

嫌気性微生物による固形性デンプンの加水分解

長岡技術科学大学（学）○樋口 義丈（正）大橋 晶良、井町 寛之、原田 秀樹

1. 目的

嫌気性処理法は下水汚泥などの固形性有機物の処理技術として広く普及しているが、下・廃水の嫌気性処理に比べ処理速度が遅く、その原因は加水分解過程にあると言われている。加水分解については、純菌レベルでの研究は進んでいるものの、消化汚泥などの嫌気性微生物群集に関する研究は数少なく、固形性有機物にアタックする加水分解酵素は、バルク液中に溶解しているものと細菌の細胞膜表層に固着のものに分けられるが、消化汚泥内ではどちらの酵素が加水分解に大きく寄与しているのか、また加水分解細菌は基質によって加水分解酵素能が変わるのか、など不明な点が多い。このため、固形性有機物に対する嫌気性処理能力の向上には、微生物による加水分解メカニズムの解明が重要である。

そこで、本研究では、加水分解酵素としてよく知られ、酵素活性を容易に測定できる α アミラーゼに注目し、バッチ実験を通して消化汚泥における固形性有機物の加水分解の実態をつかむとともに、固形性デンプン分解優占嫌気性細菌を単離し、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法によりバッチ実験における単離株のモニタリングを行い、消化汚泥内のデンプン加水分解細菌数と α アミラーゼ活性の関係について調査、基質の違いによる消化汚泥の α アミラーゼ活性への影響について検討した。

2. 実験方法

 α アミラーゼ活性評価：

バッチ実験は、下水消化汚泥（4000 mg VSS/L）を培地に加え、セルムバイアルにて35℃で振とう培養を行った。幾つかの基質条件で実験を行った結果、固形性デンプンを優先的に加水分解している菌に注目した実験系をたてる必要性があった。そこで、基質として固形性デンプン（トウモロコシ抽出、COD 2000 mg/L）を用い、固形性デンプン加水分解菌（starch degrading bacteria：SDB）が優占するよう集積培養し、投入デンプンが消費された時点で、異なる4種類の基質①固形性デンプン、②マルトース、③グルコース、④デンプンとグルコースの混合1：1）を各2000 mg COD/L 再投入した。マルトースは α アミラーゼによるデンプンの加水分解代謝産物でありさらに加水分解を必要とする基質として、グルコースは α アミラーゼによる加水分解の最終代謝産物であり α アミラーゼ遺伝子のカタボライト抑制基質と考えられているため、それぞれ実験条件に組み入れた。バッチ実験期間中、適時サンプリングを行い、 α アミラーゼ活性、マルトース、グルコース、全糖、s-COD およびVFA濃度を測定した。デンプン濃度は汚泥の全糖濃度がデンプン、マルトースおよびグルコースから成るとして、計算より評価した。

α アミラーゼ活性は、汚泥混合液（gross）、バルク液（filtrate）、細胞表層（net）の3形態別に評価した。汚泥細胞表層の α アミラーゼ活性は、汚泥混合液とフィルター濾過によるバルク液の酵素活性測定値の差から算出した。その酵素活性の測定は α アミラーゼ測定試薬（日本バイオコン）を用いて行い、活性値はCU単位で示され、一般的な酵素単位（U）と比例関係にある。

固形性デンプン加水分解菌の単離とモニタリング：

固形性デンプン加水分解菌の単離は、バッチ実験に用いた消化汚泥を植種源とした固形性デンプン集積培養系内からロールチューブ法を用いて行った。また、その単離株の16S rRNA 遺伝子配列に基づいた分子系統解析を行った。さらに、その結果から単離株を特異的に検出するプローブを作成し、メンブレンフィルターを用いたFISH法によりバッチ実験における汚泥中の単離株をダイレクトカウントし、その消長をモニタリングした。

3. 実験結果および考察

 α アミラーゼ活性評価：

処理場から採取した消化汚泥混合液は、常にほぼ一定の α アミラーゼ活性（約500 CU/g-VSS）を有していた（Fig.1、control）。バッチ実験の一例として、デンプンを添加した系の α アミラーゼ活性の推移をFig.1に示しているが、混合液の α アミラーゼ活性（gross）は、デンプンの消費と共に上昇し、デンプンが枯渇すると減少に転じた。2.7日目にデンプンを添加

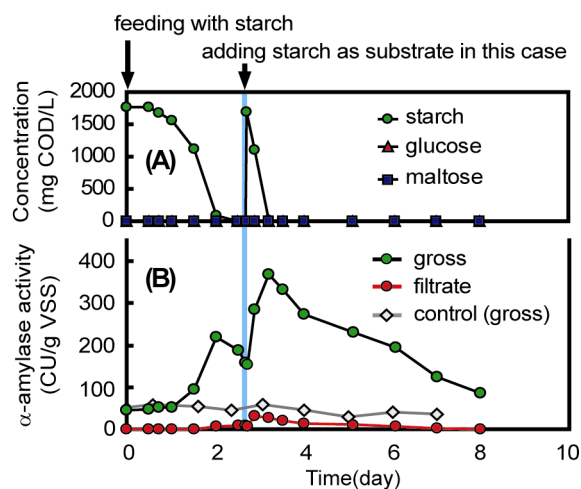


Fig.1 バッチ実験における消化汚泥中の基質および中間代謝物としての糖濃度の変化(A)と α アミラーゼ活性の変化(B)

Key words : 嫌気性処理、固形性有機物、加水分解、加水分解酵素、酵素発現

連絡先：〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1 長岡技術科学大学 環境系 水圏土壌環境制御研究室 Tel : 0258-47-1611 (内線6646)

すると、活性は再び急上昇し 370 CU/g-VSS に達した。この時デンプンは素早く消費され、その後の活性は徐々に低下した。なお、代謝産物としてのグルコースおよびマルトースの濃度は検出限界以下であった。バッチ実験での α アミラーゼ活性の推移は、他の基質条件下でも同様の傾向を示したが、グルコースを単独で添加した系では、他の条件と比較して α アミラーゼ活性のピーク値は極端に低かった。一方、バルク液に溶存の α アミラーゼ活性 (filtrate) は、すべての実験系で汚泥混合液の α アミラーゼ活性 (gross) に比較して非常に低い値であった。このことは、 α アミラーゼの大部分は細胞表層に存在していることを示し、加水分解は固形性有機物と細胞表層の接触が重要であり、バイオフィームやグラニュールを用いた処理方法は有効ではないことが示唆された。

固形性デンプン加水分解菌の単離とモニタリング：

消化汚泥より単離した4種の固形性デンプン加水分解細菌 SDB は *Aeromonas* 属に近縁な (16S rRNA 遺伝子配列による相同性で 94%)、新規グループを形成する細菌であった (Fig.2)。

この単離株のみで形成されるグループ (以下 SDB) を特異的に検出可能な DNA プローブを作成し、バッチ実験における消化汚泥サンプルをメンブレンフィルター上に固定、FISH 法を用いて SDB のダイレクトカウントを行い、デンプン加水分解細菌数と α アミラーゼ活性の関係を調査した (Fig.3)。基質を再投入するまでの SDB 優占化期間では、基質投入直後は観察することができなかった SDB が徐々に増加し、それと共に α アミラーゼ活性も上昇した。2.7 日目に基質を再投すると、直後に SDB の急速な増殖が確認された。グルコース単独基質の場合にもデンプン基質の場合と同様な菌数増殖が視られた。しかし、細胞表層に固着した α アミラーゼ活性 (net) は、デンプン基質で高い活性を示したのに対し、グルコース単独基質では半分程度の活性しか示さなかった (Fig.3)。

SDB の菌数と α アミラーゼ活性の関係をグラフにすると Fig.4 の様に直線関係を示した。これより、基質の投入によって変化する消化汚泥の α アミラーゼ活性には、SDB が大きく関与していることが推察される。この関係の傾き ($\Delta \text{CU} / \Delta \text{cell number}$) は SDB 1 cell あたりの α アミラーゼ活性であり、グルコース基質により増殖した SDB は、デンプン基質により増殖した SDB にくらべ半分以下の α アミラーゼ活性しか持っていなかった。また、デンプンとグルコースの混合基質およびマルトース基質を与えた系では、SDB 1 cell あたりの α アミラーゼ活性はデンプン基質の場合と同様な値を示し、グルコース単独基質の場合にのみ他の基質条件に比べて明らかに低い活性値となった。

これより、デンプンやマルトースを含み加水分解を必要とする基質は、何らかの要求刺激を与え、SDB の α アミラーゼ遺伝子の発現を活性化させることで、 α アミラーゼ活性を上昇すると推察される。

4. まとめ

消化汚泥中の α アミラーゼのほとんどは細胞表層に存在し、固形性有機物の嫌気性処理には細菌と基質との接触が極めて重要である。消化汚泥内では様々な微生物が加水分解反応に関わっており、汚泥として詳細な現象を追うことは困難であったため、消化汚泥内の固形性デンプン加水分解菌 SDB に注目し単離に成功した。SDB は新規グループを形成する細菌であった。SDB 1 cell あたりの net の α アミラーゼ活性は、グルコース単独基質においてのみ低い値を示し、SDB は α アミラーゼによる加水分解が要求される基質に接すると、 α アミラーゼ活性が高まる結果となった。これは、 α アミラーゼがデンプンやマルトースといった加水分解を必要とする基質に発現誘導されるためと考えられる。

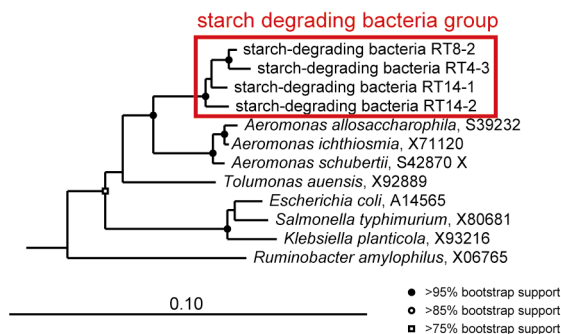


Fig.2 単離された新規の固形性デンプン加水分解細菌グループとその近縁種との分子系統解析結果

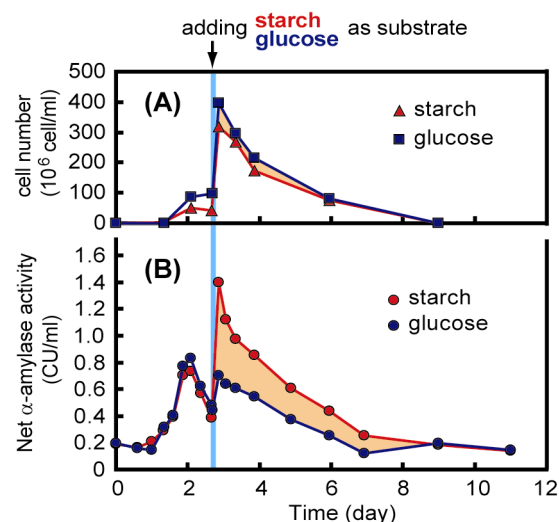


Fig.3 固形性デンプン投与時とグルコース投与時のデンプン加水分解細菌SDBの菌数の変化(A)および α アミラーゼ活性の変化(B)

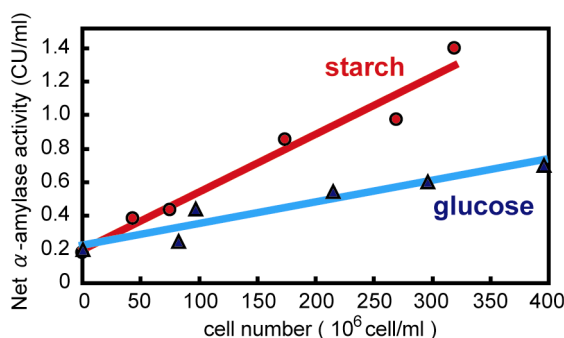


Fig.4 デンプンを基質とした場合とグルコースを基質とした場合のSDBの菌数と α アミラーゼ活性の関係