

# ウイスキー醸造における乳酸菌の役割

鰐川 彰

さまざまな酒類製造において、乳酸菌の関与は、よい面と悪い面の両面でも取り上げられてきた。よい面の代表的なものには、ワインのマロラクティック発酵や清酒の生酏などが挙げられる。モルトウイスキーにおいても古くから品質に好影響を与える関与が指摘されている。この現象は、「乳酸菌後発酵」として広く認知されてきた。しかしながら、具体的な成分はこれまで明らかにされていなかった。

モルトウイスキーの本場はスコットランドであり、数十の蒸留所が存在している。設備の規模や蒸留機の形状が異なることはもちろんであるが、蒸留所ごとに品質が異なることが知られている。蒸留所を見学すると、品質は気候や仕込みに使われる湧き水、蒸留機の形状によると説明を受けることが多い。蒸留所ごとの品質は何によって決まっているのだろうか。

また、歴史的な影響からスコットランドでは、ビール余剰酵母が使用されることが多かった。アルコール収率が向上するなどの利点は指摘されていたが、香気組成に与える影響はないのだろうか。

本稿では、ウイスキー作りでの乳酸菌と酵母の共生について、上記の3つの問いを交えながら、具体的な成分を明示して解説したい。

## モルトウイスキーの製造方法

まずはじめに製造方法について説明する。モルトウイスキーは粉碎した麦芽に温水を加え、麦芽中の糖化酵素によりデンプンを糖化する。その後、固液分離し冷却される。

これにウイスキー酵母を加え約3日間発酵させる。スコットランドにおいては、かつてはウイスキー酵母に加えビール余剰酵母が併用されることが多かった。この理由は、以前はビール余剰酵母のみでウイスキー製造がなされていたため、ウイスキー酵母が工業的に供給されるまで続いたようである。ウイスキー酵母が工業的に生産された後も習慣としてビール酵母は併用されている。工業的に供給されるウイスキー酵母はほとんどの蒸留所で共通の菌株が使用されている。DCL type 'M'がその代表的なものである。

発酵が終了したもろみは蒸留に供され、銅製の単式蒸

留機で2回蒸留される。これをオーク樽に詰め貯蔵される。貯蔵中に無色透明だったウイスキーは、ポリフェノールなどの溶出により琥珀色へと変化する。溶出される香気成分の代表的なものにオクラクトンと呼ばれるβ-メチル-γ-オクタクトンがある。樽貯蔵により付与される甘い香気のひとつである。

## 乳酸菌後発酵

発酵工程中に乳酸菌が混入し、品質に影響を与えることが古くから知られている。発酵初期の乳酸菌の汚染は、発酵停止を引き起こし、アルコール収率を低下させるとされる。このほかにも発酵停止により糖類が残存し、これらが蒸留中の加熱により不快な香気成分に変換することや、乳酸菌自体がオフフレーバーを生成することが報告されている<sup>1)</sup>。このように発酵初期の乳酸菌の汚染は、経済的な損失だけではなく品質にも悪影響を与える。ウイスキーの発酵は、同じ麦芽を原料として製造されるビールと比較されることが多い。ビールは糖化工程の後、乳酸菌に抗菌性を有するホップを加え煮沸し殺菌工程を経るため、乳酸菌の汚染は問題となることは少ない。ウイスキーにおいては、工業的に製造された圧搾酵母を大量に添加し、アルコール発酵を速やかに開始させる必要がある。乳酸菌は、原料や設備、環境に由来するものと考えられている。

その一方で乳酸菌が品質に良い影響を与えることも知られている。汚染が発酵初期の増殖だったのに対し、発酵後期に乳酸菌が増殖する場合とされる。たとえば、van Beekらは発酵時間を経るにしたがい菌叢が変化することを報告している<sup>2)</sup>。この後期に増殖した菌により乳酸菌後発酵がおこなわれると考えられる。

Simpsonらは増殖する乳酸菌の消長を遺伝子レベルで調査している<sup>3)</sup>。彼らは整備期間で操業を止めていた前後での菌種を調査した。それまで見られていた菌種は整備期間直後には消失したが、数ヵ月後には再度出現したと報告している。このことはいわゆる蔵つきの微生物の存在を示唆し、それが蒸留所の個性の一端を担っていることを意味している。

ウイスキー中の甘い香気成分

**γ-デカラクトンおよびγ-ドデカラクトン** 筆者らは、モルトウイスキー中の甘い香気成分として、匂い嗅ぎ-ガスクロマトグラフィー (GC-O) により、γ-デカラクトンとγ-ドデカラクトンを見いだした<sup>4)</sup>。起点となったのは、樽貯蔵前の無色透明のあるウイスキーが、甘くファッティーな香気を有していたことによる。貯蔵ウイスキーを溶媒抽出した後、GC-Oに供したところ、シスおよびトランス体のβ-メチル-γ-オクタラクトン、γ-ノナラクトン、γ-デカラクトン、γ-ドデカラクトンの5つの甘い香気を検出した。官能スコアとの相関性を調べたところ、γ-デカラクトンおよびγ-ドデカラクトンのみが正の相関性を示した(表1)。樽貯蔵で増加することが知られているβ-メチル-γ-オクタラクトンは、樽貯蔵したウイスキーのみに見られたのに対し、貯蔵前のウイスキー中でもγ-デカラクトンおよびγ-ドデカラクトンは存在していた。このことからγ-デカラクトンおよびγ-ドデカラクトンは発酵中あるいは蒸留中に生成したものと考えられた。いずれも甘いピーチ様の香気で、酒質にプラスの効果をもたらすものと予想された。

**ラクトン生成経路** 微生物によるラクトン生成は、天然に入手可能なヒドロキシ脂肪酸であるリシノール酸

表1. ラクトン含有量と官能評価間の相関係数

化合物名	貯蔵	未貯蔵
シス-β-メチル-γ-オクタラクトン	-0.726	—
トランス-β-メチル-γ-オクタラクトン	-0.214	—
γ-ノナラクトン	-0.239	0.371
γ-デカラクトン	0.538	0.831
γ-ドデカラクトン	0.592	0.807

からの報告がある<sup>5,6)</sup>。そこでこの経路を参考に、これらラクトン類の生成経路を検討した。その結果、併用されるビール酵母が死滅することにより不飽和脂肪酸が供給され、これを利用し乳酸菌がヒドロキシ脂肪酸を生成し、続いて酵母のβ-酸化によりこれらラクトンが発酵中に生成されるものと推察された<sup>7)</sup>(図1)。パルミトオレイン酸が10-ヒドロキシパルミチン酸を経てγ-デカラクトンへ、オレイン酸が10-ヒドロキシステアリン酸を経てγ-ドデカラクトンへ変換される。

この生成経路において注目すべき点は3点ある。ビール酵母は発酵初期から死滅し乳酸菌の増殖を促進すること(図2)、乳酸菌が存在しないと前駆体のヒドロキシ脂肪酸は産生されないこと、そしてビール酵母を添加すると前駆体の含有量が増加することである(図3)。

**ウイスキー中のラクトンの光学純度** さらに詳細なメカニズムの解明のために、光学純度に着目し検討を進めた。10-ヒドロキシ酸およびγ-ラクトンはともに分子内に不斉炭素有する。生物は光学活性の高い化合物を生成する傾向があるため、光学純度から関与する微生物を特定できると期待し検討をおこなった。

まずウイスキー中のラクトン類の光学純度について測定した(表2)<sup>8)</sup>。その結果、著しく(R)-体もしくは(S)-体に偏っていることはなく、ラセミ体に近い存在比率であった。

では前駆体のヒドロキシ酸の光学純度は、どのような分布を示しただろうか。調査した乳酸菌においては、その多くが(R)-体のみのヒドロキシ酸を産生していた。その一方で、供した株の中で1株のみが低い光学純度を示した。さらに詳細に調べたところ、この株は10-ヒドロキシステアリン酸のほかにも10-ケトステアリン酸を産生することがわかった(図4)。ちなみにこの株はスコットランドの蒸留所から分離された*Lactobacillus hilgardii*

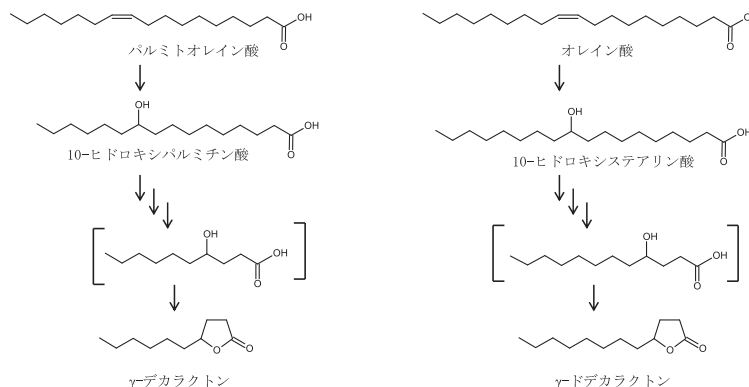


図1. γ-デカラクトンおよびγ-ドデカラクトンの生成経路

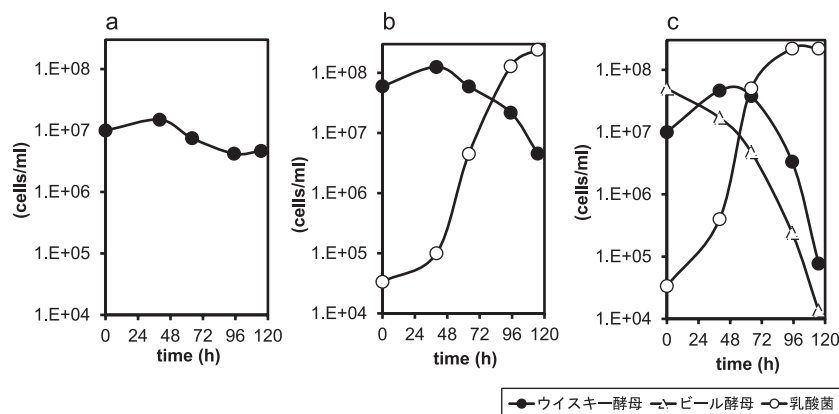


図2. アルコール発酵中の菌数変化. a ウイスキー酵母単独, b ウイスキー酵母+乳酸菌, c ウイスキー酵母+ビール酵母+乳酸菌.

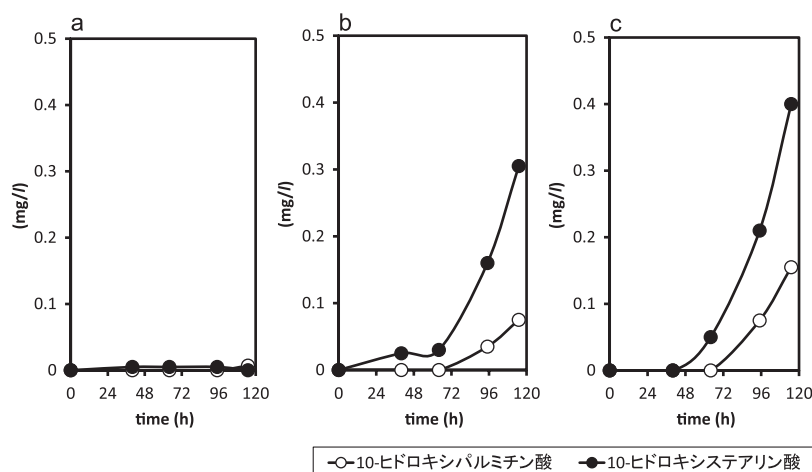


図3. アルコール発酵中のヒドロキシ酸の経時変化. a ウイスキー酵母単独, b ウイスキー酵母+乳酸菌, c ウイスキー酵母+ビール酵母+乳酸菌.

表2. ウイスキー中のラクトンの光学純度

化合物名	光学純度 (%) <sup>a</sup>
γ-デカラクトン	+5 ~ +26
γ-ドデカラクトン	-10 ~ +30

<sup>a</sup> 光学純度 =  $([R]-[S])/([R]+[S]) \times 100$

に属し、10-ヒドロキシ酸よりケト酸を産生した。

では前駆体のヒドロキシ酸とラクトンの光学純度はどのような関係だろうか。光学純度の異なるヒドロキシ酸およびそのメチルエステル体をウイスキー酵母に与えラクトンを生成させた<sup>9)</sup>。その結果、ともに相関係数が0.99以上と両者の間にはきわめて高い正の相関性が得られ、基質の光学純度に依存したラクトンが生成した。すなわ

ち、(R)-体のヒドロキシ酸からは(R)-体のラクトンが生成されることがわかった(図5)。

他方、ケト酸を数種類のウイスキー酵母でラクトン化反応をおこなったところ、菌株間で多少の違いはあったものの、ウイスキー中の光学純度とほぼ同等のラクトンの生成が観察された(表3)。また、この値は光学的に不活性と考えられる。

これまで光学活性について述べてきた。蒸留中や樽貯蔵中には光学純度は変化しないことを確認しており、もろみ中でのラクトンの光学純度が-10~+30%になるような微生物が関与していると考えられる。すなわち、これまでの結果より、以下の2つの生成経路が存在することが推察された(図6)。γ-ドデカラクトンを例にとると、ひとつは10-ケトステアリン酸を経てウイスキー酵母によりラクトン化する経路と、もうひとつは(R)-10-ヒド

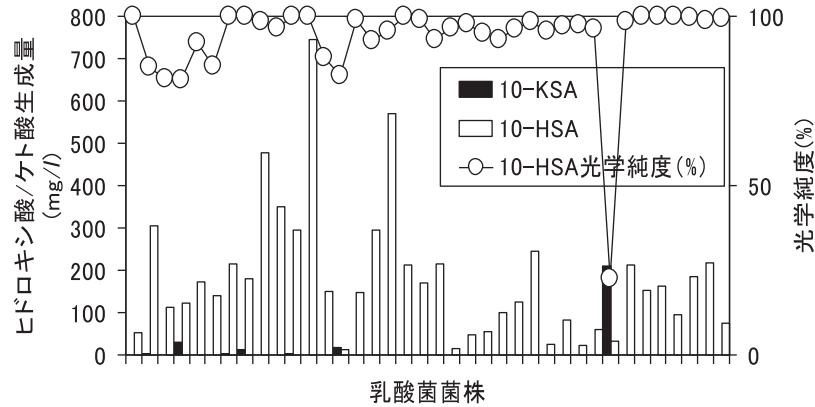


図4. 乳酸菌菌株によるオレイン酸からのヒドロキシ酸とケト酸生成. 10-KSA, 10-ケトステアリン酸; 10-HAS, 10-ヒドロキシステアリン酸; 光学純度 (%) =  $([R]-[S])/([R]+[S]) \times 100$ .

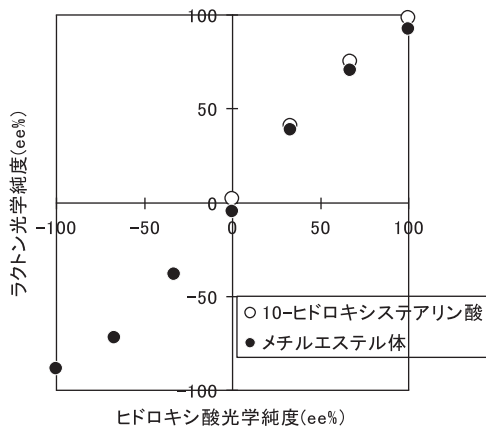


図5. ウイスキー酵母による光学純度の異なるヒドロキシ酸からのラクトン生成

表3. 10-ケトステアリン酸から生成されるγ-デカラクトン光学純度

菌株	光学純度 (%)
DCL type' M'	+9.2
No.41	+27.0
No.334	+28.8
No.466	-17.0
No.672	+32.0

ロキシステアリン酸からウイスキー酵母以外の微生物による(光学活性が維持されずに変換される)経路である。

### ビール余剰酵母の役割

ビール酵母は死滅しやすく、乳酸菌の増殖を促進しラクトンの基質の供給源であることは先述した。このほか

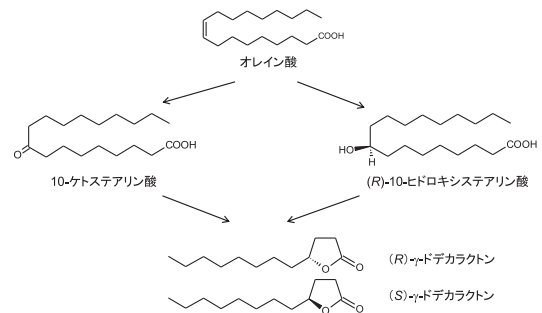


図6. ラクトン推定生成経路

表4. ビール余剰酵母抽出部の Aroma Extract Dilution Assay

化合物名	香気特性	FD-factor (3 <sup>n</sup> )
イソ酪酸エチル	フルーティー	3
2-メチル酪酸エチル	フルーティー	4
未同定	ネギ様	3
未同定	ナッツ様	5
メチオナール	イモ様	7
桔草酸+イソ桔草酸	酸様	4
フラネオール	甘い	3
ホモフラネオール	甘い	2
未同定	甘い	4

に酒質にどのような影響があるのであろうか。

ビール余剰酵母を水蒸気蒸留し香気成分を抽出し、どのような香気を有しているかをGC-Oを用いて調べた<sup>10)</sup>。Aroma extract dilution analysisによるFD-factorを表4に示した。この手法は、GC-Oにおいて匂いがしなくなるまで希釈する方法で、この値が大きいほど香気強度が

強く、寄与が高いことを示す。もっともFD-factorが大きかったのはメチオナルだった。この成分はボディーク感に寄与すると思われる。このほかには分岐脂肪酸のエチルエステルといったフルーティーな香気や、フラノン類などの甘さに寄与すると思われる香気を有していた。

### 蒸留所の個性とは

インプリケーションの域をでないが、これまでの結果から蒸留所ごとの品質に与える要因について簡単に議論し、まとめにかきたい。

工場見学の際に受ける説明も要因としてあるのも事実であろう。ウイスキーに関していえば情緒的な価値が大きく、科学的な裏付けはマーケティングとしては不要かもしれない。

では科学的にはどのようなことがいえるのであろうか。乳酸菌菌株によってヒドロキシ脂肪酸の生成量は異なった。ラクトン含有量もさまざまで、その生成には乳酸菌が関与する。乳酸菌叢が蒸留所によって異なることは、ラクトン含有量の差異の一因であると考えられる。さらにいえば、蒸留所ごとの菌叢の違いがラクトン含有量の差を生み出しているのかもしれない。しかしながらこの現象はあくまでも一面にすぎず、乳酸菌はこのほかのことにも関与しているのかもしれない。個々の乳酸菌が単独でそれぞれ特別な香気生成をしていることは考えにくい。これ以外の共生が起きているのかもしれない。

ビール余剰酵母が死滅し脂肪酸が菌体外に漏洩し、これを乳酸菌が酸化させ、酵母がラクトン化する。ウイスキー醸造においては、こうした物質の受け渡しがなされ微生物の共生が重要な香気生成に関与している。特に主役を演じるのは乳酸菌で人為的な制御なしにこうした共生がおこなわれていることはたいへん興味深い。

本研究はニッカウキスキー(株)細井健二技術開発部長とおこなったものです。細井氏をはじめ関係された皆さまに感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Palmer, G. H.: *Ferment*, **10**, 367 (1997).
- 2) van Beek, S. and Priest, F. G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 297 (2002).
- 3) Simpson, K. L. *et al.*: *Microbiology*, **141**, 1007 (2001).
- 4) Wanikawa, A. *et al.*: *J. Inst. Brew.*, **106**, 39 (2000).
- 5) Okui, S. *et al.*: *I. Biochem.*, **54**, 536 (1963).
- 6) Hagerdon, S. and Kaphammer, B.: *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**, 773 (1994).
- 7) Wanikawa, A. *et al.*: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **58**, 51 (2000).
- 8) Wanikawa, A. *et al.*: *J. Inst. Brew.*, **107**, 253 (2001).
- 9) Wanikawa, A. *et al.*: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **60**, 14 (2002).
- 10) Wanikawa, A. *et al.*: *Distilled Spirits Tradition and Innovation*, p.95, Nottingham University Press (2003).