

令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：33114

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H01512

研究課題名(和文) 機能性ルーメン微生物群集の高密度・コンパクト化による非食用バイオマスのメタン発酵

研究課題名(英文) Methane fermentation of inedible biomass by highly concentrated and compacted functional rumen microbial communities

研究代表者

中井 裕 (Yutaka, Nakai)

新潟食料農業大学・食料産業学科・教授

研究者番号：80155655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：作物残渣や古紙を牛の第一胃内容液で処理すること(ルーメン処理)によって、その後のメタン発酵が促進されることを明確にした。ルーメン処理およびその後のメタン発酵過程における酵素および微生物群集を観察した。繊維分解酵素であるセルラーゼは処理過程において多様であったが、キシラナーゼは特定の種類の酵素が高い活性を維持し続けた。ルーメン処理槽においてルーメン由来のセルラーゼは、その活性を1か月以上も維持した。ルーメン処理過程において、分子量が異なるセルラーゼが少なくとも5種類の存在し、それらを産生または産生に関与する微生物は未同定の種であり、ルーメン微生物群集において優占種ではなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは牛のルーメン(第一胃)液を活用したルーメン・ハイブリッド型メタン発酵システムを開発し、草本のリグノセルロース分解効率を高め、高効率なバイオガス化を実現してきた。さらに本研究により、ルーメン微生物の植物繊維分解の活性を長期間維持できること、さらにこれらに関わる酵素の種類、構造などを明らかにした。以上より、本研究は非食用バイオマスのエネルギー化システム開発に必要な重要な情報を提供した。

研究成果の概要(英文)：After the treatment of crop residues or waste paper by cattle rumen fluid, methane fermentation of these materials was accelerated. Enzymes and microbial communities in the process was investigated. Fiber degrading cellulase was diverse in the process; however, specific enzymes of xylanase showed high enzymatic activity continuously. Cellulase activity in the rumen treatment tank was continued for more than one month. At least five types of cellulases having different molecular sizes were existed. Microbes producing or involving these cellulases were unclassified species and not dominant in the microbial community.

研究分野：環境農学(含ランドスケープ科学)

キーワード：メタン ルーメン微生物 バイオマス メタゲノム セルラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

穀物残渣は、世界では 517 百万トン、日本でも 1.4 百万トンにのぼり、有効利用が求められている。申請者らは、これまで、古紙や穀物残渣のナタネ茎葉のバイオガス化の前処理として牛の第一胃(ルーメン)内容液を利用する方法を開発した。ルーメンを使用した前処理を行うこと(以下、ルーメン処理)によって、古紙では 2.7 倍のメタン生成を得、ルーメン処理により、セルロース、ヘミセルロース、リグノセルロースの分解が促進することを示した(Baba, Tada, Fukuda, Nakai, Bioresource Technology, 2013, 94-99)。また、酵素活性測定により、ルーメン処理した液をメタン発酵に投入した場合、このことにより、メタン発酵槽に少ない酵素が補われること、ヘミセルロース分解のキシラナーゼがプラスされる補填効果が見られ、メタン発酵槽におけるセルロースやキシロース分解がさらに促進されることが示唆された。同様に、製紙工場残渣であるペーパースラッジをルーメン処理した後にメタン発酵を行った実験において、ルーメン液の原生動物(原虫)数を変化させてルーメン処理を行った場合、ルーメン液中の原虫総数とメタンガス生成に正の傾向の傾向を観察した。ルーメン原虫の中で *Polyplastron multivesiculatum* などはキシラナーゼを保有し、グラム陽性細菌の持つ酵素と近いことが報告されている(FEMS Microbiol Lett., 1999, 181, 145-52)。また、セルラーゼ、ヘミセルラーゼの関連遺伝子 GHs(glycoside hydrolases)の網羅的解析結果では(Dai, et al., AEM. 2015, 1375-1386)、原虫由来ヘミセルラーゼが全体の 6%を占めており、申請者らの原虫数とメタン収率の正の相関についても、原虫の持ち込み量増加によって、キシラナーゼ供給量が増え、ペーパースラッジからのメタンガス発生量が高くなっているとも考えられた。このことから、これらルーメン原虫は、リグノセルロースバイオマスのメタン生成を向上させる一つの指標になる可能性が考えられた。

しかし、ルーメン処理後にメタン発酵を行うハイブリッド処理において、ルーメン微生物がメタン発酵槽内でも働き続けられるのか、両リアクターにおけるリグノセルロース分解に大きく寄与する主要微生物は何なのか、微生物と酵素活性との関係性など多くの点が未解明である。

## 2. 研究の目的

牛のルーメン微生物の分解活性については、古くから畜産分野で研究されてきたが、と畜後、体外排出されたルーメン液中の微生物活性や群集構造の変化について着目した研究はない。と畜場において、ルーメンは解体され、1頭あたり約 100L のルーメン液が排出される。通常は汚水処理施設で処理されるが、これを回収して利用する場合、微生物が空気に暴露されることが問題となる。そこで、申請者らは、嫌気性ルーメン微生物の活性が低下しないよう、還元剤システムを添加することで、微生物活性が維持できることを明らかにし、特許取得した(特許第 5920728 号)。しかし、大量のルーメン液を運搬する際には、コスト削減のため、微生物分解機能を維持したまま減容化できることが望ましい。

申請者らがメタゲノム解析を行った結果、ルーメン微生物の中で、セルロース分解に関わる細菌はルーメン中で優占種である *Ruminococcus albus* とともに、その他の希少種も存在することを明らかにした(Baba et al. J Biosci Bioeng., 2017, 123, 489-496)。つまり、ルーメン液がセルロース分解に優れる理由の一つに、従来、ほとんど注目されなかった希少種の存在が重要である可能性が示唆された。以上をふまえ、優占種と希少種の双方が維持される減容化であることが望まし

い。そこで本研究では、これまでほとんどわかっていない機能性を有する希少種を特定するために、セルロース・ヘミセルロース・リグニン分解酵素の活性に着目し、メタゲノム解析による群集構造解析結果と照らし合わせることで明らかにし、優占種および希少種、それぞれの特異的なプローブを設計し、これらを指標生物として分解機能を評価しながら、高機能を保持しながら、高密度にルーメン微生物を減容化する手法を確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ルーメン・メタン発酵ハイブリッド処理における顕微鏡および遺伝子網羅解析

これまでも申請者らは、細菌の網羅解析を行い、既存データベースで解析した。しかし、真核生物のルーメン原虫では、まだ一部の遺伝子情報があるのみで、様々な種の酵素遺伝子や分子生物学的特徴は不明である。そこで本研究では次世代シーケンサーを用いて難培養のルーメン繊毛虫が関わる繊維分解系の分子メカニズムを明らかにする。得られた知見から減容化がルーメン繊毛虫へ及ぼす影響を評価し、細胞への負担が軽微な技術を開発する。まず顕微鏡下で 100 細胞を単離し、全ゲノム増幅と次世代シーケンシングで得られた配列を核ドラフトゲノムとする。同時に RNA-seq によって得られる配列をクエリーとして核ドラフトゲノムに与え、ルーメン繊毛虫の転写産物を得る。得られた網羅的配列を Blast 解析や KEGG へのマッピングで解析し、ルーメン繊毛虫が持つ繊維分解酵素遺伝子や関連代謝系遺伝子を明らかにする。ルーメン処理や減容化ではこれら遺伝子の動態をモニタリングし、それぞれの処理が及ぼす影響を評価する。

#### (2) 高機能性を保持したルーメン液の高密度・減容化

ポリ鉄を用いてルーメン液を減容化し、トマトの茎、デントコーン、コーヒー滓、籾殻などの様々な非食用バイオマスに対する分解活性について、ルーメン処理とメタン発酵の両方の結果から、明らかにする。また、それぞれのサンプルの DNA を抽出し、微生物群集構造解析に用いる。

#### (3) 減容化ルーメン液を活用したルーメン・ハイブリッド型メタン発酵による非食用部のバイオガス生産の最適化と評価

これまで明らかにしてきた最適な減容化条件を用いて、ルーメン液を減容化し、来年度の実証プラントでの実施を目標に、非食用バイオマスのルーメンメタンハイブリッドシステムで、高効率にバイオガス化を行う最適条件の検討を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 高活性セルラーゼと発現する微生物種の同定

カルボキシメチルセルロース(CMC)をモデルとしたルーメン処理を行い、分解速度がルーメン処理 12 時間目から 24 時間目にかけて最大となり、それ以降は急激に低下することを明らかにした。また SDS-PAGE およびザイモグラムによる解析では、分子量や CMC 分解活性が異なる複数の CMCase が存在しており、前処理を通じて酵素ごとに異なる消長を示した。これらの結果から、ルーメン処理過程においてセルロースを効率的に分解する CMCase の存在が明らかになった。

繊維分解酵素として重要なキシラナーゼについてもセルラーゼと同様に進めた。興味深いことに、ルーメン処理を通じて特定の限られたキシラナーゼが高い活性を維持しているという、セルラーゼと全く異なる推移をとることが明らかになった。これらのキシラナーゼを特定すべく、

ショットガンメタゲノム解析で構築されたデータベースをサーベイしたが、候補遺伝子は見いだされなかった。そこで LC/MS/MS を新たに行い、キシラナーゼおよび繊維分解酵素を産生する生物種の特特定を進めている。

一方、投入されたルーメン内容物を長期的に利用することを想定して、回分的なルーメン処理による植物繊維の分解、また回分処理中のセルラーゼ活性の変遷を調べた。その結果、ルーメン内容物を投入することなく処理を続けても、セルラーゼ活性は 1 か月以上も維持されることが新たに明らかになった。

## (2) ルーメン処理とメタン発酵処理における微生物群集構造

これまでルーメン処理において植物細胞壁を分解する微生物種が示されている(Baba et al. J Biosci Bioeng., 2017, 123, 489-496)。そこで、ルーメン処理後のメタン発酵槽内におけるこれらの微生物の消長を明らかにするため、ルーメン処理液からメタン発酵にかけて、経時的にショットガンメタゲノムシーケンスを行った。これより各時点において 1000 万リード以上の配列が得られた。得られたリードを用いた 16S rRNA 遺伝子のメタゲノム解析では、ルーメン処理からメタン発酵液にかけた微生物種の動態、とくに前処理からメタン発酵にかけて微生物群集が捉えられた。

セルラーゼ活性の高い時期と低い時期の微生物群集を比較した。その結果、セルラーゼ活性の高い時期に、有意に多く検出された配列の中から、セルロース分解微生物を検出することができた。

高活性セルラーゼをコードする遺伝子と考えられる配列やそれをもつ分解微生物の検出である。さらにルーメン発酵にて揮発性脂肪酸(メタン発酵の基質となる)の生産とセルロース分解微生物の配列も検出されており、セルロース分解微生物がメタン発酵の基質供与に寄与することも示された。これらの結果から、後段のメタン発酵の条件によっては、メタン生成菌の機能的不全による揮発性脂肪酸の蓄積が起こることが確認された。

高活性セルロース分解酵素とそれを発現する微生物の同定とこれに関与する微生物群集構造解析を試みた。その結果、ルーメン処理過程において、セルロース分解に関与するエンドグルカナーゼとして、分子量が異なるものが少なくとも 5 種類存在すること、それらを産生または産生に関与する微生物はルーメン微生物群集において優占種ではない未同定の種であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Baba Yasunori, Matsuki Yu, Takizawa Shuhei, Suyama Yoshihisa, Tada Chika, Fukuda Yasuhiro, Saito Masanori, Nakai Yutaka	4. 巻 34
2. 論文標題 Pretreatment of Lignocellulosic Biomass with Cattle Rumen Fluid for Methane Production: Fate of Added Rumen Microbes and Indigenous Microbes of Methane Seed Sludge	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 421 ~ 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME19113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takizawa Shuhei, Abe Kenichi, Fukuda Yasuhiro, Feng Mengjia, Baba Yasunori, Tada Chika, Nakai Yutaka	4. 巻 257
2. 論文標題 Recovery of the fibrolytic microorganisms from rumen fluid by flocculation for simultaneous treatment of lignocellulosic biomass and volatile fatty acid production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cleaner Production	6. 最初と最後の頁 120626 ~ 120626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jclepro.2020.120626	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shuhei Takizawa, Yasunori Baba, Chika Tada, Yasuhiro Fukuda & Yutaka Nakai	4. 巻 22
2. 論文標題 Sodium dodecyl sulfate improves the treatment of waste paper with rumen fluid at lower concentration but decreases at higher condition.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Material Cycles and Waste Management,	6. 最初と最後の頁 656-663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Lee Chol Gyu, Baba Yasunori, Asano Ryoki, Fukuda Yasuhiro, Tada Chika, Nakai Yutaka	4. 巻 Inpress
2. 論文標題 Identification of bacteria involved in the decomposition of lignocellulosic biomass treated with cow rumen fluid by metagenomic analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 Inpress
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asano Ryoki, Hayakawa Atsushi, Fukushima Jun, Nakai Yutaka, Shimura Yoichiro, Abe Midori, Inamoto Tamio	4. 巻 8
2. 論文標題 Changes in Bacterial Communities in Seawater-Flooded Soil in the Four Years After the 2011 Tohoku Tsunami in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Marine Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 76 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jmse8020076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takizawa Shuhei, Baba Yasunori, Tada Chika, Fukuda Yasuhiro, Nakai Yutaka	4. 巻 78
2. 論文標題 Pretreatment with rumen fluid improves methane production in the anaerobic digestion of paper sludge	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Waste Management	6. 最初と最後の頁 379 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wasman.2018.05.046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takizawa Shuhei, Baba Yasunori, Tada Chika, Fukuda Yasuhiro, Nakai Yutaka	4. 巻 87
2. 論文標題 Preservation of rumen fluid for the pretreatment of waste paper to improve methane production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Waste Management	6. 最初と最後の頁 672 ~ 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wasman.2019.02.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 浅野亮樹, 早川敦, 阿部みどり, 志村洋一郎, 小林弥生, 福島淳.	4. 巻 4
2. 論文標題 東日本大震災で津波浸水した農地土壌の5年後における微生物群集解析.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 秋田県立大学ウェブジャーナル.	6. 最初と最後の頁 147-152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 瀧澤修平, 阿部憲一, 福田康弘, 多田千佳, 中井裕.
2. 発表標題 凝結凝集法によって回収したルーメン微生物のエンドグルカナーゼ活性の特徴
3. 学会等名 第18回 日本畜産環境学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 瀧澤修平, 阿部憲一, 福田康弘, 多田千佳, 中井裕
2. 発表標題 凝結凝集法がルーメン微生物の回収効率および植物系バイオマス分解特性におよぼす影響.
3. 学会等名 第30回 廃棄物資源循環学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 S. Takizawa, Y. Fukuda, C. Tada, Y. Nakai.
2. 発表標題 Fibrolytic Enzyme Activity During Pretreatment using Rumen Fluid for the Anaerobic Digestion of Lignocellulose.
3. 学会等名 16th International Water Association World Conference on Anaerobic Digestion. (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 瀧澤修平, 多田千佳, 福田康弘, 中井裕
2. 発表標題 ルーメン液を利用したペーパースラッジのバイオガス化におけるルーメン原虫の影響
3. 学会等名 第12回バイオマス科学会議
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 瀧澤修平, 福田康弘, 多田千佳, 中井裕
2. 発表標題 ルーメン液を利用した植物系バイオマスの前処理におけるセルラーゼの挙動
3. 学会等名 第17回日本畜産環境学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 瀧澤修平, 浅野亮樹, 福田康弘, 多田千佳, 中井裕
2. 発表標題 ルーメン微生物群集による植物系バイオマス分解過程における多糖分解酵素活性の推移
3. 学会等名 第125回日本畜産学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Takizawa S, Fukuda Y, Tada C, Nakai Y
2. 発表標題 Change in Cellulase Activity during Pretreatment with Rumen Fluid for the Anaerobic Digestion of Lignocellulosic Biomass
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Adachi, H., Goto, N., Kusube, T., Kawai, S., Baba, Y
2. 発表標題 Continuous solubilization of organic waste by cattle rumen fluid for methane production
3. 学会等名 2018 Joint Seminar on Environmental Ecology and Restoration between Taiwan and Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年



1. 発表者名 足立明香, 藤暢宏, 楠部孝誠, 河井重幸, 馬場保徳.
2. 発表標題 メタン発酵効率化のためのルーメン微生物を利用した植物バイオマスの連続可溶化
3. 学会等名 第11回北陸合同バイオシンポジウム
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 馬場保徳
2. 発表標題 ウシルーメン液処理によるメタン発酵効率化 ; 複合微生物系の理解に向けた NGSの活用
3. 学会等名 日本生物工学会バイオインフォマティクス相談部会講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 馬場保徳, 松木悠, 馬場 (森) 裕美, 陶山佳久, 多田千佳, 福田康弘, 三宅克英, 齋藤雅典, 中井裕.
2. 発表標題 ウシルーメン液によるメタン発酵前処理過程の微生物群集構造解析.
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 馬場保徳, 松木悠, 馬場 (森) 裕美, 陶山佳久, 多田千佳, 福田康弘, 三宅克英, 齋藤雅典, 中井裕.
2. 発表標題 ウシルーメン液による植物バイオマス可溶化処理およびその後のメタン発酵過程の微生物群集構造解析.
3. 学会等名 第2回環境微生物系学会合同大会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 Method of organic acid fermentation by rumen fluid using cellulose-containing waste matter	発明者 中井裕, 馬場保徳, 多田千佳, 福田康弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、EP 2631299 B1	取得年 2019年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	多田 千佳  (Tada Chika)  (30413892)	東北大学・農学研究科・准教授   (11301)	
研究分担者	福田 康弘  (Fukuda Yasuhiro)  (50527794)	東北大学・農学研究科・助教   (11301)	
研究分担者	馬場 保徳  (Baba Yasunori)  (70747823)	石川県立大学・生物資源環境学部・助教   (23303)	
研究分担者	阿部 憲一  (Abe Kenichi)  (80618835)	新潟食料農業大学・食料産業学科・講師   (33114)	
研究分担者	浅野 亮樹  (Asano Ryoki)  (20646137)	新潟食料農業大学・食料産業学科・講師   (33114)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------