

総 合 論 文

平成19年度 生物工学賞 受賞



嫌気微生物による有用物質生産と 環境浄化・エネルギー回収への応用

西尾 尚道



Production of Useful Materials by Anaerobes and Its Application for Environmental Protection and Energy Recovery

Naomichi Nishio (*Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530*) *Seibutsu-kogaku* **86**: 2-11, 2008.

1. 発酵工学から環境バイオテクノロジーへ

筆者は広島大学工学部醸酵工学科に教務員、次いで助手として上久保 正先生の指導のもとで、炭化水素発酵によるビタミンB群の生産を行ったのが、微生物との係わりの始まりであり、上久保先生が京都大学に異動された関係で、京都大学より「非糖質炭素源からのB群ビタミンの微生物生産」で農学博士を取得した。その後、東京大学から教授として異動されてきた永井史郎先生のもとで、当初メタノール資化性細菌などを用いて、主として好気培養系における有用物質生産およびその解析を行ってきた。その後、その当時ヨーロッパを中心に嫌気微生物処理およびメタン生成菌など嫌気性菌の単離が活発に行われるようになったので、永井先生からこれからは嫌気微生物を中心に研究展開してはどうかと勧められた。それを受けて、ミカン外皮の嫌気酸発酵による有機酸生産の論文を初めて発表してから、「メタン生成菌の増殖特性とその機能の利用」の照井賞受賞まで、嫌気性菌の研究にシフトした。以来、環境・エネルギー分野にもインパクトのある嫌気性菌の研究に嫌気もささずに没頭しており、かれこれ30年近くが経過する。

嫌気性菌の利用について考えてみると、わが国は古くから発酵産業が盛んであるが、近年は医薬品、アミノ酸、核酸、酵素生産など好気性菌の利用にシフトしている。しかし、自然界には嫌気性菌が圧倒的に多い上に、嫌気性菌の培養は通気を必要としないので省エネルギー的である。

そこで、主としてメタン発酵エコシステム中の嫌気性微生物を用いて、その代謝系を利用した有用物質生産系の開発を行った。一方で、メタン発酵系は自然界における嫌気的環境浄化法である上にエネルギーも回収できるので、その処理およびエネルギー回収の高速化および効率化を図った。さらに水素発酵の導入および乾式アンモニア発酵の導入による新規な処理システムを提案した。以下、これらの2分野の研究概要をまとめる。

2. 嫌気微生物による有用物質生産

自然界は嫌気条件の方が圧倒的に高く、その微生物種も数多い。その中で、図1に示すようにメタン発酵エコシステムは少なくとも加水分解菌群、有機酸発酵菌群、水素生成・酢酸生成菌群およびメタン生成菌群からなる複雑な複合微生物系を形成しており、嫌気微生物の宝庫と言える¹⁻²⁵⁾。そこで、このメタン発酵系から微生物を単離し、あるいは保存機関から取り寄せ、図1の各種微生物を用い各種有用物質の生産を試みた。以下に興味ある点を紹介したい。

2.1 水素発酵 水素は次世代のクリーンエネルギーとして脚光を浴びている。古くからアセトン・ブタノール発酵菌である *Clostridium acetobutylicum* は発酵前段で酢酸、酪酸と共に水素を生成することは知られている。しかし、生成水素により阻害を受け、アセトン・ブタノールに代謝変換する。

また、光合成細菌はヒドロゲナーゼあるいはニトロゲ

加水分解・酸発酵菌 水素生産: *Enterobacter aerogenes*¹⁻⁵⁾
R,R-2,3-ブタンジオール生産: *Paenibacillus polymyxa*⁶⁻⁸⁾
エチル(R)-3-ヒドロキシ酪酸生産: *Paracoccus denitrificans*⁹⁾
セルロース分解: *Neocallimastix frontalis*^{10,11)}
デンプン分解: *Pyrococcus friosus*¹²⁾

水素・酢酸発酵菌 セルロースから酢酸生産: *Clostridium thermoaceticum*^{13,14)}
酢酸及びB12生産: *Acetobacterium* sp.^{15,16)}
水素・二酸化炭素から酢酸・エタノール生産: *Moorella* sp.¹⁷⁻¹⁹⁾

メタン生成菌 コリノイド生産, 二酸化炭素・ギ酸相互変換, 補酵素還元:
*Methanosarcina barkeri*²⁰⁻²²⁾
水素・二酸化炭素からメタン生産: *Methanobacterium*
thermoautotrophicum^{23,24)}
酢酸からメタン生産: *Methanosaeta concilli*²⁵⁾

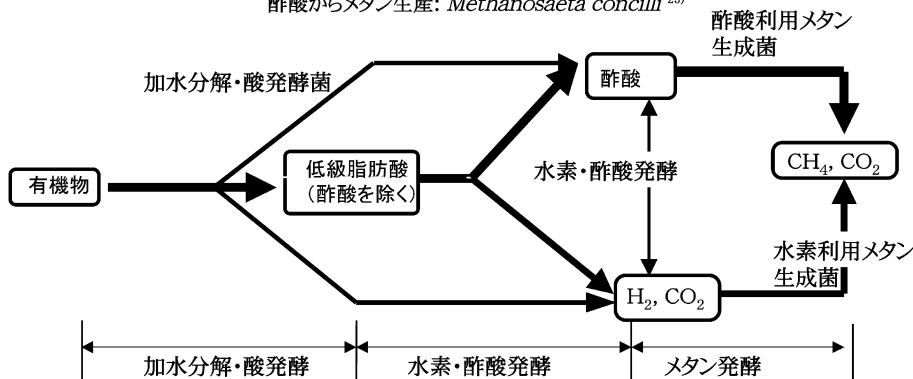


図1. メタン発酵エコシステム中の微生物による有用物質生産

ナーゼを用いて水素を生成する。光合成細菌による水素生産は世界に先駆けてNEDOプロジェクト「環境調和型水素製造技術研究開発」が精力的になされてきた。しかし、水素生成速度はそれほど高くない。そこで、水素発酵菌の探索を行った。図1に示したようにメタン発酵系には水素生産微生物が必須となっている。そこで、下水処理場から消化汚泥を持ち帰り、これを水素発酵微生物源として、グルコース単槽ケモスタット培養を行い、希釈率をどんどん上げてゆき、高速水素生産菌の馴養を試みた。最終的にロールチューブ法により単離し同定した。その結果は何の変哲もない通性嫌気性細菌、*Enterobacter aerogenes* HU 101であった¹⁾。しかし、本菌は水素阻害を受けないこと、各種糖類を利用できること、生成速度が高いことなどの利点を有している。しかし、水素収率が低い欠点があったので、収率向上を目指して変異株の取得を試みた。*Enterobacter*属はいわゆる混合酸発酵を行い、水素、ギ酸、酢酸、乳酸、ブタンジオール、エタノールを生成する。そこで、乳酸生産を抑えるためにプロトン自殺法、ブタンジオール生成を抑えるためにアリールアルコール法を用いた。その結果、二重変異株（AY-2）で水素収率を野生株の2倍の1.2 mol/molグルコースまで増加できた¹⁾。収率の向上は引き続き行っており、アセト乳酸シンターゼ阻害のスクリーニングにより1.8 mol/molグルコース²⁾へ増加できた。本菌を用いてのほぼ理論収率に達した。しかし、本菌は大腸菌などと違って、

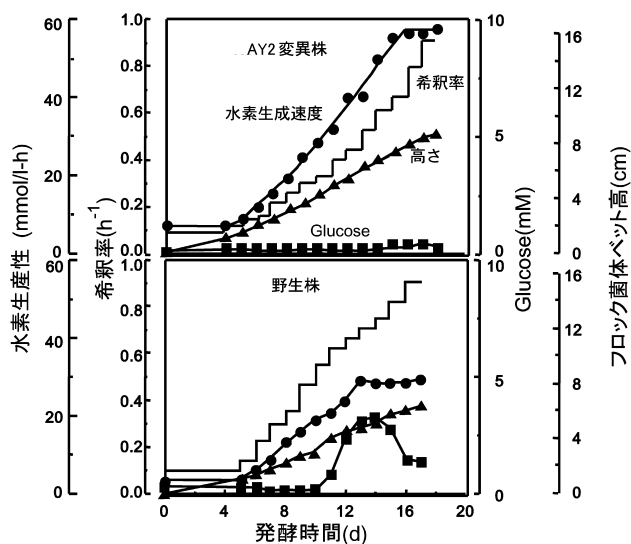


図2. *E. aerogenes*によるグルコースの水素発酵

NADHから直接水素を生成する系を有している³⁾。したがって、本菌をホモ酢酸菌に仕上げれば、水素収率は最大の4 mol/molグルコースとなる。さらに収率向上を目指している。一方、本菌はフロック形成能が高く、UASBリアクターで容易に生産速度を向上できる。図2に示したように、前述のAY-2ではこのフロックを利用した連続培養（メタン発酵のUASBグラニュールに類似）の希釈率は0.9 h⁻¹とメタン発酵に比べて非常に高く（処理時間として1時間）、生産性を約60 mM/hと飛躍的に向上で

きた⁴⁾。このことは、微生物をうまく制御できれば高速水素発酵は可能であり、嫌気処理系、つまりメタン発酵に導入できることを意味する。この点は、後で有機排水の水素・メタン二段発酵システムにて言及する。

2.2 高濃度・高速ビタミンB₁₂関連物質の生産系の開発

発 ビタミン B₁₂ は発酵法で生産されているが日本は残念ながら輸入に頼っているのが現状であり、独自の発酵生産技術の開発が望まれている。現在、プロピオン酸菌などの変異株を用いて生産されているようである。プロピオン酸菌の場合、酢酸およびプロピオン酸の生成物阻害が高濃度生産の障害となる。さて、偏性嫌気性のメタン生成菌 *Methanosarcina barkeri* は安価なメタノール炭素源で増殖し、生成物はガス状のメタンであり生成物阻害はない。また菌体内 B₁₂ 化合物含量は高い（野生株のプロピオン酸菌の 10 倍）。しかし、偏性嫌気条件下での高濃度培養の実績は皆無であった。かくして、メタノール流加繰り返し回分培養系による高濃度菌体培養にチャレンジした。まず、使用培地の改善を図った。これまで、メタン生成菌の S 源としては硫化物が用いられてきたが、使用濃度範囲が狭いこと、増殖必須金属と不溶性の塩を形成することなど不向きであったので S 源の検討を行った。その結果、システインを見いだしたと同時にシステインの代謝系も明らかにした²¹⁾。このシステイン改良培地を用いての *M. barkeri* の繰り返し流加回分培養結果を図3に示す²⁰⁾。本菌の B₁₂ 化合物生産は 135 mg/l の高い値を示した。さらに興味深い点として、生産された B₁₂ の大部分（70%）は菌対外に蓄積した。つまり、補酵素の分泌発酵に成功した。しかし、生産された B₁₂ 化合物は不完全型のコビンアミド（FB）であり、完全型も 5-ヒドロキシベンズイミダゾール塩基を含む FIII であった（B₁₂ は 5, 6-ジメチルベンズイミダゾール塩基を含む）。さらに、多孔性無機担体を充填した固定床バイオリアクターを用いて B₁₂ 生産性を試みた結果、図4に示したように、2.3 時間の滞留時間、メタノール消費速度 72 g/l/日の条件で、61 mg/l/日を得た²²⁾。このように嫌気性菌はエアレーションを必要としないため、簡単な培養装置で培養できる。さらに、この固定床系は培地中の Co, Fe, Ni 濃度により、対応する B₁₂、ヘム、F₄₃₀ 生産濃度を調整できることを見いだした²⁶⁾。この場合も B₁₂ は主として FB が菌対外へ分泌されていた。そこで、いわゆる B₁₂ への生物変換をいろいろ試みたが成功せず、このメタン菌による B₁₂ 生産方法は日の目を見なかった。一方、嫌気性ホモ酢酸生成菌 (acetogen) に属する *Acetobacterium* sp. はまさに B₁₂ を菌体内に高含量蓄積する。そこで、グルコースからの B₁₂ 生産¹⁵⁾、メタノール・ギ酸系での連続培養解析¹⁶⁾を行った。確かに B₁₂ であり、菌体内含量は

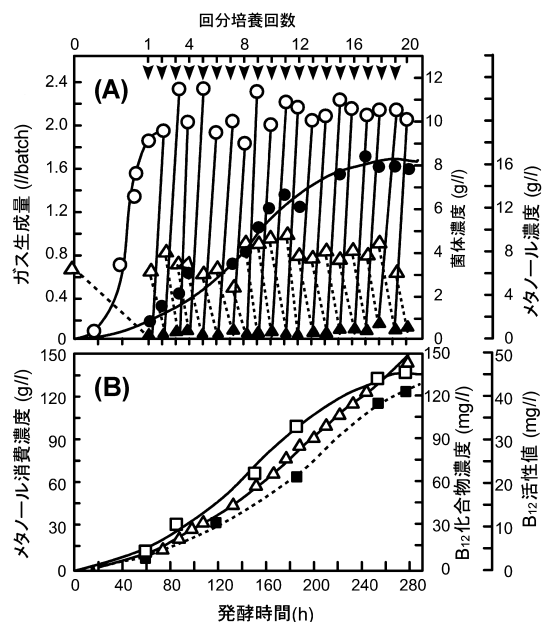


図3. *M. barkeri* の繰り返し流加回分培養。A: ○, 回分培養当たりのガス生成量; ●, 菌体量; △, メタノール; ▲, 残存メタノール; 矢印, メタノール添加; 破線矢印, メタノール含有濃縮培地添加。B: □, B₁₂ 化合物量; ■, B₁₂ 活性 (*E. coli* 215 バイオアッセイ値); 全メタノール消費量。

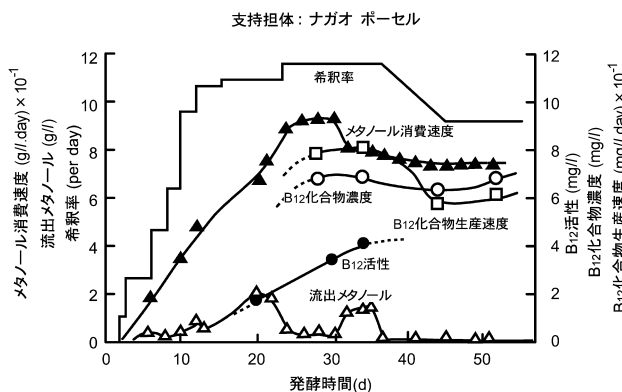


図4. 固定床リアクターによる *M. barkeri* のメタノールからの高速ビタミン B₁₂ 発酵生産

5 mg/g 菌体と高かったが、生成酢酸阻害により、高濃度培養は困難であった。そこで、生成酢酸消費系としてメタン生成菌 *Methanosaeta concilii* を選び、循環連続培養系を構築した。*M. concilii* の比増殖速度は *Acetobacterium* の 10 分の 1 であり、通常の混合連続培養では *M. concilii* の保持が困難である。そこで、まず *Acetobacterium* のメタノール・ギ酸（あるいは CO₂）下での回分培養系をセットし、酢酸が阻害濃度に達した時点で別途調整した *M. concilii* の高濃度固定床バイオリアクターと循環した。固定床側の pH が上昇した時点で *Acetobacterium* リアクターを pH スタット連続培養系とした。つまり、*M. concilii* によって酢酸が消費されるならば pH が上昇することになり、培

地が自動供給される。本 pH スタット二槽二菌循環培養系により B₁₂ 生産性を回分培養に比べて 20 倍増加できた²⁵⁾。さて、*Acetobacterium* の酢酸生成経路とメタン生成菌のメタン生成経路は、最終部分以外は類似しているので、真の B₁₂ を生産する *Acetobacterium* をメタンを生成するように改変すれば、あるいは *M. barkeri* の FIII および FB 生成系を真の B₁₂ へ改変できれば、有機廃水の嫌気処理系（メタン発酵）でエネルギーを回収しつつ B₁₂ 生産が可能となる。将来の技術開発に期待したい。

2.3 メタン、水素、二酸化炭素などバイオガスを基質とした有用物質生産 メタン生成菌および水素生成酢酸菌は地球温暖化の元凶である二酸化炭素を還元できる。そこで、まず単離したギ酸資化性メタン生成菌による H₂・CO₂ と蟻酸の相互変換系^{27,28)}を開発した。水素は輸送がコスト高となるが、ギ酸として輸送し、再度水素に変換できる。将来の水素社会の構築に寄与できよう。またメタン生成菌 *M. barkeri* は CO を蟻酸へ還元できる²⁹⁾。このことは、バイオマスなどからできる合成ガスの利用拡大につながる。還元型補酵素は高価であるので、H₂ の有効利用法として NADP の NADPH への還元の新規反応を開発した³⁰⁾。これにより還元型補酵素の供給が可能となったので、酵母 *Candida pelliculosa* との休止菌体共役系によるキシロースのキシリトールへの水素による生物還元が可能となった^{31,32)}。最近、バイオマスからのバイオエタノール生産が世界中で脚光を浴びているが、デンプン系からでは食料・飼料と拮抗することになり、実際価格問題が生じている。一方、木質系からだと糖化技術とリグニン利用が問題となる。その点、バイオマスあるいは石炭など非バイオマスをいったんガス化（合成ガス）し、このガスからバイオエタノール生産が可能となれば、原料の違いがまったくなくなる。この観点から、米国では中温菌の *Clostridium ljungdahlii* による合成ガスからのバイオエタノールのモデルプラントが動いている。新たに自然界から単離・同定した高温ホモ酢酸生成菌 *Moorella* sp. は少量ながら酢酸以外にエタノールを生産し得る^{33,34)}。さらにエタノール生産遺伝子も明らかにできた³⁵⁾ので、現在遺伝子操作改変株による高濃度生産に挑戦している。

2.4 光学活性化合物の生産 嫌気性菌は、多くの場合、複数の有機酸およびアルコールを最終産物として生産する。そこで、光学活性体生産をターゲットに研究を行った。*Paenibacillus polymyxa*⁶⁻⁸⁾を用いてグルコースからの (R,R)-2,3-ブタンジオールを行った。図5に見られるように、グルコースの流加培養において、637 mM の 2,3-ブタンジオールを対グルコースモル収率 0.81 で得ることができた⁶⁾。ここに至るまでの詳細を説明する。本

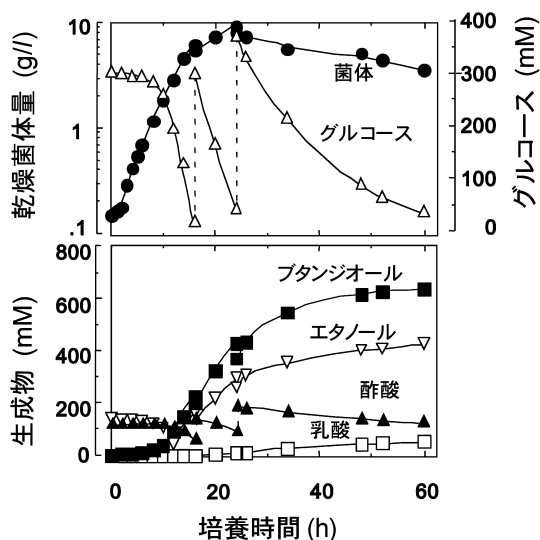


図5. グルコースおよび酢酸の間欠流加培養による *P. polymyxa* の光学活性 2,3-ブタンジオール生産

菌はグルコースの回分培養では 300 mM のグルコースから 174 mM のブタンジオールを生産する（モル収率 0.58）。しかし、グルコースと共に酢酸を添加すると酢酸はエタノールとなるが、その間に補酵素 NADH を酸化する。したがってグルコースからのモル収率は 0.87 に増加するとともに生産濃度が 248 mM に増加した。このことを利用した流加培養結果が図5である⁶⁾。本菌は培養温度 39°C ではキシロースも利用できる⁷⁾。さらに、グルコースおよびキシロースの流加培養が可能である。グルコースを優先的に利用するが、キシロール利用時に酢酸を生成し、この酢酸をグルコース利用時に利用でき、図5に見られたように、外から酢酸を加えることなくジオール濃度を増加できた⁸⁾。そのほか光学活性体生産に関しては、*Paracoccus denitrificans*⁹⁾を用いて硝酸存在化でのエチルアセト酢酸の R-3 ヒドロキシ酪酸への不斉還元を試み、高い光学純度を得た。

3. 環境浄化・エネルギー回収への応用

3.1 酸発酵系の解析および高速処理化 図1に示したようにメタン発酵系は大きく分ければ、酸発酵とメタン発酵に大別される。単槽メタン発酵では、これらの二発酵を一槽で行うため、低速処理を余儀なくされているという点がメタン発酵の最大の欠点である。そこで、高速化を目指して、メタン発酵系の前段に位置する有機酸発酵系の解析を、みかん廃棄物を用いて行った³⁶⁾。その結果、みかん廃棄物の可溶化・酸発酵は高速であり、1日の滞留時間で主として酢酸を生成することを明らかにした。また、酢酸あるいは酪酸の液膜による抽出発酵を試みた。すなわち、TOPO（トリオクチールフォスフィ

ンオキシド) 含浸パラフィン膜を介して非解離の酸の抽出特性を解析し、TOPO-ケロシン含浸液膜抽出発酵法を開発した³⁷⁾。超好熱菌、*Pyrococcus furiosus* は、最適温度 98°C の超好熱でデンプンから水素と酢酸を生成する。しかし、生成物阻害により高濃度酢酸生成は困難であった。そこで、まずデンプン廃液の流加培養を実施し、生成酢酸による阻害が起り始めた時点でセラミックフィルターを内蔵したろ過培養系を組み込み、デンプン廃液の酢酸除去灌流培養法を開発した¹²⁾。

3.2 メタン発酵系の解析 各種基質を用い解析を行った。特にプロピオン酸³⁸⁾ および酢酸³⁹⁾ のメタン発酵系を選び、水素、酢酸およびプロピオン酸の阻害の動力学的解析を行い、阻害の重要性および程度を明確にした。その結果、たとえばプロピオン酸の K_i 値は 58 mg/l の非常に低い値であり、メタン発酵を順調に進行させるにはプロピオン酸の蓄積をいかに防ぐかを定量的に示した。

3.3 メタン発酵の高速化 嫌気廃水処理(メタン発酵)は、高濃度廃水に適用できること、通気を必用としないこと、余剰汚泥が少ないこと、メタンが回収できることなど多くの利点を有しているが、最大の欠点は処理速度が遅く、大容量の処理槽を必用としていた点である。近年欧米を中心に UASB 法などの高速処理法が開発されてきた。要は高濃度の微生物をいかに処理槽内に保持するかである。そこで、まず固定床法として知られているセラミック担体充填リアクターによる H_2 ⁴⁰⁾ ギ酸および酢酸⁴¹⁾ の高速メタン化を達成した。さらに、メタン発酵系の下流から順番に、つまりプロピオン酸⁴²⁾、乳酸⁴³⁾、グルコース⁴⁴⁾ を用いて UASB メタン発酵法を実施し、いずれも高速処理可能であるが、グルコースの場合、酸発酵が進みやすく他のものより低速処理を余儀なくされることを明らかにした。加えて灰分、菌体外ポリマー、微生物解析などから生物顆粒(UASB グラニュール)形成機構を明らかにした。さらに、この UASB 法をフェノール排水に用い、高速処理を達成できた⁴⁵⁾。また、海洋低泥ヘドロの酢酸発酵・UASB メタン発酵二段循環処理システムを研究開発した⁴⁶⁾。

3.4 メタン生成菌の培養と増殖特性の解析 前述のごとく、高濃度培養系に不向きなメタン生成菌の S 源について検討した。*M. barkeri* および高温性水素利用メタン生成菌、*Methanobacterium thermoautotrophicum* を用いた。その結果、システインが有効であることを見いだした^{21, 47)}。システインはシステインでヒドラターゼにより代謝されピルビン酸となり、菌体収率の向上にも寄与した。これまでメタン発酵系は低い酸化還元電位であることはよく知られていたが、実際、*M. thermoautotrophicum*

および *M. barkeri* で、低酸化還元電位 (−430 mV) が必要であった⁴⁸⁾。 $H_2 \cdot CO_2$ 供給法としてホローファイバーが有効であることを明らかにした。これによりメタンへの変換速度 33 l/l/日を得た⁴⁹⁾。メタン生成菌は最小培地でも増殖可能であるが菌体収率は好気性菌に比べてきわめて低い。このことは廃水処理では余剰汚泥の排出が少なく有利となる。しかし、純粋菌の高濃度培養および培地の最適化研究は少ない。まず、*M. barkeri* を用いて実験計画法に基づいて培地の最適化を行った。その結果、ガス生成速度を倍加できた⁵⁰⁾。また、生成ガスを指標にした流加培養法も開発し、175 時間の培養で 24 g/l の高濃度培養を達成できた⁵¹⁾。

3.5 人為的微生物コンソーシアムによるセルロースからのメタン生成 上記のごとく、固定床あるいは UASB 法を用いて多くの化合物が高速処理可能である。これらは総説に示している⁵²⁾。しかし、セロース化合物は固形物の分解が遅いため UASB 法を用いることができないし、菌叢との接触が悪いため固定床も用いることができない。ところが反芻動物は、たとえば牛、羊は反芻胃にセルロース分解菌を共生されることにより、効率的なセルロース分解を行っている。そこで、セルロース分解菌として、偏性嫌気性糸状菌、*Neocallimastix frontalis* を選び、各種セルロース基質の分解を試みた。確かに優良なセルロース分解菌であり¹⁰⁾、高濃度セロース粉末 (32 g/l) を分解でき、主生成物として水素、ギ酸、乳酸、酢酸、エタノールを生成した¹⁰⁾。そこで、人為的 3 種微生物コンソーシアムによるセルロース粉末のメタン化を試みた¹¹⁾。つまり、水素およびギ酸をメタンへ変換する *Methanobacterium formicicum*、酢酸をメタンへ変換できる *Methanosaeta concilii* との 3 種共生系の確立を試みた。結果を図 6 に示す。図のように水素、ギ酸、乳酸およびエタノールの生成を低レベルに保ちながら、メタン生成が可能となった。すなわち種間水素移動により、*N. frontalis* は、より酢酸生成に代謝シフト(乳酸およびエタノールの減少)し、単独で生成する酢酸および水素から生成されるメタン量よりも大量のメタン生成が可能となった。とはいえ、酢酸からのメタン生成、つまり *M. concilii* によるメタン生成が依然として律速になっており、さらに工夫を要する。結論的には、基質に対応する加水分解菌を選択することにより、人為的にメタン発酵微生物コンソーシアムを構築しうることを示しており、将来、人工 UASB グラニュール形成の一助となるであろう。

3.6 固体廃棄物の高速嫌気消化法の開発 近年有機排水のメタン発酵処理法は広く普及するに至っている。特に食品排水ではよく用いられており、ビール排水では UASB メタン発酵法が普及している。今日では、各

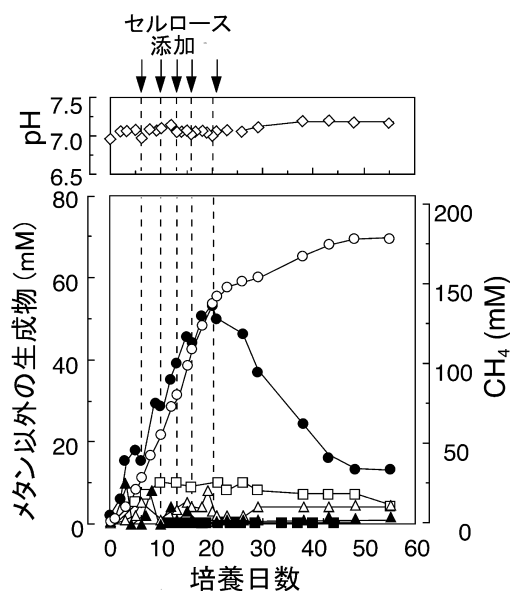


図6. *N. frontalis*, *M. formicicum* および *M. concilii* の3種共生コンソーシアムによる粉末セルロースのメタン発酵。○, メタン; ■, 水素; □, 乳酸; ●, 酢酸; △, エタノール; ▲, ギ酸。

種リサイクル法が施行されているので、有機廃棄物へその対象が移っている。そこで、経済産業省の地域新生コンソーシアムの採択を受けて、生ゴミの二段メタン発酵の実証試験を実施した。まず、みかん外皮の酸発酵技術³⁶⁾を用いて可溶性・酸発酵を行い、ついで主として生成した酢酸含有液の固定床方式⁴¹⁾メタン発酵を採用し実施した。この酸発酵・メタン二段発酵は海洋底泥有機ヘドロの除去にも適用した。結果を図7に示す⁴⁶⁾。

まず、ヘドロを酸生成槽へ投入し酸発酵を行った。図に見られるように pH の低下と酢酸蓄積が見られる。この時点で別途酢酸のメタン発酵用に調製した UASB メタン発酵槽と連結した。酸生成槽での酢酸消費、およびそれに伴うメタン生成槽でのメタン生成が見られる。この時点でヘドロを入れ替え、同様な実験を後2回行った。いずれも良好な結果が得られている。酸生成槽に微量のビタミンを添加することにより、酸発酵を酢酸生成にシフトすることができた。このことは余剰濃縮汚泥にも適用でき、汚泥の酸発酵処理として事業化されている(特許第3683518号：汚泥処理装置および汚泥浄化処理法)。

さらに、国内で乾物ベース、年間200万トン排出されている余剰脱水汚泥の乾式メタン発酵の実証試験も行った(広島県産学官協同プロジェクト)^{53,54)}。これについては独自の方式なので詳細を述べたい。有機汚泥のような高窒素含有有機物では、酸発酵過程でタンパク由来のアンモニアを必ず生成する。このアンモニアのメタン生成阻害のため、通常は濃縮汚泥(固形物濃度=3%程度)を用いて湿式メタン発酵処理する。あるいは脱水汚泥(固

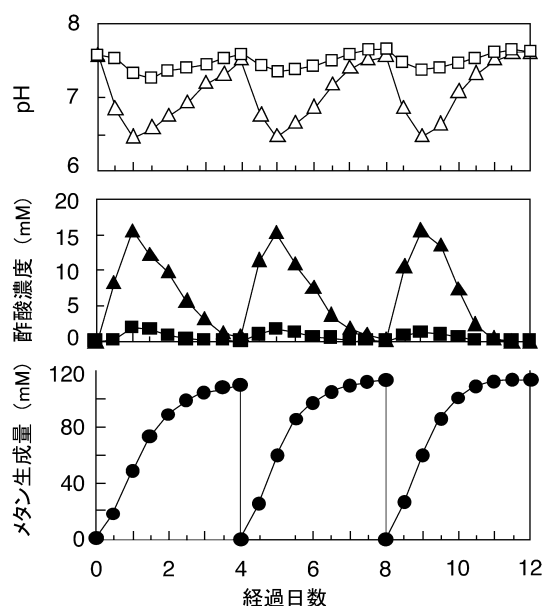


図7. 底泥ヘドロから酢酸発酵・UASB メタン発酵処理システムのプロファイル。△, 酢酸発酵槽のpH; □, UASB メタン槽流出液pH; ▲, 酸発酵流出液酢酸; ■, UASB メタン槽流出液酢酸; ●, UASB メタン槽メタン生成。

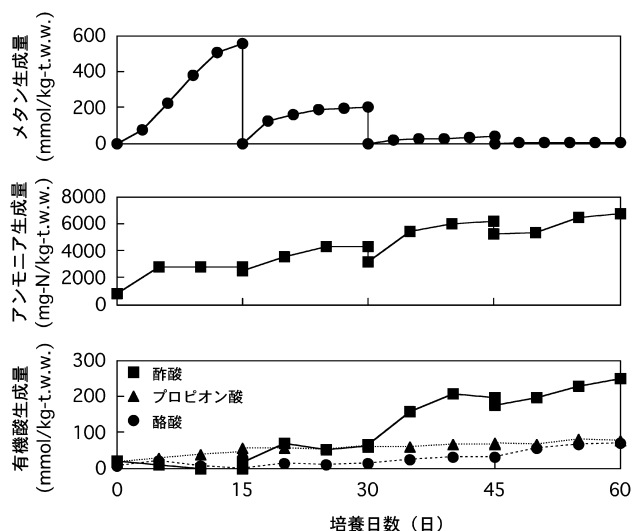


図8. 余剰脱水汚泥の乾式半連続メタン発酵

形物濃度=20%)を用いる乾式メタン発酵の場合は炭素含量の高い剪定枝、段ボール、古紙などを同時投入し、発生アンモニア濃度を下げて実施されているのが現状である。つまり、脱水汚泥単独の乾式メタン発酵は前例がない。実際脱水汚泥単独でメタン発酵を実施した場合、図8に示すように、最初の回分培養では生成アンモニアが少いためメタン発酵は進行する。しかし、半連続運転が進行するにつれアンモニア生成は順調に起るので、アンモニアがどんどん蓄積することになり、最終的にメタン発酵は完全に停止した。そうであれば、逆にアンモニア発酵をもっと促進し脱アンモニア汚泥を用いれば、

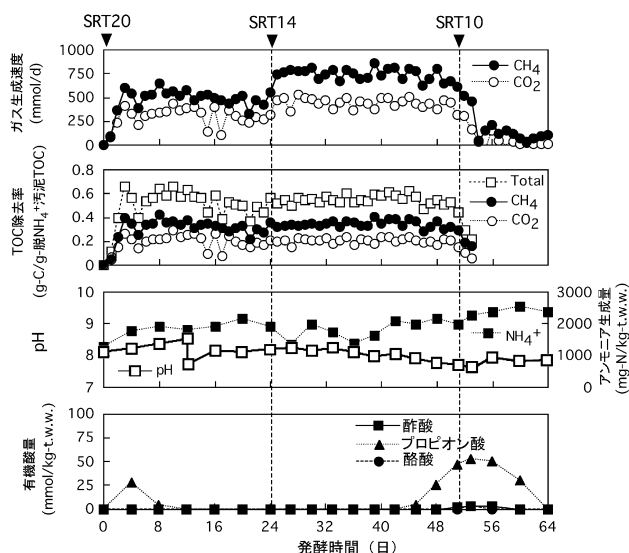


図9. 乾式アンモニア生成・脱アンモニア汚泥の乾式メタン発酵

汚泥単独でも乾式メタン発酵可能と考察した。実際脱アンモニア汚泥の乾式メタン発酵を図9に示す^{52,53}。図中のSRTは脱水汚泥の滞留時間である。つまり、実験室規模では脱アンモニア汚泥を使えば、乾式条件でもSRT14時間で運転可能なことを示している。ちなみに汚泥の湿式メタン発酵の処理時間、滞留時間は平均で30日である。ベンチプラント（100 kg/日処理規模）でもほぼ同様な結果を得ることができた。現在、NEDO補助金で鶏糞を対象に事業化を急いでいる。

さて、有用物質生産の項で水素発酵は高いポテンシャルを有していることを示したが、実際の嫌気処理分野での利用を考えたい。水素生産は現在天然ガス改質、メタノール改質あるいは直接高炉ガスから得られている。カーボンニュートラルなバイオマス資源からの生産が望まれる。水素発酵は図1に示した通り、嫌気処理ではメタン発酵の前段に位置し、固形有機物の可溶化および酸発酵も可能である。このような観点から、水素・メタン二段発酵を提唱している。つまり、生成メタンを改質して水素を得るのではなく、廃棄有機物から直接水素を得、燃料電池で電力変換できる。生成メタンは二槽リアクターの保温に用いる。当然二槽を必要とするので、一見無駄のように思えるが水素発酵はメタン発酵よりも格段に高速であり可溶化も促進するので、結果的には処理槽の小型化が図れる。具体例を図10に示す。

食品廃棄物のモデルとしてパン廃棄物を選んだ（国内で年間10万t排出）。100 g/l濃度にけん濁し、55°Cで可溶化・水素発酵を実施した。その結果を図11に示す^{52,54}。pH7に制御した場合、24時間で可溶化率91%、水素240 mM、水素収率2.4 mmol/ 廃棄パンを得た。可溶化液はTOC20000ppm、酢酸および酪酸各々150 mM 含んでお

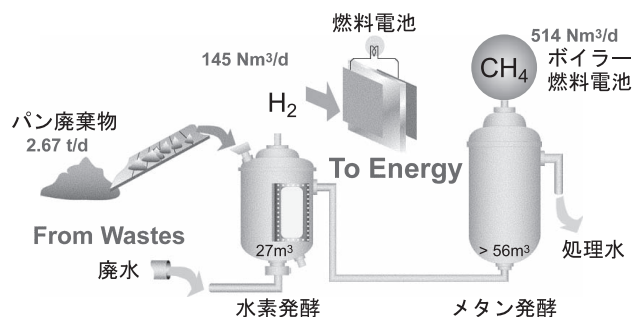


図10. パン廃棄物の水素・メタン二段発酵イメージ

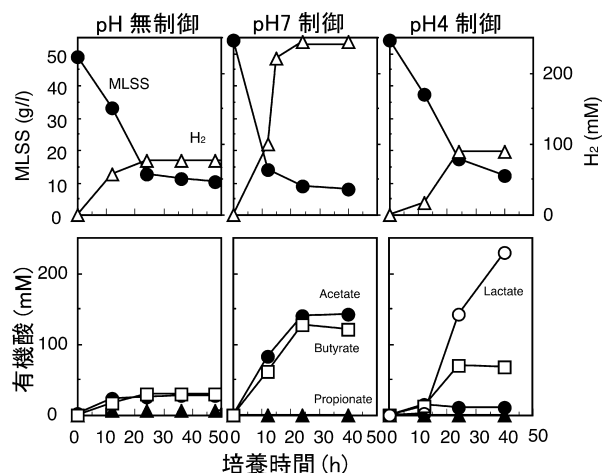


図11. パン廃棄物の水素発酵

り、良好なUASBメタン発酵液となる。実際、固液分離液をUASBリアクターに通液し、滞留時間2時間でメタン収率8.6 mmol/g 廃棄パンを得た。したがって、図10に示したように、2.67 t/日の廃棄パンを嫌気処理するのに、約30 m³の水素発酵槽および60 m³のUASBメタン発酵槽を要し、3日で水素145 Nm³/日の水素および514 Nm³/日のメタンを得ることが可能と見積もられた^{52,54}。今、国内では木質系からの液体燃料（エタノール発酵）生産研究および事業化が盛んに行われているが、次世代のクリーンエネルギーの水素発酵も鋭意研究開発、事業化すべきであると考え。環境省地球温暖化事業が採択されたので、実用化に向けて努力している。同時に燃料電池の低廉化が強く求められる。

一方、バイオマスからのバイオディーゼル生産もヨーロッパを中心に盛んになっているが、さらに盛んになれば副産物のグリセロール廃水も飛躍的に増大し、新たな環境問題となる。前述の水素発酵の高いポテンシャルを持っていた *E. aerogenes* の最良基質はグリセロールである³⁾。そこで、グリセロール廃水を用いて *E. aerogenes* による水素発酵を行った。まず、回分処理結果を示す。バイオディーゼル廃液中のグリセロール濃度は400 g/lとあまりにも高いため10 g/lとなるよう水で希釈し処理し

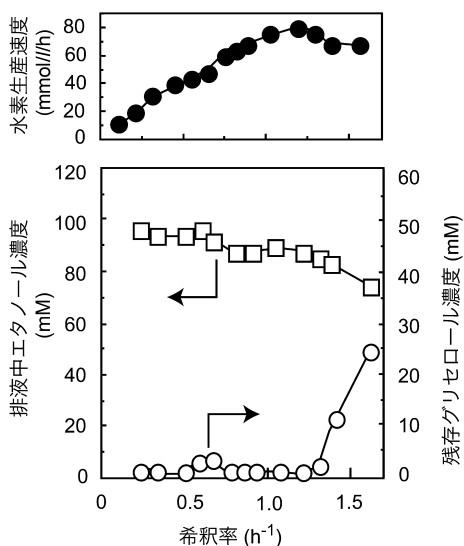


図12. グリセロール含有バイオディーゼル廃水の *E. aerogenes* による水素・エタノール発酵

たが、48 h 処理でもグリセロールの全量消費が見られなかった。しかし、酵母エキスおよびトリプトンを含む複合培地で同グリセロール濃度に希釈した場合、24 h 処理で全グリセロールを消費し、水素収率 0.89 mol/mol およびエタノール収率 1.0 mol/mol を得た。微生物処理では成分不足が明らかとなった。また、グリセロール濃度を 1.7, 3.3, 20, 25 g/l に調製し、培地成分を加えて処理した場合、グリセロール濃度の増加、つまり希釈の減少と共に水素およびエタノール収率が減少し、乳酸が増加した。塩分（バイオディーゼル製造時 KOH 使用）の阻害効果が予想された。実際、食塩の影響を調べてみると、試薬レベルのグリセロールを用いた場合では 1% 食塩添加でも水素生産が見られなかったのに対し、廃液では 0.5% 食塩添加で水素生成の減少が見られた。次に、グリセロール濃度 10 g/l に調製したグリセロール廃水含有培地での連続自己凝集能を利用した微生物凝集菌体充填リアクター（イメージは UASB メタン発酵リアクター）での連続処理結果は、純グリセロール培地では希釈率 1.3 h⁻¹、最大水素生産速度 80 mmol/l・h が可能であったのに対し、廃液では希釈率 0.8 h⁻¹、最大水素生産収率 30 mmol/l・h と低い。そこで、さらに発泡練石（レンガの破片のようなもの）を微生物付着担体として用いた固定床リアクターにしたところ、希釈率 1.2 h⁻¹、最大水素生産速度 63 mmol/l・h の高速水素生産が可能となった（図 12）。以上の結果を模式的に図 13 に示した。石油から生成される軽油の代替燃料として、今後ますますバイオディーゼルの生産が盛んになると思われるが、その際、製法からグリセロールの副生は避けられない。グリセロールの新たな利用法を見いだすか、あるいは新たな処理法を開発し

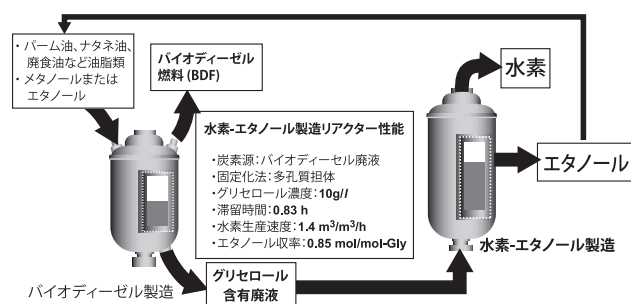


図13. グリセロール含有バイオディーゼル廃水の *E. aerogenes* による水素・エタノール発酵のイメージ

ておく必要がある。

本研究で行った処理法は、バイオディーゼル燃料製造時に水素燃料およびエタノール燃料を得ることができ、まだまだ解決すべき問題点はあるが早く実用化すべき技術と考えている。

おわりに

また、石油価格が高騰したニュースが流れている。日本に限らず、化石燃料に依存しないかあるいは依存を軽減する方策が求められている。一方で循環社会の構築も求められている。

その点から考えると、嫌気性菌の活用は大きな助けになる。もともとエタノール発酵は嫌気性菌のエネルギー取得方法である。最近、穀物資源を用いて実用化されているが、食料および飼料と競合する大きな問題点を有している。木質系資源を用いての生産も一部実用化されているが、可燃性のものを取って可溶化しエタノール発酵をするのは本当に得策であろうか。筆者はこう考える。未利用あるいは種々雑多なバイオマスに適した前処理を必要とするエタノール発酵法を見いだすのではなく、これらをいったんガス化し（熱分解、超臨界など）、生成した合成ガスを用いてエタノール発酵の方が得策と考える。そうすれば、アルコール発酵はあらゆるバイオマスに対して対応できるし、バイオマスに限らず製鉄所ガス、低品位の泥炭なども用いることが可能となる。ガス化技術は完成度の高い技術である。

循環型社会の構築については、乾式メタン発酵の効用を強調したい。資源の少ないわが国にとって、余剰汚泥、畜産廃棄物および生ゴミは見方を変えれば貴重な資源と言える。現状ではお金をかけて処理している。余剰汚泥を例にとると、現状で1億t程度排出されている。98%は水であるので濃縮し、減量化のために一部湿式メタン発酵し脱水・焼却、埋め立て処理されている、あるいは直接脱水・焼却、埋め立て処理されている。一部の処理場では、汚泥に生ゴミなどを混合し、生成ガス量を増加さ

せ、処理場内利用する方策も検討されている。しかし処理場への生ゴミの輸送・搬入などに問題を有している。であれば、汚泥を脱水し、この脱水汚泥を用いて乾式メタン発酵した方がよい。実施例でも示した通り、アンモニアを生成し、脱アンモンした汚泥であれば、乾式条件（水分 80%程度）でメタン発酵可能である。生成回収したアンモニアはどう利用できるであろうか。窒素肥料として利用できる。

現在、世界中の窒素肥料はいわゆるハーバー・ボッシュ法により水素ガス（化石燃料より製造）と窒素ガスより製造されている。まさに農業革命を起こした画期的方法である。しかし、国内の全処理場が乾式メタン発酵を実施したとすれば、国内の窒素肥料使用量を上回るアンモニアを処理場で作ることが可能となる。そうなれば処理場は単なる処理場ではなく、エネルギーおよび有用物質製造工場となる。あるいはアンモニアを水素に改質するのも一案だと思う。なぜなら、水の改質あるいはメタン改質よりもエネルギー投入が少なくてすむからである。さらに、乾式メタン発酵を鶏糞に適用した場合を考えてみる。鶏糞は多くの尿酸を含み、窒素含量が非常に高く、単独での湿式メタン発酵すら全世界で成功していない。乾式アンモニア・メタン二段発酵に最適な廃棄物と言える。実際、アンモニアを生成させ、脱アンモニアを行えば乾式条件でメタン発酵可能である。この効用を考えてみる。家畜糞尿は現在コンポスト処理が主流であるが、悪臭問題を有していると共に生産過剰に陥っている。乾式メタン発酵では密封系で行うので悪臭を回避できる。上記のメタンおよびアンモニアの効用に加えて、残渣はきわめてリン含量が高く、リン資源として利用できよう。このように、乾式（アンモニア）・メタン発酵は廃資源のカスケード利用であり、循環型社会の構築に向けて重要なバイオ技術になり得るし、水素社会にも対応できる。

ここで紹介した研究は、広島大学工学部醗酵工学科醗酵工学研究室（1980～1997）と改編に伴った広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻代謝変換制御学研究室（1997～現在）で行ってきたものである。すでにお名前を挙げた上久保 正教授（故人）には、微生物の利用に関するご指導をいただいた。永井史郎教授には嫌気発酵の研究指導をいただいた。その間、実に多くの先生方、研究室の多くの優秀な学生の皆さん、特に博士課程の留学生の皆さんに支えて頂いた。それらの成果である。ここに深甚の謝意を表する。助教授時代以来、現在に至るまで、共に研究を行ってきた柿園俊英・広島大学大学院准教授、教授以降現在に至るまで、共に研究に携わってきた東京農工大学大学院・中島田 豊准教授のご尽力は多大である。

文 献

- 1) Rachman, M. A., Furutani, Y., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 358–363 (1997).
- 2) Ito, T., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 227–232 (2004).
- 3) Nakashimada, Y., Rachman, M. A., Kakizono, T., and Nishio, N.: *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1399–1405 (2002).
- 4) Rachman, M. A., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 450–454 (1998).
- 5) Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 260–265 (2005).
- 6) Nakashimada, Y., Marwoto, B., Kashiwamura, T., Kakizono, T., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 661–664 (2000).
- 7) Marwoto, B., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: *Biotechnol. Lett.*, **24**, 109–114 (2002).
- 8) Marwoto, B., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 112–119 (2004).
- 9) Nakashimada, Y., Kubota, H., Takayose, A., Kakizono, T., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 368–372 (2001).
- 10) Srinivasan, K., Murakami, M., Nakashimada, Y., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 153–158 (2001).
- 11) Nakashimada, Y., Srinivasan, K., and Nishio, N.: *Biotechnol. Lett.*, **22**, 223–227 (2000).
- 12) Nakashimada, Y., Nakae, K., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 155–160 (1999).
- 13) Koesnandar, Nishio, N., and Nagai, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 711–714 (1990).
- 14) Koesnandar, Nishio, N., Kuroda, K., and Nagai, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 398–403 (1990).
- 15) Bainotti, A. E., Setogaichi, M., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **81**, 324–328 (1996).
- 16) Bainotti, A. E. and Nishio, N.: *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 191–201 (2000).
- 17) Sakai, S., Nakashimada, Y., Yoshimoto, H., Watanabe, S., Okada, H., and Nishio, N.: *Biotechnol. Lett.*, **26**, 1607–1612 (2004).
- 18) Sakai, S., Nakashimada, Y., Inokuma, K., Kita, M., Okada, H., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 252–258 (2005).
- 19) Inokuma, K., Nakashimada, Y., Akahoshi, T., and Nishio, N.: *Arch. Microbiol.*, **188**, 37–45 (2007).
- 20) Mazumder, T. K., Nishio, N., Hayashi, M., and Nagai, S.: *Biotechnol. Lett.*, **8**, 843–848 (1986).
- 21) Mazumder, T. K., Nishio, N., Fukuzaki, S., and Nagai, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 617–622 (1986).
- 22) Mazumder, T. K., Nishio, N., Fukuzaki, S., and Nagai, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 511–516 (1987).
- 23) Jee, H. S., Nishio, N., and Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 235–238 (1988).
- 24) Jee, H. S., Nishio, N., and Nagai, S.: *Biotechnol. Lett.*, **10**, 243–248 (1988).
- 25) Bainotti, A. E., Futagami, K., Nakashimada, Y., Chang, Y. J., Nagai, S., and Nishio, N.: *Biotechnol. Lett.*, **19**, 989–993 (1997).

- 26) Lin, D. G., Nishio, N., Mazumdar, T. K., and Nagai, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 196–200 (1989).
- 27) Nishio, N., Eguchi, S. Y., Kawashima, H., and Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 557–561 (1983).
- 28) Eguchi, S. Y., Nishio, N., and Nagai, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 148–151 (1985).
- 29) Mazumder, T. K., Nishio, N., and Nagai, S.: *Biotechnol. Lett.*, **7**, 377–382 (1985).
- 30) Eguchi, S. Y., Nakata, H., Nishio, N., and Nagai, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 213–217 (1984).
- 31) Kitpreechvanich, V., Nishio, N., Hayashi, M., and Nagai, S.: *Biotechnol. Lett.*, **7**, 657–662 (1985).
- 32) Nishio, N., Sugawa, K., Hayase, N., and Nagai, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 356–360 (1989).
- 33) Sakai, S., Nakashimada, Y., Yoshimoto, H., Watanabe, S., Okada, H., and Nishio, N.: *Biotechnol. Lett.*, **26**, 1607–1612 (2004).
- 34) Sakai, S., Nakashimada, Y., Inokuma, K., Kita, M., Okada, H., and Nishio, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 252–258 (2005).
- 35) Inokuma, K., Nakashimada, Y., Akahoshi, T., and Nishio, N.: *Arch. Microbiol.*, **188**, 37–45 (2007).
- 36) Nishio, N., Kitaura, S., and Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, **60**, 423–429 (1982).
- 37) Nuchnoi, P., Nishio, N., and Nagai, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 195–199 (1989).
- 38) Fukuzaki, S., Nishio, N., Shobayashi, M., and Nagai, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 719–723 (1990).
- 39) Fukuzaki, S., Nishio, N., and Nagai, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3158–3162 (1990).
- 40) Jee, H. S., Yano, T., Nishio, N., and Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, **65**, 413–418 (1987).
- 41) Nishio, N., Kayawake, E., and Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, **63**, 205–209 (1985).
- 42) Fukuzaki, S., Nishio, N., Sakurai, H., and Nagai, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 50–57 (1991).
- 43) Fukuzaki, S., Chang, Y. J., Nishio, N., and Nagai, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 465–472 (1991).
- 44) Chang, Y. J., Nishio, N., Maruta, H., and Nagai, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 430–434 (1993).
- 45) Chang, Y. J., Nishio, N., and Nagai, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 348–353 (1995).
- 46) Takeno, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 450–454 (2001).
- 47) Yano, T., Jee, H. S., Nishio, N., and Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, **64**, 383–387 (1986).
- 48) Jee, H. S., Yano, T., Nishio, N., and Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 123–126 (1988).
- 49) Jee, H. S., Nishio, N., and Nagai, S.: *Biotechnol. Lett.*, **10**, 243–248 (1988).
- 50) Silveira, R. G., Kakizono, T., Takemoto, S., Nishio, N., and Nagai, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 20–25 (1991).
- 51) Nishio, N., Kakizono, T., Silveira, R. G., Takemoto, S., and Nagai, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 481–485 (1992).
- 52) Nishio, N. and Nakashimada, Y.: *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, **90**, 63–87 (2004).
- 53) Nishio, N. and Nakashimada, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 105–112 (2007).
- 54) 西尾尚道, 中島田 豊: 生物工学, **85**, 171–173 (2007).