ビオチン活性物質の蓄積に対する酵母エキスの効果について*

岩原章二郎, 小国喜久子
(香川大学農学部農芸化学科)

昭和 48 年 3 月 22 日 受理

Effect of Yeast Extract on the Production of Biotin-vitamins (Studies on the Bacterial Production of Biotin-vitamins Part III)

By Shojiro IWAHARA and Kikuko OGUNI
*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kagawa University, Kagawa-ken, Japan*

The effects of peptone, yeast extract and inorganic metal salts on the bacterial production of biotin-vitamins were investigated. The results are as follows;

(1) The production of biotin from dethiobiotin by some bacteria isolated from soil was greatly accelerated by the addition of peptone, yeast extract or meat extract. Yeast extract was the most effective.

(2) Purine and pyrimidine bases and vitamins seemed to be contained in yeast extract were almost no effective, on the other hand, a mixture of inorganic salts seemed to be contained in yeast extract was very effective on the production of biotin from dethiobiotin. Among inorganic salts, iron salt was specifically effective.

(3) The production of dethiobiotin from pimelic acid by the bacteria was strongly inhibited by the addition of yeast extract or iron salt. (Received March 22, 1973)

緒 言

微生物によるビオチン活性物質の蓄積に対して顕著な効果を示す物質としては、ビオチンの生合成の前駆物質であるピメリン酸以外では、アデニン⁽¹⁾およびアシドマイシン⁽²⁾がデスチオビオチンからのビオチンの生合成を強く阻害し、その結果としてピメリン酸からのデスチオビオチンの生合成をいちじるしく促進することが報告されている。そのほか鉄や亜鉛などの金属塩が、かびによるビオチンの生合成を促進することが報告されている⁽³⁾。その他の有効物質については、ほとんど知られていない現状である。

著者らは、細菌類によるビオチン活性物質の蓄積について、研究中に土壌より分離した細菌類によるデスチオビオチンからのビオチンの生成に対して、ペプトンや酵母エキスが顕著な促進効果を示すことを見出した。一

方、酵母エキ스는ピメリン酸からのデスチオビオチンの生成を強く阻害するというアデニンやアシドマイシンとは全く逆の効果を示すことを認めた。酵母エキス中の有効成分を明らかにするとともに、その作用機作等を明らかにする目的で本研究を行ない、2, 3 の興味ある結果を得たので報告する。

実験材料および方法

1. 使用菌株 本研究においては、土壌より分離した細菌類（いずれも有孢子桿菌、未同定）を用いて行った。

2. 培養基および培養方法 菌の培養は下記に示す組成の培養基を基本とし、実験目的に応じて種々の物質を添加して行なった。試験管 (18 mm × 180 mm) に培養基 4 ml を分注し、種菌を斜面培地より 1 白金耳接種し、試験管振とう機上 (210 rpm) で 30°C において 48 時間培養した。培地組成: グルコース 20 g, DL- α -アラニン 10 g, カザミノ酸 5 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g,

* 細菌類の蓄積するビオチン活性物質に関する研究 (第 3 報)。

KCl 0.5g, NaHCO₃ 5g, デスチオビオチン 0.1g またはビメリン酸 1g をイオン交換水 1l に溶解し, pH 7.4 に調整して用いた。

3. 菌体量の測定 菌体の増殖度の測定は, 培養液を適当に希釈し, 日立 101 型分光光度計で 610 m μ における O. D. を測定して行なった。

4. ビオチン活性物質の定量 ビオチン活性物質の定量は, 前報⁽⁴⁾で述べた方法により, total biotin は *Saccharomyces cerevisiae*, true biotin は *Lactobacillus arabinosus* を用いる微生物定量法により行なった。

実験結果

1. デスチオビオチンからのビオチンの生成に対するペプトンおよび酵母エキス等の効果

一般に細菌類は, デスチオビオチンからのビオチンの生合成能が弱いといわれている⁽⁵⁾。著者らは土壌より多数の細菌を分離し, それらの細菌類によるデスチオビオチンからのビオチンの生成について検討中に, 2, 3 の細菌においては合成培地で培養した場合には, ビオチンをほとんど生成しないが, 培地にペプトンを添加すると, ビオチンの生成量が増大することを見出した。その 1 例を Table I に示す。Table I に示すように, 試験したすべての細菌において, ペプトンがビオチンの生成に対して有効であることが明らかとなった。試験した細菌のうちで KY-21-1-25 菌株においては, とくにペプトンの効果は顕著で, ペプトンを添加するとビオチンの生成量は無添加の場合の約 50 倍にも達する。以下の実験は, 主として本菌株を用いて行なった。デスチオビオチンの

添加濃度の影響について検討した結果, Fig. 1 に示すように, ビオチンの生成量はペプトンを添加した場合には, デスチオビオチン 50 μ g/ml まではデスチオビオチンの添加量に依存して増大した。それ以上添加しても, ほとんど変化は認められなかった。一方ペプトン無添加の場合には, 高濃度のデスチオビオチンを添加してもビオチンの生成量は微量であった。酵母エキスについても同様の結果が得られた。以上の結果から, ビオチンの生

Fig. 1. Effect of Dethiobiotin Concentrations on the Production of True Biotin by Strain KY-21-1-25.

—○— Peptone (10mg/ml) was added,
—●— Peptone was not added.

Table I. Effect of Peptone on the Production of True Biotin from Dethiobiotin by Bacteria

Strain tested	True biotin produced (m μ g/ml)*	
	A	B
KY-1	2.2	15.0
KY-2	8.0	15.0
KY-3	2.1	20.0
KY 7	3.0	78.0
KY-16	8.0	30.0
KY-21-1-25	3.0	160.0

The bacterial strains were cultured for 2 days on the medium containing dethiobiotin (100 μ g/ml) with continuous shaking at 30°C.

* A: Peptone was not added, B: Peptone (10mg/ml) was added.

Table II. Effect of Peptone, Meat Extract and Yeast Extract on the Production of True Biotin from Dethiobiotin by Strain KY-21-1-25

Addition	Growth (O. D. at 610 m μ)	True biotin produced (m μ g/ml)
None	7.7	7.4
Peptone (1%) (Kyokuto)	12.9	238.3
Peptone (1%) (Arei)	8.1	261.1
Polypeptone (1%) (Wako)	11.7	255.0
Yeast extract (1%) (Nissan)	13.5	440.0
Meat extract (%) (Wako)	12.2	173.3

The cultural conditions were the same as Table I.

成に対してペプトンが顕著な効果を示すことが明らかとなったので、ペプトン以外の天然物の効果について検討し、Table II に示すような結果を得た。Table II に示すように、ペプトンのほか肉エキスおよび酵母エキス等もペプトンと同様に有効であり、とくに酵母エキスが有効であった。これらの酵母エキスやペプトン等は菌の生育に対しても有効であるが、菌の生育に対する効果に比較して、ビオチンの生成に対する効果は顕著であった。たとえば酵母エキスの場合 (Table II および Fig. 2),

その添加によって菌体量の増加は 1.5 倍程度であるが、ビオチンの生成量は無添加の場合の 100~500 倍にも達する。このことは酵母エキスやペプトン中には、ビオチンの生成に対して特異的に作用する因子が存在することを暗示するものである。Fig. 2 は、酵母エキスおよびペプトンの添加濃度の影響について調べたものである。Fig. 2 に示すように、酵母エキスの場合には添加濃度 1% までは添加濃度の増加とともにビオチンの生成量は増大するが、1% 以上になると菌の生育もかなり阻害され、ビオチンの生成量も減少する。ペプトンの場合には、添加濃度 2% までは菌の生育およびビオチンの生成量は添加濃度とともに増大する傾向を示すが、ビオチンの最大生成量は酵母エキスの場合よりも低く、酵母エキス添加の場合の 1/4 程度である。以上の実験結果から、とくに酵母エキス中にはビオチンの生合成を特異的に促進する物質が存在することが予想される。そこで、酵母エキス中の有効成分を明らかにする目的で、酵母エキス中に存在することが知られている主な既知物質⁽⁶⁾について、その効果について検討した。その結果、Table III に示すようにビタミン類および核酸塩基類はほとんど効果を示さなかったが、無機塩類の混合物が特異的に有効であった。ビタミン類、核酸塩基類を混合しても、天然の酵母エキスの効果には及ばないが、無機塩類の混合物を単独で添加した場合よりも、いくぶん良好な結果が得られた。無機塩類の混合物が特異的に有効であったが、この効果がいずれの金属塩によるものであるかを明らかにするた

Fig. 2. Effect of Peptone and Yeast Extract Concentrations on the Production of True Biotin by Strain KY-21-1-25.

—●— growth in the presence of dethiobiotin (100 μ g/ml),
 ---○--- growth in the absence of dethiobiotin, —●— True biotin produced in the presence of dethiobiotin (100 μ g/ml),
 ---○--- True biotin produced in the absence of dethiobiotin.

Table III. Effect of Vitamins, Purine and Pyrimidine Bases and Metal Salts on the Production of True Biotin by Strain KY-21-1-25

Addition*	Growth (O.D. at 610 m μ)	True biotin produced (m μ g/ml)
None	11.8	3.0
(I)	9.3	12.0
(II)	12.9	164.2
(III)	11.4	5.41
(I)+(II)+(III)	13.1	276.0
Yeast extract (1%)	13.0	438.3

* (I): vitamins mixture (μ g/ml); thiamine-HCl (0.4), riboflavin (1.5), nicotinic acid (12.5), pantothenic acid (1.0), pyridoxine (0.35), folic acid (0.1), biotin (0.01), inositol (17.0), choline-HCl (20.0), *p*-aminobenzoic acid (0.06), vitamin B₁₂ (0.0001).

(II): metal salts mixture (μ g/ml); CaCl₂·2H₂O (3.7), FeSO₄·7H₂O (2.5), CuSO₄·7H₂O (2.0), ZnSO₄·7H₂O (2.2), MnSO₄·7H₂O (0.2), CoSO₄·7H₂O (0.3).

(III): Purine and pyrimidine bases mixture (μ g/ml); adenine (10), guanine-HCl (10), uracil (10), cytosine (10), thymine (10).

The bacterium was cultured on the medium containing dethiobiotin (100 μ g/ml) and various substances indicated with continuous shaking for 2 days at 30°C.

めに、個々の金属塩の効果について検討したところ、Table IV に示すような結果を得た。Table IV から明らかなように、混合物から鉄塩を除いた場合には、ビオチン生成量は著しく減少した。他の金属塩を除いても、ほとんど影響は認められなかった。一方、各金属塩を単独で添加した場合には、鉄塩を添加した場合にのみ顕著な効果が見られた。他の金属塩の効果は微弱であった。この結果から、ビオチンの生合成に対して鉄塩が特異的に有効であることが明らかとなった。つぎに鉄塩の濃度の影響について検討した結果、Fig. 3 に示すように、硫

酸鉄 2.5 $\mu\text{g/ml}$ まではその添加濃度に依存してビオチンの生成量は増大した。鉄塩の過剰による阻害作用は認められなかった。鉄塩を十分量添加した場合においても、酵母エキス 1% 添加の場合と比較すると、その効果は酵母エキスの大体 1/2 以下であった。このことは、酵母エキス中には、鉄化合物以外にビオチンの生合成を促進する因子が存在していることを暗示するものである。

2. ビメリン酸からのビオチン活性物質の生成に対する酵母エキスおよび硫酸鉄の影響

以上の実験結果から、鉄塩および酵母エキスがデスチオビオチンからのビオチンの生成に対して顕著な促進効

Table IV. Effect of Metal Salts on the Production of True Biotin from Dethiobiotin by Strain KY-21-1-25

Addition	(O.D. at 610 m μ) Growth	True biotin produced (m $\mu\text{g/ml}$)
None	8.7	6.1
Yeast extract (1%)	11.6	494.0
Metal salts mixture	12.0	179.2
(-Ca ²⁺)	10.2	177.5
(-Fe ²⁺)	7.7	28.0
(-Cu ²⁺)	10.5	168.8
(-Zn ²⁺)	8.8	172.3
(-Co ²⁺)	10.8	182.1
(-Mn ²⁺)	10.2	198.6
Metal salt		
Fe ²⁺	8.5	163.5
Ca ²⁺	10.8	15.3
Cu ²⁺	10.1	9.8
Zn ²⁺	8.9	12.4
Co ²⁺	11.0	11.0
Mn ²⁺	6.4	13.0

Metal salts concentration and sort of metal salts were the same as indicated in the Table III. The cultural conditions were the same as Table I.

Fig. 3. Effect of Fe²⁺ Concentrations on the Production of True Biotin from Dethiobiotin by Strain KY-21-1-25.

The bacterium was grown on the medium containing dethiobiotin (100 $\mu\text{g/ml}$) with continuous shaking for 2 days at 30°C.

—●— growth, —○— true biotin produced.

Table V. Effect of Yeast Extract and Fe²⁺ on the Production of Biotin-vitamins by Strain KY-21-1-25

Pimelic acid (500 $\mu\text{g/ml}$)	Addition			Growth (O.D. at 610 m μ)	Biotin-vitamins produced (m $\mu\text{g/ml}$)	
	Dethiobiotin (100 $\mu\text{g/ml}$)	Yeast extract (10 mg/ml)	FeSO ₄ · 7H ₂ O (5 $\mu\text{g/ml}$)		Total biotin	True biotin
—	—	—	—	12.3	10.1	0.8
—	—	+	—	16.6	16.0	4.8
—	—	—	+	11.1	13.0	4.6
+	—	—	—	14.6	13,000.0	0.8
+	—	+	—	15.4	133.3	15.8
+	—	—	+	11.9	647.0	9.4
—	+	—	—	16.2	—	4.1
—	+	+	—	15.9	—	658.2
—	+	—	+	9.4	—	202.5

Fig. 4. Effect of Fe^{2+} Concentrations on the Production of Biotin-vitamers from Pimelic Acid by Strain KY-21-1-25.

The bacterium was grown on the medium containing pimelic acid ($500 \mu\text{g/ml}$) with continuous shaking for 2 days at 30°C .

—●— growth, —○— biotin-vitamers (total biotin) produced.

果を示すことが明らかとなったが、この効果がデスチオビオチンからのビオチンの生成に対して特異的なものであるかどうかを明らかにする目的で、以下の実験を行った。その結果を Table V に示した。Table V に示すように、ビメリン酸またはデスチオビオチンを添加しない場合には、全ビオチン活性物質（主成分はデスチオビオチン）ならびにビオチンともに、その生成量は微量であるが、硫酸鉄または酵母エキスの添加によってビオチンの生成量は増大する。前駆物質としてビメリン酸を添加した場合には、全ビオチン活性物質の生成量は著しく促進されるが、ビオチンの生成量は無添加の場合とほぼ同じであった。しかし、ビメリン酸と同時に硫酸鉄または酵母エキスを添加した場合にはビオチンの生成量は促進されるが、全ビオチン活性物質の蓄積は著しく抑制されることが明らかとなった。デスチオビオチンを前駆物質として添加した場合には、今までに述べた結果と同様に硫酸鉄または酵母エキスを同時に添加すると、ビオチンの生成量は著しく増大した。つぎに硫酸鉄の添加濃度の影響について検討し、Fig. 4 に示すような結果を得た。Fig. 4 に示すように、ビメリン酸からのビオチン活性物質の生成は、硫酸鉄 $2.5 \mu\text{g/ml}$ まではその添加濃度に依存して減少する。この結果は、Fig. 3 に示すデスチオビオチンからのビオチンの生成に対する促進効果とは全く逆の関係にあることを示している。酵母エキスの

Table VI. Inhibitory Effect of Yeast Extract and Fe^{2+} on the Production of Biotin-vitamers from Pimelic Acid by the Bacteria

Strain tested	Addition		Biotin-vitamers (total biotin) produced ($\mu\text{g/ml}$)
	Yeast extract (10 mg/ml)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($5 \mu\text{g/ml}$)	
M-116-8-1	—	—	3.0
	+	—	0.2
	—	+	1.0
M-116-7	—	—	2.0
	+	—	0.2
	—	+	0.5
M-202-1-1	—	—	2.0
	+	—	0.06
	—	+	1.0
M-192-5-1	—	—	3.0
	+	—	0.1
	—	+	1.0
N-4	—	—	3.5
	+	—	0.2
	—	+	0.7
KY-21-1-25	—	—	5.0
	+	—	0.07
	—	+	0.8

The bacteria were cultured on the medium containing pimelic acid ($50 \mu\text{g/ml}$) with continuous shaking for 2 days at 30°C .

場合にも添加量が 0.5% 以上になると、ビメリン酸からのビオチン活性物質の蓄積はほぼ完全に抑制される。他のビオチン活性物質生産菌についても検討した結果、Table VI に示すようにビメリン酸からのビオチン活性物質の蓄積に対して、酵母エキスおよび硫酸鉄は強い抑制作用を示すことが明らかとなった。酵母エキスは、硫酸鉄よりも強い抑制作用を示した。

考 察

以上の実験結果から酵母エキス、ペプトンおよび肉エキス等が、細菌におけるデスチオビオチンからのビオチンの生成を著しく促進することが明らかとなった。とくに酵母エキスの効果は顕著であり、酵母エキスを添加することによりビオチンの生成量は、無添加の場合の 100~500 倍にも増大した。このことは酵母エキス中には、ビオチンの生成を特異的に促進する因子が含有されていることを示すものである。酵母エキス中の有効成分について検討し、有効成分の 1 つは鉄化合物であろうと推論するにいたった。本研究においては酵母エキスやペプトン中の鉄化合物が直接作用しているものであるかどうかについては検討していないが、硫酸鉄がビオチンの

生成に対して特異的に有効であり, 本研究に使用した酵母エキスをペプトン中には十分量の鉄を含有していることなどから考えて, 酵母エキスやペプトン中の有効成分の 1 つは鉄化合物であろうと考えられる. Eisenberg⁽⁸⁾ は *Phycomyces blakesleeanus* によるビオチンの生成に対する鉄およびその他の金属化合物の効果について検討し, 鉄および亜鉛がかなり有効であることを示している. しかし, 鉄の場合にはあまり顕著な効果は認められず, むしろ亜鉛の方が有効であることを示している. 本研究において亜鉛やマンガンなどの金属塩も, ビオチンの生合成に対してかなり有効であるが, 鉄塩が特異的に顕著な効果を示すことが明らかとなった. この結果から鉄がビオチンの生合成において, なんらかの重要な役割を果たしていることは事実であるが, その作用機作については全く不明である. 酵母エキスが, ビオチンの生合成に対して鉄単独の場合よりも顕著な促進作用を示すことから考えて, 酵母エキス中には鉄化合物以外にビオチンの生合成を特異的に促進する物質が含まれているものと考えられるが, その化学構造や作用機作等については現在検討中であるが詳細は不明である. 一方, 硫酸鉄や酵母エキスはデスチオビオチンからのビオチンの生成に対しては顕著な促進効果を示すのに反し, ビメリン酸からのビオチン活性物質 (主成分はデスチオビオチン) の蓄積に対しては強い抑制作用を示す. その抑制作用の機作については不明であるが, おそらく硫酸鉄や酵母エキスの添加によりビオチンの生合成が促進されるために, ビオチンによる repression を受けるためであろうと考えられるが, この点については今後さらに検討する必要がある.

要 約

細菌によるビオチン活性物質の蓄積に対する酵母エキ

ス, 肉エキス, ペプトンおよび金属塩の効果について検討し, 以下に示すような結果を得た.

(1) 細菌によるデスチオビオチンからのビオチンの生成はペプトン, 酵母エキスおよび肉エキス等の添加により著しく増大した. これらのうちで, 酵母エキスが最も有効であった.

(2) 酵母エキス中に存在すると考えられる既知のビタミン類, 核酸塩基, 無機塩類等について検討し, 無機塩類がビオチンの生成に対して特異的に有効であり, そのうち鉄塩が特異的に有効であることが明らかとなった.

(3) ビメリン酸からのデスチオビオチンの蓄積は, 酵母エキスまたは鉄塩の添加により強く抑制された.

終りにのぞみ, ご指導とご鞭撻を賜った京都大学教授緒方浩一博士ならびに香川大学教授堀明博士に感謝の意を表します.

本研究の一部は昭和 46 年 10 月, 日本農芸化学会関西支部・西日本支部合同大会において発表した.

- (1) T. Tsuboi, C. Sekijo, Y. Yoshimura and O. Shoji: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1135 (1967).
- (2) K. Ogata, Y. Izumi and Y. Tani: *ibid.*, **34**, 1872 (1970).
- (3) M. A. Eisenberg: *J. Bacteriol.*, **86**, 673 (1963).
- (4) 岩原章二郎, 中野 咲: 農化, **46**, 467 (1972).
- (5) S. Iwahara, S. Takasawa, T. Tochikura and K. Ogata: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 385 (1966).
- (6) J. R. Norris and D. W. Ribbons: "Methods in Microbiology," Vol. 3 A, Academic Press, London and New York, 1970, p. 255.