

多摩川水系における洗剤由来の酵素の分布

1990年

田 畑 真佐子

東京理科大学薬学部助手

目 次

1. 緒 言	1
2. 実験方法	1
2-1 試 料	1
2-2 水質試験	1
2-3 セルラーゼ活性測定法	1
2-4 プロテアーゼ活性測定法	2
3. 結果および考察	2
3-1 洗濯用洗剤の酵素活性	2
3-2 洗濯排水の酵素活性	7
3-3 浅川流域河川水の酵素活性	7
3-4 洗剤酵素の河川水中での消長	10
4. ま と め	12
5. 参考文献	12

1. 緒 言

酵素の配合された洗濯洗剤は、1960年代より主にヨーロッパで使用されてきた。その普及の理由の一つは、洗濯に温湯を用いる習慣があるからである。わが国でも浴室、湯沸器の普及や排水のリン酸塩規制の問題などから酵素が見直されて、洗剤に配合されるようになってきた。とくに近年では、全自動洗濯機の普及と共に、短時間で洗浄効果をあげる目的で、従来配合されていたプロテアーゼのほかセルラーゼ、リパーゼ等を配合した洗剤が発売され、急速に広まっている。都市近郊では、現在いまだ下水道が完備していない地区も多いが、そこではこれら酵素を含有する洗濯排水が河川水中に流入することになる。

洗剤酵素の安全性に関しては、酵素配合現場の作業員の呼吸傷害をとまなう肺疾患が、酵素を含むダストの吸入によるとの報告が1969年Flindt³⁾によりなされているが、酵素洗剤そのものについては、正常使用の限りでは酵素を含まない洗剤に比べ、皮膚によりひどい刺激が起こることはないという見解が示されている^{4) 5)}。しかし、自然水域にこれら高力価の酵素を含む洗濯排水が流入した場合、水域環境にどのような影響を及ぼすかについては全く知見がない。そこで本研究では、洗濯酵素の自然水域での残留性や水質への影響を評価する目的で、多摩川水系において酵素活性の分布調査を行った。

2. 実験方法

2-1. 試 料

洗剤は市販のコンパクト洗濯洗剤を用い、通常の洗濯時使用濃度 (0.75g/l) に蒸留水で溶解して洗剤溶液とした。使用した洗剤は、アタック (花王株式会社)、トップ (ライオン株式会社)、レモンチアー (プロクター、ギャンプル、ファーイースト、インク)、アリエール (プロクター、ギャンプル、ファーイースト、インク) の4種である。

河川水試料は、東京都八王子市、日野市の浅川水系で9地点から1989年6月12日 (地点1、2、3、4)、10月13日 (地点5、6、7、8、9) に採取した。採取の際、ガーゼでろ過してゴミを取り除き、ポリタンクにつめ、4℃で保存した。試料水はグラスファイバーフィルター (GA100, TOYO) およびメンブランフィルター (0.45 μ m, ADVANTEC) を用いてろ過し分析に供した。酵素活性測定に際しては、上記のろ液を限外ろ過で (ULTRAFILTER UK-10, TOYO) 約10倍に濃縮して測定した。

2-2. 水 質 試 験

試料水のpHは、ガラス電極pHメーター (東亜電波) を用いて測定した。陰イオン界面活性剤濃度はメチレンブルー法により⁶⁾、また総有機炭素濃度はTOC計 (Shimadzu TOC-10B) を用いて測定した。

2-3. セルラーゼ活性測定法^{7) 8)}

試 薬

基 質：カルボキシメチルセルロースナトリウム (和光純薬) 1.25g を蒸留水に加熱溶解した。

緩衝液：グリシン1.514gとNaCl 7.305g を蒸留水に溶解し、1M NaOHでpH 9 に調整後、全量100ml

とした。

Alkali-PAHBAH : 4-hydroxybenzoic hydrazid(Aldrich)0.761gとNaOH 4gを蒸留水に溶解し、100 mlとした。

Alkali-bismuth : bismuth nitrate (関東化学) 7.28g、potassium sodium tartrate (関東化学) 4.23g、NaOH 1.8gを蒸留水に溶解し、15mlとした。

操 作

試験溶液、基質、緩衝液を5 : 4 : 1の割合で混ぜ、25°Cでインキュベートした。経時的にこの2 mlを採取し、alkali-PAHBAH 2 ml, alkali-bismuth 4 μ lを加え70°Cで13分反応させ、冷後、410nmにおける吸光度を測定した。試験溶液のかわりに蒸留水を用いてブランクとした。グルコースを用いて検量線を作成し、活性はグルコース μ mol/min/試験溶液mlで表した。

2-4. プロテアーゼ活性測定法^{9) 10)}

試 薬

基 質 : カゼイン(MERCK) 1.2gとNa₂PO₄ 2.87gを蒸留水に加熱溶解し、1M NaOHでpH10に調整後、全量40mlにした。

6%トリクロロ酢酸(TCA)溶液

フェノール試液(ナカライテクス)

操 作

試験溶液と基質を5 : 1の割合で混ぜ、25°Cでインキュベートした。経時的にこの4 mlを採取し、6%TCA 4 mlを加え、3,500rpmで10分遠心分離した。上清6 mlを採り、0.6M NaOH 6 ml、フェノール試液希釈液(1→3) 3 mlを加え、25°Cで30分インキュベートした。その後、660nmで吸光度を測定した。試験溶液のかわりに蒸留水を用いてブランクとした。チロシンを用いて検量線を作成し、活性はチロシン μ mol/min/試験溶液mlで表した。

3. 結果および考察

3-1. 洗濯用洗剤の酵素活性

市販の洗濯用洗剤4種の酵素活性を、プロテアーゼ活性はカゼインを基質に用いて分解物の酸可溶性の低分子ペプチドの定量をアンソン-萩原氏法により^{9) 10)}、セルラーゼ活性はカルボキシメチルセルロースを基質に用いて、分解物のグルコースをHARBAR法により^{7) 8)}経時的に測定した。一例としてFigure 1, 2にそれぞれ洗剤溶液(アタック)のセルラーゼ、プロテアーゼ活性測定時のインキュベート時間と吸光度の関係を示した。各試料の活性は、このようなグラフより吸光度の直線的増加部分の傾きから求めた。

洗剤酵素の活性のpH、温度依存性を調べた。結果をFigure 3, 4に示した。また、洗剤溶液25°Cと40°Cで保存したときの活性の安定性を調べた。至適pHはプロテアーゼではpH10-11、セルラーゼでは

pH 9で、いずれもアルカリ性で活性が強い。温度については、40℃では25℃の場合に比べ約3倍活性が上昇する。しかし、Figure 5に示すように、25℃での保存では両酵素とも安定であったが、40℃では急激に活性が低下した。以上のことより、試料のプロテアーゼ活性はpH10、25℃、セルラーゼ活性はpH 9、25℃で測定するのが適当と判断した。

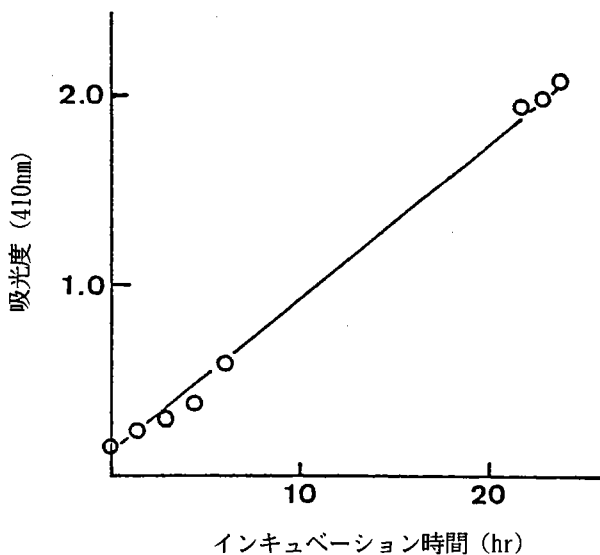


Fig. 1 洗剤溶液（アタック）のセルラーゼ活性

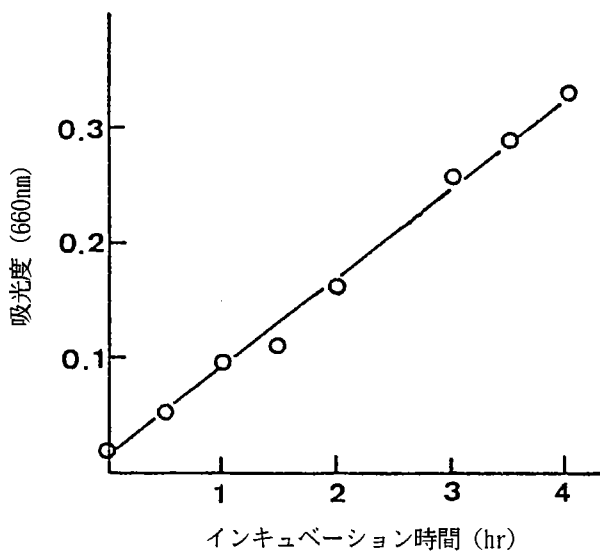


Fig. 2 洗剤溶液（アタック）のプロテアーゼ活性

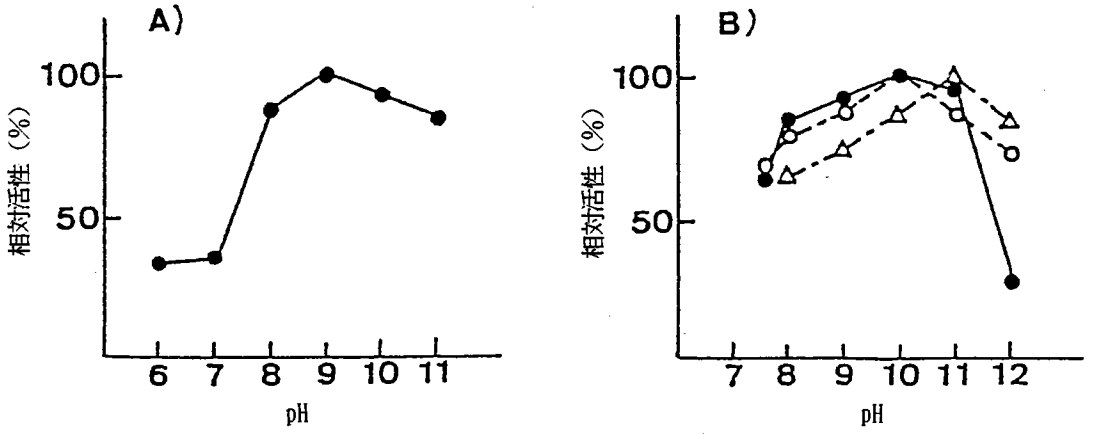


Fig. 3 洗剤酵素活性のpH依存性

A) セルラーゼ活性: 洗剤 (アタック)

インキュベーション温度 25°C

B) プロテアーゼ活性: —●— 洗剤 (アタック)

---○--- 洗剤 (トップ)

—△— 洗剤 (レモンチアー)

インキュベーション温度 25°C

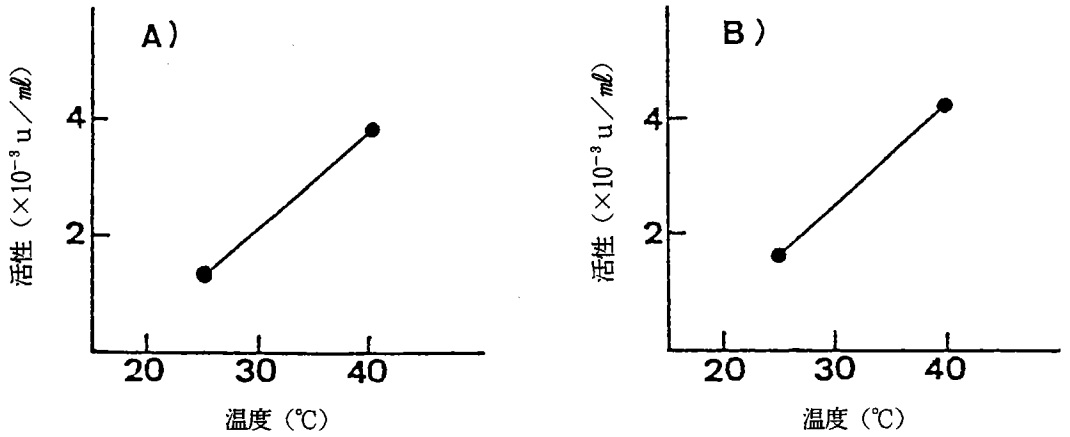


Fig. 4 洗剤酵素活性の温度依存性

A) セルラーゼ活性: 洗剤 (アタック)

pH 9

B) プロテアーゼ活性: 洗剤 (アタック)

pH 10

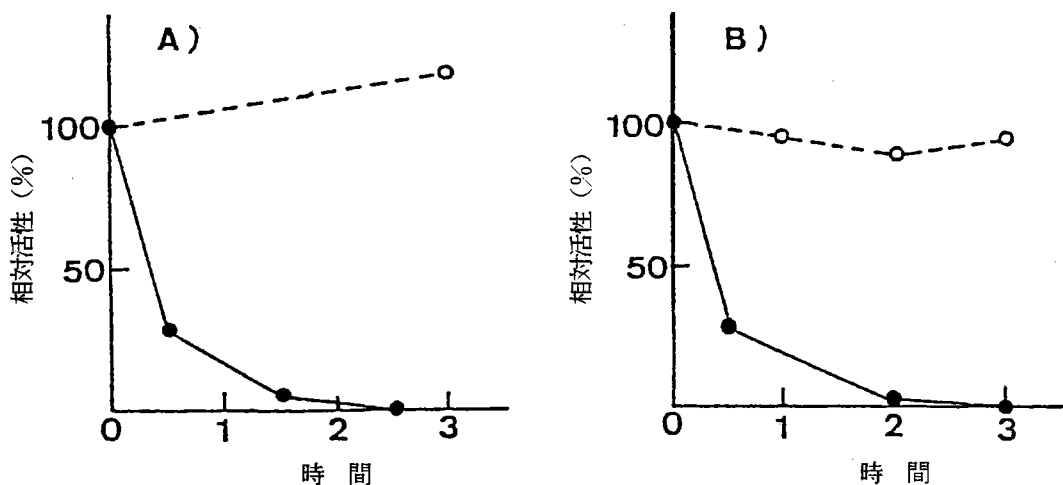


Fig. 5 洗剤酵素の安定性

A) セルラーゼ活性：洗剤（アタック）

pH9 インキュベーション温度 25°C

プレインキュベーション温度 ---○--- 25°C

—●— 40°C

B) プロテアーゼ活性：洗剤（アタック）

pH10 インキュベーション温度 25°C

プレインキュベーション温度 ---○--- 25°C

—●— 40°C

上記の条件で、各洗剤の通常洗濯時の濃度に溶かした洗剤溶液の酵素活性を測定した。その結果は Table 1 の通りであった。

Table 1 洗濯洗剤の酵素活性

洗 剤	セルラーゼ		プロテアーゼ	
	($\mu\text{mol}/\text{min}/$ 洗剤溶液* ml)	($\mu\text{mol}/\text{min}/$ 洗剤 g)	($\mu\text{mol}/\text{min}/$ 洗剤溶液* ml)	($\mu\text{mol}/\text{min}/$ 洗剤 g)
ア タ ッ ク	5.06×10^{-4}	6.75×10^{-1}	3.14×10^{-2}	4.19×10
ト ッ プ	—	—	4.09×10^{-2}	5.45×10
レモンチアー	—	—	7.25×10^{-3}	9.67
アリエール	—	—	2.26×10^{-2}	3.01×10

* : 洗剤溶液 0.75g/l

次に、洗濯排水が河川などに流れ込んだ場合希釈されると考えられるので、試料水からの酵素の濃縮手法として、限外ろ過法を検討した。洗剤溶液を限外ろ過濃縮し、その前後の活性を測定した。Table 2 に示すように、洗剤希釈液の濃縮後の活性回収率は良好で、濃縮中の活性の損失はほとんどないと考えられた。また、河川水中の溶存物質の活性測定法に及ぼす影響を調べるため、浅川より採取した試料水に洗剤を添加し、直ちにメンブランフィルターで除菌し、ろ液中の洗剤酵素の活性を測定した。その結果はTable 3 に示すように、蒸留水に添加した場合と同等の活性であり、酵素活性測定に対する河川水中の溶存物質の影響は認められなかった。

Table 2 限外ろ過濃縮時における洗剤酵素活性の変化

酵 素	原 液 *		濃縮液 **		活性回収率 (%)
	容量 (ml)	活性 (Abs)	容量 (ml)	活性 (Abs)	
セルラーゼ	400	0.02	33	0.29	100
プロテアーゼ	400	0.02	33	1.43	91.7

* 洗剤アタック (0.01g/100ml)

** TOYO UH-1 限外ろ過膜を使用

Table 3 洗剤酵素の河川水への添加実験結果

酵 素	活性 (Abs/hr)	
	洗剤アタック／蒸留水 (0.1g/100ml)	洗剤アタック／浅川河川水 (0.1g/100ml)
セルラーゼ	0.533	0.616
プロテアーゼ	0.113	0.116

3-2. 洗濯排水の酵素活性

洗剤の酵素活性が洗濯後にどの程度残存しているかを調べるために、洗濯直後の洗剤液の酵素活性を測定した。市販の洗剤4種を用いて通常の使用濃度で洗濯機で洗濯し、その排水のセルラーゼおよびプロテアーゼ活性を測定した。

Table 4 洗濯排水の酵素活性

使用洗剤	セルラーゼ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$)	プロテアーゼ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$)
アタック	5.69×10^{-4}	1.80×10^{-3}
アタック	3.85×10^{-4}	2.14×10^{-3}
アタック	6.13×10^{-4}	1.18×10^{-2}
トッブ	—	1.83×10^{-3}
トッブ	—	6.00×10^{-3}
レモンチアー	—	1.36×10^{-3}
アリエール	—	1.24×10^{-2}

Table 4 に示したように、洗濯直後の排水ではTable 1 に示した洗剤溶液の酵素活性と比較して活性の著しい低下は見られず、通常の洗濯後では活性がほとんど残存していることがわかった。

3-3. 浅川流域河川水の酵素活性

多摩川支流の浅川流域において9地点から採水し、セルラーゼおよびプロテアーゼ活性を測定した。また、あわせて陰イオン界面活性剤濃度、TOC濃度も測定した。その結果をTable 5 に示した。さらにその結果をサンプリング地点と併せて模式的にFigure 6 に示した。

地点1、5は家庭からの排水が直接流れ込んでいる排水溝であり、地点2、3、4、6、9は排水溝の水が集まり支流となり河川本流に流れ込む所、地点7は南浅川の本流である。また、地点8は湯殿川の upstream で、人家がほとんどないところである。酵素活性は1、2、3、4、5地点で見いだされた。また界面活性剤濃度は地点1、5で高く7、8では検出されなかった。TOC濃度もほぼこれと対応して1、4、5等で高かった。

Table 5 河川水のTOC、酵素活性、陰イオン界面活性剤濃度

地点	温度 (°C)	pH	セルラーゼ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$)	プロテアーゼ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$)	TOC (mg/l)	陰イオン界面活性剤 (mg/l)
1	17	7.2	1.3×10^{-5}	1.4×10^{-3}	21.3	10.37
2	16	7.1	4.6×10^{-6}	4.4×10^{-6}	1.7	2.81
3	18	7.2	7.0×10^{-6}	ND	6.3	0.66
4	20	7.2	7.5×10^{-6}	8.3×10^{-4}	22.5	1.10
5	19	7.2	5.6×10^{-7}	9.9×10^{-3}	47.2	11.79
6	18	7.3	ND	ND	10.4	0.76
7	17	7.1	ND	ND	2.3	ND
8	—	7.2	ND	ND	1.6	ND
9	—	7.0	ND	ND	16.6	0.59

ND : 検出限界以下

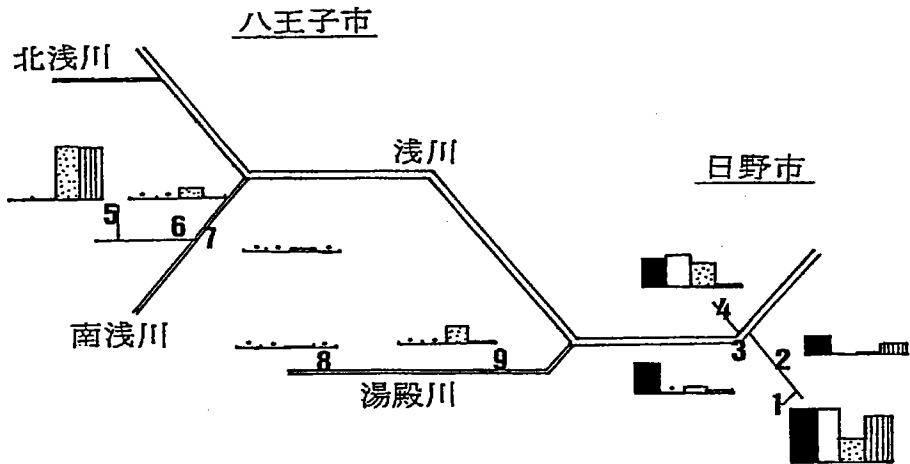
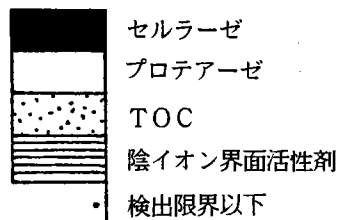


Fig. 6 浅川流域におけるセルラーゼ活性、プロテアーゼ活性、TOCおよび陰イオン界面活性剤濃度の分布



このように試料水に酵素活性が見いだされたが、自然水中には微生物なども存在しており、それらが分泌した酵素の活性ということも考えられる。微生物は一般に、弱酸性から微アルカリ性下でよく生育し、その条件下で働く酵素を分泌している。従来広く知られているセルラーゼの至適pHは4-7、プロテアーゼの至適pHはペプシンで3、細菌由来で6-8¹¹⁾等である。一方、洗濯洗剤の溶液は通常アルカリ性であることから、洗剤にはその条件下で活性が充分働くように、高アルカリ条件下で生育する特異な微生物から得た、アルカリ性下に至適pHをもつ酵素が配合されている。今回使用した市販の洗剤の酵素もFigure 3, 4に示すように、アルカリ性に至適pHがあった。河川水中に検出された酵素の特性を明らかにするために、酵素活性が検出された試料水について活性のpH依存性を調べた。地点1の試料水のセルラーゼ活性についての結果をFigure 7に、地点1、2、4の試料水のプロテアーゼ活性の結果をFigure 8に示した。セルラーゼ活性はpH8で最大、プロテアーゼ活性はいずれもpH11で最大であった。

以上のように、試料水のセルラーゼ活性、プロテアーゼ活性がアルカリ性に至適pHをもっていること、またTable 5に示したように、酵素活性の検出された試料で界面活性剤濃度も高いことから、試料水で検出された酵素活性は洗濯洗剤に由来するものと考えられる。

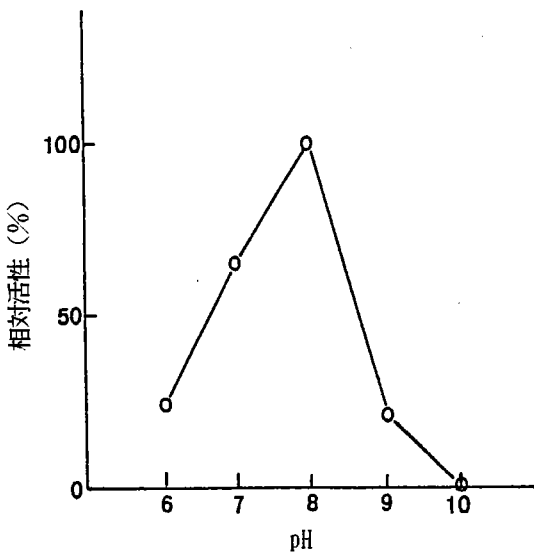


Fig. 7 河川水のセルラーゼ活性のpH依存性

試料：地点1

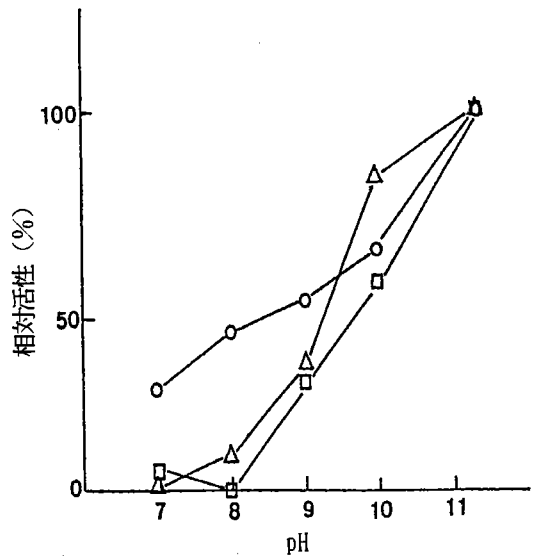


Fig. 8 河川水のセルラーゼ活性のpH依存性

試料： —○— 地点1
 —△— 地点2
 —□— 地点4

3-4. 洗剤酵素の河川水中での消長

河川等に流れ込んだ洗剤酵素の活性がどの様に変化するか調べるため、河川水への洗剤溶液の添加実験を行った。地点5または7の試料水と洗剤溶液と混合して室温に放置し、経時的にその一部を採取して酵素活性を測定した。洗剤はアタック、トップ、レモンチアーを用い、アタックについてはセルラーゼおよびプロテアーゼ活性、トップ、レモンチアーについてはプロテアーゼ活性の変化を観察した。地点5の結果をFigure 9-A, Bに、地点7の結果をFigure 10-A, Bに示した。地点5の試料水ではセルラーゼ活性は4日後にはじめの30%に、プロテアーゼ活性は1日後にはじめの30%に低下した。地点7の試料水では地点5に比べ活性の低下が少なかった。地点5の試料水は家庭から排出される生下水にちかく、地点7の河川本流の水に比べTOCも著しく高く汚濁している。このことより、洗剤酵素は流れ込んだ水中の微生物により分解されたり、懸濁物へ吸着したりすることにより、活性の低下が速まると考えられる。

3-2に示したように、洗濯直後の洗剤溶液では活性が大部分残存している。したがって、下水道設備の完備していない所では、家庭からかなり活性の強い洗濯排液が直接河川に流れ込むと考えられる。事実、家庭からの排出直後の地点の試料水で酵素活性が検出された。しかし、流下に伴い活性は減少し、本流では検出されなくなっている。河川水への添加実験によると24時間後も活性が残存していることと、流入排水が本流へ至るまでの時間を考えると、本流での活性の低下には酵素自身の失活よりむしろ希釈の要因が大と考えられる。また、今回の実験では、水中微生物の増殖を防ぐため試料水をメンブランフィルターでろ過して除菌後、水中に遊離の酵素の活性を測定した。試料水は家庭よりの排出直後のものほど汚濁しており懸濁物が多いことから、洗剤の酵素はそれらの懸濁物に吸着し、河川水中では懸濁物と共に底泥へと沈降している可能性もある。試料水のろ過操作により吸着された酵素は除去されていることも予想されるので、今後懸濁状態での試料水の酵素活性や、河川底泥の酵素活性なども検討する必要があると考えられる。

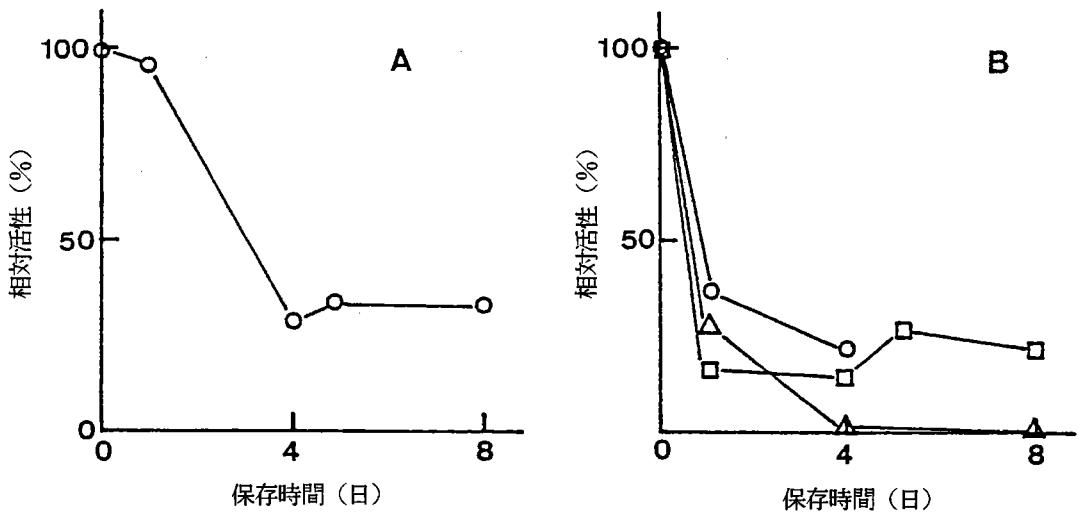


Fig. 9 洗剤酵素活性の河川水中での変化

A) セルラーゼ活性

洗剤 (アタック) 溶液 (0.75g/l) / 試料水 地点 5 (1/9)

B) プロテアーゼ活性

—○— 洗剤 (アタック) 溶液 (0.75g/l) / 試料水 地点 5 (1/9)

—△— 洗剤 (トップ) 溶液 (0.75g/l) / 試料水 地点 5 (1/9)

—□— 洗剤 (レモンチアー) 溶液 (0.75g/l) / 試料水 地点 5 (1/9)

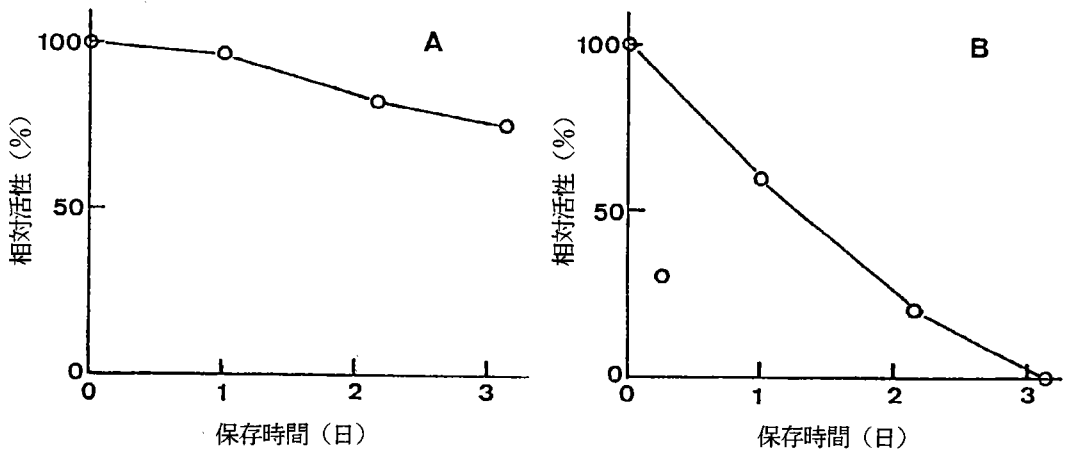


Fig. 10 洗剤酵素活性の河川水中での変化

A) セルラーゼ活性

洗剤 (アタック) 溶液 (0.75g/l) / 試料水 地点 7 (1/9)

B) プロテアーゼ活性

洗剤 (アタック) 溶液 (0.75g/l) / 試料水 地点 7 (1/9)

4. ま と め

市販洗濯洗剤のセルラーゼ、プロテアーゼ活性について調べ、多摩川の浅川水系においてそれらの活性の調査した。

洗剤のセルラーゼ、プロテアーゼはそれぞれpH 9、10-11に至適pHを持ち、25℃では安定であるが40℃では不安定であった。通常の洗濯後では酵素活性はほとんど残存していた。

浅川流域の排水溝では、洗剤に由来すると考えられるアルカリに至適pHをもったセルラーゼとプロテアーゼ活性が見いだされたが、流下に伴い活性は低下し、南浅川本流水では検出されなかった。一般家庭からは活性の強い洗濯排水が排出されると予想されるが、河川本流に至るまでに希釈や懸濁物への吸着、沈降により河川水中の酵素活性が低下すると考えられた。

5. 文 献

- 1) 小巻利章, R&Dレポート「酵素利用技術の新展開」 209-224
- 2) Charles A. S., JAACS 60:1025-1027 (1983)
- 3) Flindt M. L., The lancet 1:1177-1181 (1969)
- 4) 小巻利章, フレグランスジャーナル, 7:88 (1974)
- 5) 谷森修平, フレグランスジャーナル, 42:43 (1980)
- 6) 日本薬学会編, 衛生試験法注解, 金原出版 (1980)
- 7) Lever M., Analy. Biochem., 81:21-27 (1977)
- 8) Lever M., Analy. Biochem., 47:273-279 (1972)
- 9) Anson M. L., J. Gen. Physiol., 22:79 (1938)
- 10) 萩原文二, Ann. Rep. Fac. Sci Osaka Univ. 2:35-79 (1954)
- 11) 酵素ハンドブック, 朝倉出版