

(38) 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 (II)

～油脂分解菌の探索を中心として～

Cultivation and Decomposition Characteristics of Fatty Oil Decomposing
Micro-Organisms Using a Membrane Separation Process(II)

- The study focused on identifying fatty oil decomposing bacteria -

古崎 康哲*, 石川 宗孝*, 中西 弘*

Yasunori KOSAKI*, Munetaka ISHIKAWA*, Hiroshi NAKANISHI*

Abstract : We cultivated fatty oil decomposing micro-organisms by feeding with fatty oil alone in an activated sludge process combined with membrane separation. Isolation and identification were performed to examine flora by bacteriological methods. Batch experiments were performed to examine decomposition characteristics of this micro-organism and identification. Consequently, the following results were obtained. (1) Fatty oil decomposing micro-organisms more decomposed fatty oil than the control. This organism is considered possess 10 times more fatty oil decomposing bacteria than the control. (2) Based on the results of long chain fatty acid measurement by gas chromatography, that hydrolytic ability of the fatty oil of this micro-organism was higher than the control. (3) Six out of 18 isolated bacteria were found to be related to decomposition of fatty oil *Nocardia sp.* (4) Three of these strains decomposed fatty oil from the results of the tween80 test and fatty oil decomposing test, respectively.

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

1. はじめに

前報¹⁾において著者は、膜分離高濃度活性汚泥法の方式を用いることにより、投入する有機炭素源が油脂のみである場合においても、高い油脂除去率が得られること、また、反応槽内では油脂のみを有機炭素源として増殖可能な微生物、すなわち油脂分解微生物が培養されていることを示した。この微生物は油脂を唯一の炭素源として増殖できるだけでなく、一般的な活性汚泥に較べて油脂の分解速度が高いことがわかった。これらの知見から、油脂の新たな生物処理方法として膜分離活性汚泥法が有効であることを報告した。

油脂分解微生物による油脂の分解は、一般的な生物分解と同様に、まず、酵素リパーゼによってグリセリンと高級脂肪酸とに加水分解された後、グリセリンは解糖経路に入り、高級脂肪酸は β 酸化経路に入り、最終的にはそれぞれ TCA サイクルにより CO_2 と H_2O に分解されると考えられる。一般的に油脂が排水中の有機物の中でも特に分解されにくいのは、活性汚泥微生物の中にこれらの経路に関与する微生物が少ないものと考えられる。松山²⁾は油脂に対して馴養された活性汚泥から、油脂分解能力の高い菌株を分離している。このことから、油脂分解微生物においても、

*大阪工業大学土木工学科 Dep. of Civil Eng., Faculty of Eng., Osaka Institute of Technology

油脂分解過程において特異的に作用する細菌が多数存在していることが考えられる。また、油脂分解に関与する細菌を単離することができれば、FISH 法などの遺伝子工学的な細菌の直接定量への道を開くことができ、より正確な微生物相の把握が可能になると考えられる。

本研究では前報と同様の操作にて連続培養を行い、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探索を行い、油脂の分解機構について検討した。

2. 実験装置および方法

2. 1. 油脂分解微生物の培養および分解試験

(1) 油脂分解微生物の連続培養

実験装置の概略を Fig.1 に示す。実験装置は有効容量約 45 ℓ の膜分離活性污泥装置であり、操作方法および各基質の投入方法は前報¹⁾と同様に行った。供試污泥は馴致期間を短縮させるため、下水処理場の活性污泥と、研究室内で培養した油脂分解微生物をほぼ同じ割合で混合させたものを使用した。また、培養を促進させるため微生物活性助剤であるサポニンを前報同様に添加した。その培養条件を Fig.2 に示す。培養当初は投入する有機炭素源をグルコース、グルタミン酸ソーダ、酢酸アンモニウムを混合した人工下水とし、5～15 日おきに油脂の投入量を段階的に増大させるとともに人工下水の投入量を減らしていった。48 日目以降は炭素源を油脂のみとし、前報の結果より、培養に最も適した油脂投入量として、TOC 容積負荷 $0.3 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{day}$ (ギサ抽出物質容積負荷 $0.4 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{day}$) にて運転を行った。MLSS 濃度は約 $30,000 \text{ mg/ℓ}$ 前後とし、Hex-SS 負荷は $0.013 \text{ kg-Hex/kg-MLSS/day}$ である。

(2) 油脂分解微生物の計数

連続培養中の油脂分解微生物の計数を行うための寒天平板培地には油脂寒天培地と CGY 寒天培地を使用した。油脂寒天培地は油脂分解菌を探索するための選択培地として使用し、前報¹⁾と同様に有機炭素源を油脂（サラダ油：N 社製）のみとしたものを使用し、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 寒天培地はカシトン、グリセリン、酵母エキスを主成分とする培地であり、高い生菌数が得られるため、活性污泥中の細菌相の構成を調べることに使用されている³⁾。

(3) 回分実験

回分実験は、連続培養された油脂分解微生物の油脂分解能力および油脂分解過程を調べるために行った。実験装置

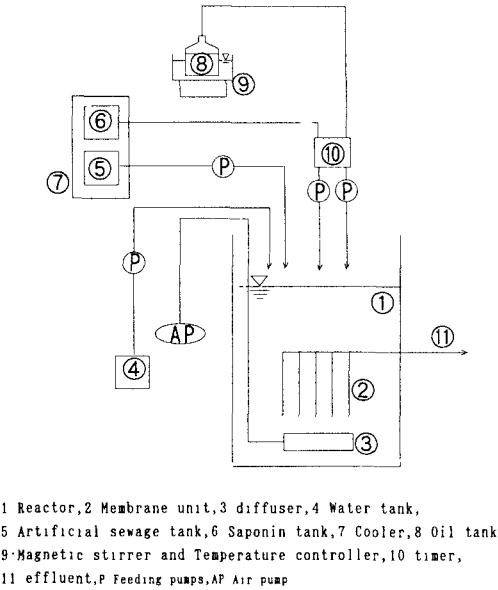


Fig.1 Experimental apparatus in continuous cultivation

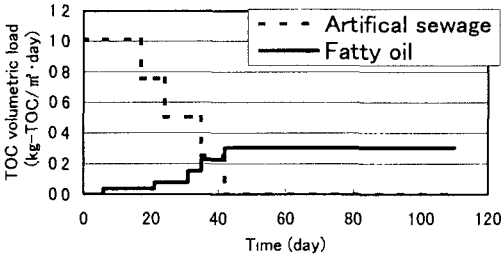


Fig.2 Cultivation conditions

は、容量 3 ℓ の円筒形の反応槽に微生物濃度約 5,000 mg/ℓ、初期油脂濃度約 700 mg-Hex/ℓ となるよう油脂（サラダ油）を投入し、栄養塩類を所定量、曝気量を 10 ℓ/min として、所定の時間ごとにサンプリングを行い、ヘキサン抽出物質濃度、MLSS、高級脂肪酸濃度を測定した。対照微生物としては、研究室においてペプトン、肉エキスを主成分として培養した活性汚泥を用いた。

2. 2. 油脂分解微生物の単離および単離菌の脂質分解試験

(1) 油脂分解微生物の単離と同定のための特徴づけテスト

油脂分解微生物うち、油脂分解に関与する細菌を調べるための単離は、生菌数の測定を行った平板の中でもコロニー数が 50 CFU 以下である高希釈倍率の平板上から、他と隣接或いは混在していないコロニーのうち、形態や色が違ったものを釣菌し、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、スラントにて保管した。さらに、分離された細菌の同定のための特徴づけテストとして、グラム染色、形態、運動性、オキシダーゼ活性、カタラーゼ活性、OFテスト、芽胞の有無を調べた。テスト方法および同定は Steel and Cowan らの方法⁴⁾によった。

(2) 単離菌の脂質分解試験

油脂分解微生物からの単離菌について、油脂の加水分解能力を調べるため、tween80 テスト⁴⁾および油脂分解テストを行った。tween80 はオレイン酸のソルビタンエステルであり、微生物培養においてオレイン酸の代用として使用されるものである。そのテスト方法は Table.1 に示すような tween80 を主成分とする寒天平板培地に単離菌を画線培養し、コロニーの周りに白濁を生じた菌について陽性とし、脂質の分解性があると判断するものである。油脂分解テストの試験方法は、分離菌を液体培地で増殖させた後、菌を洗浄し、油脂培地から寒天を除いて調整した液体油脂培地に植菌し、130rpm、25℃、48 時間振とう培養を行い、GC にて高級脂肪酸の分析を行い、分解代謝物である遊離脂肪酸の存在が認められたものを陽性とした。

Table.1 Composition of tween80 agar plate

Composition	(g/ℓ)
Tween80	10 *
Peptone	10.0
NaCl	5.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1
Agar	20.0

3. 分析方法

一般水質項目は前報と同様とし、脂肪酸の分析については下記のように行った。

炭素数 8～22 の高級脂肪酸は、遊離脂肪酸と、油脂として存在する脂肪酸（エステル化脂肪酸）の2種類について行った。また、炭素数 6 以下の低級脂肪酸は前報にて検出しなかったため行わなかった。分析方法は、採取試料の適量を分液ロートに分取し、塩酸(1+2)を加え酸性とし、ヘキサンにより抽出した後蒸留水で数回洗浄し、水溶液相を捨て、無水硫酸ナトリウムで脱水したものをトリメチルシリル化し、GC(本体：SHIMADZU GC-14B、検出器：FID、ガム：ULBON HR-1)により測定を行った。以上の方法で検出された脂肪酸を遊離脂肪酸とし、けん化処理を行った後同様の操作を行い、検出された脂肪酸をエステル化脂肪酸とした。

4. 実験結果と考察

4. 1. 油脂分解微生物の連続培養および分解特性

(1) 槽内水質と生菌数からみた培養経過

槽内の水質および生菌数を Fig.3 に示す。槽内の

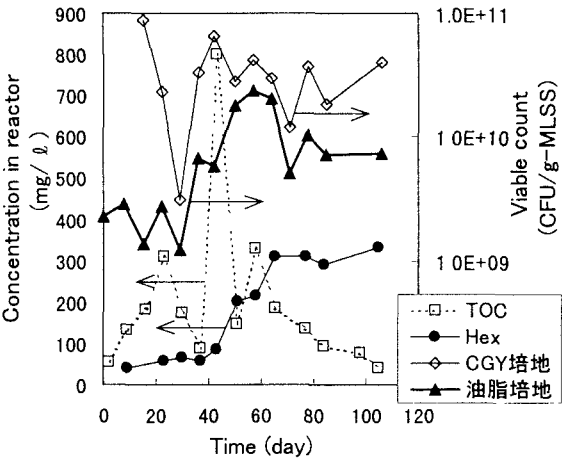


Fig.3 Changes in water quality and viable count in reactor

TOC は培養開始から 60 日目前後までは大きな増減がみられ、特に投入する有機炭素源を油脂のみとした直後の 42 日目は、急激な増大がみられた。また、ヘキサ抽出物質（以下 Hex と略す）についても 40～70 日目までは 50～300 mg-Hex/ℓ と増加する傾向がみられ、槽内の生物相が不安定であることが推測されたが、70 日目以降は TOC、Hex ともに変化は少なくなり、生物相が定常状態となったことが推測された。油脂培地における生菌数は、培養開始直後は 2.0×10^{10} 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ていることがわかった。CGY 培地では 30 日目まで減少したが、これは人工下水の投入量を減らしたためであると考えられる。40 日目以降は 2.0×10^{10} CFU/g-MLSS 前後に増加したが、これは細菌相が油脂の分解代謝物を資化する菌相へとシフトしたためであると考えられる。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 70 日目以降であるとした。また、このときの CGY 培地での生菌数は活性汚泥の生菌数として報告されている 9.2×10^{11} CFU/g-MLSS⁹⁾と較べると低い値であり、油脂を有機炭素源としない細菌にとっては存在しにくい環境であることが推測された。

(2) 分解速度からみた油脂分解特性

Fig.4 は回分実験におけ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）と較べて Hex の減少が大きくなり、前報と同様、油脂分解能力が高いことが確認された。これは、油脂分解に関与する細菌数が多いためと考えられる。このことは回分実験で使った微生物の油脂培地における生菌数が、油脂分解微生物で 2.48×10^9 CFU/g-MLSS であるのに対し、対照微生物では 2.67×10^8 CFU/g-MLSS であり、油脂分解微生物の方が約 10 倍多いことから裏付けられる。次に、初期濃度を変化させて回分実験を行った結果を Monod 型反応式で整理したところ、油脂分解微生物の最大分解速度定数 k、飽和常数 Ks はそれぞれ 0.44 g-Hex/g-MLSS/day、1336 mg/ℓ となった。これは前報の 0.54 g-Hex/g-MLSS/day、260 mg/ℓ という結果と較べると飽和定数が高くなったが、最大油脂分解速度はほぼ同じであったことから、今回培養された微生物は前報とほぼ同じ微生物であったと考えられる。このときの最大油脂分解速度を、他の文献^{2),9)10)}で報告されている油脂分解菌の分解速度と比較したものが Table.2 である。各報告とも実験方法が違っているため、およその比較しかできないが、その分解速度はほとんどが 0.2～0.5 g-Hex/g-MLSS/day であり、本研究で得られた分解速度と、ほぼ同じであることがわかった。このことから、本法により培養された微生物は、一般に報告されている油脂分解菌と同等の分解能力を有することがわかった。

(3) 脂肪酸組成からみた油脂分解特性

Fig.5 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表したものである。脂肪酸濃度はいずれも Hex 濃度の約 60 %であった。それ以外は、標準試料からは同定されなかった脂肪酸や、脂肪酸以外の物質であると考えられる。5 分後における脂肪酸組成の割合は実験に供したサラダ油の脂肪酸組成の割合とほぼ同じであり、炭素数 16 および 18 の高級脂肪酸がグリセリンとエステル結合した状態であり、油脂における脂肪酸の標準的な存在形態であった。12 時間後における脂肪酸濃度は、油脂分解微生物を用い

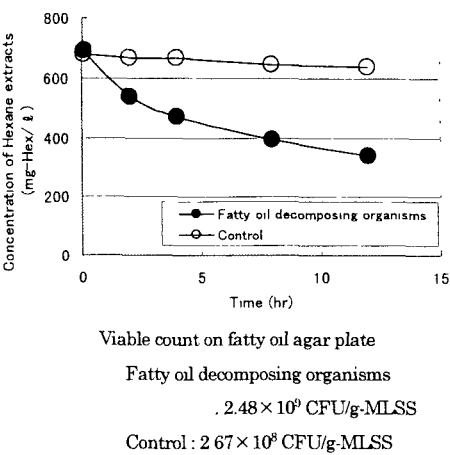


Fig.4 Changes in concentration of hexane extracts in batch experiment

Table.2 Fatty oil decomposing rate of existing bacteria

Name	Decomposing rate g-Hex/g-MLSS day	Reference
Fatty oil decomposing organism	0.44	
Super H strain	0.53	9)
Acclimated sludge	0.07	2)
Activator on the Market A	0.19	2)
A-1 strain	0.42	2)
MK-1 strain	0.44	2)
MK-2 strain	0.37	2)
ER-B1 strain	0.52	10)
ER-B1 strain	0.98	10)

た場合では Hex 濃度に対応して、エステル結合した脂肪酸の減少がみられた。これは、油脂が菌体の生産する酵素により加水分解されたためと考えられる。一方、対照微生物ではエステル結合した脂肪酸はほとんど減少がみられず、油脂の加水分解がほとんど行われていないことがわかった。新妻ら⁹⁾はトリグリセリドの分解にともなって、代謝物質としてグリセリンと脂肪酸の生成がみられることを示しているが、油脂分解微生物を用いた場合、12 時間後の脂肪酸組成からは油脂の代謝物質としての遊離脂肪酸は、本実験での分析方法における検出限界 5 mg/l 以下であった。これは、油脂の加水分解にともなって生成した遊離高級脂肪酸は、速やかに低級脂肪酸に分解されるためであると考えられる。また、酪酸や酢酸などの低級脂肪酸は、ヘキサンでの抽出が困難になるため、低級脂肪酸濃度を TOC 濃度で推定したが、12 時間後の TOC 濃度の増加はみられなかった。このことから、高級脂肪酸の分解生成物である低級脂肪酸も、速やかに CO₂ と H₂O に完全に分解されたものと考えられる。一方、対照微生物の場合はエステル結合した脂肪酸がほとんど分解されなかったために、代謝物である遊離脂肪酸の消長を推定することはできなかった。以上のことから、油脂分解微生物は対照微生物に較べて、油脂の加水分解能力が高いことがわかった。また、高級脂肪酸を完全分解する能力も高いものと推測された。

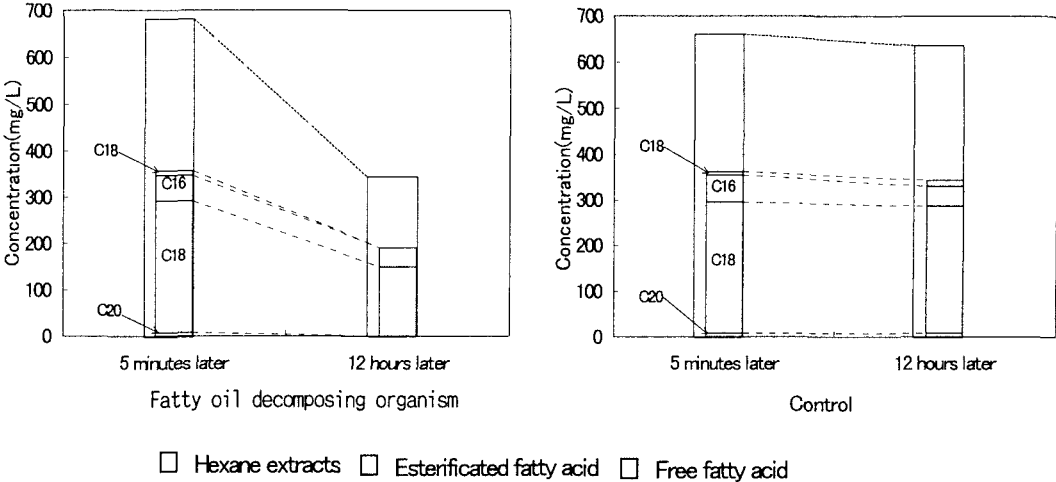


Fig.5 Composition of fatty acid in batch experiment

4. 2. 油脂分解に関与する細菌群および単離菌の脂質資化性

(1) 油脂分解に関与する細菌群

Table.3 は、培養開始から 85 日後の槽内から細菌を単離し、特徴づけテストを行った結果である。単離菌は、油脂培地から 6 株、CGY 培地から 12 株得られた。単離菌のうち、油脂培地からの細菌は全て OF テストで好気的に酸の生成を示したのに対し、CGY 培地から単離された菌は 1 株だけであった。通常の活性汚泥にはグルコースから好気的に酸を生成する菌は 10% 以下であることから³⁾、油脂分解に関与する細菌は好気性細菌であることが推測された。以上の結果をもとに、Steel & Cowan の第 1 次鑑別表⁴⁾に従って属までの同定を行ったところ、CGY 培地からの単離菌は通常の活性汚泥中にも存在する細菌で、属名も多様であったのに対し、油脂培地からの単離菌は全て *Nocardia* sp. であった。油脂培地は有機炭素源を油脂のみとしており、この培地から単離される細菌は油脂分解に直接関与する可能性が高いといえる。油脂分解の過程において本属の細菌が関与することは、排水中の油脂濃度が高くなるとスカムが発生しやすいこと、*Nocardia* 属が増加するとスカムが発生しやすい⁷⁾ことから推測することができる。また、Hong ら⁸⁾は、放線菌スカムの原因細菌である *Nocardia amarae* と、活性汚泥中に一般的に存在する *Pseudomonas auruginosa* の 2 株について増殖速度パラメータを調べ、高級脂肪酸を有機炭素源とした場合は、*N. amarae* の方が、基質を獲得しやすいことを示しており、本研究の結果を裏付けている。

Table.3 Diagnostic scheme for identifying isolated bacteria

	No.	Gram stain	Shape	Oxidase	Catalase	OFtest	Motility	Spore	genus
Fatty oil agar plate	1	+	R	—	+	O	—	—	<i>Nocardia.sp</i>
	2	+	R	—	+	O	—	—	<i>Nocardia.sp</i>
	3	+	R	—	+	O	—	—	<i>Nocardia.sp</i>
	4	+	R	—	+	O	—	—	<i>Nocardia.sp</i>
	5	+	R	—	+	O	—	—	<i>Nocardia.sp</i>
	6	+	R	—	+	O	—	—	<i>Nocardia.sp</i>
CGY agar plate	7	—	R	—	—	—	—	—	
	8	—	R	+	+	—	—	—	<i>Moraxella.sp</i>
	9	—	R	—	—	—	—	—	
	10	—	R	+	—	—	—	—	<i>Eikenella.sp</i>
	11	—	R	—	+	—	—	—	<i>Acinetobacter.sp</i>
	12	+	R	+	+	—	—	—	
	13	—	R	+	+	—	—	—	<i>Moraxella.sp</i>
	14	—	R	—	+	—	—	—	<i>Acinetobacter.sp</i>
	15	+	R	—	+	O	—	—	<i>Nocardia.sp</i>
	16	—	R	—	—	F	—	—	<i>Streptobacillus.sp</i>
	17	+	R	+	+	F	—	+	<i>Bacillus.sp</i>
	18	—	R	+	+	—	+	—	<i>Alcaligenes.sp</i>

+ :positive, - :negative, R:rods, O:oxidation, F:fermentation

(2) 油脂培地から単離した *Nocardia sp.*の油脂分解特性

Table.4 は油脂培地から単離した *Nocardia sp.*に対して油脂の分解性を調べるため、tween80 テスト、および油脂分解テストを行った結果である。tween80 テストにおいては単離菌 6 株の内 4 株が陽性を示し、この 4 株のうち油脂分解テストから 3 株が陽性を示した。このことから、これら 3 株の単離菌は油脂の加水分解能力あることがわかり、油脂分解微生物中において、実際に油脂の分解に関与していることがわかった。これらの細菌は菌体内外で、加水分解酵素であるリパーゼや高級脂肪酸のβ酸化に関与する酵素を生産する能力があるものと考えられ、さらに詳しく検討する必要がある。また、両試験ともに陰性であった 2 株は、高級脂肪酸の分解代謝物である低級脂肪酸、もしくは油脂の分解代謝物であるグリセリンを資化する細菌であると考えられる。

Table.4 Lipid degradation test for identifying isolated bacteria in fatty oil agar plate

No.	Tween80 test	Fatty oil decomposing
1	—	—
2	—	—
3	+	+
4	+	—
5	+	+
6	+	+

5. 結論

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を行い、油脂に対して増殖能力のある細菌群、いわゆる油脂分解微生物を培養し、回分実験からその油脂除去速度および脂肪酸組成を調べて油脂分解特性について検討した。さらに、微生物を単離して油脂分解能力を持つ細菌の探索を行った。本研究で得られた知見は次の通りである。

(1) 油脂分解微生物の油脂分解特性

①本研究で培養された油脂分解微生物は対照微生物と較べて、回分実験における Hex の減少量が大きく、その時の生菌数（油脂培地）はそれぞれ 2.48×10^9 、 2.67×10^8 cells/g-MLSS であった。このことから、油脂分解微生物の分解能力が高いのは、油脂分解に関与する細菌が多いためであることが考えられた。また、その結果を Monod 型反応式で整理したところ、最大分解速度定数は 0.44 g-Hex/g-MLSS/day となり、他の文献値とほぼ同じであった。このことから、本法により培養された微生物は、一般的な油脂分解菌と同等の分解能力を

有することがわかった。

②脂肪酸の GC 分析から、油脂分解微生物は人工下水で培養した対照微生物に較べて、炭素数 16 および 18 のエステル結合した脂肪酸の減少量が大きく、油脂の加水分解能力が高いことがわかった。また、分解代謝物である高級脂肪酸、低級脂肪酸も蓄積がみられなかったことから、油脂を完全に分解する能力も高いことがわかった。

(2) 油脂分解に関与する細菌群および単離菌の脂質資化性

①油脂分解微生物から 18 株の細菌が単離されたが、その中で油脂分解に特に関与する細菌 6 株は全て *Nocardia.sp* であることがわかった。このことから、有機炭素源を油脂のみとした場合、本属の細菌が増殖しやすいことがわかった。

②油脂培地からの単離した 6 株の *Nocardia.sp* について、tween80 テスト、および油脂の分解試験を行ったところ、3 株の単離菌がともに陽性であった。このことから、油脂分解微生物中において実際に油脂分解に関与する細菌を特定することができた。これらの細菌は菌体内外で、加水分解酵素であるリパーゼや高級脂肪酸の β 酸化に関与する酵素を生産する能力があるものと考えられ、さらに詳しく検討する必要がある。

本研究で使用した実験装置は(株)クボタより提供を受けたものです。また、研究を進めるに当たって大阪工業大学衛生第II研究室及び大阪市立環境科学研究所の方々から多大なご協力を頂きました。ここに謝意を表します。

<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,Vol.34,pp.221-229(1997)
- 2) 松山秀明:流動式担体活性汚泥法による油脂の効率的分解,用水と廃水,Vol.35,pp.597-604(1993)
- 3) 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,Vol.23,pp.251-258(1987)
- 4) 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)
- 5) 新妻卓逸,鈴木幸喜,蜂谷栄一:グリセリドおよび高級脂肪酸の生分解性,東北学院大学工学部研究報告,Vol.23,pp.65-68(1988)
- 6) Jurg K, Willi G: Influences of wastewater composition and operating conditions on activated sludge bulking and scum formation, *Wat.Sci.Tech*,Vol.30,pp.181-189(1994)
- 7) 堺好雄:下水処理場における放線菌障害,月刊下水道,Vol.13,No.5,pp.2-12(1990)
- 8) Hong C, Kok N.T, Montgomery W.L.C: Filamentous growth in activated sludge, *Appl.Biochem.Biotech*, Vol.57/58,pp.851-856(1996)
- 9) 古川憲治,中村泰介,橋本奨:強力油分解菌と特殊バイオフィルターによる油含有排水の処理,用水と廃水,vol.34,pp.585-592(1992)
- 10) 渡辺昭,木幡信和,日沼宏年:油脂分解菌を用いた含油排水処理,エバラ時報,No.172,pp.14-22(1996)