

東北大学 正 松本順一郎
東北大学 学 徐 銳 基

1. はじめに:

活性汚泥によるオリブ油中の脂肪酸の分解機構について回分実験によって検討したが⁽¹⁾, n-ヘキサン抽出物質としての油分全体の消長ののみを検討したもので、オリブ油中個々の構成成分である脂肪酸の分解挙動について未検討であった。そこで、今回は単一脂肪酸を用い、活性汚泥による分解機構に関して実験を行った結果を報告する。

2. 実験方法および分析手順:

実験に用いた基質組成を表-1に示す。基質の C/N 比は 5/1 である。通常の長鎖脂肪酸は水に難溶性であるため、脂肪酸の 1/10 程度の乳化剤 Tween 80 を加え、超音波機器でエマルジョンしたものを基質として用いた。表-2に示しているのは本実験に用いた長鎖飽和及び不飽和脂肪酸である。投入基質の pH は 7.0 である。植種汚泥はオリブ油で 1 年以上 fill and draw の方式で十分馴致したものを用いた。実験は、水温 20°C、振とう速度 125 回/分、振幅 2 cm で振とう培養装置を用いて回分実験を行った。

まず、汚泥濃度約 2500 mg/l になるように同時に 6 本の 500 ml 坂口フラスコに植種した。各フラスコに同じ濃度の脂肪酸を加えて、全量を 150 ml とした。初期脂肪酸濃度は 100 mg/l から 1000 mg/l まで変化させて投入した。振とうを開始して、反応時間が 0, 12, 24, 48 (hr) となるような時間間隔で、フラスコを振とう機からはずして分析した。フラスコ内混合液中の脂肪酸量を図-1に示す分析手順で分析した。一定量のメタノールとクロロホルムを振とう機からはずしたフラスコに添加し抽出操作を行う。抽出した混合液を遠心分離させ、水層を捨て、残りの脂層に Na_2SO_4 を加え、脂層中微量の水分を脱水する。次に、溶剤を揮発させ、乾燥、冷却したのち、全脂質重量を秤る。又、標準脂肪酸の n-C₁₃ トリデノ酸を添加し、エステル化して、ガスクロに注入して、脂肪酸濃度を定量した。

3. 実験結果および考察:

図-2 は、3つの長鎖飽和脂肪酸の分解過程を示す経日変化の一例を示す。ミリスチン酸、パルミチン酸の回分初期において、急速に分解、除去されることわかる。また、その初期除去速度は C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:0} の順に小さくなる。そこで、各脂肪酸の初期比除去速度の濃度依存性を次のように検討した。

先に報告したもの⁽²⁾と同じ手法で、単一基質除去速度について適用されている Michaelis-Menten の酵素反応速度式を用いた。

$$v = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} = -\frac{\Delta S}{\Delta t} = \frac{v_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad \text{----- (1)}$$

ここで:

v = 基質の比除去速度 (1/day), S = 基質の初期濃度 (mg/l)

$v_{\max}$ = 基質の比除去速度の最大値 (1/day), K_m = 飽和常数 (mg/l)

表-1. 基質組成

Fatty Acid	1000 mg/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500 mg/l
K_2HPO_4	1600 mg/l
KH_2PO_4	200 mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 mg/l
CaCl_2	50 mg/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20 mg/l
NaCl	20 mg/l

表-2. 脂肪酸

C _{14:0}	Myristic
C _{16:0}	Palmitic
C _{18:0}	Stearic
C _{18:1}	Oleic
C _{18:2}	Linoleic

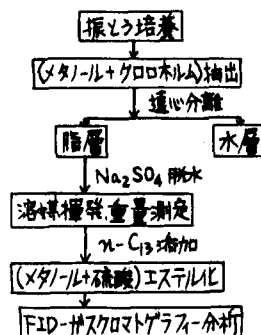


図-1. 分析手順

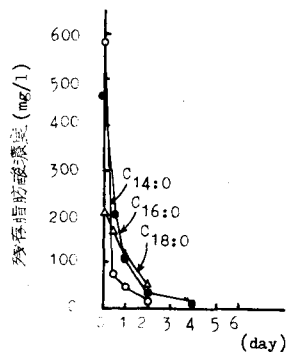


図-2. 経日変化

回分実験では、基質濃度と環境条件が時間とともに変化する非定常状態なので、汚泥の比基質除去速度に及ぼす基質濃度の影響は回分実験の初期速度から決定しなければならない。本実験では0時間から12時間までの回分初期の除去速度から比基質除去速度を計算した。(1)式を逆数変換すると(2)式のようなLineweaver-Burk plot式になる。

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{S} \quad \text{----- (2)}$$

(2)式に従って、実験結果を整理すると、図-3になる。(C_{18:0}の実験は現在継続中) また、このようにして求められた最大比基質除去速度 $v_{\max}$ と飽和常数 K_m を用いて、Michaelis-Menten型に整理すると、比基質除去速度 v の基質依存性は図-4になる。

活性汚泥による長鎖飽和脂肪酸の初期最大比除去速度 $v_{\max}$ は炭素数の増大とともに減小したことがわかる。これは、脂肪酸の水溶性の難易に関係していると考えられる。即ち、基質が細胞内で分解されるためには、細胞膜を透過するように、水溶性であるが、または、細胞外酵素によって、水溶性になるものでなければならない。従って、水溶性の高い脂肪酸ほど分解されやすいことになる。表-3には、飽和脂肪酸の水に対して溶解度を示す。炭素の鎖長が長くなるほど、溶解度が小さくなる。一般に、不飽和脂肪酸が飽和脂肪酸より高い溶解度をもつことは良く知られている。図-4によると、不飽和脂肪酸 C_{18:1} の活性汚泥による初期比除去速度は飽和脂肪酸 C_{18:0} のそれより大きいことがわかる。Loehrら⁽³⁾は、脂肪酸の微生物による分解速度について、炭素数12から20までの飽和及び不飽和脂肪酸を塩の形で与え、好気条件下で検討したが、ほぼそれと同じような傾向が得られた。即ち、C_{14:0} の脂肪酸最も分解されやすく、C_{16:0}、C_{18:1}、C_{18:0} の順で、炭素数や不飽和基に従って、最大基質比除去速度 $v_{\max}$ が減小する。

また、飽和脂肪酸の分解に関するβ-酸化理論によると、飽和脂肪酸は炭素原子2個が単位になって酸化分解していくものと推定されている。本実験では、ガスクロによる分析結果、混合液中 C_{14:0} のミリスチン酸を基質として用いた回分培養の12時間目で、少量の C_{12:0} のラウリン酸が検出された。しかし、C_{16:0} のパルミチン酸と C_{18:0} のステアリン酸を基質として用いた回分実験では、そのような中間産物は見られなかった。

4. おまけ:

オリブ油で馴致した活性汚泥による飽和長鎖脂肪酸の分解について炭素数の増加とともに初期分解速度は小さくなる事が判明した。また、二重結合基をもつ不飽和脂肪酸は飽和脂肪酸より分解されやすいとのことが明らかになった。

参考文献:

- (1) 徐、松本、土木学会第34回年講、II-276 (1979)
- (2) 徐、大久保、松本、工業用水、No.245 (1979)
- (3) Loehr, R.C., and Roth, J.C., J.W.P.C.F. 40, R335 (1968)

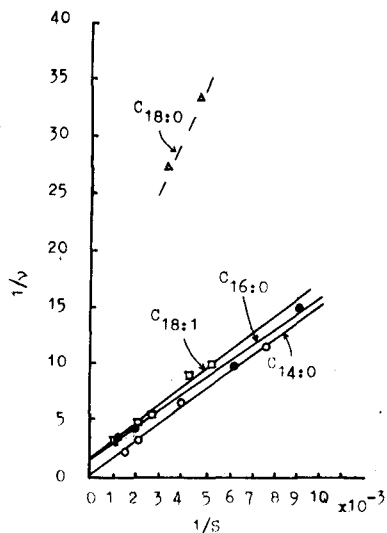


図-3. S と v の Lineweaver-Burk plot

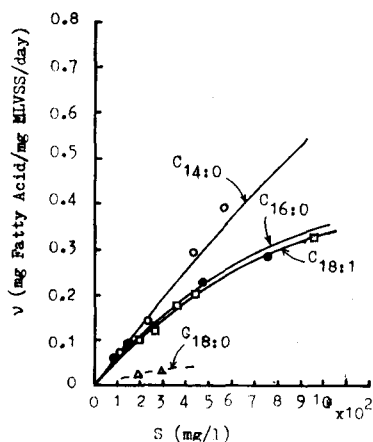


図-4. S と v の関係

表-3. 飽和脂肪酸の水に対する溶解度 (at 20°C)

Fatty Acid	Solubility
Myristic	0.0020
Palmitic	0.0007
Stearic	0.0003

単位: g. fatty acid / 100 g. H₂O