特集

酵素および微生物の固定化

バイオテクノロジーを適用した新しい効率的な水処理技術の可能性の夢が各所で語られ、種々の研究が進められています。酵素あるいは微生物の固定化は、その新しい技術の重要な柱になるものです。しかしながら、水処理技術の中に、この固定化技術を明解に位置づけるためには、さらに多くの研究開発が必要のようです。

本特集では、固定化技術の基本的な性格を、固定化に関して豊かな経験を持つ執筆者に論じていただきました。会員諸氏が、新しい水処理技術の夢の実現への指針を本特集から読みとられることを願う次第です。

(担当 大久保泰宏* 大垣真一郎**)

固定化とは***

戸 田 清

1. はじめに

バイオテクノロジーを、下水の生物処理プロセスに活用することによって、下水の処理効率を質的にも量的にも高めようとする計画が建設省などを中心に進められている。この場合のバイオテクノロジーの定義は、下水処理プロセスの開放的な性格からして、当然、遺伝子操作のような閉鎖的ないわゆるニューバイオテクノロジーに限定したものではなく、細胞融合、大量培養、バイオリクターを含む幅広いものである。バイ

オフィーカスと呼ばれるこの計画は、環境浄化能力に優れた菌を、自然界から分離するとか人工的に造成したりするとかして保存しておき、必要に応じて大量培養後この微生物群をリアクター内にできるだけ高菌体濃度になるように閉じ込めたり、活性汚泥の中に投入するなどの方法によって、在来の活性汚泥に含まれない高活性菌の利用を可能にすることを骨子としている。純粋培養あるいは集積培養した菌を、下水中汚染物質の生物分解反応のための触媒として用いることに特色がある。

本稿は、微生物を固定化して排水処理に用いる場合の長所、短所、問題点、対策等について概観しようとするものである。

2. 固定化とは

周知のように固定化の概念は酵素の不溶化に端を発している。高価な酵素を1回だけの回分反応で使い捨てにしないで、反応液から分離した後、次の反応に再使用できるようにすることを目的としたものである。繰り返し使用の間に固定した酵素が離れて反応液の中に溶け込んでしまっただけは困るので、イオン交換樹脂に物理的に吸着させるイオン結合型の固定化法よりも、

Kiyoshi Toda

昭和33年 東京大学農学部卒業
ミツカン酢、東京大学、東京
教育大学、名古屋大学を経て
55年 東京大学応用微生物研究所
教授
工学博士
〔趣味〕 社交ダンス

* Yasuhiro Okubo, 西原環境衛生研究所, 本誌編集企画委員

** Shinichiro Ogaki, 東京大学工学部, 本誌編集企画委員

*** Invitation to Immobilization, 昭和61年8月12日受理

化学試薬を用いて共有結合により担体と酵素を反応により1つの分子にしてしまう方法がよいと考えられ、諸種の化学的固定化方法が開発された。しかし、この方法で酵素を担体に固定する時に酵素の大半が試薬の作用や反応熱で失活してしまう欠点があって実用上には不満が残る。 κ -カラギーナンのようなゲルに酵素を包括する方法¹⁾はきわめて簡単な操作でほとんど100%の酵素活性を担体に固定できるが、カリウムのようなイオンが共存しないとゲルが反応液に溶解してしまう。最近光や放射線の作用で硬化する高分子合成化合物に酵素を固定化する方法が研究されている。

固定化の考え方は酵素に関して、このような形で展開してきたと思うが、微生物の固定化は、酵素を微生物から分離精製せずに菌体に含まれたままの酵素の袋として使用する点で変わりはないが、生き物であるという点で若干様子が違っている。酵素の場合は固定化時の失活が重要な問題であるが、微生物の場合は固定化時に少々失活しても、完全に死滅しない限り固定化した担体の中や表面で増殖させることができるので、この点はあまり問題にならない。その代わり好気性微生物の呼吸に必要な酸素を包括型担体の内部まで十分に供給することが困難であるという問題が大きい。また、担体の閉鎖系の中では菌の分裂令の若がえりがないため次第に比活性が低下せざるを得ない。

3. 活性汚泥法の特長

固定化微生物の技術を応用して下水の生物処理の効率を向上させるためには、現行の活性汚泥法による下

表1 活性汚泥法による下水処理の特長

- (1) フロック自己形成性かそのフロックに固着する凝集沈降性の微生物が優占種となって汚染物の除去をおこなっている。
- (2) 活性汚泥を処理水から自然重力沈降により濃縮して分離する。
- (3) 分離した活性汚泥の大部分を、曝気槽の入口にリサイクルして下水-汚泥混合液の活性汚泥濃度を高め、汚染物質の除去速度を促進する。
- (4) 微生物群および原生動物群からなる自然発生系である。
- (5) 微生物の呼吸代謝に基づく生物酸化が、汚染物質を除去する反応原理となっているため、多量の酸素の供給を必要とする。
- (6) 生物的適温よりも低い温度で操作することが多い。
- (7) 流入下水に含まれる基質の種類が雑多であり、概して、基質濃度が低く、基質濃度および流入下水の流量の変動が著しい。
- (8) 処理プラントを通過する液の混合特性がプラグフロー型ないし不完全混合流型であることが多い。

水処理の特性と問題点を明確にしておくことが必要である。まず活性汚泥法の特長として表1に掲げた諸点があげられる。

表1に示した活性汚泥法の特長のうち、その本質的な限界を打ち破るための対策として以下のことが考えられる。

(1) フロックを形成しない菌、フロックと親和性のない菌はいくら高い生物分解活性を持っていても、活性汚泥内に定着することができない。このような微生物を担体に固定化することにより排水中有機物の生物分解速度を向上させ、また処理排水から菌体の分離を容易にする、(2) 化学薬剤の添加やバイオペリマー生成微生物の共生により非凝集性微生物に強制的に沈降分離性を与える。この場合は活性汚泥の菌種相を人為的に調節できる利点はあるが、混合液からの菌の分離が凝集菌体の自然沈降分離によるため、曝気槽内の菌体濃度のある数値以上に高めることが困難であるので、混合排水中の菌濃度は活性汚泥法に比べて著しく改善されることにはならない、(3) 固定化菌として、例えば、基質飽和定数の小さい微生物を利用する(表1の7)とか酸素消費当たりの基質消費収率の大きい微生物を用いる(表1の5)ことが望ましいし、特異的に基質を消費する能力を有する菌を調合することに成功すれば、多様な組成の排水成分を総合的に除去することが期待できる(表1の7)、また(4) クリーニング用溶剤のテトラクロロエチレンとか農薬成分のBHCなど有機塩素化合物に代表される特殊な合成化学物質を分解する性質の菌を固定化して用いることにより集中的に目標物質を除去することが可能である。

4. 下水処理微生物の固定化

活性菌をリアクター内に高菌体濃度で閉じ込めて利用する方法には、固定化酵素の研究を中心に発展してきた諸種の蛋白固定化技術が応用される。また、特に微生物の固定化のため改良された方法も含めて、主なものを表2に掲げた。

表2 微生物固定化方法のタイプ

- (1) イオン交換樹脂のような担体に菌体を物理的に吸着させる。(結合力は担体側にある)
- (2) プラスチック板のような担体に付着させる。(吸着力は菌体側にある)
- (3) ゲルの内部に菌体を包括する。
- (4) 合成膜による濾過捕集等の方法で菌体をリアクター内に保持する。
- (5) 多孔性担体の微孔内で菌を繁殖させる。
- (6) 添加物(化学薬品、バイオペリマー形成微生物)の作用により非フロック形成菌をフロック化する。

表3 担体の条件

- (1)物理的に脆弱でないこと
- (2)沈降分離性がよいこと
- (3)調製が容易であること
- (4)安価であること
- (5)有効係数が1か1よりも大きいこと
- (6)生分解性がないこと
- (7)生物毒性がないこと
- (8)菌体活性の再生が可能か、長期連続使用で反応の安定性があること

微生物用の担体として注目されているものを列挙すれば、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、光硬化樹脂、ゼオライト、セラミックス、発泡煉石、抗火石、ポリエチレンラシヒリングなどゲル粒子と付着材を中心に試験研究が進められているが、微生物を固定するための担体として、表3に示す条件ができるだけ多く満たされていることが必要である。

下水処理放流水の水質改善と汚泥発生量の低減という建設省のバイオフォーカス計画の主要な二大目標の達成に、このように、所望の活性を有する微生物を担体に固着または包括する微生物固定化技術は有望な方法であることが期待される。しかしながら、新しい技術の応用にあたって何がよくなり何が悪くなるかを計量してバランスにかけ、これから展開するであろう事態を予測し、その対策をあらかじめ立てておくことが望まれる。

5. 固定化微生物の長所

微生物を固定化して用いることは、固定化微生物のタイプがゲル包括型か付着生物膜型かで違いがあるが、活性汚泥法に比べて表4に示すメリットがある。

(1)については、純粋培養で得た菌体を担体に固定し

表4 固定化微生物の長所

- (1)排水の性状にあわせて所望の微生物を選べる。
- (2)高い菌濃度を維持し、処理効率を高めることが可能である。
- (3)処理済液から分離して再利用することが容易である。
- (4)処理システムから菌が淘汰されるのを防ぐ。
- (5)毒性物質による阻害を受けにくい。
- (6)汚染物質の除去能が高いがフロック形成性のない菌を排水浄化に利用できるようにする。
- (7)汚染化学物質を分解するプラスミドを有する菌を固定化し、環境への放出を抑制するとともに多元的な浄化機能をつける。
- (8)活性汚泥のようにバルキングを起こして正常な操作が妨げられることがない。

図1 システムに導入した微生物の定着と消失

て用いる場合と、微生物分離源を直接担体に含ませて排水と混合接触させ、分解菌を担体内に集積させる場合がある。

(2)については、ゲル担体内の固定菌体濃度が 10^{10} 個/ cm^3 のオーダーの値に達したという報告²⁾がある。しかし、濃厚仕込みをしさえすればよいというわけではなく、担体内部で基質濃度が希薄になるため担体内の活性菌の比率が相当低くなることは避けられない。

(5)については、固定化微生物が遊離細胞に比べて毒性物質の影響を受けにくいことは、フェノール、シアンなどの有害汚染物質が混入する排水の処理に有利な点である。理論的な計算では、有効係数で数倍に分解速度が高くなることが予測されているが³⁾、実際の処理条件は計算に用いたデータと懸け離れていることが往々にしてあるから、注意する必要がある。

(7)について、近年組換体の環境への放出ならびに散布の論議が多くなってきた⁴⁾。環境浄化に組換体を利用する場合に、組換体自身の安全性が認定されたとしても、生態系に影響がないようにするために、できるだけ自然環境への放出は最小限にとどめるべきことは当然である。その意味で固定化微生物の形で使用することが推奨される。

図1は環境における組換体の挙動を示す。組換体を固定化する目的は2つあり、1つは環境内で特定の部分に集中し一種の封じこめを行うことと、もう1つは環境の定在菌により growth out されないように菌種のハーレムを形成させ菌集団としての純潔性を保持することである。固定された菌体の脱離増殖の比率はどの位か、ゲル包括、膜内固定、吸着材への付着、など固定化方法による菌の漏出、脱離の速度がどう違うかなどが課題である。

6. 固定化微生物の問題点

すでに、断片的に触れてきたが、固定化微生物の問題点を総括すれば表5のごとくである。

7. 固定化微生物の改良方法

表5 固定化微生物の問題点

- (1) 固定した菌の活性に寿命がある。
- (2) 定期的に固定化微生物の再生か交換が必要である。
- (3) 使用済みの担体の処分対策がある。
- (4) 活性のある菌体の増殖は担体の表面に限られる。
- (5) 漏出菌の担体外増殖が生ずる。
- (6) ゲル内で特に酸素拡散が律速になりやすい。
- (7) 安価で理想的な担体がまだ開発されていない。
- (8) 原生動物と細菌の捕食共生系が実現できない。
- (9) 浮遊性 BOD の捕集除去ができない。

固定化微生物の欠点を補強するためにいろいろ工夫が凝らされている。2, 3 の例を以下にあげる。

ゲル包括法は担体内の酸素不足が反応速度のネックになるので⁵⁾、ヘモグロビンとかパーフルオロ化合物⁶⁾の酸素吸着剤を担体内に仕込んで酸素濃度を富化する。

担体内にイオン交換樹脂とか活性炭のごとき吸着剤を仕込んで担体内の基質濃度を高めて反応速度を促進する。

ビーズ内拡散抵抗を機械的に低下させることのできる凝集分散性の固定化材料を開発する。

好気菌と嫌気菌または光合成菌⁷⁾のように適当な種類の菌を組み合わせると同一の担体に固定化し、coimmobilization により共生効果をあげる。

8. おわりに

バイオリアクターを活用した新排水処理システムの概念図をまとめると図2のごとくなる。

有用菌をゲルに固定化して、充填床、流動床型の反応器を用いて下水処理を行うのは、経済性の評価を問題にしなければ、容易に実行できると考えられる。しかし、ゲル内拡散抵抗、反応の安定性、使用済担体の処理法など、実用化する上で問題点が残されている。

担体に微生物を付着増殖させたものを排水処理に使う方法はさらに実行しやすいが、付着生物膜が肥厚すると付着面近傍が嫌気条件になって剝離脱落するのが難点であり、また、組換体などを環境になるべく拡散させることなく排水処理微生物として利用しようとする場合の固定化の目的にはあわない。

固定化微生物を組み込んだバイオリアクターを使用する目的は、活性汚泥法の代用品として利用する場合

図2 バイオテクノロジーを利用した新排水処理システム

と、活性汚泥法が不得意とする、たとえば特殊な汚染化学物質などの除去処理に応用する方向の2つがある。後者の方向、つまり活性汚泥法の負担しきれない部分を補完する役割をバイオリアクターに求める方が実行しやすいと考えられる。

文 献

- 1) Takata I., Tosa T., Chibata I. (1977) Screening of matrix suitable for immobilization of microbial cells. *J. Solid-Phase Biochem.*, 2, 225-236.
- 2) Dhulster P., Barbotin J-N., Thomas D. (1984) Culture and bioconversion use of plasmid-harboring strain of immobilized *E. coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 87-93.
- 3) Moo-Young M., Kobayashi T. (1972) Effectiveness factors for immobilized enzyme reactions, *Can. J. Chem. Eng.*, 50, 162-167.
- 4) Halvorson H.O., Pramer D., Rogul M. (1985) Engineered organisms in the environments: Scientific issues, American Soc. for Microbiol., Washington, D. C.
- 5) Toda K., Sato K. (1985) Simulation study on oxygen uptake rate of immobilized growing microorganisms, *J. Ferment Technol.*, 63, 251-258.
- 6) Adlercreutz P., Mattiasson B. (1982) Oxygen supply to immobilized cells. 3. oxygen supply by hemoglobin or emulsions of perfluorochemicals, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 165-170.
- 7) Adlercreutz P., Holst O., Mattiasson B. (1982) Oxygen supply to immobilized cells: 2. Studies on a coimmobilized algae-bacteria preparation with in situ oxygen generation, *Enzyme Microb. Technol.* 4, 395-400.