

氏名(本籍)	井原一高(愛知県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第2535号		
学位授与年月日	平成13年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	メタン発酵リアクタのモニタリング手法に関する基礎研究		
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	黒田健一
副査	筑波大学助教授	農学博士	杉浦則夫
副査	筑波大学教授	工学博士	松村正利

論文の内容の要旨

本研究は、メタン生成菌をはじめとする微生物群の代謝状態をオンラインで計測可能な指標として、メタン菌に普遍的に存在する補酵素F₄₂₀を測定するシステムを試作し、メタン生成速度との関係を明らかにするとともに、電子伝達体であるNAD(P)Hのモニタリングをメタン発酵リアクタに応用し、これらが新規の発酵状態を知る指標として有効であるかを検討したものである。

1. 画像処理を用いた補酵素F₄₂₀計測システムの構築

- (1) 判別分析法およびメディアンフィルタを用いた画像処理手順により、メタン生成菌由来の画像を抽出することが可能であった。また補酵素F₄₂₀量を表す指標として、画面当たりに蛍光画像が占める割合である蛍光画素濃度が適当であった。
- (2) メタン生成菌由来の蛍光褪色現象は励起光照射やサンプルの酸素暴露による影響を受けることが判明した。従って測定の再現性の確保には、これらの影響を最小限にする必要があると考えられた。

2. 補酵素F₄₂₀の画像処理によるメタン生成菌体密度の測定

前章で構築したシステムを用いて、合成培地を用いたH₂/CO₂資化メタン生成菌、酢酸資化メタン生成菌の回分培養を行い、F₄₂₀濃度の計測を試みた。

- (1) H₂/CO₂資化メタン生成菌の回分培養では、メタン生成速度と補酵素F₄₂₀濃度をあらかず蛍光画素濃度の変化は類似した挙動を示し、両者に正の相関が見られた。
- (2) 酢酸資化メタン生成菌の回分培養では、メタン生成速度と蛍光画素濃度は類似した挙動を示し、両者に正の相関が見られた。位相差顕微鏡による画素数とメタン生成速度との相関は、蛍光画素数のそれに比べ低かった。MLVSSはメタン生成速度と異なる変化を示した。
- (3) 活性化したメタン生成菌の増加に伴いF₄₂₀濃度が上昇し、メタン生成速度の上昇が見られた。F₄₂₀濃度を表す蛍光画素濃度はメタン生成速度の指標として有効であると考えられた。

3. NAD (P) Hを用いたメタン発酵リアクタのモニタリング

- (1) 酢酸を基質とした培養においてスタートアップ後、NAD (P) H濃度が低下しメタン生成速度が上昇した。一般にメタン生成が安定せず、NAD (P) H濃度の変動も大きい傾向にあった。一方、メタン生成速度が安定し、リアクタが定常状態と考えられるときは、NAD (P) H濃度は低く安定した状態であった。このとき基質である酢酸の蓄積は見られなかった。
- (2) 実験結果から、NAD (P) Hプローブの応答によりメタン発酵リアクタ内の状態を検出できる能力があると判断されたが、その応答はメタン生成速度の低下現象が始まる前に検出できるとは限らないため、リアクタの波紋を検出するにはpHや有機酸濃度といった他のパラメータと併用して判断する必要があると考えられた。

4. 補酵素F₄₂₀測定法およびNAD (P) Hモニタリングの評価と両者の比較

- (1) サンプルングプランジャの設置によって、本研究で構築した補酵素F₄₂₀測定システムはオンライン化が可能であると考えられた。また測定精度の向上には、メタン菌蛍光と背景の分離に関する点や、形状からメタン菌の種類識別といったソフトウェアに関する改良によって可能であると考えられた。
- (2) $d [NAD (P) H] / dt$ のパワースペクトル密度の解析では、周波数が高くなるとともにその値が小さくなる場合には、メタン生成速度と関連があり、 $d [NAD (P) H] / dt$ の変化は水理的滞留時間後のメタン生成速度との間に、やや低い相互関係が存在した。これはNAD (P) H信号からメタン生成速度を予測する可能性を示唆したものであると考えられる。
- (3) 定常状態と考えられる区間を含む実験区において、 $d [NAD (P) H] / dt$ 、メタン生成速度そしてプロピオン酸濃度の3つを、相互相関関数の時間差から時系列に並べると、プロピオン酸濃度、 $d [NAD (P) H] / dt$ 、メタン生成速度の順であり、NAD (P) H単独ではなく、プロピオン酸濃度のモニタリングもメタン生成速度の変化を事前に把握する上で重要であると考えられる。

審査の結果の要旨

本論文では、メタン生成菌に固有に含まれる補酵素F₄₂₀の測定方法を開発し、補酵素F₄₂₀とメタン生成菌の活性を示すメタン生成速度との関係について研究を行った。次いで、微生物の代謝によって現れるNAD (P) Hに着目し、メタン発酵における新規のモニタリング指標としての有用性を検討した。

メタン発酵は廃水処理と同時にエネルギー回収が可能な手法であるが、メタン生成菌が嫌気性菌であることから環境変化に鋭敏であり、阻害物や過負荷に対して影響を避けるために微生物を直接モニタリングする方法が必要とされている。本論文では、それらを念頭に置き、非破壊的計測手法である画像処理を用いて補酵素F₄₂₀を測定する方法を確立し、補酵素F₄₂₀がメタン生成速度と相関があることを明らかにした。一方、NAD (P) H蛍光プローブを用いたモニタリングでは、NAD (P) H濃度がメタン発酵リアクタの状態を反映していることを示した。さらに、NAD (P) H変化速度とメタン生成速度もしくは阻害物であるプロピオン酸との相互相関について解析したところ、三者の時間差からNAD (P) Hはプロピオン酸濃度の影響を受けた後にメタン生成速度に関係していた。これはNAD (P) Hがメタン生成速度の予測可能性を示すものであり、メタン発酵リアクタのモニタリング指標として有用であると考えられた。本論文で示した手法は、非破壊手法であることから、オンラインリアルタイムでメタン発酵の状態を計測することが可能になった。これらの研究成果は、メタン発酵のモニタリング、リアクタの安定化や高速化に貢献できるという点で高い応用性を持っている。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。