各種水産物中の動物性蛋白因子 (APF) 及びビタミン B₁₂ について—Ⅶ. 大腸菌乾燥菌体によるビタミン B₁₂ の分解*

森 高 次 郎・前 田 安 彦

(東大農学部)

Animal Protein Factor (APF) and Vitamin B₁₂ in Marine Products—Ⅶ.

Degradation of Vitamin B₁₂ by the Vacuum-Dried

Cells of *Escherichia coli*

Takajiro MORI and Yasuhiko MAEDA

As previously reported, the authors have confirmed that vitamin B₁₂ is decomposed by several species of bacteria, such as *Escherichia coli*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* and others. To ascertain the presence of the vitamin B₁₂ destroying enzyme, several experiments were carried out, using *Escherichia coli*. In these experiments vitamin B₁₂ was determined by the *Euglena* method, after digesting bacterial cells with trypsin.

The extracellular enzyme was not detected, as the culture medium revealed no decomposing activity on the vitamin. The intact cell suspension, however, degraded the vitamin under the presence of bacteriostatic agents such as toluene, chloroform and thymol as shown in Table 1. The cells killed and dried by Lyophil method were capable for the vitamin degradation, whereas the activity was lost entirely in the azone-dried cells (Table 2).

前報¹⁾に於て水産物より分離せられる主なる細菌たる *Pseudomonas* 及び *Achromobacter* 属中にビタミン B₁₂ を分解するものの多い事を明かにし、一方各種一般細菌の B₁₂ 分解能を調べ *Escherichia* 属及び *B. subtilis* に分解力の強いもののある事を報告した。従来微生物の分解については何等報告なく著者等の研究が最初である。著者等は更に進んで最大の B₁₂ 分解力を示す *Escherichia coli* I を使用し B₁₂ 分解酵素の存在を証明しようと試みて 2, 3 の知見を得たので報告する。

実験の部に記す如く生菌体並びに低温真空乾燥菌体には B₁₂ 分解作用が認められたが細胞外酵素は検出されなかった。従つて細胞内酵素の存在が推定される。この酵素の抽出、性質等については追つて報告したい。

実 験

菌株は千葉大学腐敗研究所から分譲を受けた *E. coli* I を使用した。本菌は B₁₂ 5000 m μ を添加せる 5 cc の肉汁培養に於て 37°C 5 日間で B₁₂ を 2500 m μ (分解率 45%) にまで減少せしめた。尚 B₁₂ の定量は前回同様全て *Euglena* 法によつた。

1. 細胞外酵素作用

細胞外酵素の有無をみる為 2 日, 4 日, 10 日間普通肉汁中に菌を培養後, 菌体を遠心分離した培養液 9 cc をとり B₁₂ 液 50 m μ /cc を 1 cc 添加しトルオールで覆い 37°C に 5 日間放置後, B₁₂ の変化を調べた。この条件下では B₁₂ に変化なく細胞外 B₁₂ 分解酵素の存在を認めなかった。

2. 生菌体の B₁₂ に対する作用

E. coli I の細胞内酵素の存否をみる為 37°C, 2 日普通肉汁に静置培養後, 菌体を遠心分離により集め, これを 1 回洗滌後, 1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.0) に懸濁しその菌懸濁液の B₁₂ に対する作用をみた。

1955 年 5 月 6 日受理

* 本報告は昭和 29 年 7 月の日本水産学会に於て講演発表した。

即ち菌懸濁液 9 cc (乾燥菌量 70 mg/cc) に B₁₂ 液 5000 mγ/cc を 1 cc 添加し更に制菌剤として、トルオール、クロロフォルム、或いはチモールを加え、密栓して 37°C に放置した。別に懸濁液に B₁₂ 液を添加後直ちに 90°C、20 分加熱し、トルオールで覆ったものを対照とした。5 日後反応液を遠心分離にかけ菌体と上澄に分け、菌体は数回水で洗滌し洗液は先の上澄と合せた。このようにしてわけた菌体は更に酵素処理を行い、上澄、洗滌液と共に夫々 B₁₂ を測定した。実験は数回行い何れも同様の結果を得た。その一例を Table 1 に示す。

Table 1. Decomposition of vitamin B₁₂ by the intact cells of *E. coli* I.

	Survival vitamin B ₁₂ mγ after incubation for 120 hrs. at 37°C.			Decomposition rate
	Cells	Supernatant	Total	
Covered with toluene	500	3400	3900	31.5 %
" chloroform	450	3500	3950	31.0 %
" thymol	500	3200	3700	35.0 %
Control A*	400	5300	5700	

* The reaction mixture was initially heated for 20 min. at 30°C. and then incubated.

3. 乾燥菌体の B₁₂ に対する作用

E. coli I の凍結真空乾燥菌体及びアセトン乾燥菌体を作り B₁₂ に対する作用をみた。凍結真空乾燥粉末は *Lyophil* 法²⁾ によつて作成した。この粉末 500 mg を 1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.0) 9 cc に懸濁し B₁₂ 液 500 mγ/cc を添加し、更にトルオールにて覆つて B₁₂ に対する作用をみた。実験方法は上述生菌懸濁液の場合と同様に行つた。なお本粉末は、培養試験及び PROCA 氏染色により生活力を全く失つてゐる事を確認した。実験結果の一例を Table 2 に示す。

Table 2. Decomposition of vitamin B₁₂ by the vacuum-dried preparation of *E. coli* I.

	Survival vitamin B ₁₂ mγ after incubation for 120 hrs. at 37°C.			Decomposition rate
	Cells	Supernatant	Total	
Covered with toluene	350	3000	3350	36.8 %
" "	500	3200	3700	30.2 %
Control A*	450	4900	5350	
" B**	250	5000	5250	

* see Table 1.

** Cell suspension and vitamin B₁₂ solution were incubated separately, united at the definite period and heated immediately.

アセトン乾燥粉末は BÜCHNER³⁾ の zymin の製法に準じて唯温度を約 -10°C に保つて作り、乾燥量 500 mg を使用し上記真空乾燥の場合と同様に B₁₂ に対する作用を調べたが、全く B₁₂ 分解力を示さなかつた。

結果並びに考察

以上の結果から *Escherichia coli* I は休止状態、即ち栄養分を与えず、且つトルオール等の制菌剤の存在下に B₁₂ を分解し、又真空乾燥 (*Lyophil* 法) によつて全く生活力を失つた状態に於てもビタミン B₁₂ を分解する事が判つた。これは *E. coli* I にビタミン B₁₂ 分解酵素が存在する事を示すものと考えられる。

著者等が水産学会に於て講演せる後 J. JÄNNES が音波及びアセトンで殺した *E. coli* 細胞が B₁₂ を吸収することを報告した。然し我々の実験に於ては細胞内に吸収される B₁₂ があつたとしても酵素消化により当然溶出される筈で従つて JÄNNES の報告により著者等の実験結果並に結論に何等変更の必要を認めない。

文 献

- 1) 森・橋本・前田：日水産，20，604 (1954).
- 2) E. W. FLOSDORF: "Freeze-Drying", Reinhold Publishing Corporation, New York (1949).
- 3) E. BÜCHNER: Ber., 35, 2376 (1902).
- 4) J. JÄNNES: Acta Physiol. Scand., 31, 183 (1954); C. A.: 48, 12892 (Nov. 1954).