

研究成果報告書

所属機関	職名	氏名
山梨大学 大学院 総合研究部	准教授	大槻 隆司

研究テーマ

廃棄雑草に特化した高効率メタン発酵微生物群の機能解析

研究報告

1. 研究の背景と目的

メタン発酵は、廃水処理などにおいて100年以上前から利用されてきた技術である。エネルギー変換効率が80%以上にも達する優秀なバイオマス変換技術であるが、汚泥や食品残渣、糞尿など、分解が容易なバイオマスに対しては適用例が多くあるものの、草本や木本はその難分解性が支障となり、単独原料でのメタン発酵処理は困難であるとされてきた。

日本国内では、全国の自治体で道路・公園・河川・山林などの維持目的で刈草が行われており、大量の草本バイオマス（本報告においては「雑草」と表記する）が排出される。雑草のみでの処理量統計は報告されていないが、排出された雑草の含まれる木竹類一般廃棄物処理量は全国で年間97,000トンに達し（環境省中央環境審議会第90回地球環境部会資料）、新エネルギー・産業技術総合開発機構による試算では雑草の代表格であるススキだけでも全国で年間200万トンが排出されているが、特に都市部におけるメタン化利用は進んでいない。平成25年度の環境省廃棄物処理技術情報一般廃棄物処理実態調査結果によると、東京都や大阪府では、全一般廃棄物を含めてメタン化施設利用はゼロとなっている。一般廃棄物として排出される雑草の焼却処理には1トンあたりおよそ1万円のコストを要している。雑草は、刈草作業により収集されるため他の廃棄物の混入が少ないこと、収集された廃棄雑草は、様々な植物体の混合物ではあるが、家庭残渣（いわゆる生ゴミ）に比べるとはるかに組成変動が少なく、発酵工程に供した場合は制御が行いやすい原料となることが利点としてあげられる。さらに、バイオマスを資源として活用しようとする場合、多くは広域のバイオマスを1箇所集積して処理しようとするため、輸送にかかる労力やエネルギー消費が問題となるが、刈草は市町村レベル、あるいはさらに小単位の自治会等のレベルで行われることも多く、これらを大規模集積することは現実的ではない。

これらの特性を考慮して、筆者は、雑草「のみ」を原料に高効率でメタンを回収できること、自治会程度の狭域地区ごとに設置して小規模でメタンを生産できる設備に適用できる（将来的にはこれらの設備をウェブ化することで相互エネルギー供給を可能とする）こと、特殊な知識や技能をもつ人材による管理をほとんど必要とすることなく、一般市民が雑草を投入するだけでメタンが生産される（簡易浄化槽程度の管理のイメージ）こと、という要求を満たすことのできるメタン発酵系を構築することを目標としている。この目標を達成するためには、雑草を資化してメタンを生産する微生物群の取得と、取得した微生物群の特性の把握が重要となる。雑草のみを原料としてメタン発酵を行う場合、従来より行われてきた一般的なメタン発酵と異なり、含まれる炭素源に対する窒素源比率が著しく低い（C/N比が高い）状態となるため、メタン発酵は困難であるとされてきた。ゆえに発酵微生物群やその特性に関する知見もほとんどない。

筆者は、雑草のみを原料として、メタンを生成することのできる微生物群の取得に取り組み、すでにいくつかのメタン発酵微生物群の取得に成功している。これらの微生物群は、窒素源比率が著しく低い状態（C/N比が200程度）でも雑草を資化してメタンを生成することが可能であり、従来より知られている一般的なメタン発酵とはメタン生成に至る機序が異なっている可能性がある。

本研究では、これらの微生物群を用いて、低窒素源状態で雑草からメタンを生成する微生物群の菌相構成ならびに各構成微生物の機能を明らかにすることを目的とした。

2. 研究成果および考察

2.1. 発酵中の菌相動態

メタン発酵は、容量175 mlのメジウム瓶に雑草としてギョウギシバ1 g、0.1 Mリン酸ナトリウムカリウム緩衝液(pH 7.2)95 mlを入れオートクレーブしたものを培地として、山梨県甲府市内の濁川(NR)、山梨大学構内貯水槽(RP)から採取した底泥ならびに当研究室で保有している剪定枝に馴化したメタン発酵微生物群(WB)を5 ml接種してブチルゴム栓をし、気相を3分間窒素置換したのち35°Cで90日間培養した。雑草のサイズはWBで10-50 mmの小片、NRとRPでは1 mm以下の粉末を用いた。気相中のメタンは経時的なサンプリングを行いガスクロマトグラフィーにより、発酵終了後の残存雑草成分分析は既法に従った^{1,2)}。菌相推移は16S rRNA遺伝子領域を標的としたPCR-DGGE法によりモニタリングした。

90日間で新たな培地に植え継ぐ継代を、WBでは12回、NRおよびRPでは4回行ったのちのメタン生産、pH変化、ならびにの真正細菌およびメタン生成古細菌の菌相推移を図1に示した。メタン生産量(及び総バイオガス中のメタン含有率)は雑草乾重量1 kgあたりWBで51 L(48%)、NRで207 L(79%)、RPで242 L(74%)であり、継代を繰り返しても安定的にメタン生産が可能な微生物群であった。PCR-DGGEによるモニタリングでは、雑草成分の分解から有機酸生成までを担う真正細菌相が比較的多様性に富んでおり、メタン生成古細菌相はそれぞれの微生物群で2-3種が優先種となっていると推察された。いずれの微生物群も、90日間を通じて菌相構成に大きな変動は見られず安定した微生物群であると考えられた。

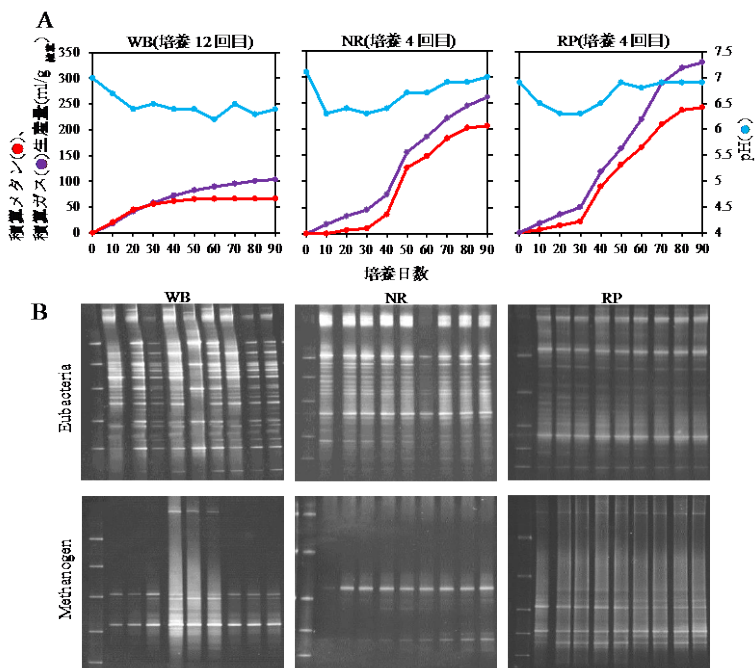


図1 各微生物群における総バイオガスとメタンの生産量ならびにpHの変化(A)、PCR-DGGEの泳動像(B)。泳動像は左よりDGGEマーカーと培養10日毎の増幅DNA。

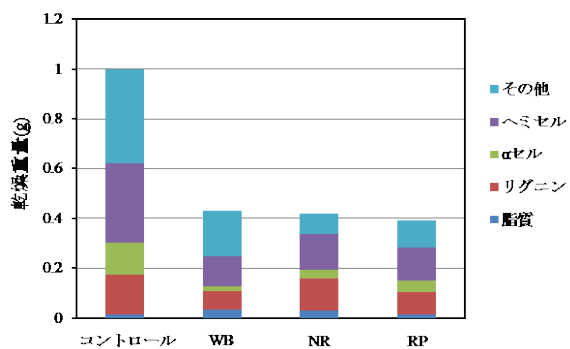


図2 メタン発酵前(コントロール)および各試験区の発酵後残渣の雑草成分の構成

90日間のメタン発酵後に回収した雑草残渣の成分分析結果を図2に示した。いずれの試験区においても固形成分の60%が減少した。構成成分毎にみると、 α -セルロースはWBで85%、NRで75%、RPで65%、ヘミセルロースはWBで63%、NRで54%、RPで58%が減少した。糖の供給源となるこれらの多糖の減少率ではWBが最も高い値を示したが、メタン生産量は最も低く、雑草分解率の高さが必ずしもメタン生産量の多さには結びつかないことが示された。いずれの試験区においても、セルロースで15-35%、ヘミセルロースの40%程度が資化されずに残っていることから、これら多糖の分解を妨げるリグニンをメタン発酵前に白色腐朽菌等で処理することであらかじめ分解しておくことにより、さらにメタン生産量の増大を図れる可能性があり、検討する必要がある。

2.2. 16S rRNA遺伝子配列を用いた微生物群構成種の解析

NRとRPにおいて優れたメタン生産性が得られたことから、両微生物群の構成微生物種について次世代シーケンサーMiSeqを用いたアンプリコン解析を行った。NRについては継代4回目の培養60日目と継代9回目の培養63日目、RPについては継代4回目の培養60日目と継代9回目の21, 63, 83日目にサンプリングした菌体より総DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子領域を標的としたユニバーサルプライマーPro341FとPro805R³⁾を用いてPCR増幅を行ったのち、MiSeq用のバーコード配列を付加するPCR反応を行ってシー

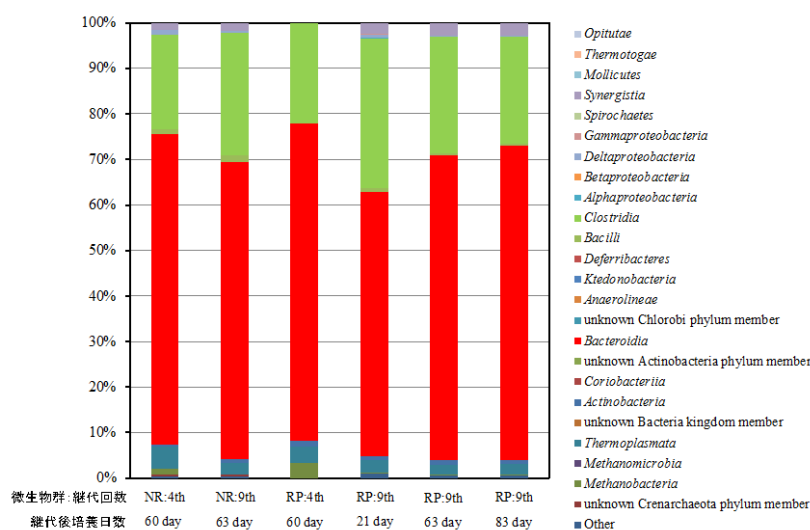


図3 MiSeq配列データを用いて算出した網分類構成比

*coccus*属4.5%、継代9回目は*Bacteroides*属6.0%、*Porphyromonadaceae*科59.1%、*Clostridium*属1.9%、*Methanobacterium*属0.006%、*Methanomassiliicoccus*属2.5%となった。RPでは継代4回目、継代9回目とも*Porphyromonadaceae*科が優勢を占め、42.5%–62.7%で変動した。継代4回目で18.3%を占めていた*Dysgonomonas*属は継代9回目では最大でも0.003%程度まで減少していた。メタン生成古細菌では継代4回目で*Methanomassiliicoccus*属3.5%、*Methanobacterium*属3.3%であったが継代9回目では*Methanomassiliicoccus*属2.0–2.8%に対して*Methanobacterium*属は0.2%と減少していた。

以上の結果より、本研究で取得した微生物群は、*Bacteroides*属、*Clostridium*属、*Porphyromonadaceae*科に分類される真正細菌が雑草構成成分の分解を行い有機酸、水素、二酸化炭素を生成し、それらの生成物のうち特に水素と二酸化炭素を用いて*Methanomassiliicoccus*属ならびに*Methanobacterium*属のメタン生成古細菌がメタンを生成している構成が主体となっている可能性が示された。

2.3. 超低窒素源状態でメタン発酵可能な原因の調査

本研究で用いた雑草の成分分析の結果、雑草乾重量1 g中のVS（揮発性固体分）は 0.905 ± 0.005 g、C/N比は 217 ± 101.6 であった。メタン発酵の培養において、炭素源・窒素源となりうるものは雑草以外に添加していないので、雑草1%含有の培地100 mlであれば培養系内には最大でも4 mg程度の窒素しか含まれないことになる。しかし、たとえばRPの培養において継代9回目、培養103日目に液相に含まれる窒素分（亜硝酸、硝酸、アンモニア態）を調べたところ、100 mlあたり計7.12 mgの窒素が検出された。このことから、培養系を嫌気化するために気相を置換している窒素ガスを固定している可能性が高いと考え、微生物の空中窒素固定能を調べる際に用いられるアセチレン還元法により窒素固定能の有無を調べた。

全容33 mlのガスクロバイアルに雑草粉末0.2 gと0.1 Mリン酸ナトリウムカリウム緩衝液(pH 7.2) 19 mlを入れオートクレーブ後、RPおよびNR継代微生物群の懸濁液1 mlを加え、気相を1分間窒素置換した。さらに、アセチレン0.09%を含む窒素の混合ガスを用いて気相を10秒間置換し、35 °Cにて21日間静置培養を行った。培養後は、陽圧分の気相を回収してガスクロマトグラフィーにより気相に含まれるエチレンを定量した。その結果、NRにおいては培養液1リットルあたり6.4 μmol 、RPにおいては培養液1リットルあたり5.0 μmol のエチレンが生成していることが明らかとなった。気相中に封入されたアセチレンがエチレンに還元されたことは培養液中にニトロゲナーゼの活性が存在することを示している。すなわち、本研究で樹立した微生物群は、気相中の窒素を固定して液相に窒素源を供給する能力を有していることが明らかになった。

培養の際に、気相を窒素でなくヘリウムで置換して嫌気化するとメタン生産量が激減することから、気相中より固定される窒素がメタン生成に及ぼす影響があることが示唆されるが、相当量の空中窒素を固定したとしても、従来知られているよりもはるかに高いC/N比の状態でもメタンが生産されているものと考えられ、本研究で樹立した微生物群が雑草のみを原料として高効率でメタンを生成しうる機構はメタン発酵の常識を覆す様々な仕組みを含んでいるものと予想される。今後は、微生物群を構成している各微生物種の単離と、単離株を組み合わせた再構成実験、あるいは構成微生物種や鍵となる酵素の活性の増減と代謝産物動態の詳細な分子生物学的解析を組み合わせた雑草分解からメタン生成に至るまでの経路の解明などを行い、効率的なメタン生産系の構築に貢献する成果を重ねたい。

ケンス反応に供した。解析の結果各試料において10万以上のリードが得られ、Operational taxonomic unit (OTU)の相同性より推定される網分類での構成比を示したものを図3に示した。両微生物群において、Bacteroidia綱とClostridia綱が非常に優勢であり、メタン生成に関わる古細菌が属するMethanobacteria綱とThermoplasmata綱が僅かに存在することが明らかになった。属分類でみると、NRの継代4回目は*Bacteroides*属13.5%、*Porphyromonadaceae*科54.6%、*Clostridium*属1.9%、*Methanobacterium*属1.2%、*Methanomassiliicoccus*属4.5%、継代9回目は*Bacteroides*属6.0%、*Porphyromonadaceae*科59.1%、*Clostridium*属1.9%、*Methanobacterium*属0.006%、*Methanomassiliicoccus*属2.5%となった。RPでは継代4回目、継代9回目とも*Porphyromonadaceae*科が優勢を占め、42.5%–62.7%で変動した。継代4回目で18.3%を占めていた*Dysgonomonas*属は継代9回目では最大でも0.003%程度まで減少していた。メタン生成古細菌では継代4回目で*Methanomassiliicoccus*属3.5%、*Methanobacterium*属3.3%であったが継代9回目では*Methanomassiliicoccus*属2.0–2.8%に対して*Methanobacterium*属は0.2%と減少していた。

3. 文献

- 1) Yokoyama T *et al.* (2002) J Agric Food Chem 50: 1040-1044.
- 2) Browning BL (1967) Methods of Wood Chemistry, Vol.2, Wiley-Interscience, pp.589-590.
- 3) Takahashi S *et al.* (2014) PLoSONE 9: e105592.

4. 将来展望

本研究により、雑草のみを唯一の原料として、投入原料1キログラムあたり240リットルのメタンを生産するという前代未聞の性能を有する微生物群を獲得することに成功した。この値は実験室における小スケール実験での値であり、メタン発酵実機に適用するにあたっては、スケールアップすることで収率は低下するのが常であるが、半分に低下したとしても原料キログラムあたり120リットルのメタンを生産する非常に優れたシステムを構築することが可能である。

冒頭にも記したとおり、筆者は雑草「のみ」を原料に、狭域地区ごとに設置して小規模でメタンを生産できる設備に適用でき、一般市民が雑草を投入するだけでメタンが生産される発酵系を構築することを目標としている。小規模発酵設備では原料となる雑草の量や季節変動など課題も多いが、今後も、本研究で樹立した微生物群のメタン生成機序をひとつずつ解き明かし、簡便な制御方法を確立することで、雑草を含むリグノセルロースの高効率エネルギー変換に貢献していきたい。

5. 研究発表

5.1. 査読付論文発表

- 1) Matsuda S, Ohtsuki T (2016) Establishment and analysis of microbial communities capable of producing methane from grass waste at extremely high C/N ratio. *International Journal of New Technology and Research* 2: 81-86.

5.2. 学会発表

- 1) 松田修平、大槻隆司：雑草を原料とした高C/N比メタン発酵における微生物群構成種の単離：平成28年度日本生物工学会大会：富山国際会議場（2016年9月30日）