

Brevibacterium linens の揮発性物質生成に 関する一般性状*

鴫田文三郎・細野明義・五條敏弘・中村蔚

信州大学農学部 畜産製造学研究室

緒 言

Brevibacterium linens (以下 *B. linens* と記す) は 0.6 から 2.5 μ の桿菌で、至適温度約 21°C, グラム陽性, 好気性, 好塩性を有し¹⁾, その栄養要求性からみると heterotrophic bacteria に属する^{2,3)}。また, 近年, リボフラビン, ニコチン酸, パントテン酸などのこの菌による生合成に関する基礎的研究⁴⁾ もおこなわれ, 新しい利用面の開発が期待されつつある。

B. linens は古くからリンブルガー, ブリックなど半硬質チーズの表面熟成菌として利用されてきた一つの菌種で, これらチーズの独特な風味, 早期熟成などはこの菌の作用によると考えられてきた。すなわち, 1930年頃より, Steinfatt⁵⁾ あるいは Albert ら⁶⁾ が *B. linens* の基礎的な諸性質の解明を進めるかたわら, 乳蛋白質の加水分解作用をゆうすることを認めた。その頃, Kelley ら⁷⁾ はこの菌がチーズの表面で, その熟成過程にチーズ蛋白質を分解する作用性を認め, その作用性が, 酵母との共棲において一層促進されることも認めた。この現象は Harttey ら⁸⁾, Iya ら⁹⁾ および Purko ら¹⁰⁾ に種々の興味を与え, リンブルガー, ブリックなどにおける *B. linens* と酵母との生育関係, 作用性など具体的な研究にまで発展した。その結果, これらチーズの熟成初期は主として酵母の作用が盛んで, その表面は次第にアルカリ側に傾き, その後 *B. linens* が作用し熟成に関与することが明らかにされ, 次第にこの事実が定説化するに至った。さらに, チーズのリンド部位に比較的多くの遊離アミノ酸の生成が定量され, 表面熟成菌としての *B. linens* の蛋白分解作用性も実際的に証明された^{11,12)}。

その後, この種のチーズは熟成が比較的早いことから, 主として *B. linens* の蛋白分解作用および蛋白分解酵素が研究の対象となり, その菌体外酵素^{13,14)}, ならびに菌体内酵素¹⁵⁾ の至適 pH, 阻害剤など酵素化学的な解明が行なわれ, 特殊な蛋白分解酵素生産経過も認められている。

上述のごとく, *B. linens* に関する研究は種々行なわれてきたが, その一つの特性である独特な風味物質の生産性についてはほとんど研究されず今日に至り, 単に「その風味は蛋白質の分解の結果生じてくるものと考えられる。」と述べた Kosikowski ら¹⁶⁾ の見解がその著書に認められるのみである。近年, 牛乳, 乳製品はもちろんのこと, 広く食品工業の分野においても微生物の代謝産物としての風味物質の生成機構およびその利用面の解明が強く要望され, またそれらの報告も決して少くない。著者らは *B. linens* の代謝機能と風味生成に関する一連の研究を進めているが, その初報として, *B. linens* の培養時における揮発性物質の産出経過を定性的に, あるいは定量的に, 今後の研究の問題を把握する目的も含めて追

* *Brevibacterium linens* の代謝とその応用 工

跡し、二、三の興味ある現象を得たので以下報告する。

実 験

1 供試菌株

ドイツの Weiphenstephan にある Milchwirtschaftliches Institut der Technischen Hochschule München から譲り受けた *B. linens* を加糖肉汁寒天培地(肉エキス1%, ペプトン1%, グルコース1%, 食塩0.5%, 寒天1.5%)に21°C, 10日間あらかじめ培養し, 4°Cで保存しておく。これから加糖肉汁培地(上記培地より寒天を除いたもの)に1白金耳接種し, 21°Cで2日間培養し, 同様にしてこれを二回継代培養したものを供試菌株とした。

2 培地と培養法

肉エキス1%, ペプトン1%, グルコース1%, 食塩0.5%からなる培地を供試標準培地(Medium-S)とした。この培地の各々の成分の濃度はそれぞれ0から10%に, またそのpHは4.0から10.0に変え, これらを互に組み合わせて調整したものを供試培地とし, 揮発性物質生成に対する培地の成分濃度ならびにpHの影響を観察した。なお, 本試験はそれぞれの試験培地に *B. linens* を2%量接種し, 往復振盪培養機(回転数140 r. p. m., 振巾70mm)により21°Cで所定の日数培養し, 以下の種々の分析に供した。

3 培養過程の性状

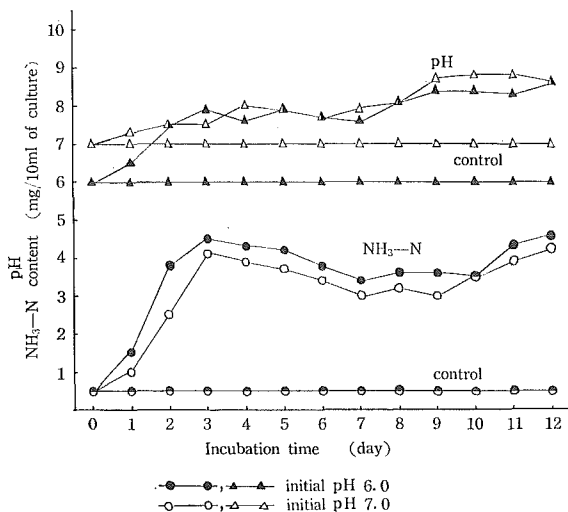


Fig. 1 Changes of pH and NH₃-N contents in cultures during incubation.

Initial pH of medium; 6.0 and 7.0

Incubation temp.; 21°C

Medium; Medium-S

glucose	1%
pepton	1%
bouillon	1%
NaCl	0.5%

まず, *B. linens* の供試標準培地における培養過程の一般的な性質を知るために, その pH の変化, NH₃-N の生産性, 揮発性物質の生産および培地の initial pH による影響などについて観察した。

a) pH およびアンモニア (NH₃-N) 含量の変化

pH の測定——培地の pH の調整および培養後の pH は東亜電波製ガラス電極 pH メーターで測定した。

NH₃-N の定量——アンモニアの定量は培養液 10 ml を Folin 法¹⁷⁾ に準じ, 室温で 90 分間通気し定量した。

図—1 は培地を pH 6 および 7 に調整し, 12 日間培養したときの経時的变化を示したものである。図より明らかなごとく, pH および NH₃-N 含量の変化が認められ, 特にその変化は培地の initial pH で異なるが, 培養日数 2 ~ 4 日付近にピークがあ

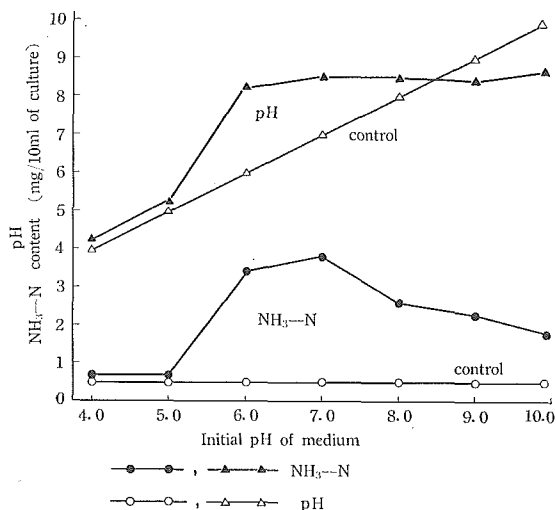


Fig. 2 Effect of initial pH of medium on changes of pH and NH₃-N content in cultures. Incubation; For 7 days at 21°C Medium ; Medium-S

から酸性側に傾く傾向を示す。微生物の発育あるいは代謝機能と培地の pH との関連性は古くから注意されてきた課題で、大腸菌の酸性培地において脱炭酸作用が、アルカリ性培地において脱アミノ作用が、より活性であるという結果¹⁸⁾と考え合わせると、上述の結果は今後の研究課題を示唆している。なお B. linens は生育に好ましい pH に自ら調整する性質をゆうしているという Sands¹⁹⁾の見解もあるが、その発育曲線より単純に肯定できないであろう。

b) 揮発性物質の含量変化

揮発性酸の定量——培養液 100 ml を硫酸酸性 (pH 2.0) にし、これを 3 l 容丸底フラスコにとり、減圧水蒸気蒸溜 (減圧度 4~12mmHg, 蒸溜温度 27° ± 3°C, 平均流出量 2~3 ml/min, 蒸溜時間 60分) を行ない、流出液を 0.1 N 苛性ソーダ (トラップ冷却温度約 -3°C) で受ける。これを 0.1 N 硫酸で逆滴定し、揮発酸中の中和に要した 0.1 N 苛性ソーダの ml をもって揮発性酸の総量とした。

揮発性塩基の定量——同一培養液 100 ml を苛性ソーダでアルカリ性 (pH 9.0) にし、前述の場合と同一条件で減圧水蒸気蒸溜を行ない流出液を 0.1 N 塩酸で受けてこれを 0.1 N 苛性ソーダで逆滴定し、揮発性塩基の中和に要した 0.1 N 塩酸の ml をもって総揮発性塩基とした。

なお、揮発性酸および塩基類の抽出法として用いた減圧水蒸気蒸溜法については次報以下で詳述するが、その回収率は総量で 90% 以上を示し、含有量と正の相関を示すことは明らかに認められている。

B. linens を 12 日間培養し、経時的にその総量の変化を調べ、その結果を図一 3 に示した。図の示すとおり、培養過程において、全般的に揮発性塩基の生産量が揮発性酸に比べ多いことが認められ、前述した培養過程の pH の変化からも予想されるごとく、一般に B. linens は揮発性塩基の生産性に富むことが明らかとなった。さらに、この生産性は培養日数の経過によってもなつて増加の傾向にあり、培養開始後 5 日、9 日、11 日目においてそれぞれピークをなしている。この現象は先に Friedman ら¹³⁾ が B. linens のプロテアーゼの生産性について検討した際に、4 日目と 8 日目に特異的なプロテアーゼ活性を示したことを報告しており、これを本結果と対比させると、プロテアーゼの活性の高い頃と揮発性塩基が多く生産される

り一つの特徴を示している。さらに第二のピークが 9~10 日付近に生じ、この菌の培養過程における活性、酵素作用性の一面を示唆している現象と考えられる。

次に、培地の initial pH と培養後の pH および NH₃-N 含量について観察した。結果は図一 2 に示した。図は 7 日間培養後の結果であるが、initial pH 6~7 付近で最も培地がアルカリ性に傾き、また NH₃-N 含量も高い。しかし initial pH が 4 付近では B. linens の活性はほとんど示さず、また、代謝生産物も認められない。また極端に培地の pH がアルカリ性であると、むしろ final pH

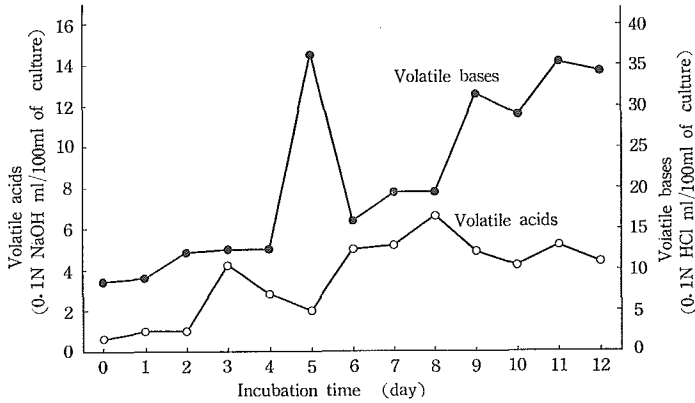


Fig. 3 Changes of total amounts of volatile acids and bases in cultures during incubation.

Incubation; 21°C
Initial pH; 7.0
Medium ; Medium-S

培養前の pH を 4.0~10.0 にし、これに *B. linens* を 7 日間培養したときの揮発性酸および塩基の総量を測定し、その結果を図-4 に示した。定量法は b) の方法と同様である。

図の示したとおり、揮発性物質は pH 4.0, 5.0 においてほとんど生産されない。また培養液においても、菌体の増殖した様子はほとんど認められなかつた。これは図-2 の結果からも予想されるところで pH 4.0, 5.0 において *B. linens* は生育できないものと思われる。このことは *B. linens* は pH 5 以下の酸性側で生育しないと、多くの実験で明らかにされている²⁰⁾ が、これと一致するところである。pH 6.0 以上になると酸性、塩基性両物質ともに若干生産され、pH 7.0 でその生産量が最高に達し、さらにそれよりもアルカリ側になると共に減少する傾向を示す。

揮発性酸は極く少数のケト酸を除けば、その多くは後述のごとく揮発性脂肪酸であつて、図の示す揮発性酸の酸量の変化はそのまま揮発性脂肪酸の酸量の変化を意味するものと解釈して誤りはないと考える。しかるに、揮発性脂肪酸の生成において糖、脂肪、アミノ酸がそのおもなる前駆物質であることはすでに衆知のところであり、かつ、それら前駆物質からの揮発性脂肪酸の生成機構は複雑である。ことに、本実験の pH 7.0 における揮

頃とがほぼ一致し、揮発性塩基の生成と蛋白質との関係を考えるとき、特に興味深いものがある。

c) 揮発性物質の生産と培地の initial pH

前項では、培養前の培地 pH が 7.0 の場合による揮発性の酸ならびに塩基の生産性について比較検討した。すでに a) で、菌の活性および代謝機能と培地の pH は重要な問題であることは述べた。ここではこれら揮発性物質の生成に対する pH の影響を検討する目的から

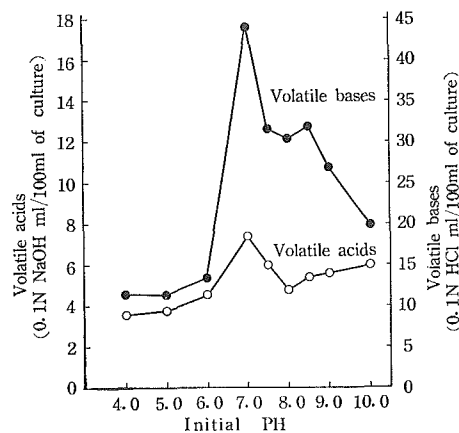


Fig. 4 Effect of initial pH of medium on the production of volatile acids and bases in cultures.

Incubation; For 7 days at 21°C
Medium ; Medium-S

発性酸の比較的多量に生産される結果はそれらいずれの前駆物質に由来するものか、その作用酵素の解明とともに重要な課題で、その全貌はいまだ不明であるが、個々の前駆物質および酵素作用については追って後報する。

一方、塩基として代表されるアミンの多くは α -アミノ酸からの脱炭酸によつて生成されると云われているが、Gale の研究¹⁸⁾によると、Str. faecalis, Cl. septicum, E. coli などのアミノ酸からアミンの生成に関与する decarboxylase は pH 5.0~8.0 においてよく生産され、またその酵素作用の至適 pH も同じ 5.0~8.0 の間にある。したがつて、それよりアルカリ側においてはその酵素の生産もなく、またアミンの生成もないことになる。他の細菌の decarboxylase の至適 pH は酸性側という記載²¹⁾ もあり、その他の報告も合わせて一般に、細菌の decarboxylase の至適 pH は中性から酸性側にあると云えるが、本実験における pH 7.0 付近での揮発性塩基の特異的な生成は B. linens の decarboxylase の産出もしくは作用至適 pH が 7.0 付近にあると予想することも可能である。

4 揮発性酸性物質

前述の実験で概括的ではあるが、B. linens の供試標準培地における揮発性の酸性および塩基性物質の生産性を把握することができた。また培地の initial pH による発育および代謝活性も概説できた。本実験ではさらに揮発性酸性物質の生産性と培地の initial pH およびその成分組成について検討した。

d) 培地組成とその生産

培地の pH の変化が酸の生成に如何に影響するかは c) で述べたが、本実験では供試標準培地の組成成分の変化にともなう酸の生産量の変化について検討した。この酸の定量法は b) に述べた方法によつた。図—5 はそれぞれの培地組成濃度を 0~10% に変え、また initial pH を 7.0 として 21°C で 7 日間培養したときの結果である。

まず、食塩濃度の影響であるが、揮発性酸はその濃度 5% 付近で最高の生産量を示す。B. linens は耐塩性が強く、15% の食塩濃度でも生育し得る²²⁾ と云われているが、チーズの熟成過程に他の微生物の汚染を防止できる一つの性質として貴重である。しかし、耐塩性とはいえ、本結果より明らかなごとく、5% 以上の食塩濃度で B. linens の揮発性酸の生産性は低下し、さらに後述するごとく揮発性塩基の生産も 3% 以上の食塩濃度ではその生産量が低下しており、高濃度の食塩含量下では風味物質を円滑に生産出来ないことを示している。この傾向は一般微生物も同様で、たとえば Str. diacetylactis および Leu. lactis などの有用微生物による芳香性物質の生産性も、その至適塩度は異なるが類似した傾向を示す²³⁾。

肉エキス、ペプトンの場合は図—5 に示すごとく、その濃度が高い程、酸の生産性を増す傾向を示すが、特にペプトン濃度の影響が顕著である。このことは、蛋白質あるいはアミノ酸類が酸の前駆物質となつてゐることを意味し、その関連性の深いことを示している。次にグルコースについての結果をみると、その濃度が 1% 付近で最高の生産量を示している。揮発性酸の生成において、グルコースは重要な前駆物質になつてゐることは前述したところであるが、B. linens の場合も揮発性酸生成に対し、グルコースがなんらかの重要な役割を演じているものと考えられる。

e) 揮発性脂肪酸とその含量

培養過程に生産された揮発性物質の種類についてはガスクロマトグラフィーで定量した。

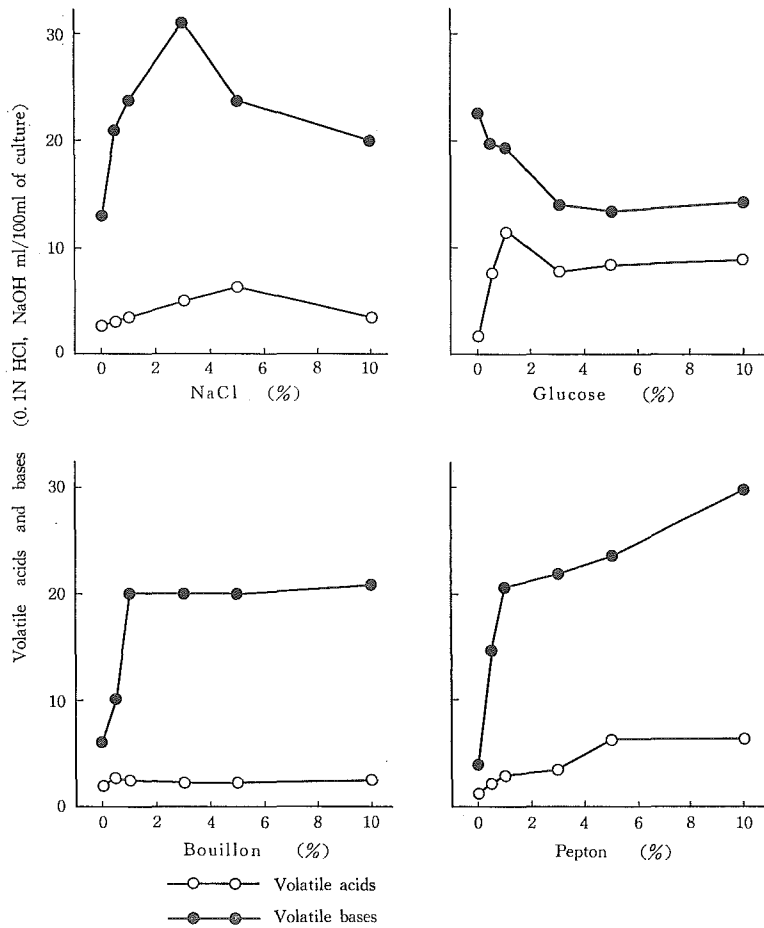


Fig. 5. Effect of media components on the production of volatile acids and bases in cultures.

Incubation; For 7 days at 21°C

Medium ; Varying the concentration of only one component in Medium-S.

揮発性脂肪酸の抽出——b) で述べた蒸溜法で得た流出液を 0.1N 苛性ソーダで中和し、揮発酸をナトリウム塩とした後、500 ml 容共通撹合せナス型フラスコにうつし、35°C で減圧乾固した。これを約 30ml の蒸溜水で洗い出し、再び硫酸酸性にして 20~30 ml のエチルエーテルで 3 回抽出し、最後にエーテルを除去したものを G. C. による揮発性脂肪酸分離定量のための試料とした。

ガスクロマトグラフィー (G. C.) ——G. C. による揮発性脂肪酸の定量法は中江ら²⁴⁾ の方法に準じた。すなわち、装置として、柳本製ガスクロマトグラフ GCG-200 型および水素炎検出器 GCF-100 型を使用し、カラム (銅製 2 m × 0.5 cm) に Diasolid S-Tween 20 (95 : 5)、キャリアーガス He、その流速 60 ml/min.、カラム温度 125°C、試料室温度 180°C でおこなった。得られたガスクロマトグラムのピーク確認は標準脂肪酸の検量線を作成し、その保持時間によった。また、定量はその検量線から得られた面積重量法換算係数により計算した。なお、本実験は供試標準培地を用い、21°C の温度で培養したものである。

Table 1. Gaschromatographic analysis of volatile fatty acids in cultures during incubation.

Incubation time	Volatile Fatty Acids (%)						
	Acetic	Propionic	i-Butylic	n-Butylic	i-Valeric	n-Valeric	Caproic
0	—	—	—	—	—	—	—
1	34.72	6.54	5.64	0.60	29.99	—	22.51
2	30.79	2.76	7.52	0.14	39.21	—	19.68
3	43.90	3.77	10.09	1.11	31.22	t	9.91
4	35.51	1.44	11.91	2.92	30.51	t	17.71
5	25.71	t	23.08	3.02	30.43	t	17.75
6	28.74	2.26	7.48	2.49	48.56	t	10.47
7	33.76	2.94	15.78	2.61	36.61	t	8.30
8	49.07	4.15	11.94	0.22	21.67	0.17	12.78
9	43.22	0.19	8.47	0.46	33.49	t	14.17
10	60.38	0.28	8.66	0.44	20.30	t	9.94
11	43.15	t	3.22	t	30.08	t	23.55
12	57.21	0.24	4.66	0.22	26.54	t	11.22

Incubation; 21°C
 Medium ; Medium-S

t; trace,
 —; undetected

表1はその結果を示すものである。培養過程において各揮発性脂肪酸とも複雑な増減を示している。これは培養過程において各揮発性脂肪酸の酸化、分解、消費さらには *Cl. kluveri* にみられるような酢酸→酪酸→カプロン酸のごとき相互転移²⁵⁾などの諸因が重なったためによる結果と考えられるが、その原因解明は困難である。しかしながら、全般的に酢酸、i-吉草酸、カプロン酸が他の脂肪酸に比べかなり多い。ことに、i-吉草酸についてはこれまでに他のチーズスターターがi-吉草酸を多量生産したことを論じた報告がないことから、この現象は *B. linens* が持つきわめて特異的な性質と云わなければならない。

一方細菌によるイソ系揮発性脂肪酸の生成機構については現在のところバリン、ロイシン、イソロイシンからの生成が知られている。すなわち、Ritterら^{26, 27)}はグルイエール、ティルジット、リンブルガーチーズから分離した好気性菌(ミクロコッカス)によつて、バリン、ロイシンから脱炭酸により、それぞれ直接にi-酪酸およびi-吉草酸が生成することを論じている。さらに中江ら²⁸⁾も市販チェダーチーズから分離した乳酸桿菌の resting cell を用いて、ロイシンからのi-吉草酸の生成および、バリンからのi-酪酸の生成を報告している。その他、ルーメンバクテリアによるロイシンからのi-吉草酸の生成²⁹⁾も報告されており、*B. linens* の特異的なi-吉草酸の生成においてもこれらアミノ酸が重要な前駆物質になっているものと思われる。

またi-吉草酸のみならず、他の揮発性脂肪酸についても同様に各種アミノ酸がそれらの

前駆物質になり得ることが予想される。すでに乳酸菌についてはホエー培地にカザミノ酸や単独アミノ酸を添加した場合に揮発性脂肪酸の生成量が増すこと³⁰⁾や、また resting cell を各アミノ酸に作用させた場合に揮発性脂肪酸が生成すること^{28,31)}から、アミノ酸からの揮発性脂肪酸の生成が明らかに証明されている。B. linens においてもアミノ酸から揮発性脂肪酸が生成することの可能性も強く、糖および脂肪からの生成と合わせて次報で詳述する予定である。

5 揮発性塩基性物質

B. linens による揮発性塩基性物質の生産は酸より多いことはb)で述べた。このことは緒論でも述べたごとく、B. linens の生成する特有の風味と関係あるものと著者らは考えている。本実験では酸と同様、その生産性と培地の initial pH およびその組成について定性的に検討した。

f) 培地組成とその生産

d)で述べたと同様、培地の組成の変化による揮発性塩基性物質の生産量の変化について検討した。この塩基の定量法はb)に述べた方法に準じた。図一5はその結果で、培養条件はd)と同様である。

まず、食塩濃度の影響であるが、揮発性酸の生産とは異なり、塩基性物質は食塩濃度3%で最高の生産量を示した。肉エキス、ペプトンの濃度による変化を見ると、その濃度が高い程塩基性物質の生産量が増加している。この傾向は前述の揮発性酸と比較してその生産が顕著であり、塩基性物質の生産と蛋白質あるいはその分解物との関連性は揮発性酸より一層密接であることを示唆している。

さらに、グルコースについてみると、塩基の生産が糖濃度の増加にともない減少している。これは Koessler ら³²⁾が Colin. bacilli の Growing Culture を用いてヒスチジンからのヒスタミンの生成を研究した際、グリセロールやグルコースのような容易に利用される炭素源を入れておかないとアミンは生成されないと述べている事実と全く相反する結果であり、B. linens においては揮発性塩基に対し、糖の存在はむしろ阻害的であることが認められる。

g) 塩基、特にアミン類の定性

揮発性塩基の組成について、二、三の知見を得るため、培養7日目の培養液を用いて、その代表されるアミン類について定性的試験を行なった。その試験方法は次のとおりである。

塩基性物質の抽出——b)項で述べた塩基性物質の抽出法によって得たものを塩酸塩とし、これを(抽1)とした。その時の蒸留残留物から99%のエタノールを用いて抽出³³⁾して得たものを(抽2)とした。さらに、アルカリ性にした培養液を Block ら³⁴⁾の方法に準じ、エーテルにより48時間連続抽出し、これを0.1N 燐酸で受け、抽出後これを苛性ソーダで中和しn-ブタノールで抽出、硫酸ナトリウムで乾燥後塩酸塩としたものを(抽3)とした。

ペーパークロマトグラフィー——東洋濾紙 No. 50 を用い、展開剤としてブタノール、酢酸、水(4:1:2)を用いた。顕色試薬および反応として、Ninhydrin 試薬、Dragendroff 試薬、Diazo 試薬、芥子油反応および坂口反応を用いた。試料はすべて供試標準培地を用い、7日間、21°C で培養したものから調製し、前述の三方法で抽出した塩酸塩をペーパークロマトグラフィーで検討した。

検出されたクロマトグラムは図一6に示した。図は Ninhydrin 陽性スポットであるが、それぞれ(抽1)から、Rf値0.25, 0.47, 0.60, 0.94の四種、(抽2)から0.26の一種、(抽

3) から 0.35, 0.48, 0.92 の三種, 計八種類のスポットが認められた。各スポットを順に A ~ H とし (図-6), 上述の各種顕色反応と Rf 値³⁵⁾ から, A; ヒスタミン, B; エチルアミン, C; チラミン D; H; ジブチルアミン E; カタベリン, F; メチルアミン, G; ジエチルアミンと判定した。なお, カタベリンのブタノール, 酢酸, 水 (4:1:2) を用いる Rf 値は文献未知であるので, ブタノール, 酢酸, 水 (4:1:5) の Rf 値 0.17³⁶⁾ より判定した。特に, Rf 値 0.25 付近は種々の物質, たとえばプトレッシン, カタベリン, ヒスタミンなどが, 重複するところであるが, スポット A は Diazo 反応陽性であったことから, Imidazol 核をゆうすることが明らかであり, また, カタベリン, プトレッシンに特有の反応である黒野法³⁷⁾ で陰性を示した。さらに, 脂肪族第 2 級アミンのニトロプルシットナトリウムおよびア

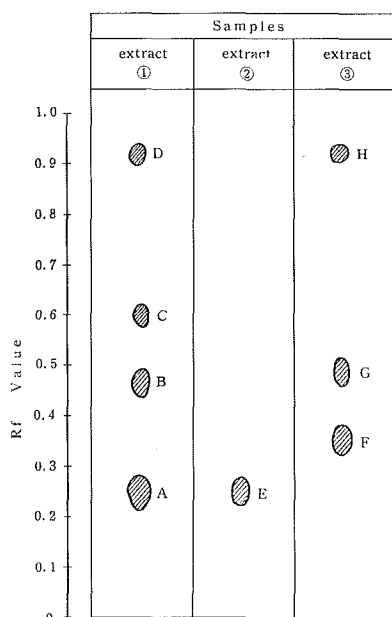


Fig. 6 Paper chromatograms of amines extracted from the culture.

Incubation; For 7 days at 21°C
Initial pH; 7.0
Medium ; Medium-S
Solvent ; Butanol-Acetic acid-Water (4:1:2)

Character of spots for reactions.

Reactions	Spots							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Ninhydrin reaction	+	+	+	+	+	+	+	+
Dragendorff's reaction	+	-	-	-	+	+	-	-
Diazo reaction	+	-	+	-	-	-	-	-
Musterd oil reaction	+	-	-	-	+	+	-	-
Sakaguchi's reaction	-	-	-	-	-	-	-	-

セトアルデヒドによる検出³⁸⁾ で陰性を示した。したがって, スポット A はヒスタミンの脱炭酸したヒスタミンと判定した。さらに, スポット E はカタベリンあるいはプトレッシンのいずれかであることが予想され, 96% エチルアルコールの溶解度試験よりカタベリンと判定した。なお, ヒスタミンの生産量は比較的多く, その塩酸塩として容易に結晶単離することが可能である。

アミン類はチーズ中にも含有していることは以前から知られていること^{39, 40)} で, その含量が多い場合不快臭の原因になると一般にいわれている⁴¹⁾。しかしながら, 一方 B. linens による熟成チーズの特有の風味に対するこれらアミンの帰与も見のがせないところであり, 今後本格的な検討が必要である。なお, プトレッシン, スペルミン, スペルミジンなどが L. casei⁴²⁾, H. parainfluenzal⁴³⁾ などの発育を促進する補助因子としても注目され, 特に B. linens と乳酸菌との共棲を論ずる上にも興味ある問題と考えられる。

6 揮発性中性物質

h) 培地組成とその生産

前述の各種実験においては揮発性中性物質について全く触れなかつたが, 中性物質の中でも特に中性カルボニル化合物およびアルコール類は風味物質

として重要である。したがって、上述の酸性、塩基性、両物質の試料と同様の条件で得たものについて、下記の方法で定性的に検討した。

揮発性中性物質の定性——Bodnar ら⁴⁴⁾の方法に準じ次の方法により行った。培養液から10 ml とりこれをゴムキャップを付した20 ml 容試験管にとり、無水硫酸ナトリウム6 gを飽和させ、5分間振盪した後、70°Cの水浴中に5分間浸し、10 ml 容のシリンジをゴムキャップにさしこみ、ピストンを5回往復させ、試料中の head space (約9 ml 容) sample 10 ml をとり、G. C. 用試料とした。使用した G. C. は前述の柳本製を用い、カラム (2 m×0.5 cm) に Celite—polyethylene glycol 4000 (95:5)、キャリアーガス He、その流速 45 ml/min.、カラム温度 70°C の条件で検出した。得られたガスクロマトグラムの定性は既知標準物質の保持時間によった。さらに、補助的手段として、Feigl の記載⁴⁵⁾に従い以下の検出反応を行った。すなわち、アルコールの検出にキサントゲン酸反応および Davy 反応、アルデヒドの検出にアンモンニヤ性銀溶液 (Tollens 試薬) 法、Fehling 試薬法および Nessler 反応、カルボニル化合物の検出にヨードホルム試験、亜硫酸水素ナトリウム—ヨード反応および Nessler 反応をそれぞれ用いた。

なお、上述の head space sample によるガスクロマトグラムは、定量的な検討の結果、含量ピーク面積とは正の相関を示すが、最高で14%の変動を示すので、ピークの高さ (mm) × ピークベース (mm) により定性的にその含量を示した。

結果は表—2に示したとおりである。なお、表—2には培地成分の濃度を変えた各培地のうち、揮発性酸および塩基の生産がそれぞれ比較的多かつた培養液についてのみ示した。表に示されているとおり、培養7日目におけるそれら風味物質の組成を示すガスクロマトグラムからカルボニル化合物として、フォルムアルデヒド、アセトアルデヒド、アセトンの三種、アルコールとして、エタノール、i-プロパノール、n-プロパノール、i-ブタノールの四種が検出されている。

また、表には示していないが c) および d) と全く同じ方法で揮発性中性物質の生成におよぼす培地の pH ならびに培地養分濃度の影響について検討した。その結果は次に要約されるとおりである。

Table 2. Gaschromatographic analysis of neutral volatile substances

Medium Neutral Volatiles	NaCl		Glucose		Bouillon		Pepton	
	3%**	5%*	0%**	1%*	1%*	10%**	5%*	10%**
Formaldehyde	52***	44***	72***	140***	72***	80***	118***	162***
Acetoaldehyde	108	88	2	116	114	2	228	8
Aceton	2	1	0	4	2	216	20	408
Ethanol & i-Propanol	8	1	0	28	8	154	20	324
n-Propanol	0	0	20	0	0	0	160	50
i-Butanol	24	48	30	84	6	0	770	816

Incubation ; For 7 days at 21°C

Medium ; Varying the concentration of only one component in Medium-S.

- * The medium which produced large amounts of volatile acids.
- ** The medium which produced large amounts of volatile bases.
- *** The value; Peak height (mm)×Peak width at base(mm).

まず、培地の pH の影響であるが、initial pH 7～8 付近において最も多く揮発性中性物質が生産し、食塩はその低濃度においてアセトン、エタノールの生成が多く、高濃度（食塩濃度10%）においては i-ブタノールを多く生産する特性を示した。また、アルデヒド類の高い生産を望む場合は培地の糖濃度を高く（約5%）するのが良いことを認めた。肉エキスおよびペプトンなどの濃度と生産中性物質の量は必ずしも一致しないが、これらの高濃度（約10%）はアセトアルデヒドの生成を顕著に減少する傾向を示し、3から5%の培地濃度で生産が最も大であった。総括して、一般に中性物質の生成においても培地成分濃度の影響が大きいことが認められ、特に肉エキス、ペプトンの濃度差によつてアセトアルデヒド、アセトンの生成量が大きく増減している。

一方、これら化合物は乳製品に芳香性を与え、以前からチーズやバターにおける重要な風味物質として研究され、その生成機構についても漸次明らかにされている。チーズにおける中性カルボニル化合物の生成はクエン酸醗酵、アミノ基転移などにより酸性カルボニルが生成され、これが中性カルボニルの前駆物質になるといわれている⁴⁶⁾。そして Bassett ら^{47,48)} はペーパークロマトグラフィーによつて多くの酸性および中性カルボニル化合物を同定し、各種チーズにおける特徴的なケト酸の生成様式を明らかにしている。それによると、ブルーチーズでのケト酸がクエン酸醗酵と脂肪酸の β 酸化によつて生成するのに対し、B. linens により熟成するブリック、リンブルガーなどのチーズにおいてはケト酸はおもにクエン酸醗酵とアミノ基転移により生成することが明らかにされている。また、アルデヒドの生成についても、その機構が明らかにされており、アミノ酸のストレッカー分解によるものが主であると云われている^{49,50)}。さらに、これらケトンおよびアルデヒドの還元によりアルコールが生成することも衆知のところである^{51,52)}。このように、これら中性風味物質の生成機構は必ずしも単純ではないが、チーズ、バターに限らず in vitro での培養過程においてもこれら風味物質の生成機構は本質的には同じであろうことは充分予想されるところであるが、本報では単に中性風味物質の生産性の傾向について記述するに止める。

なお、本実験では三種類のカルボニル化合物、四種類のアルコールを検出したのみに終つたが、最近 Day ら⁵³⁾ が分子蒸溜、ガスクロマトグラフ、質量分析計の手法を用いてブルーチーズよりおよそ100に近い中性風味物質を検出していることから、B. linens の場合もこれらの手法を用いればさらに多くの中性風味物質の検出が可能と考えられる。

以上、本実験では B. linens の培養過程における風味物質として、揮発性酸ならびに揮発性塩基の生産性およびそれらの組成について比較検討し、またそれにおよぼす培地の pH および養分濃度の影響について検索した。さらに、培養中に生産された中性風味物質の組成についてもふれた。

得られた諸結果の中で B. linens が揮発性塩基の生産性に富み、特にヒスタミンの含量が高いこと、および揮発性脂肪酸として i-吉草酸が特異的に生産される事実などは B. linens の生産するいわゆる「リネンス風味」を特徴づける現象の一つと考えられ、今後の研究において特に注目したい結果であるように思われる。本報告は B. linens の培養過程における一般性状を認識するため、定性的な実験法に基づいての結果を述べたが、その個々については追つて後報する。

要 約

B. linens の生産する風味物質およびその一般的性状を知る目的から、本報では、培養過程の性状あるいは揮発性物質の生産性について種々検討を行なつた。すなわち、揮発性物質としては、酸性、塩基性および中性物質を対照とし、培地の pH、組成と菌の発育およびそれらの生産性を比較検討し、さらに、その組成について定量的にあるいは定性的に分析した。結果は次のごとく要約される。

1 *B. linens* は培地 pH 4~5 付近でほとんどその発育が認められない。しかし、それ以上の pH では発育し、pH 7 付近で最も顕著である。7 日間の培養で培地の final pH は主に 8.5 付近に変化するが、培地の initial pH 9~10 の強アルカリの場合、むしろ酸性側に変化し同じ final pH を示した。NH₃-N の生産性は菌の発育の顕著な pH 6.0~7.5 で最も大である。なお、培養過程の pH および NH₃-N の生産性の変化は単純なシグモイド曲線を示さなかつた。

2 揮発性塩基性物質は他の酸性および中性物質と比較して、その生産量が多く、*B. linens* の特有の風味を構成する主成分と考えられる。一方、酸性および中性物質の生産も決して少くない。なお、塩基性および酸性物質の生産は培地 pH 7 付近で最も大であり、また、培養の経過に伴うその生産性は複雑で、培養後 5, 9, 11 日付近にそれぞれ含量のピークを示した。

3 揮発性酸は培地のグルコース、肉エキス、ペプトンの含量が多くなるにしたがつてその生産が増加する傾向を示し、また、食塩 5% の濃度で最も大であつた。その組成は酢酸、i-吉草酸、カプロン酸が多く、ことに i-吉草酸の多量生産性は文献未知の新事実である。

4 揮発性塩基は培地の肉エキス、ペプトン含量の増加で顕著に多くなり、また食塩濃度 3% の時、最も多い生産量を示した。しかしグルコースの存在はむしろその生産を減少させる傾向を与える。その中のアミン類として、ヒスタミン、エチルアミン、チラミン、ジブチルアミン、カタペリン、メチルアミン、ジエチルアミンなどを検出した。

5 揮発性中性物質として、フォルムアルデヒド、アセトン、アセトアルデヒド、エタノール、i-プロパノール、n-プロパノール、および i-ブタノールなどを検出した。すなわち、三種のカルボニル化合物と四種のアルコールを認めた。これらの物質の生産においても培地の各成分濃度の影響が大であり、特に肉エキス、ペプトンの濃度差がアセトアルデヒド、アセトンの生産に影響するところ大であつた。

文 献

- (1) Breed, R. S., Murray, E. G. D., and Smith, V. R., (1957) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* P. 492
- (2) Friedman, M. E., Wood, W. A., and Nelson, N. E., (1953) *J. Bact.*, 66:568
- (3) Purko, M., Nelson, W. O., and Wood, W. A., (1953) *ibid.*, 66:561
- (4) Karlin, R., and Bertoye, R., (1964) *C. R. Soc. Biol.*, 158:336
- (5) Steinfatt, F., (1930) *Milchwirt. Forsch.*, 9:1
- (6) Albert, J. O., Long, H. F., and Hammer, B. W., (1944) *Iowa Agr. Expt. Sta. Reseach Bull.*, P. 328
- (7) Kelley, C. D., and Marquardt, J. C., (1939) *J. Dairy Sci.*, 22:309
- (8) Hartley, C. B., and Jezeski, J. J., (1944) *ibid.*, 27:413
- (9) Iya, K. K., and Frazier, W. C., (1949) *ibid.*, 32:475
- (10) Purko, M., Nelson, W. O., and Wood, W. A., (1951) *ibid.*, 34:699
- (11) Tuckey, S. L., and Sahasrabudhe, M. R., (1957) *ibid.*, 40:1329
- (12) Szumski, S. A., and Cone, J. F., (1962) *ibid.*, 45:349
- (13) Friedman, W. O., Nelson, W. O., and Wood, W. A., (1953) *ibid.*, 36:1124
- (14) Thomasow, J., (1950) *Kieler Milchwirt. Forsch.*, 2:35
- (15) Kwei-Hay Wong, and Cone, J. F., (1964) *Bact. Proc.*, P. 2
- (16) Kosikowski, F. V., and Moquot, G., (1958) *Advances in cheese technology* P. 139
- (17) 藤井暢三 (1961) *生化学実験法* P. 69 南江堂
- (18) Gale, E. F., (1946) *Adv. in Enzymole.*, 6:1
- (19) Sands, M. A. R., (1953) *Abstr. Doct. Diss. St. Coll.*, 16:91
- (20) Foster, E. M., Nelson, F. E., Speck, M. L., Doestch, P. N., and Olson, J. C., (1957) *Dairy Microbiology* P. 66
- (21) 赤堀四郎他編 (1964) *生化学講座* 5 P. 44 共立出版
- (22) Foster, E. M., Nelson, F. E., Speck, M. L., Doetsch, P. N., and Olson, J. C., (1957) *Dairy Microbiology* P. 33
- (23) Račić, J., Obradović, B., and Mitić, S., (1965) *Milchwiss.*, 20:341
- (24) Nakae, T., and Elliott, J. A., (1965) *J. Dairy Sci.*, 48:287
- (25) Stadman, E. R., and Barker, H. A., (1949) *J. Biol. Chem.*, 180:1085
- (26) Ritter, V. W., and Hanni, H., (1960) *Milchwiss.*, 1:296
- (27) Ritter, V. W., and Hanni, H., (1960) *Path. Microbiol.*, 23:669
- (28) Nakae, T., and Elliott, J. A., (1965) *J. Dairy Sci.*, 48:293
- (29) Bladen, H. A., Bryant, M. P., and Doetsh, R. N., (1961) *ibid.*, 44:173
- (30) 中江利孝・細野明義・中西武雄 (1964) *日畜会報* 35:167
- (31) Nakae, T., and Elliott, J. A., (1965) *J. Dairy Sci.*, 48:287
- (32) Koessler, K. K., and Hanke, M. T., (1919) *J. Biol. Chem.*, 39:539
- (33) 岩本多喜男 (1957) *薬誌* 77:1180
- (34) 杉山登 (1964) *有機化合物の微量確認法* P. 224 培風館
- (35) Bremmer, J. M., and Kenten, R. H., (1951) *Biol. Chem. J.*, 49:651

- 36 Lederer, E., (1957) *Chromatography* P.204
- 37 黒野勘六 (1921) 農学会報 231:747
- 38 名大外科教室 (1958) 名大医学 76:1
- 39 Silverman, G. J., and Kosikowski, F. V., (1954) *J. Dairy Sci.*, 37:645
- 40 Silverman, G. J., and Kosikowski, F. V., (1955) *ibid.*, 38:950
- 41 Silverman, G. J., (1955) *Dissertation Abst.*, 15:968
- 42 Kihara, H., Klatt, O. M., and Snell, E. E., (1952) *J. Biol. Chem.*, 197:801
- 43 Herbst, E. J., Keister, D. L., and Weaver, R. H., (1958) *Arch. Biochem. Bioph.*, 75:178
- 44 Bodnar, S. J., and Mayeux, S. J., (1958) *Anal. Chem.*, 30:1384
- 45 Feigl, F., (1954) *Spot tests II. Organic applications*
- 46 Harper, W. J., (1959) *J. Dairy Sci.*, 42:207
- 47 Bassett, E. W., and Harper, W. J., (1956) *ibid.*, 39:918
- 48 Jackson, H. W., and Hussony, R. V., (1958) *ibid.*, 41:920
- 49 Jackson, H. W., and Hussony, R. V., (1958) *ibid.*, 41:1206
- 50 Keenery, M., and Day, E. A., (1957) *ibid.*, 40:874
- 51 Schönbery, A., et al., (1952) *Chem. Rev.*, 50:261
- 52 赤堀四郎他編 (1962) 生化学講座 11 P.43-82 共立出版
- 53 Day, E. A., and Anderson, D. F., (1965) *Agri. and Food Chem.*, 13:2

Primary Observation on the Production of Volatile Substances by *Brevibacterium linens*

by Fumisaburo Tokita, Akiyoshi Hosono,
Toshihiro Gojo and Masashi Nakamura

Laboratory of Animal Products Technology, Fac., Agric., Shinshu Univ.

Summary

The close relationship of *B. linens* and a characteristic cheese flavor of Limburger and Brick which are ripened by the micro-organism has long been recognized but no work on the role of actions of it to the flavor production seems to have been undertaken. This paper is a general preliminary report on the behavior of *B. linens* during incubation for the purpose of investigating this problem.

In this experiments liquid standard medium (Meidum-S; peptone 1%, glucose 1%, bouillon 1%, NaCl 0.5%, pH 7.0) was used for the most part. *B. linens* was incubated at 21°C for various prescribed time in the Medium-S and other media varying pH and the concentration of only one component from the Medium-S, then changes of pH, $\text{NH}_3\text{-N}$ contents, and amounts and components of volatile acids, bases, neutral substances separated from cultures by steam distillation were observed qualitatively and quantitatively by the methods of gaschromatography (G. C.), paper partition chromatography (P. P. C.) and others. The results obtained are summarized as follow.

(1) *B. linens* scarcely grew under the initial pH 4.0 to 5.0. In initial pH 6.0 or above, however, it grew remarkably. Especially, near in initial pH 7.0 was the most favorable condition for its growth. After incubation for 7 days pH in cultures were constantly brought to near 8.5 (Fig. 2).

The contents of $\text{NH}_3\text{-N}$ in cultures increased but no sigmoid curve during incubation, and it was observed larger in the cultures incubated for 5, 9 and 11 days under initial pH 6.0 to 7.0 (Fig. 1).

(2) Near in the initial pH 7.0 of media was the most favorable condition for the production of volatile bases and acids during incubation (Fig. 4).

Volatile bases were always quantified larger amounts than volatile acids and neutral substances in each medium and their contents were increased but no linear during incubation as $\text{NH}_3\text{-N}$ contents (Fig. 3). It is quite possible from the facts that volatile bases were main components of the characteristic cheese flavor ripened by *B. linens*. On the other hand contents of the volatile acids and neutral

substances were also quantified no linear during incubation such as that of the bases.

(3) The higher concentration of bouillon, pepton or glucose in media proportionally increased the production of volatile acids, and 5% NaCl content was the most proper condition for their production (Fig. 5).

Form the data of G.C., acetic, propionic, iso-butyric, n-butyric, iso-valeric and caproic acids were commonly found in media. Among these fatty acids acetic, iso-valeric and caproic acids were found a remarkable heigher (Table 1), especially, iso-valeric acid was the most interesting because of no such high production had been found in the other cheese starters.

(4) Bouillon or pepton in medium was also useful component to produce the volatile bases, and 3% NaCl was favorable to its production (Fig. 5).

Volatile amines were isolated and identified by P. P. C. and spot tests. Histamine, thyramine, dibutylamine, monoethylamine, monomethylamine, diethylamine and cadaverine were then comformed (Fig. 6). Histamine was found larger amounts than the others and crystalized easily from the distilate.

(5) As neutral volatile substances, three neutral carbonyl compounds and four alcholes have been detected by G.C. and spot tests. They were formaldehyde, acetoaldehyde, acetone, ethanol, iso-propanol, n-propanol and iso-butanol. Their production were also effected by a medium components, especially, bouillon or pepton were effected remarkably on the production of acetoaldehyde and acetone (Table 2).