

高速液体クロマトグラフィーによる微生物中の トコフェロール定量に関する一考察

A Study on Tocopherol Analysis in Microorganisms
by High Performance Liquid Chromatography.

玉 置 ミヨ子
戸 川 成 代

緒 言

脂質代謝の老化防止に関与しているビタミンとして最近とくに注目されているトコフェロール (Toc) は高等植物や微生物に於いて活発に合成¹⁾ され、又藻類にも広く分布し²⁾³⁾ クロロフィル含量の高いものほど α -Toc は多く含まれているとされている⁴⁾⁵⁾。又、その分析方法も従来の比色法、螢光法、薄層クロマトグラフィー (TLC)、ガスクロマトグラフィー (GC)⁶⁾ に代わって Toc 同族体の分離定量が簡単に、しかも正確に行なえる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による方法が脂溶性ビタミン総合研究会・ビタミンE小委員会⁷⁾ や勝井⁸⁾ らの研究によって明らかにされて以来、HPLC による食品中のビタミンE定量に関する報告がされ始めた⁹⁾⁻¹⁴⁾。

しかし、微生物に於ける Toc 同族体の分離定量については今のところ報告されていない。そこでわれわれは、クロレラ、イーストを試料に微生物菌体の Toc 同族体の抽出方法を検討し、併せてわれわれの研究室で培養した耐塩機構解明¹⁵⁾¹⁶⁾ に供した数種の微生物について Toc 同族体の含有量を測定したので報告する。

実 験 方 法

1. 菌体試料

Toc 同族体の抽出方法の検討には、ミヤコ海洋生物研究所より分与され、養殖魚の飼料として培養された海産性クロレラの凍結乾燥菌体及び市販のパン用圧搾イーストを、各々水に懸濁して、3,000r.p.m. 10分遠心分離し得られた菌体を Wet cell とした。実際の Toc 同族体の含

高速液体クロマトグラフィーによる微生物中のトコフェロール定量に関する一考察

有率を調べる為に供した微生物菌体は、緑藻類の一種、*Dunaliella Primolecta*, *Dunaliella Tertiolecta* と *Chlorella regularis var. umbricata*, *Chlorella Salina* 及びわれわれが土から分離し、同定した石油資化性酵母 *Candida Tropicalis* OT-65¹⁷⁾ の三種類で、次にのべる培養方法により培養した。

Chlorella ……Table 1 の培地組成を用い、500ml容三角フラスコに50mlずつ培地を分注し、

Table 1 Composition of medium for *Chlorella*

グルコース	30 g	* A ₅ 液	
KH ₂ PO ₄	3 g	H ₃ BO ₃	3.1 g
尿素	3 g	MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.23 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.287 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	8mg	(NH ₄) ₆ M ₀₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.088 g
A ₅ 液*	1ml	Co(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.146 g
NaCl	14.6 g	Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	0.033 g
純水	1000ml	KBr	0.119 g
		KI	0.083 g
		Cd(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.154 g
		NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ · 6H ₂ O	0.198 g
		VOSO ₄ · 2H ₂ O	0.02 g
		Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ · 24H ₂ O	0.474 g
		N/10 H ₂ SO ₄	1000ml

Table 2 Composition of medium for *Dunaliella*

NaCl	29.22 g	Fe-EDTA	3.64mg
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.5 g	EDTA-2Na	1.89mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.087mg
KCl	0.2 g	H ₃ BO ₃	0.61mg
CaCl ₂	0.2 g	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.015mg
KNO ₃	1.0 g	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.06mg
NaHCO ₃	0.043 g	MnCl ₂	0.23mg
TRIS	2.45 g	(NH ₄) ₆ M ₀₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.38mg
K ₂ HPO ₄	0.045 g	純水	1000ml

Table 3 Composition of medium for Yeast

グルコース	45.04 g
NH ₄ Cl	6.6 g
KH ₂ PO ₄	2.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 g
Biotin	2μg
NaCl	29.21 g
純水	1000ml

太陽光照射、温度28~32℃で数日間静置培養後、培養液を 3,000r.p.m. 10分間遠心分離し、得られた菌体を供試用 Wet cell とした。

Dunaliella ……Table 2 の培地組成を用いクロレラと同様に培養後、培養液を遠心分離し供試用とした。

Candida ……Table 3 の培地組成を用い500ml容肩つきフラスコに50mlずつ分注し、28℃で数日間振盪培養し、培養液をクロレラと同様に遠心分離し供試用菌体とした。

2. 試薬

1) エチルエーテル、n-ヘキサン、クロロホルム、石油エーテル、1,4-ジオキサン、メチルアルコール、エチルアルコール、ベンゼン……市販の特級品を用いた。

2) 純 α -、 β -、 γ -、 δ -トコフェロール (Toc)、トコール……エーザイ株式会社から分与されたものを使用し、トコールは内部標準物質 (内標) として用いた。

3. 脂質画分の抽出

脂質画分の抽出は Folch の分配法¹⁸⁾ の原理を組み合わせた Bligh-Dyer の方法¹⁹⁾ をもとに Fig. 1 の如く行なった。つまりクロレラ菌体 2 g を精秤し、10ml の純水に懸濁し更にクロロホルム、メタノール (C : M = 1 : 2) を 37.5ml 加え、激しく振盪し、10分間放置して抽出の後、3,000r.p.m. 5分遠心分離して菌体層と液層に分け、菌体残渣物を除き上層部にクロロホルムと水を各々12.5ml ずつ加えて、振盪し液が二層に分離するのを待ち、下層のクロロホルム層を分取する。先に分別採取した菌体残渣物については、始めと同様に、水10ml、C. M 液37.5ml 加え以下、先と同操作を2回繰り返して、クロロホルム層を3回分合一する。水分を除く為、少量のベンゼンを加えて窒素気流下にクロロホルムを留去し脂質画分を得た。尚、本法による添加 Toc 回収率をみるために、全く Toc を含有しないと確認済みの市販のパン用圧搾イーストに既知量の標準

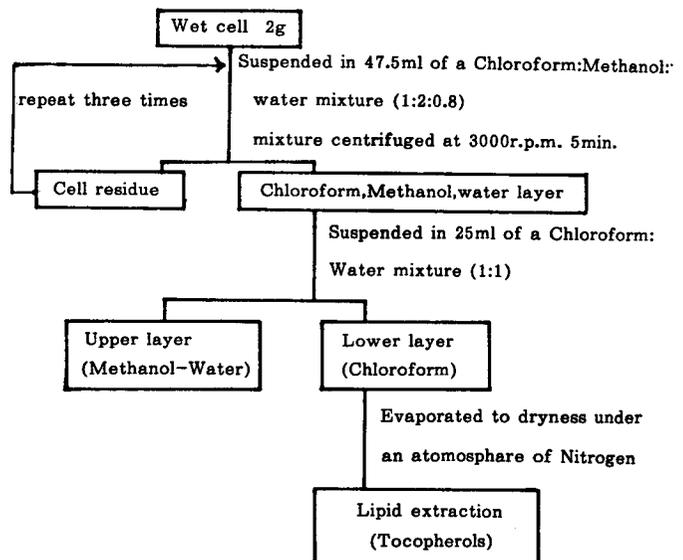


Figure 1 Schema of the procedure to extract lipid including tocopherols from microorganism.

α -、 β -、 γ -、 δ - Toc を添加し同様の抽出方法で脂質画分を抽出し HPLC で Toc 回収テストを行なった。

4. 脂質中に含まれるクロロフィルの除去

Bligh-Dyer 法で得たクロレラ脂質はクロロフィルを含んだ濃い緑色を呈しており、定量に直接の妨害はないが HPLC のカラムにこれらの物質が吸着され著しくカラムを汚染し、その機能が低下する恐れがあるので²⁰⁾ 得られた脂質について次に述べる活性炭カラムによる色素の除去を試みた。

活性炭はしばしば酸化触媒として働く恐れがあるので5~10倍量の20%サクサンと数分間煮沸し、熱水で洗浄し、水に懸濁した後活性炭100g当たり50mgのシアニ化カリウムを加えて充分熱水で洗浄し、酸化の触媒中心をおさえた活性炭²¹⁾ 2gをクロロホルムに懸濁させて、クロマトカラム管に流入し、N₂で加圧しながらクロレラ脂質を活性炭カラムに流下し、流出した液を集めた。更に活性炭カラムをクロロホルム、メタノール(C:M=2:1)20mlずつで3回洗って先の流出液と合一し、溶媒をN₂気流下に留去し、内標としてトコロールを添加したヘキサンの一定量に溶解し HPLC 試料とした。尚、本法による添加回収率をみるためにクロロフィルを含んだ脂質に既知量の標準 Toc を添加し同様の処理を行なった。

5. ケン化操作

1) ケン化時間の検討

アルカリ分解に要する時間を沸騰後、5分、15分、30分に設定し、クロレラ菌体を試料として次項に述べるケン化操作を行ない、測定値を比較した。

2) 不ケン化物抽出方法の検討

ケン化後の処理を簡便に迅速に行なうべく勝井⁹⁾ 原ら²²⁾ の行なった遠心管による不ケン化物の抽出方法を検討した。つまり、50ml容褐色共栓遠心沈澱管にパン用圧搾イースト (Wet cell) 1~2gをとり、既知濃度の標準 Toc アルコール溶液1ml、ピロガロール400mg、エチルアルコール7ml、60% KOH 水溶液2mlを加え、沸騰後5分間、還流しケン化を行なった。ケン化後、ただちに急冷し、水16ml、更にヘキサン10mlをホールピペットで正確に加え、激しく5分間振盪し、3,000r.p.m. 5分間遠心分離し、上層部のヘキサン層を一定量、マイクロシリンジで採取し、HPLC に注入した。

一方、分液ロートによる不ケン化物の抽出溶媒を検討すべく、同様にしてケン化操作を終えた試料を、水16ml、不ケン化物抽出溶媒50mlと共に300ml容褐色分液ロートに移し、充分振盪、攪拌の後、二層に液が分離するのを待って、上層を分取した。下層部についても更に2回、同様にして不ケン化物抽出を繰り返し全抽出液を合わせ、洗液がアルカリ性を示さなくなるまで蒸留水で洗浄し芒硝を加え脱水の後、N₂気流下に溶媒を留去した。得られた不ケン化物はト

コール含有の一定量のヘキサンに溶解し HPLC 試料とした。尚、不ケン化物抽出溶媒として、ヘキサン、エチルエーテル、石油エーテルの三種類を用い、各々溶媒における添加 Toc 同族体の回収率を比較検討した。

6. HPLC による定量

内部標準物質としてトコール²³⁾ を添加した一定量のヘキサンで前処理した試料を溶解し、うちマイクロシリンジで10 μ l 採取し、カラムに注入して HPLC を行ない、内標と対比して定量した。分析装置は島津高速液体クロマトグラフ LC-3A を用い下記条件によりトコフェロール同族体の分離定量を行なった。

分析条件

カラム：Shimazu zorbax SIL (4.6mm \times 250mm)

移動相：n-Hexane. 1.4-Dioxane. Et OH (97.6 : 2.0 : 0.4)

流体：1.5ml/min.

検出器：島津分光螢

光光度計、RF-500

(励起波長298nm、

螢光波長325nm)

上記条件での標準物質のクロマトグラフは Figure 2 に示す通りである。

実験結果及び考察

1. 脂質画分の抽出方法の検討

Bligh-Dyer 法を応用した脂質画分の抽出方法による Toc 同族体の抽出率をみるために、パン用圧搾イーストに既知量の標準 Toc を添加して行なった回収試験では、Table 4 に示すように各 Toc 共に 97~103% の回収

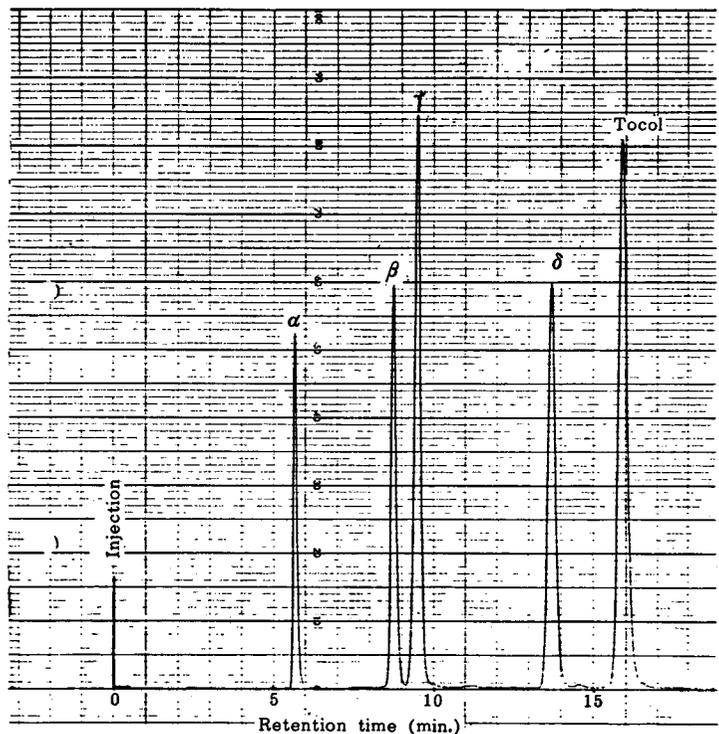


Figure 2 HPLC Chromatogram of a mixture of α -, β -, γ -, δ -Tocopherol and tocol standards.

高速液体クロマトグラフィーによる微生物中のトコフェロール定量に関する一考察

Table 4 Recoveries of Tocopherol added to Baker's yeast cell by Bligh-Dyer method.

Tocopherol	Added tocopherol A(n μ g)	Recovered tocopherol B(n μ g)	Recovery $\frac{B}{A} \times 100(\%)$
α -Tocopherol	516	513	99.4
β -Tocopherol	517	501	96.9
γ -Tocopherol	763	783	102.6
δ -Tocopherol	998	980	98.2

Table 5 Recoveries of Tocopherol removed chlorophyll by the active carbon treatment.

Tocopherol	Added tocopherol A(n μ g)	Recoverd tocopherol B(n μ g)	Recovery $\frac{B}{A} \times 100(\%)$
α -Tocopherol	516	140	27.1
β -Tocopherol	517	212	41.0
γ -Tocopherol	763	176	23.1
δ -Tocopherol	998	405	40.6

率を示しており本法による脂質抽出操作中の Toc の損失はないといえる。従ってクロロフィルを含有していない微生物菌体の Toc 同族体の定量を行なう場合には、本法により脂質画分を抽出しヘキサンに溶解すれば HPLC 試料とすることができる。

2. 脂質中のクロロフィルの除去

クロロフィルを多量に含む緑藻類の脂質を脱色の為に行なった活性炭処理の結果、総 Toc 値で菌体を直接ケン化した値の 1/5~1/10 位しか検出されなかった。活性炭カラム処理による Toc 抽出率の低さと考えられる。

この点を実証する為に行なった既知量の Toc をカラム処理した回収テストの結果は Table 5 の如くであり、活性炭カラムによる Toc の損失が判明した。カラムクロマトグラフィーによるクロロフィルの吸着と Toc の完全な溶出をみるため、更に GC や TLC の試料精製に行なわれた津郷ら²⁴⁾ のフロリジルカラムや芝原ら²⁵⁾ の活性アルミナカラムにより、クロレラ脂質に添加した標準 Toc の回収試験を行なって、色素の除去を試みたが、Toc の溶出が不十分であったり、Toc の 100% 近い溶出ではクロロフィルも共に溶出してくる等で、いずれの方法も良好な結果は得られなかった。従ってクロロフィルを多く含む微生物より得た脂質の脱色は、カラム処理による方法は不適當であると結論を得た。

3. 微生物菌体のケン化操作

微生物菌体のアルカリ分解に必要なケン化時間については実験者によりまちまちで Stancher ら²⁶⁾ によるタラ肝油については常温で一夜攪拌している例もある⁵¹⁾ が一般には沸騰湯浴中で 15~30 分を行なわれている。クロレラ菌体による本実験の結果は各時間共に著明な差異が

高速液体クロマトグラフィーによる微生物中のトコフェロール定量に関する一考察

Table 6 Recovery of Tocopherol from Baker's yeast cell containing tocopherol when these are extracted once with hexane using centrifuge tube (%)

Tocopherol	Added tocopherol A(ng)	Recovered tocopherol B(ng)	Recovery $\frac{B}{A} \times 100(\%)$
α -Tocopherol	516	437	84.6
β -Tocopherol	517	421	81.4
γ -Tocopherol	763	610	79.9
δ -Tocopherol	998	589	59.0

Table 7 Recovery of tocopherol from Baker's yeast cell containing tocopherol when these are extracted thrice with Hexane, ethyl ether and petroleum ether using separatory funnel (%)

Tocopherol	Added tocopherol (ng)	Recovered tocopherol (ng)			Recovery (%)		
		A Hexane	B petroleum ether	C ethyl ether	A	B	C
α -Tocopherol	516	508	503	509	98.4	97.5	98.6
β -Tocopherol	517	492	514	509	95.2	99.4	98.5
γ -Tocopherol	763	696	760	749	91.2	99.6	98.1
δ -Tocopherol	998	919	981	971	92.1	98.3	97.3

なく、沸騰後5分間のケン化で充分であると結論を得た。従ってその後の各種条件の検討にはケン化時間を沸騰後5分と定めて行なった。

又、定量法の迅速化をはかる為に行なった沈澱管によるパン用圧搾イースト菌体に添加した既知量の標準 Toc 回収率の結果は Table 6 の如く期待通りの好成績を示さなかった。われわれが予備実験として大豆油を試料に行なった結果は α -Toc では99.5%の回収率を示したことから菌体試料からくる物理的・化学的な特性により十分に抽出し得なかったと思われる。

更に菌体に於ける Toc 同族体の満足すべき抽出をみるために充分な抽出溶媒を用いて Toc 同族体の抽出溶媒の種類について検討した結果は Table 7 にみられる如くヘキサンに於いては抽出回数を増やしても α -Toc 以外の抽出が充分でないことがわかる。但し試料菌体を加えないで同様の処理を行なった標準 Toc の回収率はいずれも99~101%の好成績であった。ヘキサンによる試料中の VE 抽出率の低下は最近の B. Stancher ら²⁶⁾ の実験でも報告され、試料の共存により Toc 同族体の抽出の難易が異なることは非常に興味深い。

石油エーテル、エチルエーテルを用いての Toc 回収結果は Table 7 にみられる如く、両者共 Toc 同族体の全てが100%近い回収率を示していることから両者とも不ケン化物抽出溶媒として用いることができるが、激しく攪拌するとエマルジョンになりやすいエーテルに比して液層の分離が速い石油エーテルを用いた方がとり扱い上便利である。以上のことから微生物菌体

高速液体クロマトグラフィーによる微生物中のトコフェロール定量に関する一考察

を試料とした Toc 同族体の分離定量は Wet cell 1~2 g、5%ピロガロールアルコール 8 ml、60% KOH 水溶液 2 mlを加え、沸騰後 5 分間還流冷却し急冷の後、分液ロートに水 16 ml と共に移し、石油エーテル 50 ml ずつで 3 回抽出を行えばよいと結論を得た。以上の方法でクロレラ、ドナリエラ、酵母菌について Toc 同族体の分離定量を行なった結果は Table 8、9、10 の如くである。クロレラ、ドナリエラには Wet cell 100 g 当たり平均 8 mg の総 Toc が含有され、共に α -Toc の占める割合が 90% 前後占め、クロロフィル含量の高いものには α -Toc が多く含まれるという報告に一致している。酵母菌体については一般に VE 含有は認められない²⁷⁾ とされているが、本法によって行なった数回の実験では Table 9 の如く、ごく微量ではあるが α -Toc、 δ -Toc の存在が確認された。従来の分析方法では感知できないほどの微量であることから本来、酵母菌の大部分に微量の VE を含有している事実が見過ごされてきたものか、あるいは培養条件による菌の特性によるものかは今後、更に多くの酵母菌をとり扱うことによって明らかになるであろう。

本法により酵母菌に限らず多くの微生物について培養条件と VE 含有量との関係を追求す

Table 8 Tocopherol contents in chlorella and Dunaliella.

Sample	Tocopherol contents (mg/wet cell 100 g)				
	α -Toc	β -Toc	γ -Toc	δ -Toc	総 Toc
<i>Chlorella regularis</i> var. <i>umbricata</i>	4.57	0.32	0.13	0.16	5.18
<i>Chlorella Salina</i>	5.18	0.34	0.13	0.17	5.82
<i>Dunaliella Primolecta</i>	9.90	0.28	0.20	0.18	10.56
<i>Dunaliella Tertiolecta</i>	11.80	0.20	0.21	0.23	12.44

Table 9 Tocopherol contents in yeast.

Sample	Tocopherol contents (ng/wet cell 100 g)				
	α -Toc	β -Toc	γ -Toc	δ -Toc	総 Toc
<i>Candida Tropicalis</i> OT-65	13.4	—	—	41.8	55.2

Table 10 Percentage composition of tocopherol in Chlorella, Dunaliella and yeast.

Sample	Tocopherol composition (%)			
	α -Toc	β -Toc	γ -Toc	δ -Toc
<i>Chlorella regularis</i> var. <i>umbricata</i>	88.2	6.2	2.5	3.1
<i>Chlorella Salina</i>	89.0	5.8	2.2	2.9
<i>Dunaliella Primolecta</i>	93.8	2.7	1.9	1.7
<i>Dunaliella Tertiolecta</i>	94.9	1.6	1.7	1.8
<i>Candida Tropicalis</i> OT-65	24.3	—	—	75.7

ることは VE の量産資源の面と作用機構解明の点から意味深いものと思っている。

要 約

HPLC による微生物菌体の Toc 同族体定量法について脂質画分の抽出方法、特に緑藻類から得た脂質中に多量に含まれるクロロフィルの除去及び菌体の直接ケン化法について検討し、数種の微生物について VE 含有量を測定した。

1) 菌体からの脂質画分で抽出する方法は、Bligh-Dyer 法を応用して行なった結果、添加 Toc の回収率は97~103%を示し、緑藻類以外の微生物については本法により脂質画分試料を準備し、HPLC 分析することができる。

2) クロロフィルを多量に含む緑藻類の脂質画分に含まれるクロロフィル除去には活性炭カラム、フロリジルカラム、中性アルミナカラム処理のいずれにも完全な Toc 回収率をみることができず、脂質画分を更にケン化、又は菌体を直接ケン化する方法によらなければいけない。

3) 微生物菌体の直接ケン化法について種々検討してみた結果、ケン化時間は沸騰後5分間で充分であった。ケン化後の Toc 抽出溶媒としては菌体試料共存下ではヘキサンには、 β -、 γ -Toc がやや難溶でエチルエーテルではエマルジョンになりやすく、石油エーテルによる抽出が最も扱いやすかった。

4) 以上の方法によりクロレラ、ドナリエラ、特定酵母等について Toc 同族体の含有量について調べた結果、総 Toc でクロレラには、Wet cell 100 g 中平均5.50mg、ドナリエラでは平均11.84mg含有され、いずれも α -Toc が90%前後占め他に β 、 γ 、 δ -Toc が確認された。

尚、酵母菌に於ては VE は含有されていないという過去の概念と異なり、微量ではあるが含有の可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を進めるに当たり、種々御助言をいただきました小原国彦教授、並びに本実験に積極的に努力された飯塚都子嬢に敬意と謝意を表します。又、試料を提供いただいた多くの方々へ深謝いたします。

なお、本研究の一部は私立短期大学協会研究助成金によって行ないました。

文 献

- 1) 日本ビタミン学会編：“ビタミン学(1)” p. 193 (1980).
- 2) A. Jensen: J. sci. Food Agr., 20, 449 (1969).
- 3) 兼松 弘, 牛草寿昭, 丸山武昭ら：栄養と食糧, 36, 239-245 (1983).
- 4) V. H. Booth: Phytochem., 2, 421 (1963).
- 5) 山内 亮, 松下雪郎：農化, 50, 569-570 (1976).

高速液体クロマトグラフィーによる微生物中のトコフェロール定量に関する一考察

- 6) 勝井五一郎：ビタミン，54，361-371 (1980).
- 7) 脂溶性ビタミン総合研究委員会，ビタミンE小委員会：ビタミン，51，373-380 (1977).
- 8) 勝井五一郎：ビタミン，55，267-272 (1981).
- 9) Taylor, P., Barnes P.: Chem. Ind., 20, 722-726 (1981).
- 10) Manz, U., Philipp, K.: Int. J. Vitam. Nutr. Res. 51, 342-348 (1981).
- 11) 平井和子，石沢里美，三浦真希子ら：大阪市立大学生活科学部紀要，29，9-13 (1981).
- 12) 及川桂子：家政学雑誌，33，628-632 (1982).
- 13) 兼松 弘，牛草寿昭，丸山武紀ら：油化学，32，51-53 (1983).
- 14) 兼松 弘，牛草寿昭，丸山武紀ら：油化学，32，122-126 (1983).
- 15) HIDEO TAKADA, KUNIHICO OHARA et al: the 17th International SEAWEED SYMPOSIUM
にて発表 (1971).
- 16) 小原国彦，玉置ミヨ子，高田英夫：昭和48年度大会日本農芸化学会に発表
- 17) 小原国彦，玉置ミヨ子：相愛大学，相愛女子短期大学研究論集，17，25-31 (1970).
- 18) J. Folch, M. Leas & G. H. Sloan: J. Biol. Chem. 226, 497 (1957).
- 19) E. G. Bligh & W. J. Dyer: Can. J. Biol. Chem. Physiol. 37, 911 (1959).
- 20) 日本食品工業学会、食品分析法編集委員会編：“食品分析法” p. 486 (1982).
- 21) 成田耕造，村上孝夫：“クロマトグラフィーの実験 Vol. 1” p. 21 (1964).
- 22) 原 京子，石里弘三，湯口泰昌：栄養と食糧，29，235-250 (1976).
- 23) 勝井五一郎：ビタミン，54，451-452 (1980).
- 24) 津郷友吉，山内邦男，菅野長右エ門：農化，50，525-529 (1976).
- 25) 芝原 章，福水 誠，山庄司志郎ら：農化，51，575-581 (1977).
- 26) BRUNO Stancher and FABIO Zonta: J. Chromatogr. 256, 93-100 (1983).
- 27) 橋谷義孝：“酵母学” p. 305 (1967).