

## 学位論文の要旨

氏名	樋之口 大作
学位論文題目	独立栄養性脱窒細菌を固定化するコア-シェル型多孔性マイクロカプセルの創製と硝酸性窒素処理への応用

近年、硝酸性窒素による地下水汚染が世界中で深刻な問題となっている。飲料水中に硝酸性窒素が多量に含有することによる健康被害としては、メトヘモグロビン血症と発ガンリスクが挙げられる。硝酸性窒素は、現在の浄水場では処理することが不可能な物質であるため、早急な浄化対策が求められている。

現在、硝酸性窒素の処理技術として、イオン交換法やRO（逆浸透）膜法が広く知られている。しかし、これらの処理法はコストが高く、分離処理であるため分離後に残存する硝酸性窒素の後処理が必要となる。一方、硝酸性窒素を窒素ガスまで分解する処理法としては、脱窒細菌を用いた生物化学的処理法がある。この処理法は、コストが比較的安価であるという特長も有するが、微生物の取り扱いが困難であることや反応器外に微生物が流出した場合に二次的環境汚染を引き起こす可能性があるなどの問題がある。そこで、これらの問題点を克服するために、マイクロカプセル中に微生物を固定化する手法がある。一般的な方法として、アルギン酸カルシウムなどゲル素材の担体が、調製の簡便さや固定化微生物の活性が高いなどの点から用いられている。しかし、ゲルの潜在的弱さのために、長時間使用による担体の崩壊や微生物の漏洩などの問題がある。そのため、固定化担体として化学的・機械的強度のある耐久性に優れた合成高分子を用いたマイクロカプセルを開発できれば、その応用技術を向上させることが可能となる。

本研究では、内核に脱窒細菌の反応場を有する化学的・機械的強度のある合成高分子を壁材としたコア-シェル型マイクロカプセルの開発を目的とし、その硝酸性窒素処理能力の基礎的な検討及びマイクロカプセルの構造制御についての検討を行った。本論文は、その研究成果をまとめたものである。以下に、本論文の構成を記述する。

第一章は、硝酸性窒素汚染及びその処理技術、固定化生体触媒、マイクロカプセル化技術について記述した。そして、硝酸性窒素による地下水汚染の深刻さ、生物化学的手法及びマイクロカプセル化技術の優位性を説明し、本研究の意義と目的を明らかにした。

第二章は、硝酸性窒素の生物化学的処理として用いる独立栄養性脱窒細菌 (*Paracoccus denitrificans* IFO13301) の培養操作及び培養液組成に対する脱窒能力の特性について記述した。培養した脱窒細菌は、硝酸性窒素及び中間生成物である亜硝酸性窒素を完全に処理することが可能であった。また、培養液に $\text{NaNO}_3$ 、無機炭素源、金属原子を添加することによって、処理能力が向上し、毒性の高い亜硝酸性窒素の生成を抑制できる高活性な脱窒細菌を得ることができた。

第三章は、第一に目的のマイクロカプセルを調製する際に用いる有機溶媒（ジクロロメタン）から脱窒細菌を保護するため、その保護の役割を担うものとして脱窒細菌を固定化する粒子径がマイクロオーダーの微粒化アルギン酸カルシウムビーズを調製し、その脱窒能力の評価を行った。そして、第二にs/o/wエマルジョン法、相分離及び液中乾燥法を併用する手法により、ポリスチレン（PSt）を壁材とするマイクロカプセルを調製し、その脱窒能力の評価を行った。その結果、単核構造を有するコア-シェル型の多孔性PStマイクロカプセルを開発でき、その脱窒能力を確認できた。

第四章は、2ステップの調製方法から形成される第三章において記述したPStマイクロカプセルとは異なり、ジクロロメタンからの微生物保護及び相分離物質としてアルギン酸ナトリウム水溶液を用いており、2つの役割を果たすことによって1ステップからなる簡便な調製手法を提案した。w/o/wエマルジョン法、相分離及び液中乾燥法を併用する方法により、強度に優れるポリメチルメタクリレート（PMMA）を壁材とするマイクロカプセルの調製を行った。そして、調製したマイクロカプセルを回分式脱窒実験において繰り返し連続使用することで、その脱窒能力の特性評価を行った。その結果、マイクロカプセルの単核中に脱窒細菌を高い活性を保持したまま固定化することができた。さらに、硝酸・亜硝酸性窒素を完全に処理することが可能であり、繰り返し連続使用することで処理能力が向上した。3回目の脱窒実験では、反応中間生成物であり毒性の高い亜硝酸性窒素の生成を完全に抑制することができ、効率的な脱窒反応になることを確認した。また、脱窒細菌の活性が低下した場合、カプセルを培養することで再び処理能力を向上することができ、再利用可能であった。加えて、カプセルの崩壊はなく耐久性においても優れていることを確認した。

前章までに、*Key Technology*となる微生物の活性を保持したまま固定化する技術を確立できた。第五章では、マイクロカプセルを調製する際の条件が、カプセルの構造に与える影響を詳細に検討した。具体的に、内水相溶液を添加しない場合のカプセル調製から行い、PEG [エマルジョン安定剤]、PMMA [カプセル壁材]、アルギン酸ナトリウム水溶液 [微生物保護及び相分離物質]、ソルビタンモノオレエート [エマルジョン安定剤]、脱窒細菌、内水相溶液の添加量もしくは濃度について条件を変化させ調査した。表面形態及び単核構造に影響を及ぼす因子は、PEGやソルビタンモノオレエート（エマルジョン安定剤）が大きな役割を果たすことが分かった。また、PMMAの添加量により膜厚の制御が可能であることを確認し、カプセル形成物質が構造に及ぼす機能を明らかとした。本章で検討したカプセルは、微生物固定化担体に限らず、様々な応用が可能な固定化担体であると考えられる。

第六章は、以上の結果に関する総括を行った。

## 論文審査の要旨

報告番号	理工研 第216号	氏名	樋之口 大作
審査委員	主査	幡手 泰雄	
	副査	高橋 武重	伊地知 和也
		吉田 昌弘	

## 学位論文題目

独立栄養性脱窒細菌を固定化するコア-シェル型多孔性マイクロカプセルの創製と硝酸性窒素処理への応用  
(Development of Core-Shell Type Porous Microcapsules with Autotrophic Denitrifying Bacteria and Their Application to Treatment of Nitrate-Nitrogen)

## 審査要旨

提出された学位論文及び論文目録などを基に学位論文審査を実施した。

本論文は、中空構造である合成高分子マイクロカプセルに固定化した脱窒細菌の働きにより、地下水汚染物質である硝酸性窒素を処理する研究をまとめたものであり、全六章より構成されている。

第一章は、硝酸性窒素汚染及びその処理技術、固定化生体触媒、マイクロカプセル化技術について記述した。そして、硝酸性窒素による地下水汚染の深刻さ、生物化学的手法及びマイクロカプセル化技術の優位性を説明し、本研究の意義と目的を明らかとした。

第二章は、独立栄養性脱窒細菌の培養操作及び培養液組成に対する脱窒能力の特性について記述した。培養液に $\text{NaNO}_3$ 、無機炭素源、金属原子を添加することによって、処理能力が向上し、反応中間生成物であり毒性の高い亜硝酸性窒素の生成を抑制できる高活性な脱窒細菌を得ることに成功した。

第三章は、第一にカプセル調製の際に用いるジクロロメタン (DCM) から脱窒細菌を保護するため、その保護の役割を担うものとして脱窒細菌を内包する微粒化アルギン酸カルシウムビーズを調製した。そして、第二にs/o/wエマルジョンの相分離と液中乾燥法を併用する手法により、前述で調製した微粒化ビーズを固定化した単核構造を有するポリスチレン (PSt) マイクロカプセルを調製し、その脱窒能力を確認した。

第四章は、2ステップの調製方法から形成されるPStマイクロカプセルとは異なり、DCMからの微生物保護及び相分離物質としてアルギン酸ナトリウム水溶液を用いることで1ステップからなる簡便な調製手法を提案した。w/o/wエマルジョンの相分離と液中乾燥法を併用する手法により、強度に優れるポリメチルメタクリレート (PMMA) を壁材とするマイクロカプセルを調製し、繰り返し連続使用することで脱窒能力の特性評価を行った。調製したカプセルの固定化容積は大きく、硝酸・亜硝酸性窒素を完全に処理することが可能であり、3回目の脱窒実験では、亜硝酸性窒素の生成を完全に抑制する効率的な脱窒反応になることを確認した。また、脱窒細菌の活性が低下した場合、カプセルを培養することで再利用可能であることも明らかとした。

第五章では、マイクロカプセルを調製する諸条件が、カプセル構造や形態に与える影響を検討した。具体的に、内水相溶液を添加しない場合のカプセル調製から着手し、ポリエチレングリコール (PEG)、PMMA、アルギン酸ナトリウム水溶液、ソルビタンモノオレエート、脱窒細菌、内水相溶液の添加量もしくは濃度について諸条件を変化させ調査し、カプセル形成物質が構造に及ぼす基礎的な機能を明らかとした。

第六章は、以上の結果についての総括を行った。さらに、調製したマイクロカプセルを利用するバイオリアクターの開発と将来展望について述べた。

以上、本論文は、中空構造である合成高分子マイクロカプセルに固定化した脱窒細菌の働きにより、地下水汚染物質である硝酸性窒素を処理する研究をまとめたものであり、硝酸性窒素処理及びカプセル調製技術に大きく寄与し、さらに、微生物利用の応用技術を向上させるものである。よって、審査委員会は博士(工学)論文として合格と判定した。

## 最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第216号	氏名	樋之口 大作
審査委員	主査	幡手 泰雄	
	副査	高橋 武重	伊地知 和也
		吉田 昌弘	

平成18年2月3日（金）に論文発表会が行われ、申請者は13時から約45分間にわたり研究背景及び成果など論文内容について説明し、その後、審査委員及び出席者との質疑応答を行った。以下に質疑応答の主要なものを示す。いずれの質疑に対しても的確に対応し、満足すべき回答を得ることができた。

- 【Q1】ジクロロメタン以外の溶媒でマイクロカプセルは調製可能であるのか、また、調製後にジクロロメタンはどの程度残存しているのか。
- 【A1】ジクロロメタン以外の溶媒でもマイクロカプセルは調製できる。しかし、微生物を用いているため液中乾燥の際に低沸点の溶媒が必要である。また、溶媒の残存については、調製したスケールでは確認されていない。スケールアップした場合でも、液中乾燥の条件を調整することで対応できると考えられる。
- 【Q2】ウレタン骨格のマイクロカプセルは調製可能であるのか。
- 【A2】我々の研究グループでは、農薬を固定化したウレタンマイクロカプセルの開発に成功している。コア-シェル型の構造形態に限定しなければ、この技術を本研究に応用することは可能である。
- 【Q3】マイクロカプセルを調製する際に減圧する理由は何か。
- 【A3】調製時間が長いと微生物へダメージを与えることになる。そのため、減圧下で調製時間の短縮を行っている。
- 【Q4】カプセル壁が多孔質構造になる原因と細孔制御による処理速度のコントロールは可能であるのか。
- 【A4】ジクロロメタンが気化するときに細孔が形成され多孔質構造となる。ジクロロメタンの除去速度を調整することで細孔サイズを制御できるため、処理速度をコントロールすることは可能である。
- 【Q5】硝酸性窒素を処理するために水素ガスはどの程度必要になるのか。そして、水素ガスを有効利用する手段を考えているのか。
- 【A5】化学量論式から計算すると1gの硝酸性窒素を処理するために0.36gの水素ガスが必要となる。現段階では、バブリングにより供給しているが、水（20℃）への溶解度は1.6mgH<sub>2</sub>/lと低いため、バイオリアクターによる処理では中空糸を利用することで飽和水素水を作成し、これを用いることで低コスト及び安全性に優れた処理技術になると考えている。
- 【Q6】作製したバイオリアクターについて、なぜ攪拌式タイプのものを選択したのか。
- 【A6】バイオリアクターの設計思想は、脱窒処理、再生・洗浄というサイクルを簡便な操作で可能とすることである。操作の簡便化及びマイクロカプセルの移動において、攪拌槽を利用する方式が都合が良いためである。
- 【Q7】繰り返し連続使用することでなぜ処理速度は向上したのか。また、バイオリアクターを用いて行う連続処理でも同様な現象が起きるのか。
- 【A7】繰り返し連続使用（長期使用）することで、脱窒細菌内の還元酵素が硝酸性窒素を処理する環境に適合し、代謝経路が確立され活性化したと考えられる。また、長期使用という観点において、バイオリアクターによる処理でも同様な現象が起きると考えられる。

以上の結果から、4名の審査委員は申請者が大学院博士後期課程修了者としての学力ならびに見識を有するものと認め、博士(工学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。