

## カツオ幽門垂のビタミンB群に関する研究—III

ビタミン B<sub>6</sub> について

柿 本 大 吉

Studies on B-Vitamins of Pyloric Coeca of Skipjack  
(*Katsuwonus vagans*)—III  
on Vitamin B<sub>6</sub>

Daiichi KAKIMOTO

## Abstract

1. Content of vitamin B<sub>6</sub> in the pyloric coeca of skipjack was studied by bioassay. *L. casei* and *S. faecalis* were used for the determination of pyridoxal and pyridoxamine respectively.

2. Basal medium of the bioassay contains vitamin-free casein hydrolysate. The latter was prepared from commercial casein hydrolysate by a newly-devised method, that is, by oxidation of the hydrolysate with KClO<sub>3</sub>. The vitamins which are contained in the commercial casein hydrolysate are completely broken down by oxidation with KClO<sub>3</sub>, although certain kinds of amino acids are also decomposed (Table 4). A perfect basal medium can be prepared by supplement of the decomposed amino acids to the medium with oxidized casein hydrolysate (Table 4).

3. Pyridoxal and pyridoxamine content in the pyloric coeca is 1.35 and 0.88  $\gamma$  per one gram of dry matter respectively. Presence of pyridoxine was not detected (Table 7). The determination was made on fresh material.

4. A piece of proposed evidence shows that pyridoxal in the pyloric coeca is transformed partly into pyridoxamine when the dissected-out organ has been stored at -4°C for one month (Table 6).

前報<sup>1,2)</sup>に引続きカツオ幽門垂に含まれているビタミン含量を明らかにすのためB<sub>6</sub>の定量を行つた。又B<sub>6</sub>の定量に関しては従来の方法を一部変えて定量を容易にした。多くのBビタミンと同様B<sub>6</sub>の定量はBioassayによるのが普通である。ピリドキサル、ピリドキサミン、ピリドキシンの如く構造類似化合物の総和を定量するAtkinら<sup>3)</sup>の方法や、各個のB<sub>6</sub>を2種類以上の異なつた菌によつて定量する別な方法もある。例えばピリドキサミンは*S. faecalis*によつて定量されるが、この菌はピリドキサルとピリドキサミンに対し同等のresponseを示すことが知られているので、ピリドキサミンを定量するには同一試料でピリドキサルを*L. casei*によつて定量し、前記*S. faecalis*の定量値からこの値を引き去つて算出する。又ピリドキシンは*Neurospora sitophyla*によつて単独に定量し得るが、この方法は菌体重量を一々天秤によつて正確に秤らねばならないので繁雑であり、更に培養時間も他の方法よりも長いので不便である。著者は同一試料を*Saccharomyces carlsbergensis*によつてB<sub>6</sub>の総和を測り、*S. faecalis*によるピリドキサル、ピリドキサミン量を引き去つてピリドキシンを定量した。B<sub>6</sub>の定量に用いる基礎培地中、アミノ酸類にはB<sub>6</sub>不含カゼイン水解物を使用することになっているが、我国では目下のところこれに適した商品が見当たらないので、市販カゼインからB<sub>6</sub>を除去して用いなければならない。著者は定量に先だちB<sub>6</sub>不含カゼイン水解物の調製について研究し、併せて幽門垂中のB<sub>6</sub>含

量を定量した。

## 実験及び結果

### 1. ビリドキサル

ビリドキサルは *L. casei* により Rabinowitz, Snell<sup>4)</sup> らの方法で定量した。

i) ビリドキサル不含カゼイン水解物の調製：ビリドキサルの定量に用いるカゼイン水解物は酸加水分解液とトリプシン消化により分解したものを等量混合して調製する。この両混合液から B<sub>6</sub> を除去するにはフラー土、或いは Darco-G 60 等の吸着剤によるのが普通である。著者はこれらの吸着によらず、わが国で容易に入手し得る酸性白土を用いて吸着除去することに成功した。カゼイン水解物は次のような方法で作った、すなわち市販カゼインを 20% の塩酸で 16~20 時間煮沸分解し、減圧下で蒸発を繰返し大部分の塩酸を除去する。水解物中他の一つであるトリプシン消化液は同じカゼイン 1 g に N/10 苛性ソーダ 20 cc を加え湯煎上で溶解してから 15 ポンド 30 分間加圧加熱し、冷却後希塩酸で pH を 8.2 とし、これにパンクレアチン 1 g を加えトルオールで防腐しつつ 37°C, 24 時間消化して作った。なお消化液中には菌の発育に影響を与える脂肪類もあるので消化後 30 分間煮沸し酵素作用を止めた後 pH を 4.0 に調整し、エーテル、トルオール (10:3) を加えて充分振盪し約 3 時間後に分液漏斗で溶媒を除去し、水解液中に残存する溶媒をも除去して作った。両カゼイン水解液を等量混和したものは、その中からビリドキサルを酸性白土によつて除去してから基礎培地に使用した。

ii) 酸性白土の活性化：市販の酸性白土をそのまま使用するとビリドキサルの除去は不完全であり基礎培地としては使用出来ないので、次に述べる処理法で活性度を高めて使用した。

A. 酸性白土を坩堝中で還元焰により約 3 時間焼いた。

B. 酸性白土を蒸留水で充分洗滌してから A と同様にして焼いた。

C. 酸性白土 30 g を 2% の酢酸 100 cc. に浸漬し、約 1 時間振盪後濾過し、蒸留水で充分洗滌してから 150°C の空気浴中で 4~6 時間乾燥し粉末にした。

iii) カゼイン水解物からビリドキサルの除去：前記 3 種類の処理法で得た酸性白土 15 g はカゼイン水解物（カゼイン 1 g に相当する溶液）の pH を 1.0 に調整したものに加え、約 3 時間振盪した後濾過し、使用した酸性白土は充分水洗して濾液と合せる。次にこの溶液の pH を 6.8 に調整し全容を 50 cc にする。以上の如くして得たカゼイン水解物中にビリドキサルが残存するか否かを確かめるため、カゼイン水解物を含まぬ Rabinowitz らの培地と合せ全容を 100 cc となし、この溶液を試験液に *L. casei* による Bioassay を行つた。なお比較検討するために 10 mr のビリドキサルを加えたものも使用した。培養条件は 30°C, 24 時間で、測定は濁度法によつた。Table 1 はその結果である。すなわちカゼイン水解物中のビリドキサルの除去は前記何れの方法でも良いが、このうち還元焰で焼いた酸性白土を用いた場合が 120°C で乾燥したものに比較し良好であることは、10 mr のビリドキサルを補足した培地に於ける菌の繁殖の度合からみて明らかである。以上の如くカゼイン水解物からビリドキサルを除去するには、操作も簡単な還元焰で 3 時間焼いた酸性白土によるのが望ましい。なおこの他酸性白土の使用法、吸着時の pH 条件等も吟味したが、前記の如くカゼイン 1 g 相当の水解物に 15 g, pH は 1.0 が最も良好な結果を示した、次に若しビリドキサルを除去する際にカゼイン水解物中のアミノ酸類が同時



Table 1. The responses of *L. casei* to pyridoxal which may be contained in casein hydrolysate treated with Japanese acid clay.

Type of treatment of Japanese acid clay before addition to casein hydrolysate	The responses of <i>L. casei</i> to pyridoxal in casein hydrolysate	
	Turbidometric measurement (T%)	
	With 10 m $\gamma$ of pyridoxal	Without pyridoxal
Burned with reducing flame for 3 hrs	45	96
After treatment with 2% acetic acid, the acid clay was dried for 4 hrs. at 120°C	68	97
After washing with distilled water, the acid clay was burned with reducing flame for 3 hrs	43	96
Control. Not-treated casein hydrolysate	21	25

Table 2. Adsorption of pyridoxal, but not of amino acids, in casein hydrolysate by Japanese acid clay treatment

Types of basal medium			Responses of <i>L. casei</i>	
			Turbidometric measurement (T%)	
			With 10 m $\gamma$ of pyridoxal	Without pyridoxal
Basal medium, not supplemented			42	96
Basal medium + L. Aspartic acid	0.5 mg		43	96
" + L. Glutamic acid	0.5 mg		42	97
" + DL. Methionine	0.5 mg		42	96
" + DL. Phenyl alanine	0.5 mg		42	96
" + L. Tyrosine	0.5 mg		41	95
" + L. Histidine	0.5 mg		42	96
" + L. Leucine	0.5 mg		42	96
" + DL. Isoleucine	0.5 mg		42	95
" + L. Arginine	0.5 mg		42	97
" + Serine	0.5 mg		42	96
" + DL. Valine	0.5 mg		41	96
" + all Above amino acids			42	96

に失われることがあるとすれば、基礎培地としては不完全になる。依つて *L. casei* に不可欠のアミノ酸を補足し、菌の発育に対するアミノ酸の影響をしらべた。Table 2 はその結果である。これをみると著者の考案した酸性白土法はアミノ酸を補足する必要がなく、従来使用したフラー土と同様に使用出来ることを知つた。

iv) 標準曲線の作成：前項の実験結果に従いピリドキサル不含カゼイン水解物を調製し基礎培地に加えた。基礎培地組成は Rabinowitz らのものをを用い標準曲線はピリドキサルを 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 m $\gamma$  加えた培地によつて作成した。Fig. 1 の標準曲線は *L. casei* の 30°C, 24 時間培養の結果で示したものである。

v) 試料の調製：天然物中のピリドキサ

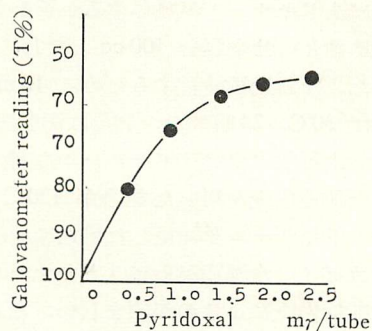


Fig. 1. Response of *L. casei* to pyridoxal. *L. casei* was incubated at 30°C for 24 hrs.

ールは全てが遊離型とは限らないので 定量にあたって、酸又はアルカリにより結合型は全て遊離型にして定量した。すなわち幽門垂 5 g に塩酸を加え pH を 1.8 にした後全容を約 180 cc とし、20 ポンドで 5 時間加圧加熱してから 蒸溜水を加えて 500 cc に稀釈して定量を行つた。又遊離法の別法として同一試料に 1 N 苛性ソーダ 10 cc を加え、前と同様加圧加熱し塩酸で中和後 500 cc に稀釈したものについても測定した。Table 3 はその結果を示したものである。表で示したように試料の前処理によつて幾分定量値に相違があり、酸処理法が高い値を示したが、回収率からみて酸処理法が信頼のおける結果である。すなわちカツオ幽門垂中のピリドキサル含量は乾物 1 g 中約 1250 mr であつた。

Table 3. Pyridoxal content in the pyloric coeca of skipjack.

Acid-treated sample				
Concentration of sample	Content in a tube (mr)	Content in one gram of fresh matter (mr)	Content in one gram of dry matter (mr)	Recovery (%)
1/500	0.41	205	1025	92
Alkali-treated sample				
1/500	0.50	250	1250	98

## 2. ビリドキサミン

ビリドキサミンもビリドキサルと同様に Rabinowitz, Snell らの方法が広く用いられている。氏らによると菌は *S. faecalis* であり、この菌はビリドキサミンとビリドキサルに対し同等の response を示すので、ビリドキサミンのみを定量するにはあらかじめビリドキサールの含有量を *L. casei* で測定しておき、*S. faecalis* による値からこれを引き去る方法による。*S. faecalis* によるビリドキサル、ビリドキサミンの総和を測定するにあたり、ビリドキサールの場合と同様に基礎培地に用いるカゼイン水解物からビリドキサミン並にビリドキサルを除去しなければならない。このことにつき諸種の 実験を繰返えしたが、カゼイン水解物を塩素酸カリで酸化する方法を考案したので、その成績を述べる。

i) ビリドキサミン不含カゼイン水解物の調製：カゼイン分解物はビリドキサールの項で述べたと同様にして作り、その pH を 3.5 に調整した。次にカゼイン 1 g に相当する水解物に塩素酸カリ 0.05 g を加え、酸化に要する時間を決めるため各々 20, 30, 60 及び 120 分煮沸分解し、各分解時間の異なる試料につきビリドキサミンが除去されたか否かを試験した。試験法はビリドキサールの場合と同じように酸化を行つたカゼイン水解物とそれを含まない Rabinowitz らの培地を合せ、これに *S. faecalis* を移植し、30°C, 72 時間培養、菌が生産する酸をアルカリで滴定しその量によつてカゼイン水解物中に残存するビリドキサミンの量とした。然しながら塩素酸カリによる酸化が若し水解物中のアミノ酸を同時に酸化し、*S. faecalis* に不可欠のアミノ酸を失うとすれば、カゼイン水解物中にビリドキサミンが残つていても菌は繁殖出来ないので、各培地にアミノ酸を補足しビリドキサミンが酸化で失われることを確かめると同時に、アミノ酸類の帰趨をしらべた。Table 4 は実験結果である。この実験によるとビリドキサミンの酸化時間は 60 分で完全に行われるが、これと同時にチロジン、メチオニン、ロイシン以上 3 種類のアミノ酸も失われる。従



Table 4. Responses of *S. faecalis* to pyridoxamine and amino acids, in case of supplying the amino acids to the casein hydrolysate oxidized with  $\text{KClO}_3$ .

Supplemented amino acids, mg per tube (final volumes are 2 cc.)	Supplemented pyridoxamine m $\gamma$ per tube	Responses of <i>S. faecalis</i> N/20 NaOH (cc.)				
		0 *	I *	II *	III *	IV *
None supplied	10	2.4	2.0	0.4	0.2	0.2
	0	2.0	1.8	0.4	0.2	0.2
L. Arginine 0.5	10	2.3	2.0	0.4	0.2	0.2
	0	2.0	1.7	0.4	0.2	0.2
DL. Leucine 0.5	10	2.4	2.1	0.6	0.6	0.3
	0	1.9	1.7	0.4	0.2	0.2
DL. Isoleucine 0.5	10	2.4	1.9	0.4	0.2	0.2
	0	2.0	1.7	0.4	0.2	0.2
L. Glutamic acid 0.5	10	2.3	1.9	0.4	0.2	0.2
	0	1.9	1.8	0.3	0.2	0.2
L. Histidine 0.5	10	2.4	1.9	0.4	0.2	0.2
	0	2.0	1.7	0.4	0.2	0.2
L. Lysine 0.5	10	2.4	2.0	0.3	0.2	0.2
	0	1.9	1.8	0.4	0.2	0.2
DL. Methionine 0.5	10	2.3	2.2	0.8	0.7	0.4
	0	1.8	1.7	0.4	0.2	0.2
DL. Threonine 0.5	10	2.4	2.0	0.4	0.2	0.2
	0	2.0	1.8	0.4	0.2	0.2
L. Tyrosine 0.5	10	2.3	2.3	0.9	0.9	0.5
	0	1.9	1.7	0.4	0.2	0.2
DL. Valine 0.5	10	2.5	2.0	0.4	0.2	0.2
	0	2.0	1.8	0.4	0.2	0.2
L. Tyrosine } each DL. Methionine } 0.5 DL. Leucine }	10	2.4	2.3	2.0	2.0	1.8
	0	2.0	1.8	0.5	0.2	0.2
Above noted } each all amino acids }	10	2.5	2.4	2.0	2.0	2.0
	0	2.0	2.0	0.5	0.2	0.2

\* Casein hydrolysates was oxidized by following methods

0 : Not-treated with  $\text{KClO}_3$ , I : Treated with  $\text{KClO}_3$  at pH 3.5 for 20 mins,II : Treated with  $\text{KClO}_3$  at pH 3.5 for 30 mins, III : Treated with  $\text{KClO}_3$  atpH 3.5 for 60 mins, IV : Treated with  $\text{KClO}_3$  at pH 3.5 for 120 mins.

つてこのカゼイン水解物を基礎培地に使用するには上記3種類のアミノ酸を補足する必要がある。

ii) *S. faecalis* の発育に及ぼす  $\text{KCl}$  の影響：塩素酸カリを pH 3.5 で作用させるとカゼイン水解物中のピリドキサミンは酸化されるが、自らは  $\text{KCl}$  に変化する。従つてこの水解物を用いて基礎培地を作成すれば、培地中に  $\text{KCl}$  が含まれることになる。細菌類は塩類の或る濃度で発育が阻害されることが知られているので、この点も明らかにする必要がある。前述の如くカゼイン水解物を酸化するに要する  $\text{KClO}_3$  の量は 1 g 相当の水解物に 0.05 g であり、酸化後基礎培地を調製する場合 100 cc に稀釈されるので、仮りに  $\text{KClO}_3$  のままで計算しても基礎培地中では 0.05% に相当する。今 10 m $\gamma$  のピリドキサミンを含む培地に  $\text{KClO}_3$  を 0.01 から 2.0% になるように培地を作り、*S. faecalis* を植えてその繁殖をしらべてみたが、Table 5 に示す如く、0.7% 以下の濃度の場合には何らその影響を認めなかった。従つて著者がピリドキサミン酸化に用いた  $\text{KClO}_3$  の量はこの assay には阻害を及ぼさないと判断される。

Table 5. Inhibition by KCl of the growth of *S. faecalis*.

Amount of KCl added to basal medium containing 10 m $\gamma$ of pyridoxamine (%)	Growth of <i>S. faecalis</i> N/20 NaOH (cc.)
0	2.4
0.01	2.46
0.05	2.40
0.1	2.60
0.3	2.40
0.5	2.40
0.7	2.40
0.9	1.94
1.0	1.60
2.0	0.90

iii) 標準曲線の作成：標準曲線の作成にあたり接種菌の濃度及び培養温度とその時間を規制する必要がある。*S. faecalis* によるピリドキサミンの定量には通常 30°C, 20~24 時間が採用され、測定は濁度法による。著者が新に作成した基礎培地について 二三試験した結

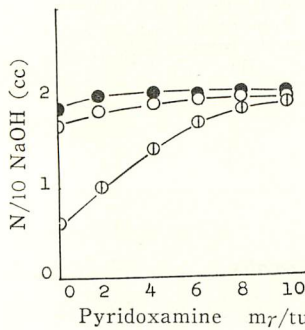


Fig. 2. Responses of *S. faecalis* to pyridoxamine.

Inoculum is not diluted.

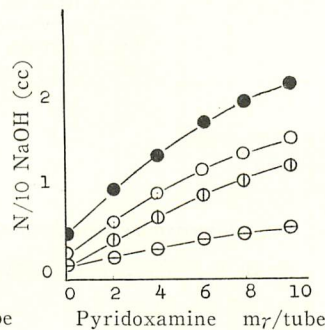


Fig. 3. Responses of *S. faecalis* to pyridoxamine.

Inoculum is diluted 50 times.

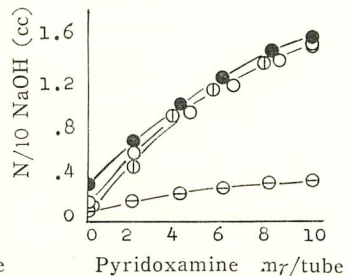


Fig. 4. Responses of *S. faecalis* to pyridoxamine.

Inoculum is diluted 100 times.

- Growth of *S. faecalis* incubated at 30°C for 72 hrs.
- Growth of *S. faecalis* incubated at 30°C for 48 hrs.
- ①— Growth of *S. faecalis* incubated at 30°C for 24 hrs.
- ⊖— Growth of *S. faecalis* incubated at 30°C for 18 hrs.

果では、濁度法による場合既往の条件と一致する他、30°C, 48 時間の培養法では酸度滴定でも定量出来ることを知った。又この場合の接種菌の濃度は 100 倍稀釈のものが適する (Fig. 2, 3, 4, 5 参照)。カゼイン水解物の塩素酸カリ処理法はピリドキサミンの定量のみならず、前述の *L. casei* によるピリドキサル及び *Sac. carlsbergensis* による全 B<sub>6</sub> 定量にも応用出来る。今その一例として *L. casei* によるピリドキサールの定量に於ける標準曲線を作る場合、酸

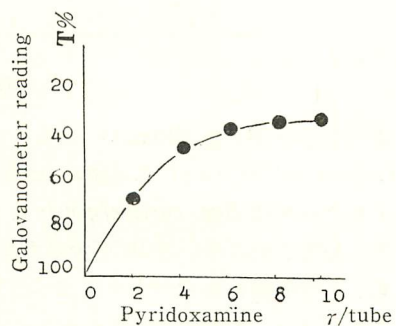


Fig. 5. Response of *S. faecalis* to pyridoxamine. Inoculum is diluted 100 times *S. faecalis* was incubated at 30°C for 18 hrs.



性白土処理のカゼイン水解物を使用した場合と比較した結果は Fig. 6 の通りであり、ほぼ同一の Response curve が得られることを知った。

iv) 幽門垂中のピリドキサミン含量：試料幽門垂は枕崎市に陸揚げされた新鮮なものを、この 1g に 0.055 N の塩酸 180 cc を加え、20 ポンド 5 時間加圧加熱して、試料中のピリドキサミンを遊離させた後、*S. faecalis* による定量を行った。Table 6 は幽門垂中のピリドキサミン量を示したものである。なおこの実験には特に新鮮な幽門垂を用いた以外に、これを  $-4^{\circ}\text{C}$  の冷蔵庫に 1 カ月間貯蔵し、それによつて幽門垂中の  $\text{B}_6$  が如何に変化するかを検べた。又蛋白質分解の要領で加水分解した幽門垂中の  $\text{B}_6$  についても試験した。その結果 1 カ月間貯蔵した場合にピリドキサールは減少するが、それとほぼ同量のピリドキサミンが増加している結果を得た。又酸加水分解によるとピリドキサールの一部はピリドキサミンに変化するが、この場合  $\text{B}_6$  量が分解前に比べ可成り減少することを確めた。

Table 6. Content of pyridoxamine in the pyloric coeca.

Samples	Content in one gram of dry matter			
	Apparent value by <i>S. faecalis</i>		Pyridoxal by <i>L. casei</i>	
	(A)	(r)	(B)	(r)
Fresh pyloric coeca	2.23		1.35	
Pyloric coeca stored at $-4^{\circ}\text{C}$ for one month	2.12		0.90	
Fresh pyloric coeca acid-hydrolyzed	1.86		0.84	
				Pyridoxamine (A)-(B) (r)
				0.88
				1.22
				1.02

v) ピリドキシン：ピリドキシンは *Neurospora sitophyla* によつて単独に定量されるが、著者は *Sac. carlsbergensis* により全  $\text{B}_6$  を定量し、前述の *S. faecalis* による値を引き去る方法により定量した。Table 7 はその結果を示したものであり、幽門垂中には殆んどピリドキシンが含まれていないことを知った。

Table 7. Pyridoxine content in the fresh pyloric coeca

Content in one gram of dry matter		
Total $\text{B}_6$ by <i>Sac. carlsbergensis</i>	Pyridoxal and pyridoxamine	Pyridoxine
(A) (r)	(B) (r)	(A)-(B) (r)
2.26	2.27	0

## 摘 要

幽門垂中の  $\text{B}_6$  を Bioassay で測定し次の結果を得た。

1. ピリドキサールは *L. casei*, ピリドキサミンは *S. faecalis* と *L. casei* の両菌により、ピリドキシンは *Sac. carlsbergensis* と *S. faecalis* 両菌により定量した。これらの定量にあたり、基礎培地に用いる  $\text{B}_6$  不含のカゼイン水解物を著者の創意により調製した。すなわちカゼイン水解物を塩素酸カリによつて酸化し、これに二三のアミノ酸を補足することにより定量し得ることを明らかにした。

2. 新鮮なるカツオ幽門垂中には乾物 1g 中、ピリドキサールが 1.35 r, ピリドキサミンが 0.88 r 含まれ、貯蔵中にピリドキサールの一部がピリドキサミンに変化することを知つ

た。又ピリドキシンはこの器官には含まれていない。

## 文 献

- 1) 柿本大壱・金沢昭夫：日水誌., **22**, 574~576 (1957).
- 2) 柿本大壱：同誌, **22**, 577~582 (1957).
- 3) Atkin, L., A. S. Schultz, W. L. Williams and C. N. Frey : *Ind. and Eng. Chem., Anal. Ed.*, **15**, 141~144 (1943).
- 4) Rabinowitz, J. C. and E. E. Snell : *J. Biol. Chem.*, **169**, 631~642 (1947).