衛生化学
EISEI KAGAKU
32 (5) 384-390 (1986)

水質汚濁指標に関する研究 (第7報) アミノ酸の COD_{Mn} について

松本久男, 宮島幸子, 松本礼子

徳島文理大学薬学部

Investigations on the Water Pollution Index. VII. On the Chemical Oxygen Demand of Amino Acids Using Permanganate

HISAO MATSUMOTO, SACHIKO MIYAZIMA

and REIKO MATSUMOTO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri

University, Tokushima 770, Japan

(Received May 19, 1986)

Amino acids are contained in various effluents and environmental waters and their COD values are adopted as a water pollution index. In this report, chemical oxygen demand (COD) originated from each amino acid was investigated. Acidic and alkaline COD determination was carried out with semimicro method using permanganate. The COD values of most amino acids were linearly increased with their molar concentration. The effect of AgNO_3 added into the reaction mixture was evidently recognized and the acidic values of amino acid, L-aspartic acid, increased by 27.5 times compared with those when it was not added.

Big differences in COD values were shown among different groups of amino acids. Acidic COD values of amino acids did not reach the plateau values after 30 min's heating as the official method. In the alkaline method, COD values differed very little and showed higher values compared with the acidic method. Heating time (60 min) was considered to be adequate.

The decomposition rate to the theoretical values (complete oxidation) was 19.4% in the acidic and 43.9% in the alkaline method. Therefore the alkaline method will be utilized as a water pollution index of effluents containing amino acids.

Keywords—water pollution; chemical oxygen demand; amino acid; catalytic effect silver nitrate; decomposition rate

緒 言

排水中にアミノ酸を排出する業種としては、食品・薬品工場のほか厨房排水等種々の排出源が考えられ、また蛋白質から二次的に生成する場合も考えられる。またし尿やその消化脱離液¹⁾、下水中²⁻⁴⁾にも含まれているとの報告がある。これらの放流水は最終的には公共水域に到達するが、その放流先が湖沼、海域の場合は環境基準として化学的酸素要求量 (COD) 規制を受けることになる。一方、水質総量規制における排出水の汚濁負荷量の指標としても KMnO_4 を使用する COD が定められているので、各アミノ酸と COD_{Mn} の関係を明らかにして置く必要がある。

アミノ酸の COD_{Mn} についてはごく限られたアミノ酸について断片的な資料しか提出されていない。⁵⁾ それも酸性高温法のみで、アルカリ性法 COD についてはほとんど報告が見られない。アミノ酸の COD の解明は蛋白質の COD 究明の基礎としても重要である。本報では先に報告したセミマイクロ法⁶⁾ による COD 測定法により各アミノ酸の COD_{Mn} について系統的に検討した結果について報告する。

実 験 の 部

1. 試薬及び装置 1) 試薬——(1) 蒸留水及び COD 測定用試薬類は前報と同じものを使用した。

(2) アミノ酸: glycine, L-alanine, L-serine, L-threo-

nine, L-valine, L-leucine, L-isoleucine, L-phenylalanine, L-proline, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-arginine, L-lysine, L-tyrosine, L-cysteine, L-methionine, L-tryptophan, L-histidine, L-hydroxyproline は味の素(味の素)の試薬アミノ酸セットS及び和光純薬特級を使用した。

2) 装置——セミマイクロ法 COD 測定装置：前報⁶⁾のものを使用した。

2. 実験方法 1) COD_{Mn} 測定操作——さきに報告⁶⁾したように、酸性法、アルカリ性法共に試料溶液を20 ml に減少したセミマイクロ法により実施した。沸騰水浴中での加熱時間は、酸性法では公定法とよく対応する20分を、アルカリ性法では60分を採用した。ただし、酸性法で AgNO₃ を加えない場合の実験は、未だ対応性が明確でなかったので30分間加熱した。

2) アルカリ性法 COD 処理によるアンモニアの遊離試験——試料20 ml を撹合せ容量50 ml の三角フラスコに取る。次に、20% 水酸化ナトリウム溶液0.4 ml, 0.025 N KMnO₄ 2.0 ml を加え、沸騰水浴中で還流冷却しながら所定の時間加熱する。加熱が終了しだいグルコース (1×10⁻¹ M) を0.5 ml 加え再度1分間加熱する。KMnO₄ が脱色した後、蒸留水を加え全量26 ml としたあと沸石を加え加熱蒸留する。留液は16 ml 採取しアンモニア性窒素をインドフェノール法⁷⁾により測定する。

回収率の計算はインドフェノール法により測定したアンモニア性窒素 (mg/l) をモル濃度に換算し、最初の試料のモル濃度に対する比率から求めた。なお、アンモニア性窒素標準液を添加した場合の蒸留回収率は92.7%であった。

3) アルカリ性法 COD 処理後の硝酸イオンの測定——アルカリ性 COD 処理によるアンモニアの遊離の試験で加熱蒸留した後の残液を試料に用いる。蒸留水を留液採取量(約16 ml)加え、更に蒸留をつづけ、留液(16 ml)中にアンモニア性窒素が検出されないことを確認後再び残液に精製水を加え全量26 ml とし、デバルタ合金0.05 g を加え蒸留する。留液(16 ml)を留取し、インドフェノール法によりアンモニア性窒素を測定する。⁸⁾

硝酸性窒素標準液を添加して回収率を求めたところ、約83.3%であった。

実験結果及び考察

1. AgNO₃ を加えない場合の酸性 COD_{Mn} とアミノ酸濃度の関係

酸性高温法において AgNO₃ を加えない場合の各アミノ酸の COD 値をモル濃度について測定して Fig. 1 に示した。前報までは銀塩を加えた場合の曲線を示したが、塩素イオンのマスキングに消費されると過剰量が少

Fig. 1. Acidic COD Values of Amino Acids as the Function of the Mol Concentration

AgNO₃ not added, heating time: 30 min.

なくなることも考えられるからである。モル濃度を採用した理由は前報⁹⁾と同じで、COD の測定反応は化学的な酸化反応であり、特定の官能基によって影響されることが多いと考えたからである。多くのアミノ酸はそのモル濃度と共にほとんど直線的に COD 値が上昇しているが、COD 約 15 mg/l を越すと上昇は緩慢になるものが多い。しかし、L-cysteine, L-tyrosine, L-tryptophan のように酸化され易いアミノ酸は 20 mg/l 近くまで直線的に上昇している。

したがって COD 値の計算は KMnO₄ が約半量残る点すなわち、10 mg/l 前後になるよう希釈率を調節して測定することになっているが、アミノ酸の場合は、10 mg/l を多少上下しても COD 値の誤差は少ないものと考えられる。

Glycine, L-alanine, L-valine, L-leucine, L-isoleucine の COD 値は、Ag 無添加では非常に低いことが分かる。また L-aspartic acid は特異なカーブを示している。

2. 酸性 COD_{Mn} における AgNO₃ 添加の効果

塩素イオンのマスキングのためと、触媒効果を期待し

Fig. 2. Effect of AgNO_3 on the Acidic COD Values of Amino Acids

Heating time: 30 min.

Fig. 3. Acidic COD Values of Amino Acids as the Function of Heating Time

有し、銀塩無添加でも COD 値が高いアミノ酸にこのような場合が見られる。

3. 加熱時間と酸性 COD_{Mn} 曲線

Fig. 3A は AgNO_3 を加えない場合、Fig. 3B は 20% AgNO_3 1.0 ml を加えた場合の COD 値の時間的経過を示す。L-cysteine, L-methionine は非常に短時間で KMnO_4 と反応する。その他のアミノ酸については、銀塩無添加の30分加熱では COD 上昇が非常に不十分である。一方、銀塩添加では Fig. 3B のように COD の時間経過が明らかに早くなっているが、公定法に規定の30分ではまだ最大値に達していない。60分でもまだ L-glutamic acid, L-aspartic acid, L-arginine などでは上昇中のものが見られる。しかし、L-serine, L-valine などではほぼ最大値に達している。このように加熱時間を延長すれば酸化率は高くなるが、 KMnO_4 の自己分解が多くなり、空試験も高くなる。(60分加熱で 2.3 mg/l を示す)。したがって単に加熱時間を長くすることにより酸化率を高めることは適切でない。

て、日本薬学会、衛生試験法 (1980) では 20% AgNO_3 溶液を、JIS (1981) では AgNO_3 又は Ag_2SO_4 が添加されている。さきに報告したフェノール類¹⁰⁾ や糖類¹¹⁾ の大部分では触媒効果は見られなかった。アミノ酸の場合を Fig. 2 に示す。ただし、本図では COD 値を出来るだけ 10 mg/l に合わせるため各アミノ酸の濃度が統一されていないので別に無添加の時の COD に対する 20% AgNO_3 1 ml 添加時の上昇比を計算して検討した。最高は L-aspartic acid 27.5 倍、L-serine, L-phenylalanine で 10 倍前後、L-alanine, L-threonine, L-isoleucine, L-hydroxyproline, L-glutamic acid で 5 倍前後の高い上昇比を示した。前報⁹⁾ において脂肪酸の酸化分解は炭素鎖の短い脂肪酸へと分解すること、アミンの酸化分解では脂肪酸を生成して KMnO_4 消費を行うこと¹²⁾ を明らかにした。したがって、酸性アミノ酸が特に上昇率が高いのは 2 個のカルボキシル基に対し銀塩が触媒効果を示すためと考えられる。

一方、Ag の効果がほとんど見られないアミノ酸も見られ、Fig. 2A に示すように特殊な官能基又は異項環を

Fig. 4. Alkaline COD Values of Amino Acids as the Function of the Mol Concentration

Heating time: 60 min.

4. アルカリ性 COD とアミノ酸の濃度との関係

Fig. 4 はマイクロ法によるアルカリ性法 (60分加熱) における COD 曲線を示す。どのアミノ酸もその COD 曲線は酸性法のような大きな差は見られず、COD 6.0 mg/l を示すアミノ酸のモル濃度は $0.1\text{--}0.5 \times 10^{-4}$ M に集中している。また低濃度ではほとんど直線的に COD 値が上昇することが分かる。すなわち酸性法で低値であったアミノ酸がアルカリ性法では他のアミノ酸とほぼ同じレベルに高くなっている。これらのことから、アルカリ性法において、酸化反応を促進する官能基は酸性の場合と異なるものであることが推定され、それはアミノ基¹²⁾ であると考えられる。

5. アルカリ性 COD_{Mn} と加熱時間

アルカリ性法による COD の時間経過を Fig. 5 に示す。環境基準による20分、環境汚染分析法¹³⁾ の30分の加熱時間では COD 値は上昇途中であり、分解が不十分である。一方、衛生試験法 (1980) の60分、加熱では、多くのアミノ酸がほぼ最大値に到達していることが分かる。60分 (マイクロ法では40分に対応) 加熱は、かなり長時間を要するが、アルカリ性法では KMnO_4 の自己分解も非常に少ないので、合理的と考えられる。

6. アルカリ性 COD 処理によるアンモニアの遊離

脂肪酸アミンはアルカリ性 KMnO_4 で加熱処理する

Fig. 5. Alkaline COD Values of Amino Acids as the Function of Heating Time

と徐々にアンモニアを遊離することを先に報告¹²⁾ した。すなわちエチルアミンでは40分後に約60%、アミルアミンでは約26%のアミノ基の窒素はアンモニアとしての遊離を示した。

アミノ酸のアミノ基もアルカリ性 COD 処理で遊離することが予想されるので、加熱時間を追って測定した結果を Fig. 6 に示す。時間と共に徐々にアンモニアを遊離し、40分後では glycine で約 43%、L-aspartic acid で約25%を示した。この時、硝酸イオンの生成は Fig. 6 のように非常に少なかった。アンモニアの生成率が頭打ちになってしまうのは KMnO_4 の残存量に関係するものと考えて KMnO_4 の使用量を2倍に増した L-alanine の場合では20分後で61%を示した。また、 KMnO_4 を10倍量に増すと20分後が最大となり、L-alanine で69%、glycine で50%のアンモニアを遊離した。

7. 各アミノ酸の COD 値と分解率

マイクロ法で測定した各アミノ酸の COD 値 (g/g) B

TABLE I. Relationship between Theoretical and Experimental COD Values Obtained with the Semimicro Acidic and Alkaline Method (Amino Acids)

Amino acids	A Theoretical COD (g/g) ^{a)}	B Experimental COD (g/g) ^{b, c)}		B/A (%)		COD (ppm) at 1×10^{-4} M	
		Acidic	Alkaline	Acidic	Alkaline	Acidic	Alkaline
Glycine	0.639	0.008	0.390	1.25	61.0	0.059	2.93
L-Alanine	1.08	0.008	0.732	0.741	67.8	0.069	6.52
L-Serine	0.761	0.268	0.280	35.2	36.8	2.82	2.94
L-Threonine	1.07	0.087	0.293	8.13	27.4	1.04	3.49
L-Valine	1.71	0.012	0.426	0.702	24.9	0.145	5.00
L-Leucine	1.83	0.012	0.457	0.656	25.0	0.161	6.00
L-Isoleucine	1.83	0.014	0.594	0.765	32.5	0.177	7.79
L-Phenylalanine	1.94	0.356	0.251	18.4	12.9	5.88	4.14
L-Tyrosine	1.68	1.49	1.84	88.7	109	27.0	33.3
L-Cysteine	1.19	0.384	0.471	32.3	39.6	4.65	5.71
L-Methionine	1.61	0.366	0.649	22.7	40.3	5.46	9.68
L-Tryptophane	1.80	1.61	1.22	89.4	68.0	32.8	25.0
L-Proline	1.53	0.027	0.745	1.76	48.7	0.308	8.57
L-Hydroxyproline	1.22	0.311	0.738	25.5	60.5	4.08	9.68
L-Histidine	1.03	0.273	0.501	26.5	48.6	5.73	10.5
L-Aspartic acid	0.721	0.032	0.184	4.44	25.5	0.429	2.45
L-Glutamic acid	0.979	0.043	0.326	4.39	33.3	0.625	4.80
L-Arginine	1.14	0.043	0.407	3.77	35.7	0.909	8.57
L-Lysine	1.53	0.063	0.547	4.12	35.8	0.926	10.0
Mean	1.33	0.285	0.582	19.4	43.9	4.91	8.79
S.D.	0.415	0.468	0.387	27.2	22.1	9.11	7.75

a) Calculated by $N \rightarrow NH_3$.

b) Heating time: 20 min in acidic, 60 min in alkaline.

c) 20% $AgNO_3$ 1 ml added.

と理論的 COD 値 (g/g) A に対する酸化率%, 及び 1×10^{-4} M 濃度における COD 値を Table I に示す. なお理論値はアミノ酸分子中の炭素は CO_2 に, 水素と酸素は H_2O に, 窒素は NH_3 に, 硫黄は SO_3 に変化するものとして計算した.

従来アミノ酸の COD は非常に低いと言われていたが酸性法では L-tyrosine, L-tryptophan のように酸化率の非常に高いアミノ酸もあることが見落とされていた. 酸化率平均は19.4%であるが, ばらつきが大きい. アミノ酸の COD 値の報告は非常に限られており, 近藤ら⁵⁾ は酸性法で, 直火で10分間沸騰加熱した結果を報告している. これは加熱条件が明らかに標準法と異なるが, 酸化率では glycine で3%, L-alanine で<1%, L-methionine で4%, L-glutamic acid で6%を示し, Table I の値と多少の違いをみせている. 一方, アルカリ性法の平均酸化率は43.9%に達している. これは先に脂肪族アミンについて報告したように, アミノ基の脱離とそれに続く酸化反応が起こっているためと考えられる.

8. 酸性 COD_{Mn} の20分, 30分加熱時の COD 値

実験途中でセミマイクロ法による酸性 COD 値は加熱時間30分よりも20分の方が標準法との対応性がよい⁶⁾ ことが分かった.

各アミノ酸の平均 COD 値は, 20分で0.285 (g/g) であり, 30分では0.333 (g/g) で20分値の1.17倍であることが判明した.

9. 各アミノ酸の BOD 値

希釈法 (一部検圧法) で測定した各アミノ酸の BOD 値を Table III に示す. 平均 0.932 (g/g) で, 酸化率は理論値に対し70.4%となった. また L-valine 以外はすべて50%以上を示している. このようにアミノ酸の BOD 酸化率は非常に高く, アルカリ性 COD 0.582 (g/g) の約1.6倍を示している. 窒素含有化合物は主として第一段よりも第二段の BOD を示すと言われている¹⁴⁾ が, アミノ酸では第一段の BOD が非常に高いことが確かめられた. なおアミノ酸の BOD 酸化率は井上¹⁵⁾ によると glycine 6—34%, L-alanine 50%, L-as-

Fig. 6. Time Course of Recovery Rate of Ammonia Produced by the Decomposition of Amino Acids as a Result of Alkaline COD Treatment

$$N \text{ recovery rate (\%)} = \frac{\text{ammonia produced (M)}}{\text{amino acid (M)}} \times 100.$$

partic acid 29.46%, L-glutamic acid 38—51%の報告があり、本報よりも低めの値が多くなっている。

結 論

アミノ酸の COD 値は濃度と共にほぼ直線的に上昇する。酸性高温法における AgNO_3 添加の効果は多くのアミノ酸で顕著に見られ、特に酸性アミノ酸の L-aspartic acid では無添加時の27.5倍を示した。しかしアミノ酸の種類によって COD 値に大きな違いが見られた。時間的経過を見ると、硝酸銀の添加によって COD 値の上昇速度が明らかに早くなるが、30分加熱では大部分のアミノ酸はまだ最大値に達していない。

アルカリ性法ではどのアミノ酸の COD 値もあまり大きな差が見られず、酸性法よりもかなり高い値を示した。加熱時間では20分又は30分では不十分で衛生試験法の60分（マイクロ法では40分）が合理的と考える。

理論的 COD 値に対する割合は各アミノ酸平均で酸性法19.4%に対し、アルカリ性法では43.9%と高い値を示

TABLE II. Acidic COD Values at 20 min and 30 min as Heating Time (Amino Acids)

Amino acids	COD (g/g) ^{a)}	
	Heating time (min)	
	20	30
Glycine	0.008	0.013
L-Alanine	0.008	0.012
L-Serine	0.268	0.352
L-Threonine	0.087	0.120
L-Valine	0.012	0.023
L-Leucine	0.012	0.025
L-Isoleucine	0.014	0.021
L-Phenylalanine	0.356	0.466
L-Tyrosine	1.49	1.62
L-Cysteine	0.384	0.367
L-Methionine	0.366	0.419
L-Tryptophane	1.61	1.58
L-Proline	0.027	0.045
L-Hydroxyproline	0.311	0.492
L-Histidine	0.273	0.440
L-Aspartic acid	0.032	0.050
L-Glutamic acid	0.043	0.065
L-Arginine	0.043	0.065
L-Lysine	0.063	0.147
Mean	0.285	0.333
S.D.	0.468	0.480

20% AgNO_3 1 ml added.

TABLE III. BOD Values of Amino Acids

Amino acids	B		BOD (ppm) at 1×10^{-4} M
	Experimental BOD (g/g)	B/A (%)	
Glycine	0.499	78.1	3.75
L-Alanine	0.666	61.6	5.93
L-Serine	0.481	63.3	5.06
L-Threonine	0.837	78.2	9.97
L-Valine	0.638	37.3	7.48
L-Leucine	1.48	80.8	19.4
L-Isoleucine	1.53	83.4	20.0
L-Phenylalanine	1.49	76.7	24.6
L-Tyrosine	1.20	71.6	21.8
L-Cysteine	0.560	47.1	9.47
L-Methionine	0.998	77.4	14.9
L-Tryptophan	1.59	88.4	32.5
L-Proline	1.30	85.1	15.0
L-Hydroxyproline	0.784	64.3	10.3
L-Histidine	0.482	46.8	10.1
L-Aspartic acid	0.672	93.2	8.94
L-Glutamic acid	0.866	80.8	19.4
L-Arginine	0.732	64.2	15.4
L-Lysine	0.894	58.5	16.3
Mean	0.932	70.4	14.2
S.D.	0.383	15.3	7.46

A : theoretical COD (g/g), calculated by $\text{N} \rightarrow \text{NH}_3$.

し、アルカリ性法は汚濁指標として十分利用出来ることが分かった。また BOD 値の平均酸化率は70.4%で、アルカリ性法の約1.6倍を示した。

アミノ酸の COD 処理による酸化分解は、カルボキシル基とアミノ基の両方が関与していると考えられるが、その機構と生成物について検討中である。

引用文献

- 1) 石川哲也, 小瀬洋喜, 佐藤孝彦, 衛生化学, **25**, 147 (1979).
- 2) 秋山 高, 佐藤孝彦, 鹿児島大学医学雑誌, **15**, 366 (1963).
- 3) 宗宮 功, 河村清史, 水処理技術, **21**, 3 (1980).
- 4) 田中庸央, 荒川幸夫, 水処理技術, **16**, 667 (1975).
- 5) 近藤準子, 山崎康男, 第7回下水道研究発表会講演要旨, 1970年, p.215.
- 6) 松本久男, 宮島幸子, 小原由子, 衛生化学, **28**, 357 (1982).
- 7) 日本薬学会, “衛生試験法注解1980,” 金原出版, 東京, 1980, p.741.
- 8) 日本薬学会, “衛生試験法注解1980,” 金原出版, 東京, 1980, p.834.
- 9) 松本久男, 宮島幸子, 小原由子, 衛生化学, **30**, 149 (1984).
- 10) 松本久男, 宮島幸子, 衛生化学, **30**, 222 (1984).
- 11) 松本久男, 宮島幸子, 小原由子, 松本礼子, 衛生化学, **31**, 192 (1985).
- 12) 松本久男, 日本衛生学雑誌, **39**, 770 (1984).
- 13) 山縣 登, 大喜田敏一編, “環境汚染分析法 13,” 大日本図書, 東京, 1973, p.62.
- 14) 日本薬学会, “衛生試験法注解1980,” 金原出版, 東京, 1980, p.818.
- 15) 井上善介, 用水と廃水, **14**, 142 (1972).