

嫌気性ルーメンツボカビ菌 *Piromyces* sp. P1 による セルロース分解とメタン菌の存在

桂 栄¹⁾・十倉充範²⁾・宮崎孔志²⁾・牛田一成²⁾・小島洋一²⁾

Rong Gui, Mitsunori Tokura, Kohji Miyazaki, Kazunari Ushida and Yoichi Kojima

Cellulose digestion by a ruminal anaerobic fungus, *Piromyces* sp. P1, with or without methanogen

要旨：メタン菌存否の環境下で *Piromyces* sp. P1 を培養しセルロース分解率を測定した。その結果、セルロース分解率はメタン菌非存在下では 44.3%であったが、メタン菌の存在によって分解率は 65.5%に増大した。これは水素生成がメタン菌の存在によってスムーズに行われたためと考えられた。そこで、*Piromyces* sp. P1 の水素生成を阻害するために、水素あるいは一酸化炭素（ヒドロゲナーゼ阻害剤）を添加し分解率を調べた。気相中 50%の水素を添加したところ、分解率は 34.5%に低下した。一酸化炭素の添加による阻害はさらに著しく 16.6%まで低下した。これらの結果から、メタン菌が水素を消費し水素分圧を低下させることが、*Piromyces* sp. P1 のセルロース分解を促進する要因であると思われた。

緒 言

近年ルーメン中の嫌気性ツボカビ菌の存在が明らかにされ、繊維分解に重要な貢献をしていることが指摘されるようになった¹⁾。嫌気下での繊維分解を促進するためには、解糖系で生じた電子をスムーズに処理することが要求される。ツボカビ菌の電子処理は水素生成反応に大きく依存しているが、この反応は熱力学的に不利であるため水素分圧が低く保たれないと進行しにくい²⁾。そこで、水素をメタンに転換するメタン菌をツボカビ菌とともに共培養した場合には水素分圧が低く保たれ、ツボカビ菌による繊維分解が促進される可能性が考えられた。本研究

では、1) メタン菌との共培養によりセルロース分解がどの程度促進されるか、2) 水素生成による電子処理を阻害した場合、セルロースの分解がどの程度抑制されるのか検討することにした。

材料および方法

実験には Bauchop & Mountfort の方法³⁾ に準じてストレプトマイシンとペニシリンによってめん羊のルーメンから選択し単離したツボカビ菌のうちメタン菌による汚染が認められた *Piromyces* sp. P1 を用いた。この菌株からメタン菌を除去するためにアンピシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシンを含む抗生物質液を加えた。混合系では培

1) 中国農業科学院草原研究所

China Agriculture Academy of Plain Institute, China

(平成 5 年 4 月～6 月 京都府立大学農学部研修生、本実験は研修期間中に行ったものである)

2) 京都府立大学農学部畜産学研究室

Laboratory of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, 606 Kyoto, Japan

平成 7 年 8 月 11 日受理

養液と *Piromyces* sp. P1 菌糸体を蛍光顕微鏡下で観察し、さらにグラム染色標本をすることで付着細菌の単独性を確認した。*Piromyces* sp. P1 の単離と維持には Joblin の培地⁴⁾を用いた。前培養および測定のために、M10⁵⁾を改変した培地を用いた。M10 の培地には基質としてセロビオースと結晶性セルロース (アピセル S F, 旭化成) をそれぞれ 0.1% になるように加えたものを用いた。メタン菌の混在する *Piromyces* sp. P1 を維持用培地で 4 日ごとに新しい培地に移植した。M10 培地で前培養した後、培養 4 日後の *Piromyces* sp. P1 を接種し (5% inoculum), 実験を行った。このとき *Piromyces* sp. P1 の単独培養系を作出するためにアンピシリン, クロラムフェニコール, ストレプトマイシンからなる抗生物質液を加えた。メタン菌との共存系は単離時と同じストレプトマイシンとペニシリンからなる抗生物質液を加えた。

水素生成を阻害する実験では、ヒドロゲナーゼ阻害剤である一酸化炭素と水素分圧を高めるために水素を気相の 50% となるようにシリンジを用いて添

加した⁶⁾。なお培養は 120ml 血清ビンを用い、39°C で 7 日間静置状態で行った。培養終了後、生成されたガスの成分分析をガスクロマトグラフを用いて行った⁷⁾。培養液を中性デタージェント法で抽出し、残さを 80°C で乾燥し残存セルロース量とした。

結果および考察

単独培養区, メタン菌との共培養区でのガス生成量を図 1 に示した。共培養区では単独培養区よりも総ガス生成量が有意に増加しており, 発酵が盛んに行われたことがうかがえる。また, 共培養区では水素の蓄積がほとんど認められず (0.73ml/l medium), 水素分圧が低く保たれていたことが示された。

単独培養区, メタン菌との共培養区, 水素添加区および一酸化炭素添加区でのセルロース分解率を図 2 に示した。共培養区のセルロース分解率は 65.5% であり, 単独培養区の 44.3% を顕著に上まわった。同様の結果は他のツボカビ菌 (*Neocalimastix* sp. N1) でも認められている⁸⁾。共培養区

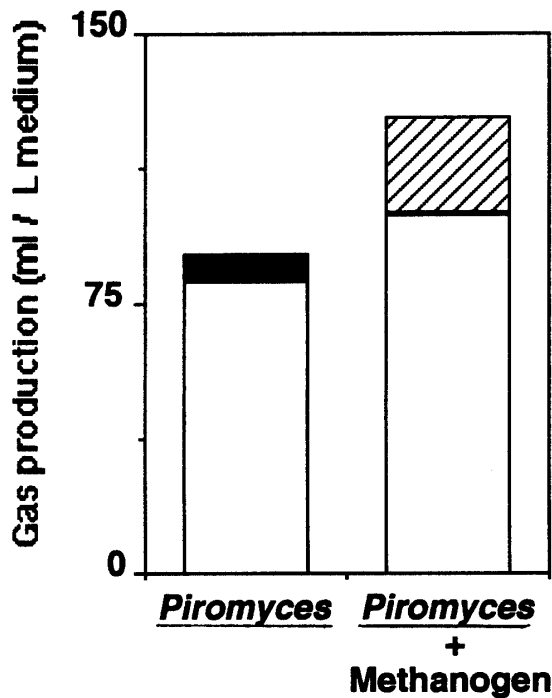


Fig. 1. Gas production by *Piromyces* sp. P1 with or without methanogen

□ : CO₂, ■ : H₂, ▨ : CH₄

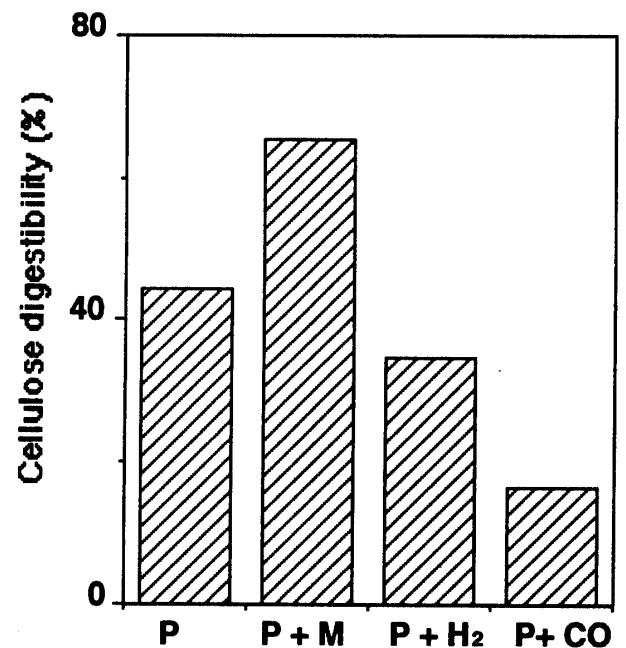


Fig. 2. Effects of methanogen existence and hydrogen or carbon monoxide addition on cellulose digestion by *Piromyces* sp. P1

P : Pure culture of *Piromyces*

P+M : Coculture of *Piromyces* with methanogen

P+H₂ : Pure culture of *Piromyces* under H₂ addition

P+CO : Pure culture of *Piromyces* under CO addition

では水素がほとんど検出されず (図1), またセルロース分解酵素はメタン菌には存在しないので, 水素分圧の低下が *Piromyces* sp. P1 によるセルロース分解を促進したと考えられる。そこで水素分圧の影響を調べるために, 予め水素分圧を高めた水素添加区を設定しセルロース分解率を測定した (図2)。その結果, 水素添加区の分解率は34.5%になり, 単独培養区の44.3%と比較し有意に低下した。

セルロースの分解が水素分圧の影響を受けるのは, 水素分圧が高いと水素生成反応が生じにくくなり, 細胞内に蓄積した電子をスムーズに処理出来なくなるためと考えられる。つまり, 水素生成反応がスムーズに行われるか否かがセルロースの分解に影響を与えていると考えられた。そこで, 一酸化炭素 (ヒドロゲナーゼ阻害剤) によって水素生成を阻害した場合のセルロース分解率を測定した (図2)。水素生成が一酸化炭素によってほぼ完全に阻害されていることが確かめられたので (0.50ml/ℓ medium), その際のセルロース分解率を調べたところ, 16.6%と著しい低下が認められた。このことから, 水素生成反応がセルロース分解に大きな影響を与えていることが示された。一酸化炭素によって水素生成の阻害とセルロース分解率の著しい低下が認められたが (図1, 2), わずかながら増殖できたことから, 水素生成が主要な電子処理手段ではあるものの水素以外の電子処理生成物が存在していたと考えられる。本株は電子処理物質として乳酸やエタノールを生成するため, これらの物質の生成割合が増加していたのかもしれない。水素生成のしやすさによって発酵パターンが変動することは, 種々の細菌において認められている。例えば, *Ruminococcus flavefaciens* を単独で培養するとエタノールを生成するが, メタン菌と共培養するとエタノールは生成されないことが知られている⁹⁾。逆に水素生成を阻害した場合でも *Megasphaera elsdenii* では発酵パターンの変動が認められた¹⁰⁾。

以上の結果から *Piromyces* sp. P1 によるセルロースの分解は水素分圧の影響を大きく受け, メタン菌との共存はセルロースの分解を促進することが示された。これは水素生成反応によって細胞内に蓄積した電子をスムーズに処理できるためと推察された。

引用文献

- 1) Fonty, G. and K. N. Joblin, in "Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants" (T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima, eds.), 656-680. Academic Press, San Diego. 1991.
- 2) Wolin, M. J., in "Digestion and Metabolism in The Ruminant" (McDonald, I. W. and A. C. I. Warner, eds.), 135-148. Univ. of New England Pub. Unit. Armidale. 1975
- 3) Bauchop, T. and D. O. Mountfort, Appl. Environ. Microbiol., 42:1103-1110. 1981.
- 4) Joblin, K. N., Appl. Environ. Microbiol., 42: 1119-1122. 1981.
- 5) Caldwell, D. R. and M. P. Bryant, Appl. Environ. Microbiol., 14: 794-801. 1966.
- 6) Hino, T., K. Miyazaki and S. Kuroda. J. Gen. Appl. Microbiol., 37: 121-129. 1991.
- 7) Ushida, K., A. Miyazaki and R. Kawashima. Jpn. J. Zootech. Sci., 53: 412-416. 1982.
- 8) Tanaka, H., K. Ushida and Y. Kojima. Jpn. J. Zootech. Sci., 63: 917-923.
- 9) Latham, M. J. and M. J. Wolin, Appl. Environ. Microbiol., 34: 297-301. 1977.
- 10) Miyazaki, K., T. Hino and H. Itabashi. Jpn. J. Zootech. Sci., 62: 1000-1005. 1991.

Summary

Cellulose digestion by *Piromyces* sp. P1, a ruminal anaerobic fungus, was determined under the existence of methanogen. The digestibility without methanogen was 44.3%, but the existence of methanogen improved the digestibility to 65.5%. This may be caused by the ease of hydrogen production under the existence of methanogen. Hydrogen and carbon monoxide were added to inhibit hydrogen production by *Piromyces* sp. P1. Addition of 50% hydrogen depressed the digestibility to 34.5%, and that of carbon monoxide much more depressed it to 16.6%. These results suggest that the reduction of hydrogen partial pressure by methanogen may improve the cellulose digestion by *Piromyces* sp. P1.