

氏 名 (国籍)	楊 英 男 (中 国)
学 位 の 種 類	博 士 (生物工学)
学 位 記 番 号	博 乙 第 2144 号
学位授与年月日	平成 17 年 7 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	微生物固定化法を用いた高効率メタン発酵及び有用物質の生産に関する研究

主 査	筑波大学教授	農学博士	前 川 孝 昭
副 査	筑波大学教授	農学博士	佐 竹 隆 顕
副 査	筑波大学教授	工学博士	王 碧 昭
副 査	筑波大学助教授	博士 (農学)	北 村 豊
副 査	筑波大学教授	学術博士	水 鉤 揚 四 郎
副 査	(独)産業技術総合研究所	農学博士	澤 山 茂 樹

論 文 の 内 容 の 要 旨

バイオマスは、再生利用可能な有機資源で、環境調和型のエネルギー資源として注目されている。さらに、バイオマスは、化石エネルギー由来の CO₂ による地球温暖化防止に有効と考えられている。本研究の主テーマであるメタン発酵プロセスは、まず廃棄物系バイオマス中の高分子有機物が低分子物質に変換し、ついでメタン生成菌によってメタンと二酸化炭素が生成される。この発酵プロセスでは様々な微生物の作用によって生化学的反応が進行するという特徴がある。メタン発酵はエネルギー回収と廃棄物処理を兼ねた一石二鳥の方法と期待されているが、有機物の分解率が低く、反応が遅いという問題がある。

本研究は、微生物固定化により、増殖の遅いメタン生成菌をリアクタ内に高密度に固定化させる方法で、メタン発酵の高効率化を図ることを目指した。そこで、微生物固定に用いる担体材料を無機質、有機質材料から探し、メタン生成特性や固定化微生物に与える影響、バイオリアクタ内の担体固定化方式を検討した。さらにメタン発酵の効率化のためには、微生物の活性を常に高く保たなければならない。これを解析するために、バイオリアクタにおける微生物叢を把握することが重要と考えられていた。そこで 16S rRNA 解析とリアルタイム PCR 法によってメタン菌群の特徴の抽出を試みた。さらにメタン生成菌はビタミン B₁₂ を生産することが知られている。そこで、H₂/CO₂ 資化性メタン生成菌を用いて固定床メタン発酵を行い、ビタミン B₁₂ を効率良く生産する方法についても検討した。

以上の視点で試みた研究成果の要旨は次のとおりである。

- 1) 担体材料によって、固定化リアクタのメタン発酵特性が大きく異なること、異なった材料には異なった形態の菌が優占的に固定化されることを知った。16S rRNA クローン解析によって、バイオリアクタ内固定化微生物叢の概要を把握することが可能となった。
- 2) バイオリアクタの固定床方式と担体材料の細孔サイズはメタン発酵特性に影響があることを明らかにし、固定床方式は、流動床より固定化された菌体密度が高いが、メタン菌群の生物多様性は流動床方式が有利であった。16S rRNA によるクローン解析の結果、主要な固定化メタン菌は *Methanosarcina* sp. であることが判った。

- 3) バイオマスに多く含まれるセルロースの嫌気性分解について有効な担体を検討した結果、高密度の微生物がカーボンフェルト固定床に固定された。カーボンフェルトを担体としたセルロースのメタン発酵は有効である。
- 4) カーボンフェルト材料を担体として用い、固定床・流動床ハイブリッドリアクタを開発した。このシステムでは高濃度のプロピオン酸 (10000mg/l) において、メタン生成が認められた。短いスタートアップと高い有機物除去率も示した。リアクタの流動床部分に多様なメタン生成菌が固定されることに對し、固定床部分は主に *Methanosarcina* 様メタン生成菌が生息していた。ハイブリッドリアクタの流動床に固定されたメタン生成菌の多様性が、メタン生成に重要な役割を果たしていると考えられた。
- 5) H_2/CO_2 資化性馴養メタン生成菌を用い、ビタミン B_{12} の精製と定量分析について検討した。その結果、このメタン生成菌に最適な抽出と精製方法を見出した。特にコバラミンのシアニ化を図る方法を検証した。明条件ではビタミン B_{12} が不安定になるため、ビタミン B_{12} の生産を目的とするメタン生成菌培養では、光の遮断が必要であった。菌体内に蓄積されたビタミン B_{12} をすべて抽出するため、ビタミン B_{12} を抽出・精製する前に、菌体液を冷凍・解凍または超音波破碎処理をする必要がある。メタン菌の活性は一番活発な対数増殖期であり、ビタミン B_{12} の含有率は最も高いことが確認された。
- 6) 有機性担体としてヘチマを用いて、 H_2/CO_2 を基質とするガスを資化する高効率連続メタン発酵とビタミン B_{12} の生産を検討した。その結果、高効率ビタミン B_{12} 生産のため、それを構成しているコバラミンの構成物質である Co や補酵素の活性に重要な Fe など微量金属塩が必要であることが判った。適切な HRT の選択はシステムの安定性、メタン生成菌の活性、またビタミン B_{12} の生産に大きな影響があることを明らかにし、ヘチマを固定化材料とすると、基質ガス供給に伴う pH の低下に對して、高い抵抗力を持つことがわかった。このシステムで、メタン発酵の高効率化と同時にメタン生成菌によるビタミン B_{12} の生産が達成された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文はバイオマスのメタン発酵によるバイオガスの生産速度の高効率化と副産物の生成効率の向上を図ることを試みたものである。もともと増殖の遅いメタン生成菌をバイオリアクタ内に配置した担体材料を高密度に固定化し、バイオリアクタ内の菌体密度を高めることによってその目的を達成することを試みている。

微生物を固定化する担体材料として有機系および無機系材料を選定し、固定化材料のバイオリアクタ内に配置する方法として、流動床、固定床およびこれらの併用について比較検討したものである。その結果、担体材料として有機系の材料は微生物との親和性に秀れ、メタン生成速度でも秀れているが、耐久性の点で劣ることを知った。無機系材料のものについては耐久性、および材料と微生物との親和性の点からカーボンフェルトを選択した。また、固定化担体のバイオリアクタの配置方法について、走査電子顕微鏡におけるメタン菌の付着状況、16SrRNA のクローン解析ならびにリアルタイム PCR 法によるメタン菌群の定性・定量解析を行なった。この結果、固定床の球菌の優占が顕著であったことに對し、流動床のメタン菌群の菌叢に生物多様性がみられた。このことから、固定床カーボンフェルト担体における菌密度の高い特性と流動床カーボンフェルト担体の菌の多様性に着目した固定床・流動床ハイブリッドメタン発酵を試み、その相乗効果を確認した。固定床メタン発酵を有機質担体に試み、 H_2/CO_2 を基質とする生物メタネーション実験を行い、メタン濃度の向上とビタミン B_{12} の在来法より 4～5 倍高い濃度を得、付加価値の高いメタン発酵副産物の生産に道を開いた。

これらの成果はオイルリファイナリ社会からバイオマスリファイナリ社会への転換を推進する科学技術の実現に貢献し、特に生物工学、食品工学の学術分野の発展に寄与するものである。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。