

酵素活性で見た嫌気性微生物による固形性デンプンの加水分解

Alpha-Amylase Activity of Starch Degrading Bacteria in Digested Sludge

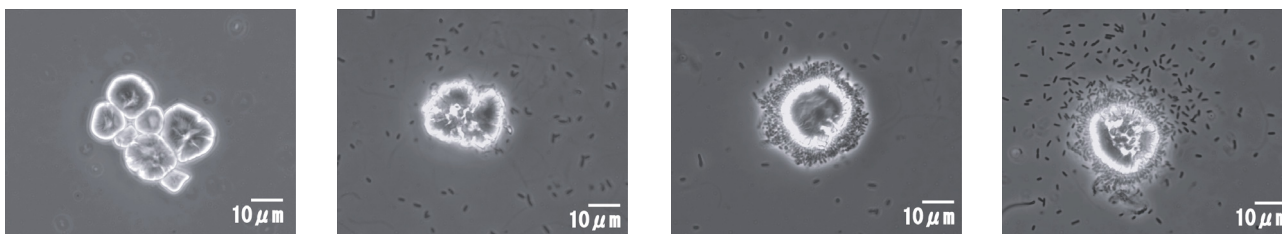
水圏土壌環境研究室 樋口義丈 (Yoshitake Higuchi)

指導教官 大橋 晶良、井町 寛之、原田 秀樹

1. はじめに

嫌気性処理法は下水汚泥などの固形性有機物の処理技術として広く普及しているが、下・廃水の嫌気性処理に比べ処理速度が遅く、その原因は加水分解過程にあると言われている。加水分解については、純菌レベルでの研究は進んでいるものの、消化汚泥などの嫌気性微生物群集に関する研究は数少なく、固形性有機物にアタックする加水分解酵素は、バルク液中に溶解しているものと細菌の細胞膜表面に固着のものに分けられるが、消化汚泥内ではどちらの酵素が加水分解に大きく寄与しているのか、また加水分解細菌は基質によって加水分解酵素能が変わるのか、など不明な点が多い。このため、固形性有機物に対する嫌気性処理能力の向上には、微生物による加水分解メカニズムの解明が重要である。

そこで、本研究では、加水分解酵素としてよく知られ、酵素活性を容易に測定できる α アミラーゼに注目し、バッチ実験を通して消化汚泥における固形性有機物の加水分解の実態をつかむとともに、基質の違いによる消化汚泥の α アミラーゼ活性の影響について検討した。また、固形性デンプン分解優占嫌気性細菌を単離し、fluorescence in situ hybridization (FISH)法によりバッチ実験における単離菌のモニタリングを行い、消化汚泥内のデンプン加水分解細菌と α アミラーゼ活性の関係について調査した。



消化汚泥より単離したデンプン加水分解細菌 (SDB) による固形性デンプンの加水分解

2. 実験方法

α アミラーゼ活性評価：

バッチ実験は、下水消化汚泥(4000 mg VSS/L)を培地に加え、セルムバイアルにて 35°Cで振とう培養を行った。幾つかの基質条件で実験を行った結果、固形性デンプンを優先的に加水分解している菌に注目した実験系をたてる必要性があった。そこで、基質として固形性デンプン(トウモロコシ抽出、COD 2000 mg/L)を用い、固形性デンプン加水分解菌(starch degrading bacteria : SDB)が優占するよう集積培養し、投入デンプンが消費された時点で、異なる4種類の基質(①固形性デンプン、②マルトース、③グルコース、④デンプンとグルコースの混合 1 : 1)を各 2000 mg COD/L 再投入した。マルトースは α アミラーゼによるデンプンの加水分解代謝産物でありさらに加水分解を必要とする基質として、グルコースは α アミラーゼによる加水分解の最終代謝産物であり α アミラーゼ遺伝子のカタボライト抑制基質と考えられているため、それぞれ実験条件に組み入れた。バッチ実験期間中、適時サンプリングして、 α アミラーゼ活性、マルトース、グルコース、全糖、s-COD およびVFA 濃度を測定した。デンプン濃度は汚泥の全糖濃度がデンプン、マルトースおよびグルコースから成るとして、計算より評価した。

α アミラーゼ活性は、汚泥混合液(gross)、バルク液(filtrate)、細胞表面(net)の3形態別に評価した。汚泥細胞表面の α アミラーゼ活性は、汚泥混合液とフィルター濾過によるバルク液の酵素活性測定値の差から算出した。その酵素活性の測定は α アミラーゼ測定試薬(日本バイオコン)を用いて行い、活性値はCU単位で示され、一般的な酵素単位(U)と比例関係にある。

固形性デンプン加水分解菌の単離：

消化汚泥から固形性デンプン加水分解菌SDBを固形性デンプンによる集積培養とロールチューブ法にて単離し、その16S rDNA配列より分子系統解析を行ったのち、バッチ実験における汚泥中の単離菌をFISHでモニタリングするために、単離菌を特異的に検出するプローブを作成した。

3. 実験結果および考察

α アミラーゼ活性評価：

処理場から採取した消化汚泥混合液は、常にほぼ一定の α アミラーゼ活性(約 0.05 CU/g-VSS)を有していた(Fig.1, control)。バッチ実験の一例として、デンプンを添加した系の α アミラーゼ活性の推移を Fig.1 に示しているが、混合液の α アミラーゼ活性(gross)は、デンプンの消費と共に上昇し、デンプンが枯渇すると減少に転じた。2.5 日目にデンプンを添加すると、活性は再び急上昇し 0.37 CU/g VSS に達した。この時デンプンは素早く消費され、その後の活性は徐々に低下した。なお、代謝産物としてのグ

ルコースおよびマルトースの濃度は検出限界以下であった。バッチ実験での α アミラーゼ活性の推移は、他の基質条件下でも同様の傾向を示したが、グルコースを単独で添加した系では、他の条件に比較して α アミラーゼ活性のピーク値は極端に低かった。

一方、バルク液に溶存の α アミラーゼ活性(filtrate)は、すべての実験系で汚泥混合液の α アミラーゼ活性(gross)に比較して非常に低い値であった。このことは、 α アミラーゼの大部分は細胞表面に存在していることを示し、加水分解は固形性有機物と細胞表面の接触が重要であり、バイオフィームやグラニュールを用いた処理方法は有効ではないことが示唆された。

バッチ実験におけるデンプン消費量と細胞表面に固着した α アミラーゼ活性(net)の関係を明らかにするため、基質消費量(- Δ S)と汚泥netの活性(CU)をグラフしたところ、強い正の直線関係が見られた(Fig.2)。このことは、菌体の増殖に伴って α アミラーゼ活性が増加することを間接的に意味しており、この線形の傾き(- Δ CU/ Δ S)は、固形性デンプン加水分解細菌 SDB の単位生物量当たりの α アミラーゼ活性能 SAP(specific alpha-amylase potential)と見なせる。デンプン以外の基質に対しても消費量と α アミラーゼ活性(net)は同様に比例関係にあった。SAPの値は基質の種類によって影響され(Fig.3)、デンプンあるいはマルトースを含む基質では同様な値を示したが、グルコース単独基質の場合は他の基質条件に比べて明らかに低く、ほぼ1/4であった。これより、デンプンやマルトースを含む加水分解を必要とする基質は、SDBに何らかの要求刺激を与え、 α アミラーゼ遺伝子の発現を活性化させることで、SDBの α アミラーゼ活性を上昇すると推察される。また、 α アミラーゼ遺伝子のカタボライト抑制基質と言われているグルコースでもSAPの値が正であることから、SDBは常時 α アミラーゼ遺伝子を発現し、 α アミラーゼ活性能を有していると考えられる。

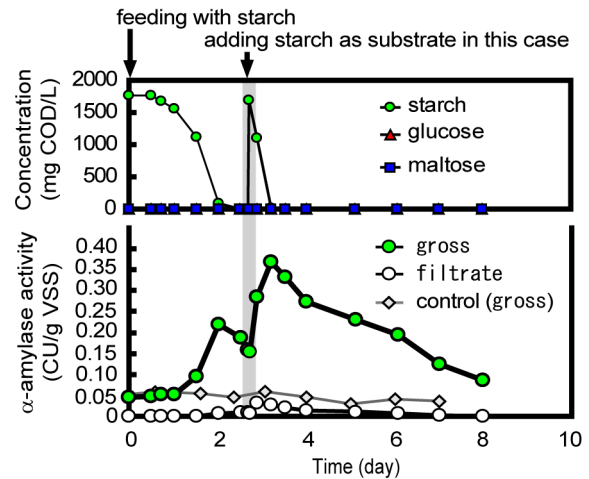


Fig.1 バッチ実験における消化汚泥中の α アミラーゼ活性の変化と基質および中間代謝物としての糖濃度の変化

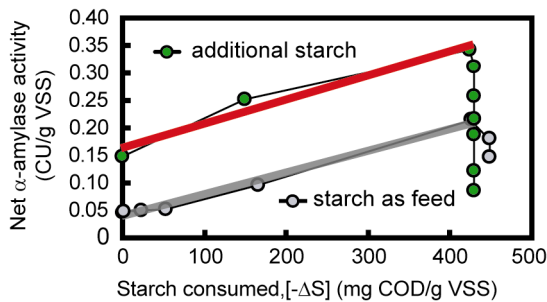


Fig.2 基質としてのデンプン消費量と細胞表面に固着する α アミラーゼ活性(net)の関係



Fig.3 SDBの単位生物量当たりの α アミラーゼ活性能 SAP(specific alpha-amylase potential)

固形性デンプン加水分解菌の単離：

消化汚泥より単離した4種の固形性デンプン加水分解細菌 SDB は *Aeromonas* 属に近縁な、新規グループを形成する菌であった(Fig.4)。このSDBを特異的に検出可能なDNAプローブを作成した。この単離菌に特異的なDNAプローブを作成し、バッチ実験における消化汚泥中のデンプン加水分解細菌をFISHで計数測定したところ、デンプン加水分解細菌数は基質の消費量に比例して増加した。グルコース単独基質の場合にも他の基質条件と同様な菌数の増加が見られた。また、菌数当たりのnetの α アミラーゼ活性は、グルコース単独基質において低い値を示した。これは、 α アミラーゼがデンプンやマルトースといった加水分解を必要とする基質に発現誘導されることを支持する上述の結果と符合していた。

4. まとめ

消化汚泥中の α アミラーゼのほとんどは細胞表面に存在し、固形性有機物の嫌気性処理には細菌と基質との接触が極めて重要である。消化汚泥内では様々な微生物が加水分解反応に関わり、汚泥全体として反応を追うことは困難であった、そこで消化汚泥内の固形性デンプン加水分解細菌 SDB に注目し単離に成功した。SDBは新規グループを形成する菌であった。SDBは α アミラーゼ分解が要求される基質に接すると、菌当たりの α アミラーゼ活性が高まると考えられる。

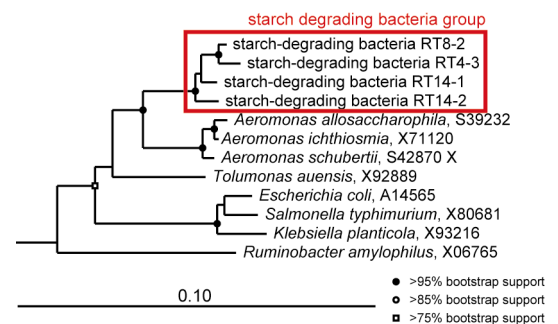


Fig.4 固形性デンプン加水分解細菌とその近縁種との分子系統解析結果