

納豆菌によるアンモニア生成とその有用性

齋藤さくら 清水雪花 長澤晟行 東口芽倭

要旨

本研究では、近年燃料として注目を浴びているアンモニアに着目し、納豆菌による発酵でより多くのアンモニアを作ることを目指す。おからに納豆菌を加え、任意の期間放置し、おから内のアンモニア濃度を滴定によって測定した結果、2日目までは増加したが、3日目以降は増加しないこと、納豆菌の生育に不可欠であるビオチンを多く含む無添加無塩のピーナッツバターを混ぜたもののほうがアンモニアの生成量が多いことが分かった。この生成量の増加がビオチンのみによるものなのかを調べるため、ビオチンのサプリメントを使用し同様の実験を行なったところ、ビオチンのサプリメントを混ぜたものと納豆菌のみのものに差が見られなかった。また、今回の結果より、おからから生成できるアンモニアがどれほど二酸化炭素削減につながるのかを試算した。

1. はじめに

地球温暖化が深刻化する現代社会において、脱炭素社会に向け、二酸化炭素を出さない燃料であるアンモニアに注目が集まっている。工業的なアンモニア生成法としては、「ハーバー・ボッシュ法」が主流であるが、この方法では合成時に炭酸ガスが発生してしまう上、エネルギーを大量に消費するため、温暖化ガスを出さない新たな生成法の研究が進められている。そこで我々は、日本人にとって身近な菌である納豆菌 (*Bacillus subtilis var. natto*) が大豆を発酵させるときに出すアンモニアに着目し、新たなアンモニア生成法確立を目指した。調べたところ、納豆菌については、食品として臭いを減らす研究は盛んに行なわれているが、アンモニアを増やす研究は見られなかった。本研究では、おからを発酵させる時にアンモニア生成量が1番多くなる条件を調べた。発酵に豆でなくおからを使用する理由としては、排出されているというおからを用いることで、フードロスの削減につながるのではないかと考えたからだ。

納豆菌によるアンモニアの生成経路についてはグルタミン酸の資化と、尿素回路の二種類であることが明らかにされている¹⁾。また、納豆菌の生

育にはビタミン B 群の一つであるビオチンが必要であり、納豆特有の粘質物(ポリグルタミン酸、PGA)の生成にも密接な関連があることが明らかになっている²⁾。PGAは、納豆菌により分解され、グルタミン酸となることが知られている。そこで、我々はPGAの合成をビオチンによって促進できれば、アンモニアの生成量も増えると考えた。我々は、先に行なった実験(以下予備実験)では、おからにビオチンを多く含む食品であるピーナッツバターを混ぜて発酵させた。するとアンモニア生成量が格段に増加した。しかし、ビオチンが完全にアンモニア生成促進に関係しているとは言い切れなかったため、本実験ではピーナッツバターを混ぜるものと、サプリメントのビオチンを混ぜるものとを比較して実験を行なった。

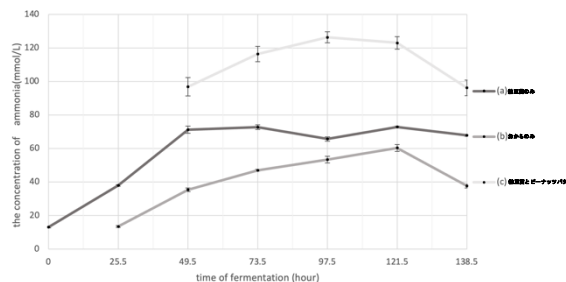


図1. 予備実験でのアンモニア濃度の変化
おから25gに次のものを加え、発酵させた。アンモニア濃度の平均値をプロットし、エラーバーで標準偏差を記した。

2. 材料・研究方法

2-1. 研究試料

納豆菌(高橋祐蔵研究所)

おから(伊賀屋食品工業株式会社,市販)

ピーナッツバター(生鮮館なかむら,無添加無塩)

持続型ビオチン(DHC,1錠 0.1 gにつき 500 µg
のビオチンを含む)

純水(適量)

2-2. 研究方法

(1)滅菌 おから 300 g を 3 つの 300 mL ビーカーに均等に入れ,アルミホイルで蓋をし, 121 °C, 20 分滅菌した.

(2)納豆菌の調製 10 mL の純水に納豆菌を付属の計量スプーン一杯分入れよくかき混ぜた(以後これを納豆菌溶液とする).

(3)発酵 フリーザーパックに, 滅菌したおから 25 g と純水 25 mL を入れたものを複数用意し, 納豆菌溶液を 2 mL 摂取し,何も加えないもの (a'), ピーナッツを 20 g 加えたもの (c'), ピーナッツを 40 g 加えたもの (c''), ビオチン 1 錠を粉末状にして加えたもの (d), ビオチン 2 錠を粉末状にして加えたもの (d') の 5 種類を作成した. それぞれに空気を充填し, 温度を一定に保つことのできる実験用乾燥機内で, 約 40°C に保ち 1~6 日間発酵させた.

(4)アンモニアの濃度の測定 任意の期間発酵させたフリーザーパックに, 気体を逃さないよう素早く 100 mL の純水を加えよく混ぜた. その後木綿の布を用いて溶液を絞って濾し, 10 倍に希釈した.その後 0.005 mol/L の硫酸を用いてメチルオレンジを指示薬として,フリーザーパック一袋につき,4 回の中和滴定を行ない塩基の濃度を測定した.その後平均値を算出した. 滅菌, 発酵の温度等は, 先行研究を参考にした³⁾.

3. 結果

実験の結果が表 1, グラフ化したものが図 2 であ

る. 発酵後のフリーザーパックに水を 100 mL 入れた時点での, 溶液中のモル濃度を計算した. (c') は 0 日目から 5 日間滴定を行なった. それ以外は 1 日目から滴定を行なった.

表 1. 発酵時間によるアンモニア濃度の変化
一番濃度が濃くなった値を斜体字で表示している.

時間	(a)	(c')	(c'')	(d)	(d')
(h)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)
0		33.050			
24	15.300	51.700	72.900	16.750	18.675
47	40.025	<i>95.800</i>	83.800	32.050	39.350
71	47.650	90.900	<i>107.40</i>	<i>44.750</i>	<i>46.000</i>
93		<i>59.275</i>	91.400	89.200	43.000

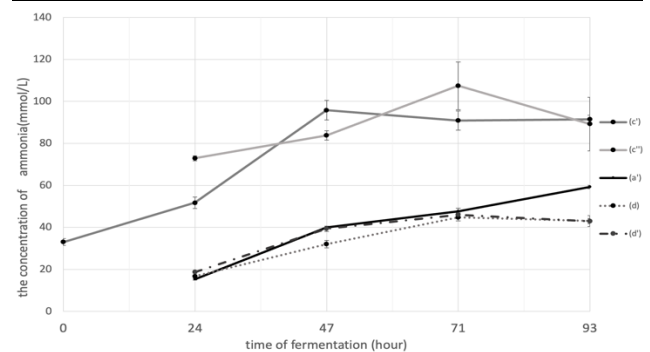


図 2. 発酵時間によるアンモニア濃度の変化

それぞれの平均値をプロットし, エラーバーで標準偏差を記した.

(a') は 5 日間で単調増加した. (c'), (c'') の二つを比べるとアンモニア濃度にそこまで差が見られなかった. (d) (d') については, (a') とほとんど変わらなかった.

(c'), (c'') は, 溶液を濾す時に図 3-A のような糸引が確認された. また, (c'), (c'') は, 滴定の際に図 3-A のような白い沈殿ができた.



図 3. 実験で見られた生成物の様子

A: (c) の糸引 B: (c) の白い沈殿

4. 考察

4-1. 実験についての考察

結果より, (d), (d') は, (a')とほとんど変わらない変化をしたので,ビオチンがアンモニア生成を促進するわけではないことが分かった.しかし本実験には,ピーナッツバターに含まれるビオチンの量よりも大分多量にビオチンを混ぜたことや,水溶性ビタミンであるビオチンを粉末状のまま混ぜたことなどいくつか問題点がある.完全にピーナッツバターのビオチンと条件を揃えられた訳ではないので,これらが要因となってビオチンを混ぜてもほとんど効果がないように見えた可能性もある.

また(c'), (c'') は,糸引が確認されたことから,大量にPGAが生成されたと考えられる,

ピーナッツバターを混ぜてアンモニアの生成量が増えた理由は, ピーナッツバターのアミノ酸の組成にあると考えた.アンモニア生成に関わるアミノ酸は,図4の通りである.また,先行研究²⁾によると,アミノ酸のうち,シスチン,メチオニンは糸引つまりPGAの生成を阻害する.表2よりわかるように,茹でた大豆と比べてもピーナッツバターには,アンモニア生成の元となるアミノ酸が多く含まれているのに対し,大豆に似て,PGAの生成の促進を阻害するアミノ酸が少ない.このような組成がアンモニア生成に良い影響を与えたと考えられる.

予備実験の(a)と本実験の(a')を比較すると, (a)は2日目で上限を迎えたのに対し, (a')は5日目まで増加し続けた.また,最高値も(a')の方が少なかった.実験上,条件は変えていない.本実験で用いたおからに含まれるアミノ酸の量が少なかった可能性がある.発酵期間によるアンモニアの変化は,おから内に含まれるアミノ酸の量によって変化するのではないかと考えた.

(c'),(c'')は誤差範囲が広がってしまった.これは,ピーナッツバターを混ぜた時に見られる沈殿によって,指示薬の色の変化が見えにくくなっていたからであると考えた.(c'')の方がより多くピーナッツバターを入れていたので,沈殿の量が多か

った.誤差を考慮すると,(c') (c'')は,予備実験での(c)の増減とほぼ一致する.

また,図5に模式的に示した通り、本実験と予備実験の結果を合わせて考えたアンモニアの増減と先行研究⁶⁾のPGAの変化の量を重ねてみると,PGAが分解されて量が減っている間にアンモニア濃度も高くなっていく.PGAが最高値を迎えたあと,アンモニアが最高値を迎える.また,PGAが完全に分解され終わる前にアンモニアが最高値を迎えておりそれ以降は増えていないこのことから,一定期間経つと,PGAが分解されてもアンモニア生成が増えなくなることがわかった.PGAが分解されてもアンモニア濃度が上がっていないことから,PGAが分解された後の分解が進んでいないと考えられ,グルタミン酸からアンモニアへの分解を促進させることができればアンモニア濃度は増えると予想できる.

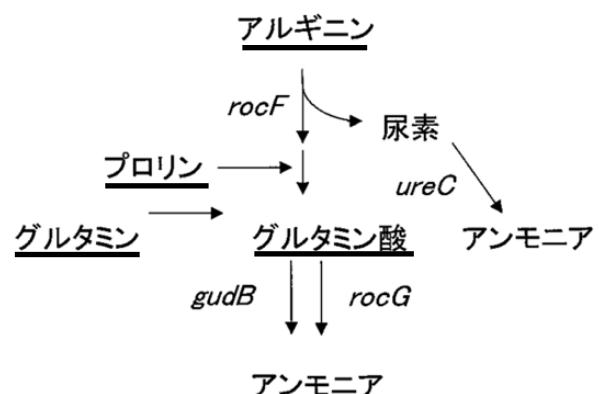


図4. アンモニア生成過程¹⁾

納豆菌の系統的育種による商品の差別化と品質向上, 竹村浩,
2014より引用. アミノ酸は下線で示した.

表2. 食品のアミノ酸の量(mg/可食部 100 g)⁵⁾

	アルギニン	グルタミン酸	プロリン	メチオニン	シスチン
茹でた大豆	1200	3000	870	210	220
おから	410	710	340	97	110
ピーナッツバター	2700	4700	1000	230	290

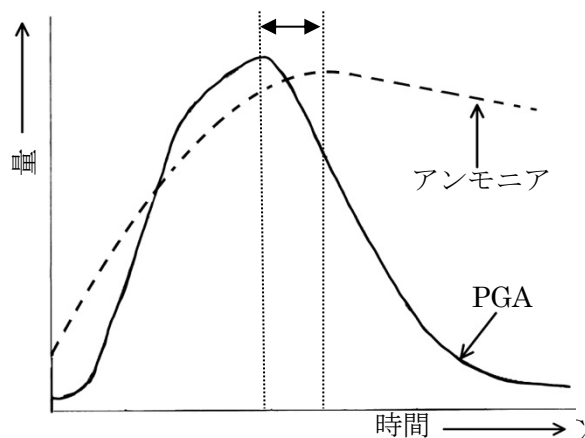


図5. PGAの量の変化とアンモニアの変化の模式図
 生物コーナ―納豆菌も納豆粘質物(ポリグルタミン酸)を食べる！, 伊藤義文・木村啓太郎, 2006より引用, 一部改変

で行なったが, 本研究でもアンモニアを生成することが顕著に見られたことから, 適した温度であったと考える。

4-2. 実験についての考察

二酸化炭素削減度合いについての考察

本実験の目的は, 納豆菌によるおからの発酵からより多くのアンモニアを生成させ, 二酸化炭素の削減につなげることである。よって, 今回の実験で生成したアンモニアの最大量で, どれほどの二酸化炭素が削減できるのか試算を行なった。

(c”) で, 生成したアンモニアの量はおから 25 g あたり 0.15 g である。参考文献のデータ 78) から, おからの排出量を 70 万トン, 廃棄率を 9% とし, おからの廃棄量を求めたところ 63000 トンとなった。このアンモニア生成法を用いると, 廃棄されているおからからおよそ 380 トンのアンモニアが生成できる。この生成したアンモニアを発電に使った場合, 経済産業省の発表している資料 9) によると, 石炭火力発電で発電した際に排出される二酸化炭素を 760 トン削減することが可能になる。日本の二酸化炭素排出量の 12 億トンと比較すると小さ

い値ではあるが, 脱炭素化へ貢献できる。また, 廃棄されたおからは, 通称焼却処分となる¹⁰⁾ ので, その分の二酸化炭素も抑えることができる。

5. まとめと今後の展望

ピーナツバターを混ぜることで格段にアンモニア生成量は増加した。しかし, ビオチンによるアンモニア生成促進は, 本実験で確認することはできなかった。アンモニア生成量が増える期間は, 発酵させるおからに含まれるアミノ酸の量によって変化することが分かった。また, 40°C で発酵させることでアンモニアを生成させる事が出来ることも分かった。本実験で生み出したアンモニアから, 二酸化炭素削減量を試算すると, 760 トンになる事が分かった。

今後は, 水に溶かした少量のビオチンで実験を行ないたい。また, ピーナツバター以外のアミノ酸を加えた場合でも同じように増えるのかも調べたい。アンモニアの生成量を増やすためには, グルタミン酸の分解を促進することが有効であると考えている。

本実験で生成したアンモニアを燃料として活用するためには, 高濃度のアンモニアを気体として取り出す必要がある。我々は, 冷却によりアンモニアを凝縮させることで取り出すことができるのではないかと考えている。アンモニアは, 他の気体と比べて沸点が -33.34°C と高いため, 少ないエネルギーで液化することができる。今後は, アンモニア生成量を増やすだけでなく燃料としての活用に向けた実験にも取り組んでいきたい。

6. 参考文献

- 1) 竹村浩, 2014, 納豆菌の系統的育種による商品の差別化と品質向上. 日本醸造協会誌, 109 巻, 2 号, 79-80.
- 2) 藤井久雄, 1962, 納豆菌による粘質物の生成に関する研究(第一報). 日本農芸化学会誌, 36 巻, 12 号, 1000-1001.
- 3) 宮村英宏・竹中陽子・竹中哲夫, 1998, 納豆

菌発酵によるおからの改質. 日本食品保蔵科学会誌, 24 巻, 1 号, 38, 41.

4) 文部科学省科学技術・学術政策局政策課資源室, 2023. 5, 日本食品標準成分表(八訂)増補 2023 年第 2 章(データ),

https://www.mext.go.jp/content/20230428-mxt_kagsei-mext_00001_012.xlsx, 2024, 1, 15, 2024.1.14

5) 文部科学省科学技術・学術政策局政策課資源室, 2023. 5, 日本食品標準成分表(八訂)増補 2023 年アミノ酸成分表編電子書籍第 2 章第 1 表(データ),

https://www.mext.go.jp/content/20230428-mxt_kagsei-mext_00001_022.xlsx, 2024.1.15

6) 伊藤義文・木村啓太郎, 2006, 生物コーナー納豆菌も納豆粘質物(ポリグルタミン酸)を食べる!, 化学と生物, 44 巻, 8 号, 569-572.

7) 日本豆腐協会, 2011.12.2, 食品リサイクル法に係る発生抑制

8) ミナミ産業株式会社, 2017, おから無排出化による資源の有効活用, 「第 5 回 食品産業もったいない大賞」表彰 事例集, 6

9) 経済産業省資源エネルギー庁資源・燃料部, 2021. 5, 我が国の燃料アンモニア導入・拡大に向けた取組について,

https://www.meti.go.jp/shingikai/energy_environment/green_innovation/pdf/gi_006_03_06.pdf, 2024.1.14

10) Shuhong Li et al. 2013, Soybean Curd Residue: Composition, Utilization, and Related Limiting Factors. International Scholarly Research Notices, 2013, article.