

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2021-193884
(P2021-193884A)

(43) 公開日 令和3年12月27日(2021. 12. 27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 1/00 (2006.01)	C12N 1/00 S	4B064
C12N 1/20 (2006.01)	C12N 1/20 ZNAD	4B065
C12P 5/02 (2006.01)	C12N 1/20 ZABA	4D059
C12N 1/14 (2006.01)	C12P 5/02	
CO2F 11/04 (2006.01)	C12N 1/14 A	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-100457 (P2020-100457)
(22) 出願日 令和2年6月9日 (2020.6.9)

(71) 出願人 501241645
学校法人 工学院大学
東京都新宿区西新宿 1 丁目 2 4 番 2 号
(74) 代理人 110001519
特許業務法人太陽国際特許事務所
(72) 発明者 藤井 克彦
東京都新宿区西新宿 1 丁目 2 4 番 2 号 学
校法人工学院大学内
Fターム(参考) 4B064 AB03 CA02 CA05 CA09 CD30
DA16
4B065 AA01X AA23X AA41X AA58X AA86X
AA99X AC14 BA22 CA03 CA54
CA55
4D059 AA23 BA12 BA22 BA25

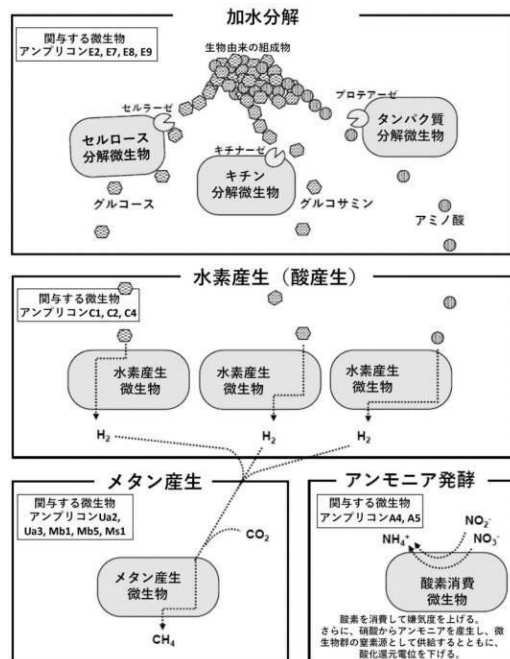
(54) 【発明の名称】 微生物混合物、メタン産生用組成物、及びメタン産生方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 複数種類の特定の微生物を常温で共培養することによって、生物由来の組成物からのメタン産生が可能となる微生物混合物を提供する。

【解決手段】 Enterobacteriaceae科に属する微生物、 Ps eudomonadaceae科に属する微生物、 及びClostridiaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの微生物と、 Methanobacteriaceae科に属する微生物 及びMethanosarcinaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの微生物と、 Aspergillaceae科に属する微生物及びArthopyreniaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの微生物と、 を含む、微生物混合物。

【選択図】 図 6



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Enterobacteriaceae科に属する微生物、Pseudomonadaceae科に属する微生物、及びClostridiaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物と、

Methanobacteriaceae科に属する微生物及びMethanosarcinaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物と、

Aspergillaceae科に属する微生物及びArthopyreniaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物と、を含む、微生物混合物。

【請求項 2】

さらに、

配列番号1で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物と、

配列番号2で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物と、

配列番号3で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物と、

からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物を含む、請求項1に記載の微生物混合物。

【請求項 3】

セルロース、キチン、及びタンパク質のうちの少なくとも1種を分解する少なくとも1種の微生物と、

少なくとも1種の水素産生微生物と、

少なくとも1種のメタン産生微生物と、

少なくとも1種の酸素消費微生物と、を含む、微生物混合物。

【請求項 4】

基質としての生物由来の組成物1gの存在下において常温条件下で1ヶ月培養することで、10ml以上のメタンを産生することができる、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の微生物混合物。

【請求項 5】

請求項1～請求項4のいずれか1項に記載の微生物混合物を含み、生物由来の組成物からメタンを産生できる、メタン産生用組成物。

【請求項 6】

生物由来の組成物を含む溶液に、請求項1～請求項4のいずれか1項に記載の微生物混合物を接種することと、

前記接種された微生物混合物を常温条件下で培養することと、を含む、メタン産生方法。

【請求項 7】

前記生物由来の組成物が、消化汚泥である、請求項6に記載のメタン産生方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、微生物混合物、メタン産生用組成物、及びメタン産生方法に関する。

【背景技術】

【0002】

家庭及び産業由来の下水を処理するためには、一般的に活性汚泥法が用いられている。活性汚泥法は、下水に好気性微生物を加えてエアレーションを行うことで、下水に含まれる溶解性物質及び残存浮遊性物質を分解する方法である。この分解の過程において、好気性微生物は、下水中の有機物、窒素、又はリン等の栄養分を利用しながら顕著に増殖する。しかし、下水中の浮遊物質（つまり、好気性微生物）の濃度を一定範囲内にコントロールした方が前記分解の効率が良いことから、増殖しすぎた好気性微生物を、余剰汚泥とし

10

20

30

40

50

て系外に排出する必要がある。

下水処理場は年間を通して昼夜なく稼働しており、つまり、余剰汚泥は全国で常時発生している。そのため、余剰汚泥の処分場確保及び処分費用の増大が問題となっている。一部の下水処理場では、余剰汚泥を有効利用する方法として、メタンを産生する微生物による嫌気消化法（いわゆる、メタン発酵）を用いて、余剰汚泥から60%程度のメタンを含むバイオガスを産生させ、さらに余剰汚泥の減容を行っている。しかし、それでも余剰汚泥の減容率は30%程度であり、残りの約70%の余剰汚泥は、これ以上の再利用が難しい「消化汚泥」として残存する。この消化汚泥は、日本国における産業廃棄物の約4割を占める現状にある。

【0003】

例えば、非特許文献1には、30の好気条件下で消化汚泥を加水分解できる糸状菌が開示されている。Umbelopsis属、Penicillium属、Cunninghamella属、Neosartorya属、Fusarium属、又はChaetomium属の糸状菌が、キシラナーゼ、キチナーゼ、又はケラチナーゼ活性を有することが記載されている。

【0004】

非特許文献2には、50の密閉条件下でのメタン産生菌によるメタン発酵の際に、Penicillium属、Cunninghamella属、Neosartorya属、又はFusarium属等の菌から得たヒドロラーゼを添加することが記載されている。

【0005】

特許文献1には、30の好気条件下で消化汚泥を加水分解できる糸状菌が開示されている。Penicillium属、Cunninghamella属、Neosartorya属、又はUmbelopsis属の糸状菌が、キシラナーゼ、キチナーゼ、又はケラチナーゼ活性を有することが記載されている。さらには、消化汚泥に前記糸状菌を接種し培養することで、30の好気条件下で、消化汚泥の固形物重量が10%程度減少したことが記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2014-158433号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Fujii, K. et al (2013) Journal of Applied Microbiology 115, 718-726

【非特許文献2】Sato, H. et al (2016) New Biotechnology 33, 1-6

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、非特許文献1及び特許文献1に記載の糸状菌は、好気条件下で生物由来の組成物の一例である消化汚泥を加水分解できるが、加水分解された消化汚泥からさらにメタンを得たい場合、メタン産生菌は嫌気性微生物であるため、開示された糸状菌とメタン産生菌を共培養することはできない。さらに、非特許文献2も、糸状菌とメタン産生菌との共培養について記載しておらず、また、非特許文献2においては、基質とする消化汚泥を予め酸処理する必要があるため、かつ、培養槽を50で加温し続けるコストが発生する。よって、上記特許文献1、非特許文献1、及び非特許文献2のいずれにおいても、分解性微生物とメタン産生微生物とを含む複数種類の微生物を常温で共培養することによって、生物由来の組成物からのメタン産生が可能となる微生物混合物は記載されていない。

【0009】

本開示は、上記に鑑みなされたものであり、本開示は、複数種類の特定の微生物を常温で共培養することによって、生物由来の組成物からのメタン産生が可能となる微生物混合物を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

課題を解決するための具体的手段には、以下の態様が含まれる。

< 1 > Enterobacteriaceae科に属する微生物、Pseudomonadaceae科に属する微生物、及びClostridiaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物と、Methanobacteriaceae科に属する微生物及びMethanosarcinaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物と、

Aspergillaceae科に属する微生物及びArthopyreniaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物と、を含む、微生物混合物。

< 2 > さらに、

配列番号1で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物と、

配列番号2で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物と、

配列番号3で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物と、

からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物を含む、上記< 1 >に記載の微生物混合物。

< 3 > セルロース、キチン、及びタンパク質のうちの少なくとも1種を分解する少なくとも1種の微生物と、

少なくとも1種の水素産生微生物と、

少なくとも1種のメタン産生微生物と、

少なくとも1種の酸素消費微生物と、を含む、微生物混合物。

< 4 > 基質としての生物由来の組成物1gの存在下において常温条件下で1ヶ月培養することで、10ml以上のメタンを産生することができる、上記< 1 > ~ < 3 >のいずれか1つに記載の微生物混合物。

< 5 > 上記< 1 > ~ < 4 >のいずれか1つに記載の微生物混合物を含み、生物由来の組成物からメタンを産生できる、メタン産生用組成物。

< 6 > 生物由来の組成物を含む溶液に、上記< 1 > ~ < 4 >のいずれか1つに記載の微生物混合物を接種することと、

前記接種された微生物混合物を常温条件下で培養することと、を含む、メタン産生方法。

< 7 > 前記生物由来の組成物が、消化汚泥である、前記< 6 >に記載のメタン産生方法。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 1 】

本開示によれば、複数種類の特定の微生物を常温で共培養することによって、生物由来の組成物からのメタン産生が可能となる微生物混合物を提供することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 2 】

【 図 1 】 微生物混合物を継代培養したときの、温度依存的なメタン産生量の結果を示すグラフである。

【 図 2 】 微生物混合物由来のアンプリコンを、PCR-DGGE法で泳動した結果を示す、染色後のゲルの写真である。

【 図 3 】 真正細菌由来のアンプリコンの属種を推定して描いた系統樹である。図中の四角枠内は、実施例1で得られたアンプリコンを示す。図中のスケールバーの長さは、塩基の置換割合が1ヌクレオチドあたり0.05塩基であることを示す。

【 図 4 】 古細菌由来のアンプリコンの属種を推定して描いた系統樹である。図中の四角枠内は、実施例1で得られたアンプリコンを示す。図中のスケールバーの長さは、塩基の置換割合が1ヌクレオチドあたり0.05塩基であることを示す。

【 図 5 】 菌類又は原生生物由来のアンプリコンの属種を推定して描いた系統樹である。図

10

20

30

40

50

中の四角枠内は、実施例 1 で得られたアンブリコンを示す。図中のスケールバーの長さは、塩基の置換割合が 1 ヌクレオチドあたり 0 . 0 5 塩基であることを示す。

【図 6】微生物混合物による、生物由来の組成物の加水分解、水素産生、アンモニア産生、及びメタン産生の関係推定図である。

【図 7】微生物混合物が有する、セルラーゼ、キチナーゼ、及びプロテアーゼ活性の測定結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本開示に係る実施形態について詳細に説明する。但し、本開示は以下の実施形態に限定されるものではない。以下の開示において、その構成要素（要素ステップ等も含む）は、特に明示した場合を除き、必須ではない。数値及びその範囲についても同様であり、本開示を制限するものではない。

本開示において「工程」との語には、他の工程から独立した工程に加え、他の工程と明確に区別できない場合であってもその工程の目的が達成されれば、当該工程も含まれる。

本開示において「～」を用いて示された数値範囲には、「～」の前後に記載される数値がそれぞれ最小値及び最大値として含まれる。

本開示中に段階的に記載されている数値範囲において、一つの数値範囲で記載された上限値又は下限値は、他の段階的な記載の数値範囲の上限値又は下限値に置き換えてもよい。また、本文中に記載されている数値範囲において、その数値範囲の上限値又は下限値は、実施例に示されている値に置き換えてもよい。

本開示において組成物中の各成分の含有率は、組成物中に各成分に該当する物質が複数存在する場合、特に断らない限り、組成物中に存在する当該複数種の物質の合計の含有率を意味する。

【0014】

微生物混合物

本開示において、微生物混合物は、2種類以上の微生物の混合物であることが好ましく、例えば、3種類～10種類、11種類～20種類、又は、それ以上の種類数の微生物の混合物であってもよい。本開示の微生物混合物における、各微生物の存在比率は、特に限定されない。

【0015】

< 微生物混合物に含まれる微生物 >

（第一の実施形態）

本開示の第一の実施形態に係る微生物混合物は、Enterobacteriaceae科に属する微生物、Pseudomonadaceae科に属する微生物、及びClostridiaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物と、Methanobacteriaceae科に属する微生物及びMethanosarcinaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物と、Aspergillaceae科に属する微生物及びArthopyreniaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物と、を含む。

【0016】

Enterobacteriaceae科に属する微生物、Pseudomonadaceae科に属する微生物、及びClostridiaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物と、Methanobacteriaceae科に属する微生物及びMethanosarcinaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物と、Aspergillaceae科に属する微生物及びArthopyreniaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物と、を含む、微生物混合物は、常温で培養する（微生物混合物に含まれる微生物を共培養する）ことによって、生物由来の組成物からのメタン産生が可能となる。

【0017】

本開示の第一の実施形態に係る微生物混合物の作用は明確でないが、以下のように推定される。

本開示の第一の実施形態に係る微生物混合物のうち、Enterobacteriaceae科に属する微

10

20

30

40

50

生物、Pseudomonadaceae科に属する微生物、及びClostridiaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物は、常温条件下で、生物由来の組成物中のセルロースのグルコースへの分解、キチンのグルコサミンへの分解、及びタンパク質のアミノ酸への分解のうち少なくとも1つを行い、また、前記群より選ばれる少なくとも1つの微生物は、常温条件下で、前記分解されたグルコース、グルコサミン、又はアミノ酸を取り込み、水素を産生する。

本開示の第一の実施形態に係る微生物混合物のうち、Methanobacteriaceae科に属する微生物及びMethanosarcinaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物は、常温条件下で、前記産生された水素と、二酸化炭素とを取り込み、メタンを産生する。

本開示の第一の実施形態に係る微生物混合物のうち、Aspergillaceae科に属する微生物及びArthopyreniaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物は、常温条件下で、酸素を取り込み、増殖することができる。つまり、前記Aspergillaceae科に属する微生物及びArthopyreniaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物は、増殖の過程で酸素を消費するため、培養槽内の嫌気性を上げることができる。このため、嫌気性微生物である前記Methanobacteriaceae科に属する微生物及びMethanosarcinaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物は、培養槽内においてより効率よくメタンを産生することができる。

以上のことから、生物由来の組成物を基質としてメタンを産生する場合に、共培養によって少ない工程数で、常温でも、効率よくメタンを得ることができる。生物由来の組成物がキチン又はセルロース等の難分解性の物質を含む場合、例えば消化汚泥である場合に、このような効果はより顕著であり、これまで基質にすることが難しかった難分解性の組成物であっても基質に用いてメタン産生を行うことができる。

さらには、前記Aspergillaceae科に属する微生物及びArthopyreniaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物は、常温条件下で、生物由来の組成物中の硝酸からアンモニアを産生することができる。前記アンモニアは、微生物混合物の窒素源となり、微生物混合物に含まれる微生物が、より効率よく機能を発揮することができる。

なお、本開示は上記推定作用には何ら制限されない。

【0018】

本開示において、Enterobacteriaceae科に属する微生物の例としては、Cronobacter属に属する微生物、Citrobacter属に属する微生物、Enterobacter属に属する微生物、Escherichia属に属する微生物、Lelliottia属に属する微生物が挙げられるが、これらに限定されない。Cronobacter属に属する微生物の例としては、Cronobacter sakazakii等が挙げられる。Citrobacter属に属する微生物の例としては、Citrobacter freundii等が挙げられる。Enterobacter属に属する微生物の例としては、Enterobacter asburiae又はEnterobacter tabaci等が挙げられる。Escherichia属に属する微生物の例としては、Escherichia coli等が挙げられる。Lelliottia属に属する微生物の例としては、Lelliottia amnigena等が挙げられる。

本開示において、Enterobacteriaceae科に属する微生物は、配列番号4、配列番号5、配列番号6、又は配列番号7で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることが好ましく、98%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることがより好ましく、100%の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることがさらに好ましい。本開示において、配列同一性は、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, National Center for Biotechnology Information (NCBI)) をデフォルトパラメータで用いることで求めることができる。

【0019】

なお本開示において、例えば、配列番号Nで示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列(又は、18S rRNA遺伝子配列)を有する微生物

物とは、微生物が有する16S rRNA遺伝子配列（又は、18S rRNA遺伝子配列）の全長のうち、連続する一部分の配列が、配列番号Nで示されるDNA塩基配列の全長に対して95%以上の配列同一性を有する微生物をいう。

【0020】

本開示において、Pseudomonadaceae科に属する微生物の例としては、Pseudomonas属に属する微生物が挙げられるが、これらに限定されない。Pseudomonas属に属する微生物の例としては、Pseudomonas matsuisoli等が挙げられる。

本開示において、Pseudomonadaceae科に属する微生物は、配列番号8又は配列番号9で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることが好ましく、98%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることがより好ましく、100%の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることがさらに好ましい。

10

【0021】

本開示において、Clostridiaceae科に属する微生物の例としては、Clostridium属に属する微生物、Fonticella属に属する微生物、又はLutispora属に属する微生物が挙げられるが、これらに限定されない。Clostridium属に属する微生物の例としては、Clostridium amylolyticum又はClostridium punense等が挙げられる。Fonticella属に属する微生物の例としては、Fonticella tunisiensis等が挙げられる。Lutispora属に属する微生物の例としては、Lutispora thermophila等が挙げられる。

本開示において、Clostridiaceae科に属する微生物は、配列番号10、配列番号11、又は配列番号12で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることが好ましく、98%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることがより好ましく、100%の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることがさらに好ましい。

20

【0022】

本開示において、Methanobacteriaceae科に属する微生物の例としては、Methanobacterium属に属する微生物が挙げられるが、これらに限定されない。Methanobacterium属に属する微生物の例としては、Methanobacterium espanolae、Methanobacterium subterraneum、又はMethanobacterium flexile等が挙げられる。

本開示において、Methanobacteriaceae科に属する微生物は、配列番号13又は配列番号14で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることが好ましく、98%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることがより好ましく、100%の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることがさらに好ましい。

30

【0023】

本開示において、Methanosarcinaceae科に属する微生物の例としては、Methanosarcina属に属する微生物等が挙げられるが、これらに限定されない。Methanosarcina属に属する微生物の例としては、Methanosarcina spelaei、Methanosarcina horonobensis、Methanosarcina acetivorans等が挙げられる。

本開示において、Methanosarcinaceae科に属する微生物は、配列番号15で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることが好ましく、98%以上の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることがより好ましく、100%の配列同一性を有する16S rRNA遺伝子配列を有する微生物であることがさらに好ましい。

40

【0024】

本開示において、Aspergillaceae科に属する微生物の例としては、Aspergillus属に属する微生物、Penicillium属に属する微生物、又はMonascus属に属する微生物が挙げられるが、これらに限定されない。Aspergillus属に属する微生物の例としては、Aspergillus penicillioides等が挙げられる。Penicillium属に属する微生物の例としては、Penicillium expansum等が挙げられる。Monascus属に属する微生物の例としては、Monascus purpu

50

reus等が挙げられる。

本開示において、Aspergillaceae科に属する微生物は、配列番号16又は配列番号17で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する18SrRNA遺伝子配列を有する微生物であることが好ましく、98%以上の配列同一性を有する18SrRNA遺伝子配列を有する微生物であることがより好ましく、100%の配列同一性を有する18SrRNA遺伝子配列を有する微生物であることがさらに好ましい。

【0025】

本開示において、Arthopyreniaceae科に属する微生物の例としては、Arthopyrenia属に属する微生物が挙げられるが、これらに限定されない。Arthopyrenia属に属する微生物の例としては、Arthopyrenia salicis等が挙げられる。

10

本開示において、Arthopyreniaceae科に属する微生物は、配列番号18又は配列番号19で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する18SrRNA遺伝子配列を有する微生物であることが好ましく、98%以上の配列同一性を有する18SrRNA遺伝子配列を有する微生物であることがより好ましく、100%の配列同一性を有する18SrRNA遺伝子配列を有する微生物であることがさらに好ましい。

【0026】

本開示において、Enterobacteriaceae科に属する微生物、Pseudomonadaceae科に属する微生物、及びClostridiaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物は、例えば、上記のうちいずれか1つの科に属する1種の微生物であってもよく、上記のうちいずれか1つの科に属し、互いに同じ属に属しても異なる属に属してもよい複数種の微生物であってもよく、上記のうち複数の科について科ごとに1種ずつの微生物からなる複数種の微生物であってもよく、上記のうち複数の科について科ごとに複数種の微生物(同一属に属しても異なる属に属してもよい)からなる複数種の微生物であってもよい。

20

本開示において、Enterobacteriaceae科に属する微生物、Pseudomonadaceae科に属する微生物、及びClostridiaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物は、配列番号4で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物、配列番号5で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物、配列番号6で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物、配列番号7で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物、配列番号8で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物、配列番号9で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物、配列番号10で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物、配列番号11で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物、及び配列番号12で示される各塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物を含む、9種類以上の微生物を含むことが好ましい。前記配列同一性の割合は、98%以上がより好ましく、100%がさらに好ましい。

30

40

【0027】

本開示において、Methanobacteriaceae科に属する微生物及びMethanosarcinaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物は、例えば、上記のうちいずれか1つの科に属する1種の微生物であってもよく、上記のうちいずれか1つの科に属し、互いに同じ属に属しても異なる属に属してもよい複数種の微生物であってもよく、上記のうち複数の科について科ごとに1種ずつの微生物からなる複数種の微生物であってもよく、上記のうち複数の科について科ごとに複数種の微生物(同一属に属しても異なる属に属してもよい)からなる複数種の微生物であってもよい。

本開示において、Methanobacteriaceae科に属する微生物及びMethanosarcinaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物は、配列番号13で示され

50

る塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物、配列番号14で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物、及び配列番号15で示される各塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物を含む、3種類以上の微生物を含むことが好ましい。前記配列同一性の割合は、98%以上がより好ましく、100%がさらに好ましい。

【0028】

本開示において、Aspergillaceae科に属する微生物及びArthopyreniaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物は、例えば、上記のうちいずれか1つの科に属する1種の微生物であってもよく、上記のうちいずれか1つの科に属し、互いに同じ属に属しても異なる属に属してもよい複数種の微生物であってもよく、上記のうち複数の科について科ごとに1種ずつの微生物からなる複数種の微生物であってもよく、上記のうち複数の科について科ごとに複数種の微生物(同一属に属しても異なる属に属してもよい)からなる複数種の微生物であってもよい。

本開示において、Aspergillaceae科に属する微生物及びArthopyreniaceae科に属する微生物からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物は、配列番号16で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する18SrRNA遺伝子配列を有する微生物、配列番号17で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する18SrRNA遺伝子配列を有する微生物、配列番号18で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する18SrRNA遺伝子配列を有する微生物、及び配列番号19で示される各塩基配列と95%以上の配列同一性を有する18SrRNA遺伝子配列を有する微生物を含む、4種類以上の微生物を含むことが好ましい。前記配列同一性の割合は、98%以上がより好ましく、100%がさらに好ましい。

【0029】

本開示の第一の実施形態に係る微生物混合物は、さらに、配列番号1で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物と、配列番号2で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物と、配列番号3で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物と、からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物を含むことができる。

【0030】

本開示の第一の実施形態に係る微生物混合物は、配列番号1で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する1種類以上の微生物と、配列番号2で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する1種類以上の微生物と、配列番号3で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する1種類以上の微生物と、を含むことが好ましい。

【0031】

本開示において、配列番号1で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物は、真正細菌であることが好ましい。

本開示において、配列番号2で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物は、古細菌であることが好ましい。

本開示において、配列番号3で示される塩基配列と95%以上の配列同一性を有する16SrRNA遺伝子配列を有する微生物は、古細菌であることが好ましい。

【0032】

なお前記配列同一性の割合は、98%以上がより好ましく、100%がさらに好ましい。

【0033】

以下に、本開示において記載した配列番号1~配列番号19の塩基配列を示す。なお配列番号1~配列番号19で示される塩基配列は、微生物が有する16SrRNA遺伝子配

10

20

30

40

50

列（又は、18SrRNA遺伝子配列）の全長のうち、連続する一部分の配列である。

【0034】

[配列番号1]

5' CCTTCGGGTGGACAGGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCCTTATCATGTGTTGCCAGCGTAGAGGGGGCACTCACATGAGACTGCCGGAGACAATTCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCCTGGGCCACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGAA
CCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAAAAAGCCGGCCCCAGTTGGGATCGGAGGCTGCAACTCGCCTCCGTGAACGCGGAGTT
GCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG 3'

【0035】

[配列番号2]

5' GGGGACCCATGTGCCACTCTTAACGGGGTGGCTTTTTTAGAGTGTA AAAAGCTTTAGGAATAAGAGCTGGGCAAGAC
CGGTGCCAGCCGCGCGGTAA 3'

10

【0036】

[配列番号3]

5' GGGAGCCCCATGTGCCACTCTTAACGGGGTGGCTTTTTTAGAGTGTA AAAAGCTTTACGAATAAAAGCTGGGCAAG
ACCGGTGCCAGCCGCGCGGTAA 3'

【0037】

[配列番号4]

5' CCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGGG
GGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCT
CGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTATTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGC
TAGTAATCGTATATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG 3'

20

【0038】

[配列番号5]

5' CCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTATGGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGA
CCTCGGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAT
CGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG 3'

30

【0039】

[配列番号6]

5' CCTTCGGGACTCATGATACAGGGCGGCAGGGCTGTCGTCAGCCTCGTTGTTTGGTGAATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCCTTATCCAAAAGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGA
AGGAGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGC
GACCTCGGAGAGACAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG
GAATCGTAGTAAATCGTAGATCAAAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG 3'

【0040】

[配列番号7]

5' CCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACTAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACC
TCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCG
CTAGTAATCGTAAATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG 3'

40

【0041】

[配列番号8]

5' CCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGACTAGCAAAGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAA
CGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCA
AGCCGCGAGGGGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAAT

50

CGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG 3'

【 0 0 4 2 】

[配列番号 9]

5' CCTTCGGGAACCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGACTAGCAAAGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAA
CGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCA
AGCCGCGAGGGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAAT
CGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG 3'

【 0 0 4 3 】

[配列番号 1 0]

5' CCTTCGGGGCAGGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTATCATTAGTTGCTACCATTAAGTTGAGCACTCTAGTGAGACTGCCACGGTTAACGTGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGAGTACAAAAGAGATGCAATACC
GTGAGGTGGAGCCAAACTCAAAAACCTCATCCAGTTCGGATTGTAGGCTGAAACTCGCCTACATGAAGCCGGAGTTGCTA
GTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG 3'

10

【 0 0 4 4 】

[配列番号 1 1]

5' CCTTTAGGGCAAGAAGACAGGTGGGGCATGGGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAATCCCGCAACC
AGCGCAACCCTTATCTTTTTTGGTACCATTAATTTGAGCACTCTATTGAGACTGCCCCGGTTAACGTGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGAGTACAAAAGATGCAATACC
GCGAGGTGGAGCCAAACTCAAAAACCTCATCCAGTTCGGATTGTAGGCTGAAACTCCCCTACCTGAAGCCGGAGTTGCTA
GTAATCGCGAATCAACATGTCGCGGTGAATACCTTCCCGGGCCTTG 3'

20

【 0 0 4 5 】

[配列番号 1 2]

5' CCTTCGGGACAGGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTATACTTAGTTGCTAGCATTTGGTTGAGCACTCTAAGTAGACTGCCGGAGACAATTCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTATAACAACGGGAAGCGAACCA
GTGATGGCAAGCAAATCCCTAAAAAATACTCCCAGTTCAGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAACATGAAGTCGGAGTTGCT
AGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG 3'

30

【 0 0 4 6 】

[配列番号 1 3]

5' GGGGACCCCATGTGCCACTCTTAACGGGGTGGCTTTTTCTTATGTGTA AAAAGCTTTTGAATAAGAGCTGGGCAAGA
CCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAA 3'

【 0 0 4 7 】

[配列番号 1 4]

5' GGGGACCCCATGTGCCTCTCTTAACGGGGTGGCTTTTTTGTAGTGTAAAAAGCTTTGAGAATAAGAGCTGGGCAAGA
CCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAA 3'

【 0 0 4 8 】

[配列番号 1 5]

5' GGGGACGACACCGAGTGCCAATCTCATGTGCTGGGTGTCCGGGTGTGTAATATACACCTGTTAGCGGGGCCGGGCAA
GACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAA 3'

40

【 0 0 4 9 】

[配列番号 1 6]

5' TCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCAATTTGACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTAT
CGTTTATTTGATAGTACCTTACTACATGGATACCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAACCTCGACTTCGGA
AGGGGTGATTTATTAGATAAAAAACCAACGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGAATCATAATAACTAAGCGAATCGCATGGC
CTTGCGCCG 3'

【 0 0 5 0 】

[配列番号 1 7]

5' TCAAAGATTAAGCCATGCATGTTAAGTATAAGCAATTTGACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTAT

50

CGTTTATTTGATAGTACCTTACTACATGGATACCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAACCTCGACTTCGGA
AGGGGTGTATTTATTAGATAAAAAACCAACGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGAATCATAATAACTAAGCGAATCGCATGGC
CTTGCGCCG 3'

【 0 0 5 1 】

[配列番号 1 8]

5' TCAAAAATTAACCCACCCATGTTTAAGTATAACCAATTATACCGTGAAAATGAGAATGGCTCATTAAATCAGTTATC
GTTTATTTGATAGTACCCTACTACTTGGATACCCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAACCCCAACTTCGGGA
GGGGTGTATTTATTAGATAAAAAACCAATGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGAATCATAATAACTAAACGAATCGCATGGCC
TTGCGCGG 3'

【 0 0 5 2 】

[配列番号 1 9]

5' TCAAAAATTAACCCAAGCCAGTTTTTAGTATTAACCAATTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTAT
CGTTTATTTGATAGTACCTTACTACATGGATACCCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAACCCCAACTTCGGG
AGGGGTGTATTTATTAGATAAAAAACCAATGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGAATCATAATAACTAAACGAATCGCATGGC
CTTGCGCCG 3'

【 0 0 5 3 】

(第二の実施形態)

本開示の第二の実施形態に係る微生物混合物は、セルロース、キチン、及びタンパク質のうち少なくとも1種を分解する少なくとも1種の微生物と、少なくとも1種の水素産生微生物と、少なくとも1種のメタン産生微生物と、少なくとも1種の酸素消費微生物と、を含む。

【 0 0 5 4 】

セルロース、キチン、及びタンパク質のうち少なくとも1種を分解する少なくとも1種の微生物と、少なくとも1種の水素産生微生物と、少なくとも1種のメタン産生微生物と、少なくとも1種の酸素消費微生物と、を含む、微生物混合物は、常温で共培養することによって、生物由来の組成物からのメタン産生が可能となる。

【 0 0 5 5 】

本開示の第二の実施形態に係る微生物混合物の作用は明確でないが、以下のように推定される。

本開示の第二の実施形態に係る微生物混合物のうち、セルロース、キチン、及びタンパク質のうち少なくとも1種を分解する少なくとも1種の微生物は、常温条件下で、生物由来の組成物中のセルロースのグルコースへの分解、キチンのグルコサミンへの分解、及びタンパク質のアミノ酸への分解のうち少なくとも1つを行う。本開示の第二の実施形態に係る微生物混合物のうち、少なくとも1種の水素産生微生物は、常温条件下で、前記分解されたグルコース、グルコサミン、又はアミノ酸を取り込み、水素を産生する。本開示の第二の実施形態に係る微生物混合物のうち、少なくとも1種のメタン産生微生物は、常温条件下で、前記産生された水素と、二酸化炭素とを取り込み、メタンを産生する。本開示の第二の実施形態に係る微生物混合物のうち、少なくとも1種の酸素消費微生物は、常温条件下で、酸素を取り込み、増殖することができる。前記酸素消費微生物は増殖の過程で酸素を消費するため、培養槽内の嫌気性を上げることができる。このため、嫌気性微生物である前記メタン産生微生物は、培養槽内においてより効率よくメタンを産生することができる。以上のことから、生物由来の組成物を基質としてメタンを産生する場合に、共培養によって少ない工程数で、常温でも、効率よくメタンを得ることができる。生物由来の組成物がキチン又はセルロース等の難分解性の物質を含む場合、例えば消化汚泥である場合に、このような効果はより顕著であり、これまで基質にすることが難しかった難分解性の組成物であっても基質に用いてメタン産生を行うことができる。

さらには、前記少なくとも1種の酸素消費微生物は、常温条件下で、生物由来の組成物中の硝酸からアンモニアを産生することができる。前記アンモニアは、微生物混合物の窒素源となり、微生物混合物に含まれる微生物が、より効率よく機能を発揮することができる。

10

20

30

40

50

なお、本開示は上記推定作用には何ら制限されない。

【0056】

本開示において、セルロース、キチン、及びタンパク質のうち少なくとも1種を分解する少なくとも1種の微生物とは、セルロース、キチン、及びタンパク質のうち少なくとも1種を分解することができる微生物であれば特に限定されない。例えば、セルロースを分解する微生物、キチンを分解する微生物、及びタンパク質を分解する微生物は、それぞれ、セルラーゼ活性、キチナーゼ活性、又はプロテアーゼ活性を有し、それぞれ、セルロースをグルコースに、キチンをグルコサミンに、又はタンパク質をアミノ酸に分解する微生物であることが好ましい。また、一つの微生物がこれらの活性のうち複数を有していてもよい。前記活性が発揮される際の環境条件は、生物由来の組成物を基質としたメタン産生の際に、加温の必要がなく、共培養を利用することができる観点から、常温かつ嫌気の下であることが好ましい。

10

なお本開示におけるセルロース、キチン、及びタンパク質のうち少なくとも1種を分解する微生物は、当業界で、セルロース、キチン、及びタンパク質のうち少なくとも1種を分解する微生物として一般的に知られている微生物を用いてもよい。なお当業界で一般的に知られているとは、例えば、当業界における文献、データベース、又は、微生物種名などによって知られていることをいう。

【0057】

本開示において、水素産生微生物とは、水素を産生することができる微生物であれば特に限定されない。例えば、水素産生微生物は、グルコースから水素を産生する活性、グルコサミンから水素を産生する活性、又はアミノ酸から水素を産生する活性のうち少なくとも1つを有することが好ましい。前記活性が発揮される際の環境条件は、生物由来の組成物を基質としたメタン産生の際に、加温の必要がなく、共培養を利用することができる観点から、常温かつ嫌気の下であることが好ましい。

20

なお本開示における水素産生微生物は、当業界で一般的に知られている、水素産生微生物を用いてもよい。

【0058】

本開示において、メタン産生微生物とは、メタンを産生することができる微生物であれば特に限定されない。例えば、メタン産生微生物は、水素からメタンを産生する活性を有することが好ましい。前記活性が発揮される際の環境条件は、生物由来の組成物を基質としたメタン産生の際に、加温の必要がなく、共培養を利用することができる観点から、常温かつ嫌気の下であることが好ましい。

30

なお本開示におけるメタン産生微生物は、当業界で一般的に知られている、メタン産生微生物を用いてもよい。

【0059】

本開示において、酸素消費微生物とは、酸素を消費することができる微生物であれば特に限定されない。例えば、酸素消費微生物は、酸素を微生物内に取り込む活性を有することが好ましい。さらには、硝酸からアンモニアを産生する活性を有することが好ましい。前記活性が発揮される際の環境条件は、生物由来の組成物を基質としたメタン産生の際に、加温の必要がなく、共培養を利用することができる観点から、常温かつ嫌気の下であることが好ましい。

40

なお本開示における酸素消費微生物は、当業界で一般的に知られている、酸素消費微生物であってもよい。酸素消費微生物は、当業界で一般的に知られている、いわゆる好気性微生物であってもよい。本開示における酸素消費微生物は、前記したように嫌気条件下で酸素を消費することが好ましいため、酸素濃度が一定程度存在する嫌気条件（つまり、酸素濃度が一定以下しかない条件）でも、酸素を消費することが可能な微生物であることが好ましい。

【0060】

本開示において、常温とは、培養槽を加温する必要がない観点から、5 ~ 40 が好ましく、10 ~ 35 がより好ましく、15 ~ 35 がさらに好ましく、30 が特

50

に好ましい。本開示において、嫌気とは、微生物混合物中の各微生物が備える機能を発揮しやすい観点から、培養槽の気相中酸素濃度又は液相中酸素濃度が5%以下である条件を指すことが好ましく、培養槽の気相中酸素濃度又は液相中酸素濃度が3%以下である条件を指すことがより好ましい。

【0061】

本開示において、微生物とは、好気性微生物と嫌気性微生物とを含む。好気性微生物とは、増殖するために酸素を必要とする微生物であって、微好気性微生物、及び偏性好気性微生物を含む。嫌気性微生物とは、増殖するために酸素を必要としない微生物であって、通性嫌気性微生物、偏性嫌気性微生物、及び耐酸素性微生物を含む。

【0062】

本開示において、生物由来の組成物とは、セルロース、キチン、又はタンパク質を含んでいれば特に限定されない。本開示における生物由来の組成物としては、例えば、生物汚泥（例えば下水の汚泥）、より具体的には消化汚泥等が挙げられる。消化汚泥とは、余剰汚泥を基質として、メタン産生微生物等の嫌気性微生物が分解した際に発生する、難生分解性の成分から構成される汚泥残渣である。消化汚泥には、例えば、微生物の細胞壁多糖に由来するキチン、微生物の構成に由来するタンパク質、人毛に由来するケラチン、し尿由来のセルロース、及び植物の細胞壁由来のキシラン等の難分解性糖質などが含まれる。

【0063】

< 微生物混合物の入手方法 >

本開示において、「本開示の微生物混合物」とは、特に断りが無くまた矛盾が無い限り、本開示の第一の実施形態に係る微生物混合物、及び、本開示の第二の実施形態に係る微生物混合物の両方を包含する。また、「本開示の」とは、特に断りが無くまた矛盾が無い限りは、第一の実施形態と第二の実施形態の両方を包含する。

【0064】

本開示の微生物混合物は、土壌と、生物由来の組成物とを30で1ヶ月培養することで、得ることができる。生物由来の組成物の例としては、消化汚泥が挙げられる。より詳細には、例えば、以下に記載した方法で入手することができる。日本の東京都八王子市にある川口川の川岸の表面堆積物から、土壌サンプルを採取することができる。1gの前記土壌サンプルを、ポルテックスミキサーを用いて20mlの滅菌水に懸濁し、これを種菌とする。

【0065】

次に、種菌を培養するための消化汚泥を準備する。脱水消化汚泥（固形物量17%）は、例えば、日本の神奈川県横浜市にある下水処理場から得ることができる。下水汚泥の脱水に用いられる無機凝集剤であるポリ塩化アルミニウムは、微生物にとって毒であるため、脱水消化汚泥中のポリ塩化アルミニウムは水道水で繰り返し洗浄して取り除く。詳細には、300gの脱水消化汚泥と600mlの水道水とを、1000mlのビーカーに入れて混合し、その混合物を、三層のガーゼフィルターに通して、上清に含まれるポリ塩化アルミニウムを取り除く。この取り除く操作を、フィルター溶出液のpHが6.0以上になるまで5回繰り返す。洗浄してフィルターに残った残留物を、乾燥器FSP450（ADVANTEC社、東京、日本）にて60〜48時間で完全に乾燥させ、粉末になるよう粉砕し、直径1mmの篩に通す。篩を通った消化汚泥粉末を、以下の試験における消化汚泥（基質）とする。なお、消化汚泥試料中の炭素、窒素、及び水素の含有量は、元素分析装置JM-11（株式会社ジェイ・サイエンス・ラボ、京都、日本）で分析したところ、消化汚泥1.0g中、炭素335.1mg、窒素58.1mg、及び水素53.2mgである。

【0066】

そして前記種菌を、17ml容量のガラスバイアル内で培養する。詳細には、100μlの前記種菌を、10mlの滅菌水と100mgの消化汚泥粉末との混合液に接種する。バイアル上部にある7ml分の気相には1分間窒素ガスを流入し、プチルゴム栓とアルミキャップで、バイアルを密閉する。前記種菌を、30で1ヶ月培養することで、本開示

10

20

30

40

50

の微生物混合物とすることができる。

【0067】

なお、上記に記載した本開示の微生物混合物の入手方法は、一つの例示であって、これに拘束されない。

【0068】

なお、前記微生物混合物は、特定の場所の土壌から採取することができるが、それぞれの微生物を単離して培養することができず、混合物中に含まれる全ての微生物を網羅する生存試験方法も確立されていないため、現行の寄託制度のもとでは寄託機関に寄託することが不可能である。

従って、学校法人工学院大学八王子キャンパス（所在地：東京都八王子市中野町2665-1、電話番号：042 622 9291）において、前記微生物混合物を、微生物混合物No. Riverbank-A30として、分譲可能な状態に保存されており、必要に応じて第三者が入手することができるようになっている。

【0069】

また、本開示の微生物混合物は、どのような方法で入手したものを使用しても良く、例えば、単離又は購入した各微生物を、本開示の微生物混合物となるように各微生物を適宜混合することで作製してもよい。

【0070】

<微生物混合物の機能>

本開示の微生物混合物は、基質としての生物由来の組成物1gの存在下において常温条件下で1ヶ月培養することで、10ml以上のメタンを産生することができる。

【0071】

本開示の微生物混合物は、基質としての生物由来の組成物1gの存在下において常温条件下で1ヶ月培養することで、10ml～500mlのメタンを産生することが好ましく、15ml～400mlのメタンを産生することがより好ましく、20ml～300mlのメタンを産生することがさらに好ましい。

なお、生物由来の組成物、消化汚泥、基質、及び常温についての詳細は、上述の<微生物混合物に含まれる微生物>に記載のものと同様である。

【0072】

また、前記微生物混合物（微生物混合物に含まれる微生物）の機能を確認する方法は、例えば、実施例に記載の条件において微生物混合物を培養して、微生物の生育、メタンの産生等を確認する方法であってもよい。具体的には、脱水消化汚泥を、洗浄、乾燥、粉碎、及び篩化することで、消化汚泥（基質）とすることができる。消化汚泥中の炭素、窒素、及び水素の含有量は、メタンを産生するための基質を含んでいる観点、及び、微生物混合物に含まれる微生物が増殖するための栄養源が含まれている観点から、消化汚泥1.0g中、炭素10mg～1000mg、窒素10mg～100mg、及び水素10mg～1000mgが好ましい。

【0073】

培養槽中において、生物由来の組成物を含む溶液に微生物混合物を接種する際の混合比率は、特に制限されないが、微生物が増殖しやすい観点から、微生物混合物1質量部に対して、消化汚泥0.1質量部～10質量部であることが好ましく、1質量部であることがより好ましい。微生物が増殖しやすい観点から、さらに水を10質量部～1000質量部添加することが好ましく、100質量部添加することがより好ましい。

なお生物由来の組成物を含む溶液に微生物混合物を接種する際は、微生物混合物に含まれる微生物をそれぞれ1種類ずつ別々のタイミングで接種してもよく、又は微生物混合物に含まれる微生物を複数種類ずつ複数回に分けて接種してもよい。あるいは、微生物混合物に含まれる全微生物種類を同時に一度のみ接種してもよく、微生物混合物に含まれる全微生物種類の同時摂取を複数回行ってよい。操作が容易である観点から、微生物混合物に含まれる全微生物種類を同時に一度のみ接種することが好ましい。

【0074】

10

20

30

40

50

培養槽中には、さらに、例えば各微生物の増殖を促進又は抑制するための、一般的に微生物の培養又は細胞の培養に用いられるような、市販の培地に含まれる、有機物又は無機物などが含まれていてもよい。

【0075】

接種後、培養槽の気相に酸素以外の安定なガス、例えば窒素ガスを流入させて培養槽を密閉し、常温で1ヶ月培養することができる。培養の期間は、10日～60日間であってもよく、20日～40日間であってもよい。

【0076】

メタンを定量する方法についても、例えば、実施例に記載の方法を用いることができる。具体的には、気体のメタンを定量することが好ましく、培養槽内の気相を採取し、気相に含まれる気体を、ガスクロマトグラフを使用して定量することができる。

10

【0077】

なお一般的に、メタン産生微生物がメタンを産生する最適pHは、6.8～7.6である。よって、pHを6.8よりも低くすることで、メタン産生を抑制することができる。また、一般的に、水素産生微生物は、低いpHに対して耐性を有しており、pH4.5以上であれば、水素を産生することができる。

よって、本開示の微生物混合物は、生物由来の組成物1gを基質として、常温条件下、かつ、例えばpH4.5～pH6.8で1ヶ月培養することで、10ml以上の水素を産生することができる。前記水素の産生は、10ml～2000mlが好ましく、20ml～1800mlがより好ましく、40ml～1600mlがさらに好ましく、80ml～1200mlが特に好ましい。

20

【0078】

メタン産生用組成物

本開示のメタン産生用組成物は、微生物混合物を含み、生物由来の組成物からメタンを産生できる組成物であることが好ましい。

【0079】

本開示のメタン産生用組成物は、微生物混合物を含み、生物由来の組成物からメタンを産生できる組成物であれば特に限定されない。本開示のメタン産生用組成物に含まれる微生物混合物は、生きた状態の微生物であってもよく、仮死状態の微生物であってもよい。微生物が菌類である場合、菌糸又は胞子のいずれとして含まれていてもよい。

30

【0080】

本開示のメタン産生用組成物は、本開示の微生物混合物の他に、固体媒質（例えば、ゼラチン、乳糖）及び液体媒質（例えば、水、生理食塩水）、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤などが含まれていてもよい。これらの成分の配合量は、本開示の微生物混合物がメタン産生用組成物として作用しうるのであれば、特に制限されない。

【0081】

本開示のメタン産生用組成物の形状は特に限定されず、例えば、粉末状、顆粒状、固体状、液体状、凍結物状、又は、それらがカプセルに封入された形状であってもよい。これらの形状は、本開示の微生物混合物がメタン産生用組成物として作用しうるのであれば、特に制限されない。

40

メタンを産生できる詳細な条件については、＜微生物混合物の機能＞に記載の、微生物混合物の機能を確認する方法と同様である。

【0082】

メタン産生方法

本開示のメタン産生方法は、生物由来の組成物を含む溶液に、微生物混合物を接種することと、前記接種された微生物混合物を常温条件下で培養することと、を含むことができる。

【0083】

本開示において、生物由来の組成物を含む溶液とは、生物由来の組成物を含んでいれば特に限定されない。本開示における生物由来の組成物を含む溶液には、生物由来の組成物

50

以外に、例えば、水又は生理食塩水などが含まれてもよい。

【0084】

本開示において、生物由来の組成物を含む溶液に、微生物混合物を接種することとは、生物由来の組成物に、微生物混合物を添加することを含んでいれば特に限定されない。微生物混合物を接種する詳細な条件については、前記<微生物混合物の機能>における微生物混合物の機能を確認する方法に記載の微生物混合物接種の場合と同様の条件を適用できる。

【0085】

本開示において、接種された微生物混合物を常温条件下で培養することとは、接種された微生物混合物を常温条件下で培養することを含んでいれば特に限定されない。接種された微生物混合物を常温条件下で培養する詳細な条件については、前記<微生物混合物の機能>における微生物混合物の機能を確認する方法に記載の微生物混合物接種後の培養と同様の条件を適用できる。

【0086】

本開示のメタン産生方法は、消化汚泥を含む溶液に、微生物混合物を接種することと、前記接種された微生物混合物を常温条件下で培養することと、を含むことができる。接種及び培養の詳細については、前記<微生物混合物の機能>における微生物混合物の機能を確認する方法における接種及び培養についての記載を参照できる。

【実施例】

【0087】

以下、本開示を実施例により更に具体的に説明するが、本開示はその主旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。なお、特に断りのない限り、「部」は質量基準である。「%」も同様に質量基準である。

【0088】

以下において、分子生物学的な試薬は、東洋紡株式会社（大阪、日本）、サーモフィッシュャーサイエンティフィック社（ウォルサム、マサチューセッツ、米国）、又はMPバイオメディカル社（サンタアナ、カリフォルニア、米国）から購入した。その他の全ての化学薬品は、和光純薬株式会社（京都、日本）から購入した。培養に用いるガラス及びプラスチック製の実験器具は、株式会社マルエム（大阪、日本）又はアズワン株式会社（大阪、日本）から購入した。

【0089】

実施例 1

（微生物混合物の採取）

日本の東京都八王子市にある川口川の川岸の表面堆積物から、土壌サンプルを採取した。1 gの前記土壌サンプルを、ポルテックスミキサーを用いて20 mlの滅菌水に懸濁し、これを種菌とした。

【0090】

（消化汚泥の準備）

脱水消化汚泥（固形物量17%）は、日本の神奈川県横浜市にある下水処理場から得た。下水汚泥の脱水に用いられる無機凝集剤であるポリ塩化アルミニウムは、微生物にとって毒であるため、脱水消化汚泥中のポリ塩化アルミニウムは水道水で繰り返し洗浄して取り除いた。詳細には、300 gの脱水消化汚泥と600 mlの水道水とを、1000 mlのビーカーに入れて混合し、その混合物を、三層のガーゼフィルターに通して、上清に含まれるポリ塩化アルミニウムを取り除いた。この取り除く操作を、フィルター溶出液のpHが6.0以上になるまで5回繰り返した。洗浄してフィルターに残った残留物を、乾燥器FSP450（ADVANTEC社、東京、日本）にて60～48時間で完全に乾燥させ、粉末になるよう粉碎し、直径1 mmの篩に通した。篩を通った消化汚泥粉末を、以下の試験における消化汚泥（基質）とした。なお、消化汚泥試料中の炭素、窒素、及び水素の含有量は、元素分析装置JM-11（株式会社ジェイ・サイエンス・ラボ、京都、日本）で分析したところ、消化汚泥1.0 g中、炭素335.1 mg、窒素58.1 mg、及

10

20

30

40

50

び水素 53.2 mg であった。

【0091】

(種菌の培養)

前記種菌を、17 ml 容量のガラスバイアル内で培養した。詳細には、100 μl の前記種菌を、10 ml の滅菌水と100 mg の消化汚泥粉末との混合液に接種した。バイアル上部にある7 ml 分の気相には1分間窒素ガスを流入し、ブチルゴム栓とアルミキャップで、バイアルを密閉した。前記種菌を、30、40、又は50 で1ヶ月培養した。この、30、40、又は50 で1ヶ月培養された種菌を、以下において、微生物混合物とした。

【0092】

(水素産生及びメタン産生の定量)

前記30、40、又は50 で1ヶ月培養した微生物混合物について、バイアル上部の気相をサンプリングし、水素及びメタンの定量を行った。

水素及びメタンの定量は、熱伝導度型検出器付きのガスクロマトグラフGC-8A(株式会社島津製作所、京都、日本)を使用して、カラムはShincarbon STカラム50/80(2.0 m × 3.0 mm 内径、信和化工株式会社、京都、日本)を使用し、0.5 ml の注入量で、キャリアガスとしてアルゴン(43.5 ml/min)を用いて、カラム温度は80 の条件で行った。水素及びメタンの標品は、ジューエルサイエンス株式会社(東京、日本)から購入した。

結果を図1に示す。図中、縦軸は、消化汚泥1 g あたりのメタン産生量(ml)を示し、横軸は、継代回数(回)を示す。本開示の微生物混合物は、培養温度30 かつ継代回数1回~8回において、消化汚泥1 g あたり20 ml 以上のメタンを産生した。培養温度30 で4回継代培養したときは、消化汚泥1 g あたり20.79 ml のメタンを産生した。培養温度40 においては、継代回数に関わらず消化汚泥1 g あたり約2.5 ml 以上メタンを産生した。培養温度50 においては、継代回数に関わらずメタンの産生は確認できなかった。以上のことから、本開示の微生物混合物により高効率なメタン産生が可能であり、また、培養温度を適切に設定することで、微生物混合物は継代しても安定的に維持できることが示された。なお図1において、継代回数1回とは、消化汚泥と上記種菌とを1か月培養したことを示す。図1において、継代回数2回とは、消化汚泥と前記継代回数1回で得られたものとを1か月培養したことを示す。継代回数3回とは、消化汚泥と前記継代回数2回で得られたものとを1か月培養したことを示す。継代回数4回以降も同様である。

【0093】

(微生物混合物のPCR-DGGE法による解析)

前記30、40、又は50 で1ヶ月培養した微生物混合物について、PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(PCR-DGGE法)は、以下のとおりに実施した。

【0094】

- PCR -

前記30、40、又は50 で1ヶ月培養した微生物混合物の培養液1 ml を、20,000 × g、10分、及び4 の条件で遠心分離することで、微生物混合物の細胞を収集した。土壌試料用Fast DNA SPINキット(MPバイオメディカル社)を用いて、前記細胞からゲノムDNAを抽出した。

【0095】

真正細菌については、V6~V8領域に相当する16S rRNA 遺伝子をPCRで増幅した。Heuer et al. (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. Appl Environ Microbiol 63:3233-3241.に記載されたように、プライマーはF984GC(配列番号20)とR1378(配列番号21)を用い、ポリメラーゼはKOD-Fx-Neopolymerase(東洋紡株式会社)を用いた。PCRの条件は、94 2分を1サイクルと、94 15秒、50 30秒、68 30秒を34サ

10

20

30

40

50

線形の変性剤濃度勾配とした6%ポリアクリルアミドゲルを使用した。菌類又は原生生物由来のアンプリコンの場合は、20%~45%の線形の変性剤濃度勾配とした7%ポリアクリルアミドゲルを使用した。なおアンプリコンの分子量を推定するため、各ゲルのウェルには、それぞれ分子量マーカーもロードした。

電気泳動は、50Vの定電圧で、真正細菌由来のアンプリコンの場合は58~18時間、古細菌、菌類、及び原生生物由来のアンプリコンの場合は60~20時間で実施した。電気泳動後のゲルは、100mlのTAE緩衝液で溶解した10 μ lのSYBR Green (ライフテクノロジーズ株式会社)で染色した。

結果を図2に示す。微生物混合物を30 $^{\circ}$ で培養した場合、真正細菌由来のアンプリコンC1(配列番号10を含む)、C2(配列番号11を含む)、Ue1(配列番号1を含む)、E2(配列番号4を含む)、C4(配列番号12を含む)、E7(配列番号5を含む)、P1(配列番号8を含む)、P2(配列番号9を含む)、E8(配列番号6を含む)、及びE9(配列番号7を含む)と、古細菌由来のアンプリコンMb1(配列番号13を含む)、Ua2(配列番号2を含む)、Ua3(配列番号3を含む)、Mb5(配列番号14を含む)、及びMs1(配列番号15を含む)と、菌類又は原生生物由来のアンプリコンR1(配列番号18を含む)、R2(配列番号19を含む)、A4(配列番号16を含む)、及びA5(配列番号17を含む)とが確認された。微生物混合物を40 $^{\circ}$ で培養した場合、真正細菌由来のアンプリコンC2、Ue1、E2、C4、E7、P2、及びE8と、古細菌由来のアンプリコンMb1、Mb2、Ua1、Ua2、Ua3、Mb4、Mb5、及びUa4と、菌類又は原生生物由来のアンプリコンR1、R2、A3、D1、AC1、及びAC2とが確認された。微生物混合物を50 $^{\circ}$ で培養した場合、真正細菌由来のアンプリコンC2、Ue1、E2、C4、E7、P2、及びE8と、古細菌由来のアンプリコンMb1、Mb2、及びUa2と、菌類又は原生生物由来のアンプリコンR1、R2、A3、D1、AC1、及びAC2とが確認された。なお確認されたアンプリコンの数は、存在する微生物種数に相当し、泳動停止位置は微生物種に固有のGC塩基含量を示す。また、上記アンプリコンは、PCR-DGGE法で解析するためにGC塩基含量に富んだGCクランプを含むプライマーで増幅されており、上記アンプリコンの塩基配列はGCクランプの塩基配列を含む。よって上記において「アンプリコンX(配列番号Yを含む)」とは、アンプリコンXの塩基配列は、配列番号Yで示される塩基配列及びGCクランプの塩基配列を含むことを意味する。

本開示の微生物混合物は、30 $^{\circ}$ で継代培養した場合、少なくとも、10種類の真正細菌、5種類の古細菌、及び4種類の菌類又は原生生物を含むことが分かった。

【0103】

- PCR-DGGE法で得られたアンプリコンのシーケンス解析 -

前記DGGE法で得られたゲルに470nmの光を照射し、30 $^{\circ}$ で1ヶ月培養した場合の各アンプリコンを含む部位をゲルから切り出した。切り出した部位は、20 μ lのTE緩衝液(pH8.0)に4 $^{\circ}$ で72時間浸し、各アンプリコンを抽出した。次に、前記抽出した1 μ lのアンプリコンを鋳型として、GCクランプを含まないプライマーを用いて再度PCRを実施した。なおPCRの条件は、プライマー以外は、上記のDGGE法におけるPCRの条件と同様である。PCR産物は、GeneJET PCR精製キット(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を使用して精製し、BigDye Terminator v3.1(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を使用してシーケンス解析を実施した。シーケンス解析の結果は、BLASTアルゴリズムを利用して、GenBank、EMBL、及びDDBJのデータベースに登録されている既知の微生物種の配列と比較した。MEGA6プログラムの最尤推定を利用して、真正細菌及び古細菌については16SrRNA遺伝子に基づいて系統樹を作成し、菌類又は原生生物については18SrRNA遺伝子に基づいて系統樹を作成した。

真正細菌由来のアンプリコンの分類学上の位置(属種)を示す系統樹を図3に示す。アンプリコンC1、C2、及びC4は、Clostridiaceae科に由来することが分かった。アンプリコンE2、E7、E8、及びE9は、Enterobacteriaceae科に由来することが分かつ

10

20

30

40

50

た。アンプリコン P 1 及び P 2 は、Pseudomonadaceae科に由来することが分かった。アンプリコン U e 1 は、未分類の真正細菌に由来することが分かった。

古細菌由来のアンプリコンの分類学上の位置（属種）を示す系統樹を図 4 に示す。アンプリコン M s 1 は、Methanosarcinaceae科に由来することが分かった。アンプリコン M b 1 及び M b 5 は、Methanobacteriaceae科に由来することが分かった。アンプリコン U a 2 及び U a 3 は、未分類の古細菌に由来することが分かった。

菌類又は原生生物由来のアンプリコンの分類学上の位置（属種）を示す系統樹を図 5 に示す。アンプリコン A 4 及び A 5 は、Aspergillaceae科に由来することが分かった。アンプリコン R 1 及び R 2 は、Arthopyreniaceae科に由来することが分かった。

【 0 1 0 4 】

Enterobacter asburiaeはタンパク質を分解することができるため、アンプリコン E 8 及び E 9 が由来する真正細菌は、消化汚泥中のタンパク質を分解することができる。Citrobacter freundiiはセルラーゼ、キチナーゼ、及びプロテアーゼを有し、Cronobacter sakazakiiはキチナーゼ及びプロテアーゼを有することから、アンプリコン E 2 及び E 7 が由来する真正細菌は、消化汚泥中の炭水化物及びタンパク質を加水分解することができる。Clostridium amylolyticum及びClostridium punenseは水素を産生することができることから、アンプリコン C 1、C 2、及び C 4 が由来する真正細菌は、水素を産生することができる。

Methanobacteriaceae科及びMethanosarcinaceae科は、メタンを産生することができることから、アンプリコン M s 1、M b 1、及び M b 5 が由来する古細菌は、メタンを産生することができる。

Penicillium expansum及びMonascus purpureusは、セルラーゼ、キチナーゼ、及びプロテアーゼを有することから、アンプリコン A 4 及び A 5 が由来するAspergillaceae科の種は、セルラーゼ、キチナーゼ、及びプロテアーゼを有すると考えられる。一方で、Aspergillaceae科は一般的に嫌気条件下では至適ではないため、アンプリコン A 4 及び A 5 が由来するAspergillaceae科の種は、消化汚泥を含む培養液中の酸素を消費して、嫌気性微生物である他の真正細菌及び古細菌等が効率よく働くことができるように関係している。

上記で説明したように、実施例 1 における微生物混合物が消化汚泥からメタンを産生するメカニズムを図 6 に示す。

【 0 1 0 5 】

（酵素活性の測定）

前記 3 0 で 1 ヶ月培養した微生物混合物を、酵素活性の測定に用いた。1 0 0 μ l の前記 3 0 で 1 ヶ月培養した微生物混合物を、1 0 m l の滅菌水及び 1 0 0 m g の消化汚泥粉末が入った新しいバイアルに接種し、1 回継代した。継代した微生物混合物 2 m l を、2 0 , 0 0 0 × g、1 0 分、4 の条件で遠心分離し、上清を酵素活性の評価に用いた。

Palmisano et al. (1993) Hydrolytic enzyme activity in landfilled refuse. Appl Microbiol Biotechnol 38:828 832.及びRamirez et al. (2004) Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. J Microbiol Methods 56:213 219.に記載の方法を利用して、セルラーゼ及びキチナーゼの定量は、シグマアルドリッチ社（セントルイス、ミズーリ、米国）から購入したセルロースアズール及びキチンアズールを使用した。

詳細には、0 . 2 m l の前記上清、0 . 8 m l の 5 0 m M クエン酸緩衝液（p H 5 . 0）、及び 5 m g のセルロースアズール又はキチンアズールを、遠心管の中で混合し、3 0 で 1 時間培養した。培養後、遠心管を 2 0 , 0 0 0 × g、1 0 分、4 で遠心分離して上清を回収し、5 4 0 n m における吸光度を測定した。なおセルラーゼ及びキチナーゼの 1 U n i t とは、5 4 0 n m における吸光度が 0 . 0 1 上昇する酵素量、と定義した。プロテアーゼ活性は、Pierce Protease Assay キット（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を使用して、1 μ g のトリプシン相当の活性に換算して数値化した。

結果を図 7 に示す。図中、縦軸は、セルラーゼ活性の測定及びキチナーゼ活性の測定に関しては、5 4 0 n m における吸光度が 0 . 0 1 上昇する酵素活性を 1 としたときの、酵

10

20

30

40

50

素活性 (Unit/ml/時間) を示し、トリプシン活性の測定に関しては、1 μg のトリプシン相当の活性を 1 としたときの、酵素活性 (トリプシン相当/ml/時間) を示す。図中の棒グラフは平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。本開示の微生物混合物は、培養温度 30 °C において、約 0.18 Unit/ml/時間のセルラーゼ活性を有し、約 0.056 Unit/ml/時間のキチナーゼ活性を有し、かつ、約 0.33 μg トリプシン相当/ml/時間のプロテアーゼ活性を有していた。

【0106】

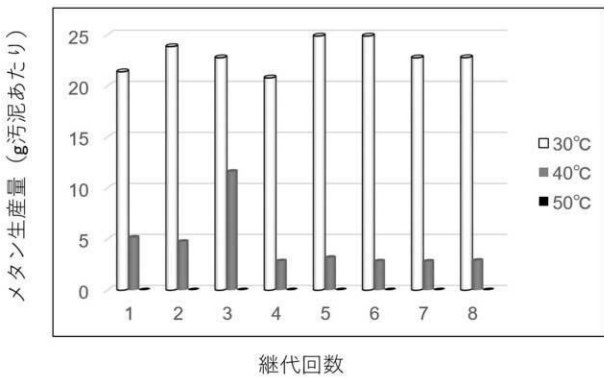
以上のことから、実施例 1 では、複数種類の特定の微生物を常温で共培養することによって、生物由来の組成物からのメタン産生が可能となる微生物混合物、メタン産生用組成物、及びメタン産生方法を提供することができた。

【産業上の利用可能性】

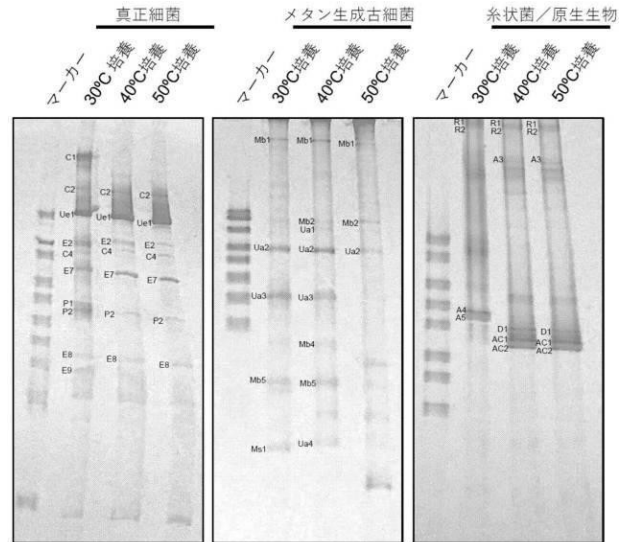
【0107】

本開示の微生物混合物は、消化汚泥を含む溶液に接種して常温で培養することにより、水素又はメタンを発生させることができ、これらは燃料として使用することができる。さらに本開示の微生物混合物は、消化汚泥を減容することができ、産業廃棄物量を低減させることができる。

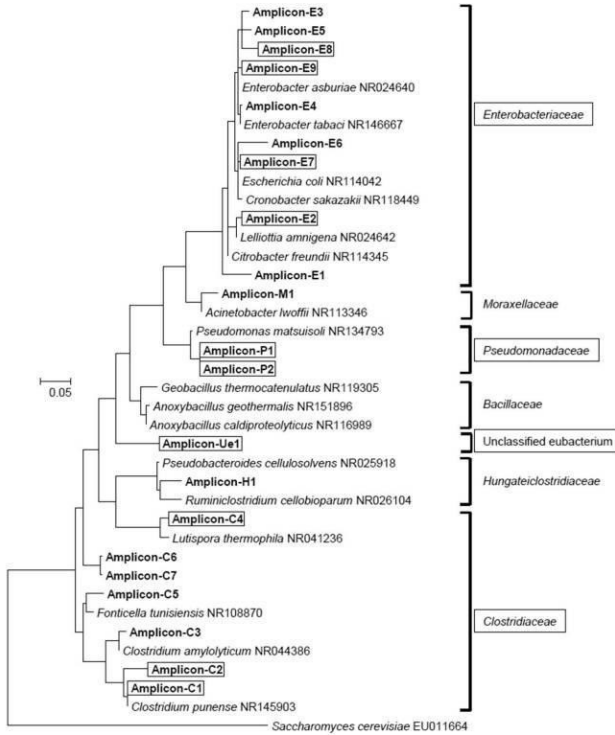
【図 1】



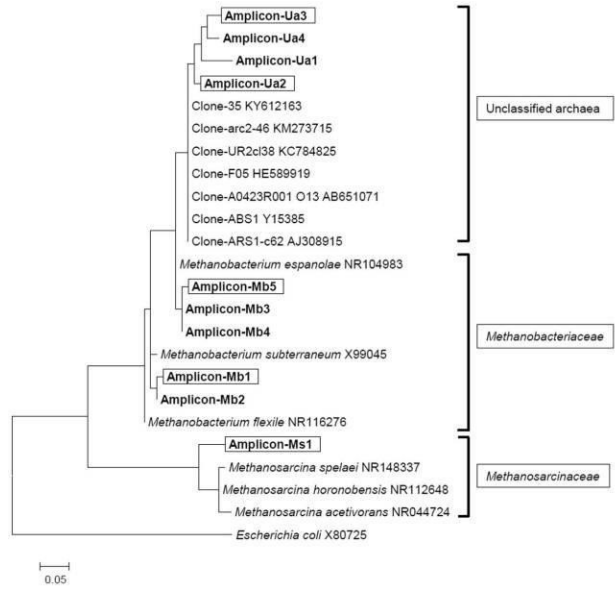
【図 2】



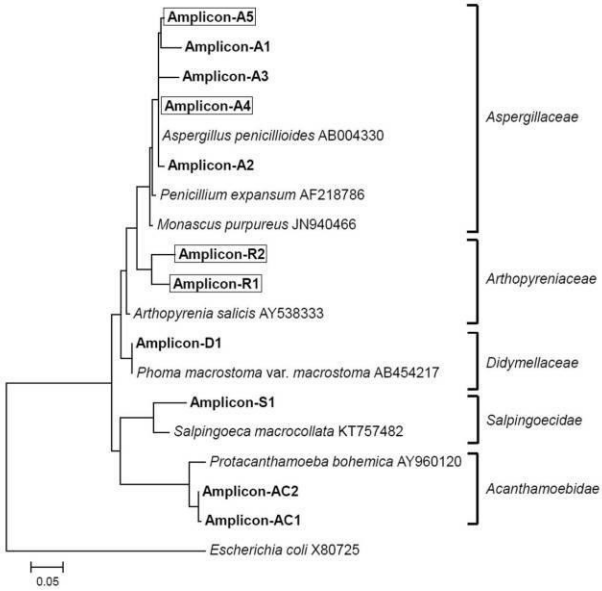
【 図 3 】



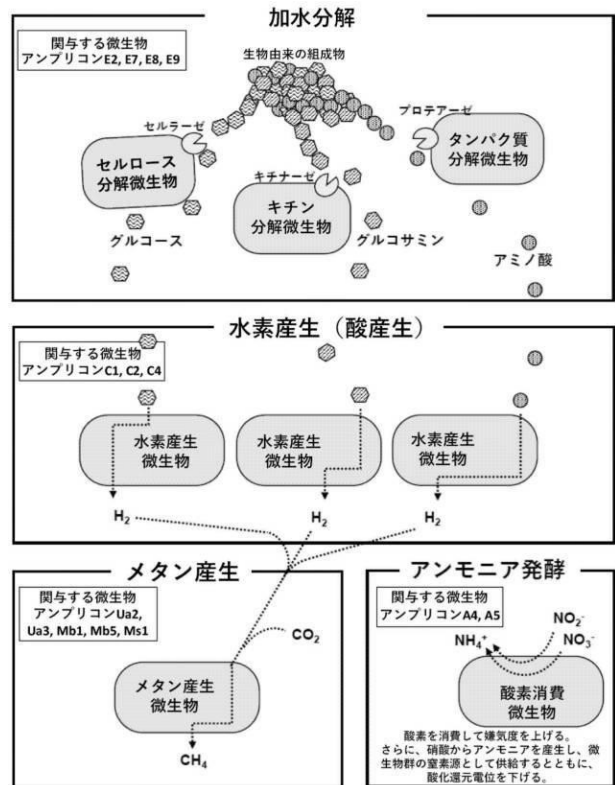
【 図 4 】



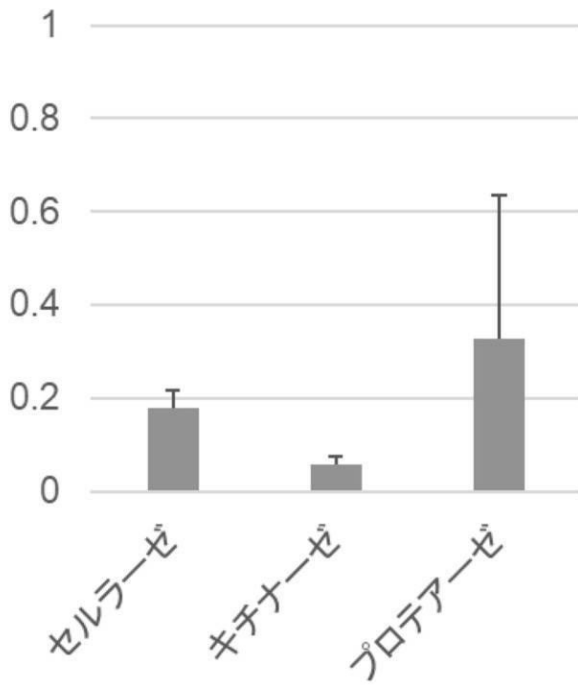
【 図 5 】



【 図 6 】



【図7】



【配列表】

2021193884000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 0 2 F 3/00 (2006.01)	C 0 2 F 11/04	A	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 0 2 F 3/00	G	
	C 1 2 N 15/11	Z	