

## 甜菜生汁および廃糖蜜のイタコン酸醗酵の原料化のための前処理

中川 允利<sup>1</sup>・上家 一則<sup>1</sup>・石橋 憲一<sup>1</sup>・弘中 和憲<sup>1</sup>

(受理: 1990年5月31日)

Pretreatments of beet thick juice and molasses as carbon sources for itaconic acid fermentation

Mitsutoshi NAKAGAWA<sup>1</sup>, Kazunori KAMIIE<sup>1</sup>, Ken-ichi ISHIBASHI<sup>1</sup> and Kazunori HIRONAKA<sup>1</sup>

### 摘 要

甜菜生汁および廃糖蜜中には過剰なカリウムイオンや蟻酸・酢酸などの揮発性有機酸が存在し、そのままでは*Aspergillus terreus* K 26によるイタコン酸醗酵の原料として使用することが困難なため、カチオン交換・エーテル抽出および電気透析による前処理について検討した。

- (1) シックジュースのカチオン交換およびエーテル抽出あるいは電気透析による前処理で、カリウムイオンはグルコース模擬培地中の濃度あるいはそれ以下、蟻酸・酢酸については殆ど完全に除去された。
- (2) HA糖蜜は無処理であるいはわずかに過剰のカリウムイオンの除去が必要であるが、HB糖蜜はカチオン交換およびエーテル抽出あるいは電気透析による脱塩が必要であった。

キーワード: 前処理, 甜菜生汁, 甜菜廃糖蜜, イタコン酸醗酵, メチレンコハク酸。

甜菜は北海道における基幹作物の1つであり、国内産の砂糖生産量(粗糖換算)は1987年92万トン<sup>1)</sup>でその約70%はビート糖で占められている。

ビート生汁あるいは副生する廃糖蜜中には、*Aspergillus terreus* K 26によるイタコン酸醗酵を阻害<sup>2,3)</sup>する過剰なカリウムイオンおよび蟻酸・酢酸などの揮発酸が含有され、そのままでは醗酵原料として使用することが困難である。

しかし、化石資源の枯渇化は免れ難く、ビート生汁

あるいは廃糖蜜のごとき循環資源を、合成樹脂の原料として多量安価に要求されているイタコン酸に転換するプロセスを確立することが望まれている。

そこで、まず、生汁および廃糖蜜を、カチオン交換およびエーテル抽出あるいは電気透析で前処理することにより、イタコン酸醗酵の原料として使用可能であることを、処理液の組成から明らかにした。

<sup>1</sup> 帯広畜産大学生物資源化学科

<sup>1</sup> Department of Bioresource Chemistry, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Hokkaido 080, Japan

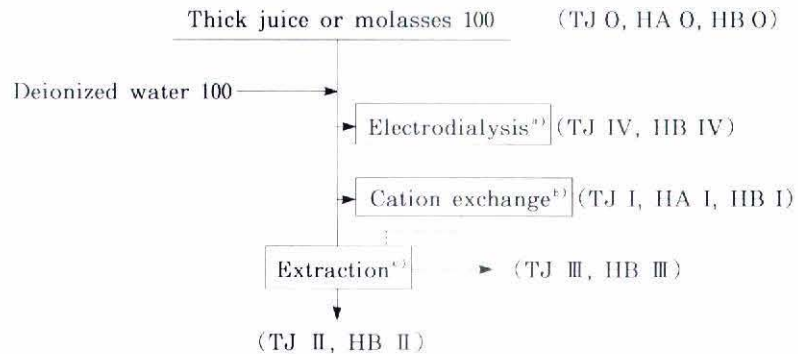


Fig. 1. Outline of various pretreatments of thick juice, HA and HB molasses.

- a) Thick juice or HB molasses soln. of 20 percent by weight was electrodialed with the apparatus in the previous report<sup>4)</sup>.
- b) Test resin & volume: Hydrogen form of Amberlite IR 120 B & 5 times resin volume to be required for exchanging metals in thick juice or molasses.
- c) Extraction with ethyl ether at pH 2 or less than that for 7 days.

## 実験方法

**糖質原料** ビートシックジュースおよび廃糖蜜は、日本甜菜製糖㈱より恵与されたシックジュース、HAおよびHB糖蜜(TJ, HAおよびHBと略記)を使用した。

**前処理** Fig. 1に示した操作に従って処理した。シックジュース、HAおよびHB糖蜜(TJO, HAO, HBO)は脱イオン水で2倍に希釈し、夾雑塩の当量数の約5倍の交換容量に相当する量のAmberlite IR 120Bを用いて脱カチオンし、処理液(TJI, HAI, HBI)とした。2倍に希釈した原料は10N硫酸でpH2に調製し、7日間連続してエーテル抽出し、処理液(TJII, HBII)とした。

カチオン交換後の処理液の1部(pH2以下)は、更に7日間エーテル抽出し、処理液(TJIII, HBIII)とした。

約20% (wt) のシックジュースおよびHB糖蜜は脱カチオンと脱酸が同時に行える多膜槽型電気透析<sup>5)</sup>により処理液(TJIV, HBIV)とした。

**分析** まず、固形分、灰分、有機酸などの一般成分の分析を行った。全糖分は試料を0.2% HCl溶液とし

てから100°C30分間加水分解後Somogyi法<sup>6)</sup>で測定した。全窒素はマイクロケルダール法<sup>7)</sup>により分析した。少量の過塩素酸を用い硝酸で湿式灰化した試料について、金属元素は原子吸光分析装置(島津AA-650型)で定量し、リンは比色法<sup>8)</sup>で定量した。

乳酸およびコハク酸はガスクロマトグラフ装置(日立163型)にガスクロ工業㈱製Unisole F-200 30/60 I.D. 3 mm φ × 2 m のガラスカラムをセットし、田淵<sup>9)</sup>らの方法に準じて定量した。その他の有機酸は、高速液体クロマトグラフ装置(日本分光工業㈱)にShodex Ionpak C-811 8 mm φ × 500 mm カラムをセットし、溶離液として2 mM HClO<sub>4</sub>を用い、反応液として0.2 mM BTB, 15 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM NaOHの混合溶液を用い、pH指示薬の色調の変化を430 nmで検出することにより測定した。

試薬は、和光純薬工業㈱の特級を使用した。

測定値は、2~3回の測定結果を平均して示してある。

## 結果と考察

**原料および処理液の分析** TJ, HAおよびHBの一般分析の結果を表1に示した。

Table 1. Composition of beet thick juice and molasses (g in 100 g)

	TJ*	HA**	HB***	Analytical method
Dry matter	68.45	81.24	85.91	70°C Vacuum drying
Ash	1.52	0.41	9.15	550°C Electric furnace
Total sugar	62.80	58.10	56.20	Somogyi's method
Total nitrogen	0.40	2.01	1.76	Kjeldahl method
P (mg/ 100 g)	1.98	4.87	5.07	Colorimetry
Ether extractive organic acids (as lactic acid)	0.21	0.12	3.60	Titration acidity
Steam distillable organic acids (as acetic acid)	0.19	ND	1.25	Titration acidity

\* : Thick juice.

\*\* : Molasses from the sugar manufacturing process with ion exchangers.

\*\*\* : Molasses from the sugar manufacturing process with Steffen's method.

TJは、砂糖の製造工程に入る前に、貯蔵を兼ね予め濃縮されたジュースで、固形分含量が廃糖蜜に比べ若干少なかった。

HAは、精製工程にイオン交換樹脂処理が組み込まれたプロセスから排出される廃糖蜜で、灰分・有機酸

含量が共にTJより少ないのが特徴である。

HBは、精製工程にステッフェン法を導入したプロセスから排出される廃糖蜜で、TJおよびHAに比べ、灰分・有機酸量など夾雑物の多いのが特徴である。

TJ無処理および処理液中の金属イオン、P、Nお

Table 2. Amounts of some metal ions, P, N and organic acids in non- or pre-treated beet thick juice (mg in kg)

	Thick juice				
	0	I	II	III	IV
K	6760	0.27	5210	0.32	1096
Na	1420	0.34	608	0.48	404
Ca	27.7	0.002	19.8	0.003	20.3
Mg	2.58	0.13	2.37	0.14	2.47
Fe	2.51	0.002	2.10	0.003	1.71
Mn	1.90	ND**	0.38	ND	0.75
Zn	4.13	0.061	0.73	0.075	3.77
Cu	ND	ND	ND	ND	ND
P	19.8	12.3	17.5	11.9	7.72
N (g/ 100 g)	0.40	0.086	0.14	0.050	0.16
Citric	228	182	86.0	79.6	172
Malic	645	616	276	264	290
Succinic	230	230	56.3	53.0	ND
Lactic	6620	6620	ND	ND	197
PCA*	6540	5480	767	723	173
Formic	360	353	ND	ND	ND
Acetic	664	658	ND	ND	ND
Propionic	ND	ND	ND	ND	ND
Isobutyric	487	478	ND	ND	ND
Butyric	183	180	ND	ND	ND

Pretreatment : 0, Non-treatment ; I, Cation exchange ; II, Ether extraction ; III, Cation & ether extraction and IV, Electrodialysis.

Analytical method : Metal ions were measured by atomic absorption spectroscopy. The lactic and succinic acids were determined by gas chromatography. Other organic acids were measured by high performance liquid chromatography. P and N were determined by the same methods shown in Table 1.

\* : Pyrrolidone-carboxylic acid.

\*\* : Not detected.

よび有機酸量が、原料kg基準のmg数として表2に示されている。TJ中にはK, Na, 乳酸, PCA (ピロリドンカルボン酸) が著量に、蟻酸・酢酸も可成りな量存在している。金属イオンはカチオン交換で、揮発酸はエーテル抽出で除去され、カチオン交換に引き続き

エーテル抽出を行えば金属と揮発酸はほぼ完全に除去された。電気透析処理は、1回パスの連続法のため金属イオンの除去は顕著でなかったが、揮発酸は殆ど完全に除かれていた。

HAおよびHBの無処理および処理液中の成分を表

Table 3. Amounts of some metal ions, P, N and organic acids in non- or pre-treated beet molasses (mg in kg).

	HA molasses		HB molasses				
	0	I	0	I	II	III	IV
K	765	0.17	32000	0.58	31400	0.33	144
Na	495	0.30	12900	0.41	11900	0.41	370
Ca	165	0.004	365	0.003	160	0.005	82.4
Mg	41.6	0.13	20.3	0.29	20.2	0.30	9.55
Fe	2.80	0.004	16.9	0.005	13.9	0.005	16.4
Mn	0.49	ND**	3.46	ND	3.56	ND	2.29
Zn	0.23	0.056	22.5	0.071	22.5	0.079	22.9
Cu	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P	48.7	27.6	50.7	28.1	50.4	28.8	19.8
N (g / 100 g)	2.01	1.41	1.76	0.30	0.76	0.22	0.58
Citric	290	255	756	588	444	476	675
Malic	296	275	1540	1390	605	488	689
Succinic	ND	ND	3480	2940	1250	1360	ND
Lactic	1250	1250	55500	28000	612	ND	1330
PCA*	ND	ND	26200	22000	5860	2700	2200
Formic	ND	ND	2600	2250	255	ND	ND
Acetic	ND	ND	7660	7590	37.5	ND	ND
Propionic	ND	ND	369	362	75.1	ND	ND
Isobutyric	ND	ND	2020	1980	ND	ND	ND
Butyric	ND	ND	619	609	ND	ND	ND

Pretreatment : 0, Non-treatment ; I, Cation exchange ; II, Ether extraction ; III, Cation exchange & ether extraction and IV, Electrodialysis. Analytical method : Metal ions were measured by atomic absorption spectroscopy. The lactic and succinic acids were determined by gas chromatography. Other organic acids were measured by high performance liquid chromatography. P and N were determined by the same methods shown in Table 1.

\* : Pyrrolidone-carboxylic acid.

\*\* : Not detected.

3に示した。HA中には揮発酸は検出されなかったので、カリウムイオンを除去するためにカチオン交換のみを行った。

HB中には著量のK, Na, 乳酸, PCA, 蟻酸および酢酸が含有されており、カチオン交換処理では著量の有機酸が、エーテル抽出のみでは著量の金属イオンが残存した。

脱カチオンおよび脱酸のために、カチオン交換およびエーテル抽出あるいは電気透析による処理が有効であった。

イタコン酸醗酵培地としての比較 無処理液および処理液中の全糖濃度(グルコースとして)が10%になるように希釈したときの溶液中の成分量(mg/100ml)を表4に示した。

Table 4. Amounts of some metal ions, P, N and organic acids in various solutions containing 10% total sugar as glucose (mg/ 100ml).

	G*	TJ			HA		HB		
		0	III	IV	0	I	0	III	IV
K	11.00	108	0.0051	17.4	13.2	0.0029	569	0.0059	2.56
Na	2.90	22.6	0.0076	6.43	8.52	0.0052	229	0.0073	6.58
Ca	3.60	0.441	0.0001	0.323	2.84	0.0001	6.49	0.0001	1.47
Mg	20.50	0.041	0.0022	0.0393	0.716	0.0022	0.361	0.0053	0.170
Fe	0.11	0.040	0.0001	0.0272	0.0482	0.0001	0.301	0.0001	0.292
Mn	0.019	0.030	ND	0.0119	0.0084	ND	0.062	ND	0.0407
Zn	0.029	0.066	0.0012	0.0600	0.0040	0.0010	0.400	0.0014	0.407
Cu	0.005	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P	4.30	0.315	0.189	0.123	0.838	0.475	0.902	0.512	0.352
N	52.0	6.40	0.80	2.60	34.6	24.3	31.3	3.91	10.3
Cirtic	—	3.63	1.27	2.74	4.99	4.39	13.4	8.47	12.0
Malic	—	10.3	4.20	4.62	5.09	4.73	27.4	8.68	12.3
Succinic	—	3.66	0.844	ND	ND	ND	61.9	24.2	ND
Lactic	—	105	ND	3.14	21.5	21.5	987	ND	23.7
PCA**	—	104	11.5	2.75	ND	ND	466	48.0	39.1
Formic	—	5.73	ND	ND	ND	ND	46.3	ND	ND
Acetic	—	10.6	ND	ND	ND	ND	136	ND	ND
Propionic	—	ND	ND	ND	ND	ND	6.56	ND	ND
Isobutyric	—	7.75	ND	ND	ND	ND	35.9	ND	ND
Butyric	—	2.91	ND	ND	ND	ND	11.0	ND	ND

Pretreatment : 0, Non-treatment ; I, Cation exchange ; III, Cation & ether extraction and IV, Electrodialysis.

\* : The elements of modeled glucose medium were determined from those of inorganic salts, tap water and corn steep liquor of the Glucose-CSL medium as follows (mg/ 100ml) : K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 24.5, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8.96, CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 13.2, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 208, FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0.548, MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O 0.068, ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0.128, CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O 0.020, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 16.0 and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 297.

グルコース模擬培地 (G培地) は, CSL (Corn steep liquor) を使用する天然のグルコース培地<sup>2)</sup> を模擬し, 糖以外の成分は完全に無機成分で置き換えられたもので, 元素量として第2欄に, 対応する化合物量として脚注に示されている。

TJ無処理希釈液では, KイオンがG培地中濃度の9.8倍で, 蟻酸・酢酸はそれぞれ5.73および10.6 (mg/100ml) 存在した。カチオン交換およびエーテル抽出処理によりカリウムイオンおよび揮発酸はほぼ完全に除去されたが, 電気透析処理ではカリウムイオンの脱カチオンに関し多少不十分さが見受けられた。

HA希釈液は無処理でK・NaがわずかにG培地に比し多いのみで, そのままあるいはカチオン交換のみで醗酵原料となし得る。

HB無処理希釈液にはG培地に比較し, K52倍, Na79倍, Ca1.8倍, Fe2.7倍, Mn3.3倍およびZn14倍が含有され, 更に蟻酸46.3および酢酸136 (mg/100 ml) が含まれていた。イオン交換およびエーテル抽出あるいは電気透析処理により, 金属イオンはG培地以下に, 揮発酸も殆ど完全に除去されることが判明した。

以上の結果, HAについてはカチオン交換処理が, TJおよびHBについては, 膜面汚染に就いて対策は残るものの, 省エネルギー・省資源的に有利で技術の確立している電気透析処理が有利であると推察される。

## 謝 辞

原料を恵与してくださいました日本甜菜製糖(株)総合研究所 増田昭芳所長に深謝致します。

成分分析にあたり実験の1部を手伝っていただいた, 田中雅夫, 寺山佳之, 西尾昌泰, 貫 雪絵および山田みどりの諸君に感謝致します。

## 文 献

- 1) 日本国勢図会 (矢野), p309, 国勢社 (1989) .
- 2) 中川允利, 中村以正, 小林達吉: 醸工, 53, 294-302 (1975) .
- 3) 中村以正, 中川允利, 小林達吉: 醸工, 53, 453-442 (1975) .
- 4) 中川允利, 中村以正, 小林達吉: 醸工, 53, 286-293 (1975) .
- 5) Somogyi, M.: J. Biol. Chem., 160, 61-68 (1945) .

6) AOAC, "Official Methods of Analysis", 12th ed. p927, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. (1975) .

7) Brerenblum, J. Chain, E.: Biochem. J., 32, 295-298 (1938).

8) Tabuchi, T., Serizawa, N.: Agr. Biol. Chem., 39, 1049-1054 (1975) .

## Summary

The previous report described that the excess of potassium ion, formic acid and acetic acid on itaconic acid fermentation with *Aspergillus terreus* K 26 was highly inhibitory.

This paper describes the procedure to exclude those inhibitors in cheaper raw materials such as beet thick juice and molasses for producing itaconic acid in large quantities.

(1) With regard to thick juice, the excess of potassium ion and the volatile acids had to be excluded through cation exchange and extraction or through electro dialysis. Potassium ion was removed to the concentration of modeled glucose medium; volatile acids were almost completely removed.

(2) In the case of HA molasses, it is necessary to exclude slightly excessive potassium ion. For HB molasses, the volatile acids had to be excluded also through extraction or electro dialysis to the same concentration level as mentioned above.

Res. Bull. Obihiro Univ., I, 17 (1990): 7~12

## オウシュウクロマツ針葉の糖脂質と リン脂質の季節的変動

小嶋 道之<sup>1</sup>・白木 英行<sup>1</sup>・大西 正男<sup>1</sup>・伊藤 精亮<sup>1</sup>

(受理: 1990年5月31日)

Seasonal changes in glycolipids and phospholipids  
of *Pinus nigra* needles

Michiyuki KOJIMA, Hideyuki SHIRAKI, Masao OHNISHI and  
Seisuke ITO

### 摘 要

オウシュウクロマツの針葉に含まれる糖脂質とリン脂質の季節的変動を調査した。糖脂質の含量は冬期に若干減少したが、逆にリン脂質のそれは12月から2月にかけて高い割合を示した。また、新規なB型DGDG, Gal( $\beta$  1 $\rightarrow$ 6)-Gal( $\beta$  1 $\rightarrow$ 3')-diacylglycerol(DG)は夏期には全く認められなかったが、冬期には認められ、特に2月に最も多量に含まれていた。また、B型DGDGの分子種組成は、A型DGDG, Gal( $\alpha$  1 $\rightarrow$ 6)-Gal( $\beta$  1 $\rightarrow$ 3')-DGよりもむしろMGDGのそれに類似していた。

ホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルエタノールアミン(PE)の分子種組成はホスファチジルグリセロール(PG)のそれより複雑であり、またPCやPEのジリノレン(18:3-18:3)、リノレイルリノレン(18:2-18:3)およびパルミトイルリノレン(16:0-18:3)分子種には2種の18:3の位置異性体が年間を通して存在していた。リン脂質分子種の季節的変動を調べたところ冬期には不飽和度の高い分子種の割合が増大し、それに伴って飽和(16:0と18:0)およびモノエン脂肪酸(18:1)を含む分子種の割合が減少した。

キーワード: オウシュウクロマツ針葉, グリセロ糖脂質, グリセロリン脂質, 分子種変動, シス-5-NMI脂肪酸。

### 緒 言

耐凍性が増大する時期に生じる生理的および構造的な変化については、各種の植物で盛んに研究がなされている<sup>1,2)</sup>。特に膜脂質組成の変化についてはいくつ

かの報告があり、低温および凍結時における細胞の損傷と膜の相転移温度との関連性が議論されている<sup>3,4)</sup>。しかし、大部分の植物は、それ自身低温馴化能を有していて、広葉樹では夏期に比べて秋から初冬にある程度の低温に耐え得る細胞構造に変化して<sup>5)</sup>、膜脂質で

<sup>1</sup> 帯広畜産大学生物資源化学科

<sup>2</sup> Department of Bioresource Chemistry, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Hokkaido 080, Japan.

あるリン脂質含量が増大し、かつ不飽和脂肪酸の割合が増大することが報告されている<sup>9,10)</sup>。常緑針葉樹の葉においても同様の事が考えられているが、針葉樹の葉にはシス-5 NMI脂肪酸 (*cis*-5-olefinic non-methylene interrupted fatty acids) が含まれている<sup>11)</sup>点で広葉樹とは異なり、その脂肪酸の季節的変動は代謝(合成と分解)の面からも興味を持たれている<sup>12)</sup>。これまでに高木らは、シス-5 NMI脂肪酸の構造および分布について精力的に研究して、裸子植物の種子脂質にはこの脂肪酸が広く存在することを明らかにし<sup>13)</sup>、日本産イチイ葉の脂質の糖脂質画分には、このシス-5 NMI系列の18:4, 20:3および20:4の存在を報告している<sup>14)</sup>。しかし、各脂質クラスの分子種レベルでの組成については、まだ明らかにされていない。

今回は、オウシュウクロマツの針葉に含まれる主要な糖脂質、モノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)およびリン脂質、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルグリセロール(PG)の季節的変動を調査して、耐凍性の増大する時期におけるこれら極性脂質の分子種組成の変動を調査することを目的とした。

## 実験方法

### 1. 実験材料

帯広畜産大学構内に植生しているオウシュウクロマツ(*P. nigra*)の針葉を1988年秋から1989年夏まで経時的に採取して実験材料とした。

### 2. 脂質の抽出

経時的に採取したオウシュウクロマツ針葉を小片にした後、直ちに熱イソプロパノールを加えポリトンで2分間ホモジナイズした。吸引濾過で得られた残渣を熱イソプロパノール、クロロホルム-イソプロパノール(1:1, v/v)、およびクロロホルムで色素類がまったくなくなるまで抽出をくり返した。全抽出液は濃縮乾固した後にFolch法で水洗して下層を全脂質とした<sup>15)</sup>。

### 3. 脂質クラスの定量

各脂質クラスの定量は、全脂質を2次元ケイ酸薄層クロマトグラフィー(2D-TLC)で分離後、既知量の内部標準、ペンタデカン酸(Aldrich Chemical社

製)を加え、5%メタノール性塩酸とともに100°C、2時間メタノリシスをして得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー(GLC)で分析して行った。2D-TLCの展開溶媒は、1次元にクロロホルム-メタノール-アンモニア(65:25:4, v/v)、2次元にクロロホルム-アセトン-メタノール-酢酸-水(10:4:2:2:1, v/v)を用いて行った。

### 4. 脂質クラスの分別精製

全脂質はケイ酸カラムクロマトグラフィーに供して、クロロホルムで中性脂質画分、アセトンで糖脂質画分およびメタノールでリン脂質画分を順次溶出した。得られた糖脂質画分は、展開溶媒としてクロロホルム-メタノール-酢酸-水(80:14:9:3, v/v)を用いた分取用ケイ酸TLCおよび順相の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供してMGDGとDGDGを分別精製した。HPLCの溶離液は、A液、イソプロパノール-ヘキササン-水-メタノール(80:55:3:2, v/v)およびB液、イソプロパノール-ヘキササン-水-メタノール(80:55:15:10, v/v)を用い、A液で5分間溶出し、50分後にB液が40%になるようにしてグラジエント溶出を行った。カラムはERC-CN-1181で、カラム温度は40°C、流速は1.0ml/min、205nmで検出した。また、リン脂質画分は、セルロフタインDEAE イオン交換A-200に供して、クロロホルム-メタノール(1:4, v/v)で中性リン脂質画分、続いて酢酸を流した後にクロロホルム-メタノール-10M酢酸アンモニウム(1:4:0.01, v/v)で酸性リン脂質画分を分別した。酸性リン脂質画分はFolch法で水洗した後にケイ酸TLCに供してホスファチジルグリセロール(PG)を、また中性リン脂質画分からはホスファチジルコリン(PC)とホスファチジルエタノールアミン(PE)をそれぞれ分別精製した。

### 5. MGDGおよびDGDGの分子種分析

分別精製したMGDGおよびDGDGの分子種分析は逆相HPLCで行った。分取した各ピークの構成脂肪酸は、メタノリシスした後にGLCで同定した。また、DGDGの各ピークに含まれるA型〔Gal(α1→6)Gal型〕および新規なB型〔Gal(β1→6)Gal型〕の割合は、弱アルカリ処理を行った後に得られた脱アシル化混合物をトリメチルシリル(TMS)誘導体としてGLCで分析した<sup>16)</sup>。また、A型および



B型DGDGそれぞれの分子種組成は、HPLCの各ピークに含まれるA型とB型の割合を基にして計算で求めた<sup>15)</sup>。

## 6. PC, PEおよびPGの分子種分析

PC, PEおよびPGの1,2-ジアシルグリセロール(DG)残基の分子種組成を明らかにするために、ホスホリパーゼCで極性基をはずした後に、ジニトロベンゾイル(DNB)誘導体として逆相HPLCに供し、分子種組成の割合を求めた。すなわち、精製した各試料1mgに30mMのホウ酸を含む10mMトリス塩酸buffer(pH 7.5)1.25mlを加えて、超音波処理により乳化後、2ユニットの*B. cereus*のホスホリパーゼC(Sigma社製、タイプⅢ)を加えて37°Cで1時間反応後、生じた1,2-DGをエーテルで抽出した。25mgの3,5-ジニトロベンゾイルクロリドと0.5mlの無水ピリジンを加え、60°Cで10分間反応してDNB-DG誘導体を調製した<sup>15)</sup>。

## 7. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

HPLC分析は、島津製作所製LC-6A型およびTOSOH CCPD液体クロマトグラフを用いて行った。ピークの検出はエルマ光学社製ERC-7520型示差屈折計、島津製作所製SPD-2A型およびTOSOH UV8010紫外線検出計で行った。MGDGとDGDGの分子種分析はERC ODS 2222(0.8×25cm)を用い、移動相としてメタノール-水(95:5, v/v)を使用し、カラムオープン50°C、流速1.5ml/minで行った。DNB-

DG誘導体の分析は、Ultrasphere ODS(4.6×25cm)を用い、移動相にはアセトニトリル-イソプロパノール(4:1, v/v)、カラムオープン25°C、1.0ml/minの流速条件で行い、254nmで検出した。各ピークの分子種の同定は、分取してメタノリシスを行い、構成脂肪酸の組成をGLCに供して行った。

## 8. ガスクロマトグラフィー(GLC)

脂肪酸メチルエステルは、日立G3000型ガスクロマトグラフ(水素炎イオン化検出器付)で分析した。CP-Sil 88 WCOT Fused silicaキャピラリーカラム(50m×0.25cm, ガスクロ工業社製)を用い、150°Cから200°Cまで3°C/minの昇温条件で分析した。また、DGDGの脱アシル化物は、TMS化後に日立163型ガスクロマトグラフ(Diasolid ZTカラム, 0.3×100cm, カラムオープン245°C)で分析した。

## 結果および考察

### 1. 脂質含量の季節的変動

オウシュウクロマツ針葉の脂質を経時的に調査した(Fig. 1-A)。新鮮針葉10gに対して全脂質含量は390~440mgの範囲に含まれていて、特に中性脂質のそれは全期間を通して60%以上で、その大部分は色素類で占められていた。糖脂質は、夏期に最も高い値で冬期に減少を示したが、一方リン脂質は12月に若干増大し、その後徐々に減少を示した。したがって、リン脂質/糖脂質の値は12月から4月に0.56から0.63を示し、冬期にリン脂質と糖脂質の割合は高くなることが示され

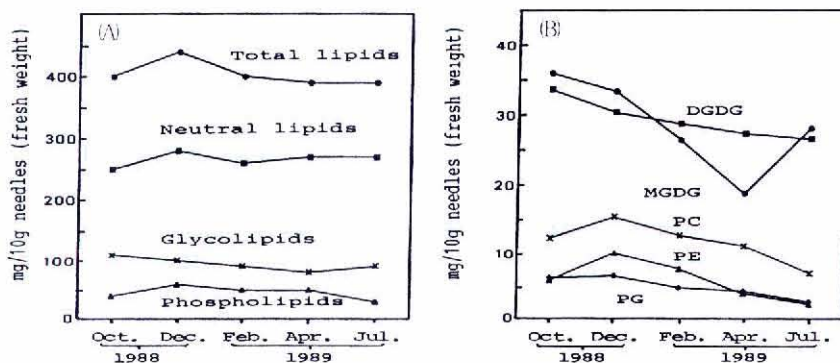


Fig. 1. Seasonal changes in the content of total lipids, neutral lipids, glycolipids and phospholipids (A), and in the content of monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), digalactosyldiacylglycerol (DGDG), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylglycerol (PG) (B) from *P. nigra* needles.

た。Senserは、エゾマツ針葉に含まれる脂質含量をクロロフィルに対する値として示し、1年間を通して調査して、耐凍性の高くなる冬期には夏期に比べて約2倍の脂質を含んでいることを報告している<sup>16)</sup>。また、Rodionovらはオウシュウアカマツの針葉の乾燥重量に対する脂質割合を4年間調査して、秋期から春期に全脂質量が最大となり、夏期に向かって急速に減少することを報告している<sup>17)</sup>。

主要な脂質クラスの経時的な変化をFig. 1-Bに示した。冬期のPC、PEおよびPGの割合は、夏期のそれに比べて約2から4倍に増大したが、MGDGとDGDGは秋期から夏期に若干減少した。また、MGDG/DGDGの値は1.07(10月)、1.10(12月)、0.92(2月)、0.68(4月)および1.06(7月)を示し、2月から4月のMGDGの減少は他の時期のそれに比べて著しいことが示された。

オウシュウクロマツ針葉のDGDGにはGal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)Gal鎖(A型)の他に新規なGal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6)Gal鎖(B型)が混在していることを先に明らかにした<sup>18)</sup>が、A型とB型の割合を経時的に調査したところ、夏期にはB型DGDGがほとんど認められなかった。しかし、冬期の12月から出現して、2月には最大値(全DGDG中11%)を示し、春期には減少することが認

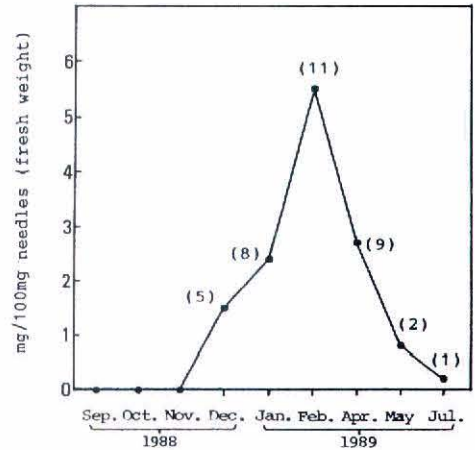


Fig. 2. Seasonal changes in the content of novel digalactosyldiacylglycerol, Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6)-Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3')-diacylglycerol (B type), in *P. nigra* needles. Numbers in parentheses show the percentage of B type in DGDG.

められた (Fig. 2)。すなわち、DGDG含量の季節的変動は、A型は夏期から秋期に向かって最大値を示し、一方B型は冬期に最大値となることが明らかになった。また、リン脂質含量は、PC、PEおよびPGともに12月に最大値を示し、その後春期に向かって徐々に

Table 1. Seasonal changes of molecular species compositions of MGDG and DGDG in *P. nigra* needles.

Molecular species	Oct.		Dec.			Feb.			Apr.		
	MGDG	DGDG	MGDG	DGDG		MGDG	DGDG		MGDG	DGDG	
				A	A <sup>1)</sup>		B <sup>2)</sup>	A		B	A
18:3-18:4	8	1	6	1	1	7	2	5	10	2	7
16:3-18:3	13	1	23	2	14	20	2	14	17	1	11
18:3-18:3	63	56	56	44	54	57	50	71	57	50	60
18:3-20:3	5	2	2	2	5	5	2	2	5	2	8
16:2-18:3	2	<1	1	<1	1	1	<1	<1	1	<1	1
18:2-18:3	4	1	5	2	7	4	3	3	4	4	7
18:2-20:2	2	3	2	13	13	2	5	4	2	5	5
18:1-18:3	1	2	1	2	1	1	2		1	2	2
16:0-18:3	2	16	4	24	-	4	25	-	3	24	-
17:0-18:3	-	<1	-	1	2	-	1	-	-	1	<1
17:0-18:3	-	1	-	1	<1	-	1	-	-	1	<1
18:0-18:3	<1	4	<1	6	3	1	4	-	<1	4	-
16:0-18:2	-	4	-	3	-	-	3	-	-	4	-

1) A, Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)-Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3')-diacylglycerol

2) B, Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6)-Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3')-diacylglycerol

減少するパターンを示した。

2. グリセロ糖脂質の分子種組成の季節的変動

主要なグリセロ糖脂質であるMGDGとDGDGの1, 2-DG残基の分子種組成を調査したところ、少なくとも7から13分子種の存在が認められた (Table 1)。これらの分子種の中には、微量ではあるが高等植物のそれにはほとんど認められない18:3-18:4、20:2-18:3、20:3-18:3および17:0-18:3などの分子種が存在していた。また、DGDGはGal( $\alpha$ 1→6)Gal鎖 (A型) とGal( $\beta$ 1→6)Gal鎖 (B型) の2種類の糖鎖構造を有するDGDGの混合物であり、両型のDGDGのDG残基はそれぞれ特徴があって、B型DGDGの分子種組成はA型のそれよりもむしろMGDGのそれによく類似していた。この傾向は、各時期で認められた (Table 1)。また、MGDGおよびA型とB型DGDGの分子種組成の経時的な変動は、冬期 (12月や2月) に調製した試料では16:3-18:3や18:3-18:4など高度不

飽和型分子種の割合が高かった。B型DGDGの分子種組成は、12月に比べて2月では18:3-18:3や18:3-18:4の割合が高い特徴が認められたが、4月ではそれらの割合は減少した。Selstanらは、オウシュウアカマツ針葉を低温馴化するとMGDGの減少とDGDGの増加を認め、同時にDG含量も増加することを明らかにしている<sup>19)</sup>。このことは、低温下でDGDG合成酵素のガラクトリピド:ガラクトリピドガラクトシルトランスフェラーゼ (GGGT) の活性化が起ることを示唆するものであろう。

本実験では、冬期にMGDGが減少し、またA型DGDGも若干減少を示したが、B型DGDGは2月に最大値を示したことから、B型DGDGとGGGT活性との関連性について今後の研究が期待される。

3. グリセロリン脂質の分子種組成の季節的変動

主要な中性グリセロリン脂質であるPCおよびPEの1,2-DG残基の分子種組成をTable 2に示した。各時

Table 2. Seasonal changes of molecular species compositions of PC and PE in *P. nigra* needles (%)

Molecular species	PC					PE				
	Oct.	Dec.	Feb.	Apr.	Jul.	Oct.	Dec.	Feb.	Apr.	Jul.
18:3-20:4	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2
18:3-18:3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18:3-18:3*	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2
18:3-20:3	1	2	2	2	1	2	3	3	3	3
18:3-20:3	1	2	2	2	1	2	4	3	3	1
18:2-18:3	5	6	6	5	3	2	3	4	3	2
18:2-18:3*	5	6	6	6	4	6	9	7	9	7
18:2-18:2	15	16	14	13	7	5	8	9	8	5
18:1-18:3	8	7	9	8	8	11	10	9	10	14
16:0-18:3	7	9	10	10	10	7	9	10	10	12
18:3-20:2										
16:0-18:3*	6	8	6	8	5	10	13	11	11	5
18:1-18:2	6	9	13	9	8	1	3	5	3	3
16:0-20:3	12	8	6	8	14	30	11	9	12	16
16:0-18:2	25	18	17	19	21	14	15	16	15	16
16:0-20:2	1	1	2	2	3	1	1	1	1	1
18:0-18:2	4	2	2	3	9	1	2	2	2	3
16:0-18:1	1	1	1	1	2	<1	1	2	2	2
16:0-16:0	<1	1	<1	<1	2	1	1	1	1	2
Others	<1	<1	<1	<1	<1	5	2	4	3	3

\* 5, 9, 12-18:3

期ともにPCとPEでは22から23分子種が認められたが、酸性リン脂質であるPGでは中性リン脂質よりも

**Table 3.** Seasonal changes of molecular species compositions of PG in *P. nigra* leaves (%)

Molecular species	Oct.	Dec.	Feb.	Apr.	Jul.
16:1-18:3	18	12	8	26	7
18:2-18:2	1	1	2	1	1
18:1-18:3	16	24	23	19	12
16:0-18:3	13	7	6	9	8
16:1-18:2					
16:0-20:3	3	3	3	<1	4
16:0-18:2	36	40	37	29	37
18:0-18:2	6	5	14	4	7
16:0-18:1	<1	3	3	1	1
16:1-18:0	3	2	1	4	5
16:0-16:0	4	4	5	7	19

単純な組成で、11分子種から構成されていた (Table 3)。特にPCとPEの分子種には、脂肪酸の炭素鎖の5, 9, 12位と9, 12, 15位にそれぞれ二重結合を有する18:3の位置異性体含有分子種が数種認められた。一方、MGDGやDGDGの分子種には5, 9, 12-18:3はほとんど認められないので、これらの異性体分子種の存在は中性リン脂質の特徴を示すものである。PCの主要分子種は18:2-18:2, 18:1-18:2, 16:0-18:2および16:0-20:3で、夏期に向かって前2者が減少し、後2者が4月から10月に高い割合で認められた (Table 2)。またPEの主要分子種は、18:1-18:3, 16:0-18:3, 16:0-18:2および16:0-20:3で、夏期に18:1-18:3が増加し、逆に16:0-18:3 (5, 9, 12-型) が減少した。16:0-20:3は10月に最大値を示し、16:0-18:2は各時期を通してほぼ一定であった。このように、PCとPEの各時期に認められる分子種組成の割合は、両者で多少の増減はあるが、主要な分子種の割合はほぼ等しかった。酸性リン脂質であるPGの主要分子種は16:0-18:2, 18:1-18:3および16:1-18:3で、PCやPEに比べて20:3含有分子種の割合はごく微量であった。また、リン脂質の分子種の全不飽和度に注目して、不飽和度5以上/4以下の値を調べると、PCでは10月から7月までの各時期にそれぞれ0.14, 0.21, 0.22, 0.18および0.11を示して冬期に高く、またPEでも10月から7月まで順

次0.17, 0.25, 0.23, 0.23および0.21を示した。しかし、PGでは全不飽和度4の分子種が最も多く、PCやPEより不飽和度が低いことが認められたが、全不飽和度4以上/3以下の値を経時的に調べてみると、10月から4月では0.5以上を示し、7月では0.24を示した。このように、PGはPCやPEと同様に冬期の分子種が夏期のそれよりも不飽和度が高いことが示された。

以上の結果から、リン脂質では冬期に脂肪酸の不飽和化酵素の活性化と共に、不飽和脂肪酸含有型分子種の合成がさかんにになり、膜の流動性を保持する機構と関連して、膜の耐凍性が維持されるものと推察される。

### 引用文献

- 1) 酒井 昭: 「植物の耐凍性と寒冷適応」一冬の生理・生態学— 1982, pp. 81-215.
- 2) 吉田静夫: 植物の冷温傷害に関する細胞学的研究 環境科学総合研究所年報, 8, 57-65 (1989).
- 3) A. H. Filter and R. K. M. Hay 太田安定, 森下豊昭, 橘 泰憲, 岩橋 誠共訳: 温度環境 「植物の環境と生理」 1985, pp. 187-214.
- 4) J. K. Raison, J. M. Lyons, R. J. Mehlhorn and A. D. Keith: Temperature induced phase changes in mitochondrial membrane detected by spin labeling. J. Biol. Chem., 246, 4030-4040 (1971).
- 5) J. M. Lyons: Chilling injury in plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 445-466 (1973).
- 6) N. Murata, N. Sato, N. Takahashi and Y. Hamazaki: Compositions and positional distributions of fatty acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and chilling resistant plants. Plant Cell Physiol., 23, 1071-1079 (1982).
- 7) 吉田静夫: 植物の低温傷害 (冷害) の機構—液相膜プロトン輸送能の低下が原因 化学と生物 28, 2-3 (1989).
- 8) 匂坂勝之助: 高等植物の低温馴化 化学と生物 61, 1139-1142 (1987).
- 9) S. Yoshida and A. Sakai: Phospholipid changes associated with the cold hardiness of cortical cells from poplar stem. Plant

- & Cell Physiol., 14, 353-359 (1973) .
- 10) S. Yoshida : Studies on lipid changes associated with frost hardness in cortex in woody plants. Contr. Inst. Low Temp. Sci., B, 18, 1-43 (1974) .
- 11) G. R. Jamieson and E. H. Reid : The leaf lipids of some conifer species. Phytochemistry, 11, 269-275 (1972) .
- 12) Y. Itabashi and T. Takagi : cis 5 olefinic nonmethylene interrupted fatty acids in lipids of seeds, arils and leaves of Japanese yew. Yukagaku, 31, 574-579 (1982).
- 13) T. Takagi and Y. Itabashi : cis 5 olefinic unusual fatty acids in seed lipids of gymnospermae and their distribution in triacylglycerols. Lipids, 17, 716-723 (1982) .
- 14) 小嶋道之, 大西正男, 間野康男, 佐々木茂文, 伊藤精亮, 藤野安彦 : アズキ種子, 葉及び根に含まれるグリセロ脂質群の1, 2-ジアシルグリセロール残基の構造的関連, 油化学, 8, 619-625 (1989).
- 15) M. Kojima, K. Seki, M. Ohnishi, S. Ito and Y. Fujino : Structure of novel glyceroglycolipids in Adzuki bean (*Vigna angularis*) seeds. Biochem. Cell Biol., 68, 59-64 (1990) .
- 16) M. Sensor : Frost resistance in spruce [*Picea abies*] : III. Seasonal changes in the phospho and galactolipids of spruce needles. Z. pflanzen physiol., 105, 229-239 (1982).
- 17) V. S. Rodionov, M. K. Ilinova and T. A. Shulyakovskaya : Yearly rhythms of changes in concentration and fatty acid composition of lipids in pine buds. Biol. Bull. Acad. Sci. USSR., 13, 555-563 (1987) .
- 18) M. Kojima, H. Shiraki, M. Ohnishi and S. Ito : Two diglycosyldiacylglycerol isomers in plant leaves, ferns, mosses and seaweeds. phytochemistry, 29, 1161-1163 (1990) .
- 19) E. Selstam and G. Oquist : Effects of frost hardening on the composition of galactolipids and phospholipids occurring during

isolation of chloroplast thylakoids from needles of scots pine. Plant Sci., 42, 41-48 (1985).

### Summary

The seasonal variation of contents of glycolipids and phospholipids from needles of *Pinus nigra* was investigated. A characteristic change was a slight decrease in galactolipids in winter, and an increase in phospholipids from December to February. Novel digalactosyldiacylglycerol (DGDG B isomer), Gal( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) - Gal( $\beta 1 \rightarrow 3'$ ) - diacylglycerol (DG), was not detected in summer, but was observed after December, especially predominant in February. The seasonal changes in the 1,2-DG moieties of the DGDG B isomer were quite similar to those of MGDG but not the DGDG A isomer, Gal( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) - Gal( $\beta 1 \rightarrow 3'$ ) - DG.

Molecular species compositions of phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) were more complicated than those of phosphatidylglycerol (PG) from needles of *P. nigra*. In PC and PE, the isomers of the dilinolenin (18:3-18:3), linoleoyllinolenin (18:2-18:3) and palmitoyllinolenin (16:0-18:3) species existed in all seasons. Quantitative analyses of seasonal changes in the phospholipid species showed that the highly unsaturated molecular species increased at the expense of glycerolipid species esterified with the saturated (16:0 and 18:0) and monounsaturated (18:1) fatty acids in winter.

Res. Bull. Obihiro Univ., I, 17(1990): 13~19