なお、パパインの凝乳作用は第 4 表に記した条件で酸化すると失われることを認めた。凝乳作用がパパインの蛋白質分解作用と相関することは一般に認められているが⁽¹⁰⁾、この酵素の麦芽蛋白質凝集作用が蛋白質分解作用と全く無関係であることはこの表に示される結果から明らかである。

従ってパパインの麦芽蛋白質凝集作用と蛋白質分解作用との作用活性は全く別個のものであると考えられる。

結 論

(1) パパインの麦芽蛋白質凝集作用は、種々の化合物の添加により、これを促進または抑制することができる。

(2) 麦芽蛋白質水溶液にパパインを加えた場合、凝集現象がおきると溶存パパイニン力価は減少し、凝集を抑制すれば溶存パパイニン力価は大きい。

(3) パパインの蛋白質分解作用と、麦芽蛋白質凝集作用との活性は全く別個のものである。

本研究の発表を許可された麒麟麦酒株式会社川村社長、時国専務、熊沢常務、御指導賜った奥田譲先生並びに所長梅田博士及び直接御教示、御鞭撻を賜った研究所尼崎分室長黒岩博士に深甚の謝意を表します。

(1) 堀江 雄 : 本誌投稿中.	Chemists, p. 307 (1955).
(2) J. R. Kimmel, E. L. Smith : <i>J. Biol. Chem.</i> , 207, 515 (1954).	(6) 黒岩芳郎, 堀江 雄 : 特許番号第 207841 号, <i>C. A.</i> , 49, 6380 (1955).
(3) 赤堀四郎 : アミノ酸及び蛋白質, 共立出版, p. 595 (1947).	(7) 赤堀四郎編 : 酵素研究法, II, 朝倉書店, p. 252 (1956).
(4) G. v. Holt, K. D. Voigt, K. Gaede : <i>Biochem. Z.</i> , 323, 345 (1952).	(8) 赤堀四郎編 : 同上, p. 294 (1956).
(5) "Methods of Analysis, A. O. A. C.", 8th Ed., Association of Official Agricultural	(9) 赤堀四郎編 : 同上, p. 240 (1956).
	(10) E. T. Hinkel, Jr., C. Zippin : <i>Ann. N. Y. Acad. Sci.</i> , 54, 228 (1951).

[農化 第 35 卷, 第 13 号, p. 1241~1244, 1961]

パン酵母に及ぼすビタミン効果の研究 (第 3 報)*

ビオチン要求性パン酵母のニコチン酸分泌型

鈴木 弥 彦 (日東理化学研究所)

昭和 36 年 3 月 17 日 受 理

緒 言

酵母の生育因子としてビオチンが発見されて以来、ビオチンは酵母を始めとして多くの微生物・動物の生育因子としてみとめられてきた。生体内におけるビオチンの作用は今日においても未検討の部分が多いが、ピメリン酸、デスチオビオチン⁽¹⁾、アスパラギン酸及び他のアミノ酸⁽²⁾、オレイン酸等による代替性⁽³⁾の研究より、アスパラギン酸、セリン、スレオニン等のデアミナーゼ、オキザロ酢酸、コハク酸のデカルボキシラーゼの補酵素としての役割⁽⁴⁾、オレイン酸等の脂肪の合成及びオルニチンよりチトルリンの合成⁽⁵⁾、酵母の解糖代謝への関与⁽⁶⁾等徐々にビオチンの役割が解明されてきている。

最近、ビオチンを要求する酵母が、培地中にビオチンの低濃度しか存在しない状態で生育するとき、培地中へ 5-アミノイミダゾールリボシドを蓄積することが報告され⁽⁷⁾、またニコチン酸の分泌蓄積も報告された⁽⁸⁾。さらに Rose, Nickerson⁽⁹⁾ 等は 5 属 8 種にわたる酵母についてビオチン不十分培地中へのニコチン酸の分泌を検討して、菌株により差があることを見出している。

パン酵母の生育に及ぼすビタミン効果の研究として、国内産パン酵母株につき、ビタミンの要求性、ビタミンの添加効果等について検討したが、使用したパン酵母株はビオチン要求性を示しているので、パン酵母でのニコ

* Studies on the Vitamin Effect of the Bakar's Yeast. Part III. The Secretion Type of Nicotinic Acid by the Biotin Dependent Baker's Yeast.
By Yahiko SUZUKI (The Nitto Institute of Chemical Research)

チン酸分泌についての研究を行なった。

実験及び考察

A. 実験方法

1. 使用菌株：第1報⁽¹⁰⁾において分離された国内産パン酵母株の A~J の 10 株と Fleischmann No. 189 の計 11 株の *Saccharomyces cerevisiae* に属する酵母を使用した。

2. 接種菌：Yeast ext.-malt ext. 寒天斜面培地で冷蔵庫中に保存せる菌株より、新たに同一培地により 30° で 20 時間培養した菌体を殺菌生理食塩水 4 ml で集め、これを遠心分離により沈澱・洗滌を数回行なって後、稀釈して 10^7 /ml の懸濁液とし、これをピペットで 1 滴ずつ接種した。最終菌濃度は約 10^8 /ml である。

第 1 表 基礎培地組成

グルコース	20 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.25 g
CaCl ₂	0.25 g
ビリドキシン塩酸塩	1.0 mg
イノシトール	10 mg
Ca-パントテン酸	1.0 mg

1 l 中の組成；pH 4.5

第 1 図 パン酵母のビオチン依存曲線

3. 培地：使用培地は Rose, Nickerson 培地によった。糖源としてはグルコースを使用し、窒素源は硫酸アンモンを使用した第 1 表の如き組成のものである。

4. ビオチン溶液：基礎培地に添加するビオチンの最終濃度は、2.0, 0.05, 0.025, 0 m γ /ml の 4 段階になるようにした。2.0 m γ /ml の濃度は総ての菌株で最高生育を与える濃度であり、0.05, 0.025 m γ /ml はわずかにしか生育を許さない濃度である (第 1 図)。

5. 培養方法：前記培地 5 ml を殺菌綿栓試験管 (1.8×17 cm) に分注し、これにビオチン液を 1 ml 加えて総量を 6 ml とし、110° で 20 分間加圧殺菌した後、菌を接種し、30° で静置培養を行った。24, 48, 69, 120 時間において各試験管の生育を 650 m μ の波長で比濁により求め、さらに遠心分離によって菌体を沈澱除去し、上澄液をニコチン酸の分析に供した。

6. ニコチン酸の分析法：培地中に分泌されたニコチン酸の分析は、*Lactobacillus arabinosus* 17-5 を定量菌とするバイオアッセイ法によって行なった。ニコチン酸の定量培地はビタミン除去カゼイン加水分解物・グルコースを主体とするもので、第 2 表の如き組成である。*Lactobacillus arabinosus* 17-5 によるニコチン酸の定量範囲は 0~200 m γ /ml で、ニコチン酸のほかにも本菌の生育はニコチンアミド、コエンチーム I にも依存するので、これらの合計として定量されている⁽¹⁰⁾。分析方法は種々のビオチン濃度培地で生育せしめられた後の培養濾液 1 ml を試料として分

第 2 表 *Lactobacillus arabinosus* によるニコチン酸定量培地

グルコース	20 g	ビリドキサル	0.1 mg
酢酸ソーダ	20 "	Ca-パントテン酸	1 "
カゼイン加水分解物	5 "	p-Aminobenzoic acid	0.2 "
DL-メチオニン	200 mg	葉酸	10 γ
DL-トリプトファン	100 "	ビオチン	10 "
L-シスチン	100 "	KH ₂ PO ₄	500 mg
アデニン H ₂ SO ₄	10 "	K ₂ HPO ₄	500 "
グアニン HCl	10 "	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	200 "
ウラシル	10 "	FeSO ₄ ·7 H ₂ O	10 "
キサンチン	10 "	MnSO ₄ ·4 H ₂ O	10 "
チアミン HCl	1 "	NaCl	10 "
リボフラビン	1 "		
ビリドキシン HCl	1 "		

1 l 中の組成；pH 7.0

析培地 1 ml を含む試験管に加え、定量菌を接種後、37° で 48 時間培養を行ない、蒸留水で 5 倍に稀釈して総量を 10 ml とし、650 m μ の波長で比濁により菌の生育度を求め、同時に行なった標準曲線 (ニコチン酸濃度-生育曲線) に挿入して試料中のニコチン酸の含量を算出した。

B. 結果及び考察 Rose, Nickerson の検討によれば、ビオチン不十分培地でのニコチン酸分泌の型は次の 3 つに分別される。

(a) 低濃度のビオチンの添加によって

生育が阻止されるほどニコチン酸分泌の多いもの。

(b) 生育の良悪にかかわらず、ニコチン酸分泌の極めて少ないもの。

第 2 図 培地中ニコチン酸分泌型

(1) 型: A株, (2) 型: B株, (3) 型: C株, (4) 型: G株
 — 生育, ---- ニコチン酸
 (1): ビオチン 2.0 mg/ml, (2): 0.05 mg/ml,
 (3): 0.025 mg/ml

第 3 表 ビオチン不十分培地での生育によるニコチン酸の分泌

ニコチン酸分泌型	ビオチン添加濃度 mg/ml	細胞数 $\times 10^7$	酵母乾燥重量 mg/ml	分泌ニコチン酸 mg/ml	分泌ニコチン酸 / 酵母乾燥重量 g/g
1 型 (A株)	2.0	3.29	143	120	0.841
	0.05	1.90	82.5	112	1.36
	0.025	1.32	57.3	90.0	1.57
2 型 (B株)	2.0	3.16	137	17.0	0.124
	0.05	2.04	88.5	130	1.47
	0.025	1.35	58.6	164	2.80
3 型 (C株)	2.0	3.55	154	124	0.806
	0.05	1.82	79.0	100	1.27
	0.025	1.38	59.9	134	2.24
4 型 (G株)	2.0	3.29	143	45.0	0.322
	0.05	1.91	82.8	35.0	0.422
	0.025	1.45	62.9	74.0	1.18

ニコチン酸の分泌が認められ、その型式はパン酵母内でも差異を生じるのであるが、ニコチン酸の培地中への分泌量と生育とによる型式には差異があっても、生育にビオチンを要求する酵母をビオチン不十分培地で生育せしめることにより、単位酵母重量当りのニコチン酸の分泌量は第 3 表の如く明かに各型式で増加して Rose, Nickerson のいう如く、ニコチン酸がビオチンの不十分添加条件によって阻害される 1 つ、または数個のビオチン依存代謝反応に関与していることが考えられる。

要 約

国内産パン酵母株 10 株と Fleischmann No. 189 の計 11 株はその生育のためにビオチンを要求し、2 mg/ml 位のビオチン添加によって最高の生育を示す。これらの酵母を各種ビオチン濃度の培地で生育せしめると、培地中にニコチン酸を分泌する。このニコチン酸の分泌の型式が菌株によって異なり、4 つの型式に分別されることが認められた。この方法はパン酵母間のビタミンに関連した分別方法として、栄養要求である bios type 等の方法とともに、1 つの手段になる可能性があるように思われる。

(c) ビオチンを高濃度に添加して生育が良好なものほどニコチン酸の分泌の多いもの。

本報において検討した 11 株のパン酵母についても同様な指標で整理してみると第 2 図の如き 1, 2, 3, 4 の型に区別されるようである。

(1) ビオチンを高濃度に添加して、生育が良好なものほどニコチン酸の分泌の多いもので c 型と同一であり、これに属するのは A 株のみである。

(2) ビオチンを低濃度に添加して生育が阻止されるほどニコチン酸の分泌の多いものは a 型と同一であって、B, D の 2 株がこれの典型的なものであり、E, I の両株はこの傾向のやや不明瞭なものである。

(3) ビオチンの高濃度添加により生育が良好であるときは生育の初期にニコチン酸の分泌が多く、低濃度添加では或る程度の生育が起ってからニコチン酸の分泌を示すもので b 型と c 型の中間と考えられる。これに属するのは C, F, H の 3 菌株である。

(4) 生育の多少にかかわらずニコチン酸の分泌の少ないもので b 型と同一で、これには J. G. Fleischmann No. 189 株が属する。

これらのビオチン不十分培地におけるニコチン

酸の分泌の型式と、各菌株のビ

オチン要求における依存曲線⁽¹⁾

とを比較検討すると、明瞭な 2

型に属する B, D 株と 4 型に属

する J. G. Fleischmann No.

189 株はビオチンの低濃度範囲

で依存を示し、ビオチンの濃度

が高くなっても生育は向上しな

い傾向をもつことが認められた。

かくの如くビオチン不十分培

地で酵母を生育せしめるとニコ

終りに臨み御鞭撻をいただいた中土研究所長に謝意を表し、御指導を仰いだ坂口東大名誉教授、有馬教授、田村助教授に深甚の謝意を表する。

(1) J. H. Mueller : <i>Bact. Revs.</i> , 4, 97 (1940).	765 (1958).
(2) A. G. Moat, Emmons : <i>J. Bact.</i> , 68, 687 (1954).	(7) D. P. Lones, C. Rainbow, J. D. Woodward : <i>J. Gen. Microbiol.</i> , 19, 146 (1958).
(3) G. E. Wessman, L. P. Allen, C. H. Werkmann : <i>ibid.</i> , 67, 554 (1954).	(8) S. W. Challinor, A. H. Rose : <i>Nature</i> , 174, 877 (1954).
(4) Warner, M. Cohn et al. : <i>ibid.</i> , 69, 706 (1955).	(9) A. H. Rose, W. J. Nickerson : <i>J. Bact.</i> , 72, 324 (1956).
(5) MacLeod et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 180, 1003 (1949).	(10) J. C. Rabinowitz : <i>J. Biol. Chem.</i> , 176, 157 (1948).
(6) R. S. Robert, A. G. Moat : <i>ibid.</i> , 233, 765 (1958).	(11) 鈴木弥彦 : 本誌, 35, 648, 654 (1961).

〔農化 第 35 卷, 第 13 号, p.1244~1248, 1961〕

パン酵母に及ぼすビタミン効果の研究 (第 4 報)*

世界パン酵母のビタミン含量

鈴木 弥 彦 (日東理化学研究所)

昭和 36 年 3 月 17 日 受 理

緒 言

国内産パン酵母製品より分離された酵母 10 株と, Fleischmann No. 189 について種々の観点よりビタミン効果を検討してきたが, 菌株の種類も少く, また工業的規模に類似した条件での培養も困難であり, 製品中のビタミン含量を比較しても培養法, 培地等の差よりの影響が大きく, 充分なる検討とは考えられなかった。

東京大学応用微生物研究所 (山口, 古屋)⁽¹⁾, 食糧研究所 (佐藤, 津村, 田中) および当研究所の協同において行なわれた「世界パン酵母の比較研究」^(2,3)においてパン酵母性能と菌体内ビタミン含量との関係, 及び菌体内ビタミン含量とビタミン要求性等の関係について検討する機会が与えられたので, 同一培地, 同一培養法により生育せしめた酵母菌体内ビタミン含量について比較を行ない, 食糧研究所・佐藤等によって行なわれたパン酵母性能検査⁽²⁾, 及び当研究所で行なった性能検査⁽⁴⁾との関連について比較考察を加えた結果について報告する。

実 験 及 び 考 察

A. 実験方法

1. 使用菌株 : 「世界パン酵母の比較研究」にあたり東京大学応用微生物研究所第三研究室において日本を含めて 12 カ国より蒐集された 47 株のパン酵母株及びビール酵母, 清酒酵母, 葡萄酒酵母, Rasse II の計 51 株である。各菌株の整理番号は山口, 古屋等⁽¹⁾の使用せるものと同一であって第 1 表の如くである。

2. 分析試料 : 各ビタミンの分析試料は, 試験管による斜面培養-10 ml 静置培養-200 ml 振盪フラスコ培養-500 ml 振盪フラスコ培養-3 l 振盪フラスコ培養を経た種酵母を 15 l のジャー・フェーマンターによって通気培養, 通気・流加培養する 7 段階の培養を経て得られた圧搾酵母を使用した。各培養に使用せる培地は主として甘蔗糖蜜, 酵母エキス, 硫酸アンモン, 尿素である。圧搾酵母を 1% 濃度でトルエンを加えて 37° で 7 日間自己消化後, 東洋濾紙 No. 5C で菌体残渣を濾別除去し, 得られた淡黄色の透明液を分析に供した。各ビタミンの分析において試料の酵素処理法, 酸・アルカリ分解法が報告されているが, 一時に多数の試料・多種類のビタミンについて分析するため, 便宜的に自己消化法を採用した。これによる二, 三のビタミン含量は真の値より低い分析値を与える可能性があるが, 一応の比較は可能であると思われる。

* Studies on the Vitamin Effect of the Baker's Yeast. Part IV. The Vitamin Content of the Baker's Yeast of the World.

By Yahiko SUZUKI (The Nitto Institute of Chemical Research)