

旧式焼酎醸造過程におけるジアセチルの生成について

田邊幾之助・坂田太吉・迫間敬子

(応用微生物学研究室)

昭和55年8月10日 受理

Study on the Diacetyl-Production in the Process of the Shôchû-Brewing

Ikunosuke TANABE, Takichi SAKATA, and Keiko SAKOMA

(Laboratory of Applied Microbiology)

緒 言

ジアセチル (diacetyl) は、特に、ビールではひやめし臭、清酒ではジアセチル臭とか未熟臭の原因物質として微量 (弁別閾値, 0.1ppm) でもきられているが、近年、それらの醸造過程における生成および生成機構が各分野の鋭意ある研究で次々と明らかになって来た¹⁾。それによると、ジアセチルは醸造酵母より漏洩した α -アセト乳酸 (α -acetolactic acid) の分解由来する²⁾。 α -アセト乳酸は酵母がバリン生合成の中間産物として生成するもので、発酵の低温経過よりも高温経過で多量に生成することが認められている。この α -アセト乳酸が、特にビールでは、パスツーリゼーションによって酸化的脱炭酸が促進され、ジアセチルになる。しかし、ビール醸造は約1週間の発酵に続く2カ月弱の後発酵が行なわれ、この間に生成して来るジアセチルは酵母がこれを還元して無臭の 2, 3-ブタンジオール (2, 3-butane-diol) とし消失させるので、ビールのジアセチルレベルは上昇しない³⁾。

一方、乳製品、特にチーズに関しては、ジアセチルは香气成分として、特に従来から、その生成には意が払われて来た。ところが、チーズ中でのジアセチルの生成も乳酸菌によって生成される α -アセト乳酸の化学的な酸化的脱炭酸によるもので、更に、乳酸菌の増殖時にクエン酸が存在すると、ジアセチルの生成が促進されることも確かめられている^{5,11)}。

我々は、昭和41年来、地場産業である旧式焼酎醸造の微生物管理を研究して来たが、醸造経過中、乳酸菌がかなり高レベルで生育し、時に高酸度醪の原因となることも明らかにした⁶⁻¹⁰⁾。ここで注目すべきことは、酵母 (一次醪)・醪いづれにおいても比較的高温経過 (32° 又は 33°C 以下) であり、白麴菌を使用するこ

とによる低 pH (pH 3.8~4.0) およびクエン酸の生成 (酒母, 8~9g/l; 醪, 1.5g/l), 更に、乳酸菌から漏洩した α -アセト乳酸のジアセチルへの酸化的脱炭酸を促進する蒸溜などジアセチル生成の条件が非常にそろっている^{6,9,10)}。このため、製品焼酎、酒母および醪のジアセチルレベルを明らかにし、醸造微生物のジアセチル生成への関与を検討することによって、旧式焼酎醸造過程の微生物管理に寄与することを目的として研究を行った。

材料と方法

ジアセチルの定量は PRILL and HAMMER 法に従って行った⁴⁾。なお、ジアセチル標準曲線作成に際しては、ジアセチル標準溶液の調製が困難なので、ジメチルグリオキシメート (dimethyl glyoximate) を使用した。

焼酎製品のジアセチル分析には市販の甘藷焼酎を六銘柄 (伊佐錦, 小鶴, さつま白波, さつま富士, さつま兵六, 七夕) を購入して実験に供した。又、酒母、醪の試料については小正醸造株式会社日置工場の同一日の全タンクからサンプリングして分析した。

乳酸菌と酵母の分離は前報に従って、表1に示した分離培地で、稀釈水として4倍稀釈リンゲル液を用いる稀釈平板法で行った。

焼酎乳酸菌のジアセチル生産能の分布の検討にはすでに分離していたものを 101 株使用した^{9,10)}。又、目安として用いたアセチルメチルカービノール (acetyl-methylcarbinol) の産生の検出は常法どおり VOGES-PROSKAUER テストを用いた。更に、これら菌株のうちでアセチルメチルカービノール生産能の目立ったものを焼酎の酒母・醪を模した全麴培地に接種、これに MEISEL 発酵栓を付して (写真1) 発酵経過を確かめなが

Table 1. The media, used in a series of microbiological examination of Shôchû-brewing

- a) the medium for isolation of lactic acid-bacteria in the Shôchû-brewing and preservation of the stock-cultures

beef-extract	3g
polypepton	10g
yeast-extract	2g
glucose	10g
tween 80	1g
ascorbic acid	1g
tomato-juice*	300ml
distilled water	700ml

pH: not adjusted in addition of calcium carbonate, though adjusted to 6.8 usually in no addition, and the isolation, in which test-tubes are used, is carried out at pH 5.4 (1%-agar medium).

Agar: 2% for plate-cultures, and 1% for stab-cultures.

Kabicidine: 1 mg suspended in one ml of alcohol is added to 20ml of the medium for isolation.

- b) the medium for cultivation and physiological tests of lactic acid-bacteria, especially of heterofermentative bacteria

beef-extract	15g
polypepton	10g
yeast-extract	5g
glucose	30g
distilled water	1l

pH 6.8

- c) the medium for the methyl red-VOGES-PROSKAUER-test

polypepton	7g
glucose	5g
K_2HPO_4	5g
tomato-juice*	300ml
distilled water	700ml

pH 6.8

* A canned juice was centrifuged at 8500 rpm for 15 min and the resulted supernatant was employed.

ら培養した。全麴培地は元石 100g の白米を水に浸漬し、水切りした後、これを 300ml の三角フラスコに入れ、121°C 10分間滅菌蒸煮する。これに白麴菌 *Aspergillus awamori* var. *kawachii* の胞子を接種、30°C 2日間培養する。出来上った白麴に、酵母には滅菌水道水 120ml を加え、ばれいしょ・ぶどう糖培地の 3日培養を 1ml 接種した。乳酸菌には滅菌水道水の代わりに肉汁培地（肉エキス, 0.3g; こうぼエキス, 0.2g; ポリペプトン, 1g; 水道水, 120ml）を用い、

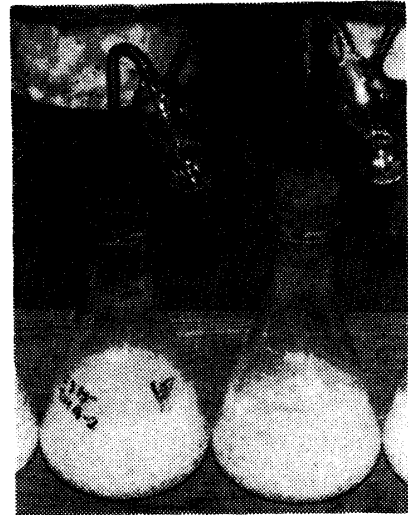


Photo 1. Moromi in an Erlenmeyer-flask with a MEISSEL fermentation-plug.

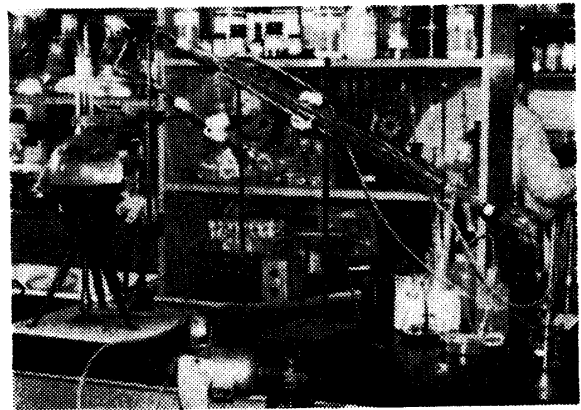


Photo 2. Apparatus for the quantitative analysis of diacetyl.

更にアルコールを5%となるよう加えた。接種には分離培地（表1の分離培地から寒天、炭酸カルシウムおよびカビサイジン抜いたもの）での2日培養を1ml接種した。

結果および考察

1. ジアセチルの定量

PRILL and HAMMER 法でジアセチル定量の際、写真2の装置ではジアセチルの回収率は水が溶媒では95%以上であったが、溶媒にアルコールが含まれる場合は同一の蒸溜条件では図1のとうりであった。これによると、試料のアルコール濃度が15%以下ならばジアセチルの回収率は90%以上を保證されるので、焼酎および酒母・醪試料でも稀釈してアルコール濃度をなるべく低くすればアルコール存在下でもジアセチルの定量が可能であると判断出来た。

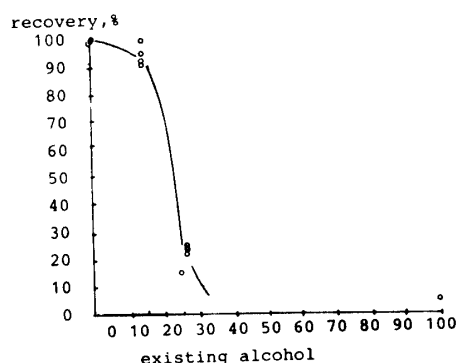


Fig. 1. Recovery of diacetyl in the presence of alcohol in the quantitative analysis by the method of PRILL and HAMMER.

Table 2. Amounts of diacetyl in the Shôchû

Brands of the Shôchû	diacetyl mg/l
Isanishiki	0.91
Kozuru	0.52
Satsuma Fuji	0.77
Satsuma Hyôroku	1.35
Satsuma Shiranami	0.34
Tanabata	0.33

2. 製品焼酎および酒母・醪中のジアセチル

製品焼酎におけるジアセチルレベルは表2のとうりであった。この値はビール等での弁別閾値 0.1mg/l をかなり越えているので、甘藷焼酎の芳香にはジアセチルが何らかに関与しているものと思われる。一方、酒母および醪中のジアセチル量も表3に示したように 0.1

Table 3. Analysis of the Shubo- and Moromi-samples, which were collected from all the fermenting tanks in Hi'oki-distillery, on Dec. 22nd in 1978

samples date tank-No.	acidity ml	diacetyl mg/l	citric acid g/l	L-lactic acid g/l	V.P.- reaction	viable counts			
						lactic acid- bacteria/ml	yeasts ×10 ⁷ /ml	sporeforming bacteria/ml	
1-1	9.64	0.16	4.27	n.d.	+	125	3	90	
1-2	14.26	0.12	7.08	n.d.	+	25	6	35	
1-3	22.00	0.25	7.50	n.d.	+	100	475	—	
1-4	22.44	0.15	7.75	0.014	—	20	90	14	
1-5	22.10	0.08	7.65	n.d.	—	65	50	110	
2-2 {	27	7.54	0.57	2.14	n.d.	—	20	350	10
	28	8.06	0.30	2.21	0.015	—	55	59	15
	29	8.17	0.11	2.18	n.d.	—	50	230	35
2-3 {	30	7.60	0.21	1.99	n.d.	—	45	240	50
	23	7.76	0.23	2.46	n.d.	—	45	130	5
	24	7.98	0.24	2.44	0.062	—	25	700	10
2-4 {	25	8.40	0.23	1.17	0.014	—	10	75	10
	26	9.42	0.21	3.68	n.d.	—	10	123	40
	21	7.60	0.09	2.32	n.d.	—	15	405	35
2-5 {	22	8.30	0.21	1.97	n.d.	—	30	355	35
	66	8.68	0.32	2.21	n.d.	—	35	355	50
	67	8.62	0.41	2.28	n.d.	—	25	375	15
2-6 {	62	8.34	0.28	2.30	n.d.	—	7	265	12
	63	8.78	0.22	2.23	n.d.	—	15	300	45
	64	7.42	0.30	2.33	n.d.	—	295	35	65
2-7 {	65	8.40	0.49	2.40	n.d.	—	45	280	50
	57	8.48	0.24	2.06	n.d.	—	40	195	30
	58	8.66	0.13	2.04	n.d.	—	35	245	20
2-8 {	59	8.36	0.15	2.28	n.d.	—	15	385	55
	61	8.58	0.26	2.42	n.d.	—	30	200	15

* Date, 1-3 (1-ji-3-kka-Moromi, Shubo) means the third day of the first mashing (Shubo), and date, 2-6 (2-ji-6-ka-Moromi) means the sixth day of the second mashing (Moromi), the day before distillation of Moromi, and the eleventh day in the total period of the Shôchû-brewing.

** n.d.: not detected.

mg/l を越えるものが多い。ただ使用した酒母・醪試料が良好な微生物管理下にあるため乳酸菌の生菌数が低く、試料中の L-乳酸もほとんど検出されないので、酒母・醪中のジアセチルは乳酸菌以外、多分酵母に由来するものと思われる。なお、ジアセチルの還元生成物のアセチルメチルカービノルを検出する反応である VOGES-PROSKAUER 反応とジアセチルレベルとの相関性は必ずしも認められなかった。

3. 焼酎微生物のジアセチル産生

以上の実験からは、焼酎微生物とジアセチルレベルとの関連性は不明確なので、焼酎酒母および醪中より分離した乳酸菌と焼酎醸造に用いられる酵母のジアセチル産生能について検討した。なお、乳酸菌については、予備実験として、ジアセチルの還元生成物であるアセチルメチルカービノルの検出を乳酸菌の培養について行った。特に、常法のポリペプトン・ぶどう糖培地では乳酸菌はいずれもほとんど生育がなかったのでトマトジュースを30%添加した培地(表1)での培養

について VOGES-PROSKAUER 反応を行った。結果は表4のとうり、*Lactobacillus sake*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. xylosus*, *L. salivarius* のホモ発酵型乳酸菌はほぼ全ての被検菌株がアセチルメチルカービノル産生、一方、ヘテロ発酵型乳酸菌の *L. brevis*, *L. fermentum* は全て産生しない点は注目出来る。特に、白糠仕込の高酸度醪での乳酸菌は *L. sake* か *L. brevis* に対し、甘藷仕込では *L. acidophilus* と *L. brevis* が普通に検出される乳酸菌であるので、いずれの場合でもどちらの乳酸菌が優勢であるかによって酒質への影響も異なったものになる。そこで、使用菌株中、VOGES-PROSKAUER 反応の著しい菌株 *L. sake* C-2-1, *L. sake* F-a-1, *L. plantarum* I-3a-1 および反応が陰性であった *L. brevis* B-3a-1 と焼酎酵母 SH-4 および酒造組合酵母を全麴培地に接種して 24°C で培養し、12日後ジアセチルを分析してその生産能を確かめた。酵母の発酵経過は図2のとうり、ジアセチルの分析結果は表5に示してある。これによると、*L. sake* C-

Table 4. The VOGES-PROSKAUER-reaction of Shôchû-lactic acid-bacteria

	sweet potato-Shôchû stains	rice-Shôchû strains
methyl red + VOGES-PROSKAUER- reaction +	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3, 3-4, 13-1, 18-2, 26-1, 42-2, 42-4, 46, 46-3, 48-2, 54-1, 54-2, 59, 79-1, 80-1, 80-3	
	<i>L. plantarum</i> 37-1,	<i>L. plantarum</i> I-3a-3, I-3a-1,
	<i>L. sake</i> 5, 53-1,	<i>L. sake</i> A-2-1, A-2-2, A-2-5, A-2-6, B-8c-1, C-2-2, C-2-3, C-2-4, C-2-6, C-2-8, C-2a-1, C-2a-3, C-2c-1, C-3a-3, C- 2a-2, C-2e-1, F-a-2, F-a-3, F-a-4, F-b-1, F-b-4, G-3b-1, G-3b-2, G-3b- -3, H-3a-2, C-2-1, C-2-5, D-a-2, F- a-1, F-b-2, H-3a-1, H-3a-2, I-3a-2,
	<i>L. xylosus</i> 11, 11-1, 45-2, 45-3,	
methyl red + VOGES-PROSKAUER- reaction -	<i>L. brevis</i> 14-1, 21-1, 21-3, 33-1, 33-2, 39-1, 39-2, 70-1, 70-2, 14-2, 17-2, 17-4, 19-1, 19-2	<i>L. brevis</i> A-2-3, A-2-4, A-2-7, B-2-1, B-2-2, B-2-3, B-2-4, B-2-5, B-2-6, B-2-5, B-2-6, B-2a-1, B-2a-2, B-3a-1, B-4a- -1, B-2-4, D-a-1, E-a-1, E-a-2, G- 3e-1, G-3e-2, I-3e-1, B-2-7, C-2-7, C-3a-1, G-3a-1, G-3a-2
	<i>L. fermentum</i> 22	

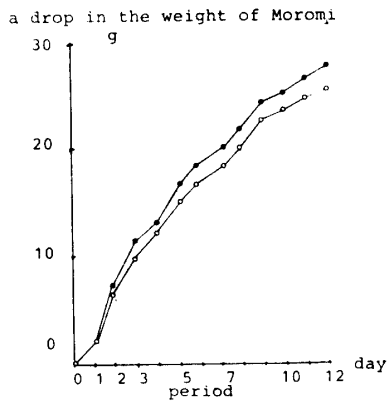


Fig. 2. A drop in the weight of Moromi in an ERIENMEYER-flask with a MEISSEL-fermentation-plug over a 12-day fermentation, corresponding to the weight of released carbon-dioxide.

* Black circles: Kumiai-yeast.
Blank circles: Shôchû-yeast SH-4.

Table 5. Diacetyl-production in the laboratory-Koji-mashing

sample	day	acidity ml	diacetyl mg/l	alcohol %
no inoculation	0	3.68	0.13	
	6	7.48	0.18	
	12	70.0	0.13	
Shôchû-yeast SH-4	6	9.03	0.32	15.6
	12	9.21	0.17	17.0
Shôchû-yeast Kumiai-kôbo	6	8.50	0.35	11.9
	12	10.16	0.23	13.6
<i>L. sake</i> C-2-1	6	26.23	0.44	
	12	32.89	0.25	
<i>L. brevis</i> B-3a-1	6	21.30	0.11	
	12	30.24	0.15	
<i>L. sake</i> F-a-1	6	28.53	0.22	
	12	37.10	0.29	
<i>L. plantarum</i> I-3a-1	6	26.20	0.59	
	12	32.99	0.64	

2-1 と *L. plantarum* I-3a-1 のジアセチル産生はかなり大きく、特に醪中での菌数によっては影響があるものと思われる。しかし、焼酎酵母 SH-4 および酒造組合酵母はいずれも弁別閾値をわずかにこえる量のジアセチルを産生するので、菌数の点からもこの方がかえって問題かも知れない。なお、VOGES-PROSKAUER 反応が陰性であった *L. brevis* B-3a-1 はブランクを差し引くとジアセチルの産生は全くないと判断出来た。

以上から、製品焼酎中のジアセチルは多くは焼酎酵

母と、生菌数は少いが総菌数が多いホモ発酵型乳酸菌によって産生されたものと思われ、物料中の微生物相組成による酒質差の検討によってはじめてジアセチルの製品に及ぼす影響を明らかにすることが出来よう。

要 約

旧式焼酎醸造は酒母・醪の温度管理、白麴菌の使用による多量のクエン酸の生成と低 pH、乳酸菌の汚染および醪の蒸溜など、ジアセチル生成の条件がそろっている。このため、製品焼酎、酒母・醪のジアセチルレベルを明らかにし、醸造の微生物管理に寄与することを目的として研究を行った。

アルコール存在下でのジアセチル定量は、アルコールが15%以下ならば、炭酸ガス気流下の水蒸気蒸溜によるジアセチルの回収率は90%以上であった。このようにして定量した製品焼酎および酒母・醪中のジアセチルはそれぞれ 0.3~1.3, 0.2~0.3mg/l であった。酒母・醪中の微生物は酵母と乳酸菌にしばられるが、乳酸菌は *Lactobacillus sake*, *L. acidophilus* などホモ発酵型のものがかなりのジアセチル生成量を示している。しかし、生成量は少いが、生菌数が圧倒的に多い酵母に注意が必要である。ただ、製品焼酎のジアセチルレベルでは、甘藷焼酎の場合、問題にならないものと思われる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、適切な御助言をいただいた元東京大学農学部教授（現在、東京家政大学教授）津郷友吉先生、又、供試材料を御提供下さった小正醸造有限公司、なかでも、試料採取の労を直接とって下さった同社工場次長佐藤哲郎氏など関係各位に深く感謝の意を表す。

文 献

- 井上喬: ビールのダイアセチル臭と酵母のアミノ酸代謝, *Amino Acid-Nucleic Acid*, 36 49-59 (1977)
- Inoue, T., and Y. Yamamoto: Changes in vicinal diketone and α -acetoxy acid contents during fermentation of lager beer, *Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd.*, 13 89-97 (1970)
- Inoue, T., Y. Yamamoto, E. Kokubo and Y. Kuroiwa: Formation of acetoxy acids during wort fermentation by brewer's yeast, *Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd.*, 16, 11-18 (1973)
- Prill, E.A. and Hammer B.W.: A colorimetric method for the microdetermination of diacetyl, *Iowa State Coll. J. Sci.*, 12 385-395 (1938)
- 佐々木林治郎, 津郷友吉, 今村経明, 村井宗昭: 乳酸菌による Diacetyl 生産について, *日畜会報*, 24, 176-179 (1953)
- 玉岡寿, 田邊幾之助, 小林武一, 大林晃, 松村悦男: 旧

- 式焼酎醸造の微生物学的研究（第一報）米麴・甘藷仕込過程
中の微生物相の変遷, 醸協, 66, 810-815 (1971)
- 7) 玉岡寿, 田邊幾之助, 小林武一, 大林晃, 松村悦男: 旧
式焼酎醸造の微生物学的研究（第二報）米麴・生白糠仕込
過程中の微生物相の変遷, 醸協, 66, 816-818 (1971)
- 8) 玉岡寿, 田邊幾之助, 小林武一, 大林晃, 松村悦男: 旧
式焼酎醸造の微生物学的研究（第三報）生白糠麴・生白糠
仕込過程中の微生物相の変遷, 醸協, 66, 893-896 (1971)
- 9) 田邊幾之助, 有川順子, 丸山智之, 佐藤平二: 高酸度焼
酎醪における乳酸菌の蛍光抗体法による検出について, 日
農化大会講演要旨集, p. 158 (1980)
- 10) 田邊幾之助, 音地龍夫, 二石真智子, 迫間敬子: 旧式焼
酎醸造過程の乳酸菌について, 日農化関西西日本合同大会,
要旨集, p. 25 (1978)
- 11) 津郷友吉, 慶田雅洋: 乳業用乳酸菌の香気生産について,
化学と生物, 3, 292-300 (1965)

Summary

The Shôdhû-brewing is in possession of a lot of conditions, favorable for diacetyl-formation: temperatures of Shubo and Moromi, a good deal of citric acid and low pH produced by the Shiro-koji-mold, contamination of Moromi by lactic acid-bacteria, and distillation of Moromi. Therefore, the clarified results concerning the amounts of diacetyl in Shôchû, Shubo, and Moromi may serve for the exact microbiological-control of Shôchû-brewing.

Diacetyl-determination in the presence of alcohol was investigated with the ascertainment of the fact that diacetyl-recovery of more than was to be brought forth by means of a steam-distillation under carbon-dioxide-stream, if alcohol-concentration in the sample was kept less than 15%. The concentrations of diacetyl in Shôchû, and Shubo and Moromi were 0.3 to 1.3 mg/l and 0.2 to 0.3 mg/l, respectively. The microflora of Shubo and Moromi consists mainly of Shôchû-yeasts and lactic acid-bacteria. It was confirmed that homo-fermenting lactic acid-bacteria, such as *Lactobacillus sake* and *L. acidophilus*, produce a considerable amount of diacetyl; but attention should be given to the diacetyl-production by the yeast, which is, originally, not a producer of a large amount of diacetyl, due to the fact that their viable-count in Shubo and Moromi is quite large. However, it was guessed that existing amounts of diacetyl in the sweet potato-Shôchû might be put out of consideration.