

(6) 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

Influence of pH and Metabolites on Inhibition of Anaerobic Hydrogen Fermentation by Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus paracasei*

高畠寛生*、河野有吾**、丹野幸***、野池達也*

Hiroo TAKABATAKE*, Yugo KOHNO**, Yuki TANNO***, Tatsuya NOIKE*

ABSTRACT; The development of hydrogen fermentation from organic waste has drawn much attention because it contributes the formation of the recycling society. It was often observed, however, that hydrogen fermentation from organic waste was suddenly terminated, and one of the possible reasons is the inhibitory effect of lactic acid bacteria. Therefore, this paper focused on the effect of lactic acid bacteria, which is *Lactobacillus paracasei* isolated from the waste in the bean curd manufacturing, on hydrogen fermentation with respect to the influence of pH. The coculture of *Lb. paracasei* inhibited the hydrogen fermentation by *Cl. acetobutylicum*. This inhibition was more significant under pH 4.5 than pH 6.5. It was found that the supernatant of the culture medium of *Lb. paracasei* also inhibited the hydrogen fermentation and that this inhibition was visible under less than pH 5 and disappeared under more than pH 6.2. And the results of the agar well diffusion test where chymotrypsin and trypsin were applied as proteases clarified that *Lb. paracasei* excreted a bacteriocin and that it stopped the growth of hydrogen producing bacteria. The molecular weight of the bacteriocin in the supernatant of the culture medium of *Lb. paracasei* seemed to be between 1,350 and 17,000.

KEY WORDS; Lactic Acid Bacteria; *Lactobacillus paracasei*; Hydrogen Fermentation; Bacteriocin; pH

1 研究背景

循環型社会システム形成の必要性が認識されている今日、廃棄物からの有価物回収プロセスの開発が求められている。本研究で注目している有機性廃棄物からの水素発酵プロセスはその一つである。水素は、次世代エネルギーとして注目されている物質であり、その燃焼エネルギーは、143kJ/g で、メタン、エタノール、石油、プロパンがそれぞれ 55.7、29.7、41.8、50.3kJ/g であるのと比較しても十分に高い。現在、水素ガスを利用した燃料電池や水素エンジンの開発・研究が急速に行われているが、水素ガスを供給する側の技術開発が遅れている。現在、水素は主にナフサや天然ガスなどの化石燃料から生産されている¹⁾。しかし、化石燃料からの水素の製造は、温暖化ガスの発生や化石燃料の枯渇の危険性から、あまり望ましくないと考えられる。一方、ある種の嫌気性細菌、光合成細菌、藻類などはその代謝の過程から水素を発生させることが知られている^{2)~4)}。そこで、本研究では、有機性廃棄物を原料とし水素発酵微生物を利用して水素を生産す

* 東北大学大学院工学研究科 (Graduate School of Engineering, Tohoku University)

** 東北大学大学院工学研究科修士課程 (Master Course Student at Graduate School of Engineering, Tohoku University)

*** (株) 環境建設エンジニアリング (Environment Construction Engineering Corporation)

るプロセスの開発を主目的としている。

有機性廃棄物からの水素発酵は比較的不安定であり、水素生成が突然停止する現象がしばしば観察される。有機性廃棄物からの水素発酵の実現化のためには、水素発酵の不安定原因や停止理由の解明及びその安定化が必要不可欠である。Noike et al.⁵⁾ は、その際に過剰の乳酸が検出されること、乳酸菌共存下で水素生成が阻害されること、その抑制方法として熱処理が有効であることを示した。しかし、その影響メカニズムや程度については不明な点が多い。そこで、本研究ではオカラから単離した乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* を用いて、その水素発酵阻害における pH 依存性と代謝物質の影響について検討した。

2 実験方法

2.1 菌株

本研究で用いた乳酸菌は、オカラから単離したものであり、16S-rRNA の塩基配列、形態及び生理性状学的性質により *Lactobacillus paracasei* であると同定した。水素生成細菌である *Clostridium acetobutylicum* IAM19012、*Enterobacter aerogenes* IAM12348T、*Enterobacter cloacae* IAM12349T 及び *Enterobacter sakazakii* IAM12660T は、東京大学分子細胞生物学研究所 IAM カルチャーコレクションから譲渡されたものである。

Table1 培地組成 (数値は 1 リットル中の値)

組成	グルコース培地	MRS 改変培地	PYG 培地
グルコース	5g	20g	10g
酵母エキス	0.5g	5g	10g
ペプトン	—	10g	10g
酢酸ナトリウム	—	5g	—
クエン酸二アンモニウム	—	2g	—
NH ₄ Cl	2.6g	—	—
K ₂ HPO ₄	0.25g	2g	4mg
KH ₂ PO ₄	—	—	4mg
MgCl ₂ · 6H ₂ O	125mg	—	—
MgSO ₄	—	280mg	8mg
CaCl ₂	—	—	8mg
NaHCO ₃	—	—	400mg
NaCl	—	—	80mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5mg	—	—
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.5mg	—	—
MnCl ₂ · 4H ₂ O	2.5mg	—	—
MnSO ₄ · 4H ₂ O	—	280mg	—
KI	2.5mg	—	—
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.5mg	—	—
H ₃ BO ₄	0.5mg	—	—
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.5mg	—	—
ZnCl ₂	0.5mg	—	—
システイン-HCl	—	—	500mg

2.2 *Lb. paracasei* 共存下での水素発酵バッチ実験

様々な pH 環境下での *Lb. paracasei* 共存が *Cl. acetobutylicum* による水素発酵に対する影響を検討するために、水素発酵バッチ実験を行った。水素発酵バッチ実験には、pH を 4.5、5.5 或いは 6.5 に制御し、それぞれについて *Lb. paracasei* の接種の有無、計 6 系列のバッチ実験を行った。容量 750ml の反応槽を用い、加圧

滅菌したグルコース培地 (Table1) 500ml を基質として水素発酵バッチ実験を行った。反応槽の気相を窒素ガスで置換し、*Cl. acetobutylicum* を水素生成細菌として接種した。接種した菌体量は 10ml (5.77mg) であり、グルコース培地 (pH5.5) で培養したものを冷蔵庫で保存しておいたものである。また、*Lb. paracasei* には MRS 改変培地 (Table1) で 24 時間程度培養したものを 5ml (12.5mg) 採取し接種した。なお、pH の制御には pH コントローラーを用い、2N の NaOH を適宜投与した。

2.3 *Lb. paracasei* 培養上清共存下での水素発酵実験

Lb. paracasei による水素生成阻害が、*Lb. paracasei* と水素生成細菌との競合によるものなのか、*Lb. paracasei* が分泌する阻害物質によるものなのかを検討するために、容量 31ml の試験管を用い、*Lb. paracasei* 培養上清共存下での水素発酵実験を行った。実験は Run1~6 の 6 系列行った (Table2)。水素生成細菌には、水素発酵バッチ実験と同様の *Cl. acetobutylicum* を用いた。*Lb. paracasei* には、MRS 改変培地で十分に培養させたものを用い、培養上清には、その培養液を 5000rpm で 20 分間遠心分離した後、0.22 μ m の滅菌済フィルターで濾過したものを用いた。なお、*Lb. paracasei* 培養上清中にはグルコースが検出されず、大量の乳酸 (約 19000mg/l) が検出された。

実験手順は以下の通りである。容量 31ml の試験管に一定量の PYG 培地を加え、気相を窒素で置換した後、121℃で 20 分間加圧滅菌する。その後、*Cl. acetobutylicum* 培養液、そして *Lb. paracasei* 培養液、或いは *Lb. paracasei* 培養上清を加え、気相中の圧力を大気圧にした後、35℃の振とう培養器で培養した。

Table2 乳酸菌 *Lb. paracasei* 培養上清共存下での水素発酵実験条件

Run	1	2	3	4	5	6
PYG 培地(ml)	9	8	5	0	0	9
<i>Cl. acetobutylicum</i> 培養液(ml)	1	1	1	1	1	1
<i>Lb. paracasei</i> 培養液(ml)	0	0	0	0	0	1
<i>Lb. paracasei</i> 上清(ml)	0	1	4	9	9	0
初期 pH	5.55	5.47	5.38	4.99	6.23	4.57

2.4 寒天拡散法による *Lb. paracasei* 上清中のバクテリオシンの検証

Lb. paracasei 培養上清中の水素発酵阻害物質が、バクテリオシンであるのか否かを寒天拡散法により検証した。寒天拡散法はバクテリオシンの検証法として一般的に用いられる手法である⁶⁾。まず、滅菌プレート上に寒天培地を準備し、その上に指標菌を均等に固定する。その培地に径 5~6mm の孔を形成し、試料を 40 μ l 注入する。その後、密閉し、30℃で培養する。そして培養後、試料孔の周囲における増殖阻止円形成の有無を確認する。

本研究で用いた指標菌は、*E. aerogenes*、*E. cloacae* 及び *E. sakazakii* である。また、試料には *Lb. paracasei* を MRS 改変培地上で十分に培養した培地上清 (2.3 に用いたものと同様) に対し、様々な形で処理したものである (詳細は 3.3 節の Table3 に示す)。試料 1~8 には、バクテリオシンを不活化させるプロテアーゼとして利用されているトリプシンまたはキモトリプシン^{7)~9)} で培地上清を一晩作用させたものを用いた。その作用 pH 及び注入時の pH を Table3 のように、NaOH 或いは HCl を用いて変化させた。試料 9~17 には、

プロテアーゼを投入せずに、培地上清のみを表のように pH 調整した。また、コントロールとして試料 18 には蒸留水を用いた。

2.5 分析方法

pH の測定にはガラス電極 pH 計を用いた。生成ガス中の水素及び二酸化炭素の割合は、TCD 検出器つきガスクロマトグラフ（水素：Shimadzu GC-8A、2.0m ステンレスカラム、UnibedC 充填、試料注入部温度 100℃、カラム温度 70℃、検出器温度 100℃、窒素キャリアガス（50ml/min）、二酸化炭素：Shimadzu GC-8A、2.0m ステンレスカラム、PorapakT 充填、試料注入部温度 140℃、カラム温度 70℃、検出器温度 100℃、ヘリウムキャリアガス（30ml/min））により測定した。グルコース濃度の定量には、グルコース測定キット（グルコーステスト B ワコー、和光純薬）を用いた。乳酸及び揮発性脂肪酸（蟻酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸）の定量には、キャピラリー電機泳動装置（Photal, CAPI-3200、キャピラリーカラム（ID75 μ m $\times$ 805mm）、20℃、220nm インダイレクト UV 検出器）を用いて測定した。MLSS の測定は、Standard Method に従った¹⁰⁾。OD（600nm）は、HACH 吸光分光光度計（DR/4000U Spectrophotometer）により 600nm の吸光度を測定した。また、*Cl. acetobutylicum* と *Lb. paracasei* の混合培養において、それぞれの菌体量の割合を、位相差顕微鏡下におけるダイレクトカウント（形態により識別）により行った。この割合に対し、全体の OD600 値を乗ずることでそれぞれの菌体量を評価した。*Lb. paracasei* 培養上清中に存在する高分子の分子量をゲルクロマトグラフ（BIO-RAD、BioLogic LP、TOYOPEARL HW-55F カラム 1.5cm $\times$ 46cm、バッファー（Tris buffered saline, pH5.5）、流量 0.5ml/min、カラム温度 30℃）により測定した。

3 実験結果及び考察

3.1 乳酸菌 *Lb. paracasei* 共存下での水素発酵における pH の影響

pH4.5、5.5 及び 6.5 における水素発酵バッチ実験の結果をそれぞれ Fig.1、2 および 3 に示す。

まず、pH4.5 における水素発酵バッチ実験の結果 (Fig.1) に注目する。*Lb. paracasei* 非共存下では 170ml/reactor の水素ガス発生が観察されたのに対し、*Lb. paracasei* 共存下ではガス発生が全く観察されなかった。グルコースからの水素収率は、*Lb. paracasei* 非共存下および共存下で、それぞれ 0.88、0.0mol/mol であった。両系列共に、実験開始 7~8 時間後あたりからグルコースの減少、乳酸の発生及び OD の増加が観察された。*Lb. paracasei* 共存下では、*Lb. paracasei* の菌体量が増加したのに対し、*Cl. acetobutylicum* の菌体量の顕著な増加が観察されなかった。

pH5.5 (Fig.2) では、*Lb. paracasei* 非共存下と同様に共存下でも水素ガスの発生が観察された。しかし、水素ガスの生成量は、*Lb. paracasei* 非共存下では約 400ml/reactor であったのに対し、*Lb. paracasei* 共存下では約 250ml/reactor だった。グルコースからの水素収率は、*Lb. paracasei* 非共存下および共存下で、それぞれ 1.72、0.94mol/mol であった。また、両系列共に、水素ガス発生に伴うグルコース濃度の減少、乳酸の発生及び OD の増加が観察された。この際、*Cl. acetobutylicum* の顕著な増殖が観察されたのに対し、*Lb. paracasei* の顕著な増殖は観察されなかった。

pH6.5 (Fig.3) でも、ほぼ同様な傾向が観察された。*Lb. paracasei* 非共存下及び共存下での水素ガス発生量は、それぞれ約 260ml/reactor 及び 210ml/reactor だった。グルコースからの水素収率は、*Lb. paracasei* 非共存下および共存下で、それぞれ 0.97、0.70mol/mol であった。また、乳酸の発生量は pH4.5 及び 5.5 の場合より著しく少なかった。なお、全てのバッチ実験において発生したガスは水素と二酸化炭素のみであった。

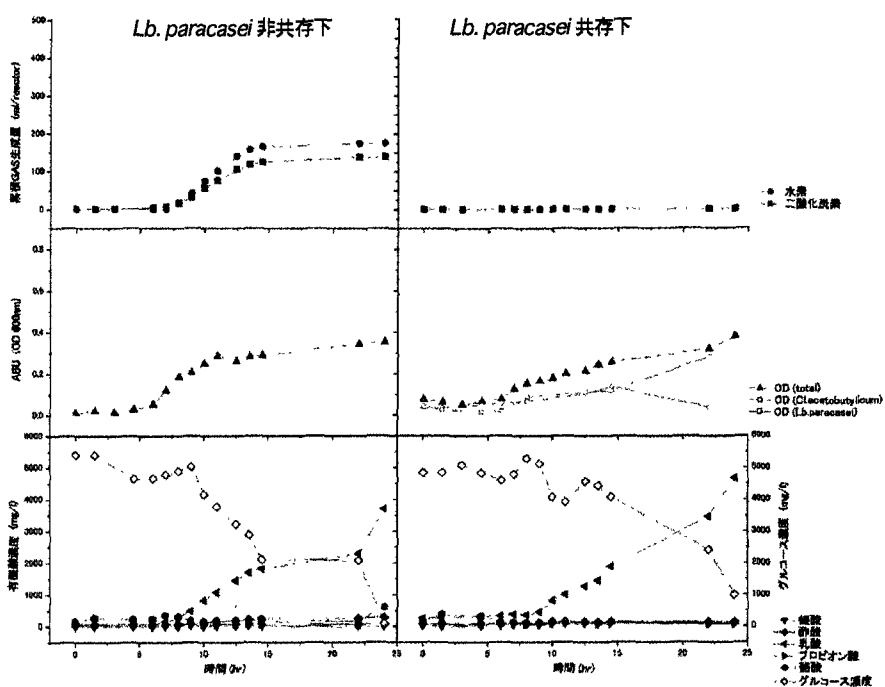


Fig.1 pH4.5 における水素発酵バッチ実験の結果

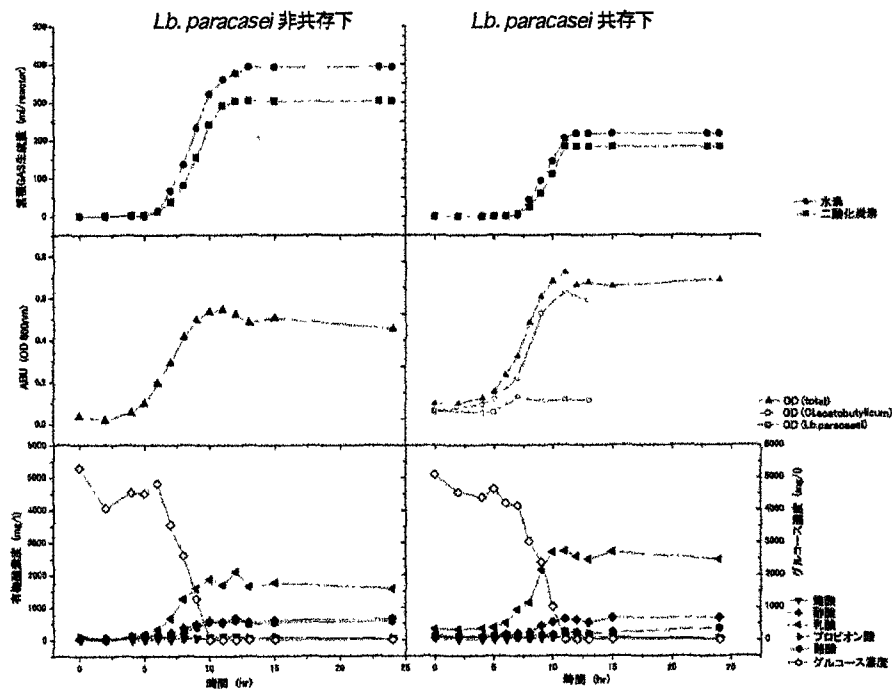


Fig.2 pH5.5 における水素発酵バッチ実験の結果

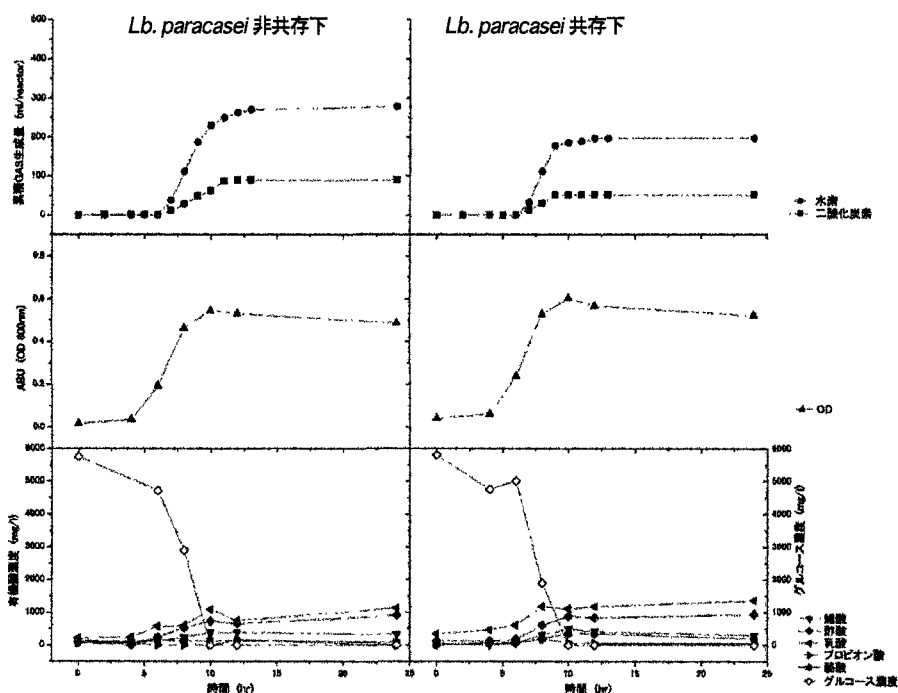


Fig.3 pH6.5 における水素発酵バッチ実験の結果

各 pH における全水素生成量、乳酸生成量、全ガス生成量に対する水素ガス生成量の割合、及び *Lb. paracasei* 非共存下での水素ガス生成量に対する *Lb. paracasei* 共存下での水素ガス生成量の割合を Fig.4 に示す。*Lb. paracasei* 非共存下では、pH5.5 の際に水素発生量が最大となった。水野ら¹¹⁾は、大豆サイロ汚泥によるグルコース及び製麺工場排水からの水素発酵において、5.2～5.5 の pH で水素収率が最大となることを報告しており、本実験の結果とほぼ一致した。*Lb. paracasei* 共存下による水素ガス生成量は、非共存下と比較して全ての pH において減少した。特に、pH4.5 では *Lb. paracasei* 共存下では水素ガスが全く生成しなかった。この結果は、*Lb. paracasei* が共存することで、水素ガス生成が阻害されることを示している。*Lb. paracasei* 非共存下での水素ガス生成量に対する *Lb. paracasei* 共存下での水素ガス生成量の割合は、pH4.5、5.5 及び 6.5 においてそれぞれ 0%、55%及び 80%であり、pH が高くなるに伴い大きくなった。これは、*Lb. paracasei* による水素生成阻害は、低 pH ほど大きくなることを意味している。また、乳酸の生成量は、*Lb. paracasei* 共存下では非共存下に比べて大きく、pH が高くなるに伴い減少した。一般的に、乳酸はグルコースなどの糖類がピルビン酸にまで解糖され、そしてピルビン酸が還元されることで生成される^{12), 13)}。このような乳酸生成代謝経路は *Lb. paracasei* だけでなく、*Cl. acetobutylicum* も有する¹⁴⁾。pH が高くなるに伴い乳酸生成量が減少するのは、このような代謝経路の活性が低下したためであると考えられる。すなわち、pH が上昇するに伴い、乳酸発酵代謝の活性が低下するため、乳酸菌である *Lb. paracasei* の活性が低下し、水素発酵阻害が緩和されると考えられる。また、発生ガス中の水素ガスの割合は、pH が高くなるに伴い上昇し、pH5.5 及び 6.5 では、*Lb. paracasei* 接種の有無による差異は確認されなかった。

以上の結果より、*Cl. acetobutylicum* による水素発酵における最適 pH は 5.5 であり、*Lb. paracasei* による水素発酵阻害は pH4.5 のときに最大で完全に水素発酵が阻害され、pH の上昇に伴い、その水素発酵阻害が緩和されることが明らかとなった。

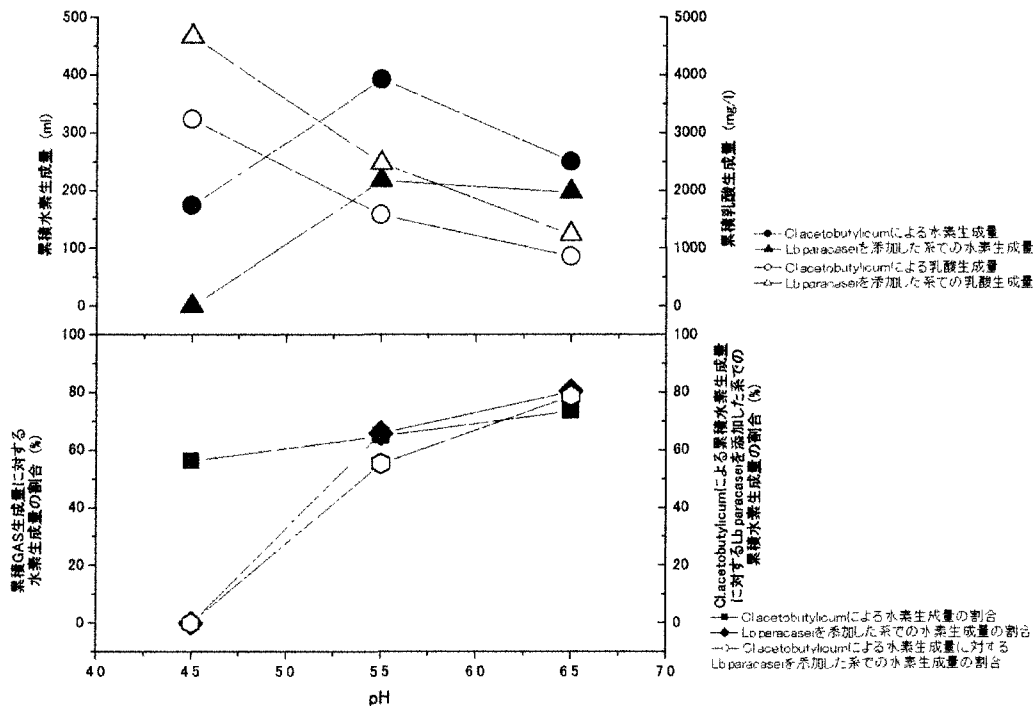


Fig.4 各 pH における累積水素生成量、乳酸生成量、全ガス生成量に対する水素ガス生成量の割合、及び *Lb. paracasei* 非共存下での水素ガス生成量に対する *Lb. paracasei* 共存下での水素ガス生成量の割合

3.2 乳酸菌 *Lb. paracasei* 培養上清による水素発酵阻害

前節では、乳酸菌 *Lb. paracasei* の共存によって水素生成が阻害されることが明らかとなった。乳酸菌による水素発酵の阻害機構として、本実験の環境下では主に基質の競合と阻害物質の分泌が考えられる¹⁵⁾。前節における pH4.5 での水素発酵実験では、*Lb. paracasei* 共存下では水素発酵が完全に停止し、*Cl. acetobutylicum* 菌体量の顕著な増加が観察されなかった。このことは単なる基質競合だけでは説明のできない現象である。もし、*Lb. paracasei* が何らかの水素発酵阻害物質を分泌しているのならば、培養上清の共存によって水素発酵が阻害されると考えられる。そこで、*Lb. paracasei* の培養上清による水素発酵に関して検討した。

各 Run における累積水素ガス発生量の経時変化を Fig.5 に、グルコース及び乳酸の変化、pH、収率を Table3 に示す。*Lb. paracasei* を接種した Run6 では、前節と同様に水素生成が全く観察されず、乳酸が大量に発生した。これに対し、*Lb. paracasei* もその上清も投与していない Run1 では、培養懸濁液 1 リットルあたり 57.4mmol の水素が発生した。このとき、グルコース 1mol あたりの水素収率は 1.87mol/mol であった。また、*Lb. paracasei* の培養上清を 1ml 投与した Run2 では、18.2mmol/l の水素が発生し、0.40mol/mol の水素収率が得られた。Run1 及び Run2 の結果は、*Lb. paracasei* の培養上清が共存することによって、水素発生量及び水素収率が低下したことを示している。上清を 4ml 投与した Run3 及び上清が 9ml である Run4 では、水素発生が全く観察されなかった。これらの結果より、*Lb. paracasei* の上清には *Cl. acetobutylicum* による水素発酵を阻害する物質が含まれると考えられる。

Run1~4 及び Run6 は pH4.5~5.5 の範囲で行われたが、Run5 は、pH を 6.2 以上とした。このとき、乳酸

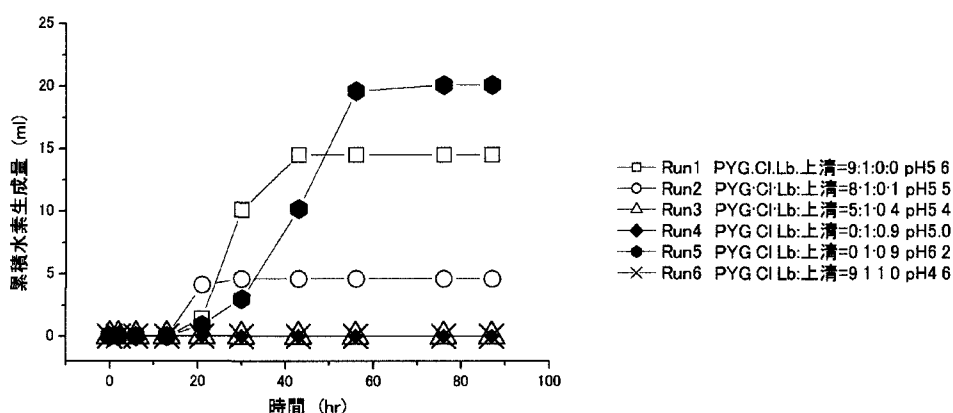


Fig.5 *Lb. paracasei* 培養上清による水素発酵阻害実験における累積水素ガス生成量の経時変化

上清のみからでも乳酸を基質として 79.6mmol/l (乳酸 1mol から 0.47mol/mol) の水素が発生した。このことは、*Cl. acetobutylicum* は乳酸を基質として水素を生産できること、及び、*Lb. paracasei* 培養上清の水素生成阻害は、pH6.2 以上では抑制されることを示唆している。

3.3 寒天拡散法による *Lb. paracasei* 培養上清中のバクテリオシンの検証

前節では、乳酸菌 *Lb. paracasei* 培養上清に水素発酵の阻害作用があることが認められた。乳酸菌が有する抗菌作用として一般的に知られているのが、バクテリオシンの分泌である。バクテリオシンは、ペプチド抗生物質の一部であり、近縁の細菌に対して抗菌作用を示すタンパク物質と定義されている¹⁶⁾。本節では、*Lb. paracasei* 培養上清中のバクテリオシンの存在、及びその pH 依存性について検討した結果を示す。

Table 3 *Lb. paracasei* 培養上清による水素発酵阻害実験におけるグルコース及び乳酸の変化、pH、収率

項 目	単位	Run					
		1	2	3	4	5	6
初期グルコース濃度	mmol/l	52.0	45.5	29.6	0.0	0.0	46.9
グルコース消費量	mmol/l	30.7	45.5	29.6	0.0	0.0	46.9
初期乳酸濃度	mmol/l	5.9	22.8	76.7	195.4	187.9	35.1
乳酸発生量	mmol/l	27.4	73.5	64.3	9.0	-170.0 ^a	105.5
水素生成量	mmol/l	57.4	18.2	0.0	0.0	79.6	0.0
初期 pH	-	5.55	5.47	5.38	4.99	6.23	4.57
pH 増加分	-	-0.95	-1.48	-0.91	0.29	1.28	-0.78
収率	mol/mol	1.87 ^b	0.40 ^b	0.00	0.00	0.47 ^c	0.00

^a "-" は、乳酸が消費されたことを意味している。

^b グルコース消費 1mol あたりの水素生成量

^c 乳酸消費 1mol あたりの水素生成量

Table4 寒天拡散法による増殖阻止円形成の有無

(+: 増殖阻止円の形成有り, -: 増殖阻止円の形成なし)

試料	プロテアーゼ	pH		宿主細菌		
		反応時 pH	培養時 pH	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. salazakii</i>
1	キモトリプシン	3.75	3.75	++	++	++
2		3.75	6.89	--	--	--
3		7.06	4.52	--	--	+-
4		7.06	7.06	--	--	--
5	トリプシン	3.75	3.75	++	++	++
6		3.75	7.26	--	--	--
7		6.96	4.44	+-	--	--
8		6.96	6.96	+-	--	--
9	なし	3.75	3.75	+++++	++	+++++
10		4.55	4.55	+--	none	+-
11		4.95	4.95	+-----	--	+-----
12		5.52	5.52	---	none	---
13		5.91	5.91	-----	--	+-----
14		6.45	6.45	---	none	---
15		6.96	6.96	-----	--	-----
16		3.75	7.04	--	--	--
17		6.96	4.50	++	+-	++
18	蒸留水			--	--	--

様々な pH における *Lb. paracasei* 上清中のバクテリオシンの活性に関して、寒天拡散法により検討した。ここでは、バクテリオシンを不活性化させるプロテアーゼとしてキモトリプシン及びトリプシンを用いた。一般にバクテリオシンは pH4~5 で高い活性を有すのに対し、キモトリプシン及びトリプシンは中性域で高い活性を有することが知られている^{8),9)}。そこで、プロテアーゼ反応時の pH と寒天培地による宿主細菌培養時の pH をおよそ 4 或いは 7 に調整し検討した。培養後の増殖阻止円の有無を Table4 に示す。

試料 9~17 は *Lb. paracasei* 培養上清に対し、プロテアーゼを作用させず、pH を調整したものである。pH3.75 (試料 9) では全てのケースで増殖阻止円が形成され、pH4.55 (試料 10) や pH4.95 (試料 11) では増殖阻止円が観察されることがあった。pH5.52 以上 (試料 12~15) では、増殖阻止円が形成されることはほとんどなかった。また、pH を一度 6.96 にまで上昇させても、4.50 にまで低下させることで増殖阻止円は形成された (試料 17)。また、キモトリプシンやトリプシンを反応させた試料 1~8 では、pH を 3.75 とした試料 1 及び 5 のときに主に増殖阻止円が形成された。ここで、反応時 pH が 7 付近で培養時 pH が 4 付近である試料 3、7 及び 17 に注目すると、プロテアーゼを投与した試料 3 及び 7 では、増殖阻止円が形成されなかったのに対し、プロテアーゼを投与しなかった試料 17 では、増殖阻止円が形成された。この結果は、プロテアーゼの作用によって上清の宿主細菌増殖阻止能が失われたことを意味する。すなわち、*Lb. paracasei* 上清中にはバクテリオシンが分泌されていることを示している。しかし、このバクテリオシンによる増殖阻害は、pH5 前後では明確ではない。前節の実験では、pH5 前後でも水素生成が完全に阻害された。すなわち、*Lb. paracasei* 上清による水素発酵阻害にはバクテリオシンの作用以外のもの、つまり水素生成細菌の増殖を阻害しないが水素発酵を阻害する作用が存在すると考えられる。その解明は、今後の課題である。

3.4 *Lb. paracasei* 培養液上清中の高分子分子量の測定

Lb. paracasei 培養上清をゲルクロマトグラフにより分画した。カラムより排出される溶液を 50 ドロップ (約 3ml) ごとに分取し、その溶液中の全有機炭素 (Shimadzu TOC-5000A) を測定することにより、培養上清中

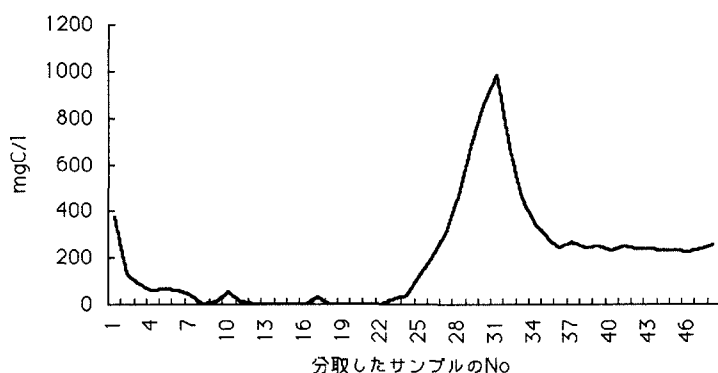


Fig.6 *Lb. paracasei* 培養上清中の分子量スペクトル

の分子量スペクトルを得た。*Lb. paracasei* 培養上清中の分子量スペクトルを Fig.6 に示す。培養上清中に一つの大きなピークが検出された。標準物質により得られた分子量スペクトルと比較すると、このピークは分子量 1,350 (Vitamin B-12) と 17,000 (Myoglobin) の間にあることがわかった。すなわち、*Lb. paracasei* によって分泌されたバクテリオシンの分子量は 1,350 と 17,000 の間であると推測される。

乳酸菌が分泌するバクテリオシンは、性状と分子量により 4 つに分類される¹⁷⁾。ClassI ランチビオティック (分子量<5,000)、ClassII 耐熱性ポリペプチド (分子量<10,000)、ClassIII 熱感受性タンパク質 (分子量>30,000) ClassIV タンパク質以外 (糖質や脂質) と複合体を形成するバクテリオシンである。これより、*Lb. paracasei* が分泌するバクテリオシンは、ClassI 或いは II に属すと考えられる。現在数多くの報告があり、食品保存等の観点から実用上有益なバクテリオシンの多くは ClassI 或いは II に属している。特に ClassI のランチビオティックは、様々な生産菌が知られている¹⁸⁾。*Lb. paracasei* が分泌するバクテリオシンに関する報告例は非常に少ないが、本研究の結果は、*Lb. lactis* が分泌し、現在汎用的に最も利用・研究されているバクテリオシンである Nisin に性状が似ていることを示している。Nisin は分子量が約 3500 であり、pH4.0 前後で最大の活性を示し、pH7 以上で完全に失活する¹⁵⁾。しかし、Nisin はキモトリプシンの作用で失活するがトリプシンでは失活しないこと¹⁵⁾、本研究で用いた *Enterobacter* 属細菌のようなグラム陰性細菌に対しては抗菌性を有さないこと¹⁵⁾ など異なる点も多い。特に、グラム陰性細菌に作用するバクテリオシンはあまり知られておらず¹⁵⁾、これらの点からも *Lb. paracasei* が分泌するバクテリオシンが食品保存学上、有益なものである可能性があり、今後更なる研究が必要である。

4 結論及び今後の展望

オカラから単離した乳酸菌 *Lb. paracasei* による水素発酵阻害における pH 依存性及び代謝産物の影響について検討した。*Lb. paracasei* 非共存下では pH5.5 のときに水素生成量が最大となった。*Lb. paracasei* 共存下では水素発酵が阻害され、その程度は低 pH ほど顕著であり、pH4.5 では水素生成が全く生じなかった。*Lb. paracasei* 培養上清共存下では、培養上清投与量が大きくなるに伴い、水素発酵が阻害された。また、この培養上清に対し、キモトリプシンやトリプシンを用い、寒天拡散法を試みた結果、培養上清中には *Lb. paracasei* が分泌したバクテリオシンが存在し、特に pH4 前後で水素生成細菌の増殖を阻害することが明らかとなった。さらに、この培養上清中の分子量スペクトルを測定したところ、上清中に存在するバクテリオシンの分子量は、1,350 と 17,000 の間であることが示唆された。

以上より、*Lb. paracasei* による水素生成阻害は、pH を高くすることにより抑制することが可能であること

が明らかとなった。しかし、その際には水素生成細菌自体の水素生成能も低下した。

有機性廃棄物からの水素生成を連続的に安定して行う際には、水素生成細菌を優占させることが重要である。したがって、乳酸菌が混入してきた際には、一時的に pH を高く維持し、乳酸菌の増殖を抑制することのも一つの運転方法として有効であると考えられる。今後、乳酸菌と水素生成細菌の相互関係の解明、及び、安定した連続的水素発酵プロセスの開発が望まれる。

参考文献

- 1) 中井多喜雄 (1996) 新エネルギーの基礎知識、産業図書
- 2) Nandi, R. and Sengupta, S. (1998): Microbial Production of Hydrogen : An Overview, *Critical Review in Microbiology*, **24**(1), 61-84
- 3) Roychowdhury, S., Cox, D. and Levandowsky, M. (1988): Production of Hydrogen by Microbial Fermentation, *International Journal of Hydrogen Energy*, **13**(7), 407-410
- 4) Zajic, J.E., Kosaric, N. and Brosseau J.D. (1978): Microbial Production of Hydrogen, *Advanced Biochemical Engineering*, **9**, 58-109
- 5) Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O. and Ohba, M. (2002): Inhibition of Hydrogen Fermentation of Organic Wastes by Lactic Acid Bacteria, *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11-12), 1367-1371
- 6) 川井泰、伊藤敏敏 (1998) : 乳酸桿菌の作る抗菌性バクテリオシンの特性、*Milk Science*, **47**(3), 165-172
- 7) Lee, H.J., Joo, Y.J., Park, C.S., Kim, S.H., Hwang, I.K., Ahn, J.S. and Mheen, T.I. (1999): Purification of characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 isolated from Kimchi, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88**(2), 153-159.
- 8) Losteinkit, C., Uchiyama, K., Ochi, S., Takaoka, T., Nagahisa, K. and Shioya, S. (2001): Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **91**(4): 390-395.
- 9) Guerra, N.P. and Pastrana, L. (2002) Modeling the influence of pH on the kinetics of both nisin and pediocin production and characterization of their functional properties, *Process Biochemistry*, **37**, 1005-1015.
- 10) American Public Health Association (1992) Standard methods for the examination of water and wastewater, *American Public Health Association*, Washington, D.C.
- 11) 水野修、新谷真史、鈴木清彦、矢口淳一、野池達也 (2000) : 製麺工場排水からの水素生成に及ぼす pH の影響、*環境工学研究論文集*, **37**, 97-106
- 12) Vishnu, C., Seenayya, G. and Reddy, G. (2000): Direct conversion of starch to L(+) lactic acid by amylase producing *Lactobacillus amylophilus* GV6, *Bioprocess Engineering*, **23**, 155-158
- 13) Hujanen, M. and Linko, Y.-Y. (1996): Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **45**, 307-313
- 14) Simon, E. (1947): The Formation of Lactic Acid by *Clostridium acetobutylicum* (Weizmann), *Arch. Biochem. Biophysics*, **13**, 237-243
- 15) 乳酸菌研究集談会編 (2000) 乳酸菌の科学と技術、学会出版センター
- 16) Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. (1976): Bacteriocins of gram-positive bacteria, *Bacteriological Reviews*, **40**(3), 722-756
- 17) Klaehammer, T.R. (1993): Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Review*, **12**(1-3), 338-356
- 18) 園元謙二、指原紀宏 (2001) : 乳酸菌のバクテリオシンの構造と作用機構、蛋白質 核酸 酵素, **46** (4)、323-331