

氏 名 (本国籍)	TANDISHABO KALAYI (コンゴ民主共和国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第598号
学位授与年月日	平成25年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Isolation and Characterization of a Novel <i>Coprothermobacter proteolyticus</i> Strain IT3 (新規細菌 <i>Coprothermobacter proteolyticus</i> IT3 株の単離と性質)
審査委員会	主査 岐阜大学 教授 鈴木 徹 副査 岐阜大学 教授 高見澤 一裕 副査 静岡大学 教授 河合 真吾

論文の内容の要旨

炭酸ガスは様々な物理化学的な方法でいったん捕捉されると、適切な貯蔵方法で封入できる。現時点での炭酸ガスの発生量は年間 22 ギガトンであり、海洋、帯水層、枯渇した油田や天然ガス田は各々数十年間の貯蔵能力を持っている。しかし、もし枯渇した油田や天然ガス田の 10% が利用され 50% に上る炭酸ガスの封入が行われるならば、枯渇油田や天然ガス田はすぐに飽和になり、必然的に帯水層や海洋に炭酸ガスの貯留が依存することになる。結果として、海洋封入は、枯渇油田やガス田、石炭層、鉱山洞窟や岩塩洞窟などの地質学的封入方法と比較して一番大きな能力を持っている。

地下封入での大きな欠点は炭酸ガスの大気中へのもれと海洋 pH の酸性への変化で、その結果、海洋のエコシステムへの影響が懸念される。したがって、炭酸ガスと海水の化学的・物理的反応性の理解が必要となる。一方、地中での長期間にわたる貯蔵はより安定であると証明されている。さらに、炭酸ガスの油田への注入はすでに石油回収の強化方法として利用されている。

近未来における最も優れた炭酸ガス封入方法は、枯渇油田とガス田の利用である。ただし、比較的低い貯蔵能力に関する問題が残っている。この問題の解決方法は炭酸ガスのメタンへの変換である。この方法は、炭酸ガス利用のリサイクルによる枯渇油田とガス田の貯蔵に用途を広げる「地下嫌気消化槽」にもつながる。

本論文の主たる目的は、新たな *Coprothermobacter proteolyticus* の単離と性質の解明である。*C. proteolyticus* は、高温性、チオ硫酸還元、硫酸非還元性の嫌気性細菌でタンパク質を酢酸、炭酸ガスと水素に変換する。しかし、本菌の家畜糞尿の高温性嫌

気消化や油田における生理生態学はほとんど知られていない。*C. proteolyticus* はいくつかの油田で発見されているが、施設のとっぺんにある鋼管の腐食やチオ硫酸の還元による油田の酸性化など限られた影響しかわかっていない。実際、最近の研究では高温油田における主たるメタン生成経路は酢酸酸化であると示されている。*C. proteolyticus* は、発酵的に水素生成を行い酢酸は利用しない。しかし、枯渇油田の水から本菌の高温性メタン生成集積培養がタンパク質に富んだ基質を使用して達成された。この結果は、枯渇油田の微生物学的強化石油回収に向けた本菌の潜在能力を示している。実際、枯渇した油田では、*C. proteolyticus* によって生成される水素と炭酸ガスの還元によってメタンが生成されている。

研究の究極のゴールは温室効果ガスの主体である炭酸ガスを捕捉しメタンを生産し再生可能エネルギーもしくはバイオ燃料を作ることである。これは、地球の平均気温上昇による地球の気候変動の原因となる温室効果ガスの削減につながる。

本研究では、*Coprothermobacter* 属細菌の分布と *C. proteolyticus* に属する新たな細菌 IT3 株についてこれまでに知られていない高い水素生産性について述べる。

16SrDNA 配列から *Coprothermobacter* 細胞数は 1.54×10^8 copies ml⁻¹ で、理論上すべての水素生産菌の 40% を占めると計算した。家畜糞尿単独処理している消化槽中での *Coprothermobacter* 属細菌の分布はあまり高くなかった (5 か所中 2 か所で、40%)。 *Coprothermobacter* 属細菌の存在は、処理するバイオマスの種類、メタン収率、水理学的滞留時間に強く依存した。供給原料の種類や運転温度に関係なく *Coprothermobacter* 属細菌は滞留時間 15 から 25 日、1 日のメタン発生量 1.1 m³/day/m³ 以上で多く検出された。

次に、*Coprothermobacter* 属細菌のメタン発酵槽内での役割解明のために、新たに *Coprothermobacter* 属細菌 IT3 株を単離し、既報の同属細菌 BT^T 株および I8 株と比較した。その結果、次のことが明らかとなった。

- ・60°C では IT3 株は独立した細胞の凝集体であるが、BT^T 株はやや短いフィラメント状となった。
- ・70°C までの温度範囲では IT3 株の増殖が早いですが、これ以上の温度になると BT^T 株が増殖活性を維持する。
- ・55°C から 65°C の範囲では IT3 株の水素生産が BT^T 株の水素生産よりも高いが、70°C 以上では逆となる。
- ・IT3 株及び BT^T 株、I8 株はキモトリプシン様セリンプロテアーゼを持ち、IT3 株がより強い活性を持つ。

この研究では、農産廃棄物である家畜糞尿の嫌氣的消化に焦点を絞ったが、得られた結果は、枯渇油田における *C. proteolyticus* のような高温性発酵性細菌による炭酸ガス削減に寄与することができる。

審 査 結 果 の 要 旨

地球温暖化防止や脱原子力発電のための持続可能なエネルギーの一つとしてバイオマス系廃棄物のメタン発酵によるエネルギー回収が注目を集めている。対象のバイオマス系廃棄物としては、家畜糞尿、生ごみ、食品工業廃棄物、レストランやコンビニの食物残渣、下水処理場からの余剰汚泥と広範囲である。一般に有機物からのメタンガ

スへの転換効率は60–65%で、これ以上の変換率はあまり例がない。多くのバイオマス系廃棄物には必ずデンプン、セルロース、ヘミセルロース、リグニン、ペクチン、タンパク質等の天然高分子化合物が含まれており、それらがメタン生成の原料となっている。しかし、現時点では、デンプン、セルロース、ヘミセルロースなどの炭水化物が主たるメタン生成の原料となっており、その他の物質は微生物分解を受けにくい材料となりにくい。

これらの高分子化合物を加水分解できればメタン発酵の効率が上昇することが考えられる。そのため、メタン発酵の前段階である加水分解プロセスや酸生成プロセスの微生物学的研究が極めて大切となってくる。

この研究の流れの中で、*Coprothermobacter* 属細菌に注目した。*Coprothermobacter* 属細菌は1985年に初めて単離された細菌で、高温性、チオ硫酸還元、硫酸非還元性の嫌気性細菌でタンパク質を酢酸、炭酸ガスと水素に変換する。しかし、本菌の家畜糞尿の高温性嫌気消化や油田における生理生態学はほとんど知られていない。

まず、*Coprothermobacter* 属細菌特異的PCRプライマーを用いたPCRで、各種メタン発酵槽での *Coprothermobacter* 属細菌の分布を調べた。そして、乳牛糞を原料とする高温発酵タンクに多く分布することを見出した。また、水素発酵性細菌に占める *Coprothermobacter* 属細菌の割合が40%に達する発酵槽も存在することを明らかにした。この場合、*Coprothermobacter* 細胞数は 1.54×10^8 copies ml⁻¹ であった。家畜糞尿単独処理している消化槽中での *Coprothermobacter* 属細菌の分布はあまり高くなかった（5か所中2か所で、40%）。*Coprothermobacter* 属細菌の存在は、処理するバイオマスの種類、メタン収率、水理的滞留時間に強く依存した。一方、供給原料の種類や運転温度に関係なく *Coprothermobacter* 属細菌は滞留時間15から25日、1日のメタン発生量1.1 m³/day/m³以上で多く検出された。

次に、*Coprothermobacter* 属細菌のメタン発酵槽内での役割解明のために、新たに *Coprothermobacter* 属細菌 IT3 株を単離し、既報の同属細菌 BT^T 株および I8 株と比較した。その結果、次のことが明らかとした。

- ・60°CではIT3株は独立した細胞の凝集体であるが、BT^T株はやや短いフィラメント状となった。
- ・70°Cまでの温度範囲ではIT3株の増殖が早い、これ以上の温度になるとBT^T株が増殖活性を維持する。
- ・55°Cから65°Cの範囲ではIT3株の水素生産がBT^T株の水素生産よりも高いが、70°C以上では逆となる。
- ・IT3株及びBT^T株、I8株はキモトリプシン様セリンプロテアーゼを持ち、IT3株がより強い活性を持つ。

以上、本研究は、*Coprothermobacter* 属細菌、特に *C. proteolyticus* は、バイオマス系廃棄物に含まれる広い範囲の天然物から水素や炭酸ガスを生成し、メタン発酵の前段階としてあるいは水素発酵のための細菌として重要な役割を担っていることを明らかにし、メタン発酵の効率化や炭酸ガスの貯留のために役立つ内容である。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

これらの研究は以下の雑誌に発表している。

1. Tandishabo, K., Nakamura, K., Umetsu, K., and Takamizawa, K (2012). Distribution and role of *Coprothermobacter* spp. in anaerobic digesters. J. Biosci. Bioengi., 114, 518-520.
2. タンディシャボー カライ、伊賀佳美、玉木秀幸、中村浩平、高見澤一裕 (2012) 嫌気性消化槽から単離した *Coprothermobacter* 属 IT3 株の諸性質—高温域における水素生成およびペプチド分解について—、環境技術、40, 753-761.