研究論文

膜分離法を利用した油脂分解微生物の培養

—油脂分解菌の探索を中心として—

Cultivation of Fatty Oil-Decomposing Micro-Organisms Using a Membrane Separation Process

—The study focused on identifying fatty oil decomposing bacteria—

奥田友章*・古崎康哲*・石川宗孝**・中西 弘**

ABSTRACT

In this study, fatty oil-decomposing micro-organisms were cultivated by using fatty oil as the only carbon source in an activated sludge process combined with membrane separation. Batch experiments were performed to examine decomposition characteristics of these micro-organisms. Isolation and identification were performed to examine flora by bacteriological methods. Consequently, the following results were obtained. (1) The fatty oil decomposition ability of fatty oil-decomposing micro-organisms was higher than the control micro-organisms (common activated sludge process). (2) The fatty oil hydrolytic ability of these micro-organisms was higher than the control micro-organisms. (3) Six out of seven bacteria related to decomposition of fatty oil in twenty-four isolated bacteria were found to be *Nocardia* sp.. (4) It was found that all of seven isolated bacteria had the hydrolytic ability of the fatty oil and the decomposition ability of free fatty acid.

Key Words : Fatty oil, Fatty oil-decomposing micro-organisms, Membrane separation process, *Nocardia* sp.

要 旨

本研究では、膜分離活性汚泥法を用い、投入する有機炭素源を油脂のみとし、油脂分解微生物を培養した。油脂分解微生物の油脂分解特性について調べるために、回分実験を行った。また、油脂分解に直接関与する細菌を探索するために、細菌学的手法により油脂分解微生物を構成する細菌を単離し、同定した。その結果、以下のような知見が得られた。(1)油脂分解微生物は対照微生物（活性汚泥）と較べて、最大油脂除去速度定数は約2倍であり、油脂分解能力が高い。(2)油脂分解微生物は対照微生物と較べて、油脂の加水分解能力が高い。(3)24株の単離菌の内、油脂の分解に関与する細菌7株中6株は *Nocardia* 属であった。(4)単離された細菌7株はすべて、油脂の加水分解能力および、遊離脂肪酸の分解能力を有することがわかった。

キーワード：油脂、油脂分解微生物、膜分離法、*Nocardia* 属

1. はじめに

高濃度の油脂を含む排水が流入する処理施設では、油脂に起因すると思われるさまざまな弊害が起ることが知られている^{1,2)}。そのため、油脂の生物処理を効率的に行うための高機能な微生物およびその適切な利用方法の開発が望まれている。

そこで、本研究では、膜分離活性汚泥装置を用い、サポニンを添加することにより、通常の活性汚泥から、油脂除去に優れた汚泥（油脂分解微生物）の培養を行い、得られた油脂分解微生物について回分実験を行い、油脂分解特性と油脂分解過程を検討した。また、細菌学的手法³⁾により油脂分解微生物を構成する細菌を単離し、油脂分解に直接関与する細菌の

* 大阪工業大学大学院 Tomoaki OKUDA, Yasunori KOSAKI

** 大阪工業大学工学部 Munetaka ISHIKAWA, Hiroshi NAKANISHI

1998年11月4日受付

1999年5月19日受理

図-1 連続培養実験の実験装置

探索を行い、油脂の分解機構について検討した。

2. 実験方法

2.1 連続培養実験

実験装置は図-1に示すように、反応槽と各基質の投入装置から構成されている。反応槽は有効容量45ℓで浸漬型の分離膜（材質：塩素化エチレン、平均孔径：0.4μm、有効膜面積：0.11㎡/枚）を反応槽下部に5枚設置し、反応槽の水面と膜との水頭差により、ろ過を行う構造になっている。曝気は、膜の直下から約60ℓ/minで行い、膜が常に洗浄されるようになっている。油脂は表1のような性状のサラダ油を適宜希釈し、撹拌しながら間欠的に1日合計7時間投入した。サポニンは、槽内汚泥の油脂に対する馴致を早め、油脂の分解を促進する目的²⁾で、油脂投入と同時に投入した。栄養塩類は、表2に示す組成のものを定量ポンプで常時投入した。供試汚泥には、下水処理場の活性汚泥と、研究室内で油脂に馴致させた汚泥をほぼ同じ割合で混合したものを用いた。

実験条件を図-2に示す。実験開始当初は、投入する有機炭素源をグルコース、グルタミン酸、酢酸アンモニウムを主成分とした人工下水を使用し、TOC容積負荷を1.0 kg/m³/dayとし、段階的に投入する有機炭素源を人工下水から油脂へと移行させ、

表1 油脂の性状

項目	濃度 (mg/ℓ)
BOD	604
COD _{Mn}	118
COD _{Cr}	2320
TOC	494
Hex	660

N社製サラダ油を1000倍希釈

表2 栄養塩類の組成

成分	濃度 (g/ℓ)
K ₂ HPO ₄	2.18
KH ₂ PO ₄	0.85
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	4.46
NH ₄ Cl	0.17
MgSO ₄ ・7H ₂ O	2.25
CaCl ₂	2.75
FeCl ₃ ・6H ₂ O	0.025
(NH ₃) ₂ CO ₃ ・H ₂ O	1.05

図-2 連続培養実験の実験条件

43日目から有機炭素源を油脂のみとし、TOC容積負荷を0.3 kg/m³/dayとして実験を行った。

分析項目は、ヘキサン抽出物質（以下Hexと略す）、TOC、MLSS、生菌数とした。Hex、TOC、MLSSの測定はともに下水試験方法に従った。また、Hexは混合液、TOCはろ液を測定した。生菌数は寒天平板培地を用い、油脂分解菌を探索するための選択培地として油脂培地¹⁾を使用し、非選択培地としてCGY培地を使用した。油脂培地は有機炭素源を油脂のみとし、この培地で増殖可能な細菌は油脂の分解に直接関与する可能性があると判断した。CGY培地はカシトン、グリセリン、酵母エキスを主成分とする培地で、高い生菌数を得ることができる⁴⁾。

2.2 油脂分解微生物の分解特性

連続培養実験で培養した油脂分解微生物（実験開

表3 栄養塩類の組成

成分	濃度 (g/l)
KH ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	1
KCl	0.3
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.5
CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.2
NH ₄ Cl	1

始100日目)の油脂分解能力および油脂分解過程を調べるために、回分実験を行った。実験装置は、反応槽、恒温水槽、エアープンプから構成されている。反応槽は、有効容量3 lの円筒型で、その中に表3に示す組成の栄養塩類、微生物濃度(MLSS)約5000 mg/l、初期油脂濃度約700 mg-Hex/lを投入し、曝気量を10 l/minとして、所定の時間ごとにサンプリングし、Hex, MLSS, 高級脂肪酸濃度を測定した。高級脂肪酸濃度は、下水試験方法に準じてヘキサンにより抽出した後、GC(本体:SHIMADZU GC-14B, 検出器:FID, カラム:ULBON HR-1)により測定した。ただし、本法では遊離脂肪酸は分析できるが、グリセリンとエステル結合した脂肪酸(グリセリド)は分析できない。そこで、グリセリドの分析については、ヘキサンにより抽出した後、KOHを用いてグリセリドをけん化させ、全てを遊離脂肪酸の状態にして分析に供した。また、対照微生物は、研究室内で、グルコースを主成分として培養した活性汚泥を用いた。

2.3 油脂分解に関与する細菌の探索

連続培養実験で培養した油脂分解微生物の中で、油脂分解に関与していると考えられる細菌の探索を行うために、生菌数の測定を行った平板培地の中から、他と隣接あるいは混在していないコロニーのうち、形態や色が違うものを釣菌し、平板上で2回植え継ぎを行い純粋菌であることを確認した後、スラントで保存した。単離した細菌は、特徴づけテストを行い、属までの同定³⁾を行った。また、油脂培地から単離した細菌は、油脂分解に直接関与していると考えられるため、油脂分解試験を回分実験により行った。実験は、容量300 mlの三角フラスコに油脂液体培地を50 ml分取し、純粋培養した単離菌を投入した後、25°C, 120 rpmで振とう培養し、48hr, 98hr後の試料をGCにより測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 連続培養実験

図-3 槽内濃度の経時変化

図-4 生菌数の経時変化

図-3, 図-4に槽内の水質および生菌数の経時変化を示す。TOCは実験開始65日目まで大きな増減がみられ、有機炭素源を油脂のみとした直後には急激な増大がみられた。Hexは40~65日目までは増加する傾向がみられ、槽内の生物相が安定していないと推測されたが、65日目以降は、TOC, Hex, MLSSはどれも変化は少なくなり、生物相が定常状態となったことが推測された(また、膜透過水のHexは、常に0 mg/l程度であった)。油脂培地における生菌数は、培養開始直後は 2.0×10^9 CFU/g-MLSS前後であったが、40日目以降は 1.0×10^{10} CFU/g-MLSS前後となり、油脂を有機炭素源とする細菌が増加したことがわかった。以上のことから、細菌相が安定した後に水質が安定したものと考え、培養が定常状態となったのは65日目以降であると考えられる。

3.2 油脂分解微生物の分解特性

図-5は回分実験による油脂濃度の経時変化を示したものである。油脂分解微生物は対照微生物(活性汚泥)と比べ、Hexの減少が大きかった。このことから、油脂分解微生物は対照微生物と比べ、油脂

図-5 Hexの経時変化

図-6 L-Bプロット

分解能力が高いことがわかった。

次に、油脂の初期投入濃度を变化させて回分実験を行った結果を次式のような Monod 型の式で整理した。

$$\frac{dC}{dt} = \frac{kXC}{K_s + C} \quad \dots\dots\dots (1)$$

ここで、 dC/dt ：油脂分解速度 (mg/ℓ/day)， k ：最大油脂除去速度定数 (1/day)， K_s ：飽和定数 (mg/ℓ)， X ：MLSS 濃度 (mg/ℓ)， C ：Hex 濃度 (mg/ℓ)

(1)式を変換し、図-6 の L-B プロットにより k と K_s を求めたものを表 4 に示す。油脂分解微生物の k と K_s は、それぞれ、0.44 (1/day)、1300 (mg/ℓ) となり、対照微生物で同様の実験を行った場合に較べ最大油脂除去速度定数が約 2 倍高くなっていることがわかった。このことから、油脂分解微生物は、油脂分解能力が高いことが確認された。

図-7 は油脂分解微生物と対照微生物について回分実験を行い、油脂投入 5 分後と 12 時間後の脂肪酸組成の変化を示したものである。油脂（サラダ油）

表 4 k 、 K_s の比較

	最大油脂除去速度定数 k : (1/day)	飽和定数 K_s : (mg/ℓ)
油脂分解微生物	0.44	1300
対照微生物 (活性汚泥)	0.27	1000

投入 5 分後の脂肪酸組成は炭素数 16 および 18 の脂肪酸がグリセリド（油脂）としてそれぞれ約 40 mg/ℓ、約 180 mg/ℓ であったものが、12 時間後には、油脂分解微生物ではグリセリドの濃度が減少しているのに対し、対照微生物では減少がみられなかった。このことから、油脂分解微生物はグリセリドを加水分解する能力が高いことがわかった。また、グリセリドの分解代謝物である遊離脂肪酸に蓄積がみられないことから、油脂分解微生物は遊離脂肪酸の分解能力も高いことがわかった。

3.3 油脂分解に関与する細菌の探索

表 5 は定常状態後の槽内から細菌を単離し特徴づ

図-7 脂肪酸組成の変化

表5 単離菌の特徴づけテストと属名

単離 培地	No	グラム 染色	形状	オキシターゼ 試験	カタラーゼ 活性	O F テスト	運動性	芽胞	属名
油脂培地	1	+	桿	-	+	O	-	-	<i>Nocardia</i> sp.
	2	+	桿	-	+	O	-	-	<i>Nocardia</i> sp.
	3	+	桿	-	+	O	-	-	<i>Nocardia</i> sp.
	4	+	桿	-	+	O	-	-	<i>Nocardia</i> sp.
	5	+	桿	-	+	O	-	-	<i>Nocardia</i> sp.
	6	+	桿	-	+	O	-	-	<i>Nocardia</i> sp.
	7	+	桿	-	+	F	-	-	<i>Corynebacterium</i> sp.
CGY 培地	8	+	桿	-	+	O	-	-	<i>Nocardia</i> sp.
	9	+	桿	-	+	F	-	-	<i>Corynebacterium</i> sp.
	10	-	桿	+	-	F	+	-	
	11								
	12	+	桿	-	-	F	-	-	<i>Brochothrix</i> sp.
	13	+	桿	-	-	O	+	-	
	14	+	球	-	-	F	+	-	<i>Enterococcus</i> sp.
	15	-	桿	-	+	O	+	-	
	16	+	桿	-	+	F	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	17	-	球	-	+	O	+	-	<i>Acinetobactor</i> sp.
	18	+	球	-	+	O	+	-	
	19	+	桿	-	+	F	-	-	<i>Corynebacterium</i> sp.
	20	-	桿	-	+	O	+	-	
	21	+	桿	-	+	F	-	-	<i>Corynebacterium</i> sp.
	22	-	桿	-	-	F	-	-	<i>Streptobacillus</i> sp.
	23	-	桿	-	+	O	+	-	
	24	+	桿	-	-	F	-	-	<i>Brochothrix</i> sp.

図-8 単離菌の油脂分解試験

けテストを行い、属までの同定を行った結果である。単離された細菌は24種類でNo.1～7は油脂培地から、No.8～24はCGY培地から単離されたものである。CGY培地から単離された細菌は、属名が多様であったのに対し、油脂培地から単離された細菌は7株中6株が *Nocardia* 属であった。

次に、図-8は油脂培地から単離した7株について油脂の分解試験を行い、炭素数18(C18)のグリセリドおよび遊離脂肪酸の経時変化を調べたものである。7株の単離菌ではすべてグリセリドの減少がみられ、代謝物である遊離脂肪酸の生成がみられたことから、油脂の加水分解能力があることがわかった。また、遊離脂肪酸の生成濃度はグリセリドの減少量に較べて小さな値となった。炭素数18より小さい脂肪酸についてもほとんど検出されなかったことから、遊離脂肪酸の分解能力があることがわかった。これらのことから、油脂培地から単離された7株の細菌はすべて油脂の加水分解能力および遊離脂肪酸の分解能力を有することがわかった。

4. おわりに

本研究では投入する有機炭素源を油脂のみとして連続培養実験を行い、油脂分解微生物を培養し、以下のような知見を得た。

(1) 油脂分解微生物の分解特性

1. 本研究で培養した油脂分解微生物は対照微生物

(活性汚泥)と較べて、回分実験でのHexの減少が大きく、最大油脂除去速度定数は約2倍であり、油脂分解能力が高いことが確認された。

2. 脂肪酸のGC分析から、油脂分解微生物は、対照微生物と較べて、グリセリド(油脂)の減少が大きく、油脂の加水分解能力が高いことがわかった。また、グリセリドの分解代謝物である遊離脂肪酸の蓄積がみられないことから、遊離脂肪酸の分解能力も高いことがわかった。

(2) 油脂分解に関与する細菌の探索

1. 油脂分解微生物から単離された細菌24株の内、油脂培地から単離された細菌7株中6株は *Nocardia* 属であった。

2. 油脂培地から単離された細菌7株はすべて油脂の加水分解能力および遊離脂肪酸の分解能力を有することがわかった。

参考文献

- 1) 古崎康哲, 石川宗孝, 中西弘: 膜分離を用いた油脂分解微生物の培養と油脂分解特性に関する基礎的研究, 環境工学研究論文集, 34, pp.221-229 (1997)。
- 2) 石川宗孝, 北村友一: 微生物活性助剤を用いた油分の除去, 環境技術, 21, pp.556-559 (1992)
- 3) Cowan, S. T: 医学細菌同定の手びき, 第3版, 坂崎利一訳, 近代出版 (1993)
- 4) 橋本奨, 藤田正憲, 池道彦: SRT制御に伴う活性汚泥細菌相の構成変化, 衛生工学研究論文集, 23, pp.251-258 (1987)

行事案内

'99センシング技術応用セミナー

「環境対応技術の最新動向」

日時: 11月24日(水) 10:00～16:40

会場: 住友電設大阪本社 会議室

大阪市西区阿波座2-1-4

TEL: 06-6537-3570

主催: センシング技術応用研究会, (株)大阪府技術協会

参加費 (講演テキスト代含む)

主催団体: ¥12,000, 協賛団体: ¥15,000

一般: ¥20,000, 学生: ¥6,000

次 第

「総論: 空気・土壌環境技術」

摂南大薬学部 宮田 秀明氏

「電磁波環境技術」

徳島大工学部 伊坂 勝生氏

「遺伝子組換え酵母による環境ホルモンの検出」

大阪大学大学院薬学研究科 西原 力氏

「バイオ菌を利用した水の浄化方法とその効果」

青木電器工業(株)環境事業部 高橋 利洋氏

「におい環境のモニタリング」

新コスモス電機(株)産機営業本部 北口 久雄氏

「使用済み家電商品のリサイクル」

(株)松下テクノリサーチ技術部 徳舩 弘幸氏

申込先: (株)大阪府技術協会

TEL 0725-51-2541 FAX 0725-53-2332