

# 酒類中のジアセチル生成について

酒類総合研究所 プロセス工学研究室 小林 健

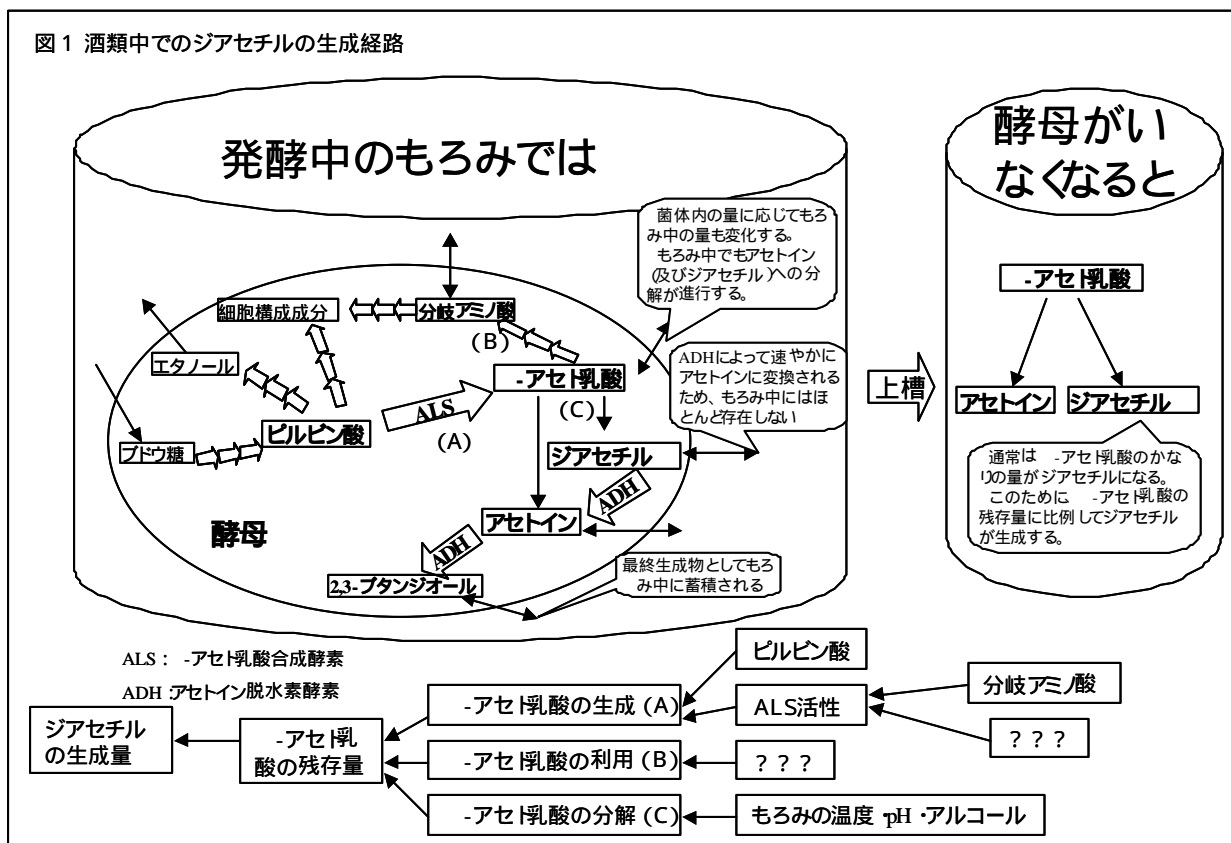
## 1. はじめに

従来清酒もろみの発酵制御はエタノールの生成に注目して行われてきたが、香味成分等の制御には別の面からの管理が重要である。ジアセチルは清酒中の代表的なオフフレーバー物質でつわり香（火落ち香）の本体として知られており、吟醸酒や、低アルコール清酒製造などのもろみの発酵が未熟な場合に多く生成することが知られている。ビールにおける研究からの類推により、清酒中での生成経路は分岐アミノ酸合成系によりピルビン酸から  $\gamma$ -アセト乳酸を経て生成するとされているが、分析方法が確立されていないこともあって速度論的な解析はもとより、生成に影響を及ぼす要因の特定すら行われていない。このため、ジアセチルの制御はもっぱら経験にたよったもろみ管理によってのみ行われている現状である。そこで、この研究においては清酒もろみでの関連物質の分析方法を確立し、生成機構を解明し、最終的にはこれに基づいて、ジアセチルの生成を押しさえるための発酵制御法を開発することを目指している。

## 2. 酒類中でのジアセチルの生成経路

発酵中のもろみではバリン、ロイシン及びイソロイシン（分岐アミノ酸）の生合成経路によって、酵母の菌体内でピルビン酸から  $\gamma$ -アセト乳酸が生成する。生成した  $\gamma$ -アセト乳酸は分岐アミノ酸合成の材料として使われるが、一部は化学的に分解してジアセチルまたはアセトインになる。この反応は酸素濃度に影響されて、酸素濃度が低い場合はジアセチルの生成は少なくなる。生成したジアセチルとアセトインはアセトイン脱水素酵素によって酵母菌体内でジアセチルからアセトインへ、最終的には 2,3-ブタンジオールへと還元される。さらに、ここに登場する  $\gamma$ -アセト乳酸、ジアセチル、アセトイン及び 2,3-ブタンジオールといった化合物は酵母細胞膜を拡散によって通過して細胞内ともろみ液の間で

図1 酒類中でのジアセチルの生成経路



濃度平衡に達していると考えられる。-アセト乳酸の分解はもろみ液中でも進行し、生成したジアセチルとアセトインは酵母菌体内で生成したものと同様に還元される。実際のもろみでは低酸素濃度でジアセチルの生成が低く押さえられていることとアセトイン脱水素酵素の働きが活発なためにこれらの反応の結果としてジアセチルはほとんど存在しないことが予想される。

一方上槽により酵母から分離された清酒では、酸素濃度が高まっているため、残存する-アセト乳酸からかなりの割合で生成するジアセチルはアセトインに還元されることなく蓄積し、上槽時点での-アセト乳酸量に応じたジアセチルの生成が見られる。

### 3. ジアセチルの研究の問題点について

このような生成経路から、ジアセチルの生成量は上槽時の-アセト乳酸の残存量で決定され、この残存量は-アセト乳酸の生成(A)、分岐アミノ酸合成系での利用(B)及び分解(C)のバランスによって決定されることがわかる。このうち生成(A)及び利用(B)に関しては分岐アミノ酸合成経路の調節の観点から多くの議論がなされており、生成反応を行う-アセト乳酸合成酵素の発現と酵素力価の制御因子についてもかなり理解されているが、酒類もろみ中で実際にどのような調節を受けているのかは全く分かっていない。また、分解(C)に関しては井上らによってビール中での反応速度が求められているが、清酒中での速度は知られていない。

このように研究が進んでいない理由としては、ジアセチル及びその生成に関連する-アセト乳酸、アセトインはいずれも中間代謝物でありその生成、消費の実体に分かりにくいことと、-アセト乳酸は比較的不安定な物質でありジアセチル、アセトインとの正確な分別定量が行えなかったことが挙げられる。

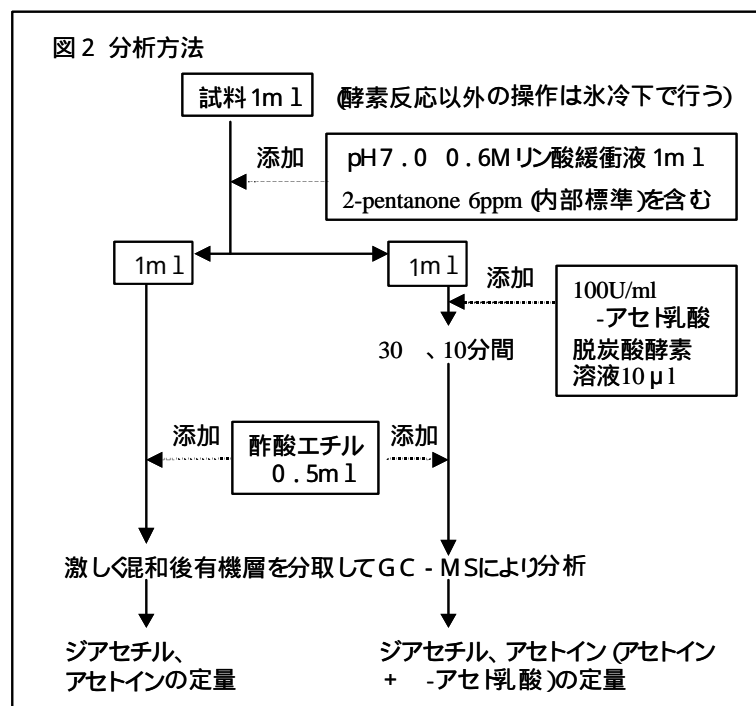
特に分析法に関しては、従来の方法では-アセト乳酸のかなりの量がジアセチルやアセトインとして定量されたり、-アセト乳酸をジアセチル又はアセトインに加熱分解して定量する際に、もろみでは-アセト乳酸以外の物質からジアセチルやアセトインが生成することなどにより信頼できる分析値を得ることが困難であった。

### 4. ジアセチル関連物質の分析方法

我々は、中性では-アセト乳酸が比較的安定であることと解離状態にあり有機溶媒に抽出されないことを利用して図2の方法によりジアセチルとアセトインの分析を行った。この方法では-アセト乳酸の存在下でもジアセチルとアセトインを正確に定量することができた。

-アセト乳酸は、-アセト乳酸脱炭酸酵素で処理することにより試料を非加熱でアセトインに変換して測定した。この方法により加熱に伴う誤差を生じることなく定量が行えた。

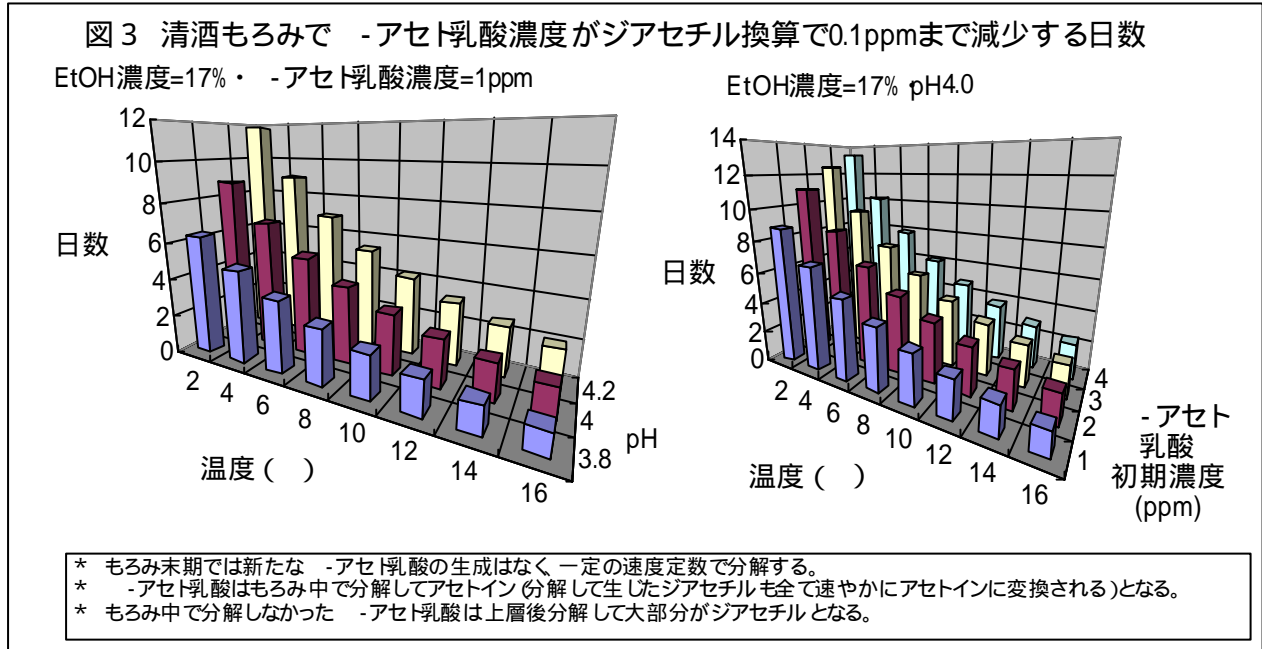
この分析法により確認したところ、予想どおり発酵中の清酒もろみ中にジアセチルは検出されなかった。



### 5. -アセト乳酸の分解反応

-アセト乳酸の分解は単純な化学反応であり、温度・pH・アルコール濃度だけの速度式で定量化することが可能であった。この速度式を使用すると、もろみ末期の-アセト乳酸濃度を測定することによりジアセチルが生成しない濃度まで減少するのに必要なもろみの温度と日数を求めることが可能になる(図3)。

分解によってジアセチルとアセトインが生成し、その生成比は酸素濃度によって変化する。酸素濃度が低いとジアセチルの生成が減少するが酸素濃度 0.05ppm でもジアセチルは生成し、酸素濃度の低減によりジアセチルの生成を押さえることは困難である。逆に空気が飽和した溶液中でもジアセチルの生成は 100%ではなく一部はアセトインに分解する。このためにこれらの反応を利用して  $\gamma$ -アセト乳酸を定量する従来の分析法は正確ではない。



## 6. 酵母による $\gamma$ -アセト乳酸の生成

$\gamma$ -アセト乳酸の生成量は反応基質であるピルビン酸濃度と  $\gamma$ -アセト乳酸合成酵素活性に応じて変化する。前述のとおり、 $\gamma$ -アセト乳酸は中間代謝物でありその濃度変化から生成・消費の傾向を検討することは困難なことから、酵母菌体内の  $\gamma$ -アセト乳酸合成酵素活性を測定することにより、 $\gamma$ -アセト乳酸の生成に影響を与える要因を検討することとした。一般的に酵母の  $\gamma$ -アセト乳酸合成酵素活性は分岐アミノ酸濃度等により制御されることが言われているが、これまでの実験では清酒中では分岐アミノ酸濃度よりも温度等の発酵経過に強く影響されていることが示唆されている。また、この酵素活性は酵母増殖期に増大し、比較的早い時期から低下することが分かった。

## 7. まとめ

ジアセチルは  $\gamma$ -アセト乳酸の酸化的分解で生じるが、清酒で実際上ジアセチルが生成するのは上槽後酵母と分離された後であり、上槽時点で残存する  $\gamma$ -アセト乳酸がジアセチルの生成の原因となる。

$\gamma$ -アセト乳酸の分解反応では、0.05ppm 程度の低い酸素濃度においてもかなりの量のジアセチルが生成することから、ジアセチルは上槽時の  $\gamma$ -アセト乳酸の残存量にほぼ比例して生成すると考えられる。

もろみ中の  $\gamma$ -アセト乳酸合成酵素活性と  $\gamma$ -アセト乳酸濃度の推移から判断すると、もろみ前半では生成と分岐アミノ酸合成への利用のバランスが、もろみ後半では分解が  $\gamma$ -アセト乳酸の濃度に影響を及ぼしていると考えられる。

今後は発酵経過に内在するより直接的な  $\gamma$ -アセト乳酸合成酵素の制御要因を探りジアセチルの生成機構を解明したい。