

海洋性イルカの胃内より分離した微生物  
による遊離低級脂肪酸の生成—I  
グルコース・ペプトン培地における遊離  
低級脂肪酸組成の経時変化

森 井 秀 昭

The Production of Free Volatile Fatty Acid by  
Microorganisms Isolated from Stomachs  
of Marine Little Toothed Whales—I

The free volatile fatty acid composition in culture  
solutions from glucose-peptone media

Hideaki MORII

In order to ascertain the origin of free isovaleric and other volatile fatty acids which were detected previously in the stomach fluids of porpoises, the free volatile fatty acids in the culture solutions of the microorganisms isolated from the stomachs of marine little toothed whales were studied by GLC. The microorganisms used in experiment were 2 strains of bacteria, *Corynebacterium* sp. (C1 strain: gram positive) and *Vibrio* sp. (V1 strain: gram negative), and a strain *Candida tropicalis*-like yeast (Y1 strain). Incubations were made by glucose-peptone media (glucose 1.0%, peptone 2.0%, yeast extract 0.1%, sodium chloride 0.5% (V1 strain 2.5%), pH 7.0) for various hours at 37°C. The results obtained are as follows:

1) Although the free volatile fatty acid composition in the culture solutions differ by microorganism and incubation time, all of acetic, propionic, isobutyric, butyric and isovaleric acids were produced in all the culture solutions.

2) Among these acids, acetic and isovaleric acids in both *Vibrio* sp. and *C. tropicalis*-like yeast, and acetic, isobutyric and isovaleric acids in *Corynebacterium* sp. were dominant through various culture hours.

3) It was suggested that in *Corynebacterium* sp. of gram positive bacteria in addition to acetic acid, isobutyric and other volatile branched-chain fatty acids were largely utilized, but in *Vibrio* sp. of gram negative bacteria, volatile

branched-chain fatty acids were hardly utilized while mostly utilized was acetic acid.

前報<sup>1)</sup>では、アラリイルカの皮下脂肪中にはイソ吉草酸を主とした側鎖脂肪酸が多量に含有されていることを述べた。これらの成因として、イルカ類の胃の構造は反すう動物に類似し、したがってイソ吉草酸などの側鎖脂肪酸も反すう動物と類似の機構で生成されていることが考えられた。そこでイルカ類の胃腔内における微生物の存否および胃内容液中のイソ吉草酸などの遊離低級脂肪酸の有無などについてしらべた結果、イルカ類の胃腔内には *Vibrio* などの細菌類<sup>2)</sup>や酵母<sup>3)</sup>が存在し、また胃内容液中にはイソ吉草酸などの遊離低級脂肪酸が含有されていたこと<sup>4)</sup>などを報告した。

今回はイルカ類の胃腔内から分離した微生物がイソ吉草酸などの遊離の低級脂肪酸を生成するか否かを知るため、グルコース・ペプトン培地を用い、培地中に生成される遊離低級脂肪酸組成を経時的にガスクロマトグラフィーでしらべた。なお供試菌株としては、細菌の場合にはグラム陽性細菌とグラム陰性細菌でその生体内の高級脂肪酸組成は相違し、したがって培地中に生成される遊離の低級脂肪酸組成もこれらの間で異なることが考えられたので、これらの両者よりそれぞれ1菌株および酵母1菌株を用いて実験を行なった。

### 実験材料および方法

**供試菌株** イルカ類の胃腔内から分離した微生物<sup>2,3)</sup>のうち、細菌類としてはグラム陽性桿菌の *Corynebacterium* sp. (C1株)、およびグラム陰性桿菌の *Vibrio* sp. (V1株)、および酵母としては *Candida tropicalis* 様酵母 (Y1株) の計3菌株を用いた。

**菌株の培養** 前培養は基本培地 (グルコース1.0%, ペプトン2.0%, 塩化ナトリウム0.5% (V1株は2.5%), pH 7.0) を用い、細菌のV1株は12時間、および細菌のC1株および酵母は24時間37°Cで培養した。この培養液の1白金耳を試験培地 (基本培地) の100mlに接種し、同温度で一定時間培養したものについて遊離低級脂肪酸の測定をした。

なお発育量の測定は前報<sup>2)</sup>と同様にして行なった。

**遊離低級脂肪酸の分析用試料の調製** まず培養液の100mlを約1N-水酸化ナトリウム溶液で中和後17,000 rpmで15分間遠心沈殿し、上澄液を70°Cで減圧濃縮した。これに少量の蒸留水を加え、約12N-硫酸で酸性とした後毎分8mlの留出速度で40分間水蒸気蒸留を行なった。次に留出液は口過後0.1N-水酸化ナトリウム溶液で中和 (遊離低級脂肪酸量) 後70°Cで減圧乾固し、これを出来るだけ少量の約12N-硫酸で酸性としてエーテルで5~6回抽出を行なった。抽出エーテルは無水硫酸ナトリウムで脱水後口過し、室温でエーテルを溜去し、ただちにガスクロマトグラフィーで分析を行なった。

**ガスクロマトグラフィー** 中江ら<sup>5)</sup>の方法に準じて行なった。カラム、充てん剤および機器などの概要をTable 1に示す。

なお脂肪酸の同定および定量は前報<sup>1)</sup>と同様にして行なった。したがって試料内に $\alpha$ -メチル酪酸が存在するときはイソ吉草酸区分に含まれる可能性が残されているが、現段階では実験技術上その分離が困難である。

Table 1. Operating conditions of GLC.

Instrument	Yanagimoto Gas Chromatograph GCG-500
Column	20% Tween 20 on Diasolid S (80-100 mesh), 4mm i. d. x 3m copper spiral tubing
Column temp.	178 °C
Detector	Hydrogen flame ionization system, H <sub>2</sub> 40 ml/min.
Carrier gas	He 30 ml/min.
Sample size	0.1-0.2 μl

実 験 結 果

供試菌株の発育曲線を Fig. 1 に示す。

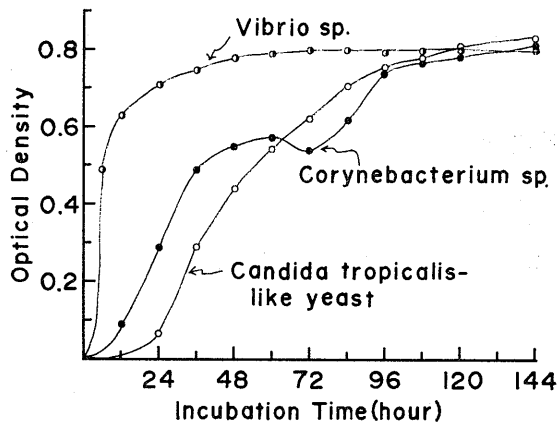


Fig. 1. Growth curves of the microorganisms used in experiment.

*Vibrio* sp. は他の 2 菌株に比し発育度が著しく早く、また72時間目以降では発育は全く見られなかった。また *Corynebacterium* sp. の発育曲線は特異的で、72時間目付近で一時減少しその後再び急上昇した。培養液中に生成した遊離低級脂肪酸組成のガスクロマトグラムの一例として、*Corynebacterium* sp. の

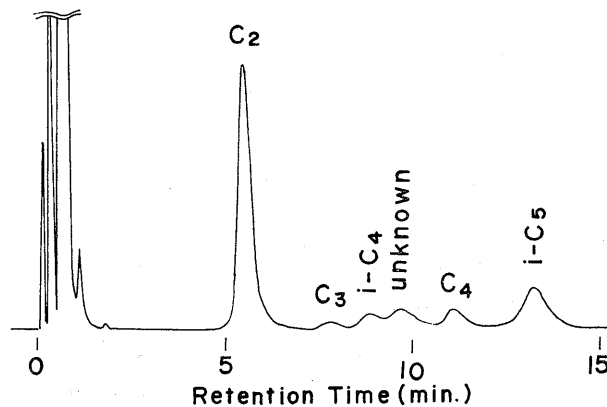


Fig. 2. Gas chromatogram of free volatile fatty acids in the 24 hour culture solution of *Corynebacterium* sp.

24時間培養の結果を Fig. 2 に、また *Vibrio* sp., *Corynebacterium* sp. および *C. tropicalis* 様酵母の24~144または168時間培養液中における遊離低級脂肪酸量およびその組成を Table 2, 3 および 4 に示す。

*Vibrio* sp., *Corynebacterium* sp. および *C. tropicalis* 様酵母ともその培養液中にはすべて酢酸, プロピオン酸, イソ酪酸, 不明物質, 正酪酸およびイソ吉草酸が生成されていた。

Table 2. The production of free volatile fatty acids in the culture solutions of *Vibrio* sp.

Hours	Total VFA meq/100ml	VFA composition (%)					
		C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	i-C <sub>4</sub>	?	C <sub>4</sub>	i-C <sub>5</sub>
24	1.67	60.9	1.0	2.3	24.1	1.9	9.8
48	1.72	37.7	0.6	2.5	46.2	2.3	10.7
72	1.65	3.9	trace	trace	91.0	1.0	4.1
96	1.60	53.0	0.6	2.1	34.0	2.3	8.0
120	1.49	51.5	1.0	5.0	23.4	3.4	15.7
144	1.44	48.4	1.0	5.5	25.6	2.9	16.6

*Vibrio* sp. の培養24時間目の培養液中では酢酸が大部分を占め、不明物質およびイソ吉草酸がこれに次いで多く、プロピオン酸, イソ酪酸および正酪酸は著しく少なかった。48~72時間目にかけて酢酸の占める割合が激減し、逆に不明物質の割合が激増したが、その他の成分はほとんど変化は見られなかった。96~144時間目の安定期では遊離低級脂肪酸量は徐々に減少し、またその組成は酢酸の割合が減少し逆にイソ酪酸およびイソ吉草酸の割合は増加していた。

Table 3. The production of free volatile fatty acids in the culture solutions of *Corynebacterium* sp.

Hours	Total VFA meq/100ml	VFA composition (%)					
		C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	i-C <sub>4</sub>	?	C <sub>4</sub>	i-C <sub>5</sub>
24	0.59	64.3	2.0	4.0	6.6	5.2	17.9
48	1.14	49.8	1.5	5.1	17.9	3.4	22.3
72	1.12	38.5	1.0	23.0	19.9	2.4	15.2
96	1.11	18.6	0.8	36.2	22.0	4.2	18.2
120	1.71	36.5	1.1	5.4	26.9	4.3	25.8
144	2.20	14.3	1.1	43.4	18.5	3.7	19.0
168	2.34	33.2	1.4	21.7	18.2	3.6	21.9

*Corynebacterium* sp. の培養24時間目の培養液中では酢酸が大部分を占め、次いでイソ吉草酸が多く、プロピオン酸, イソ酪酸, 不明物質および正酪酸は少なかった (Fig. 2)。48~96時間目にかけては酢酸の割合が漸次減少し、逆にイソ酪酸および不明物質の割合が増加し、とくにイソ酪酸の増加の割合は大きかった。120~168時間目にかけては遊離低級脂肪酸量は徐々に増加し、この間でも酢酸とイソ酪酸の割合は著しく変動した。なおプロピオン酸, 正酪酸およびイソ吉草酸は培養期間全体を通じ余り変化は見られず、またその量は前二

者では著しく少なかったが、イソ吉草酸は常に20%近くを占めていた。

*C. tropicalis* 様酵母では培養期間全体を通じて培養液中の遊離低級脂肪酸組成はほとんど変化は見られず、その大部分が酢酸で、次いでイソ吉草酸が多かった。

Table 4. The production of free volatile fatty acids in the culture solutions of *Candida tropicalis*-like yeast.

Hours	Total VFA meq/100ml	VFA composition (%)					
		C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	i-C <sub>4</sub>	?	C <sub>4</sub>	i-C <sub>5</sub>
24	0.37	76.7	1.9	4.5	3.0	4.6	9.3
48	0.41	67.0	3.1	4.5	5.4	9.1	10.9
72	0.52	72.5	3.0	6.2	1.9	6.2	10.2
96	0.52	71.7	4.8	6.3	2.7	6.3	8.2
120	0.51	67.2	8.1	6.3	2.7	5.2	10.5
144	0.50	67.7	2.7	6.8	2.5	6.7	13.6

## 考 察

培養液中に生成された遊離低級脂肪酸組成は各微生物間および培養時間でそれぞれ異なっていたが、いずれの場合にもイルカの胃内容液中に存在していた遊離低級脂肪酸と同一成分の脂肪酸が生成されていた。しかもイルカの胃内容液中では酢酸とイソ吉草酸が遊離低級脂肪酸の大部分を占めていたが、今回の各微生物の培養液においても、培養の初期などではこれとほぼ同様の傾向を示していた。これらの事実からイルカの胃内容液中に存在していたイソ吉草酸などの遊離低級脂肪酸についてもその胃腔内で微生物の作用により生成されたことは十分に考えられる。

*Vibrio* sp. の24~72時間培養液および *Corynebacterium* sp. の48~96時間培養液では遊離低級脂肪酸量はほぼ一定に保たれ、したがってこの間に逐次生成される遊離低級脂肪酸はその大部分がこれら菌体により利用されているものと考えられる。この場合、*Vibrio* sp. では遊離低級脂肪酸組成の変動はほぼ酢酸と不明物質の増減傾向に限られ、酢酸以外の低級脂肪酸はほとんど変動が見られず、また *Corynebacterium* sp. では酢酸の他イソ酪酸にも著しい変動が見られ、このことは120~168時間培養液においても同様で、したがって *Vibrio* sp. では利用される脂肪酸の大部分が酢酸であること、また *Corynebacterium* sp. では酢酸の他イソ酪酸などの低級側鎖脂肪酸も多く利用されているものと推察される。イルカ胃内では *Vibrio* が優先し<sup>2)</sup>、したがって胃内で生成されるであろう遊離低級脂肪酸のうち、遊離低級側鎖脂肪酸についてはその大部分が胃腔内に蓄積され、ひいてはイルカ体内に吸収されるものと思われ、イルカ油脂中にイソ吉草酸などの低級側鎖脂肪酸が多量に存在する理由もよく説明されるようである。また今回 *Vibrio* から生成された遊離低級側鎖脂肪酸の大部分がイソ吉草酸でイソ酪酸は少なく、この傾向はイルカ油脂中の低級脂肪酸組成<sup>1)</sup>とよく類似している。しかしこれらのことについては供試菌株も少なく、また供試培地や培養条件もイルカの胃内状態とは著しく異なるのでさらに検討を要する。

なお低級脂肪酸の生成過程については、酢酸などの直鎖脂肪酸はグルコース起源とも考えられるが、イソ吉草酸などの側鎖脂肪酸はグルコース起源とは考えにくい。反すう動物では胃腔内で生成される遊離低級側鎖脂肪酸は微生物によるアミノ酸の脱アミノ作用で生成され

6,7), したがって今回の場合もこれと同様の機構で低級側鎖脂肪酸が生成されたものと考えられる。これについては今後さらに検討されなければならない。

## 要 約

イルカ類の胃内から分離した細菌 (*Corynebacterium* sp. および *Vibrio* sp.) および酵母 (*Candida tropicalis* 様酵母) を用い, グルコース・ペプトン培地により生成される遊離低級脂肪酸組成を経時的にしらべ次の結果を得た。

1) 培養液中に生成された遊離低級脂肪酸組成は各微生物間および培養時間などでそれぞれ異なっていたが, いずれの場合にも酢酸, プロピオン酸, イソ酪酸, 正酪酸およびイソ吉草酸が生成された。

2) これらの脂肪酸のうち, *Vibrio* sp. および酵母の培養液中では酢酸とイソ吉草酸が, また *Corynebacterium* sp. の培養液中では酢酸, イソ酪酸およびイソ吉草酸が大部分を占めていた。

3) グラム陽性細菌の *Corynebacterium* sp. では酢酸の他イソ酪酸などの低級側鎖脂肪酸も多く利用されるが, グラム陰性細菌の *Vibrio* sp. では低級側鎖脂肪酸は余り利用されず, その大部分が酢酸であると考えられた。

## 文 献

- 1) 森井秀昭・金津良一：日水誌, 38, 599~605 (1972)
- 2) 森井秀昭：同誌, 38, 1177~1183 (1972)
- 3) 森井秀昭：同誌, 39, 333 (1973)
- 4) 森井秀昭・金津良一：同誌, 38, 1035~1039(1972)
- 5) 中江利孝・中西武雄：農化, 37, 302~305 (1963)
- 6) K. LE-SHAZLY : *Biochem. J.*, 51, 640~647 (1952)
- 7) K. LE-SHAZLY : *ibid*, 51, 647~653 (1952)