

Title	パックブンの有効利用に関する研究 : パックブンに含まれるペルオキシダーゼについて
Author(s)	古川, 憲治; 橋本, 奨
Citation	日本水処理生物学会誌. 1991, 27(1), p. 47-52
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/3147
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

パックブンの有効利用に関する研究 —パックブンに含まれるペルオキシダーゼについて—

Studies on Effective Utilization of Pak-bung -Pak-bung Peroxidase Properties-

古川 憲治¹⁾, 橋本 奨²⁾
Kenji FURUKAWA¹⁾ and Susumu HASHIMOTO²⁾

(大阪大学工学部環境工学科¹⁾・福井工業大学建設工学科²⁾
(Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Osaka University¹⁾
Department of Construction, Fukui Institute of Technology²⁾)

1. はじめに

近年、自然の汚水浄化能力を利用する廃水処理法が見直されている。その中でも、ホテイアオイをはじめとする水生植物の栄養塩除去能力を利用する方法が、低コストの最終廃水仕上げ処理法として多くの研究者によって取り上げられてきた。^{(1)・(5)}しかしながら、その実用化に際しては、処理にともなって多量に発生するホテイアオイを如何にして効率的に回収、処分するか依然として大きな問題が残されている。

我々の研究室では、ホテイアオイに代わって東南アジアの水生野菜パックブン(Pak-bung)を利用する『水耕栽培型水処理法』を開発し、その汚水浄化機能をパイロットプラント並びに実プラント試験にて検討してきた。^{(6)・(8)}この処理法には、処理にともなって連続的に収穫されるパックブンを食糧として有効利用できるという大きな利点がある。しかし、わが国では、廃水を培養基として栽培したパックブンを食糧として利用するには消費者の心理的障害が大きいと予想されること、又パックブンを食糧として収穫するには多大なコストがかかること等から、食糧以外にパックブンの有効利用法がないものかを種々検討した結果、パックブンに臨床検査試薬と

して工業的に重要な酵素ペルオキシダーゼ(EC. 1. 11. 1. 7)が高活性で含有されていることが明らかとなった。本研究では、パックブンに含まれるペルオキシダーゼ活性、並びにその酵素的特性について若干の検討を加えとともに『水耕栽培型水処理法』で収穫できるパックブンがペルオキシダーゼ抽出材料としてどの程度の市場価値を有するかについても検討した。

2. 実験材料並びに方法

(1)パックブン

学名は*Ipomoea aquatica*で、国によってはパックブン(タイ)、エンツァイ(中国)、カンコン(フィリピン)、水朝顔(日本)と呼ばれるヒルガオ科に属する東南アジア産の水生野菜である。パックブンには、原種であるタイパックブン(Thai Pak-bung)と栽培種であるチャイニーズパックブン(Chinese Pak-bung)の2種ある。これら2種のパックブンを6月から10月にかけて、窒素表面積負荷量 $1.26\text{g-N/m}^2/\text{日}$ 、リン表面積負荷量 $0.724\text{g-P/m}^2/\text{日}$ で連続運転しているパックブン栽培水槽にて栽培し、実験に供した。

(2)バックブンプランター栽培槽

礫を充填した幅324mm、長さ565mm、高さ175mm、栽培面積0.18m²のプランターを上向流モードで6槽直列に接続したものを2列準備し、Fig.1のように配置した。Table 1に示す組成の希釈アルコール蒸留廃液を20g-TOC/m³/日の容積負荷量で処理している水路型自然表面曝気槽からの流出水を500L/日の流量でバックブンプランター栽培槽に連続供給した。バックブンプランター栽培槽処理水は、栽培槽の内部を好気状態に維持するために3,000L/日の流量で循環させた。水路型自然表面曝気槽の詳細については前報⁽⁶⁾を参照された。

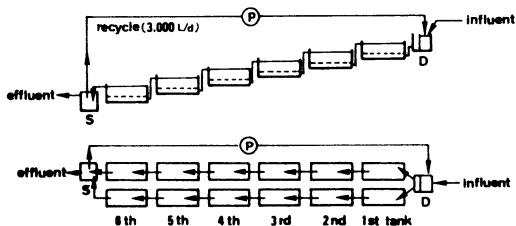


Fig. 1. Configuration of multi-stage hydroponic type wastewater treatment process.

D : distribution tank,
S : storage tank

Table 1. Characteristics of concentrated alcohol distillery waste

Item	Concentration	
BOD	308,000	mg/L
TOC	191,000	mg/L
COD	491,000	mg/L
T-N	20,000	mg/L
T-P	9,100	mg/L

(3)分析方法

20-30g(湿重)のバックブンプランターをハサミで約1cm角になるよう細かく刻み、100mLの水道水を加えて冷却下ホモゲナイザー処理(日本精機製、AM-10型、13,000rpm、5分間)した後サラシ布で濾過し、得られる濾液を遠心分離(国産遠心機、MODEL H-251、4℃、15,000rpm、10分間)して得られる濾液をペルオキシダーゼの粗酵素抽出液として実験に供した。ペルオキシダーゼ活性はo-アミノフェノール法⁽⁹⁾、または4-アミノアンチピリン法⁽¹⁰⁾にて測定した。

3. 実験結果

(1)バックブンプランターのペルオキシダーゼ活性

2種のバックブンプランターを葉、茎、根に分別して、各々の部位から水道水によりペルオキシダーゼを抽出した。Table 2には、調製した粗酵素液につき測定したペルオキシダーゼ活性を基にして計算した各部位毎のペルオキシダーゼ活性を示した。いずれの部位でも、栽培種であるチャイニーズバックブンプランターの方が原種であるタイバックブンプランターよりも高いペルオキシダーゼ活性を示した。更に、いずれの種でも根部の方が葉部、茎部よりもペルオキシダーゼ活性のことが明らかとなった。20g(湿重)のチャイニーズバックブンプランターを100mLの水道水でホモゲナイザーした後、遠心分離をすることにより6U/mLの活性のペルオキシダーゼ粗酵素液が得られる。以後の実験では、全てペルオキシダーゼ活性の高いチャイニーズバックブンプランターを使用した。

Table 2. Peroxidase activity in Pak-bung.

Sample	Portion	Peroxidase activity	
Chinese	leaf	26.9	U/g wet weight
	stem	28.1	..
Pak bung	root	41.6	..
Thai	leaf	19.0	U/g wet weight
	stem	19.0	..
pak bung	root	37.0	..

(2)バックブンプランター・ペルオキシダーゼの細胞内分布

バックブンプランターのペルオキシダーゼがバックブンプランター組織のどの部分に存在するかを明らかにする目的で、収穫したバックブンプランターの葉、茎部を小倉らの方法⁽¹¹⁾により細胞壁、ミトコンドリア、リボソーム、上澄み部の四つに分画し、分画した各区分につきペルオキシダーゼ活性を測定してペルオキシダーゼの細胞内分布を求め、Fig.2に示す結果を得た。上澄み液のペルオキシダーゼ活性が最も高く、全体のペルオキシダーゼ活性の54.5%を占めた。次いで、細胞壁区分に全体のペルオキシダーゼの40.6%が含まれていた。ミトコンドリア画分とリボソーム画分に含まれるペルオキシダーゼ活性は極めて少なかった。このペルオキシダーゼの分布パターンはトマト・ペルオキシダーゼの細胞内分布パターン⁽¹¹⁾と良く似ている。以上の結果、上澄み液、ミトコンドリア、リボソームの各画分に含まれる全体の約59%のペルオキシダーゼが実験に採用した抽出法で細胞から抽出されることが明らかになった。

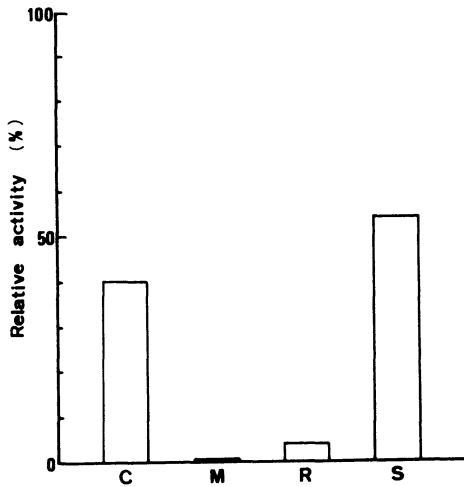


Fig. 2. Distribution of peroxidase in various fractions isolated from Pak-bung.

C : cell wall fraction
M : mitochondria fraction
R : ribosome fraction
S : supernatant fraction

(3) パックブンから抽出したペルオキシダーゼ粗酵素液の低温下での保存・安定性

西洋わさびと違って、パックブンは伸長した匍匐茎(ランナー)を刈り取ることによって長期間、連続的に収穫することが可能である。(タイ、フィリピン等の東南アジアでは周年収穫可能であるが、水温が20℃以下に低下するわが国においては、6月から11月にかけてのみパックブンの栽培が可能である)もし、パックブン・ペルオキシダーゼの粗酵素液を何等かの方法で保存することが可能であるならば、経済的なペルオキシダーゼの精製が可能となる。そこで、実験方法の項で述べたの方法によってパックブンの葉、茎部から調製したペルオキシダー

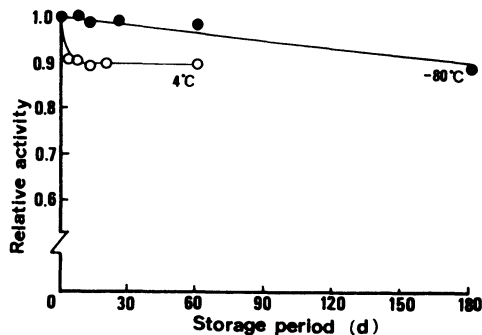
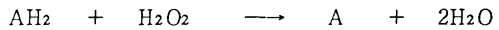


Fig. 3. Preservation of crude Pak-bung peroxidase solution under cold storage.

ゼの粗酵素液を低温(4~-80℃)下で長期間保存し、経時的にペルオキシダーゼ活性を測定することによりその保存・安定性を検討し、Fig. 3に示す結果を得た。4℃での保存試験では2ヶ月後に試料が腐敗してしまったことから、それ以後データを取ることが出来なかったが、2ヶ月後でも初発ペルオキシダーゼ活性の約90%が保存されていた。-80℃の保存条件下でも粗酵素液のペルオキシダーゼ活性は時間経過につれて徐々に低下したが、6ヶ月後でも初発ペルオキシダーゼ活性の90%もの活性が維持されることが明らかになった。

(3) パックブン・ペルオキシダーゼの水素供与体に対する基質特異性

ペルオキシダーゼは次式のように、H₂O₂を酸化剤として種々の水素供与体(AH₂)の酸化を触媒する。



この酵素反応における、ペルオキシダーゼの水素供与体に対する特異性は極めて低く、抽出材料の差異によってペルオキシダーゼの基質特異性は大きく変化する。そこでパックブン以外の材料から抽出したペルオキシダーゼとパックブンから抽出したペルオキシダーゼとの差異を明らかにする目的で、種々の水素供与体に対するペルオキシダーゼの基質特異性を市川らの方法⁽¹⁰⁾によって検討し、Table 3に示す結果を得た。比較のために市販の西洋ワサビから抽出・精製されたペルオキシダーゼ(東洋紡績製)を用いて行った同様の試験結果と、市川らがペルオキシダーゼ高生産株として選択した*Penicularia filamentosa* IFO 6523の培養上澄み液から調製したペルオキシダーゼ粗酵素液を用いて試験した成績⁽¹⁰⁾も併せて表に示した。パックブン・ペルオキシダーゼのN,N-dimethylanilineとresorcinolに対する基質特異性は西洋わさび、*Penicularia*のペルオキシダーゼと同様低か

Table 3. Hydrogen donor specificity of crude peroxidase from Pak-bung.

Hydrogen donor	Relative activity (%)		
	Pak-bung ^a	Horse radish ^b	<i>Penicularia</i> ^c
Phenol	100	100	100
N,N-dimethylaniline	140.8	34.1	20
N,N-diethylaniline	41.5	22.7	20
Resorcinol	33.8	30.7	10.8
α-naphthol	239	35.2	7.8

^a : crude enzyme solution
^b : purified commercial horse radish peroxidase
^c : partial purified mold *Penicularia filamentosa*

った。しかし、バックブン・ペルオキシダーゼは他のペルオキシダーゼと違い、N,N-dimethylanilineと α -naphtholに対して著しく高い基質特異性を示した。

次に、バックブン・ペルオキシダーゼと市販の西洋ワサビから抽出精製されたペルオキシダーゼ(東洋紡製)を用いて、4-アミノアンチピリン法で発色させた反応液の510nmにおける吸光パターンを測定した結果をFig.4に示した。両者間に発色の度合に差が見られたものの、殆ど同様の吸光パターンであったことから、4-アミノアンチピリン法で生成する発色物質はバックブン・ペルオキシダーゼの場合も、西洋ワサビのペルオキシダーゼの場合も同一であることが確認された。

(4)バックブンからのペルオキシダーゼ生産

Table 4には、各種汚水を用いて行った『水耕栽培型水処理法』のパイロット並びに実プラント試験で得られたバックブン収穫量を一覧表にして示した。バックブンの収穫量は供試下水の質(特に、窒素、磷濃度)と処理水温によってかなり変化することが判る。

以下、供試下水として団地下水を用いて行った実プラント試験で得られたバックブンの収穫量をもとにして、収穫したバックブンをペルオキシダーゼの抽出材料とした場合にバックブンがどの程度の付加価値を生み出すことが出来るか試算し、Table 5に示した。バックブンが栽培収穫できる夏期4ヶ月の収穫量(1.08t/ha/月)をもとにすると、 5.54×10^7 U/ha/月のペルオキシダーゼが抽出可となる。ペルオキシダーゼ抽出コストの見積が難しいので、最終的にバックブンがペルオキシダーゼ抽出材料としてどの程度の市場価値を持つかについての判断は出来ないが、現在のペルオキシダーゼの消費者価格が

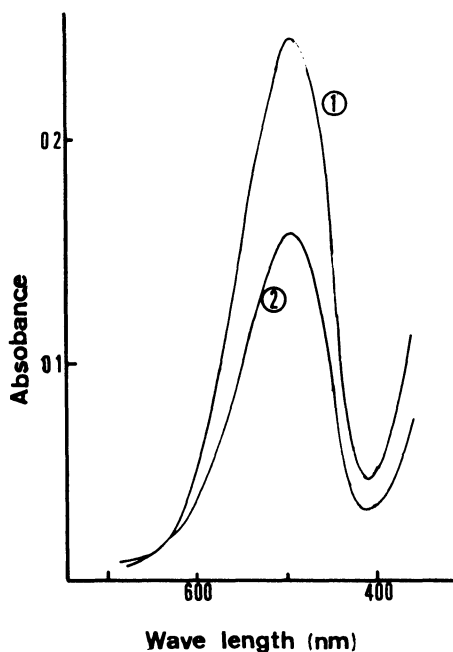


Fig. 4. Absorption spectra of color products of horse raddish and Pak-bung peroxidase.

- ① horse raddish peroxidase
- ② Pak-bung peroxidase

2,500円/5,000Uであることから考えて、バックブンがある程度の市場価値を持つ可能性は高い。

Table 4. Crop yield of Pak-bung in hydorponic type wastewater treatment process

Wastewater	Wastewater concentration(mg/L)			Temp. (°C)	Crop yield			
	TOC	N	P		(t/ha/y) ^{*)}	(t/ha/y) ^{*)}		
Synthetic W.*	2.1-3.6	13.9-22.2	3.57-5.23	25-30	17	20.4	34	40.8
Alcohol D.W. ^{**)}	3.0-9.8	1.7- 5.1	0.7 -2.5	20-30	14.2-28.1	28.4-56.2		
Domestic W. ^{*)}	2.1-41.9	3.6-18.8	0.41-2.4	20-32	12.9	25.8		

- * : synthetic wastewater
- ** : alcohol distillery wastewater
- *) : domestic wastewater
- *) : harvested Pak-bung(leaf and stem)
- *) : crop yield including finally harvested root portion

Table 5. Trial of peroxidase production from Pak-bung which can be harvested in hydroponic type wastewater treatment plant

Crop yield of Pak-bung	1.08 t-DW/ha/month
Peroxidase activity	432 U/g-DW
Peroxidase production*	3.74 x 10 ⁸ U/ha/month
	5.54 x 10 ⁷ U [#] /ha/month [#]
Amount of peroxidase production	2.77 x 10 ⁷ yen/ha/month
Economic value of Pak-bung for raw material of peroxidase extraction	2.77 x 10 ⁶ yen/ha/month [§]

* 80 % of extraction efficiency was assumed

[#] international unit(U[#])= U/7

[§] raw material cost was assumed to be 10 % of peroxidase production

4. 考 察

『水耕栽培型水処理法』でnutrient absorberとして使用しているチャイニーズ・バックブンはペルオキシダーゼが高い活性で含まれていることが明らかになった。しかも、水道水による簡単な抽出操作でバックブンに含まれるペルオキシダーゼの約59%を回収することが出来る。細胞壁中にも全体の41%のペルオキシダーゼが含まれているが、これを抽出するには、高い濃度の糖、塩を用いなければならないので『水耕栽培型水処理法』の副産物の有効利用の観点からすると問題がある。

水道水で抽出したバックブン・ペルオキシダーゼの粗酵素液は、4℃で2ヶ月間保存しても、活性が10%程度しか落ちず、安定した状態で保存することが可能であった。このバックブン粗酵素液の低温下での安定性はバックブンをペルオキシダーゼの抽出材料として有効利用する際に大きな利点となる。即ち、『水耕栽培型水処理法』で連続的に収穫できるバックブンをオンサイトで水道水にて抽出し、低温下に保存しておき、抽出粗酵素液の量がまとまった段階で、精製工場に送れば、効率的な酵素精製が可能となる。

バックブン・ペルオキシダーゼについての基質特異性の検討から、西洋ワサビ、カビ *Penicularia filamentosa* のペルオキシダーゼと基質特異性が若干異なることが明らかとなった。4-アミノアンチピリン法で発色する反応液の吸光パターンの比較から、バックブンと西洋ワサビのペルオキシダーゼとしての酵素作用には大きな違いのないことが明らかとなった。ペルオキシダーゼには多くの isozyme のあることが知られており、その isozyme の分布パターンの違いが基質特異性にも関係しているものと考えられる。

5. 要 約

『水耕栽培型水処理法』に使用している東南アジアの水生野菜バックブンにはペルオキシダーゼが高い活性で含有されていることを明らかにした。水道水を用いた簡単な抽出操作でバックブン細胞に含まれるペルオキシダーゼの約59%を回収することができた。抽出したペルオキシダーゼの粗酵素抽出液は低温下での保存・安定性に優れていた。バックブン・ペルオキシダーゼは西洋ワサビやカビ *Penicularia filamentosa* のペルオキシダーゼとは基質特異性の点で若干異なっていることが明らかになった。『水耕栽培型水処理法』の副産物として連続収穫できるバックブンをペルオキシダーゼの抽出材料として有効利用できる可能性を示した。

参考文献

- (1) R. Dings: Upgrading Stabilization pond Effluent by Water Hyacinth Culture, J. WPCF, 50, (5):833-845(1978)。
- (2) C.M.Rebecca and B.C.Wolverton: Comarative Study of Wastewater Lagoon with and without Water Hyacinth. Economic Botany, 34, (2): 101-110(1980)。
- (3) W.J.O'Brien: Use of Aquatic Macrophytes for Wastewater Treatment, J. Envi. Engg. Div, ASCE, 107, (EE4):681-697(1981)。
- (4) R.H.Jeffrey: Use of Water Hyacinth Aquatic Treatment Systems for Ammonia Control and Effluent Polishing, J.WPCF, 56, (3):219-225 (1984)。

- (5) A. S. Weber and G. Tchobanoglous: Prediction of Nitrification in Water Hyacinth Treatment Systems, J. WPCF, 58, (5):376-380(1986)。
- (6) S. Hashimoto, K. Furukawa and Y. Ozaki: A Channel Flow System for Wastewater Treatment and Food Production, J. Ferment. Technol., 68, (4):p.343-356(1985)。
- (7) 橋本奨, 古川憲治, 尾崎保夫, 松村尚人, 中島光一:水生生物による汚水処理と食糧生産に関する研究—パイロットプラントの処理成績—, 水処理技術, 26, (6):393-408(1985)。
- (8) 橋本奨, 古川憲治, 金柱洪:水耕栽培型水処理施設による水処理と酵素・食糧生産, 第26回下水道研究発表会講演集, 433-435(1989)。
- (9) Y. Yamada, S. Kobayashi, K. Watanabe, U. Hayashi and H. Inoue: Production of Horse Radish Peroxidase by Plant Cell Culture, J. Chem. Tech. Biotech., 38, 31-39(1987)。
- (10) K. Ichikawa, K. Ozaki, K. Kimoto and Y. Watanabe: Partial Purification and Characterization of Peroxidase from *Penicularia filamentosa*, Agr. Biol. Chem., 45, (5):1297-1299 (1981)。
- (11) 小倉長雄, 川久保歌子, 飯島正, 中川弘毅, 竹花秀太郎: トマト果実のパーオキシダーゼについて, 千葉大園報, 19:55-62(1971)。