

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3989529号  
(P3989529)

(45) 発行日 平成19年10月10日(2007.10.10)

(24) 登録日 平成19年7月27日(2007.7.27)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 1/20

F

C 1 2 S 1/02 (2006.01)

C 1 2 N 1/20

D

C 1 2 S 1/02

請求項の数 5 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2007-70465 (P2007-70465)  
 (22) 出願日 平成19年3月19日(2007.3.19)  
 (62) 分割の表示 特願平11-54592の分割  
 原出願日 平成11年3月2日(1999.3.2)  
 (65) 公開番号 特開2007-182584 (P2007-182584A)  
 (43) 公開日 平成19年7月19日(2007.7.19)  
 審査請求日 平成19年3月19日(2007.3.19)

微生物の受託番号 FERM P-17268

(73) 特許権者 301021533  
 独立行政法人産業技術総合研究所  
 東京都千代田区霞が関1-3-1  
 (72) 発明者 松井 徹  
 茨城県つくば市二の宮3-24-6 ハイ  
 ツライラック101  
 (72) 発明者 鈴木 正則  
 静岡県清水市西久保136-1 1-13  
 4  
 (72) 発明者 倉根 隆一郎  
 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法  
 人産業技術総合研究所つくばセンター内

審査官 柴原 直司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物脱硫法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アルキル化ベンゾチオフエン分解する能力を有するロドコッカス属T09株(FERM P-17268)を用いてアルカリ化ベンゾチオフエンを分解することを特徴とする含硫複素環式化合物の分解方法。

【請求項2】

アルキル化ベンゾチオフエンを含有する培地中で前記微生物を培養することを特徴とする請求項1記載の分解方法。

【請求項3】

アルキル化ベンゾチオフエンを前記微生物の休止菌体と接触させることを特徴とする請求項1記載の分解方法。

【請求項4】

アルキル化ベンゾチオフエンが、2-メチルベンゾチオフエン、3-メチルベンゾチオフエン、5-メチルベンゾチオフエン、又は2-エチルベンゾチオフエンであることを特徴とする請求項3に記載の分解方法。

【請求項5】

微生物が、ロドコッカス属T09株(FERM P-17268)であることを特徴とする請求項1乃至5のいずれか一項に記載の分解方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

## 【 0 0 0 1 】

本発明は、微生物を利用する含硫複素環式化合物の分解方法に関し、より詳しくは、石油等の化石燃料中に含まれるアルキル化ベンゾチオフェンのような難分解性の含硫複素環式化合物を効率的に分解する方法に関する。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 2 】

石油のような炭化水素燃料中には多種類にわたる硫黄化合物が存在しており、これらの硫黄化合物が大気中に放出されると環境に重大な影響を与えることから、炭化水素燃料中の硫黄含量を低減させる脱硫操作が求められている。

脱硫方法としてはアルカリ洗浄や溶剤脱硫などの方法も知られているが、現在では水素化脱硫が主流となっている。水素化脱硫は、石油留分中の硫黄化合物を触媒の存在下で水素と反応させ、硫化水素として除去して製品の低硫黄化をはかる方法である。触媒としては、アルミナを担体としたコバルト、モリブデン、ニッケル、タングステン、などの金属触媒が使用される。金属触媒は一般にその基質特異性が低く、多様な種類の硫黄化合物を分解し、化石燃料全体の硫黄含量を低下させる目的には適しているが、特定のグループの硫黄化合物に対してはその脱硫効果が不十分となることがあると考えられる。たとえば、脱硫後の軽油中にはなおもアルキル化ベンゾチオフェン、アルキル化ジベンゾチオフェンなどの種々の含硫複素環式化合物が残存している。

## 【 0 0 0 3 】

このような背景から、微生物を用いて含硫複素環式化合物を分解する方法についても多数検討されている。これらの方法の多くは、ジベンゾチオフェン、アルキル化ジベンゾチオフェンの脱硫に関するものであり、例えば、シュウドモナス (*Pseudomonas*) CB1 (非特許文献 1 参照)、ロドコッカスロドクロウス (*Rhodococcus rhodochrous*) IGTS8 (ATCC53968) (非特許文献 2 参照)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) sp. SY-1 (非特許文献 3 参照)、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) sp. D0 (非特許文献 4 参照) や、アルスロバクター (*Arthrobacter*) K3b (非特許文献 5) などがジベンゾチオフェンあるいはアルキル化ジベンゾチオフェンを分解することが報告されている。

## 【 0 0 0 4 】

一方、化石燃料中の有機硫黄化合物として相当量含まれる化合物にベンゾチオフェン類があるが、ベンゾチオフェンをモデル化合物とした微生物分解に関する報告が最近幾つかなされている。たとえば、イソプロピルベンゼン分解菌として分離されたシュードモナス (*Pseudomonas*) RE204 はベンゾチオフェンを *trans*-4-(3-hydroxy-2-thienyl)-2-oxobut-3-enolate まで分解することが報告されている (非特許文献 6 参照)。また、ベンゾチオフェンを唯一の硫黄源として土壌より分離したゴルドナ (*Gordona*) 213E は培養液中にベンゾチオフェン 5-オキシド、ベンゾチオフェン 5,5-ジオキシド、2-(2'-ヒドロキシフェニル)エタン-1-アルなどを中間体として蓄積することが報告されている (非特許文献 7 参照)。

## 【 0 0 0 5 】

アルキル化ベンゾチオフェン類についてはシュードモナス (*Pseudomonas*) BT1 が、共酸化法により、ベンゾチオフェン、4-メチルベンゾチオフェン、5-メチルベンゾチオフェン、7-メチルベンゾチオフェンをそれぞれ、相当する 2,3-ジオン体に、2-メチルベンゾチオフェン、3-メチルベンゾチオフェン、2,3-ベンゾチオフェンをそれぞれ相当するスルホキシドおよびスルホン体に変換することが報告されている (非特許文献 8 参照) が、アルキル化ベンゾチオフェンを唯一の硫黄源として分解する微生物については報告がない。

【 非特許文献 1 】 Isbister, J.D. and obylinski, E.A. Microbial desulfurization of coal, in Coal Science and Technology, Ser.9, p.627 (1985)

【 非特許文献 2 】 Kilbane, J.J. Resources, Conservation and Recycling, 3, 69-70 (1990)

【 非特許文献 3 】 ohmori, T., Monna, L., Saiki, Y. and Kodama, T. Appl. Environ. Microbiol., 58, 911-915, (1992)

【 非特許文献 4 】 van Afferden, M., Schacht, S., Klein, J. and Truper, H.G., Arch. Micro

10

20

30

40

50

biol.,153, 324-328, (1990)

【非特許文献5】Dahlberg, M.D.(1992) Third International Symposium on the Biological Processing of Coal, May4-7, ClearwaterBeach,FL,pp.1-10.Electric Power Research Institute, PaloAlto, CA.

【非特許文献6】Eaton.R.W. and Nitterauer.J.D.,Journal of Bacteriology,3992-4002 (1994)

【非特許文献7】Gilbert.S.C.,Morton.J.,Buchanan S.,Oldfield C.,and McRoberts A., Microbiology.144 2545-2553 (1998)

【非特許文献8】Saftic.S, Fedrak.P.M.,Environmental Science and Technology,26, 1759-1754 (1992))

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、ベンゾチオフエン等の含硫複素環式化合物に作用し、それを分解する能力のある微生物を自然界から単離し、その微生物を用いて含硫複素環式化合物を分解する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、土壌からのスクリーニングによって採取したロドコッカス(Rhodococcus)属T09株およびコリネバクテリウム(Corynebacterium)属T14株がベンゾチオフエン等の含硫複素環式化合物を分解する能力があることを見出し、本発明を完成した。

20

すなわち、本発明は、ロドコッカス属またはコリネバクテリウム属に属し、含硫複素環式化合物を分解する能力を有する微生物を用いて含硫複素環式化合物を分解することを特徴とする含硫複素環式化合物の分解方法である。

【発明の効果】

【0008】

本発明により、アルキル化ベンゾチオフエンをはじめとする含硫複素環式化合物を穏和な条件で効果的に脱硫することができるようになる。また、アルキル化ベンゾチオフエンは化石燃料中に存在する硫黄化合物なので、本発明は化石燃料の脱硫法としても利用することができる。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において使用する微生物は、ロドコッカス属又はコリネバクテリウム属に属し、含硫複素環式化合物を分解する能力を有する微生物であれば特に限定されない。例えば、ロドコッカス属T09株およびコリネバクテリウム属T14株が好適に用いられ、それと実質的に同一の菌学的性質を有する菌株であればいずれの菌株も使用することができる。このロドコッカス属T09株およびコリネバクテリウム属T14株は、日本各地より採取した多種類の土壌からのスクリーニングによって見出されたものであり、その菌学的性質は表1のとおりである。

40

【0010】

[表1]

形態的性質

	T09	T14
・細胞の形	桿菌	桿菌
・孢子形成の有無	無	無
・運動性の有無	無	無
・16SrRNAの部分配列(相同性)	Rhodococcus sp. (98.4%)	

50

・ グラム染色性	陽性	陽性	
・ オキシダーゼ	-	-	
・カタラーゼ	+	+	
・ O - F 試験	-	-	
・ 硝酸塩還元	-	+	
・ ピラジナミダーゼ	-	+	
・ ピロリドニルアシルアミダーゼ	-	-	
・ アルカリフォスファターゼ	-	-	
・ -グルクロニダーゼ -	-	-	
・ -ガラクトシダーゼ	-	-	10
・ -グルコシダーゼ	+	-	
・ N-アセチル- -グルコサミニダーゼ	-	-	
・ ウレアーゼ	+	+	
発酵性			
・ ブドウ糖	-	-	
・ リボース	-	-	
・ キシロース	-	-	
・ マンニトール	-	-	
・ マルトース	-	-	
・ 乳糖	-	-	20
・ グリコーゲン	-	-	

## 【 0 0 1 1 】

上記菌学的性質をBergey's Manual of Systematic Bacteriology vol.2 (1986)およびBergey's Manual of Determinative Bacteriology 第9版 (1994)と照合したところ、T09株はロドコッカス属、T14株はコリネバクテリウム属に属するものと同定された。これらの株は、工業技術院生命工学工業技術研究所にそれぞれ受託番号FERM P-17268、FERM P-17269として寄託されている (寄託日：平成 1 1 年 2 月 2 6 日)。

## 【 0 0 1 2 】

本発明において用いる微生物の培養は、微生物の通常の培養法にしたがって行われる。 30  
培養の形態は固体培養でも液体培養でもよいが、液体培養が好ましい。培地の栄養源としては通常用いられているものが広く用いられる。炭素源としては利用可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、スクロース、ラクトース、コハク酸、クエン酸、酢酸などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、ポリペプトン、肉エキス、大豆粉、カゼイン加水分解物などの有機栄養物質が使用される。脱硫反応に影響を与える可能性のある硫黄化合物を含まない培地で培養するのが望ましい場合には、塩化アンモニウムのような無機窒素化合物も使用することができる。そのほか、リン酸塩、炭酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、鉄、マンガン、亜鉛、モリブデン、タンゲステン、銅、ビタミン類などが必要に応じて用いられる。培養は、微生物が生育可能である温度、pHで行われ、使用する微生物の最適培養条件 40  
で行うのが好ましい。一般的には、培地のpHを適当なpH、例えばpH 6 ~ 8 とし、また、適当な温度、例えば約30 にて、振盪又は通気条件下で好氣的に行われる。

## 【 0 0 1 3 】

本発明の方法により分解可能な含硫複素環式化合物としては、ベンゾチオフェン、アルキル化ベンゾチオフェンを例示することができる。アルキル化ベンゾチオフェンとしては、2-メチルベンゾチオフェン、3-メチルベンゾチオフェン、5-メチルベンゾチオフェン、2-エチルベンゾチオフェンなどが例示される。

本発明の含硫複素環式化合物の分解方法は、含硫複素環式化合物を含有する培地で上記微生物を上記のような条件で培養することにより行うことができる。その場合、基質である含硫複素環式化合物の培地中の濃度は、好ましくは5 ~ 1,000ppmであり、より好ましく 50

は25～100ppmである。

また、本発明の含硫複素環式化合物の分解方法は、上記微生物を上記培地中で培養した後、得られた培養物から遠心分離などの集菌操作によって得られた休止菌体を含硫複素環式化合物と接触させて行うこともできる。このような休止菌体による脱硫は、例えば以下のようにして行われる。

#### 【0014】

まず、休止菌体を調製する。新鮮な培地に種菌を適当量、例えば1～2容量%接種する。培地としては、上記の培地を用いることができる。種菌としては、対数増殖期初期から定常期までのいずれかの状態の菌を用いればよく、好ましくは対数増殖期後期のものを用いる。種菌の量は必要に応じて増減することができる。その後、pH6～9、約30℃にて1～2日間往復又は回転振盪培養する。また、培地としてはA培地(Izumi Y., Ohshiro T., Ogino H., Hine Y., Shimao M., Applied and Environmental Microbiology, 223-226 (1994))を用いるのが好適である。次いで、菌体を分離集菌し、洗浄することにより休止菌体を得られる。集菌は、培養菌体が対数増殖期初期から定常期までのいずれの状態にある時に行ってもよいが、対数増殖期中期から後期の状態にある時に行うのが好ましい。また、集菌は、遠心分離の他、濾過、沈降分離等のいかなる方法で行ってもよい。菌体の洗浄には、生理食塩水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液等のいかなる緩衝液を使用してもよく、また、水を用いて菌体を洗浄することもできる。

#### 【0015】

休止菌体による脱硫は、休止菌体を適当な緩衝液に懸濁して調製した菌懸濁液に基質である含硫複素環式化合物を添加して反応させることにより行う。緩衝液としては種々の緩衝液を使用できる。緩衝液のpHは特に限定されないが、pH6～7が好適である。また、緩衝液の代わりに、水や培地等を使用することもできる。菌体懸濁液の濃度は、OD<sub>660</sub>が1～100の間が好適であり、必要に応じて増減できる。基質の濃度は、1～100ppmが好適であるが、必要に応じて増減できる。反応は30℃で行うのが好適であるが、そのほかの適当な温度でもよく、また反応時間は1～2時間が好適であるが、必要に応じて増減できる。また、基質を添加する前に反応温度と同じ温度に反応液を予備加熱してもよい。

#### 【0016】

また、休止菌体による反応は、n-テトラデカン等の有機溶媒を添加した油水2相系で行うこともできる。この場合、使用可能な有機溶媒としては、n-テトラデカンの他、C8～C20のn-パラフィンやケロシン、軽油、重油などが挙げられる。また、必要に応じて反応液上方の気相を酸素で置換封入してもよい。

脱硫率の測定は、ガスクロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー/質量スペクトル分析などを使用して行うことができる。また、必要に応じて他の分析方法を併せて利用してもよい。

#### 【実施例】

#### 【0017】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例の範囲に限定されるものではない。

〔実施例1〕ベンゾチオフエン又はアルキル化ベンゾチオフエンを含む培地での脱硫菌の培養

ベンゾチオフエン25ppm(N,N-ジメチルホルムアミド溶液)を含むA培地(Izumi Yら, Applied and Environmental Microbiology, 223-226 (1994))2mlに、1白菌耳量のロドコッカス属T09株を植菌し、30℃で120時間培養した。A培地中には培地成分として硫黄源が全く含まれていないことから、上記培地において該菌株の増殖が認められる場合は、ベンゾチオフエンを唯一の硫黄源として増殖していることが示唆される。得られた培養液の660nmにおける吸光度(OD<sub>660</sub>)を測定したところ、2.45であった。同様の操作を行い、ベンゾチオフエンの代わりに種々のアルキル化ベンゾチオフエンを添加して培養を行った場合のOD<sub>660</sub>を測定した結果を表2に示す。尚、ベンゾチオフエンは東京化成社製、3-メチルベンゾチオフエンおよび5-メチルベンゾチオフエンはLancaster Synthesis社製のものを用い

10

20

30

40

50

た。2-メチルベンゾチオフエン、2-エチルベンゾチオフエンはJ.T.Anderson, Journal of Chromatography, 354 83 (1986)の方法に従って合成した。

また、上記と同様の操作をロドコッカスT09株の代わりにコリネバクテリウム属T14株を用いて行い、OD<sub>660</sub>を測定した結果を表2に示す。

【0018】

[表2]

アルキル化ベンゾチオフエン等に対する生育

	T09	T14
ベンゾチオフエン	2.45	2.00
2-メチルベンゾチオフエン	2.58	n.t.*
3-メチルベンゾチオフエン	1.23	2.30
5-メチルベンゾチオフエン	2.50	2.27
2-エチルベンゾチオフエン	2.29**	n.t.*

\*試験せず

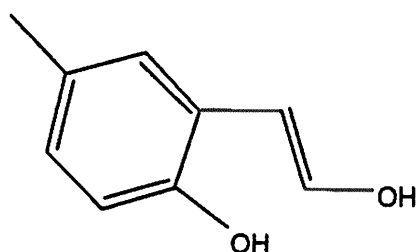
\*\*14日間培養

【0019】

〔実施例2〕アルキル化ベンゾチオフエンの脱硫生成物の分析

上記の操作によって得られた培養液のうち、T09株を5-メチルベンゾチオフエンを含むA培地にて培養した培養液を10,000rpm、5分間遠心分離した。得られた上清から、Waters社製固相抽出カラムによって常法に従って、極性成分を抽出し、抽出液を25℃、760mmHgにて減圧乾燥した。さらに、得られた乾固物にトリメチルシリル誘導体化用試薬(Supelco社製)1mlを添加し、50℃、20分処理することにより、トリメチルシリル化反応を行った。得られた反応物をGC/MS分析に供したところ、図1に示すガスクロマトグラムがえられ、保持時間10分付近のピークの質量スペクトルとして図2に示すスペクトルが得られた。比較として5-メチルベンゾチオフエンの代わりに硫酸マグネシウム7水和物25ppmを添加した場合の培養液を上記と同様の操作によってGC/MS分析を行ったが、同様なスペクトルは得られなかった。従って、このスペクトルはロドコッカスT09株の5-メチルベンゾチオフエン脱硫による脱硫生成物であると考えられる。質量スペクトルから、5-メチルベンゾチオフエンの脱硫生成物は以下のようなものが推定された。

【化1】



【0020】

上記の構造から、5-メチルベンゾチオフエン分子から、硫黄原子が除去されており、ロドコッカスT09株により、脱硫反応が起きていることがわかる。また、微生物としてT09株の代わりに、コリネバクテリウムT14株を用いた場合においても同様のスペクトルを有する脱硫生成物が得られた

【0021】

〔実施例3〕菌体によるベンゾチオフエン又はアルキル化ベンゾチオフエン類の分解

ベンゾチオフエン25ppm(N,N-ジメチルホルムアミド溶液)を含むA培地(IzumiYら, Applied and Environmental Microbiology, 223-226 (1994))2mlに、1白菌耳量のロドコッカス属T09株を植菌し、30℃で120時間培養した。得られた培養液を4℃、10,000rpm,5minの条件で遠心分離し、沈殿をpH7.5の1/15Mリン酸緩衝液にて2回洗浄し、同緩衝液に懸濁し

10

20

30

40

50

て反応用菌体とした。この反応用菌体の測定波長660nmでの濁度は40であった。

#### 【0022】

分解反応は、反応用菌体2mlの入った20ml容のリム付き試験管にグルコース水溶液およびベンゾチオフェン（N,N-ジメチルホルムアミド溶液）を終濃度それぞれ、10g/l、25ppmになるように加え、30℃にて往復振とうすることにより行った。残存ベンゾチオフェン量の測定は、一定時間反応後の反応液に等量の酢酸エチルを添加、攪拌抽出後、酢酸エチル層を、ガスクロマトグラフィーにより定量した。ガスクロマトグラフィー分析は、島津製作所社製GC-14AにJ&Wサイエンティフィック社製カラムDB-17(0.25mm×0.25μm×30m)を装着し、水素炎イオン化検出器（FID）にて分析した。反応10時間後のベンゾチオフェン分解率は、90%であった。また、あらかじめ、反応用菌体を121℃、5minオートクレーブ処理し、菌体のベンゾチオフェン分解活性を失活させたものを上記と同様の操作で反応した場合には、ベンゾチオフェン量は100%残存していたことから、ベンゾチオフェンは反応用菌体のベンゾチオフェン分解活性により分解したものであることが確認された。

10

上記と同様の操作で、反応用菌体にベンゾチオフェンを添加する代わりに種々の5メチルベンゾチオフェンを添加した場合の分解率を測定した結果、および、反応用菌体としてT09の代わりにT14株を使用した場合の分解率の測定結果を表3に示す。

#### 【0023】

〔表3〕

アルキル化ベンゾチオフェン等の分解率

菌株	基質	反応時間(h)	分解率(%)
T09	ベンゾチオフェン	10	90
T09	5-メチルベンゾチオフェン	10	60
T14	ベンゾチオフェン	90	100
T14	5-メチルベンゾチオフェン	90	100

20

#### 【0024】

〔実施例4〕菌体による溶媒中のベンゾチオフェン又はアルキル化ベンゾチオフェン分解軽油のような疎水性溶媒中でのアルキル化ベンゾチオフェンの分解が可能かどうかを調べるため、反応用菌体と疎水性溶媒に溶解したベンゾチオフェン又はアルキル化ベンゾチオフェンの反応を行った。反応用菌体は上記と同様の操作を用いて調製し、疎水性溶媒としてn-テトラデカン（東京化成社）を用いた。分解反応は、グルコース10g/lを含む反応用菌体1mlに25ppmのベンゾチオフェン又は5-メチルベンゾチオフェンを含むn-テトラデカン溶液1mlを添加し、30℃にて24時間往復振とうすることにより行った。

30

その結果、ベンゾチオフェンを用いた場合は、30.4%、5-メチルベンゾチオフェンを用いた場合は35.4%の分解率がそれぞれ得られた。

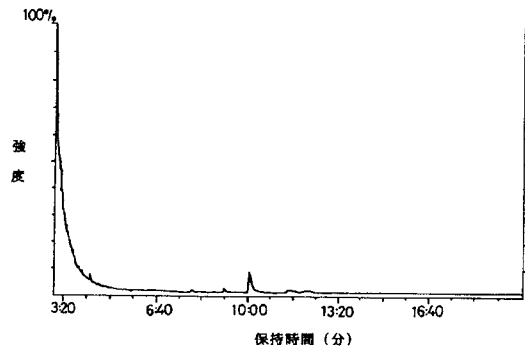
#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0025】

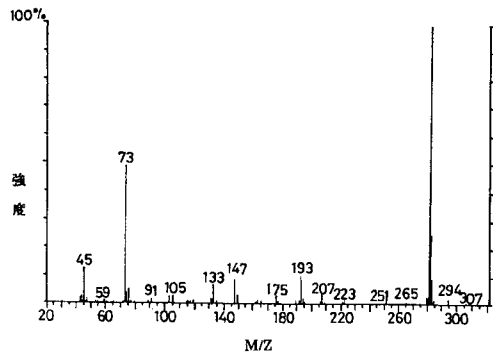
【図1】脱硫生成物を含む試料のガスクロマトグラムを示す。

【図2】脱硫生成物の質量スペクトルを示す。

【 図 1 】



【 図 2 】





---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平6-184557 ( J P , A )  
特開平9-310078 ( J P , A )  
特開平10-243791 ( J P , A )  
特開平11-9293 ( J P , A )  
Biotechnol. Bioeng., (1992), 40, p.1107-1114  
Appl. Environ. Microbiol., (1992), 58, [3], p.911-915  
Resour. Conserv. Recycl., (1990), 3, [2-3], p.69-79

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N      1 / 2 0  
C 1 2 S      1 / 0 0 - 1 / 0 2  
J S T P l u s ( J D r e a m 2 )