

Bioassay による食品中の Vitamin B₆ の定量

高 橋 沢*
山 名 信 子*

緒 言

微生物栄養の研究により各種ビタミン B 群が、微生物にとつても必須生育因子であることが明らかにされてから、天然物中に微量に存するビタミンを定量するのに物理化学的定量法では困難な場合が多く、実用的な定量法として Microbioassay が採用されて来た。

B₆はその化学構造から Pyridoxine と呼ばれ研究の発展により B₆の多元性が見出され Pyridoxine 以外に Pyridoxal, 及び Pyridoxamine の存在が明らかになり、これら B₆の作用を有する化合物を総称して B₆群と呼んでいる。

B₆は紫外線に対して何れも不安定であるが、抽出操作はどの天然物にも適するという方法がないため、試料に応じて適当な方法をえらぶ必要がある。

本法の原理は、B₆の必須生育因子として要求する菌株 *Saccharomyces carlsbergensis* を使用した。*Saccharomyces carlsbergensis* は Pyridoxine, Pyridoxal, Pyridoxamin, のいずれの型にも同様に利用出来るので、これら三者を分別定量することも可能であるが、私達は総 Vitamin B₆の定量を行った。この B₆を全く含まない基礎培養基を作成し、これに標準ビタミン B₆及び定量しようとする試料をそれぞれ添加し、使用菌株を接種培養するとそのビタミンの添加量に応じて生育を示すことを利用して試料中のビタミン量を定量した。

Saccharomyces carlsbergensis による Vitamin B₆の定量は、福井、岸部、谷氏等¹⁾によつて B₆3型について分別定量されているが、動物組織や酵母中の B₆は大半が Pyridoxal と Pyridoxamine よりなるが一般の植物組織に於いては3型が共存しており、自然物中の B₆の型態は一定していないから食品中の B₆の定量等の栄養学的研究には全 B₆としての含量を知れば一応充分であると思う。

又高田、福井、岸部氏²⁾は醸酵製品中の B₆の定量について発表され酵母、糸状菌等が、発育中に相当多量の B₆を生産することを証明されており、Lieck, H, Söndergaard, H,³⁾はオランダの食品中のビタミン B₆

含量を定量し、一般に動物性食品に多く最も多かつたのは、牛肝臓の 1 mg %, 植物性食品では酵母の 1.1 mg %を最高とし、バナナの 0.5 mg %がこれにつき穀類の B₆は 0.1~0.3 mg %で製粉では減少し、パンの B₆は 0.1~0.2 mg %で蔬菜は水分が多い割合に B₆に富み、0.1 mg %前後であると発表している。

そこで私達は日常最も必要とされている食品の代表的なものを取り上げて、Vitamin B₆の定量を行った結果を報告する。

実 験 の 部

微生物定量法の準備及び操作

(1) 使用菌株並びに保存法

使用菌株 : *Saccharomyces carlsbergensis*
strain 4228 ATCC 9080

試験管*に斜面に凝固した滅菌麦芽寒天培地「ニッサン」に菌体を塗抹、32°C 24 時間斜面培養し冷所に貯え、2 週間以内に移植した。

* よく洗滌乾燥した試験管に綿栓をして、3 日間 120°C 1 時間乾熱滅菌したものを使用した。

(2) Vitamin B₆ 標準液の調整

25%アルコールでビタミン B₆結晶 100γ/cc 溶液を作成し、冷蔵庫に保存した。この原液を 5 mγ/cc に稀釈して分注に備えた。

(3) 基礎培地の調整

第 1 表 成 分 組 成

組 成	1 l 中の量	組 成	1 l 中の量
カザミノ酸「ニッサン」	8 g	塩化カルシウム	250mg
イノシトール	50mg	硫酸マグネシウム	250mg
ビ タ ミ ン B ₁	500γ	硫酸マンガン	5 mg
パントテン酸カルシウム	5 mg	リン酸カリウム	1.1g
ビ オ チ ン	16γ	塩 化 第 二 鉄	5 mg
ニコチン酸	5 mg	クエン酸カリウム	10g
塩化カリウム	850mg	ク エ ン 酸	2 g
ブ ド ウ 糖	100g		

*本学副手

Vitamin B₆ 定量用基礎培地「ニッサン」を使用した。その成分組成は第1表の如くである。

上記粉末基礎培地を本品1管(13.0g)に蒸留水を加え2~3分煮沸溶解後全量を100ccとする。

(4) 接種菌液の調整

定量に際し新たに麦芽寒天培地に32°C24時間培養した *Saccharomyces carlsbergensis* の菌体を数回滅菌生理食塩水で洗滌、遠沈をくりかえしたのち、食塩水中一定濃度になる様懸濁する。この菌液を光电比色計(使用フィルターS53, ベッセル10mm)で20%に調整して所定の濃度とした。この懸濁液をさらに食塩水で10倍に稀釈したものを接種菌液とする。

(5) 試料の調整

(i) 牛肝臓

新鮮な牛肝臓100gを秤取し、同容量の水を加えてトルエン数滴入れ、2昼夜32°C恒温器に放置後30分間コッホ釜にて殺菌し濾過後、pH5.0~6.2として100ccとなし500倍に稀釈した。

(ii) 牛肉

ミンチ肉100g試料調整は牛肝臓と同じ。1000倍に稀釈した。

(iii) 唐辛子

よく乾燥した粉砕試料1gを0.05N H₂SO₄ 10ccを加え硝子ポンベに封入し、130°C2時間oil bath中で分解した。後開管しpH5.0~5.2とし100となし、この原液を1000倍に稀釈した。

(iv) 清酒

一級月桂冠1ccを100ccメスフラスコで一定量にし30分間殺菌pH5.0~5.2として、10倍に稀釈した。

(v) 醤油

キッコマン濃口醤油1.5ccを100cc一定量にし150倍に稀釈した。

(vi) 糖密

2gを100cc一定量にしpH5.0~5.2の原液を10倍に稀釈した。

(vii) 味噌

赤味噌1gを100cc一定量の水にとかし、pH5.0~5.2の原液を10倍に稀釈した。

(viii) ビール

ビール1ccを100cc一定量にしpH5.0~5.2の液を検液とした。

各試料の稀釈は定量に際してStandard curveに挿入してそれぞれ含有γ数を求める時に定量範囲に当てはめられる様大体的見当をつけるため、既に定量されている文献値を参考に各稀釈したものである。

(6) ビタミンB₆標準系列の作成

定量に際し50ccの三角フラスコに基礎培地5cc、標準曲線作成用のビタミン溶液を加え水を加えて9ccとした。第2表の段階のものを測定誤差を少なくするために同番号のものをそれぞれ2組用意した。

第2表

試験管番号	0'	0	1	2	3	4
ビタミン量(mγ)	0'	0	2.5	5.0	10.0	20.0
ビタミンB ₆ 5mγ/cc	0	0	0.5	1	2	4
蒸留水	4	4	3.5	3	2	0
基礎培地	5	5	5	5	5	5
計(cc)	9	9	9	9	9	9

(7) 培養および酵母繁殖度の測定

前述の標準系列作成第2表の如く分注し、試料検液を標準曲線の中へ入ってくる様稀釈したものを1, 2, 4cc取水を3, 2, 0cc添加して4ccとなし、それぞれ培地5ccを加えて9cc培養とする。分注後10分間蒸気殺菌し、冷後接種菌液1ccを無菌的に滅菌ピペットで注加し(但し、0'番号のものは接種しない)。綿栓して20°に傾斜し、32°C16時間培養した。培養後10分間蒸気殺菌した。

以上の様にして培養したものをコタキ製AKA光电比色計で繁殖度を比濁で測定した。

(使用フィルターS53, ベッセル10mm)

先ず接種していないconstantの液に100%光を透過させ、試料及び標準溶液の比濁を行つた結果第3表、第4表の値を得た。

第3表 標準系列平均透過率

試験管番号	0	1	2	3	4
B ₆ 濃度mγ	0	2.5	5.0	10.0	20.0
平均透過率%	6	22	34	54	65

第4表 検液測定結果

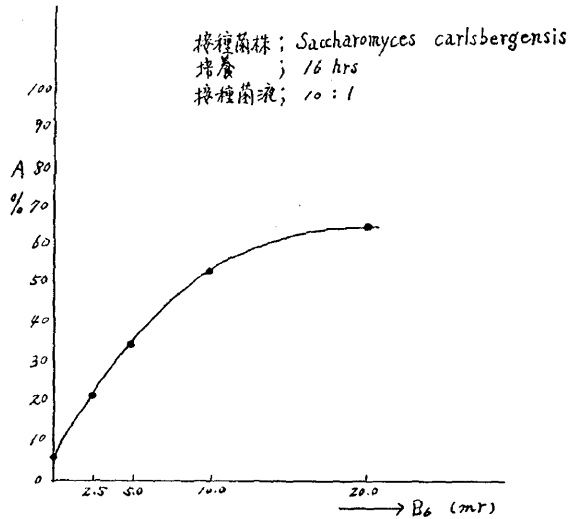
試料名	醤油			味噌			清酒			ビール		
分注(cc)数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
平均透過率%	51	58	76	25	40	62	30	60	71	52	64	70
試料名	肝臓			牛肉			唐辛子			糖密		
分注(cc)数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
平均透過率%	15	25	83	18	25	55	12	14	16	9	14	20

(8) 標準曲線の作成及び試料の分析

上述の方法によつて得た透過率の値を縦軸に標準ビ

タミン B₆ 溶液を横軸にとつて標準曲線をかき、検液について得た透過率を挿入して検体中の定量しようとするB₆の含有量を求めると第5表の如くであつた。

第一図 Vitamin B₆ 標準曲線



第5表 試料 1 cc中のVitamin B₆ 含有量

試料名	醤油	味噌	清酒	ビール
B ₆ 含有量 γ/cc	1.5	0.7	2.0	1.5

試料名	肝臓	牛肉	唐辛子	糖蜜
B ₆ 含有量 γ/cc	375	475	100	5

考 察

微生物定量法においては、他の方法では仲々検出されない微量のビタミンに対してもよく response を示すので、その感度はすぐれていると思われるが、しかし生物を用いるので、くりかえし実験を行つた際の再現性が問題となる。使用菌が標準ビタミンと試料中のそのビタミンの同一量に対して “response” を示すことを前提としているため私達は、2, 3種類の菌株か

ら *Saccharomyces carlsbergensis* を選び出し、最も B₆ を必須生育因子として要求するものであると解つた。そこで定量条件を一定にするために、使用菌、温度、培地の pH、培地に良く慣れた菌株、等微妙なる条件を考慮して定量を行つた。又定量のたびごとに必ず同一条件下で標準系列を調製し、Standard curve を作成した後挿入しなければならない事。以上の定量法により動物性食品の中の牛肉 475γ/cc、牛肝臓 375γ/cc、のB₆を定量し、又清酒 2.0γ/cc、味噌 0.7γ/cc、醤油 1.5γ/cc、ビール 1.5γ/cc、唐辛子 (青) 100γ/cc、糖蜜5γ/ccの定量値を得た。

Bioassay はテクニックが解れば非常に簡単にしかも精度も高く定量出来ることが証明出来た。

終りに本研究に終始御懇切なる御指導をいただきました平教授に深く感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 福井三郎, 岸部忠信, 谷喜雄; ビタミン 5 巻 (1952) 217p
- 2) 高田亮平, 福井三郎, 岸部忠信; ビタミン 5 巻 (1952) 415p
- 3) H, Sördergaard, H; Intern. Z. Vitaminforsch. 29 ビタミン 16巻 164p
- 4) 谷喜雄 ビタミン研究実験講座 (1) 546p
- 5) ビタミン学
- 6) 鈴木友二, 村岡三郎; ビタミン, アミノ酸微生物定量法
- 7) 川崎近太郎, 小川俊太郎; ビタミンの化学と定量法
- 8) 微生物学ハンドブック
- 9) 日産研究所編; 微生物学的定量法ビタミン編