

氏名・(本籍)	くり 栗	た 田	さ と る 学
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	理	第 3 0 9 号	
学位授与年月日	昭和46年1月27日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
最終学歴	昭和25年3月 東京工業大学応用化学科卒業		
学位論文題目	嫌気性細菌による石油中の有機イオウ化合物 からのH ₂ S発生に関する基礎的研究		
論文審査委員	(主査) 教授	田 宮 信 雄	教授 北 原 喜 男 教授 瀬 戸 秀 一

論 文 目 次

- 第 1 章 緒 論
- 第 2 章 実験方法
- 第 3 章 嫌気性有機イオウ化合物分解菌の分離・培養
- 第 4 章 嫌気性チオフェン分解菌によるチオフェンからのH₂S発生
- 第 5 章 嫌気性チオフェン分解菌による水添残渣油、原油、アスファルテンからのH₂S発生
- 第 6 章 嫌気性チオフェン分解菌及びその抽出物によるチオフェンからのH₂S発生
反応に関する基礎研究
- 第 7 章 総括と考察

論文内容要旨

第1章 緒言

硫酸塩還元菌 *Desulfovibrio* は嫌氣的に硫酸塩等を還元して H_2S を発生するが石油のイオウ化合物を還元する能力はない。 *P. vulgaris* 菌はシスチン、システインなどの含硫アミノ酸に作用して H_2S を発生する。又従来よりある種の細菌が石油中に含まれる有機イオウ化合物に嫌氣的に作用し H_2S を発生すると云われて来たが学術的に裏付けされた研究はなく又その応用例もない。本論文ではチオフェン、ジメチルスルフィド、1-ブタンチオール、ポリスルフィドなどの有機イオウ化合物を分解し H_2S の発生を触媒する嫌氣性有機イオウ化合物分解菌の分離培養とその代表的な嫌氣性チオフェン分解菌によるチオフェン及びアスファルテンなどの石油類からの H_2S 発生について、又この細菌の酵素学的性質について検討した結果を述べ、明らかにした点を紹介する。

第2章 実験方法

本実験方法の要約は次の通りである。

菌の分離培養は通常の方法に準じて行った。嫌氣性有機イオウ化合物分解菌による有機イオウ化合物からの H_2S 発生反応は恒温槽中 $38^{\circ}C$ に保持されたガラスフラスコ中で N_2 を通気しながら行い、発生する H_2S は亜鉛-カドミウム酢酸溶液に吸収せしめ通常のヨード滴定により定量した。生菌の分散液及び無細胞抽出液によるチオフェンからの H_2S 発生反応はワールブルグ検圧装置により N_2 又は H_2 雰囲気下で行った。発生する H_2S はアルカリ溶液に吸収せしめ *S. t. Lorant* 法により定量した。この菌の無細胞抽出液としては生菌を超音波破碎し、遠心分離した上ずみ液を用いた。増殖時の菌量は $660m\mu$ に於ける濁度を測定し予め作成した乾燥菌体量との検量線から求めた。

第3章 嫌氣性有機イオウ化合物分解菌の分離・培養

石油に含まれる有機イオウ化合物、特に環状イオウ化合物に作用する嫌氣性菌についての報告はない。著者は代表的なイオウ化合物としてチオフェン、ジメチルスルフィド、1-ブタンチオール、ポリスルフィドを選び、これらの化合物を嫌氣的に分解し H_2S を発生する細菌の探索、分離、培養、を試み新しく嫌氣性有機イオウ化合物分解菌を単離した。この分離培養のために行った実験方法の要約は次の通りである。

菌株は新潟県の油田地帯の坑道地下 200 m の油泥及びカフジ原油貯蔵ドラム底から採取した。これらの菌株は最初嫌氣的硫酸塩培地で粗に分離培養した。生じたコロニーをそれぞれの有機イオウ化合物を含む培養液で嫌氣的に継代培養しそれぞれ純粋と思われる菌を分離した。これらの菌を嫌氣性チオフェン分解菌、嫌氣性ジメチルスルフィド分解菌、嫌氣性1-ブタンチオール分

解菌，嫌気性ポリスルフィド分解菌と仮称する。これらの菌は $0.5 \times 3 \mu$ の桿菌で既知の *Desulfovibrio* よりも大きく動きがにぶい。この菌の成長最適 pH は 7.2 ~ 7.8，温度は 38°C 附近にある。又これらの菌の培養にはポリペプトンが必要であり，その最適濃度は 0.5 g/ℓ 附近にある。併し乳酸なしでも菌は増殖する。これらの菌は嫌氣的雰囲気ですべての有機イオウ化合物に作用して H_2S を発生する。

第4章 嫌気性チオフエン分解菌によるチオフエンからの H_2S 発生

嫌気性チオフエン分解菌を嫌氣的雰囲気でチオフエンに作用せしめチオフエンからの H_2S 発生について検討した。その要約は次の通りである。

pH 7.2 ~ 7.8，温度 38°C， N_2 又は H_2 ガス雰囲気の条件で嫌気性チオフエン分解菌はチオフエンに作用し再現性よく H_2S を発生し，チオフエンを添加しない培養液からの H_2S 発生量に比較してその発生量は極めて大きい。即ち培養液 5 ℓ - チオフエン 0.2 ml の系に於ける反応に於て，菌を接種してから約 12 時間の誘導期を経て菌量は時間と共に増殖し 18 時間目に最高菌量に達し以後徐々に減少した。一方 H_2S は 12 時間目頃から発生し同じく 18 時間目で最高発生量を示し菌量のピークは H_2S 発生速度のピークとほぼ一致する。一方発生した H_2S の全量は 76 ~ 83 mg のイオウ量に相当し又一方その培養液のみから発生した全 H_2S 量は 16 mg ~ 28 mg のイオウ量に相当する。その差 60 ~ 55 mg に相当する H_2S はチオフエンから発生した事は明らかで，0.2 ml のチオフエンに含まれるイオウ量約 78 mg と比較するとその大部分が H_2S として発生することが明らかである。これは，反応前及び反応後に於けるイオウ収支の検討結果からも確認された。増殖時に於ける菌の比活性は菌量がピークに達する附近で最高となる。この H_2S 発生量は培養液に対するチオフエン添加量の増量と共に増大しやがて飽和状態に達する。チオフエンの最適濃度は 1 ml/5 ℓ 培養液附近にある。本反応に於てチオフエンからの生成物として H_2S 以外のガス状物質は検出されず，チオフエンの分解から生じた炭素骨格からの生成物は菌体又は培養液中に残存しているものと考えられる。

第5章 嫌気性チオフエン分解菌による水添残渣油，原油，アスファルテンからの H_2S 発生

嫌気性チオフエン分解菌を又水添残渣油，原油，アスファルテンの各々に嫌氣的に作用せしめると H_2S が発生する事を見出しこの反応について検討した。

pH 7.2 ~ 7.8，温度 38°C， N_2 又は H_2 ガスの雰囲気下の条件でチオフエン分解菌は水添残渣油，原油，アスファルテンに含まれるイオウ化合物に作用し再現よく H_2S を発生する。一方これらを添加しないときの培養液からの H_2S 発生量は少ない。この場合も菌の増殖に比例して H_2S 発生量は増大し菌量の増殖ピークは H_2S 発生速度のピークとほぼ一致する。

本反応に於て培養液に $FePO_4$ を添加した場合，水添残渣油，原油，アスファルテンからの H_2S 発生量が増大し，而も H_2S が発生し始める迄の誘導期が短縮する。この事から $FePO_4 (Fe^{+3})$

はイオウ化合物からのH₂S発生を促進する役割を果す事が明らかである。又本反応は新しい培養液を添加して改めて菌を増殖させる事によってくり返し連続的に行うことができる。従ってこれら石油類のイオウ分をこの細菌の作用によって除去できる可能性が確認された。

第6章 嫌気性チオフェン分解菌及びその抽出物によるチオフェンからのH₂S発生反応に関する基礎研究

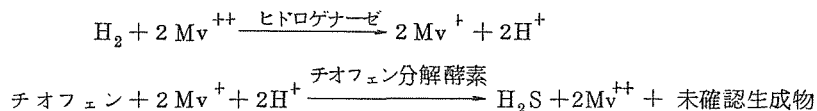
ワールブルグ検圧装置を用いて、チオフェン分解菌の分散液^{*1}及びその無細胞抽出液^{*2}によるチオフェンからのH₂S発生反応を行いこの菌の酵素的性質を検討した。

この生菌の分散液及び無細胞抽出液はN₂ガス雰囲気中でメチルビオローゲンの存在下Na₂S₂O₄と作用してH₂ガスの発生を触媒した。即ち反応開始と共に直ちにH₂ガスが発生した。この生菌の及び無細胞抽出物の活性はそれぞれ1.1, 1.5 μmole/min/mg 乾燥重量であった。即ち、この菌はヒドロゲナーゼ作用をもつ。

次に、この生菌の分散液はH₂ガス又はN₂ガス雰囲気中でメチルビオローゲンの存在下でチオフェンからのH₂S発生反応を触媒する。即ちH₂ガス雰囲気下では反応開始後直ちに反応液が青色を呈し始めメチルビオローゲン還元体の生成が認められる。反応液が青色を呈すると同時にチオフェンからH₂Sが発生し始める。一方N₂ガス雰囲気下では反応開始後約20~30分を経過してからH₂Sの発生が認められる。これらの反応は再現よく行われH₂Sを発生する事を確認した。

又この菌の無細胞抽出液はH₂ガス雰囲気下でメチルビオローゲンの存在下に於てチオフェンからのH₂S発生を触媒する。この場合も反応開始後直ちにメチルビオローゲン還元体が生成してH₂Sの発生が認められる。従って、この菌にはチオフェンの分解に関与しH₂S発生を触媒する酵素仮称「チオフェン分解酵素」の存在が予想される。N₂ガス雰囲気下ではこの反応はおこらない。

この無細胞抽出液による反応に於て、メチルビオローゲンなしではH₂Sは発生しない。又無細胞抽出液のない状態でメチルビオローゲンはチオフェンに作用せずH₂Sを発生しない。又ATPの添加は本反応に影響を与えない。従って無細胞抽出液によるチオフェンからのH₂S発生を触媒作用は次の2つの過程からなる事で説明出来る。



又この生菌の分散液はN₂ガス雰囲気中で乳酸の存在下メチレンブルーの青色を速やかに褪色せしめた。即ちこの菌は乳酸デヒドロゲナーゼ作用をもつことからこの菌には乳酸デヒドロゲナーゼの存在することが明らかである。

* 1 生菌 0.02Mリン酸 buffer (pH 7.2 ~ 7.8)

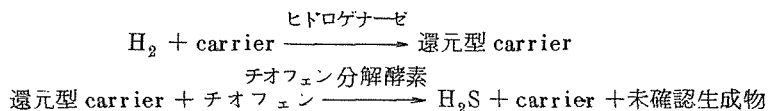
* 2 無細胞抽出液は 0.02Mリン酸 buffer (pH 7.2 ~ 7.8) 抽出液

Mv : メチルビオローゲン

第7章 総括と考察

石油中の有機イオウ化合物からの嫌気性菌による H_2S 発生については予測されていたが、今日尚、その予測を裏付ける証拠がなかった。著者が単離した嫌気性有機イオウ分解菌は、チオフエン等の有機イオウ化合物を嫌氣的に分解し H_2S を発生する事を明らかにした。この反応に関する基礎的な実験結果を考察して次の結論を得た。

- (1) 嫌気性チオフエン分解菌、嫌気性ポリスルフィド分解菌、嫌気性ジメチルスルフィド分解菌、嫌気性n-ブチルメルカプタン分解菌の分離培養方法を確立した。
- (2) 培養はポリペプトン乳酸を含む培養液に有機イオウ化合物を添加し、pH7.2~7.8、温度38°C、 N_2 又は H_2 ガス雰囲気下で行うのが最適である。ポリペプトンは必須栄養源である。
- (3) 上記(1)に示したこれらの菌は硫酸塩還元菌Desulfovibrioとは異なり、それと比較して稍々大きく動きのにぶい桿菌である。
- (4) これらの菌は嫌氣的に有機イオウ化合物に作用して H_2S の発生を触媒する。
- (5) 嫌気性チオフエン分解菌によるチオフエンからの H_2S 発生を定量的に検討して確認した。
- (6) 嫌気性チオフエン分解菌は又水添残渣油、原油、アスファルテンに含まれるイオウ化合物に作用し H_2S 発生を触媒する。
- (7) 上記反応に於て $FePO_4$ の存在は H_2S 発生反応を促進する。
- (8) 嫌気性チオフエン分解菌はヒドロゲナーゼ作用を示す。
- (9) 嫌気性チオフエン分解菌は乳酸デヒドロゲナーゼ作用を示す。
- (10) 嫌気性チオフエン分解菌はWarburg装置に於て栄養源を含まない反応液中でメチルビオローゲンの存在下、チオフエンからの H_2S 発生を触媒する。本反応は H_2 ガス雰囲気下で速やかに起り、 N_2 ガス雰囲気下でおそい。
- (11) 嫌気性チオフエン分解菌の無細胞抽出液は又ヒドロゲナーゼ作用を示す。乳酸デヒドロゲナーゼの作用は未確認である。
- (12) 又、この菌の無細胞抽出液は又メチルビオローゲンの存在下、チオフエンからの H_2S 発生を触媒する。
- (13) 従って嫌気性チオフエン分解菌に仮称 Π チオフエン分解酵素 Π の存在が予想される。
- (14) この菌の無細胞抽出液によるチオフエンからの H_2S 生成機構を考察しヒドロゲナーゼ、チオフエン分解酵素、及び電子伝達体が相互に密接な関係を以て反応に参与する事を示した。



- (15) 今後、明らかにすべき主要な問題点として次の諸点をあげる。
 - イ。仮称 Π チオフエン分解酵素 Π の単離。
 - ロ。チオフエンの炭素骨格からの生成物の確認。

論文審査結果の要旨

栗田学提出の論文は嫌気性細菌による石油中の有機イオウ化合物からの硫化水素発生について検討したもので7章より成り立つ。

第1章緒言，第2章実験方法に続き，第3章では本実験に使用した細菌菌株の分離方法について述べている。チオフェンその他の有機イオウ化合物を加えた培地にいろいろな場所から得た菌を接種培養し，硫化水素生成の有無を調べる。こうして硫化水素生成能の大きい菌株を数種の有機化合物につき分離した。

第4章ではこうして得た菌をチオフェン等を含む培地に接種し，発生する硫化水素を窒素又は水素ガスを通気することにより系外に導き定量することにより，硫化水素発生の場合を定量的に検討した。こうして硫化水素発生に必要な培地組成，条件を明らかにすると共に硫化水素の収率を検討した。適当な条件下では与えたチオフェン中のイオウの75%は硫化水素に変化する。

第5章ではこれらの菌を原油，水添残渣油，アスファルテン等鉱油に作用させて硫化水素が発生することを観察した。pH7.8，38°，N₂又はH₂通気下，少量のリン酸鉄を加えると硫化水素がよく発生する。また培地を交換，添加することにより連続して石油の脱硫を行う可能性が示された。

第6章ではこれらの嫌気性細菌がチオフェンに働いて脱硫を行う反応の酵素的機構について考察している。この菌はヒドロゲナーゼを持ち，この菌の分散液または無細胞抽出液は水素ガスによりメチルピオローゲンを還元する。そして無細胞抽出液は水素雰囲気下，メチルピオローゲンを加えてやればチオフェン作用して硫化水素を発生する。このことからメチルピオローゲンまたはこれに代るべき電子伝達体が“チオフェン分解酵素”の存在下にチオフェンに作用，還元して硫化水素を発生する機構が考えられた。

第7章では以上の実験結果を総括し，今後の応用発展の方向につき考察している。

以上栗田学の論文は嫌気的条件下で石油中の有機イオウ化合物を脱硫，硫化水素にする細菌を初めて分離し，脱硫に関する基礎的条件と，脱硫機構の一部を明らかにしたものである。よって審査員らは栗田学提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認めた。