

1. まえがき

活性汚泥法が広く都市下水処理に用いられてきた。これらの処理操作には未だ不確かな要素が多く種々の障害、たとえば、バルキング、低温時の影響、重金属阻害等に対し、細胞内の逐次の生理現象については仲々つかめないでいる。細胞の有機物の50~80%が蛋白質と考えられその推移が汚泥の活性と関連していると思われる。演者は、細胞物質のゲルろ過による分画をし細胞内の生理現象(蛋白質合成)を追跡しようと試みた。

2. 実験方法

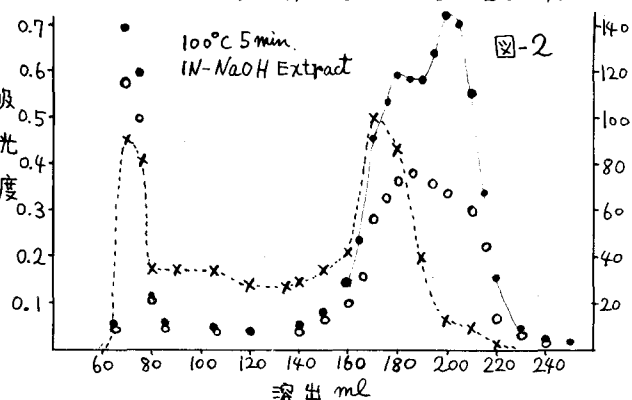
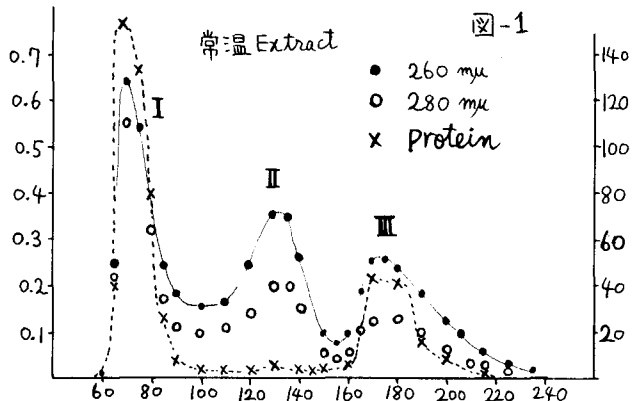
ペプトン(蛋白質の分解生成物で食塩、酸により沈殿しなく、熱凝固性もない)を炭素、窒素源としリン酸緩衝液入下水で2ヶ月以上24時間サイクル Batch法により馴養した汚泥を用いた。基質添加後各時間毎にサンプリングし基質の除去量、MLSS、蛋白量を測定し同時に3, 8, 15, 24時間の抽出液をただちに内径2.5 cm ゲル長さ50 cmのカラムを用いセファデックス G-50(排除限界分子量10,000)で分画した。溶出液は蛋白質の安定性を考えて0.2N-NaCl-0.1N-NaAc PH=6の緩衝溶液を用いた。溶出速度は35 ml/hr, フラクシヨ ンコレクターで5 mlづつ採取した。蛋白質の抽出率は熱アルカリ抽出が最も良いがゲルろ過の結果熱分解されていることがわかったので、常温でのアルカリ超音波砕抽出によった。図-1 図-2

抽出操作;

混合液50 mlを遠心分離し、分離汚泥を1N-NaOH 40 mlで超音波破砕器に入れ9 KHz 160 W 6分の一一定条件で抽出し液量を50 mlに合わせ10,000 Rpmで10分間超遠心分離する。この上澄み5 mlをゲルろ過に供した。この操作での蛋白抽出率は3回抽出分の約80%であった。

分析方法;

ペプトン基質は重クロム酸COD, 蛋白質はLowry-Folin法を用いた。標準蛋白としてBovin Albuminを用いた。ゲルろ過の画分は260 mμ(核酸の吸収曲大)と280 mμ(蛋白質の吸収曲大)での吸光度を求め、フラクシヨ ン吸収曲線のピークについては紫外部吸収曲線をとった。さらに各フラクシヨ ンの蛋白量を



定量した。図中X印が蛋白濃度を表わす。

3. 実験結果と考察

ペプトン基質は一次反応で除去され3時間で基質除去が終わっている。その時点でMLSSが最大となり溶液のCODの増加とともに逐次減少している。各時間の抽出液の蛋白量は2時間までのピークがあり3時間で最も少なくなりその後徐々に増加している。図-3 3, 8, 15, 24各時間のゲルろ過の結果いずれも3つのピークが出現した。

まず用いたペプトン (Bovin Albumin

として34%の蛋白量を与える) のゲルろ過

によりその大略の分子量分布をみたのが図4である。

分子量の推定の為に Bovin Albumin (MW 70,000) チトリロム (MW. 12,000) ビタミンB₁₂ (MW. 1354) を用いてその溶出位置を求めた。(V₀=65ml)

図-5, 6, 7, 8に各時のフラクション吸収曲線を示す。

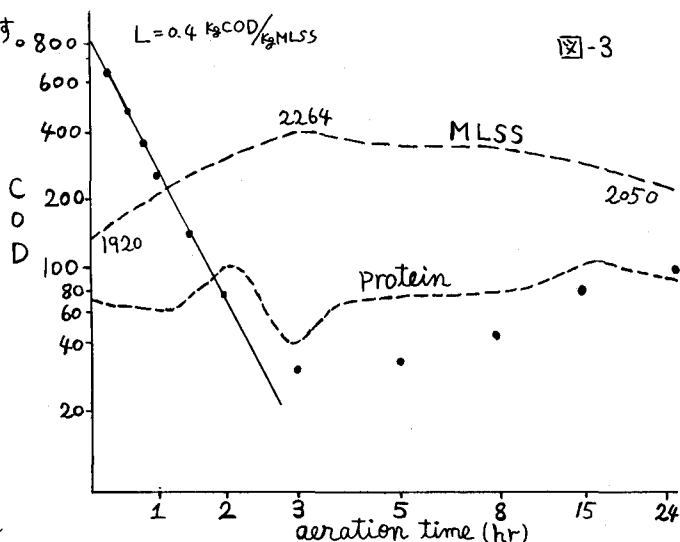


図-3

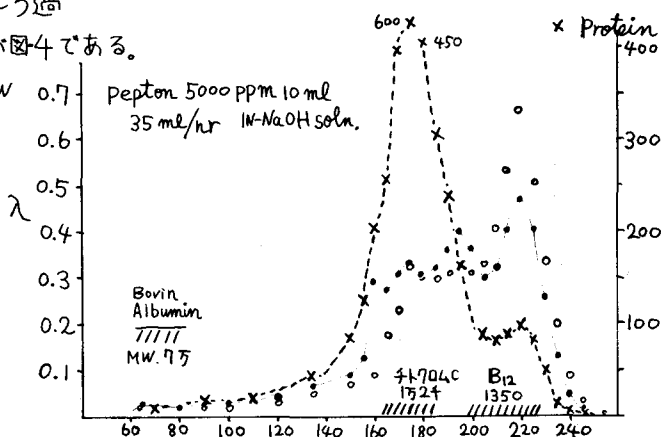


図-4

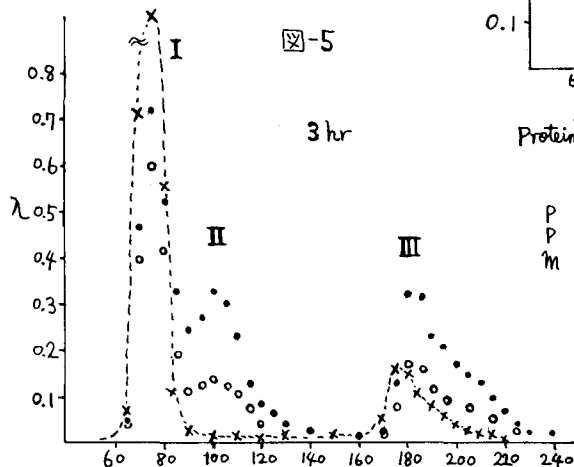


図-5

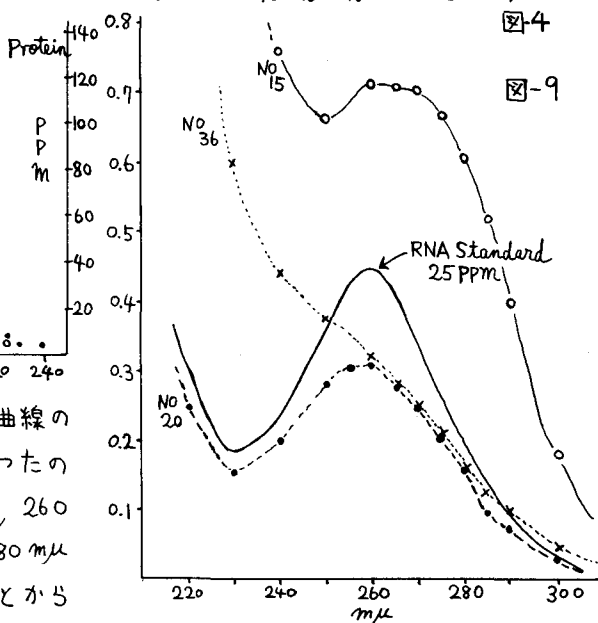


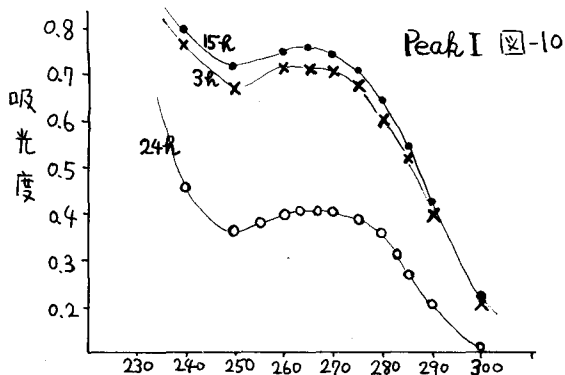
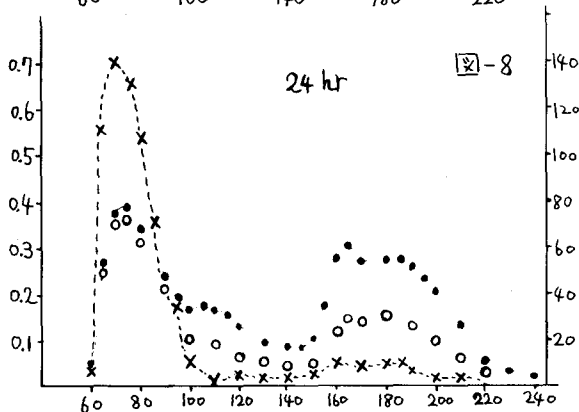
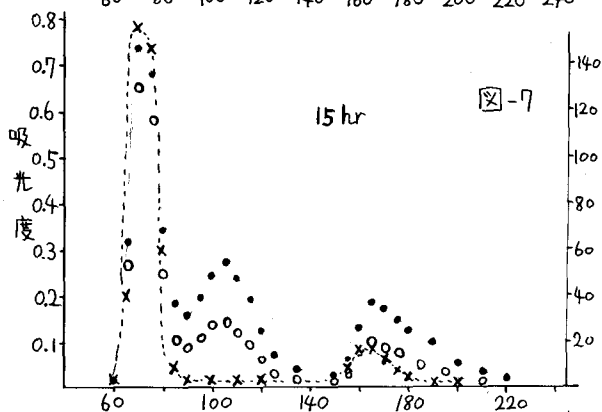
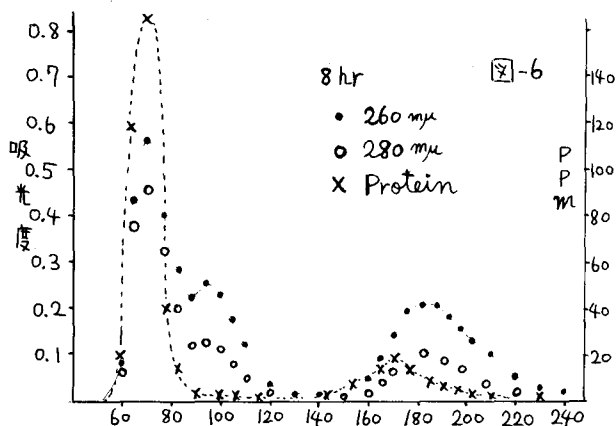
図-9

3時間後の抽出ゲルろ過のフラクション吸収曲線のI, II, IIIのピークについて紫外吸収曲線をとったのが図-9である。ピークIIは230mμに極小点, 260mμに極大点があること, しかも260及び280mμに吸収がありながら蛋白量が極端に少ないことから

明らかに核酸であることがわかる。又分子量の推定から $MW \approx 3 \sim 5$ 万のRNAであろうと思われる。細胞中において蛋白質の多くは核酸と結合して核蛋白として存在すると考えられピークIは核酸と蛋白の混合物と考えられる。実際に図-9においてピークIのフラクション15の吸収曲線を見ると、吸収極小が $250m\mu$ であると同時に極小値が $260m\mu$ に対して大きい(純粋なRNAの場合 $OD \frac{230}{260} \approx 0.4$ で、不純になるとその値が大きくなる)こと、さらに $280m\mu$ 付近に肩があることで裏付けられる。ピークIIIはチトクロムC及びビタミンB₁₂の分画位置から分子量 $1300 \sim 1$ 万の物質と推定され3時間後のピークIIIにおける蛋白質濃度の顕著なピークは、ペプトン基質の除去が終了した時点であることから取込まれた基質によるものと思われる。一方この蛋白のピーク位置が図-4におけるペプトン分画の蛋白質ピークの位置 ($170 \sim 180 ml$) と良く一致していることから支持される。次に各ピークの時間変化を追ってみる。図-10最も分子量の大きいピークIは24時間後にはかなり吸光度が減少しているが、 $280m\mu$ の吸収は相対的に大きくなりより蛋白質に近いものと考えられる。いずれも核蛋白と考えられるピークIが時間とともに核酸部分が減少(特に15時間以降)して蛋白質に近くなっているのは汚泥の自己酸化現象、或は活性の低下を現わしているのかもしれない。

ピークI;

$OD \frac{280}{260}$	Bovin Albumin
	1.200
3h	0.854
15h	0.866
24h	0.909



ピークⅡは、3、15時間のものが標準のRNAとよく一致しているが24時間では大きく減少し、しかも純度が悪くOD_{230/260}が0.809と大きな値を示していることはピークⅠの場合と似た現象であろう。ピークⅢでは3時間のものがピークⅠ、Ⅱとは逆により核酸に近いものになっていることが特徴的である。図-11 図-12

以上細胞抽出液のゲル分画を試みた結果をまとめてみる。まず核酸がピークⅡで分離確認された。それが24時間後には消失した。一番蛋白質に近いと思われるものがピークⅠに現われ、同時にピークⅢにおいて蛋白質に近いものが核蛋白としてのピークに近づいた。ゲルろ過と紫外部吸収によりある程度細胞内の現象の変化をとらえることが可能であることがわかった。活性汚泥が低温、負荷変動、或は重金属阻害に対しどのように応答しているかをゲルろ過を用いて今後検討したい。

さらに他のゲルについての検討、核酸、アミノ酸

の定量等を併用することは意義があると思われる。又RNAなどは不安定な物質であるから抽出の条件やゲルろ過の条件についての検討もさらに行なう必要がある。

