

## ■ 特 集 ■ 植物資源のエネルギー化

## 固定化微生物のエネルギー化への応用

## Application of Immobilized Microbial Cells to Energy Production

軽 部 征 夫<sup>\*</sup>  
Isao Karube

鈴 木 周 一<sup>\*\*</sup>  
Shuichi Suzuki

## 1. はじめに

近年化石燃料の有限性が指摘され、これに代わるエネルギー資源の開発が世界的に要望されている。このようなすう勢から再生産可能なバイオマスの利用が注目されている。バイオマスから燃料を生産する多くの方法が提案されているが、微生物を用いるプロセスが有効と考えられている。発酵プロセスを利用したバイオマス燃料としてエタノールなどの液体燃料およびメタンや水素などの気体燃料がある。バイオマスから燃料を生産するプロセスで最も重要なことはエネルギー収率を向上させることである。すなわち燃料を生産するために要する全エネルギーを生産された燃料の全エネルギーより低く抑えなければならない。このためには省エネルギー型のプロセスの開発が重要である。

最近酵素や微生物のような生体触媒を工業的に利用する目的でこれらを水不溶性の高分子や無機担体に結合させる（固定化する）技術が開発された。この技術の導入により各種の固定化酵素や固定化微生物が調製され、これらは食品や医薬品などの製造プロセスや分析化学など広範囲な分野に応用されつつある<sup>1)</sup>。微生物を生存状態のまま高分子担体中に固定化すると微生物はその生理機能を長期間保持している。したがって固定化微生物を用いて各種の有用物質を長期間連続的に生産できる。通常の発酵は回分式で行なわれ、発酵槽中で微生物を増殖させ、これに代謝産物を生産させる。このため通常の発酵では多量の栄養源の有機物質とエネルギーを消費している。しかも微生物は発酵に

用いた後に廃棄されている。一方固定化微生物を用いれば微生物の培養に要する多量の有機物質を必要とせず（代謝産物を生産するのに要する有機物質のみを消費）、発酵槽の運転に要する動力費を大幅に削減できると予想される。したがって固定化微生物を充填した反応槽（バイオリクターとも称される）を用いて長期間有用物質を生産できれば、このプロセスは省資源省エネルギー型のプロセスと考えられる。

これらの固定化酵素や固定化微生物は将来著しい発展が予想されている生物化学工業の主役を担うものといえる。ここではバイオマスのエネルギー化に焦点を合せ、固定化微生物バイオマス燃料生産およびエネルギー変換システム（電池）への応用について述べる。

## 2. バイオマスからの水素生産

微生物が水素を利用したり水素を産生したりすることは今世紀の初めから知られていた。水素を産生する微生物は偏性嫌気性菌、通性嫌気性菌、光合成および藻類に分類される<sup>2)</sup>。

水素産生菌はグルコース、しょ糖、デンプンなどの炭水化物、ピルビン酸、ギ酸、マレイン酸などの有機酸、各種アミノ酸やタンパク質などから水素を生成する。例えば水素産生菌の *Clostridia* における水素生成経路について簡単に述べる。グルコースから中間代謝物のピルビン酸が生成し、このピルビン酸は脱炭酸されて水素が生成する。

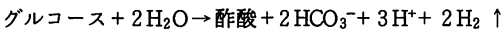
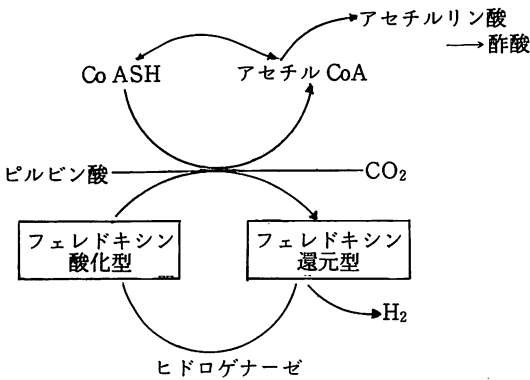
また *Clostridium butyricum* などでは  $\text{NADH}$ —および  $\text{NADPH}$ —フェレドキシソキシドリダクターゼ活性を有しており、 $\text{NADH}$  や  $\text{NADPH}$  から水素を生成する。したがって *Clostridia* の場合には 1 モルのグルコースから 2 モルあるいは 4 モルの水素が生成

\* 東京工業大学資源化学研究所助教授

\*\* 東京工業大学資源化学研究所教授

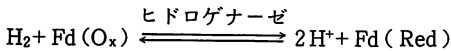
Ⓔ227 横浜市緑区長津田町 4259

することになる。



しかし実際には水素産生菌は乳酸、ギ酸などの種々の有機酸を産生する<sup>3)</sup>。したがってグルコースからの水素の生成量は上に述べた理論生成量よりは少ない。そこでグルコースから水素への変換効率を上げることがきわめて重要である。最近筆者らは水素産生菌を培養する際にフラビン化合物を添加するとほぼ定量的にグルコースから水素が生成することを見出した。この機構については今のところ明らかでないが、フラビン化合物処理をすると乳酸の生成量が減少することが明らかとなった。今後は最近脚光をあびている遺伝子工学的手法による水素産生菌の育種が展開されるものと考えられる。

水素産生菌による水素生成の最終段階で重要な役割を果たしているのがヒドロゲナーゼである。微生物にはそれぞれ異なる電子キャリアーを必要とするヒドロゲナーゼが存在している。*Clostridium* のヒドロゲナーゼはフェレドキシンを電子キャリアーとして下式に示すように水素生成に関与している。



ここで Fd (Ox) は酸化型フェレドキシン、Fd (Red) は還元型フェレドキシンである。ヒドロゲナーゼはきわめて酸素に対して不安定で、好氣的条件下では容易に失活する。したがって水素産生菌を用いて水素を連続的に生産することはきわめて困難であった。そこで筆者らは水素産生菌の *Clostridium butyricum* をポリアクリルアミドゲル中に固定化した。この固定化水素産生菌をグルコース溶液中に懸濁させたところ、水

素を長期間連続的に生成することを見出した<sup>4)</sup>。すなわち水素産生菌中のヒドロゲナーゼ系が固定化により安定化されたためと考えられた。さらに固定化に適する担体を検索したところ、アセチルセルロースフィルター中に寒天ゲルを用いて菌体を固定化する方法が最も水素産生菌に適していることが見出された<sup>5)</sup>。すでに述べたように水素産生菌は各種の有機物から水素を生成することが知られている。そこで固定化水素産生菌を廃水に適用し、廃水から水素の生成を試みた。各種の廃水から水素を生成することが明らかとなったが、アルコール工場の廃水が水素生成に最適であることがわかった<sup>6)</sup>。そこで固定化水素産生菌を用いる連続的な水素生産システムを製作することにした。固定化水素産生菌 2 kg (乾燥菌体 20 g) を 5 l の小型培養機に入れ、これに BOD 約 80,000 ppm のアルコール工場の廃水を流速 10 ml/min で連続的に移送した。このシステムで、20 ml/min/kg 湿菌体ゲルの水素が 20 日間にわたって連続的に生産できることが明らかとなった<sup>7)</sup>。

### 3. 固定化藻類を用いる光水素生産

藻類や光合成細菌が光存在下で水素を生成することは以前から知られていた。緑藻、らん藻、光合成細菌などの光合成微生物は太陽光を利用して生体内還元物質 (NADPH) と高エネルギー化合物 (ATP) の蓄積を行ないこれを利用して炭酸固定を行なう。これらの微生物は、水の光分解を含む光化学系 II と光化学系 I とを有する緑藻やらん藻と、嫌氣的条件下で生育し光化学系 I のみを有する光合成細菌に大別される。これらの微生物のうちでらん藻を用いる水素生産が最も注目されているのでここではらん藻による水素生成を中心に述べる。

らん藻はすでに述べたように光化学系 I および光化

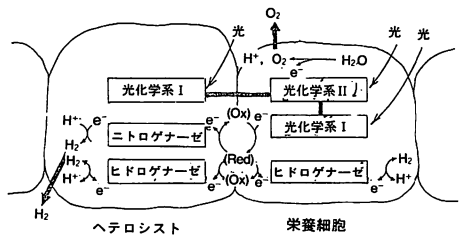


図-1 らん藻による水素生成経路

学系Ⅱを有し、好氣的と嫌氣的の光合成機能を有し、窒素を固定する。らん藻における光水素発生はニトロゲナーゼ系によるがヒドロゲナーゼもある。このらん藻による水素生成経路を模式的に図-1に示す。らん藻は培養も簡単であり、水素生産システムとして有望視されている。すでに述べたようにらん藻の水素生成に関与しているのはニトロゲナーゼであるがニトロゲナーゼもヒドロゲナーゼと同様に不安定であり、しかも連続的に用いると構造的破壊が起るのでらん藻を用いる長期間の水素生成はきわめて困難と考えられていた。筆者らはらん藻の *Anabaena* sp. に着目し、これをすでに述べた寒天ゲル中に固定化した。この固定化らん藻の光水素生成能について検討したところ、もとのらん藻の約3倍の水素生成能を有していることが示された<sup>8)</sup>。これはらん藻中の水素生成系が固定化により安定化されたものと考えられ、らん藻を用いる水素生産にも固定化技術の導入がきわめて重要であることが明らかとなった。そこで寒天濃度の水素生成能におよぼす影響について調べたところ、らん藻は2%の寒天中に固定化した場合に最大の水素生成能を示すことがわかった。そこで容積20ℓの反応槽を製作し、最適条件下で水素の連続生産を試みた。固定化らん藻は水素と酸素および炭酸ガスを生成する。そこで生成する酸素は好気性菌の *Bacillus subtilis* の呼吸作用を利用して除くことにした。すなわち *Bacillus subtilis* の懸濁液を小型培養機に入れ、これに生成した混合ガスを導入し、酸素を除いた。次に炭酸ガスをソーダライムのカラムで取り除くと水素が得られた。このシステムで0.16—0.52 μmoles/g 湿菌体・時間の水素が1週間に渡って連続的に生産された。このように固定化らん藻を用いて水から水素を光照射下で生産することができた。しかし固定化らん藻による水素の生成能はまだ低く、さらに水素生成能の高いらん藻の検索が必要と考えられる。

#### 4. 固定化微生物によるメタンの生産

メタン発酵は嫌氣的環境下で起こる普遍的な微生物反応で、汚濁した河川や沼で容易に観察することができる。このメタン発酵はすでに有機物性廃棄物の処理方法の1つとして実用化されているが、最近のエネルギー・資源開発問題に関連し再び注目されている。メタン産生菌は自然界に広く分布しているが純粋分離と培養が困難なためにあまり研究が進展していなかった。メタン産生菌として *Methanobacterium*, *Methan-*

*osarcina*, *Methanococcus*, *Methanospirillum*などが知られているが、これらの細菌はメタン生成あるいは生育のために水素を電子供与体として、炭酸ガスを電子の受容体として利用する。これらの細菌のメタン生成経路については十分に明らかになっていないが、水素と炭酸ガス、ギ酸、酢酸、アルコールなどを基質としてメタンを生成する。

通常メタン発酵は栄養源、微生物群、物理的環境に左右され、メタンを定常的かつ効率的に生成させるのは難しいとされていた。そこでメタン産生菌を固定化し、この固定化メタン産生菌を用いるメタン生産が、考えられるに至った<sup>9)</sup>。メタン産生菌は廃水処理施設の消化槽から分離することができる。これを数回に渡って継続培養し、メタン産生能の高い微生物群を分離した。このメタン産生菌を寒天ゲル中に固定化したところ、メタンを生成することがわかった。この固定化メタン産生菌の最適温度は37°Cで至適pHは7.0から7.5であった。さらに固定化メタン産生菌は好氣的条件下でもメタンを生成し、メタン生成に関与している酵素系が固定化によって安定化されたためと考えられた。このメタン産生菌をアルコール工場の廃水に適用し、連続的にメタン生成を行なわせたところ、初めはメタンの生成能は低かったが次第にメタンの生成能は高くなった。このメタン生成の活性化は担体中でのメタン産生菌の増殖に基づくものと考えられた。メタンの生成速度は500 μmoles CH<sub>4</sub>/g 乾菌体・時間であり、3ヶ月以上このメタンの生成速度は維持された。したがってメタン産生菌を固定化することによって連続的にメタンを生産できることが明らかとなった。さらにメタン生成能の高い高温メタン産生菌の検索やガス拡散のよいアセチルセルロース担体の採用によってさらにメタン生成能の高い固定化菌体も得られている<sup>10)</sup>。将来このような固定化メタン産生菌を採用することによって廃棄物から効率的にメタンを生産するプロセスが開発されるものと考えられる。

#### 5. 固定化微生物によるアルコールの生産

バイオマスからアルコールなどの液体燃料を生産するには発酵法が利用される。アルコール発酵は古くから醸造工業で利用されているが、石油化学工業などに比べると近代化のたち遅れている工業分野である。したがってバイオマスからアルコールを生産するためには効率のよいプロセスを開発しなければならない。このために発酵法などの改良、菌体の再利用、連続培養、

などが盛んに研究されている。一方固定化微生物を利用したアルコール生産プロセスも省エネルギープロセスとして注目されている。例えば千畑らは *Saccharomyces carlsbergensis* を海草から分離した多糖類の  $\kappa$ -カラギーナンに固定化し、これを用いるエタノールの連続生産を試みている<sup>11)</sup>。まず酵母を  $\kappa$ -カラギーナン溶液と混合した後ビーズ状に成形し、これをカラムリアクターに充填した。初めゲル中で酵母が増殖し、ゲル内の菌数が  $10^9$ 個/ $m\ell$ に達すると固定化酵母はグルコースからほぼ定量的にエタノールを生産する。20%濃度のグルコースをリアクターに移送すると（リアクター内の滞留は1時間）100 mg/ $m\ell$ のエタノールを生産させることができる。廃糖蜜をリアクターに移送したところ約1ヶ月に渡ってエタノールを連続的に生産させることに成功している。このように固定化酵母を用いることにより、従来の発酵法と比べ10倍以上の速度でアルコールを生産することができる。その他固定化微生物を用いてアセトンやブタノールを生産する試みもある。

固定化微生物を用いる液体燃料の生産は省エネルギー型プロセスとして実用化が期待されている。しかしバイオマスから燃料を生産する場合に最も重要な課題は発酵液からの燃料の分離方法である。バイオガスの場合には分離が比較的簡単であるが、アルコールなどの液体燃料の場合は従来からの蒸留法を用いなければならない。このプロセスは多量のエネルギーを必要とすることはよく知られている。したがって膜分離のような省エネルギー型のプロセスの開発が安価なバイオマス燃料を生産するためには必要である。

6. 固定化水素産生菌を用いる燃料電池

高エネルギーで電子の豊富な炭水化物、脂質およびタンパク質などは直接電極で反応しにくい。しかしこれらの化合物に微生物を作用させると微生物によってこれらの化合物は代謝され、各種の代謝産物が生産される。これらの代謝産物のなかには電極活性物質が含まれている。したがって微生物を用いることによって各種の複雑な有機化合物を電池の燃料として供給することが可能になる。このような微生物のもつ巧みで効率的な反応を利用して電気エネルギーを得ようとする微生物電池の原理が初めて提案されたのは1960年代の初めである。その後微生物電池の出力が低いという問題が明らかにされ、あまり研究されなくなった。すでに微生物を固定化すると水素を連続的に生産することを述

べた。水素はクリーンエネルギー燃料として注目されているが、電極での反応性もきわめて高い。そこでこれを電池に適用すると電気エネルギーが効率的に得られると考えられる。すでに水素-酸素型燃料電池は実用化の段階に達しておりこれに水素を供給すると効率的に発電することができる。

筆者らは固定化微生物を用いる種々の電池を試したがいずれも出力は低かった<sup>12)</sup>。そこで水素生産反応槽と燃料電池（水素-酸素型）を組み合わせた微生物電池システムを考えるに至った<sup>7, 13)</sup>。（図-2）。このシステムは固定化微生物を用いる水素生産反応槽（5  $\ell$ の小型微生物培養機）、微生物によって生産される炭酸ガスを除くソーダライムを充填したカラム、水素溜、および5個の水素-酸素型燃料電池から構成されている。ここで用いた水素-酸素燃料電池は白金黒-ニッケル網をアノードとしパラジウム黒-ニッケル網をカソードとするもので、両極は濃水酸化カリウムを含有するナイロン製の隔膜で分離されている。水素生産反応槽にはアセチルセルロースフィルターに固定化した水素産生菌2 kg（湿重量）を充填した。この反応槽にアルコール工場廃水（BOD 60,000 ppm）を流速10  $m\ell/min$ で連続的に移送したところ、40  $m\ell/min$ の速度で水素が生産されることが明らかとなった。そこでこ

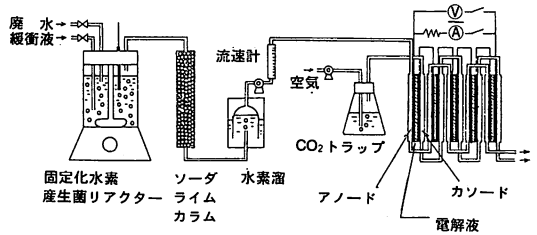


図-2 固定化水素産生菌を用いる微生物電池システム

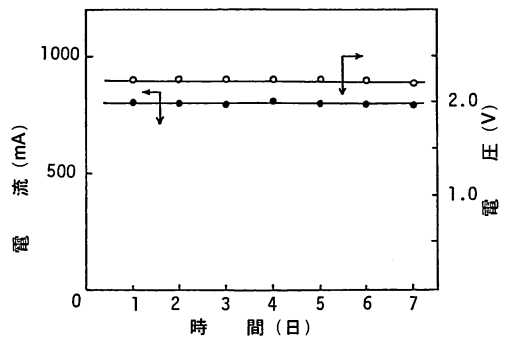


図-3 微生物電池システムの連続運転

の水素を燃料電池のアノード室にポンプで連続的に移送し、カソード室には空気を120 mℓ/minの流速で移送した。この結果を図-3に示す。この結果から明らかに0.8 Aの電流が7日間に渡って連続的に得られた。この際の5個の水素-酸素型燃料電池の端子電圧(合計)は2.2 Vであった。このように固定化微生物を用いる電池は一步実用に近づいた。これをさらにスケールアップするにはさらに微生物の水素生成能を向上させる必要がある。すでに述べたように水素産生菌の培養の際にフラビン化合物(リボフラビンなど)を共存させるとグルコースからはば定量的に水素が生成することが見出されており、このような水素産生菌を固定化して用いることによりさらに水素生産性が向上し、電池の出力が上がるものと期待している。

7. 固定化らん藻を用いる光化学電池

固定化らん藻 (*Anabaena* sp.) を用いると光エネルギーを利用して連続的に水素を生産できることはすでに述べた。そこで生成した水素を水素-酸素型燃料電池(湿式)に適用した。この電池システムを図-4に示す。この電池システムは寒天に固定化したらん藻1 kgを含む反応槽(20ℓ)、酸素を除く *Bacillus subtilis* 含有反応槽、ソーダライムカラム、水素-酸素型燃料電池から構成されている。水素生産反応槽に蛍光灯を挿入し、光を照射したところ(20,000 ルックス)、水素、酸素、炭酸ガスが生成した。この混合ガスを *Bacillus subtilis* を含有する反応槽に導入し、酸素のみを除去した。さらにこれをソーダライムカラムを通すと水素のみが得られたので、この水素を白金黒-白金アノード、炭素カソードから成る燃料電池に移送した。この電池システムで約20 mAの電流が5日間に渡って連続的に得られた<sup>8)</sup>(この際の端子電圧は250 mVであった)。このように光と固定化らん藻を利用して電気エネルギーを連続的に得られることがわかったが、まだ出力が低い問題点がある。

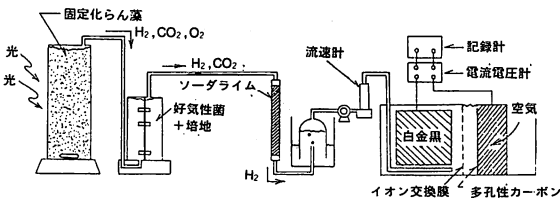


図-4 固定化らん藻を用いる光化学電池システム

また固定化葉緑体(葉の中で光合成を行なっているオルガネラ)と固定化水素産生菌を組み合わせ、電子運搬体としてフェレドキシンを用いると光水素生成が可能である。そこで、このシステムを用いる光化学電池の原理が提案された<sup>14)</sup>(図-5)。すなわち固定化葉緑体中の光化学系 I, II を利用して水を分解し、この電子をフェレドキシンを介して固定化水素産生菌の菌体中のヒドロゲナーゼに運搬し、水素を生成させ、この水素を燃料電池に適用しようとするものである。したがってこの電池システムは固定化葉緑体リアクター、固定化水素産生菌リアクター、水素-酸素型燃料電池から構成される。このシステムにフェレドキシンを連続的に循環させ、固定化葉緑体に光を照射するとフェレドキシンが還元される。これを固定化水素産生菌を含有するリアクターに移送すると、ここでフェレドキシンは酸化されて水素が生成する。水素と酸化型フェレドキシンは電池のアノード室に移送され、水素は電極で反応し電流が得られる。酸化型フェレドキシンは再び固定化葉緑体リアクターにもどり光照射下で還元される。実際このシステムに光を照射すると1~2 mAの電流が得られるが葉緑体の寿命が短かく(約6時間)、さらに葉緑体の安定化が必要である。

一方緑藻の *Chlorella* と水素産生菌を組み合わせ、電子キャリアーとして NADP を用いる水素生成系が見い出され(図-6)、これらを固定化して用いる光化学燃料電池も提案されている<sup>15)</sup>。この研究はまだ緒にいたばかりであり、水素の生成能も低いが、緑藻の *Chlorella* はらん藻よりも安定であり、長期間の使用が可能である。したがってさらに水素生成能が向上すれば将来有望な水素生成系と考えられる。

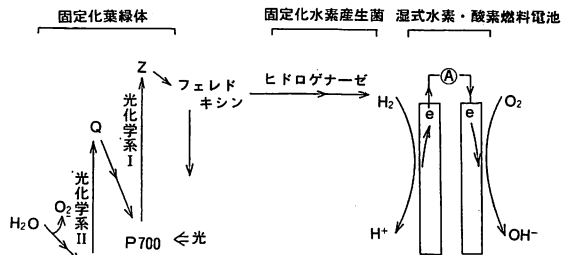


図-5 固定化葉緑体を用いる光化学電池の原理

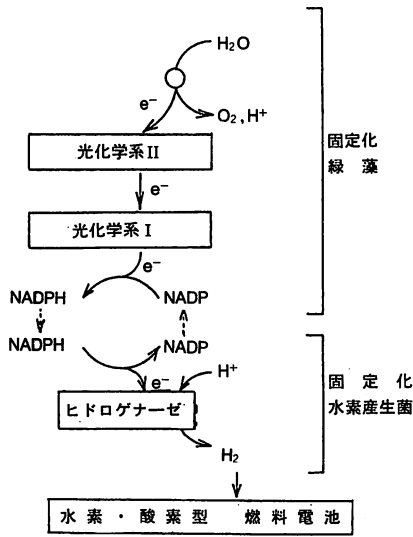


図-6 固定化緑藻-水素産生菌を用いる水素生成系

### 8. おわりに

以上生物化学プロセスすなわち微生物を用いるエネルギー生産および変換について筆者らの研究を中心に述べた。生物機能はきわめて巧みかつ効率的であるが、これを工業的に応用しようとする場合安定性に問題があった。しかし近年進展した生体触媒や微生物の固定化技術の開発により、生物機能を著しく安定化することが可能になった。すでに述べたように固定化微生物の採用により水素やメタンなどのバイオガスの長期間の連続生産が可能となり、これを用いる電池システムの開発研究も始まっている。これらのシステムの次の課題は微生物によるバイオガスや燃料の生産性の向上である。このためにはこれらの生成能の高い微生物の検索も有効であるが、最近注目を集めている遺伝子工学的手法による微生物の積極的な育種が必要と考えられる。このような育種された新しい微生物を採用することによりバイオマスあるいは光エネルギーを利用してきわめて効率的なエネルギーの生産・変換が行なわれることを期待している。

### 参考文献

- 1) O. Zaborsky (ed.) : "Immobilized Enzymes", CRC Press, Cleveland, 1973.  
千畑一郎 (編著) : 「固定化酵素」, 講談社, 1974.  
H.H. Weetall and S.Suzuki (eds.) : "Immobilized Enzyme Technology", Plenum Press, New York, 1975.  
福井三郎 (編著) : 「生体触媒としての微生物」, 共立出版, 1979.
- 2) C.T.Gray, H.Gest : Science, 148, 186 (1965)
- 3) 鈴木周一 (編著) : 「エネルギー資源と微生物」, 共立出版, 1979.
- 4) I.Karube, T.Matsunaga, S.Tsuru, S.Suzuki : Biochim. Biophys. Acta, 444, 338 (1976)
- 5) I.Karube, S.Kuriyama, T.Matsunaga, S.Suzuki : Energy Development in Japan, 3, 141 (1981)
- 6) S.Suzuki, T.Matsunaga, S.Tsuru, S.Suzuki : Biotechnol. Bioeng. Symp., 8, 501 (1979)
- 7) I.Karube, S.Suzuki, T.Matsunaga, S.Kuriyama : Ann. New York Acad. Sci. (in press)
- 8) H.Kayano, I.Karube, T.Matsunaga, S.Suzuki : Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. (in press)
- 9) I.Karube, S.Kuriyama, T.Matsunaga, S.Suzuki : Biotechnol. Bioeng., 22, 221 (1980)
- 10) 軽部征夫, 松永是, 鈴木周一 : 日本化学会春季年会講演予稿集, 1981.
- 11) M.Wada, J.Kato, I.Chibata : Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 8, 241 (1979)
- 12) I.Karube, T.Matsunaga, S.Tsuru, S.Suzuki : Biotechnol. Bioeng., 19, 1723 (1977)
- 13) S.Suzuki, I.Karube, T.Matsunaga, S.Kuriyama, N.Suzuki, T.Shirogami, T.Takamura : Biochimie, 62, 353 (1980)
- 14) H.Kayano, T.Matsunaga, I.Karube, S.Suzuki : Biotechnol. Bioeng. (in press)
- 15) 萱野啓道, 軽部征夫, 松永是, 鈴木周一 : 日本化学会春季年会予稿集, 1981.

