

水素生成菌の探索とホタテガイ中腸腺の水素発酵

能登裕子, 中川良二, 八十川大輔, 長島浩二

Screening of hydrogen-producing bacteria and their fermentation activity in scallop digestive gland homogenates

Hiroko Noto §, Ryoji Nakagawa, Daisuke Yasokawa and Koji Nagashima

Twenty eight anaerobic bacteria were screened in the soil around Ebetsu city, and identified as *Clostridium* species by homology analysis of 16SrRNA. Of these, 2 bacteria (*Clostridium acidisoli*), No. 11 and No. 22, have a hydrogenase gene and produce hydrogen gas in the scallop digestive gland homogenates.

Hydrogen fermentation by these bacteria effectively decreased the protein content in the scallop digestive gland homogenates by 25%.

These results demonstrate that use of hydrogen-producing fermentation of soil *Clostridium* bacteria might decrease the solid waste produced in seafood processing.

北海道ではホタテ、サケ、ジャガイモ、ビートなどの主要農水産物が大規模に生産され、それらを原料に各種食品が生産されている。これらの加工処理工程中に大量の未利用残渣や副産物が生じ、これらの処理コストが加工業者の経営を圧迫している。さらに、食品リサイクル法の施行に伴い、廃棄物の処理費用が増大し、未利用残渣や副産物の有効利用、廃棄物の低減化が強く求められている。特にホタテ貝加工処理残渣(中腸腺)は多水分、重金属(カドミウム)を含むために処理が難しく、排出量も毎年約3万トンである。

これまで、田口ら¹⁾はシロアリから分離した水素生成菌により糖質を基質にした水素発酵を行っているが、タンパク質を基質にした水素発酵の検討はこれまでほとんど行われていない。タンパク質が豊富である水産加工廃棄物の水素発酵技術が開発されれば、水素発酵で生成される水素ガスをエネルギーとして利用すると同時に廃棄物の低減化につながる事が期待される。

そこで、本研究では、タンパク質を基質とし、水素生成菌によるホタテ貝加工処理残渣(中腸腺)の発酵によ

り、水素ガスを生成させると同時にその低減化を図ることを目的に、土壌から水素生成菌をスクリーニングし、ホタテガイ中腸腺を基質とした水素発酵について検討を行った。

実験方法

1. 水素生成菌の探索とスクリーニング

北海道江別市近郊(岩見沢市、長沼町、南幌町、江別市(当センター))の土壌をグルコース培地²⁾(組成:グルコース2%,ポリペプトン2%, KH_2PO_4 0.4%,酵母エキス0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%,L-システイン塩酸塩一水和物0.2%)に添加し、30℃で1週間嫌気培養(ガス組成:CO₂10%,H₂10%,N₂80%)して、コロニーを釣菌した。

得られたコロニーの16SrRNA遺伝子の塩基配列を決定し、ホモロジー検索³⁾を行い菌種を推定した。ヒドロゲナーゼ遺伝子検出用プライマーは*Clostridium*属6種類の塩基配列を参考に設計(F:ATATGACAATAATGGAAGAAG,R:TCTTGTTGTTATAACTGCATC)

事業名:一般試験研究

課題名:食品加工廃棄物の処理に関するシステム技術の開発

した。これらのプライマーと菌同定時に用いた DNA テンプレートを用いて PCR を行い、増幅された DNA を 2.5% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色してバンドを検出した。

2. 発酵処理

ホタテウロ（中腸腺）に一定量の生理食塩水を加えてホモジネートを調製し、オートクレーブ処理を行った後に、菌液（20% 菌液量）を加えて一定期間嫌気培養を行った。

3. 生成ガスおよび培養液の分析

培養中に生成したガス量は水上置換法により、ガス組成はガスクロマトグラフィーを用いて測定した。

タンパク質量は Coomassie 試薬を用いて、グルコース量は、F キット (Roche)^{4) 5)} で定量した。

COD（化学的酸素要求量）は重クロム酸カリウム法により測定した。

実験結果および考察

1. 水素生成菌の分離

江別市近郊の土壌を嫌気培養して得られたコロニーを表 1 に示した。Clostridium 属 28 株が取得され、C. acidisoli が 21 株を占め、Clostridium 属以外のものは見られなかった。

得られた菌株の内、水素生成に深く関与するヒドロゲナーゼ遺伝子を持つと推定されたものは C. sardiniense 1 株、C. acidisoli 3 株であり、C. acidisoli の 2 株（分離菌株番号 11, 22（以下菌株 11, 22 と表記））が安定的に培養が可能であることが明らかとなった。このことから、C. acidisoli 2 株を水素生成有望株とし、以下のホタテウロの発酵試験に供した。

2. ガスおよび水素生成

3 種のウロ濃度のホモジネートに水素生成有望株を接種して培養した時のガス生成量と水素濃度を表 2 に示した。菌株 11, 22 共にウロ濃度が低い培養液ほど発生ガス量が多くなり、発生ガス中の水素濃度は何れのウロ濃度においても約 25% で、25% ウロ濃度培養での水素生成量（いずれも約 1.8L/ウロ湿重量 kg）が最も多くなった。田口ら¹⁾ の分離した水素生成菌 AM21B 株は、砂糖 1g から約 0.6L の水素ガスを生成させる。ホタテガイ中腸腺中には 0.41g/ウロ湿重量 kg のグルコースが存在するが、これから生成する水素ガス量は、上記 AM21B 株の場合を参考にすると 0.25L/kg となる。今回の中腸腺の水素発酵では、25% ウロ濃度で 1.83L/kg の水素ガスが生成していることから、当該ガスのほとん

どは、糖由来でなく、ウロの分解物（アミノ酸など）から由来したものと考えられた。

ガス生成は、菌株 11 は、ウロ濃度 100, 50, 25% でそれぞれ培養開始から 143 時間後、165 時間後、115 時間後で、菌株 22 では、143 時間後、121 時間後、23 時間後で最大となり、その後ほとんど生成しなかった。水素の生成もガスと同様な傾向を示し、菌株 11, 22 共にウロ濃度が高くなるほどガス生成までの時間が長くなる傾向を示した。柘植ら⁶⁾ によると重金属（カドミウム）の影響により微生物の増殖が阻害されることが明らかになっている。このことから、ウロ濃度が高くなるとウロに含まれる重金属（カドミウム）の影響から菌の増殖が阻害されるため、ガス生成までの時間が長くなることが推察された。

3. 発酵による有機物の低減化

水素発酵によりウロ中の有機物の低減化の比率を調べるために、培養前後でのグルコース量とタンパク質量を測定し、低減化率を求めたものを表 3 に示した。グルコース及びタンパク質の低減化率は、何れの試験区においても、グルコースは約 90%、タンパク質は約 50% であった。さらに、COD は、ウロ濃度が低くなるほど下がることが分かった。

このように、菌株による水素生成の違いは、ほとんど認められないが、ウロ濃度 25% で培養した時、最も多く生成し、有機物の低減化に関しては、グルコース及びタンパク質の低減化率は、何れの試験区においても、グルコースは約 90%、タンパク質は約 50% 低減化していた。以上のことから、本研究で有望株とした 2 株を用いてウロ濃度 25% で培養を行うと良好な水素生成と有機物の低減化を行うことができることが明らかとなった。

タンパク質の分解率をさらに上げるためには、発酵中の pH の調整や連続式発酵法の採用などを検討する必要があると思われる。COD を排水基準値以下に下げることが出来れば、上澄をそのまま排水することができ、残渣はカドミウムと分離して肥料等に利用可能となる。また、これらに必要なエネルギーの一部は生成した水素ガスで賄うことができることから、処理コストの削減が可能となると考えられる。

要 約

土壌中より嫌気性菌を 28 株分離し、この中から安定的に培養できる水素ガス生成菌 2 株（何れも Clostridium acidisoli の近縁菌）を選抜した。これらの菌株はホタテウロ 25% 濃度のホモジネートでの培養で良好に水素ガ

表1 土壌から探索した菌株リスト

分離菌株 番号	採取場所	菌種	一致率	ヒドロゲナーゼ 遺伝子
1	当センター	<i>Clostridium sp.</i>	98%	無
2	当センター	<i>Clostridium sp.</i>	98%	無
3	当センター	<i>Clostridium sp.</i>	98%	無
4	当センター	<i>Clostridium sardiniense</i>	99%	有
5	岩見沢	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
6	岩見沢	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
7	岩見沢	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
8	岩見沢	<i>Clostridium acidisoli</i>	97%	無
9	岩見沢	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
10	岩見沢	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
11	岩見沢	<i>Clostridium acidisoli</i>	99%	有
12	岩見沢	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
13	南幌	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
14	南幌	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
15	南幌	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
16	南幌	<i>Clostridium acidisoli</i>	97%	無
17	南幌	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
18	南幌	<i>Clostridium sp.</i>	95%	無
19	南幌	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
20	南幌	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
21	長沼	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
22	長沼	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	有
23	長沼	<i>Clostridium beijerinckii</i>	97%	無
24	長沼	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無
25	長沼	<i>Clostridium sp.</i>	92%	無
26	長沼	<i>Clostridium acidisoli</i>	99%	無
27	長沼	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	有
28	長沼	<i>Clostridium acidisoli</i>	98%	無

表2 ウロの水素発酵時の発生ガス量と水素量

分離菌株 番号	ウロ濃度 (%)	ガス発生量 (L/ウロ湿重量 kg)	水素濃度 (%)	水素量 (L/ウロ湿重量 kg)
	100	1.90	25	0.48
11	50	2.88	23	0.66
	25	7.05	26	1.83
	100	1.41	23	0.32
22	50	2.38	22	0.52
	25	7.10	25	1.78

表3 ウロの水素発酵前後での有機物量

分離菌株番号	ウロ濃度 (%)	グルコース量		タンパク質量		COD (g/L)
		g/kg	%	g/kg	%	
	100 (培養前)	0.41	100	1.331	100	315
			(低減化率*)		(低減化率)	
	100	0.016	96	0.798	40	311
11	50	0.0035	98	0.255	62	168
	25	0.0026	97	0.152	54	108
	100	0.035	91	0.463	65	294
22	50	0.0069	97	0.253	62	146
	25	0.016	84	0.121	64	82

*低減化率：(培養前-培養後)/(培養前)×100

スを生成し(約1.8L/ウロ湿重量kg), グルコースは約90%, タンパク質は約50%低減化することが明らかになった.

文 献

- 1) 田口文章, 長谷川勝重, シロアリから分離した水素生成菌による廃棄物処理と水素産生, 用水と廃水, 36, 3, 225-232, (1994).
- 2) Tetsuya Doi, Hisami Matsumoto, Fumitaka Shinya, Nobuko Ohshita, Yutaka Takemoto and Tsukasa Shinada, Hydrogen fermentation using microflora from Organic wastes, Biotechnology of Lignocellulose Degradation and Biomass Utilization, K. Ohmiya, K. Sakka, S. Karita, T. Kimura, M. Sakka and Y. Onishi, UNI PUBLISHERS CO., LTD, Japan, 847-852, (2003).
- 3) 長島浩二, 八十川大輔, 中川良二, 池田隆幸, 塩基配列に基づく細菌同定法の食品マイクロフローラ解析への応用, 日食科工誌, 45, 58-65 (1998).
- 4) Beutler, H.O. & Michal, G., Neue Methode zur Enzymatischen Bestimmung von Äthanol in Lebensmitteln, *Z. Anal. Chem.* 284, 113-117 (1977).
- 5) Beutler, H.O., in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.), *Verlag Chemie, Weinheim*, Deerfield Beach/Florida, Basel, 3rd, VI, 598-606, (1984).
- 6) 柘植利久, 松本貞義, 重金属化合物の土壤微生物に及ぼす影響に関する研究, 近畿大学農学部紀要, 10, 53-69 (1977).