水産研究・教育機構 機関リポジトリ
FRA Japan Fisheries Research and Education Agency Institutional Repository

水素細菌Hydrogenovibrio marinus MH-110の養魚飼料としての生産および利用に向けた培養，成分分析および短期飼育による特性評価

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2025-01-07 キーワード (Ja): 水素細菌;養魚飼料;特性評価 キーワード (En): Hydrogenovibrio marinus 作成者: 奥, 宏海, 西原, 宏史, 上谷, はる, 松成, 宏之, 徳田, 雅治, 吉永, 葉月, 古板, 博文, 村下, 幸司, 山本, 剛史 メールアドレス: 所属: 茨城大学, 茨城大学
URL	https://doi.org/10.57348/0002012551

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

原著論文

水素細菌 *Hydrogenovibrio marinus* MH-110 の養魚飼料としての生産および利用に向けた培養，成分分析および短期飼育による特性評価

奥　宏海*1・西原宏史*2・上谷はる*2・松成宏之*1・徳田雅治*3・
吉永葉月*1・古板博文*1・村下幸司*1・山本剛史*1

Laboratory scale evaluation of the hydrogen oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus* MH-110 for production and utilization as an aquafeed

Hiromi OKU, Hirofumi NISHIHARA, Haru KAMITANI, Hiroyuki MATSUNARI, Masaharu TOKUDA, Hazuki YOSHINAGA, Hirofumi FURUITA, Koji MURASHITA and Takeshi YAMAMOTO

Proteins from some bacteria are possible candidates for novel aquafeed ingredients. As a preliminary study to utilize the hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus* MH-110 as a fish feed, we cultured the bacterium in a 10L jar-fermenter with a continuous gas-flow system with H_2, O_2, and CO_2 for 10 hours. The cultivation successfully produced 50.7g of *H. marinus* bacterial cells, which contained 50% protein with a similar amino acid profile to that in a common fish meal-based feed. In a subsequent feeding experiment for 8 days using juveniles of the red sea bream (*Pagrus major*), the digestibility of the bacterial protein was 83%. These results suggest that *H. marinus* MH-110 could become a viable option for a protein source for aquafeed.

キーワード：水素細菌，*Hydrogenovibrio marinus*，養魚飼料，特性評価
2023年8月18日受付　2024年7月12日受理

養魚用飼料の主要なタンパク源は多獲性魚類に由来する魚粉（fish meal）であり，その供給は天然資源に依存している。1980-90年代以降，その供給源となる漁獲による漁業生産量は横ばいである一方，養魚飼料用の魚粉は世界的な養殖業の広がりによる需要の増大のため供給不安と価格上昇に直面しており，今後の養殖業の持続的発展のため魚粉代替飼料の導入が求められている（Naylor *et al*. 2000, Tacon and Metian 2008, Revesz and Biro 2019）。代替飼料原料としては，比較的安価で供給量も豊富であるため，脱脂大豆やコーングルテンミールなどの植物性原料やフェザーミールなどの畜産副産物が多く利用されている（Naylor *et al*. 2009, Ayadi *et al*. 2012, Montoya-Camacho *et al*. 2019）。また，こうした既存の代替原料に加えて，近年は藻類，昆虫，および微生物（単細胞タンパク質，single cell protein）など，これまであまり飼料として利用されて

*1　国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所養殖部門生理機能部
〒516-0193　三重県度会郡南伊勢町中津浜浦 422-1
Physiological Function Division, Aquaculture Research Department, Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, National Research and Development Agency, Minami-Ise, Mie, 516-0193, Japan
E-mail : oku_hiromi18@fra.go.jp
*2　茨城大学農学部食生命科学科
*3　国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所養殖部門育種部

こなかった，いわゆる新飼料と呼ばれるものも開発が進められている（Mousavi *et al*. 2020, Rando and Rene 2020, Jannathulla *et al*. 2021）。特に細菌類を用いた飼料はタンパク質含量が高く，またアミノ酸バランスは魚粉などの動物性のものに近いことから養魚飼料用のタンパク源として有望視されている（Najafpour 2015, Jannathulla *et al*. 2021）。それに加えて，気候や季節に左右されず培養槽で集約的に生産できることや，菌種・菌株によっては独立栄養性で安価に生産可能であることなどの生産面の利点もあり，既に商業化も含めた量産や利用方策が検討されているものもある（Jones *et al*. 2020, Suman *et al*. 2015）。

単細胞タンパク質の候補の一つである水素細菌は水素酸化細菌（hydrogen oxidizing bacterium, HOB）とも呼ばれ，気体水素をエネルギー源として好気的に酸化し，二酸化炭素を炭素源として独立栄養的に増殖することのできる細菌類の総称である（Bowien and Schlegel 1981）。人工的に菌体を生産するためには，ガス培養器を用いて，通気によりガス原料である気体の水素・酸素・二酸化炭素を液体培地に溶存させ，また液体培地には窒素源としてのアンモニウム塩類を添加して培養する（Repaske 1966, Angenent *et al*. 2022）。それに加えて，水素細菌において水素利用を担うヒドロゲナーゼはその活性中心に金属イオン（Ni^{2+}およびFe^{2+}）を持つため，触媒成分としてこれらの金属イオンも培地に添加する必要がある（Repaske 1966, Angenent *et al*. 2022）。ガス原料の通気に際しては、特に酸素分圧の調整が重要である。水素細菌は水素を酸化してエネルギーを獲得することから，酸素は必須であり，酸素が欠乏すると菌体の増殖は停止し（酸素律速），代わりに菌体内にポリβヒドロキシ酪酸（PHB）などの貯蔵物質を合成・蓄積する（Repaske 1966）。その一方，高酸素濃度の状態ではヒドロゲナーゼをはじめ菌体の代謝系が阻害され（oxygen damage），増殖が低下することもある（Bowien and Schlegel 1981）。そのため，水素細菌の培養においては酸素欠乏を避けつつ酸素分圧を低く保つことが重要となる。それに加えて，大気条件（酸素分圧pO_2約 20%）などある程度の高酸素分圧に耐性を持ち，取り扱いの容易な菌株を選定することも可能である。現在，いくつかの企業等で量産化や商業化が検討されている*Cupriavidus necator*（以前の学名である*Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*，および*Hydrogenomonas eutropha*などの表記も用いられる）において，その酸素耐性が検討されている。*C. necator* 335株（*Alcaligenes eutrophus*ATCC17697, type strain）においては増殖の至適pO_2は 4.8%と報告されているが（Ishizaki and Tanaka 1990），*C. necator* H16などの派生株も含めて本種は$pO_2$40%までの酸素分圧においても増殖可能とされている（Wilde and Schlegel 1982）。

水素細菌は近年，飼料や食料用途のタンパク質生産，PHBなどの化学品生産，あるいは炭素固定能に着目した排出CO_2の利用技術として注目されている（Lin *et al*. 2022）。特に*C. necator*において生産技術開発が先行している（Angenent *et al*. 2022）が，水素細菌の分類群には性質の異なるいくつかの菌種・菌株が含まれており（Bowien and Schlegel 1981, Lin *et al*. 2022），利用目的に応じて適切な菌種を選択することも可能である。産業的に飼料用タンパク源として生産するためには，酸素耐性など取り扱いが容易であることと量産化が可能な高増殖能を持つことが望ましい。わが国においてもそうした条件に合致する水素細菌株が分離されており，そのうちの一つである海洋由来の水素細菌*Hydrogenovibrio marinus* MH-110は増殖に関して$pO_2$40%までの酸素耐性をもち，至適条件では*C. necator*における$0.12h^{-1}$（Yu and Lu 2019）を上回る増殖速度$0.60\text{-}0.67h^{-1}$を示すとされている（Nishihara *et al*. 1989および1991a）。また，この菌株においては，2L容量のジャーファーメンターを用いて培地成分，ガス供給の条件，および鉄分など必須成分の逐次添加条件が検討され，連続通気培養法（a continuous gas flow system）による高濃度培養を達成するなど量産化に向けた基礎的知見はすでに得られている（Nishihara *et al*. 1991a）。今後，本菌種を養魚飼料として実用化を進めるためには，生産規模拡大に向けた培養法の改良は必須であるが，それに加えて，菌体成分の特性解明および摂餌，消化吸収および成長など養魚飼料としての直接的な評価も併せて行う必要がある。そうしたことから，本研究では，2L規模での培養における既往成果を踏まえつつ，培養規模を 10L（working volume;7.6L）とした上で連続通気培養を行い，その培養特性に関するデータを取得した。それに加えて，得られた培養菌体サンプルを用いて，本菌株の成分分析およびマダイ（*Pagrus major*）稚魚における消化吸収率の測定を行い，養魚飼料としての利用可能性を検討した。

材料と方法

水素細菌*H. marinus* MH-110の連続通気培養　水素細菌*H. marinus* MH-110株は茨城大学において維持したものを使用し，また本菌の培養は茨城大学農学部（茨城県阿見町）において行った。連続通気培養は2L培養槽における既報の条件（Nishihara *et al*. 1991a）に準じて行ったが，10L培養槽への規模拡大に伴い修正を加えて実施した。

液体培地には無機塩類を含む培地を用い，その1L当たりの組成は 5.0g $(NH_4)_2SO_4$，2.5g K_2HPO_4，0.5g KH_2PO_4，0.5g $MgSO_4{\cdot}7H_2O$，29.3g NaCl，10mg $CaCl_2{\cdot}2H_2O$，10mg $FeSO_4{\cdot}7H_2O$，0.6mg $NiSO_4{\cdot}6H_2O$とし，それに2mLの微量元素溶液（Nishihara *et al*. 1989）を添

加した。また，培養系に供給するガス原料（H_2，O_2およびCO_2の混合気）はマスフローコントローラー（HORIBA，京都府京都市）を用いて必要に応じて任意の比率で調製した。なお以下，混合気の組成は常温・常圧下での体積比（%）で示す。

前培養はフラスコを用いて行った。1L容量のフラスコに液体培地200mLを入れて植菌し，気相を混合気（H_2：O_2：CO_2=75：15：10）で置換して32°C，105rpmの条件で振とう培養した。培養開始15時間後に気相を混合気（H_2：O_2：CO_2=70：20：10）で再度置換し，20時間後まで振とう培養を継続し，その後，5mg$FeSO_4$·$7H_2O$の添加および14%アンモニア水を用いたpH調整（pH6.5）を行った。

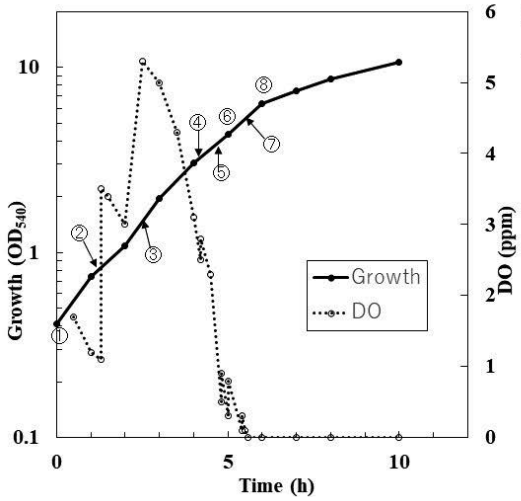
ジャーファーメンターによる連続通気培養は10L容量培養槽（MBF1000-ME, 東京理化器械, 東京都文京区）に混合気を通気し，撹拌数750-800rpmで運転した。培養液量は1L容量のフラスコによる前培養液（8本分;1,600mL）とあわせて7.6Lとした。培養温度は34°Cとし, 溶存酸素濃度（DO）および菌体濁度（OD540nm）を随時測定した。また，pHは常時モニターし，6Mアンモニア水を自動滴下することによりpH6.5に保った。図1に示した通り，菌体増殖の状態に応じてガス組成，通気量，撹拌数の調整および鉄成分（$FeSO_4$·$7H_2O$）の添加を行った（図1）。

培養終了後，得られた菌体は遠心分離により集菌し，0.9%の生理食塩水で一回洗浄した後，冷凍保存した。その後凍結乾燥したものを以降の成分分析および試験飼料作製に供した。

菌体の成分分析　菌体の水分，灰分，粗脂肪，および粗タンパク含量の分析は常法通り行い，また各項目とも1サンプルにつき2回測定し，その平均を測定値とした。水分は常圧加熱乾燥法により行い，105°Cで8時間の加熱乾燥による重量変化から水分含量を測定した。その後，乾燥サンプルは直接灰化法に供し，550°C6時間の燃焼により残った全無機質量を灰分（Ash）とした。粗脂肪（Crude fat）はソックスレー法により決定し，エーテル抽出画分を粗脂肪とした。粗タンパク含量に関しては，ケルダール法により窒素含量（Nitrogen（N））を測定し，その値に換算係数6.25を乗じたものを粗タンパク含量（N×6.25）とした。各成分の含量は測定した水分含量を元に乾物中の含量（%Dry matter）に換算した。

総アミノ酸組成は自動アミノ酸分析計（L-8900，日立ハイテク，東京都港区）を用いて行った。凍結乾燥したサンプルは6N HClを加えて脱気し，22時間110°Cで加水分解したのち，アミノ酸自動分析に供した。トリプトファンについては4.2N NaOHを加えて脱気し，110°Cで24時間加水分解した後HPLCを用いた液体クロマトグラフ法（Penke *et al*. 1974）にて行った。HPLCのシステムは送液システムはLC-10Ai，蛍光検出器はRF-10AXL，分離カラムはShim-pack CLC-ODS（0.15m× 6mm i.d.）（いずれも島津製作所，京都府京都市）を用いた。

脂肪酸組成はGC/MS分析により決定した。総脂質はクロロホルム-メタノール（2:1, v/v）で抽出し，5%塩酸メタノールでメチルエステル化したものをヘキサンに溶解し分析に供した。GC/MS分析にはガスクロマトグラフQP-5050（島津製作所）およびDB-WAXカラム（0.25mm× 30m× 0.25μm, Agilent, Santa Clara, CA, US）を使用した。温度条件は初めに60°C，1分間加温した後, 毎分30°Cの割合で200°Cまで温度を上昇した。その後240°Cまで毎分3°Cの割合で温度上昇させ，最後に240°Cで40分間維持した。各脂肪酸メチルエステル量はEIマスの総イオン強度として測定し，脂肪酸種



Continuous gas flow culture of *H. marinus* MH-110 in 10L jar fermenter

	Time (h)	manipulation in culture conditions
①	0	750rpm, H_2:O_2:CO_2=1200:150:150 (total 1500, ml/min) $pO_2$10%, 0.197vvm
②	1.3	H_2:O_2:CO_2=1200:240:160 (total 1600, ml/min) $pO_2$15%, 0.211vvm
③	2.5	H_2:O_2:CO_2=1120:320:160 (total 1600, ml/min) $pO_2$20%, 0.211vvm, addition of $FeSO_4$·$7H_2O$ 760mg
④	4.2	H_2:O_2:CO_2=1400:400:200 (total 2000, ml/min) $pO_2$20%,0.263vvm
⑤	4.8	H_2:O_2:CO_2=1760:500:250 (total 2510, ml/min) $pO_2$19.9%,0.330vvm
⑥	5	800rpm,H_2:O_2:CO_2=1740:500:250 (total 2490, ml/min) $pO_2$20.1%,0.328vvm
⑦	5.4	H_2:O_2:CO_2=2100:600:250 (total 2950, ml/min) $pO_2$20.3%,0.388vvm
⑧	6	addition of $FeSO_4$·$7H_2O$ 760mg

図1．10L培養槽における連続通気培養
菌体増殖（OD_{540}）および溶存酸素濃度（DO）をグラフとして左側に，また培養中に行った操作を表として右側に示す。
略語の説明；rpm:1分間当たりの回転数，vvm:1分間における液体単位体積あたりのガス通気量

は保持時間および質量スペクトルを標準物質（Bacterial Acid Methyl Ester Mix, Sigma-Aldrich, St. Louis, US）と比較することにより同定した。脂肪酸の相対含量は検出された脂肪酸の総イオン強度中における相対値として算出した。

ミネラル含量はICP発光分光法により決定し，サンプルを硝酸により加熱分解した後に分析に供した。分析はICP発光分析装置ICPE-9000（島津製作所）を用いて行い，また各元素濃度決定に用いた標準物質はいずれも原子吸光用の標準液（富士フィルム和光純薬，大阪府大阪市）を使用した。

菌体タンパク質の消化吸収率の測定　マダイ幼魚における*H. marinus* MH-110の凍結乾燥菌体タンパク質の消化吸収率の測定はGlencrossらの方法（2005）を参考とし，まず，対照飼料および対照飼料･乾燥菌体（重量比で7:3）の混合飼料の二種類の飼料の消化吸収率を測定し，その値を元に乾燥菌体の消化吸収率を計算により求めた。一般的な養魚用飼料を模したもの，すなわち，魚粉（チリ産イワシ魚粉）を主なタンパク源とし，脂質源として魚油（タラ肝油）を添加したものを基本飼料（Basal diet）とし（表1），二種類の試験飼料を作製した（表2）。菌体含有の試験飼料として基本飼料70%に凍結乾燥菌体29.5%を混合した飼料を調製した（Marinus diet, 表2）。また，対照飼料（Reference diet）は基本飼料99.5%とし，いずれの試験飼料にも指標物質として0.5％酸化イットリウム（重量比で0.5%酸化イットリウムと99.5%セルロースを混合したもの）をいずれの試験飼料にも0.5%添加した（表2）。試験飼料は原料を混合・加水した後，手動のガーリックプレスを用いて，おおよその粒子径2-3mm，長さ5-10mmに造粒した。その後70℃で3時間乾燥した後，使用時まで冷凍保存した。

表1. 基本飼料の配合（数値は重量比）

Ingredient	%
Fish Meal	50
Soybean meal	4.8
Corn gluten meal	4.4
Wheat flour	24
Fish oil	7.97
α-Stearch	2.33
Vitamin mixture [1]	1
Choline chloride	0.5
Mineral mixture [2]	5
Total	100

[1]Premix containing thiamin・HCl, 0.5g; riboflavin, 2g; pyridoxine・HCl, 0.5g; nicotinic acid, 7.5g; Ca-pantothenate, 5g; myo-inostiol,20g; biotion 0.05g; foloc acid, 0.15g; L-ascorbic acid, 5g; Ascorbic acid calcium salt dihydrate, 12g; vitaminK_3, 0.4g; α -tocopherol acetate, 4.4g; cyanocobalamine, 0.001g; cholecalciferol, 0.0005g; vitaminA palmitate, 0.25 × 10^6IU/100g premix.

[2]Premix containing $Ca(H_2PO_4)_2$・H_2O, 32g; calcium lactate, 3.5g; ferric citratre, 2.5g; $MgSO_4$・$5H_2O$, 15g; KH_2PO_4, 32g; NaCl, 1g; $AlCl_3$・$6H_2O$, 0.015g; KIO_3, 0.003g; $CuSO_4$・$5H_2O$, 0.031g; $MnSO_4$・$5H_2O$, 0.175g; $CoCl_2$・$6H_2O$, 0.001g; $ZnSO_4$・$7H_2O$, 0.353g/100g premix.

表2. 試験飼料の配合（数値は重量比）

Test diet	Basal diet	*H.marinus* MH-110 (freeze dried)	0.5%Yittrium oxide*
Reference	99.5	0	0.5
Marinus	70	29.5	0.5

*0.5%Yittrium oxide:0.5%Yittrium oxide+99.5% cellulose

給餌飼育および採糞は水産研究・教育機構南勢庁舎（三重県南伊勢町）の屋内飼育施設において2020年6月に実施した。試験に用いたマダイ幼魚はアーマリン近大（和歌山県白浜市）より購入し，水研機構南勢庁舎にて市販の稚魚用飼料を用いて飼育したものを使用した。試験水槽は40Lの採糞水槽を用い，飼育水中に排泄された糞を排水部のカラム中に沈降させることにより回収した（Cho and Kaushik 1990）。飼育中は常時通気し，飼育水は砂濾過海水を60L/hのかけ流しとした。期間中の水温は21.7~23.4℃であり，また照明条件は6:00-18:00点灯（12L12D）の条件とした。

試験開始に先立ち，対照飼料を5日間給餌して飼育環境に馴致し，その後48時間絶食して初期体重を測定した。初期体重7.5~9.3gのマダイ幼魚を各水槽12尾収容して試験を開始し，対照飼料または*H.marinus* MH-110凍結乾燥菌体を含む試験飼料を給餌した。各試験区の反復数は2とし，給餌は1日2回（8:00および16:00），手撒き飽食給餌とした。連続通気培養により得られた菌体およびそれを用いて調製できた試験飼料の量から1日2回の飽食給餌が可能な日数として，飼育期間は8日間とし，その後48時間絶食した上で終了時体重を測定した。初期および終了時の平均体重（initial and final body weights），飼料効率（feed efficiency）および平均日間摂餌率（daily food consumption rate）は水槽毎に測定した（n=2）。平均値の差はIBM SPSS Statistics ver.26（IBM, Chicago, IL, USA）を用いてt検定により比較し，$p < 0.05$の場合を統計的な有意差とした。また，糞は1日2回回収し，少量の飼育水とともに−20℃で凍結保存した。期間中に回収した糞は凍結乾燥後，分析に供した。分析用の採糞サンプルは飼育4日目から8日目までの5日間に回収したものを用い，指標物質であるイットリウム含量はミネラル同様にICP発光分光法により，また窒素および各アミノ酸の含量も前述の方法により求めた。なおその際，副次的なデータであるが，用いた試験飼料のアミノ酸やミネラル組成も測定されており，その一部は一般的な養魚飼料における参考値として記載した。

給餌した各飼料のタンパク質のみかけの消化吸収率は飼料および糞中の指標物質（イットリウム）とタンパク質含量から求め（Glencross *et al*. 2005），試験飼料に30%配合した菌体の消化吸収率は既報の計算式（Glencross *et al*. 2005, Tlusty *et al*. 2017）により算出した。

結　果

***H. marinus* MH-110の連続通気培養**　培養初期は酸素による増殖阻害を抑えるために培養ガスの酸素分圧を低く設定し，菌体濃度の増加に従って酸素律速にならないように培養ガスのpO_2や通気量を増やすように制御した。また培養開始2.5時間後および6時間後に硫酸鉄（$FeSO_4 \cdot 7H_2O$）を添加した。培養経過を図1に示す。

培地6Lに1.6Lの前培養液を加え（培養液量7.6 L），H_2:O_2:CO_2=1,200:150:150（mL/min, $pO_2$10%, 0.197vvm）の混合ガスを通気しながら撹拌数750rpm，34°Cで培養を開始した。直ちに菌体の増殖と溶存酸素の消費によるDOの低下がみられた。培養開始1時間後にはDO値が1.2ppmとなったため，ガス組成をH_2:O_2:CO_2=1,200:240:160（mL/min, pO_2 15%, 0.211vvm）に調整して培養を継続した。培養の進展とともに条件を制御し，最終的にはH_2:O_2:CO_2=2,100:600:250（mL/min, pO_2 20.3%, 0.388vvm），800rpmの通気撹拌条件で，培養開始5.6時間後に培養液濁度（OD_{540}）は5を超えるまで増殖し，DO値が0ppmになるまで対数増殖を維持することができた。培養開始6時間後までの対数増殖期における増殖速度は$0.55h^{-1}$であった。その後，酸素律速条件になると徐々に増殖速度は低下したものの，菌体は増殖し続け，10時間の培養でOD_{540}は10.68に達した。培養終了時には湿菌体240g，凍結乾燥菌体として50.7g（湿重量の21%）を回収した。

***H. marinus* MH-110菌体の成分**　培養により得られた*H. marinus* MH-110菌体の凍結乾燥物について，栄養学的な特性を明らかにするため成分分析を行った。

菌体の乾物中の窒素含量は11.7%であり，換算係数6.25を乗じて得られたタンパク含量の予想値は72.9%であった（表3）。ソックスレー法によりエーテル抽出された粗脂肪含量は0.8%であり（表3），また脂肪酸組成としては炭素数16および18の飽和あるいは一価不飽和脂肪酸が多く含まれ，それらが全体の97%を占めていた（表4）。

アミノ酸（表5）およびミネラル（表6）含量に関しては，次項「3. マダイにおける消化吸収率の測定」の分析で副次的に得られた基本飼料（Basal diet）の数値も参考までに併記した。アミノ酸組成に関しては，必須アミノ酸の多くは魚粉主体の飼料（Basal diet）と比較して同等に含まれており（表5），例えば*H. marinus* MH-110においてはリジンは3.9%（Basal diet 3.1%），メチオニンは1.7%（同1.2%）であった。また，*H. marinus* MH-110においてはヒドロキシプロリンおよびタウリンは総アミノ酸中の0.1%と極めて微量であった（表5）。なお，アミノ酸含量の合計値は50%であり，ケルダール法（N × 6.25）によるタンパク含量72.9%とは20%以上の差があった（表3および表5）。

表3. *Hydrogenovibrio marinus* MH-110凍結乾燥菌体の一般成分（数値は重量%）

	%Dry matter
Nitrogen(N)	11.7
(N×6.25)	(72.9)
Crude Fat	0.8
Ash	14.3

表4. *Hydrogenovibrio marinus* MH-110の脂肪酸組成（数値はGC分析における各脂肪酸ピークの総脂肪酸中における相対値（%total fatty acid））

Fatty acid	%
14:0	1.4
16:0	21.1
16:1	53.1
17:0	0.1
$17:0_{CFA*}$	0.4
18:0	9.4
18:1	13.6
ohters	0.9
total	100.0

*CFA:Cyclopropane Fatty acid

表5. *Hydrogenovibrio marinus* MH-110および基本飼料のアミノ酸組成（数値は試料中の重量%。（）内は総アミノ酸における各アミノ酸の相対含量（重量比））

	H.marinus MH-110	Basal diet
Essential amino acids		
Lysine	3.9(7.9)	3.1(7.4)
Methionine	1.7(3.5)	1.2(2.9)
Leucine	4.3(8.5)	3.7(8.8)
Isoleucine	2.5(5.0)	1.8(4.3)
Phenylalanine	2.2(4.5)	1.9(4.6)
Tryptopnane	0.4(0.8)	0.4(0.9)
Valine	3.0(5.9)	2.1(5.1)
Threonine	2.5(5.0)	1.9(4.5)
Histifine	1.0(2.0)	1.3(3.0)
Arginine	2.6(5.3)	2.6(6.2)
Nonessential amino acids		
Cystine	0.2(0.3)	0.3(0.7)
Glutamic acid	8.4(16.8)	6.8(16.2)
Glycine	2.7(5.5)	2.6(6.1)
Alanine	3.5(7.0)	2.8(6.6)
Aspartic acid	5.0(9.9)	3.4(8.0)
Tyrosine	2.0(4.1)	1.5(3.5)
Serine	2.3(4.6)	1.9(4.5)
Proline	1.7(3.3)	2.2(5.3)
Hydroxyproline	0.0(0.1)	0.3(0.7)
Taurine	0.0(0.1)	0.4(0.9)
Total	50.0(100)	42.1(100)

培養時に液体培地に添加した主要なミネラル元素について，菌体における含量を表6に示した。ナトリウム（Na）およびニッケル（Ni）は基本飼料と比べて4倍程度，鉄（Fe）は約16倍多く含まれていた。またカリウム（K），リン（P）およびマグネシウム（Mg）は基本飼料と同程度であり，カルシウム（Ca）の含有は確認できなかった。

表6. *Hydrogenovibrio marinus* MH-110および基本飼料における主要ミネラル含量（ppm）

	H.marinus MH-110	Basal diet
Na	25107.5	6565.6
K	6191.5	6128.7
P	21032.4	18922.2
Ca	not detected	18820.6
Mg	2064.9	2379.7
Ni	20.2	4.5
Fe	6524.9	399.8

マダイにおける消化吸収率の測定　*H.marinus* NH-110の養魚飼料としての利用可能性を調べるため，30%の凍結乾燥菌体を配合した飼料をマダイ稚魚に給餌し，飼料中および回収した糞中の含量から*H. marinus* MH-110のタンパク成分のみかけの消化率を算出した。

8日間の給餌試験期間中は，対照飼料（Reference diet）には劣るものの菌体含有飼料（Marinus diet）においても摂餌および平均体重の増加は認められた（表7）。ただし対照飼料と比較すると，菌体含有飼料では終了時体重と平均日間摂餌率は有意に低い値であった（表7）。算出した*H.marinus* MH-110の凍結乾燥菌体の窒素および総アミノ酸のみかけの消化吸収率はそれぞれ82.5%および83.2%であり，対照飼料の88.7%および90.5%より低かった。なお飼育期間中に試験飼料給餌区（Marinus diet）において供試魚1尾の死亡があったが，水槽からの飛び出しによるものであり飼料の影響ではないと考えられた。

表7. マダイ幼魚の飼育期間中の成長指標

diet	Initial body weight(g)	Final body Weight(g)	Feed efficiency	Daily food consumption rate(%)
Reference	8.4±0.2	13.0±0.3	1.2±0.0	3.9±0.0
Marinus	8.4±0.0	11.2±0.1*	1.2±0.0	2.7±0.1*

Values=mean ± standatd error(n=2), *:p<0.05

考　察

本研究においては菌体培養および飼育試験のいずれも小規模あるいは短期間での実験室スケールでの検討ではあるが，生産から飼料利用までを一連のプロセスとして実施した。水素細菌の養魚飼料化を図る上では生産面・利用面とも規模拡大は必須であるが，そのためには，実験室規模であっても実例を積み重ねながら問題点の洗い出しとその改善を逐次試みることは有益である。今回の検討においては，*H.marinus* MH-110の凍結乾燥菌体が50%以上の高タンパク含量であることや80%以上の消化率を示したことから将来的には養魚飼料として利用可能と期待される。その一方で今後，影響を確認あるいは改善すべき点も明らかになっており，養魚飼料として生産や利用する際に検討を要する点について考察したい。

好気性水素細菌は水素を酸化してエネルギーを獲得するために酸素は必要であるが，高酸素分圧条件では増殖能を失うことが知られている（Bowien and Schlegel 1981, Wilde and Schlegel 1982）。その主な要因として考えられているのが，水素を酸化する酵素であるヒドロゲナーゼの酸素感受性である（Angenent *et al*. 2022）。*H. marinus* MH-110は大気中（pO_2約20%）を上回る酸素分圧（$pO_2$40%）でも増殖能を維持することができる，取り扱いの容易な水素細菌株の一つであるが，これは*H. marinus*のヒドロゲナーゼが高い酸素耐性を持つことによる（Nishihara *et al*. 1991aおよび1997, Shomura *et al*. 2011）。こうした菌体の特性に加えて，2L培養槽を用いた先行研究において，ガス混合比，通気量の制御および硫酸鉄（$FeSO_4{\cdot}7H_2O$）等の増殖に必要な無機成分の追加により菌体増殖を維持する生産手法も確立している（Nishihara *et al*. 1991a）。そうした既往成果を基に，本研究では培養槽の規模を2Lから10Lにスケールアップして連続通気培養を実施した（図1）。2Lの培養槽では培養開始10時間後まではDO3ppm付近を維持して増殖させることが可能であった（Nishihara *et al*. 1991a）。一方，10L容量ジャーファーメンターによる今回の培養では，培養5.6時間まで酸素律速にならずに対数増殖を維持することができたが，それ以降はDO値0ppmとなった。結果的に10時間の培養で凍結乾燥菌体50.7g（7.56g/L）が得られたものの，酸素律速条件になると徐々に増殖速度は低下した。こうしたことから規模拡大に伴い至適DOを維持するための通気方法など培養システムを改善する必要があることが示唆された。また，*H. marinus* MH-110株では酸素欠乏条件下においては菌体内にグリコーゲン様の多糖類を合成・蓄積することが知られており（Nishihara *et al*. 1993），その場合，炭水化物の利用能の低い肉食性の養殖魚にとって多糖類の蓄積は飼料としての栄養価を低下させる可能性がある。今後さらに事例を重ねて培養規模の拡大や生産技術の高度化を進めていくことになるが，生産量の増加と併せて質的な面からの検討もあわせて考慮する必要がある。

細菌類を原料とする単細胞タンパク質は一般に高タンパク含量であり，アミノ酸バランスは魚粉などの動物性タンパク質に近いことが知られている（Najafpour 2015, Angenent *et al*. 2022）。*H. marinus* MH-110におい

てもタンパク成分に関しては同様の特徴が見られた。なお，タンパク含量についてはアミノ酸含量の総和は50%（表5）であり，ケルダール法（N × 6.25）による粗タンパク量72.9%（表3）とは数値に20%以上の食い違いがあった。これは他の単細胞飼料においても知られている通り，細菌類には非タンパク性の窒素，特に核酸が多く含まれているため（Jannathulla *et al*. 2021），ケルダール法ではタンパク含量を過大に見積もった可能性がある。アミノ酸組成に関しては表5に示した通り，*H. marinus* MH-110においても全体的なアミノ酸バランスは魚粉主体の基本飼料（Basal diet）と類似したものであった。特に植物性原料では不足し成長の制限要因となりうるリジンやメチオニン（Gatlin Ⅲ *et al*. 2007, Montoya-Camacho *et al*. 2019）の含量は基本飼料と同等以上であり，養魚飼料として十分な量含まれていると考えられた。また，その他のアミノ酸ではヒドロキシプロリンおよびタウリンはいずれも総アミノ酸中の0.1%しか含まれていなかった（表5）。特にタウリンは多くの海産魚の成長にとって必須の栄養素であり（Takeuchi, 2007），こうした不足成分に関しては養魚飼料として利用する際には適宜添加する必要がある。

メタン資化細菌*Methylococcus capsulantus*はじめいくつかの細菌由来の単細胞タンパク質あるいはそれを用いた加工製品では，すでに水産養殖での利用に向けて飼料試験が始められている。タイセイヨウサケ，ニジマス，コイなどでの*in vivo*消化試験において粗タンパク質では80％以上の消化吸収率が報告されている（Skrede *et al*. 1998, Lee *et al*. 2020, Yu *et al*. 2022）。また水素細菌*C. necator*（*Hydrogenomonas eutropha*）ではラットでの検討であるが，煮沸（boil）や超音波処理（sonically rupture）した菌体タンパク質は，いずれも93%の消化吸収率を示したとされている（Calloway and Kumar 1969）。また，既存の動物性あるいは植物性の代替タンパク質原料に関しては，ニジマスにおいて粗タンパク質の消化吸収率が見積もられており，血粉の火力乾燥物（blood meal, flame-dried）では16%と低い値が報告されているが，それ以外の動物性（凍結乾燥血粉，肉骨粉および家禽由来のミールなど）あるいは植物性（大豆，アブラナ科植物やトウモロコシ由来のミールなど）の原料では58%から99%とされている（Cho and Kausik 1990）。別魚種での比較ではあるが，*H. marinus* MH-110では，マダイにおけるタンパク質（窒素および総アミノ酸）の消化吸収率は約83%であり（表8），他の魚粉代替飼料原料と比較しても大きな遜色はない値であった。ただし，本研究の試験飼料（表1）においても用いた脱脂大豆（soybean meal）やコーングルテンミール（corn gluten meal）に限って言えば，粗タンパク成分の消化吸収率はいずれも96%と報告されており（Cho and Kausik 1990），これらのすでに汎用されている魚粉代替飼料原料には10%以上劣っていることになる。そのため，今後は菌体調製法や加工法などを通して，一層の利用性の改善を進める必要がある。

表8. 基本飼料および*Hydrogenovibrio marinus* MH-110凍結乾燥菌体におけるタンパク成分の消化吸収率

Digestibility（%）	%Nitrogen	%Total amino acids
Reference diet	88.7	90.5
Marinus diet	86.1	88.0
H.marinus (Freeze dried)	82.5	83.2

また，脂質成分の特徴に関しては既報（Nishihara *et al*. 1991b）と一致し，*H.marinus* MH-110に含まれている主要な脂肪酸組成は炭素数16および18の飽和あるいは一価不飽和脂肪酸であった（表4）。これらの脂肪酸はいずれも魚類などの脊椎動物において体内で生合成可能な脂肪酸種であるため（Segner and Bohm 1994, Pereira *et al*. 2003），必ずしも飼料から摂取する必要はないと考えられた。海産魚類の成長にとって，DHAなどのn-3系高度不飽和脂肪酸は必須であることが知られているが（Ishikawa 2007），*H.marinus* MH-110においてはそれらの脂肪酸は確認されず，また粗脂肪含量も0.8%と極めて低かった（表3）。そうしたことから，本菌体は飼料脂質源とはならず，養魚飼料として利用する際には他の代替飼料原料と組み合わせ，不足する脂肪酸は別途補いながらタンパク源として用いるのが適切と考えられた。

単細胞タンパク質の利用に関しては，その菌種の本来の性質に加えて，培養方法に起因する成分の影響も考慮する必要がある。海洋性の水素細菌である*H. marinus* MH-110の培養においては，高濃度の塩化ナトリウムやヒドロゲナーゼの成分である鉄やニッケルを添加するため，飼料利用時にはその持ち込みの影響も考慮する必要がある。今回の検討では，*H. marinus*菌体には高含量のナトリウム（Na）や鉄（Fe）が含まれることが明らかになっており，今後その影響評価が必要である。特に鉄の供給源である硫酸鉄（$FeSO_4{\cdot}7H_2O$）は飼料中の脂質成分の劣化と摂餌へ悪影響がニジマスにおいて報告されている（Desjardins *et al*. 1987）ため，注意が必要である。鉄分などの菌体成分との関連は今のところ不明であるものの，本研究のマダイにおける検討では，菌体配合飼料において対照飼料と比べて低い摂餌率（daily feed consumption rate）を示しており（表7），その原因解明と改善は今後の課題である。

このように本研究では，ラボスケールや短期飼育ではあるが，水素細菌*H. marinus*の培養生産から飼料利用までを一連の工程として実施し，その生産や利用特性を明らかにした。その過程で得られた知見は今後，*H. marinus* MH-110を養魚飼料として活用を進める上での基盤情報になりうると考えられる。いくつか今後検討

すべき課題があったものの，本菌においては 50% 以上の高タンパク含量であること，動物性原料のアミノ酸に近い組成であること，および 80% 以上の消化性を示したことなどから飼料タンパク質源として利用できる可能性があると考えられた。こうした特徴は既報の水素細菌 *C.necator* と類似したものではあるが（Angenent *et al*. 2022），増殖速度は *C. necator* の $0.12h^{-1}$（Yu and Lu 2019）に対して $0.67h^{-1}$（Nishihara *et al*. 1991a）であり，こうした増殖能の高さを活用した培養法を開発できれば菌体の生産性を高められる可能性がある。水素細菌に関しては，その他にも生産特性や成分特性の異なる菌株がいくつか分離されている（Bowien and Schlegel 1981, Lin *et al*. 2022）。今後，本研究で扱った *H. marinus* も含め，それぞれの菌種の特性に応じた生産や利用法が開発され，養魚飼料としての選択肢が増えることも期待される。

謝　辞

本研究は水産庁事業・養殖業成長産業化技術開発事業「水素細菌を活用した養殖飼料開発」において実施した。また、本研究の一部は第 18 回シーフードショー大阪（2021）において紹介しており、国立研究開発法人水産研究・教育機構のウェブサイトにも掲載されている。（http://www.fra.affrc.go.jp/cooperation/event/seafood_show/20210317.html）（2024 年 10 月 23 日閲覧）

文　献

Angenent SC, Schuttinga JH, Efferen MFH, Kuizenga B, Bree B, Krieken RO, Verhoeven T J, Wijffels, RH (2022) Hydrogen oxidizing bacteria as novel protein source for human consumption: an overview. *The Open Microbiol. J.*, **16**, e187428582207270. DOI: 10.2174/18742858-v16-e2207270.

Ayadi FY, Rosentrater KA, Muthukumarappan K (2012) Alternative protein sources for aquaculture feeds. *J. Aquaculture Feed Sci. Nutr.*, **4**, 1-26.

Bowien B, Schlegel HG (1981) Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, **35**, 405-452.

Calloway D, Kumar AM (1969) Protein quality of the bacterium Hydrogenomonas eutropha. *Appl. Microbiol.*, **17**, 176-178.

Cho CY, Kaushik SJ (1990) Nutritional energetics in fish: Energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairneri*). in "Aspects of food production, consumption and energy values. World review of nutrition and dietetics." (ed. by Bourne GH), Karger, Basel, 61, pp132-172.

Desjardins LM, Hicks BD, Hilton JW (1987) Iron catalyzed oxidation of trout diets and its effect on the growth and physiological response of rainbow trout. *Fish Physiol. Biochem*., **3**, 173-182.

Gatlin Ⅲ DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, Herman E, Hu G, Krogdahl A, Nelson R, Overturf K, Rust M, Sealey W, Skonberg D, Souza EJ, Stone D, Wilson R, Wurtele E (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Res.*, **38**, 551-579.

Glencross B, Evans D, Dods K, McCafferty P, Hawkins W, Maas R, Sipsas S (2005) Evaluation of the digestible value of lupin and soybean protein concentrates and isolates when fed to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using either stripping or settlement faecal collection methods. *Aquaculture.*, **245**, 211-220.

Ishikawa M (2007) Lipids. in "Dietary supplements for the health and quality of cultured fish." (ed. by Nakagawa H, Sato M, Gatlin Ⅲ DM) CAB International, Oxon, UK, pp64-73.

Ishizaki A, Tanaka K (1990) Batch culture of *Alcaligenes eutrophus* ATCC17697^T using recycled gas closed circuit culture system. *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 170-174.

Jannathulla R, Sravanthi O, Moomeen S, Gopikrishna G, Dayal JS (2021) Microbial products in terms of isolates, whole-cell biomass, and live organisms as aquafeed ingredients: production, nutritional values, and market potential – a review. *Aquaculture International.*, **29**, 623-650. https://doi.org/10.1007/s10499-021-00644-2.

Jones SW, Karpol A, Friedman S, Maru BT, Tracy BP (2020) Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture. *Curr. Opin. Biotech.*, **61**, 189-197. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.026.

Lee S, Kumar V, Cleveland B, Romano N, Vemuri GN, Yadav AK, Meiler K, Hardy RW (2020) Fishmeal alternative from renewable CO_2 for rainbow trout feed. *Aquaculture Res.*, **51**, 4065-4074. DOI: 10.1111/are.14749.

Lin L, Huang H, Zhang X, Dong L, Chen Y (2022) Hydrogen-oxidizing bacteria and their applications in resource recovery and pollutant removal. *Sci. Total Env.*, **835**, 155559. https://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155559.

Montoya-Camacho N, Marquez-Rios E, Castillo-Yanez FJ, Lopez JLC, Lopez-Elias JA, Ruiz-Cruz S, Jimenez-Ruiz EI, Rivas-Vega ME, Ocano-Higuera VM (2019) Advances in the use of alternative protein sources for tilapia feeding. *Rev. Aquaculture.*, **11**, 515-526.

Mousavi S, Zahedinezhad S, Loh JY (2020) A review on insect meals in aquaculture: the immunomodulatory and physiological effects. *Int. Aquat, Res.*, **12**, 100-115. https://doi.org/10.22034/IAR(20).2020.1897402.1033.

Najafpour GD (2015) Chapter14-single cell protein. in "Biochemical engineering and biotechnology (second edition)"., Elsevier, Amsterdam, pp417-434.

Naylor RL, Goldburg RJ, Primavera H, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature.*, **405**,1017-1024.

Naylor R, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliot M, Farrell AP, Forster I, Gatlin DM, Goldburg RJ, Hua K, Nichols P (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106**, 15103-15110.

Nishihara H, Igarashi Y, Kodama T (1989) Isolation of an obligately chemolithoautotrophic, halophilic and aerobic hydrogen-oxidizing bacterium from marine environment. *Arch. Microbiol.*, **152**, 39-43.

Nishihara H, Igarashi Y, Kodama T (1991a) Growth characteristics and high cell-density cultivation of a obligately chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110 under a continuous gas-flow system. *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 358-361.

Nishihara H, Igarashi Y, Kodama T (1991b) *Hydrogenovibrio marinus gen. nov., sp. nov.,* a marine obligatory chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium. *Int. J. System. Bacteriol.*, **41**, 130-133.

Nishihara H, Igarashi Y, Kodama T, Nakajima T (1993) Production and properties of glycogen in the marine obligate chemolithoautotrophy, *Hydrogenovibrio marinus*. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 414-416.

Nishihara H, Miyashita Y, Aoyama K, Kodama T, Igarashi Y, Takamura Y (1997) Characterization of an extremely thermophilic and oxygen-stable membrane-bound hydrogenase from a marine hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus. Biochem. Biophysic. Res. Com.*, **232**, 766-770.

Penke B, Ferenczi R, Kovacs K (1974) A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins. *Anal. Biochem.*, **60**, 45-50.

Pereira SL, Leonard AE, Mukerji P (2003) Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.*, **68**, 97-106.

Rando BF, Rene ER (2020) Production of micronutrient enriched algae, microorganisms and insects for food and feed: Perspectives and updates. *Res. Rev. Insights.*, **4**, 1-3. Doi: 10.15761/RRI.1000159.

Repaske R (1966) Characteristics of hydrogen bacteria. Biotechnol. Bioeng. Ⅷ, 217-235.

Revesz N, Biro J (2019) Recent trends in fish feed ingredients-mini review. *Acta Agraria Kaposvariensis.*, **23**, 32-47. DOI: 10.31914/aak.2286.

Segner H, Bohm R (1994) Chapter 27 Enzymes of lipogenesis. in "Biochemistry and molecular biology of fish, vol3." (ed. by Hochachka, P. W., Mommsen, T. P.) , Elsevier, Amsterdam, pp313-325.

Shomura Y, Yoon KS, Nishihara H, Higuchi Y (2011) Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. *Nature.*, **479**, 253-256.

Skrede A, Berge GM, Storebakken T, Herstad O, Aarstad KG, Sundstol F (1998) Digestibility of bacterial protein grown on natural gas in mink, pigs, chicken and Atlantic salmon. *Anim. Feed Sci, Tech.*, **76**, 103-116.

Suman G, Nupur M, Anuradha S, Pradeep B (2015) Single cell protein production: a review. *Int. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **4**, 251-262.

Tacon AGJ, Metian M (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeed: trends and future prospects. *Aquaculture.*, **285**, 146-158.

Takeuchi T (2007) Amino acid, peptide. in "Dietary supplements for the health and quality of cultured fish." (ed. by Nakagawa, H., Sato, M., Gatlin Ⅲ, D. M.) CAB International, Oxon, UK, pp47-63.

Tlusty M, Rhyne A, Szczebak JT, Bourque B, Bowen JL, Burr G, Marx CJ, Feinberg L (2017) A transdisciplinary approach to the initial validation of a single cell protein as an alternative protein source for use in aquafeeds. *Peer J.*, **5**: e3170; DOI 10. 7717/peerj.3170.

Wilde E, Schlegel HG (1982) Oxygen tolerance of strictly aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **48**, 131-143.

Yu H, Liang H, Longshaw M, Wang J, Ge X, Ren M, Zhang L (2022) Methanotroph (*Methylococcus capsulantus*, Bath) bacteria meal (FeedKind) could effectively improve the growth, apparent digestibility coefficient, blood biochemical parameters, antioxidant indices of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio var*. Jian). *Anim. Feed Sci. Tech.*, **288**, 115293. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115293.

Yu J, Lu Y (2019) Carbon dioxide fixation by a hydrogen-oxidizing bacterium: biomass yield, reversal respiratory quotient, stoichiometric equations and bioenergetics. *Biochem. Engin. J.*, **152**, 107369. https://doi.org/10.1016/j.bei.2019.107369.