

22

酵素学的手法による浄水中の同化可能有機炭素前駆物質の構成成分推定

京都大学大学院 文亮太, 大河内由美子, 伊藤領彦

Components estimation of assimilable organic carbon precursors in drinking water using enzymatic treatment

Graduate School of Kyoto Univ. Ryota Bun, Yumiko Ohkouchi, Sadahiko Itoh

1. はじめに

現在の水道システムは塩素消毒により微生物の増殖活性を抑制することで微生物学的安定性を保っているが、同時に消毒副生成物やカルキ臭の発生といった問題を抱えている。この問題の解決法の一つとして残留塩素濃度の低減が考えられるが、同時に微生物学的安定性を維持することが必要となる。給配水過程での微生物再増殖因子として、データ比較の容易さや感度の高さという点から同化可能有機炭素 (Assimilable Organic Carbon : AOC) が用いられる。既往研究では、残留塩素なし、あるいは最小化した水道システムにおいて微生物再増殖を抑制可能な AOC 濃度が提案されている¹⁾ものの、現在の我が国の高度浄水処理水中の AOC 濃度はそれらの値を大きく超過している²⁾。そのため、残留塩素濃度低減に先駆けて、浄水中の AOC 濃度を大幅に低減する必要がある。

一方、天然有機物の分画、分析手法を用いた調査結果から、琵琶湖淀川水系の水道原水中には多糖類やタンパク質などの高分子量有機物が多量に含まれていることが報告されている^{3, 4)}。これらは直接的には AOC として測定されないが、浄水処理過程のオゾンや塩素消毒などの酸化処理により AOC 試験菌株が利用可能な低分子量有機物に変換され、AOC 増加に繋がることが報告されている^{5, 6)}。また、微生物活性によって、処理過程や給配水過程で AOC が増加する可能性も示唆されている⁷⁾。以上より、浄水の AOC 濃度を低減するためには、酸化や生物活性により AOC へと変換されうる AOC 前駆物質を確実に除去する必要がある。AOC 前駆物質を評価した研究例としては、水道原水にオゾンを注入し AOC 生成能を測定した研究⁸⁾があるが、これはオゾンと有機物の反応特性にのみ注目したものであり、生物活性により変換されうる AOC 前駆物質量を評価するには不適である。そこで本研究では、酵素学的手法を用いた加水分解処理を適用することで、浄水中に残存する AOC 前駆物質の構成成分および存在量について推定を行った。

2. 実験方法

2.1 加水分解酵素単独処理による AOC 前駆物質の加水分解

欧米で浄水処理プロセスの一つとして行われている人工涵養プロセスでは、生分解性有機物が効果的に除去されることが報告されている⁹⁾。この有機物除去過程では複数の細胞外加水分解酵素の活性が上昇しており、高分子量有機物の低分子化に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、表 1 に示した 4 種類の加水分解酵素をそれぞれ試料水に添加し、加水分解反応を行った後に AOC および TOC 濃度の変化を測定した。用いた加水分解酵素の至適条件および本研究で採用した反応条件を表 2 に示した。なお、酵素タンパク質由来のアミノ酸により酵素添加試料では AOC の増加が起こりうるため、酵素反応を行った試料 (以下、酵素処理試料) と、あらかじめ 90℃、2 時間の加熱により不活性化した酵素を用いて同様の処理を行った試料 (以下、コントロール試料) の有機炭素濃度を比較することで、酵素処理による実質的な加水分解効果を評価した。

採水は大学キャンパスの実験室内給水栓で行い、試料水 pH を調整後、表 2 に示す反応条件で酵素処理を行った。なお、AOC の測定方法は上水試験方法解説編¹⁰⁾に準拠した。

2.2 複数の加水分解酵素の相乗作用による AOC 前駆物質の加水分解

2.1 で述べたように人工涵養プロセスでは、複数の加水分解酵素が同時に作用することが報告されている。この報告から、複雑な構造を有する高分子量有機物に対して複数の加水分解酵素が競合的、あるいは段階的に作用することで、相乗的な有機物分解効果が得られると考えられる。そこで、単独処理で用いた加水分解酵素のうち、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼの 3 種

類のうち2種類の酵素を順に試料水に添加し、AOC 前駆物質の低分子化に対する酵素の相乗作用を検討した。採水、酵素処理、AOC 測定方法は2.1と同様の方法で行った。

表1 人工涵養プロセスで活性上昇が確認された加水分解酵素の触媒作用

酵素名称	作用
α -グルコシダーゼ	糖中の α -グリコシド結合の加水分解反応を触媒
β -グルコシダーゼ	糖中の β -グリコシド結合の加水分解反応を触媒
ロイシニアミノペプチダーゼ	ペプチドのN末端に結合したアミノ酸残基の分離
酸性ホスファターゼ	リン酸エステルの加水分解反応を触媒

表2 各加水分解酵素の反応至適条件と加水分解反応に用いた条件

酵素名称	酵素溶液調製に使用した緩衝液	反応pH	至適温度	添加Unit数	タンパク質量(mg)	反応時間(hr)
α -グルコシダーゼ	50 mM リン酸バッファー (pH=7.0)	7.0	37°C	40	0.34	4
β -グルコシダーゼ	50 mM リン酸バッファー (pH=7.0)	5.0		20	0.41	4
ロイシニアミノペプチダーゼ	50 mM リン酸バッファー (pH=7.2)	7.0		20	0.714	4
酸性ホスファターゼ	20 mM ビス-トリソバッファー (pH=6.0)	5.0		20	1.25	2

3. 結果

3.1 加水分解酵素単独処理による AOC 濃度変化

加水分解酵素をそれぞれ試料水に添加し、加水分解反応を行った場合の AOC 増加量を図1に示す。しかし、前述したように酵素添加による TOC 上昇分が AOC 増加の原因となっている可能性を否定できない。そこで、図1の第2y軸に示すように、コントロール試料中の AOC/TOC に対する酵素処理試料中のその比率を算出し、比率が1以上の場合は酵素処理により AOC 前駆物質の低分子化が起こったものと考えた。

α -グルコシダーゼ単独処理では、酵素処理試料とコントロール試料間では大きな濃度変化はみられなかった。また、AOC/TOC の比率は 0.97 であり、酵素処理による明確な AOC 濃度の増加は起こっていないと判断された。

β -グルコシダーゼ単独処理では、酵素処理によって AOC_{P17} 濃度が水道水試料の約 65 $\mu\text{gC/L}$ から約 190 $\mu\text{gC/L}$ 増加した。AOC/TOC の比率は、1.21 と酵素処理試料で約 20% 高い値を示しており、以上の結果を合わせて、酵素処理により高分子量有機物の加水分解が進み、AOC_{P17} の増加が起こったと判断された。ロイシニアミノペプチダーゼ、酸性ホスファターゼの処理でも、同様に AOC_{P17} 濃度がそれぞれ水道水試料の約 27、65 $\mu\text{gC/L}$ に対して約 330、200 $\mu\text{gC/L}$ ずつ増加した。AOC/TOC の比率はそれぞれ、1.92、1.14 であり、どちらも酵素処理により AOC_{P17} の増加が起こったと判断された。

3.2 複数の加水分解酵素の相乗作用による AOC 濃度変化

それぞれ単独で加水分解酵素処理した場合と比較して、加水分解酵素を2種類ずつ試料水に添加し酵

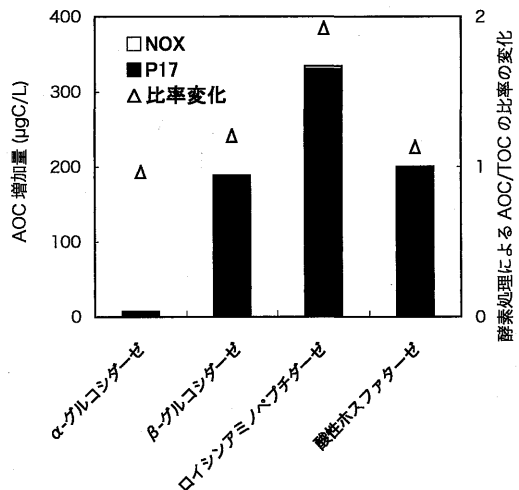


図1 加水分解酵素単独処理による AOC 増加量および試料間の AOC/TOC 比率

素処理を行った場合、図2に示す β -グルコシダーゼとロイシニアミノペプチダーゼを組み合わせただけの場合のみ、相乗作用が確認できた。単独処理した場合のそれぞれのAOC増加量の合計が約700 $\mu\text{g/L}$ であったのに対して、複合処理試料では約900 $\mu\text{g/L}$ とさらに大きな増加を示した。AOC/TOCの比率はいずれの場合でも1以上の値を示しており、酵素処理によりAOC_{P17}の増加が起こったと確認された。

4. 考察

4.1 AOC 前駆物質構成成分の推定

図1から、 β -グルコシダーゼ処理によるAOC_{P17}濃度の増加が確認された。この結果から、水道水中に残存しているAOC前駆物質中には β -グリコシド結合を有する多糖類が存在し、酵素処理によって加水分解されることで、低分子量有機化合物が生成しAOCとして測定されたと考えられる。一方、 α -グルコシダーゼ処理によるAOC増加は確認されず、 α -グリコシド結合を有する多糖類はAOC前駆物質中にはほとんど存在しないと考えられる。同様に、ロイシニアミノペプチダーゼ処理によるAOC増加も確認され、ペプチドまたはタンパク質もAOC前駆物質の主要構成成分であることが判明した。特にAOC_{P17}濃度が増加していることから、ペプチドの末端からP17株が利用可能なロイシンなどのアミノ酸が遊離したと考えられる。酸性ホスファターゼ処理についてもAOC_{P17}濃度の増加が確認された。リン酸エステル結合を有する有機リン化合物にはヌクレオチドやリン脂質といった多様な高分子量物質が存在しており、それらのリン酸エステル結合が加水分解され、それに伴い何らかの低分子量有機物が遊離した結果、AOC_{P17}濃度の増加に繋がったと考えられる。

図2からは β -グルコシダーゼとロイシニアミノペプチダーゼの相乗作用が確認され、糖タンパクやペプチドグリカンのような、糖鎖とペプチドを両方有する構造の有機物質がAOC前駆物質中に含まれていることが推測される。

上に示した構造多糖類やタンパク質は多くが親水性であり、琵琶湖湖水中に含まれる高分子量有機物の約60%が親水性物質であるという報告³⁾からも、これらの有機物質がAOC前駆物質になりうることが示唆された。今後、AOC低減を行っていく際には同時にAOC前駆物質の除去が求められる。また、琵琶湖湖水では多糖類やタンパク質が湖内生産されることが知られているが⁴⁾、これはすなわち採水時期によって有機物群の由来や組成が変動する可能性があることを示唆する。本研究では秋から冬にかけて採水を行ったことから、構造多糖類を含む土壌由来の有機物質が多く残存している一方で、 α -グリコシド結合を有する細胞内貯蔵多糖類を多く含む水環境由来の有機物質は少ないと考えられ、結果に影響を与えた可能性がある。本研究では一般的に化学的酸化処理で報告されているAOC_{NOX}成分の増加は確認されなかったが、生物活性炭などの生物処理プロセスではむしろAOC_{P17}成分の前駆物質が重要になることが示された。

4.2 AOC 前駆物質構成成分の存在量の推定

AOC_{P17}濃度の増加量が水道水試料のTOC中に占める割合から、水道水試料のTOC中のAOC_{P17}前駆物質の構成成分がどれくらいの割合で存在しているのかを推定し、表2に示した。なお、 β -グルコシダーゼとロイシニアミノペプチダーゼの複合処理においては、相乗作用による増加分だけを示した。これらは最低でも浄水中TOCの約30%を占めており、AOCがTOCの約3.0-6.0%であることと比較すると極めて大きく、AOC前駆物質除去の重要性が改めて示される結果となった。

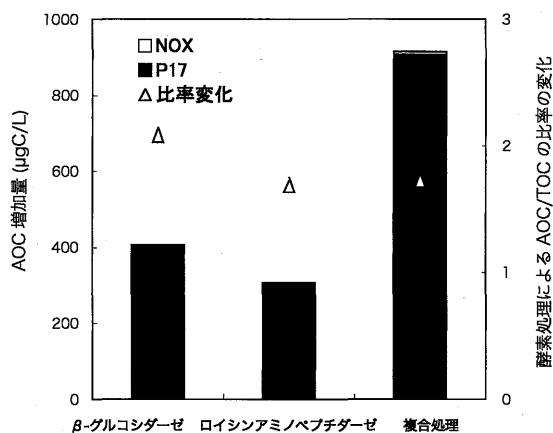


図2 β -グルコシダーゼとロイシニアミノペプチダーゼの複合処理によるAOC増加量および試料間のAOC/TOC比率

表 3 加水分解酵素処理による AOC_{P17} 濃度変化と水道水試料 TOC 中に占める割合

酵素名称	AOC _{P17} 増加量(μgC/L)	水道水試料TOC中に占める割合(%)
α-グルコシダーゼ	4.7	0.47
β-グルコシダーゼ	330.8	36.9
ロイシニアミノペプチダーゼ	319.1	35.6
β-グルコシダーゼ + ロイシニアミノペプチダーゼ	195.7	21.3

5. 結論

本研究では、浄水中の AOC および AOC 前駆物質の存在量と構成成分の推定を目的とし、酵素学的手法を用いて AOC 濃度の測定を行った。その結果、得られた主要な知見を以下に記す。

- 1) 加水分解酵素処理によって主に AOC_{P17} 濃度が増加した。特に、β - グルコシダーゼの基質となり得る構造多糖類、ロイシニアミノペプチダーゼの基質であるペプチドやタンパク質、ホスファターゼにより分解されるリン酸エステル化合物が AOC 前駆物質として確認された。
- 2) β - グルコシダーゼとロイシニアミノペプチダーゼの相乗作用から、ペプチドグリカンや糖タンパクといった、ペプチドと糖鎖を両方有する構造の有機物質が AOC 前駆物質に含まれることが示唆された。
- 3) 判明した AOC 前駆物質構成成分の存在割合は、最低でも浄水中の TOC の約 30% を占めることが分かった。TOC 中の AOC の存在割合と比較して極めて多く、AOC 前駆物質の除去の重要性が示された。

本研究では化学的酸化処理により親水化・低分子化される AOC_{NOX} 成分前駆物質に加えて、生物処理により変換されうる AOC_{P17} 成分前駆物質が浄水中に多量に残存していることを示した。今後求められる AOC 濃度のさらなる低減には、両成分の前駆物質を確実に除去するための処理プロセスを検討する必要があると考えられる。

参考文献

- 1) 大河内由美子, Ly Bich Thuy, 石川卓, 河野圭吾, 伊藤禎彦: 残留塩素濃度を低減した水道システムにおける要求水質に関する研究, 第 61 回全国水道研究発表会講演集, pp.476-477, 2010.
- 2) 宮川徹也, 安藤正典, 西村修, 秋葉道宏, 西村哲治: 全国の水道における同化可能有機炭素の調査, 第 55 回全国水道研究発表会講演集, pp.562-563, 2004.
- 3) 徐育子: 包括的分画手法を用いた溶存有機物の親水性および塩基性画分のハロ酢酸生成量への寄与率評価, 京都大学大学院修士論文, 2008.
- 4) 清水芳久: 季節変化を考慮した琵琶湖南湖水中難分解性有機物の特性把握と生態毒性評価, 平成 21 年度水質保全研究助成報告書, 2009.
- 5) 笠原伸介, 築山誠, 石川宗孝: 淀川表流水中に含有する生物同化可能有機炭素および細菌増殖ポテンシャルの浄水処理に伴う基礎的挙動, 水環境学会誌, Vol.25, No.10, pp.605-612, 2002.
- 6) 西村修, 千葉信男, 金志勲: 浄水システムの安全性向上を目指した同化性有機炭素およびその生成能の評価, 公衆衛生情報みやぎ, Vol.363, pp.18-20, 2005.
- 7) 石川卓: 浄水中の同化可能有機炭素を基質とする微生物再増殖に対して残留塩素濃度低減が与える影響, 京都大学大学院修士論文, 2009.
- 8) 吉田俊幸, 高橋惇, 千葉信男, 野村宗広, 中野和典, 西村修: 同化性有機炭素生成能の提案と試験方法, 第 58 回全国水道研究発表会講演集, pp.592-593, 2007.
- 9) Kolehmainen, R. E., Korpela, J. P., Münster, U., Puhakka, J. A., Tuovinen, O. H.: Extracellular enzyme activities and nutrient availability during artificial groundwater recharge, *Water Res.*, Vol.43, pp.405-416, 2009.
- 10) 日本水道協会: 上水試験方法解説編, pp.935-941, 2001.

キーワード: 同化可能有機炭素、AOC 前駆物質、酵素加水分解、水道水

Key Words: assimilable organic carbon(AOC), AOC precursors, enzymatic hydrolysis, drinking water