

木質バイオマス添加によるウシルーメン液内の菌叢変化

志村洋一郎, 高橋智子, 佐々木聡子, 稲元民夫

秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

下水汚泥や家畜廃棄物などからのバイオガス生産・利用は再生可能エネルギーの一つとして再評価されている。メタンガスがウシ嘔気に含まれ、第一胃（ルーメン）内にメタン生成古細菌が存在することは古くから知られている。そのため、我々は反芻動物が植物バイオマス消化に十分な微生物叢を持つと考え、ウシルーメン液のメタンガス産生に木質バイオマス試料の利用が可能であるのかを検討するため、ウシルーメン液にスギ粉碎粉末（JCP）あるいはセルロース粉末（CP）を添加して培養し、メタンガス産生の確認と反応槽内の菌叢解析を行った。メタンガス産生は培養 10 日目より検出され、JCP 添加区では最大 3% 程度、CL 添加区では最大 5% 程度であった。PCR-DGGE 法による細菌叢解析では、*Ureibacillus* 属菌や *Lysinibacillus* 属菌が検出され、リグノセルロース分解への関与が推測された。メタン菌の解析では *Methanobrevibacter* 属菌と *Methanobacterium* 属菌が培養期間全体を通じ存在することが考えられた。ルーメン内菌叢は、添加されたバイオマス試料により変化するが、メタン菌では大きな変化がないことが推察された。

キーワード：ルーメン細菌叢, 木質バイオマス, メタン発酵, PCR-DGGE

地球温暖化スポード抑制のため、CO₂ やメタンなどの温室効果ガスの排出抑制が求められている。また、2011 年の東日本大震災以後、それまで以上に多様な発電様式や再生可能エネルギー、特に地域に潜在する資源を利用したエネルギー生産が求められている。バイオガスは下水汚泥や家畜廃棄物などを利用した再生可能エネルギーの一つである。近年では、古紙をウシルーメン液で前処理しメタン発酵槽へ添加することでメタン回収率が向上すること（Baba ら 2013）やナタネ茎をウシルーメン液で前処理することで発酵槽へキシラナーゼ活性が持ち込まれること（馬場ら 2015）が報告され、地域資源の一つである植物（廃棄）バイオマスの利用にも有効な手段の一つと捉えられるようになった。ウシ嘔気にはメタンガスが含まれ、第一胃（ルーメン）におけるメタン発生は古くから知られている。我々はウシルーメン液での植物バイオマス消化に関する細菌叢およびメタン生成古細菌の飼料による変化を知るために、ウシルーメン液へスギ粉碎粉末あるいはセルロース粉

末を添加して培養し、メタン産生と菌叢変化を調べた。なお、本研究の一部は、平成 27 年度東北復興次世代エネルギー研究開発プロジェクト報告書に報告した内容を含んでいる。

材料と方法

ウシルーメン液の培養

反応槽を 2 組準備し、それぞれにウシルーメン液 150 mL を入れ、38°C で 32 日間培養した。培養開始 1 日後に木質バイオマス試料としてスギ粉碎粉末 1.5 g あるいはセルロース粉末 0.5 g を添加した。セルロース粉末を添加した反応槽には、栄養源の補助として乾燥ブイオン粉末（日水製薬）1.0 g を同時に添加した。21 日目以降、両反応槽には随時トリプトソーヤブイオン培地（5 あるいは 10 mL）あるいはおよび高グリセリン溶液（1 あるいは 2 mL）を添加した。ルーメン液は pH7.5 付近になるように 3 M 酢酸ナトリウム溶液を添加し、毎日定時に調整した。1 日お

きに 6 mL ずつ分取し、各種分析まで -80°C のフリーザーで保存した。反応槽内の変化は反応槽の重量を測定することで行った。なお、ウシルーメン液は -30°C で凍結保存していたものを使用直前に解凍して使用した。

バイオマス試料

木質バイオマス試料は、スギ粉碎粉末 (Japan cedar powder, 以下 JCP と略) (50% 通過粒径 $36.38\ \mu\text{m}$, 80% 通過粒径 $62.25\ \mu\text{m}$, 糖化率 (メイセラーゼ) 77.9% , (Ctec2) 81.4%) および濾紙 (ワットマン No.1) から調製されたセルロース粉末 (cellulose powder, 以下 CP と略) を使用した。なお、スギ粉碎粉末は本学システム科学技術科学部機械工学科・准教授高橋武彦先生から分与いただいた。また、高グリセリン溶液は、秋田運送株式会社・鈴木秀雄様から分与いただいた。

メタンガス産生

反応槽に取付けた袋から、シリンジで気体を 1 mL 抜き取り、Porapak Q カラム ($80\text{-}100\ \text{mesh}$, $\phi 2\ \text{mm} \times 3\ \text{m}$, 信和化工) をつけた GC-8A システム (島津) を用い、TCD 検出器 (50°C) でメタンガス濃度 (%) を測定した。移動相は窒素ガスを用いた。3 回計測し平均値を示した。

菌叢解析

DNA 抽出

凍結保存していた培養分取液は解凍後、 $10,000 \times g \cdot 1\ \text{分間} \cdot 4^{\circ}\text{C}$ で遠心分離し沈殿を得た。得られた沈殿は PBS に懸濁後、遠心分離し沈殿を得た。これを 2 回実施後、沈殿に $10\ \text{mM Tris-HCl} \cdot 1\ \text{mM EDTA}$ 溶液 ($\text{pH}8.0$, 以下 TE) を加え懸濁し、セルストレーナ ($100\ \mu\text{m mesh}$, DB Falcon) を通して大きな残渣を取り除いた。これを再度遠心分離し沈殿を得た。得られた沈殿 $50\ \text{mg}$ から、Morita らの方法 (2007) に従い DNA を抽出した。得られた DNA は TE に懸濁して使用まで -20°C で保存した。

遺伝子増幅

真正細菌を対象とする場合、得られた DNA $50\ \text{ng}$ を鋳型とし、357f-GC/518r プライマーペアで 16S

rRNA 遺伝子の V3 領域を PCR 法にて増幅した (Muyzer, De Waal, Uitterlinden, 1993)。

メタン生成古細菌を対象とする場合、上記の領域を Nested-PCR 法にて増幅した (Zhou, Hernandez-Sanabria, Guan, 2010)。即ち、1 回目の PCR では得られた DNA $40\ \text{ng}$ を鋳型とし、Met86f/Met915r プライマーペアで遺伝子増幅し、2 回目の PCR では精製した 1 回目の増幅産物 $10\ \text{ng}$ を鋳型とし、ARC344f-GC/519r プライマーペアで増幅した。使用したプライマー一覧を付録に付す。

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE)

DCode システム (BioRad) を使用した。説明書に従い、 8% アクリルアミドゲルを用い、 $8\ \text{M}$ 尿素・ 40% ホルムアミドを変性剤濃度 100% として、真正細菌の場合は変性剤濃度勾配を $30\text{-}50\%$ 、そしてメタン生成古細菌の場合は $40\text{-}55\%$ とし、 $130\ \text{V} \cdot 4\ \text{時間} 30\ \text{分} \cdot 60^{\circ}\text{C}$ で電気泳動した。泳動終了後、ゲルは SYBR Gold (Invitrogen) で $30\ \text{分間}$ 染色した。染色後、ミリ Q 水で $10\ \text{分間}$ 洗浄後、Image Analyzer LAS-4000 (富士フイルム) でゲルを撮影し、バンドを確認した。その後、ゲルからバンドを切り取り、TE $50\ \mu\text{L}$ の入ったチューブに入れ、一晚凍結後、DNA を抽出・精製した。これを鋳型とし 357F/519R プライマーペアで PCR 増幅し、増幅産物について DNA 配列解析を行い、得られた配列で NCBI-BLAST 検索を行い、相同性の高い菌について属レベルで同定した。

結果および考察

木質バイオマス利用により生じる菌叢変化やバイオガス産生への可能性を知るために、スギ粉碎粉末 (JCP) あるいはセルロース粉末 (CP) をウシルーメン液へ添加し培養を行い、メタンガス産生とルーメン液内の菌叢変化を調べた。また、期間の後半では高グリセリン溶液を添加しその影響を検討した。

始めに反応系の全体の変化についてであるが、JCP 添加区および CP 添加区で、期間を通じ重量は約 $100\ \text{g}$ 程度減少した。21 日目以降に液体培地や高グリセリン溶液を新たに添加したこともあり、重量変化がより緩やかになる傾向となった。メタンガス

産生は培養 10 日目から認められ、JCP 添加区では最大で約 3.0%、CP 添加区では最大 5.0%程度であった (図 1)。CP 添加区では、新たに培地を添加することで一時的にメタンガス産生量は低下したが、その後上昇する傾向が見られ、メタン生成よりも生育の方に生合成経路が向かい一時的にメタン生成菌叢のバランスが崩れたものと推測された。本実験では JCP や CP が利用されたかどうかは判別しなかったが、実験後半に加えた培地や高グリセリン溶液はバイオガス産生に有効な菌叢を維持するための効果はあったものと類推している。

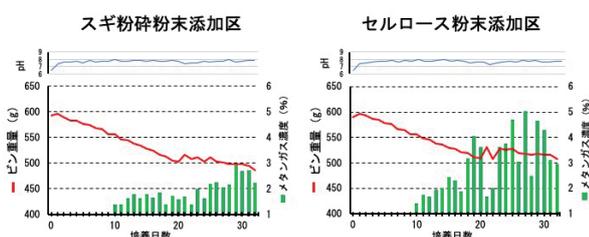


図1. 木質バイオマス添加ウシルーメン液の培養概要

真正細菌の菌叢解析結果を図 2 に示す。添加する木質バイオマス試料の違いによりバンドパターンが若干異なっており、菌の炭素源利用性の違いにより変化することが推測された。JCP 添加区では、培養前半に *Lysinibacillus* 属菌バンドが、また、5 日目から終盤まで 2 種の *Ureibacillus* 属菌バンドが確認された。*Lysinibacillus* 属菌では *L. manganase* でオキシダーゼ活性とカタラーゼ活性が (Liu ら, 2013), そして *Ureibacillus* 属菌では *U. thermosphaericus* によるリグノセルロース分解への関与やバイオエタノール生産への応用が報告されている (Okuda ら, 2008; 塩谷, 2010)。一方、CP 添加区では、5 日目頃まで *Lysinibacillus* 属バンドが確認されたが、*Ureibacillus* 属菌バンドは検出されなかった。これらの他に、*Bacillus* 属菌や *Virgibacillus* 属菌バンドが確認された。0 日目では確認されていない少数の菌種であり、炭素源により増減すると考えられた。

自然界では、カビやキノコの産生するペルオキシダーゼなどの酸化酵素とセルラーゼなどの糖質加水分解酵素などにより木質腐朽が進むが、今回のウシルーメン液では、*Lysinibacillus* 属菌や *Ureibacillus* 属菌が木質バイオマス飼料の消化に中心的な役割を担っているものと推察される。

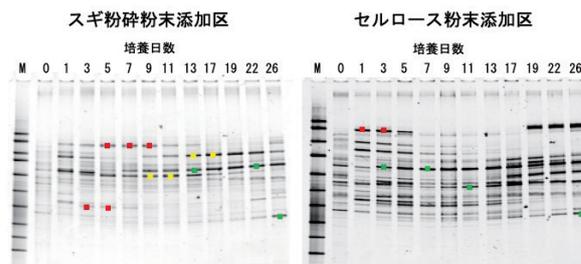


図2. 木質バイオマス添加ウシルーメン液の菌叢変化(真正細菌)

赤色点, *Lysinibacillus* 属菌; 黄色点, *Ureibacillus* 属菌; 緑色点, *Bacillus* / *Virgibacillus* 属菌; M, DGGEマーカーIII(ニッポンジーン)

メタン生成古細菌の菌叢解析結果を図 3 に示す。培養初期から JCP 添加区と CP 添加区の両方に、*Methanobrevibacter* 属菌と *Methanobacterium* 属菌のバンドが確認された。CP 添加区でのみ、培養 13 日目以降と 22 日目以降に新たな *Methanobrevibacter* 属菌のバンドが確認された。培養 21 日目以降に添加した液体培地の効果とみているが、JCP 添加区では見られなかったことから、バイオマス分解に由来するフェノール化合物などの影響も考えられた。

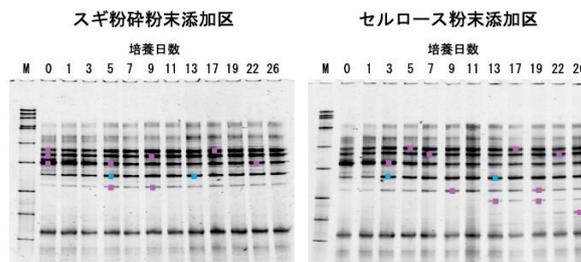


図3. 木質バイオマス添加ウシルーメン液の菌叢変化(メタン古細菌)

ピンク色点, *Methanobrevibacter* 属; 水色点, *Methanobacterium* 属; M, DGGEマーカーIII(ニッポンジーン)

Baba ら (2013) は、ウシルーメン液で前処理した古紙をメタン発酵槽へ投入し、セルロース系バイオマスからのメタン収率の向上を報告した。また、馬場ら (2015) は、ナタネ茎をルーメン液で処理しメタン発酵槽へ投入することで、発酵槽へのキシラナーゼの持込があること、そしてメタン発酵中のセルロース分解期間が短縮されることを示唆した。このように反芻動物のルーメン液は植物バイオマスの消化に寄与する微生物や酵素を含む良い材料であると考えられる。反芻動物は、ウシのような草を好むもの (glazer) とシカのように樹皮のようなものなどを好むもの (blazer) がおり、それぞれの食性に合わせ、ルーメン内菌叢は異なる。近代のウシ飼養体系ではデンプン質が多い傾向があるため、放牧など草食が多いウシや樹皮などを食するシカなどのルーメン液から、植物バイオマスを効率的に分解する菌株や酵

素遺伝子の取得の可能性があるのでないかと考えている。

本研究では、ウシルーメン液での木質バイオマス試料の利用性を検討するため、ウシルーメン液にスギ粉碎粉末あるいはセルロース粉末を添加し約1ヶ月間培養し、メタン生成と反応槽内の菌叢解析（真正細菌とメタン生成古細菌）を行った。木質バイオマス試料添加で3～5%程度のメタン産生を認めた。リグノセルロース分解に関与すると考えられる *Lysinibacillus* 属菌と *Ureibacillus* 属菌のバンドを新たに検出し、ルーメン内菌叢は添加したバイオマス試料に対応して変化することが推察された。

謝辞

本研究は、秋田県立大学学長プロジェクト研究費（創造的研究費）および平成27年度東北復興次世代エネルギー研究開発プロジェクトの支援を受け実施された。スギ粉碎粉末は秋田県立大学システム科学技術学部・准教授高橋武彦先生から分与いただいた。高グリセリン廃液は、秋田運送株式会社・鈴木秀雄様より分与いただいた。この場をかりて感謝の意を記します。

文献

- Morita, H., Kuwahara, T., Ohshima, K., Sasamoto, H., Itoh, K., Hattori, M., Hayashi, T., Takami, H. (2007). An Improved DNA isolation method for Metagenomic analysis of the microbial flora of the Human intestine. *Microbes and Environments*, 22, 214–222.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., Uitterlinden, AG. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695–700.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., Guan, L. L. (2010). Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3776–3786.
- Lane, L. J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (pp.115–175). (Ed.) Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. John Wiley & Sons Ltd. Chichester.
- Bano, N., Ruffin, S., Ransom, B., Hollibaugh, J. T. (2004) Phylogenetic composition of Arctic ocean Archaeal and comparison with Antarctic assemblages. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 781–780.
- 塩谷捨明 (2010). 「生物プロセスシステムの最適化に関する研究」『生物工学会誌』.88, 2-10.
- Okuda, N., Soneura, M., Ninomiya, K., Katakura, Y., Shioya, S. (2008). Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 128–133.
- Liu, H., Song, Y., Chen, F., Zheng, Wang, G. (2013). *Lysinibacillus manganicus* sp. nov., isolated from manganese mining soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3568–3573.
- Baba, Y., Tada, C., Fukuda, Y., Nakai, Y. (2013). Improvement of methane production from waste paper by pretreatment with rumen fluid. *Bioresource Technology*, 128, 94–99.
- 馬場保徳, 多田千佳, 福田康弘, 中井裕 (2014). 「ウシルーメン液を使用した前処理がメタン発酵のセルラーゼおよびキシラナーゼ活性に及ぼす効果」. 第25回廃棄物資源循環学会研究発表会, 公演原稿 2014, 275–276.
- 板橋久雄 (1998). 「ルーメンにおける消化」『反芻動物の栄養生理学』(佐々木康之監修, 小原嘉昭編). 農文協. pp. 87–112.
- Watanabe, T., Asakawa, S., Nakamura, A., Nagaoka, K., Kimura, M. (2004). DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiology Letters*, 232, 153–163.

〔 2019年6月30日受付
2019年7月9日受理 〕

Impact of wood biomass addition for bovine rumen fluid bacteria flora

Yoichiro Shimura, Satoko Takahashi, Satoko Sasaki, Tamio Inamoto

Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

Biogas production, which using a waste of livestock, food production, and so on, have been reevaluated as a renewable energy. It has been known that methane causes belch of bovine. We carried out methane fermentation with bovine rumen fluid adding Japan cedar powder (JCP) or a cellulose powder (CP) to better understand impact of wood biomass addition on methane production, and bacterial flora in methane fermentation using bovine lumen fluid. Fermentation with both JCP and CP detected methane ten days from day zero. Maximum methane concentrations were about 3% with JCP and 5% with CP. The bacterial flora analysis by of PCR-DGGE detected bands of *Lysinibacillus* sp. and *Ureibacillus* sp. in JCP and *Lysinibacillus* sp. in CP. These results suggested that these bacteria contributed to lignocellulose degradation. Bands of *Methanobrevibacter* sp. and *Methanobacterium* sp. were detected in both JCP and CP. While bacterial flora in rumen fluid would be impacted by additional nutrient materials should they be adopted, methane archaea would remain the same.

Keywords: Rumen fluid bacterial flora, wooden biomass, methane fermentation, PCR-DGGE

