

海洋性イルカ胃内から分離した *Vibrio* sp.

による魚類およびイカ類培地からの

低級および高級分枝鎖脂肪酸の生成

森 井 秀 昭

The Production of Short- and Long-Chain Branched Fatty Acids from Fish- and Squid-Extract Media by *Vibrio* sp. Isolated from the Stomach of Marine Little Toothed Whales

Hideaki MORII

Seeking the origin and the function of short- and long-chain branched fatty acid in oil of marine little toothed whales, the author studied whether or not *Vibrio* sp. isolated from the stomach of the animals produce the short- and long-chain branched fatty acids from fish- or squid-extract media. That is, the composition of short-chain fatty acids produced by the *Vibrio* sp. (V1, V2, V3, V4 and V5 strains : see previous paper (1)) from fish- and squid-extract liquid media, and the composition of long-chain fatty acid in the lipid of the *Vibrio* sp. incubated on squid-extract agar medium were studied by GLC. The results obtained are as follows.

1) In all the strains acetic, propionic, iso-butyric, n-butyric, iso-valeric (containing α -methyl butyric) and n-valeric acids were produced from all the fish- and squid-extract media. Acetic acid was ordinarily dominant, and iso-valeric acid showed a high value in some cases. Iso-butyric acid was scanty in all the cases.

2) In all the strains saturated iso-fatty acids of iso 10 : 0-iso 18 : 0 were recognized uniformly. The maximum value of iso-fatty acids was iso 16 : 0 in V1 and V2 strains and odd number of iso 17 : 0 or iso 15 : 0 in V3 and V4 strains.

3) Two types of the strains which anteiso fatty acids were recognized in some strains and not recognized in some others. The acid compositions in the former were mostly anteiso 13 : 0, 15 : 0 and 17 : 0.

イルカ油脂中の iso および anteiso 型の低級および高級分枝鎖脂肪酸 (低級および高級分枝酸と略記) の成因を明らかにするため、前報ではイルカ胃内から分離した微生物 (1, 2) によるペプトン・グルコース培地からのこれら分枝酸の生成の有無をしらべた結果、培地中に遊離の状態で低級分枝酸 (3, 4) が、また菌体中に高級分枝酸 (5) が生成されることを述べた。

通常微生物により培地中に生成される遊離の低級脂肪酸 (低級酸と略記) 組成は培地成分により変化する。また菌体中の高級脂肪酸 (高級酸と略記) についても同様で、事実、ペプトン培地培養の場合にはペプトン・グルコース培地培養の場合に比べ菌体中の分枝酸量は

著しく増加し、組成も変化していた (5)。

そこで今回は、イルカの餌料である魚類およびイカ類から調製した培地を用い、イルカ胃内微生物を培養した場合でも、イルカ油脂中の分枝酸と同じ分枝酸が生成されるか否か、またその組成が油脂中のそれと類似するか否かについて検討するため、培地中に生成する遊離の低級酸組成および菌体脂質中の高級酸組成を GLC でしらべた。なおイルカ胃内では *Vibrio* sp. が優占し (1)、したがって油脂中のこれら分枝酸が胃内で微生物の作用により生成されるとしても、それは主として *Vibrio* sp. によると考えられたため、今回はとくに *Vibrio* sp. について実験を行なった。

材 料 と 方 法

供試細菌 培地中の生成低級酸組成をしらべる実験には *Vibrio* sp. の V1, V2, V3, V5 株〔前報 (1) 参照〕を、また菌体脂質中の高級酸組成をしらべる実験には *Vibrio* sp. の V1, V2, V3, V4 株を用いた。V1・V2 株, V3・V4・V5 株では生理化学的性状はほぼ一致し (1), またペプトン・グルコース培地を用いた場合の菌体中の高級分枝酸量も V1・V2 株は V3・V4・V5 株に比べて著しく多く、後者ではその存在をほとんど認めなかった (5)。

培地の調製 マアジ, マサバ, イサキなど魚類の場合は全魚体, イカ類 (Table 3 参照) は介殻と墨汁のうを除いたものをそれぞれ播漬後 2 倍容の水道水を加え, 5°C の冷蔵庫中に一夜放置した後, 50°C で 1 時間加熱後煮沸し, 二重ガーゼでろ過した。これを 120°C (2 気圧下) で 15 分間滅菌しろ紙でろ過し, 塩化ナトリウム 2.5% を加え pH 7.0 に調整し, 再度加熱滅菌したものを培地とした。

低級分枝酸生成試験 30°C で 18 時間培養した培養液の 1 白金耳を 100 または 200 ml 容試験培地に接種し, 同温度で 36 時間培養後, 培地中に生成した遊離の低級酸量と組成をしらべた。

高級分枝酸生成試験 前報 (5) と同様にして 30°C で 3 日間平板培養後の菌体脂質の高級酸組成をしらべた。

低級酸の調製 25% メタリン酸で除蛋白したものを前報 (6) と同様にして調製した。

菌体からの脂質の抽出 前報 (5) と同様にして培養基から分離した菌体を Bligh and Dyer 法に準じクロロホルム・メタノールで抽出した。なお含油量は V1 株 0.3%, V2 株 0.6%, V3 株 1.1%, V4 株 0.8% であった。

高級酸メチルエステルの調製 前報 (7) と同様にして行なった。

高級酸メチルエステルの水素添加 GLC における脂肪酸同定のために行なった脂肪酸メチルエステルの水素添加は前報 (7) と同様にして行なった。

低級酸の GLC Tween 20 カラムで行なった。これらの概要を Table 1 に示す。

低級酸の同定は標準物質で検討したが, iso 吉草酸と α -メチル酪酸の保持時間は同じであった。したがって, iso 吉草酸区分には α -メチル酪酸が含まれる。

Table 1. Operating conditions of GLC of short chain fatty acid.

Instrument :	Shimadzu Gas Chromatograph GC-3BF
Colum :	20% Tween 20 on Diasolid S (80-90 mesh) 3.0 mm i.d. x 2.0 m, stainless steel spiral tubing
Column temp. :	173°C
Injector temp. :	248°C
Detector :	Hydrogen flame ionization system, H ₂ 40 ml/min. Temp. 220°C
Carrier gas :	N ₂ 30 ml/min.
Sample size	0.4-0.8 μ l

Table 2. Operating condition of GLC of long-chain fatty acid.

Instrument :	Shimadzu Gas Chromatograph GC-3BF
Colum :	5% Diethylene Glycol Succinate Polyester (DEGS) on Shimalite W (60-80 mesh) 5% Silicone GE SE-30 on Chromosorb W (60-80 mesh), 3 mm i. d. x 4.4 m, glass spiral tubing
Column temp. :	DEGS : 185-187°C, SE-30 : 190°C
Detector :	Hydrogen flame ionization system, H ₂ 0.4 kg/cm ²
Carrier gas :	N ₂ 1.4 kg/cm ²
Air :	1.0 kg/cm ²
Sample size :	0.1-0.4 μ l

高級酸の GLC 極性の DEGS と無極性の SE-30 の両カラムで行なった。これらの概要を Table 2 に示す。

高級酸の同定は DEGS と SE-30 の両カラムについて ECL を測定し, 前報の値 (8) または既往の文献値 (9) と比較し, さらに偶数直鎖の飽和脂肪酸 (飽和酸と略記) の 10 : 0 ~ 22 : 0, 直鎖不飽和酸の 14 : 1 ω 5, 16 : 1 ω 7, 18 : 1 ω 7, 18 : 1 ω 9, 18 : 1 ω 12, 18 : 2 ω 6, 18 : 3 ω 3, 18 : 3 ω 6, 20 : 1 ω 9, 20 : 1 ω 15, 20 : 2 ω 6, 20 : 3 ω 3, 20 : 3 ω 6, 20 : 4 ω 6, 20 : 5 ω 3, 22 : 1 ω 9, 22 : 2 ω 9, 22 : 6 ω 3 および iso 14 : 0, anteiso 15 : 0, iso 16 : 0, anteiso 17 : 0 の混合分枝酸で検討した。

結 果

Vibrio sp. により, 魚類およびイカ類培地から生成された低級酸組成を Table 3 に示す。

各供試菌株とも, いずれの培地からも酢酸, プロピオン酸, iso 酪酸, n 酪酸, iso 吉草酸と微量ではあるが

Table 3. Production of FVFA from fish- and squid-extract media (NaCl 2.5%) by *Vibrio* sp.

Species (Japanese name)	Total FVFA (meq/100ml)	Fatty acids (%)					
		C ₂	C ₃	iC ₄	C ₄	iC ₅	C ₅
V1 strain							
<i>Trachurus japonicus</i> (Maaji)	1.85	88.8	0.4	0.6	0.6	9.3	0.3
<i>Scomber japonicus</i> (Masaba)	2.16	87.2	0.9	0.7	0.3	10.7	0.2
<i>Parapristipoma trilineatus</i> (Isaki)	0.79	93.0	1.8	0.4	1.3	3.5	tr
<i>Argyrosomus argentatus</i> (Ishimochi)	0.58	72.5	1.2	2.2	0.8	22.7	0.6
<i>Astroconger myriaster</i> (Maanago)	0.86	41.2	0.2	0.7	10.3	46.1	1.5
<i>Sepioteuthis lessoniana</i> (Aoriika)	0.77	90.5	2.1	0.4	1.0	6.0	tr*
<i>Poryteuthis kensaki</i> (Kensakiika)	0.76	94.0	2.6	0.1	0.5	2.8	tr
<i>Loligo japonicus</i> (Jindouika)	0.81	95.7	0.8	0.2	0.8	2.5	tr
V2 strain							
<i>Trachurus japonicus</i> (Maaji)	1.57	91.2	0.4	0.4	0.8	7.2	tr
<i>Scomber japonicus</i> (Masaba)	1.89	86.4	0.8	0.4	0.3	11.8	0.3
<i>Parapristipoma trilineatus</i> (Isaki)	0.77	94.4	3.4	0.4	0.1	1.7	tr
<i>Argyrosomus argentatus</i> (Ishimochi)	0.58	89.2	1.3	0.8	1.1	5.1	2.5
<i>Astroconger myriaster</i> (Maanago)	0.93	97.2	0.8	0.2	0.2	1.6	tr
<i>Sepioteuthis lessoniana</i> (Aoriika)	0.80	88.4	1.5	0.4	1.7	8.0	tr
<i>Poryteuthis kensaki</i> (Kensakiika)	0.81	97.1	1.4	0.3	0.2	1.0	tr
<i>Loligo japonicus</i> (Jindouika)	1.17	95.5	1.1	0.3	0.5	2.6	tr
V3 strain							
<i>Trachurus japonicus</i> (Maaji)	1.76	94.3	0.2	0.3	0.7	4.5	tr
<i>Scomber japonicus</i> (Masaba)	2.01	94.1	2.7	0.3	0.8	2.1	tr
<i>Parapristipoma trilineatus</i> (Isaki)	0.85	97.2	0.5	0.4	0.5	1.4	tr
<i>Argyrosomus argentatus</i> (Ishimochi)	0.93	86.7	8.1	0.4	0.3	4.5	tr
<i>Astroconger myriaster</i> (Maanago)	1.35	90.7	0.8	0.4	2.1	6.0	tr
<i>Sepioteuthis lessoniana</i> (Aoriika)	1.44	94.7	2.3	0.4	0.3	2.3	tr
<i>Poryteuthis kensaki</i> (Kensakiika)	1.46	93.8	2.1	0.4	0.4	3.3	tr
<i>Loligo japonicus</i> (Jindouika)	0.98	96.3	1.0	0.3	0.4	2.0	tr
V5 strain							
<i>Trachurus japonicus</i> (Maaji)	2.50	86.8	0.7	0.6	0.1	11.8	tr
<i>Scomber japonicus</i> (Masaba)	2.41	96.1	1.8	0.1	0.3	1.7	tr
<i>Parapristipoma trilineatus</i> (Isaki)	0.90	96.5	1.7	0.2	0.3	1.3	tr
<i>Argyrosomus argentatus</i> (Ishimochi)	0.82	78.7	6.9	1.5	0.6	11.7	0.6
<i>Astroconger myriaster</i> (Maanago)	1.03	97.1	0.8	0.3	0.2	1.6	tr
<i>Sepioteuthis lessoniana</i> (Aoriika)	0.96	88.5	1.5	0.4	1.6	8.0	tr
<i>Poryteuthis kensaki</i> (Kensakiika)	0.95	93.6	2.1	0.4	0.6	3.3	tr
<i>Loligo japonicus</i> (Jindouika)	1.32	94.4	2.2	0.5	0.5	2.4	tr

*tr : trace. Incubation was made for 36 hrs. at 30°C.

n 酪酸をも生成した。これら脂肪酸は大部分が酢酸で占められたが、iso 吉草酸を著量に認める場合もあり、とくに V1 株がマアナゴ培地から生成した脂肪酸は酢酸よりむしろ iso 吉草酸が多かった。また iso 酪酸も認められたが、いずれも少量であった。

なお、各供試菌株とも、マアジとマサバ培地から生成した低級酸量はイサキ、イシモチ、マアナゴなど白味の魚やイカから調製した培地からの生成量よりも著しく多かった。

イカ培地で培養した *Vibrio* sp. の菌体脂質中の高

Table 4. Fatty acid composition in lipid of *Vibrio* sp. incubated on squid extract-agar medium (%).

Fatty acid		Strain	V1	V2	V3	V4
iso	10 : 0		0.01	0.01	0.02	0.01
	10 : 0		0.01	0.01	0.09	0.10
	10 : 1		nd*	nd	nd	nd
iso	11 : 0		0.01	0.01	0.01	0.01
	anteiso	11 : 0	tr**	tr	tr	tr
		11 : 0		0.02	0.03	0.06
iso	11 : 1		nd	nd	nd	nd
	12 : 0		0.05	0.04	0.22	0.13
	12 : 0		0.15	0.08	1.08	2.13
iso	12 : 1		0.02	0.02	0.42	0.42
	13 : 0		0.14	0.06	0.20	1.18
	anteiso	13 : 0		0.06	0.03	tr
13 : 0			0.27	0.16	0.02	0.09
13 : 1			tr	0.04	tr	nd
iso	14 : 0		0.31	0.54	0.15	0.12
	14 : 0		1.57	0.75	2.12	4.18
	14 : 1		0.31	0.19	1.08	0.56
iso	15 : 0		0.76	0.43	0.21	5.90
	anteiso	15 : 0	0.41	0.34	tr	nd
		15 : 0		7.23	5.67	1.15
iso	15 : 1		1.96	1.40	0.02	tr
	16 : 0		2.23	4.52	0.24	0.42
	16 : 0		11.45	7.86	36.99	26.04
iso	16 : 1		24.73	25.34	20.45	24.40
	17 : 0		1.73	1.08	0.41	2.81
	anteiso	17 : 0		0.54	0.73	nd
17 : 0			8.34	5.63	1.07	2.45
17 : 1			14.58	15.79	0.70	0.52
iso	18 : 0		0.40	0.84	0.22	0.18
	18 : 0		0.88	0.92	4.48	3.61
	18 : 1		17.82	23.53	14.28	9.86
iso	18 : 2 ω 6		0.03	0.01	0.15	0.12
	18 : 3 ω 6		nd	nd	0.10	0.50
	18 : 3 ω 3		0.08	0.09	nd	nd
iso	19 : 0		tr	tr	nd	nd
	19 : 0		0.05	0.04	0.14	0.31
	19 : 1		0.51	0.74	0.18	0.08
iso	20 : 0		nd	nd	0.03	0.04
	20 : 0		0.03	tr	0.20	0.09
	20 : 1 ω 9		0.31	0.47	1.69	0.69
iso	20 : 2 ω 6		nd	nd	0.15	0.18
	20 : 3 ω 9		0.13	nd	0.32	3.36
	20 : 3 ω 6		nd	nd	0.13	nd
iso	20 : 4 ω 6		0.43	0.43	2.62	1.57
	20 : 4 ω 3		0.07	0.03	0.71	0.19
	20 : 5 ω 3		0.94	0.81	3.42	2.25
iso	21 : 0		nd	nd	nd	0.02
	22 : 0		nd	nd	nd	nd
	22 : 1 ω 9		0.12	0.06	0.32	0.17
iso	22 : 2 ω 6		0.19	0.18	0.29	0.18
	22 : 4 ω 6		0.04	0.04	0.36	0.16
	22 : 5 ω 6		0.05	0.05	0.24	0.23
iso	22 : 5 ω 3		0.03	0.05	0.27	0.34
	22 : 6 ω 3		1.00	0.95	2.99	3.10
	iso (total)		5.63	7.52	1.69	10.79
anteiso (total)		1.01	1.10	tr	tr	

* nd : not detected. ** tr : trace.

級酸組成を Table 4 に示す。

各供試菌株とも iso 10 : 0 ~ iso 18 : 0 の iso 型飽和酸をほぼ一様に含有し、また V3 株を除く他の菌株ではその量もかなり多かった。その組成は V1, V2 株では iso 16 : 0, V3 株では iso 17 : 0, V4 株では iso 15 : 0 を極大とした。なお、iso 型不飽和酸は確認できなかった。

anteiso 型脂肪酸 (anteiso 酸と略記) については、V1, V2 株では anteiso 13 : 0, 15 : 0 および 17 : 0 の奇数飽和酸を認めたが、量は少なかった。なお、不飽和酸は認められなかった。また V3, V4 株では anteiso 酸の存在をほとんど認めなかった。

直鎖酸は、ペプトン・グルコース培地やペプトン培地で培養した場合と同様、炭素数13以下の脂肪酸を比較的多く含む点で共通していたが、各種の高度不飽和酸を含む点で異なり、とくに V3, V4 株ではかなり多量に認められた。

考 察

イルカ胃内から分離した *Vibrio* sp. は、イルカの餌料である魚類やイカ類から調製した培地から iso 吉草酸などの分枝酸を含む低級酸を生成した。しかも低級酸は、培地によっては iso 吉草酸を著量に含み、イルカ胃内容液について見られた傾向 (4, 6) とほぼ同一傾向を示す場合もあった。すなわち、イルカ胃内で認めた iso 吉草酸などの低級酸 (4, 6) は、胃内で優占するこれら *Vibrio* sp. (1) を主とする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 iso 吉草酸などの低級分枝酸も、これらの分枝酸に由来すると考えられる。

一方、高級分枝酸のうち、iso 酸については、前報 (5) で述べたようにペプトン・グルコース培地では V4 株は iso 酸をほとんど生成しなかったが (5)、今回イカ培地では約11%の iso 酸を生成した。また V1, V2 株ではペプトン培地培養の場合と同様に iso 16 : 0, V3, V4 株では iso 17 : 0 や iso 15 : 0 などイルカ油脂中に多く含まれるこれら iso 酸を最も多く生成し、その量もかなり多かった。また、anteiso 酸については、今回 V1, V2 株はイルカ油脂中主成分である anteiso 13 : 0, 15 : 0 および 17 : 0 を生成したが、ペプトン・グルコース培地やペプトン培地ではこれら両菌株とも anteiso 酸の生成を認めなかった (5)。すなわち、通常イルカによりよく摂餌されているイカを培地とすることで、胃内微生物により生成される分枝酸

組成がよりイルカ油脂中の組成に近づいたということができ、したがってイルカ油脂中の高級分枝酸についても反すう動物 (10) 同様、これら胃内微生物脂質に由来することが考えられる。

しかしこれらのことをより確かにするには次のような事項を検討する必要がある。すなわち 1) 生体イルカの胃内で常時多数の微生物が生育するか否か (現在までに微生物を分離したイルカは大部分が死後のイルカであり、また生菌数についてはこれらのほんの 1 ~ 2 例しかしらべていない)、そして 2) 低級分枝酸の成因を考えるについては、反すう動物に見られるように (11~13) 胃内容液中の低級酸量とアミノ酸量およびアンモニア量との間に相関性があるかどうか、3) 高級分枝酸の成因を考えるについては、同様に (10) 胃内容物菌体部の脂肪酸組成とイルカ油脂中の組成が類似するかどうかなどについてしらべる必要がある。

要 約

海洋性イルカの胃内から分離した *Vibrio* sp. により、魚類やイカ類培地から生成された遊離の低級酸組成、およびイカ培地の寒天平板上で培養した同菌体脂質中の高級脂肪酸組成をしらべ、次の結果を得た。

1. 各供試菌株とも、いずれの培地からも酢酸、プロピオン酸、iso 酪酸、n 酪酸、iso 吉草酸、n 吉草酸を生成した。通常、これら脂肪酸の大部分が酢酸であったが、iso 吉草酸を著量に含む場合もあった。しかし iso 酪酸はいずれも少量であった。

2. いずれの菌体脂質にも iso 10 : 0 ~ iso 18 : 0 を一様に認め、また V1, V2 株では iso 16 : 0, V3, V4 株では iso 17 : 0 や iso 15 : 0 など奇数酸を極大とした。

3. 菌体脂質には anteiso 酸を認める場合とそうでない場合があり、そして前者の場合の成分は主として anteiso 13 : 0, 15 : 0 および 17 : 0 であった。

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。

文 献

- 1) 森井秀昭 (1972). 日水誌, **38**, 1177-1183.
- 2) Morii, H. (1973). *Bull. Japan. Sco. Sci. Fish.*, **39**, 333.
- 3) 森井秀昭 (1973). 本誌, **35**, 85-90.
- 4) 森井秀昭 (1979). 本誌, **47**, 43-48.

- 5) 森井秀昭 (1974). 日水誌, **40**, 275-283.
- 6) 森井秀昭・金津良一 (1972). 日水誌, **38**, 1035-1039.
- 7) 金津良一・森井秀昭・福原忠信 (1969). 本誌, **28**, 161-165.
- 8) 森井秀昭・金津良一 (1972). 日水誌, **38**, 599-605.
- 9) Ackman, R. G., Burgher, R. D. and Jangaard, P. M. (1963). *Can. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 1627-1641.
- 10) Keeney, M. and Kats, I. (1962). *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **39**, 198-201.
- 11) EL-Shazly, K. (1952). *Biochem. J.*, **51**, 640-647.
- 12) EL-Shazly, K. (1952). *Biochem. J.*, **51**, 648-653.
- 13) Lewiss, D. (1955). *Brit. J. Nutrient*, **9**, 215-229.