

〔醸酵工学 第55巻 第1号 51-55. 1977〕

酵母および細菌によるベンゾ (a) ピレンの 吸収挙動について*

堀津 浩章・杉浦 正久・友枝 幹夫

岐阜大学農学部農芸化学科

Some investigations for determination of benzo(a)pyrene, and about absorption behavior of benzo(a)pyrene to yeast or bacterium. HORITSU, H., M. SUGIURA, and M. TOMOEDA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Gifu University, Kagamihara, Gifu, 504) Hakkokogaku 55: 51-55. 1977.

The authors found thin layer chromatography better than gas chromatography for benzo(a)pyrene determination.

Experiments on absorption behavior of benzo(a)pyrene into yeast or bacterium showed that for *Saccharomyces cerevisiae*, the absorption ratio extractable with methylene dichloride from dry cells was 44.9% and the absorption ratio extractable with benzene from crushed cell homogenate was 55.1%, whereas for *Escherichia coli* these ratios were 98.4% and 1.6%, respectively.

Thus there is a great difference in absorption behavior for benzo(a)pyrene between *S. cerevisiae* and *E. coli*.

石油 *n*-パラフィンには非常に微量ではあるが、発癌性多環芳香族化合物、ベンゾ (a) ピレンが含まれているとも言われ、¹⁾ そのため石油 *n*-パラフィンを炭素源として微生物蛋白質を生産する際には、ベンゾ (a) ピレンの完全除去が大切である。ベンゾ (a) ピレンの定量には (1) ガスクロマトグラフィー、(2) ペーパークロマトグラフィーおよび (3) 薄層クロマトグラフィー (TLC) が検討され、(1) については脇阪・中山²⁾ により詳しく報告され、(2) については Hoffmann³⁾ により、そして (3) については松下⁴⁻⁷⁾ により詳しく報告されている。特に (3) については、アルミナ G およびアセチル化セルロースの二層一次または二次 TLC、溶媒抽出、分光蛍光分析法により高感度の方法として特に大気または重油、灯油等の気体や液体の試料からベンゾ (a) ピレンを含むいろいろな多環芳香族炭化水素の分離、同定に使用されている。さらに松下⁸⁾ は Grimmer⁹⁾ の方法に改良を加え、市販酵母について、それに含まれる微量のベンゾ (a) ピレンの抽出・定量に応用している。

これに対し著者らの目的はベンゾ (a) ピレン存在下で微生物を培養した際のベンゾ (a) ピレンの行方を追跡すること、またその吸収分布を調べることであり、濃度を松下⁸⁾ の報告よりもはるかに高濃度を使用し、また分布も低濃度から高濃度とかなり広い分布をもつために、松下⁸⁾ の方法を改良することも必要となった。さらに本報では生体内分布を調べるため、なるべく生体成分を変性させないことも必要となる。例えば松下⁸⁾ の方法では酵母よりベンゾ (a) ピレンをジメチルスルホキシドあるいは強苛性ソーダ、強塩酸などで処理している。これらは生体内のいろいろな吸収レベルをみるには必ずしも適当ではない。上述の (2) については既に松下⁸⁾ によって不適当とみなされたので、ここでは (1) および (3) について比較したところ、(3) が優れていることを認めた。そこで本定量法を用いてベンゾ (a) ピレン存在下で酵母および細菌を培養した際、酵母および細菌がベンゾ (a) ピレンの吸収に対し、いかなる挙動を示すか比較したところ、酵母および細菌では、その吸収挙動にかなりの差異が認められたので、その結果について報告する。

* 微生物における毒性有機化合物吸収に関する研究 (第1報)

実験方法

供試化合物 ベンゾ (a) ピレンは和光純薬製のものを使用した。血清については常法⁹⁾により調製した。

供試菌株 実験に供した *Saccharomyces cerevisiae* No. 511 株および *Escherichia coli* No. 187 株は、いずれも当研究室保存菌株である。

培地組成、培養法およびベンゾ (a) ピレンの分離法 酵母、細菌の培地として Moore の培地¹⁰⁾ (グルコース 0.5%, ポリペプトン 0.5%, 酵母抽出物 0.2%, 磷酸第二カリ 0.2%) を用い、酵母については pH 5.5, 細菌については pH 7.1 とした培地を 500 ml の肩付きフラスコに 100 ml 入れ、殺菌後、酵母または細菌を 1 白金耳接種し、酵母は 28°, 細菌は 35° で、それぞれ 24 時間振盪培養 (往復振盪, 振幅 7 cm, 120 cycle/min) した後、各々の培養物について、5,000×g, 5 分間遠心分離し、各菌体を分離、生理食塩水にて洗浄したものを各洗浄菌体とした。ベンゾ (a) ピレン 2.5 mg を 0.25 ml のジメチルスルホキシドに溶解したものを、1 夜流水にて透析した血清 30 ml に加え可溶化させたものを殺菌済の Moore 培地 70 ml に加え、全容量を 100 ml とした後、洗浄菌体 (酵母、細菌共に乾燥重量 100 mg) を加えて 24 時間、それぞれの温度で振盪培養した培養混合物を 5,000×g で 5 分間遠心分離後、菌体を 30% 血清で洗浄し、デシケーター中で五酸化磷存在下で乾燥した。乾燥菌体からベンゾ (a) ピレンの抽出については、一般的にはベンゼン抽出法が行われているが、ここでは最近、平川等¹¹⁾により改良された 2 塩化メチレン法を参考にした。すなわち、菌体の加温処理にもとづく影響を少なくするため、ベンゼン (bp 80°) の代わりに、2 塩化メチレンで 48 時間還流抽出を行った。この抽出区分を菌体・2 塩化メチレン抽出区分 [Fraction (I)] とした。2 塩化メチレン抽出後の菌体については、水を加えて Braun cell homogenizer にてガラスビーズ (0.45 mmφ) 存在下総計 10 分間破碎した。なお、この水分を含んだホモジネートよりベンゾ (a) ピレン抽出に当たっては、2 塩化メチレンより水に対する溶解度が 1/30 であるベンゼンで抽出した。その抽出区分を菌体ホモジネート・ベンゼン抽出区分 [Fraction (II)] とした。

ベンゾ (a) ピレンの定量法 ベンゾ (a) ピレンの定量法については、ガスクロマトグラフィーと TLC について比較実験を行った。

1) ガスクロマトグラフィーによる定量法 ベンゾ

(a) ピレンのガスクロマトグラフィーによる定量法については、脇阪・中山の方法を参考にした。装置は島津製 GC4A 型を用い、パッキングとして 1.3% SE-30 を用い、サポーターとして Chromosorb W (40-60 mesh) を直径 4 mm 長さ 200 cm のガラス管に充填させたカラムを使用した。カラム温度は 230°, キャリアガス (N₂) は流速 20 ml/min, FID 検出器を使用した。

2) TLC による定量法 Avicel SF (旭化成製) 10 g を蒸留水 30 ml に加え、10~15 分間攪拌後、アプリケーションにてプレートを調製した。Silica Gel G については、Silica Gel G (Merck 製) 10 g を蒸留水 20 ml に加え、1 分間攪拌した後、アプリケーションにてプレートを調製した。なお TLC については展開前の処理が試料の分離に大きな影響を与えるので、この点について次の 4 通りの方法を検討した。

a. プレートに水を噴霧した後、70°, 20 分間処理後、固定相溶媒として *N, N* ジメチルホルムアミドでプレートを処理した。

b. *N, N* ジメチルホルムアミドをプレートに噴霧した後、70°, 20 分間処理した。

c. プレートに水を噴霧した後、70°, 20 分間処理、次いで *N, N* ジメチルホルムアミドを固定相溶媒として処理後、温風乾燥した。

d. プレートに水を噴霧後、室温にて 12 時間乾燥させた後、*N, N* ジメチルホルムアミドを固定相溶媒として処理した。

上述の 4 通りのいずれかの方法により前処理を行ったプレートに試料およびベンゾ (a) ピレン標品をマイクロシリンジで 50 μl 添加した後、イソオクタンで約 90 分間展開した。ベンゾ (a) ピレンの検出は紫外線鑑識器により 2537 Å での青紫色蛍光にもとづき確認した。薄層板よりのベンゾ (a) ピレンの抽出および定量については、上述の a~d のいずれかの方法で展開した TLC のスポットについて次の方法を用いた。すなわち内径 5 mm のガラス管の中央にくびれをつくり、一端を毛細管状に引き延ばす。毛細管側のくびれのところにガラスウールをつめる。他端は、そのままの太さでサッカーに連結する。展開した TLC のベンゾ (a) ピレンのスポットを上述の装置で吸引しながらスポット部分を毛細管でかきとり、かきとった吸着剤を試験管に移す。次いで吸引側よりベンゼンを加えてガラスウールに残って付着している TLC 吸着剤からベンゾ (a) ピレンを抽出する。この操作をもう一度繰り返し充分にベンゾ (a) ピレンを回収する。次いで口径 0.45 μm

のミリポアフィルターにてベンゾ (a) ピレンを含むベンゼン抽出液を濾別した後、抽出液を濃縮し、改めてベンゼンにて抽出、一定量とし分光光度計にて記録紙に吸収曲線を描かせる。定量法については吸収曲線の4つの吸収ピークの最大吸収波長 338.9 nm について Wedgwood のベースライン法¹²⁾ によりベンゾ (a) ピレンを定量した。

結果および考察

ベンゾ (a) ピレン定量法に対するガスクロマトグラフィーおよび TLC の比較 従来の方法にもとづき、1, 2, 4, 6, 8 および 10 μg のベンゾ (a) ピレン標品についてガスクロマトグラフィーによる定量法を検討した。実験結果の1例として6 μg のベンゾ (a) ピレンについてのガスクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

Fig. 1 で明らかなように、ベンゾ (a) ピレンのピークに対する溶媒 (ベンゼン) のピークのテーリングによる影響も著しく、またベンゾ (a) ピレン自体のピークも対称性を欠くことが示される。なおベンゾ (a) ピレン 1, 2, 4, 8 および 10 μg について実験した結果も同じような溶出パターンを示した。次にガスクロマトグラムよりベンゾ (a) ピレンの定量について検討するため、各濃度のパターンについて Fig. 1 の斜線に示されたような区画について、その面積比を重量法によって測定した結果を Table 1 の2列目に示す。

次に TLC によるベンゾ (a) ピレンの定量について検討した。本実験は実験方法 2) に述べられた方法に

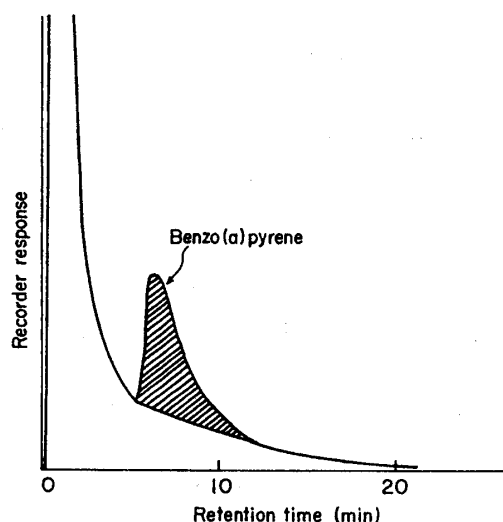


Fig. 1. Gas chromatogram of authentic benzo-(a)pyrene.

Concentration of benzo(a)pyrene, 6 μg .

基づき TLC の吸着剤として Avicel SF および Silica Gel G 両者について比較した結果、薄層上のスポットについては Avicel SF 使用の際には、標品が 4 μg 以下ではスポットも鮮明であったが 6 μg 以上の濃度ではスポットのテーリングも大きかった。一方、Silica Gel G については 30 μg までテーリングが見られなかった。次いで最も実験結果の良かった 2) d) によってベンゾ (a) ピレン標品を展開した後、ベンゼンにてベンゾ (a) ピレンを回収し定量した結果を、Table 1 の3列目に示す。

Table 1 から明らかなようにベンゾ (a) ピレンの定量法としては、TLC がガスクロマトグラフィーに比べ優れていることが示された。そこで本実験では TLC によってベンゾ (a) ピレンを定量した。なお、薄層よりベンゾ (a) ピレンの回収溶媒として White¹³⁾ はメタノールを用いているが、著者らの実験結果からは、メタノールは回収率が悪かった。また溶媒濾過に当たっては、濾紙を使用すると、かなりのベンゾ (a) ピレンが吸着されるので、ミリポアフィルター (0.45 μm) を使用することが大切である。プレートの厚さについても、いろいろの厚さで検討したが、薄い方が望ましく、ここでは 0.2 mm を採用した。吸着剤よりの抽出回数については、2回で充分であった。TLC の吸着剤の前処理としては先に述べた a から d まで4通りについて検討した結果、d が最も良い結果を与えた。

酵母および細菌のベンゾ (a) ピレン吸収挙動について *S. cerevisiae* No. 511 株および *E. coli* No. 187 株について、25 ppm のベンゾ (a) ピレン存在下で洗浄菌体を用い、24時間振盪培養した後、菌体に吸収されたベンゾ (a) ピレンの分別を行った。その結果を Table 2 に示す。Table 2 より、まず乾燥菌体重量当たりのベンゾ (a) ピレン吸収能は、*E. coli* が *S. cerevisiae* に比べ約2倍と、はるかに大きいことが認められた。次にその内訳についてみると、菌体・2塩化メチレン-ベンゼン抽出量については *S. cerevisiae* では全吸収量の 44.9% に対し、*E. coli* では 98.4% となり、*E. coli* では *S. cerevisiae* に比べ、菌体より抽出されやすい状態で存在しているものと考えられる。これに対し *S. cerevisiae* では一度吸収されたベンゾ (a) ピレンは、かなり抽出されにくい状態で存在していること、言い換えれば、乾燥酵母そのままの状態では非常に抽出されにくい形になっていること、それに反し、*E. coli* では非常に高濃度のもとで培養したにもかかわらず吸収量が低いことの2つの新しい知見を得た。しかし本実験で使用されたベン

Table 1. Comparison of gas chromatography with thin layer chromatography for benzo(a)pyrene determination.

Conc. of benzo(a)pyrene ($\mu\text{g/ml}$)	Gas chromatography	Thin layer chromatography
	Ratio of area	Ratio of height
0	0	0
1	1.00	1.00
2	2.37	1.98
4	3.58	3.85
6	5.16	5.88
8	9.17	7.90
10	10.63	9.70
20	—	18.85
30	—	29.27

Note: Values are relative to that of 1 $\mu\text{g/ml}$ of benzo(a)pyrene taken as 1.0.

Table 2. Distribution of benzo(a)pyrene between methylene dichloride extractable fraction from dried cells (I) and benzene extractable fraction from cell homogenate (II) of *S. cerevisiae* or *E. coli*.

Fraction		(I)		(II)	
Microorganism	Dry weight (mg)	Amount absorbed (μg)	Absorption* ratio (%)	Amount absorbed (μg)	Absorption* ratio (%)
<i>S. cerevisiae</i>	1174	81.5	44.9	100.0	55.1
<i>E. coli</i>	887	294.5	98.4	4.8	1.6

Note: *Absorption ratio = $\frac{\text{Benzo(a)pyrene absorbed into fraction } (\mu\text{g})}{\text{Total amount of absorption } (\mu\text{g})} \times 100$

S. cerevisiae or *E. coli* cells (initial, 100 mg dry weight) were cultivated in a 500 ml shaking flask containing 100 ml of Moore's medium in the presence of 2.5 mg benzo(a)pyrene for 24 hr.

ゾ (a) ピレンの濃度は実際に比べ、非常に高濃度で行われたものであり、この結果をそのまま実際にあてはめることは出来ない。また、この操作で用いた溶媒抽出で、いかなる成分が、それぞれの区分に抽出されてくるかについては今後さらに詳しい研究を必要とする。さらにベンゾ (a) ピレン以外の炭化水素吸収についても併せ考えなければならないと思う。

要 約

著者らは、ベンゾ (a) ピレンの定量法として TLC が優れていることを認めた。次に *S. cerevisiae* および *E. coli* のベンゾ (a) ピレン吸収挙動を検討した結果、*S. cerevisiae* では全吸収量に対し、菌体・2 塩化メチレン・ベンゼン抽出率は44.9%であるのに対し、*E. coli* では98.4%であった。逆に菌体ホモジネート・ベンゼン

抽出率は *E. coli* ではわずかに1.6%であるのに対し、*S. cerevisiae* では55.1%であり、このことから *S. cerevisiae* と *E. coli* との間には、ベンゾ (a) ピレンの吸収挙動に大きな差異が存在することを認めた。

文 献

- 1) 渡辺：石油と微生物, 5, 32 (1971).
- 2) 脇阪, 中山：東京都衛生研究所年報, 14, 67 (1964).
- 3) Hoffmann, D., Wynder, E.L.: *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, No. 9, 91 (1962).
- 4) Matsushita, M., Suzuki, Y.: *Bull. Chem. Soc. Japan.*, 42, 460 (1969).
- 5) 松下, 江角, 山田：分析化学, 19, 951 (1970).
- 6) 松下, 江角, 鈴木：分析化学, 21, 331 (1972).

- 7) 松下, 江角: 分析化学, **21**, 1594 (1972).
- 8) Grimmer, G., Wilhelm, G.: *Deutsch. Lebensmittel Rundschau*, **65**, 229 (1969).
- 9) 医科学研究所学友会編: “細菌学実習提要”東京, 丸善, 44 (1969).
- 10) Moore, B. G., Harrison, A. P.: *J. Bact.* **90**, 989 (1965).
- 11) 平川, 橋本, 岡崎, 福井, 渡辺: 日本農芸化学
- 会講演要旨集, 380 (1971).
- 12) Wedgwood, P. G., Cooper, R. L.: *Analyst*, **79**, 163 (1954).
- 13) White, R. H., Howard, J. W.: *J. Chromato.*, **29**, 108 (1967).

(昭51. 8. 4受付)