

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870791

研究課題名(和文) 木材チップのみを基質としたユニークなメタン発酵の特性解明

研究課題名(英文) Elucidation of characteristics regarding a unique methanogenic fermentation of wood chip

研究代表者

高野 初美 (TAKANO, Hatsumi)

日本大学・生物資源科学部・研究員

研究者番号：40647103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：メタン発酵は嫌気性微生物の分解活性を利用し、有機物を可燃性バイオガスに変換する技術である。我々は、木材チップを効率よく分解しメタンガスを生成する独自の微生物群集の構築を試行し、培養条件の検討を進めると共に菌相構造を明らかにした。また、メタン発酵にとって重要な分解反応を担う微生物種の同定と機能に関する基礎的知見を明らかにした。さらに、木材堆肥から新奇なリグニン分解性担子菌及び放線菌をいくつか分離した。これら木材腐朽菌による木質リグニンの分解処理は、木質バイオマス分解性メタン発酵の効率化に貢献することが期待された。

研究成果の概要(英文)：Methane fermentation is a technique that utilizes the decomposing activity of the anaerobic microorganisms, which convert the organic matter into a flammable biogas. We attempted to culture a unique microbial community that produce methane efficiently by decomposing wood chips, it revealed the study of culture conditions and the bacteria phase structure of the consortia. Also, we had to clarify the basic knowledge about the function and identification of microbes responsible for the important decomposition reaction for methane fermentation. Furthermore, we isolated the novel lignin-degrading basidiomycetes and actinomycetes from wood chip compost. The decomposition processing of wood lignin by these wood-rotting microbes was expected to contributed the efficiency of methane fermentation utilizing wood biomass.

研究分野：農学

キーワード：木質バイオマス メタン発酵 再生可能エネルギー 共生 菌相構造解析

1. 研究開始当初の背景

(1)昨今の我が国における電力問題を背景に、自国の資源を活用したバイオマス発電への期待が高まっていた。その基質として、特に産出量の多い間伐残材を有効利用する取り組みが注目されていた。しかし、実用化段階にある廃材の燃焼・ガス化による発電プロセスは、大規模施設の必要と運搬コストという2つの大きな問題を抱えており、汎用性に乏しかった。そこで、我々は、各地に設置可能な中小規模処理槽でのバイオマス発電に向け、新たな技術開発を行うべくメタン発酵に着目した。

(2)メタン発酵において、木材を単一基質とした例は少なく、槽内で機能する微生物の種類や相互作用に関する報告はほとんどなかった。その理由として、メタン発酵は多様な嫌気性微生物が共生することにより成立する複雑な反応であり、それを担う微生物の分離同定及びその機能解析は特殊な技術と長期間の観察を必要とすることが挙げられた。

2. 研究の目的

木質バイオマスを基質とするメタン発酵の微生物学的解析を行うため、我々は独自に木材チップ分解性高温メタン発酵微生物群集を構築した。本研究では、この発酵液と立ち上げの基とした木材堆肥について、詳細な菌相構造解析を行い、木質成分の分解に関与する微生物種の分離同定とその機能を解明すること及びメタン発酵の効率化と微生物制御に関する新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)メタン発酵微生物群集の確立と菌相解析

嫌気性細菌培養用の合成培地をバイアルビンに添加し、窒素充填下で木材チップ、または熟成木材堆肥を接種し、55℃で半連続培養した。1週間毎にガス量測定、ガスクロマトグラフィーによるガス組成分析および培地と木材チップの添加等を行い、約2年半にわたりメタン発酵微生物群集構築の経過を観察した。また、基質の添加量及び形状を始めとする培養条件の検討を実施した。また、構築した発酵液よりDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子を標的とするPCR-DGGE法により真正細菌及びメタン生成アーケア群の菌相変化を追跡した。さらに、メタゲノム解析を実施し、変遷する菌群の構成を詳細に解析した。

(2)機能性微生物種の選抜と分離同定

真正細菌、メタン生成アーケアまたは特定の菌群を特異的に検出するプライマーを用いてクローン解析を行った。その結果をPCR-DGGEのプロファイルと照らし合わせ、培養経過に伴い検出される配列を標的とし、選抜を行った。標的微生物種の遺伝子配列を解読し、相同性検索および系統解析により菌種の推定を行った。また、好気性細菌は固体培

地法、嫌気性細菌は窒素置換した液体培養法を用いて標的細菌種の培養を実施した。その際、メタン生成アーケアは酢酸あるいは水素を基質とし、セルロース分解性嫌気性細菌は木材チップ、稲わら、ろ紙等を基質とした。また、木質リグニン分解菌の分離には、放線菌あるいは真菌を標的とした各選択分離培地を用いて探索を行った。

(3)木質分解の効率化と性能評価

基質である木質に対し、好気および嫌気の各分解に関与する微生物群集の機能をより効率よく利用するための条件検討を実施した。微生物の培養条件として、温度や湿度に加え発酵基質である木材の形状による微生物分解性を比較した。また、木材堆肥より分離したリグニン分解微生物を用いて木材チップに含まれるリグニンをあらかじめ部分分解する腐朽処理を施し、メタン発酵の基質とする2段階分解法を施行し、その効果を調査した。また、構築した高温メタン発酵液の分解性能を評価するため、COD_{Cr}測定、バイオガスおよび有機酸分析を実施した。

4. 研究成果

(1)メタン発酵微生物群集の確立と菌相解析

木材チップあるいは木材堆肥 5gに嫌気性細菌用培地(M培地)を300ml添加したバイアルビン(750ml容積)で発酵を開始した。構築した高温メタン発酵液は、0.5~3.0gの木材チップ負荷に対し、平均して200~300ml/週を示し、その値は培養開始から約20週で安定化した(図1)。

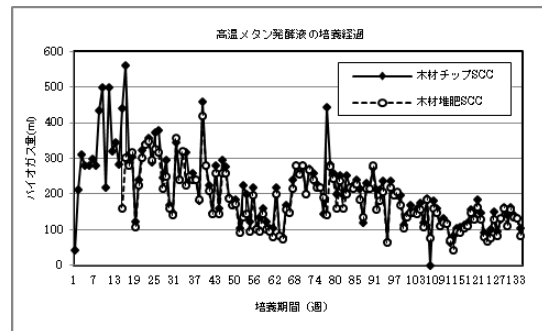


図1. 高温メタン発酵液の培養経過

メタンガスの割合は、木材チップが約5mmの場合は15%程度だったが、半分の2.5mmにすると24%程度まで上昇した。また、木質メタン発酵においては、基質となる木材の樹種よりもチップの形状がバイオガス発生量に影響することが示唆された。培養開始から6カ月後付近から木材チップの連続的な投入により、窒素欠乏と推測される発酵不良が発生した。そこで、20~40mMの塩化アンモニウムを添加したところ、再現性良く回復することが明らかとなった。一方、pHの変動は培養期間中ほとんどなく、7.2-7.6の中性付近を推移した。培養当初の固形物量は1.6%と低く、湿式メタン発酵の状態であったが、余剰

固形分の除去を行わなかったため、木材チップの添加と共に徐々に固形物量が増え、後半には固形物量が50%以上の乾式メタン発酵へと移行した。多くの固形物は培養初期の比較的大きな木材チップと微生物の混合体と示唆された。バイアル瓶から固形物を一様にサンプリングすることが困難であったことから、半連続培養による汚泥交換は液相のみで行った。次に、木材堆肥の炭素率(C/N比)をスミグラフで測定した結果、C/Nは28~30前後であることが分かった。この結果から、メタン発酵液の構築に用いた木材堆肥は炭素率が高く、木質分解微生物に適した状態であることが示唆された。

バイオガス発生量とメタン生成アーケアのPCR-DGGEパターンの変化は顕著に関連性が見られ、発酵状況を知る一つの指標となることが確認された。さらに、真正細菌群の菌相は非常に多様であり、木質分解に關する菌群が非常に複雑であることが明らかとなった。

真正細菌群の16S rRNA遺伝子を標的とするメタゲノム解析を実施し、木材堆肥及びメタン発酵液に存在する菌相の分類学的調査を行った。その結果、木材堆肥には好気性、嫌気性細菌を含む450属以上の多様な細菌群が生息していることが明らかとなった。さらに、細菌群の約30%は未だ分離例のない未知細菌群で構成されることが分かった。一方、高温メタン発酵液では、嫌気性細菌の*Caloranaerobacter*属、*Clostridium*属、*Moorella*属及び*Thermoanaerobacter*属など特定の菌群が顕著に優占化することが明らかとなった。この結果から、これらの細菌群が、木質分解に深く関与することが強く示唆された。

(2)機能性微生物種の選抜と分離同定

16S rRNA遺伝子配列を標的とするPCR-DGGE法及びクローン解析を網羅的に実施し、木材あるいは木材堆肥からメタン発酵に馴養される真正細菌群及びメタン生成アーケアの菌相を調査した。また、木質の好氣的分解(腐朽)および嫌氣的分解(発酵)の各段階に關する機能微生物と推測される標的微生物の分離培養を試みた。

(i)メタン生成アーケア：分子生物学的解析から、木材堆肥では水素とギ酸資化性の*Methanobacterium*属、酢酸とメタノール資化性の*Methaosarcina*属、酢酸資化性の*Methanotrinx*属の中温性あるいは高温性の複数アーケアが主に存在することが明らかとなった。一方、本研究で構築した高温メタン発酵液では、酢酸酸化細菌と共生下でメタンを生成する水素とギ酸資化性の*Methanoculleus*属が優占化していることが分かった。また、単独で生育する水素資化性の*Methanothermobacter*属もわずかに検出された。どちらも高温性のメタン生成アーケアであり、高温メタン発酵に適した菌相へと変

化したことが示唆された。しかし、培養法では*Methanothermobacter*属しか検出されなかった。このことから、木質分解性メタン発酵系内で主に機能しているメタン生成アーケアは、共存する細菌群と強い共生関係を築き、主に水素をメタンへと転換する特徴を有していることが強く示唆された。

(ii)セルロース分解性細菌：ろ紙を基質とする集積培養およびクローン解析を試みた結果、高温性セルロース分解菌である*Clostridium thermocellum*やセロビオースやグルコース分解菌である*Tepidanaerobacter*属、*Acetomicrobium*属に分類される配列を取得した。しかし、これらの細菌群は強い共生関係にあるため、純化された単一菌株を取得することは困難であることが分かった。次に、稲わらを基質とする集積培養および分子生物学的解析を行った結果、高温性セルロース分解菌である*Clostridium stercorearium*に近縁の配列が多数取得された。続いて、木材チップを基質に同様の操作を行った結果、高温性セルロース分解菌が分類される*Clostridium cluster III*に分類される新奇性の高い配列Clone56が検出された。本配列を特異的に増幅するプライマーをデザインし、様々な条件で培養を試みたところ、本配列に相当する微生物種は、木質セルロースを好んで分解し生育することが強く示唆された。このことから、本菌は木質分解性高温メタン発酵液において、セルロース分解に關する重要な標的細菌種であると推測され、分離培養を継続している。以上の結果から、本研究で構築した木質分解性メタン発酵液には、複数のセルロース分解性細菌が存在し、各基質に適応した優占種が機能していることが明らかとなった。さらに、木質のみならず、セルロース系基質の分解に幅広く応用可能な微生物群集であることが示された。

(iii)リグニン分解性微生物：フミン酸ピタミン寒天培地(HV agar)を用いて木材堆肥からの放線菌選抜分離を試みた。28、40、50でそれぞれ培養した結果、約150株の分離株を得た。そのうちの89株について16S rRNA遺伝子配列を解析し、相同性検索を行ったところ、28、40の培養では*Streptomyces*属が約7割を占める一方、50では本属は4割と著しく減少した。その代わりに、高温性の*Microbispora*属、*Thermopolyspora*属、*Actinomadura*属が分離された。培養温度の上昇により、分離される菌株の多様性が低くなり、特定の放線菌が分離されやすくなることが分かった。この内、リグニンモデル基質であるRBBR(レマゾールブリリアントブルーR)の脱色活性試験で陽性を示した株がいくつかの*Streptomyces*属分離株において確認されたが、分解活性は不安定であった。次に、木材堆肥に新鮮な木材チップを添加し、37あるいは45で中長期間にわたる好氣的な集積培養を実施した。それを分離源として放線

菌を培養し、RBBR 脱色活性を明瞭に示す菌株をリグニン分解性菌株とする選択的探索を実施した。その結果、異なる表現型のコロニー 20 株以上を分離し、その内 15 株がリグニン分解活性を示した。そこで、それら菌株の 16S rRNA 遺伝子配列を解読し、菌種の推定を行ったところ、多くの分離株が高温性の *Streptomyces* 属細菌に近縁であることが明らかとなった (*S. thermocophilus*, *S. phaeochromogenes*, *S. aureus*)。一方、分離株 AGRT-13 は *Streptomyces* 属に分類されるものの、既知放線菌と低い類縁性を示したことから、新規リグニン分解性放線菌であることが示唆された。

次に、貧栄養培地あるいは素寒天培地を用いて木材堆肥からの真菌類の分離を試みた。堆肥に含まれる木片をエタノール等で表面殺菌し、そのまま固体培地上において 25℃、湿度 80% で 1 週間ほど培養し、生育した菌糸を釣菌した。その結果、約 15 株の真菌を取得した。菌種の推定を行うため、分離株より DNA を抽出し、18S rRNA 遺伝子配列、D1/D2 領域、ITS 領域などを解析し、相同性検索を行った。その結果、分離株の大半が子のう菌門に属する真菌で *Phomopsis* 属や *Trichoderma* 属、*Discotroma* 属などのセルラーゼ生産による木材分解菌に近縁であることが明らかとなった。一方、表現型から担子菌と推測される菌株 3 株 (AGRS 22-3、AGRS 3-4、AGRS 3-5) を取得したため、遺伝子配列の解析を行ったところ、リグニン分解を行う白色腐朽菌の一種である *Sphaerobolus* 属に近縁な新奇担子菌株の一群であることが示唆された。そこで、RBBR の脱色及びバーベンドム反応を検討した結果、3 株とも陽性を示したことからこれらの分離株はリグニン分解菌であることが明らかとなった。さらに、比較対照菌株とした白色腐朽菌 *Trtmetes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* と比べ、より高温の 40℃ でもリグニン分解性を示すことが分かった。また、セルロースおよびキシラン分解性は比較対照菌株と比べ著しく緩慢であることから、本研究で分離した担子菌株は、セルロースを残して、高選択的にリグニンを分解する高温性の「選択的白腐朽菌」であることが示唆された。

(3) 発酵の効率化と性能評価

木質の好氣的分解（腐朽）および嫌氣的分解（メタン発酵）におけるそれぞれの効率的な条件検討を実施すると共に構築した木質分解性メタン発酵液の性能を調査した。

まず、木材の好気分解に関与する微生物群集に関してその分解特徴を調査した。木材堆肥に新鮮な木材チップを添加し、37℃あるいは 45℃、湿度は約 70% になるよう調整し、中長期間にわたる好氣的な集積培養を実施した。約 1 年間で木質分解を重量減少率で評価した結果、37℃では最大で約 5%、45℃では約 30% と高温での分解効率が高いことが示さ

れた。また、チップ形状は必ずしも分解効率に大きく影響を与えないことが明らかとなった。さらに、培養開始 50 日までは緩慢な分解を示すが、100 日を超えると顕著に分解が促進し、木質の減少が観察された。これらのことから、好氣的に木質を分解する微生物相が安定するには少なくとも 3 か月以上の期間が必要であり、その後は安定し分解機能を維持することが確認された。

次に、真菌を用いた木材腐朽処理に関して、木材堆肥から分離した担子菌 AGRS 22-3 株についてその分解特性を検証した。まず、粉状木材とふすまを混合 (2:1) した基材あるいは木材チップ (0.5~1cm メッシュ) を単一で深型シャーレ (高さ 9cm) に 40g 入れ、重量含水率 60% で補水後に寒天培地で培養した真菌株を寒天ごとくり抜き、基材と良く混ぜて 25℃あるいは 40℃、湿度 80% 前後で 2~6 か月間培養し、木材の減少率を測定することで分解性を検証した。混合基材の場合、AGRS 22-3 株と比較対照の担子菌 5 株 (*T. versicolor*, *P. chrysosporium* 2 株、*Hypsizyqus marmoreus*, *Pleurotus eryngii*) はいずれも 4 か月間で 0.5%~1% (25℃) 未満の木材減少率 (重量比) しか示さなかった。一方、単一基材の場合、2 か月間で AGRS 22-3 株は 0.6% (25℃)、5.7% (37℃)、3.5% (40℃) の木材減少率 (重量比) を示した (図 2)。

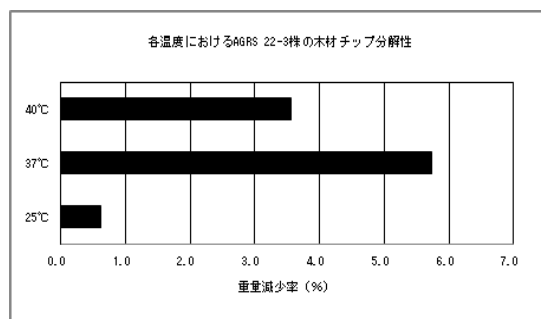


図 2 . AGRS 22-3 株の木材チップ分解率

これらは対照菌株と比べて最大で 5 倍もの減少率にあたりると同時に高温域での分解活性が高いという特徴が明らかとなった。これらのことから、本研究で木材堆肥より分離した担子菌 AGRS 22-3 株は、既知の木材腐朽菌と比較して、高い温度で効率よく木材を分解する機能性真菌として利用できることが強く示唆された。

続いて、構築した高温メタン発酵液の分解性能を評価するため、COD_{cr} 測定、バイオガスおよび有機酸分析を実施した。基質として、粉木材あるいは各種担子菌株を用いて腐朽処理した木材の 2 種類を用いた。微生物相は、構築したメタン発酵液の液相を 5% (v/v) で植菌し、分解率を算定した。まず、1g の粉木材をメタン発酵した場合、培養 2 週間では 45~60ml のバイオガスが発生し、その内の約

15%がメタンガスであった。培養8週間では、80ml~100mlのバイオガスが発生し、その内の約25%がメタンガスであった。CODcr分解率は、平均19.6%(2週間)、17.1%(8週間)であった。メタン発酵前の基質重量から減少した有機物量と全CODcr量から算出した理論メタンガス生成量に対して、本発酵液のメタン転換効率を計算すると培養2週間では理論値の32%、8週間では65%のメタン転換効率を得られた。葉を30%含む剪定枝を基質とする高温メタン発酵において、分解率(VS基準)25%、メタン転換率72%、メタン濃度が55%という報告例があるが、それと比較してもリグニンを含む木材チップ単一の基質でのメタン発酵効率としては、十分に機能し得ることが確認された。次に、各種白色腐朽菌を用いて約3カ月間腐朽処理した木材チップを滅菌し、上述した条件でメタン発酵した場合、培養8週間では130~260mlのバイオガスが発生し、その内の約30~35%がメタンガスであった。最もガス発生率が高かったのは、本研究にて分離したAGRS 22-3株で腐朽処理した木材チップ(266ml)、次いで *T. versicolor* (166ml) で、*P. chrisosporium* による処理木材からは、最もガス発生量が少なかった(130-140ml)。CODcr分解率は、16-26%で腐朽菌株間に差異が見られた。最も差があったのは、*P. chrisosporium* (26.0%)とAGRS 22-3株(16.4%)による腐朽処理木材をメタン発酵したものであった。メタン転換効率は、各菌株の腐朽処理木材において、43.4% (*P. chrisosporium*)、39.0% (*T. versicolor*)、49.7% (AGRS 22-3株)であった。*P. chrisosporium* および *T. versicolor* (カワラタケ)は白色腐朽菌として研究例の多い担子菌であり、木材細胞壁を破壊しながらリグニン分解酵素および多糖分解酵素を侵入させるという強力な植物細胞分解機構を有している。そのため、本菌による腐朽処理では木質成分の多くが流出し、栄養分の乏しいバイオマスになるという欠点が指摘されてきた。本研究においても、これら2菌による腐朽処理木材は分解率が高いにもかかわらず、メタン転換効率がそれに付随しなかったのは、腐朽によってリグニンが分解されるにとどまらず、セルロースにまで分解が及びメタン発酵のための基質が担子菌によって消費されたためであると考えられた。一方、本研究にて木材堆肥から分離した *Sphaerobolus* 属類縁菌AGRS 22-3株は、木質リグニンを十分分解するにも関わらず、多糖類の消費は比較的抑えられており、腐朽処理後の木材チップにはメタン発酵の基質として十分なセルロースが残存していることが強く示唆された。このような選択的分解を行う白色腐朽菌は数少なく、その分解機構についても明確でない部分が残っていることから、AGRS 22-3株をモデルとする選択的リグニン分解特性およびその機能性利用については今後さらなる検討が必要であると考え

られた。また、構築したメタン発酵液を用いた乾式での性能評価およびスケールアップした発酵槽での性能に期待が持たれるところだが、現在のところ発酵液の容積が少ないこと及び連続培養系維持条件の検討が課題となり、その試行には至っていない。

有機酸分析については、粉末材をメタン発酵した時のみ分析を実施し、木材チップを基にした半連続メタン発酵液では主に酢酸が検出されが、木材堆肥を基にしたメタン発酵液では、酢酸だけでなくプロピオン酸も検出された。メタン発酵微生物群集の中でも複雑な菌相を有する酸生成段階に關与する微生物は、いまだ未知な菌群が多く、その役割もほとんど解明されていない。今回検出された有機酸はこれら酸生成菌群の働きを考察する上で重要な情報であり、木質分解性メタン発酵微生物群集のさらなる機能解明に繋がる知見となることが期待された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{ 雑誌論文 } (計0件)

{ 学会発表 } (計3件)

1) 高野(白鳥)初美、大川桃世、榊田達哉、石井匡志、高野英晃、上田賢志：木質分解性メタン発酵系確立のための有用菌群の単離同定、日本農芸化学会2015年度大会(2015年3月29日岡山大学)

2) 高野(白鳥)初美、石井匡志、上田賢志：木材チップ分解性メタン生成微生物群集の構築とその特性、日本農芸化学会2014年度大会(2014年3月29日、明治大学)

3) 高野初美、山成貴士、鈴木寛二、石井匡志、上田賢志：ユニークな木材チップ堆肥から分離される放線菌群の多様性、日本放線菌学会2013年度大会(2013年9月5日、メルパルク広島)

{ 図書 } (計0件)

{ 産業財産権 }
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

生命工学研究室ホームページ
<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~ueda/lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 初美 (TAKANO Hatsumi)

日本大学・生物資源科学部・研究員

研究者番号：40647103

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：