分離菌中葡萄汁又は葡萄酒によく繁殖するものは Homo-type の乳酸菌に属する *L. plantarum* と Hetero-type の乳酸菌全部であり、これ等の菌につき葡萄酒品質に及ぼす影響を試験し、前者は単なる乳酸味を与えるのみであるが、後者は特有の酸味と顕著な不快臭味を与えることを確めた。

なお菌分離用疾病酒と分離菌との関連につき考察した。

終りに臨み種種御懇切な御指導を賜った東大教授兼当研究所長朝井勇宣博士並びに種種御便宜を与えられた横塚勇助教授に謹んで謝意を表する。尙本研究の研究費の一部は文部省科学研究費によるものである。

(1) PASTEUR : <i>Etudes sur le vin</i> , Paris, 1873.	(5) DOUGLAS and CRUESS : <i>Fruit Product J.</i> , 15, 324, 345 (1936); <i>Wines u. Vines</i> 17. No. 234.
(2) MÜLLER-THURGAU u. OSTERWALDER : <i>Die Bakterien im Wein u. Obstwein</i> , 1913.	(6) CRUESS : <i>Advances in Enzymology</i> , 3, 362 (1943).
(3) NIEHAUS : <i>Stellenbosche Agr. Coll. South Africa, Bull.</i> , 16, (1930).	(7) 北原 : 農化, 16, 819 (1940).
(4) RIBEREAU-GAYON : <i>Ann. Ferm.</i> , 7, 21 (1942); <i>Chem. Zentr.</i> , 1942 II, 2956.	(8) FRIEDEMANN and GRAESER : <i>J. Biol. Chem.</i> , 100, 291 (1933).

Summary

21 strains of lactic acid bacteria were isolated from diseased wines brewed at Kōshu district in Japan, and their classification and effects on wine were investigated.

Of these bacteria 6 strains belonged to the "hetero-fermenter" grew well in the grape juice or the wine and caused the so-called "turne disease" that is, produced a lot of volatile acids and lactic acid, might or might not mannitol, and gave the unpleasant taste and odor.

On the other hand, only 3 strains of the "homo-fermenters" grew well in these musts and produced a lot of lactic acid but not gave the unpleasant taste and odor. The other "homo-fermenters" could to grow in the eow acidic musts, but not in the ordinary grope juice.

前スルフォン化エゾ松木粉のヒドロキシルアミン共存エタノリス シスに應及びリグノオキシムスルフォン酸に就て*

(サルファイト蒸解の研究 第5報)

軒 原 栄 三 (国策パルプ工業株式会社附属農林科学研究所)

昭和 27 年 7 月 12 日 受理

On the Ethanolysis in Presence of NH_2OH of Presulphonated Spruce Wood Meal, and Lignoximesulphonic Acid. (Studies on the Sulphite Cooking. Part 5)

By Eiōz NOKIHARA (The Research Laboratory of the Kokusaku Pulp Industry Co., Ltd.)

1. 緒 言

HÄGGLUND 等⁽¹⁾に依つて、亜硫酸蒸解は先ずリグニンが木材中で他成分と結合したまゝスルフォン化され "Solidlignosulphonate" を生成する第1段階と、此が加水分解され更にスルフォン化を受けて可溶のリグノスルフォン酸となつて溶出する第2段階に分けられた。ERDTMAN⁽²⁾⁽³⁾は此の第1段のスルフォン化を受けるリグニンの活性基を A, 第2段のそれを B' (リグニンは他成分と B なる結合を為し其の加水分解によつて遊離となつた形が B') と名付けた。A は吾々⁽⁴⁾⁽⁵⁾によつて更に X 及び Z なる2つの活性基に分けられる事が明らかにされた。X, Z 及び B' の形に就ては LINDGREN⁽³⁾が詳細に論じている。

筆者は前報⁽⁶⁾に於てエゾ松木粉の NH_2OH 共存エタノリスで α -及び β -lignoxime を得、リグニンと炭水化物の結合又はリグニン分子同志の結合は「リグニンのカルボニール基の関与するアセタール又はヘミアセタール結合」である事を推論したが、本報に於ては先ず木粉を中性組成の $\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{NaHSO}_3$ で X 及び Z をスルフォン化して solid lignosulphonate と為し次で NH_2OH 共存エタノリスを行い、 α - 及び β -lignoxime-

* 岡田元及び共同研究者によるリグニンに関する研究 第11報。

sulphonic acid (以下 α, β -LOSA と略記) を得た。依つて其の反応経過と LOSA の組成を述べ、B がアセタール (又はヘミアセタール) 結合——従つて B' はカルボニール (又はエノール) 基の可能性の大なる事を論ずる。

2. 実験と其の結果

(1) 前スルホン化エゾ松木粉 (Solid lignosulphonate) の調製 40 メッシュのエゾ松木粉をエタノール・ベンゾール混液で抽出脱脂後 $[\text{Na}_2\text{SO}_3 \text{ 120 g} + \text{NaHSO}_3 \text{ 30 g}/\text{H}_2\text{O} \text{ 1000 cc}]$ の蒸解液を液比 1:10 に加え、137°, 6 時間蒸解した。蒸解後木粉残渣を濾過し完全に水洗した。

残渣木粉収率: 91.5%, klasonlignin 含量: 25.2%, 硫黄含量 0.88%。

従つて此の残渣木粉中のリグニンに就ては硫黄含量 3.49% である。

(2) 前スルホン化エゾ松木粉の NH_2OH 共存エタノリシス 上記試料木粉 20.0 g (絶乾量として) を硝子製耐圧フラスコに採り、3% エタノール性塩酸 200 cc 及び $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ 4.2 g を加え沸騰湯浴中反応させる。所定時間後取出した反応容器は水冷後残渣木粉を濾過、更にエタノール洗滌及びソックスレー抽出器による抽出洗滌を行い乾燥秤量し、その klasonlignin 含量及び硫黄 (KLINGSTEDT 氏変法⁽⁷⁾) を測定する。

(3) α -及び β -Lignoximesulphonic acid の取得と其の組成 上記の母・洗・抽出液を合して水 5 l 中に注入すると淡褐色絮状沈澱を生ず。之を遠心分離にて集め、更に硝子漏斗にて濾過し可及的水分を除いた後真空デシケーターにて硫酸上乾燥し褐色無定形粉末 (α -LOSA) を得る。遠心分離の上澄液はエーテルにて連続数日間抽出し、蒸発皿に移して湯浴上エーテルを揮散せしめると黄褐色シラップ (β -LOSA) を得る。

エタノリシス反応経過及び α -, β -LOSA の収率を図示すれば Fig. 1. 及び 2. の如くである。 α - 及び β -

Fig. 1. Progress of the ethanolysis in presence of NH_2OH of presulphonated spruce wood meal.

Fig. 2. Yields of α , β -lignoximesulphonic acid and total dissolved lignin in ethanolysis in presence of NH_2OH of presulphonated spruce wood meal.

LOSA のメトキシル基 (VIEBÖCK-BRECHER 法⁽⁸⁾), 窒素 (FRIEDRICH の分解剤を用いる微量ケルダール法⁽⁹⁾) 及び硫黄 (マイクロボンベンロールを用い

CARIUS 法による分解後坂本法容量分析⁽¹⁰⁾) 含量の測定結果は Table 1 の如くである。

(4) オキシム基の検証 亜硫酸蒸解液中のリグノスルホン酸は 2-naphthylamine の如き芳香族アミンで沈澱するが、其の機構に就て KLASON⁽¹¹⁾ はアミンがスルホン基と塩を作るものと考えた。本報の LOSA は N:S が Table 2 の如く α に於ては 2:1, β は 10:1 であるので (単なる塩形成のみでは N:S=1:1), かゝる塩形成があつても大部分はそれぞれ以外の形の N であるが、LOSA の N が全てオキシム態であるか否かを確める為、BLOM⁽¹²⁾ によつて始められた free NH_2OH 及びオキシムの分別比色定量法を用いた。原理は試料中の free NH_2OH は沃度の醋酸溶液で酸化し、スルファニル酸でジアゾ化し α -naphthylamine で赤色のアゾ色素となし其の呈色を標準 NH_2OH 液と比色する。オキシムの場合は先ずスルファニル酸溶液で試料を加熱加水分解しオキシムを NH_2OH として上述通り行う。此方法の試薬及び条件は種種考究されているが NOVAK-

Table 1. Compositions of Lignoximesulphonic Acids obtained at Various Reaction Times in Ethanolysis in presence of NH_2OH of Presulphonated Spruce wood Meal.

Fraction	α -lignoximesulphonic acid				β -lignoximesulphonic acid			
	-OCH ₃	N	S	OCH ₃ :N:S	-OCH ₃	N	S	OCH ₃ :N:S
Reaction time in boiling water bath (hrs.)	(%)	(%)	(%)	(mole ratio)	(%)	(%)	(%)	(mole ratio)
3.5	16.42	1.69	1.66	5.3:1.2:0.5	14.38	6.52	0.90	4.6:4.6:0.3
6	16.22	1.69	1.81	5.2:1.2:0.6	14.72	6.91	1.32	4.8:4.9:0.4
8	15.70	1.72	1.88	5.1:1.2:0.6	13.40	7.39	1.64	4.3:5.3:0.5
12	15.77	1.85	1.72	5.1:1.3:0.5	13.63	7.52	—	4.4:5.4:—
19	16.82	2.07	1.55	5.4:1.5:0.5	13.61	7.26	0.47	4.4:5.2:0.15
28	14.25	1.90	1.35	4.6:1.4:4.4	13.34	8.02	0.28	4.3:5.7:0.1
Average	15.86	1.82	1.66	5.1:1.3:0.5	13.85	7.25	0.92	4.5:5.2:0.3

These -OCH₃ contents include -OC₂H₅, which were introduced in ethanolysis with NH_2OH .

WILSON 法⁽¹³⁾に依つて施行した。其の結果 free NH_2OH (塩も同じ) のテストは呈色極微で、之は恐らく試料に附着残存せる極微量の NH_2OH であると考えられるが、一方 LOSA を加水分解すれば濃赤色に着色する故に LOSA の N は全てオキシム態である。

(5) α -LOSA の電圧滴定 LOSA は強酸性のスルホン基と塩基性のオキシム基を含む故此等を電圧滴

Fig. 3. Curves of potentiometric titration of α -lignoximesulphonic acid solution in alkaline EtOH- H_2O with 0.01 N HCl (glass electrode pH meter used).

↑, ⇐ and ⇐ indicate the 1st, 2nd (isoelectric point) and 3rd inflexion point. Amount between ↑ (⇐) and ⇐ (⇐) indicates SO_3H (oxime) content.

3. 考 察

Fig. 1 に見られる如く反応残渣木粉の残リグニン率と残硫黄率の曲線が概ね同一経過を辿る事は、此の反応に於て溶出せるリグニンと残留せるリグニンとの硫黄の配分の比が大体等しい事を意味している。反応に用いた前スルホン化木粉中のリグニンの硫黄含有量は 3.49% である (筆者は本研究の第 2 報⁽⁵⁾で前スルホン化反

定で求める試みを行った。 α -LOSA の反応時間 3.5, 12 及び 28 h のものそれぞれ約 100 mg をエタノール 15 cc, 水 15 cc 及び 0.1 N NaOH 約 3 cc に溶解してアルカリ性溶液とし、之に 0.01 N HCl を 1 cc 宛加えつゝ毎回其の pH を硝子電極 pH 計で測定した。結果は Fig. 3 の如くである。図に見られる如くアルカリ側から滴定してゆくと pH 8.5 に 1 つの変曲点 (第 3 変曲点) が見られる。次で pH 6 附近から溶液は濁り始め、4.4 で沈澱は最大量に達し又此処に変曲点 (第 2 変曲点) が見られる (此の点が後述する α -LOSA の等電点)。更に pH 3.2 に変曲点 (第 1 変曲点) がある。此の事は次のように解釈されよう。

即ち LOSA は酸性のスルホン基と塩基性のオキシム基を有する両性電解質で酸性側から NaOH で滴定してゆくと下式のようになる。従つて第 1 2 変曲点間は強酸性のスルホン基を表し、第 2 3 変曲点間はオキシム基を示す。電圧滴定から求めたスルホン基の S% 及びオキシム基の N% を Table 1 のそれぞれの値と対比して示せば Table 2 の如くになり良く一致する。

以上の結果から固状リグニスルホン酸に於てリグニンは炭水化物又は他のリグニン分子とアセタール又はヘミアセタール結合をしており而もリグニンがカルボニールを供与している事が推察出来た。KULLGREN⁽¹⁰⁾は solid ligno sulphonic acid をアルコールと加熱して溶出する時 alkoxyl 基の導入された lignosulphonic acid を得、此の alkoxyl 基は元のリグニンのアセタール結合の所に入つたと考えた。又 ERDTMAN⁽²⁾ は前記

B基に対して次の如き環状ヘミアセタールを考えている。此等は筆者の考えに一致する。併し最近の LINDGREN⁽³⁾ の研究に依るとB基もA基と同じくリグニンのベンゼン核に対し α 位炭素の -OH であるが、之がエーテル化されている事及び側鎖に対しパラの OH もエーテル化されている事によつてAと反応性が異なるものであると言う。従つてB基の確定にはなお多くの

実験事実の集積が望まれる。筆者の此の研究に於てもオキシム化されるカルボニール基は炭水化物又はリグニンの他の分子との結合に与つているものと考えられるが、此のカルボニール基が第2段のスルフォン化でスルフォン化されるかどうか〔即ちX・Z以外のリグニンのスルフォン化を受けるWなる活性基(=ERDTMANのB基)が此のカルボニール基に対応するかどうか〕と言う点は未解決である。此の解決の為にLOSAのスルフォン化を試みる必要がある。之によつて新しい -SO₃H の導入が無いが又はオキシム基が脱離し -SO₃H が入れれば対応すると言える。併しオキシム基が脱離せずとも新たな -SO₃H が導入されれば対応は無く別の基である。此点は今後の研究課題である。

本研究に於て種種御指導御鞭撻を賜つた当研究所岡田所長、末弘女史及び三川礼氏並びに東大助教授丸尾文治氏に深謝する。又実験を担当された田中竜三君の御苦勞に感謝する。

- (1) E. HÄGGLUND : Chemistry of Wood, New York 1951, pp. 415, 206, cf. pp. 196.
- (2) H. ERDTMAN : *Tappi*, 32, 71, 75, 303, 346 (1949).
- (3) B. O. LINDGREN : *Svensk. Papperstidn.*, 55, 78 (1952).
- (4) 三川 礼 : 工化, 54, 651, 741 (1951).
- (5) 軒原栄三 : 農化, 26, 236 (1952).
- (6) 軒原栄三 : 農化, 26, 303 (1952).
- (7) 三川, 佐藤, 高崎 : 工化, 54, 717 (1951).
- (8) 津田, 落合共著 : 有機微量・少量分析法, 198 頁.
- (9) F. PREGL : Die quantitative organische Mikroanalyse, 4. Auf., S. 110.
- (10) (8) の 150 頁.
- (11) P. KLASON : F. E. BRAUNS 著, "The Chemistry of Lignin," Academic Press. (1952) pp. 375, 629.
- (12) J. BLOM : *Biochem. Z.*, 194, 385 (1928).
- (13) R. NOVAK and P. W. WILSON : *J. Bact.*, 55, 517 (1948); cf. G. ANDRES : *Ann.*, 518, 107 (1935); 近藤, 秋田 : 農化, 23, 373 (1950).
- (14) Q. P. PENISTON, J. L. MCCARTHY and H. HIBBERT : *J. Am. Chem. Soc.*, 61, 530 (1939).
- (15) W. B. HEWSON and H. HIBBERT : *ibid.* 65, 1173 (1943).
- (16) C. KULLGREN : *Svensk Kem. Tidn.*, 44, 15 (1932).

Summary

Each 20 g of presulphonated spruce wood meal (solid lignosulphonic acid ; Klason lignin and sulphur content are 25.2% and 0.9%, respectively) was treated with 200 cc of 3% ethanolic HCl and 4.2 g NH₂OH·HCl in boiling water bath during 1.5~28 hrs. After 10~28 hrs., about 60% of lignin was dissolved. When ethanolic filtrates were introduced in 5/ H₂O, light yellow flocculent precipitates (α) were formed. By the continuous extractions of aqueous filtrates with ether and evaporation of ether, brown syrups (β) were obtained. Average -OCH₃, nitrogen and sulphur contents of α (β) are .15.86, 1.82 and 1.66% respectively (13.85, 7.25 and 0.92%). Therefore, their mole ratio in α (β) is 5.1 : 1.3 : 0.5 (4.5 : 5.2 : 0.3).

From the results of the colorimetric determination of free NH₂OH and oxime by Navak-Wilson's method [*J. Bacteriology*, 55, 517 (1948)], and of the potentiometric titrations of α , it is confirmed that nitrogen of α is oxime-form, and α is amphoteric [HO₃S-L(OCH₃)₇

・ $(OC_2H_5) \cdot (=NOH)_2$, isoelectric point : pH 4.5], having acidic $(-SO_3H)$ and basic groups $(=NOH)$. Therefore, α (β) was designated, by the author, as α (β)-lignoximesulphonic acid. From results above mentioned, it is assumed that lignin molecule in presulphonated wood meal (solid lignosulphonic acid) has carbonyl group and may be connecting with each other or with carbohydrate by means of acetal-linkage.

It is supposed that β is similar in reference to these characters.

微生物による酒石酸の分解について (第 1 報)

野 村 眞 康 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 27 年 7 月 14 日 受理

The Decomposition of *d*-Tartarate by the Microorganism

By Masayasu NOMURA (Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

d-酒石酸は他の有機酸と共に広く植物界に存在しており、又細菌や糸状菌が之を分解する事は古くから知られている。それ故酒石酸が生物の代謝上重要な役割を演じているのではないかと想像されるが、之に関してはまだ殆ど知られていない。比較的近年、坂口教授、多田氏は *Bact. succinicum* を用い *d*-酒石酸から高収量でコハク酸を得ており⁽¹⁾、又 VAUGHN 等は分類学的見地から研究を進め、*coliaerogenes* 属細菌が広く酒石酸分解力を有し⁽²⁾、又酒石酸分解力を有する嫌気性菌は殆ど *Clostridium* 属に属する事を報じ、且つ *Clostridium* 属による分解生産物として、酪酸、醋酸、 CO_2 、 H_2 及び微量の焦性ブドウ酸、ethyl alcohol を示した⁽³⁾⁽⁴⁾。併し酒石酸の分解機構についての定量的な詳細な研究は従来殆どなされていない。それ故筆者は、この点に関して研究を進めようと思い、先づ土壌中から *d*-酒石酸を強力に分解する細菌を分離し、その中の一種を用いて実験を進め若干の結果を得たのでここに報告する。

実 験 の 部

1. 菌の分離及び性質 NH_4 -tartarate 1.23%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 各 0.05%, 水道水を用い pH=7.0 に調節した培地に採集土壌を投入し 30° に培養、之を順次同じ培地に植えつけた後、常法の如く扁平培養を繰返して純粋にした。かくして得られた細菌の中の 1 種 Strain 3 L は、0.6~1.0 $\mu \times$ 1.0~1.7 μ の大きさの短桿菌で、菌端は鈍円、孤立又は 2 箇連結、稀に 3~5 箇鎖状に連結している。単極毛を有して活潑に運動し、孢子を生ぜず、ブイオン寒天の斜面にはよく発育して白色光沢を有し、若い菌体は緑色螢光を発する。グラム染色-。ゼラチンを液化せず。カタラーゼ+。澱粉を糖化せず。NO₃⁻ の還元+。H₂S の発生+。Indol の発生-。Methyl-Red test -。VOGES-PROSKAUER'S test +。クエン酸を唯一の炭素源として成育可能。リトマスミルク培地に於ては、酸の生産を示して 6 日後に凝固。ガスの発生及び pH の低下によつて判定した糖類の醗酵性は、glucose, maltose, dulcitol, rhamnose, glycerin+, lactose, salicin±, sucrose, mannose, galactose, fructose, arabinose, dextrin-。以上の点から *Pseudomonas* 属に属すると考えられるが、詳細な菌学的研究は今後行う予定である。

2. 酒石酸の分解と生産物の確認 前培養：酒石酸-ブイオン-寒天培地 (Na-*d*-tartarate 1%, ペプトン、肉エキス各 1%, NaCl 0.5%, 寒天 2%, pH ≈ 6) に菌を接種。30°, 24 時間培養後、無菌的に菌体を集めて細菌浮遊液をつくる。之を用いて次の組成で resting cell による *d*-酒石酸の分解を調べた。

培地組成：Na-*d*-tartrate (遊離酒石酸として 8.365 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g, 水道水 100 cc (細菌を乾燥量として 1.2 g 含む), M/15 磷酸緩衝液 (pH=7.0) 700 cc, 全量 800 cc。

30°, 73 時間静置培養をした後培養液を分析する。先づ菌体を除いた濾液の一部をとり残存酒石酸を MATCHETT 等の方法⁽⁵⁾で比色定量した。他の一部をとり 2, 4-dinitrophenyl hydrazine 2 N HCl の溶液を加えた所、少量の赤褐色樹脂状の沈澱を生じた。これは Na₂CO₃ に不溶で恐らく aldehyde の hydrazone と思われるが量が僅少で確認されなかつた。他の一部については常法により中性蒸溜を行い、溜液について jodoform 反応、SCHIFF の反応を行つたが何れも-で、alcohol, acetone, aldehyde, diacetyl などの生成は殆ど認められないと思われる。尚 NICLAUX の方法⁽⁶⁾で alcohol などの被酸化性物質を定量したが微量で定量範囲以下であつた。中性蒸溜残渣は他の残液に合して低温で減圧濃縮をして 100 cc とし、この中の一部は酸性水蒸気蒸溜