

焼酎もろみから分離した乳酸菌の特性

高山 清子*¹・水谷 政美*¹・山本 英樹*¹・越智 洋*¹・工藤 哲三*¹

Characteristic of Lactic Acid Bacteria Isolated from *Shochu Mash*

Kiyoko TAKAYAMA, Masami MIZUTANI, Hideki YAMAMOTO, Hiroshi OCHI and Tetsuzo KUDO

これまで宮崎県内の焼酎製造場の焼酎もろみについて生酸菌の分布を調査した。そして 63 株の乳酸菌を分離、分類した。その結果、約半数が *Lactobacillus pacasei* (以下 *L. paracasei* と表記) と分類された¹⁻³⁾。

今回、焼酎もろみから分離した乳酸菌の特性を調べるためクエン酸資化性試験、ジアセチル生産性試験をおこなった。また、平成 19 年宮崎県本格焼酎鑑評会の出品酒を分析した結果、芋焼酎中のジアセチルおよび酢酸濃度は、その他穀類焼酎に比べ高い傾向にあり、もろみ中の乳酸菌が関与していると推察された。

キーワード：焼酎もろみ，乳酸菌，クエン酸，酢酸，ジアセチル

1 はじめに

焼酎の一次もろみは白麹菌，黒麹菌が生産するクエン酸により pH が低く保たれているため，乳酸菌は生育し難い。しかしながら二次もろみにおいては，主原料と水の投入によりクエン酸の濃度が低下するため，乳酸菌が比較的生育し易い環境になり，しばしば酸度が非常に高くなるような異常発酵現象が見られる。この原因は乳酸菌の汚染によるものと考えられ，これまで研究がなされてきた⁴⁻⁹⁾。高宮は南九州の焼酎工場の生酸菌の分布状況を調査し，417 点の試料から高頻度で生酸菌を検出したと報告している⁸⁾。

ジアセチルはつわり香の原因物質であり，弁別閾値は低く¹⁰⁾，沸点が 88 °C であることから蒸留過程で焼酎に移行し，焼酎の香りに影響を与えている。岩田らは鑑評会の出品酒および焼酎もろみ中のジアセチル量から，焼酎中のジアセチルは生酸菌等の汚染菌に起因すると推察しており¹¹⁾，田辺らも焼酎もろみから分離した乳酸菌によるジアセチル生成を確認している⁴⁻⁶⁾。そこで，焼酎もろみ中の乳酸菌の特性を明らかにするため，焼酎

もろみから分離した乳酸菌のジアセチル生産性およびクエン酸資化性について検討した。さらに，本格焼酎に含まれるジアセチルおよび酢酸の分析をおこない，乳酸菌が焼酎の品質に及ぼす影響を調査したので報告する。

2 実験方法

2-1 ジアセチル生産性試験およびクエン酸資化性に使用した培地

ジアセチル生産性試験及びクエン酸資化性には，以下に示す 3 種の培地を用いた。

(1) GYP 培地¹²⁾

グルコース 1 %，酵母エキス 0.5%，ペプトン 0.5%，酢酸ナトリウム 0.2 %，salts solution 0.5 %，Tween 80 solution 1 %

(2) CYP 培地 (炭素源としてクエン酸を含む)

クエン酸 0.2%，クエン酸三ナトリウム 0.8 %，酵母エキス以下 GYP 培地と同様

(3) CGYP 培地 (炭素源としてグルコースとクエン酸を含む)

グルコース 0.5 %，クエン酸 0.1 %，クエン酸三ナトリウム 0.4 %，酵母エキス以下 GYP 培地と同様

* 1 応用微生物部

2-2 焼酎もろみから分離した乳酸菌のクエン酸資化性

これまでに乳酸菌が増殖したと考えられる異常発酵もろみの有機酸分析を数件おこなった。図1に正常なもろみの有機酸クロマトグラム、図2に異常発酵したもろみのクロマトグラムを示す。異常発酵したもろみのクエン酸の濃度は正常もろみの約 1/10 程低く (1700mg/l), 乳酸及び酢酸の濃度は高い (乳酸 8200mg/l, 酢酸 5000mg/l) という特徴を確認した。このようなもろみでは、製麴でのクエン酸生成が少なかったことやクエン酸代謝経路をもつ乳酸菌が増殖し、クエン酸が代謝され酢酸が生成したことが考えられる。そこで、宮崎県内の焼酎製造場から分離、同定した乳酸菌についてクエン酸資化性試験をおこなった。

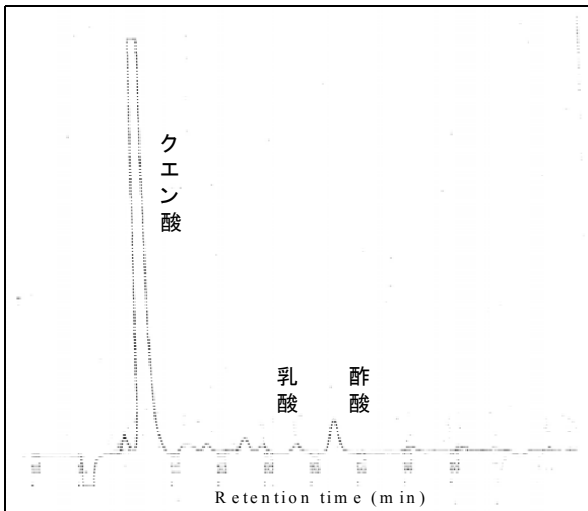


図1 正常もろみの有機酸クロマトグラム

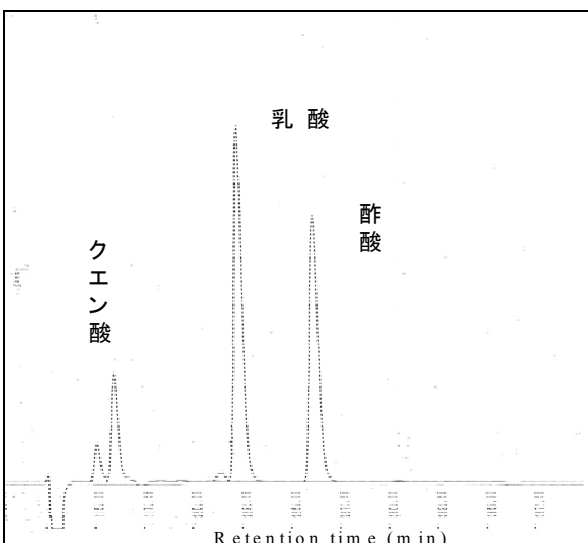


図2 異常発酵もろみの有機酸クロマトグラム

クエン酸資化性試験は、焼酎もろみから分離した乳酸菌9株 *L. paracasei*, *L. plantarum/pentosus*, *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. buchneri*, *L. parabuchneri*, *L. fermentum*, *Pediococcus acidilactici* (以後 *P. acidilactici* と表記), *P. pentosaceus* および、2-1に示す培地を使用した。滅菌した CYP 培地に十分に生育した前培養液を接種後、30℃で3日間静置培養した。そして培養液の 660nm における吸光度を測定し、各乳酸菌の増殖度を求めた。

次に、CYP 培地で増殖が確認された菌株について GYP, CYP, CGYP 培地で 30℃, 3日間培養後の有機酸を測定した。すなわち、培養液を 20倍希釈し 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過後、高速液体クロマトグラフ LC-10A (島津製作所製、有機酸分析システム) により測定した。

最後に、CYP 培地で最も増殖した *L. paracasei* について経時的に増殖度を測定し、増殖曲線を作成した。培養、測定条件は以下のとおりとした。

装置: BIO-PHOTO RECORDER TN-2612 (ADVANTEC 製)

培養条件: GYP および CYP 培地に、十分生育した前培養液を 10倍希釈し、その1滴をL字型試験管の培養液に接種した。直ちにL字型試験管を装置に取り付け、30℃で静置培養した。途中、2時間間隔で培養液の吸光度 (660nm) を測定し増殖曲線を作成した。

2-3 焼酎もろみから分離した乳酸菌のジアセチルおよび2, 3-ブタンジオール生産性

培養後のジアセチルおよび 2,3-ブタンジオールは、しょうゆ試験法¹³⁾を参考にガスクロマトグラフにて測定した。すなわち滅菌した培地に十分に生育した前培養液を接種後、30℃で3日間静置培養した。培養液 6ml に酢酸メチル 3ml および塩化ナトリウム 1g を加えて抽出し、遠心分離後の酢酸メチル相を試料とした。また、分析条件は以下のとおりとした。

装置: HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II ガスクロマトグラフ

①分析カラム: DB-WAX (0.53mm \times 60m, アジレント製)

②検出器: FID

③注入口温度: 150℃

④検出器温度:250℃

⑤カラム温度:Initial Temp45℃, Initial time7.0min. 5℃/min 220℃ 5min.

2-4 本格焼酎中のジアセチルおよび酢酸の分析

平成 19 年宮崎県本格焼酎鑑評会に出品された芋焼酎（19 点）および麦，米，蕎麦の穀類焼酎（21 点）について，ジアセチル及び酢酸の分析をおこなった。本格焼酎中のジアセチルは Hayasaka らの方法¹⁵⁾，Kobayashi らの方法¹⁶⁾，BCOJ ビール分析法¹⁷⁾を参考に，ヘッドスペース中の揮発成分を SPME ファイバーに吸着させる固相抽出法にて分析をおこなった。すなわち 4ml バイアル（SUPERUCO 製）に試料 500 μ l 塩化ナトリウム 0.3g を入れかくはん後，40℃の恒温槽に 40 分間バイアルを浸した。SPME ファーバーをヘッドスペース中に 3 分間露出させて揮発性成分をファイバーに吸着させた後，ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP5050A（島津製作所製）に導入した。分析条件は以下のとおりとした。

(1) SPME ファイバー

65 m Carbowax-divinylbenzene（SUPERUCO 製）

(2) GCMS

装置：GCMS-QP5050A（島津製作所製）

①分析カラム：ZB-WAX（0.25mm × 60m，島津製作所製）

②気化室温度：200℃

③インタフェース温度：200℃

④カラム温度：Initial Temp 40℃ Initial time 10.0min. 3℃/min 200℃ 0min.

⑤キャリアガス：ヘリウム（90kPa）

⑥イオン化電圧：70eV

⑦測定モード：SIM(m/z = 86)

ジアセチル（Wako 製，純度 98.0%）は再留して標準液を調製し，検量線を作成した。

酢酸は，高速液体クロマトグラフ LC-10A（島津製作所製，有機酸分析システム）により測定した。

3 結果および考察

3-1 焼酎もろみから分離した乳酸菌のクエン酸資化性

クエン酸を唯一の炭素源とした CYP 培地において 30℃で 3 日間静置培養後の濁度を測定し，乳酸菌の増殖を確認した（図 3）。その結果，焼酎醪から最も多く分離された *L. paracasei* は CYP 培地でよく増殖した。その他 *L. brevis*，*L. plantarum/pentosus*，*P. acidilactici* においても増殖が確認されたが，*L. buchneri*，*L. parabuchneri*，*L. fermentum*，*L. hilgardii*，*P. pentosaceus* では確認されなかった。

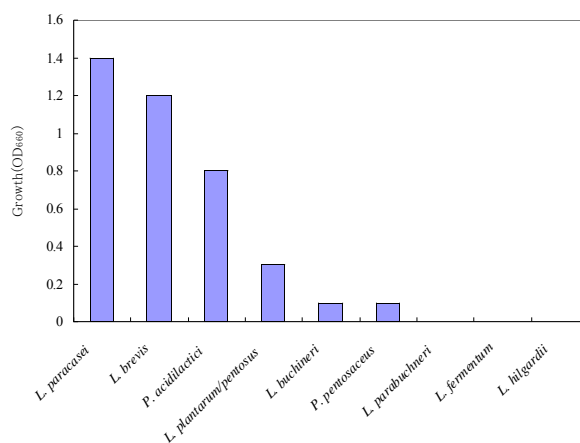


図 3 焼酎もろみから分離した乳酸菌の CYP 培地における増殖（30℃，72 時間静置培養後の濁度）

次に CYP 培地で増殖が確認された菌株について GYP，CYP，CGYP 培地で培養前のグルコース，クエン酸濃度および 30℃，72 時間静置培養後のクエン酸，乳酸，酢酸濃度を表 1～3 に示す。

表 1 GYP 培地における有機酸濃度

	Before fermentation GYP medium	After fermentation			
		<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum/pentosus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>P. acidilactici</i>
Glucose	10000				
Citric acid		nd	nd	nd	nd
Lactic acid		8800	5400	3800	5100
Acetic acid	1000	1100	1200	1200	1200

表 2 CYP 培地における有機酸濃度

	Before fermentation CYP medium	After fermentation			
		<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum/pentosus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>P. acidilactici</i>
Glucose					
Citric acid	7600	nd	5800	300	30
Lactic acid		800	20	1500	1300
Acetic acid	1000	4400	2300	4800	4600

表 3 CGYP 培地における有機酸濃度

	Before fermentation CGYP medium	After fermentation			
		<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum/pentosus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>P. acidilactici</i>
Glucose	5000				
Citric acid	3800	3500	nd	nd	60
Lactic acid		4300	4200	3400	3900
Acetic acid	1000	1200	2500	3000	2400

グルコースを炭素源とした GYP 培地においては主に乳酸を生成した。一方、炭素源をクエン酸に置き換えた CYP 培地の場合、生成した乳酸は少なく、クエン酸が資化され主に酢酸を生成した。また、その他の菌株についても発酵前後の有機酸を比較したところ、クエン酸資化性菌において同様の結果が得られた。

最後に、GYP および CYP 培地における *L. paracasei* の増殖を濁度 (OD₆₆₀) で求めた増殖曲線を図 4 に示す。CYP 培地において高い増殖を示した *L. paracasei* は、約 40 時間後から徐々に菌の増殖が確認された。以上の結果より、これらの乳酸菌ではクエン酸を炭素源として増殖可能であることが確認された。

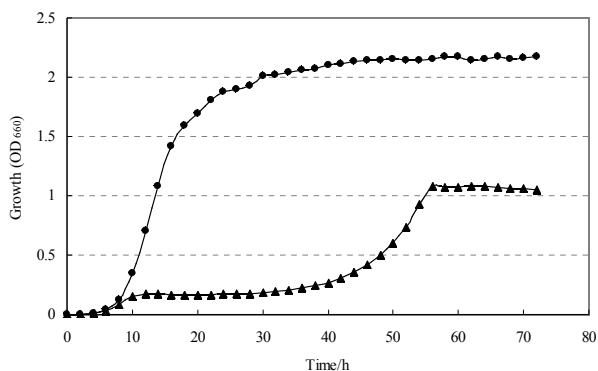


図 4 GYP および CYP 培地における *L. paracasei* の増殖曲線
● ; GYP medium, ▲ ; CYP medium

3-2 焼耐もろみから分離した乳酸菌のジアセチルおよび2,3-ブタンジオール生産性

ジアセチル (2,3-butanedione) は沸点 88 °C, パター様と表現される物質である。ジアセチル臭は乳酸菌が発酵に関与した際に発生する特徴的な香りであり、乳酸発酵を主体として製造される発酵乳製品などでは良い香りとされるが、酒類では悪い香りとされる場合が多く、様々な研究がなされている。酒類においては、「つわり香」, 「ジアセチル臭」などと表現され弁別閾値が低いという特徴がある。ジアセチルの分析法としては、比色分析法とガスクロマト法がよく使われているが、ガスクロマト法は感度が高いため、現在ビールの公

定法にもなっており¹⁷⁾ 広く使われている¹⁸⁾。

本研究ではガスクロマトグラフを使用し、ジアセチル及びその後還元されて生成する 2, 3-ブタンジオールの分析をおこなった。ジアセチル生産が最も多かった *L. paracasei* を CGYP 培地で培養後分析したクロマトグラムを図 5 に、焼耐もろみから分離した乳酸菌のジアセチルおよび 2,3-ブタンジオール生産量を表 4 ~ 6 に示す。

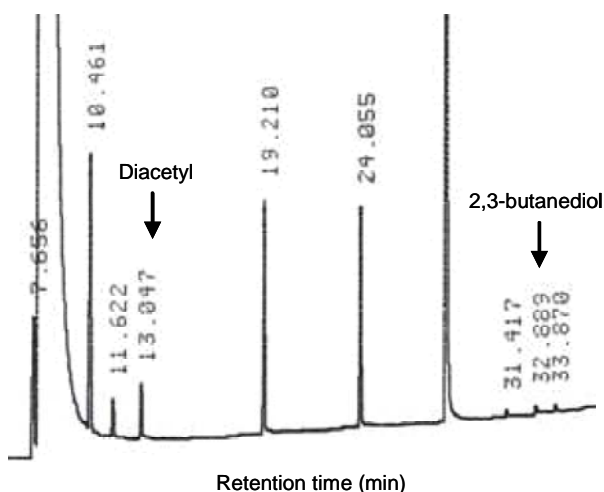


図 5 ジアセチルおよび 2, 3-ブタンジオールのガスクロマトグラム (Cultivation by *L. paracasei* was carried out at 30 °C for 72 hours.)

表 4 GYP 培地におけるジアセチルおよび 2,3-ブタンジオール濃度

	After fermentation			
	GYP medium	<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum/pentosus</i>	<i>P. pentosaceus P. acidilactici</i>
Diacetyl	—	2	nd	nd
2,3-butanediol	—	44	41	52

表 5 CYP 培地におけるジアセチルおよび 2,3-ブタンジオール濃度

	After fermentation			
	CYP medium	<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum/pentosus</i>	<i>P. pentosaceus P. acidilactici</i>
Diacetyl	—	1	nd	nd
2,3-butanediol	—	19	47	38

表 6 CGYP 培地におけるジアセチルおよび 2,3-ブタンジオール濃度

	After fermentation			
	CGYP medium	<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum/pentosus</i>	<i>P. pentosaceus P. acidilactici</i>
Diacetyl	—	10	4	weak
2,3-butanediol	—	41	40	34

ジアセチルの生成量は、菌株、培地の種類によって異なっていた。焼酎もろみから最も多く分離された *L. paracasei* はジアセチル生産性が高く、その他 *L. plantarum/pentosus*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* においてもジアセチルの生成が確認された。また、グルコースのみを炭素源とした GYP 培地に比べ、グルコースにクエン酸を添加した CGYP 培地においてより多くジアセチルが生成した。

今回焼酎もろみから最も多く検出された *L. paracasei* は、クエン酸資化性、ジアセチル生産性ともに高かった。また、これらの乳酸菌ではグルコースのみを炭素源とした培地に比べ、クエン酸を添加した培地においてジアセチルを多く生産した。これは、クエン酸を代謝する過程においてクエン酸がオキサロ酢酸、ピルビン酸、活性アルデヒドとなり、活性アルデヒドとピルビン酸が縮合して α -アセト乳酸が生成され、酸化、脱炭酸を経てジアセチルが生成したと考えられる¹⁴⁾。更にこれらの乳酸菌では、クエン酸のみを炭素源とした CYP 培地における発酵試験後、クエン酸濃度が低下し、酢酸濃度が上昇した。クエン酸代謝経路を有する乳酸菌ではクエン酸を資化し、その代謝過程で酢酸を生成する¹⁴⁾。実際に、グルコースがほとんど無い蒸留前のもろみにおいても乳酸菌が検出され、その大部分がクエン酸を資化した。したがってこれらのクエン酸資化性乳酸菌が増殖した場合、揮発性酸が上昇すると考えられる。

焼酎の一次もろみにおいてはもろみが高酸度、高アルコール濃度に保たれているため乳酸菌は生育し難いが、二次もろみにおいてはもろみが希釈され酸度が低下するため、乳酸菌が比較的生育できると考えられる。糖がほとんど残っていない発酵後期においては主にクエン酸資化性乳酸菌が生育し、焼酎中のジアセチル、酢酸に影響を及ぼしていると推察された。

3-3 本格焼酎中のジアセチルおよび酢酸

本格焼酎中のジアセチルをガスクロマトグラフ質量分析計で分析し、得られたクロマトグラムを

図6に示す。ジアセチルは11.9分に検出された。

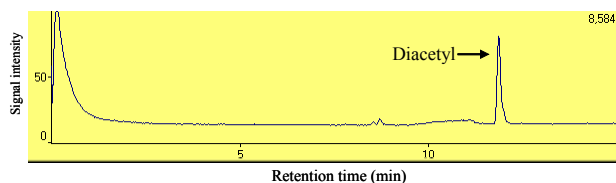


図6 本格焼酎のジアセチル分析

Selected ion monitoring spectra. ($m/z = 86$)

Vaporic compounds were analyzed by GC-MS with headspace method. The SPME fiber coated with a $65 \mu\text{m}$ Carbowax – divinylbenzene was exposed to the headspace for 3min at 40°C .

次に芋焼酎およびその他穀類焼酎中のジアセチルおよび酢酸濃度を図7に示す。

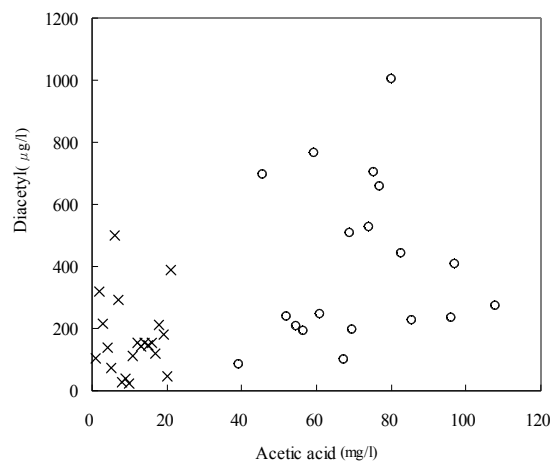


図7 本格焼酎中のジアセチルおよび酢酸

○ ; Sweet potato × ; Grain (barley, rice, buckweat)

芋焼酎のジアセチル濃度は $85\mu\text{g/l}$ から $1000\mu\text{g/l}$ 、酢酸濃度は 40mg/l から 110mg/l とばらつきがあった。一方、麦、米、蕎麦の穀類焼酎のジアセチル濃度は $25\mu\text{g/l}$ から $500\mu\text{g/l}$ 、酢酸濃度は 40mg/l 以下であった。図7より芋焼酎中のジアセチルおよび酢酸濃度は、その他穀類焼酎に比べ高い傾向にあった。

次に、岩田らの報告¹¹⁾にあるように、本格焼酎中のジアセチルが焼酎の品質に影響を及ぼしているのではないかと推察されたため、宮崎県本格焼酎鑑評会出品酒の原料別評点順位とジアセチル濃

度の関係を調査した。芋，麦，米，蕎麦焼酎の評点順位とジアセチル濃度との関係を図8～11に示す。

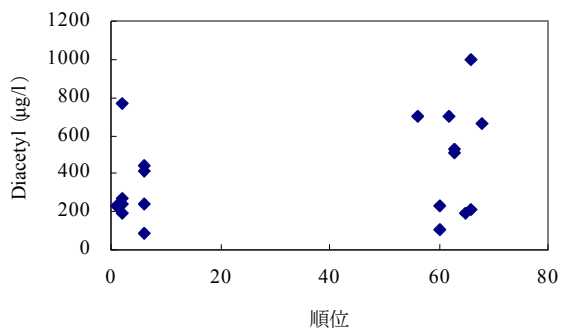


図8 芋焼酎評点順位とジアセチル濃度

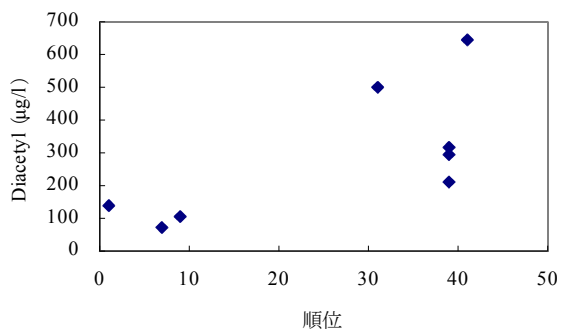


図9 麦焼酎評点順位とジアセチル濃度

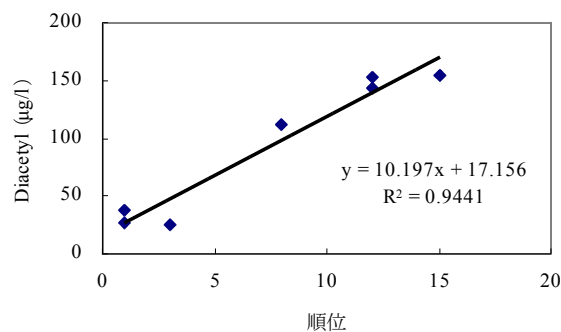


図10 米焼酎評点順位とジアセチル濃度

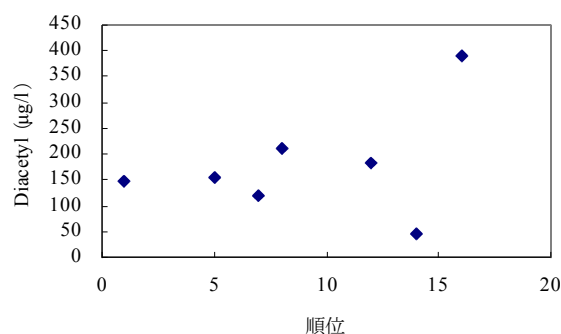


図11 蕎麦焼酎評点順位とジアセチル濃度

本格焼酎中のジアセチルについて岩田らは、熊本国税局における鑑評会の出品酒中のジアセチル分析値と官能評点を比較し、米製においてはジアセチルが官能評点と強い相関があること、大麦製では逆に負の相関があること、甘藷製焼酎においては官能評点と相関があったが有意なほどではなかったことを報告している¹¹⁾。本研究において、平成19年宮崎県本格焼酎鑑評会出品酒中のジアセチル分析値と官能評点を比較したところ、米製焼酎においては相関がみられたがその他の焼酎においては確認されなかった。主に乳酸菌により生成すると考えられるジアセチルについては、今後その影響についてさらに検討する必要がある。

焼酎もろみ中の乳酸菌について遠藤らがPCR-DGGE法により焼酎もろみ中に多様な乳酸菌叢があると報告しているように¹⁹⁾、腐造に至るような増殖は示していないが、焼酎もろみ中に $1 \sim 10^8$ CFU/ml の乳酸菌が存在していることが明

らかになった^{1,2)}。一方、ウイスキーの製造においては従来汚染菌とされていた乳酸菌が見直されており²⁰⁾、鰯川は他の微生物と協調して甘い微量香気成分を生成し酒質の個性を形成していると報告している²¹⁾。焼酎製造においても乳酸菌の存在は酒質を左右する大きな要因になっていると考えられるため、今後さらに研究を進めていきたい。

4 まとめ

焼酎醪中の乳酸菌の特性を明らかにするため、分離菌のジアセチル生産性およびクエン酸資化性について検討し、本格焼酎中のジアセチル及びクエン酸量の分析をおこなったところ、以下の知見が得られた。

- 1) 焼酎もろみから最も多く分離された *L. paracasei* はクエン酸資化性が高く、その他 *L. brevis*, *L. plantarum/pentosus*, *P. acidilactici* においても資化性が確認された。乳酸発酵前後の有機酸濃度から、クエン酸が資化されると主に酢酸が生成した。
- 2) 焼酎もろみから最も多く分離された *L. paracasei* はジアセチル生産性が高く、その他、*L. plantarum/pentosus*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* においてジアセチルが確認された。ジアセチルの生成量は、グルコースのみを炭素源とした培地よりもクエン酸を添加した培地で多かった。
- 3) 芋焼酎中のジアセチルおよび酢酸濃度は、その他穀類焼酎に比べ高い傾向にあり、もろみ中の乳酸菌が関与していると推察された。
- 4) クエン酸が豊富な焼酎もろみではジアセチル生産性、クエン酸資化性乳酸菌が多く存在しており、焼酎中のジアセチルおよび酢酸濃度に影響していることが示唆された。

5 謝辞

本研究を行うにあたり、宮崎県本格焼酎鑑評会出品酒の分析にご協力頂いた宮崎県酒造組合に深謝申し上げます。

6 参考文献

- 1) 竹下淳子, 工藤哲三, 山本英樹, 水谷政美,

- 柏田雅徳:宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **49**, p.127-131 (2004)
- 2) 竹下淳子, 工藤哲三, 山本英樹, 水谷政美, 柏田雅徳:宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **49**, p.119-125 (2004)
 - 3) 高山清子, 工藤哲三, 水谷雅美, 山本英樹, 柏田雅徳:宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **50**, p.117-119 (2005)
 - 4) 田邊幾之助, 音地龍夫, 二石真智子, 迫間敬子, 志々目義紀:鹿大農学術報告, **32**, p.69-77 (1982)
 - 5) 田邊幾之助, 二石真智子, 迫間敬子, 有川順子:鹿大農学術報告, **33**, p.47-52 (1983)
 - 6) 田邊幾之助, 二石大介, 金丸芳:鹿大農学術報告, **34**, p.45-57 (1984)
 - 7) 百瀬洋夫, 内山奈々, 藤倉寛子:醸協, **92**, p.452-457 (1997)
 - 8) 高宮義治:醸協, **77**, p.907-910 (1982)
 - 9) 玉城武, 高宮義治, 高江州朝清, 下地睦子:醸協, **81**, p.130-132 (1986)
 - 10) 宇都宮仁:醸協, **101**, p.730-739 (2006)
 - 11) 岩田博, 中嶋則行, 水野昭博, 高原康生, 黒須猛行, 里見弘司, 石井徹, 伊藤康, 菅間誠之助:醸協, **79**, p.51-55 (1984)
 - 12) 小崎道雄:乳酸菌実験マニュアル, (朝倉書店, 東京), (1992)
 - 13) 財団法人日本醤油研究所編:しょうゆ試験法, (醤油通信社, 東京), (1985)
 - 14) 乳酸菌研究集談会編:乳酸菌の科学と技術, (学会出版センター, 東京), (2003)
 - 15) Yoji Hayasaka, Eveline J. Bartowsky:J.Agric.Food Chem. **47**, p.612-617 (1999)
 - 16) Ken Kobayashi, Kazutaka Kusaka, Toshirou Takahashi, and Kazuo Sato:J. Biosci.Bioeng., **99**, p.502-507 (2005)
 - 17) ビール酒造組国際技術委員会:醸協, **100**, p.865-868 (2005)
 - 18) 井上喬:ジアセチル, (幸書房, 東京), (2001)
 - 19) Akihito Endo, Sanae Okada : J.BIOSCI.BIOENG, **99**, p.216-221 (2005)
 - 20) Edited by J.H.Bryce and G.G.Stewart:DISTILLED SPIRITS:Tradition and innovation,

(NOTTINGHAM University Press), (2004)

21) 鱒川彰:醸協, **98**, p.241-250 (2003)