

山梨大学工学部 正 片山けい子

1. はじめに

活性汚泥法をはじめとする廃水の生物学的処理において、重金属イオンは、混入した際阻害をひきおこし、処理水質の悪化をもたらす毒物の一つである。特に銅イオン（以下 Cu^{2+} ）は重金属イオンの中でも強力な阻害を生ずることが知られており、現象面に関しては、処理水質のみならず、活性汚泥の代謝能力を直接示す、dehydrogenase 活性についても報告されている¹⁾。本研究は、従来なされてきた報告に加えて、 Cu^{2+} による阻害のタイプがどのようなものであるかを明らかにするために、skim milk で培養した活性汚泥を用い、培養基質の主成分である lactose の加水分解を触媒する β -galactosidase および、活性自体の指標となる dehydrogenase の2つの酵素に対する Cu^{2+} の阻害に関し、酵素反応速度論的考察を行い、得られた知見について報告するものである。

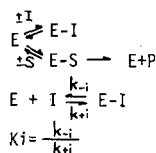
2. 実験方法

skim milk 水を人工下水とし、乳業廃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を供試汚泥とした。酵素活性測定時における反応液中の SS は約 2000~4000 mg/l、 Cu^{2+} は、0~127.1 mg/l の範囲であった。 β -galactosidase 活性は、O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を基質とする Kuby et al の方法²⁾、dehydrogenase 活性は、下水試験方法を一部変えて測定した。 Cu^{2+} は $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ を用いた。対イオンである SO_4^{2-} は、両酵素活性に影響を及ぼさなかった。

3. 酵素の阻害

酵素(E)の阻害には、[I] 基質(S)が結合すべき活性中心に阻害剤(I)が結合することにより、E-S複合体の生成を不可能にする拮抗阻害と、[I] IがSの結合する活性中心とは別の部位でEと結合し、E-S-I という三重複合体を作ることによって、生成物(P)が生ずることを不可能にする非拮抗阻害の2つが主にあげられる。

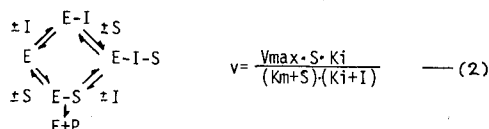
拮抗阻害は以下の model で表わされ、



式(1)が導かれる。

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S + K_m / K_i \cdot I} \quad \text{--- (1)}$$

非拮抗阻害は以下の model で表わされ、



式(2)が導かれる。

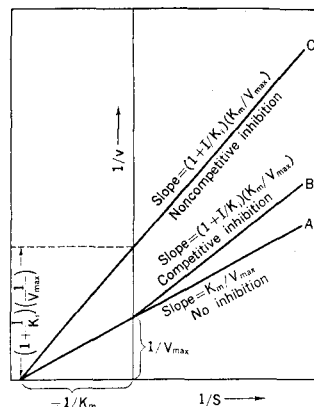


Fig.1. Double reciprocal plots for competitive and noncompetitive inhibition³⁾

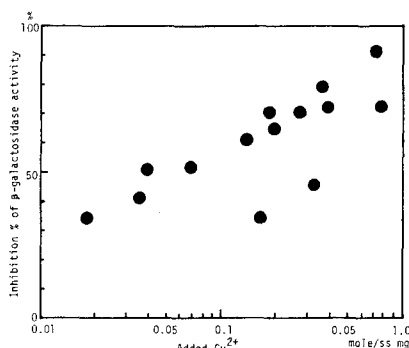


Fig.2 Effect of Cu^{2+} on β -galactosidase activity
Inhibition % of β -galactosidase activity = (activity with Cu^{2+}) / (activity without Cu^{2+}) $\times 100$

阻害剤の存在しない場合の式は、

$$E + S \rightleftharpoons E-S \rightarrow E + P$$

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad \text{--- (3)}$$

(3)式で表わされる。

(1), (2), (3) 式の逆数をとリ, $\frac{1}{v}$, $\frac{1}{S}$ をプロットすると, Fig. 1 が得られる。³⁾ すなわち, 阻害剤のある場合とない場合について, S を変えて v を測定することにより, 阻害のタイプを判定することができる。

4. 結果および考察

β -galactosidase および dehydrogenase に及ぼす Cu^{2+} の影響を Figs. 2 および 3 に示した。

β -galactosidase 活性は, β 1 mg あたり, Cu^{2+} 0.05 μ mole 添加で約 50% 阻害された。これは, β 1000 mg/l のとき Cu^{2+} 3.2 mg/l に相当する。

dehydrogenase 活性は, β 1 mg あたり, Cu^{2+} 0.01 μ mole 添加で約 50% 阻害され, 0.08 μ mole では, ほぼ 100% 阻害された。

そこで, Cu^{2+} による阻害のタイプを明らかにするために, β -galactosidase および dehydrogenase 活性と, Cu^{2+} のある場合とない場合について, 基質濃度を変えて v を測定し, Lineweaver-Burk プロットを行ったものが Figs. 4 および 5 である。

Cu^{2+} による阻害の程度は, 加水分解と触媒する β -galactosidase と, 酸化還元と触媒する dehydrogenase とでは, 若干異なるものの, これら 2 酵素の阻害のタイプは, 非拮抗阻害であることが判明した。よって, Cu^{2+} はこれらの酵素の活性中心以外の部位に結合し, 阻害をいさおすものと考えられる。また, Figs. 4 および 5 に示されたとおり, Cu^{2+} を添加した場合, 勾配は異なり, $1/S$ 軸上の切片は共通でない。さらに, $1/S$ 軸上の切片は, 阻害された酵素の方が阻害されない酵素より大である。このことは, いかに基質濃度を上げて, 阻害剤により低下した $V_{\max}$ は回復されないという非拮抗阻害の特徴を表している。

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)の補助を受けて行われたことを記し, 謝意を表します。

参考文献

1) 下水道協会誌, 5, (45), 9-15, 1968

2) Methods in Enzymology, 1, 241-248, 1955

3) Biochemical Engineering, University of Tokyo Press, 98, 1973

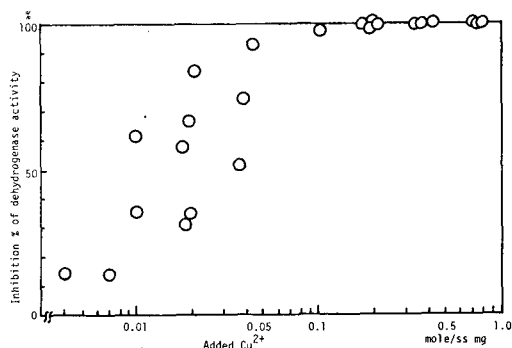


Fig. 3 Effect of Cu^{2+} on dehydrogenase activity
Inhibition % of dehydrogenase activity = (activity with Cu^{2+}) / (activity without Cu^{2+}) $\times 100$

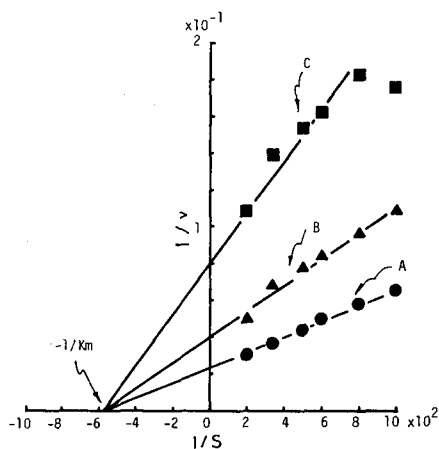


Fig. 4 Noncompetitive inhibition of β -galactosidase by Cu^{2+}
 Cu^{2+} concentration; A: 0mM, B: 0.05mM (3.2mg/l), C: 0.5mM (31.8mg/l)

v , the initial zero order velocity expressed in units, 1 unit = 0.012 μ mole of α -nitrophenol produced per ss 10mg per min
 s , the initial substrate conc. expressed in moles/l

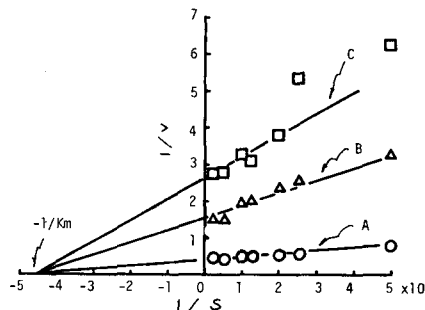


Fig. 5 Noncompetitive inhibition of dehydrogenase by Cu^{2+}
 Cu^{2+} concentration; A: 0mM, B: 0.05mM (3.2mg/l), C: 0.1mM (6.4mg/l)

v , the initial zero order velocity expressed in units, 1 unit = 1 μ g of tetrazolium formazon produced per ss 10mg per min
 s , the initial substrate conc. expressed in %