焼酎蒸留廃液の麴菌培養による有効利用と固形分の除去

焼酎蒸留廃液は BOD, SS とともに高く、高速度処理が困難であり、これまで産業廃棄物として大半が海洋投棄などにより処理されてきた。しかし、その海洋投棄もロンドン条約により 1996 年 1 月から禁止される予定であり、蒸留廃液の効率的処理法の開発が急務となっている。今回は廃液を麴菌の培地として利用し、得られた菌体を蛋白質源として飼料に利用するとともに、廃液処理の負荷を軽減するというユニークな方法について解説していただいた。

森村 茂・木田建次

1. はじめに

九州地区における最近の 1 年間の焼酎製造量は、25% アルコール換算で約 256,000 kl にもなる。正確な蒸留廃液量は調査されていないが、平均的数値として、常圧蒸留では 25% アルコール換算製造量の 1.8 倍、減圧蒸留では 1.0 倍の蒸留廃液が排出される。製造された焼酎の常圧蒸留と減圧蒸留の比が 1:1 と仮定して焼酎製造量から推算すると、焼酎蒸留廃液量は約 360,000 kl にも達することになる。

焼酎蒸留廃液の性状は焼酎製造原料によって、また蒸留法によって異なるが、第 1 表に示したように BOD 値は 34,000~84,000 mg/l と非常に高く、高速度処理が困難な高濃度有機廃水である。さらに、SS 含量も、30,000~46,000 mg/l と高いため、ますますその処理が困難となり、その大半が海洋投棄などにより処理されている。しかし、ロンドン条約で、1996 年 1 月 1 日以降産業廃棄物の海洋投棄が禁止される予定であり¹⁾、蒸留廃液の効率的処理法の開発が急務となっている。

われわれは、最初に麴菌を好気培養することで焼酎蒸留廃液中の固形分除去とそれに伴う有効利用を行い、次に固形分が除去された残液の高速度嫌気性処理と生物学的脱窒・硝化を行うことで、BOD 成分だけでなく窒素

成分をも除去するトータルシステムの開発を行ってきた。本稿では、有効利用と固形分除去に関する検討結果を、次稿では、麴菌の好気培養の検討結果とその後の嫌気性処理および脱窒・硝化に関する検討結果から構築した焼酎蒸留廃液の効率的処理システムを紹介する。

2. 焼酎蒸留廃液の性状とその特性

焼酎蒸留廃液の濾過性を調べるために比抵抗を測定した。固形物の有効利用を目的としたため高分子凝集剤を添加することなく測定したが、第 1 表に示したように、米焼酎蒸留廃液の比抵抗は 1.26×10^{13} m/kg と非常に高く、機械的に SS を廃液から分離することが困難であることがわかった。

SUKAN と YASIN²⁾ は、固形物を含む有機廃水にカビを培養することで、固形物が分解され固液分離が容易になると報告している。焼酎蒸留廃液は、第 1 表に示したように栄養的に優れていると思われることから、廃液を培地としてカビを好気培養することにより、濾過性の向上および有用物質の生産が期待された。

3. 焼酎蒸留廃液からの糖化酵素の生産³⁾

焼酎蒸留廃液を培地として麴菌などのカビを培養することにより、濾過性の向上以外にグルコアミラーゼや

Utilization of Distillery Wastewater and Removal of Suspended Solids from the Wastewater by Cultivation of Koji

Shigeru MORIMURA and Kenji KIDA (Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kumamoto University)

第1表 焼酎蒸留廃液の主な性状

	麦焼酎蒸留廃液		米焼酎蒸留廃液	芋焼酎蒸留廃液
	常圧蒸留	減圧蒸留	減圧蒸留	常圧蒸留
BOD (mg/l)	52,400	79,800	84,000	34,700
SS (mg/l)	30,100	46,200	40,400	33,600
有機物 (mg/l)	59,200	84,300	90,500	37,800
pH	4.0	4.1	4.3	4.2
比抵抗 (m/kg)			1.26 × 10 ¹³	

第2表 各種培地を用いて生産された糖化力の比較

培 地	糖化力 (U/ml)
米焼酎蒸留廃液培地	38.9~88.9
麦焼酎蒸留廃液培地	55.5~77.8
芋焼酎蒸留廃液培地	31.1
岡崎培地	32.1~56.4
大出培地	
林田培地	
固体麹	41.7(U/g)

α -アミラーゼなどの糖化酵素を高活性で生産できれば、蒸留廃液からの酵素生産だけでなく培養液の一部を液体麹として使用することも可能となり、焼酎製造プロセスの改善にもつながる。そこで、まず麦焼酎蒸留廃液からの糖化酵素の生産について主として検討した。

3.1 菌株の評価

初発 pH を5に調整した麦焼酎蒸留廃液培地を用いて、フラスコ振盪培養により酵素生産を行い菌株の評価を行った。その結果、試験に供した4菌株のうち *Aspergillus fumigatus* AF-1 と *Aspergillus awamori* var. *kawachii* が、4日間の培養でそれぞれ 55.0, 52.2 U/ml と高い糖化力を示した。そこで、以後の糖化酵素生産実験では九州一円で焼酎製造に広く用いられている *A. awamori* var. *kawachii* を使用することにした。

3.2 種々の焼酎蒸留廃液培地による酵素生産

第2表は、フラスコ振盪培養6日後の酵素活性を示している。米および麦焼酎蒸留廃液培地を用いたとき芋焼酎蒸留廃液培地よりも高い酵素活性を得ることができたが、同一培地、例えば米焼酎蒸留廃液培地においても、使用した蒸留廃液のロットにより生成された酵素活性に 38.9~88.9 U/ml と差が見られた。

また、比較としてこれまで報告されている培地^{4,9)}を用いて *A. awamori* var. *kawachii* を培養したが、生成された酵素活性は焼酎培地に比べ低かった。さらに、焼酎製造に使用されている固体麹をブレンダーで粉碎した後、酵素を抽出し活性を測定したが、1g 固体麹当たり 41.7 U であった。直接の比較はできないが、焼酎蒸留廃液は糖化酵素生産用培地として優れた培地であると言

第1図 *A. awamori* var. *kawachii* のフラスコ振盪培養による糖化酵素生産

える。

3.3 フラスコ振盪培養による糖化酵素の生産

500 ml の三角フラスコを用いて培地の初発 pH 5.0、培地量 100 ml、培養温度 35°C の条件で振盪培養を行い、糖化酵素、菌体濃度および培養液の pH の経時変化を調べた。第1図に示したように、菌体濃度は培養3日目で約 40 g/l に達し6日目まではほぼ一定したが、8日目に低下した。一方、酵素活性は培養日数の経過とともに増加し、8日目には 84 U/ml になった。

経時的にサンプリングした培養上澄液を SDS-PAGE システムを用いて電気泳動したところ、主として1種類のタンパク質が分泌されその濃度が経時的に増加した。一般に固体麹では種々の酵素が生産されるが、焼酎培地による糖化酵素の生産はほぼ単一酵素しか生産されないことから、精製工程も考慮すると非常に優れたプロセスになると考えられた。

しかし、培養上澄液を用いて基質をタビオカデンプンとして生デンプン分解活性を測定した結果、可溶性デンプン分解活性は 73.3 U/ml であったが、生デンプン分解活性は 0.03 U/ml と非常に低いことから、本酵素は生デンプン分解活性を有していないことがわかった。

3.4 Jar fermentor 培養へのスケールアップに

おけるせん断力の影響とその軽減化⁷⁾

カビの培養による酵素生産においてはせん断力が影響を及ぼすことが知られている^{8,9)}ので、フラスコスケールから Jar fermentor にスケールアップをする場合、せん断力の影響を考慮しなければならない。

一般的に、ベレット状菌体の方がフィラメント状菌体よりもせん断力の影響を受けにくいと言われているので、まずベレット状菌体形成のための培養条件について

検討した。菌の形態をペレット状にするには、前培養した菌体の接種法^{10,11}や培養条件を制御する方法¹²などが報告されているが、ここではフラスコ振盪培養における培養時間と菌の形態変化の関係を調べた。すなわち、麦焼酎蒸留廃液培地に水溶性デンプンを添加し全糖濃度を18~30 g/l まで変化させて、各全糖濃度における培養時間と菌の形態変化の関係を顕微鏡観察により調べた。その結果、ペレット状菌体を得るためのフラスコ振盪培養による前培養時間は24時間、フィラメント状菌体を得るための前培養時間は48時間以上要することがわかった。

そこで、ペレット状およびフィラメント状菌体を用いて核酸の漏出速度を測定することにより、菌の形態とせん断力の影響について検討した。

第2図は各搅拌速度における核酸の漏出速度を示しているが、田中ら¹³の報告にあるように、搅拌速度が増加すると核酸の漏出速度が大きくなることから、せん断力の影響が増大すると考えられた。しかし、菌の形態によりその影響は大きく異なり、搅拌速度が200 rpm から600 rpm へと増大した場合に、フィラメント状菌体では核酸の漏出速度が約1.5倍にまで増大するのに対し、ペレット状菌体では約1.2倍にしかならなかった。しかも、ペレット状菌体の600 rpm での核酸漏出速度は $2 \times 10^{-2} \Delta A_{260}/h$ とフィラメント状菌体の200 rpm での値の約70%にすぎず、ペレット状菌体はせん断力の影響をほとんど受けないことがわかった。

3.5 Jar 培養による糖化酵素の生産

フラスコ振盪培養24時間および48時間で得られたペレットおよびフィラメント状菌体を用いて、200, 400, 600 rpm の各搅拌速度でJar培養を行い、糖化力および菌体量の経時変化を調べた。

第3図は、フィラメント状およびペレット状菌体を用

第2図 ペレット状菌体とフィラメント状菌体でのせん断力による核酸漏出速度の比較
□, ペレット状菌体; ■, フィラメント状菌体

第3図 ペレット状菌体とフィラメント状菌体のJar培養におけるせん断力の影響
○, △, ペレット状菌体; ●, ▲, フィラメント状菌体

いた場合、各搅拌速度における培養中の糖化力と菌体量の最高値を示している。フィラメント状菌体と比較して、すべての搅拌速度においてペレット状菌体を用いた方が糖化力が高くなった。また、最も高い糖化力が、フィラメント状菌体を用いた場合400 rpmの搅拌速度で得られているのに対し、ペレット状菌体では600 rpmにシフトしており、その値も113 U/mlと高い値となった。

このように、*A. awamori* var. *kawachii*による焼酎蒸留廃液からの糖化酵素生産においては、24時間前培養したペレット状菌体を用いることにより、Jar培養へのスケールアップに関して全く問題なく、600 rpmの搅拌速度で113 U/mlの高い糖化力が得られることがわかった。

4. 焼酎蒸留廃液からのタンパク質分解酵素の生産¹⁴⁾

焼酎蒸留廃液を培地として生産される糖化酵素は、生デンプン分解能を有さない糖化酵素であった。焼酎蒸留廃液にはタンパク質が多く含まれることから、より付加価値の高い酵素の生産を目的としてタンパク質分解酵素の生産について検討した。

プロテアーゼを生産する8種の保存株を用いて、新名ら¹⁵⁾の合成培地および麦焼酎蒸留廃液培地でフラスコ振盪培養を行った結果、*Aspergillus usami* mut. *shiro-usami* IFO 6082が最も高いプロテアーゼ活性を有していた。この結果に基づき、*A. usami* mut. *shiro-usami* IFO 6082を最優秀菌株としてJar培養を行った。

フラスコ振盪培養により決定した初発pH 5、温度30℃の至適培養条件下で、通気量1 vvm 搅拌速度400~800 rpmでJar培養を行った。培養には糖化酵素生産

第4図 Jar 培養における攪拌速度の影響
(72 時間培養)

の場合と同様に 24 時間のフラスコ振盪培養で得られたペレット状菌体を用いた。第4図に示したように、800 rpm ではせん断力の影響を受け菌体は増殖できず、プロテアーゼを産生しなかった。一方、400 rpm では菌体濃度は 600 rpm とほぼ同じであったが、プロテアーゼ活性は 600 rpm の約半分となった。プロテアーゼ生産においても糖化酵素の場合と同様に 600 rpm で 240 U/ml と最も高い活性が得られ、この値はフラスコ振盪培養で得られた活性 (150 U/ml) よりも大きな値であった。この結果は、麦焼酎蒸留廃液からの糖化酵素生産におけるせん断力の影響を検討したときに得られた結果と一致しており、ペレット状菌体を用いることによりせん断力の影響が軽減され、その結果、600 rpm という高い攪拌速度で運転でき、溶存酸素濃度が律速にならなかったためと考えられた。菌体濃度も培養 24 時間後に 22 g/l に達しており、プロテアーゼ生産に関しても全く問題なく Jar fermentor スケールで生産できることがわかった。

5. 焼酎蒸留廃液からの微生物タンパク質の生産およびその飼料化のための予備検討¹⁶⁾

糖化酵素やタンパク質分解酵素生産も有効なプロセスであるが、これらの酵素は菌体が増殖してから分泌されることから、酵素生産のための培養時間が長くなる。一方、菌体は 24 時間で増殖することから、焼酎蒸留廃液からのタンパク質源としての菌体生産は酵素生産と比較して効率的な利用法になると考えられた。そこで、麹菌 *A. awamori* var. *kawachii* を用いて好気培養を行い、菌体増殖と焼酎蒸留廃液の性状の経時変化を調べた。また、廃液中の有機物からの菌体生成収率を物質収支をとって調べた。さらに生成菌体の飼料化のための消化率についても検討した。

第5図 *Aspergillus awamori* var. *kawachii*
のフラスコ振盪培養での経時変化

5.1 フラスコ振盪培養による菌体生産と培養液の経日変化

初発 pH 5.5 でフラスコ振盪培養を行い、菌体濃度、菌体中のタンパク含量、比抵抗、TOC、SS の経時変化を分析し、第5図に示した。菌体濃度は 24 時間培養で 16 g/l に増加し、48 時間後には 28 g/l、72 時間後には 32 g/l となった。その間、菌体中のタンパク含量は約 35 % で一定していた。一方、比抵抗は培養 48 時間までは急激に減少し、それ以降は約 3×10^{11} m/kg となり、焼酎蒸留廃液の約 1/35 にまで低下した。また、TOC と SS 濃度は培養 72 時間で蒸留廃液の 76% と 25% に低下した。さらに、培養 72 時間後の PO_4^{3-} 濃度も、焼酎蒸留廃液中の 1,360 mg/l から 235 mg/l にまで低下していた。このように、焼酎蒸留廃液を培地として培養して得られた菌体は、タンパク含量が 35% と高く飼料化が可能であると考えられた。しかも、麹菌を培養することにより焼酎蒸留廃液の比抵抗が小さくなるため固液分離が容易となること、および TOC、SS、リンが減少することからその後の廃水処理への負荷が軽減でき、菌体生産プロセスは有効利用法として優れていることが示唆された。

5.2 Jar fermentor 培養による菌体生産

酵素生産の項で述べたように、せん断力の影響を軽減するために 24 時間前培養したペレット状菌体を用いて攪拌速度 600 rpm で Jar 培養すると最大酵素活性を得ることができた。そこで、菌体生産のための Jar 培養においても 24 時間フラスコ振盪培養したペレット状菌体を用いて、フラスコ振盪培養の結果に基づいて初発 pH 5.5、培養温度 35℃、通気量 1 vvm、攪拌速度 600 rpm の条件で行った。第6図に示したように、アミラーゼ活性は培養時間が長くなると増加するが、菌体濃度は 24 時間で約 43 g/l に達し、その後はほぼ一定していた。従って、アミラーゼやプロテアーゼの酵素生産と比較して菌

第6図 Jar 培養における乾燥菌体重量と糖化力の経時変化

第7図 Jar 培養における菌体のタンパク質含量と消化率の経時変化

体生産は短時間の培養で十分であることがわかった。

5.3 Jar fermentor 培養における物質収支

焼酎蒸留廃液からの菌体生成収率を明らかにするために、Jar 培養 24 時間後の培養濾液、培養菌体の全有機物濃度と CHN 分析から計算した C, N 濃度、および CO₂ ガス発生量から計算した C 濃度を、焼酎蒸留廃液培地 1 l から生成される重量に換算して、有機物、炭素、窒素の物質収支をとり第3表にまとめた。

有機物換算では、米焼酎蒸留廃液中の 82.6 g の有機物から 37.0 g の菌体（有機物としては 32.5 g）が得られ、菌体への転換率は 39.3% となった。一方、CHN 分析結果および炭酸ガス発生量から計算した炭素収支では、培地中の 41.8 g の炭素のうち 37.1% が菌体に取り込まれ、56.2% は培養液中に残存し、9.1% が炭酸ガスに転換されていた。窒素収支に関しては培地中の 5.9 g の窒素のうち 33.9% が菌体中に取り込まれ、69.5% は培養液中に残存することがわかった。

5.4 Jar fermentor を用いた好気培養におけるタンパク質含量と消化率の経時変化

Jar 培養における菌体中のタンパク質含量および消化率の経時変化を第7図に示した。タンパク質含量は培養経過中 35% 以上であり、フラスコ振盪培養の値よりも高い値を示した。消化率も培養期間中約 52% と一定していた。このように、菌体中のタンパク含量はフラスコ振盪培養と同等かそれ以上の値を示し飼料に適していると思われたが、消化率が若干低かった。また、24 時間培

第8図 24 時間 Jar 培養で得た菌体の消化率に及ぼす加熱処理時間の影響

養後の菌体中のタンパク質以外の成分は、粗脂肪 9.9%, 炭水化物 19.0%, 繊維 26.7% であった。なお、炭水化物値は全体からその他の成分分析値を差し引いたものである。

5.5 消化率向上のための加熱処理の効果

菌体の消化率を向上させる方法として加熱処理が有効であると言われている。そこで、Jar 培養 1 日後の菌体についてオートクレーブを用いて 100°C の条件で処理時間と消化率の関係を調べた。第8図に示したように、加熱時間が 20 分までは消化率が向上したが、それ以降はほぼ一定した。20 分間の加熱処理により消化率は 52% から 62% へと 10% 向上することから、消化率向上のための前処理法として加熱処理が有効であることがわかった。

第3表 24 時間 Jar 培養後の菌体生産における物質収支

	焼酎蒸留廃液	菌体を除去した培養濾液	菌体	CO ₂	菌体収率 (%)
全有機物 (g)	82.6	45.5	32.5		39.3
全炭素 (g)	41.8	23.5	15.5	3.8	37.1
全窒素 (g)	5.9	4.1	2.0		33.9

6. おわりに

焼酎蒸留廃液を培地として *A. awamori* var. *kawachi* を好気培養すると、わずか 1 日の Jar 培養でタンパク質約 40%, 粗脂肪約 10% の菌体が、約 40 g/l の濃度で得られることがわかり、この菌体の飼料としての利

用が考えられる。また、培養により廃液の比抵抗が大きく低下することから固液分離が容易となった。さらに培養上澄液の TOC 濃度が低下し、後段の廃液処理への負荷が軽減されるだけでなく、 PO_4^{3-} が 83% 除去されることがわかった。

以上、*A. awamori* var. *kawachii* の好気培養による菌体生産は、焼酎蒸留廃液の有効利用と濾過性の向上、さらにリン除去も含む廃水処理への負荷軽減として有効なプロセスであることがわかった。

＜熊本大学工学部応用化学科＞

文 献

- 1) 日本経済新聞（夕刊）1993 年 11 月 12 日
- 2) S. S. SUKAN, B. A. YASIN : *Process Biochemistry*, 21, 50 (1986)
- 3) S. MORIMURA, K. KIDA, Y. YAKITA, Y. SONODA, H. MYOGA : *J. Ferment. Bioeng.*, 71, 329 (1991)
- 4) 岡崎光雄, 新名惇彦, 照井堯造 : 醸工, 23, 581 (1965)
- 5) 大出通資 : 醸工, 26, 400 (1968)
- 6) S. HAYASHIDA : *Agric. Biol. Chem.*, 39, 2093 (1975)
- 7) S. MORIMURA, K. KIDA, Y. SONODA : *J. Ferment. Bioeng.*, 74, 129 (1992)
- 8) S. MUTAKATA, N. KOBAYASHI, S. SATO, J. TAKAHASHI : *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 760 (1988)
- 9) 福島弥一, 岡田王春, 伊藤晴通, 深瀬哲朗, 茂田井宏 : 醸酵工学, 69, 441 (1991)
- 10) J. C. VAN SUIJDAM, N. W. F. KOSSEN, P. G. PAUL : *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 211 (1980)
- 11) J. BARNOS-GONZALEZ, C. MARTINES, A. AGUILERA, M. RAIMBAULT : *Biotechnol. Lett.*, 11, 551 (1989)
- 12) J. M. STYOGANTSEVA, R. J. ARE, U. E. VIESTURS : *Acta Biotechnol.*, 9, 149 (1989)
- 13) H. TANVKA, J. TAKAHASHI, K. UEDA : *J. Ferment. Technol.*, 52, 646 (1975)
- 14) S. MORIMURA, K. KIDA, Y. SONODA : *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 183 (1994)
- 15) A. SHINMYO, M. OKAZAKI, G. TERUI : *J. Ferment. Technol.*, 46, 733 (1968)
- 16) S. MORIMURA, K. KIDA, M. NAKAGAWA, Y. SONODA : *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 160 (1994)

●執筆者紹介（順不同・敬称略）

木田 建次＜Kenji KIDA＞

昭和21年6月1日生れ＜勤務先と所在地＞熊本大学工学部応用化学科，〒860 熊本市黒髪2-39-1＜略歴＞昭和46年大阪大学工学部醸酵工学科修士課程修了，三菱油化，日立造船を経て昭和61年熊本大学講師，平成2年同大学助教授，平成6年同大学教授，現在に至る＜抱負＞水環境，廃棄物のリサイクルなどの研究開発及びこの分野での海外協力も含め，少しでも環境保全に貢献したい＜趣味＞健康のための水泳とお酒。

森 村 茂＜Shigeru MORIMURA＞

昭和32年2月26日生れ＜勤務先と所在地＞熊本大学工学部応用化学科，〒860 熊本市黒髪2-39-1＜略歴＞昭和55年大阪大学工学部醸酵工学科卒，同年日立造船（株）入社，平成元年熊本大学助手，現在に至る＜抱負＞環境保全のための廃水処理技術及び酵母の生理学に興味を持っている＜趣味＞休日に子どもとする軽いスポーツ。

谷 口 肇＜Hajime TANIGUCHI＞

昭和14年4月24日生れ＜勤務先とその所在地＞農林水産省食品総合研究所，〒305 茨城県つくば市観音台2-1-2＜略歴＞昭和43年東京大学農学系大学院博士課程退学，同年東京大学農学部助手，62年農林水産省食品総合研究所素材化技術研究室長，平成3年岩手県醸造食品試験場長，平成5年農林水産省食品総合研究企画連絡室長，現在に至る＜抱負＞一見単純だが非常に奥の深い糖質の世界に強い魅力を感じている＜趣味＞盛岡在任中（岩手県醸造食品試験場）にスキーを覚えて50の手習いで楽しんでいる。

福井 作蔵＜Sakuzo FUKUI＞

大正13年6月12日生れ＜勤務先とその所在地＞福山大学工学部生物工学科 遺伝子工学，〒729-02 広島県福山市学園町1番地三蔵＜略歴＞昭和22年京都大学農学部農芸化学科卒，29年京都大学助教授（食糧科学研究所），30年東京大学助教授（応用微生物研究所），53～56年同大学教授（応用微生物研究所），53～63年広島大学教授（工学部発酵工学）63年福山大学教授（工学部生物工学），広島大学名誉教授，現在に至る＜抱負＞生物行動学＜趣味＞美感覚の解析，美術観賞。