

VII-17

嫌気性水素発酵系における酵素活性について

日本大学工学部 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

水素ガスは、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ガスが生成することが知られており近年、嫌気性酸生成相について数多くの研究が行われてきた。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、総容量 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。

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 $26.2 \text{ kgCODcr/m}^3 \cdot \text{day}$ 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応相に接種し複合基質で馴養したものをを用いた。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更に使用した基質はスクロースを用い濃度は 4000 mg/L とした。本研究では酵素の活性を測定する

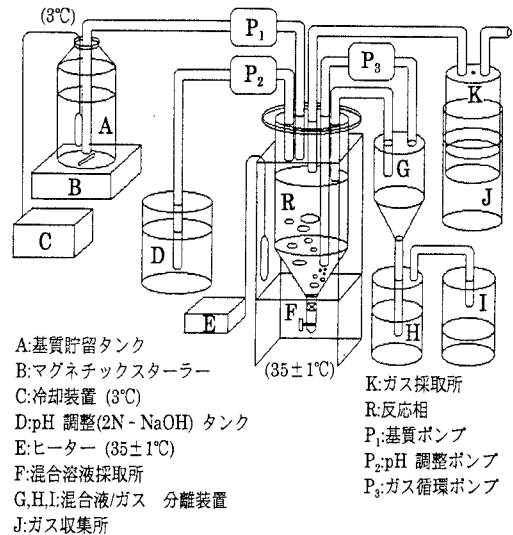


図.1 実験装置図

表.1 複合基質 (mg/L)

		Case1 (10:0)	Case2 (8:2)
Sucrose		11665	10308
Protein		0	2514
NH_4HCO_3		2480	2350
Nutrient Compositions			
Na_2HPO_4	48	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.05
KH_2PO_4	182	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	112	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.18
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	18.2	H_3BO_3	0.24
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5.6	Yeast extract	50

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常時40℃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7.29L/day、Case2が2.03L/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)が99%以上分解されていた。Case2のタンパク質(ゼラチン)は26.7%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分間当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0.379mg-suc/分・mgでCase2における酵素活性単位は0.499 mg-suc/分・mgであった。今回の実験ではCase1よりもCase2の菌体の方が酵素の活性が高いという結果になった。

4.まとめ

今回の実験ではCase1(10:0)での酵素活性単位が0.379、Case2(8:2)での酵素活性単位が0.499と基質に炭水化物だけを用了ものよりも炭水化物とタンパク質を用了もののほうが活性が高い結果となった。今回の実験では水素ガスが多く生成されることは必ずしも酵素の活性が高いということにはつながらない。

5.今後の課題

今回の酵素についての実験は間接法で行った。間接法の短所は基質の消費速度を連続的に測定出来ない事と試料を定量引抜くことが困難な事である。今後、酵素に関してのデータを収集していくにはより多くの実験・分析が必要であると考えられる。そのためには純度の高い酵素がより大量に必要になってくる。今後は純度の高い酵素の抽出法とその安定した保存方法、より適した実験方法を検討していく予定である。

6.謝辞

本研究を進めるにあたり、終始御指導下さった大学院2年生の佐藤靖敏氏をはじめ、実験に協力してくださった学部4年生の市居嗣之氏、鈴木義孝氏に感謝します。

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)

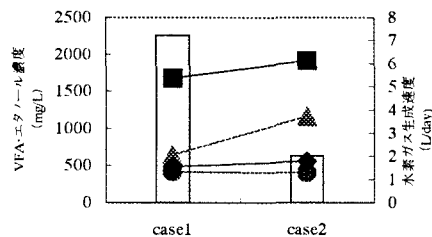


図.2 VFA・エタノールと水素ガス生成速度の關係

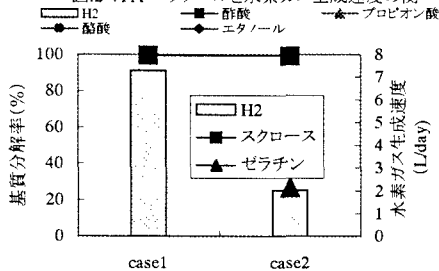


図.3 基質分解率と水素ガス生成速度の關係

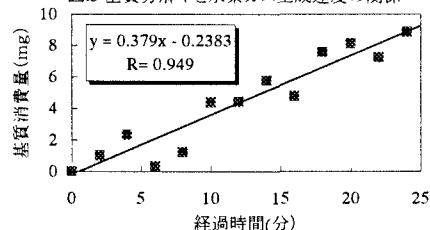


図.4 Case1での酵素活性

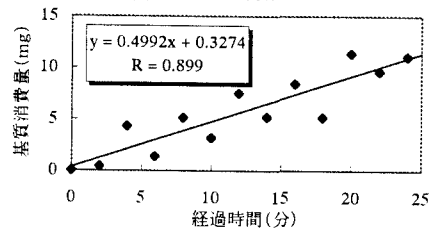


図.5 Case2での酵素活性