

## 清酒の火落菌に関する研究 (第4報)

### II. 火落菌の發育促進性物質

#### C. 火落菌及び酵母菌の發育促進性物質と Vitamin

##### B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> concentrate 及び Bios fraction との関係

大 谷 義 夫

微生物の發育は未知の有機物質の存在によりて増殖促進せらるゝ事は疑ふ可からざる事實にして是等の物質は動植物の組織、臓器、酵母菌體又は夫等の水溶液中に含まれ然もその多くは Vitamin B 物質と共存するか故に從來往々にして Vitamin B を以て微生物の發育促進性物質の如く想像せられたり。今茲に微生物の發育と Vitamin B との関係につきて論ぜられたる研究を見るに、細菌類に關しては、Cole & Lloyd<sup>(1)</sup> が麻病菌の培養には Vitamin (血液の酒精エキス)の必要を述べ Shearer<sup>(2)(3)</sup> は細菌類中或る種の病原菌の發育には特に Vitamin の効を認め、Kligler<sup>(4)</sup> は諸種の病原菌が動植物の組織を加へると良好なる發育を示す事はその中に含まるゝ水溶性 Vitamin 物質に依るものなるべしと想像せり、又 Davis<sup>(5-7)</sup> の研究によれば influenza 菌の發育には2種の物質を必要とす、而してその一は鐵を含む色素にして、他は所謂 Vitamin 又は之の類似物なり、更に Agulhou & Legroux<sup>(8)</sup> は該細菌の發育に對し血液及び血精が促進作用をなすことは蛋白質によるに非ずして Vitamin にありと述べたり、最近に至り Leichtenritt & Zielaskowski<sup>(9)</sup> は枸櫞汁を Diphtheria 菌に與へその發育が促進せらるゝことを知り之の有効成分は Vitamin D によるものと想像せり、然れども M'Leod & Wyon<sup>(10)</sup> は2~3の細菌を用ひ、或る種の Vitamin B 含有食品、米糠及び牛乳等を與へたるに前者には發育促進性を認めしも後2者にはその効少き事實よりして Vitamin B と細菌の發育促進性物質との間には種々の相違点ありと述べ、次で Wyon<sup>(11)</sup> は Vitamin B の細菌榮養上の効果を否定せり、火落菌に關しても余は既に該菌の發育促進性物質は Vitamin B 本體に非らざることを認め而して酵母菌の發育素たる Bios と異なる點を擧げたり。更に酵母菌の發育要素たる Bios と Vitamin との異同に就きて見るに、此の問題に就いては屢々論究せられたる所にして Williams<sup>(14)</sup>, Bachmann<sup>(15)</sup>, Swoboda<sup>(16)</sup>, 三尾氏<sup>(17)</sup>, Abderhalden & Schauman, Ide, 等<sup>(18)(19)</sup> は兩者は同一物なりと考へ、Emmett & Stockholm<sup>(20)</sup>, Funk & Dubin<sup>(21)</sup>, Fulmer, Nelson & Sherwood<sup>(22)</sup>, Flemming<sup>(23)</sup>, 衣笠、服部兩氏<sup>(24)</sup>、安藤氏等<sup>(25)</sup> は別々のものであることを主張せり、又最近戸出氏<sup>(26)</sup> は Vitamin B の分解又は變形產物が酵母の發育を助長するものならんことを考へられたり。

かくの如く微生物の發育促進性物質と Vitamin B との間には密接なる關係を有し居れども Vitamin 化學の進歩發達と共に現在に於ては Vitamin として取り扱はるゝ範圍には微生物の發育要素を含まず、而して從來此の方面の研究に於て單に Vitamin 又は水溶性 Vitamin と稱するものは Vitamin B を意味するものなり、最近の研究は Vitamin B を B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> 及び

其他の factor に分たれたれどもいづれも動物に對してのみ關係を有するものである。

微生物の發育促進性物質中細菌の發育促進性物質と酵母 Bios の性質の比較は細谷、黒屋<sup>(27)</sup>兩氏が溶血性連鎖球菌と酵母菌を用ひて相違あることを認めたり。

余は<sup>(13)</sup>曩きに火落菌の發育促進性物質の研究を行ひ該物質は自然界に於ては Vitamin B を含む母體に存すれども該物質の性質は酵母菌の Bios の性質とは異なることを述べたり。然れども研究試料及び實驗方法の相違せる結果を比較せるのみにては果して此の兩者が異なることの證明にはならず、故に余は火落菌及び酵母菌の發育促進性物質の性質を比較せんが爲めに今回試料及び調製方法を同一にして之を與へ、發育促進性に就きて吟味せり。

## 1. 實 驗 方 法

(i) 供用菌種 火落菌及び酵母菌の菌種としては次のものを用ひたり。

a. 火落菌 前實驗より引續き使用せる基本菌種の培養を用ふ。

b. 酵母菌 山本頼三氏<sup>(28)</sup>の實驗によれば酵母菌中、麥酒酵母は發育素を要求する種類である、故に本實驗にはその目的の爲に *Saccharomyces cerevisiae* を用ふることにした。

(ii) 種植法 種植量を出來るだけ少量に用ふることの必要なる理由は既に前報告に述べたるが如し、故に火落菌は常法により基本菌株の清酒10日間培養、酵母菌は麴汁寒天新鮮培養を一白金耳採り之を 2cc の Hayduck 液に平等に浮遊せしめ、各々一白金耳宛を種植す。

(iii) 培養基 火落菌の培養には無菌清酒を試験管に各々 20cc を分注して用ひ、酵母菌の培養には Hayduck 液を使用す、此の際蔗糖は再結精製し、その他の物質は Kahlbaum 製品の Extra pure を用ひ、その溶液を 20cc 宛試験管に容れて用ひ、かくて是等の培養液に發育促進性物質の試料を添加して試験せり。

(iv) 發育促進性物質試料 發育促進性物質の試料調製には最近の研究に依る Vitamin B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> concentrate 及び Bios fraction の方法を採用し、更に是等の試料を酸、アルカリ又はフラー土等を用ひて處理したる溶液を作りてその作用を検することとせり。

## 2. Vitamin B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> concentrate との關係

(i) Vitamin B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> concentrate の調製

Vitamin B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> concentrate の調製法中 Vitamin B<sub>1</sub> は Kinnerslay & Peters<sup>(29)</sup> 法、Vitamin B<sub>2</sub> は Sherman & Axtmayer<sup>(30)</sup> 法に依りて調製せしものにして、最近鈴木恒也氏<sup>(31)</sup>の實驗に於ても該法を應用せられて居る。(尙本實驗の1部は鈴木氏より分與せられたるものを用ふ)。其の調製法は次の如し。

(a) Vitamin B<sub>1</sub> concentrate. 米糠 100gm に醋酸にて酸性とせる水 500cc を加へ 1 晝夜放置して抽出し、之を吸引濾過す。その透明溶液を 50°C 以下にて減壓濃縮し後微酸性となる迄中和し、數回エーテルを以て油分を除去す、後、此の溶液に中性醋酸鉛を加へて蛋白質物及び Vitamin B<sub>2</sub> を沈澱せしめて濾別し、濾液に硫化水素を通じ、鉛を別離したる後減壓にて 25cc に濃縮し、等量の 95% 酒精を加へて保存す。

(b) Vitamin B<sub>2</sub> concentrate. 米糠 100gm に水 200cc を加へ 120°C にて 4 時間加壓蒸氣を通じ Vitamin B<sub>1</sub> を破壊せしめたる後、更に 200cc の水を加へて 1 晝夜静置す、かくて後之を濾過しエーテルにて油分を除き減壓濃縮して 25cc とし 95% 酒精を等量加へて保存せり。

(ii) 發育促進性物質としての Vitamin B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> concentrate

火落菌及び酵母菌の發育促進性物質として、Vitamin B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> concentrate 並に市販 Oryzanin 液の 10 倍稀釋液を用ひ、その添加量を 0.1, 0.5, 1.0 及び 3 cc とし、供試菌種の發育促進性を檢せり、而して火落菌は 6 日間培養、酵母菌は 4 日間培養し、培養後よく振盪し其の濁濁度を以て其の發育程度を知る。(以下之に準ず)

發育促進性物質としての Vitamin B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> concentrate

培養温度 = 30°C

添加物質種類	添加量 (cc)	火落菌	酵母菌
グ イ タ ミ ソ B <sub>1</sub>	0.1	++	++
"	0.5	++±	++±
"	1.0	+++	+++
"	3.0	+++±	+++±
グ イ タ ミ ソ B <sub>2</sub>	0.1	++	++
"	0.5	++±	++±
"	1.0	+++	+++
"	3.0	+++±	+++±
オ リ ザ ニ ソ 液	0.1	++	++
"	0.5	++±	++±
"	1.0	++±	++±
"	3.0	+++	+++
加水 (對照)	0.1	±	±
"	0.5	+	±
"	1.0	+	+
"	3.0	+±	+

備考 實驗結果は數回行つたもの、平均を以て示す (以下之に従ふ)

上表に見るが如く Vitamin B 物質は之を加へるとき火落菌及び酵母菌は共に發育を促進せられたり、而して Vitamin B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> concentrate のいづれにも該作用ある事を認む、故に是等兩物質中には供試兩菌の發育促進性物質を含むものと見て差支なきものと思惟せり。

(iii) Vitamin B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> concentrate の酸、アルカリ  
及びフラー土處理による發育促進作用の變化

Vitamin B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> concentrate 2 cc に N/5 鹽酸又は N/5 苛性曹達 2 cc を加へ 2 時間加温處理し後之を中和し水を加へて原液の 10 倍稀釋液となす、又フラー土を用ひて吸着せしむる場合には豫め 10 倍に稀釋せる溶液とし之に 10% のフラー土を加へて處理しその濾液を使用す、是等の方法に關しては第 3 報<sup>(13)</sup>に記せり、かくして處理したる溶液 2 cc 宛培養液に加へて試験せり。その實驗結果は次の如し。

Vitamin B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> concentrate の酸、アルカリ及び  
フラー土處理による發育促進作用の變化

培養温度 = 30°C

添 加 物 質 種 類	火 落 菌	酵 母 菌
ヴ ィ タ ミ ン B <sub>1</sub>		
酸 處 理	+++±	+++±
ア ル カ リ 處 理	++±	+++±
フ ラ ー 土 處 理	++±	+++±
原 液	+++±	+++±
ヴ ィ タ ミ ン B <sub>2</sub>		
酸 處 理	+++±	+++±
ア ル カ リ 處 理	++±	+++±
フ ラ ー 土 處 理	++±	+++±
原 液	+++±	+++±
加 水 (對 照)	++	+

上表の如く Vitamin B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> concentrate を酸、アルカリ及びフラー土に處理せる溶液に就て見るに火落菌の發育促進性物質はアルカリには破壊せられ、フラー土に吸着せらるゝも、酸に對しては變化を受けざるものゝ如し、又酵母菌の發育促進性物質は是等のいづれにも作用せらるゝ事なきが如し。而して此の火落菌の發育促進性物質の性質は細谷、黒屋兩氏<sup>(27)</sup>の研究せられたる溶血性連鎖球菌の發育要素の性質の記載によく一致するものなり。

### 3. Bios fraction との関係

#### (i) Bios fraction の調製

Bios fraction の調製法の最も適切なる方法が最近 Narayanan<sup>(22)</sup> によりて研究せられた、然れども該方法は Bios 所謂酵母の發育要素の fraction の爲にはそのまま應用し得れども、細菌の發育促進性物質は前實驗<sup>(13)</sup>に示せる如く硝酸銀バリタに沈澱するが故に Narayanan 法中硝酸銀バリタ處理以下を2つの fraction に分つ必要あり、故に余は硝酸銀バリタを使用する以前を豫備操作とし、以後を fraction A 及び B に分ちて各々處理せり。

(a) 豫備操作 供試料として米胚芽及び乾燥酵母を用ひ、その各々を 400gm 採りてフラスコに入れ、50%酒精を加へて温浸し、残滓は2回同様にして50%酒精に處理し、濾液は減壓のもとに濃縮し、之に水酸化バリウムを加へて20%濃度の溶液となさしめたる後2~3時間15封度の高温蒸氣に加熱し、後之に稀硫酸を加へてバリウムを除去し、適當に減壓濃縮して中性醋酸鉛の過剰を加へ1晝夜放置したる後濾過し、溶液中の鉛は之を硫化水素を通じて除き再び之を濃縮し80%温酒精5倍量を加へて3回抽出す、抽出液は之を合して酒精分を減壓にて去り少量とし5%硫酸にて溶解し後飽和隣タンゲステン酸(5%硫酸溶解)を過剰に加へて1晝夜暗所に放置して濾過し、沈澱は之を少量の水に洗ひ落し、濾液と別々に水酸化バリウムを加へて處理す、かくてこゝに生じたる沈澱を去り兩濾液を合し過剰のバリウムは硫酸を以て硫酸バリウムとして分つ、かくて得たる濾液は微酸性を呈す。此の豫備操作を行ひたる後此の液に硝酸銀バリタを用ひて濾液と沈澱に分つ、前者を fraction A とし、後者を fraction B とす。

(b) Bios fraction A. 豫備操作を行つて得た溶液に硝酸銀液の過剰を加へ飽和水酸化バリウムを加へてアルカリ性となす、此の際沈澱を生ずる故之を濾別す(沈澱は fraction B)。水酸化バリウム液によく洗滌したる後洗液と濾液を合して之に稀硫酸を加へてバリウムを除去し更に硫化水素を通じて銀を分ち此の溶液を濃縮し80%酒精を加へて酒精不溶の無機物を去りたる後10%鹽化白金液(酒精溶解)を加へ生じたる赤褐色の沈澱を濾過し去り、濾液に硫化水素を通じて白金を除きたる後濃縮して10ccとなす。是即ち Narayanan 法による Bios fraction にして酵母の發育要素は此の fraction に來るものと述べて居る。

(c) Bios fraction B. 硝酸銀バリタの沈澱を水に洗ひ落し稀硫酸を加へて微酸性とし、後硫化水素を通じて銀とバリウムを除き、濾液を濃縮し80%酒精を加へ、更に10%鹽化白金を以て處理すること fraction A の場合と同様にし、最後に濾液を濃縮して10ccとなす。

## (ii) 發育促進性物質としての Bios fraction A 及び B

Bios fraction により得たる fraction A 及び B 溶液を夫々10倍に稀釋して之を培養液中に夫々 0.1, 0.5, 1.5 及び 3cc 宛注加し以て發育促進性を檢せり。

## 發育促進性物質としての Bios fraction A 及び B.

培養温度 = 30°C

添加物質種類	添加量 (cc)	火落菌	酵母菌
米胚芽水			
ビオス フラクシオン A	0.1	++	+±
"	0.5	++	++
"	1.5	+++	+++
"	3.0	++±	+++±
ビオス フラクシオン B	0.1	++	+±
"	0.5	++±	+±
"	1.5	++±	+±
"	3.0	+++±	+±
酵母水			
ビオス フラクシオン A	0.1	+±	++
"	0.5	++	++±
"	1.5	++	+++
"	3.0	++±	+++±
ビオス フラクシオン B	0.1	++	+±
"	0.5	++	+±
"	1.5	++±	+±
"	3.0	+++	++
加水 (對照)	0.1	±	+
"	0.5	+	+
"	1.5	+	+
"	3.0	+±	+

以上の結果を見るに米胚芽及び乾燥酵母の Bios fraction を加へるとき火落菌及び酵母菌はいづれも發育の促進せらるゝ事を認めたり、而して此の際火落菌の發育促進作用が酵母菌の之に比して著しく異ると見らるゝは火落菌の發育促進が Bios fraction B 即ち硝酸銀バリタによりて沈澱せらるゝ部分に著しきに對し酵母菌のそれは Bios fraction A 即ち硝酸銀バ

リタにて沈澱せられざる部分に存することにして換言すれば Narayanan の Bios fraction の正確なることを意味し、同時に余の前実験に於ける硝酸銀バリタ沈澱の火落菌發育促進性物質の性質を検したる結果の確實なりしを意味するものなり。

(iii) Bios fraction A 及び B の酸、アルカリ及び  
フラー土處理による發育促進作用の變化

Bios fraction A 及び B 溶液を 2cc とり之に N/5 鹽酸及び N/5 苛性曹達 2cc を加へ 2 時間加温し後之を中和し、更に水にて原液の 10 倍に稀釋せる溶液となし、又フラー土を用ふる場合は豫め原液の 10 倍稀釋液とせるものに 10% のフラー土を加へ處理せること凡て前述の如し、かくて得たる液 2cc を試験管培養液に加へて檢したるに、その實驗成績は次の如し。而して火落菌及び酵母菌の培養は前實驗と同様にして行ふ。

Bios fraction A 及び B の酸、アルカリ及びフラー土  
處理による發育促進性の變化

培養温度 = 30°C

添 加 物 質 種 類	火 落 菌	酵 母 菌
米 胚 芽 水		
ビオス フラクシオン A		
酸 處 理	++	+++
ア ル カ リ 處 理	+±	+++
フ ラ ー 土 處 理	+±	+++
原 液	++	+++
ビオス フラクシオン B		
酸 處 理	+++	+
ア ル カ リ 處 理	++	+
フ ラ ー 土 處 理	++	+
原 液	+++±	+
酵 母 水		
ビオス フラクシオン A		
酸 處 理	++	+++
ア ル カ リ 處 理	+±	+++
フ ラ ー 土 處 理	+±	+++
原 液	++	+++
ビオス フラクシオン B		
酸 處 理	+++	+
ア ル カ リ 處 理	++	+
フ ラ ー 土 處 理	++	+
原 液	+++	+
加 水 (對 照)	+±	•+

以上の實驗結果を通覽するに火落菌の發育促進性物質は Bios fraction を用ひたる場合にもアルカリ及びフラー土に處理せるものは著しく發育増殖性が鈍りたり、されど酵母菌に對してはかゝる關係を認めず、而して又火落菌に對しては fraction B が有効なるに拘らず酵母菌には fraction A の方が作用著しき事は前述せるが如し。

#### 4. 摘 要

本實驗結果を摘録すれば次の如し。

1. Kinnerslay and Peters 法による Vitamin B<sub>1</sub> concentrate 及び Sherman and Axtmayer 法による Vitamin B<sub>2</sub> concentrate 中には火落菌及び酵母菌の發育促進性物質を含有す。
2. 是等の Vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> concentrate を酸、アルカリ及びフラー土に處理せしに火落菌に對してはアルカリ及びフラー土に處理せる場合に發育促進性を失ふも、酸處理液には變化なし而して酵母菌に對しては是等のいづれにも變化せらるゝ事を認めず。
3. 火落菌及び酵母菌の發育促進性に就て Bios fraction との關係を見んが爲に Narayanan fraction 法を應用することにしたれども、余の前實驗に於て火落菌の發育促進性物質が硝酸銀バリタに沈澱することよりして、Narayanan 法による硝酸銀バリタに沈澱せざる部分を fraction A とし、之に沈澱する部分を fraction B として試験せしに、火落菌の發育促進性物質は fraction B の方に、酵母菌の夫れは fraction A の方に移ることを確かめたり。
4. Bios fraction A 及び B を各々酸、アルカリ及びフラー土に處理せる結果は Vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> の concentrate に於ける場合の如く、火落菌の發育促進性物質はアルカリ及びフラー土に處理することによりて該作用を損すれども、酵母菌に對してはかゝる變化を見ず。
5. 本研究結果に見る如く火落菌の發育促進性物質と酵母菌の發育促進性物質 Bios とは明らかにその性質を異にするものなり、而して前者の性質は寧ろ細谷、黒星<sup>(28)</sup>兩氏の研究せられたる溶血性連鎖球菌の發育要素の性質と一致する處多し。

本實驗に關し鈴木恒也氏より受けたる御好意に謝意を表し、又松本正三君の助力を謝す。

(大阪帝大工學部醸造學教室)

#### ● 考 文 献

- 1) Cole, W. & Lloyd, D. J., J. Path. Bact., 2, 267 (1916-17)
- 2) Shearer, C., Lancet, I, 59 (1917)
- 3) Shearer, C., Lancet, II, 714 (1917)

- 4) Kligler, I. J., *J. Exp. Med.*, **30**, 31 (1919)
- 5) Davis, D. J., *J. Infect. Dis.*, **21**, 392 (1917)
- 6) Davis, D. J., *J. Infect. Dis.*, **23**, 248 (1918)
- 7) Davis, D. J., *J. Am. Med. Assoc.*, **77**, 683 (1921)
- 8) Agulhon, H. & Legroux, R., *Comp. Rend.*, **167**, 597 (1918)
- 9) Leichtentritt, B. & Zielaskowski, M., *Biochem. Z.*, **131**, 499 u. 513, (1922)
- 10) M'Leod & Wyon, G. A., *J. Path. Bact.*, **24**, 205 (1921)
- 11) Wyon, G. A., *J. Path. Bact.*, **26**, VI (1923)
- 12) 大谷義夫: 本誌 **11**, 15 昭和8. (1933)
- 13) 大谷義夫: 本誌 **11**, 274 昭和8. (1933)
- 14) Williams, R. J., *J. Biol. Chem.*, **38**, 465 (1919)
- 15) Bachmann, F. M., *J. Biol. Chem.*, **39**, 235 (1919)
- 16) Swoboda, F. K., *J. Biol. Chem.*, **44**, 531 (1920)
- 17) 三尾常次郎: 日新醫學 **12**. 1255 大正12. (1923)
- 18) Abderhalden, E. & Schauman, H., *Fermentforschung*, **2**, 120 (1920)
- 19) Ide, M., *J. Biol. Chem.*, **46**, 521 (1921)
- 20) Emmett, A. D. & Stockholm, M., *J. Biol. Chem.*, **43**, 278 (1920)
- 21) Funk, C. & Dubin, H. E., *J. Biol. Chem.*, **44**, 487 (1920) *ibid.* **48**, 437 (1921)
- 22) Fulmer, F. I., Nelson, V. F. & Sherwood, F. F., *J. Am. Med. Soc.*, **43**, 186 (1921), *ibid.*, **43**, 191 (1921)
- 23) Flemming, W. D., *J. Biol. Chem.*, **49**, 119 (1921)
- 24) 衣笠豊、服部安藏: 薬学雑誌 **487**, 579. 大正11. (1922)
- 25) 安藤啓三郎: 実験医学雑誌 **8**. 19. 大正13. (1924)
- 26) 戸出: 日本医学 **13**. V. 大正13. (1924)
- 27) 細谷省吾、黒屋政彦: 実験医学雑誌 **8**. 905, 大正13. (1924)
- 28) 山本頼三: 日本農藝化学会誌 **1**. 1051, 大正14. (1925)
- 29) Kinnerslay, H. W. & Peters, R. A., *Biochem. J.*, **21**, 777 (1927)
- 30) Sherman, H. C. & Axtmayer, J. H., *J. Biol. Chem.*, **75**, 207 (1927)
- 31) 鈴木恒也: 本誌 **11**. 44, 昭和8. (1933)
- 32) Narayanan, B. T., *Biochem. J.*, **24**, 6 (1930)