

# 脱窒菌 *Pseudomonas denitrificans* の固定化に関する 研究 (PART 1)

山岡邦雄\*・加藤美都子\*

## The study of immobilization of *Pseudomonas denitrificans* (PART 1)

Kunio Yamaoka Mitsuko Kato

### Abstract

The study of denitrification by the cells is worth notice for its genetics and water waste treatment. The stimulation of denitrification ability is useful for these purpose. We reported that monovalent cations enhanced nitrate reductase activity.

These activated cells were immobilized with acrylamide gel to retain high nitrate reductase activity. The condition of immobilization was determined. Moreover, ascorbic acid was added to immobilized reagents to maintain the nitrate reductase activity.

まずアクリルアミド樹脂で最適の固定化条件を求めた。この条件下で NRase 活性を増大させるために 1 価カチオンで処理した菌体を固定化したところ対照菌体のそれに比べ NRase 活性は高い値を保持した。さらに NRase 活性保持率を高めるために還元剤を添加したところその効果が若干認められたので報告する。

### 1. 緒論

硝酸呼吸は生物のエネルギー獲得系として非常に重要であり、その機構の解明、およびその利用は生物進化の問題や、公害対策の面から大いに興味を持たれるものである。<sup>1)2)3)4)</sup>脱窒菌の一種である硝酸還元菌 *Pseudomonas denitrificans* は異化型条件下で硝酸還元酵素 (NRase) の作用により硝酸を還元し亜硝酸を経て窒素にまで変化させる。この NRase 活性を増大させることは公害対策の面などから考えて重要なことと考えられる。我々はこの菌体を 1 価カチオンで処理することにより NRase 活性が増大することをすでに報告した。<sup>5)6)7)</sup>

菌体は対数増殖期を越えて培地中で放置されると定常期を経た後、溶菌し NRase はその活性を低下させてゆく。また生菌のままでは脱窒反応に連続使用することが困難と考えられる。そこでこの 1 価カチオンで NRase 活性を増大した菌体をアクリルアミド樹脂で固定化することを試みた。

### 2. 実験方法

#### (1) 使用菌株

*Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867

#### (2) 菌体培養条件

異化型培養法については Nishimura<sup>8)</sup>らの方法を原則として用いた。即ち、N源として KNO<sub>3</sub>と NH<sub>4</sub>Cl を含む培地中で嫌氣的呼吸を行わせることにより増殖させた。菌体は対数増殖期にあるものを用いた。

#### (3) 固定化方法

##### ① 菌懸濁液および菌破砕液の調整

異化型条件下で培養した菌体を 0.033M リン酸緩衝溶液 (KPB pH 7.0) で集菌洗浄後、同緩衝溶液に懸濁したものを菌懸濁液として用いた。また菌体破砕

\*宇部工業高等専門学校工業化学科

液はこの懸濁液を超音波破碎することにより得た。(20 KC, 1 min×5)

### ② 固定化試薬および固定化フィルムの作成

固定化試薬については中村<sup>9</sup>らのアクリルアミドゲルの作成方法を参考にした。即ちA液として1N Hydrochloric acid 48ml, N,N,N,N-Tetramethylethylene diamine 0.92ml, Trishydroxymethylaminomethane 11.96g を100ml水溶液に, B液としてAcrylamide 20g, N,N-methelenebisacrylamide 5.0g, を100ml溶液にC液としてRiboflavin 8mgを100ml水溶液に調整したものを1:2:1に混合した液に菌液を加えよく混合し, 厚さ2mmのアクリル板の枠に流し込みポリプロピレンシートで封じた。(Fig. 1)

このモノマーに下から紫外線を15min照射し重合固化させたフィルムを5×5mmの大きさを素早く切断し酵素反応に用いた。

### ③ 固定化フィルムを用いた酵素反応

酵素反応は生菌の場合と同様の方法で行った。ただし繰り返し実験については反応終了後よく固定化フィルムを0.033M KPB (pH7.0)でよく洗ったものを繰り返し用いた。

### ④ 菌体のカチオン処理および, 硝酸還元酵素活性の測定

方法は山岡<sup>9</sup>の方法にしたがった。ただし固定化フィルムを用いてのNRase活性測定の場合は三角フラスコに各反応試薬と共に固定化フィルムを加えゆるやかに振とうして酵素反応を行わせた。

## 3. 結果と考察

### (1) 固定化条件の検討

固定化試薬(A液:B液:C液=1:2:1)を1に対して混合する菌懸濁液量について検討したところ(0.125~0.25)の割合で混合すると良好なフィルムが得られた。また, そのさい使用する菌体濃度は4.5-5.5mg cell/ml (O. D.=3.0 at 580nm)を用いた場合, 酵素活性もフィルム強度も良好なものが得られた。

### (2) 活性化された菌体の固定化および固定化菌体の活性化

既に報告したように<sup>5</sup>異化型条件下で培養した*P. denitrificans*は1個のカチオンで処理することによりそのNRase活性が著しく増大することが認められた(Table

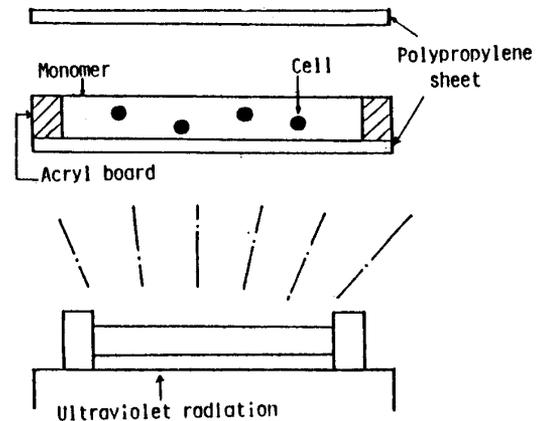


Fig. 1 Immobilization by U.V. radiation

1)。そこでこの増大したNRase活性を持つ菌体を固定化した(A I)。一方, 対照菌体を先に固定化した後固定化フィルムを1個カチオンで処理し, NRase活性の変化を検討した(I A)。Fig 2に示すように1個カチオンにより増大したNRaseの活性は生菌状態よりその活性は低下するものの, 対照菌体を固定化したものより高い値を保持した。また先に活性化して固定化した場合(A I)に比べ固定化後に活性化(I A)した場合はNRase活性に大きな差は認められなかった。これは固定化した後カチオン処理するとカチオンとcellとの接触が不十分なためと考えられる。

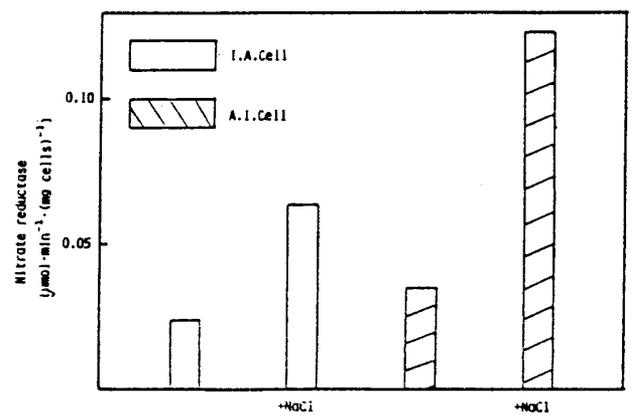


Fig. 2 The relation of activation and immobilization

### (3) 活性化菌体固定化フィルムの繰り返し実験

1個カチオンでNRase活性の増大した菌体の固定化でNRaseの高活性が保持されることが認められたのでそのフィルムによる繰り返し実験を行った。

Fig 3に示すようにA I, I A何れの場合も固定化フィ

Table 1 Effect of various salts and sugar-alcohols on cellular activity of nitrate reductase in *Pseudomonas denitrificans*

Supplements (0.5 M)	Nitrate reductase [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg cells})^{-1}$ ]	
	Methyl viologen	Formate
	None	0.062
NaCl	0.415	0.180
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.447	0.230
LiCl	0.376	0.202
KCl	0.306	0.170
KNO <sub>3</sub>	0.198	0.122
RbCl	0.224	0.126
CsCl	0.308	0.144
NH <sub>4</sub> Cl	0.260	0.143
MgCl <sub>2</sub>	0.062	0.041
MgSO <sub>4</sub>	0.056	0.014
Mannitol	0.112	0.057
Sorbitol	0.118	0.054

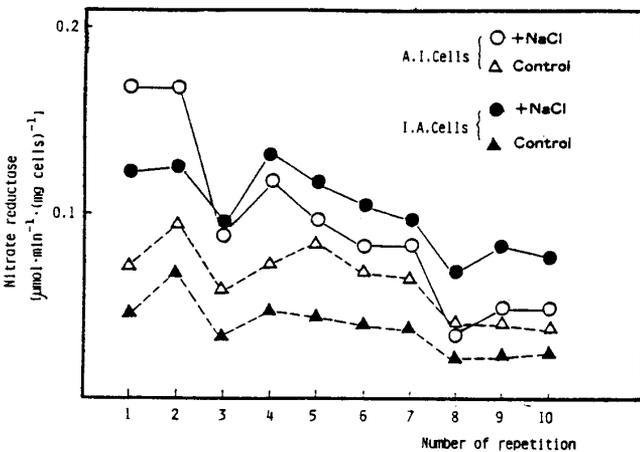


Fig. 3 Repetition test of I.A. cells and A.I. cells

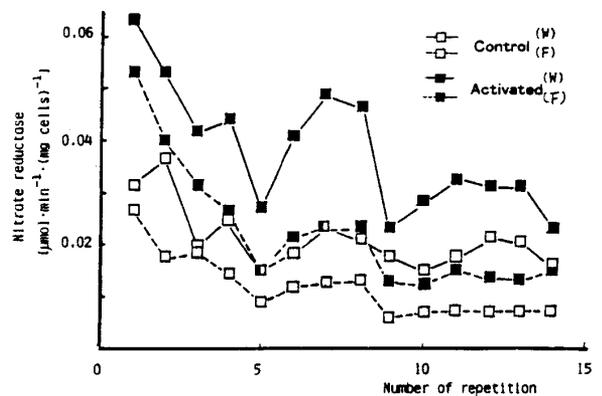


Fig. 4 Repetition test of the activated cells and its homogenate (W) ; Whole Cell (F) ; Cell homogenate

ルムは対照菌に比べ高い値を示し、繰り返し実験に耐えることが認められた。

(4) 菌体破砕液の固定化フィルムでの繰り返し実験

菌体を固定化した場合フィルム強度にやや難点があるので菌体を超音波処理により破砕し、その菌体破砕液を固定化後繰り返し実験に用いた。Fig 4 に示すようにフィルム強度は良好になったものの菌破砕液中の NRase 活性

は whole cell のそれに比べ低下が著しくなった。これは菌体破砕液の場合、組織が壊されるため各種酵素の影響や酸化され易さのためと思われる。

(5) 還元剤 (アスコルビン酸) の添加効果

whole cell の場合でも菌体破砕液の固定化フィルムの場合でも繰り返し使用すると NRase 活性の低下が著しい。そこで固定化のさいに還元型のアスコルビン酸を共

存させその効果を検討したところ Fig 5, Fig 6 に示すような結果を得た。whole cell の場合 (Fig 5) アスコルビン酸を添加したフィルムは、繰り返し使用しても 9 回ぐらゐまで安定した NRase 活性を示した。一方アスコルビン酸無添加のフィルムはやや低い NRase 活性を示した。さらに菌体破砕液についても同様にアスコルビン酸添加効果を検討したが、各種酵素の影響のためか添加効果は認められなかった (Fig 6)。アスコルビン酸濃度を更に高くするとフィルム強度に難点が生じるため、菌体破砕液の場合は酵素の精製などの前処理が必要と考えられる。

以上のことから、1価カチオンにより NRase 活性の増大した菌体のアクリルアミド樹脂による固定化は1価カチオン効果を失うことなく保持できることが認められた。また whole cell の固定化の場合においてはアスコルビン酸により繰り返し使用のさいの NRase 活性低下が若干防止されることが認められた。

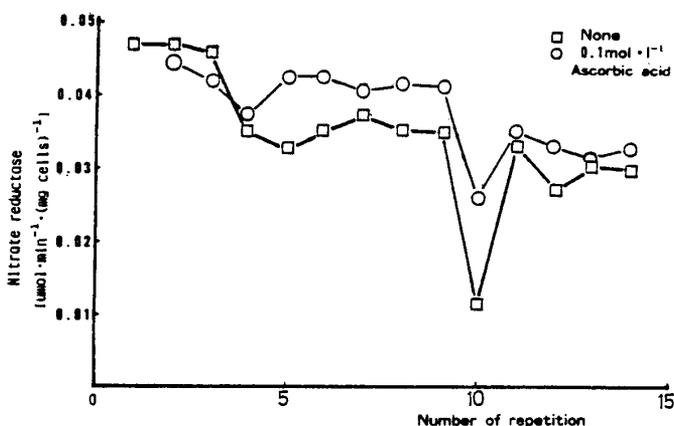


Fig. 5 The effect of ascorbic acid on immobilized whole cells

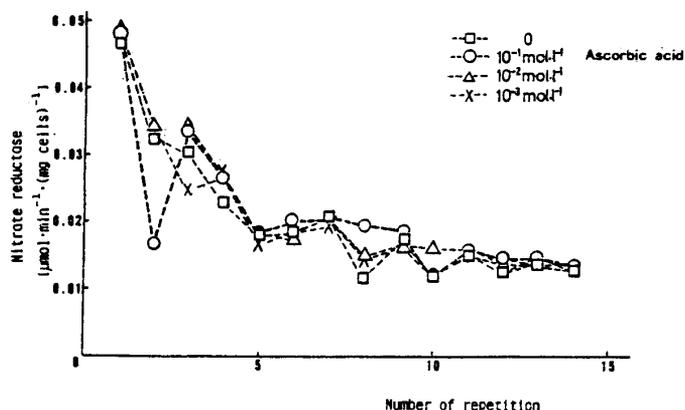


Fig. 6 The effect of ascorbic acid on immobilized cell homogenate

#### 4. まとめ

異化型条件下で生育させた *P. denitrificans* を 1 価カチオンで処理し NRase 活性を増大させた菌体をアクリルアミド樹脂で固定化した。さらに NRase 活性の低下を防ぐためにアスコルビン酸を添加したところ良好な結果を得た。

#### 5. 謝辞

本実験に当たり終始ご指導頂いた京都大学工学部上原助教教授に深謝する。また実験に協力してくれた本校卒業生、豊永義宏、副島俊明、広本義孝、江見和宏、高木晃の各氏に深謝する。

#### 6. 文献

- 1) 山中健生 生化学 Vol 48, No 5, (1976)
- 2) C.C. Delwiche and Barbara A Bryan Ann. Rev. Microbiol. 30, 241-62 (1976)
- 3) Nishio T., Koike I., Hattori A. Estimates of denitrification and in coastal and estuarine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 45 No. 2, 444-450 (1983)
- 4) Storch T.A., Dunham V.L. Impact of iron discharges from wastewater treatments plants on algal growth and species composition. PB Rep. No PB-81-120602, 107, (1980)
- 5) 山岡邦雄 宇部工業高等専門学校研究報告 Vol. 26 (1980)
- 6) 山岡邦雄 加藤美都子, 兼安気郎 宇部工業高等専門学校研究報告 Vol. 31 (1985)
- 7) 山岡邦雄, 加藤美都子, 三戸留美, 宇部工業高等専門学校研究報告 Vol. 32 (1986)
- 8) Yushi Nishimura et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 87 140 (1979)
- 9) 中村正二郎 臨床病理, 特集11; (1966)

(昭和61年10月9日受理)