

B-1

生物学的リン除去活性汚泥における嫌氣的アミノ酸摂取

東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻

○渡辺暁人

同上

味埜俊

同上

佐藤弘泰

1. はじめに

生物学的リン除去プロセスを担うポリリン酸蓄積細菌の代謝についての既存の研究は、酢酸やプロピオン酸などの揮発性脂肪酸に関するものが主であるが、実際の下水中には揮発性脂肪酸以外の成分も多く含まれている。例えばタンパク質は、実際の下水中の有機物質組成の約 20% を占めており、活性汚泥の代謝に対して大きく影響すると考えられる。本研究では、このタンパク質の構成物質である遊離アミノ酸のポリリン酸蓄積細菌による嫌氣的摂取について検討した。

2. 実験方法

生物学的リン除去活性汚泥のアミノ酸代謝を調べるために、実験室で培養したリン除去活性汚泥と実際の処理に使われている活性汚泥を用いて、カゼインタンパクの分解物質であるカサミノ酸を基質とした嫌気好気式バッチ実験を行なった。

実験対象汚泥としては、回分式嫌気好気リアクターにより、グルタミン酸、ペプトン、酵母エキスを含む人工下水で馴致したリン除去活性汚泥と、実下水処理に用いられている芝浦下水処理場の東京都パイロットプラントの汚泥を用いた。人工下水で馴致した汚泥を用いた実験(実験①とする)は 100mgC/L、実下水処理汚泥を用いた実験(実験②とする)には 200mgC/L のカサミノ酸を基質として投与した。バッチ実験の容器には 1L 三角フラスコを使用した。実験の時間条件は嫌気条件 120 分の後好気条件 60 分とし、30 分ごとにサンプリングを行なった。嫌気状態にするには窒素で曝気した。

サンプルの測定項目は TOC、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、MLSS、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、汚泥内の PHA、アミノ酸である。アミノ酸については、サンプル中の遊離アミノ酸をダブシルクロリドで誘導体化し、逆相高速液体クロマトグラフィーにより分離・定量した。バイアル中のサンプル 50 μl に対し、1.3mg/ml(アセトニトリル)のダブシルクロリド溶液 500 μl 、炭酸水素ナトリウムバッファ 200 μl を添加し、70°C で 20 分加熱してダブシル誘導体化した後、アセトニトリル、炭酸水素ナトリウムバッファを溶離液として HPLC で各アミノ酸を分離し、436nm の波長での吸光度を測定し、定量した。

3. 実験結果および考察

3.1 HPLC の結果

HPLC で 17 種類の遊離アミノ酸を分離・測定した結果を図 1 に示す。また、アルファベットは各アミノ酸の一文字表記であり、それぞれ次のアミノ酸を表している。

グルタミン酸:D、アスパラギン酸:E、セリン:S、トレオニン:T、グリシン:G、アラニン:A、アルギニン:R、プロリン:P、バリン:V、メチオニン:M、イソロイシン:I、ロイシン:L、フェニルアラニン:F、システイン:C、リジン:K、ヒスチジン:H、チロシン:Y

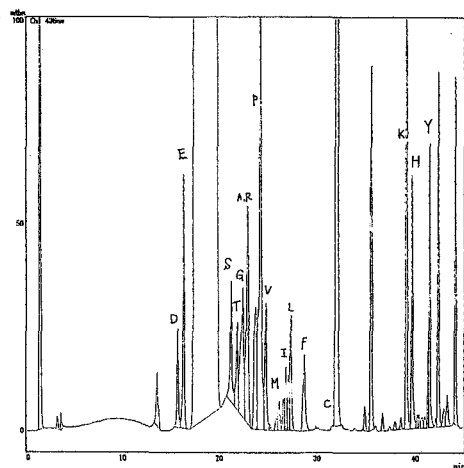


図1 HPLCによるアミノ酸分析のクロマトグラム

図 1 のように、HPLC により各アミノ酸の良好なピークの分離が得られたが、アラニンとアルギニンはピークが重なった。

3. 2 バッチ実験の結果

バッチ実験における炭素収支を図 2、3、各アミノ酸の濃度変化を図 4、5 に示す。

図 2、図 4 によると、実験①においては嫌気条件において各アミノ酸の汚泥による摂取が行なわれ、全体としての TOC の減少が見られたが、図 3、図 5 を見ると実験②ではどのアミノ酸も実験①ほどには摂取されず、全体の TOC の減少もほとんどなかった。また、どちらの実験においても、アミノ酸の摂取と収支が合う程度の PHA の蓄積は確認されなかった。

カサミノ酸投与実験で、嫌気条件で汚泥に摂取されたアミノ酸と摂取されなかったアミノ酸、またそれらの時間的変化の例を表 2 と図 6、図 7(実験①の結果)に示す。

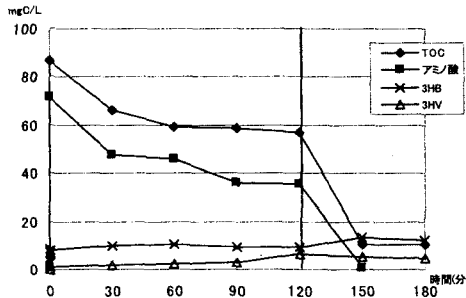


図 2 実験①の炭素収支

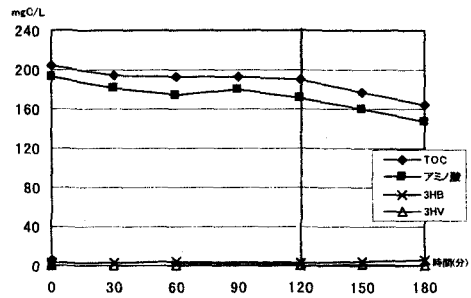


図 3 実験②の炭素収支

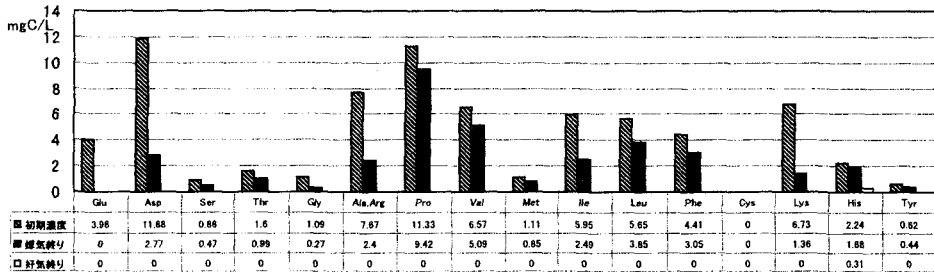


図 4 実験①のアミノ酸濃度変化

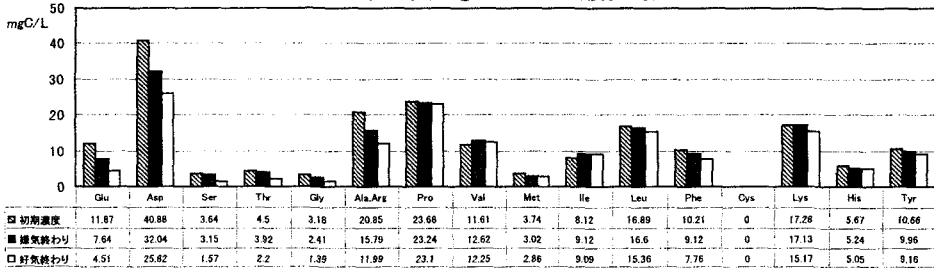


図 5 実験②のアミノ酸濃度変化

表 2 嫌気条件でのアミノ酸の摂取状況

	よく摂取されたもの	少し摂取されたもの	あまり摂取されなかったもの
実験 1	Glu、Asp、Gly、Arg+Ala、Lys	Ser、Thr、Ile	Pro、Val、Met、Phe、Leu、His、Tyr
実験 2	Glu、Asp、Gly、Arg+Ala	Ser、Thr	Pro、Val、Met、Ile、Leu、Phe、Lys、His、Tyr

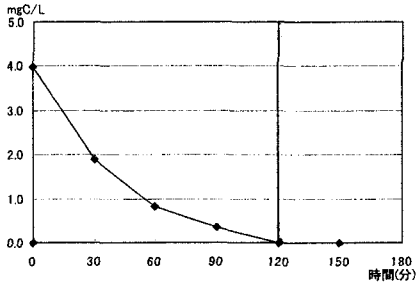


図6 摂取されたアミノ酸の例(グルタミン酸)

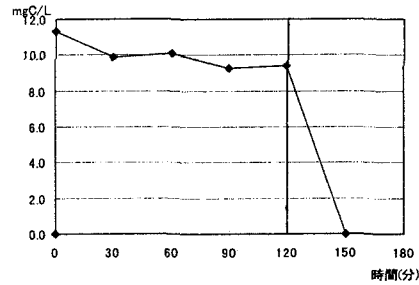


図7 摂取されなかったアミノ酸の例(プロリン)

3. 3 考察

上記のように、同時に投与されても、アミノ酸の種類によって嫌気条件でよく摂取されるものとされないものがあった。また、二つの実験結果の間にも、基質摂取量に違いがあった。実験①において嫌気条件で摂取されなかったアミノ酸も、好気条件では完全に摂取されているが、実験②では、嫌気条件で摂取されなかったアミノ酸は好気条件でも摂取されないままだった。

嫌気条件でよく摂取されたアミノ酸の特徴は、グルタミン酸、アスパラギン酸はそれぞれ2-オキシグルタル酸、オキサロ酢酸として直接 TCA サイクル内の物質に変換され、また、少し摂取されたものも含め、その他の摂取されたアミノ酸に共通するのは、多くがピルビン酸を介して TCA サイクル内に入るアミノ酸である¹⁾、ということである。これらのアミノ酸の代謝機構に関しては、今後詳細を検討する必要がある。

既往の研究^{2,3,4)}では、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、セリンは嫌気条件で汚泥によく摂取されること、フェニルアラニンはほとんど摂取されないこと、また嫌気条件で汚泥に摂取されたアミノ酸は一時的に蓄積された後、一部が PHA 合成に使われ、残りの大部分はタンパク質の生合成に用いられる可能性があること、摂取されたグルタミン酸が汚泥中にγ-アミノ酪酸として蓄積されること、アスパラギン酸はフマル酸に変換されることなどが報告されている。これらに対し、本研究ではグルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンなどが汚泥によく摂取されたという結果については一致したが、アミノ酸の PHA への変換・蓄積は見られなかった。他の物質への変換が行なわれているかどうかは、今後検討を行なう必要がある。

実験②でアミノ酸の嫌氣的摂取がほとんど行なわれなかった理由としては、実下水の中に遊離アミノ酸の形のアミノ酸がほとんど含まれておらず、そのため代謝に利用することができなかったのではないかと、ということが考えられる。実下水中のタンパク質は、遊離アミノ酸まで加水分解される前に、アミノ酸が数個くっついたオリゴペプチドの形のままで生合成に利用される可能性も考えられるため、今後は、ペプチドの形で代謝を調べることが重要であると考えられる。

4. まとめ

生物学的リン除去活性汚泥を用いて、嫌気条件におけるアミノ酸の摂取を調べる実験を行った。その結果、嫌気条件において、特定の数種のアミノ酸が、その他のアミノ酸に比べて優先的に摂取される傾向が見られた。これらのアミノ酸の代謝に関する検討が必要である。また、アミノ酸は汚泥に摂取されても PHA としては蓄積されなかった。

謝辞:本研究は、文部省科学研究費補助金(COE 形成基礎研究)の補助により行なわれた。

参考文献: 1) 生方 悠 (1989) 衛生工学論文集 第 25 巻 p109-115、2)松尾吉高ら(1987)、衛生工学論文集 第 23 巻 p287-299、3)Arun et al.(1988) *Advances in Water Pollution Control, Water Pollution in Asia*, IAW PRC, p313-319、4)Sato et al.(1998) *Wat. Sci. Tech.* Vol.37, No.4-5, p.579-582