

山梨大学工学部 正会員 平山けい子

1.はじめに 銅、水銀、カドミウム等の重金属イオンが、活性汚泥中の加水分解酵素の1つである、 β -galactosidase (以下 β -Gase) に対し、可逆的非拮抗阻害剤として作用することをこれまでに明らかにした。^{1,2)} 重金属イオンによる β -Gase の阻害機構を、酵素の構造と機能とにわたって解明するためには、高度に精製された酵素標品を得ることが要求される。また、今後、廃水処理への応用が期待される固定化酵素あるいは固定化微生物法においても、廃水処理に耐える酵素の諸性質の把握が必要になるものと考えられ、精製酵素標品の調製が要求されよう。本研究においては、酵素の精製の第一段階である、活性汚泥細菌の細胞の破壊ないし活性汚泥中の β -Gase の可溶化に関して、いくつかの基本的な方法を用いて検討を行った。

2.方法 スキムミルク水を人工下水として、回分法で培養した活性汚泥と実験に用いた。培養液の組成も、Table 1 に示した。 β -Gase の可溶化には、タンパク質の基本的な可溶化方法である、超音波あるいは凍結融解による細胞の破壊、界面活性剤の利用、有機溶媒の利用等の方法を用いた。これらの方法による処理後、抽出した画分について、 β -Gase 活性を測定し処理前の活性と比較して回収率を算出した。 β -Gase 活性は、*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を基質とする方法で測定した。³⁾

3.結果および考察 超音波処理には、acetone 乾体を用いた。acetone 乾体を、0.1M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.0 に懸濁し、冷却しながら発振周波数 20KHz 出力 90W で1ないし2分間処理後、遠心上清中の β -Gase 活性を測定した (Fig. 1)。超音波処理では、遠心上清中に β -Gase 活性は観察されなかった。1分間処理で残存率が100%を超えたのは、超音波処理により膜の透過性が増加し細胞内に存在する β -Gase 活性が相加されたものと推察される。2分間処理では、残存率は28.2%と低く、 β -Gase が超音波処理により破壊ないし不活性化されたものと考えられる (Table 2)。

凍結融解処理は、生菌体を0.01Mリン酸緩衝液 pH 7.1 に懸濁し、 -20°C で凍結後、室温融解を5回くり返し行った (Fig. 2)。処理後の遠心上清中の β -Gase 活性は、処理前の0.5%であった。また、残存率は、33.3%と低く、凍結融解処理によりかなりの量の β -Gase の失活が観察された (Table 3)。

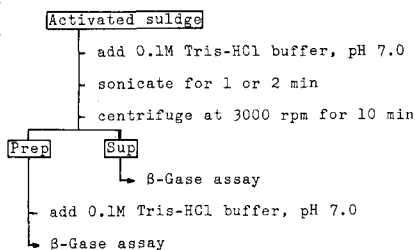
界面活性剤として、陰イオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、陽イオン性界面活性剤であるセチルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTAB)、非イオン性界面活性剤である Tween 40、Tween

80、Triton X-100、ステロイド環をもつ界面活性剤であるデオキシコール酸ナトリウム (DOC) を用いた。生菌体を、界面活性剤各々1%を含む0.1Mリン酸

Table 1 Analysis of skim milk

Constituent	skim milk* solution (1000 mg l ⁻¹)
	mg l ⁻¹
BOD	711.1
COD	552.3
Total-N	52.3
Total-P	9.9

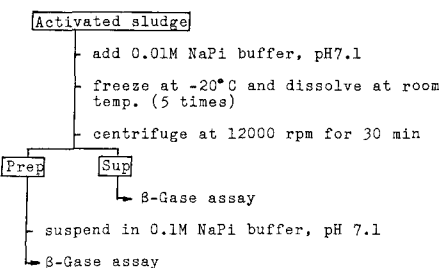
* contained reducing sugar (as lactose)
53.6%. BOD:N:P was about 72:5:1

Fig.1 Procedure of sonication for β -Gase releaseTable 2 Effect of sonication on β -Gase release

Treatment	% Release	% Residual
sonication 1 min	0	147.9
2 min	0	28.2

Table 3 Effect of freeze-dissolve treatment on β -Gase release

Treatment	% Release	% Residual
Freeze-dissolve	0.5	33.3

Fig.2 Procedure of freeze-dissolve treatment for β -Gase release

緩衝液 pH 7.0 に懸濁し、4°C 24hr 静置後遠心上清中に存在する β -Gase 活性を測定した。また、界面活性剤の除去には、セロハンチューブを用いて、遠心上清画分の透析を行い、透析後の β -Gase 活性を測定した (Fig. 3)。

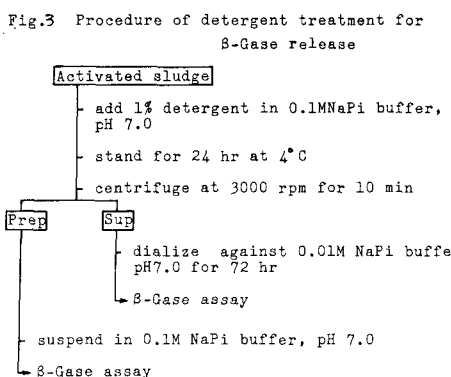


Table 4 に、各界面活性剤により可溶化された β -Gase の回収率と残存率を示した。かつこ内には、透析後の β -Gase の回収率を示した。SDS 3.0(0.7)%, CTAB 2.1(0.6)%, Tween 40 0(0)%, Tween 80 7.8(8.8)%, Triton X-100 2.2(1.1)%, DOC 10.9(5.3)% の活性が回収された。回収率は全般に低く、また界面活性剤の種類による回収率の相違は明らかとは言い難い。残存率に関しては、Tween 40, Tween 80 を用いた場合、各々 149.7%, 130.7% と 100% を超えているが、これは Tween 40, Tween 80 の使用により膜の透過性が高まり、細胞内に存在する β -Gase 活性が加わったため、全体として活性が上昇したものと推察される。

有機溶媒処理には、acetone, n-butanol, ethanol, methanol, i-propanol, toluene を用いた。溶媒を活性汚泥の 80% となるよう加え、30°C 1.5hr 振盪し、遠心分離により溶媒を除去した後、0.1M リン酸緩衝液 pH 7.0 で 15hr 抽出した後の遠心上清中の β -Gase 活性を測定した。別に、acetone 乾体³⁾を用い、0.1M リン酸緩衝液 pH 7.0 で 48hr 抽出した後の遠心上清中の β -Gase 活性を測定し、回収率を算出しあわせて Table 5 に示した。acetone 2.5%, n-butanol 0.9%, ethanol 2.3%, methanol 0%, i-propanol 1.8%, toluene 3.2%, methanol 0%, acetone 乾体では 18.8% の活性が回収された。いずれの有機溶媒を用いた場合でも、緩衝液での抽出後の遠心上清中に回収される β -Gase 活性は低く、また遠心残渣中に残存する β -Gase 活性も 0~40% と低かった。acetone 乾体の緩衝液抽出画分の β -Gase 活性回収率は 18.8% と、今回行った方法の中で最も高かった。

4.まとめ 活性汚泥中の β -Gase の可溶化方法の検討を行った。可溶化には、超音波処理、凍結融解処理、界面活性剤の利用、有機溶媒の利用による方法を用いた。acetone 乾体を緩衝液で抽出することにより、18.8% の β -Gase 活性が回収された。他の方法による回収率は 0~10% 以下であった。

本研究の一部は、昭和 59 年度文部省科学研究費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) 水質汚濁研究 (1984), 7, (2), 28-35 2) 土壌学会第 38 回年講 (1983) 3) 蛋白質の基礎実験法 (1981) 南江堂 p21-22

Table 4 Effect of detergent type on β -Gase release

Detergent	%Release	%Residual
SDS ^{a)}	3.0(0.7)	-
CTAB ^{b)}	2.1(0.6)	0
Tween 40 ^{c)}	0(0)	149.7
Tween 80 ^{d)}	7.8(8.8)	130.7
Triton X-100 ^{e)}	2.2(1.1)	26.4
DOC ^{f)}	10.9(5.3)	-

a) Sodium dodecylbenzenesulfate
b) Cetyltrimethylammonium Bromide
c) Polyoxyethylene(20) Solbitan Monopalmitate
d) Polyoxyethylene(20) Solbitan Monooleate
e) Polyoxyethylene(10) Octylphenyl Ether
f) Sodium deoxycholate
Parenthesized number reveals "% Release" after dialysis.

Fig. 4 Procedure of solvent treatment for β -Gase release

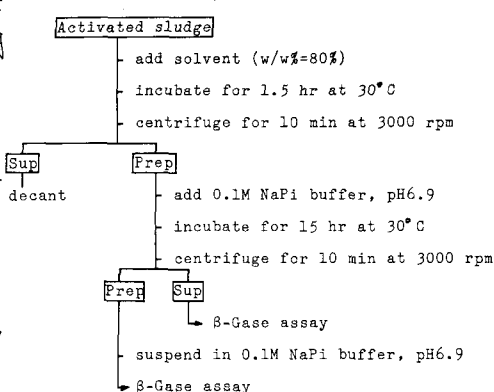


Table 5 Effect of solvent type on β -Gase release

Solvent	% Release	% Residual
acetone	2.5	30.2
n-butanol	0.9	22.1
ethanol	2.3	22.0
methanol	0	0
i-propanol	1.8	32.0
toluene	3.2	40.0
acetone+tethylether (acetone powder)	18.8	10.2