

Counter current 装置による Ensilage 中の 揮発性脂肪酸の定量について

堀 慧・田 辺 昭

The quantitative determination of volatile fatty acids in ensilage
by counter current distribution apparatus

Satoshi HORI and Akira TANABE

(1) In this experiment, we identified and estimated quantitatively the volatile fatty acids (V.F. As.) in ensilage, by means of paper partition chromatography and counter current distribution method respectively.

(2) One dimensional-ascending method was employed in the paper chromatography, and n-butanol (1% ammonia) saturated with water was used as the mobile phase, and a solution of brom-cresol-green in ethanol as the indicator.

The chromatogram was run at the room temperature.

(3) In counter current distribution, n-butanol saturated with water was used as the mobile phase and water saturated with butanol as the stationary phase. Forty nine transfer distributions were done, and eighty agitations every one distribution.

(4) By the methods described above, the V.F. As. in ensilage could accurately be estimated.

(5) The percentages of acetic acid in the ensilages were in the range of 0.7 to 1.3, and approximately constant in the ensilages of different kinds and qualities. But, the worse the quality of ensilage, the more butyric acid was contained.

The ensilages made of red clover contained a little propionic acid, but that made of corn no propionic acid.

I. 緒 言

Ensilage は、わが国においては、家畜特に乳牛の冬期間の粗飼料として欠くことの出来ないものである。畜産の振興に伴い、その生産利用は将来益々増大するものと思われる。

Ensilage には Lactic acid のほかに、その製造過程中的に醸酵産物である Acetic acid, Propionic acid 及び Butyric acid 等の揮発性脂肪酸（以下 V.F. As. と略称する）が含まれている。幸にしてこれらの V.F. As. は反芻獣に容易に吸収され、動物の体 energy として利用される。しかしながら近時わが国においても多くの発生を見ている反芻獣の Ketosis の発病機序が簡明せられた今日では、飼料中の V.F. As. 就中 Butyric acid 含有の多寡如何は家畜の衛生に重大な関連を持つわけである。

さて、V.F. As. をその分配係数の差を利用して、定性と同時に定量することは、すでに多くの人々によつて試みられている。たとえば FRIEDMANN²⁾(1937) は分液漏斗を使つて、水と Ethyl ether を溶媒とし、これに sample を分配させ、その分配係数と全滴定値から含まれてい

る V.F.As. の定性と定量を行い、また、SATO²⁾等 (1947) は Counter current 装置を用い、
 磷酸 buffer と Isopropyl ether を溶媒として V.F.As. の定量と定性を行つている。

しかしながら、可検材料が Ensilage のように V.F.As. の含有量が少く、かつ含まれている
 V.F.As. の種類が未知の場合には FRIEDEMANN, SATO 等の方法では実験の手續が複雑になる憾
 がある。そこで、著者等は先ず Paper chromatography により sample 中に含まれている
 V.F.As. の種類を知つたのち、これを Counter current 装置にかけ、その分配係数と滴定値
 から V.F.As. を定量すると、よくその目的を達することが出来ることを知つたのでこゝに報
 告する。

II. 予 備 実 験

1. Paper chromatography における V.F.As. の Rf 値の測定

HISCOX³⁾の方法を BURTON¹⁾が改良したものに大体準拠した。すなはち Acetic acid, Propionic
 acid, Butyric acid 及び Valeric acid の純品をとり、これを Ammonium Salt とし、
 Ammonia 1%を混じた水飽和 Butanol を溶媒として室温で 1 次元、上昇法で展開した。濾
 紙は東洋濾紙 No. 50 を、発色には Bromcresol green
 の 1% Ethyl alcohol 溶液を用いた。酸は黄色地に
 青緑色の Spot として現われる。Table 1 のように各
 酸の Rf 値には相当な差があつたので酸の同定は容易
 であつた。

2. Counter current 装置による既知 V.F.As. の 定量

ある物質 M の A, B 2 液における分配係数を K
 とし、いま、A, B 2 液を同量に入れた分液漏斗に
 M の 1 定量を投じて、これを 1 回分配させた場合、A を軽い液、B を重い液とすれば、M は
 A 液中に $\frac{K}{1+K}$ 、B 液中に $\frac{1}{1+K}$ の割合に分配される。従つて Counter current 装置で
 n 回の分配を行つた場合は $\left(\frac{K}{1+K} + \frac{1}{1+K}\right)^n = 1$ の展開によつて与えられる各項の割合
 だけ各抽出管に分配されるわけである。これによつてえがかれた曲線が分配の理論曲線である。
 著者等は 60 本架の Counter current 装置を用い、Butanol を飽和した水及び水を飽和した
 Butanol を溶媒とし、原則として 49 回の分配を行つた後、標示薬として Methyl red を用い
 $\frac{N}{100}$ NaOH で滴定して各抽出管の酸度を測定した。こゝに面白くなかつたことは Butanol
 の存在下で V.F.As. を Alkali で滴定すると滴定値が理論値の 120% ± 0.5 % に出てくること
 である。従つて、あとで計算の場合この factor を乗じて補正した。

Fig. 1, 2, 3 は Acetic acid, Propionic acid 及び Butyric acid の $\frac{N}{10}$ 液 4 cc. を単独
 で振つた時の成績である。

なお、分配係数 K は純品を分液漏斗で振つて決定出来るが、この方法は温度その他の原因で
 成績が面白くなかつた。よつて著者等は二項展開の一般項 $T_r = \frac{n!}{r!(n-r)!} \frac{K^r}{(1+K)^n}$ を利用
 し Counter current 装置で振つて最高値の出る箇所から、式 $\frac{r+1}{n-r} > K > \frac{r}{n-r+1}$ で算出した。

Table 1. Rf value of V.F.As.

Acid	Rf-value
Acetic acid	0.11
Propionic acid	0.19
Butyric acid	0.32
Valeric acid	0.47

One dimensional-ascending method.
 Temperature 15°C

Fig. 1. Forty-nine transfer distribution of acetic acid.

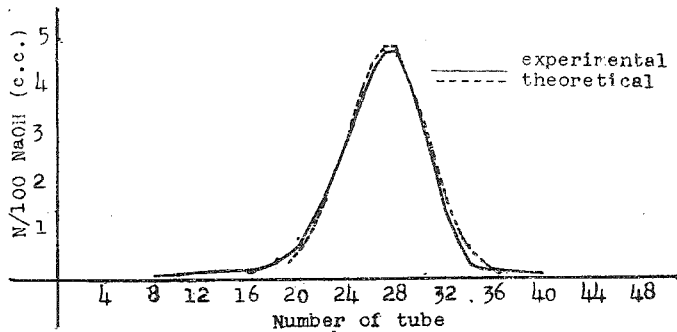


Fig. 2. Forty-nine transfer distribution of propionic acid.

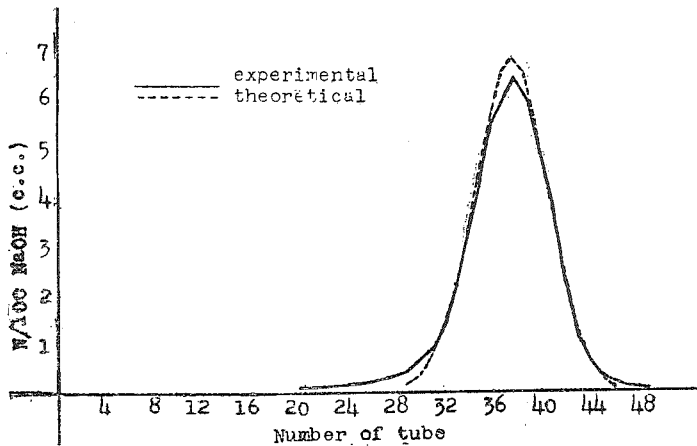
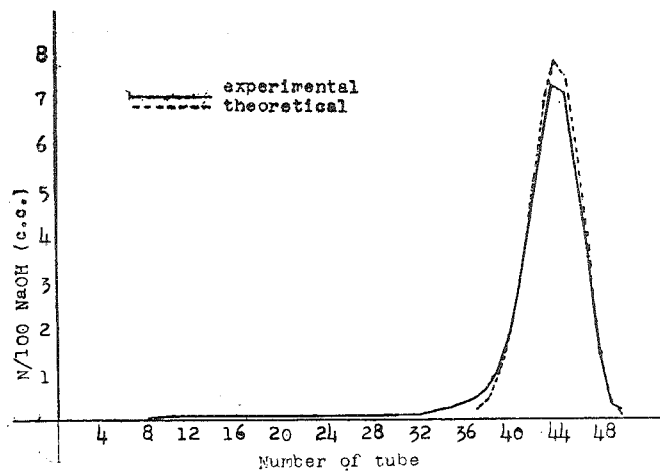


Fig. 3. Forty-nine transfer distribution of butyric acid.



たゞしこの場合 n は分配回数, r は滴定の最高値を出した抽出管の番号である. このようにして算出した V.F.As. の水と Butanol に対する分配係数は 15°C において, Acetic acid 1.2 Propionic acid 3.0 Butyric acid 7.0 であつた.

Fig. 4 は Acetic acid と Butyric acid の混合液を. Fig. 5 は Acetic, Butyric 及び Propionic acid の混合液を展開した時の成績である.

即ち, Acetic acid と Butyric acid の混合物は 49 回の分配で殆ど完全に分れるので滴定値からでも, あるいは最高値を基にした計算からでも各酸の量を容易且つ正確に知ることが出来る. 次で混液の V.F.As. が 3 種類で, しかもその量が等しい時は, 49 回の分配では分離が充分でなく, 近似値の算出は出来るが正確な定量は困難である. しかしながら後で述べるように, Ensilage 中の V.F.As. は主として Acetic acid と Butyric acid であり, Propionic acid が含まれているとしても, その量は少なかつたので実際問題として

Fig. 4. Forty-nine transfer distribution of a mixture of acetic and butyric acids.

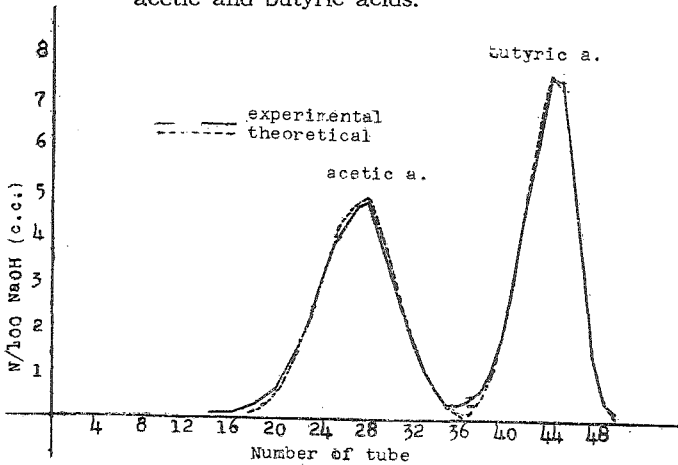


Fig. 5. Forty-nine transfer distributyon of a mixture of acetic, propionic and butyric acids.

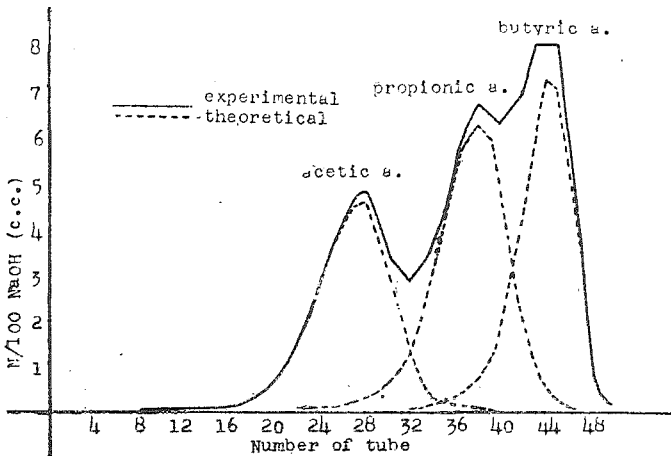


Table 2. The ensilages used in this experiment.

Sample No.	Where the ensilage was made	Raw material	Quality
1	The livestock farm of Okayama	Corn	good
2	The farm of Okayama University	"	bad
3	"	"	excellent
4	Laboratory	Red clover	bad
5	"	"	"
6	"	"	"
7	"	"	"
8	"	"	good

は大体ことたりた。

Ⅲ. Ensilage 中の V.F. As. の定性 と定量

供試材料は Table 2 の如く、岡山県岡山種畜場、岡山大学農場で製造されたもの及び P. RIKINS⁴⁾ 等の法にならい当教室で実験用小型サイロで作ったものである。

1. Ensilage から V.F. As. の抽出

Ensilage 約 35g. を細かくきざみ、30.0g. を正確に蒸溜瓶に移す。次でこれに 10N H₂SO₄ 30cc. を加え、法に従つて水蒸気蒸溜を行い、出てくる液を 25cc. づつの fraction として取り、蒸溜液が全く中性になるまで蒸溜を続けた。このようにして溜出された液は、fraction として 10~12, 容量として 250~300cc. であつた。

2. Paper chromatography による V.

F. As. の定性

予備実験と同じ術式で、溜液の各 fraction について Paper chromatoghy を実施した。その成績は Table 3 の如く、Acetic acid 及び Butyric acid は供試

Ensilage のすべてに含まれていたが, Propionic acid はクローバで造つたものには僅かに含まれていたが, 玉蜀黍を原料としたものには認められなかつた. また Propionic acid と Butyric acid は 4~6 までの fraction で溜出しつくされ, それ以降の各 fraction の酸は, すべて Acetic acid であることがわかつた.

Table 3. Result of paper chromatography of steam distillate.

No. of Sample	No. of fraction Acid	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		1	Acetic Prop. Buty.	≡ +	≡ +	≡ ±	≡ —	≡ —	≡ —			
2	Acetic Prop. Buty.	≡ +	≡ +	≡ +	≡ ±	≡ —						
3	Acetic Prop. Buty.	≡ ±	≡ —	≡ —	≡ —	≡ —						
4	Acetic Prop. Buty.	≡ ≡ ≡	≡ + +	≡ + +	≡ + +	≡ + +	≡ ± ±	≡ — —	≡ — —	≡ — —	≡ — —	
5	Acetic Prop. Buty.	≡ + +	≡ + +	≡ + +	≡ + +	≡ + —	≡ — —	≡ — —	≡ ± —			
6	Acetic Prop. Buty.	≡ + ≡	≡ + ≡	≡ + ≡	≡ + ≡	≡ ± +	≡ — —	≡ — —	≡ — —	≡ — —	≡ — —	
7	Acetic Prop. Buty.	≡ ± +	≡ — +	≡ + +	≡ ± ±	≡ ± ±	≡ — —	≡ ± —				
8	Acetic Prop. Buty.	≡ ±	≡ ±	≡ —	≡ —	≡ —	≡ —	≡ —				

3. Counter current 装置による V.F.As. の定量

前述のように Ensilage 中の V.F.As. を完全に抽出するには, 溜液が 250~300cc. になるまで水蒸気蒸溜を行わねばならないが, こうした場合, 溜液の酸濃度は極めて稀薄となつて定量が困難な場合がある. そこで著者等は, Table 3 によつて含まれている酸が Acetic acid だけであることが判明した fraction はたゞちに $\frac{N}{100}$ -NaOH で滴定してその酸度を測り, あとで計算の場合, Counter current 装置で出てきた Acetic acid の量に加えて Ensilage 中の Acetic acid の量とした.

Counter current 装置での定量は次の要領で実施した. 即ち, Table 3 で 2 種以上の V.F.As. を含む各 fraction と, 念のためその次の fraction の各等量をよく混和し, そのなかから 10cc. を第 1 の抽出管に移し, これに上層液 10cc. を更に加え, 2 分間 (80 回) 振盪して分配を行わしめてから静置する. しばらくすると上下層が完全に分離するので, 予め下層液 10cc. を入れてある第 2 抽出管に上層液を移し, 次で第 1 抽出管に上層液 10cc. を加えてから同様の分配を行つた. (注: 上下層は 2~5 分間で完全に分離するが, 上層液又は下層液の過不足は分離時間を

遅延させる) 分配は原則として49回行つたが、60回行つたものもあつた。

所要の分配が終つたならば、抽出管から上下層液を同時に取り出し、各管毎に $\frac{N}{100}$ NaOH で滴定した。そしてたとえば Fig. 6 のように sample 中に含まれる V.F. As. が2種類であつ

Fig. 6. Forty-eight transfer distribution of a sample which doesn't contain propionic acid.

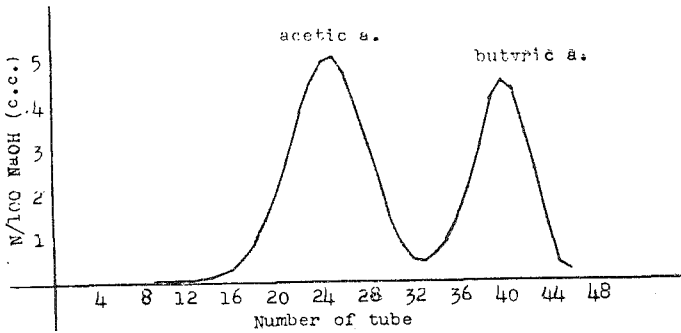
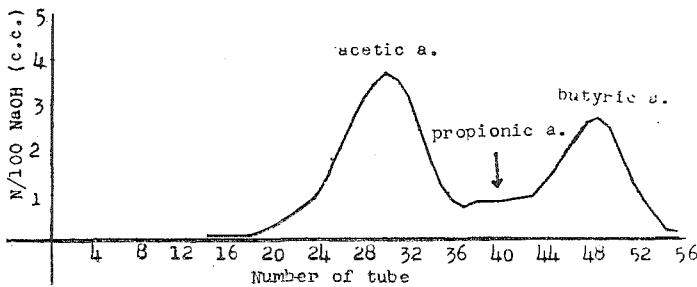


Fig. 7. Fifty-six transfer distribution of the sample which contain a little propionic acid.



て、両酸の分離が完全なものとは滴定値から、Fig. 7 のように微量の Propionic acid が含まれていて、酸の分離が充分でなかつたものは、式

$$\frac{a}{\frac{n!}{r!(n-r)!} \cdot \frac{kr}{(1+k)^n}}$$

から Acetic acid 及び Butyric acid の量をそれぞれ算出すると共に、全滴定値から前記両酸の量をさし引いた値をもつて Propionic acid の量とした。但し式中 r は最高の滴定値を示した抽出管番号; a は r 管で消費した $\frac{N}{100}$ NaOH 量; n は分配回数; K は分配係数である。

以上の様にして定量した結果は Table 4 の如

Table 4. The V.F. As. Content in Ensilage.

Sample No.	Acid	Acetic a. (%)	Prop. a. (%)	Buty. a. (%)	Remark	
					Raw material	Quality
1		0.94	0	0.17	Corn	good
2		1.24	0	0.87	"	bad
3		1.12	0	0.05	"	excellent
4		1.35	0.26	0.89	Red clover	bad
5		1.30	0.06	0.69	"	"
6		0.68	0.13	1.19	"	"
7		0.67	0.04	0.85	"	"
8		0.81	0	0.07	"	good

くである。即ち、

(1) Acetic acid の含有量は 0.68~1.35 % の間にあつて、Ensilage 原料の種類或はその品質と含有量の間には関連はなかつた、

(2) Propionic acid はクローバを原料としたものには僅かに含まれていたが、玉蜀黍で造つたものにはなかつた。

(3) Butyric acid の含量は 0.05~1.19 % の間にあつて、Ensilage の品質が悪いもの程その含量が多かつた。

(4) Acetic, Propionic 及び Butyric acid 以外の V.F. As は認められなかつた。

Ⅲ 要 約

1, 本実験において著者等は、Ensilage 中の V.F. As を Paper partition chromatography と Counter current distribution 法によつてそれぞれ定性と定量を行つた。

2, Paper partition chromatography は一次元上昇法で行い、移動相としては水飽和 n-Butanol (1% ammonia) を用いた。

3, Counter current distribution では、移動相として水飽和 n-Butanol, 固定相として n-Butanol 飽和水を用いた。

1 回の分配では80回の振盪を行い、49回の分配を行つた。

4, 以上の方法で Ensilage 中の V.F. As. は比較的容易かつ正確に定性と定量が出来た。

5, Ensilage 中の Acetic acid は 0.7~1.3 % の間にあつて、原料の種類或は品質の善し悪しには関連がない。しかしながら Butyric acid は Ensilage の品質が悪いもの程その含量が多かつた。

Red clover で造つた Ensilage には少量の Propionic acid が含まれていたが、玉蜀黍を原料としたものには含まれていなかつた。

文 献

1. BURTON H.S., Nature, **173** 127 (1954)
2. FRIEDEMANN T.E., J. Biol. Chem., **123** 161 (1937)
3. HISCOX E.R. and BERRIDGE N.T., Nature, **166** 522 (1950)
4. PERKINS A.E. and PRATT A.D., J. Dairy Science, **34** 606 (1951)
5. SATO Y., BARRY G.T. and CRAIG L.C., J. Biol. Chem., **170** 50 (1947)