

## 飲用水中の硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素の酵素分析法

山口県衛生公害研究センター (所長: 田中一成)

長 田 健太郎・松 村 宏

### Enzymatic Determination of Nitrate and Nitrite Nitrogens in Drinking Water

Kentaro OSADA, Hiroshi MATSUMURA

Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health (Director: Dr. Kazushige TANAKA)

#### はじめに

現在、水道水・井戸水等の飲用水中の硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素の定量法としては、公定法であるカドミウム・銅カラム法 (以下「Cd-Cu法」という.) が広く使用されている<sup>1)</sup>。しかし、Cd-Cu法はカラム調整に手間どること、カラム使用に伴う還元力の低下、有害物質であるカドミウムを含有する検査排液の処理等、分析操作以外の問題が多いという難点がある。他の定量法としては、ブルシン-スルファニル酸法、フェノールジスルホン酸法、サルチル酸ナトリウム法、硝酸イオン電極法、高速液体クロマトグラフ法、紫外外部吸収法など多くの方法<sup>1~7)</sup>がある。しかし、精度・感度・妨害物質・操作の迅速性や簡易さなどにおいては、いずれの方法にもそれぞれ欠点がある。

そこで今回、著者らは微生物より調整した硝酸還元酵素 nitrate reductase (EC 1.6.6.2) を用い、飲用水中の硝酸を亜硝酸に還元して測定する方法を検討したので報告する。

#### 実験方法

##### 1 試薬等

nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form (NADH) : オリエンタル酵母製  
nicotinamide adenine dinucleotide phosphate,

reduced form (NADPH) : オリエンタル酵母製  
penylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) :  
Sigma社製

dithiothreitol (DTT) : 和光純薬工業製  
硫酸ストレプトマイシン : 和光純薬工業製  
スルファニルアミド溶液およびN-(1-ナフチル)-エチレンジアミン溶液はCd-Cu法と同様のものを使用した。

その他の試薬は全て特級を使用した。

##### 2 微生物及び培養方法

硝酸塩同化性酵母 *Candida utilis* (IFO0619) を使用し、Table 1 に示す硝酸塩培地で培養した。

Table 1 Growth media for the preparation of nitrate reductase from *C. utilis*

Reagent	Concentration (g/l)
Glucose	10
NaNO <sub>3</sub>	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.5
NaCl	0.1
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.02
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.005
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.001
MnCl <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0.001
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.001
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.001

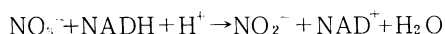
### 3 酵素活性の測定

酵素反応は 0.5  $\mu$ mol NADH, 5  $\mu$ mol  $\text{KNO}_3$  を含む50mMリン酸緩衝液 (pH 7.3) 1.9mlに 0.1mlの酵素溶液を添加し、25°Cで30分間おこなった。反応はスルファニルアミド溶液 0.2mlを加えて5分間静置して停止し、ついでN-(1-ナフチル)-エチレンジアミン溶液 0.2mlを加えて発色させさらに20分間静置した後、波長 540nmの吸光度を測定した。酵素活性の1 unit は25°Cで1分間に1  $\mu$ molの亜硝酸を生成する酵素量として定義した。また、酵素の比活性の上昇をみるための蛋白質量は、280nmの吸光度で決定した。

### 4 硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素の定量方法

試料水0.1mlを10ml容試験管にとり、精製した nitrate reductase 0.1unit と 0.5  $\mu$ mol NADHを含む100mMリン酸緩衝液 (pH7.3) 0.1mlを加え、25°Cで30分間反応をおこなった。反応の停止及び発色は酵素活性の測定と同様におこなった。

試料水中の硝酸性窒素は、次の反応で亜硝酸性窒素に還元される。



この反応によって生じた亜硝酸性窒素を測定することにより、硝酸性窒素の量を知ることができる。この方法による測定値は、試料水中に最初から存在する亜硝酸性窒素も加えた値となるため、Cd-Cu法と同じく硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素の合計量である。

## 結 果

### 1 培養条件

500ml容の三角フラスコに100mlの液体培地を入れ、*C. utilis* を振とう培養し酵素を誘導した。酵素活性は30°C、12時間で最大となり、その後は急速に減少した。従って、以後の実験には12時間培養の菌体を使用した。

### 2 酵素の精製

培養液を遠心分離 (3,000 X g, 30min) して菌体を集め、50mMリン酸緩衝液 (pH 7.3) で2回洗浄した。この菌体10g (wet weight) を0.1 mM DTTと1 mM PMSFを加えた50mMリン酸緩衝液 (pH 7.3) 20mlに懸濁し、細胞を破壊してCell free extractとした。本酵素はこの状態では不活性化しているので、最終濃度 2 mMにな

るようフェリシリアン化カリウムを添加し、酵素の活性化をおこなった。さらにストレプトマイシン処理、硫酸分画、DEAE-Toyopeal650Sによって部分精製した。精製の要約をTable 2に示した。nitrate reductase は約17倍に精製され、

Table 2 Summary of purification of nitrate reductase from *C. utilis*

Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Cell free extract	187	257	0.7	100
Streptomycin sulfate supernatant	152	174	0.9	81
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitate	112	75	1.5	60
DEAE-Toyopeal 650 S	61	5.2	12	33

収率は33%であった。精製酵素中には、亜硝酸をアンモニアに還元し過剰の反応を引き起こす nitrite reductase は存在しなかった。

### 3 酵素の性質

精製された nitrate reductase の性質を Table 3 に示した。酵素の保存性については、0.1M DTT

Table 3 Characterization of nitrate reductase

Optimum pH	7.3
pH Stability	7-8
Km value (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	0.15mM
Km value (NADH)	60 $\mu$ M
Km value (NADPH)	78 $\mu$ M

と1mM PMSF及び20%グリセロールを含むリン酸緩衝液 (pH 7.3) 中で-20°Cで保存したところ、3か月で活性は42%残っていた。

### 4 検量線の作成

$\text{KNO}_3$  の標準溶液を使用して硝酸性窒素0.0~1.0mg/lの範囲で吸光度を検討したところ、Fig.1に示すように相関係数 0.997と非常に良好な直線関係が得られた。

### 5 Cd-Cu法との比較

県内の水道水、井戸水を試料水として、本法と公定法であるCd-Cu法との比較をおこなった。結果はFig.2に示すように、相関係数0.960と良く一致していた。

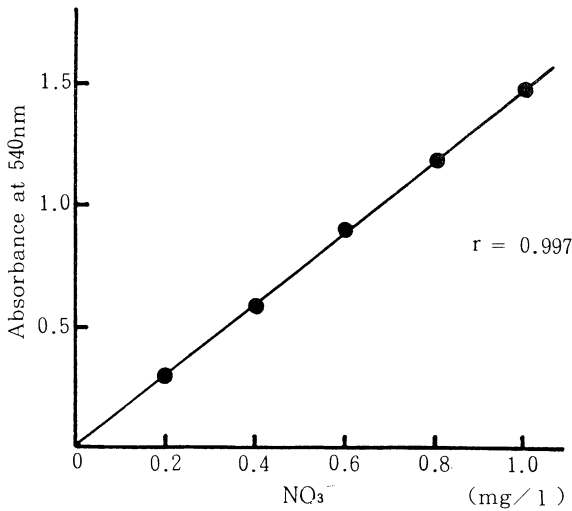


Fig.1 Calibration curve of nitrate nitrogen

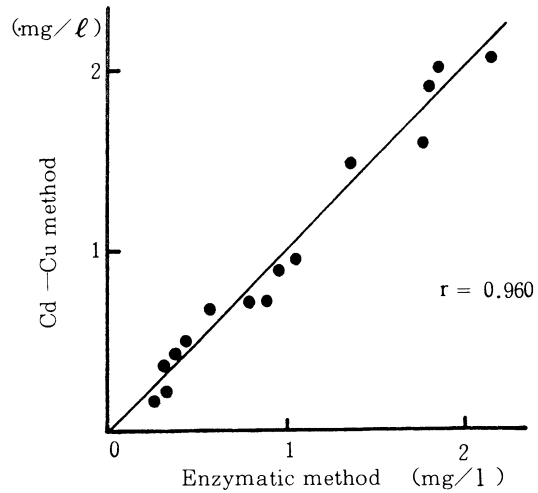


Fig.2 Correlation between the Cd-Cu and the enzymatic determinations

Table 4 Effect of Ions in the enzymatic determination

Ions	Concentration (mM)	Error (%)	Observed (%)
Ca <sup>2+</sup>	5	+2	
Zn <sup>2+</sup>	5	-5	
Mn <sup>2+</sup>	5	-8	
Mg <sup>2+</sup>	5	-9	
Hg <sup>2+</sup>	0.1	-100	
Na <sup>+</sup>	5	-2	
K <sup>+</sup>	5	+4	
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	5	-12	
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 1)	5	-8	
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	5	-6	
Cl <sup>-</sup>	5	-5	
ClO <sup>-</sup>	0.1	-61	

1) measured at 340nm absorption

## 6 共存物質の影響

飲用水に含まれる種々の陽イオン・陰イオンにより、nitrate reductase がどの程度阻害を受けるかを検討した。Table 4 に示すように、本法は通常含まれる陽イオン・陰イオンでは殆ど影響を受けないが、水銀イオン及び残留塩素で著しく阻害された。

## 考 察

酵素法による硝酸性窒素の分析は、食品や環境水においては Cu-Cu 法と良い相関があることが報告されている<sup>9-14)</sup>。また、酵素の固定化によ

る酵素電極や自動分析も試みられている<sup>15-17)</sup>。

今回、著者らは *C. utilis* の酵素を使用して飲用水における分析法の確立と問題点について検討した。この酵素は EC 1. 6. 6. 6. 1 の NADH のみを補酵素とする酵素<sup>18)</sup>や EC 1. 6. 6. 3 の NADPH のみを補酵素とする酵素<sup>19)</sup>とは異なり、NADH 及び NADPH の両方を補酵素とする EC 1. 6. 6. 2 の同化型硝酸還元窒素であった。酵素の性質は他の微生物のもの<sup>20)</sup>と良く一致していた。本方法は使用菌の *C. utilis* の培養が容易であり、また NADH を補酵素として使用するため、メチルビオロゲンを電子受容体とする場合にように嫌気的条件を必要とせず、分析操作は非常に簡単である。しかし、*C. utilis* の nitrate reductase は in vivo では不活性型が存在し、何らかの制御を受けている誘導酵素と考えられる。しかも培養の対数増殖期の間あたりで酵素量が最大となるため、菌体収量が少なく、微妙な培養条件の違いにより集菌した菌体の酵素量にかなりの変動がみられた。酵素収量を安定にするには詳細な諸条件の設定が必要であろう。また、精製した酵素の保存にはさらなる低温条件や安定剤の添加が必要であろう。

なお、本酵素は水銀イオンや残留塩素で阻害を受けるが、飲用水中に水銀イオンが酵素を阻害する濃度で存在することは通常ありえない。また残

留塩素は分析前の試料水に少量の亜硫酸ナトリウムを加えることで除去できる。従って通常の分析には影響ないものと考えられる。

### 要 約

硝酸塩培地で *C.utilis* から nitrate reductase を誘導し精製した。この酵素を用いて飲用水の硝酸性窒素の定量を試みたところ、公定法である Cd-Cu法との間に高度の相関を示して良く一致した。妨害物質の影響は、水道水中に含まれる残留塩素の濃度が高いと問題になるが、分析前に試料水に亜硫酸ナトリウムを添加することで除去できた。Cd-Cu法においては廃液の処理やデータの再現性等に問題があるが、迅速かつ簡単におこなえる本法は、酵素の調整と安定性に配慮する必要があるものの、特に多数検体の分析を頻繁におこなう場合には有効であろう。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲をいただいた当センター所長田中一成博士に厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) 日本水道協会編：上水試験方法。日本水道協会，1985，P.255～272.
- 2) 井上康子ほか：仙台市衛生試験所報。(11)，250～255(1981)
- 3) 秋元克己ほか：栃木県衛生研究所報。(12)，75～77 (1981)
- 4) 小野知美ほか：堺市衛生研究所報。(3)，161～167(1985)
- 5) 藤本敏子ほか：尼崎市衛生研究所報。(10)，40～44 (1985)
- 6) 鈴木 全ほか：水道協会雑誌。(504)，2～6 (1976)
- 7) 日色和夫ほか：分析化学。27，283～287 (1978)
- 8) Payne,W,J.:Bacteriol.Rev. 37，409～452 (1973)
- 9) 浜野 孝ほか：神戸市環境保健研究所報。(14)，51～54 (1981)
- 10) Hamano,T. et al.: Agric. Biol.Chem. 47，2427～2433 (1983)
- 11) 三ッ橋幸正ほか：神戸市環境保健研究所報。(15)，31～33 (1985)
- 12) Thayer,J.R. et al.: Anal. Biochem. 102，110～119 (1980)
- 13) Kiang,C. et al.: Anal. Chem 50，1319～1322 (1978)
- 14) Kobos, R. K. et al.:Anal. Chem. 51，1122～1125 (1979)
- 15) Senn, D. R. et al.:Anal. Chem. 48，954～958 (1976)
- 16) Kiang, C. et al.: Anal. Chem. 50，1323～1325 (1978)
- 17) 高野昭男ほか：福岡市衛生試験所報。(10)，56～59 (1985)
- 18) Giri, L. et al.: J.Biol. Chem. 254，11703～11712 (1979)
- 19) Pan,S. et al.: Biochim.Biophys. Acta. 523,297～313 (1978)
- 20) Guerrero, M. G. et al.: Biochim. Biophys. Acta. 482，272～285 (1977)