

氏名(国籍)	張 燕 生 (中 国)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 甲 第 2803 号
学位授与年月日	平成14年3月25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	メタン菌の高密度培養における微量金属の取り込み特性
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 田中秀夫

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究はメタン菌の高密度培養を達成するために微量金属の取り組み特性を検討した。とくに、メタン菌の高密度培養に対する微量金属塩の影響、微量金属の取り込み速度とメタン菌の増殖速度との関係を明らかにした。また、メタン菌細胞中の微量金属元素の正確な測定法ならびにメタン菌体密度と有機酸のオンラインモニタリング法を開発した。以下はその主要な研究成果である。

- (1) 嫌気性培養試験管を用いて酢酸資化性メタン菌の回分培養を行い、メタン菌高密度培養に対する微量金属塩濃度の影響及び適正濃度について検討し、次の結果が得られた。①高密度メタン菌培養のために従来法より高い微量金属塩濃度を付加する②微量金属塩濃度の適正化によるメタン発酵の促進及び安定化が確保できる。③微量金属による発酵阻害の発生は金属塩濃度以外にメタン菌の初期密度がかかわる。④異なる微量金属塩液添加濃度におけるメタン生成の反応速度定数の変化は、培養温度の影響と同様に微量金属塩濃度も反応速度定数に大きな影響を及ぼす。⑤反応速度定数の解析から微量金属栄養素が不足している状態、最大反応速度定数を有する適正濃度及び微量金属による毒性の発生する阻害がある。
- (2) 3.7Lの嫌気性培養ジャーファーメンタリアクタを用いて従来法の微量金属塩濃度(0.1ml/L)と高微量金属塩濃度(15ml/L)における酢酸分解系馴養メタン菌の連続培養を行い、高密度メタン菌培養の達成には従来法の微量金属塩濃度を大きく増加させることによって可能であることを実証した。
- (3) メタン菌細胞への微量金属元素の取り込み量を知るために、ICP(イオンプラズマ型質量分析装置)を用いて細胞の微量金属イオン含有量を測定した。従来法の培地ではメタン菌濃度が0.5g/L以上に達するとFe, Zn, CuとNiなど栄養元素が不足になり、さらに5g/L以上に増殖するとCoも不足となる。細菌濃度が10g/L以上のメタン発酵を達成するためには、従来法培地のFe, Cu, Ni, Co, Zn濃度を大幅に高くする必要がある。
- (4) メタン菌細胞中に取り込まれる微量金属元素の正確な測定法を確立するために、その測定において最も大きな誤差をもたらす細胞洗浄法を検討した。蒸留水、生理塩水、燐酸塩緩衝液及びEDTAと燐酸塩との混合液を用いた洗浄実験の結果、細胞内イオンの計測値における変動係数の最も大きい洗浄液は蒸留水であり、その変動係数の最も少ないものは燐酸緩衝液であった。さらに原子間力顕微鏡を用いて細胞表面を検鏡したところ、細胞の凹みと細胞破壊が見られた。この現象の発生原因及び計測に影響する要因を検討した結果、蒸留水を用いた洗浄では細胞では細胞の破壊が多く、測定の誤差をもたらす主な原因であると推定した。細胞破壊の現象を

防ぐために、メタン菌培養液にグルタルアルデヒド溶液を加え、軽く固定化した後、細胞サンプルを遠心分離・洗浄する方法を試みた。この細胞洗浄方法は細胞破壊を軽減し、細胞破壊に由来する誤差を防ぎ、適切な方法であると考えられた。

- (5) メタン発酵におけるメタン菌密度の計測法では乾燥重量法、濁度法及び細胞数計測法といった代表的な測定法はいずれもオンライン測定には不向きである。メタン菌の細胞質と細胞壁の特定の成分に依存するスペクトル吸収パターンに基づき、発酵液中のメタン菌密度と発酵液中の有機酸について、近赤外分光 (NIR) 法によるメタン菌密度の計測法及びメタン発酵の酢酸濃度とメタン菌密度の同時計測法の確立を試みた。その結果、近赤外分光分析法を用いたメタン菌密度と有機酸濃度の同時測定及びオンライン化を可能とした。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究はメタン菌の高密度培養を達成するために微量金属の取り込み特性を主眼として検討を進めたものである。その結果、メタン菌高密度培養に対する微量金属塩の影響、微量金属の取り込み速度とメタン菌の増殖速度との関係を明らかにし、さらに、高速メタン発酵を実現するために、メタン菌細胞への栄養元素の取り込み量の測定を試みた。即ち、ICP (イオンプラズマ型質量分析装置) を用いて細胞の微量金属イオン含有量を測定した。従来法の培地ではメタン菌濃度が0.5g/L以上に達するとFe, Zn, CuとNiなどの微量金属元素が不足になり、さらに5g/L以上に増殖するとCoも不足となった。メタン細菌密度を10g/L以上のメタン発酵に達成するために、従来法培地のFe, Cu, Ni, Co, Zn濃度を高くする必要がある。さらに、メタン菌細胞中の微量金属元素の正確な測定法及びメタン菌と有機酸との同時測定とオンラインモニタリング法を開発した。

以上のように、本研究はメタン菌によるバイオマスの嫌氣的分解を高速化するための基礎的知見を得ており、さらにメタン発酵装置のコンパクト化への道を拓いた成果はバイオマス変換等の農業工学や水処理工学分野の発展へ寄与するところが大きいと判断する。

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。