

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— II
ペプトン・グルコース培地における遊離低級
脂肪酸の発育環境条件にともなう変化

森 井 秀 昭

The Production of Free Volatile Fatty Acids by Microorganisms Isolated
from the Stomach of Marine Little Toothed Whales— II
Changes with Environmental Conditions for Growth of Free Volatile
Fatty Acids Produced from Peptone-Glucose Medium

Hideaki MORII

In order to ascertain the origin of free volatile fatty acids (FVFAs) which were detected previously in the stomach fluid of porpoises, the acid composition in the culture solutions of the microorganisms isolated from the porpoises was studied by GLC. The microorganisms used for the experiment were 2 strains of bacteria, *Corynebacterium* sp. (gram positive) and *Vibrio* sp. (gram negative), and a strain of *Candida tropicalis*-like yeast. Incubations were made in peptone-glucose medium (1) by changing growth temperature, pH value and NaCl concentration. The results obtained are as follows.

1) In all the microorganisms acetic, propionic, iso-butyric, isovaleric (containing α -methyl butyric) and n-valeric acids were produced under any environmental condition and acetic and iso-valeric acids usually showed a high value. The concentration of iso-butyric acid from *Corynebacterium* sp. was high in some cases.

2) In all the microorganisms acetic acid decreased and iso-valeric acid increased under the optimum condition for growth, and this trend was remarkable especially in the bacteria. In addition, the composition of FVFA from *Vibrio* sp. under the optimum condition for growth was similar to that in the stomach fluid of the porpoises (2).

前報(1)では、イルカ胃内容液から検出した低級分枝鎖脂肪酸(低級分枝酸と略記)(2)が胃内で微生物の作用により生成されたものであるか否かを検討するため、イルカ胃内から分離した微生物(3, 4)を用い、ペプトン・グルコース培地からの iso 吉草酸などの低級分枝酸の生成の有無を経時的にしらべた。その結果、いずれの供試微生物からも iso 酪酸や iso 吉草酸などの遊離の低級分枝酸を常に生成することを述べた。すなわち、イルカ胃内容液から検出した遊離の低級分枝酸は胃内で微生物により生成されたと考えられ、ひいてはイルカ油脂中の低級分枝酸もこれらの低級分枝酸に由来すると考えられる。しかし、これらの低級分枝酸が

胃内で微生物により生成されるとする考えをより確かにするには、胃内容液中の遊離の低級脂肪酸(低級酸と略記)組成がこれら微生物により生成される遊離の低級酸組成に類似する必要がある。

通常微生物により生成する遊離の低級酸組成は発育環境条件により著しく変化する。そこで今回は、前報(1)同様、胃内から分離したグラム陽性細菌、グラム陰性細菌および酵母の各1菌株を用い、発育環境条件を変えることによりペプトン・グルコース培地中に生成する遊離の低級酸組成をガスクロマトグラフィー(GLCと略記)でしらべ、胃内容液中の組成との類似性を検討した。

材料と方法

供試微生物 前報(1)と同様にグラム陽性桿菌の *Corynebacterium* sp., グラム陰性桿菌の *Vibrio* sp. および *Candida tropicalis* 様酵母の3菌株を用いた。

試験方法 発育温度, pHおよび塩分濃度を変えることにより培地中に生成する遊離の低級酸量と組成をしらべた。発育温度試験は20~45°Cまで5°C間隔, pH試験は5.0~9.0まで1.0間隔, 塩分濃度試験は1.0~5.0%まで1.0%間隔とした。

培養方法 発育温度試験は基本培地〔ペプトン2.0%, グルコース1.0%, 塩化ナトリウム0.5% (*Vibrio* sp. は, 2.5%), pH7.0), pH試験は基本培地のpHを6N-塩酸と6N-水酸化ナトリウムで調整した培地, また塩分濃度試験は基本培地の塩化ナトリウム濃度を変えた培地を用いた。また, pHおよび塩分濃度試験の培養温度は *Vibrio* sp. では30°C, *Coryne-*

bacterium sp. と *C. tropicalis* 様酵母では35°Cとし, 3日間培養した。なお, 培養方法の詳細は前報(1)に述べてある。また発育量の測定は前報(3)と同様にして行った。

遊離低級酸の調製・低級酸のGLC 前報(2)と同様にして行なった。

結 果

各供試菌株の培養温度を変えた場合の発育度をFig.1に, また培地中に生成した遊離の低級酸量と組成をTable 1に示した。

Corynebacterium sp. では発育最適温度に近づくと培地中の生成低級酸は徐々に増加したが, 酢酸などの減少にともない iso 吉草酸 (α -メチル酪酸を含む) などの分枝酸が増加した。

Vibrio sp. では25~35°Cにかけて発育はおお盛であった。培地中に生成した低級酸量は多少増加の傾向

Table 1. Variation with incubation temperature of FVFA produced in culture solutions of microorganisms.

Incubation temperature (°C)	Total FVFA (meq/100 ml)	Fatty acids (%)					
		C ₂	C ₃	iC ₄	C ₄	iC ₅	C ₅
<i>Corynebacterium</i> sp.							
20	0.26	72.0	0.7	4.0	9.4	11.8	2.1
25	0.45	72.0	0.4	3.1	6.2	15.6	2.7
30	0.56	64.0	0.2	3.7	1.3	30.3	0.5
35	0.87	61.9	0.1	4.1	1.0	32.6	0.3
40	1.38	52.1	0.1	6.7	0.8	40.2	0.1
45	0.88	45.3	0.1	4.8	0.9	39.7	0.2
<i>Vibrio</i> sp.							
20	1.19	82.4	0.8	3.1	2.3	11.4	tr*
25	1.23	72.8	0.3	3.5	1.8	21.6	tr
30	1.22	72.7	0.2	3.0	2.1	22.0	tr
35	1.20	76.7	0.3	2.9	2.3	17.8	tr
40	1.08	88.8	0.4	2.5	2.1	6.2	tr
45	—						
<i>Candida tropicalis</i> -like yeast							
20	—						
25	0.42	69.2	8.1	7.3	5.0	10.4	tr
30	0.47	72.6	3.7	6.5	5.2	12.0	tr
35	0.43	67.7	2.7	9.3	6.7	13.6	tr
40	+						
45	—						

*tr : trace. Incubations were made in PGY medium (pepton 2.0%, glucose 1.0%, yeast extract 0.1%, NaCl 0.5% (*Vibrio* sp. 2.5%), pH 7.0) at 35°C in *Corynebacterium* sp. and yeast, and at 30°C in *Vibrio* sp. Data showed the results in 3-day culture.

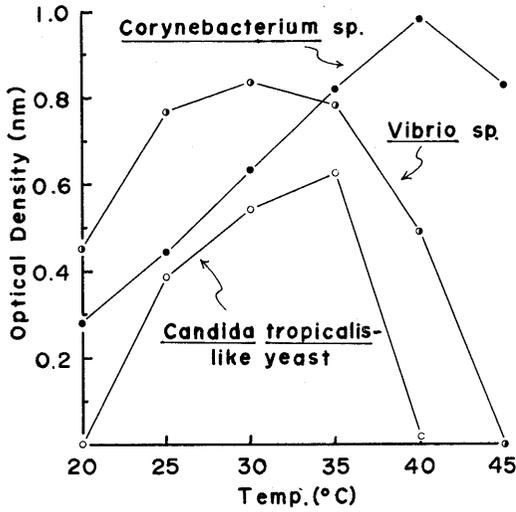


Fig. 1. Growth curves of microorganisms in different temperatures.

を示した。また25~35°C培養では20または40°Cに比べ酢酸が少なく iso 吉草酸が多い傾向を認めた。

*C. tropicalis*様酵母では25~35°Cで良い発育を示した。培地中の生成低級酸量と組成はいずれの温度でも大き

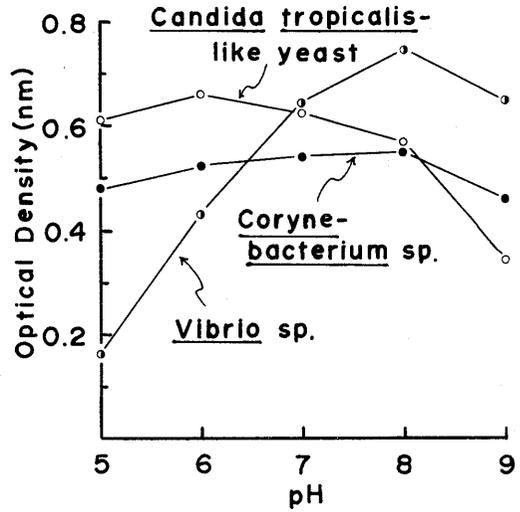


Fig. 2. Growth curves of microorganisms in different pH values.

な変化がなかった。

培地のpHを変えた場合の供試微生物の発育度をFig. 2に、また培地中に生成した遊離の低級酸量と組成をTable 2に示した。

Table 2. Variation with pH value of the medium of FVFA produced in culture solutions of microorganisms.

pH value	Total FVFA (meq/100ml)	Fatty acids (%)					
		C ₂	C ₃	iC ₄	C ₄	iC ₅	C ₅
<i>Corynebacterium sp.</i>							
5.0	0.44	39.4	0.1	19.3	0.8	40.1	0.3
6.0	0.54	39.9	0.1	19.1	0.9	39.8	0.3
7.0	0.59	34.1	0.1	16.2	0.8	48.5	0.3
8.0	0.62	35.4	0.1	15.0	0.7	48.4	0.4
9.0	1.02	35.6	0.1	14.7	0.5	48.8	0.3
<i>Vibrio sp.</i>							
5.0	0.14			not analyzed			
6.0	0.92	80.5	0.9	0.9	2.2	15.5	tr*
7.0	1.03	64.8	0.1	3.2	1.9	30.0	tr
8.0	1.04	66.4	0.1	3.9	1.9	27.7	tr
9.0	1.24	77.4	1.9	2.1	2.1	16.5	tr
<i>Candida tropicalis-like yeast</i>							
5.0	0.28	72.6	3.0	8.7	5.9	9.8	tr
6.0	0.48	75.6	4.8	6.4	4.8	8.4	tr
7.0	0.46	85.5	1.9	3.5	3.3	5.8	tr
8.0	0.46	82.2	3.4	5.7	2.9	5.8	tr
9.0	0.63	82.2	4.4	2.3	2.6	8.5	tr

*tr: trace. pH values of the medium were controlled with HCl and NaOH. Conditions of incubation are same as in Table except for pH values of the medium. Data showed the results in 3-day culture.

Corynebacterium sp. では pH 8 に近づくにつれ発育度は徐々に増加したが、pH 9 では低下した。培地中の生成低級酸量もこれと平行して pH 8 まで徐々に増加した。pH 9 では発育度とは逆に急激な増加を示した。組成は pH の変化により余り変わらなかったが、pH 7 以上では pH 6 以下に比べ酢酸が少なく iso 吉草酸の多い傾向を認めた。なお、今回 iso 酪酸を多く含んだが、本菌株がこのような傾向を示すことは前報(1)で述べた通りである。

Vibrio sp. では pH 8 に近づくにつれ発育度は著しく増加したが pH 9 では低下した。培地中の生成低級酸量は pH 8 までは発育度と平行して増加したが、pH 9 では発育度とは逆に著しく増加した。その組成を見ると pH 7 と 8 は pH 6 と 9 に比べ酢酸が少なく、iso 吉草酸が著しく多かった。

C. tropicalis 様酵母では pH 6 で最も良い発育を示したが pH 5～8 でも発育度に著しい差異はなかった。しかし pH 9 では激減した。培地中の生成低級酸量は pH 5 で著しく少なく、pH 6～8 ではそれほど差異はなかったが、pH 9 では発育度とは逆に著しく増加した。その組成は pH の変化にともなう著しい差異は見られなかったが、pH 6 以下では 7 以上に比べ酢酸が少なく、分枝酸が多い傾向を認めた。

なお、培地の pH は塩酸と水酸化ナトリウムのみで調整したための培養時間の経過とともに著しく変化した。各 pH 間の発育度も培養時間で変化し、前報(3)で述べた最適発育 pH と今回の結果とは異なっていた。また、今回の *Corynebacterium* sp. の結果を見ると、培養時間の選択が適当であればさらに有意な差が得られると考える。なお、発育度が低下した pH 9 で逆に低級酸量が増加したのは、これら微生物による低級酸の利用率の低下が考えられた〔前報(1)参照〕。

培地の塩分濃度を変えた場合の供試微生物の発育度を Fig. 3 に、また培地中に生成した遊離の低級酸量と組成を Table 3 に示した。

Corynebacterium sp. では塩分濃度の増加にともない発育度は徐々に減少した。一方、培地中の生成低級酸量は塩分濃度の増加につれ徐々に増加し、とくに 5% 濃度では著しく高い値を示した。すなわち、本結果は発育度とは逆の傾向となる。低級酸組成は塩分濃度を変えてもそれほど変わらなかったが、2% 以下の濃度では 3% 以上に比べ酢酸が少なく、分枝酸とくに iso 吉草酸の多い傾向が見られた。

Vibrio sp. では塩分濃度が 3% で最も良い発育を示した。培地中の生成低級酸量は塩分濃度が 3% を超

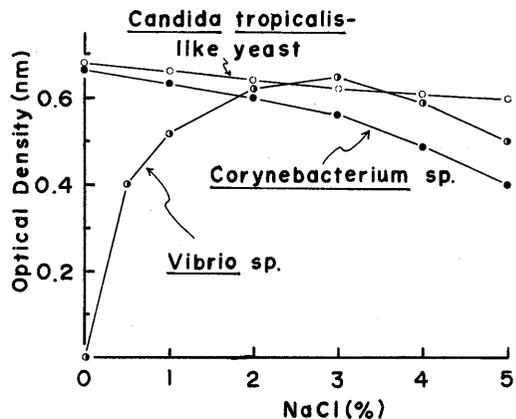


Fig. 3. Growth curves of microorganisms in different NaCl concentrations.

える頃から急激に増加し、5% になると著しく高い値を示した。またその組成は、塩分濃度が 3% に近づくにつれ直鎖脂肪酸、とくに酢酸が激減し、分枝酸、とくに iso 吉草酸の増加が著しかった。

C. tropicalis 様酵母では塩分濃度の増加にともない発育度は徐々に減少した。培地中の生成低級酸量は塩化ナトリウム無添加ではとくに低く、1～4% では著しい差異は見られなかったが、5% ではとくに高い値を示した。また組成を見ると塩分濃度の変化にもとづく差はほとんど認めなかった。

なお、いずれの供試菌株の場合も 4～5% 塩分濃度で低級酸量が著しく増加したのは、pH の場合と同様、利用率の低下によるものと考えられる。

考 察

Table 4 には各供試菌株が分離されたイルカ胃内容液中の遊離低級酸組成を示したが、*Vibrio* sp. が分離された試料 2 と *C. tropicalis* 様酵母が分離された試料 3 の結果についてはすでに報告(2)したものである。また試料 1 からは *Corynebacterium* sp. が分離された。

すなわち、*Vibrio* sp. の培養により得られた低級酸の組成と同菌株が分離された胃内容液(試料 2)中の組成とは、いずれの発育環境条件の場合ともよく類似し、とくに最適発育条件下の結果では両者がほぼ同一組成を示すものもあった。この結果から考えると、イルカ胃内容液中に見出された低級酸は胃内で微生物により生成されたと推察され、したがってイルカ油脂中の低級分枝酸もこれらの分枝酸に由来すると考えられ

Table 3. Variation with NaCl concentration of the medium of FVFA produced in culture solutions of micro-organisms.

NaCl (%) [*]	Total FVFA (meq/100 ml)	Fatty acids (%)					
		C ₂	C ₃	iC ₄	C ₄	iC ₅	C ₅
<i>Corynebacterium</i> sp.							
0.0	0.48	41.8	0.2	5.2	0.6	51.8	0.4
1.0	0.62	40.4	0.1	5.2	0.5	53.4	0.3
2.0	0.67	42.6	0.1	5.4	0.5	51.1	0.3
3.0	0.70	48.0	0.1	4.4	0.4	46.7	0.4
4.0	0.87	51.0	0.1	4.1	0.6	43.9	0.3
5.0	1.30	51.2	0.1	4.4	0.9	43.0	0.4
<i>Vibrio</i> sp.							
0.0	—						
1.0	1.30	88.7	1.8	1.5	2.0	6.0	tr**
2.0	1.31	74.6	0.1	6.2	1.2	17.9	tr
3.0	1.39	53.1	tr	5.4	0.5	41.0	tr
4.0	1.54	75.4	0.1	2.0	1.0	21.5	tr
5.0	2.33	76.0	2.0	2.0	1.5	18.5	tr
<i>Candida tropicalis</i> -like yeast							
0.0	0.35	81.2	2.2	3.6	5.9	7.1	tr
1.0	0.46	80.4	2.3	2.9	5.5	8.9	tr
2.0	0.43	78.3	1.6	4.3	7.6	8.2	tr
3.0	0.42	82.0	3.0	4.6	4.3	6.1	tr
4.0	0.44	74.7	2.4	4.7	6.2	12.0	tr
5.0	0.77	75.1	2.7	6.5	5.1	10.6	tr

* Percentage of NaCl added to the PGY medium. ** tr : trace. Conditions of incubation are same as in Table 1 except for NaCl concentration of the medium. Data showed the results in 3-day culture.

Table 4. FVFA in stomach fluid of the whale, *Neomeris phocaenoides*.

Fatty acids	Sample 1 (%)	Sample 2 (%)	Sample 3 (%)
C ₂	tr	67.3	38.0
C ₃	3.6	5.6	2.0
iso C ₄	6.7	4.0	2.4
?	32.4	3.2	2.6
C ₄	1.0	1.3	1.0
iso C ₅	55.3	18.6	54.0
C ₅	0.9	tr*	tr

* tr : trace. *Corynebacterium* sp., *Vibrio* sp., and yeasts were isolated from the stomach fluid of sample 1, 2, and 3 respectively.

る。一方, *Corynebacterium* sp. の場合, とくに発育温度試験での最適温度, すなわちイルカ体温付近に近づくと酢酸が激減し iso 吉草酸が激増することで胃内容液中の組成 (試料 1) により接近したが, それで

も両者が一致する段階にはほど遠く, また *C. tropicalis* 様酵母の場合には, 培養により得られた結果と胃内容液中の結果 (試料 3) とは著しく異なっていた。

前報 (3) で述べたように, イルカ胃内では *Vibrio* sp. が優占することから考えると, 今回の *Vibrio* sp. の培養液について得られた結果と胃内容液の結果が類似していたことはうなづける事実である。なお, 試料 1 と 3 の場合, 胃内に *Vibrio* 様の細菌を検境により認めしたが, 胃内でこれが優占していたか否かについては明らかでない。しかしながら, 培地中に生成される低級酸組成は培地成分で変動することが予測されるので, 今後この点の検討も必要である。

要 約

イルカ胃内から分離したグラム陽性細菌 (*Corynebacterium* sp.), グラム陰性細菌 (*Vibrio* sp.) および *C. tropicalis* 様酵母により, ペプトン・グルコース培

地から生成する遊離の低級酸量と組成を、発育温度、pH および塩分濃度を変えてしらべ、次の結果を得た。

1. 各供試菌株について、いずれの環境条件下でも酢酸、プロピオン酸、iso 酪酸、n 酪酸、iso 吉草酸(α -メチル酪酸を含む)、n 吉草酸を生成し、通常酢酸と iso 吉草酸が多かった。なお、*Corynebacterium* sp. では iso 酪酸を多く含むこともあった。

2. 各供試菌株について、いずれも発育最適条件下では酢酸が減少し、iso 吉草酸の増加を認めたが、とくに細菌はこの傾向が強かった。なお、*Vibrio* sp. の最適条件下での低級酸組成は胃内容液中の組成とよく類

似した。

終りに、本論文のご校閲をいただいた東北大学農学部教授金田尚志博士に対し謝意を表する。

文 献

- 1) 森井秀昭 (1973). 本誌, **35**, 85-90.
- 2) 森井秀昭・金津良一 (1972). 日水誌, **38**, 1035-1039.
- 3) 森井秀昭 (1972). 日水誌, **38**, 1177-1183.
- 4) 森井秀昭 (1973). 日水誌, **39**, 333.