

自然水中におけるでんぷん分解活性の比色測定

前田 修*・尾形 一法**

はじめに

自然水中の懸濁有機物は、直接補食される場合を除き、細菌など微生物が溶出する外生酵素によって分解されてから微生物体内に摂取されると考えられる。植物が生産したり、排水の流入などによって自然水中に持ちこまれる高分子の炭水化物のうち、比較的分解され易いものとしてはでんぷんが主要な物質である。でんぷんは *Acinetobacter*, *Serratia*, *Xanthomonas* など、きわめて多種類の細菌と酵母が生産するアミラーゼにより分解される。¹⁾ したがって水界でのでんぷん分解活性を調べることは、河川・湖沼などに対する有機物の負荷と、それに対する水中微生物の応動を解析する上に、重要な意義を持つものと思われる。

アミラーゼによるでんぷんの分解を測定するため、生化学的にはヨード反応によりでんぷんの減少を知る法、分解による粘性変化を知る法、産生する還元糖を定量する法などが実施されている。しかしこうした方法では、自然水中での極めて微弱な酵素活性を測定するのは困難であった。それゆえ自然水に対するこれまでの研究は、培地上に発生する集落を計数して酵素を溶出する微生物の数を相対的に知ることに向けられており、酵素活性を測定する研究はほとんどなされていない。

近年、血清・尿中の α アミラーゼを測定する目的で、特殊な合成基質を用いた比色法が開発され、臨床検査に用いられるようになった。筆者らはこの基質を用いて自然水中でのでんぷん分解活性を測定する方法を検討し、充分実用に耐えることを確かめた。細部の検討はまだ充分ではないが、微生物活性からみた水界の構造を知る場合や富栄養化の評価尺度を求める場合など、きわめて広い応用範囲をもつ可能性が見出されたので、ここに大略を報告する。

方法の検討

ここで用いるモデル基質は blue starch polymer と呼ばれ、ファルマシア社で製造されている錠剤*** (以下試薬と略す) である。この試薬は架橋をもったグルコース直鎖で構成され、グルコースの6位置に確率的にトリアジンが結合したものとされている。²⁾ 水に不溶で、青色の懸濁液となるが、分解されると色素を付けたグルコース (または水溶性のポリマーなど) が定量的に溶出する。それゆえ、分解度は青色色素液を比色定量することにより知ることができる。

臨床検査で血清中の α アミラーゼを測定する場合の手順は次のようである。

* 筑波大学生物科学系

** 埼玉県立川口高等学校

*** 日本における商品名: Amylase Test - Daiichi.

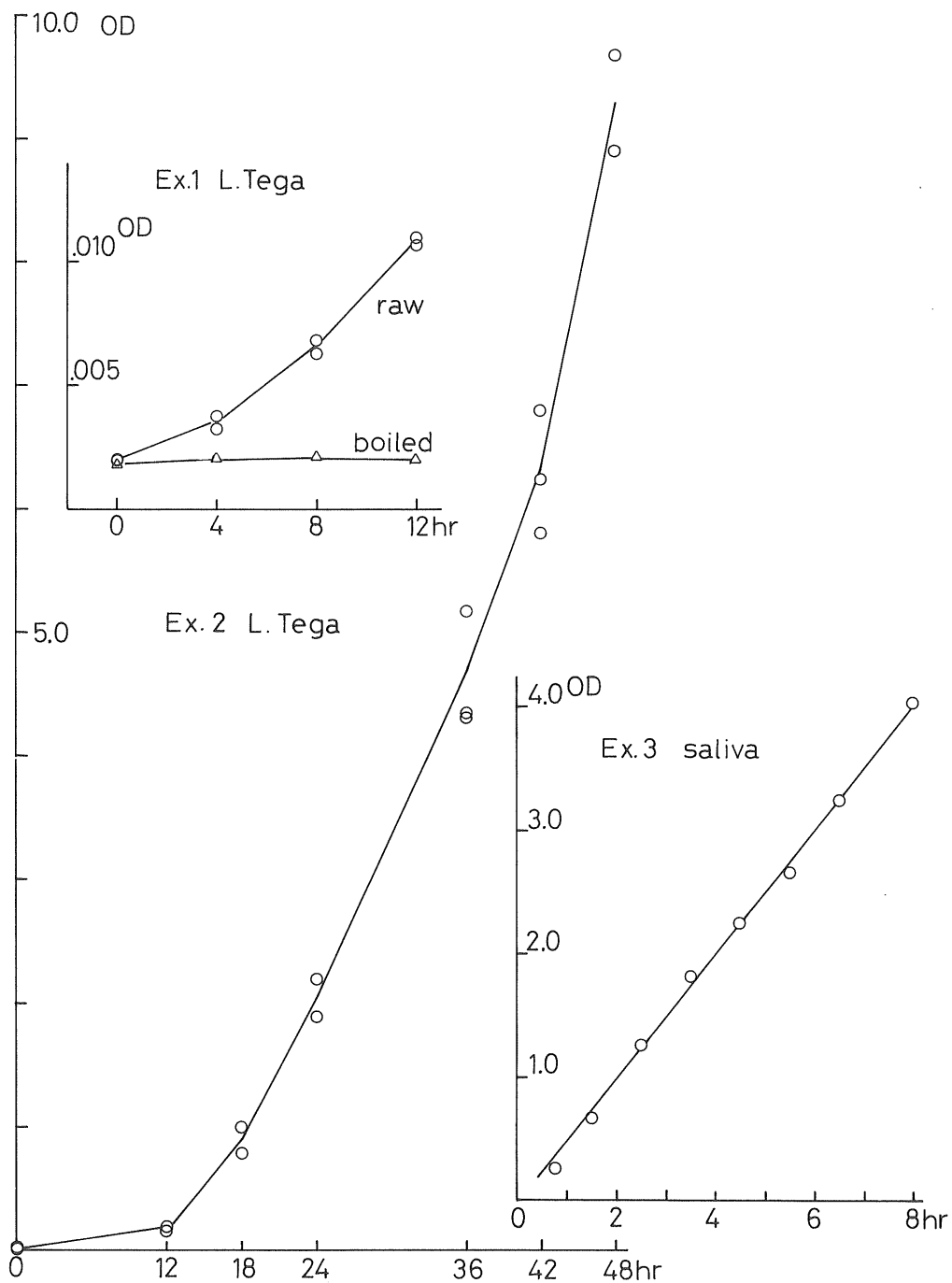


図1 アミラーゼテスト試薬発色の経時変化。Ex. 1, 手賀沼表層水 (raw, 原水; boiled, 煮沸水); Ex. 2, 手賀沼表層水原水; Ex. 3, 稀釈唾液。

- 1) 試験管に試料 0.1 ml, 蒸溜水 4.0 ml をとり, 前もって 37°C, 5 分間の加温を行なう。
 - 2) 試薬 1 錠を加え, 37°C に 30 分放置, 後 0.5 規定 NaOH 1.0 ml を加えて混和, 反応を停止する。
 - 3) 3000 廻転で 10 分間遠心, 蒸溜水を対象として上澄を 620 nm で比色する。
- こうした手順はそのままでは自然水に適用できないので, 改変のためにいくつかの試験を行った³⁾。まず極めて富栄養な手賀沼より得た試水 5 ml に試薬 1 錠を加え, 20°C の滅菌瓶中で培養して発色の経時変化を追った (図 1)。図中 Ex. 1 にみるように, 対象とした煮沸試水では発色がまったく進まないが, 原水の発色は時間とともに増大し, Ex. 2 に明らかなように, その増大は指数関数的であった。一方比較のためにとりあげた稀釈唾液での発色は, 直線的な経時変化を示した (Ex. 3)。これは培養期間中の酵素濃度が, 唾液では一定であるが, 試水では漸次増大することによると思われる。そこで同じ試水に煮沸・濾過・抗生物質添加などの処理を施して発色を比較した (表 1)。

表 1 各種処理がアミラーゼテスト試薬の発色に及ぼす影響。
無処理試水の発色度を 100.0 としたときの相対値で表わす (手賀沼表面水, 7 月, 20°C 24 時間培養, 3 実験値の平均)。

処 理	発 色 度	光 合 成 活 性
無処理原水	100.0	100.0
煮沸 (3 分間)	3.8	0.0
ミリポアフィルター濾過		
H A フィルター	21.5	0.7
S C フィルター	36.2	0.2
ストレプトマイシン添加		
5 μg/ml	39.1	100.3
50 μg/ml	40.0	94.9
500 μg/ml	34.6	5.9
盲検 (蒸溜水)	4.3	0.0

この結果から試水中での発色は, 溶存していた酵素よりはむしろ, 微生物の増殖と基質添加による誘導によって, 培養中の試水内で産生される酵素に依存する率が高いものと推定された。またこの

試験では、盲検値を差引く必要のあること、10mmセルを用い比色するためには常温でほぼ18時間以上の培養期間を要することが明らかとなった。

次に手賀沼試水を用いて基質濃度と発色との関係を調べた（図2）。試水5mlを用いた場合、基質

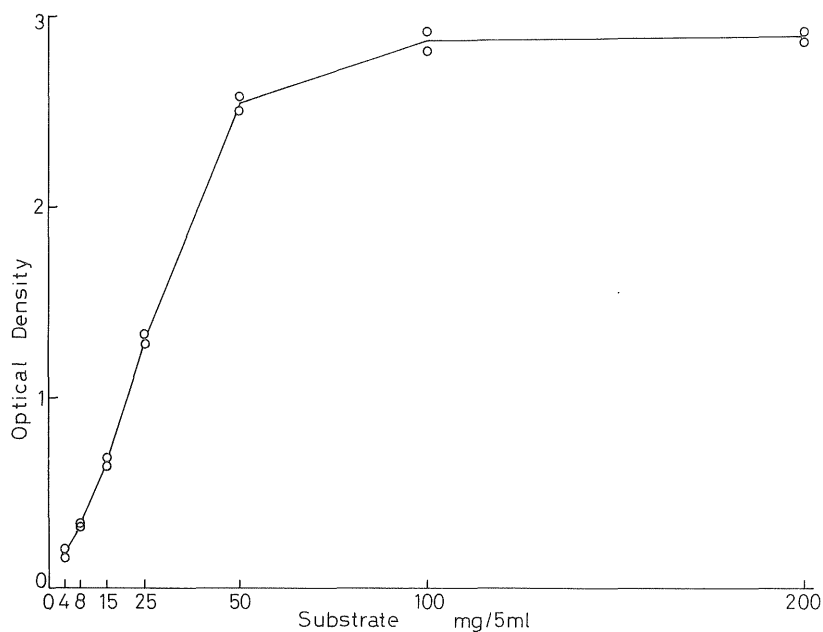


図2 アミラーゼテスト試薬の添加量と発色度との関係。手賀沼表層水、室温24時間培養。

量約100mgで発色は飽和に達した。それゆえ、市販の試薬1錠200mgを添加すれば、培養中に基質不足を来すことはないと考えられた。また静置培養と振とう培養とを比較したところ発色に大差を生じなかったため、以後の実験は静置培養のみとした。

培養温度と発色の再現性について検討したところ、発色は温度に大きく依存し、20℃付近で培養すると再現性のよい結果が得られることがわかった（表2）。また試薬は緩衝作用をもち、これを投入した試水は培養中ほぼpH7.2に保たれた。このほか発色の安定性、反応停止条件などの検討の上、自然水中でのでんぷん分解測定の標準操作を次のように定めた。

表2 アミラーゼテスト試薬発色の再現性と温度条件（10回のくり返し実験の結果）。

培養温度	吸光度				
	最低値	最高値	平均	標準偏差	変動係数
教育大占春池，24時間培養，2月					
0℃	0.014	0.025	0.019	0.0039	21.0%
6	0.018	0.023	0.021	0.0017	8.2
16	0.030	0.035	0.033	0.0017	5.1
20	0.035	0.040	0.038	0.0016	4.1
25	0.068	0.085	0.074	0.0054	7.4
30	0.850	1.510	1.091	0.2030	18.6
37	0.070	0.081	0.078	0.0039	5.0
教育大占春池，48時間培養，2月					
20	0.186	0.210	0.197	0.0101	5.1
教育大プール跡，24時間培養，10月					
5	0.017	0.025	0.020	0.0024	12.1
15	0.035	0.050	0.042	0.0044	10.6
20	0.078	0.100	0.089	0.0072	8.1
25	0.165	0.202	0.185	0.0109	5.9
30	0.400	1.210	0.807	0.2591	31.2
35	1.100	2.350	1.697	0.4208	24.8

1. 10mlの滅菌剤注射筒に試薬1錠を加え，試水10.0mlを吸いとり25℃（または現場温度）に24時間放置する。
 2. 直ちに比色するときは，試水をそのまま遠沈管に移し，3000廻転で15分間遠心，上澄を蒸溜水に対して620nmで比色する。
 3. 盲検として蒸溜水を同様に処理し，その発色値を試水の発色からさしひく。
 4. 直ちに比色できない場合は，0.5規定水酸化ナトリウム液1.0mlを加えて反応を停止させる。
 5. 試水の不均一性を考慮し，測定は同一試料について3回くり返す。
- こうして得た測定値は，吸光度（ E_{620} ）またはO. D. Unitを用いて相対的に表示することとした

が、Somogi - Nelson 法による還元糖の定量値と比較したところ、青色発色の 1 ODU はほぼグルコース 15.2 μg に相当したので、これを用いて絶対量に換算することもできる。

自然水での測定例

試水に試薬を添加して24時間培養したときの発色度を試水のもつでんぶん分解活性とし、この活性を各地の池沼について比較した。表3は7月に測定した結果の一部で、活性には水域により大きな差があることが明らかである。10月に茨城県南部の18池沼について測定した活性の大きさは、水中に懸濁するDNAと蛋白質の濃度に対し1%、RNA濃度に対し5%、クロロフィルa濃度に対し10%以内の有意水準で相関を示した。でんぶん分解活性が生物に由来する懸濁物の量と相関するのは当然とも云えるが、植物に由来するクロロフィルよりも細菌により多く含まれているDNAの濃度と高い相関を示すのは興味深い。

表3 低地湖沼におけるでんぶん分解活性の測定例（7月）。

試水	クロロフィル a $\mu\text{g} / \ell$	蛋白質 $\mu\text{g} / \ell$	アンモニア $\mu\text{g N} / \ell$	でんぶん分解活性 ODU
長沖中沼	7	315	80	0.12
龍ヶ崎蛇沼	11	825	180	0.14
教大プール跡	8	822	50	0.57
東大心字池	98	4825	130	0.98
教大占春池	29	1470	70	1.35
上野不忍池	27	2005	105	1.65
霞ヶ浦桜川口	11	390	640	1.75
手賀沼我孫子岸	261	5740	440	2.25
土浦乙戸沼	16	512	320	2.29
利根町二ツ沼	91	3940	250	3.05

図3aは中沼におけるこの活性の垂直変化を示している。垂直的にも季節的にもこの活性が変動するのは明らかで、一般には表水層上部、変水層および底土上に活性の高い水層を見出した。図3bは沿岸域、図3cは湾内の海水中での活性垂直分布で、ここでは表面水中での活性を1としたときの相対値で示してある。図のbでは活性とDNAとの垂直分布が相似的であるが、図のcでは両

者にくいちがいがみられる。このくいちがいは河川流下物によるものとも思われるが、詳しい吟味はなされていない。図3 d は下田湾を中心とした淡水—汽水—沿岸水域の表面水における活性を示したもので、海水の活性は河川水に較べて極めて低いこと、また活性はとくに河口付近で高まることなどが示されている。

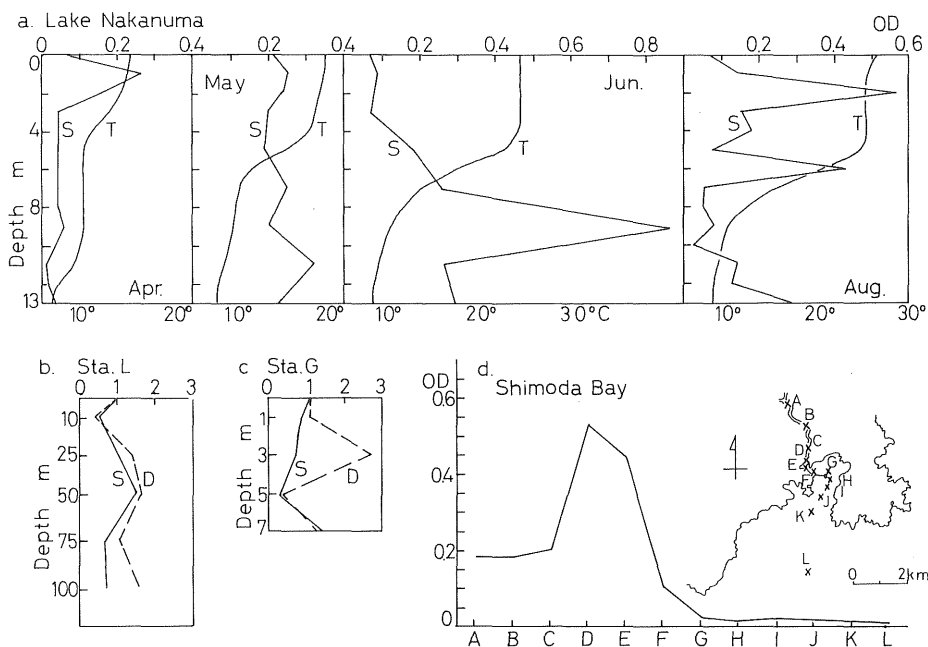


図3 自然水域におけるでんぷん分解活性の測定例。a, 中沼 (S, 活性; T, 水温); b, 下田沖測点L (S, 活性; D, DNA濃度; 表面水中の値を1としたときの相対値で示す); c, 下田湾内測点G (同前); d, 下田湾周辺の測点A—Lにおける表面水の活性, 12月 (A—B河川, C—E河口域, F—J湾内, K—L沿岸域)。

図4は河川での測定例である⁴⁾ここでは原水および濾過水の示す発色度を懸濁態蛋白質量で除し、蛋白質量あたりの比活性を示した。水源池から水田地帯を貫流している桜川では活性に地域的変動が認められるものの、上流から下流に向っての変動の方向性もっていない⁵⁾また原水の比活性と濾水の比活性との地域変動には多少の差を生じているが、これが何を意味するものかは今後の検討を要する。

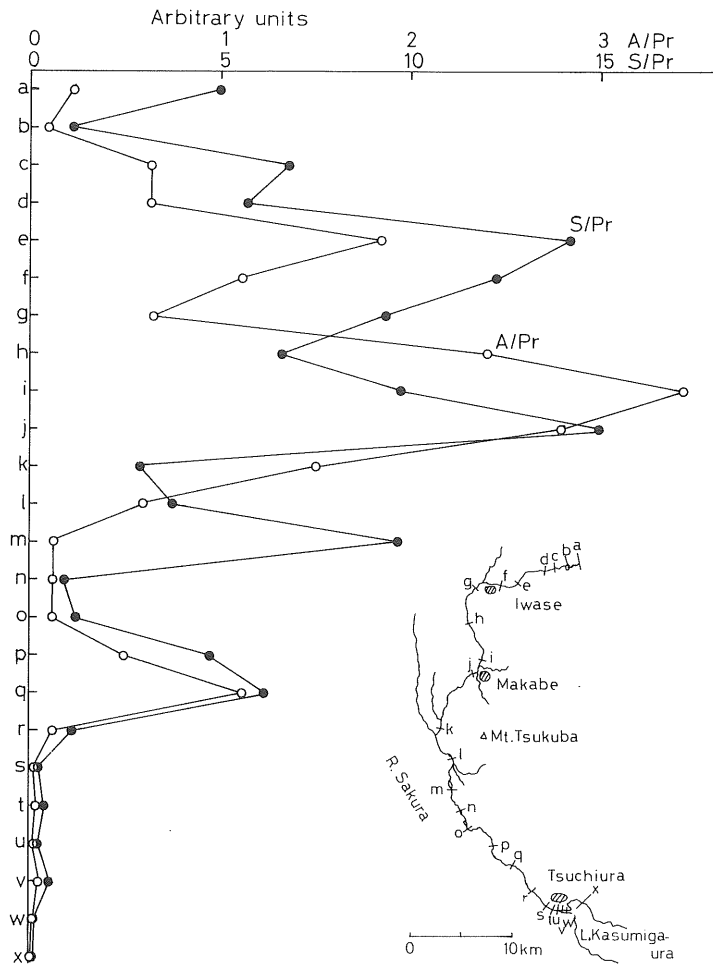


図4 8月の桜川におけるでんぷん分解の蛋白質量に対する比活性 (S/Pr) およびアミラーゼ活性 (A/Pr)。縦軸は測点を、横軸は任意単位を表わす。

試水にリン酸塩あるいは硝酸塩を添加してでんぷん分解活性を調べると、発色度が原水とあまり変わらない水域と、大きく増加する水域とが見出された。図5は筑波大学構内の松美上池(雨水調整池)の表面水に異なった濃度のリン酸塩、硝酸塩およびその双方を添加した場合の発色度を比較したものである。リン酸塩のみを添加した場合にも発色は増大するが、それはせいぜい無処理水の2倍程度にすぎなかった。しかし硝酸塩を添加すると発色は100倍を越えて飛躍的に増大し、硝酸塩とリン酸塩とを同時に添加した場合はさらに高い発色度が得られた。こうした現象は、無機栄養塩が添加され

ると微生物の増殖速度が高まり、酵素の生産が増加することによってもたらされるものと考えられた。

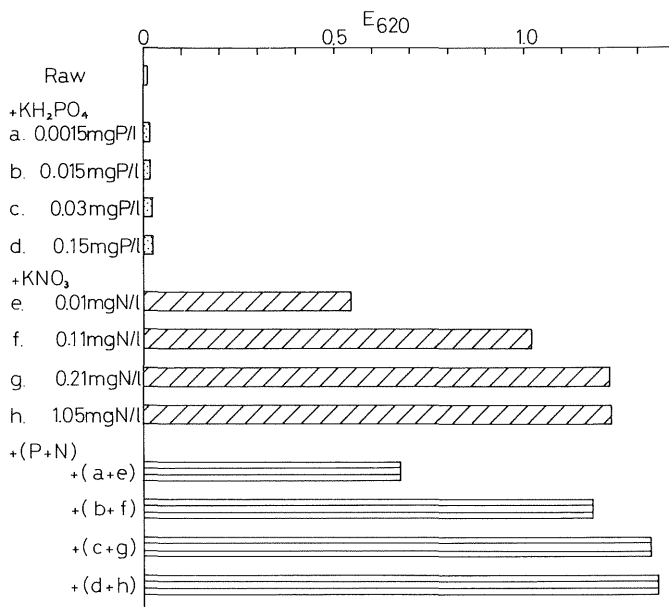


図5 試水に磷酸塩 (KH_2PO_4), 硝酸塩 (KNO_3) またはその双方 (P+N) を添加した場合のアミラーゼテスト試薬発色度の変化。Raw は無処理の原水を表わす。

考 察

水界におけるでんぷんの分解は、好気条件下では *Pseudomonas* 類, 多種類の *Bacillus* 類, *Actinomyces* 類および菌類によって, また嫌気条件下では主として *Clostridium* 類によって受け持たれている⁸⁾ 試水に blue starch polymer を添加すると, すでに溶在していた酵素, 基質の増加によって誘導された酵素を含めた既存の微生物が放出する酵素と, 培養中に増殖した微生物が放出する酵素とによって基質分解が進められ, 遊離するオリゴ糖量に比例した発色度が得られるものと推定される。

いくつかの実例で示したように, 自然水中に blue starch polymer を添加して一定時間後の発色を測定すると, 水域ごとに, あるいは同一水域でも深さや季節ごとに, 異なった発色度が得られ

る。これは従属栄養微生物の現存量および微生物の増殖を規制する環境条件が試水ごとに異なっているためと解される。試水に試薬を添加することによって得られる発色度を、仮にでんぷん分解活性と呼ぶことにするが、これは試水のもつ潜在的な基質分解活性 (potential activity) を表わすことになる。この発色度は、そのまま自然水のもつ有機物分解能に対する1つの尺度として有効に機能すると思われる。

基質添加以前の、現場試水がもつでんぷん分解能は、試水に溶在しているアミラーゼの活性を測定することによって比較できよう。このためには試水を予めHAミリポアフィルターなどで濾過し、菌体を除去した濾水に基質を添加して、発色度を求めればよい。こうして得られる濾水の発色度を、仮に試水のアミラーゼ活性と呼ぶことにしている。

無機栄養塩の添加によって、発色が大きく異なるのは興味深い。発色の差が酵素濃度の差に基くものとすれば、これは培養中における微生物の増殖速度の差を表わすことになる。したがってこの現象を応用すれば、微生物の増殖に対する試水中の無機栄養条件を知ることができる。すなわち、充分量のN、PまたはN+Pを添加した場合の発色度を無処理水の発色度と比較することによって、試水中の無機栄養条件がN欠乏かP欠乏か、あるいは過剰に存在するかを相対的に評価することができよう。また試水を熱分解して懸濁物中の栄養塩を溶出させ、これに菌体を接種して発色度を求めれば、試水のもつ潜在的な無機栄養条件を簡便に測定することができ、富栄養度を評価する1つの尺度として有効な手段たりうる可能性もある。

本稿でとりあげた方法は、基質のあいまいさ、酵素活性評価の不完全さ、また Kinetics による解析の不便さなど、生化学的にみれば多くの問題を含んでいる。しかし自然水域を環境科学的に解析しようとする場合、その測定値に多少のあいまいさが残されていても、実用に耐えるものならば可とせざるを得ない場合が多い。また自然界に存在する多種類の基質の分解に関与する多くの酵素の現場での作用機作に関する知識が充分には集積されていない現段階では、基質および分解産物に対する細かい吟味はさほどの意義を持たないと思われる。そこで本稿では、用いた基質をでんぷん、これに作用する酵素をアミラーゼとあえて呼ぶことにした。

でんぷん分解活性をもつ一般の従属栄養細菌は好気条件下で増殖するので、極めて汚染した試水を標準法で試験すると、培養中に酸素不足を来す恐れがある。この場合には充分空気を残した瓶内で培養すればよく、また逆に、酸素条件をも含めた試験を行なう場合には密栓した酸素瓶内で培養すればよい。いずれにしても、この測定法の操作手順は簡便で野外試験にも適し、特殊な機器や放射性同位元素などを必要とせず、また例えばBOD₅のように測定結果を得るのに長時間を要するものでもない。今後さらに測定法の吟味と意義付けが検討される必要はあるが、水界における物質の動態解析や水質環境の評価などに適用しうる範囲は広く、本法の利用価値は極めて高いものと云えよう。

引 用 文 献

1. Golterman, H. L. (1975) : *Physiological Limnology, An Approach to the Physiology of Lake Ecosystems*. Elsevier, Amsterdam.
2. 第一化学薬品株式会社 (1970) : アミラーゼ研究会報告集。
3. 前田修 (1975) : 日本陸水学会第40回大会 (大分) 講演要旨集。
4. 前田修 (1977) : 日本陸水学会第42回大会 (日光) 講演要旨集。
5. 前田修 (1977) : 夏の渇水期における桜川の流下物に関する植物生態学的考察。筑波の環境研究 2, 53—58。
6. Rheinheimer, G. (1971) : *Mikrobiologie der Gewässer*. Gustav Fischer, Stuttgart.