養殖魚類の脂質に関する研究—I

飼料用炭化水素資化酵母のトリグリセリドと ステリルエステルの組成について

松 居 正 巳^{*1}・河 端 俊 治^{*2}

(1974 年 10 月 14 日受理)

Studies on the Lipid Components in Cultured Fishes—I The Triglycerides and Sterylesters in the Lipids of Single Cell Protein from Hydrocarbons

Masami MATSUI^{*1} and Toshiharu KAWABATA^{*2}

The present studies aimed to elucidate the structures of triglycerides and sterylesters contained in the single cell protein (SCP) grown on hydrocarbons. Lipids of two types of SCP samples were extracted with a chloroform-methyl alcohol mixture (2:1). The triglycerides and sterylesters in these lipids were separated by thin layer chromatography then subjected to gas chromatographic (GLC) analysis.

The lipids of SCP samples were found to consist of triglycerides having even and odd carbon numbers ranging from C₃₀ to C₃₄, these triglycerides were composed of fatty acids which contained even and odd numbers of carbon atoms ranging from C₁₃ to C₁₉. On the basis of these carbon numbers for fatty acids and triglycerides, the possible structures for triglycerides in the SCP sample were estimated. In order to obtain confirmatory evidence for the estimation, a new type of GLC reaction column was devised for separating the fatty acids of a triglyceride into the form of methylester derivatives.

When triglycerides of the C₄₈ and C₄₉ series were analyzed using the new apparatus, it was revealed that the C₄₈ triglyceride consists of fatty acids, C 14:0, C 15:1, C 16:1 and C 17:1, while the latter contained C 14:0, C 15:1, C 16:1, C 17:1 and C 18:1, respectively.

It was found that the sterylesters in the SCP samples ergosterol-fatty acid complexes consisting of fatty acids with carbon numbers ranging from 13 to 18.

たんばく資源の確保は今や世界的な問題となつている。これに関連し動物飼料の供給対策の1つとして炭化水素資化酵母菌体たんばく (SCP) を家畜、家禽あるいは養魚などの飼料として答申するための実用化の検討が各国で広く行なわれている。¹⁾ わが国の水産関係においても魚の増養殖のたんばく飼料の1部として SCP を利用することが検討されてきたが、現在のところ厚生省から使用許可がおりていないため、実用化されるまで至っていない。

ところで、SCP の製品中に含有されている脂質中には奇数脂肪酸の存在しているという報告がある。²⁾ しかし、SCP 中のトリグリセリドの脂肪酸構成についての報告は全くみられない。

^{*1} (株)島津製作所東京研究所 (Tokyo Research Laboratory, Shimadzu Seisakusho, Ltd., Shibasaki, Chofu-shi, Tokyo)

^{*2} 国立予防衛生研究所食品衛生部 (Department of Biomedical Research on Food, National Institute of Health, Shinagawa-ku, Tokyo)

今回、著者らは2種の試製 SCP 試料についてトリグリセリド (ここでは TG と記す) とステリルエステル (SE と記す) の脂肪酸組成を調べ、それらの脂肪酸組成から TG と SE の構造を推定した。さらに、TG の構成脂肪酸を確認する意味で新しい機構の反応ガスクロマトグラフを試作し、SCP の TG の構成脂肪酸の分析に応用し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

SCP の試料 国内の2社で開発した試作品2種 (A, B) を用いた。

試薬 クロロホルム、メチルアルコール、エチルアルコール、石油エーテル、エチルエーテル、酢酸、硫酸、水酸化カリウム、N-ニトロソ N-メチルウレタンは和光純薬製の特級品を用いた。また、TG とエルゴステロールは Applied Science Laboratories 社製のクロマトグラフィー用試薬を使用した。

Table 1. Analytical conditions for gas chromatography and GC-MS analysis

Analytical conditions Samples	Apparatus	Column	Column length and I. D.	Carrier gas
Sterols	Shimadzu GC-5APF	1% OV-17	2 m × 3 mm	N ₂
	Shimadzu-LKB-9000 (GC-MS)	1% OV-17	2 m × 3 mm	He
Triglycerides	Shimadzu GC-5APF	1% OV-1	0.5 m × 3 mm	He
Fatty acids	Shimadzu GC-4BPF	15% DEGS	2 m × 4 mm	N ₂
		*20% KOH	0.05 m × 4 mm	He

* Reaction column

Table 2. Triglyceride components in the SCP samples

Samples Carbon numbers	A	B
	(%)	(%)
39	—	0.4
40	—	2.6
41	—	5.2
42	0.2	4.7
43	0.9	3.6
44	2.2	6.6
45	3.3	11.4
46	5.6	12.8
47	10.4	10.6
48	10.8	12.1
49	20.7	11.1
50	15.1	9.7
51	17.7	5.9
52	8.5	3.3
53	3.3	—
54	0.9	—

Table 3. Fatty acid components in the SCP samples

Samples Fatty acids	A	B
	(%)	(%)
C13 : 0	tr.	1.0
C13 : 1	tr.	tr.
C13 : 2	tr.	tr.
C14 : 0	4.0	4.1
C15 : 0	tr.	5.8
C15 : 1	16.3	7.5
C15 : 2	tr.	1.2
C16 : 0	3.4	6.8
C16 : 1	4.5	15.2
C17 : 0	4.0	2.3
C17 : 1	36.9	21.4
C18 : 0	tr.	tr.
C18 : 1	22.7	12.3
C18 : 2	8.1	15.3
C18 : 3	tr.	7.9

tr.: Trace

測定装置 ガスクロマトグラフは島津製作所製 GC-5APF と GC-4BPF を用いた。また、ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) は島津-LKB 9000 を使用した。

分析法 1) SCP より脂質の抽出; 乾燥した SCP 試料 50 g とクロロホルム: メチルアルコール (2:1 v/v) 150 ml を 300 ml の分液ロートに入れ、振とう器にて 30 分間振とうし、ブフナーロート付吸引びんでろ過した。ろ液は 300 ml の丸底フラスコに入れ、約 40°C の水浴上で有機溶剤が完全になるまで減圧濃縮した。濃縮した試料は TLC で TG と SE を分離した。^{3,4)}

2) TG, SE の加水分解; TLC から分離した TG と SE は 1 N の水酸化カリウム-エチルアルコール液 (エチルアルコール 100 ml に 5.6 g の水酸化カリウムを溶解させたもの) 10 ml を加えて 60°C の水浴上で 1 時間還流冷却を行なった。加水分解物は冷却後、蒸留水 20 ml を加えて、石油エーテル 50 ml で 3 回抽出した。石油エーテルは無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮し、得られた試料は GC-MS の分析試料とした。

一方、水層は 1 N の硫酸で酸性 (pH 5~2) にし、エチルエーテル 50 ml で 3 回抽出した。抽出した試料は 10 ml まで濃縮し、N-ニトロソ N-メチルウレタンに水酸化カリウムを加えて発生したジアゾメタンをエチルエーテル液に捕集した溶液でメチルエステルとした。メチル化した試料は GLC の分析試料とした。

3) GLC, GC-MS の分析条件; GLC, GC-MS でのステロール、脂肪酸メチルエステル、TG, SE の分析条件は Table 1 に示す。

結果および考察

SCP 中の TG 組成 食用油脂の TG を GLC で分析した場合、そのクロマトグラムは TG の炭素数の小さい順に流出される。TG の炭素数は $3n+3$ (n は脂肪酸の炭素数) で示されるが、ここでは TG の炭素数を $3n$ とした。

Table 2 は 2 種の SCP 試料中の TG 組成を示したが、TG の炭素数は 35~54 までが検出された。しかし、2 種の試料では TG 組成は異なっていることが分つた。しかも両者の TG 組成は現在まで知られている天然油脂中の TG 組成とは明らかに異なり、とくに、炭素数が奇数の TG は量的にみて、天然油脂中の TG 組成に比べてかなり相違があることが分つた。

TG の脂肪酸組成 SCP 中の脂肪酸組成に奇数脂肪酸が存在していることはすでに報告されているが、³⁾ ここでは TG の脂肪酸構成をしらべる目的で TG を加水分解し、その脂肪酸組成を分析した。その結果は Table 3 に示したが、炭素数 12~18 の脂肪酸組成であつた。天然の食用油脂の脂肪酸組成と比較して SCP の TG の脂肪酸に奇数脂肪酸が多く存在していることは今までの報告と一致している。

TG の脂肪酸構成の推定 TG の脂肪酸構成を推定する方法については現在までいろいろ提案されているが、³⁾ ここでは TG の炭素数と脂肪酸の炭素数から TG の脂肪酸構成の推定を行なった。

SCP の TG は炭素数 36~54 であり、その脂肪酸の炭素数は 13~18 であつた。両者の炭素数より脂肪酸の構成を推定すると Table 4 に示すような結果が得られた。実際には不飽和、飽和の脂肪酸構成も含めて考えればさらに多くの TG が存在するものと思われるが、TG を GLC で分析する場合、一般に高温で分析し、かつ短かい分離管を使用するので不飽和、飽和の脂肪酸構成の TG の分離はほとんど不可能であると考えられる。今まで容易に測定できる方法がなかつたために上記 TG の存在の確認は困難とされている。そこで、われわれは TG と脂肪酸構成を分析する装置について検討した。

TG の脂肪酸構成を分析する装置の試作 TG を直接 GLC で分析する方法はすでに確立されており、また、脂肪酸メチルエステルを GLC で分析する方法も確立されている。そこで、TG 分析用の装置と脂肪酸分析用の GLC を結合すれば TG の脂肪酸構成分析は可能であるが、TG を脂肪酸メチルエステルに変換する反応部がなければこの装置の意味は全くない。TG を脂肪酸メチルエステルにする方法にはエステル交換がある。この反応は試料が液体状であることで前提とされているが、GLC で分析する場合試料は気体状なので直接適用できない。しかし、酸、アルカリ物質を解媒にしてメチルアルコールを用いて GLC で

Table 4. The estimated structures of triglycerides in the SCP samples

Carbon number of triglycerides	Possible structures of triglycerides					
39	$\begin{matrix} -13 \\ -13 \\ -13 \end{matrix}$					
40	$\begin{matrix} -13 \\ -13 \\ -14 \end{matrix}$					
41	$\begin{matrix} -13 & -13 \\ -13 & -14 \\ -15 & -14 \end{matrix}$					
42	$\begin{matrix} -13 & -13 & -14 \\ -13 & -14 & -14 \\ -16 & -15 & -14 \end{matrix}$					
43	$\begin{matrix} -13 & -13 & -13 & -14 \\ -13 & -14 & -15 & -14 \\ -17 & -16 & -15 & -15 \end{matrix}$					
44	$\begin{matrix} -13 & -13 & -13 & -14 & -14 \\ -13 & -14 & -15 & -15 & -14 \\ -18 & -17 & -16 & -15 & -16 \end{matrix}$					
45	$\begin{matrix} -13 & -13 & -13 & -14 & -14 & -15 \\ -14 & -15 & -16 & -14 & -15 & -15 \\ -18 & -17 & -16 & -17 & -16 & -15 \end{matrix}$					
46	$\begin{matrix} -13 & -13 & -14 & -14 & -14 & -15 \\ -15 & -16 & -14 & -15 & -16 & -15 \\ -18 & -17 & -18 & -17 & -16 & -16 \end{matrix}$					
47	$\begin{matrix} -13 & -13 & -14 & -14 & -15 & -15 \\ -16 & -17 & -15 & -16 & -15 & -16 \\ -18 & -17 & -18 & -17 & -17 & -16 \end{matrix}$					
48	$\begin{matrix} -13 & -14 & -14 & -15 & -15 & -16 \\ -17 & -16 & -17 & -15 & -16 & -16 \\ -18 & -18 & -17 & -18 & -17 & -16 \end{matrix}$					
49	$\begin{matrix} -13 & -14 & -15 & -15 & -16 \\ -18 & -17 & -16 & -17 & -16 \\ -18 & -18 & -18 & -17 & -17 \end{matrix}$					
50	$\begin{matrix} -14 & -15 & -16 & -16 \\ -18 & -17 & -16 & -17 \\ -18 & -18 & -18 & -17 \end{matrix}$					
51	$\begin{matrix} -15 & -16 & -17 \\ -18 & -17 & -17 \\ -18 & -18 & -17 \end{matrix}$					
52	$\begin{matrix} -16 & -17 \\ -18 & -17 \\ -18 & -18 \end{matrix}$					
53	$\begin{matrix} -17 \\ -18 \\ -18 \end{matrix}$					
54	$\begin{matrix} -18 \\ -18 \\ -18 \end{matrix}$					

Number given in the figure indicate the carbon numbers of fatty acids.

1: Carrier gas, 2: Regulator, 3: On-off valve, 4: Primary pressure regulator, 5: Rotameter, 6: Flow controller, 7: Sample injection port, 8: Methyl alcohol injection port, 9: Triglyceride separation column (Column I), 10: Reaction column, 11: Fatty acid separation column (Column II), 12: Splitter, 13: Detector, 14: Electrometer, 15: Recorder, 16: Hydrogen gas, 17: Air compressor.

Fig. 1. Flow diagram of the gas chromatographic system for determining fatty acid components in a triglyceride in the form of methyl esters.

TG を脂肪酸メチルエステルとする方法はすでに提案されている。⁹⁾ この方法を反応部に採用すれば TG の脂肪酸構成分析が可能になるはずである。この原理に基づいて Fig. 1 に示したような装置の試作を行なった。

I の分離管で TG を分離し、分離した試料の 1/9 を FID 検出器で検出する。残りの試料は反応管に導き、TG を脂肪酸カリウム塩とし、反応管の注入口よりただちにメチルアルコールを 20 μ l 注入し、脂肪酸メチルエステルとして II の分離管で分離した。反応管内にはガラスビーズに水酸化カリウム 20% コーティングした充てん物を内径 3 mm, 長さ 5 cm のガラス管に充てんした。

この試作した装置を利用して TG の脂肪酸組成を分析する場合、分子の小さな脂肪酸 (炭素数 12 以下) で構成している TG の試料には適用できない。さらに、反応管の触媒の寿命が短かいので、連続して分析できないなどの欠点がある。しかし、TG 組成の 1~2 成分を分析するのに充分であり、今回は SCP 中の TG の炭素数 46, 49 の脂肪酸組成の分析に応用してみた。

その結果を Table 5 に示したが、炭素数 46 の TG は 14:0, 15:1, 16:1, 17:1 の脂肪酸が主成分であり、この脂肪酸組成から考えて、3 種の TG から構成されていることがわかった。また、炭素数 49 の TG は 14:0, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1 の脂肪酸組成から構成された 4 種の TG であることがわかった。

この結果から、SCP の炭素数 46, 49 の TG は単一グリセリドでなく、複合グリセリドであるといえる。また、炭素数 46, 49 の TG の脂肪酸組成には微量であるが、炭素数 14 以下, 18 以上の脂肪酸も検出された。

SCP の SE の構造 SCP 中のステロールとしてエルゴステロールが存在していることはすでに報告さ

Table 5. The structures of triglycerides in the SCP samples

Carbon number	Structures of triglycerides			
46	$\begin{bmatrix} \text{C14:0} \\ \text{C15:1} \\ \text{C17:1} \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} \text{C14:0} \\ \text{C16:1} \\ \text{C16:1} \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} \text{C15:1} \\ \text{C15:1} \\ \text{C16:1} \end{bmatrix}$	
49	$\begin{bmatrix} \text{C17:1} \\ \text{C14:0} \\ \text{C18:1} \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} \text{C15:1} \\ \text{C16:1} \\ \text{C18:1} \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} \text{C15:1} \\ \text{C17:1} \\ \text{C17:1} \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} \text{C16:1} \\ \text{C16:1} \\ \text{C17:1} \end{bmatrix}$

(I) Gas chromatograms of (A) ergosterol of sterylesters in the SCP
(B) authentic ergosterol.

(II) Mass spectrum of ergosterol of sterylesters in the SCP.

- (I) Gas chromatograms of (A) ergosterol of sterylesters in the SCP
(B) authentic ergosterol.
(II) Mass spectrum of ergosterol of sterylesters in the SCP.

Fig. 2. Identification of ergosterol of sterylesters in the SCP by GLC and GC-MS.

Fig. 3. Structures of ergosterylesters isolated from the SCP samples.

れている。⁷⁾ したがって、SCP 中の SE はエルゴステロールと脂肪酸組成のエステル結合であることが考えられる。そこで、TLC で分離した SE を加水分解し、そのステロールと脂肪酸組成の分析を行なった。ステロールは GLC と GC-MS によって分析したが、その結果を Fig. 2 に示した。両者の測定値からエルゴステロールであることが認められた。また、脂肪酸組成として炭素数 13~18 の脂肪酸が検出された。したがって、SCP 中の SE は Fig. 3 に示すような組成のエルゴステリルエステルであると考えられる。

要 約

わが国の 2 社で開発された SCP 試料について、TG と SE の構造について検討を行なった。試料中の脂質を抽出し、TLC で TG と SE を分離し、それらを GLC と GC-MS によって分析した。その得られた

結果を要約すると、

1. 2種のSCP試料中に含まれる脂質のTG組成は炭素数36~54であつた。また、TGの脂肪酸組成は炭素数13~18の脂肪酸であつた。TGと脂肪酸組成から供試SCP中のTGの脂肪酸構成を推定した。
2. TGの推定脂肪酸構成の確認のために反応GLCを試作し、SCP中に含まれる炭素数46と49のTGの分析に応用した。46のTGは14:0, 15:1, 16:1, 17:1の脂肪酸より構成され、49のTGは14:0, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1の脂肪酸構成であり、いずれも複合グリセリドであることがわかつた。
3. 供試SCP中のSEはエルゴステロールと炭素数13~18の脂肪酸のエステルであることがわかつた。

文 献

- 1) 加藤清昭: 臨床栄養, **42**, 530-539 (1973).
- 2) M. MISHINA, S. YANAGAWA, A. TANAKA and S. FUKUI: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 863-870 (1973).
- 3) N. IKEKAWA, M. MATSUI, T. YOSHIDA and T. WATANABE: 本誌, **38**, 1267-1274 (1972).
- 4) 松居正己・河端俊治・石橋 亨: 食衛誌, **14**, 517-523 (1973).
- 5) 今井 陽・坂上利夫: 脂質の生化学, 朝倉書店, 東京 (1968), pp. 37-39.
- 6) A. KATO, H. TOMITA and Y. YAMAURA: *Chem. and Ind.* 302-304 (1971).
- 7) A. TANAKA, R. YAMADA, S. SHIMIZU and S. FUKUI: *J. Ferment. Technol.*, **49**, 792-802 (1971).