

[J. Ferment. Technol. Vol. 48, No. 2 p. 73~78, 1970]

微生物による炭化水素から 1-Phenazinecarboxylic acid の生成

東原 孝規・佐藤 昭雄

(工業技術院微生物工業技術研究所)

Formation of 1-Phenazinecarboxylic Acid from Hydrocarbons by Microorganisms

Takanori Higashihara and Akio Sato

(Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Inage-higashi, Chiba, Japan)

In the course of isolation of hydrocarbon utilizing microorganisms, several strains were found to produce yellow crystalline pigment on both agar slant and plate culture media containing kerosene as the sole carbon source.

This pigment was isolated from a submerged culture fluid and an agar plate culture medium and identified as 1-phenazinecarboxylic acid by IR- and UV-absorption spectra and other chemical and physical features.

The yields of crude material per liter of the culture fluids of kerosene, *n*-hexadecane and *n*-tetradecane media were 350~320 mg, 150~40 mg and 70~40 mg, respectively. When glucose was used as the sole carbon source in place of hydrocarbon in shake culture, 40~20 mg 1-phenazinecarboxylic acid was obtained per liter of the culture fluid.

The yellow crystalline pigment-forming microorganism possessed general characteristics of genus *Pseudomonas*.

緒 言

微生物による 1-phenazinecarboxylic acid の生成は *Pseudomonas aureofaciens*^{1~4)}, *Pseudomonas aeruginosa*^{5,6)}, *Streptomyces misakiensis*⁷⁾, *Nocardiaceae*⁸⁾ などで観察されている。しかしながら炭化水素を唯一の炭素源とする培地での生成は報告されていない。

著者らは炭化水素の微生物的利用, 開発を目的として炭化水素資化性菌を多数分離してきた。これらのうち数菌株が kerosene を唯一の炭素源とする寒天平板培地および斜面培地に黄色結晶を生成することを認めた (Fig. 1)。この物質を寒天平板培養および振とう培養の培養物から結晶として単離し, 理化学的諸性質

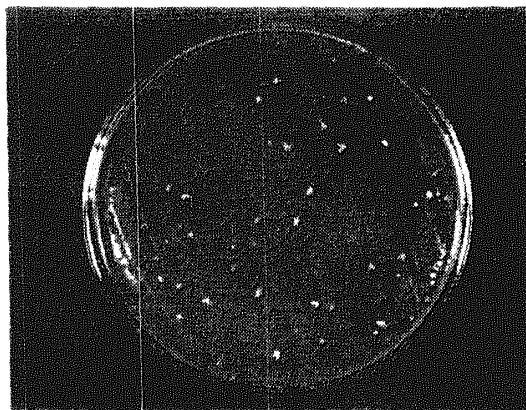


Fig. 1. Yellow crystalline pigment formation on agar medium containing kerosene by hydrocarbon-utilizing microorganism (diameter of Petri dish: 9 cm).

を検討した結果, 1-phenazinecarboxylic acid と同定した。

この物質の生産条件として数種類の炭素源について検討した。また本物質生産菌株の菌学的性質についても一部検討した。本報はこれらの結果について報告する。

実験方法

1. 炭化水素資化性菌の分離 千葉県製の油所で採取した土壌・廃液・油水など試料 37点から, Table 1 の培地で 2 回の集殖培養の後, 平板培養法にて炭化水素資化性菌を分離した (Fig. 2)。

Isolation sources

oil-soaked soils, waste waters, drain waters.

1st Enrichment culture

A: solid materials, 1g or liquid materials, 2-3ml.
B: 100ml of isolation medium in 500-ml Erlenmeyer flask.

C: on rotary shaker at 25°C for 7 days.

2nd Enrichment culture

A: 0.1~0.2ml of 1st enrichment culture.
B: 20ml of isolation medium in test tube (25 mm in diameter).

C: on reciprocal shaker at 25°C for 4 days.

Plate culture

A: 1 loop of 2nd enrichment culture (streaked).
B: 20ml of isolation agar medium in Petri dish (0.5ml kerosene was flooded over agar plate).

C: at 25°C for more than 7 days.

Slant culture

several plate cultures for purification.

Stock culture

Fig. 2. Isolation of microorganisms.

A: Inoculum, B: Medium, C: Cultivation.

2. 培養方法

A. 供試菌株 黄色結晶を生成する菌株のうち代表的な M3542 株を用いた。

B. 平板培養 Table 1 に示す寒天培地を滅菌後ペトリ皿 (2×9cm) に 20ml ずつ分注し, 一方 0.5ml の kerosene をペトリ皿ふた側のろ紙に吸収させ, 前培養液 (C項に示す) を 1 白金耳とり画線法にて塗抹, 25°Cにて 7~10日培養した。

C. 振とう培養 Table 1 に示す培地 (kerosene を除く) を 500-ml 容三角フラスコに 100ml ずつ分注

Table 1. Composition of isolation medium.

Hydrocarbon (kerosene)	20 ml
NH ₄ Cl	2.0 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
Na ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
MnSO ₄ ·4-6H ₂ O	1.0 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.5 mg
Yeast extract	0.1 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.2

When a solid medium was required, 2% agar was added to the medium.

し, 滅菌後別にろ過滅菌 (Seitz 型) した 2 ml の kerosene を接種時に添加した。前培養は大型試験管 (2.5 cm×20cm) に分離培地と同じ組成の培地 10ml を分注し, 0.2ml の kerosene を前記の方法に準じ添加, 寒天斜面培地から 1 白金耳とり接種 28°Cにて 3 日振とう培養した。この培養液を種菌として前記培養フラスコに 2 ml ずつ接種し, 28°Cにて 4 日~5 日振とう培養した (rotary shaker, 160 r.p.m.)。以下の実験に使用する培地は炭素源を除いてすべて Table 1 に示す分離培地を用いた。

3. 黄色結晶の単離および同定方法

A. カラムクロマトグラフィー 吸着剤は Merk 製の Silica Gel 0.05~0.20mm をつぎのように洗浄して用いた。Silica Gel を倍量のメタノール, 濃塩酸 (9:1) で 4~5 回洗い蒸留水で十分水洗して乾燥, 110°Cにて 1 時間活性化した。この吸着剤約 80 g を直径 2.5 cm, 長さ 66cm のカラムに充填し, 1 夜酢酸エチル, メタノール (10:3) の展開剤で洗浄後, 試料をアセトンに溶解し注入, 前記展開剤にて展開・分離した。なお流速は約 10ml/hr で行なった。

B. 薄層クロマトグラフィー プレートは Merk 製 TLC-plate Silica Gel F₂₅₄ (Pre-coated) を用いた。展開剤は酢酸エチル, メタノール, 水 (10:3:1) を使用して, 紫外線下で試料物質を検出した。

C. 赤外線吸収スペクトル 試料は KBr disk 法により調製, Perkin Elmer 製 421 型にて測定した。

D. 紫外外部吸収スペクトル 日立自記分光光度計 EPS-3T 型にて測定した。

4. 使用試薬 Kerosene は比重 0.794 (15.4°C) で10%分留198°C, 95%分留 236°C, 終点246°Cの小宗化学薬品 KK 製を使用した. *n*-hexadecane (GR), *n*-tetradecane (EP), 1-hexadecene (EP) は東京化成工業KK製を用いた. その他の試薬はすべて市販の JIS 特級品, 培地には 1 級品を使用した.

実験結果

1. 分離試料と黄色結晶生成菌株 黄色結晶を生成する菌株は試料37点のうち Table 2 に示す試料 9 点より分離された. この結晶を生成する菌株はM-2の試料を除いては, 一般に油を多く含んだ試料から分離されたが, 上記 9 試料以外について観察すると, 必ずしも油を多く含んだ試料から黄色結晶を生成する菌株が分離されるとは限らなかった. この実験で使用した菌株は試料M-3から純粋分離されたM3542株を使用した.

Table 2. Sample materials and yellow crystal-forming strains.

Sample No.	Sources	Properties	Strains isolated
M-2	in ditch beside an oil-separator	muddy water	5
M-3	about an oil-separator	oil-soaked soil (black, oily odor)	7
M-5	in a pool beside an oil-separator	oil-soaked soil (black, oily odor)	1
I-5	in settling-tank of oil-separator	oily sludge (black, oily odor)	3
I-6	in pump-area in the storage tank of crude oil	oil-soaked sand (wet, black, oily odor)	8
I-7	in pump-area in the storage tank of crude oil	oil-soaked sand (wet, black, oily odor)	11
I-8	in pump-area in the storage tank of crude oil	oil-stained water	9
I-9	in pump-area in the storage tank of crude oil	oil-soaked sand (black, oily odor)	9
I-10	in pump-area in the storage tank of crude oil	oil-soaked sand (oily odor)	10

2. 黄色結晶の単離

A. 平板培養 前記培養で平板培地に析出した結晶を寒天と共に切り取り, 乳鉢中でアセトンと共に磨砕・抽出した. この抽出操作を数回くり返し, 結晶をアセトン中に溶出, アセトン抽出液を吸引ろ過して寒天などの夾雑物を取除いた. ついでこのアセトン溶液を無水

硫酸ソーダにて脱水・ろ過し, ろ液を40°Cで減圧濃縮すると黄色結晶が得られた. なおこの結晶をメタノールで数回再結すると黄色繊細針状結晶 (mp 237.5~238°C) として得られた.

黄色結晶の生成量はこの結晶の析出が常に一定の割合で析出することなく不安定であったため, 正確な収量を得ることができなかった. しかし多量に析出した平板培地からの粗収量は 15~5 mg/plate (agar medium: 20ml, kerosene: 0.5ml) であった.

B. 振とう培養 前記培養 4 日で得た培養液は菌体も含めて reddish purple を呈し, pH 4.4~4.6 を示した. この培養液 1 l を 1 N HCl で pH 1~2 とし, 分液ロートを用いて倍量のクロロホルムで 2 回抽出した. このとき培養液の reddish purple は水層に残った. このクロロホルム溶液約 4 l をろ過し, 菌体などの夾雑物を取除き 1 l まで40°Cにて減圧濃縮した. このクロロホルム溶液を pH 10 の緩衝液 (NaHCO₃-NaOH) 約400ml とふりませ, 目的物質を水層に移行させた. この操作を 3 回繰返した. この pH 10 の水溶液を少量のクロロホルムで洗浄して, 水層に分散・残留している炭化水素・脂質などを取除いた. さらにこの水溶

Culture broth (1000ml, kerosene 20ml)

acidified to pH 1~2 with 1N HCl;
extracted with chloroform.

Chloroform solution Aqueous phase

filtered with filter paper;
extracted with pH 10 buffer solution.

pH 10 Buffer solution Chloroform solution

washed with chloroform;
acidified with 1N HCl;
extracted with chloroform.

Chloroform solution Aqueous phase

dehydrated with anhydrous Na₂SO₄;
concentrated in vacuo at 40°C.

Crude yellow crystals (336mg)

dissolved in acetone;
fed through a silica gel column;
developed with a mixture of 10 parts of ethyl-acetate and 3 parts of methanol.

Yellow effluent

concentrated in vacuo.

Yellow crystals (285mg)

recrystallized from methanol.

Yellow needles (mp 237.5~238°C)

Fig. 3. Isolation of yellow crystals.

液を 1 N HCl で酸性にして、等量のクロロホルムで 2～3 回抽出したのち、無水硫酸ソーダで脱水した。このクロロホルム溶液を減圧で濃縮すると yellowish brown の粗結晶 336mg が得られた。この粗結晶をアセトンに溶解して前記カラムクロマトグラフィーにて分離し、溶出液を濃縮すると黄色結晶 285mg を得た。この結晶をメタノールで 1～2 回再結すると黄色繊細針状結晶 (mp 237.5°C～238°C) となった。一方カラムクロマトを用いなくても上記粗結晶をメタノールで 4～5 回再結することによっても同純度の結晶が得られた。以上の操作を Fig. 3 に示す。なお色の判定は財団法人日本色彩研究所編、色の標準を使用した。

3. 黄色結晶の理化学的性質 平板培養および振とう培養物から単離した黄色結晶はつぎのような理化学的性質が一致した。この物質はクロロホルム、酢酸

エチル、アセトンによく溶解昇華性がある。メタノールから再結晶すると黄色繊細針状結晶となった。mp 237.5°C～238°C. (*uncorr.*, in open capillary). 元素分析は Found: C, 69.76; H, 3.61; N, 12.68. Calcd. for $C_{13}H_8N_2O_2$: C, 69.64; H, 3.60; N, 12.50 であった。薄層クロマトグラフィーによる性質は前記条件で R_f 0.64～0.66, スポットは黄色で紫外線下にて暗色を呈し、標準 1-phenazinecarboxylic acid と一致した (Fig. 4)。紫外吸収スペクトルは Fig. 5 に示すように、 $UV\lambda_{max}^{0.1N HCl}$ m μ : 250, 366 sh, 375, $UV\lambda_{max}^{0.1N NaOH}$ m μ : 253, 362 sh, 368, $UV\lambda_{max}^{MeOH}$ m μ : 251, 365 であり標準 1-phenazinecarboxylic acid と一致した。また赤外吸収スペクトルも Fig. 6 に見られるように標準品と一致した。質量スペクトルによると分子量 224 に示し, m/e 180 に phenazine と同様 base peak がみられた。(Fig. 7)。なお標準品との混融試験によっても融点の降下を示さなかった。

以上よりこの黄色繊細針状結晶は 1-phenazinecarboxylic acid と同定した。

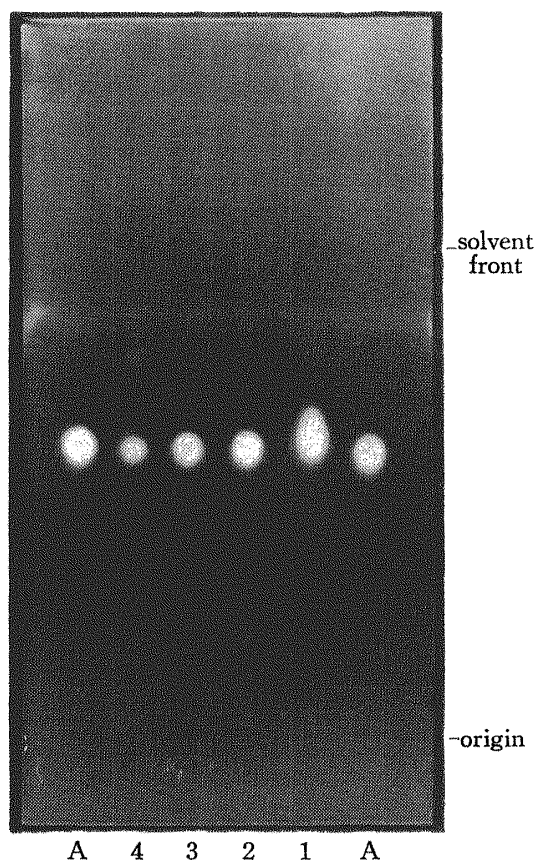


Fig. 4. Thin-layer chromatogram of crude yellow crystals.

- A. Authentic 1-phenazinecarboxylic acid.
- 1. From kerosene medium.
- 2. From *n*-hexadecane medium.
- 3. From *n*-tetradecane medium.
- 4. From glucose medium.

Solvent: Ethylacetate: methanol: water (10:3:1).

TLC plate: Silica Gel F₂₅₄ (pre-coated).

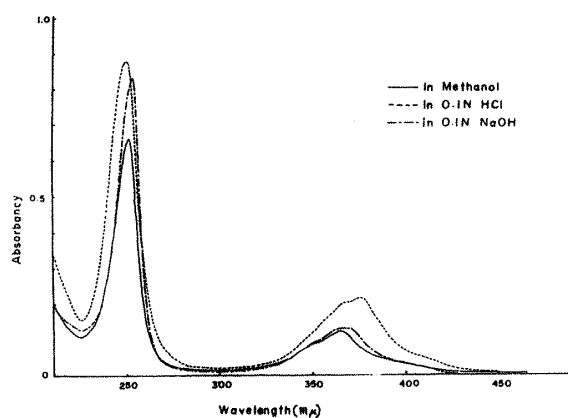


Fig. 5. Ultraviolet absorption spectra of yellow crystalline pigment.

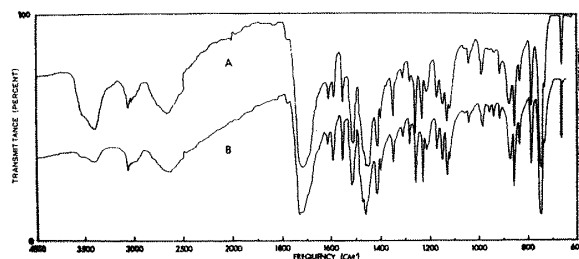


Fig. 6. Infrared absorption spectra of yellow crystalline pigment (A: authentic 1-phenazinecarboxylic acid, B: yellow crystalline pigment).

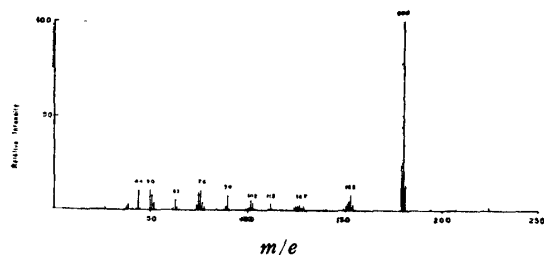


Fig. 7. Mass spectrum of yellow crystalline pigment.

4. 資化性炭化水素と 1-phenazinecarboxylic acid の生成量

Kerosene 以外の炭素源について資化性と本物質の生成量を検討した。培養は前記方法で kerosene を他の炭素源でおきかえた条件で行なった。その結果, kerosene, *n*-hexadecane, *n*-tetradecane がよく資化され, 1-hexadecene および glucose も資化された。しかし *p*-xylene, ethylbenzene, cyclohexane, ethylcyclohexane, cyclooctane は資化されなかった。

なおこの物質の生成量はカラムクロマトグラフィーによる精製前の粗収量として, 炭素源 kerosene の場合は 350~320mg/l, *n*-hexadecane で 150~40mg/l, *n*-tetradecane で 70~40mg/l, そして glucose では 40~20mg/l (glucose, 20g) であった。

5. M3542 菌株の菌学的性質 この菌株はグラム陰性の桿菌, 極べん毛で運動性がある。2%グリセリン肉汁寒天培地で dull blue green の水溶性色素を生成し培地中に拡散する。前記分離培地による振とう培養では 28°C, 1~2 日の培養で pale green の水溶性色素を生成し, 3~4 日の培養でこの色は消失して培地は reddish purple を呈する。

この菌株の特徴として, glucose を炭素源に用いると reddish purple の色素の生成はほとんど認められなかった。

Table 3. Cleavage of carbohydrates by Hugh and Leifson's method.

Condition Carbohydrate	Open tube	Covered tube
Glucose	+	±
Lactose	—	±
Sucrose	—	±

(Temperature 25°C, Age 7days)

+: Acid reaction, ±: Neutral or slightly acid reaction,

—: Alkaline reaction in the upper part of tube.

Table 4. Cleavage of carbohydrates with Barsiekow's and Ayers et al's media.

Carbohydrate	Medium	Growth	Acid	Gas
Glucose	Barsiekow	+	+	—
	Ayers	+	+	—
Lactose	Barsiekow	±	—	—
	Ayers	—	—	—
Sucrose	Barsiekow	±	—	—
	Ayers	—	—	—

(Temperature 25°C, Age 5days)

+: Positive reaction, ±: Similar growth to control, —: Negative reaction.

糖の分解については Hugh and Leifson 培地, Barsiekow 培地および Ayers らの培地を用いて試験した。結果を Table 3 および Table 4 に示す。

エタノールから酢酸の生成については Hugh and Leifson 培地 (開放) および Barsiekow 培地など用いて試験した。その結果この菌株は *Acetobacter aceti* IAM 1802 菌株でみられるような強い酸反応を示さなかった。

以上の菌学的諸性質から Bergey's *Manual of Determinative Bacteriology* 7th Edition により分類すると, この菌株は *genus Pseudomonas* に属すると考えられる。

考 察

微生物による 1-phenazinecarboxylic acid の生成は最初に 1956 年 A. J. Kluyver¹⁾ によって報告されている。それによるとこの物質を生成する *Pseudomonas aureofaciens* は kerosene の中で 3 週間懸濁された clay から分離されている。著者らが分離した菌株も目的は異なるが Kluyver が行なった条件と偶然にも類似している。しかし Kluyver がなぜ kerosene を菌株分離の過程で用いたか明確でない。

この実験から本菌株 (M3542) の特徴としてつぎのことが言える。1-phenazinecarboxylic acid の生成量は振とう培養において glucose 培地に比較し炭化水素培地を用いた場合の方が多かった。また炭化水素培地で水溶性 reddish purple の色素を生成するが glucose 培地ではこの色素の生成がほとんど観察されなかった。この reddish purple の色素は pH 2 近くで purplish red を呈し水層に移行し, pH 8 以上で grayish blue ないし blue green を呈し有機溶媒特にクロロホルムによく溶解 blue 系の色を呈することから pyocyanine

と推定している。

1961年 J. C. Senez ら⁹⁾ はパラフィン系炭化水素の脱水素反応において天然色素である pyocyanine が NAD と同じ親和性をもつ水素受容体として利用されることを報告している。また近年炭化水素培地で pyocyanine が高濃度で生成されることが知られている^{10,11,12)}。このようにフェナジン系の色素が炭化水素の代謝に関与していることが推察され、また前記 Kluyver の実験からも本物質の炭化水素培地における代謝は興味ある問題と思われる。

本物質の利用面を考察すると、1-phenazinecarboxylic acid は pyocyanine, oxychlororaphine, iodinin などの関連物質と同じように細菌の産生する色素抗生物質である。

最近、1-phenazinecarboxylic acid は藻類・高等植物などの成長を強く阻害するが、昆虫・魚・動物に対してはあまり毒性を示さないことから、除藻剤・除草剤としての用途が可能であることが報告されている^{13,14)}。またフェナジンおよびフェナジン系化合物は農薬・医薬としての開発研究が多くなされている^{15,16,17)}。

総 括

1. 分離された炭化水素資化性菌のうち数菌株が kerosene を唯一の炭素源とする寒天平板および斜面培地に黄色結晶を生成することを観察した。

2. この物質を平板培養および振とう培養物から結晶として単離し、元素分析, mp, TLC, UV, IR, などの理化学的性質を検討した結果、1-phenazinecarboxylic acid と同定した。

3. 1-Phenazinecarboxylic acid の粗収量は炭素源として kerosene, *n*-hexadecane, *n*-tetradecane, glucose を用いた場合、それぞれ 350~320mg/l, 150~40mg/l, 70~40mg/l, 40~20mg/l であった。

4. 本物質生産菌株の菌学的性質を一部検討した結果、*Pseudomonas* 属の性質をもっていた。

この実験にあたって、貴重な標準 1-phenazinecarboxylic acid を分与してくださった Köln 大学 L. Birkofer 教授に深謝いたします。また赤外分光分析を依頼した工業技術院東京工業試験所の田辺技官、ならびに菌株の分離に協力していただいた当研究所の山口、多賀谷技官に感謝いたします。

なお本研究の概要は、1967年10月、日本農芸化学会関東支部大会で発表した。また本報告の一部は *Agr. Biol. Chem.*, Vol. 33, No. 12, p. 1802~1804, 1969 (Short Communication) に掲載。

文 献

- 1) Kluyver, A. J.: *J. Bacteriol.*, **72**, 406 (1956).
- 2) Haynes, W. C., Stodola, F. H., Locke, J. M., Pridham, T. G., Conway, H. F., Sohns, V. E., Jackson, R. W.: *J. Bacteriol.*, **72**, 412 (1956).
- 3) Levitch, M. E., Stadtman, E. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **106**, 194 (1964).
- 4) Toohey, J. I., Nelson, C. D., Krotkov, G.: *Can. J. Botany*, **43**, 1055 (1965).
- 5) 武田：本誌, **36**, 286 (1958).
- 6) Korth, H.: *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. 1. Orig.*, **185**, 511 (1962). [*C. A.*, **58**, 11712e (1963)].
- 7) Isono, K., Anzai, K., Suzuki, S.: *J. Antibiotics, Tokyo, Ser. A.*, **11**, 264 (1958).
- 8) Gerber, N. N.: *Biochemistry*, **5**, 3824 (1966).
- 9) Senez, J. C., Azoulay, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **47**, 307 (1961).
- 10) Pomortseva, N. V.: *Microbiology (USSR)*, **34**, 404 (1965).
- 11) Koronelli, T. V., Stepanova, L. N.: *Microbiology (USSR)*, **37**, 372 (1968).
- 12) Lee, E. G. H., Walden, C. C.: *Appl. Microbiol.*, **17**, 520 (1969).
- 13) Toohey, J. I., Nelson, C. D., Krotkov, G.: *Can. J. Botany*, **43**, 1151 (1965).
- 14) Nelson, C. D., Toohey, J. I.: U. S. Patent, 3367765 (1968) [*C. A.* **68**, 77160p (1968)].
- 15) 渡辺, 関沢, 小田：特許公告, 昭 42—14831 (1967).
- 16) 渡辺, 関沢, 佐藤, 小田, 橋本, 谷口：特許公告, 昭43—5833 (1968).
- 17) 渡辺, 神戸, 関沢, 小田, 関, 小川：特許公告, 昭44—16680 (1969).

(昭 44.11.5 受付)