

II-106

カキ殻中のコンキオリンがカキ殻接触材反応槽の付着微生物に及ぼす影響

岩手大学工学部 学生員 ○池ヶ谷貴之 小野寺誠

正員 相沢治郎 海田輝之 大村達夫

1. はじめに

著者らはこれまでに河川の水質浄化対策として接触材にカキ殻を利用した研究を行ってきた。河川水中の有機物濃度が低い河川の場合、カキ殻中の微量有機成分と考えられるタンパク質（コンキオリン）が付着微生物のもつ酵素により加水分解されアミノ酸になり、アミノ酸が付着微生物の炭素源、窒素源として利用される可能性がある。本研究ではカキ殻中のタンパク質（コンキオリン）が付着微生物の増殖に及ぼす影響を検討することを目的としている。

2. 実験材料及び方法

2-1 カキ殻中のコンキオリン含有量

カキ殻を構成している微量有機成分であるコンキオリンを以下の方法で抽出した。カキ殻に付着している海藻類、生物死骸、細かい砂などをピンセット及びタワシを用いて十分に除去し、水洗し、50～60℃で乾燥させ、木槌を用いて1～2メッシュ（20mm～10mm）に破碎した。その後カキ殻のカルシウム含有量の中和当量に比べて、やや過剰に2N塩酸を加え、室温で一昼夜静置した。この間カキ殻は溶解し、溶液中に皮膜状藻片となって浮遊するコンキオリンが得られた。このコンキオリンを遠心分離にかけて分離し水洗した。その後0.5%炭酸ナトリウム水溶液に一夜浸漬させ、塩素イオンが検出されなくなるまで水洗した。これをさらにアルコールに一夜静置し、アセトンで洗浄し、乾燥することによって抽出した。¹⁾ 以上の過程を図-1に示す。

2-2 付着微生物によるアミノ酸の取り込み

コンキオリンは付着微生物のタンパク質分解酵素によりアミノ酸に加水分解されると考えられる。コンキオリンには16種類の基本アミノ酸が含まれており、今回の実験ではコンキオリンに含まれている割合の多い3種類のアミノ酸（Asp、Gly、Ser）を使用した。

カキ殻を接触材として人工河川水（C:N:P=6.00mg-C/l:1.50mg-N/l:0.03mg-P/l）を連続的に水路に流入させ付着増殖した微生物を採取し遠心分離により回収し、水洗して実験に用いた。実験は1ℓのトールビーカーに準備した付着微生物をいれ、人工河川水中の炭素源、及び窒素源としてアミノ酸を添加し、エアレーションを行いながら付着微生物によるアミノ酸の取り込み状況を経時的にTOCにより測定した。

図-1 カキ殻からのコンキオリン抽出法

カキ殻に付着している海藻類、生物死骸、細かい砂等をピンセット、たわしで十分に除去する。

↓
水洗し、50～60℃で乾燥させる。

↓
1～2メッシュ（20mm～10mm）に破碎する。

↓
2N HClをカルシウム含量の中和当量に比べてやや過剰に加え、室温で静置する。

↓
皮膜状藻片となって浮遊する粗コンキオリン遠心分離し水洗する。

↓
0.5%炭酸ナトリウム水溶液で洗浄し、塩素イオンが検出されなくなるまで水洗する。

↓
アルコールに一夜浸漬し、アセトンで洗浄し、減圧乾燥する。

↓
コンキオリン抽出完了

3. 結果及び考察

3-1 カキ殻中のコンキオリン含有量について

カキ殻100gより抽出されたコンキオリンの乾燥重量を測定し、平均した結果を表-1に示す。これよりカキ殻の乾燥重量当たり、平均0.13%のコンキオリンが含まれていることがわかった。この値は他

表-1 カキ殻中の有機基質含有量

	カキ殻中の Org-N(mg/g)	コンキオリン 抽出量(mg/g)
	0.734	1.07
	0.744	1.62
	0.737	1.33
	0.712	
平均	0.732	1.34

の文献²⁾に示されている値0.48%の約四分の1の値であった。また、Kjeldahl窒素法によるカキ殻中の窒素量は、乾燥重量当たり、平均で0.073%であった。この値は文献に示されている値0.15～0.2%の半分程度の値であった。これらの値よりコンキオリン中の窒素含有量は今回の実験では56.1%となり、文献値は31.3%～41.7%となり若干大きい値となった。一般にタンパク質の窒素含有量は16%といわれており³⁾少なくとも抽出された物質は有機体窒素を多く含み、ほぼコンキオリンと判断してよいのではないかと考えられる。

3-2 付着微生物によるアミノ酸の取り込みについて

図-2にTOCの経時変化を示した。これより各アミノ酸ともほぼ直線的に減少している。また、傾きとしてはGlyが一番大きく他の2つはほぼ同じとなった。

今回の反応が1基質反応のものと考え、0～4時間までの単位時間当たりの基質消費速度を初期基質消費速度とし、それを添加付着微生物量で除したものを比基質消費速度とした。比基質消費速度はMichaelis-Menten型の理論式にそうものとし、Hanes-WoolfプロットでMichaelis定数(K_m)、最大比基質消費速度(V_{max})を算出した。⁴⁾そ

表-2 各アミノ酸の比基質消費速度とMichaelis定数		
アミノ酸	最大比基質消費速度(hr^{-1})	Michaelis定数(mg/l)
アスパラギン酸(Asp)	8.58×10^{-3}	5.77
グリシン(Gly)	9.03×10^{-3}	7.81
セリン(Ser)	6.60×10^{-3}	2.42

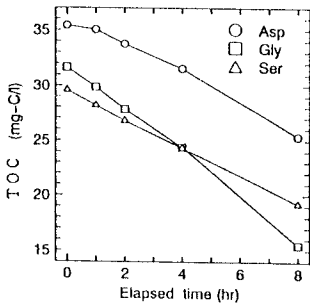


図-2 微生物によるアミノ酸の取り込み

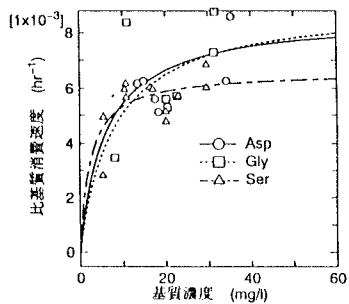


図-3 基質濃度と比基質消費速度の関係

それぞれのアミノ酸についての値を表-2、図-3に示す。

V_{max} はSerが $6.60 \times 10^{-3} (hr^{-1})$ と一番小さく、Glyが $9.03 \times 10^{-3} (hr^{-1})$ と一番大きな値を示した。Aspは $8.58 \times 10^{-3} (hr^{-1})$ となりGlyとあまり差がなかった。 K_m はやはりSerが $2.4 (mg/l)$ と一番小さくAspは $5.7 (mg/l)$ でSerの約2倍、Glyは $7.8 (mg/l)$ で約3倍の値となった。これよりSer、Asp、Glyは付着微生物により、分解され、利用されることが明らかになったが、コンキオリンが付着微生物によって、これらのアミノ酸にいかにして加水分解されるかが今後の検討課題となる。

4. おわりに

今回の実験でカキ殻中にはコンキオリンが0.13%含まれており、コンキオリンの窒素含有量は56.1%となった。アミノ酸の取り込み実験ではAsp、Gly、Serとの間に大きな差はなかったが3種類のアミノ酸が付着微生物により分解され利用されることがわかった。今後はコンキオリンに含まれている他の基本アミノ酸についても取り込み実験を行い、さらに抽出したコンキオリンを用いた取り込み実験を行い検討したい。

参考文献

- 1) 田中正三、波多野博行、喜安林三、高木豊 (1952) 真珠に関する生化学的研究(第3報) Conchiolinのアミノ酸について 日化誌, 74, 193-197
- 2) 横田弘司 (1981) カキ殻の利用に関する土壌肥科学的研究 広島農短大報, 6, 549-639
- 3) 水島三一郎、赤堀四郎編集 (1954) 蛋白質化学2 共立出版
- 4) 山根恒夫 (1980) 生物反応工学 産業図書