nine に依つて打消される。l-histidine 100 mg/l の阻害を完全に打消すに要する pantothenate は 1 mg/l である。β-Alanine の場合は 1 mg/l ではやや lag が長くなる。

(3) アミノ酸中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ と共に培地にあつて阻害を呈さなかつた dl-alanine, d-aspartic acid, l-lysine, l-cystine, dl-phenylalanine, l-proline, dl-leucine, dl-tryptophan, 8 種の混合培地も正常な増殖を呈さず, この場合も pantothenate が有効であつた。

終りに終始御指導を賜りました恩師坂口教授に感謝申上げると共に御助言を戴いた有馬助教授, 角田俊直, 田村学造, 宮沢 滋並びに坂口研究室諸氏諸兄に厚くお御礼申上げる次第である。

(尙本報告の一部は昭和 29 年 4 月農化大会で発表したものである。)

(1) 高橋 : 農化, 28, 395, 398, 425 (1954).

(3) BARTON, WRIGHT : *Wall. Lab. Comm.*

(2) R. S. W. THORNE : *J. Inst. Brewing*,
47, 255 (1941).

(1952).

Summary

In the last report the author has reported that the histidine inhibited the growth of yeast in the vitamin deficient-medium. Now the author has made a study on the inhibition of histidine to the growth of yeast in the varied concentration. The inhibition of histidine to the growth of yeast come out from the concentration of 100 mg per liter in the vitamin deficient medium. This inhibition is disappeared by the addition of Ca-pantothenate or β-alanine in the concentration of 1 mg per liter.

On the other hand the growth of yeast is abnormal in the vitaminless-medium containing amino acids mixture as nitrogen source in spite of that the l-histidine, l-arginine, l-glutamic acid, dl-serine, dl-isoleucine, dl-methionine, dl-threonine, l-tyrosine, dl-valine and glycine are excepted owing to their inhibition to the growth of yeast and therefore this abnormal growth depend on the lacking of vitamins.

酵母の Amino Acids 及び Vitamins 要求に就いて (第 5 報)

高 橋 雅 弘 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 30 年 10 月 25 日 受 理

Studies on the Requirements of Amino Acids and Vitamins of Yeast. Part V.

By Masahiro TAKAHASHI (Dept. of Agricultural Chem., Faculty of
Agriculture, University of Tokyo)

著者は前報迄⁽¹⁻³⁾に酵母の *Saccharomyces* 属の窒素源とビタミンの関係に就き述べて来た。即ち *Saccharomyces* 属酵母は其繁殖に当つて窒素源の種類により同化容易なものと同化するにはビタミンを必要とするものがあることを認めた。無機窒素 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を窒素源とすると直ちに同化するが, amino acids mixture を窒素源とする場合は同化するにビタミンを要求する。然も必要とするビタミンはアルコール酵母, ビール酵母, 清酒酵母の 3 種は各異つたものを要求する。清酒酵母は特に pantothenate を要求し amino acids mixture を窒素源として与えても, pantothenate を与えなければ繁殖を起さない。しかして斯如く amino acids mixture がビタミン無しには同化出来ない原因の一つはアミノ酸中 l-histidine, l-arginine, dl-isoleucine, dl-methionine, dl-threonine, l-tyrosine, dl-valine, dl-serine, glycine, l-glutamic acid の 10 種が同化し難いのである。特に l-histidine は完全阻害をするので容易に同化する $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ に l-histidine を添加すると清酒酵母は繁殖を始めない。尚この阻害現象は amino acids mixture に於て要求された pantothenate に依つて打消される⁽³⁾。

このような現象は従来合成培地として酵母の実験に頻用されている HYDUCK'S solution の場合といささか矛盾する如く感ぜられるが, 以上の実験結果はすべて inoculum size 接種菌体数を培養液 1 cc 当り 10^3 に限定した場合に始めて観察し得るのである。換言すれば, これら酵母の栄養条件を決定するには接種菌体数を一定にした上で実験を行う必要がある。本報告では接種菌体数に関する問題に就き述べる。

実 験 の 部

実 験 1.

実験方法： 前報に準じて行つた。

培養液： Table 1 に示す如く、麴、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, amino acids mixture, casein-hydrolyzate, asparagine, L-histidine を窒素源とする培地 11 種を調製した。各培養液は 2 cc 宛殺菌試験管に pH 4.8 に調節後 115° , 15 分殺菌培養液とした。

前培養： 麴寒天斜面培養せる酵母 1 白金耳を麴試験管培地 (Ballg. 4) 5 cc に接種, 30° , 24 時間培養後同前培地に植次ぎ, 30° , 20~24 時間培養し, 接種菌体とする。

接 種： 前培養を遠心分離し上澄を傾斜除去後殺菌生理的食塩水に懸濁遠心分離し上澄を傾斜除去する。この菌体洗滌操作を 2 度繰返し, 菌体を完全に洗滌遠心分離し秤量する。この菌体を更に生理的食塩水に懸濁接種用殺菌スポイド 1 滴 (1/25 cc) に 10^2 , 2×10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 含まれるよう稀釈する。この稀釈菌体を前記の 2 cc 培養液に滴下接種する。又この稀釈液より manipulator により 1 個を接種する。

測定法： 接種後繁殖に伴う混濁度を以て光電比色計で測定し, 同時に血球計にて菌数の実測を行つた。

使用酵母： *Saccharomyces Sake* (協会酵母 7 号)

実験結果は Table 1 に示してある如く麴液を使つた場合は 10^2 個/cc まで 72 時間培養で繁殖を示し, 2 cc に 1 個のときも 50~60% で繁殖を認めた。只 1 個の場合はやや lag が長くなり, 144 時間経過して始めて max. growth を示す。この lag の問題は又別の方向から検討する必要があるが, この実験に於ても $10^2 \dots 10^6$ と接種量が多い程短くなつてゐる。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ では 10^2 迄正常な繁殖を 72 時間で認め得るが, 1 個の接種では繁殖を起さない。amino acids mix. の場合は 10^6 /cc で始めて繁殖を示し, histidine は 10^6 /cc でも尙繁殖しない。前報で示した如く以上の繁殖し難いもの又は繁殖し得ない Amino acids mix. 又は histidine に pantothenate を加えると Amino acids mix. では $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ と同じ inoculum size まで接種量を少くすることが出来る。これに反して histidine 単独のものは 10^6 /cc でやや繁殖を認めたが, 余り顕著な効果は認め得なかつた。只 histidine に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加して更に pantothenate を加えた培地では, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 単独のものと同程度まで接種量を少くしても正常な繁殖を示した。以上種種の結果は窒素源の種類により同化しやすいものと同化し難いものが存在するが, それは接種量の多少に依つて現象が異つて出ることを示している。

TABLE 1. Relation between the Inoculum Size and Various Nitrogen Source.

	Medium component				Inoculum size per cc							
	Nitrogen source.	Carbon source	Salts	Solution	Vitamins	Monocell	$10^{1 \sim 2}$	10^3	10^4	10^5	10^6	$10^{7 \sim 8}$
1	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Glucose	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+
2	Amino acids mix.	Glucose	+	—	—	—	—	—	—	—	±	+
3	Amino acids mix.	Glucose	+	—	+	—	—	—	+	+	+	+
4	Amino acids mix.	Glucose	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+
5	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Asparagine	Glucose	+	—	+	—	—	—	—	+	+	+
6	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Asparagine	Glucose	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+
7	Histidine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Glucose	+	—	+	—	—	±	+	+	+	+
8	Histidine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Glucose	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+
9	Casein Hydrolyzate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Glucose	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+
10	Casein Hydrolyzate	Glucose	+	—	—	—	—	—	—	—	±	+
11	Koji extract	—	—	—	—	(±)	+	+	+	+	+	+

Nitrogen source: 0.03% as nitrogen,

Carbon source: Glucose 5%,

Salts solution: (1) 50 ml/l KH_2PO_4 22g; KCl 17g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05g; MgSO_4 5g; FeCl_3 0.1g; MnSO_4 0.1g; Fill up to 1l by dist. water.

(2) 25 ml/l Citric acid 20g; Sodium Citrate Fill up to 1l by dist. water.

Vitamins: Ca-Pantothenate or β -Alanine 1mg/l

実 験 2.

前の実験結果で麴液が清酒酵母の繁殖に有効であることを確認したが, その原因の一つは麴自体に含まれるべきビタミンにもあるものと考えられる。そこで麴液自体のビタミンを bioassay に依り定量した。その結果は Table 2 に示す如く thiamine, riboflavine, pyridoxal, pyridoxamine, pyridoxine, pantothenic acid, niacin,

TABLE 2. Vitamins in the Koji Extract determined by Bioassay

	Free content γ/cc	After autoclaved γ/cc	Test organism.
Thiamine	4.28	11.6	<i>Lact. fermenti</i>
Riboflavine	0.1	1.6	<i>Lact. casei</i>
Pyridoxal	0.2	0.5	<i>Lact. casei</i> <i>St. faecalis</i> <i>Sacch. carlsbergensis</i>
Pyridoxamine	0.5	1.0	<i>St. faecalis</i> <i>Sacch. carlsbergensis</i>
Pyridoxine	0.1	0.12	<i>Sacch. carlsbergensis</i>
Pantothenic acid	0.98	1.41	<i>Lact. arabinosus</i>
Niacin	12.5	15.0	<i>Lact. arabinosus</i>
Folic acid	0.15	0.153	<i>St. faecalis</i>
Biotin	0.025	0.012	<i>Lact. arabinosus</i>

Kohji extract : Ballg 7.

folic acid, biotin が測定された。この中で pantothenic acid の含有量は前報で得た amino acids mixture, 又は histidine を窒素源とした場合に清酒酵母が要求する量よりも少ない。しかも麹液の窒素はアミノ酸を主体とし, histidine をも含んでいゝることを考慮に入れるならば, 少ない pantothenate で尙且つ良

好な酵母の繁殖をみるのは前報迄の結果と矛盾する如く思われる。しかし第 2 報でも示した如く清酒酵母に対して pantothenate だけが有効なのではなく, 他のビタミン類も程度の差はあれ影響を与えている。この実験の事実からも麹液が酵母の繁殖に優良なる培地である理由が考えられるのである。しかし同じような麦芽汁の栄養がその含有するビタミンに依らず麦芽汁のアミノ酸に由来するという THORNE⁽⁵⁾ 等の主張とは相反する。著者はこの結果の相違は inoculum size を考慮に入れるか入れないかで生じて来たものと考えている。Pantothenate 以外のビタミンの影響に関しては更に検討を続けている。

実験 3.

前の実験で麹液が pantothenic acid を始め数種の清酒酵母に有効なビタミンを含むことを認め得たので, amino acids mixture 中特に阻害作用をする histidine と麹液との混合培養液と接種量の関係に就き検討した。

培養液 : Table 3 に示す如き添加量で麹と histidine 混合培地を調製。Bioassay 常法通り試験管に 2 cc 宛分注 115°, 10 分殺菌し培養液とした。

前培養 : 実験 1 に同じ。

接種菌体 : 実験 1 と同じ。

測定法 : 実験 1 に同じ。

TABLE 3. Effect of the Inoculum Size for the Growth of Yeast in the Medium containing Koji extract, Histidine and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as Nitrogen Source.

	Koji extract Ballg 7 (Ca-Pantothenate) content γ/cc	Histidine mg/cc	Inoculum size for 2cc					
			10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
1	1 cc (0.2)	0	+	+	+	+	+	+
2	0	0.300	—	—	—	—	—	—
3	1 cc (0.2)	0.300	—	+	+	+	+	+
4	0.1 (0.22)	0.300	—	—	+	+	+	+
5	0.01 (0.002)	0.300	—	—	—	±	+	+
6	Ca-Pantothenate (1γ)	0.300	—	—	—	±	+	+
7	Ca-Pantothenate (1γ) ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	0.300	—	+	+	+	+	+
8	($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	0.300	—	—	—	—	+	+

この結果は Table 3 に示した如く麹液のみの対照は 10^2 から繁殖を認め *l*-histidine のみの場合は繁殖しない。麹液 1 cc 即ち pantothenic 0.2 γ 含有した麹液 1 cc に *l*-histidine 300 γ/cc の溶液 1 cc を混和したものでは 10^3 /cc 以上の接種量で繁殖を示す。この麹液を 1/10 稀釈したものに同前 *l*-histidine 300 γ/cc 溶液 1 cc 混和培地では 10^4 /cc 以上の接種量で繁殖を認める。更に麹液の濃度を 1/100 稀釈し, その 1 cc に同前 *l*-histidine 300 γ/cc 溶液

1 cc 混和培地を調製すると $10^5 \sim 10^6$ /cc 以上の接種量で繁殖を始める。これらの現象を pantothenate 単独に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -histidine を窒素源とした場合に加え, histidine の阻害を打消す pantothenate の量と比較すると 1/5~1/10 である。換言すると histidine の阻害を打消すに要する pantothenate の量は *l*-histidine 300 γ/cc に対して 1 γ/cc であるのに対して, 麹液の場合は pantothenate は僅かに 0.2~0.02 γ/cc しか含まれていない。このようになるのは前項でもふれたように麹液の他のビタミンを検討する必要を暗示するもので, これらのことはあらためて後述する。

実験 4.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を窒素源とする場合, 清酒酵母はビタミンを要求しないが, その場合 pantothenate の生産があるかないかは histidine の阻害作用並びに pantothenate の阻害打消作用と重要な関係がある。そこで $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ のみを窒素源として繁殖させた清酒酵母の菌体分析を行った。

TABLE 4. Vitamin contained in the Broth Filtrate and in the Yeast Cells cultured in the Synthetic Medium (Used $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as nitrogen source)

	γ /Dry yeast g/	γ /brothfiltrate cc		
Thiamine	2.5	11.5	1.4	0.9
Pyridoxine	2.4	3.6	—	—
Ca-Pantothenate	12.5	12.5	0	0
Niacin	158	125	43.8	36.2
Biotin	0.012	0.010	—	—
Medium	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0.03% (as nitrogen source) glucose : 5% Salts solution : See Table 1			

培養液 : Table 4 に示した如く $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glucose, salts solution のみを入れた培養液 300cc.

培養時間 : 120 時間.

培養温度 : 30°C .

前培養 : 前回に同じ.

接種菌体 : 前培養を遠心分離し菌体のみをとり生理的殺菌水で洗滌を 3 回行い接種菌体とした.

使用菌種 : *Saccharomyces Sake* 協会酵母 7 号.

分析方法 : Bioassay に依る. 使用菌種は Table 4 に表示せるものを使用した.

結果は Table 4 に示した如く菌体と培養濾液とでは特に pantothenic acid に差異が認められる. 即ち菌体内には pantothenate が存在しているが培養濾液には全く認められないことである. この事実は清酒酵母が要求する pantothenic acid の最低限界がほぼ此処にあるのではないかと考えられる.

考 察

今回の実験で清酒酵母の窒素同化を検討する場合は接種菌体数量を十分に考慮に入れる必要があることを確認した. この考慮の結果麴液を除いては $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ が最も利用し易いものとなるが此事は THORNE 一派の実験結果と全く相反するものである. THORNE, BARTON-WRIGHT⁽⁴⁾⁽⁵⁾ 等は麴母の同化し易いものはアミノ酸であり, 麦芽が $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ 等よりも同化率の良好なのも麦芽中のビタミンに依るのでなく其中に含まれるアミノ酸, asparagine, glutamine であると報告している. Asparagine が酵母の同化には余り有効でないことは第 3 報に於ても述べているが, 本報告でも明らかな如くビタミンがアミノ酸同化には重要な役割を演じている. 又前報でも論及した如く histidine 単独の窒素源としての同化も BARTON, WRIGHT 等は同化が遅いことは述べているが, 著者の如く完全阻害作用は見出していない. これら種々の相反する結果の生じた所はいずれも接種菌体数にその原因があると思う. 従つて酵母の栄養特に増殖に対する栄養を検討する場合には接種菌体数量を規定して実験しなければ意味が甚だ不明確になる.

要 約

(1) 各種の窒素源の同化率, 同化能を検討する場合は inoculum size 接種菌体数量を規定した上で実験結果を観察する必要がある.

(2) 清酒酵母の場合培養液 1 cc 当り 10^3 個の接種量とすると窒素同化の判定では麴液以外では $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ が特に同化し易い.

(3) 麴液の同化が容易な理由はその中に含有するビタミン類の影響である.

終りに臨み終始御懇篤なる御指導を戴きました恩師坂口教授に御礼申上げると共に常に御助言戴きました有馬助教授, 角田俊直, 田村学造の諸氏始め坂口教室の諸兄に厚く感謝申上げる. 及特にビタミンの Bioassay に御協力戴いた宮沢滋氏, Micromanuplator を使用して戴いた草間保子嬢に深謝する.

(本報告の一部は昭和 30 年 3 月農化大会で発表したものである.)

(1) 高橋 : 農化, 28, 395 (1954).

(2) 高橋 : 農化, 28, 398 (1954).

(3) 高橋 : 農化, 28, 425 (1954).

(4) BARTON, WRIGHT : *Wallerstein Lab. Comm.*, (1952).

(5) R. S. W. THORNE : *Wallerstein Lab. Comm.*, (1950).

(6) M. A. JOSLYN : *Mycopathologia et Mycologia Applicata* (1951).

Summary

Nitrogen assimilability of yeast depend on its inoculum size. So in the case of the determination of the nitrogen assimilability by yeast the experiments must be carried out in the same inoculum size. Sake yeast assimilate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as a nitrogen source better than other materials except of koji extract under the condition carried on inoculum size of $10^3/\text{cc}$. High nutritive value of koji extract are caused by means of the several vitamins which are contained in the koji extract.