II-116　基質除去に伴う2，3の酵素活性の変化について

山梨大学工学部　正会員　片山けい子

1. はじめに

活性汚泥法は，好気的微生物を利用した，廃水処理法として数多く用いられてきている。活性汚泥法における廃水中の有機物除去機構に関しては，BOD，COD，NおよびP等の一般的な水質項目による研究および，生体内の反応のほとんどが酵素により触媒されるという観点から酵素化学的検討をおこなった研究がいくつかなされており，近年では，dehydrogenase活性の活性汚泥管理指標としての有効性が認められつつある[1]。今回，活性汚泥による有機物除去機構を生化学的な面から把握するために，skim milkを人工下水として培養した活性汚泥を用いて，培養基質の主成分であるcaseinを加水分解するprotease，lactoseを加水分解するβ-galactosidase，活性汚泥自体の総括的な活性を示すdehydrogenase，またcollagenの誘導タンパクであるgelatinを培養基質とした活性汚泥のcollagenaseの4種の酵素について，基質除去に伴う各酵素の活性を測定し，若干の知見が得られたので以下報告する。

2. 実験方法

Skim milkを人工下水とし，乳業排水処理施設の活性汚泥を植種して回分法で培養した汚泥（以下skim milk汚泥）と，gelatinに，glucose，KH_2PO_4を加えて調製した人工下水にskim milk汚泥を植種し，回分法で培養した汚泥（以下gelatin-glucose汚泥）の2種類の汚泥を供試汚泥とした。各培養基質の組成をTable 1に示した。

β-galactosidase活性は，o-nitrophenyl-β-D-galactopyranosideを基質とするKuby et alの方法[2]，protease活性は，caseinを基質とするKunitzの方法[3]，dehydrogenase活性は下水試験方法を各々一部修正して，またcollagenase活性は，gelatinを基質とする方法[4]により測定した。

Lactoseは Somogyi-Nelson法[5]により還元糖として定量した。Skim milk中のタンパク質，gelatinはLowry法[6]により定量した。実験装置はFig. 1に示した。培養温度は23±1°Cとした。

3. 結果および考察

初濃度として500mg/lのskim milkを与えた時の基質除去に伴う，skim milk汚泥のprotease，β-galactosidaseおよびdehydrogenase活性の変化をFigs. 2，3，4に各々示した。

TABLE 1　COMPOSITION OF SUBSTRATES

	Skim milk* sol. (1000mg/l)	Gelatin-glucose** sol. (per liter)	
BOD	711.0	601.0	(mg/l)
COD	552.3	580.0	
Total-N	52.3	39.0	
Total-P	9.9	8.7	

* Reducing sugar (as lactose) 53.55%; BOD:N:P ≒72:5:1
** 0.25g of gelatin, 0.75g of glucose and 37.5mg of KH_2PO_4; BOD:N:P≒70:4.5:1

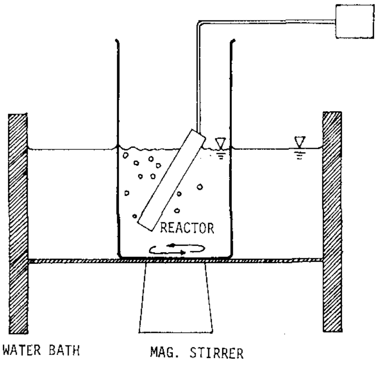

FIG. 1　APPARATUS FOR EXPERIMENTS

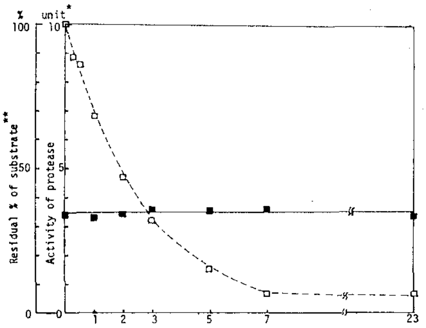

FIG.2 CHANGES IN PROTEASE ACTIVITY DURING REMOVAL OF SKIM MILK SOL.
■-■; activity of protease, □-□; residual % of protein, initial skim milk conc., 500mg/l, initial activated sludge conc., 1860mg/l; 24°
* 1 unit= 1μg of L-Tyr produced per min by 10mg of activated sludge
** protein (determined by the method of Lowry)

基質除去の第一段階である加水分解を触媒するprotease，β-galactosidase活性の変化は，ほとんどみられず，安定したレベルにあるものと考えられる。また，培養基質であるskim milkの約53%を占めるlactoseの除去は非常に速く，基質投入後約30分でほぼ完了しており，skim milkを基質とした場合の除去率の良否は，lactoseと比較して除去が遅いタンパク質部分の除去に依存するものと推察される。一方，dehydrogenaseは，protease，β-galactosidaseといった加水分解酵素とは異なり，ばっ気槽からの基質の消失すなわち，基質の汚泥内へのとり込み量の増加とともに活性の上昇が観察された。このことは，細胞内に基質がとり込まれると，生体酸化が開始し，汚泥自体の活性度が上昇することを示唆している。しかしながら，dehydrogenase活性の上昇が質的なものかあるいは量的なものであるかは不明であり，今後，検討すべき問題であると考える。

Gelatin-glucose汚泥による，培養基質中のgelatin除去に伴うcollagenase活性の変化をFig. 5に示した。collagenase活性は，skim milk汚泥のproteaseと同じく，処理時間中ほとんど活性の変化はみられなかった。collagenaseの場合も，基質の投入による新たな活性の上昇がおこらない，安定したレベルにあることを示している。

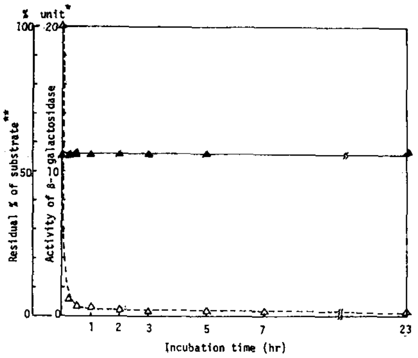

FIG.3 CHANGES IN β-GALACTOSIDASE AVTIVITY DURING REMOVAL OF SKIM MILK SOL.

▲—▲; activity of β-galactosidase, △-△; residual % of lactose, initial skim milk conc.,500ng/l;24°; initial activated sludge conc., 1785mg/l
* 1 unit=0.012μmole of o-nitrophenol produced per min by 10mg of activated sludge
** lactose (determined as reducing sugar by the method of Somogyi-Nelson)

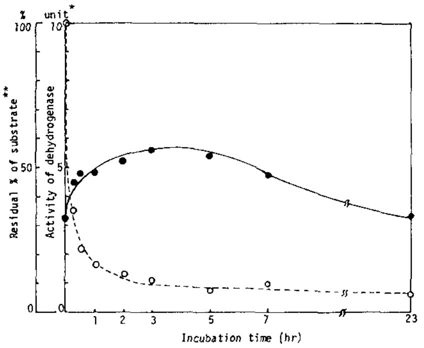

FIG.4 CHANGES IN DEHYDROGENASE ACTIVITY DURING REMOVAL OF SKIM MILK SOL.

●—●; activity of dehydrogenase, ○-○; residual % of COD, initial skim milk conc.,500mg/l, initial activated sludge conc.,2620mg/l;24°
* 1 unit= 1μg of triphenyl formazon produced per min by 10mg of activated sludge
** COD

4. おわりに

本実験では，基質をすみやかに除去する良好な汚泥の酵素活性を測定した。今後，汚泥に何らかの障害がおこった場合の酵素活性について検討を行う予定である。

本研究の一部は，昭和54年度文部省科学研究費奨励研究(A)課題番号475428の補助をうけて進められたことを記し，謝意を表します。

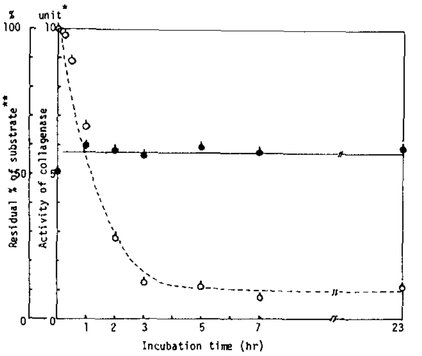

FIG.5 CHANGES IN COLLAGENASE ACTIVITY DURING REMOVAL OF SUBSTRATE

◆—◆; activity of collagenase, ◇-◇; residual % of protein, initial substrate conc., 0.125g of gelatin, 0.375g of glucose and 18.8mg of KH_2PO_4 per liter, initial activated sludge conc., 2240mg/l;24°
* 1 unit= 1μg of L-Leu produced per min by 1g of activated sludge
** protein (determined by the method of Lowry)

引用文献

1) 下水道協会誌，5，(45)，9-15，1968 など
2) Methods in Enzymology，1，241-248，1955
3) ibid.，19，569-575，1970
4) ibid.，5，659-665，1961
5) 還元糖の定量法，東京大学出版会，10-12，1969
6) Methods in Enzymology，3，447-454，1957