

(12) 有機物の分解代謝経路と活性汚泥の基質選択性

METABOLIC PASS WAY OF ORGANIC COMPOUND AND
SUBSTRATE SELECTIVITY OF ACTIVATED SLUDGE

生 方 悠
Yuu UBUKATA

ABSTRACT; This paper deals with the evaluation of the substrate selectivity of the activated sludge as heterogeneous bacterial population. The substrate selectivity was evaluated by the substrate selectivity index (SSI) that was defined by the following equation. $SSI=c/(a+b)$. Here, a, b, and c : the utilization rates of substrate A, B, and A·B mixture, respectively. For example, SSI=100% means that there are no metabolic competitions between the substrates and the utilization rate of each substrate is not influenced by the presence of other substrates. SSI=50% means that there exists the complete enzymatic inhibition as is known glucose effect.

The amino acids of 13 species were used for energy sources, because the metabolic path ways of these compounds are well known and the activated sludge was acclimated to peptone. SSI=55% was measured for a mixture of alanine and serine, 75% for glutamate and aspartate. The SSIs of more than 90% were measured for a mixture of two each essential amino acids. It was observed that the longer the metabolic pass ways of the amino acids to the TCA cycle intermediates, the larger the SSI. The extent of the substrate selectivity of the activated sludge was interpreted by the length of the metabolic pass ways of substrates to the TCA cycle intermediates.

KEYWORDS; Activated sludge, Amino acids, Substrate selectivity index,
Metabolic pass ways, TCA cycle.

1 緒 論

下水中の溶解性有機物は低分子有機物ではなくコロイド状の高分子有機物である。筆者は下水中の溶解性高分子有機物をタンパク質に対してはペプトンをまた炭水化物に対してはデキストリンを代表として用いた活性汚泥処理実験において、高分子有機物の加水分解の過程が有機物除去における律速段階になっており、高分子有機物の除去は1次反応式で、また高分子有機物の加水分解物質の除去は零次反応式で表示できることを明らかにした^{1, 2, 3)}。また溶解性高分子有機物の除去が1次反応式で示されるように活性汚泥と接触した直後に多量の有機物が除去されるのは活性汚泥の収量係数の変化および呼吸速度などから活性汚泥による高分子有機物の吸着作用によることを⁴⁾、さらにはデキストリン培養活性汚泥によるマルトオリゴ糖の除去において初期吸着量はマルトオリゴ糖の鎖長にほぼ比例することも明らかにした³⁾。

活性汚泥による有機物の主要な除去機構が高分子有機物の吸着作用にあるとしても、吸着された有機物は

* 東京都立大学工学部土木工学科 (Department of Civil Engineering, Tokyo Metropolitan University)

いずれは活性汚泥により加水分解され低分子の有機物となり活性汚泥に取り込まれる。ペプトン培養活性汚泥によるアミノ酸の取り込みにおいて、アミノ酸は二種類に分けられた¹⁾。一方はアミノ酸混合物の除去において有機物除去の重ね合わせが成立するもので、これには必須アミノ酸である Phe・Leu・Lys・Thr・Val などが含まれていた。他方はアミノ酸混合物の除去において有機物除去の重ね合わせが成立しないもので、これには Glu・Asp・Ala・Ser などが含まれていた。前者のアミノ酸は分解されて TCA 回路の中間体になるまでに 7~10 の酵素反応を経るが、後者のアミノ酸は脱アミノないしアミノ基転移反応により TCA 回路の中間体となるので酵素反応は 1 回である。

そこで今回は各アミノ酸の代謝経路における酵素反応の数と活性汚泥の基質選択性との関係を明らかにし、一般的な生化学の教科書^{5, 6)}にも書かれている TCA 回路に到るまでの有機物の分解代謝経路が、微生物の集合体である活性汚泥による有機物の除去の際にも利用できるか否かについて調べた。実験結果を総合すると、活性汚泥による種々の有機物除去においても有機物の代謝経路図が利用できたのでここに報告しておく。

具体的には下水中の代表的な有機物をタンパク質・炭水化物・脂肪とするとそれらの最終加水分解産物であるアミノ酸・グルコース・酢酸は有機物除去において重ね合わせが成立し、この有機物除去の重ね合わせが成立する根拠としては TCA 回路に到るまでの酵素反応の経路が長くその有機物独特のものであり、他の有機物とは酵素反応が競合しないことによるものと考えられる。

2 実験方法・基質選択性指標・その他

2.1 活性汚泥実験

アミノ酸の除去実験に用いた活性汚泥は、都市下水を処理する活性汚泥処理場の返送汚泥をペプトンで 1 年以上馴致・培養したものである。汚泥の培養は回分法で行ない、有機物負荷は 0.1~0.15g BOD/g MLSS・日である。汚泥の培養および有機物除去実験は 20℃ の恒温室で行なった。有機物除去実験における MLSS 濃度は約 1000 mg/l とした。活性汚泥混合液を Whatman GF/F のグラスファイバーフィルターでろ過し、そのろ液を溶解性有機物試料とした。試料中の有機物量はすべて TOC で測定した。TOC の測定には島津 TOC-500 を使用した。

2.2 有機物除去

各アミノ酸の除去実験は活性汚泥濃度を同一にした別個の反応槽で行なった。またアミノ酸混合物の除去実験においては単一アミノ酸除去実験で加えたアミノ酸量を各々混合し活性汚泥に添加した。

通常の活性汚泥処理実験におけるアミノ酸は窒素源として添加するが、本実験ではアミノ酸のみを基質として添加している。過剰のアミノ酸は脱アミノないしアミノ基転移反応により一般の有機物として分解代謝される。したがって本実験で使用されたアミノ酸は活性汚泥の炭素源として利用されていることになる。アミノ酸の分解代謝の経路は明かとなっている。

ほとんどの必須アミノ酸の除去過程においては始めの 1 時間以内にアミノ酸が急速に除去され（この間呼吸速度は高くなっていないので初期吸着と考えた）、その後は零次反応で減少した。必須アミノ酸の基質選択性指標は初期吸着を除いた零次反応の範囲から計算した。

なお微生物に対しては必須アミノ酸の概念は当てはまらないが、アミノ酸を便宜的に区分するため、ここでは代謝経路が相対的に長く、また動物に対して必須アミノ酸に属するアミノ酸を必須アミノ酸とし他のものを非必須アミノ酸と表現した。

本文においてはアミノ酸はすべて略号を用いた。Asp-アスパラギン酸、Glu-グルタミン酸、His-ヒスチジン、Ser-セリン、Arg-アルギニン、Gly-グリシン、Thr-トレオニン、Ala-アラニン、Val-バリン、Phe-フェニルアラニン、Ile-イソロイシン、Leu-ロイシン、Lys-リジン。

2.3 活性汚泥の基質選択性指標

活性汚泥の基質に対する選択性の強さは選択性指標で表現するものとする。2 種の有機物に対する活性汚

泥の基質選択性指標 (Substrate Selectivity Index : S S I) は次式で定義する。

$$S S I = c / (a + b)$$

ここにおいて a, b : 有機物 A、B の単独除去速度 , c : 有機物 A、B の混合物の除去速度

ある活性汚泥において、有機物 A、B の分解代謝の経路がまったく異なれば、ある分解酵素に対する有機物間の競合はなく、混合有機物の除去速度は有機物 A、B の各々の除去速度を重ね合わせたものとなる。この場合、混合有機物の除去速度は $c = a + b$ となるから、有機物 A、B に対する活性汚泥の基質選択性指標は 1.0 (100%、以下%で表わす) となる。また有機物 A、B のうちどちらか一方が他の有機物の中間代謝物であれば、ある分解酵素に対して有機物が競合することになるから混合有機物の除去速度は有機物 A、B のどちらかの除去速度となる ($c = a$ or b)。この場合、有機物 A、B の除去速度はほぼ等しくなるであろうから $a = b$ となり、有機物 A、B に対する活性汚泥の基質選択性指標は 50 となる。グルコース効果や Diauxie における有機物除去がこの場合の代表例である。

ここで見方をやや変えると、二種の有機物に対する活性汚泥の基質選択性指標が小さい (50 に近い) ことは、二種の有機物は構造的に類似していることになり、両有機物間における酵素反応の数は少ないことになる。また活性汚泥の基質選択性指標が大きい (100 に近い) ことは 両有機物間における酵素反応の数が多くなることになる。これらのことから、活性汚泥の基質選択性指標の大小と有機物の代謝経路における酵素反応の数が結び付けられる。

2.4 T C A 回路

好気性微生物において T C A 回路が重要な回路である理由は 2 つある。1 つは取り込んだ有機物を好氣的に分解しエネルギーを獲得するための主要回路であり、他方は前の過程で獲得したエネルギーを用いてその生物に特徴的なタンパク質などの細胞構成物をこの回路の中間体を用いて構築することにある^{2,6,7}。

細胞合成に必要な有機物が細胞外から供給されるとその有機物を合成する回路は停止し細胞外の有機物を利用する⁷ (このため厳密には基質選択性指標は 100 %にはならない)。しかし活性汚泥処理実験に用いられる有機物の数は極く少数であるので、細胞合成に及ぼす外部有機物の影響はほとんどないものと考えられる。したがって外部有機物の種類が変わることにより大きく変化するものは T C A 回路におけるエネルギー獲得に及ぼす有機物間の相互作用となる。有機物間の相互作用は、ある特定の代謝経路における酵素量は一定であろうからその酵素に対する有機物間の競合と考えると、これも有機物除去における活性汚泥の基質選択性指標で測定できるであろう。

3 実験結果及び考察

実験結果を提示する前に、タンパク質、脂肪、糖類の分解代謝経路の概略を図-1 に示す⁵。図-1 には筆者の使用した 13 種のアミノ酸が T C A 回路の中間体 (この場合にはピルビン酸も含めて) に到るまでの酵素反応の数⁶を物質名の後に記入しておいた。図-1 に示されているように有機物分解の第一段階は加水分解であり、この反応は細胞外で行われる。高分子有機化合物の加水分解の過程が活性汚泥による有機物除去過程における律速段階になっていることは以前に報告した¹。

3.1 ペプトン培養活性汚泥の基質選択性指標

各種アミノ酸を組み合わせた場合の活性汚泥の基質選択性指標を、表-1 に示す。実験番号 1~4、5~8、9~12 は各々必須アミノ酸同士、非必須アミノ酸同士、必須アミノ酸と非必須アミノ酸を組み合わせたものである。実験は 2 カ月にわたって行われたので、微生物種の変化もあるものと考えられ、全体を通してははっきりと断定できない部分もあるが、ある特定な目的を持った実験からはかなり鮮明な結論が導き出せた。

(A) Phe - Lys - Leu - Arg

芳香環をもつ Phe は分解されてアセトアセチル・C o A とフマル酸の形で T C A 回路に入る。L y s は分解されるとアセトアセチル・C o A のみを生じる。Leu はアセトアセチル・C o A とアセチル・C o A に

分解される。Arg は Glu に代謝されてから TCA 回路に入る。これらの必須アミノ酸間の基質選択性指標は 83 以上と他のものに較べて高い(実験番号-1, 3)。

(B) Leu - Val - Ile

Leu はアセトアセチル・CoA とアセチル・CoA に、Ile はアセチル・CoA とスクシニル・CoA に、また Val はスクシニル・CoA のみに代謝されて TCA 回路にはいる。これら 3 種のアミノ酸は分解代謝産物は異なるが、Ile と Val では始めの 5 つの酵素が、また Leu では 3 つの酵素が共通である⁶⁾。またこれらの分岐鎖アミノ酸は代謝経路の途中から分岐鎖脂肪酸の代謝経路にも連絡している。その結果としてこれらのアミノ酸間における基質選択性指標は 70 前後と他の必須アミノ酸間のそれより低い値を取るものと考えられる(実験番号-2)。

(C) Ala - Ser - Gly - Thr

Ala - Ser - Gly - Thr がピルビン酸を経由してアセチル・CoA にいたる経路を図-2 に示す⁶⁾。Gly の分解代謝の経路は 2 つあり、Ser にいたる経路は主要経路ではない⁶⁾。Ser と Gly・Thr との基質選択性指標は 80 以上と必須アミノ酸間における基質選択性指標と同じくらい高く、一方 Gly - Thr のそれは 69 とこれらのアミノ酸の中では最小値を取っている。これらの結果は Gly から Ser にいたる経路が主要経路でないことに起因しているのであろう。しかしそれでも、Ser - Gly の基質選択性指標は 80 と Ser - Thr のその 88 より小さく、図-2 に示される Ser - Gly - Thr の代謝分解の経路が読み取れる(実験番号-9)。また TCA 回路中間体の Glu から見ると Gly より Ser の方が TCA 回路に近いと判断される(実験番号-7)。

動植物細胞においては、Ala は酵素アラニントランスアミナーゼにより α -ケトグルタル酸にアミノ基を転移しピルビン酸に、また Ser は酵素デヒドラターゼによる脱アミノ反応を受けピルビン酸になる⁸⁾。Ala - Ser の基質選択性指標は 55 ないし 64 と実験に用いたアミノ酸の内では最も小さな値を示した(実験番号-5, 6)。Ala と Ser のアミノ酸混合物の除去速度がそれらのアミノ酸の単独除去速度にほぼ等しいことは、ピルビン酸にいたる経路の酵素に対して、有機物間の競合があるものと考えられる。グルコース効果の場合と同様にこれらのアミノ酸混合物の除去においてはどちらか一方のアミノ酸しか利用されていないのであろう。Gly からみると Ala より Ser の方が代謝経路上で近くに位置していることが基質選択性指標から判断できる(実験番号-5)。TCA 回路から Ser と Ala を比較すると Ala の方が Ser より遠いことになり(実験番号-6)、実験番号-5 の結果とは矛盾することになる。しかし図-2 に示すように Ala と Ser の両アミノ酸の代謝経路がピルビン酸にはいるところで分岐することを考えれば矛盾はなくなる。

(D) Ser - Glu - Asp

Glu は脱アミノ反応により TCA 回路の中間体である α -ケトグルタル酸に、また Asp はアミノ基転移

Table-1. Substrate selectivity indexes (%) of activated sludge acclimated to peptone.

Ex. No.	Substrates	SSI	Ex. No.	Substrates	SSI
1	Phe - Leu	99	2	Leu - Val	71
	Phe - Lys	84		Leu - Ile	66
	Leu - Lys	92		Val - Ile	69
3	Phe - Leu	89	4	Thr - Val	93
	Leu - Arg	83		Thr - Lys	79
	Phe - Arg	100		Val - Lys	73
5	Ala - Ser	55	6	Ala - Ser	64
	Ala - Gly	73		Ala - Asp	77
	Ser - Gly	70		Ser - Asp	73
7	Glu - Ser	75	8	Glu - Asp	76
	Glu - Gly	80		Glu - Ser	78
	Ser - Gly	74		Ser - Asp	82
9	Ser - Gly	80	10	Glu - His	60
	Ser - Thr	88		Glu - Arg	88
	Gly - Thr	69		His - Arg	76
11	Glu - Thr	58	12	Ser - Leu	81
	Glu - Ile	73		Ser - Phe	83
	Glu - Lys	82		Ser - Arg	75

反応により T C A 回路中間体のオキサロ酢酸になる。この3種のアミノ酸の内では Glu と Asp に対する基質選択性指標が 76 と最も小さく代謝経路上では近いと判断される。Ser から見ると Asp より Glu の方が代謝経路上では近いことが読み取れる。(実験番号-8)。

(E) 必須アミノ酸と非必須アミノ酸の組合せ

ほとんどの必須アミノ酸の除去には初期吸着と考えられる現象があり、また非必須アミノ酸の除去は同一活性汚泥量の場合短時間に終了してしまうので、この両者の組合せにおける基質選択性指標の計算においては有効な測定点の数が限定され精度が低下していた。また基質選択性指標とは別にこれらのアミノ酸混合物の除去においては、除去速度そのものが非必須アミノ酸のそれとほぼ同じであったり、場合によってはやや減少していることもあった(実験番号-9~12)。

(F) 総括

ペプトン培養活性汚泥によるアミノ酸混合物の除去実験から各アミノ酸間の基質選択性指標を求めた。基質選択性指標は Ala - Ser の 55 から Arg - Phe の 100 までに分散していた。基質選択性指標をやや詳しく調べると T C A 回路の中間体に近い Glu・Asp とピルビン酸に近い Ala・Ser の4種のアミノ酸の間における基質選択性指標は 75 以下であり、必須アミノ酸(分岐鎖アミノ酸間は除外して)の間におけるそれは 90 以上であるから、活性汚泥の基質選択性指標と T C A 回路に到るまでの酵素反応の数との間には明らかな相関関係が見いだされた(厳密には微生物における律速ないし不可逆反応となる酵素反応の数であり、また微生物の種による代謝酵素系の有無や微生物細胞における膜透過も問題になるが、ここでは触れないでおく)。同一実験日における各アミノ酸間の基質選択性指標の大小は酵素反応の数と対応しており、各アミノ酸の代謝経路の略図は図-1、2を見なくとも浮かび上がるほどである。

図-1の代謝経路は同一種の細胞を用いて推定・確認されたものである。好気性微生物の混合物である活性汚泥においても図-1の代謝経路が推定されたことは、生物種により代謝経路の調節方法は異なるとも代謝経路自体は限定され、好気的なエネルギー獲得の機構は T C A 回路以外にはないことを意味しているであろう。

3.2 下水中の有機物に対する基質選択性指標

都市下水中の有機物は多種多様である。しかし活性汚泥により容易に分解される有機物はアミノ酸、脂肪酸、炭水化物であろう。図-1の有機物の代謝経路図から、これらの有機物間における基質選択性指標は 100 であることが推定される。実験に用いた活性汚泥はペプトン培養活性汚泥であり、有機物としてアミノ酸には Ala・Glu・Phe を、脂肪酸には酢酸を、炭水化物にはグルコースを代表として使用した。実験結果を表-2に示す。ペプトン汚泥は培養基質としては用いてない有機物をかなりの速度で取り込んでいる。

酢酸は A T P を消費して補酵素 A と結合してアセチル・C o A となり T C A 回路へ入って行く。グルコースは9つの酵素反応を持つ解糖系を経てピルビン酸に代謝されるから、グルコースの T C A 回路にいたる酵素反応の数は必須アミノ酸のそれに相当する。

表-2に示すように、Ala と Glu・酢酸・グルコースとの間における基質選択性指数は 80 代であったが他のものはそれより高く 90 代であった。下水中の有機物をそれぞれに代表させた Glu・酢酸・グルコースに対する相互の基質選択性指標は 94 以上であるから、これらの有機物間には基質除去の重ね合わせが成立していた。

Table-2. Substrate selectivity indexes (%) of activated sludge acclimated to peptone.

Substrates	SSI	Substrates	SSI	Substrates	SSI
Glc - Glu	97	Ace - Phe	97	Phe - Ala	97
Glc - Ace	94	Ace - Glu	95	Phe - Glu	90
Glc - Phe	97	Ace - Ala	87	Ala - Glu	83
Glc - Ala	88				

Glc : Glucose,

Ace : Acetate

実際の都市下水を処理する活性汚泥による複合有機物の除去に関する研究は多田ら⁹⁾により報告されている。複合有機物の除去において、酢酸・グルコース系においては有機物除去の重ね合わせが成立しており、一方脂肪酸に属する酢酸・プロピオン酸系においては有機物除去の重ね合わせが成立せず酢酸の除去速度を示していた。現場で測定されたこれらの実験結果は筆者の研究結果と同質のものである。

Tischlerら¹⁰⁾は、複合有機物の除去において有機物除去の重ね合わせが成立することを実験的に確認し、このことを基礎にして複合有機物の除去が1次反応になる事を説明している。この実験に用いた有機物はグルコース・フェノール・アニリン・グリシン・酢酸であり、活性汚泥はこれらの有機物の混合物で培養したものである。複合有機物の除去においてもこれらの有機物の除去が重ね合わせたものになるであろうことは図-1の代謝経路からも推定できる。

4 結 論

ペプトン培養活性汚泥による種々のアミノ酸間における基質選択性指標を単一アミノ酸及びアミノ酸混合物の除去結果から求めた。好気性微生物におけるエネルギー生成回路として重要なTCA回路の近くに位置するアミノ酸間における基質選択性指標は小さく、TCA回路に到るまで多数の酵素反応を受けるアミノ酸間における基質選択性指標は大きかった。このことからTCA回路に到るまでのアミノ酸の代謝経路の長さが基質選択性指標の大きさで説明できた。下水中の代表的有機物の加水分解産物であるアミノ酸・酢酸・グルコースに対して、各アミノ酸間におけるこの概念を応用したところ、TCA回路に到る有機物の代謝経路から予想されたように基質選択性指標は高く、基質除去の重ね合わせが成立していた。

混合微生物系である活性汚泥においても、好気的な有機物の代謝経路はTCA回路に収束していると考えられる。有機物の分解代謝経路において同一酵素に対する有機物間の競合がない場合には有機物除去の重ね合わせが成立し、同一酵素に対する有機物間の競合がある場合には有機物除去の重ね合わせが成立しない。

本研究を遂行するに当たり種々の配慮を賜った川口士郎教授を始めとする都立大学工学部衛生工学研究室の皆様には深謝申し上げます。またTOC計の使用について便宜を頂いた田中康男主事を始めとする東京都下水道局計画部技術開発課水質係の皆様には御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 生方 悠 他：溶解性高分子有機物（ペプトン）の除去過程における律速因子と活性汚泥の基質選択性、衛生工学研究論文集（土木学会衛生工学委員会）、Vol. 24, pp. 95-103, 1988
- 2) 生方 悠：活性汚泥による溶解性高分子有機物（デキストリン）の除去機構、第22回水質汚濁学会講演集、pp. 49-50, 1988
- 3) 生方 悠：デキストリン馴致活性汚泥の基質除去特性、第43回土木学会年次学術講演概要集、pp. 1018-1019, 1988
- 4) 生方 悠：活性汚泥微生物による高分子及び複合有機物の除去機構、第42回土木学会年次学術講演概要集、pp. 810-811, 1987
- 5) 田宮信雄 他訳：コーン・スタンプ生化学（第5版）、東京化学同人、1988
- 6) 中尾 真 監訳：レーニンジャー生化学（上）（第2版）、共立出版、1985
- 7) 高橋 甫 他訳：微生物学（上）、培風館、1978
- 8) 今堀和友 他監訳：生化学辞典、東京化学同人、1984
- 9) 多田 実 他：代表的有機物の活性汚泥処理、第25回下水道研究発表会講演集、pp.195-197, 1988
- 10) L.F.Tischler and W.W.Eckenfelder, Jr.: Linear substrate removal in the activated sludge process, Adv. Wat. Poll. Res., Proc. 4th. Int. Conf., pp.361~383, 1969.