

嫌気性微生物による低級脂肪酸の生成に関する研究

京都大学 宗宮 功、○小野芳朗
宮田 篤、上坂太一

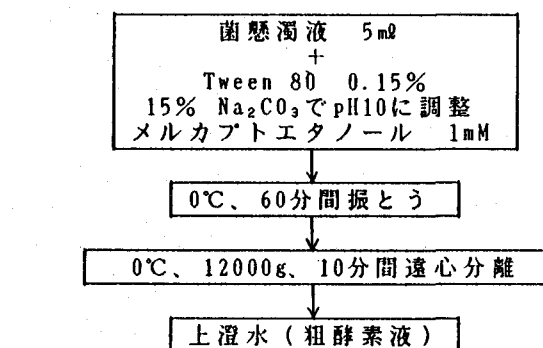
1. はじめに 本研究では、汚泥の効率的な酸発酵を進めるために、律速段階と考えられる加水分解反応の促進のため、汚泥に前処理を施し、酸生成菌による酸発酵実験を行っている。特に本報では、汚泥の酸発酵過程を明確に把握する上で新しい指標の導入が不可欠となり、前処理汚泥の酸発酵に係わる生菌数の評価、さらにそれら菌群の加水分解酵素活性の測定方法の開発を進めており、その成果を示すこととする。

2. 酸発酵菌数及び加水分解酵素活性の測定

定 (1) 加水分解酵素活性の測定方法の開発 《菌体外粗酵素液の抽出》

反応の律速段階と考えられる高分子有機物の加水分解反応は、大半が菌体外に誘導された加水分解酵素に依るものである。この菌体の有する加水分解能を、酵素活性を測定することで評価する方法の開発を試みた。加水分解酵素は多種類あるが、ここでは汚泥中の主成分であるデンプン、セルロースの炭水化物分解酵素(アミラーゼ、セルラーゼ)とタンパク分解酵素(プロテアーゼ等)を対象としてとりあげることとした。図-1には粗酵素の抽出、調整及び酵素活性測定法を示した。まず菌体外加水分解酵素は、溶液中と菌表層に付着していると考え、界面活性剤で菌体上の酵素を剥離させた後、酵素タンパクの分解を防ぐためpHを上げ、さらに酵素の活性部位の保護剤としてメルカプトエタノールを投入した¹⁾。遠心分離して粗酵素液を得た後²⁾、これに基質を反応させ、生成する還元糖(Somogyi-Nelson法)、アミノ酸(ニンドル法)を測定し、関連微生物群の酵素活性を表示することとした。

(2) 酸生成菌数の測定方法の開発 嫌気性消化のような古くて新しい処理法でも、その混合培養系である酸発酵過程に係わる細菌を独立に測定し、定量して酸発酵過程を評価する過程はあまりみられない。細菌の生化学試験においては菌の酸化、発酵能を調べるための方法としてOxidation-Fermentation(OF)法



《加水分解活性の測定》

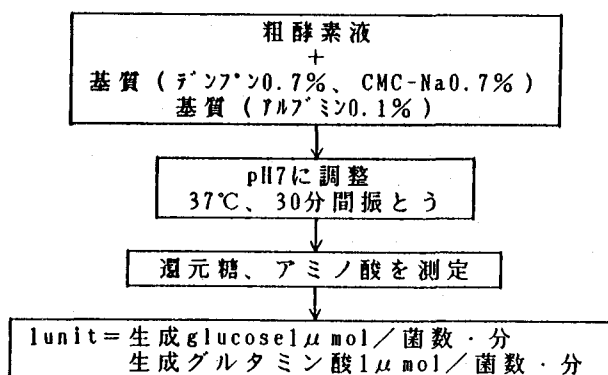


図-1 加水分解酵素活性の測定

材³⁾が適用されているが、あくまで定性試験である。ここでは酸生成菌数を測定することにより酸生成過程における生物量制御を定量的になすことを目指し、BTB指示薬が黄変することで菌が酸生成能を有することを検知するいわゆるOF法の原理を応用しつつ、簡便さ、精度を考慮して図-2に示すような平板希釈法を考案している。

寒天培地中には基質として、グルコース/ペプトンが含まれており、菌が酸発酵することで平板上のコロニー周辺が黄変する。平板上に20~30個の黄変ハローが生成したものを測定対象とし、その細菌数を計測することとした。

(3)供試汚泥 発酵の対象試料とした汚泥は、〇市終末処理場の最初沈殿池流入水を、塩化第2鉄で凝集させ沈殿した生汚泥であり、SS 26,000mg/l、全糖 7450mg/l、タンパク 15500mg/lである。これに NaOHを数段階に分けて投入し、100℃で、6分間熱処理した。

(3)回分実験装置 酸発酵実験に用いた装置は、図-3に示すようにリアクターとして500mlフラスコを用いガス捕集装置を取り付けたものである。これに凝集沈殿汚泥を前処理したもので馴致した消化汚泥（酸生成菌数 5×10^4 コ/ml）と、アルカリ無投入、0.1、0.2 gCaCO₃/gVSS投入後100℃熱処理の3つの汚泥を、1:10の割合で投入し、37℃、100rpmで振とう培養し、回分式で経時的に試料を採取した。生成した低級脂肪酸はガスクロマトグラフィ(Yanaco, G-8)で分析した。

3. 実験結果および考察 (1)加水分解酵素活性 図-4、5に

菌体当りの炭水化物およびタンパク質加水分解活性の経時変化を示した。酵素活性は、1分間に系内の菌体数当りに生成した還元糖(グルコース換算)、あるいはアミノ酸(グルタミン換算)の μmol 量として表示した。両者共に開始後10時間以内に酵素活性の頂点に達した。酵素活性はピーク時で、0.2gCaCO₃/gVSS投入汚泥がアルカリ無投入に比して約10倍から30倍大きく、前処理操作による加水分解能の上昇を表している。いずれにせよ、加水分解反応は培養初期の10時間程度で完了しているようにみられる。また炭水化物

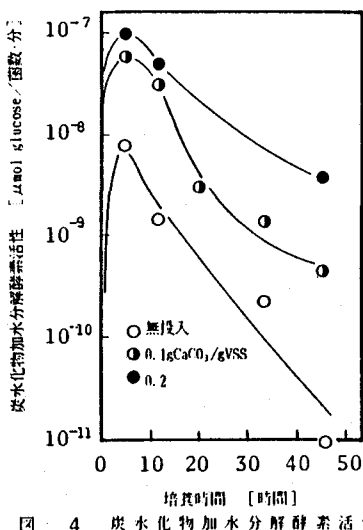


図-4 炭水化物加水分解酵素活性

培地	グルコース	50g
	ペプトン	2g
	NaCl	5g
	K ₂ HPO ₄	0.3g
	BTB	0.08g
	寒天	15g
蒸留水	1ℓ	
	(pH=8.0)	

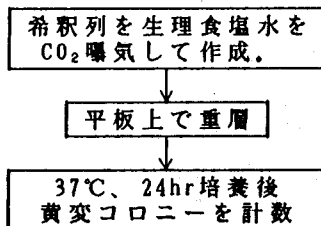


図-2 酸生成菌数の測定(希釈平板法)

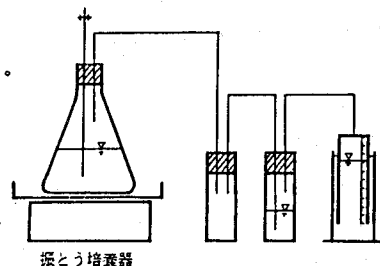


図-3 回分式酸発酵実験装置

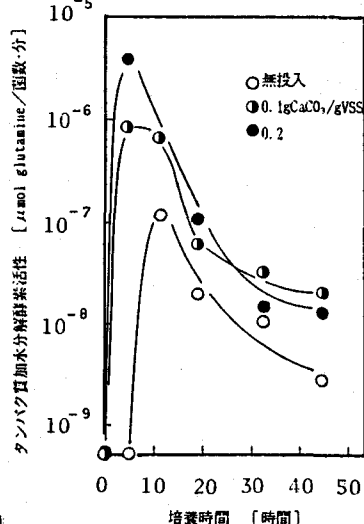


図-5 タンパク質加水分解酵素活性

酵素活性に比してタンパク質加水分解酵素活性は約10倍高く、プロテアーゼ等の働きにより、可溶化したタンパク質の加水分解が促進されると推定できる。このことは系内のアミノ酸が増加することによってもわかる。図-6に培養液中のアミノ酸の変化を示したが、約2200mg/lまで上昇し、酸発酵過程に殆ど用いられず、系内に貯り込んでいたと考えられる。一方、還元糖は系内にほとんど残留せず、菌体内に摂取され貯留されたり、酸発酵に

使われたものと考えられるが定かでない。

(2) 酸生成菌数の変化

図-7に酸生成菌数の経時変化を示した。菌体数は、初期菌体数が若干低めに設定されたこともあって培養開始後10時間を経て上昇を始めた。この10時間は、加水分解に要した時間に相当する。菌は高分子炭水化物の分解後、糖を摂取し、増殖を開始したことを表す。菌数を定量できたことにより、菌体当りの負荷量や、菌体当りの酸生成量が計算できるようになる。たとえば、GCで測定した低級脂肪酸を全

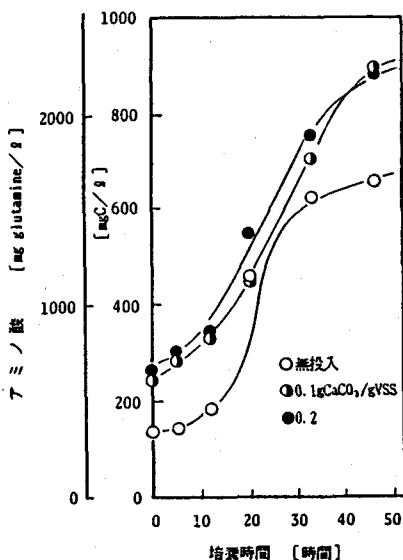


図-6 アミノ酸の生成

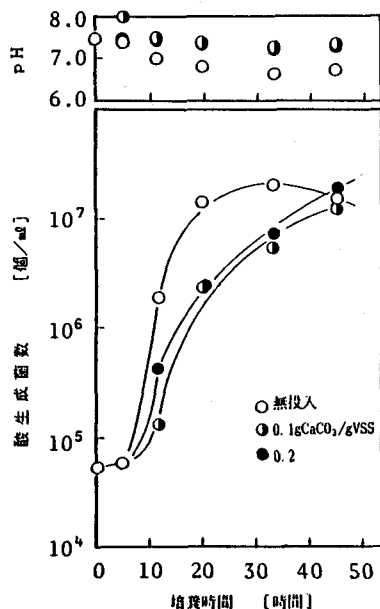


図-7 酸生成菌数の変化

て炭素換算し、合計したものを全有機酸TOAとして図-8に表示した。その内訳は酢酸、アロ・ン酸、iso・ン酸、n-酪酸、iso・吉草酸であった。TOAの増加は酸生成菌の増加に伴い、培養開始約10時間後から始まっている。酸生成菌数とTOA生成量の関係は、図-9に示すように両対数紙上でほぼ直線的な関係として得ることができる。

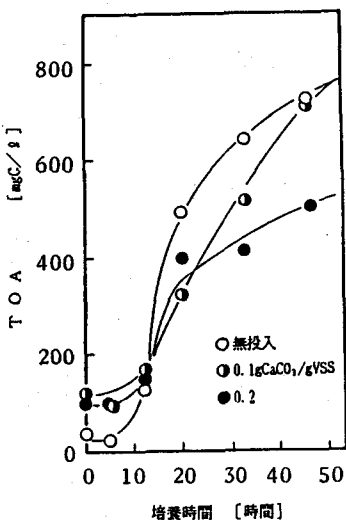


図-8 低級脂肪酸の変化

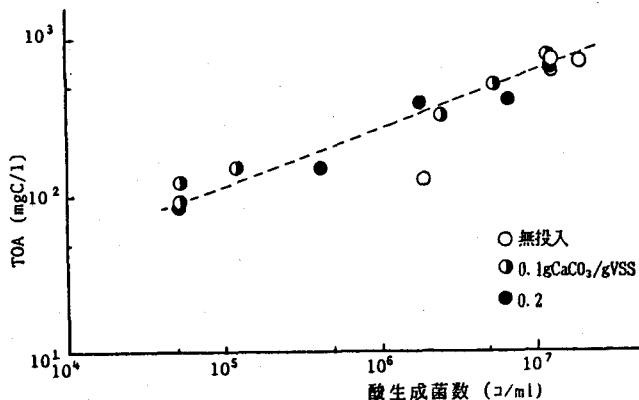


図-9 酸生成菌数と低級脂肪酸濃度

5. おわりに 以上をまとめると以下ようになる。

- (1) 加水分解能を酵素活性を測定することで把握できる方法を開発しつつある。この方法を用い、前処理した汚泥に消化汚泥を与え回分式で培養し、系内の加水分解酵素活性を測定しうる。前処理で可溶化した汚泥ほど系内の加水分解活性が高く、またタンパク質分解活性が高く、系内にはアミノ酸が貯留されていた。
- (2) 嫌気性消化の酸発酵過程における操作・管理へ向けての生物量指標として、酸生成菌数の実測方法を平板培養法により定量した。これにより酸生成菌数と酸生成量の関係を算定しうる。

参考文献

- 1) 日本生化学会「生化学実験法(5)酵素研究法」東京化学同人
- 2) 阪本ら、醗酵工学会誌、60(5)、1982
- 3) 「病原細菌の生化学的検査法」医学書院