

魚類の腸内細菌によるビタミンB群の消長—II.

コイの腸内細菌によるチアミンおよび
リボフラビンの消長*

柏田 研 一・手 島 新 一**

Studies on the Production of B Vitamins by Intestinal Bacteria of Fish—II.

Vicissitudes of Thiamine and Riboflavin by Intestinal Bacteria
of Carp (*Cyprinus carpio* LINNE)

Ken-ichi KASHIWADA and Shin-ichi TESHIMA**

Abstract

This paper is in the series of our study on vitamin vicissitude by the intestinal bacteria of fish. In the mixed culture of intestinal bacteria of the carp, the existence of certain degree of vicissitude in thiamine and riboflavin contents was observed, which may be attributed to the bacterial activity.

Some decrease of riboflavin content in the medium, however, is to be occasioned by the change of conditions, and, in the ordinary states, quite a small amount of riboflavin is expected to be supplied by the activity of the bacteria. Hence the supposed necessity to supplement thiamine and riboflavin, especially the latter, to the carp food.

The vicissitude of thiamine and riboflavin is to be affected by pH value in the medium but the affection pattern is different in the two vitamins.

魚類のビタミン栄養に対して関心が持たれるようになったのは比較的近年のことで、すでにいくつかの研究報告^{1)~6)}も出ているが、ビタミン自給に関連があると考えられる腸内細菌によるビタミンの生産については、これまでは主として人間や、他の哺乳動物を対象として研究され、魚類に関しては全く未知と言っても差支えない現状である。そこで筆者らはこの問題についての研究を始めた次第で、第1報⁷⁾ではコイの腸内細菌についてパントテン酸、ニコチン酸およびビタミンB₁₂の消長を研究した結果を報告したが、引き続きチアミンとリボフラビンにつき、前回と同様、コイの腸内細菌を混合培養した場合におけるこれらのビタミンの消長を調べ、若干の知見を得たのでその結果を報告する。

実 験 方 法

1. 腸内細菌の培養

供試魚としては前報と同様コイ (*Cyprinus carpio* LINNE) を用い、無菌的に腸内容物を取り出し、培地、温度、pHなどを異にした条件で腸内細菌の静置混合培養を行ない、所定時間毎

* この報告の要旨は昭和41年11月18日、日本水産学会九州支部大会で発表した。

** 鹿児島大学水産学部水産化学研究室 (Laboratory of Fisheries Chemistry, Faculty of Fisheries, Kagoshima University)

に菌体を含むまま培地中のビタミンを定量してその消長を調べた。用いた培地は4種で、その組成を Table 1 に示した。

Table 1. Composition of the medium for the culture of intestinal bacteria.

| Ingredients | Medium | | | |
|-----------------------------------|-------------------|------------------|----------------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Beef extract | 10.0 ^g | 4.0 ^g | — ^g | — ^g |
| Peptone | 10.0 | 10.0 | — | — |
| Acid hydrolyzed casein | — | — | 5.0 | — |
| L-Cystine | — | — | 0.1 | — |
| DL-Tryptophan | — | — | 0.1 | — |
| Asparagine | — | — | — | 10.0 |
| Malic acid | — | — | — | 0.7 |
| Yeast extract | — | — | 5.0 | — |
| Na-acetate | — | — | 10.0 | — |
| Na-phosphate, dibasic | — | — | — | 2.0 |
| Na-carbonate | — | — | — | 2.5 |
| K-phosphate, monobasic | — | — | 0.5 | — |
| " , dibasic | — | — | 0.5 | — |
| Na-chloride | 5.0 | — | 0.01 | — |
| Mg-sulfate·7H ₂ O | — | — | 0.2 | 0.4 |
| Ferrous sulfate·7H ₂ O | — | 0.2 | 0.01 | — |
| Mn-sulfate·4H ₂ O | — | — | 0.01 | — |
| Na-sulfate, anhydrous | — | 0.2 | — | — |
| Na-hydrosulfite | — | 0.08 | — | — |
| Ca-carbonate | — | — | — | 0.01 |
| Glucose | — | 10.0 | 10.0 | 20.0 |
| Lactose | — | 1.0 | — | — |
| Distilled water | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| pH | 6.8 | 6.8 | 6.8 | 6.8 |

2. ビタミンの定量

ビタミンの定量はバイオアッセイ法によって行ない、ビタミン含量は前報の方法に準じ assay tube 当りの含量で表わした。

チアミンの定量：菌体を含む培地 5ml に濃塩酸 1 滴を加え蒸気浴上に 10 分間加熱し、約 40°C に冷却した後、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 5ml と、パパインおよびタカジアスターゼ各 100 mg を加え、37°C の孵卵器中に約 20 時間放置後濾過し、濾液を pH 6.8 に補正して定量用試料とした。菌株としては *L. fermenti* ATCC 36、基礎培地は DIFCO 製培地を用いて比濁法によって測定した。

リボフラビンの定量：前記と同様の培地 5ml に 0.1 N-塩酸 10ml を加え、15lb に 20 分間加圧加熱分解後 pH 4.5 に調整して濾過し、濾液の pH を 6.8 に補正して定量用試料とし

た。菌株としては *L. casei*, 基礎培地は前と同様 DIFCO 製培地を用い, 比濁法によって測定した。

結果および考察

1. チアミンの消長

培地 1, 2, 3, 4 (pH 6.8) で腸内細菌を混合培養した場合におけるチアミンの消長を Fig. 1 に示した。なお培養は 15°, 25°, 37°C の3段階で行なった。

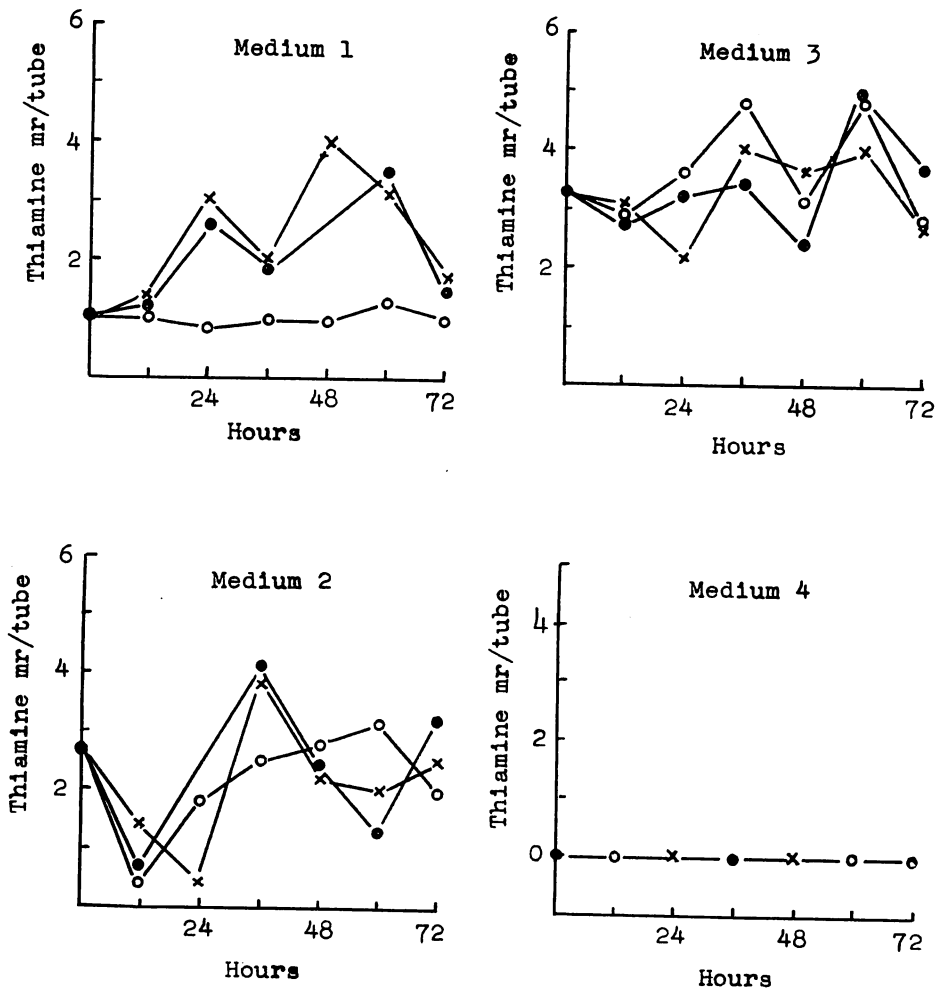


Fig. 1. Change of thiamine content in medium 1, 2, 3 and 4 by intestinal bacteria.
Incubation temperature: ○...15°C, ●...25°C, ×...37°C

培地 1 (ブイヨン培地) においてはチアミンにかなりの消長が見られ, 培養開始後 24 時間まで増加したチアミンは 36 時間後には減少し, その後培養時間の経過と共に増減が繰返される。このような経過は前の実験で見られたパントテン酸, ニコチン酸, ビタミン B₁₂ のそれ

と同様である。その変動の幅は比較的高温 (25° および 37°C) で培養した場合が大きく、15°C 培養の場合には極めて小さい。培地 2 と 3 においては、培地 1 の場合とはかなり異なった消長を示し、培養開始後 12 ないし 24 時間の間はチアミンは減少し、それ以後になって始めて増加が見られる。その変動の幅は培地 2 において大きく、培地 3 ではそれほど大きくない。培地 4 においてはチアミン量は終始全く変化が見られず、前報のニコチン酸、ビタミン B₁₂ の場合とは非常に異なっている。このようにチアミン量が増減し、あるいは増減を繰返すということは、コイの腸内にチアミン合成菌、分解菌の両者が存在することを示しているものと一応解される。しかも培地 4 で全く消長の見られなかったことから考えて、チアミンの合成、分解に関与する菌は autotrophic な菌ではなく heterotrophic な菌であろうと思われる。又、培地 1 においては当初から増加が見られたのに、この培地に糖を添加した培地 2 では当初逆に減少を示したことから見ると、コイの腸内細菌はチアミンの消長に対しては、かなり複雑な動きをし、培地の組成がその消長に影響を及ぼすことがわかる。

次にブイオン培地を用い、培地の pH がチアミンの消長に及ぼす影響を実験した結果を Fig. 2 に示した。

図によって培地の pH はチアミンの消長にかなりの影響を与えることがわかる。すなわち pH 6.0 においては、pH 6.8 の培地に見られた増加減少を繰り返すという経過は辿らず、僅かではあるが漸増の傾向を示す。pH 8.0 においてはチアミンの増加が著しく、合成菌の働きが活発になることが窺われる。

以上の実験によってわかるように、コイの腸内細菌によるチアミンの消長は培地の組成および pH が大きく影響し、又温度の影響も見逃せない。したがってコ

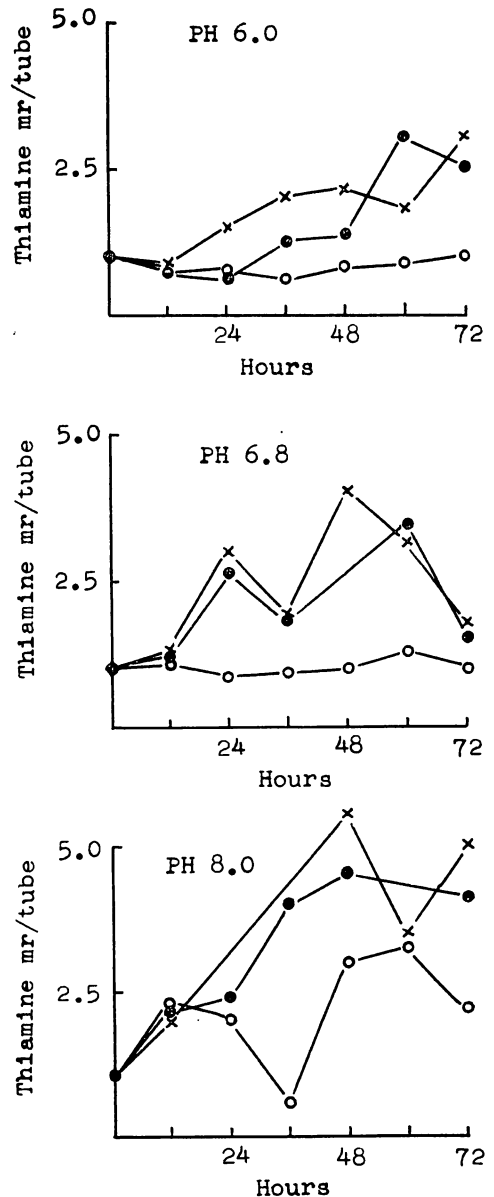


Fig. 2. Effect of pH on the change of thiamine content in bouillon by intestinal bacteria. Incubation temperature: ○...15°C, ●...25°C, ×...37°C

イの腸内ではチアミンはかなり顕著に合成される場合がある反面、条件如何では逆に分解される場合のあることも想像されるので、後者の環境におかれる場合が多いとすれば、チアミンの補足給与の必要性も生ずるものと思われる。

2. リボフラビンの消長

培地組成を異にした場合のリボフラビンの消長を実験した結果を Fig. 3 に、又ブイオン培地を用い、pH の影響を実験した結果を Fig. 4 に示した。

培地 1 を用いて腸内菌を混合培養した場合は、初めの24時間までは変化が見られないが、その後、他のビタミンで見られたと同様の増加減少を繰り返し、リボフラビンについてもコイの腸内に合成菌、分解菌両者の存在が推定される。しかし腸内に比較的近いと思われる培地 2 と 3 においては、あまり大きなリボフラビンの増減が見られず、又培地 4 においては、チアミンの場合と同様全く変化が見られない。次に Fig. 4 に示されているように、培地の pH が変わるとリボフラビンの消長にかなり明瞭な影響が現われ、酸性側 (pH 6.0) およびアルカリ性側 (pH 8.0) では中性 (pH 6.8) の場合に比べて、リボフラビン増減の幅が狭

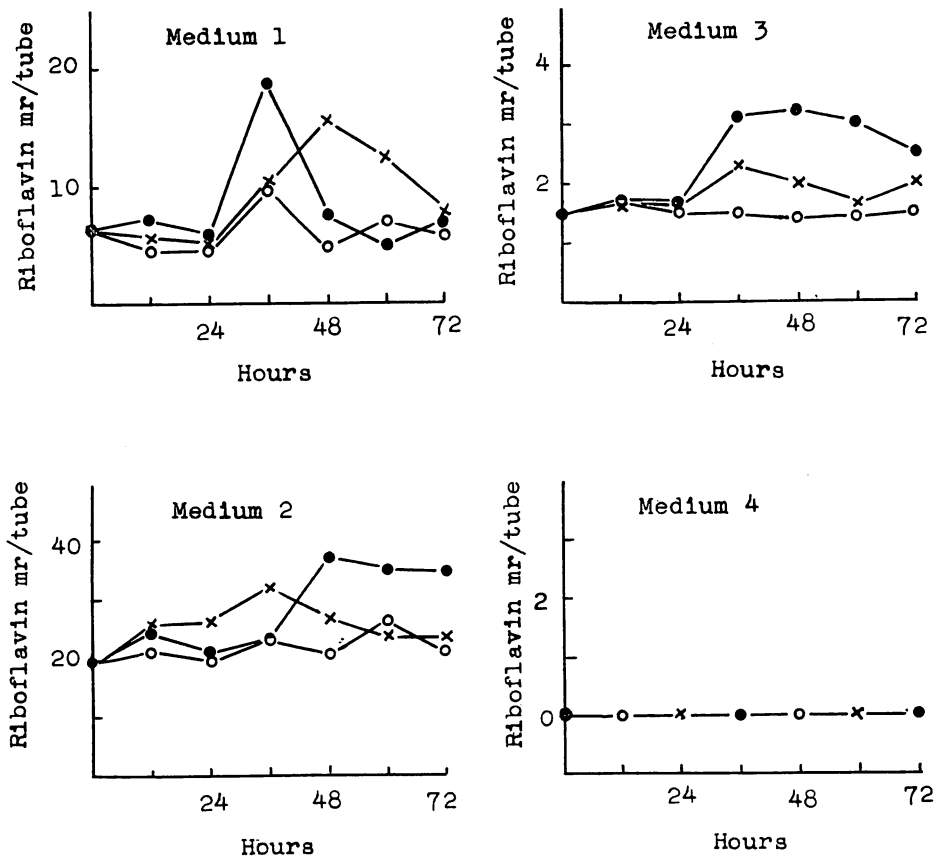


Fig. 3. Change of riboflavin content in medium 1, 2, 3 and 4 by intestinal bacteria.
 Incubation temperature: ○...15°C, ●...25°C, ×...37°C

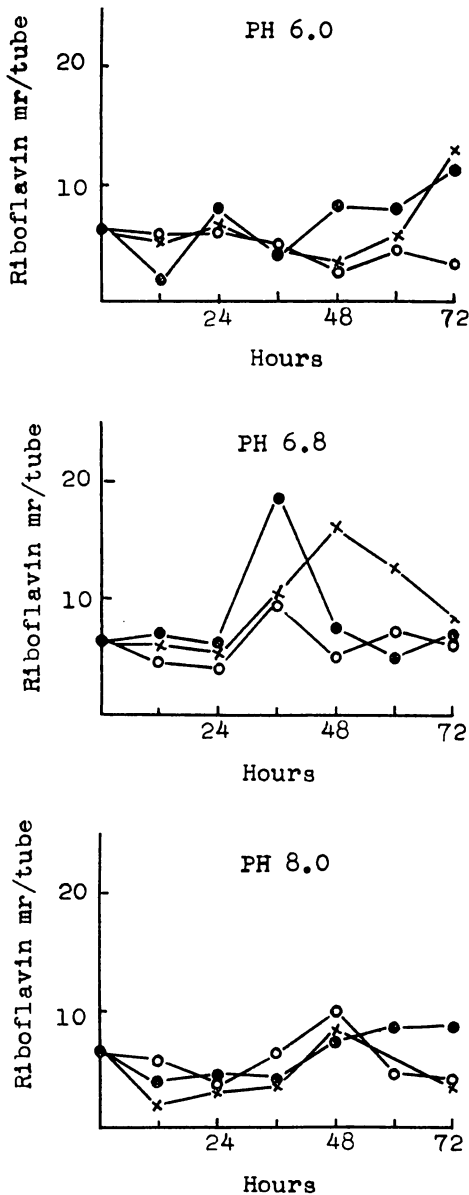


Fig. 4. Effect of pH on the change of riboflavin content in bouillon by intestinal bacteria.

Incubation temperature :

○...15°C, ●...25°C, ×...37°C

く、かつ変動の周期もいくらか長くなるようである。なおリポフラビンの場合は培養温度の影響はあまり鋭くは現われていない。

以上の実験結果から判断すると、コイの腸内でリポフラビンが合成されるのはかなり限定された条件の場合のみで、多くの場合、腸内におけるリポフラビンは合成と分解が寧ろ均衡のとれた状態にあって、腸内細菌によるリポフラビンの自給ということはあまり考えられないのではあるまいか。したがってコイがリポフラビンを要求するとすれば、コイ用の人工餌料にはリポフラビンを補足する必要があるように考えられる。

摘 要

前報に引き続き、コイの腸内細菌を組成を異にする4種の培地で、15°、25°、37°Cに静置混合培養した場合におけるチアミンとリポフラミンの消長を検討し、次の結果を得た。

1. コイの腸内にはチアミンおよびリポフラビン合成菌、分解菌両者の存在が推定される。

2. チアミンはコイの腸内では合成される場合もあり得るが、条件次第では分解が優勢になって失われる場合のあることも想定されるので、これを補足給与する必要も生ずるものと思われる。

3. リポフラビンは腸内細菌による自給ということはあまり期待できず、したがって餌料中にこれを含ませる必要があるように考えられる。

4. チアミン、リポフラビンともにその消長は培地のpHによる影響を受けるが、その模様は両ビタミンで必ずしも等

しくない。

終りに終始本実験に協力された福永洋子、佐藤親志の両氏に深謝する。なお本研究は昭和

40年度文部省科学研究費の援助によったことを付記し、併せて謝意を表する。

文 献

- 1) McLAREN, B. A et al. (1947) : *Arch. Biochem.*, **15**, 169.
- 2) HALVER, J. E. and COATES, J. A. (1957) : *Prog. Fish-Cult.*, **19**, 112.
- 3) HALVER, J. E. (1957) : *J. Nutrition.*, **62**, 225.
- 4) COATES, J. A. and HALVER, J. E. (1958) : *Spe. Sci. Rep. Fish.*, **281**.
- 5) ALLISON, L. N. (1960) : *Prog. Fish-Cult.*, **22**, 114.
- 6) CORSON, B. W. and BREZOSKY, P. E. (1961) : *ibid.*, **23**, 175.
- 7) 柏田研一・手島新一 (1966) : 日水誌, 投稿中