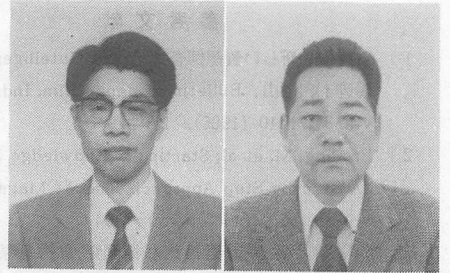


## ■ 解 説 ■

## バイオリアクターにおける微生物固定化の評価

## Estimation for Microbial Immobilization in Bioreactor

佐野 寛\*・本田 繁\*\*  
Hiroshi Sano Sigeru Honda



## 1. はじめに：微生物固定化の意義

バイオリアクターは、通常の化学反応器では資源化利用することが困難な複雑組成の原料や、エネルギー浪費型の高水分原料からも高収率・選択性良く目的の反応を進めることができるものとして注目されている。

ここで使われる菌体はしばしばbiocatalyst（生体触媒）と呼ばれ、化学反応器での触媒の地位になぞらえられる。しかしふつう菌体は水中懸濁液として存在しているので、反応器から自由に流出（wash out）し易く、また水との比重差が乏しいため、流出液から菌体を回収することも非常に困難である。

化学反応器の連続化に固定床触媒が使用されるようにバイオリアクターでも同様に菌体の固定化が望まれる。菌体濃度は、触媒濃度に相当するのでできるだけ高濃度化したい。しかし固定化によって菌体を捕捉・濃縮できる反面、固定材料自身の死容積のマイナスと、菌体の塊化・膜化による液や基質との接触面積の減少とを考慮に入れねばならぬ。

バイオリアクターの目的は、基質をより有価物質へ、

またはより無害な物質に転化することである。事例として

- A) 菌体合成：イースト（酵母）、こうじ、蛋白等、好気醗酵が多い。
- B) 有価物合成：抗生物質、ビタミン、酵素、光学異性体分割等。
- C) 分解醗酵：有機酸、アミノ酸、糖化、加水分解反応が多く、食品工業に利用される。
- D) アルコール醗酵：エタノール等酒類、アセトン、ブタノール、グリセリン等。
- E) 浄化：活性汚泥（空気酸化と有害物捕集）、コンポスト化（空気酸化と重合）、悪臭吸着分解。
- F) エネルギー回収：メタンガス、嫌気性醗酵に限定。

これらのうち固定化が役立つのは主にB・C・D・E・Fであって、特にDとFには有効性が高い。

## 2. 菌体高濃度培養効果

固定化による高濃度化は、表1に見られるようにさほど画期的なものではない。菌の巣と見なされる活性

表1<sup>1)</sup> 微生物存在濃度の事例

| バルク濃度  |                          | 面積濃度       |                           |
|--------|--------------------------|------------|---------------------------|
| 土壌細菌   | $10^6 \sim 10^{10}$ コ/g  | 皮膚         | (コ/cm <sup>2</sup> )      |
| 放線菌    | $10^5 \sim 10^7$         | (洗浄後)      | $(2 \sim 30) \times 10^3$ |
| カビ     | $10^3 \sim 10^5$         | 接種用        |                           |
| 原生動物   | $10^4 \sim 10^6$         | 吹付孢子       | $10^4$                    |
| サンドイッチ | $(1 \sim 2) \times 10^6$ | マット状カビ     |                           |
| サラダ    | $10^5 \sim 10^6$         | 孢子         | 約 $4 \times 10^8$         |
| トーフ    | $10^4 \sim 10^5$         | 猫毛状カビ      |                           |
| パン     | 約 $10^4$                 | 孢子         | 約 $5 \times 10^8$         |
| 醗酵果汁   | $10^8 \sim 10^{11}$ コ/ml | 濾床生物膜      | 約 $10^{10}$ コ/ml          |
| 富栄養水   | 約 $10^7$                 | 活性汚泥       | 約 $10^9$                  |
| 貧栄養水   | 約 $10^5$                 | U A S B 底部 | $< 10^{11}$               |

\* 工業技術院大阪工業技術試験所5部燃焼化学研究室長 〒563 池田市緑丘1

\*\* 工業技術院大阪工業技術試験所分析化学研究室主任研究官

汚泥でも富栄養水の100倍程度であり、土壌の菌レベルと同様である。これは一般に培養菌体が自重の10~30倍の水を含んだゲルを形成しているためである。

3. 固定化材料/形状効果

表2に主要な担体材料の形状からの分類を示した。包括型ゲルでは菌体が線状高分子のネットにからめられて固定されているので最も完全な固定と見なされる。しかしそれは同時に肝腎の菌活性の障害ともなる場合があり、必ずしも好ましい訳ではない。すなわち、図-1で示すように1μ級の菌体が封入されている壁には約0.01μの窓しか開いていないので、基質でも巨大分

表2 担体の形状分類

|      | 有機材料   | 無機材料   |
|------|--|--|
| 包括型  | 凝固ゲル(寒天, PVA)<br>架橋ゲル(アルギンCa)<br>重合ゲル(PAA)   | マイクロカプセル<br>シリカゲル                                  |
| 付着型  | 粒, ペレット, 貝殻, 棒板, 波板, 穴板, 格子円筒, 輪, らせん棒糸, 綿, 紐, ヒゲ, 網, 布<br>連通多孔体(Pウレタン)<br>表面処理(粗化, 孔化...) | 砂, 土, 珪藻土<br>多孔セラミック塊, 綿, 糸, 布<br>金属網<br>活性炭, コークス |
| 自己担体 | フロック<br>団粒(UASB)   | —  |

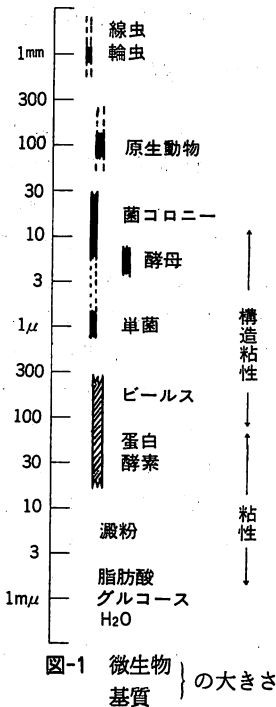


図-1 微生物基質の大きさ

子である蛋白質やセルロースは菌体との自由な接近が困難となり、SS成分などとの反応活性が阻害されることになる。ただし、セルラーゼ酵素包括体では不溶物のセルロースを糖化できた<sup>2)</sup>という例や、フィブリン固定プロテアーゼ<sup>20)</sup>による垢落し効果の例もあるので、説明は難しい。

有効表面積とはなにか 付着型の担体では、担体表面と液中とに菌体の分布が一種の平衡状態にあり、(もし表面の親油性が同じならば)担体の表面積が菌体保持量を支配することになる。しかしN<sub>2</sub>など気体分子吸着で測定されるBET比表面積はもっぱらmμ級のマイクロ細孔の表面を拾っているの、菌体付着には小さ過ぎて無効である。菌体への有効表面積は、少なくとも1μ以上の孔、望ましくはコロニーの入れる10μマクロ孔などから構成するべきである(表3)。なお、表面の有効度は平板・糸表面・孔内表面上でそれぞれ異なるはずだがまだよく分かっていない(図-2)。

自己担体は浮遊菌と本質的に異なるものでない。特

表3 付着型担体材料の比表面積

| 様式                     | m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> 槽 |
|------------------------|----------------------------------|
| 空槽壁(1 m <sup>3</sup> ) | 5                                |
| 邪魔板組込槽                 | 50 ~ 200                         |
| 隙間接触                   | 30 ~ 300                         |
| 回転円板                   | 130 ~ 160                        |
| 砂濾床                    | 1000 ~ 3000                      |
| プラ円筒充填床                | 1000 ~ 2000                      |
| 0.3 ミリ砂流動床             | (3 ~ 5) × 10 <sup>3</sup>        |
| 粗孔セラ充填床                | (1 ~ 30) × 10 <sup>3</sup>       |
| 細孔セラ充填床                | 約10 <sup>6</sup> (無効孔含)          |

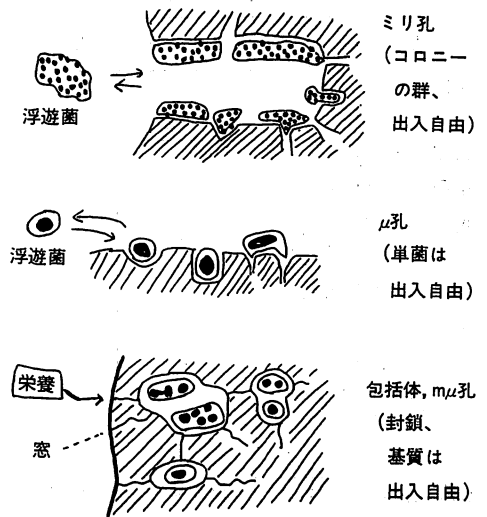


図-2 菌体の住宅モデル

にフロックは菌体の分泌ゲルで連結されたコロニーがさらに会合したものと云ってよい。団粒はより強固に会合・脱水した巨粒であるが、内部の菌は相対的に不活性な休眠状態にあると見られるので<sup>19)</sup>、このような粒子の菌・液接触面積を評定するのは原理的にさがる難しい。

菌膜の活性厚みは、好気性菌における菌体ペレットの内部へのO<sub>2</sub>侵入・消費から見てO<sub>2</sub>半減距離として0.2～0.4 mmくらい<sup>3)</sup>でありそれより内部は漸次休眠状態にあるといえる。基質消費による菌体生成収率は約0.5/好気醗酵、約0.05/嫌気醗酵と決まっています。増殖が必然的であるのが触媒と違う点で、菌固定化には動的な配慮を要する。

4. 酵素固定化との差異

酵素の固定化あるいは酵素を含有する死菌の固定化はすでにアミノ酸各種、異性化糖・低乳糖牛乳の製造等<sup>4)</sup>に実用化されていて先行的な技術と見られるので、表4に生菌の固定化との比較<sup>5)</sup>を試みた。

酵素は分子であり菌体より約2桁小さく、特定の官能基を使って担体表面に「化合」させることが可能であるが菌体はそのような結合はできない。さらに多くの菌体は水和ゲル相を身にまとっているのだから、担体表面との間に相当の距離(0.1～0.3 μ)を生じるから直接の化学結合距離(10<sup>-4</sup> μ)に接近するには絶望的である。菌体の担体として付着型がよく用いられるのは当然の成り行きである。

しかし単なる物理的な付着だけではなく、明らかに

表4 酵素固定化と菌固定化の対比

| 結合様式        |           | 酵 素       | 菌 体                     |
|-------------|-----------|-----------|-------------------------|
| 包括          | mμ孔       | ○         | ○                       |
|             | μ孔        | 流出        | ○                       |
| 表面結合        | 共有結合      | ○         | ×                       |
|             | ion結合     | ○         | △                       |
| 吸着          | 官能基親和性    | ○         | ○?                      |
|             | δ+/δ-(極性) | ○         | ○?                      |
|             | 親水/親油性    | △         | ○?                      |
| 付着          | 隙間入込み     | ×         | ○                       |
|             | 投錨効果      | ×         | ○                       |
|             | 凹凸(10μ級)  | ×         | ○                       |
|             | 粗面        | ×         | ○?                      |
|             | 平滑面       | ×         | △                       |
| 被固定物の大きさ(μ) |           | 0.005～0.1 | 0.3～2(単菌)<br>3～10(コロニー) |

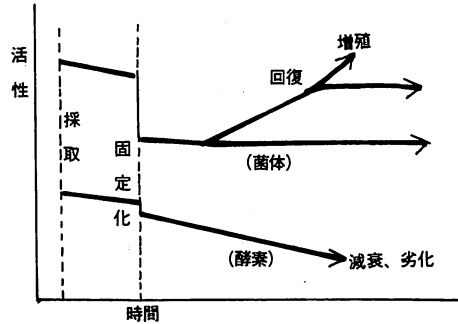


図-3 固定化と活性変化

菌の付着し易い表面とし難い表面とは存在しており、化学的な親和性による菌の吸着は重要な要素である。化学的な親菌性表面の要素としては、親水/親油性のバランスと、荷電的な+/-と、それらをもたらす原因をなしている表面官能基の存在である。

さらにもう一つの差異は、酵素活性が本質的に無機触媒と同じく使用中にしだいに活性劣化して行くものであるのに対し(図-3)、菌体は固定化時の劣化(環境悪化)を馴養により回復するのみならず基質供給により自己触媒的に増殖し活性増大をみることができる。エタノールの連続生産用の酵母の例では最初に3.5 × 10<sup>6</sup> コ/mlの酵母がカラギーナン包括され、栄養を与えられると5.4 × 10<sup>9</sup> コ/mlまで増殖した<sup>4)</sup>。この値は浮遊培養の濃度よりも約10倍ほど濃く、固定化が物理的に菌体を抱留しているだけでなく、積極的により快適な環境を提供する手段となり得ることを示している。

5. 固定化材料/化学的效果

化学的效果は、固定化あるいは菌体保持性能と、菌体活動の補助・保護性能との二つに大別される。各種材料表面の「親菌性」には、表面の親水性・親油性のように確立した数値評価法があるわけではなく、概念自体も確立途上にある。しかし表面自身の親菌性の差異の存在は定性的には明瞭であって、雑菌付着テストでは、汚水中30日担体吊り下げテストにより菌体付着を電顕観察した例<sup>6)</sup>は次の順位であった。

MMA 200 μ孔 > MMA 30 μ孔, 再生ゴム, セラハニカム, PP50 μ孔 > PVD > PE15 μ孔  
表面カビ付着性(湿潤)試験<sup>1)</sup>においては良否選別テストのみであるが次のようになる。

Pウレタン > Pアミド, 可ぞ剤入PVC,  
Pシリコン, エポキシ, アクリル > PVC

これらの傾向は、①疎水材が不利であること、②微細

孔より巨大孔が有利なこと、③可そ剤のような混入物の効果が大きいことなどを示唆している。なお、可そ剤入りPVCの場合は、可そ剤が栄養源として使われる効果と、その脱け跡の孔化による表面粗化とが重なって効いていると思われる。

表面の物理化学性を菌付着性と対応させる試みは多くないが、その一つは海水中の雑菌付着<sup>7)</sup>試験があり、データを作図した結果を図-4に示す。

表面材料の接着性は、菌の付着と似ている点が多く参考になる。臨界面張力( $\gamma$ , dyne/cm)が類似したほど接着性が良いとされ<sup>8)</sup>、 $\gamma$ 値は親水性とも関係が深く次の値が知られている。親水性の表示は、ぬれ接触角でも代行できる(表5)。

血小板細胞の付着性は、抗血栓性研究で詳しい<sup>9)</sup>歴史的に付着性の少ない材料探索が行われた結果

疎水表面→親水表面→

→親・疎水ドメイン交互block copolymerと変転している。これらの理論付けはまだ完成しているとは云い難いが<sup>10)</sup>、vdw力・水素結合・疎水結合・微小荷電反撥などが考えられる。だから親水性だけをパラメータとするのは危険であろうが、図-5のように

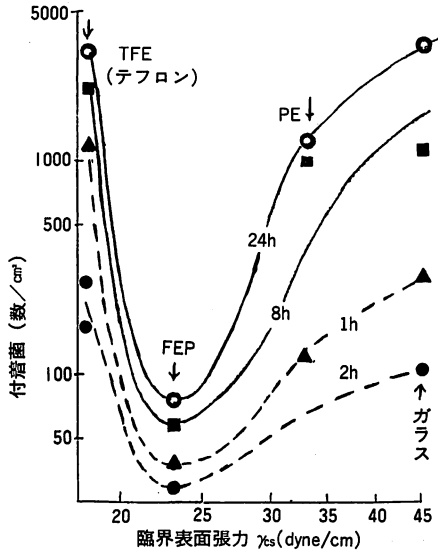


図-4 菌着生量：基板のぬれ易さ (Delaware 湾水)

表5 臨界面張力 (dyne/cm)

|            |      |       |    |
|------------|------|-------|----|
| テフロン       | 18   | PSt   | 33 |
| ヘプタン       | 20.3 | PMMA  | 39 |
| Pジメチルシロキサン | 24   | PVC   | 39 |
| PF化ビニル     | 28   | PET   | 43 |
| PP         | 29   | Nylon | 46 |
| PE         | 31   |       |    |

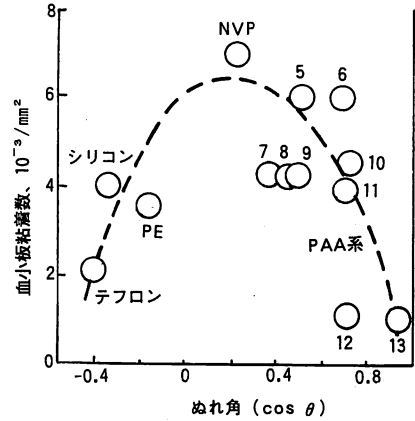


図-5 表面のぬれ易さと血小板粘着性

付着性の極大が決められるのは興味深い<sup>11)</sup>。

動物細胞は付着依存性細胞が多いので担体培養が多く研究されている。担体を使うことで不都合な培養条件：栄養枯渇・廃物蓄積・O<sub>2</sub>不足・局所pH変化などを避けることができ、実用にもなっている<sup>12)</sup>。しかし裸の菌体とだけ似た状態であり、モデルとしての利用には限界がある。

菌の表面荷電は明確な論議がし易いと考えられている。一般に水中の菌はδ-に荷電していると信じられているが、最近の報告では<sup>13)</sup> 同じpHにおいて清酒酵母が+, ビール酵母やパン酵母が-に荷電していることが明らかになり、菌の個性は無視できない。材料表面の平均的親菌性の検討において留意すべき点である。

初段階の菌付着性と、その後の菌体活動補助性とは独立した現象である。基質吸着性・pH緩衝性などはいずれも菌を環境の激変から保護し、菌の馴養期間をかせぎ出すので重要な役割がある。硝化菌(アンモニアを硝酸に変える)がCaCO<sub>3</sub>片に付着・生育し易いのは、有害老廃物を中和無害化するためと考えられる。ショックロード耐性・飢餓耐性は基質吸着備蓄能力によって得られるが、耐毒性は高級脂肪酸などについては不溶化が、フェノールなどについては一時吸着後の馴化による菌の資化能力獲得が、それぞれ効いていると考えられる<sup>21)</sup>。ただし、極難分解性であるフミンの吸着は有害無益で、被毒に相当する現象をもたらす。有害物に対しては菌体細胞膜と担体と、いずれが優先的に吸着するかで保護効果の有無が分かれる。

## 6. 事例研究

### 6.1 アルコール醗酵

回分式の醗酵システムを連続化して省エネをはかる試みは古くからある。酵母は栄養源とO<sub>2</sub>があれば増殖し、O<sub>2</sub>がなければエタノール醗酵を起こすので操作がし易い。カラギーナン包括固定化後、培養すると通常の浮遊培養の約10倍<sup>4)</sup>の濃度となり、高効率醗酵が可能になる。注目されるのはアルギン酸A1包括粒流動体では醗酵液pHを4.5→3.2と引き下げられる(雑菌を殺せる)<sup>14)</sup>、あるいはアルギン酸CaPVP+PVC球ゲル包括では糖濃度耐性が23→26%に、エタノール耐性も半濃度5→8%と向上した<sup>15)</sup>ことである。固定化による酵母の保護は顕著であるが、なぜ老廃物であるエタノール耐性も向上するか、は説明が困難である。密封を酵母が好んでいるわけでないことは、アルギン固定でもPAA固定でも酵母が表面に密集してくる<sup>16)</sup>ことから明らかである。

凝集性酵母が最近成功してビール製造に利用できるようになった。無担体でwash outしないならば固形化の目的は半ば達せられたことになる。しかし流動床として用いるには水との比重差が小さいこと、粒径分布をそろえることなどの諸課題がある。

6.2 硝化菌の固定

TGC I (高分子カチオン、図-6)に硝化菌を固定すると付着量はpH 4→6で急増する<sup>17)</sup>、これはcell-COOHの解離にほぼ比例している。cell-COO<sup>-</sup>が固定に使われても菌の硝化活性は全く変わらない。

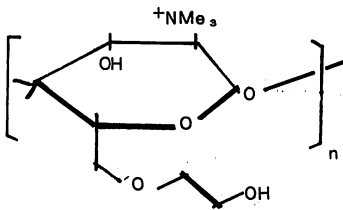


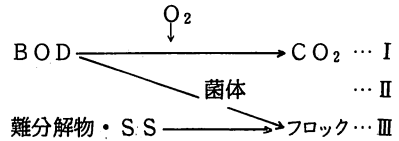
図-6 高分子カチオンの例

6.3 悪臭の土壤脱臭

畜産業・食品業・廃棄物処理場から発生する悪臭は、アンモニア・硫化物・低級脂肪酸などの混合物でせいぜい500ppm以下の希薄ガスである。無臭化菌は好気性の放線菌、中温細菌、高温細菌などで各10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>8</sup>コ/gくらい必要である。媒体がガスの場合、菌は容易に付着固定化され最も簡単なバイオリアクタとなる。土壌で十分だが乾燥させぬこと、空隙率2ℓ/kg以上維持することが必須である<sup>18)</sup>。悪臭物は菌によって資化・酸化消費されるので、栄養豊富な培地にすると菌は増えるが取り込みをやめるため無臭化能は減退する。

6.4 活性汚泥処理

難多で希薄な有機物(<数百ppm)を、好気性の雑菌連合で処理するプロセスであって、次の三種の反応が併行して起こり、水を浄化する。



基質はBODと空気O<sub>2</sub>とであり、酸化Iと増殖IIはほぼ等しい速度で起こり、IIIの捕捉は菌体ゲル生成しだいである。速度式は、

$$\text{増殖速度} = \mu \cdot [\text{菌}] \cdot [\text{基質}] / (k + \text{基質})$$

kは飽和定数である。従って反応を進めるためには菌体濃度を高いレベルに維持することが望ましく、一般には大量の生成汚泥を返送・再循環している。菌の固定法としては回転円板や散水濾床が多く用いられる。

この場合は菌体はwash outしない菌膜(厚さ2~3mm)を形成させる。前述のようにO<sub>2</sub>濃度の半減距離は約0.3mmであるから菌膜を2mm以上厚くしても好気処理にほとんど寄与できない。散水濾床の担体は25~50mm碎石でありデッドスペースが大きいが、担体を小さくすると増殖菌体による閉塞が起こり易くなる。

BOD負荷は0.3~1kg/m<sup>3</sup>・日であるから、生成菌体量もかなりの量となり、好気性水処理における菌体固定化は常に不安定なものとならざるを得ない。流動床では細粒(<1mm)を用いて比表面積を大きくし、菌膜を0.2mm以下に保って5~10kgCOD/m<sup>3</sup>・日の高率運転を行うが菌膜の増大・剝離も多くなる。流動床成立のためには、

$$\text{最小流動速度} = 0.0038 \times \text{粒径}^{1.82} \times (\text{粒子比重} - 1)^{1.94} / \text{液粘度}^{0.88}$$

の実験式があり、菌膜(比重1.005)が肥厚すると粒子が軽くなり過ぎる。また浮遊菌体が多いと粘度が高まり、いずれも不利な要因となる。

6.5 メタン醗酵

希薄な有機物からの唯一のエネルギー回収手段である。有機物は初段で加水分解され酢酸など低分子有機

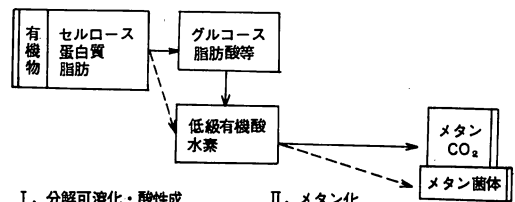


図-7 メタン醗酵の化学過程

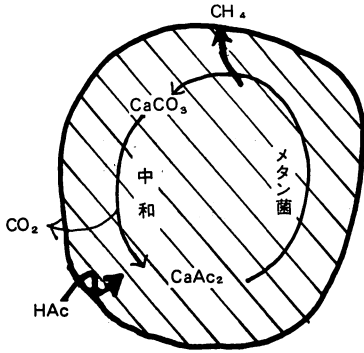


図-8 石灰による循環中和

酸を生成し、第2段階で脱炭酸反応を主にした反応でメタン生成する雑菌連合系である(図-7)。

嫌気醗酵で得られるエネルギーは好気醗酵の約1/10であり、菌体生成量も消費基質の約5%に過ぎない。そのため僅かな菌体流出でも wash out して失活に陥る。SRT/HRT(固体滞在時/水滞在時)を1より大きくするために残渣汚泥の返送を行うが、汚泥が好気性醗酵のような捕捉型のプロックを形成し難いので水との分離が困難である。そこでSRT/HRTを大きくする(固体を引留める)ためには固定化が望まれる。

嫌気醗酵菌の固定化は相対的に有利である。それは①好気醗酵では固定化により内部がO<sub>2</sub>の供給を断たれる不都合があったが、嫌気では基質溶液のみが到達できればよい。②石灰など難溶性中和剤を担体に加えておけば、初段の酢酸生成を受容し、メタン化段階で炭酸石灰を再生し、くり返し緩衝中和剤として利用できる(図-8)。③有害な高濃度脂肪酸を担体が吸着し、菌体の資化能力に応じて僅かずつ(<60ppm)栄養として取出し利用できる。④浮遊メタン菌はO<sub>2</sub>に極めて弱い、担体内部にはO<sub>2</sub>が届かず、空気もれ込みが少しあっても失活しない。

上向流固定床では實際上菌体は付着半分・隙間浮遊半分の状態だがCOD負荷は3kg/m<sup>3</sup>・日にとることが可能である。GIST-BROCADES社の流動床は砂(<1mm)担体において菌膜<0.2mmという条件で30kgCOD/m<sup>3</sup>・日の実績をあげている(ふつつ流動床では15kg)。自己担体型のUASB法では、粒が軽いため乱流は無理で層流で上向流とし、30kgまで負荷を上げられる。

まとめ

微生物固定化担体材料の技術的評価は、次の階層に区分できる

0次(消極評価)：①耐水性〔溶解・膨潤崩壊性〕

②耐菌性〔分解損失〕 ③無毒性

1次(固定化能)包括型においては、①菌取り込み量 ②固定化時生残率 ③寿命〔失活、増殖割れ〕

付着型においては、①菌付着分配率・量/時

②SRT/HRT値の上昇 ③菌体もれ

準開放型では、自己担体型①散逸率 ②凝集密度、

多孔膜型 ③もれ出し・目詰り度

2次(積極面開発)：付着性パラメータ ①形状効果

②親菌性概念の定量化と計測

菌活性補助効果 ①基質緩衝能 ②pH緩衝能

③耐毒・耐老廃物性の向上 ④馴養範囲の拡大

⑥反応速度の増大・反応収率の増大

システム適応性 ①固定床におけるSS閉塞・増殖閉塞

②流動床担体の浮/沈・破碎/凝結

参考文献

- 1) 井上真由美；化学と工業，32，904(1979)；プラスチックを侵すカビ，ラバーダイジェスト(1981)。
- 2) 嘉悦勲；バイオマス(下)柴田・木谷編，118(1981)。
- 3) 中西一弘；微生物による環境制御・管理技術マニュアル，“微生物反応における物質移動”，環境技術研究会，106(1983)；小林ら，Biotec.Bioeng.，15，27(1983)。
- 4) 千畑一郎，土佐哲也；化学増刊103，“biotecの新展開”168～174。
- 5) 佐野寛；アクアルネサンス講演会要旨(造水促進センター)，1984-9，p.45。
- 6) 来島グループ共同；産業公害，20-5，473(1984)。
- 7) S.C.Dexter；J.Col.Int.Sc. 70-2，349(1979)。
- 8) 畑敏雄；化学と工業，32，892(1979)。
- 9) 岡野ら；ibid.，900(1979)。
- 10) 山下岩男；ポリマーダイジェスト，1984-10，p.1。
- 11) 林和子ら；大工試季報，35，122(1984)。
- 12) 木幡守；工業技術，1984-7，37。
- 13) 中里ら；醗酵工学，62-5，313(1984)。
- 14) 畠山博行，野田秀夫；化学工学，48-8，603(1984)。
- 15) 大嶋ら；ibid.，48-5，369(1984)。
- 16) 古崎新太郎；化学工学協会1984秋，SK303；Biotec.Bioeng.，15，2921(1983)。
- 17) 国府田悦男；Biotec.Bioeng.，14，1596(1982)。
- 18) 太田欽幸；3)と同，“悪臭物質の微生物分解”，374(1983)。
- 19) 原田ら；衛生工学研究論文集，21，153(1985)。
- 20) 神野絃；日経バイオテク，1984.7.2，p.5。
- 21) 佐野寛，益田信雄；エネルギー・資源，4，508(1983)。