

(242)

(福井, 谷) 火落菌増殖に及ぼすビタミン B<sub>6</sub> の影響

## 〔IV〕 練 括

製麹経過中のパントテン酸, ビオチン, イノシトール及びB<sub>6</sub>の消長を追跡した。

B<sub>6</sub>, Bi及びPaAは製麹によつて増加し, Inは麹菌発育初期には合成されて一旦増加するがその後は減少してゆく事を知つた。

以上の実験は恩師高田亮平教授の御指導, 御援助下に行つた。厚く感謝する。 (高田研究室報告第442)

## 文 献

- 1) 福井, 谷, 岸部: 本誌, 33, 113 (1955).      2) 福井, 谷: ビタミン學會第6回大會講演 (1954年7月).  
3) 福井, 谷, 岸部: 本誌, 33, 175 (1955).      (昭和30, 1, 21 受理)

火落菌増殖に及ぼすビタミン B<sub>6</sub> の影響

福 井 三 郎 (姫路工大應用化學教室・京都大學工業化學教室)  
谷 喜 雄 (京都大學工業化學教室・KK谷酒造本店)

## 〔I〕 緒 言

さきにアンチビタミン使用による清酒火落菌増殖の抑制を目的として, 加水清酒にB群ビタミンを添加してその發育促進効果を試験した結果, 我々の使用した菌株に対してはB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ビオチン, PABA<sup>1)</sup> 又或菌株にはB<sub>12</sub><sup>2)</sup> が有効であつたがB<sub>6</sub>は有効でなかつた。

安藤・池田兩氏<sup>3)</sup>によつても略々同様の結果が報告されている。

その後著者等は清酒中にB<sub>6</sub>が相當多量に含有され<sup>4)</sup>, その大部分はPyridoxineであることを認め<sup>5)</sup>, 一方寺本・橋田氏等<sup>6)</sup>は活性炭處理清酒を培地とした場合, B<sub>6</sub>が火落菌促進効果を有する事を認め, 次に同氏等の考案した人工培地においても同様の事實を報告している<sup>7)</sup>。

さきに行つた著者等の実験では清酒にPyridoxineを添加して試験した爲B<sub>6</sub>の効果があらわれなかつた事も考えられるので, 清酒中に多量に存在するB<sub>6</sub>と火落との關係を再検討する目的で本実験を行うこととした。

## 〔I〕 供試菌株及び実験法

本実験に使用した菌株は伏見の火落酒より分離した2株で, 既知の人工培地には繁殖しえず, 清酒又は人工培地に麹菌その他數種の糸狀菌の菌體エキス, 又は培養濾液を添加して始めて増殖しうる菌株<sup>8,9)</sup>であつた。その電子顯微鏡寫眞を第1圖に示した\*。

なお更に伏見で分離した5株, 灘の醸造元より分離された5株, 阪大寺本研究室より分離された5株につき検討した結果は, 人工培地(寺本・橋田氏の培地及びビタミンB<sub>12</sub>定量用の*Lactobacillus leichmannii*用培地にB<sub>12</sub>を補足したもの)には阪大株の全部, 伏見の2株, 灘の1株が増殖し, 他は繁殖不可能であつた。

人工培地に増殖不可能な菌株では, 何れも本実験で示したと同様の結果が得られた。

清酒のB<sub>6</sub>濃度と火落性の關係については, 加水清酒(アルコール濃度を15 vol%に一定)の一部を以て*Sacch. carlsbergensis*法でB<sub>6</sub>量を測定し, 培養試験は内部15mmの試験

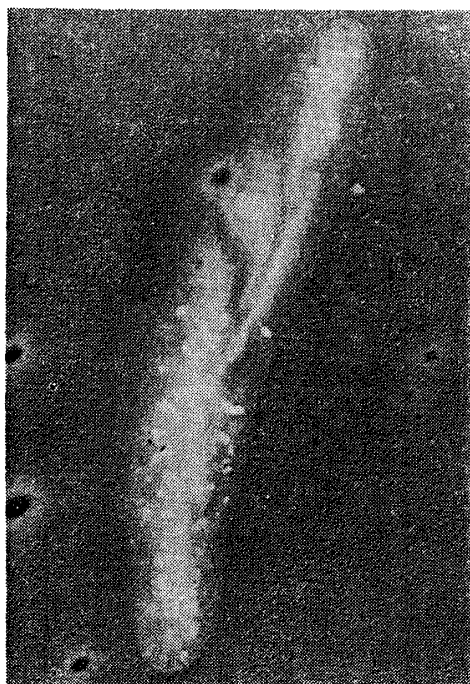


Fig. 1. Electromicroscopy of Hiochikin tested ( $\times 22,000$ )

\* 火落菌の電子顯微鏡寫眞は京都大學講師市川邦介氏及び京都大學化研小林憲之助助教授の撮影にかゝるものである。謝意を表す。

管に加水清酒10ccを入れ、火落菌懸濁液を注射針で1滴添加した。菌體数は約 $3 \times 10^7$ であつた。30°C, 12日間培養後繁殖状態を肉眼観察及び光電比色計による吸収度(%)で示した。実験結果は後述する如く B<sub>6</sub>濃度と火落性との間には明らかな関係が認められなかつた。

次に B<sub>6</sub>を除いた清酒を用いて B<sub>6</sub>関係物質の効果を試験した。

基本培地として、(1)清酒を活性炭処理して B<sub>6</sub>及び活性炭被吸着性のビタミン等を除いた上、火落菌増殖に影響すると考えられるビタミンとして1cc當り B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, PABA 各1r, ビオチン0.01r, B<sub>12</sub> 0.3m $\gamma$ 補足、(2)清酒を直射日光で照射して B<sub>6</sub>を破壊後1cc當り B<sub>2</sub> 1rを補足の2種を用いた。(兩者共 B<sub>6</sub>は存在しない事を確かめた。)

試験法は基本培地8ccに供試物質の溶液1ccを添加し、これに火落菌 Inoculum 1cc(菌數約 $3 \times 10^7$ )を接種して合計10ccとし30°Cで培養後繁殖度を測定した。

### 〔Ⅱ〕 実験結果及び考察

#### (1) 清酒の B<sub>6</sub>含量と火落との関係

清酒20種類の B<sub>6</sub>濃度(アルコール濃度を15vol%に一定にした場合)と供試菌株による火落性との関係を試験した。

菌株Ⅰ, Ⅱによる実験結果を第1表に示した。

第1表の結果を整理して、清酒の火落菌に対する抵抗性の強弱とその B<sub>6</sub>濃度との関係を第2表に示した。菌株Ⅰでは吸収度13%, 肉眼観察以上の清酒を抵抗性弱とし、菌株Ⅱでは吸収度10.5%, 肉眼観察以上を弱とした。

Table 2. Relation between vit. B<sub>6</sub> content and resistance to putrefaction of Sake

Species of bacteria	Resistance to putrefaction	Vit. B <sub>6</sub> content $\gamma$ /cc	Number of Samples
Ⅰ	strong	1.30, 1.80, 1.08, 1.70 1.12, 0.87, 1.08, 2.16 1.06, 1.10, 1.80, 1.52	12
	weak	1.70, 1.50, 2.75, 2.27 1.05, 1.00, 1.21, 0.68	8
Ⅱ	strong	1.30, 1.80, 1.50, 1.70 2.27, 0.87, 1.08, 2.16 1.10, 1.52	10
	weak	1.70, 1.08, 2.75, 1.12 1.05, 1.06, 1.00, 1.21 1.80, 0.68	10

兩菌株に対する抵抗性の強い酒と弱い酒の平均 B<sub>6</sub>濃度の有意差検定を行つた結果を第3表に示した。

即ち菌株Ⅰ及びⅡに對し抵抗性の強い群と弱い

群の B<sub>6</sub>濃度の分散を F 検定した結果は有意水準\* 10%で有意差を認めなかつたので、次に平均 B<sub>6</sub>濃度間の有意差検定を t 検定で行つた所有有意水準10%で有意差を認めなかつた。

火落菌菌株中には B<sub>6</sub>により増殖が促進されるものがある事が報告されている<sup>6,7</sup>から、清酒の火落性と B<sub>6</sub>濃度間に関係がないと云えないが、少くとも人工培地に増殖不能な菌株中には清酒 B<sub>6</sub>濃度に無関係なものがあると云いうる。

\* この場合の F 検定の有意水準としては、森口繁一氏に従い兩側危険率を採用した。(日科技連品質管理セミナー教程参照)

Table 1. Relation between vit. B<sub>6</sub> content and putrefaction of Sake

Sample No.	vit. B <sub>6</sub> content $\gamma$ /cc	Bacterial growth			
		Species of bacteria			
		Ⅰ		Ⅱ	
1	1.30	±*	8.0**	±*	10.0**
2	1.80	±	10.0	±	8.8
3	1.70	+	14.5	+	11.5
4	1.08	±	8.0	+	12.0
5	1.50	+	14.0	±	8.0
6	2.75	+	18.0	+	11.0
7	1.70	±	7.5	±	6.5
8	1.12	±	10.0	+	10.8
9	2.27	+	21.1	±	10.0
10	0.87	±	8.0	±	8.0
11	1.08	±	10.0	±	6.5
12	2.16	±	7.5	±	10.0
13	1.05	+	13.0	+	17.0
14	1.06	±	8.5	+	13.2
15	1.00	≡	36.5	+	10.5
16	1.21	+	13.0	+	11.2
17	1.10	±	6.0	±	8.2
18	1.80	±	7.0	+	11.0
19	0.68	≡	36.0	+	13.8
20	1.52	±	8.0	±	7.5

\* Bacterial growth observed by eyes

\*\* Turbidity: Per cent absorption measured by photoelectric colorimeter

(244)

(福井, 谷) 火落菌増殖に及ぼすビタミン B<sub>6</sub> の影響Table 3. Comparison of Vit. B<sub>6</sub> content of two groups of Sake (resistance: weak and strong)

Species	I		I	
	strong	weak	strong	weak
No. of samples	12	8	10	10
degree of freedom	11	7	9	9
mean	1.38	1.52	1.53	1.35
sum of squares	1.8195	3.4012	1.9232	3.1756
mean square	0.1654	0.4859	0.2137	0.3528
standard deviation	0.39	0.65	0.44	0.56
variance ratio, F <sub>0</sub>	2.94		1.66	
pooled variance	0.2900		0.2610	
degree of freedom	18		18	
t <sub>0</sub>	0.56		0.80	

F <sub>7,11</sub> (0.01)=4.88	F <sub>9,9</sub> (0.01)=5.35	t <sub>18</sub> (0.10)=1.734
F <sub>7,11</sub> (0.025)=3.76	F <sub>9,9</sub> (0.025)=4.03	t <sub>18</sub> (0.05)=2.101
F <sub>7,11</sub> (0.05)=3.01	F <sub>9,9</sub> (0.05)=3.18	t <sub>18</sub> (0.01)=2.878

(2) 火落菌増殖に及ぼす B<sub>6</sub> 関係物質の影響

清酒中の B<sub>6</sub> は、1 例をあげれば Pyridoxine (Pin) 0.57, Pyridoxal (Pal) 0.13, Pyridoxamine (Pam) 0.18  $\gamma$ /cc で大部分 Pin であつた<sup>5)</sup>。

従来行われた火落菌に対する試験でも Pin が使われているが、乳酸菌では Pin に感應せず Pal, Pam<sup>10,11)</sup> 又はこれらの Phosphate<sup>12,13)</sup> により始めて効果がある場合が多く認められている。火落菌に対しても類似の事実が豫想される故に、本実験では Pin 以外に Pal, Pam, Pam-phosphate の効果を調査した。

B<sub>6</sub> 3 型の効果を試験した結果を第 4 表に示した。

Table 4. Effect of vit. B<sub>6</sub> on the growth of *Bac. saprogenes* Sake (Hiichikin)

Medium used	Amts. added ( $\gamma$ /10ml)	bacterial growth					Turbidity after 12 days	
		Incubation period (days)				12		
		6	8	10	12			
Sake treated with active carbon	Pyridoxine	3	—	—	—	±	8.8	
		4	—	—	—	±	8.8	
		5	—	—	±	±	10.2	
	Pyridoxal	3	—	—	—	±	8.6	
		4	—	—	±	±	10.4	
		5	—	—	—	±	8.4	
	Pyridoxamine	3	—	—	—	±	5.1	
		4	—	—	—	±	8.3	
		5	—	—	—	±	8.5	
	control	—	—	—	—	±	8.0	
	Sake irradiated by sun light	Pyridoxine	3	—	—	±	+	19.0
			4	—	—	±	+	17.8
5			—	±	+	+	20.0	
Pyridoxal		3	—	±	+	+	20.4	
		4	—	—	±	+	19.0	
		5	—	—	±	+	18.0	
Pyridoxamine		3	—	—	±	+	19.1	
		4	—	—	±	+	17.0	
		5	—	—	±	+	19.0	
control		—	—	—	—	±	18.5	

日光照射清酒 (B<sub>2</sub>補足) を培地とした時の方が, 活性炭処理清酒 (必要ビタミン補足) に比し全體的に繁殖が良いが, B<sub>6</sub> 3型共使用菌株 (実験例は伏見よりの分離株による) に對しては明らかな促進効果を認めなかつた。

Pam-phosphate を活性炭処理清酒 (ビタミン補足), 日光照射清酒 (B<sub>2</sub>補足) 及び無処理清酒に添加した場合の効果を第5表に示した。

Table 5. Effect of pyridoxamine phosphate

Medium	Amts. added (mγ/10cc)	Bacterial growth					Turbidity after 12 days
		Incubation period (days)					
		4	6	8	10	12	
Sake untreated	10	—	+	+	++	+++	34.8
	20	—	±	+	++	+++	32.8
	30	±	+	+	++	+++	34.0
	control	±	+	+	++	+++	36.8
Sake treated with active carbon	10	—	—	—	±	±	10.0
	20	—	—	—	±	±	9.0
	30	—	—	—	±	±	8.5
	control	—	—	—	—	—	5.3
	tomato juice(10%)	±	±	+	++	+++	30.0
Sake irradiated by sun light	10	—	—	+	++	++	20.0
	20	—	—	+	++	++	20.5
	30	—	±	+	++	++	21.5
	control	—	—	—	±	+	10.0
	tomato juice(10%)	±	+	++	+++	+++	34.2

無処理の清酒を培地とした場合には効果があらわれないが, 活性炭処理清酒及び日光照射清酒では若干促進効果が認められた。

しかし火落菌繁殖効果の大きいことが知られているトマト汁を10%添加した場合に比し遙かに低かつた。HE-NDLIN 等によれば *Lactobac. lactis* DORNER に對するトマト汁因子の本體は Pam-phosphate であると云う<sup>14)</sup>。使用トマト汁の全 B<sub>6</sub>濃度は0.7γ/ccであり10%添加した培地中の全 B<sub>6</sub>量は0.7γ/10ccであつた。Pam-phosphate 含量は測定していないが, 第5表に示した如く Pam-phosphate 添加量を増しても効果は増さない事から火落菌に對するトマト汁の効果は既知B群ビタミン及び B<sub>6</sub>-phosphate のみによるものでなく未知促進因子が豫想される。

なお CASWELL 等<sup>15)</sup>によるトマト汁因子の代用物質である DL-alanine, Na-ethyloxalacetate, フマル酸を併用したが無効であつた。

われわれの菌株には B<sub>12</sub>も有効であつたので, 日光照射清酒 (B<sub>12</sub>含量は殆んど検知されなかつた) に Pam-

Table 6. Cooperative effect of pyridoxamine-phosphate and vit. B<sub>12</sub>

Substance added (per 10 ml media)	Bacterial growth				Turbidity after 12 days
	Incubation period (days)				
	6	8	10	12	
tomato juice	+	++	+++	+++	38.0
Pam-phosphate (25mγ)	—	±	+	++	20.5
Pam-phosphate (25mγ)+ vit. B <sub>12</sub> (0.5mγ)	±	+	++	++	25.6
vit. B <sub>12</sub> (0.5mγ)	—	±	+	++	22.0
control	—	—	±	±	10.0

(246)

(福井, 谷) 火落菌増殖に及ぼすビタミン B<sub>6</sub> の影響

phosphate と B<sub>12</sub> を併用した所第 6 表の如く各單獨よりも更に有効であつたがトマト汁には及ばなかつた。(トマト汁中には B<sub>12</sub> はないが, B<sub>12</sub> 以外の *Lactobac. leichmannii* 因子の存在が認められて居り<sup>16)</sup>, このものの効果は別報に譲る.)

### (3) 火落菌増殖による清酒中 B<sub>6</sub> 量の變化

以上の實驗で Pam-phosphate が若干有効であるが遊離の B<sub>6</sub> 3 型が無効であることを知つたが, 更にこの事實を確かめる目的で火落前後の清酒中 B<sub>6</sub> 量の増減を調べた. 本實驗では菌體を多量にうる爲にトマト汁を清酒に 10% 添加した培地を用い火落菌を 1 白金耳接種し 30°C で 10 日間培養後遠心分離して菌體と廢液に分け夫々の B<sub>6</sub> 量を測定した. (第 7 表)

火落前の B<sub>6</sub> 含量は 0.70 $\gamma$ /cc であつたのが, 火落後は菌株 I では 1.18 $\gamma$ /cc, 菌株 II では 1.17 $\gamma$ /cc となり, 明らかに B<sub>6</sub> 量の増加が認められた. 即ちわれわれの使用した菌株では菌體中に B<sub>6</sub> を合成しうる爲に B<sub>6</sub> を要求しないものと考えられる.

### (4) 考 察

以上の如く既知人工培地に増殖しえない菌株を用いて, 清酒 B<sub>6</sub> 含量と火落との関係, B<sub>6</sub> 関係物質の効果等を試験した結果, Pam-phosphate 以外の free の B<sub>6</sub> が火落菌増殖に効果を有さない事を知つた.

寺本・橋田氏等の菌株は活性炭處理清酒培地及び人工培地で Pyridoxine により増殖を促進されるが, その中の T<sub>107</sub> 菌はアルコール濃度が高まると Pyridoxine 要求性が鈍くなると云う.

B<sub>6</sub> 以外の他のビタミン B 群に対する要求性等も, 従来諸研究者の結果が區々である事實は, 火落菌の多様性によるものであつて, 簡単な結論を下しえないと考えられる.

著者等の目的とする處の火落菌の要求するビタミンを決定して, そのアンチビタミンを使用する事により火落を防止しようとする試みも, 多數の變株に共通な性質によらねばならない. 例えばビオチンは異なつた報告において比較的共通に必要と述べられているものであつて, その拮抗體の利用等を考える必要がある.

## [IV] 綜 括

(1) 既知人工培地に繁殖不可能な火落菌菌株を用いて, 清酒 B<sub>6</sub> 濃度と火落性の関係を調べたが, 明確な関係を認められなかつた.

(2) 活性炭處理又は日光照射により B<sub>6</sub> を除去後適當なビタミンを補足した清酒培地を用いて, B<sub>6</sub> 3 型の効果を調べたが無効であつた. Pyridoxamine phosphate はやゝ有効であり B<sub>12</sub> と併用すれば更に効果を示すが, トマト汁に比し著しく低い.

(3) 供試菌株を清酒に繁殖さす事により, B<sub>6</sub> が合成されて増加する事を認めた.

以上の實驗は恩師高田亮平教授御指導下に行つた. 試料をたまり實驗に御便宜をたまわつた大阪国税局鑑定官室川崎恒氏, Pam-phosphate を分與された櫻井芳人博士, 白石正英氏, 火落菌菌株を分譲載いた阪大寺本四郎教授, 橋田度氏, 灘酒造會社各位に厚く感謝する.

本報告の大要はビタミン學會第 5 回大會 (昭和 28 年 5 月) に發表した.

(高田研究室報告第 443)

## 文 献

- 1) 福井, 谷: 本誌, **29**, 257 (1951).
- 2) 福井, 谷: 本誌, **31**, 5 (1953).
- 3) 安藤, 池田: 科研報告, **28**, 68 (1952).
- 4) 福井, 岸部: ビタミン, **6**, 442 (1953).
- 5) 福井: Anal. Chem. **25**, 1884 (1953).
- 6) 寺本, 橋田: 本誌, **31**, 334 (1953).
- 7) 寺本, 橋田, 松尾: 本誌, **32**, 234 (1954).
- 8) 田村, 金子, 名倉: 農化大會講演 (1952).
- 9) 福井, 谷: ビタミン學會第 2 回例會講演 (1953).
- 10) SNELL, E. E., RANNEFELD, A. N.: J. Biol. Chem. **157**, 475 (1949).
- 11) SNELL, E. E.: J. Biol. Chem. **157**, 491 (1945).
- 12) MCNUTT, W. S., SNELL, E. E.: J. Biol. Chem. **173**, 801 (1948).
- 13) CHELDELIN, V. H., NYGAARD, A. P., KORNBERG, H. A., WILLIAMS, R. J.: J. Bact. **62**, 134 (1951).
- 14) HENDLIN, D. C., CASWELL, M. C., PETERS, V. T., Wood, TH.: J. Biol. Chem. **186**, 647 (1950).
- 15) CASWELL, M. C., KODITSCHKE, L. K., HENDLIN, D. C.: J. Biol. Chem. **180**, 125 (1949).
- 16) PEELER, H. T., YOCOWITZ, H., NORRIS, L. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **72**, 515 (1949). (昭和 30, 1, 22 受理)