされているが, これは耐塩性酵母の制御技術として
経験的に編み出されたものと考えられる。

要 約

小麦粉に8% (w/v) 食塩水を添加し24時間熟成した後
に手で伸ばし製麺したところ, 稲庭うどん等に見られてい
る空隙が形成された。熟成温度を10℃から23℃, 30℃と
高くすると空隙が大きくなった。稲庭うどんの生地から酵
母(M1株とM2株)を単離した。いずれの株も, グルコース
をはじめ5種類の単糖, 二糖類を発酵しガスを発生し, 可
溶性デンプンを資化し, 10% (w/v) の食塩水溶液にも耐
性を示した。rDNAのITS領域の塩基配列および糖の資
化性から, これらの菌株を *Hyphopichia burtonii* と同定し
た。M1株, M2株を小麦粉に添加しドウを作製し30℃に
保存すると, 10時間以降にドウ体積の増加した。対照およ
び *Hyphopichia burtonii* NBRC10837 では, 36時間にわた
りこのようなドウの膨れは認められなかった。稲庭うどん
等の手延べ乾麺の空隙形成に耐塩性酵母が関与していると
考えられた。

本研究の遂行にあたり, 稲庭うどんの生地のご提供頂い
た有限会社熊谷麺業の熊谷順社長に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 安藤剛久, 乾めんの概要, 「乾めん入門」(日本食糧新聞社,
東京) pp. 22-37 (1995).
- 2) 「稲庭うどん物語」, 無明舎出版編, (無明舎出版, 秋田) pp.
37-40, pp. 49-62 (2000).
- 3) 前田竜郎, 小麦粉製品の組織構造と食感について, 日本味
と匂学会誌, **12**, 139-144 (2005).
- 4) 大久長範, 千葉紘子, 長谷川勇治, 高島 聡, 秋山美展, 乾
めんの形と内部気泡が食塩の溶出に及ぼす影響, 日本食品
科学工学会誌, **49**, 547-550 (2002).
- 5) 大久長範, 堀金明美, 大能俊久, 吉田 充, 稲庭うどんと他
の茹で麺の圧縮強度比較, 日本食品科学工学会誌, **52**,

- 522-527 (2005).
- 6) 木村利昭, 藤原正弘, 小川敬子, 藤野良子, 相良康重, 神武
正信, 井筒 雅, 中島一郎, 走査電子顕微鏡による茹でうど
んの構造観察, 日本農芸化学会誌, **70**, 1343-1350 (1996).
- 7) 大久長範, 稲庭うどんの構造と物性, 化学工学会東北支部
News Letter, **63**, 7-8 (2008).
- 8) 大久長範, 大能俊久, 熊谷昌則, 茹で稲庭うどんの破断強度
に及ぼす空隙の影響, 日本食品科学工学会誌, **53**, 91-95
(2006).
- 9) Kurtzman, C. P., Pichia. In "The Yeasts, A Taxonomic
study," eds. Kurtzman, C. P. and Fell, J. W., Elsevier,
Amsterdam, pp. 273-352 (2000).
- 10) White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J., PCR protocols: a
guide to methods and applications. Academic Press, San
Diego, Calif., 315-322 (1990).
- 11) 大久長範, 大能俊久, 乾めんの電子顕微鏡による断面観察,
秋田県総合食品研究所報告, **5**, 58-60 (2003).
- 12) Simoncini, N., Roteli, D., Virgili, R. and Quintavalla, S.,
Dynamics and characterization of yeasts during ripening of
Italian dry-cured ham, *Food Microbiol.*, **24**, 577-584 (2007).
- 13) Rai, A. K. and Tamang, J. P., Microbiological studies of thic
meat product of the Eastern Himalayas, *Meat Sci.*, **85**,
560-567 (2010).
- 14) 村 清司, 小泉幸道, 舘 博, 内村 泰, ネパール産餅麴
ムルチャの酵母および糸状菌フロラ, 発酵協会誌, **91**,
895-900 (1996).
- 15) Takeuchi, A., Shimizu-Ibuka, A., Nishiyama, Y., Mura, K.,
Okuda, S., Tokue, C. and Arai, S., Purification and
characterization of α -amylase of *Pichia burtonii* isolated
from the traditional starter Murcha in Nepal, *Biosci.*
Biotechnol. Biochem., **70**, 3019-3024 (2006).
- 16) 末澤保彦, 高橋尚美, 市販麺類の微生物調査, 香川県産業技
術センター報告, **8**, 83-85 (2007).
- 17) 大久長範, 稲庭うどんの美味しさの秘密を探る, 飯島記念
食品科学振興財団平成17年度年報, pp. 130-132 (2005).
- 18) 横塚章治, 製めんにおける食塩の役割, 調理科学, **25**,
47-50 (1992).

引用 URL

- i) 秋田稲庭うどん協同組合, <http://www.inaniwa-udon.jp> (2012.
6.1).
 - ii) 稲庭城下うどん, <http://www.inaniwa.net/> (2012.6.1).
 - iii) 寛文五年堂, <http://www.kanbun.co.jp> (2012.6.1)
- (平成24年3月7日受付, 平成24年6月5日受理)