

学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

学位論文題目 (Dissertation Title)	A study of biohydrogen production by extremely halophilic bacterial communities from a salt pan and salt damaged soil (塩田と塩害土壌から得られた高度塩分耐性菌叢によるバイオ水素生産に関する研究)
氏 名(Name)	Dyah Asri Handayani Taroepratjeka

The world's energy today is still relying heavily on fossil fuel. The carbon-containing oil, coal, and natural gas are consumed rapidly over the past century, leading to an accelerated release of carbon dioxide. It has been a consensus that the increasing CO₂ concentration in the earth's atmosphere is a major cause of global warming and the related climate change. As the Intergovernmental Panel on Climate Change is setting the target to lower the global net human-caused emissions of carbon dioxide by about 45% by 2030 from the 2010 levels and set the goal of "net zero" in 2050, drastic measures are needed to reach these goals.

One of the options is by increasing the efficiency of electricity production and energy use in transportation and industry. Another available option is through the development of alternative energy sources, such as hydrogen. Currently, hydrogen is still mainly produced through steam-reforming of natural gas. A shift to hydrogen production from renewable sources will help to relieve the world's dependency on fossil fuel. One of the available options is through biological hydrogen production from lignocellulosic biomass.

The application of extremely halophilic bacteria for biohydrogen production from lignocellulosic biomass can potentially contribute to a cost reduction of sterilization and water. While lignocellulosic biomass is available in great quantity in nature from woods, grasses, and agricultural wastes, it has a naturally recalcitrant structure of cellulose, hemicellulose, and lignin. The cellulose and hemicellulose part can be biologically utilized through the fermentation process after the application of size reduction, pretreatment, and enzymatic saccharification. Alkaline pretreatment with NaOH is considered as the most widely used and cost-effective for lignocellulosic biomass. By using extremely halophilic bacteria, after lignocellulosic pretreatment with NaOH and neutralization with HCl, only a relatively small amount of water will be needed to dilute the pretreated biomass before the fermentation process.

Extremely halophilic hydrogen-producing bacteria were investigated, owing to their ability to live in high-salinity conditions. Based on this characteristic, it was hypothesized that extremely halotolerant hydrogen-producing bacteria could tolerate high concentrations of Na⁺ ions. To test this hypothesis, we investigated the characteristics of extremely halotolerant hydrogen-producing bacteria obtained from salt-damaged soil in Khon Kaen and a commercial salt pan field near Bangkok (Samut Sakhon), Thailand. The result of this preliminary investigation showed that hydrogen production under saturated conditions of 26% (6 M) NaCl was possible after one year of acclimatization.

The optimum conditions for biohydrogen production from glucose with extremely halophilic bacteria from Samut Sakhon salt pan, Thailand, were then identified. A hydrogen molar yield of 1.45 mol H₂/mol glucose at optimum conditions of 26% NaCl,

35°C, and pH 9 was obtained. The acclimatized bacteria were able to ferment various types of lignocellulosic-derived sugars and D-fructose, which also suggested a potential ability to produce biohydrogen from food waste. Through PCR-DGGE, the predominant hydrogen producer among the mixed culture was found to be *Halanaerobium fermentans*. A new 16s rRNA sequence of *H. fermentans* strain B4 has been identified and submitted to the GenBank data base (Accession number MN133965). The 1,424 base-pair length sequence shares 99.36% similarity with strain R-9, which has been isolated from salted puffer fish ovaries in Japan and reported in 2000. These findings provided insights into the application of extremely halophilic bacteria for biohydrogen production.

A study of three extreme halophilic microbial communities cultivated from the soils of a salt pan and salt damaged soil in Thailand was also presented. The cultivation aimed to screen potential biohydrogen producing bacteria capable of growing in 26% NaCl concentration. Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) of the V3 region of the 16s rRNA and the high-throughput amplicon sequencing of the V3-V4 regions of 16s rRNA performed on IonS5™XL platform techniques were used, and the results were compared. Several bands corresponded to the same genus of *Halanaerobium* in the DGGE result, limiting the technique to provide only a rough idea of the profiles of extreme halophilic bacterial communities. High-throughput amplicon sequencing revealed that the most abundant OTU among all communities (37-98%) shared close similarity with *Halanaerobium fermentans* R-9, while one community has many highly similar OTUs to *Halanaerobacter lacunarum* TB21 (61%). Higher hydrogen molar yields were obtained by microbial communities with the higher population of *H. fermentans* (1.15 and 1.08 mol H₂/mol glucose) compared to microbial communities dominated by *H. lacunarum* (0.66 mol H₂/mol glucose). The amplicon sequencing with NGS has provided more detailed pictures compared to the PCR-DGGE technique for the extreme halophilic bacterial communities.

(様式 9 号)

学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	Dyah Asri Handayani Taroepatjeka
審査委員	主 査： 今 井 剛
	副 査： 関 根 雅 彦
	副 査： 新 苗 正 和
	副 査： 樋 口 隆 哉
	副 査： 通 阪 栄 一
論文題目	A study of biohydrogen production by extremely halophilic bacterial communities from a salt pan and salt damaged soil (塩田と塩害土壌から得られた高度塩分耐性菌叢によるバイオ水素生産に関する研究)
<p>【論文審査の結果及び最終試験の結果】</p> <p>近年、二酸化炭素削減のために低コストで運転管理が可能なバイオマスエネルギー生産プロセスが注目されている。バイオマスからのバイオガス生産には嫌気性微生物を用いることが一般であるが、通常嫌気性微生物によって発生した水素は速やかにメタン生成菌によってメタンに変換され、水素単体での分離・回収は難しい。そこで、本研究では高度塩分耐性を持つ水素生産菌に着目した。高度塩分耐性水素生産菌は高塩分環境下で生息可能で、水素を生産する微生物である。高塩分環境下での耐塩性を持たない微生物は高浸透圧や Na イオンの成長阻害により生息できない。一般にメタン生成菌は耐塩性を持たないため、その活性を抑制できると考えられる。そこで、本研究では高度塩分耐性水素生産菌を塩田及び塩害土壌からスクリーニングし、その特性を把握するとともにその菌を同定することを目的とする。</p> <p>本博士論文は6章で構成されており、その内容は以下の通りである。</p> <p>第1章では、本研究の背景と目的、本論文の構成について述べている。</p> <p>第2章では、嫌気性微生物を用いたバイオマスからのガス生産に関する従来の研究についてまとめている。</p> <p>第3章では、タイ、コンケンの塩害土壌（2箇所）とタイ、サムットサコーンの塩田土壌（1箇所）の計3つのサンプルからスクリーニングした高度塩分耐性水素生産菌叢の水素生産能力の把握を行い、馴致期間を1年以上取ることによって飽和塩分濃度（NaCl26%）の環境下でも水素生産能が確認された。さらにこの菌叢の塩素イオン要求性についても明らかにした。</p> <p>第4章では、第3章でスクリーニングした高度塩分耐性水素生産菌叢の最適生育温度、pHが飽和塩分濃度環境下において、それぞれ35℃、pH=9であることを示した。さらに分子生物学的手法（PCR-DGGE法）により、この菌叢で優占する菌が <i>Halanaerobium</i></p>	

Fermentans R-9 の近縁種であることを同定した。しかしながら、文献にて報告されている *Halanaerobium Fermentans* R-9 と一部塩基配列が異なり、新種である可能性があるため、*Halanaerobium Fermentans* B-4 として GenBank データベースに登録申請を提出した。

第 5 章では、次世代シーケンサーを使って、第 3 章でスクリーニングした高度塩分耐性水素生産菌叢のより詳しい解析を行った。塩害土壌（水際）のサンプルと塩田土壌のサンプルにて *Halanaerobium Fermentans* が優先していること（それぞれ 98%、97%）、塩害土壌（水際から離れた比較的乾燥した土壌）のサンプルにて *Halanaerobacter Lacunarium* と *Halanaerobium Fermentans* が優先していること（それぞれ 61%、37%）が示され、この中でも *Halanaerobium Fermentans* の水素生成能が高いことが示された。

第 6 章では、以上をまとめて結論とし、今後の展望について述べている。

公聴会には、学内外から 27 名の参加があり、活発な質疑応答がなされた。公聴会での主な質問内容は、①今回タイの 2 地域でサンプリングを行っているがこの 2 地域の類似性はどうか、②この研究でスクリーニングした高度塩分耐性を持つ水素生成菌の水素生産能力を他の文献と比較するとき単位を合わせて比較すべきではないのか、③電気分解による水素生産と比べてこの生物学的方法はどのような利点があるのか、④この微生物に水素を生産させる方法は省エネという説明であったが、木材などのバイオマスを原料とする場合には前処理が必要であり、トータルとしての省エネ性はどうか、⑤実用化まではどの程度かかるのか、など多数であった。

以上のいずれの質問に対しても発表者からの的確で具体的な回答がなされた。

以上より、本研究は独創性、信頼性、有効性、実用性および完成度ともに非常に優れており、博士（工学）の学位論文に十分値するものと判断した。

論文内容および審査会、公聴会での質疑に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記の通りである（関連論文：2 編）。

- 1) Taroepatjeka D., Imai T., Chairattanamanokorn P., Reungsang A., Investigation of hydrogen-producing ability of extremely halotolerant bacteria from a salt pan and salt-damaged soil in Thailand, *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(6), 3407-3413, 2018.
- 2) Taroepatjeka D., Imai T., Chairattanamanokorn P., Reungsang A. Biohydrogen production by extremely halophilic bacteria from the salt pan of Samut Sakhon, Thailand. *Chiang Mai Journal of Science*. (October 8, 2019 掲載決定).