

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：51401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14701

研究課題名(和文)ルーメン微生物を用いた新規ルーメンミメティック有機酸生産システムの開発

研究課題名(英文)Development of a production system of organic acid by a novel rumen-mimetic bioprocess

研究代表者

上松 仁 (AGEMATU, Hitosi)

秋田工業高等専門学校・創造システム工学科・教授

研究者番号：20435407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：リグノセルロース系バイオマスを用いた有用な化学物質に変換する経済的で環境負荷が少ない方法が求められている。そこで、ルーメンミメティック・バイオプロセスを提案する。このプロセスはリグノセルロース系バイオマスの乾式粉碎とルーメン細菌の連続培養からなる。このプロセスで60日以上及びルーメン菌の連続嫌気培養を行い、結晶セルロース、稲わら、杉から揮発性脂肪酸(VFA)を生産することができた。20gのセルロースから180mmolのVFAを生産した時の炭素収率は60.6%であった。DGGE菌叢解析の結果、セルロース分解菌、その共生菌、プロピオン酸生産菌を確認した。

研究成果の概要(英文)：The process that converts lignocellulosic biomass into useful chemicals economically and with lower environmental load would be greatly beneficial. The proposed rumen-mimetic bioprocess consists of dry-pulverization of lignocellulosic biomass and continuous cultivation of ruminal bacteria. In this study, ruminal bacteria were continuously cultivated for over 60 days and used to digest microcrystalline cellulose, rice straw, and Japanese cedar to produce volatile fatty acids (VFAs). The carbon yield was 60.6% when 180 mmol of VFAs was produced from 20 g of cellulose. Sequence analysis of the DGGE bands indicates that the microbial community includes a cellulolytic bacterium, a bacterium acting synergistically with cellulolytic bacteria, and a propionate-producing bacterium, as well as other anaerobic bacteria.

研究分野：生物工学

キーワード：リグノセルロース ルーメン微生物 揮発性脂肪酸 ルーメンミメティック rumen-mimetic

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 石油資源の枯渇が予想されることから、持続可能な植物由来バイオマスからの燃料や化学原料の生産が重要な課題になって来ている。特にリグノセルロースは地球上に最も豊富に存在し食料と競合しないバイオマスとして注目されている。リグノセルロースを燃料や有用な化学原料に変換する経済的で環境負荷が少ない方法が求められている。

(2) 牛等の反芻動物の第一胃（ルーメン）に生息するルーメン微生物は、細菌、糸状菌、プロトゾア（原生動物）からなり、相互に影響し合って恒常性を保った共生的な微生物社会を形成している。そのため、個々の微生物を純粋培養するのが困難である。ルーメン微生物は反芻動物が咀嚼した飼料を消化して揮発性脂肪酸（VFA）と微生物タンパク質を生産する。反芻動物はこれらを栄養源にしている<sup>(1)</sup>。これまでのルーメン研究の目的はルーメン発酵の解明と反芻動物の生産性向上であった。ルーメン機能を模倣したルーメンミメティック・バイオプロセス（rumen-mimetic bioprocess）による有機酸生産技術の開発に関する研究報告はない。

### 2. 研究の目的

木質バイオマスを含めたリグノセルロースから有用な化学原料として揮発性脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸）を生産するためのシステムとして、反芻動物のルーメン機能を模倣したルーメンミメティック・バイオプロセスを開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 牛（日本短角種）の第一胃（ルーメン）からルーメン液 1L を採取し、これに人工唾液（ $\text{NaHCO}_3$  10.6g、 $\text{KCl}$  0.57g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  4.7g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.12g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.04g、尿素 0.56g、硫酸 1.0g、水 1L）1L を加えて 2L 容の培養器でルーメン菌の連続嫌気培養（人工ルーメン）を 39°C で行った（図 1）。

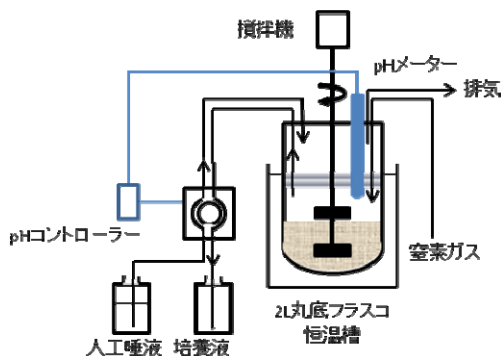


図 1. ルーメン菌の連続嫌気培養装置（人工ルーメン）

嫌気状態は窒素ガスの間欠通気により行った。攪拌は 30~40 rpm で行った。pH コントローラーにより人工唾液を添加して培養液の pH を 6.50 に維持した。人工唾液の添加量

と同量の培養液を排出液として引き抜いた。結晶セルロース（Merk 社製）およびリグノセルロースとして稲わらとスギを人工ルーメンに添加して排出液中の生成された酢酸、プロピオン酸、酪酸を HPLC で定量した。稲わらはブレンダーで粉砕し、スギは省エネルギー型乾式粉碎機（タンデムリングミル、②）で平均粒径 20~50  $\mu\text{m}$  まで微粉砕して用いた。

(2) VFA の定量は以下の条件で HPLC を用いて行った。カラム：InertSustain C18 (2  $\mu\text{m}$ , 75 × 2.1 mm i.d., GL Science Inc.)、流速：0.3 ml/min、移動相：20 mM リン酸緩衝液（pH 2.5）でのアセトニトリル濃度 1% から 50% へのリニアグラジエント 5 分、その後 50% で 3 分、カラム温度：40°C で行った。

(3) ルーメン細菌の菌叢解析は PCR-DGGE 法により行った。人工ルーメンから培養液 10ml を採取し、静置した上清から ISOPLANT II DNA extraction kit (NIPPON GENE CO., LTD.) によりルーメン細菌の全ゲノム DNA を抽出した。抽出 DNA をプライマー GC-357F (5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGCACGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3') と 518R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3') を用いて PCR で 16SrDNA の DNA 断片（約 200bp）を増幅し、変性グラジエントゲル電気泳動（DGGE）を Bio-Rad DCode システム（Bio-Rad Laboratories, Inc.）を用いて行った。DGGE のバンドパターンは Gel Doc EZ システム（Bio-Rad Laboratories, Inc.）により解析を行った。特徴的な DGGE バンドを切り出して塩基配列を決定し、NCBI の配列類似性検索（BLAST 解析）によりホモロジー検索を行いルーメン菌の同定を試みた。

### 4. 研究成果

(1) ルーメンミメティック・バイオプロセスのデザイン：反芻動物のルーメン機能を模倣したバイオプロセスとしてルーメンミメティック・バイオプロセスを開発した。このプロセスの特徴は以下の 3 つである。1) リグノセルロースを省エネルギー型乾式粉碎機（タンデムリングミル）で平均粒径 20~50  $\mu\text{m}$  まで微粉砕することにより、リグニン構造を機械的に破壊すると共に基質の比表面積（ $\text{cm}^2/\text{g}$ ）を大きくしてルーメン細菌の吸着面積を増大させ、基質の消化速度及び消化率を上げることができる。微粉砕したリグノセルロースは空気を含まず水に沈むので、固（基質と凝集菌体）/液（生産物）分離を容易にし、培養液中の基質濃度と菌体濃度を高く維持することができる。2) 炭素源以外の全ての栄養源を含んだ人工唾液による pH コントロールにより、連続培養への栄養素の供給と排出液（生産物）の引き抜きを自動で行うことができる。3) 人工唾液に含まれるアンモニア（硫酸）を窒素源にするので、木質バイオマスのようにタンパク質を含まないリ

グノセルロースもルーメン細菌の基質にすることができる。これまで無処理では消化できなかったスギが消化できるようになった。

(2) セルロース、稲わら、スギ微粉末のルーメンミメティック・バイオプロセスによる消化：20g の結晶セルロースを人工ルーメンに添加すると、直ぐに pH が低下した(図2)。これはルーメン菌がセルロース粒子に吸着してセルロースを消化して VFA を生産したからである(③)。その後、人工唾液の添加で pH6.5 に維持されたが、VFA の生成速度が高かったために一時的に 6.5 に維持できなくなり、次第に維持できるようになった。添加後 23 時間で pH が 6.5 より上昇した。これはセルロースの消化が終了し VFA が生産されなくなったためである。

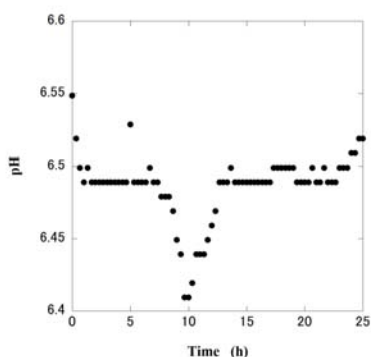


図2. セルロースの消化の pH パターン

生成した酢酸、プロピオン酸、酪酸は排出液(1670 ml)として得られ HPLC 分析(図3)で定量した(表1)。乳酸は生成されず酢酸、プロピオン酸、酪酸が主な生産物であった。

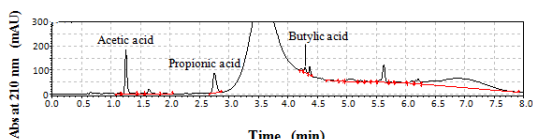


図3. 排出液の HPLC 分析

表1 ルーメンミメティック・バイオプロセスによる結晶セルロース 20g からの酢酸、プロピオン酸、酪酸の生産

VFA	mM	mmol	炭素 (mmol)	炭素 (%)
酢酸	60.2	100.6	201.2	27.2
プロピオン酸	42.5	71.0	213.0	28.8
酪酸	5.16	8.6	34.4	4.6
全 VFA	107.9	180.2	448.6	60.6
セルロース			740.0	100

表1に示すように、結晶セルロース 20g から合計 180 mmol の VFA が生産され炭素収率は 60.6%であった。同様に 20g の結晶セルロース、稲わら、スギからの VFA 生成量は、それぞれ  $183 \pm 29.7$ ,  $69.6 \pm 12.2$ , and  $21.8 \pm$

$12.9$  mmol であった(表2)。いずれも 24 時間以内で消化が終了した。

表2 ルーメンミメティック・バイオプロセスによる 20g の各基質からの酢酸、プロピオン酸、酪酸の生産

基質	生産物 (mmol)			
	酢酸	プロピオン酸	酪酸	VFA
セルロース	90.3	83.5	9.0	183
稲わら	37.7	26.9	4.9	69.6
スギ	8.9	11.9	1.0	21.8

培養液中にはルーメン菌のフロック(凝集菌体)が観察された(図4)。フロック中には粉碎稲わらやスギ木粉などの基質が観察されることから、ルーメン細菌は基質に吸着しそれらを取り込んだフロックを形成して消化するものと考えられる。

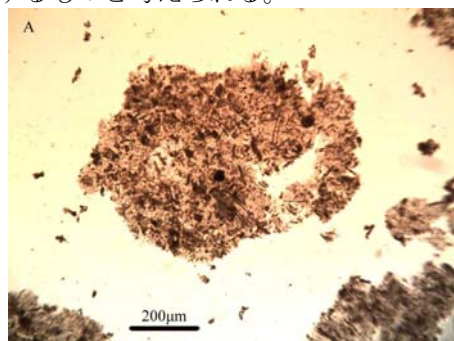


図4. 人工ルーメンの培養液中に形成された基質を取り込んでいるルーメン細菌のフロック

(3) 結晶セルロースとスギ微粉末からの VFA の連続生産：10g の結晶セルロースおよび 20g のスギ微粉末をほぼ 24 時間間隔で 2 つの人工ルーメンに添加して 32 日間に及ぶ連続 VFA 生産を行った(図5)。生産量を表3に示す。結晶セルロースとスギ微粉末からの 1 日当たりの VFA 生産量はそれぞれ 56.7、23.0 mmol/d であった。平均排水量は 670、295 ml/d で、これは連続培養の希釈率が 0.335、 $0.148 \text{ d}^{-1}$ であることを意味している。

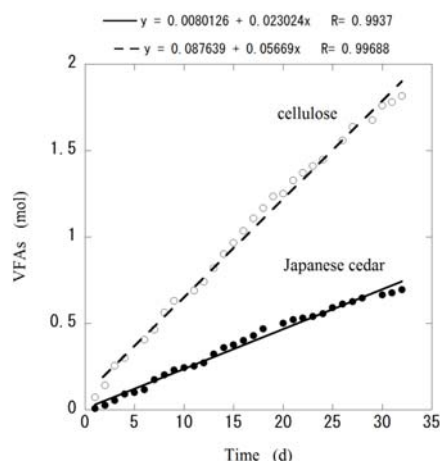


図5. セルロースとスギからの VFA の連続生産

表3 320gのセルロースと640gのスギ微粉末からの酢酸、プロピオン酸、酪酸の連続生産

基質	重量 (g)	生産 (モル)			
		酢酸	プロピオン酸	酪酸	全VFA
セルロース	320	1.17	0.596	0.047	1.81
スギ	640	0.447	0.128	0.121	0.695

平均粒径が5mmのスギのおが粉を人工ルーメンに添加しても消化されなかった。微粉碎することにより消化できた。これはセルロースを覆っているリグニン構造が破壊されて露出したセルロースにルーメン菌が到達できるようになったからである。さらに、スギ微粉末は水に沈むので人工ルーメンの攪拌をスギ微粉末が培養器の底に滞留するようにゆっくり攪拌することにより培養液中の基質及び菌体濃度を高く保つことができた。

(4) PCR-DGGE法によるルーメン菌の菌叢解析:60日間に及ぶルーメン細菌の嫌気連続培養(人工ルーメン)の菌叢解析をPCR-DGGE法で行った(図6)。DGGEゲルのバンドプロファイルは培養液中の優位な細菌種を示している。

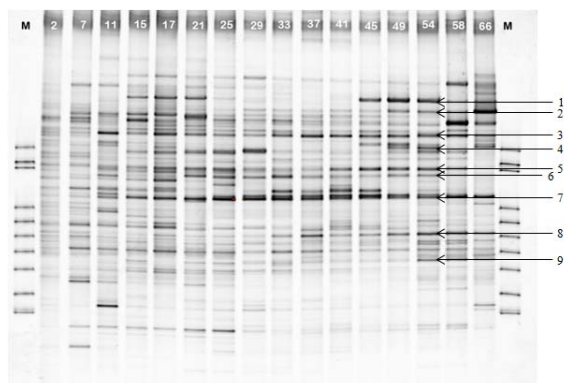


図6.人工ルーメンにおける16SrDNAのDGGEプロファイル 培養日数を上に示している。1~9のバンドの塩基配列を決定した。Mはマーカー(DGGE Maker III)である。

図6より、培養開始時(2日)では多くのバンドが見られるが、一週間(7日)以降から次第に安定なバンドが表れてきていることが分かる。これらのバンドの中から特徴的な9つのバンドを培養54日の試料のレーンから切り出して、その塩基配列(約200bp)を決定した。得られた塩基配列はDDBJのデータベースにそれぞれ登録番号LC199890~LC199898で登録した。塩基配列をBLAST解析して、バンド1~9と最も16SrDNA配列の類似性が高い細菌を表3に示す。バンド7は*Succiniclasticum ruminis* SE10(④)と最も類似性が高かった(98%)。バンド2と6はそれぞれ*Prevotella ruminicola* Bryant 23

(⑤)、*Fibrobacter succinogenes* HM2(⑥)と類似性が高かった(93%、89%)。いずれの株もルーメンから分離されている。*F. succinogenes*は中温菌の中で最もセルロース分解活性が高い菌で、セルロースに吸着して分解する(⑦)。*P. ruminicola*はセルロース分解菌と共生的に協力して植物細胞壁を分解することが報告されている(⑧)。また、本菌はルーメン細菌の中で比較的優位(約19%)を占める細菌である(⑩)。*S. ruminis*は唯一のエネルギー源としてコハク酸からプロピオン酸を生産する菌である(④)。人工ルーメンにおいてプロピオン酸の生産比率が高いのは本菌のプロピオン酸生産によると考えられる。*F. succinogenes*と*P. ruminicola*はピルビン酸からリンゴ酸を経由してコハク酸を生産するので、これら3株は共生関係にあると言える。

表3 DGGEバンド1~9の16SrDNA配列と最も類似性が高い細菌

最も16SrDNA配列の類似性が高い菌	類似 (%)
1 <i>Chryseobacterium marinum</i> NBRC 103143	83
2 <i>Prevotella ruminicola</i> Bryant 23	93
3 <i>Dysgonomonas hofstadii</i> JCM 17038	84
4 <i>Capnocytophaga sputigena</i> JCM 12967	86
5 <i>Mycoplasma yeatsii</i> GIH	84
6 <i>Fibrobacter succinogenes</i> HM2	89
7 <i>Succiniclasticum ruminis</i> SE10	98
8 <i>Sedimentibacter hydroxybenzococcus</i> JW/Z-1	91
9 <i>Mucilaginibacter composti</i> TR603	84

(5) まとめ:リグノセルロースの微粉碎はルーメンミメティック・バイオプロセスにとって必須である。セルロース分解菌がセルロース表面に到達できるかがリグノセルロースの消化率を決めている。したがって、微粉碎により基質の比表面積( $\text{cm}^2/\text{g}$ )を上げることにより消化率を上げることができる。本研究でスギを微粉碎することにより消化できることを実証した。リグノセルロースの微粉碎プロセスについては、今後も省エネルギー化に向けての研究開発を継続する必要がある。もう一つの重要な点は人工ルーメンの菌叢構造である。本研究からリグノセルロースからVFAを生産するために必要なルーメン細菌の菌叢構造は、本研究で設定したルーメンミメティック・バイオプロセスにより60日以上に亘り比較的安定に維持できることが分かった。ルーメン細菌が生育できる嫌気的な環境を保つことができた。また、菌叢解析からプロピオン酸の生産に関連した共生関係を明らかにした。プロピオン酸の生合成は、ルーメン発酵で生じた還元当量の有効な消費反応としてメタン発酵を抑える為に重要である。



(6) 今後の予定：本研究で開発したルーメンミメティック・バイオプロセスをスケールアップ、実用化して、利用されずに廃棄されているバイオマスである未利用間伐材等のリグノセルロース及び低質な未利用農資源の工業原料化と飼料化をはかるために、ルーメンミメティック有機酸・タンパク質生産システムの開発を行う(図7)。ルーメン微生物が良質なタンパク質であることは反芻動物の畜産で既に証明されている。よって、微生物菌体は家畜の良質な飼料にすることができる。

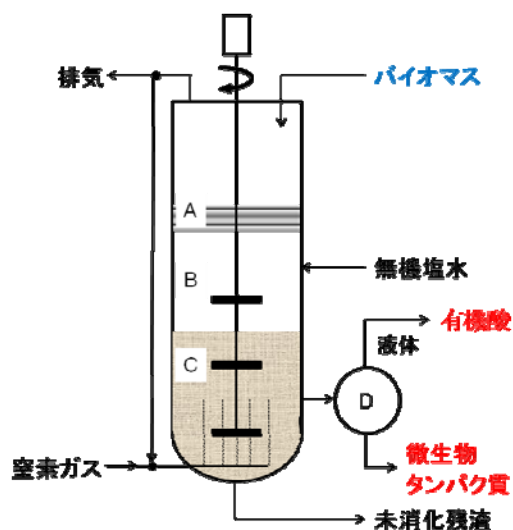


図7. ルーメンミメティック有機酸・タンパク質生産システム

A: マット層、B: 水層、C: 沈殿層、D: 固液分離槽

<引用文献>

①新ルーメンの世界、小野寺良次 監修、農文協 (2004)  
 ② Takahashi T., Sato Y., Ito K., Mori H.: Effect of agitation speed on enzymatic saccharification of dry-pulverized lignocellulosic biomass. *Renew. Energ.*, 62, 754-760 (2014).  
 ③ Huws S. A., Mayorga O. L., Theodorou M. K., Onime L. A., Kim E. J., Cookson A. H., Newbold C. J., Kingston-Smith A. H.: Successional colonization of perennial ryegrass by rumen bacteria, *Lett. Appl. Microbiol.*, 56, 186-196 (2013).  
 ④ van Gylswyk N. O.: *Succiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a ruminal bacterium converting succinate to propionate as the sole energy-yielding mechanism. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 297-300 (1995).  
 ⑤ Kabel M. A., Yeoman C. J., Han Y., Dood D., Abbas C. A., de Bont J. A., Morrison M., Cann I. K., and Mackie R. I.: Biochemical characterization and relative

expression levels of multiple carbohydrate esterases of the xylanolytic rumen bacterium *Prevotella ruminicola* 23 grown on an ester-enriched substrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 5671-5681 (2011).

⑥ Shinkai T., Ohji R., Matsumoto N., and Kobayashi Y.: Fibrolytic capabilities of ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* in relation to its phylogenetic grouping. *FEMS Microbiol. Lett.*, 294, 183-190 (2009).

⑦ Burnet M. C., Dohnalkova A. C., Neumann A. P., Lipton M. S., Smith R. D., Suen G., and Callister S. J.: Evaluating models of cellulose degradation by *Fibrobacter succinogenes* S85. *PLoS One*, 10, e0143809 (2015).

⑧ Osborne J. M., and Dehority B. A.: Synergism in degradation and utilization of intact forage cellulose, hemicellulose and pectin by three pure cultures of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microb.*, 55, 2247-2250 (1989).

⑩ Bekele A. Z., Koike S., and Kobayashi Y.: Genetic diversity and diet specificity of ruminal *Prevotella* revealed by 16S rRNA gene-based analysis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 305, 49-57 (2010).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Agematu H., Takahashi T., and Hamano Y.: Continuous volatile fatty acid production from lignocellulosic biomass by a novel rumen-mimetic bioprocess. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有、(印刷中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上松 仁 (AGEMATU, Hitosi)  
 秋田工業専門学校・創造システム工学科・教授  
 研究者番号：20435407

(2) 研究協力者

濱野 美夫 (HAMANO, Yoshio)