

Biodesulfurization of Dibenzothiophene and Its Derivatives by an Isolate; *Sphingomonas subarctica* T7b

(分離株 *Sphingomonas subarctica* T7b による
ジベンゾチオフェンおよびその誘導体の脱硫)

学位論文内容の要旨

石油は、使用しやすく高カロリーで、欠かすことの出来ないエネルギー源として世界中で使用されているが、その欠点の一つとして、硫黄分を含有するため、燃焼によって硫酸イオンを生じることである。大気中に放出され酸性雨を発生するだけでなく、内燃機関の劣化の加速が進み、さらにヒトの健康への影響も懸念されている。石油精製において脱硫は、重要な技術課題であった。現在、最も広く用いられている脱硫方法は、水素添加脱硫で高温下で触媒で反応を進行させている。この方法でほとんどの量のイオウ成分は、除去できているが、それでも残留するイオウがある。残留しているイオウは、環状化合物などの化学反応でも分解しづらい諸々の含硫化合物として存在している。さらなる脱硫のためには、貴金属性触媒の寿命の短縮を伴うより激しい反応条件が要求される。

そこでバイオ脱硫の可能性が浮上して、水素添加脱硫で反応しづらい含硫多重環状化合物などの分解に期待が持たれた。本研究でのターゲットを軽油に絞ってバイオ脱硫を研究した。軽油は、ディーゼル車の燃料として用いられ、排ガスは都市公害の原因の一つとなっており脱硫の要求は大きい。市販されている軽油は、脱硫されたものであるが、ガスクロマトグラフィーでの分析では、多数のイオウを含んだピークが多数観察され、脱硫処理できなかった化合物が多数含んでいることが判る。

1. 脱硫微生物の探索

本研究では、土壌サンプルから微生物を単離して、軽油から含硫化合物を分解して脱硫する活性のある微生物を選択した。硫化化合物を特異的に検出できる ADE 検出器を備えたガスクロマトグラフィーで軽油を分析すると、明瞭なピークとして検出され同定できる化合物のほかに、多数の不明瞭な含硫化合物が検出できる。その面積はかなりの量となる。このことは、特定の硫化物をモデル化合物として設定して、脱硫微生物を探索しても、実際の応用には、問題を残すことになる。そこで、我々は、より広い範囲の硫化物を基質と

して、脱硫微生物の探索に当たった。具体的には、市販軽油をアルミナカラムを通塔して、吸着される画分をイオウ源の基質とした培地でサンプルから集積培養を行った。含硫化合物のみを濃縮する方法は無いので、本画分には、含硫化合物のほかに炭化水素類も含まれていた。また本画分は、水には溶けないので、有機溶媒としてテトラデカンに溶かして集積用の液体培地の上に乗せた。

サンプルは、種々の地域から集めた土壌であり、北海道の中でも原油の出る地域である豊富町からも多数の土壌サンプルを収集した。土壌サンプル 167 を個別に集積培養して、テトラデカン層に含まれる含硫化合物が減少した区を選択し、さらに集積培養を行い、最後に寒天培地に集落を形成させて単菌を得た。軽油を酸化アルミのカラムを通して含硫化合物を含む画分を濃縮した。その濃縮画分を共存する環境で微生物を培養し、油層からの硫黄濃度が減少した微生物を選択した。北海道の中でも原油の出る豊富町の土壌サンプルの中に、目的の微生物が存在した。数種の微生物が、脱硫活性があると判定され、その中で最も活性の高かった T7b 株を同定した。菌の形態、生理学的性質及び 16SrRNA の塩基配列より *Sphingomonas subarctica* と同定され、*S. subarctica* T7b 株と命名した。

2. *Sphingomonas subarctica* T7b の特性試験

バイオ脱硫としては、すでに石油脱硫微生物は報告されている。その中でも脱硫活性が高い *Rhodococcus* 属微生物、なかでも報告の多い *R. erythropolis* を用いて、性能比較を行った。その結果、*S. subarctica* T7b の有用な特徴が明らかとなった。

軽油中の硫黄化合物をガスクロで検出知ると dibenzothiophen (DBT) が、最も高いピークとして検出される。軽油と培養液の 2 層系での脱硫処理を行うと、DBT の脱硫に関しては、*R. erythropolis* KA2-5-1 株を用いても *S. subarctica* T7b 株においても、すみやかに脱硫された。両株の違いが見られたのは、アルキル化された DBT および benzothiophen (BT) の脱硫であった。より長い鎖長のアルキル基の修飾がある基質については、*S. subarctica* T7b 株においてのみ脱硫が起こっていた。特に 4,6-dipropyl DBT、4,6-dibutyl DBT、4,6-dipentyl DBT、4-hexyl DBT、2-dodecyl BT、および 7-dodecyl BT に関しては、*R. erythropolis* KA2-5-1 では、全く脱硫できなかったが、*S. subarctica* T7b では、可能となっていた。*S. subarctica* T7b は、従来報告のある脱硫微生物の中でより広い基質特異性を備えた微生物であった。しかも、それぞれの基質を単独に試験した場合およびすべてを混合した場合でも脱硫性能を発揮した。一方、脱硫は、他の硫黄源があった場合、即ち硫酸イオン、メチオニンあるいはシスチンが存在すると大幅な阻害を受けた。

脱硫によって生成される化合物について調べたところ、Gibb's 反応に陽性の物質が精製されており GC-MS 分析で 2-hydroxybiphenyl と同定した。このことは、本株の脱硫機序は、*Rhodococcus* 属などで知られている 4S 系あるいは IGTS8 を経由して脱硫されていると予想される。アルキル基が、付いたままこれらの系を通過するのか、最初に側鎖が分解されるのかは、まだ不明である。

3. *S. subarctica* T7b を用いたジャー培養による脱硫試験

ジャーファーマンターを用いて pH 制御した培養をともなう脱硫処理を行った。*S. subarctica* T7b の生育は、pH 7.0 制御では、pH 6.0 区と比べ大幅に高くなった。しかし、脱硫率は、pH 7.0 制御と pH 6.0 制御区で大きな差が見られず、72 時間の培養後の脱硫率は、pH 7.0 制御で約 68 %、pH 6.0 では 60 %であった。生育量あたりの脱硫率を考えると、pH 6.0 制御区の方が高いことになる。*R. erythropolis* KA2-5-1 の脱硫処理上の問題点の一つとして軽油と培地の界面に菌体と混合した分離の面倒な層ができるが、*S. subarctica* T7b では、その層はより軽度なものであった。

4. 固定化菌体法による脱硫試験

S. subarctica T7b の培養菌体を緩衝液中で脱硫反応をさせたところ反応は進行し、特徴的な基質特異性も保たれていた。このことから固定菌体法を試みた。工業的には、培養系よりも固定化菌体化したカラムなどを通塔させて脱硫する方が合理的である。*S. subarctica* T7b を種々の素材で固定化菌体を作成して脱硫性能を調べた。アルギン酸を用いた系では、耐久性が悪かったが、ポリビニールアルコール類では、繰り返し使用に耐える固定化菌体を作ることに成功した。濃度や粒子径を検討し、より効率に脱硫できる固定化菌体を試作し、培養系に匹敵する脱硫と、10 回の繰り返し使用を確認した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 野 行 蔵

副 査 教 授 横 田 篤

副 査 講 師 曾 根 輝 雄

学 位 論 文 題 名

Biodesulfurization of Dibenzothiophene and Its Derivatives by an Isolate; *Sphingomonas subarctica* T7b

(分離株 *Sphingomonas subarctica* T7b による

ジベンゾチオフェンおよびその誘導体の脱硫)

本論文は、7章からなり、図 32、表 10、文献 141 を含む総頁数 132 の日本語論文である。
別に参考論文 1 編が付されている。

本論文は、石油中の環状硫黄化合物中でもジベンゾチオフェン(DBT)およびその誘導体を
バイオ脱硫によって分解することに関する。水素添加脱硫で反応しづらい含硫多重環状
化合物などの分解が課題である。本研究でのターゲットを軽油に絞ってバイオ脱硫を研究し
た。軽油は、ディーゼル車の燃料として用いられ、排ガスは都市公害の原因の一つとなってお
り脱硫の要求は大きい。市販されている軽油は、脱硫されたものであるが、ガスクロマトグ
ラフィーでの分析で多数のイオウを含んだピークが観察され、脱硫処理しきれなかった化合
物が多量に含まれていることが知られている。

1. 脱硫微生物の探索

本研究では、土壌サンプルから微生物を単離して、軽油の含硫化合物を脱硫できる微生物
を選択した。軽油でも多数の含硫化合物が存在するので、特定の硫化物をモデル化合物とし
て脱硫微生物を探索しても、実際の応用には問題が残る。そこで、我々は、より広い範囲
の硫化物を基質として、脱硫微生物の探索に当たった。具体的には、市販軽油をアルミナカ
ラムに通塔して、吸着画分をイオウ源とした集積培養を行った。含硫化合物のみを濃縮する
方法は無いので、本画分には、含硫化合物のほかに炭化水素類も含まれていた。また本画分
は、水に不溶なのでテトラデカンに溶かして集積培地に加えた。

サンプルは各地から集めた土壌サンプル 167 を個別に集積培養して、テトラデカン層に含
まれる含硫化合物が減少した区を選択し、さらに集積培養を行い、最後に寒天培地に集落を
形成させて単菌を得た。北海道の中で石油の出る豊富町の土壌サンプルに、目的の微生物が
存在した。数種の微生物に脱硫活性がある、その中で最も活性の高かった T7b 株を同定した。
菌の形態、生理学的性質及び 16SrRNA の塩基配列より *Sphingomonas subarctica* と同定され、
S. subarctica T7b 株と命名した。

2. *Sphingomonas subarctica* T7b の特性試験

すでに石油脱硫微生物は報告されている。中でも脱硫活性が高い *Rhodococcus* 属微生物との性能比較を行い、*S. subarctica* T7b の有用な特徴が明らかとなった。

軽油中の硫黄化合物をガスクロで検出知ると dibenzothiophen (DBT) が、最も高いピークとして検出される。軽油と培養液の 2 層系での脱硫処理を行うと、DBT の脱硫に関しては、*R. erythropolis* KA2-5-1 株を用いても *S. subarctica* T7b 株においても、すみやかに脱硫された。両株の違いが見られたのは、アルキル化された DBT および benzothiophen (BT) の脱硫であった。より長い鎖長のアルキル基の修飾がある基質については、*S. subarctica* T7b 株においてのみ脱硫が起こった。特に 4,6-dipropyl DBT、4,6-dibutyl DBT、4,6-dipentyl DBT、4-hexyl DBT、2-dodecyl BT、および 7-dodecyl BT に関しては、*R. erythropolis* KA2-5-1 では全く脱硫できなかったが、*S. subarctica* T7b では可能であった。*S. subarctica* T7b は、既知の脱硫微生物の中で最も広い基質特異性を備えた微生物であった。しかも、それぞれの基質を単独に試験した場合もすべてを混合した場合も脱硫性能を発揮した。一方、脱硫は、他の硫黄源があった場合、例えば硫酸イオン、メチオニンあるいはシスチンが存在すると大幅な阻害を受けた。

脱硫によって生成される化合物について調べたところ、Gibb's 反応に陽性の物質が生成されており GC-MS 分析で 2-hydroxybiphenyl と同定した。このことは、本株の脱硫機序は、*Rhodococcus* 属などで知られている 4S 系あるいは、IGTS8 を経由して脱硫されていると予想される。アルキル基が、付いたままこれらの系を通過するのか、最初に側鎖が分解されるのかは、まだ不明である。

3. 固定化菌体法による脱硫試験

S. subarctica T7b の培養菌体を増殖を伴わない緩衝液中でも脱硫反応は進行し、広い基質特異性も保たれていた。*S. subarctica* T7b を種々の素材で固定化菌体を作成して脱硫性能を調べた。ポリビニールアルコール類では、繰り返し使用に耐える固定化菌体を作成することに成功した。濃度や粒子径等を検討し、培養系に匹敵する脱硫と、10 回の繰り返し使用を確認した。

以上のように、本研究は軽油の微生物脱硫における新たな可能性を切り開くための基礎となる重要な知見を与えるものである。

よって審査員一同は、イダ バグス ワヤン グナムが博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。