

VII-24

水素生成に関与する嫌気性酸生成細菌の酵素について

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

嫌気性消化法の酸生成相をコントロールすることにより、クリーンエネルギーである水素ガスを回収する技術があるが、有機物の水素ガスへの転換効率が悪いために有機性廃棄物の処理という点では劣ってしまう。その解決方法としては有機物を効率よく水素ガスへと転換させることが考えられる。有機物から水素ガスへの転換は微生物の働きによるものであり、その代謝機構には生体内・外酵素が関与している。そのために、水素生成に関わる微生物の生体内・外酵素を抽出して利用できれば、有機物からの効率良い水素ガスへの転換に寄与できると考えられる。本実験では水素生成に直接関与する脱水素酵素を抽出することを第一の目的として行った。

2.実験目的

本実験の目的は水素ガスの生成に直接関与している脱水素酵素を抽出することである。脱水素酵素は細菌の中に存在するために菌体を破砕するなどの前処理が必要である。本実験では菌体の破砕に超音波破砕と減圧破砕の二パターンで行い、その影響も検討した。タンパク質は数種のイオン化する解離基を持っているので、プラス、マイナス両方の電荷をもつ可能性がある¹⁾。酵素抽出の際にはカラムを陽イオン交換カラム、陰イオン交換カラムの2種類使い、酵素抽出に適したカラムの検討も合わせて行った。

3.実験条件

図.1 に本実験で用いた装置概略図を示す。実験装置は気相部 0.6L、液相部 1.5L、全容量 2.1L のアクリル製連続培養装置である。反応槽内温度は $35 \pm 1^\circ\text{C}$ に設定し、槽内の pH 値の調整には 2N-NaOH 溶液を用いた。反応槽内で発生したバイオガスは酸性飽和食塩水を用いて水上置換法で収集した。吉田²⁾や佐藤³⁾は水素ガスを定量的に回収するのに有効とされる運転管理指標や基質組成を報告している。本研究ではその報告を参考にし、複合基質は CODcr 比で炭水化物:タンパク質=10:0 と 8:2 とし、それぞれに無機栄養塩類を加えたものの2パターン用いた。基質組成を表.1 に示す。また槽内 HRT12hour、pH 値 5.0、容積負荷 $26.2\text{kg-CODcr/m}^3 \cdot \text{Day}$ とした。種汚泥には M 乳業の汚泥を種汚泥とし本研究室で長期間馴致したものをを用いた。

細菌の洗浄にはリン酸緩衝液 (0.02M、pH 値 8.0) をを用いた。細菌の破砕には超音波破砕 (ホモジナイザー・UH-50、SMT 製、15KHz、20 分間) と減圧破砕 (フレンチ・プレス、大丘製作所、 1200kg/cm^2) の2パターンで行った。菌体を破砕した溶液に超遠心分離をかけ (HITACHI, himac CS 120FX、140000g、30 分間)、上澄みを 4°C で一晚静置したものを粗酵素液とした。酵素の抽出には FPLC (アマシャム・ファルマシア社製) をを用い、サン

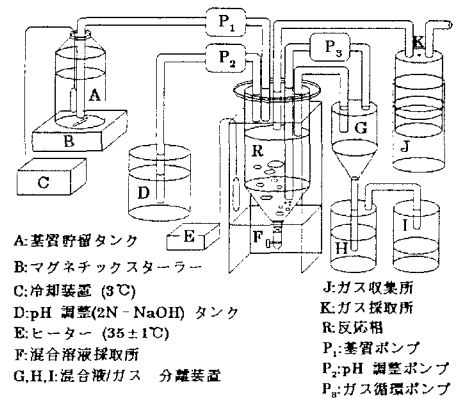


図.1 実験装置概略図

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

プル量は 1ml とした。陽イオン交換カラムとして resourceQ(アマシャム・ファルマシア社製、内容量1.0ml)、陰イオン交換カラムとして resourceS(アマシャム・ファルマシア社製、内容量 1.0ml)の 2 種類で行った。カラムのバッファーには開始液として 20mM・Tris-HCl(pH 値 8.0)と、溶出液として 20mM・Tris-HCl(pH 値 8.0、1N-NaCl)を用いた。また酵素抽出時のバッファーの流速は常時 4ml/min とした。

4.実験結果及び考察

酵素の抽出には陽イオン交換カラムを使用したときに可能であった。複合基質割合 10:0 で順養した細菌の酵素抽出結果を図.2、図.3 に、複合基質割合 8:2 で順養した細菌の酵素抽出結果を図.4、図.5 に示す。

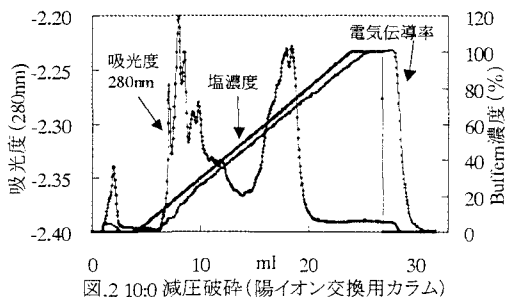


図.2 10:0 減圧破碎(陽イオン交換用カラム)

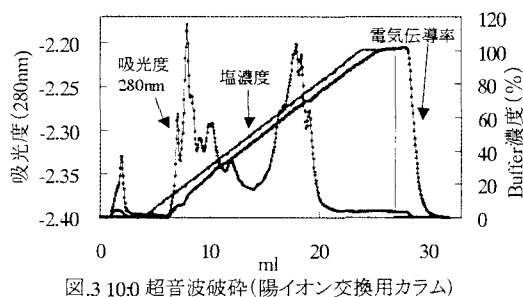


図.3 10:0 超音波破碎(陽イオン交換用カラム)

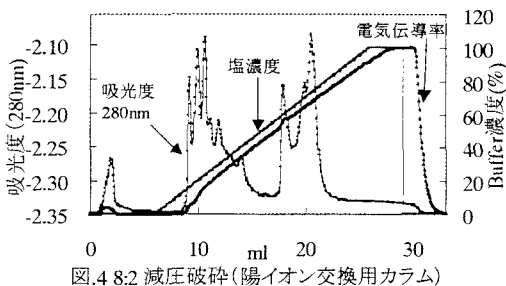


図.4 8:2 減圧破碎(陽イオン交換用カラム)

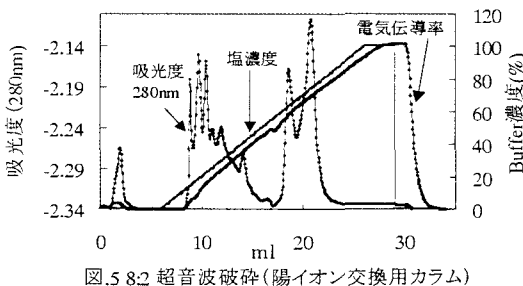


図.5 8:2 超音波破碎(陽イオン交換用カラム)

菌体の破碎に減圧破碎と超音波破碎を用いた場合とでのクロマトはほぼ同じ波形をしており、破碎の方法による大きな差異は確認できなかった。超音波破碎を用いる場合、破碎の過程で細胞や水分子が振動して発熱するので細菌の破碎には、発熱を伴わない減圧破碎のほうが有効であると考えられる。

得られたピークの内に目的とする酵素のピークが含まれていると考えられる。目的とする酵素のピークがどれであるかは今後の実験で明らかにする必要がある。

5.まとめ

- 1) 今回の条件での酵素抽出には陽イオン交換用のカラムを使用することにより可能であった。このことから今回の条件では溶液中のタンパク質はマイナスに帯電することが分かった。
- 2) 細菌の破碎には超音波破碎と減圧破碎の両方を用いたが、破碎法の違いによるクロマトの相違は認められなかった。このことから細菌の破碎には処理の際に発熱しない減圧破碎が有効である。

6.参考文献

- 1) 泉美治等:タンパク質の分離・分析法、科学同人、1985 年
- 2) 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、修士学位論文、平成 10 年
- 3) 佐藤 靖敏:嫌気性水素発酵における基質組成と滞留時間の影響に関する基礎的研究、修士学位論文、平成 11 年