

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3853459号

(P3853459)

(45) 発行日 平成18年12月6日(2006.12.6)

(24) 登録日 平成18年9月15日(2006.9.15)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 1/20 A

C 1 O G 32/00 (2006.01)

C 1 O G 32/00 A

C 1 O L 1/32 (2006.01)

C 1 O L 1/32 D

C 1 2 R 1/06 (2006.01)

C 1 2 N 1/20 A

C 1 2 R 1:06

請求項の数 9 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願平9-58060

(22) 出願日 平成9年3月12日(1997.3.12)

(65) 公開番号 特開平10-94389

(43) 公開日 平成10年4月14日(1998.4.14)

審査請求日 平成15年12月10日(2003.12.10)

(31) 優先権主張番号 M196A000477

(32) 優先日 平成8年3月12日(1996.3.12)

(33) 優先権主張国 イタリア(IT)

微生物の受託番号 CBS 208.96

(73) 特許権者 595026335

エニテクノロジー、ソシエタ、ペル、アチ
オニイタリア国ミラノ、サン、ドナート、ミラ
ネーゼ、ピア、エッフェ、マリターノ、2
6

(74) 代理人 100064285

弁理士 佐藤 一雄

(74) 代理人 100067079

弁理士 小野寺 捷洋

(74) 代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(72) 発明者 エウジェニオ、ファシェッティ

イタリア国ローマ、ピア、コラティーナ、
443、ピ/A6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *Arthrobacter* sp.、および化石燃料の脱硫のためのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

化石燃料に含まれる硫化有機分子(ここで、硫化有機分子はジベンゾチオフエン(DBT)、メチル-ベンゾチオフエン(C1-BT)、エチル-ベンゾチオフエン(C2-BT)、プロピル-ベンゾチオフエン(C3-BT)およびアルキル-ジベンゾチオフエン(C1-C3-DBT)から選択される)のC-S結合を炭素質構造を破壊することなく選択的に開くことができる *Arthrobacter* sp. CBS 208.96 の生物学的に純粋な培養物。

【請求項2】

硫化有機分子(ここで、硫化有機分子はジベンゾチオフエン(DBT)、メチル-ベンゾチオフエン(C1-BT)、エチル-ベンゾチオフエン(C2-BT)、プロピル-ベンゾチオフエン(C3-BT)およびアルキル-ジベンゾチオフエン(C1-C3-DBT)から選択される)のC-S結合を選択的に開裂することによって化石燃料から有機硫黄を除去する方法であって、

(a) 上記化石燃料のエマルジョンまたは懸濁液を、微生物 *Arthrobacter* sp. CBS 208.96 と、pH 5 ~ 9 および温度 20 ~ 40 で、酸化性雰囲気中で大気圧から3バールまでの圧力で、接触させ、

(b) (a) で得た反応混合物から、脱硫油相、水性相、および油および水と結合した生体触媒である *Arthrobacter* sp. CBS 208.96 からなる粘液相を分離し、

(c) 粘液相を脱硫工程(a) にリサイクルし、

(d) 水性相を、硫酸塩を除いてこれを硫黄に変換することができる嫌気性および好気性

10

20

微生物で処理し、

(e) 硫黄について完全に精製した水を工程(a) にリサイクルすることを特徴とする、方法。

【請求項3】

工程(a) において、界面活性剤なしで、化石燃料/水の容積比を1:1~7:1で水と混合することによって化石燃料のエマルジョンを得る、請求の範囲第2項に記載の方法。

【請求項4】

容積比が3:1である、請求の範囲第3項に記載の方法。

【請求項5】

工程(c) において、粘液相を水で洗浄した後工程(a) にリサイクルし、洗浄水を工程(d) および(e) に記載の方法で処理する、請求の範囲第2項に記載の方法。 10

【請求項6】

工程(a) において、pHが6.5~7.5である、請求の範囲第2項に記載の方法。

【請求項7】

工程(a) において、温度が25~35である、請求の範囲第2項に記載の方法。

【請求項8】

化石燃料が原油、石油留分、石油留出物および石油留出物の残渣である、請求の範囲第2項に記載の方法。

【請求項9】

連続的に行う、請求の範囲第2~7項のいずれか1項に記載の方法。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、炭素質材料に含まれる硫化有機分子のC-S結合を選択的に開くことができる *Arthrobacter sp.*の菌株、および化石燃料からそこに含まれている有機硫黄を選択的に除去する方法におけるその使用に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

化石燃料燃料は、原油およびその留分(fraction)、石油留出物(distillates)、石油留出物(distillation)の残渣などを表す。 30

【0003】

硫黄含量の高い化石燃料を使用すると、時には極めて深刻な環境問題を引き起こす酸性雨の現象の主要な原因であることがよく知られている。この理由により、北米、欧州および日本で既に施行されているかまたは公布されようとしている法律により、硫黄含量の高い化石燃料の消費をできるだけ制限する傾向が見られる。例えば、米国では、環境保護局(EPA)は、1994年現在、ディーゼル燃料の硫黄の比率を0.27%から0.05%未満の値へ減少させることを求めた。

【0004】

また、EECの規制でも、硫黄含量を減少させて米国で既に確立されているものと一致させることを求めている。更に厳しい制限が、スカンジナビア諸国(スウェーデンおよびフィンランド)で施行されている。 40

【0005】

これらの新たな規制を満足することができる化石燃料の供給はまもなく尽きてしまうことは明らかであり、化石燃料を最終的に使用する前にこれから硫黄を除去する効率的かつ経済的な技術を見出だすことが必要であろう。

【0006】

原油は、石油留分および各種の石油製品と同様に、実際には多量の硫黄を含むことが多い。例えば、原油では、硫黄は0.025~5%の割合で含まれ、重質留分でも、硫黄は10%に達する。原油では、硫黄は元素状硫黄、スルフェートおよび硫化水素の形態で微量に存在するが、これは主として様々に置換された硫化物、チオール、チオフエン、ベンゾ 50

およびジベンゾチオフェンの形態で有機マトリックスに組み込まれている。特に、テキサスの石油のような幾つかの粗生成物では、硫黄の約70%はジベンゾチオフェン(DBT)およびそのアルキル誘導体の形態で含まれている。

【0007】

無機硫黄の化合物は、物理化学的処理によって容易に除去することができるが、有機硫黄の除去は大きな問題である。

【0008】

現在採用されている石油の工業的脱硫の通常の方法では、高压高温で、金属触媒の存在下にて水素を燃料と反応させることによってC-S結合を還元して硫化水素(H_2S)とすることから成る水素化脱硫法(HDS)が用いられる。このHDS法では、いわゆる不安定な化合物の脱硫のための技術的な問題が生じるとは思われないが、これ以上の分離は、逆にヘテロ原子を含む芳香族構造を有する有機分子(不応分子(refractory molecules))の水素化脱硫に対する不応性によって妨げられると思われる。これらの不応分子は、通常は極めて過酷であってかなりの量の炭化水素の分解も引き起こされる水素化脱硫法(強度(deep)HDS)の操作条件を必要とする。また、重金属は、知られているように、この方法で用いられる触媒に有害であるので、石油中の重金属の濃度が高いと、水素化脱硫法の使用が限定される。硫化化合物の濃度も重金属の濃度も、精製の際にかなり増加するので、残留燃料油からの有機硫黄の除去の問題は、解決が一層困難である。このため、これらの既知の方法は、この問題に対する許容可能な解決法とはならない。

【0009】

これは、過去50年間に、微生物を用いて、予備燃焼相における燃料に含まれる有機硫化化合物を除去する可能性について集中的に研究されてきた理由を説明している。

【0010】

H_2S を産生する嫌気性硫酸塩-還元剤微生物、および硫酸塩および硫酸のような水溶性の無機形態を形成する好気性酸化微生物を両方共用いることに基づく、有機硫黄を除去するための多数の方法が文献に記載されている。ほとんどの好気性微生物は、Komada (Agr. Biol. Chem., 34, 1320 (1970))によって記載された代謝経路を用いて、モデル分子として用いたジベンゾチオフェン(DBT)を分解する。

【0011】

この代謝によれば、DBTは、ベンゼン環の一つから出発して分解してベンゾチオフェンの誘導体を生じるので、分子は未だ硫黄を含んでいる。この化合物は水溶性であるため、水で抽出することによって除去することが技術的には可能であるが、石油のこれらの微生物による処理、および次の硫黄を含む水溶性生成物の除去を含む脱硫工程は、DBTおよびDBT様化合物の炭素質構造の除去によるエネルギー力の損失を考慮すれば極めて経費のかかるものとなる。

【0012】

代謝を誘導して、出発の硫化分子の完全な分解を行う場合にも、同様な結果が得られる。

【0013】

DBTから硫黄を除去し、炭素質構造は完全なままでありかつ2-ヒドロキシビフェニルを蓄積するので(図1)、脱硫に特異的であることが示されている(4Sとも呼ばれる)代謝経路、スルホキシド-スルホン-スルホン酸塩-硫酸塩によってジベンゾチオフェンから硫黄を除去することができる微生物が当該技術分野で最近報告された。

【0014】

例えばKilbaneらは、代謝「4S」経路を用いてジベンゾチオフェンから硫黄を除去し、2-ヒドロキシビフェニルを生成することができるRhodococcus rhodochrousの菌株を単離したことを報告している(米国特許第5,358,870号明細書、米国特許第5,132,219号明細書、PCT/US92/01868号明細書、欧州第0445896A2号明細書)。

【0015】

しかしながら、この微生物を用いて操作すると、石油生成物を微生物懸濁液と密接に接触

10

20

30

40

50

させておくため界面活性剤を使用する必要がある。これらの剤の使用により、その方法の全体のコストがかなり増加し、次に続く相の分離工程が非常に困難になる。

【0016】

この微生物を用いる方法は、典型的には

1. 炭素源および他の栄養分の存在下での微生物の発酵、
 2. 培地からバイオマスの分離、
 3. 十分に攪拌した反応装置で、多量の水（油分の容積に対して少なくとも1：1）の存在下で行われる脱硫反応の触媒としてのバイオマスの使用、
 4. 反応の一部を形成する相の、適当な装置による分離、
 5. 触媒からなるペースト相の、水洗（flushing）および触媒性能を一定に保持するため一定量の再統合の後、脱硫反応装置へのリサイクル（再循環）、
 6. 水性相を濾過して、触媒の回収をできるだけ多くする、
 7. 出口で水流へカルシウム塩（生（live）また水和した石灰）またはアンモニウム塩（水酸化物イオン）を添加して、硫黄の酸化によって得られる硫酸塩の除去を行なうことができ、（アンモニウムイオンを使用すると、硫酸アンモニウムの溶解度が高いことによりこの塩を分離することができるようにするための溶液の濃度が分かる）、および
 8. 高効率分離装置（静電分離装置）を用いる脱硫油相から水の分離
- によって行われる。

【0017】

既知技術のこれらの方法は、下記のような主要な欠点を有する。

主として水性環境でその活性を行う生体触媒の性能を支持する目的での多量の水の使用、水相中油相の分散を助けかつ基質の生体触媒への伝達現象を促進するための反応混合物での高濃度の（0.5%）界面活性剤の使用、界面活性剤の使用によって生成したエマルジョンを破壊する目的で、バイオリアクターの出口で相を分離するための高効率装置の使用、生成した硫酸カルシウムの埋立て地における廃棄の高価格、または別に生成した硫酸アンモニウムの商業的に廃棄する必要性、脱硫反応装置への硫酸塩の実質的リサイクル（20における硫酸カルシウムの溶解度は0.2/100gであり、硫酸アンモニウムは極めて溶解性である）の結果、生成物阻害の可能性。

【0018】

Brevibacterium sp. D0 の菌株も、文献に記載されており (Van Afferden ら, *Arch. Microbiol.*, 153: 324-328, 1990)、「4S」経路の最初の3個の通路に従って、最終的に完全なDBTの無機化を行い、図2に示される工程図に従って安息香酸塩を生成する追加の代謝工程を有する。

【0019】

Grossmanらは、DBTおよび4,6-ジエチルジベンゾチオフエンから硫黄を除去することができる *Arthrobacter* の菌株の使用に基づいた生物学的脱硫法を、最近報告している (CA2097217号, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 61: 4362-4366, 1995)。

【0020】

しかしながら、この方法も欠点を有する。実際に、これらの菌株の脱硫活性は、低濃度（1mM）の硫酸イオンによって阻害される。

【0021】

【課題を解決するための手段】

炭素質材料中に含まれる硫化有機分子のC-S結合を選択的に開裂することができ、分子自体の炭素質構造は分解することがない *Arthrobacter* の新規な菌株によって、界面活性剤を用いることなく上記の既知技術の欠点を解消することができることを見いだした。これにより、生物学的反応装置を用いずに相を分離するため簡単な装置を用いて水の消費を減少させることができる。また、本発明の菌株の脱硫活性は46mMの濃度の硫酸イオンによって影響されない。

【 0 0 2 2 】

この菌株の試料を 1 9 9 6 年 2 月 9 日にCentraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)に
寄託し、登録番号CBS 208.96を受けた。

【 0 0 2 3 】

発明の具体的説明

【発明の実施の形態】

「 4 S 」経路によって D B T を分解することができる微生物株を単離するため、硫黄含量
の高い原油で汚染された部位の生物学的改良パイロットプラントから採取した土壌を用い
た。

【 0 0 2 4 】

単離は、炭素源および単一の硫黄源として D B T を含む培地で連続集積 (enrichment) お
よび精製相によって行った。その結果、 D B T を用いることができる株の存在が示された
。引き続いて、単一硫黄源として D B T を含む培地で個々に再培養した、純粋培地での微
生物の単離により、 D B T を硫黄源として用いることができる単一菌株を選択することが
できた。この菌株を、予め D S 7 の略号で印を付けた。

【 0 0 2 5 】

D B T は炭素源としても用いられることはないことを明らかにするため、 D S 7 菌株を、
一つは D B T を炭素源としてのみ、他方は炭素および硫黄源として含む 2 種類の培地 D S
3 および D S 4 で培養した。これらの培地で成長が見られないことから、菌株の部分に対
する D B T の使用だけが「 4 S 」による分解であると仮定された。

【 0 0 2 6 】

この仮定を立証するため、菌株を D S 2 培地 (単一硫黄源として D B T) で培養し、 D B
T 上の「休止細胞」でバイオマスを用いた。反応生成物を酢酸エチルで抽出し、 H P L C
および G C / M S で分析した。分析の結果、「 4 S 」経路による D B T の中間体および最
終分解生成物 (2 - ヒドロキシビフェニル) の存在が確かめられた (図 3 および図 4)。

【 0 0 2 7 】

各種の成長相において脱硫に関与する酵素の生成速度論 (kinetics) は、炭素源および単
一硫黄源として D B T を含む培地で D S 7 菌株を培養することによって行った (図 5)。
得られた結果は、下記のことを示していた。

細菌は、指数増殖期の半分を過ぎた後 (2 8 時間)、その最大酵素活性を発現する、
酵素系の安定性は、バイオマスの長期間の保存 (4 、 7 日間) の後も活性が保持され
るので、良好である、

菌株 D S 7 は、直留ガス油、水素化脱硫からのガス油、および石油の大気蒸留から得られ
る主流 (カット : 7 0 ~ 1 6 0 、 1 6 0 ~ 2 3 0 および 2 3 0 ~ 3 5 0) に含ま
れる硫化分子の主な群についてその活性を発現する、

菌株 D S 7 は、外部から薬剤を添加することなく良好なマイクロエマルジョン / マイクロ
分散液を形成することができる乳化剤を生成することができ、
相形成マイクロエマルジョン / マイクロ分散液を容易に分離することができる。

【 0 0 2 8 】

菌株 D S 7 を特徴付けするため、Bergeyの系統的細菌学便覧 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (第 1 ~ 4 巻)、1 9 8 9 年発行、Williams & Wilkins、バルチモ
アに記載の手続きを参照した。

【 0 0 2 9 】

形態学および染色特性

グラム反応	+ (2 4 時間後可変性)
形態型	多形態性、 V 細胞を有する
大きさ	0 . 6 × 1 μ m (定常期)
移動性	なし
内生孢子	なし
孢子囊 (capsule)	なし

10

20

30

40

50

Ziehl-Neelsen

異染顆粒

【 0 0 3 0 】

培養特性

栄養寒天上のコロニー

高さ

色素生産性

着色（酸で）

着色（アルカリで）

表面

縁（border）

大きさ（直径）

乳化性（emulsionability）

色の变化

Y・E・ブロス（broth）中

【 0 0 3 1 】

生理学的特性

β - ガラクトシダーゼ

チトクローム - オキシダーゼ

カタラーゼ

ウレアーゼ

ゼラチナーゼ

アルギニンデヒドロラーゼ

リジンデカルボキシラーゼ

トリプトファンデアミナーゼ

硝酸塩 → 亜硝酸塩還元

硝酸塩 → N₂還元

耐性（tolerance）330 mM NaCl

【 0 0 3 2 】

炭素源の使用

グリセロール

D - グルコース

D - フルクトース

D - マンノース

ガラクトース

L - ソルボース

ラムノース

ズルシトール

イノシトール

マンニトール

ソルビトール

エリトリトール

D - アラビノース

L - アラビノース

リボース

D - キシロース

L - キシロース

アドニトール

アルブチン

エスクリン

-（24時間後）

-

ベージュ / ピンク気味、湿りあり

凸状

なし

なし

なし

滑らか、光沢あり

全体（whole）

1.5 mm（24時間後）

速やか、水中

アルカリ性

+

-

+

+

-

-

-

-

-

-

+

+（酸化）

-

-

+（弱酸化）

+（弱酸化）

-

-

-

+（弱酸化）

+（弱酸化）

+（弱酸化）

-

-

-

+（弱酸化）

-

-

-

-

+（加水分解）

10

20

30

40

50

サリシン	-	
セロビオース	-	
マルトース	-	
ラクトース	+ (弱酸化)	
メリビオース	-	
スクロース	-	
トレハロース	-	
イヌリン	-	
メレジトース	-	
D - ラフィノース	-	10
可溶性澱粉	-	
グリコーゲン	-	
キシリトール	-	
ゲンチオビース	-	
D - ツラノース	-	
D - リキソース	-	
D - タガトース	-	
D - フコース	-	
D - アラビトール	+ (弱酸化)	
L - アラビトール	-	20
アミグダリン	-	
β - メチル - キシロシド	-	
リンゴ酸塩	-	
酢酸塩	-	
安息香酸塩	-	
クエン酸塩	-	
グルコン酸塩	+ (弱酸化)	
α - メチル - D - グルコシド	-	
α - メチル - D - マンノシド	-	
N - アセチル - グルコサミン	-	30

【 0 0 3 3 】

形態学および培養試験の結果に基づいて、本発明の菌株 D S 7 は Mycobacterium、Nocardia、Nocardioideis、Oerskovia および Arachnia 種に属することはできないということが出来る。実際に、これらの種とは異なり、D S 7 は厳密な栄養要求を持たず、これは短期間で成長し、寒天付加した (agarized) 栄養培地で糸状体 (菌糸、気中菌糸体) を生産せず、Ziehl-Neelsen による酸処理に耐性を持たない。

【 0 0 3 4 】

菌株 D S 7 は、明確な酸化性代謝能を有し、Corynebacterium 属に属する通性 (facultative) 呼吸性菌株の不安定性 (versatility)、または Arachnia 属に典型的な嫌気生活での成長能を欠いている。

【 0 0 3 5 】

また、その生理学的特徴および用いられる炭素源にたいする独特の挙動により、これが Rhodococcus 属に属することは除外することができる。この属に属する菌株は実際に、広汎な炭素化合物を使用する能力を有し、β - ガラクトシダーゼを持たない。特に、R. rhodochrous は、フルクトース、グルコース、マンノース、スクロース、マンニトール、トレハロースから酸を生産し、ラクトース上では成長しない。Rhodococcus 属に属することの除外は、膜脂質の比較分析によっても支持された。染色性および限定された酵素特性から、これは、ゼラチンの液化能を有しアルカリまたは酸で処理を施すと洗い流すことができない「ほとんどが細胞の莢膜 (cellular capsule)」およびオレンジ色の色素を生成する Br evibacterium lines 株から識別される。

【 0 0 3 6 】

菌株 D S 7 の成長因子に対する非要求性（ビタミンまたは他の要素の追加を要求しない）、「標準的な」形態遺伝学的周期（新鮮な培養物では V 細胞を有する桿状 - 楕円状、成熟すると球状）、酸素との反応（好気性菌）、炭素源の使用の仕方（酸化性のみ）、幾つかの酵素活性を精確に発現（ゼラチナーゼ、 β - ガラクトシダーゼ）、染色特性（グラム - 可変、Ziehl-Neelsen - 陰性、孢子嚢（capsule）または内生孢子なし）は、試験中のこの菌株が Arthrobacter 属であると思われる。

【 0 0 3 7 】

酢酸塩および安息香酸塩上でのこの単離菌株の非成長は、同じ型に属してはいるが、これは Grossman らによって記載された Arthrobacter の株とは異なる種であることを示唆している。

10

【 0 0 3 8 】

本発明の Arthrobacter sp. による脱硫法は、この菌株またはこの菌株から単離された酵素複合体を、水性培地で脱硫を行う基質のエマルジョンまたは懸濁液（または、その逆）と接触させることからなっている。エマルジョンまたは懸濁液は、界面活性剤なしで、機械装置を有する設備または移動（movement）部品のないミキサー、例えばエゼクター装置（ejector systems）に基づいたミキサーで得られる。混合は、室温および大気圧で、脱硫を行う基質 / 水性相の容積比が 1 : 1 ~ 7 : 1、好ましくは 3 : 1 で行われる。この方法で、酸化反応装置中の滞留時間であって一般的には石油留分の種類および相対硫黄含量によって変化する時間に対して安定なマイクロエマルジョンまたはマイクロ懸濁液を得ること

20

【 0 0 3 9 】

本発明の脱硫法は、原油、真空下での大気蒸留の熱処理を行った留分（燃料油）、および強制脱硫を施す H D S プラントから生じるガス油について行なうことができる。

【 0 0 4 0 】

本発明の脱硫法は、回分式（batchwise）または連続的に行なうことができ、好ましくは連続的に行なうことができ、下記の主要な操作相を特徴とする。

【 0 0 4 1 】

(1) 細菌 D S 7 の培養

細菌 D S 7 またはその酵素誘導体からなる生物学的触媒（生体触媒）は、任意の種類の発酵装置、好ましくは連続発酵装置で菌体（cells）を培養することによって製造する。水性培地は、同化性炭素源、窒素源並びに各種カチオンおよびアニオンを含んでいる。

30

【 0 0 4 2 】

石鹼製造産業から副生成物として得られるグリセリン性水を、例えば低価格炭素源として用いることができる。本発明の方法で用いることができる窒素源は、例えば硝酸アンモニウム、塩化アンモニウムまたは炭酸アンモニウムのようなアンモニウム塩、または尿素から選択することができる。

【 0 0 4 3 】

下記のカチオンおよびアニオンも同様に、本発明の目的に好適である。

カリウム、ナトリウム、マグネシウム、鉄、カルシウム、酸ホスフェートおよび塩化物。

40

【 0 0 4 4 】

培地は、脱硫活性を有する酵素複合体の合成を誘導しかつ維持することができ、かつ D B T、石油または高含量の硫化有機分子を有するその誘導体から選択することができる硫黄源も含んでいる。培地の製造に必要な水性相は、下記の工程 (4) から得ることができる。

【 0 0 4 5 】

細胞の成長は 20 ~ 35、好ましくは 30 の温度で、攪拌および曝気下（毎分空気 0.5 ~ 1 容 / 反応装置容積）にて行う。p H は、ほぼ中性に維持する。

【 0 0 4 6 】

2. 生体触媒の製造

培養した菌体（cells）を集めて、バイオテクノロジー産業の典型的な手順および設備を

50

用いて培地から分離する。この方法によれば、引き続いて生物学的脱硫反応に供給されるような流れでそれらを濃縮する。

【0047】

或いは、菌体を、一層高い触媒活性を有する酵素抽出物の分離工程に付すことができる。これらの操作は、通常のバイオテクノロジー技術（細胞破壊、核酸の分離など）に従って行なうこともできる。

【0048】

3. 生物学的脱硫反応

反応は、連続または回分式反応装置で行なうことができる。連続反応装置は、プラグフローまたは攪拌型（連続攪拌タンク反応装置、CSTR）のいずれかが好ましい。後者は、

10

【0049】

CSTR多段配置構成が最適である。プラグフロー反応装置では、脱硫を行う基質の懸濁液を、予め形成した水性培地に供給する。

【0050】

CSTR反応装置では、エマルジョンは、同じ反応装置で製造することができる。従って、それらは、生体触媒を、脱硫を行う油相および硫黄の生物学的酸化工程に要する酸素が得られるガス相（空気、濃縮空気など）と密接するようにして製造される。

【0051】

菌株DS7の厳密な親油性を考慮すれば、反応は、界面活性剤なしで水の量を減らして行なうことができる。1:1~7:1、好ましくは3:1の脱硫を行う材料/水の容積比を用いるのが、好都合である。

20

【0052】

油相および水相は向流で供給して、関連の生物学的反応を有する液-液抽出装置に類似の装置を製造することができる。それぞれの段階がミキサーと分離装置とからなるこれらの装置では、新鮮な触媒を、硫酸塩の除去から生じる水を用いて製造することができる（要点5を参照されたい）。この方法では、脱硫活性を最大効率で発揮する。

【0053】

脱硫反応は、20~40、好ましくは25~35の温度、および5~9、好ましくは6.5~7.5のpHで行われる。

30

【0054】

4. 反応装置の出口における相の分離

重力場において適度に増加することができる相分離装置の使用が、この分離に十分である（限定された回転数の遠心分離機、ハイドロサイクロンなど）。

【0055】

下記の3種類の流れが分離によって得られる。

【0056】

a) 脱水後、使用のために送ることができる油の脱硫相。水は主として除去が困難な生体触媒と会合しているので、脱水操作は問題とはならない。

【0057】

40

b) 通常の手法（遠心分離、濾過など）で除去することができる少量の生体触媒を含む水相。残りの水流を要点(5)に記載の方法で硫酸塩の除去段階に付し、次いで段階(1)にリサイクルする。

【0058】

c) 主として生体触媒並びに油および水からなる粘液相。この流れは、硫酸塩の含量によっては、直ちに脱硫反応装置にリサイクルし、または水に粘液流を再懸濁し、混合物に遠心分離を施すことによって行われる硫酸塩の除去を施すことができる。残留水流を、要点bに記載のものと合わせる。

【0059】

(5) 硫酸塩の除去

50

段階(4) から得られる水供給源を合わせて、硫酸塩 - 還元剤嫌気性細菌を使用して生物学的に硫酸塩を除去する。この処理は、嫌気性フィルター型(固体担体上に吸着したバイオマスを用いて操作する)またはアップ・フロー嫌気性スラッジブランケット型(Up-flow Anaerobic Sludge Blanket type)(UASB、凝集したバイオマスで操作する)の通常の嫌気性反応装置中で行なうことができる。

【0060】

この段階では、硫酸塩は可溶性の硫化物に還元される。微量の硫化水素は、石油工業で用いられる通常のプラントで除去することができ、可溶性硫化物は、例えば*Thiobacillus*、*Beggiatoa*、*Thiotrix*、*Thioploca*、*Paracoccus*属などの好気性または微好気性微生物のバイオマスを用いて次の生物学的段階で再酸化して元素状硫黄とすることができる。

10

【0061】

吸着したまたは凝集したバイオマスと共に機能する反応装置を用いて、硫化物の硫黄への酸化反応を行なうこともできる。しかしながら、微好気性微生物の場合には、要求される酸素の供給が限定されているため、バイオマスが回転担体上に吸着されている反応装置(Rotary Biological Contactor, RBC)を用いるのが好ましく、好気性微生物の場合には、頭部に沈降器(settler)を有する高さで展開された配置構成を用いることができる。

【0062】

上記の微生物は中温性であるため、室温に近い温度、好ましくは約30～35℃に制御した温度で用いるのが好ましい。好ましい操作pHは中性に近いが、酸性値に達することもあり、操作圧は大気圧に相当する。

20

【0063】

反応装置から出てくる硫黄は、水相およびバイオマスから、固形物の沈降、洗浄および濾過操作、硫黄の融解およびその分離によって分離することができる。硫黄は130℃で融解し、硫酸の製造のため市販されているような純度を有する生成物を得ることができる。

【0064】

硫黄を除去するための一連の操作により、栄養分と一緒に合わせた後、細菌DS7の培養のため段階(1)に一部をリサイクルし、一部を再使用してバイオマスを再懸濁することができるような含量の硫酸塩を有する水を生成する。これらの操作により、浄化水準の浄化水流であって直接または温和な通常の好気性後処理の後に表面水力装置(Surface hydric systems)に排出することができるようなものも得られる。この後者の操作は、石油工業で普通に利用される水処理プラントで行なうことができる。

30

【0065】

下記の実施例は、本発明を一層よく説明するためだけのものであり、発明の範囲を制限するものと考えるべきではない。

【0066】

【実施例】

例 1

Arthrobacter sp.の単離

「4S」経路によってDBTを分解することができる微生物株を単離するため、有機硫黄含量が約6%のSowedi原油で汚染された(約1.6%(重量/重量))部位の生物学的改良パイロットプラントから採取した土壌を用いた。

40

【0067】

土壌100gを水200mlに添加し、激しく攪拌して、沈澱させた後、2つの上清を5mlずつ採取した。

【0068】

これらの等分試料を用いて、2種類の異なる培地(DS1およびDS2)50mlをそれぞれ入れた2個の250mlフラスコに接種した。2回蒸留水中の上記培地の組成を、表1に示す。

表 1

成分	DS 1	DS 2
----	------	------

50

KH_2PO_4	10.0 g/l	10.0 g/l
NH_4Cl	2.0 g/l	2.0 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.2 g/l	0.2 g/l
DBT	-	0.5 g/l
コハク酸	4.0 g/l	4.0 g/l
$FeCl_3$	10.0 mg/l	10.0 mg/l
$CaCl_2$	20.0 mg/l	20.0 mg/l
pH (NaOHで)	6.4	6.4

【0069】

2個のフラスコを、30、200rpmの軌道 (orbital) NBSインキュベーターに入れた。同じ培地で72時間の間隔で、5% (容積 / 容積) の接種源を用いて、5回連続継代培養を行った。 10

【0070】

DS1培地は、他の栄養素に含まれる硫黄不純物による基本成長を示すためのコントロールとして働いた。DS2での成長の方が有意に高く、培地に含まれる微生物の部分に対するDBTの硫黄の使用の仮説が証明された。

【0071】

DS2で5回継代培養した後に得た培養液 (broth) を用いて、最大寒天付加培地 (Nutrient Agar (商品名)、DIFCO) を含むペトリ皿に (各種の希釈倍率で) 接種を行い、30で48時間インキュベーションした。成育した総てのコロニーの中から、形態学および / または着色特性が互いに明らかに異なる7個を選択した。 20

【0072】

7個の菌株は、最初に上記のNutrient Agar (商品名) 上での単一のペトリ皿で単離した後、DS2培地を含むフラスコに接種して、DBTを硫黄源として用いるそれらの能力を試験した。1個の菌株だけが、これらの条件下で生育可能であることが分かった。

【0073】

例2

分解経路の証明

A) 硫黄源としてDBT上で生育可能な唯一の菌株 (DS7と呼ばれる) を、表2に示される組成を有する培地DS3およびDS4の接種物として用いた。 30

表2

成分	DS3	DS4
KH_2PO_4	10.0 g/l	10.0 g/l
NH_4Cl	2.0 g/l	2.0 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	-	0.2 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g/l	0.5 g/l
DBT	0.5 g/l	0.5 g/l
コハク酸	-	-
$FeCl_3$	10.0 mg/l	10.0 mg/l
$CaCl_2$	20.0 mg/l	20.0 mg/l
pH (NaOHで)	7.2	7.2

【0074】

これらの培地において、DBTは、炭素源としてだけ (DS3、硫黄は硫酸塩として供給) 、および硫黄および炭素源 (DS4) としても供給された。

【0075】

これらの培地上での非生育は、DS7の脱硫活性の発現として解釈された。

【0076】

B) 「4S」経路による中間体および最終生成物 (2HBP) の存在の試験

菌株DS7を、DS2培地上で30で28時間培養し、培養液を集めて、遠心分離し、リン酸緩衝液10g/l、pH7.2で2回洗浄した。 50

【0077】

乾燥物質約100mgに等しいバイオマスを、同じリン酸緩衝液25mlに懸濁して、フラスコに入れた。40mMジベンゾチオフエン/エタノールの溶液0.625mlを攪拌しながらフラスコに加えた。従って、反応媒質中のジベンゾチオフエンの初期濃度は1mMであった。得られた混合物2mlずつを密封したアンプルに入れ、2パールの酸素で加圧した。所定のインキュベーション期間の後、酢酸エチル2mlをアンプルに加えて、DBTおよびその誘導体の抽出を行った。得られた抽出物を、HPLC(図3)およびGC/MS(図4)によって分析した。

【0078】

図3および3aに示した結果は、DBTは、2時間の反応の後にはほぼ完全に2-ヒドロキシ-ビフェニルに転換されていることを示している。図3に示した2-ヒドロキシビフェニルは、DBTの2-HBPおよび発酵相において微生物によって生物吸収した2-HBPへの直接変換による可能性があることに留意すべきである。「4S」経路により総てのDBTの分解生成物が存在することは、図3bで証明することができる。これらの生成物は、4で7日間保存した後に見られるような触媒活性の低下した細胞、または酸素を限定した速度論的実験(run)でのみ見ることができる。

【0079】

例3

A) 酵素製造の速度論(kinetics)

各種の成長相での脱硫に關与した酵素の生産傾向を示すため、低濃度の誘導物質を有するように改質した(DBTの0.5g/lからDBTの20mg/lまで)DS2培地500mlを入れた2リットルのフラスコに菌株DS7を接種した。25mlの接種物が、エルレンマイヤーフラスコで行った同じ培地での上記培養から得られた。フラスコを上記と同じ条件でインキュベーションした。

【0080】

培養液のアリクワットを16、22、28、および39時間目に採取した。試料について、下記のパラメーターを決定した。660nmでの吸光度、乾燥重量、および比脱硫活性。乾燥重量は、バイオマスをも2回蒸留水で洗浄した後105での所定の残留物として決定された。比活性は、20mlの培養液のアリクワットについて決定した。これらを8000gで10分間遠心分離し、20mM Tris-HCl緩衝液pH7.2に再懸濁して、再度遠心分離した。バイオマスを同じ緩衝液に再懸濁して、最終容積を9.75mlとした。得られた菌体懸濁液を、40mM DBT/エタノール0.25mlを加えた50mlフラスコに移した。フラスコを30で攪拌しながらインキュベーションし、所定時間毎に混合物のアリクワットを採取してHPLCで分析した。得られた結果を、図5に示す。この図から、細菌がその指数増殖期の半分を越えた時点で酵素活性のどの程度の最大発現が記録されるかが分かる。

【0081】

B) 石油留分による酵素活性の誘導

この目的のため、菌株DS7を、ジベンゾチオフエンを誘導物質および硫黄源としてのその機能において(a)硫黄13600ppmを含む石油留分230~350の0.5ml/l、(b)硫黄2000ppmを含むHDSからのガス油1ml/lに代えたDS2培地で培養した。培養は、要点Aに記載した手続きに従って500mlフラスコで行った。44時間後に、培養液20mlに含まれるバイオマスを分析して比活性を測定した。試料(a)に対するこのパラメーターは、乾燥DBT4.3mg/g/時であったが、試料(b)では乾燥DBT/時は2.6mgの値となった。これらの結果は、試験を行った石油生成物は酵素複合体の合成を誘導するような物であることを示している。

【0082】

例4

ガス油の脱硫試験

流動性添加物DODIFLOW(商標名)V3905-2の残留硫黄含量約2000ppmおよび47p

10

20

30

40

50

p mで標準的H D S脱硫処理を行ったガス油を用いた。硫黄1 0 2 0 0 p p mを含む非脱硫ガス油も、同時に実験した。連続培養の後（希釈率0 . 0 9 時⁻¹、例2 Aと類似の培地）に得られたバイオマスを遠心分離によって分離し、T r i s - H C l 緩衝液p H 7 . 2で2回洗浄した。次いで、これを同じ緩衝液に再懸濁して、乾燥生成物の濃度が3 8 m g / m lとなるようにした。

【0083】

菌体懸濁液7 . 5 m lおよびガス油2 . 5 m lを、5 3 m lボール（bowls）に入れた。このボールを2 . 0 パールの圧に置き、2 0 0 r p mで攪拌しながら3 0 でインキュベーションした（標準試験）。反応条件下（水性および酸化性環境）での可能な副反応を明らかにするため、菌体細胞懸濁液をT r i s - H C l 緩衝液に代えた試験を対照として行った。第三の試験も、石油留分および0時間として採取した菌体の存在下で行った。標準および対照試験は、2 4時間後に中断した。反応混合物を遠心分離した（8 0 0 0 g、2 0 分間）。回収された油相を、原子放射検出機（Atomic Emission Detector（商標名）AE D, Mod. HP 5921-A）を備えたHewlett-Packard 装置（Mod. 5890）を用いてガスクロマトグラフィによって分析した。クロマトグラフィ分離は、J.W.S.のDB-1型の毛細管カラムを用いて行った。0時間の寄与を差し引いた後の結果を、表3に示す。対照試験は、対応する現象を示さなかった点に留意すべきである。

表3

ガス油	硫黄, p p m	脱硫%
直留(straight-run)	1 0 , 2 0 0	1 3 . 5
H D S から	2 , 0 0 0	1 9 . 7

【0084】

この表から、細菌D S 7は、試験を行なったいずれのガス油でもその活性を示すことが分かる。

【0085】

また、表4に示したデーターから見られるように、菌体D S 7は試験を行なったガス油に含まれる主要な群の硫化分子に対して活性である。

表4

分子	脱硫%（24時間）	
	直留	H D S から
C 3 - B T	10.2	18.9
D B T	10.3	16.8
C 1 - D B T	10.3	22.9
C 2 - D B T	7.1	5.1

【0086】

例5

乳化剤の存在および非存在下での脱硫

試験は、ジベンゾチオフエンを0 . 3および3%の濃度で含むドデカンからなるモデル系を用いて行った。

【0087】

0 . 3のD B Tを用いて、3種類の異なる試験を行い、菌株D S 7の脱硫活性に対する乳化剤の影響を明らかにした。第一の試験は、乳化剤の添加なしであり、第二および第三は、それぞれTriton N-101を0 . 2 5および0 . 5%含んでいた。

【0088】

いずれの試験に対しても、下記の手順を採用した。油相のアリクウォット（2 . 5 m l）を、容量が5 3 m lの8個のボール（試験当たり2個）に入れた。乾燥生成物 / m lを1

10

20

30

40

50

2.5 mg の比率での菌体を含む緩衝液 20 mM Tris-HCl 溶液 pH 7.2 の 7.5 ml (ボール当たり約 100 mg の全乾燥生成物) を次にそれぞれのボールに加えた。ボールを閉じて、酸素で 2 バールとした。8 個のボールの内、0 時間を表す 4 個は、酸素を添加した直後に氷浴に入れて、下記の方法で直ちに分析した。他の 4 個は、30 に制御した恒温槽で攪拌下 (200 rpm) 16 時間インキュベーションした。

【0089】

8 個のボールに入れた反応混合物をガラス試験管に移して、8000 g で 15 分間遠心分離した。ドデカンのアリクウォットを酢酸エチルで適当に希釈して、HPLC で分析した。0 時間を差し引いた後に得られた結果を、表 5 に示す。

表 5

乳化剤 (Triton N-101)	DBT %	脱硫 %
-	0.3	35.1
0.25	0.3	14.6
0.5	0.3	16.4
-	3	3.1

10

【0090】

上記の結果は、細菌 DS7 は、その脱硫活性を行うことができるようにするのに市販の乳化剤を必要とないことを示している。対照的に、外部からの乳化剤は、かなりの阻害効果があることに留意すべきである。

【0091】

例 6

モデル系での脱硫試験

試験を行って、菌株 DS7 の親油性により、この方法の水消費が少なくなることを示した。

【0092】

この目的のため、それぞれの試験において 0.3% DBT / ドデカンの溶液および一定量のバイオマスを用いて、3 種類の異なる試験を行った。第一のものでは、菌体懸濁液 (乾燥生成物 19.8 mg / 水 1 ml) およびドデカン 4 ml (油相: 水相比 2:1) を用いた。しかし第二のものはドデカン + DBT (比 3:1) の容積を 6 ml に増加して同様に作成した。2 つの試験を、油相: 水相の比が 1:1 である第三のものと比較した。

【0093】

混合物を 6 個の 50 ml アンプル (2 × 試験) で反応させた。酸素をアンプルに通じて、1.5 バールとし、密封して、攪拌しながら 30 でインキュベーションした。3 個のアンプルは 0 時間に、他の 3 個は 20 時間後に、減圧した。相分離の後、有機相のアリクウォットを採取して、酢酸エチル (4 容 / 1 容) を加え、HPLC 分析を行った。

【0094】

表 6 に、0 時間を差し引いた 20 時間後に得られた結果を示す。

表 6

ドデカン／水相の比	脱硫 (分解した DBT の mg 数 / 乾燥生成物の g 数)
1 : 1	38.1
2 : 1	36.1
3 : 1	34

30

40

50

【 0 0 9 5 】

この表から分かるように、より少量の水の存在下でも脱硫は同様の水準で起こる。

【 0 0 9 6 】

例 7

菌株 D S 7 の脱硫活性に対する硫酸塩の濃度の影響

試験は、3 種類の同量の乾燥 D S 7 バイオマス (1 3 m g / m l) を懸濁した物を用いて行った。

【 0 0 9 7 】

第一 (ブランク) は、2 0 m M トリス - H C l 緩衝液、p H 7 . 2 中。

【 0 0 9 8 】

第二は、N a ₂ S O ₄ の 1 5 . 5 m M (硫黄 5 0 0 p p m に相当) を含む同じ緩衝液中。

【 0 0 9 9 】

第三は、N a ₂ S O ₄ の 4 6 . 5 m M (S 1 5 0 0 p p m) を含む同じ緩衝液中。

【 0 1 0 0 】

D B T (1 m M) を添加した後、3 種類の試験を 3 0 度 2 0 0 r p m の撹拌槽で行った。2 および 4 時間後に、D B T の残留濃度を測定した。表 7 に、得られた結果を示す。

表 7

硫酸塩 (mM)	脱硫 (%)	
	2 時間	4 時間
0	75	100
15.5	55	100
46.5	50	100

【 0 1 0 1 】

例 8

石油留分の脱硫試験

総硫黄含量が 1 . 3 6 % (Belaym 原油) である原油の大気蒸留から得られる下記の留分を用いた。1) 留分 7 0 ~ 1 6 0 、2) 留分 1 6 0 ~ 2 3 0 、3) 留分 2 3 0 ~ 3 5 0 。それぞれの留分の硫黄含量は、それぞれ 4 0 0 、2 4 0 0 、および 1 3 6 0 0 p p m であった。ジベンゾチオフェン 1 6 0 p p m に相当する追加量の硫黄を、それぞれの留分に添加した。これにより、精確な対照化合物を得ることができた。

【 0 1 0 2 】

石油留分 5 m l を、0 . 1 M リン酸緩衝液 p H 7 の 5 m l と混合した。菌体を、それぞれ乾燥生成物 1 6 および 3 2 m g / 緩衝液 1 m l に相当する 2 種類の異なる濃度で用いた。反応混合物を含むアンプルに酸素で 1 . 5 バールの圧を加え、密封した。油相と接触させる前に温度を 1 2 1 度 に 2 0 分間上昇させることによって菌体を失活させた同じ混合物からなる比較試料を用いた。単一アンプルの全内容物を遠心分離 (8 0 0 0 g 、2 0 分間) し、所定の時間 (2 4 および 4 8 時間) に例 4 に記載されている方法に従って G C / A E D によって分析を行った。クロマトグラフィ分離は J . W . S . の D B - 1 型の毛細管カラムを用いて行った。得られた総脱硫水準を、表 8 に示す。

表 8

留分	菌体 (cells)			
	16mg/l		32mg/l	
	脱硫%		脱硫%	
	24時間	48時間	24時間	48時間
70～160 ℃			2.5	4.6
160 ～230 ℃	3.2	5.4	4.1	8.5
230 ～350 ℃	4.1	7.9	8.2	14.1
ブランク	-	-	-	-

10

【 0 1 0 3 】

下記の主要な群の化合物の脱硫水準も、最終留分について測定した：メチル - ベンゾチオフエン (C 1 - B T)、エチル - ベンゾチオフエン (C 2 - B T)、プロピル - ベンゾチオフエン (C 3 - B T) およびアルキル - ジベンゾチオフエン (C 1 - C 3 - D B T)。得られた結果を表 9 に示す。

表 9

分子	菌体			
	16mg/l		32mg/l	
	脱硫%		脱硫%	
	24時間	48時間	24時間	48時間
C 1 - B T	3.5	7.7	5.9	14.3
C 2 - B T	4.2	8.1	8.4	16.2
C 3 - B T	4.5	8.3	7.7	15.1
C 1 - C 3 - D B T	3.4	7.6	8.9	17.9

20

30

【 0 1 0 4 】

例 9

水 - 油エマルジョンの分離試験および触媒の回収

菌体 / 0 . 1 M リン酸緩衝液、p H 7 (乾燥生成物 3 2 m g / m l) の均質懸濁液 1 0 0 m l を、例 4 に用いた等容の同じ脱硫ガス油と接触させた。容器を閉じて 2 バールの酸素雰囲気置き、3 0 で 2 0 0 r p m で攪拌を行いながらインキュベーションを行った。比較試験は、Triton N-10 を混合物に 0 . 2 5 % (容積 / 容積) の割合で添加することによって行った。2 4 時間後に、混合物を 2 0 0 0、4 0 0 0 および 8 0 0 0 g で遠心分離した。回収した様々な相の容積を、表 1 0 に示す。

40

表 10

重力	乳化剤使用			乳化剤なし		
	得られた相 (m l)			得られた相 (m l)		
	油相	水相	エマルジョン	油相	水相	エマルジョン
2,000	76	2	122	83	38	79
4,000	81	3	116	89	41	70
8,000	83	6	111	91	48	61

10

【 0 1 0 5 】

この表では、いずれの場合にも、乳化剤を添加せずに回収した油相および水相の方が乳化剤を用いたものより高いことが分かる。後者の場合には、回収された水相は実用上に無視し得る程度である点に留意すべきである。

【 0 1 0 6 】

従って、界面活性剤を使用すると、硫酸塩を除去した後に反応装置にリサイクルされる水相の分離は、極めて困難であると思われる。

【 0 1 0 7 】

菌株 D S 7 を用いることによる、乳化剤の使用が必要ないという利点は、明らかである。

20

実際に、低重力で遠心分離をすると、

透明な脱硫した油相、

硫酸塩を分離しようとする透明な水相、および

すべての活性な脱硫細胞を含み、酸化反応装置にリサイクルすることができる乳化相を分離することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 4 - S 路によるジベンゾチオフエンの分解経路を示す説明図。

【 図 2 】 *Brevibacterium* sp. に対して提案されたジベンゾチオフエンの分解経路を示す説明図。

【 図 3 】 図 3 (a) は、反応の開始時における「休止細胞」からの抽出物の H P L C による分析図。ピークは 2 - ヒドロキシビフェニル (R T = 1 0 . 8 5)、D B T (R T = 1 5 . 3 0) に相当する。図 3 (b) は、最適条件下で 2 時間反応後の「休止細胞」からの抽出物の H P L C による分析図。反応の開始時に含まれる D B T は 2 - H B P に変換された。図 3 (c) は、4 で 7 日間保存した細胞試料について行った H P L C 分析図。この分析から、「4 - S」経路が確かめられる。D B T - S O (7 . 7) ; D B T - スルホン (9 . 4)。

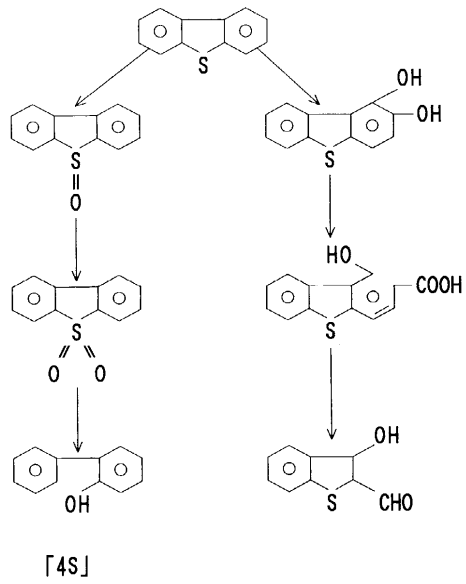
30

【 図 4 】 「休止細胞」からの抽出物の G C - M S による分析図。ピークは、それぞれ保持時間 6 7 酢酸エチル、1 2 9 2 - ヒドロキシビフェニル、2 0 9 D B T、3 7 2 D B T オキシドに相当する。

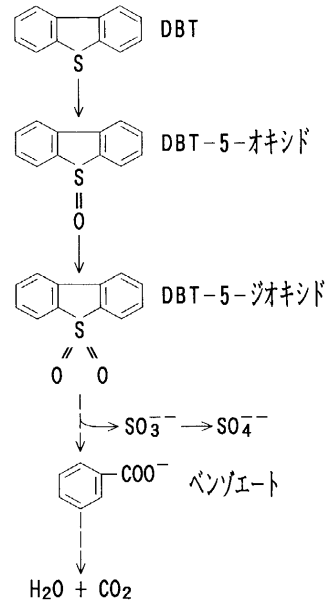
【 図 5 】 酵素複合体の生成速度論 (kinetics) を示す説明図。

40

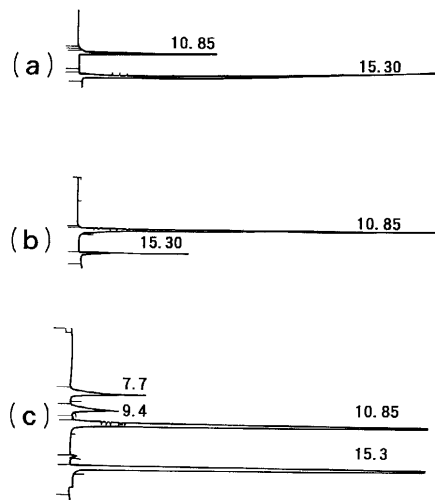
【図 1】



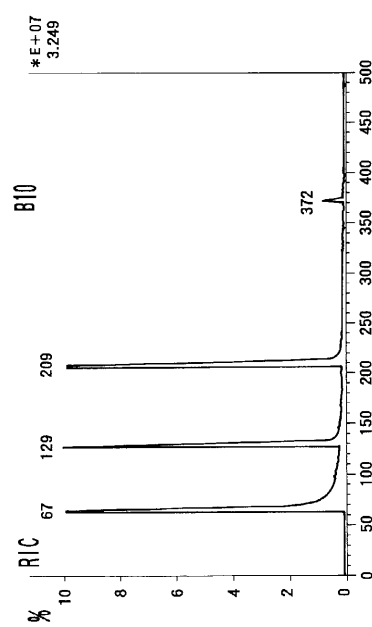
【図 2】



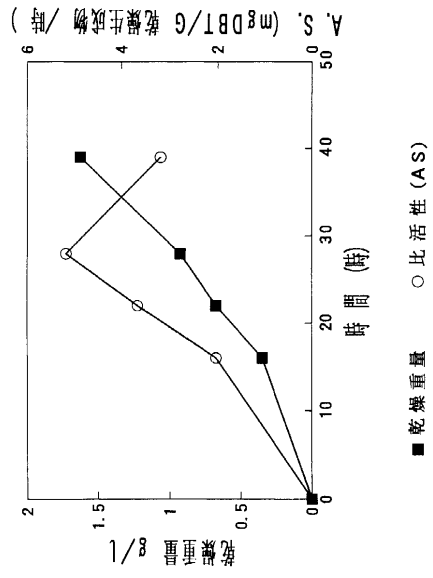
【図 3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

- (72)発明者 エツィオ、ダダーリオ
イタリア国モンテロトンド、ピア、デロ、スタディス、1
- (72)発明者 ロベルト、ジアンナ
イタリア国ローマ、ピア、エンメ・メラート、84
- (72)発明者 ペスカーレ、サチェッドゥ
イタリア国モンテロトンド、ピア、ニーロ、2
- (72)発明者 ルーカ、セルボリスカ
イタリア国ミラノ、ピア、バッシーニ、40
- (72)発明者 アンドレア、ロベルティエルロ
イタリア国ローマ、ピア、ピ・ツォルツィ、58

審査官 六笠 紀子

- (56)参考文献 Fuel,1993,Vol.72,No.12,p.1645-1649
Appl.Environ.Microbiol.,1995,Vol.61,No.12,p.4362-4366
Microbios,1996,Vol.88,No.357,p.223-236

- (58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
C12N 1/00-7/08
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)
JSTPlus(JDream2)