

嫌気性水素発酵系における酵素活性について

日本大学大学院 学生員 ○円谷 輝美
日本大学工学部 正員 佐藤 洋一
日本大学工学部 正員 中村 玄正

1.はじめに

水素は、燃焼の際に二酸化炭素を排出しないことや燃焼効率が高いなどからクリーンエネルギーとして期待されている。嫌気性酸生成相では水素が生成することが知られており、嫌気性酸生成相について数多くの研究がなされてきた。しかし水素を生成する細菌の酵素に関する報告は少ない。水素を生成する酵素を抽出し、その特性を把握することができれば水素回収プロセスの確立に大いなる飛躍が期待できると考えられる。そのためには、細菌の酵素についての基礎的なデータの収集が重要である。本研究では細菌から酵素を抽出し、酵素の活性を測ることを試験的に行った。また、同じ運転条件下で、異なる基質を用いた場合の水素生成状況とその系における酵素活性を測定し、その特性に関する知見を求めることを目的とした。

2.実験方法

2.1 実験装置

本実験装置の概略図を図.1 に示す。本実験では、槽容量 2.1L、液相部 1.5L、気相部 0.6L のアクリル製連続培養装置を用い、その反応相の攪拌には発生したバイオガスを吸排両用エアポンプを用いて循環させた。恒温槽にはヒーターを用いて、温度調節器によって $35 \pm 1^\circ\text{C}$ に設定した。複合基質はマイクロチューブポンプを用いて連続的に投入させ、基質の発酵、変性を防ぐために複合基質貯留槽を 3.5°C に保った。発生したバイオガスは酸性飽和食塩水によって水上置換でプラスチックシリンダーに収集した。

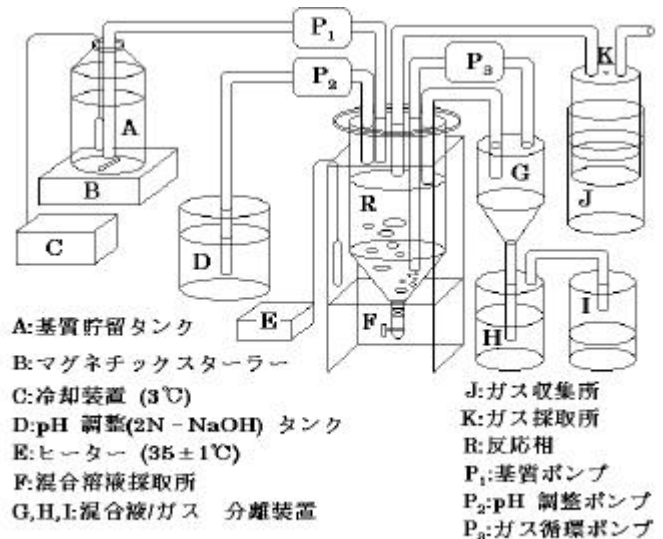


図.1 実験装置図

2.2 実験条件

表.1 に本研究で用いた複合基質を示す。炭水化物としてスクロース、タンパク質として溶解性ゼラチンを用い、その他無機栄養塩類を加えて複合基質とした。吉田¹⁾ は水素ガスの定量的な回収に有効な運転条件を報告している。本実験ではその報告を参考とし、pH 5.0、HRT 12 (hour)、CODcr 容積負荷 $26 \text{ kgCODcr/m}^3 \cdot \text{day}$ で運転した。また基質の混合割合は CODcr 比率で炭水化物 (スクロース) : タンパク質 (ゼラチン) = 10:0、8:2 とし、それぞれ Case1、Case2 とした。汚泥は食品工場より採取したものを反

表.1 複合基質 (mg/L)

		Case1 (10:0)	Case2 (8:2)
Sucrose		11665	10308
Protein		0	2514
NH ₄ HCO ₃		2480	2350
Nutrient Compositions			
Na ₂ HPO ₄	48	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.05
KH ₂ PO ₄	182	FeSO ₄ ·7H ₂ O	28
MgCl ₂ ·6H ₂ O	112	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.18
MnSO ₄ ·H ₂ O	18.2	H ₃ BO ₃	0.24
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5.6	Yeast extract	50

キーワード：酵素活性

連絡先：〒963-8642 福島県郡山市徳定字中河原一番地 日本大学工学部衛生工学研究室 (024-956-8708)

応相に接種し複合基質で馴養したものを用いた。pH 値、ガス量ともに安定したのを確認して実験を行った。菌体の洗浄には 0.02M のリン酸緩衝液を用い、菌体の破碎には超音波処理を用いた。酵素の活性を測定する際に使用した基質はスクロースを用い濃度は 4000mg/L とした。本研究では酵素の活性を測定するのに間接法を用いて行った。酵素は温度が 1℃変わると活性に約 1 割の誤差が出るために²⁾、活性測定中は温度を一定に保った。

3.実験結果及び考察

図.2 に VFA・エタノールと水素ガス生成速度の関係を示す。水素ガス生成速度は、Case1 が約 7.0 L/day、Case2 が約 2.0 L/day であり、Case1 の方が Case2 と比べて 3 倍以上大きい値となった。VFA は Case1 に比べて Case2 の方が酢酸・プロピオン酸が高い値となった。

図.3 に基質分解率と水素ガス生成速度に關係を示す。Case1、Case2 ともに基質である炭水化物（スクロース）はほぼ完全に分解されていた。Case2 のタンパク質（ゼラチン）は約 27.0%の分解率であった。図.4、図.5 にそれぞれ Case1、Case2 についての酵素活性を示す。図中に示してある式の傾きは、1mg の酵素が 1 分間あたりに消費する基質量であり、基質消費速度である。本実験ではこの値を酵素の活性単位とした。図.4、図.5 より Case1 における酵素活性単位は 0.4mg-suc/分・mg で Case2 における酵素活性単位は 0.5 mg-suc/分・mg であった。今回の実験では Case1、Case2 それぞれの菌体の酵素の活性に大きな違いがなかった。

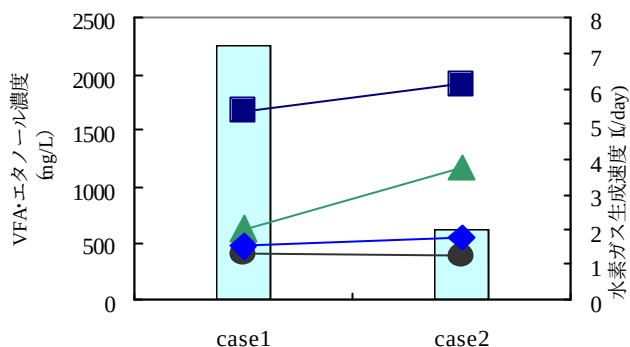


図.2 VFA・エタノールと水素ガス生成速度の關係

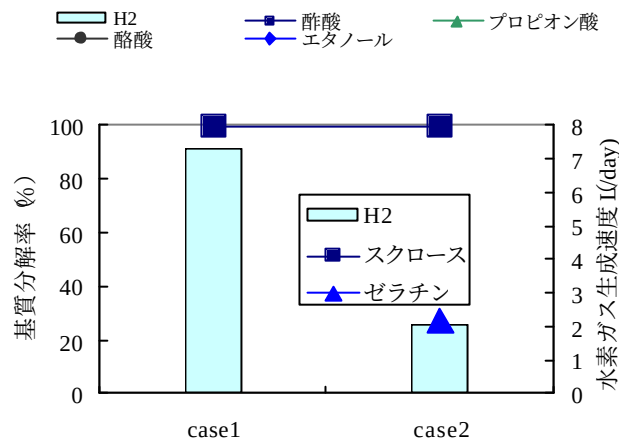


図.3 基質分解率と水素ガス生成速度の關係

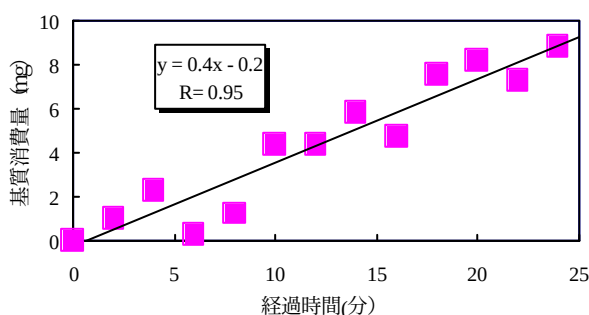


図.4 Case1での酵素活性

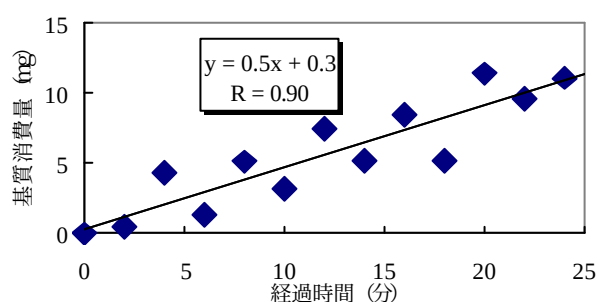


図.5 Case2での酵素活性

4.まとめ

今回の実験では Case1 (10:0) での酵素活性単位が 0.4、Case2 (8:2) での酵素活性単位が 0.5 と基質に炭水化物だけを用いたものと炭水化物とタンパク質を用いたものの活性に大きな差はなかった。水素ガス生成速度と酵素の活性には相関が認められなかった。

5.参考文献

- 1) 吉田光範:嫌気性酸生成相における複合基質からの水素発酵に関する基礎的研究,日本大学修士論文 (1999)
- 2) 泉美治等:生物化学実験のてびき,2 タンパク質の分離・分析法,化学同人出版 (1990)