

II-389

活性汚泥中の β -galactosidaseの可溶化(第3報)

山梨大学工学部 正会員 平山けい子

1. はじめに

微生物による廃水処理を、より効果的に行うには、処理に関与する微生物自体の様々な性質を明らかにすることが必要であると考えられる。今後、廃水処理への利用が期待される、固定化酵素法、固定化微生物法に対しても、処理に適した酵素の分画・精製は、微生物の分離・培養と並んで要求されよう。本報告においては、活性汚泥中の β -galactosidaseの精製に必要な、可溶化すなわち cell free extractの調製を、lysozyme/EDTA処理後、種々の非イオン性界面活性剤を用いることにより検討を行ったので、以下報告する。

2. 方法

実験に用いた活性汚泥は、スキムミルク水を人工下水として、乳業廃水処理場の活性汚泥を植殖し、回分法で培養した。

β -galactosidaseの可溶化は、Godsonの方法を、一部修正して行った¹⁾。活性汚泥約10mg(乾燥重量)を、10mM Tris-HCl緩衝液 pH8.0で1回洗浄した後、50% sucroseを含む50mM Tris-HCl緩衝液 pH8.0に懸濁し、10mM EDTA, 2.4mg/l lysozymeを添加し、方法 I では、1-4℃, 1 hr 培養した後、非イオン性界面活性剤を添加し、1-4℃で1.5 hr処理した後の、遠心上清中の β -galactosidase活性を測定した。方法 II では、lysozyme/EDTAを添加して、30℃で3 hr培養し、非イオン性界面活性剤を加えて、1-4℃で19 hr処理した後の遠心上清中の β -galactosidase活性を測定した(Table 1 および 2)。遠心上清中に回収された β -galactosidase活性と、処理前の活性を比較し、回収率を算出した。

使用した非イオン性界面活性剤は、polyoxyethylene(10)octylphenylether(Triton X-100), polyoxyethylene laurylether(Brij 35), polyoxyethylene cethylether, cethylether(Brij 58), polyoxyethylene(20)sorbitan monopalmitate(Tween 40), polyoxyethylene(20)sorbitan monooleate(Tween 80) および heptylthioglycosideである。Table 3 に、これらの非イオン性界面活性剤の親水疎水比(HLB) 値、臨界ミセル濃度(CMC) および分子量を示した²⁾。HeptylthioglycosideのHLB値は、DaviesのHLB基数に基いて算出した³⁾。

β -galactosidase活性は、o-nitrophenyl- β -D-galactopyranosideを基質とする方法で測定した⁴⁾。Protease活性は、Kunitzの方法で測定した⁵⁾。

3. 結果および考察

Table 4に方法 I および方法 IIの lysozyme/EDTA処

Table 1 Final concentrations of reagents under the standard conditions

Parameter	At lysozyme/EDTA treatment	At nonionic surfactant treatment
Cells	10mg(dry wt.)	10mg(dry wt.)
Final volume	1.5 ml	2.0 ml
Tris-HCl	Approx. 0.1M pH8.0	Approx. 0.08M pH8.0
Lysozyme	1.2mg	1.2mg
EDTA	1.64mg	1.64mg
Sucrose	16.7%	12.5%
MgSO ₄	—	0.025M
Nonionic surfactant	—	1.0%

Table 2 Time and temperature for preparation of β -galactosidase cell free extract

Step	Method I		Method II	
	Time (hr)	Temp (°C)	Time (hr)	Temp (°C)
Lysozyme/EDTA treatment	1	1-4	3	30
Nonionic surfactant treatment	1.5	1-4	19	1-4

Table 3 HLB, CMC and molecular weight of nonionic surfactants

Nonionic surfactant	HLB	CMC (mM)	Molecular weight
Triton X-100	13.5	0.24	624.9
Brij 35	15.3	0.06-0.09	1198
Brij 58	13.5	0.077	1122
Tween 40	15.6	29(mg/l)	—
Tween 80	15.0	27(mg/l)	—
Heptylthioglycoside	12.6	30	294.4

理における β -galactosidase 活性回収率を示した。

Table 5 に方法 I および方法 II の lysozyme/EDTE/非イオン性界面活性剤処理における β -galactosidase 活性回収率を示した。一般に、lysozyme による処理は、細胞内成分の破壊を避けるため、1-4°C で数10秒から数分間とされている。Lysozyme/EDTA 処理のみ行った場合、方法 I では 1-4°C で 1hr、方法 II では 30°C で 3hr と比較的長時間の処理を行ったが、各々の方法で可溶化される β -galactosidase は 4.8%, 4.0% と低かった。一方、lysozyme/EDTA 処理後、非イオン性界面活性剤を添加すると、方法 I では 6.5 から 15.2%, 方法 II では、Triton X-100 で 37.6%, Tween 80 で 32.7%, heptylthiogluconide で 33.9% と、 β -galactosidase 活性の回収率は増加した。方法 I と方法 II では非イオン性界面活性剤添加後の処理時間が各々 1.5, 19 hr と異なり、長時間処理する方が、より効果的に可溶化できることが明らかとなった。

Lysozyme/EDTA 処理により細胞壁が溶解され、非イオン性界面活性剤により膜の脂質が除かれて、 β -galactosidase の可溶化が生じたものと推察される。

非イオン性界面活性剤においては、膜蛋白質を可溶化する能力と HLB 値の間には、密接な関係があり、HLB 値が 14 付近で可溶化の能力が最も高くなるとされている²⁾。今回 β -galactosidase の可溶化に効果のあった、Triton X-100, Tween 80, heptylthiogluconide の HLB 値は、各々 13.5, 15.0, 12.6 であり、ほぼ 14 に近い値であった。精製の段階で用いる方法により、いずれかの非イオン性界面活性剤を選択することが可能である。Lysozyme/EDTA/非イオン性界面活性剤処理後の遠心上清中の protease 活性を測定し、Table 6 に示した。いずれの処理法においても、protease 活性が観察された。このことから、可溶化された β -galactosidase が、protease により分解される可能性が考えられる。しかしながら、可溶化された β -galactosidase 活性の回収率と protease 活性の大小とは、特に、関連性は認められなかった。Protease inhibitor を用いることにより、回収率を上げることも一つの方法として、考えられる。

4. まとめ

活性汚泥中の β -galactosidase の可溶化方法の検討を行った。Lysozyme/EDTA 処理を 30°C で 3hr 行った後非イオン性界面活性剤を添加し 1-4°C で 19 hr 処理後の遠心上清中に回収される β -galactosidase 活性を測定した。Triton X-100, Tween 80, heptylthiogluconide を用いた場合、各々 37.6, 32.7, 33.9% の活性が回収された。今後、得られた β -galactosidase 画分について、精製を進める予定である。

参考文献 1) Methods in Enzymology (1967), 12A, 503-516, Academic Press 2) 蛋白質の基礎実験法 (1981), 24-32, 南江堂 3) 界面活性剤 (1979), 24, 講談社 4) 水質汚濁研究 (1984), 7, 28-35 5) Methods in Enzymology (1970), 19, 569-575, Academic Press

Table 4 Release of β -galactosidase from lysozyme/EDTA exposed cells of activated sludge

Treatment	Recovery(%)	
	Method I	Method II
Lysozyme/EDTA	4.8	4.0

Table 5 Release of β -galactosidase from lysozyme/EDTA and nonionic surfactant exposed cells of activated sludge

Nonionic surfactant	Recovery(%)	
	Method I ^{a)}	Method II ^{b)}
Triton X-100	9.2	37.6
Brij 35	10.3	2.4
Brij 58	6.5	3.6
Tween 40	6.5	—
Tween 80	15.2	32.7
Heptylthiogluconide	10.8	33.9

a) All operations were carried out at 1-4°C.

b) At lysozyme/EDTA treatment, the cells were incubated at 30°C and incubated at 1-4°C at nonionic surfactant treatment.

Table 6 Protease activity in the extract of lysozyme/EDTA and nonionic surfactant exposed cells of activated sludge

Nonionic surfactant	Protease activity(unit) ^{a)}	
	Method I	Method II
Triton X-100	—	—
Brij 35	1.2	1.5
Brij 58	1.5	1.9
Tween 40	3.2	3.5
Tween 80	5.9	11.3
Heptylthiogluconide	1.7	4.5

a) 1 unit = 1 μ g Tyr produced per 10mg of activated sludge per min