[農化 第 35 卷, 第 4 号, p.319~322, 1961]

アルコール醪におけるアクロレインの生成に関する研究 (第 1 報)*

アクロレイン生成乳酸菌について

花 井 四 郎 (宝酒造株式会社)

昭和 35 年 8 月 22 日 受 理

アルコール醪を蒸溜する際往々分縮器からはげしい催涙性のガスの発生をみることがあるが、著者はこの物質を蒸溜機のいわゆる不純物処理塔から抽出される不純アルコール中に集積させて検索したところ、アクロレインであることがわかったので先に報告した^(1,2)。

アクロレインの存在については Voisenet^(3,4) が 1910 年にブドー酒の刺戟香 (peppery と称した) の研究で *Bacillus amaracrylus* (*Bacillus polymyxa*) がブドー酒中のグリセリンを代謝してつくることを初めて明らかにしたが、その後 Humphreys⁽⁵⁾ は 1924 年に *Clostridium welchii* (*Cl. perfringens*) が、また Warcollier^(6,7) は *Cl. perfringens* によってリンゴ酒やブランデー等のなかにアクロレインがつくられることを報告している。最近 Serjak 等⁽⁸⁾ および Mills⁽⁹⁾ 等は穀類を原料とするアルコール醪から乳酸菌に属すると考えられる細菌でアクロレインをつくるものを分離している。木下⁽¹⁰⁾等はブタノール醪から同様アクロレインをつくる菌を分離し、その一般的性質について報告している。

著者は刺戟性ガスを発生する蒸溜醪はすべてアクロレインの検出反応である Sidney, Leonard のトリプトファン反応を呈すること、及びアルデヒドとして定量されるものの多いことから、これら醪からアクロレインをつくる細菌を分離し、その菌学的諸性質を検索してヘテロ酸酵乳酸菌の一種として同定したが、酸酵代謝の特異性からその一変種とした方が適当と考えたので報告する。

実 験

I. 菌の分離 アクロレインの検出される醪からグリセリン・トマト汁培地 (トマト汁 400 cc, 葡萄糖 10g, 酵母エキス 10 g, グリセリン 20 g, KH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 0.01 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, MnSO_4 0.01 g に蒸溜水を加えて全量を 1 l とし、苛性ソーダで pH を 5.8 に調製した。以下これを G. G. T. 培地と称す。尚この培地からグリセリンを除いたものは G. T. 培地とする。) を用い、常法通り嫌気の状態で 30° で菌の分離を行った。5 日間放置した後発生したコロニーにはその周囲に Schiff の試薬を 1 滴落して直ちに大きな紅色のリングをつくるコロニーから菌を採取し、更に流動パラフィンに表面に浮べた G. G. T. 培地を使用して培養し、その一部を蒸溜してアクロレインの生成の有無を検出、反応を呈するものから更に純分離を行なった。

II. 形態学的性質

a. 形態大いさ : G. T. 培地で 30°, 48 時間培養したものは多く 0.4~0.7 μ × 1.5~4.0 μ の桿状、もしくは彎曲したものが単一又は数個連鎖をなす (写真参照)。

b. その他の性質 : 麴汁寒天斜面の劃線培養では生育不良、炭酸カルシウム添加の G. T. 培地の斜面培地で劃線培養した場合やや生育する。炭酸カルシウム添加の穿刺培養ではよく穿刺にそって珠数状になって生育し炭酸カルシウムを溶解する。酵母・肉エキスの液体培地 (酵母・肉エキス各々 0.5%, pH 5.8) では 24~48 時間でやや混濁し始め後全体に混濁を呈する外、液表面の器壁

第 1 図 アクロレイン生成菌の顕微鏡写真

* Studies on the Formation of Acrolein in Alcohol Mash. Part I. An Acrolein-Forming *Lactobacillus*.

By Shiro HANAI (Takara Saké-Brewing Co., Ltd.)

部に菌の乳白色のリングをつくることがある。更にこの培地にグルコースを 1% 加えたものでは混濁後沈渣を生じ上部液は透明になる。平板培養では集落は小さく周縁は entire で乳灰色のやや umbonate の形状を示す。馬鈴薯の平面培地には生育しない。

III. 生理学的性質 G. T. 培地, 及び酵母・肉エキス培地を用いて生理学的諸性質を検討し, 次のような結果を得た。

a) 生育温度: 18~39°, 最適温度: 27~33°. b) 生酸に対する適温: 25~30°. c) 死滅温度: 59°, 10分. d) 生育 pH: 3.8~8.2 の範囲内で生育するが pH 3.6 以下, 8.4 以上では生育しない. e) グラム染色: 陽性. f) 運動性: 運動しない. g) 孢子: つくらない. h) ゲラチンの液化性: 液化しない. i) タカラゼ: 有しない. j) 硝酸塩の還元: 還元しない. k) 硫化水素の生成: つくらない. l) インドールの生成: 生成する. m) リトマス牛乳の凝固: 凝固しない. n) 耐塩性: 4% 以上では生育しない. o) 耐アルコール性: 12% 以上では生育せず, 10% ではやや生育が遅れるが 8% 以下では阻害されない. p) アミラーゼ: 有しない. q) ガス発生の有無: ガスを発生する. r) 色素: 生成しない. s) ケト, アルデヒド類の生成: グルコール 2%, 酵母・肉エキス各々 0.5%, pH 5.8 の培地におけるケト, アルデヒド類の生成については, フォルムアルデヒドの Legal 反応は (+), Simon 反応は (-), ジアセチル, アセトインについては Van Niel 法及び Voges-Proskauer 法が共に陰性であることからジアセチル, アセトインは生成しない。

IV. 糖類の醗酵性及び醗酵生産物 酵母・肉エキス培地に種々の炭水化物, 或いは有機酸塩類を約 2% なる如くに添加し, 30° で 5 日培養後の醗酵性と生酸について試験した結果を第 1 表に示した。

第 1 表 各種糖類・有機酸塩の醗酵性

C 給 源	生育	滴定酸度 10cc に対する 1/10 N NaOH cc数	C 給 源	生育	滴定酸度 10cc に対する 1/10 N NaOH cc数	C 給 源	生育	滴定酸度 10cc に対する 1/10 N NaOH cc数
アラビノース	+	4.5	ラク トース	—	0	α -メチル グルコシッド	—	0
キシロース	+	2.1	メリビオース	+	3.6	グリセリン	+	0
リボース	+	+	蔗 糖	—	0	マンニトール	—	0
ラムノース	—	0	トレハロース	—	0	ソルビトール	—	0
グルコース	+	5.3	セロビオース	—	0	イノシトール	—	0
マンノース	—	0	ラフィノース	—	0	ダルシトール	—	0
ガラクトース	+	1.3	イヌリン	—	0	グルコン酸 カルシウム	±	0
フラクトース	+	2.0	デキストリン	—	0	乳酸カルシウム	—	0
ソルボース	—	0	澱 粉	—	0	酢酸カルシウム	—	0
マルトース	±	0	サリシン	—	0	対 照	—	0

醗酵生産物の試験は炭素源としてグルコース, フラクトースを用いた。即ち酵母エキス, 肉エキスの各々 0.5% を含む培地 500 cc にグルコース 25 g, 炭酸カルシウム 10 g を添加し, 液表面に流動パラフィンをはかりて嫌気状態で 30° で 7 日間培養後分析に供した。即ちその一部を硫酸酸性にして水蒸気蒸溜に附し, 溜出液について揮発酸量を求めた。揮発酸の検索はそのソーダ塩を濃縮しエステル化してからヒドラジンヒドレイトでヒドラジン誘導体をつくり, ペーパークロマトグラフィーを行った⁽¹¹⁾。n-ブタノールの水飽和液を展開剤とし, 95% エタノールの 10% 塩化第二鉄液で発色させた結果, 試料の揮発酸は酢酸と同じ R_F (0.45) を示し, 酢酸のヒドラジン誘導体の混液についても同じスポットを与えることから本菌のつくる揮発酸は酢酸であることが判明した。不揮発酸はこの蒸溜残液のエーテル抽出部から求め, 更にペーパークロマトグラフィー⁽¹²⁾を行うため, 濃縮し少量の硫酸アンモニアを加えて不揮発酸のアンモニア塩とした。95% エタノール, アンモニア, 水の比率が 80:5:15 からなる展開剤を用い上昇法で展開, のちブロムフェノールブルー 50 mg, クエン酸 200 mg, 水 100 ml からなる発色剤で呈色させた結果, 本菌のつくる不揮発酸は乳酸の R_F (0.54) と一致する唯一つのスポットを与えたので, 更にこのエーテル抽出部の乳酸を Zn 塩として晶出させ, 水で再結して分析に供した。この Zn 塩の結晶水は 18.14%, 灼熱残渣の ZnO は 27.54%, $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ でこれは DL-型乳酸の各々とよく一致することから本菌のつくる乳酸は DL 型であることがわかった。フラクトースの場合もグルコースと同じ方法によってつくった培養液に接種し, 30° で 20 日間培養のち, 前記と全く同じ方法で分析した結果, グルコースの場合におけるそれと全く同じ結果を与えた。マンニトールの抽出と定量はその培養液中に残存するフラクトースをパ

第 2 表 アクロレイン生成菌の醗酵生産物

C 給 源	培養 日数	糖			乳		酸		酢 酸	アルコール		マンニトール	
		接種 前	培養 後	消費 率	生成量	消費糖 に対する 割合	生成量	消費糖 に対する 割合		生成量	消費糖 に対する 割合	生成量	消費糖 に対する 割合
		(g)	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)		(g)	(%)	(g)	(%)
フラクトース	25	5.12	0.59	89	1.29	29	0.34	7.5	0.84	18.6	0.79	18.2	
グルコース	7	5.24	0.07	99	1.77	34	0.15	2.8	1.07	20.7			

ン酵母で醗酵消失させたのち、硫酸酸性でエーテル抽出を行ない、つぎに残液を中和してから約 1/3 量まで減圧濃縮し、これにアルコール濃度が 50% 位になる程度にエタノールを加えて沈澱を濾去し、その濾液を更に減圧濃縮してシラップ状となし、このシラップの 80% エタノール可溶部からエタノールを駆出して得たシラップ状の残液に無水アルコールを加えた。ここに生じた沈澱を除いて、その液を氷室内に放置し晶出した結晶を分取したが微量のためペーパークロマトグラフィー⁽¹⁸⁾を行ってマンニトールを確認した。即ち試料の水溶液を濾紙上にスポットし、*n*-プロピルアルコール、酢酸、水の比率が 7:1:2 からなる展開剤を用いて上昇法で展開のち風乾

第 2 図 グリセリン、糖濃度の相異によるアクロレインの生成 (*Lactobacillus brevis* との比較)

し、この濾紙を 0.5% アニシジン・メタノール液 (0.5 g アニシジンを 3 ml の 85% 磷酸に溶解のち 80% メタノール 100 ml を加える) に浸漬する。次いで余分の液を除いてから 105° で約 10 分間加熱すると糖アルコールは焦茶色になった濾紙上に白色のスポットとして残る。本試料はマンニトールと同じ R_F (0.20) を与え、更にマンニトールとの混液も唯一のスポットを与えることから本物質はマンニトールと確認した。定量はパン酵母で残糖を除いたものについて Smit 法で行なった。グルコース、フラクトースの醗酵代謝生産物の量比は第 2 表に示した。即ち本菌は前述の菌学的諸性質と醗酵代謝生産物からヘテロ醗酵乳酸菌に包含されるものと考えられる。

V. グリセリン及びその他の物質に対する作用

グリセリンからアクロレインを生成する反応は本菌の脱水作用に基くものであるが、この場合グリセリンとグルコースの濃度を変えた培養液を用いて 30° で 5 日間培養したのちのアクロレインの生成量について試験した結果を第 2 図に示した。アクロレインの生成量はどのグリセリン濃度の場合でもグルコースが 1% の時が最も多く糖濃度が高くなるに従って減少した。比較

第 3 表 アクロレイン生成菌の各種物質に対する作用

物 質	検出反応	アクロレイン 検出反応 (トリプトフ アン反応)	アルデヒド 検出反応 (Schiff 反応)	ジケトン検出 反応 (ジメチルグリ オキシム法)	ケトン 検出反応 (Legal 反応)
対 照	—	—	—	—	—
グ リ セ リ ン	卅	卅	—	—	—
プロピレングライコール	—	卅	—	—	—
アセトアルデヒド	—	—	—	—	—
ア セ ト イ ン	—	—	+	—	—
メチルグリオキザール	—	+	+	+	+
ジ ア セ チ ル	±	+	+	+	+
トリメチレングライコール	—	—	—	—	—
ピルビン酸ソーダ	—	—	—	—	—
2,3-ブチレングライコール	—	—	—	—	—

のため *Lactobacillus brevis* についても同様に試験したが、アクロレインはつくられなかった。次いでグリセリンが代謝されてアクロレインをつくったと同じように他の物質でもこの脱水反応をうけてアクロレイン、又は類似物質を生成する場合があります。第 3 表に示されるようにアクロレインはグリセリンからのみつくられ、

他の試験物質からはつくられなかった。併しプロピレングライコールのみはSchiff試薬に対し顕著な反応を呈し、明らかにアルデヒド系物質の存在を示した。従ってこのものを検索するため蒸溜液についてベンゾール・スルホン・ヒドロキシラミン酸でアルデヒドのヒドロキサム酸をつくり、イソ・アミルアルコール、氷酢酸、蒸溜水が 5:1:1 の比率からなる展開剤を用いてペーパークロマトグラフィー⁽¹⁴⁾を行った。展開後塩化第二鉄のブタノール飽和溶液で発色させたところ、プロピルアルデヒドのそれと一致する R_F (0.64) を示したので、次いで 2,4-ジニトロフェニールヒドラゾンをつかってエタノールで再結、融点を測った。その結果 154° の融点を示しプロピルアルデヒドのそれと一致すると共に、混融するも融点降下はみられなかったので本菌はプロピレングライコールに作用してプロピルアルデヒドを生成することが判明した。対照として *Lactobacillus brevis* についても同様の試験を行なったが、プロピレングライコールからはプロピルアルデヒドは生成されなかった。

考 察

著者がアルコール醗から分離したグリセリンを代謝してアクロレインを生成する細菌は前述の菌学的諸性質と醗酵代謝生成物からみて、明らかにヘテロ醗酵乳酸菌に包含されるものであり、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (6th ed.) の分類表によれば Genus *Lactobacillus* II 群に、北原の分類表に照し合せる時 *Beta-Lactobacillus* に属し、更にラフィノースを醗酵せずアラビノースをキシロースよりも強く醗酵する点から *Lactobacillus brevis* に同定されるべきものと考えられる。更に既知のアクロレイン生成菌として報告されているものと比較するに、Voisenet の *Bacillus amarycylus* や Humphreys の *Clostridium welchii* 或いは Warcollier の *Cl. perfringens* 等は明らかに異なる種属のものであり、木下、Mills, Serjak 等の分離菌に関する報告には菌学的諸性質についての詳細な記載がないが、木下の分離菌が乳酸醗酵菌としても糖類からガスの発生がみられない点著しい違いがあり、又 Mills の分離菌は硝酸塩を還元することから異なる菌種と考えられる。Serjak の分離菌は *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. pastorianus* とは異なりフラクトース、キシロース、トレハロースを醗酵しないところの新しい菌種であると報告している。従って既知の報告されたアクロレイン生成菌のうちには著者の分離したアクロレイン生成菌と一致するものは見出し得なかった。

ひるがえって本菌が分類学的には *Lactobacillus brevis* に同定されるに拘らずグリセリンからアクロレインを、プロピレングライコールからはプロピルアルデヒドを生成する脱水作用のあることよりその一変種と認め、*Lactobacillus brevis* var. *acrorreinus* とすることを提唱する。

要 約

アルコール醗からグリセリンを嫌氣的に代謝してアクロレインを生成するヘテロ型桿状乳酸菌の一種を分離し、その分類学的諸性質と醗酵代謝物について考究した。その結果本菌は *Lactobacillus brevis* に同定されることがわかったが、グリセリンからアクロレインを、又プロピレングライコールからプロピルアルデヒドを生成する特異性のあることから *Lactobacillus brevis* の一変種と認めることが適当と考え、更に既知の報告されたアクロレイン生成菌と一致するものを見出し得なかったので、本菌を *Lactobacillus brevis* var. *acrorreinus* とすることを提唱する。

終に臨み終始御懇切な御指導を賜りました醸造試験所山田所長に深甚なる謝意を表します。また実験に当り種々御教授を頂きました北海道大学佐々木教授、応微研第一研究室福井助教授に厚く御礼申し上げます。また実験と発表に便宜を与えられました当社田中社長、小穴部長及び前田工場長に感謝申し上げます。

(1) 花井四郎, 正井成之, 佐々木定, 山田正一 : 醸協, 51, 920 (1956).	<i>ibid.</i> , 198, 1546 (1934).
(2) 花井四郎 : 醸協, 54, 114 (1959).	(8) W.C. Serjak, W. H. Day, g. M. van Lanen, C.S. Boruff : <i>App. Microbiol.</i> , 2, 14(1953).
(3) M. E. Viosenet : <i>Compt. rend. (Acad. Sci.)</i> , 153, 363 (1911).	(9) Doris E. Mills, W. D. Baugh, H. A. Conner : <i>ibid.</i> , 2, 9 (1953).
(4) M. E. Viosenet : <i>ibid.</i> , 156, 1181(1913).	(10) 木下祝郎, 奥村拓二 : 醸協, 16, 449(1958).
(5) F. B. Humphreys : <i>J. Infections Dis.</i> , 35, 282 (1924).	(11) 井上吉之 : 本誌, 24, 291 (1951).
(6) G. Warcollier, A. Le Moal : <i>Compt. rend.</i> , 194, 1394 (1932).	(12) E. P. Kenedy, H. A. Bapker : <i>Anal. Chem.</i> , 23, 1033 (1951).
(7) G. Warcollier, A. Le Moal, J. Taverneir :	(13) J. Cerbulis : <i>ibid.</i> , 27, 1400 (1955).
	(14) 宇野兵治郎, 小山 炳 : 醸工, 29, 219(1951).