腐敗した細菌培地に生成した SH 基に対する 合成ビタミン K 化合物の反応

北 御 門 学
(九州大学農学部水産製造学教室)

Reactions of Synthetic Vitamin K Compounds to SH Group produced in Spoiled Bacterial Medium Manabu KITAMIKADO

Antibacterial powers of VK compounds in the medium spoiled by microbe were compared with those in the fresh medium, and the following results were obtained.

(1) When tested in the glucose-salt or caseinhydrolyzate—glucose-salt medium, the antibacterial activities of VK compounds were the same both in the fresh and spoiled media. When tested in the peptone-glucose-salt medium, however, VK compounds inhibited the growth of microbe less remarkably in the spoiled medium than in the fresh medium.

(2) There was a considerable amount of a group active to p-chloromercuribenzoate in the spoiled peptone-glucose-salt medium, and the group also had high activity to VK compounds.

(3) Consequently, it was considered that free SH groups occurred in the spoiled peptone, and the group interfered with the antibacterial action of VK compounds.

食品中には概ね蛋白質が含まれているが、この蛋白質は未変化の型ばかりでなくその一部分、或は大部分が何等かの变化を受けている場合も多い。蛋白質が変性或は分解された場合には屢々遊離の SH 基が増加するが、SH 阻害剤を防腐剤として食品に加えると、この活性化した SH 基は防腐剤の働きを阻害するであろう。また微生物の増殖によつて peptone 水中に nitroprusside 反応陽性の物質が増加するから、微生物の働きを利用して製造した食品中にも活性 SH 基が存在するかも知れない。著者は細菌の増殖しつつある培地中の活性 SH 基を定量すると共に、この活性 SH 基は SH 阻害剤である合成ビタミン K 化合物（以下 VK と略記する）と反応し得るかについて検討したので報告する。

実 験 及 び 考 察

1) VK₃ と cysteine との呈色反応に及ぼす腐敗培地の影響

腐敗培地中には VK の働きを阻害する物質が存在するか否かを検する為に次の実験を行つた。4種の細菌を peptone-glucose-salt 培地 (Anderson の M-9 培地に 2% の peptone を加えたもの) に 30°C で培養し、一定時間毎にその培養を遠心分離した。上澄液に 50 µg/ml の濃度になる如く VK₃ を添加し、30°C で 1 時間放置した。その 1 ml を水 15 ml で稀釈したものに 1 mg/ml の cysteine 水溶液 1 ml と 4.5 M の ammonia 水 1 ml とを加えて 20 分間発色させた。新鮮な培地を用いて同様に処理したものの発色度を 100 とした場合の各腐敗培地中での発色度を Table 1 に示した。この結果腐敗培地に添加された VK₃ の 1 部は cysteine との呈色反応に関与し得なくなることが判明した。

2) 細菌培養中における VK₃ 活性の減少

VK 含有培地で細菌に代謝を行わせた場合に、添加されていた VK の SH 化合物に対する反応力はいかように変化するかを検する為に次の実験を行つた。0.4 mg/10 ml の割合に VK₃ を含有する peptone-glucose salt 培地に上記の 4 種の細菌を接種すると、*Escherichia coli* と *Pseudomonas aeruginosa* とは増殖する

が *Bacillus subtilis* と *Micrococcus perflavus* とは増殖し得ない。30°C で培養後一定時間毎に遠心分離して得た上澄液 10 ml に 0.1 mg/ml の glutathione 水溶液 10 ml を加えて 30°C に放置して培地中の VK₃ と反応させた。60 分後残存する glutathione を前報²⁾と同様に amperometric titration によつて定量して Table 2 の如き結果を得た。VK₃ 含有培地で細菌に代謝を行わせると添加されていた VK₃ は SH 基に対する

Table 1. Color-reaction between VK₃ and cysteine in the spoiled media obtained by the centrifugation of various bacterial cultures.

Microbe	Age of culture(days)				
	0	1	2	3	5
<i>Escherichia coli</i> *	100	81	72	63	62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	82	70	65	64
<i>Bacillus subtilis</i>	100	86	85	82	81
<i>Micrococcus perflavus</i>	100	88	83	79	80
None of bacterium (contr.)	100	100	100	100	100

Table 2. Amperometric titration of 1 mg. glutathione in the spoiled media initially containing 0.4 mg. VK₃/10 ml.

Microbe	Age of culture(days)				
	0 (mg.)	1 (mg.)	2 (mg.)	3 (mg.)	5 (mg.)
<i>E. coli</i>	0.48	0.72	0.80	0.95	0.98
<i>P. aeru</i>	0.48	0.72	0.87	0.91	0.94
<i>B. subt.</i>	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
<i>M. perf.</i>	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
None of bacterium	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48

反応力を著明に減少する。たとえば 5 日後の *E. coli* 培養では添加された glutathione は殆んど全量が残存するから、0.4 mg/10 ml の VK₃ の殆んど全部が SH 基に対する活性を喪失しているものと見做し得る。

3) VK₃ 感受性細菌に対する VK₃ の抗菌力の減少

peptone 含有培地に添加された VK₃ は抵抗性細菌の増殖によつて SH 基に対する反応力を減少すると共に感受性細菌に対する増殖抑制効果をも減少するかどうかを検討した。VK₃ 含有 peptone-glucose-salt 培地に *E. coli* を接種し、30°C で一定時間培養後遠心分離して菌体を除却した。上澄液 10 ml づつを試験管にとり、115°C で 15 分間加熱殺菌したものに感受性細菌である *M. perf.* を接種して、30°C、48 時間後に増殖の有無を検して Table 3 の如き結果を得た。

Table 3. The growth of *Micrococcus perflavus* in the spoiled media which were obtained by the centrifugation of *Escherichia coli* cultures initially containing VK₃.

		Age of <i>E. coli</i> culture (days)					
		0	1	2	3	4	5
VK ₃ mg./10 ml. <i>E. coli</i> culture	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	0.1	+	+++	+++	+++	+++	+++
	0.2	—	±	+	+++	+++	+++
	0.3	—	—	—	+	++	++
	0.4	—	—	—	—	+	++
	0.5	—	—	—	—	±	+

この場合 115°C、15 分間の加熱によつて VK₃ の *M. perf.* に対する抗菌力は Table 4 の如く減少する。然し乍ら 0.2 mg/10 ml の VK₃ を含有する培地は加熱されても *M. perf.* の増殖を許さないものであるから、

Table 4. The growth of *Micrococcus perflavus* in the VK₃ containing medium (pH 7.2) which was heated previously at 115°C. for 15 min.

VK ₃ mg/10 ml.	0	0.1	0.2	0.3	0.4
Heated	+++	+	±	—	—
Contr. (no heated)	+++	±	—	—	—

0.5 mg/10 ml の VK₃ を添加した培地は *E. coli* の増殖によつて 5 日後には 0.2 mg/10 ml 以下の VK₃ の効力しか有せぬようになっていることが判明する。

4) caseinhydrolyzate-glucose, glucose-salt に培養中における VK₃ 活性の減少

3% caseinhydrolyzate + 2% glucose 培地と Anderson の M-9 培地とに夫々 0.3 mg/10 ml の VK₃ を添加後 *E. coli* を接種し, peptone-glucose-salt 培地の場合と同様にして SH 基との反応力の減少を検討したが 30°C, 30 日間に互つて VK の活性は殆んど減少しなかつた。故に peptone を含有する培地においてのみ VK の活性が減少することが判明した。

5) peptone 含有培地に培養中の遊離 SH 基の量

既述の如く微生物が増殖した peptone 含有培地中には SH 基と思われる活性基が存在するが, その量は VK の抗菌力に影響する程のものであるか否かを検討した。peptone を添加した Anderson の M-9 培地に *E. coli* を 30°C で培養し, 一定時間後の遠心上澄液 20 ml 中の遊離 SH 基を amperometric に定量した。但し 10% peptone 含有のものだけは水で 10 倍に稀釈してから滴定した。その結果によると Table 5 に示

Table 5. SH groups expressed as γ of cysteine in 20 ml. of the media spoiled by *Escherichia coli*.

		Age of <i>E. coli</i> culture (days)					
		0	1	2	4	6	9
Percents of peptone in <i>E. coli</i> culture	0.00	0	0	0	0	0	0
	0.01	0	0	8	10	8	7
	0.10	0	41	57	62	54	29
	1.00	0	129	161	222	89	25
	10.00	0	216	446	662	200	46

す如く peptone さえ存在すれば相当量の SH 基が生成するから, VK の抗菌力に影響を与えることが予期される。生成した SH 基が細菌の代謝の衰えと共に消滅するのは酸化されるからであろう。

Amperometric titration によつて表われたものが SH 基であることは Table 6 に示す如く 20 ml の腐敗培地中に過剰の p-chloromercuribenzoate を添加し, 室温で 10 分間放置すると滴定値が 0 となることから殆んど確実である。またこのものが VK と反応し得ることは VK₃, VK₅, VK₃-sodiumbisulfite と室温で 10 分間反応させるることによつて減少することから明らかである。

Table 6. Reaction of SH agents to SH groups produced in the spoiled medium.

SH agent	None of agent	PCMB	PCMB	VK ₃	VK ₃	VK ₅	VK ₅	VK ₃ -Na=bisulfite
mg.		0.3	0.7	0.2	0.4	0.2	0.4	0.4
SH groups in the spoiled medium (expressed as γ of cysteine)	137	32	0	77	38	71	41	77

摘 要

細菌によつて腐敗した培地における合成ビタミン K 化合物の抗菌力と新鮮な培地における抗菌力とを比較して次の結果を得た。

(1) glucose-salt 培地或は caseinhydrolysate-glucose-salt 培地において試験した場合には、腐敗培地と新鮮な培地とにおけるビタミンK化合物の抗菌力は相違しなかつた。然るに peptone-glucose-salt 培地において試験した場合は、腐敗培地における抗菌力は新鮮な培地における抗菌力よりも弱かつた。

(2) 腐敗した peptone-glucose-salt 培地中には p-chloromercuribenzoate に対して活性な基が相当量存在し、その基はまたビタミンK化合物に対しても高い活性を示した。

(3) その結果、腐敗 peptone 中には遊離の SH 基が生成しており、その SH 基がビタミンK化合物の抗菌作用を抑制すると考察した。

終りに御指導と御校訂を賜った富安行雄教授に謝意を表する。

文 献

- 1) 松山 晃: 農化, **28**, 299 (1954); **28**, 304 (1954).
- 2) 北御門 学・森 閑男: 本誌, **20**, 237 (1954).