有機物分解能に優れた高機能土壌バイオリアクターの開発

劉 文,^{1a} 西垣内祐太,¹ 荒木 誉之,¹ 李 学広,¹
渡邊 哲弘,¹ Wituspong Salikupt,² 汐見 浩二,² 豊原 治彦^{1*}

(2014 年 2 月 24 日受付, 2014 年 9 月 28 日受理)

¹京都大学農学研究科, ²FIC-LACTO CO., LTD.

Development of a soil bioreactor for efficiently degrading organic matter

WEN LIU,^{1a} YUTA NISHIGAITO,¹ YOSHIYUKI ARAKI,¹ XUEGUANG LI,¹
TETSUHIRO WATANABE,¹ WITUSPONG SALIKUPT,² KOJI SHIOMI²
AND HARUHIKO TOYOHARA^{1*}

¹Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo, Kyoto 606-8502, Japan, ²FIC-LACTO CO., LTD., Ladprao, Bangkok 10230, Thailand

Amylase and protease-producing bacteria isolated from gapi (a traditional fermented Thai food) were used to develop an efficient bioreactor by immobilizing their enzymes with various soils and filter materials. The bioreactor would efficiently degrade excess organic matter originating from overloaded food in culture ponds, thereby improving water quality. Amylase- and protease-producing bacteria were detected in all gapi samples tested. The enzyme extract of gapi was immobilized with soils and filter materials to compare the ability to adsorb these materials. As a result, the amylase and protease adsorption ability significantly differed among the soils and filter materials. In particular, soil collected from Shibecha (Hokkaido) demonstrated a high ability to adsorb amylase and protease of gapi. This ability was possibly ascribed to the high concentration of amorphous aluminum according to an analysis of soil components. Therefore, aluminum oxide was tested as a candidate immobilization carrier for the bioreactor and was found to have high ability to adsorb amylase and protease of gapi as expected. These results suggest that a bioreactor that can efficiently degrade organic matter in culture ponds could be developed by immobilizing gapi enzymes with soils with a high content of amorphous aluminum or pure aluminum oxide.

キーワード：アミラーゼ, アルミニウム, 吸着, 酵素, 土壌, バイオリアクター, プロテアーゼ

エビ養殖は東南アジアにおいて主要産業として発展し続けているにも関わらず、多発する疾病等の問題で生産が安定しないのが現状である。^{1,2)} その原因の一つとして、生産性を追求するために高密度養殖を行ってきた結果、水質が悪化したことが挙げられる。^{2,3)}

病気の発生と養殖池の環境（水質や底泥）悪化は、表裏一体の関係があると言われている。⁴⁾ 養殖池の水質悪化原因としては、残餌やエビ由来の糞、プランクトン等の有機物の底泥への蓄積が挙げられる。⁵⁾ 過剰量の有機物が底泥に蓄積すると、それを栄養源とする微生物が増殖し、溶存酸素の消費による底泥の嫌気化やヘドロの堆積が起こり、最終的には養殖池の水質が悪化する。^{6,7)} そ

の結果生じる生体へのストレスが、Vibrio 属をはじめとする病原微生物あるいはウイルスによる疾病を誘発し、大量死を招く。⁴⁾ このような養殖池の水質・底泥の悪化及び、それが招く病原菌・ウイルスの感染等の問題に対して、従来から合成抗菌剤や抗生物質等の薬剤が使用されてきた。^{8,9)}

しかし、疾病を予防・抑制するための薬剤の継続的な使用が薬剤耐性菌を発生させ、エビ養殖に更なる被害を招いているのが現状である。¹⁰⁾ また近年、消費者の健康志向の高まりから、これまで疾病の治療・予防に用いられてきた薬剤の使用が避けられる傾向にあり、それに代わる病気対策として、プロバイオティクス等の有用微生

* Tel : 81-75-753-6446. Fax : 81-75-753-6446. Email : toyohara@kais.kyoto-u.ac.jp

^a 現所属：日本学術振興会特別研究員（Kojimachi Business Center Building, 5-3-1 Kojimachi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083）

物を取り入れる動きが進んでいる。¹¹⁾ 有用微生物の活用により、エビの生存率の向上、免疫力強化や成長促進等の生体への効果があることがいくつかの報告で明らかとなっている。¹²⁻¹⁴⁾ また、その結果として、養殖場の微生物層が変化し、水質改善に寄与し得ることもいくつかの研究で示唆されている。^{9,15)}

一方、これまでに Liu and Toyohara の研究から、湿地帯における有機物分解は、そこに生息する生物が体内に直接有機物を取り込むことによるだけでなく、これらの生物が体外に酵素を分泌し、それらの酵素が底泥の土壌成分に吸着し、生物とは独立した一種のバイオリアクター（土壌バイオリアクター）として機能することによって引き起こることが明らかにされてきた。¹⁶⁾ しかし、養殖場の水質浄化目的で、このようなバイオリアクター機能を利用して底泥をデザインするという研究は皆無である。バイオリアクターの酵素の由来として用いる菌は、養殖場での利用を考慮すると、食品由来であることが望ましく、また本研究はタイのエビ養殖場での利用を念頭に置いているため、塩漬けエビを発酵させて製造するタイの伝統的な調味料¹⁷⁾であるガピ（電子付録 appendix_1; https://www.jstage.jst.go.jp/article/suisan/81/1/81_14-00011/_article/supplement/-char/ja/）に注目し、安全性且つ有機物分解能に優れる土壌バイオリアクターの開発を目的とした。

材料と方法

タイ伝統発酵食品からの菌の単離及び培養 人工海水、Nine Salt Solution (NSS; 17.6 g NaCl, 1.47 g Na₂SO₄, 0.08 g NaHCO₃, 0.25 g KCl, 0.04 g KBr, 1.87 g MgCl₂・6H₂O, 0.41 g CaCl₂・2H₂O, 0.01 g SrCl₂・6H₂O, 0.01 g H₃BO₃, 蒸留水 1000 mL) を調製し、9 cm シャーレを用いてエビ餌-NSS 寒天培地プレート（ヒガシマル製バイタルブローン 1%, 寒天 1.5% in NSS）を作製した。なお、培地調製の際にはバイタルブローンをあらかじめ終濃度 1% となるように加温により溶解し、不溶物はガーゼでろ過することにより除去した溶液に各試薬を溶解した。また、バンコクのクロントイ市場で入手した 10 種類のタイ伝統発酵食品（ガピ A-J）を少量の滅菌水に懸濁し、NSS-エビ餌寒天培地に塗抹後、インキュベーター（HB-100, タイテック）内で 37°C において 24 時間の培養を行った。培養後、ランダムに 16 個のコロニーを選択し、オートクレーブ滅菌したエビ餌-NSS 寒天培地に播種した。培養は 37°C において 24 時間行った。本研究では、すべてナカライテスク株式会社から購入した特級試薬を用いた。

プレートアッセイによる発酵食品由来菌のアミラーゼ活性の評価 10 種類の発酵食品（ガピ A-J）由来の菌 16 株を選択し、オートクレーブ滅菌したエビ餌-NSS

寒天培地プレートに播種し、インキュベーター内で 25°C において 24 時間培養を行った後、0.01 N ヨウ素溶液（3 g KI, 1.27 g I₂, 1000 mL 蒸留水）を加え、5 分間染色した。アミラーゼ活性は、コロニーを中心とする円状の非染色域として確認した（電子付録, appendix_2; https://www.jstage.jst.go.jp/article/suisan/81/1/81_14-00011/_article/supplement/-char/ja/）。なお、非染色域の大きさが 10 mm 以上のコロニーを黒色、10 mm 未満のものを灰色、検出できないものを白色として、酵素活性レベルの指標とした（電子付録, appendix_3; https://www.jstage.jst.go.jp/article/suisan/81/1/81_14-00011/_article/supplement/-char/ja/）。

プレートアッセイによる発酵食品由来菌のプロテアーゼ活性の評価 10 種類の発酵食品（ガピ A-J）由来の菌 16 株を選択し、オートクレーブ滅菌したエビ餌-NSS 寒天培地プレートに播種し、インキュベーター内で 25°C, 24 時間培養を行った後、CBB (Coomassie Brilliant Blue R250) 溶液を加え、15 分間染色した。その後、10% 酢酸と 25% メタノールとの混液で脱色した。プロテアーゼ活性は、コロニーを中心とする円状の非染色域として確認した（電子付録, appendix_2）。なお、非染色域の大きさが 10 mm 以上のコロニーを黒色、10 mm 未満のものを灰色、検出できないものを白色として、酵素活性レベルの指標とした（電子付録, appendix_3）。

16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく発酵食品由来株の相同性検索 培養後のエビ餌-NSS 寒天培地から単一コロニー（10 種類×16 株）をピックアップし、50 µL の滅菌水に懸濁した。これらの細菌懸濁液を 95°C で 5 分間加熱した後、PCR 反応のテンプレートとして用いた。プライマーは、Ishii *et al.*¹⁸⁾ に従い、modified 27F (5'-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3') と 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') を用いた。PCR の反応条件は 95°C, 10 分間を 1 サイクル, 95°C, 30 秒間, 53°C, 30 秒間, 72°C, 1 分間を 30 サイクル, 72°C, 7 分間を 1 サイクルとし、サーマルサイクラー（アステック, PROGRAM TEMP. CONTROL SYSTEM PC-701）を用いて行った。反応液の組成は、template 1 µL, 10×buffer 1 µL, dNTP 1 µL, MgCl₂ 0.3 µL, primer 1 µL (forward 及び reverse), Taq DNA polymerase 0.05 µL, 滅菌水 4.65 µL であった。得られた PCR 産物を、エチジウムブロマイドを含む 1% アガロースゲルで電気泳動し、紫外線を照射してバンドを確認した。約 1,500 bp の PCR 産物の増幅を確認後、残りの PCR 産物を *MspI* で分解し、分解多型をエチジウムブロマイドを含む 2% アガロースゲルを用いた電気泳動で解析した。異なる分解多型を示したそれぞれの PCR 産物の上流約 500 bp の塩基配列を決定した（オペ

ロンバイオテクノロジー)。得られた塩基配列について BLAST を利用し、相同性解析を行った。

土壌及び市販濾過材 吸着実験に用いた土壌は、10 種類の湿地帯土壌（網走湖，北海道；石狩川，北海道；沙流川，北海道；野付湾，北海道；風蓮湖，北海道；小川原湖，青森県；田中川，三重県；緑川，熊本県；大正池，沖縄県；マーレ川，沖縄県），3 種類の陸地土壌（標茶^{しべらち}，北海道；永源寺，滋賀県；京都大学圃場，京都府），2 種類のエビ養殖場底泥（バナメイエビ養殖場，タイ王国チャンタプリー県；クルマエビ養殖場，熊本県），2 種類の標準粘土（カオリナイト，日本粘土学会；ゲータイト，シグマ アルドリッチ ジャパン），5 種類の市販濾過材（メガリング GM-18172，ジェックス；メガバイオ GM-18171，ジェックス；プラチナソイルスーパーパウダー，JUN COMPANY LIMITED；ゼオライトサンド，Leaf Corporation；サブストラット プロ レギュラー，エーハイム ジャパン）の計 22 種類である。Figure 1 に湿地帯及び陸地土壌のサンプリング

地点を示す。なお，土壌及び市販濾過材は低温乾燥機（PS-420, ADVANTEC）を用いて 42℃ で乾燥させた後に，121℃ にて 15 分間オートクレーブした。

各種土壌のアミラーゼ吸着能の比較 土壌バイオリアクターの作製にあたっては，バンコクの市場において最も容易に入手可能であったガピ E を用いた。エビ餌-NSS 液体培地（エビ餌-NSS 寒天培地から寒天を除去したもの）100 mL に対して 1 g（湿重量）のガピ E を加え 37℃ で 24 時間培養を行い，その培養液を吸着実験に使用した。土壌と酵素の吸着反応を行うため，オートクレーブ済の土壌 0.1 g が入った 1.5 mL チューブに 1 mL のガピ培養液を加え，ローテーター（Tube Rotator TR-350, アズワン）を用いて，25℃ において 1 時間，土壌と培養液の混合を行った。その後，土壌懸濁液を 13,000×g で 5 分間遠心分離し，上清を除いた。沈殿に 1 mL の人工海水（NSS）を加え攪拌し，13,000×g で 5 分間遠心分離後，上清を除いた。この洗浄操作をもう 1 度繰り返した後に，1% デンプン溶液（100 mL の 0.2

Fig. 1 Sampling sites of land and wetland soils.

M リン酸緩衝液 pH 7.4 に 1 g の可溶性デンプンを溶解) 1 mL を加え, 25°C で 6 時間, ローテーターを用いて反応後, 13,000×g で 5 分間遠心分離した。得られた上清 50 μ L に 1 N HCl を 50 μ L 加え反応を停止後, 0.1 N ヨウ素溶液 (3 g KI; 1.27 g I₂; 100 mL 蒸留水) 100 μ L と蒸留水 800 μ L を加え, 660 nm における吸光度 (A_{660}) を分光光度計 (UV mini 1240, 島津製作所) を用いて測定した (吸光度 A_1)。オートクレーブすることで酵素活性を失活させたガビ培養液をコントロールとし, 実験群と同様の操作を行い, 660 nm における吸光度 (A_{660}) を測定した (吸光度 A_2)。

吸着実験に用いたガビ培養液の全アミラーゼ活性を求めるために次の実験を行った。15 mL チューブを用いて 1 mL のガビ培養液と 1% デンプン溶液 1 mL を 25°C で 6 時間, ローテーターを用いて反応させた。その後, 13,000×g で 5 分間遠心分離し, 上清 50 μ L に 1 N HCl を 50 μ L を加え反応を停止後, 上記と同様に呈色反応を行い, 660 nm における吸光度 (A_{660}) を測定した (吸光度 B_1)。

オートクレーブすることで酵素活性を失活させたガビ培養液をコントロールとし, 実験群と同様の操作を行い, 660 nm における吸光度 (A_{660}) を測定した (吸光度 B_2)。土壌 (0.01 g) が 1 時間あたり吸光度を 0.01 下げる酵素活性を 1 unit と定義し, 各種土壌のアミラーゼ吸着量を求めた。得られた結果について IBM SPSS Statistics (Ver. 22, IBM) を用いた多重比較検定法 (Tukey HSD test) により, 有意差検定を行った ($p < 0.05$)。

各種土壌へのアミラーゼ吸着率は次式で算出した。

アミラーゼ吸着率 (%)

$$= \frac{\text{吸光度 } A_2 - \text{吸光度 } A_1}{\text{吸光度 } B_2 - \text{吸光度 } B_1} \times 100$$

各種土壌のプロテアーゼ吸着能の比較 エビ餌-NSS 液体培地 100 mL に対して 1 g (湿重量) のガビ E を加え, 37°C において 24 時間培養を行い, その培養液を吸着実験に使用した。プロテアーゼ吸着実験では, アミラーゼ吸着実験で吸着率が高かった風蓮湖 (北海道), 大正池 (北海道), マーレ川 (沖縄県), 標茶 (北海道), 永源寺 (滋賀県), 及びバナメイエビ養殖場 (タイ王国チャンタプリー県) の 6 種類の土壌を使用した。まず, 土壌と酵素の吸着反応を行うため, オートクレーブ済の各種土壌 0.1 g が入った 1.5 mL チューブに 1 mL のガビ培養液を加え, ローテーターを用いて 25°C において 1 時間, 土壌と培養液の混合を行った。その後, 土壌懸濁液を 13,000×g で 5 分間遠心分離し, 上清を除いた。沈殿に 1 mL の人工海水 (NSS) を加えて攪拌し, 13,000×g で 5 分間遠心分離後, 上清を除いた。この洗浄作業をもう 1 度繰り返した後, 1% カゼイン溶液 (100 mL の 0.2 M リン酸緩衝液 pH 7.4 に 1 g のカゼイ

ンを溶解) 1 mL を加え, 25°C において 3 時間, ローテーターを用いて反応させた後に, 13,000×g で 5 分間遠心分離した。得られた上清 150 μ L に反応停止液 (5% トリクロロ酢酸) 150 μ L を加え, 攪拌した後に 30 分間静置し, 再度 13,000×g で 5 分間遠心分離した。その上清を 200 μ L 取り, カゼイン分解物を Lowry 法により呈色し, 660 nm における吸光度 (A_{660}) を測定した (吸光度 a_1)。¹⁹⁾

オートクレーブすることで酵素活性を失活させたガビ培養液をコントロールとし, 実験群と同様の操作を行い, 660 nm における吸光度 (A_{660}) を測定した (吸光度 a_2)。

吸着実験に用いたガビ培養液の全プロテアーゼ活性を求めるために次の実験を行った。15 mL チューブを用いて 1 mL のガビ培養液と 1% カゼイン溶液 1 mL を加え, 25°C において 3 時間, ローテーターを用いて反応させた。その後, 13,000×g で 5 分間遠心分離し, 上清 150 μ L に反応停止液 (5% トリクロロ酢酸) 150 μ L を加え, 混合した後に 30 分間静置し, 再度 13,000×g で 5 分間遠心分離した。その上清を 200 μ L 取り, カゼイン分解物を Lowry 法により呈色し, 660 nm における吸光度 (A_{660}) を測定した (吸光度 b_1)。

オートクレーブにより酵素活性を失活させたガビ培養液をコントロールとし, 実験群と同様の操作を行い, 660 nm における吸光度 (A_{660}) を測定した (吸光度 b_2)。土壌 0.1 g が 1 時間あたり吸光度を 0.01 上げる酵素活性を 1 unit と定義し, 各種土壌のプロテアーゼ吸着量を求めた。得られた結果を IBM SPSS Statistics を用いた多重比較検定法により, 有意差検定を行った ($p < 0.05$)。

各種土壌へのプロテアーゼ吸着率は次式で算出した。

プロテアーゼ吸着率 (%)

$$= \frac{\text{吸光度 } a_1 - \text{吸光度 } a_2}{\text{吸光度 } b_1 - \text{吸光度 } b_2} \times 100$$

非晶質鉄及び非晶質アルミニウム含有量の測定 網走湖, 標茶, 野付湾, 風蓮湖, 石狩川, 沙流川, 永源寺, 京大圃場, 大正池, マーレ川の計 10ヶ所の土壌について, 酸性シュウ酸塩溶解法を用いて土壌中の非晶質鉄及び非晶質アルミニウムの含有量を測定した。²⁰⁾ (NH₄)₂ C₂O₄・H₂O 16.2 g と (COOH)₂・2H₂O 10.8 g を水に溶解し, 1 L に定容したものを抽出用試薬とした。各土壌 1 g を 250 mL ポリエチレン瓶にとり, 抽出用試薬 100 mL を加えて暗室で 4 時間振盪した。懸濁液 35 mL を 50 mL 遠沈管にとり, 4 g/L の SUPERFLOC 07 Plus Flocculant (CYTEC INDUSTRIES INC.) を 1 滴加え, 5,000×g で 10 分遠心分離した。得られた上清をろ紙 (No. 6, ADVANTEC) でろ過し, 得られたろ液を 0.1 M の HCl で 10 倍に希釈した後, 0.45 μ m のフィルター (MILLEX-HP Syringe-driven filter unit, Merck Milli-

pore) で再度ろ過した。得られた抽出液の Fe, Al, Si 含有量を ICP 発光分析 (ICP 発光分析装置 ICPE-9000, 島津製作所) で測定した。

土壌バイオリアクターの餌分解能の検討 エビ餌-NSS 液体培地 100 mL に対して 1 g (湿重量) のガビ E を加え, 37°C において 24 時間培養を行い, その培養液を本実験に使用した。土壌としては, もっとも高い酵素吸着能を示した標茶の土壌を使用した。また, 土壌中では非晶質アルミニウムは空気酸化により生じた Al_2O_3 として存在していることが予想される。そこで, Al_2O_3 とガビ由来の酵素を反応させ, その餌の分解能を調べた。

オートクレープ済の標茶土壌 1, 5, 10 g, または Al_2O_3 5 g が入ったガラスフラスコに 100 mL のガビ培養液を加え, シェーカーを用いて 4°C において 1 時間混合した。その後, 懸濁液を 10 分間静置し, デカンテーションにより上清を除いた。沈殿に 100 mL の人工海水 (NSS) を加えて攪拌し, 10 分間静置後, 同様に上清を除いた。この洗浄操作を 3 回繰り返した。残った土壌に基質としてエビ餌-NSS 液体培地 100 mL を入れて 37°C で温置し, 0, 3, 6, 9, 24, 48 及び 72 時間の反応液を採取した。反応液には腐敗防止のために 2 mM の NaN_3 を添加した。採取した培養液は, 上記と同じ方法でタンパク量及びデンプン量を測定した。

結 果

アミラーゼ及びプロテアーゼ活性の評価 エビ餌-NSS 寒天培地を用いたプレートアッセイにより, 10 種類のガビ由来の菌のデンプン及びタンパク質分解能を評価した結果, すべてのガビにおいて, アミラーゼ及びプロテアーゼ活性を発現する菌が検出された (電子付録, Appendix 2, Appendix 3)。

16S rRNA 遺伝子を用いた発酵食品由来菌の種判別 16S rRNA 遺伝子を用いた PCR-RFLP の結果, ガビ A からは 3 種類, ガビ B からは 6 種類, ガビ C からは 2 種類, ガビ D からは 3 種類, ガビ E からは 3 種類, ガビ F からは 2 種類, ガビ G からは 1 種類, ガビ H からは 1 種類, ガビ I からは 2 種類, ガビ J からは 3 種類の RFLP 多型が検出された。それらの菌の 16S rRNA 遺伝子上流約 500 bp の塩基配列について, BLAST を用いた細菌基準株データベースによる相同性検索を行った結果, *Bacillus* 属, *Virgibacillus* 属, *Lysinibacillus* 属, 及び *Oceanobacillus* 属由来の 16S rRNA 遺伝子と高い相同性を示した (Table 1)。

各種土壌の酵素吸着能の比較 計 22 種類の各種土壌のアミラーゼ吸着能を評価した結果, 土壌間でアミラーゼ吸着能が有意に異なることが示された (Table 2)。特に, 標茶土壌が顕著に高い吸着能 (4.2 units) を示し, それに次いで, 風蓮湖や大正池土壌もそれぞれ 1.7, 1.6

Table 1 Comparison of 16S rRNA gene sequences of bacteria isolated from gapi with those from GenBank

Isolate	Best match in BLAST analysis (16S rRNA gene sequences)	Identity score (% similarity)	GenBank accession Number
A4	<i>Bacillus stratosphericus</i> strain B.Pat.45	100	KF862931.1
A10	<i>B. flexus</i> strain KK5	100	KF704144.1
A12	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain RS-5	100	HM179549.1
B2	<i>B. subtilis</i> strain U1066	100	AB735009.1
B3	<i>Virgibacillus dokdonensis</i> strain U1125	100	AB735044.1
B7	<i>Oceanobacillus</i> sp. BRI 39	100	KF366401.1
B8	<i>B. beijingensis</i> strain TY0111	100	KF477120.1
B9	<i>B. sp. 8-4-E13</i>	96	HF952774.1
B13	<i>B. cereus</i> strain U1079	100	AB735018.1
C7	<i>B. safensis</i> strain B.Pat.55	100	KF862941.1
C14	<i>B. cereus</i> strain U1079	100	AB735018.1
D7	<i>B. licheniformis</i> strain PHM8	99	KF732972.1
D8	<i>B. flexus</i> strain KK5	100	KF848488.1
D10	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i> strain YLB-P28	100	KF376345.1
E1	<i>B. subtilis</i> strain B.Pat.19	100	KF862908.1
E3	<i>B. subtilis</i> strain B.Pat.19	100	KF862908.1
E9	<i>B. subtilis</i> strain B.Pat.19	100	KF862908.1
F3	<i>B. subtilis</i> strain BC39	100	KF733012.1
F8	<i>B. subtilis</i> strain PRBD09	100	KF704144.1
G10	<i>B. amyloliquefaciens</i> strain BEB33	100	KJ009336.1
H10	<i>B. amyloliquefaciens</i> strain PKM16	100	KF732989.1
I1	<i>B. cereus</i> strain B.Pat.52	100	KF862938.1
I7	<i>B. pumilus</i> strain MUST-3	100	F727586.1
J2	<i>B. subtilis</i> strain PRBD09	100	KF765648.1
J6	<i>B. cereus</i> strain U1079	100	AB735018.1
J15	<i>B. firmus</i> strain TY0125	100	KF477127.1

units と高い吸着能を示した。高いアミラーゼ吸着能を示した標茶, 風蓮湖, 大正池土壌のアミラーゼ吸着率は, それぞれ 87.2, 41.4, 及び 39.9% であった。

アミラーゼ吸着実験で高い吸着能を示した風蓮湖, 大正池, マーレ川, 標茶, 永源寺, 及びバナメイエビ養殖場の 6 種類の土壌のプロテアーゼ吸着能を評価した結果, 永源寺と標茶土壌がそれぞれ 6.9, 6.4 units と高い吸着能を示し, 次いで大正池やマーレ川の土壌がそれぞれ 5.3, 4.6 units と高い吸着能を示した (Table 2)。なお, 永源寺, 標茶, 大正池及びマーレ川土壌のプロテアーゼ吸着率, それぞれ, 113.7, 105.5, 87.3, 及び 76.4% であった (データ非掲載)。

標茶土壌のバイオリアクター機能の検討 上記の実験の結果から, 標茶土壌が特に強いガビ由来酵素の吸着能を示したことから, 標茶土壌のバイオリアクター担体としての有効性が示された。しかしながら, 上記の実験では使用した土壌が 0.1 g と少量であったこと, 及びモデル基質としてデンプンとカゼインを用いていたことから, 土壌量を 1, 5, 10 g に増やすとともに, エビ餌を基

Table 2 Evaluation of adsorption ability of various materials*

Wetland soil samples			Land soil samples			Shrimp pond samples		
Site	Amylase activity (units)	Protease activity (units)	Site	Amylase activity (units)	Protease activity (units)	Site	Amylase activity (units)	Protease activity (units)
Lake Abashiri	0.1 ± 0.1^{abc}	ND	Shibecha	4.2 ± 0.2^g	6.4 ± 0.2^{cd}	Kuruma shrimp pond	0.2 ± 0.2^{abc}	ND
Ishikari Riv.	0.5 ± 0.4^{abcd}	ND	Eigen Temple	1.3 ± 0.1^{ef}	6.9 ± 0.3^d	Vannamei shrimp pond	1.2 ± 0.2^{def}	4.4 ± 0.8^{ab}
Saru Riv.	0.3 ± 0.1^{abc}	ND	Experimental field of Kyoto Univ.	0.8 ± 0.2^{bcde}	ND			
Notuke Bay	0.1 ± 0.1^{ab}	ND						
Lake Furen	1.7 ± 0.2^f	$3.4 \pm 0.0^{a*}$						
Lake Ogawara	0.3 ± 0.3^{abc}	ND						
Tanaka Riv.	0.3 ± 0.1^{abc}	ND						
Midori Riv.	0.1 ± 0.1^{ab}	ND						
Taisho Pond	1.6 ± 0.2^f	5.3 ± 0.4^{bc}						
Mare Riv.	1.6 ± 0.5^f	4.6 ± 0.2^b						

Filter material samples			Clay samples		
Trade name	Amylase activity (units)	Protease activity (units)	Name	Amylase activity (units)	Protease activity (units)
Substrat Pro	0.4 ± 0.3^{abc}	ND	Kaolinite	0.8 ± 0.2^{cde}	ND
Zeolite Sand	0.7 ± 0.3^{abcde}	ND	Goethite	0.1 ± 0.1^{abc}	ND
Mega Bio	0.2 ± 0.2^{abc}	ND			
Mega Ring	0	ND			
Platinum Soil	0.3 ± 0.3^{abc}	ND			

* Values (mean $\pm$ standard deviation of three replicates) not sharing a common superscript are significantly different ($p < 0.05$) in the amylase activity or protease activity, irrelevant to the classification of samples. ND, not determined.

Fig. 2 Proteolysis (a) and amylolysis (b) evaluation of enzyme-adsorbed soil collected in Shibecha.

質として用いて、実用性の検討を行った。

エビ餌タンパク質分解の結果を Fig. 2a に示す。土壌 1 g を使用した場合にはエビ餌タンパク質は 3 時間で約 50%, 72 時間で約 80% 分解された。一方、土壌 5 g 及び 10 g を使用した場合には 3 時間で約 90% が分解され、その後分解は進行しなかった。

エビ餌デンプン分解の結果を Fig. 2b に示す。用いた土壌量に関わらず 3 時間でエビ餌デンプンの 60% 以上が分解されたが、その後用いる土壌量によって程度は異

なるが、一旦分解が見かけ上分解は停滞し、9 時間以降再び徐々に分解が進行した。72 時間後には、いずれの土壌量の場合でも、約 90% のデンプンが分解された。

非晶質鉄及び非晶質アルミニウム含有量 土壌には鉄やアルミニウムなどが粘土などの二次鉱物中や有機物と結合し非晶質として多く含まれていることから、それらの含有量を調べた。各地点の土壌サンプルの非晶質鉄の含有量は、標茶 5.4 g/kg, 風蓮湖 14.1 g/kg, 大正池 7.3 g/kg, マーレ川 6.5 g/kg, 永源寺 1.6 g/kg, 京大圃

Fig. 3 Proteolysis and amylolysis evaluation of enzyme-adsorbed aluminum oxide.

場 4.1 g/kg, 網走湖 0.8 g/kg, 沙流川 3.0 g/kg, 野付湾 3.4 g/kg, 石狩川 3.3 g/kg であった。また、非晶質アルミニウムの含有量は、標茶 27.4 g/kg, 風蓮湖 2.8 g/kg, 大正池 1.3 g/kg, マーレ川 1.3 g/kg, 永源寺 1.8 g/kg, 京大圃場 2.0 g/kg, 網走湖 0.1 g/kg, 沙流川 0.5 g/kg, 野付湾 0.5 g/kg, 石狩川 0.3 g/kg であった。

酸化アルミニウム (Al_2O_3) のバイオリアクター機能の検討 上記に示したように、他の土壌に比べて酵素吸着能が高かった標茶の土壌は、非晶質アルミニウムの含有量が他の土壌に比べて多かった。土壌中で非晶質アルミニウムは空気酸化により生じた Al_2O_3 として存在していることが予想されるので、標茶土壌の酵素吸着能は Al_2O_3 に由来する可能性が示唆された。そこで、 Al_2O_3 とガビ由来の酵素を反応させ、餌の分解能を調べた。

ガビ由来酵素を吸着させた Al_2O_3 のエビ餌タンパク質とデンプンの分解を Fig. 3 に示す。タンパク質分解反応では、6 時間までは全く分解が認められなかったが、6 時間後から 9 時間後にかけて 45% のタンパク質分解反応が起こった。その後 24 時間までは分解が急速に進行し、約 70% のタンパク質が分解されたが、24 時間以降は分解の進行は顕著に低下した。

一方デンプン分解反応では、3 時間で約 55% のデンプンが分解された。6 時間後まで見かけ上反応は停滞し、6 時間以降緩やかに分解反応が進行し、72 時間後には 85% のデンプンが分解された。

考 察

これまでに発酵食品由来の微生物がエビの成長や生存率、水質改善に有益であることがいくつかの研究によって示されており、抗生物質に代わる疾病対策としての期待が高まりつつある。¹⁰⁾ 本研究では、土壌にバイオリアクターとしての機能を付与するために、発酵食品由来の酵素及び微生物に注目した。

日本の伝統発酵食品として納豆と鮎鮠に注目し、エビ餌-NSS 寒天培地を用いて、それらのアミラーゼ活性及びプロテアーゼ活性を評価した結果、納豆由来の菌からはプロテアーゼ活性のみが、鮎鮠由来の菌からは僅かなアミラーゼ活性のみが検出された（データ非掲載）。韓国の伝統発酵食品であるキムチ由来の酵素活性について調べたところ、納豆と同様にプロテアーゼ活性のみが検出された（データ非掲載）。一方、タイの伝統発酵食品であるガビ由来菌の酵素活性について調べた結果、アミラーゼとプロテアーゼの両方の活性が高いことが明らかになった。

養殖場の水質悪化原因としては、未分解の餌や糞に由来するタンパク質やデンプン等の有機物が考えられる。これらのタンパク質やデンプンを分解するためには、プロテアーゼやアミラーゼが必要であるが、本研究では安心安全な食品由来酵素としてガビ由来のプロテアーゼとアミラーゼに注目した。

ガビ由来菌の酵素活性の評価及び 16S rRNA 遺伝子を用いた種判別の結果、同じ菌種においても、菌株毎に酵素活性の強度に違いが見られた。この結果から、これらの微生物を実際に養殖場において活用する際には、底泥に残留した有機物を分解するプロテアーゼやアミラーゼ等を大量に分泌する菌株を選択し、使用することが効率的であると考えられた。また、16S rRNA 遺伝子を用いた種判別の結果、すべてのガビに *Bacillus* 属に属する菌が含まれていた (Table 1)。*Bacillus* 属はエビの成長や免疫力及び生存率の向上、水質改善の効果がある事が示されているが、^{14,21,22)} これらの効果は、*Bacillus* 属が持つ高いプロテアーゼやアミラーゼ活性に由来するのかもしれない。

本研究では有機物分解能に優れた養殖場底泥のデザインを最終的な目的として、各種底泥及び市販濾過材の酵素吸着能を比較した。その結果、それらの間で有意に酵素吸着能が異なることが明らかになった (Table 2)。このことから、酵素吸着能に優れた土壌を用いることで、養殖場底泥に蓄積する未分解の有機物を効率的に分解できる底泥をデザインできる可能性が示唆された。なお、今回用いた土壌資料は 0.1 g と少量であったため、各地点の土壌の性質を代表しているとは言えない。しかし今回の実験の結果は、少なくとも土壌の成分により酵素の吸着能に大きな違いがあることを示している。

各種土壌へのプロテアーゼ吸着実験では、吸着に使用した培養液の全活性よりも永源寺及び標茶土壌に吸着したプロテアーゼ活性の方が高かった。これまでに、ケイ素とアルミニウムが一定の結合をした準品質粘土鉱物（アロフェン）が、土壌中の酵素活性を促進するという報告や、²³⁾ 粘土鉱物が酵素を安定化させプロテアーゼによる分解を軽減する等の報告がある。^{24,25)} これらの知見

から、培養液の全活性よりも永源寺及び標茶土壤に吸着したプロテアーゼ活性の方が高いという結果は、土壤に含まれるアロフェン等の粘土鉱物がガビ由来のプロテアーゼの活性を高める、あるいはプロテアーゼを安定化させ、自己消化を防ぐことによるのではないかと考えられる。

Table 2 に示した各種土壤のガビ由来酵素の吸着能を比較した結果から、標茶で採集した土壤は特に強いアミラーゼ及びプロテアーゼ吸着能を示した。標茶土壤のバイオリアクター担体としての機能を土壤 1, 5, 10 g を用いて検討した。その結果 Fig. 2 に示すように、反応 3 時間で強いタンパク質及びデンプン分解能が認められた。Table 2 に示した実験では 0.1 g と少量の土壤を使用していたため、標茶土壤のバイオリアクター担体としての適性を判断するには懸念が残されたが、Fig. 2 で 10 g の土壤を用いても強い分解能が示されたことから、標茶土壤のバイオリアクター担体としての有用性が実用レベルで確認された。

酸性シュウ酸塩溶解法は有機物と結合したアルミニウムや粘土など二次鉱物中に存在するアルミニウムなどの非晶質のアルミニウムの含量を測定するのに適した方法である。²⁰⁾ ガビ由来酵素に対して強い吸着能を示した標茶の土壤について同溶解法を用いて調べた結果、特に高濃度のアルミニウムを含んでいた。標茶の土壤の有機物含量は比較的少ないことから、土壤中ではアルミニウムの大部分は空気酸化により生じた Al_2O_3 として存在していることが予想される。そこで Al_2O_3 とガビ由来の酵素を反応させ、餌の分解能を調べた (Fig. 3)。その結果、固定化させた酵素は強いタンパク分解能やデンプン分解能を示したことから、 Al_2O_3 がバイオリアクター担体として優れた機能を持つことが明らかになった。

本研究により、ガビ由来の酵素が標茶で採取した土壤に特によく吸着しエビ餌に含まれるタンパク質とデンプンを分解すること、標茶土壤に多く含まれる非晶質アルミニウムがバイオリアクター担体として優れた機能を持つことが示された。酵素を吸着したバイオリアクター土壤は養殖池の溶存酸素の低下を伴わないため、養殖池の底泥環境を悪化させることなく水質を改善することができることが期待される。今後は、水槽等を用いた実際の飼育環境下で本土壤バイオリアクターの水質浄化能を検証する必要がある。

謝 辞

本研究を行うにあたり、京都大学大学院情報学研究科生体情報処理分野の前川真吾氏に有益なご助言を賜った。また、本研究の一部は、独立行政法人日本学術振興会のアジア研究教育拠点事業、日本学術振興会科学研究費 (21380131, 25292113, 12J04439)、一般財団法人

東和食品研究振興会の援助によって行われた。ここに深く謝意を表する。

文 献

- 1) Flegel TW. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* 2006; **258**: 1-33.
- 2) 浜野かおる, 筒井 功, 前野幸男. 東南アジア諸国における汽水産エビ養殖の現状と問題点—タイの事例を中心として—. 日本水産学会誌 2010; **76**: 1123-1128.
- 3) Lightner DV. Diseases of cultured penaeid shrimp. *CRC Handbook of Mariculture* 1993; **1**: 393-484.
- 4) Kautsky N, Rönnbäck P, Tedengren M, Troell M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 2000; **191**: 145-161.
- 5) Simon JF, Matthew RPB. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. *Aquaculture* 1998; **164**: 117-133.
- 6) Michele AB, Andrew RL. High ammonium production from sediments in hypereutrophic shrimp ponds. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2001; **224**: 187-195.
- 7) Avnimelech Y, Ritvo G. Shrimp and fish pond soils: processes and management. *Aquaculture* 2003; **220**: 549-567.
- 8) Holmström K, Gräslund S, Ann W, Pongshompoo S, Bengtsson BE, Kautsky N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2003; **38**: 255-266.
- 9) Wang YB, Xu ZR Xia MS. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* pond. *Fish. Sci.* 2005; **71**: 1036-1041.
- 10) Zokaiefar H, Balcazar JL, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A, Saad CR. Selection and identification of non-pathogenic bacteria isolated from fermented pickles with antagonistic properties against two shrimp pathogens. *J. Antibiot.* 2012; **65**: 289-294.
- 11) Farzanfar A. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006; **48**: 149-158.
- 12) Rengpipat, SW, Phianphak S, Piyatiratitivorakul P, Menasveta. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 1998; **167**: 301-313.
- 13) Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA, Lovett DL, Mirvaghefi AR, Shakouri M. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 2006; **252**: 516-524.
- 14) Boonthai T, Vuthiphandchai V, Nimrat S. Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquacult. Nutr.* 2011; **17**: 634-644.
- 15) Janeo RL, Corre VL Jr, Sakata T. Water quality and phytoplankton stability in response to application frequency of bioaugmentation agent in shrimp ponds. *Aquacult. Eng.* 2009; **40**: 120-125.
- 16) Liu W, Toyohara H. Sediment-complex-binding cellulose breakdown in wetlands of rivers. *Fish. Sci.* 2012; **78**: 661-665.
- 17) 石井直道, ケラス・ラドル. 東南アジアの魚醤—魚の発酵食品の研究(5). 国立民族学博物館研究報告 1987; **12**: 235-314.
- 18) Ishii S, Yamamoto M, Kikuchi M, Oshima K, Hattori M,

- Otsuka S, Senoo K. Microbial populations responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil, as revealed by comparative 16S rRNA gene analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; **75**: 7070–7078.
- 19) Lowry OH, Nira JR, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; **193**: 265–275.
- 20) McKeage JA, Day JH. Dithionite- and oxalate- extractable Fe and Al as aids in differentiating various classes. *Can. J. Soil Sci.* 1966; **46**: 13–22.
- 21) Liu CH, Chiu CS, Ho PL, Wang SW. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *J. Appl. Microbiol.* 2009; **107**: 1031–1041.
- 22) Zokaeifar H, Babaei N, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Balcazar JL. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 2014; **36**: 68–74.
- 23) Allison SD. Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: implications for ecosystem processes. *Biogeochemistry* 2006; **81**: 361–373.
- 24) Rao MA, Violante A, Gianfreda L. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes: kinetics and stability. *Soil. Biol. Biochem.* 2000; **32**: 1007–1014.
- 25) Tietjen T, Wetzel RG. Extracellular enzyme-clay mineral complexes: Enzyme adsorption, alteration of enzyme activity, and protection from photodegradation. *Aquat. Ecol.* 2003; **37**: 331–339.