

はじめに

廃水の微生物処理の高度化あるいは効率化を図るためには、微生物自体の様々な性質を明らかにすることが、必須の条件となろう。今後、廃水処理への応用が期待される、固定化酵素ないしは固定化微生物法においても、廃水処理に適した酵素標品の分画・精製は、微生物の分離・培養と並んで要求されるものと思われる。しかしながら、酵素の精製に必要な可溶化するわけ *cell-free extract* の調製は、廃水処理槽内の微生物菌株に新旧の細胞が混在するため、比較的困難であると考えられる。本研究においては、前報¹⁾に続いて、活性汚泥中の β -galactosidase の可溶化に関し、二、三の検討を行ったので以下報告する。

2. 方法

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種し、回分法で培養した活性汚泥を実験に用いた。培養液の組成を、Table 1 に示した。今回試みた、活性汚泥中の β -galactosidase の可溶化方法は、非イオン性界面活性剤、キレート試薬、溶菌酵素の各々の単独あるいは組み合わせ、および、ホモジナイザー、カオトロピックイオン、塩による方法である。用いた非イオン性界面活性剤は、*n*-heptyl- β -D-thioglycoside (以下 *detergent*)、キレート試薬は、*cyclohexanediamine* 四酢酸 (以下 CDTA)、EDTA-2Na (以下 EDTA)、溶菌酵素は、卵白 *lysozyme* (以下 *lysozyme*)、カオトロピックイオンは、 NaClO_4 、塩は、 NaCl である。*detergent* による方法では、生菌体に 0.1M Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0 と 0.1M *detergent* を添加し、1時間 4°C で放置後遠心上清中の β -galactosidase 活性を測定した (Fig. 1)。*lysozyme*-CDTA or EDTA 法では、生菌体を 10mM Tris-HCl 緩衝液で2回洗浄し、20% sucrose を含む 30mM Tris-HCl 緩衝液に懸濁した後、40mM CDTA or EDTA と 2mg/ml *lysozyme* を添加して30分間室温で放置し、遠心上清中の β -galactosidase 活性を測定した (Fig. 2)。*lysozyme*-CDTA or EDTA-*detergent* 法では、生菌体に、25% sucrose を含む 0.01M Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0、10mM CDTA or EDTA、0.85mg/ml *lysozyme* および 0.1M *detergent* を添加して30分間放置後の遠心上清中の β -galactosidase 活性を測定した (Fig. 3)。ホモジナイザーはデフロン製を用いた。各方法による処理で得られた画分の β -galactosidase 活性と、処理前の活性を比較し回収率を算出した。 β -galactosidase 活性は、*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を基質とする方法²⁾で測定した。

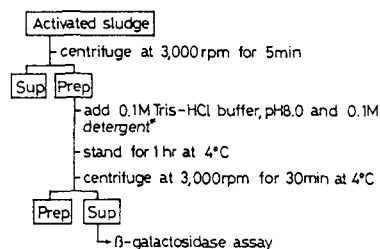
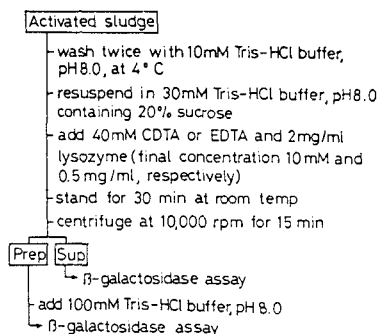
3. 結果および考察

Table 2 に、CDTA、EDTA、*detergent* を各々単独で用いた場合、*lysozyme*-CDTA or EDTA 法、*lysozyme*-CDTA or EDTA-*detergent* による各方法での β -galactosidase 活性の回収率をまとめて示した。CDTA、EDTA を各々単独で使用方法では、 β -galactosidase は全く可溶化されず、すべての活性が、遠心沈殿中に測定された。このことから、 β -galactosidase が金属イオンを介して細胞壁に結合している可能性は小さいことが示

Table 1 Composition of substrate

Constituent	Skim milk sol. (1000 mg/l)
BOD	711.0
COD	552.3
Total-N	52.3
Total-P	9.9

Reducing sugar (as lactose): 53.55%, BOD:N:P=72:5:1

Fig. 1 Procedure for preparing cell-free extract of β -galactosidase by detergent* (* *n*-heptyl- β -D-thioglycoside)Fig. 2 Procedure for preparing cell-free extract of β -galactosidase by lysozyme-CDTA or EDTA

唆される。detergent 処理による回収率は 3.4% であり、前報における、非イオン性界面活性剤 TritonX-100 による回収率とほぼ同程度であった。detergent の使用により、菌体が aggregation を生じたため、均一な懸濁液を得ることができず、残存率は測定しなかった。lysozyme-CDTA or EDTA 法では、各々、4.3%、4.8% が回収され、遠心沈殿中には、各々、59.5%、42.3% の β -galactosidase 活性が残存していた。lysozyme により細胞壁が溶解され、CDTA、EDTA により膜の構造が多少ゆるみ、若干の可溶化が生じたものと考えられる。処理前の活性から、回収率と残存率を差し引くと、失活部分は、各々約 36%、約 53% となる。これは、細胞内の protease による β -galactosidase の分解あるいは、一旦可溶化された酵素が何らかの原因により不活性化されたものと考えられる。lysozyme-CDTA or EDTA-detergent 法では、各々、21.2%、17.9% の活性が回収され、前報を含めて、最も高い回収率となった。detergent の使用により、lysozyme-CDTA or EDTA 法よりも回収率が下となったことから、細胞膜あるいはその他の部分の膜に存在する脂質と、 β -galactosidase が結合している可能性が示唆される。detergent の使用により、遠心沈殿が aggregation をおこしたため、沈殿中の β -galactosidase 活性の測定は行なわなかった。

CDTA は EDTA よりも安定度定数が大であり、ほとんどの金属イオンと EDTA よりも強く結合する性質を持つが、今回行った実験では、両者に顕著な差は認められなかった。

テフロンホモジナイザーによる機械的破壊法、カオトロピックイオン、塩による活性汚泥中の β -galactosidase の可溶化の回収率を Table 3 に示した。テフロンホモジナイザーによる方法では、活性の 2.3% が遠心上清中に回収された。遠心沈殿中の活性が、処理前の活性の 100% を超えたのは、フロックの相分化により、基質と接触する面が増したこと、ないし、基質の透過性が増したことなどに由来するものと考えられる。カオトロピックイオンは、膜蛋白質などの疎水性部分が、水と接触する際生じる水のエントロピーの減少を抑制する作用があり、蛋白質の可溶化に利用されている。また、KCl、NaCl などの塩は、静電的相互作用によって、膜や他の成分と結合している蛋白質を可溶化するのに用いられる。ここでは、最終濃度 0.5M NaClO₄、0.2M NaCl を用いて β -galactosidase の可溶化を試みたが、いずれの方法においても回収率は各々 1.3%、1.8% と低く、細胞表面からの可溶化には効果が認められなかった。

4. まとめ

活性汚泥中の β -galactosidase の可溶化の検討を行った。可溶化には、非イオン性界面活性剤、キレート試薬、溶菌酵素の単独あるいは組み合わせ、およびホモジナイザー、カオトロピックイオン、塩による方法を用いた。活性汚泥の生菌体を、溶菌酵素、キレート試薬、非イオン性界面活性剤を組み合わせで処理することにより、約 20% の β -galactosidase が回収された。他の方法による回収率は、0~5% 以下であった。

参考文献 1) 土木学会第 40 回年講 (1985) 2) 水質汚濁研究 (1984), 11, (2), 28-35 3) ドーライト試薬解説資料, No. 705 4) 蛋白質の基礎実験法 (1981), 南江堂, 21-23

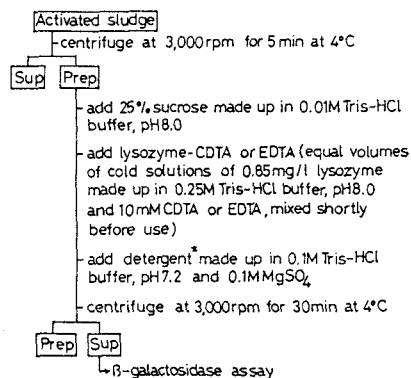


Fig. 3 Procedure for preparing cell-free extract of β -galactosidase by lysozyme-CDTA or EDTA and detergent (* n-heptyl- β -D-thioglucoside)

Table 2 Release of β -galactosidase from lysozyme-CDTA or EDTA and/or detergent-exposed cells of activated sludge

Treatment	%Release	%Residual
CDTA	0	100
EDTA	0	100
Detergent*	3.4	-
Lysozyme-CDTA	4.3	59.5
Lysozyme-EDTA	4.8	42.3
Lysozyme-CDTA-detergent*	21.2	-
Lysozyme-EDTA-detergent*	17.9	-

* n-heptyl- β -D-thioglucoside

Table 3 Release of β -galactosidase from cells of activated sludge by several treatments

Treatment	%Release	%Residual
Homogenizer	2.3	120.6
Chaotropic ion (ClO ₄ ⁻)	1.3	97.2
Salt (NaCl)	1.8	97.9