

VII-40

Clostridium acetobutylicum による水素発酵における乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* 共存による阻害

東北大学工学部土木工学科 学生会員 ○廣瀬 雄一
東北大学大学院工学研究科 河野 有吾
東北大学大学院工学研究科 正会員 高畠 寛生
東北大学大学院工学研究科 フェロー 野池 達也

1. はじめに

地球環境問題への取り組みに欠かすことの出来ない循環型社会の形成を目指す上で、バイオマスエネルギーの回収への関心が高まっている。微生物による水素やメタンの回収は、既存の廃棄物処理による環境負荷を低減させることから循環型社会の一翼を担うことが期待される。特に水素生成細菌による水素発酵は、メタン発酵と比較して回収時間が短く、実用化が期待されている技術である。

しかし、連続的に基質を投与し水素生成を行うと水素生成が停止するなどの問題点が多い。そのひとつとして乳酸菌による阻害¹⁾が挙げられる。水素生成細菌と乳酸菌は、同じ炭水化物を基質として用いることから基質競合の関係にある。また、生ごみの場合、有機性廃棄物には乳酸菌が自生しやすく、水素生成に影響を与える可能性がある。そこで本研究では、乳酸菌は無機態窒素をあまり利用しないという知見²⁾をもとに、乳酸菌共存下での有機態と無機態窒素源の差異による水素生成細菌の水素生成に及ぼす影響について比較検討した。

2. 実験方法

本研究に用いた水素生成細菌 *Clostridium acetobutylicum* 及び乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* は、pH5.5に調整したグルコース培地（表1）及びpH4.5に調整したMRS改変培地（表2）でそれぞれ十分に増殖させ、4℃以下で冷蔵保存したものを用いた。

表1 グルコース培地

グルコース	5.0g
K ₂ HPO ₄	0.25g
MgCl ₂ ・6H ₂ O	0.125g
FeSO ₄ ・7H ₂ O	5.0mg
CoCl ₂ ・6H ₂ O	2.5mg
MnCl ₂ ・4H ₂ O	2.5mg
KI	2.5mg
Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.5mg
H ₃ BO ₃	0.5mg
NiCl ₂ ・6H ₂ O	0.5mg

表2 MRS改変培地

ペプトン	10.0g
酵母エキス	5.0g
K ₂ HPO ₄	2.0g
クエン酸二アンモニウム	2.0g
グルコース	20.0g
酢酸ナトリウム	5.0g
Mg ₂ SO ₄	0.28g
MnSO ₄ ・4H ₂ O	0.28g

図1に本研究で用いた培養装置の概略を示す。容量500mlの反応槽を用い、高温加圧滅菌したグルコース培地（250ml）を基質として回分実験を行った。また、反応槽の気相部は、窒素ガスで置換した。pHは、pHコントローラーを用い、2N NaOHを適宜投与することによって4.5あるいは5.5に調整した。

本研究で行った実験系列及び実験条件を表3に示す。水素生成細菌 *C. acetobutylicum* の純粋培養系と、これに乳酸菌 *L. paracasei* を添加した混合培養系について、それぞれpH4.5と5.5に制御した。さらに、それぞれについて、窒素源として塩化アンモニウム、ペプトン、酵母エキス投与の有無に関して、8系列の回分実験（計32系列）を行った。

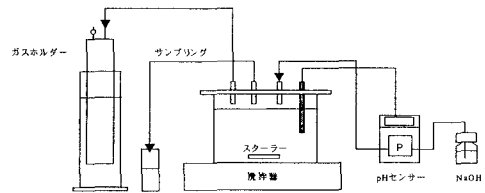


図1 実験装置概略図

表3 回分実験系列

pH	4.5, 5.5															
<i>C. acetobutylicum</i> 培養液 (ml)	10ml(菌体量:5.5mg)								10ml(菌体量:5.5mg)							
<i>L. paracasei</i> 培養液 (ml)	0ml								5ml(菌体量:7.5mg)							
塩化アンモニウム (g/l)	0	2.6	0	0	0	2.6	2.6	2.6	0	2.6	0	0	0	2.6	2.6	2.6
ペプトン (g/l)	0	0	1.0	0	1.0	1.0	0	1.0	0	0	1.0	0	1.0	1.0	0	1.0
酵母エキス (g/l)	0	0	0	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0	0	0	0.5	0.5	0	0.5	0.5

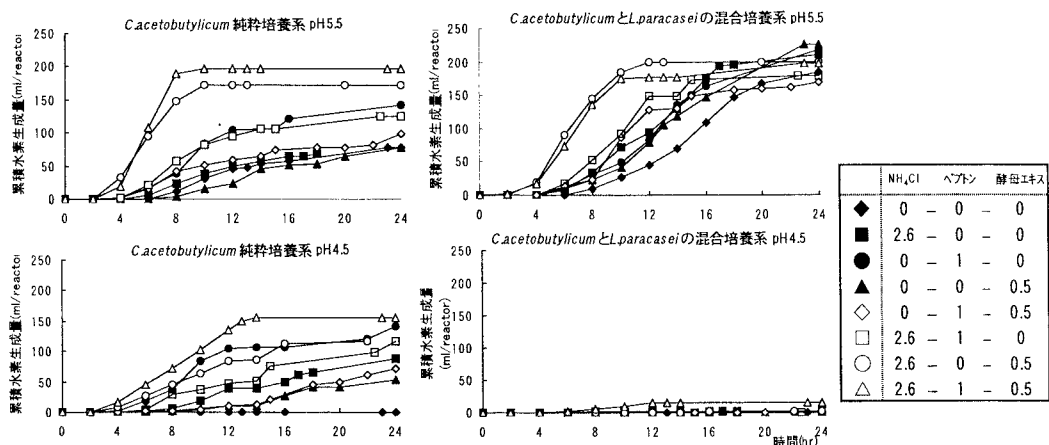


図2 各回分実験における累積水素生成量の経時変化

3. 実験結果と考察

各回分実験における累積水素生成量の経時変化を図2に示す。図2で示した全ての実験系において、窒素源を投与していない系列(0-0-0)の水素生成量が、その系における最小水素生成量となり、3種類全ての窒素源を投与した系列(2.6-1-0.5)が、ほぼ全ての系における最大水素生成量となった。また、pH4.5では、乳酸菌を添加した混合培養系の方が、明らかに水素生成が低かったのに対し、pH5.5では、純粋培養系と混合培養系の水素生成量の差はあまり観察されなかった。例えば、全ての窒素源を投与した系列(2.6-1-0.5)において、pH5.5、24時間後の水素生成量が、純粋培養系 197ml/reactor、混合培養系 197.5ml/reactorであるのに対して、pH4.5では純粋培養系 156ml/reactor、混合培養系 15ml/reactorであった。また、純粋培養系におけるpH4.5とpH5.5の水素生成量の差と比較して、混合培養系におけるpH4.5とpH5.5の差が、明らかに大きいことが観察された。これらより、pH4.5においては、水素生成細菌が乳酸菌の影響を大きく受けるが、pH5.5では、いずれの窒素源に対しても乳酸菌による水素生成細菌への影響は小さいことが示唆された。

さらに、pH5.5においては、大部分の系列において、混合培養系の水素生成量が、純粋培養系を上回っていた。特にpH5.5における、窒素源を投与していない系列(0-0-0)の最終水素生成量は、純粋培養系が77.4ml/reactorであるのに対して混合培養系は225.9ml/reactorであった。これは、窒素源が完全に制限されていなかったためだと推測される。つまり、細菌

を接種した際に、培養液中に窒素源が含まれており、その窒素源が影響したためであると推測できる。特に、乳酸菌の培養液であるMRS改変培地には、ペプトン0.2g/l、酵母エキス0.1g/lが含まれており、それらが水素生成を促進したものと考えられる。

また、純粋培養系のpH4.5、5.5それぞれにおいてペプトン以外の2種類の窒素源を固定して、ペプトンを添加したものとししないものを比較すると、水素生成が増加していた。即ち、ペプトンの添加が水素生成の増加に有効であると判断できる。

4. 結論

本研究において、以下の結論が得られた。

- 1) pH5.5では、乳酸菌による水素生成細菌への阻害は、窒素源の種類に依存しなかった。
- 2) pH4.5では、水素生成細菌が乳酸菌による影響を敏感に受けた。
- 3) 水素生成細菌の純粋培養においては、ペプトンの添加により水素生成量が増加した。

参考文献

- 1) 高畠寛生, 河野有吾, 丹野幸, 野池達也(2002) 乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* の嫌気的水素発酵阻害におけるpH依存性及び代謝産物の影響, 環境工学研究論文集, Vol.39, 55-65
- 2) M. Hujanen, Y.-Y. Linko (1996) Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 45, 307-313