発酵乳中安息香酸の前駆物質について

(昭和 44 年 9 月 6 日受理)

西本孝男* 上田雅彦* 田植 栄*

The Precursor of Benzoic Acid in Fermented Milk

Takao NISHIMOTO, Masahiko UYETA and Sakae TAUE

(Kochi Prefectural Public Health Laboratory: 5 Marunouchi, Kōchi)

In market fermented milk approximate ten ppm level of benzoic acid is detected commonly. The previous paper¹⁾²⁾ has indicated the presence of benzoic acid in skimmilk as the material of fermented milk, and also benzoic acid as a fermented product by *Lactobacillus* in skimmilk medium. This paper showed that the precursor of benzoic acid, metabolite by lactic acid bacteria, is hippuric acid.

It was found that when *Lb. casei* was grown in a skimmilk medium, benzoic acid was formed in the culture broth while hippuric acid disappeared. The conversion of hippuric acid into benzoic acid was demonstrated with a good equivalent relation between the amount of hippuric and benzoic acids before and after incubation. Such activity of hippuric acid degradation was confirmed to be present widely in *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Leuconostoc*.

(Received September 6, 1969)

まえがき

発酵乳に検出される 10 ppm 程度の安息香酸 (BA) は原料の脱脂粉乳 (SM) 由来で¹⁾, かつ乳酸菌の代謝産物と推定されること²⁾ はさきに報告した. SM 中の BA は国産, 輸入品とも 1~60 ppm 程度で一定しないが, それらを培地として乳酸菌を培養すると, すでに存在した BA の数倍量が培地中に蓄積されるのが普通である. そこで発酵乳中の BA は SM 由来のものと, 乳酸菌による生産物がプラスされたものと推定できる. この乳酸菌の代謝過程に生成される BA の前駆物質について検討を加えたのでその結果を報告する.

実験方法

1) BA 前駆物質の抽出, 同定

抽出試料としては市販 SM を用いた. BA 前駆物質は水溶, 透析性であるが, イオン交換, ゲルろ過などの方法で分離できず, 粉乳そのものより 70~80% アセトン, 80~90% メタノールで定量的に抽出される. 抽出物の溶媒を減圧で除き残渣を水にとかして酸性として食塩を飽和したのち酢酸エチルまたはエーテルで抽出, 溶媒層を 5% 重炭酸ナトリウム液で洗い高級脂肪酸などを除いた水層を酸性とし再び食塩を飽和し酢酸エチルまたはエーテルで抽出し酸性フラクションを得る. BA 前駆物

質はこのフラクションに 90% 程度の収率で移行してくる. この抽出物を *n*-ヘキサンで洗浄すると遊離脂肪酸, BA はほとんど除かれるが, BA 前駆物質は全く溶離しないので, 残渣を水または 50% メタノールより再結晶すると, mp 187° の白色針状結晶を得た. このものは赤外スペクトル, ガスクロマトグラフィー (GC), 混融などの知見から馬尿酸 (HA) と同定された.

2) 前駆物質の確認方法

抽出過程での BA 前駆物質の確認は, カザミノ酸 25.0, 酵母エキス 5.0, ブドウ糖 40.0, KH₂PO₄ 1.0, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.4, FeSO₄·7H₂O 0.02, MnSO₄·4H₂O 0.02 g/L の培地に, 10% となるように抽出物を加え *Lb. casei* IAM 1045 を接種し, 37°, 24 時間培養後培地中に生成した BA を GC で定量することにより行なった.

3) GC による BA および HA の定量方法

BA の定量は試料 50 g を酸性とし食塩を飽和したのちエーテル 70 ml で 3 回抽出, 各回に遠心分離, エーテル層を合し 5% 重炭酸ナトリウム液 50 ml で 2 回洗い, 水層を酸性とし再び食塩を飽和したのちエーテル 70 ml で 3 回抽出する. エーテル層を飽和食塩水で 1 回洗浄し無水硫酸ナトリウムのカラムに流して乾燥後, Kuderna-Danisch 濃縮器で 5 ml とし遊離のまま,

* 高知県衛生研究所: 高知市丸の内 5

Benzophenone を内標準として DEGS-H₃PO₄ (5:1) カラム, 170~180° で定量する. この方法で 10% SM より 10 ppm BA の回収率は93~97%であった.

HA は C. M. Williams' らの方法³⁾ にならい試料 50 g より BA の場合と同様にして得た抽出物をメタノールにとかしジアゾメタンでメチルエステル化したのち *p*-hydroxy secondarybutyl benzoate を内標準として BA に使用したと同じカラム, 200° で定量する. 10% SM からこの方法による 20 ppm HA の回収率は85~88%であった.

4) 乳酸菌による HA 分解 BA 生成 (HA→BA) の検討

使用菌株のうち *Lactobacillus* は理研より, *Streptococcus*, *Leuconostoc* は応微研, 醸酵研より分与を受けた. *Lactobacillus* は理研光岡の分類⁹⁾ に従い *Lb. bulgaricus* IAM 1043, 1084, *Lb. bulgaricus* IAM 1120, *Lb. acidophilus* IAM 1043, 1084, *Lb. acidophilus* "shirota" はともに *Lb. casei* とした.

合成培地は Trypticase 17.0, Soypeptone 3.0, ブドウ糖10.0, 酵母エキス7.5, Thiamine-HCl 0.1, NaCl 5.0, K₂HPO₄ 2.5, MgSO₄·7H₂O 0.4, FeSO₄·7H₂O 0.02, MnSO₄·4H₂O 0.02 g/L の組成のものを基礎培地としこれに市販特級品を再結晶した HA を 0.5 mg/ml の割合に添加分解試験用培地とした. 添加 HA は121°, 15分の殺菌条件で全く分解しない. この HA 分解試験用培地において HA→BA が完全であれば培地中に0.34 mg/ml の BA が蓄積, 検出される. 牛乳培地は市販インスタントスキムミルク15%溶液を用いた. この場合の HA→BA による培地中 BA 蓄積は SM 中の HA 量により異なるがおよそ 30~40 ppm であった.

培養は, あらかじめ被検株を基礎培地に 37°, 24時間前培養しその 0.5 ml を分解試験用培地または牛乳培地 10 ml に接種, 37°, 24時間, 72時間培養する. 培養後, 培養液を酸性とし食塩 3 g, エーテル 10 ml を加え抽出, 遠心分離して得たエーテル層の BA を GC で定量

Fig. 2. Gas chromatogram of extract from skim milk medium before and after incubating *Lb. casei*

し BA 生成率を求めた.

実験結果および考察

SM 溶液または牛乳中で乳酸発酵により生成される BA は供試菌の対数発育期に一定量が蓄積し以後培養を継続しても量的変化がない²⁾ ので, 生成 BA は培地となる SM または牛乳中に存在する一定量の前駆物質に由来するのではないかと推定され, SM アセトン抽出物の酸性フラクションより HA が同定された. 同定の際の赤外スペクトルを Fig. 1 に示した.

また乳酸発酵の過程における HA と BA の関係を Fig. 2 と Table 1 に示した.

Fig. 2 は15% SM 溶液を培地とし *Lb. casei* IAM 1045を接種 37°, 24時間培養前後におけるエーテル抽出物酸性フラクションをジアゾメタンでメチルエステル化したものの昇温ガスクロマトグラムである. 培養前の培地中には BA と HA の存在が確認できるが培養後 HA は消失し BA が約3倍程度に増量しているのがみられる. このクロマトグラムのみでは培養前後における BA の増量は確認できても, それが HA 由来であるかまたは他の lignin 関連物質⁴⁾ や phenylalanine^{5) 6)} などが前駆物質であるかどうかは明らかでない. しかし SM 培地に *Lb. casei* 培養前後の BA, HA 量を Table 1 によってみると, かなりよく対応していることが明らか

Fig. 1. Infrared absorption spectra of hippuric acid and the isolated compound from skim milk

Table 1. Benzoic Acid, Hippuric Acid Content in 10% Skimmilk and Raw Milk Medium Before and After Incubating *Lb. casei* (ppm)

samples	before		after			recovery %
	BA	HA	BA convd from HA	calcd BA	found BA	
1 domestic	1.7	10.2	7.0	8.7	10.0	115
2 "	6.1	17.6	12.0	18.1	18.8	104
3 "	2.6	25.6	17.4	20.0	21.0	105
4 "	1.7	12.4	8.4	10.1	10.6	105
5 import	0.7	30.4	20.7	21.4	25.0	113
6 "	6.5	29.2	19.9	26.4	29.0	110
7 "	0.1	37.2	25.4	25.5	30.3	119
8 raw milk	nd*	13.9	9.5	9.5	10.2	107
9 "	nd	15.8	10.8	10.8	11.4	106
10 "	0.2	12.3	8.3	8.5	9.0	106
11 "	0.4	8.6	5.9	6.3	7.3	106
12 "	nd	15.1	10.3	19.3	10.4	101

で、培養後に生成した BA は全量が HA 由来と考えることができる。この際 BA の回収率が理論値より平均 8 %程度高いのは、BA, HA それぞれの定量法の回収率差に基づくものと考えられる。

また Table 1. の生乳については、慎重に搾乳後直ちに冷却し 3 時間後に分析に供したものであるが、その BA 量はかなり低く検出できないものもあるところから、搾乳直後の生乳には BA は存在せず時間の経過と共に細菌の代謝産物として出現するものと推定される。このように牛乳中 BA は搾乳後の処理がよくないとしだいに増量するので牛乳の新鮮度の目安となり得るし、食品衛生上の管理基準として価値ある数値と考えることもできる。一方生乳中 HA はその由来はともかくとして、すでに Patton⁹⁾ が、指摘しているように常成分と考える方がより自然であると思われる。

以上の結果から BA 前駆物質は牛乳中の HA と推定されるが、しかれば、どのような乳酸菌が、HA より BA を生成するかということについては、その実験結果の概略を Table 2 に示した。

Lb. bulgaricus, *Lb. jugurti*, *Lb. helveticus*, *Lb. lactis*, *Str. lactis* の大部分は HA→BA に関与し分解能は強いとみてよい。*Lb. acidophilus* は大部分が HA→BA に関与しないが ATCC 4355 株のようにまれに HA 分解株もある。*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Str. faecalis* はほとんど例外なく強力な HA→BA 能を持つがたとえば ATCC 393 株, IAM 1043 株にみられるように分解能を欠くものもある。*Lb. brevis*, *Lb. buchneri* も HA→BA をするが一般にその能力は弱い。*Lb.*

Table 2. Benzoic Acid Formation by Lactic Acid Bacteria in Synthetic Broth Added with Hippuric Acid and Skimmilk Medium

No. of strains			BA positive strains		
			synthetic broth, 72 hr.	skimmilk medium, 72 hr.	by Davis ⁷⁾
<i>Lb.</i>	<i>bulgaricus</i>	3	3	3	—/w
	<i>jugurti</i>	6	4	4	
	<i>helveticus</i>	5	2	2	
	<i>acidophilus</i>	12	2	2	—/w
	<i>casei</i>	12	10	10	+
	<i>fermenti</i>	13	0	0	—
	<i>lactis</i>	4	3	3	—/w
	<i>plantarum</i>	5	5	5	+
	<i>brevis</i>	5	4	4	+
	<i>buchneri</i>	3	0	3	
	<i>delbrueckii</i>	3	0	—	
	<i>salivarius</i>	6	0	2	
<i>Str.</i>	<i>lactis</i>	4	2	2	
	<i>cremoris</i>	1	1	1	
	<i>thermophilus</i>	1	1	1	
	<i>faecalis</i>	3	3	3	
<i>Leuc.</i>	<i>citrovorum</i>	1	1	1	
	<i>dextranicum</i>	2	0	0	
	<i>mesenteroides</i>	3	1	1	

—: normally negative w: weak reaction
+: normally positive

delbrueckii, *Lb. salivarius*, *Lb. fermenti*, *Leuc. dextranicum* は HA→BA を全く行なわない。なお参考のために G. H. G. Davis⁷⁾ による HA→BA のデータをあげたが、使用培地や検出法が異なるので若干の相違がみられた。

これらの乳酸菌以外には *Aerobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* などの HA→BA 菌が知られているが *E. coli*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas* などには強力な分解菌はないとされている。

このような結果から普通発酵乳にスターターとして使用される乳酸菌が発酵中における HA→BA 原因菌である場合が多いことがわかる。

結 論

脱脂粉乳または牛乳を培地とし *Lb. casei* を培養すると培養前後の安息香酸、馬尿酸量は良好な対応関係を示す。また発酵乳製造に際し通常スターターとして使用される各種の乳酸菌が馬尿酸分解安息香酸生成菌であることから、発酵乳に検出される安息香酸は、一部原料の脱脂粉乳由来であるが、その大部分が脱脂粉乳中馬尿酸を前駆物質とする乳酸菌の代謝産物と推定することができる。

終わりに校閲を得た高知県衛生研究所山本義男所長、菌株の分与を得た理化学研究所光岡知足博士、および醸酵研究所に深謝する。

文 献

- 1) 西本孝男, 上田雅彦, 田植 栄: 食衛誌. **9**, 60 (1968).
- 2) 西本孝男, 上田雅彦, 田植 栄: 同上. **9**, 58 (1968).
- 3) C. M. Williams, C. C. Sweeley: Biomedical Application of Gas Chromatography 225 (1964), Plenum Press, New York.
- 4) A. K. Martin: J. Sci. Food Agr. **17**, 496 (1966).
- 5) K. Uchiyama, K. Kawaguchi, T. Tochikura, K. Ogata: Agr. Biol. Chem. **33**, 755 (1969).
- 6) K. Moore, P. V. Subba Rao, G. H. N. Towers: Biochem. J. **106**, 507 (1968).
- 7) G. H. G. Davis: J. gen. Microbiol. **13**, 481 (1955).
- 8) S. Patton: J. Dairy Science **36**, 943 (1953).
- 9) 光岡知足: 私信 (1968), 食衛誌. **10**, 147 (1969).