

(9)

生ゴミの乳酸発酵による防腐・防臭 および食中毒菌の増殖抑制に関する研究

PRESERVATION, DEODORIZATION AND INHIBITION OF GROWTH FOR
FOOD POISONING BACTERIA BY LACTIC ACID FERMENTATION OF GARBAGE

山辺賢一郎^{*}、汪群慧^{*}、成田純也^{*}、吉田晋也^{**}、森下正人^{**}、白井義人^{***}、尾川博昭^{*}
Ken-ichirou YAMABE*, Qunhui WANG*, Jun-ya NARITA*,
Shinya YOSHIDA**, Masato MORISHITA**, Yoshihito SHIRAI***, Hiroaki I.OGAWA*

ABSTRACT: To develop a garbage recycling system including garbage disposal, lactic acid and biodegradable plastics production, the preservation and deodorization of garbage during storage and the explication of their mechanisms are very important. The changes of counts of viable cell in garbage collected from university's dining hall during the storage were observed. In spite of seasons, lactic acid bacteria became preferential bacteria after the garbage was stored for 24 hours. On the contrary, *coliforms* and *clostridia* that are indexes of putrefaction and pollution remarkably decreased. The *coliforms* were not detected after the 72- or 96-hour storage. No food poisoning bacteria, such as *staphylococcus aureus* and *bacillus cereus*, were detected after the 24 hours storage. From the results of experiment adding the *staphylococcus aureus* to the garbage, it was proved that the lactic acid bacteria also easily became preferential bacteria even if food poisoning bacteria gained predominance at the beginning of the storage. It is clear from this study that lactic acid fermentation during the storage process inhibits the growth of putrefactive bacteria and food poisoning bacteria, which, as a result, makes it possible to realize the preservation and deodorization of garbage.

KEYWORDS: Lactic acid bacteria; preservation; deodorization; garbage; food poisoning bacteria

1. はじめに

環境問題の一つにゴミ処理問題があり、これは21世紀に向けて解決すべき緊急の課題である。生ゴミ(厨芥)は家庭可燃ゴミの約35%を占め、腐敗しやすく、放置すると異臭を発生し、その大部分が水分であるため取扱いが難しく、ゴミ処理問題を困難にしている。一方、生ゴミは台所から出される調理くずや残飯であるため、栄養豊富な資源であると考えられる。本研究室は、生ゴミの高栄養性に着目し、これを培養基として乳酸菌による発酵から乳酸をつくり、この乳酸を分離・精製して生分解性プラスチック(ポリ乳酸)を製造する技術システムを開発する産学官連携プロジェクトに参画した¹⁾。

*九州工業大学工学部物質工学科応用化学教室 (Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu Institute of Technology)

**北九州市環境科学研究所保健環境課 (Health Science Section, Kitakyushu City Institute of Environmental Sciences)

***九州工业大学情報工学部生物化学システム工学科 (Department of Biochemical Engineering and Science, Faculty of Computer Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology)

開発中のシステムでは“無料”あるいは“有料回収”的生ゴミから、環境にやさしく、また再資源化もしやすい生分解性プラスチック²⁾を製造することにより、生ゴミの減量化および日常生活の利便性・快適性を向上させることが期待できる。また、乳酸発酵から副生する発酵残渣は窒素分に富んでおり、肥料としての利用も可能である。本システムが完成すれば、“都市ゴミ・ゼロエミッション”構想の実現を見通すことができると考えられる。

本システムにおいて、生ゴミをディスポーザと管路で搬送・収集することを想定した。この収集方法は衛生的かつ省力的なものであるが、生ゴミを発生源から処理サイトまで搬送するには一定の滞留時間が必要である。この滞留状態において、病原性菌の増殖や生ゴミの腐敗による悪臭発生が懸念される。そこで本研究では、九州工業大学工学部生協食堂から排出された生ゴミ（大学生協生ゴミ）をディスポーザで破碎して固液分離後の固相ゴミを貯留し、その貯留生ゴミ中に自然に存在する乳酸菌を増殖させ、乳酸発酵（一次発酵）によって、生ゴミ中の腐敗性雑菌の増殖を抑制して防腐・防臭を図った。次いで、季節ごとに貯留生ゴミにおける一般細菌、乳酸菌、大腸菌群やクロストリジアなどの菌叢変化を検査し、合わせて食中毒菌の有無と動向も検索した。さらに、乳酸発酵により食中毒菌の増殖が抑制されることを確認するため、大学生協生ゴミに黄色ブドウ球菌を添加し、貯留生ゴミにおけるその菌の挙動を検討した。また、貯留中に優先菌種となっている乳酸菌の分離・同定を試みた。

2. 実験方法

2.1 生ゴミの破碎と一次発酵（貯留）

大学生協生ゴミを3倍重量の水と共にディスポーザで破碎し、1mm 目金属網で固液分離した。生協生ゴミ（湿潤重量）の7、8割は固相分（固相ゴミ）として捕捉され、貯留実験に用いた（Table 1）。供試固相ゴミの全固体分(total solid; TS)、浮遊性固体分(suspended solid; SS)、溶解性固体分(dissolved solid; DS)、溶解性物質 soluble matter とも言う）、有機物（volatile solid; VS、揮発性固体分とも言う）濃度³⁾の検討から、生ゴミ中の有機物が全固体分に占める割合(VS/TS)は96%以上であり、豊富な炭素源であることがわかった。

固相ゴミを密封ステンレスタンクに投入して、嫌気状態(窒素ガスで約5分間置換)、25±2°Cで貯留した。この貯留生ゴミを一定時間ごとにサンプリングし、一般細菌数、乳酸菌数、大腸菌群数、クロストリジア数および食中毒菌の有無と動向を調べた。また、各試料を13,000 rpmで10分間遠心分離した上清について、pH、全アルカリ度⁴⁾、可溶性糖濃度および有機酸濃度等を分析した。可溶性糖濃度はphenol法⁵⁾、乳酸をはじめ種々の生成有機酸濃度は高速液体クロマトグラフ有機酸分析システム（島津製作所製、CDD-6 A 検出器）により、それぞれ測定した。さらに、貯留期間内に発生したガスを収集し、ガスクロマトグラフ（ヒューレット・パッカート社製 HP6890、炎光光度検出器(FPD)）により、悪臭原因の一部である硫黄化合物（メチルメルカプタン、硫化水素、硫化メチル、二硫化メチル）を分析した⁶⁾。

Table 1 Characteristics of solid phase garbage

Parameter	Spring	Summer	Autumn	Winter
TS (%)	14.82	14.61	14.64	14.37
VS/TS (%)	96.1	96.3	96.7	97.1
SS (%)	13.66	13.44	13.28	13.27
DS (%)	1.16	1.17	1.36	1.10
pH	5.79	5.18	6.03	6.20
Alkalinity (H ⁺ mmol/l)	4.50	3.21	4.12	4.31

2.2 細菌数測定法

一般細菌、乳酸菌、大腸菌群およびクロストリジアの菌数測定については「食品微生物検査マニュアル」⁷⁾に準じて行い、日本製薬（株）の標準寒天培地、BCP 加プレートカウント寒天培地、デゾキシコレート寒天培地およびクロストリジア測定培地を用いた。一般細菌とは、標準寒天培地に集落を形成しうる生菌の総称である（標準平板菌数とも言う）。乳酸菌とは乳酸を多量に生成する細菌の総称であり、複雑な栄養素を要求する⁸⁾。大腸菌群は環境衛生管理上汚染指標菌または食品品質を評価する衛生指標菌として有効である。クロストリジアは腐敗を進行させ酪酸を生成する菌の代表であり、ボツリヌス菌やウエルシュ菌などの食中毒菌の指標として重要な菌である。

2.3 食中毒菌の検索

食中毒菌の検索については、「食品微生物検査マニュアル」⁷⁾に準じて行い、対象とした菌はサルモネラ菌、黄色ブドウ球菌、腸炎ビブリオ菌、セレウス菌およびウェルシュ菌である。貯留生ゴミから採取した発酵液を白金耳でそれぞれの細菌検査用選択培地に塗沫して培養した。次に培地に生育した食中毒菌の疑いのあるコロニーを釣菌し、純培養してそれぞれの菌について生化学的性状等の同定試験を行った。

2.4 乳酸菌の分離と同定

大学生協生ゴミの貯留 48 時間後の試料を 10g 採取し、 10^{-8} のオーダーまで 10 倍段階希釈を行った。分離・純培養した菌の形態観察、グラム染色性、カタラーゼ試験、嫌気培養での生育状況、生育温度等の検査を行い、乳酸菌であることを確認した。さらに、乳酸菌同定キット API CH50（日本ビオメリュー・バイテック製）を用いて 49 種類の炭水化物の資化性を調べた上で同定を行った⁹⁾。

3. 実験結果と考察

3.1 季節ごとの貯留生ゴミの一次発酵および菌叢変化

季節ごとに、2.1 に述べた方法で作成した大学生協生ゴミ（固相ゴミ）約 10 kg を、嫌気状態、25°C で貯留した。この貯留生ゴミを 24 時間ごとにサンプリングし、生成乳酸濃度、pH、可溶性糖濃度の経時変化および菌数変化を調べた。

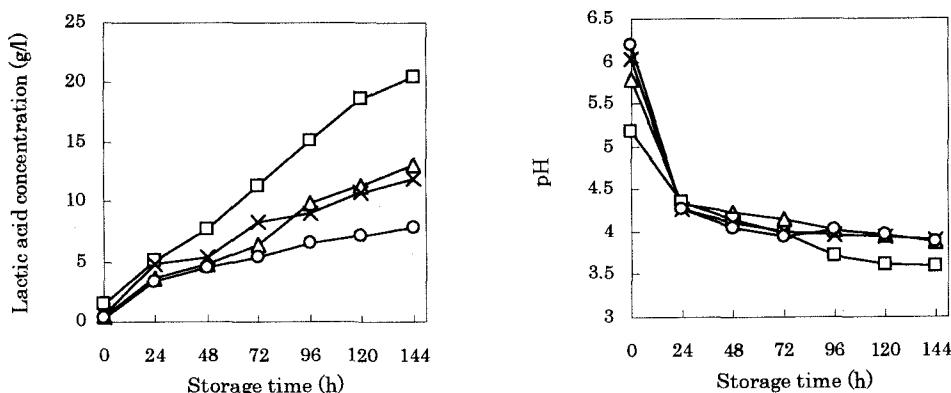


Fig.1 Changes of lactic acid concentration and pH during the storage: △, spring; □, summer; ×, autumn; ○, winter.

夏期の場合には初期乳酸濃度は最も高く、初期 pH は最も低く (Fig.1) 、一般細菌や乳酸菌などは最も多いうことがわかった (Fig.2) 。これらの結果から、夏期は大学生協食堂の室温が高いため、生ゴミ中に自然に存在する乳酸菌によって、大学生協生ゴミが収集段階で一次発酵を起こしたことが示唆される。このため、初期の生成乳酸濃度が高く、それに伴い初期 pH も低くなっていたことが考えられる。それに対して冬期は生協食堂の室温が低いため、菌の増殖が抑えられ、収集段階で生ゴミの乳酸発酵がほとんど起こらず、初期 pH は夏期に比べ高い値のままであったと考えられる。

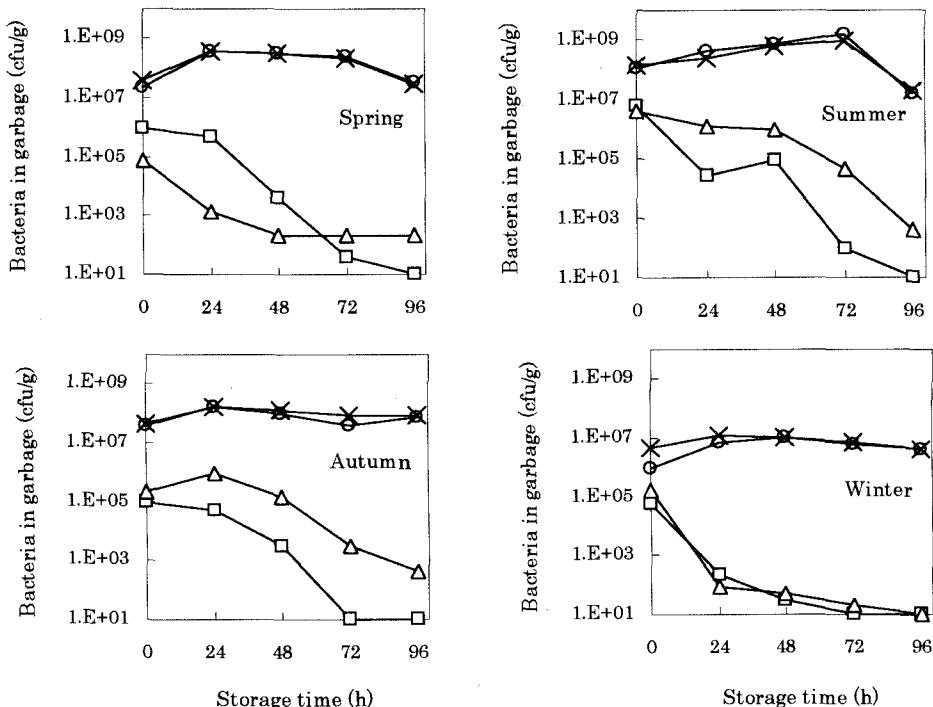


Fig.2 Changes of viable bacteria counts during the storage: ×, general bacterial population; ○, lactic acid bacteria; □, coliforms; △, clostridia

次に、貯留開始後の乳酸と可溶性糖濃度および菌叢などの変化を観ると、貯留時間に伴って、生成した乳酸量が増加し、季節ごとの乳酸濃度は冬<秋・春<夏の順で高かった。逆に可溶性糖濃度は冬>秋>春>夏の順で低くなった (Fig.3) 。乳酸菌をはじめとする糖を代謝する細菌は、冬期には少なく、糖を資化する速度 (例えば、乳酸生成速度) が生ゴミを糖化する速度 (加水分解速度) より遅かったため、可溶性糖が蓄積しやすく、夏期より高い濃度となった。また、夏期には、生ゴミの一部は収集段階で既に変化し、加水分解しやすくなり、その上、生ゴミ中に存在している一般細菌も乳酸菌と同様に貯留 72 時間まで増殖し続け、他の季節より菌数が多かったため、生ゴミの糖化速度と糖を資化する速度は両方とも速く、乳酸菌などに消費された可溶性糖は加水分解によりつぎつぎと補充され、最終的に乳酸濃度は他の季節より高くなつたと考えられる。

一方、貯留における生ゴミの pH は、季節を問わず 24 時間までに 4.4 以下に激しく低下し、その後徐々に 4 前後に低下した (Fig.1) 。乳酸菌については、季節を問わず 24 時間までに貯留生ゴミ中で優先菌種となっていた (Fig.2) 。それに対して食品汚染や腐敗などの指標となる大腸菌群とクロストリジアの菌数は、

季節を問わず減少した。大腸菌群においては、夏および春期では 96 時間で、秋および冬期では 72 時間で検出されなくなった。嫌気性であるクロストリジアの菌数は 96 時間で 10^8 cfu/g 以下まで抑えられた。これらの結果は、大腸菌群とクロストリジアの増殖可能な最低 pH が各々 4.5 と 4.6 であることから¹⁰⁾、貯留生ゴミ中の pH が生成された乳酸によって 4 前後に低下したため、それら細菌の増殖抑制が起こったものと考えられる。また、乳酸菌により生成したさまざまな増殖阻害物質がそれら細菌の生育を抑制あるいは阻害した可能性がある。さらに、大腸菌群は好気性菌あるいは通性嫌気性菌であるので、嫌気性貯留という条件は大腸菌群の増殖抑制にも影響があると思われる。これを証明するため、固相ゴミの好気性貯留と嫌気性貯留における菌叢変化を比較した。pH 低下の値は同様であるが、好気性貯留における大腸菌群の菌数が嫌気性貯留より大幅に上回り、生ゴミの腐敗が速やかに進行したという結果が得られた¹¹⁾。

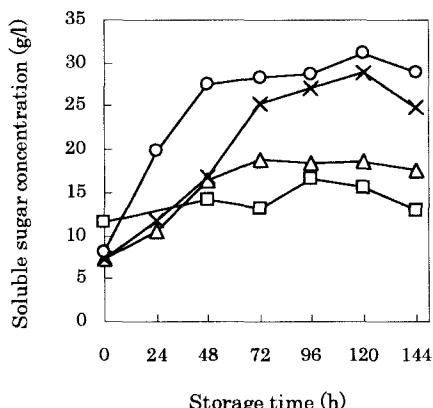


Fig.3 Change of soluble sugar concentration during the storage: △, spring; □, summer; ×, autumn; ○, winter.

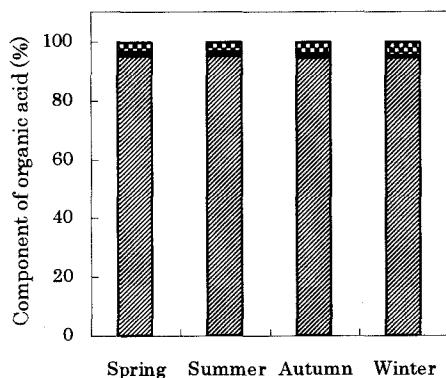


Fig.4 Component of organic acid on the sixth day:
■ lactic acid ■ succinic acid
■ formic acid ■ acetic acid

クロストリジアは、酸敗臭を生じる酪酸などの有機酸を生産し、その上アミノ酸をアンモニアやアミンにまで分解する性質を持つため、クロストリジアの増殖を抑えることは生ゴミの貯留において重要なことと考えられる。Fig.4 に示すように、貯留 144 時間後に乳酸をはじめとする種々の生成有機酸濃度の結果から、乳酸が有機酸の総生成量に占める割合は 94% 以上であり、乳酸以外の他の有機酸については、ギ酸、酢酸およびコハク酸が僅かに生成されており、それらの総量が約 0.8g/l であった。この結果は、クロストリジアなどの腐敗菌の増殖が抑えられたため、酪酸等の有機酸が生成されなかつたことを示唆している。

一方、夏期の生ゴミをディスポーバー破碎・分離後、嫌気状態で一次発酵（自然発酵）させたものと、何にも処理せず、そのまま密封タンクに投入したものから発生したガス中の悪臭物質（メチルメルカプタン(MeSH)、硫化水素(H₂S)、硫化メチル(DMS)、二硫化メチル(DMDS)）を測定した。各時間帯に 1kg 湿潤生ゴミから時間あたり発生した硫黄化合物容量を Fig.5 に示した。無処理の場合、悪臭成分の発生量は MeSH、H₂S、DMS、DMDS の順で多かった。自然発酵の場合、貯留 0~60 時間まで MeSH は検出されず、H₂S 等の硫黄化合物の発生量は貯留時間に伴って減少し、120~168 時間帯に発生した MeSH、H₂S、DMS の容量は無処理にくらべて、それぞれ 1/39、1/22、1/5 倍に減少した (DMDS では大きな差が見られなかった)。また、無処理の方が強い腐敗臭のにおいを感じた。硫黄化合物以外、アンモニア、トリメチルアミン、ジメチルアミンのような揮発性アミン（主に魚介、畜肉に含まれているアミノ酸その他の窒素化合物から変化する）や、ギ酸、酢酸、酪酸のような低級脂肪酸等の悪臭成分も腐敗の進行とともに発生することが推定されるため、

生ゴミ中の低級脂肪酸濃度を調べた。無処理の120時間以後ではそれらの低級脂肪酸総量は自然発酵より5倍以上高かった。これらの結果から、悪臭成分の発生は乳酸発酵により抑えられることが示唆された。

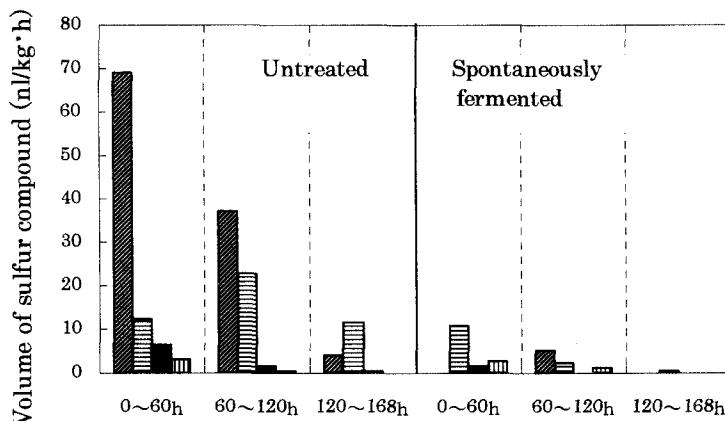


Fig. 5 Volume of sulfur compound generated from untreated and spontaneously fermented garbage:

■ methyl mercaptan ▨ hydrogen sulfide
 ■ dimethyl sulfide ▨ dimethyl disulfide

3.2 貯留生ゴミにおける食中毒菌の増殖抑制

(1) 食中毒菌の有無と動向

生ゴミの貯留および発酵過程で、保健衛生上の問題を解決することは重要である。そこで、貯留生ゴミにおける食中毒菌の有無と動向を検索した。Table 2 に示すように、貯留後生ゴミに主要な食中毒菌はほとんど検出されなかつた。黄色ブドウ球菌はヒトの化膿巣や喉などに常在している菌であり、セレウス菌は土壤細菌の一つで、自然環境に広く分布し、穀類の調理品などでしばしば見いだされる常在菌である。この2種類の食中毒菌は生ゴミの貯留前に検出されたが、貯留24時間後には検出されなかつた。この結果は、貯留生ゴミが乳酸発酵によってpHが低下し、黄色ブドウ球菌やセレウス菌などの食中毒菌の増殖を抑制したためと考えられる。

(2) 黄色ブドウ球菌の添加実験

食中毒菌、腐敗性細菌などの増殖抑制効果は乳酸発酵におけるpHの低下が第一要因であるが、それ以外に、乳酸菌が生成するさまざま増殖阻害物質がそれら細菌の生育を抑制あるいは阻害していることが近年明らかとなってきた¹²⁾。これら増殖阻害物質には、乳酸などの有機酸、過酸化水素、ジアセチルおよび低分子のタンパク質性の物質（バクテリオシン）などがある。特に、バクテリオシンは一般的に生産菌に近縁のグラム陽性菌に対して抗菌作用を示す耐熱性の物質であるが、中には食中毒の原因にもなるボツリヌス菌、黄色ブドウ球菌などをはじめとするグラム陽性菌全般に広く抗菌作用を示すものもある。

Table 2 Detection of food poisoning bacteria

Food poisoning bacteria	Storage time (h)					
	0	24	48	72	96	120
<i>Salmonella spp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Clostridium welchii</i>	-	-	-	-	-	-

+ ; Detected

- ; Not detected

代表的な食中毒菌である黄色ブドウ球菌の生育が乳酸発酵により阻害されることをさらに明らかにするため、ディスポーザで処理した大学生協固相ゴミに等重量の水を加えてミキサーで十分に攪拌した試料に、黄色ブドウ球菌を 1.9×10^7 cfu/g 添加し、嫌気状態下、25°Cで一次発酵を行った。黄色ブドウ球菌は12時間までは増加したが、それ以後菌数は急激に減衰して96時間で完全に検出されなくなった(Fig.6)。黄色ブドウ球菌は、嫌気状態下での増殖可能最小pHが4.6という耐酸性能の高い菌種の一つであるが¹³⁾、貯留生ゴミ中で生成された乳酸およびバクテリオシンなどの増殖阻害物質によりその菌数が減衰したものと考えられる。他方、乳酸菌数は貯留開始時には一般細菌数の0.1%であるにもかかわらず、24時間後には貯留生ゴミ中でほぼ優先菌種となった。以上の結果から、生ゴミを嫌気状態で貯留することにより、乳酸菌は食中毒菌などの細(雑)菌が支配的な状態においても容易に優先菌種となり、その乳酸発酵によって食中毒菌の増殖を抑制するものと示唆される。

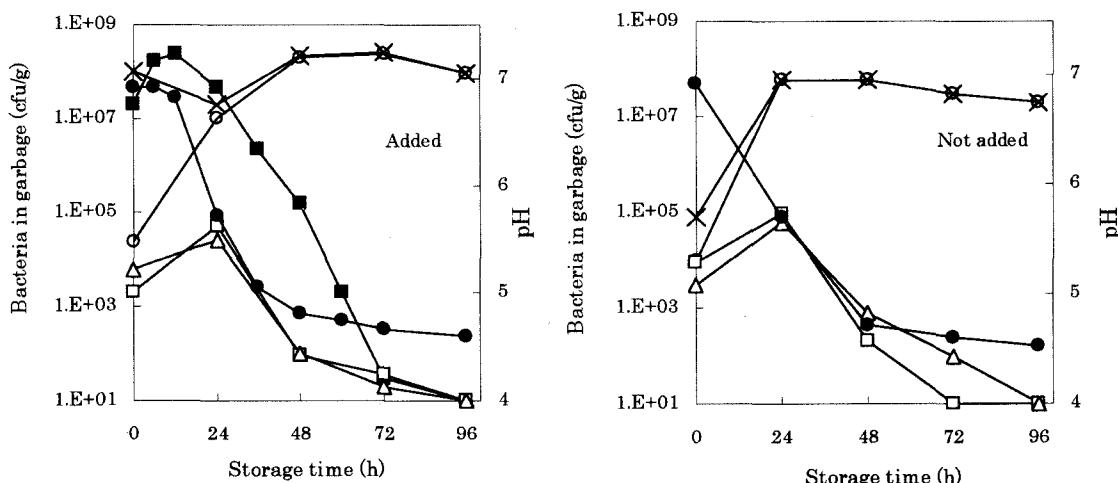


Fig.6 Changes of viable bacteria counts of the *staphylococcus aureus*-added garbage:
■, *staphylococcus aureus*; ×, general bacterial population; ○, lactic acid bacteria;
□, coliforms; △, clostridia; ●, pH.

3.3 乳酸菌の分離と同定

大学生協固相ゴミの貯留48時間後の試料から、乳酸菌の分離・同定を試みた。分離した30株はすべてグラム陽性、カタラーゼ陰性であった。Table 3にAPI CH50乳酸菌同定キットを用いて炭水化物資化性を調べた上での同定結果を示す。大学生協生ゴミより分離・同定された乳酸菌の優先菌種は、*Lactobacillus crispatus*(60%)であった。この乳酸菌は腸管、口腔から分離され、DL体乳酸产生菌として知られている¹⁴⁾。

Table 3 Identification of lactic acid bacteria in the garbage

Lactic acid bacteria	Strain(%)
<i>Lactobacillus crispatus</i>	18(60)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	5(17)
<i>Lactobacillus brevis</i>	1(3)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1(3)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1(3)
<i>Leuconostoc lactis</i>	1(3)
Not identified	3(11)

4.まとめ

高栄養性のある生ゴミを水と共に、ディスポーザで破碎し、生ゴミ中に自然に存在する乳酸菌による一次発酵（貯留）を行った。

大学生協貯留生ゴミ中の乳酸濃度および菌数は季節によって変動があり、乳酸濃度は冬<秋・春<夏の順で高かった。可溶性糖濃度および初期pHは冬>秋>春>夏の順で低くなつた。これは糖を資化する乳酸菌の増殖と関係があることがわかつた。

貯留における生ゴミのpHは、季節を問わず乳酸生成量の増加に伴つて24時間までに4.4以下に著しく低下し、乳酸菌も季節を問わず貯留生ゴミ中での優先菌種となつた。それに対して腐敗と汚染の指標となる大腸菌群とクロストリジアの菌数は減少し、大腸菌群は72時間あるいは96時間で検出されなくなり、クロストリジアの菌数は96時間で 10^3 cfu/g以下まで減少し、酸敗臭を生じる酪酸等の有機酸および硫黄化合物等の悪臭物質の生成も抑えられた。

貯留生ゴミにおける食中毒菌の有無と動向を調べた結果、生ゴミ貯留前に存在していた黄色ブドウ球菌とセレウス菌は貯留24時間以降検出されなかつた。また、貯留生ゴミに代表的な食中毒菌である黄色ブドウ球菌を 1.9×10^7 cfu/g添加した実験により、乳酸菌は食中毒菌などの雑菌が支配的な状態においても容易に優先菌種となることが確認された。

以上の結果から、貯留生ゴミ中に自然に存在する乳酸菌を増殖させ、乳酸発酵によって腐敗性菌や食中毒菌などの増殖が抑制され、生ゴミの防腐・防臭を図ることができた。さらに、本格的な連続発酵（二次発酵）における乳酸の光学純度を向上させるため、今後、貯留条件を詳しく検討する必要がある。

謝辞

本研究は、科学技術庁の科学技術振興調整費から援助を受けて行われた。また、悪臭の分析を行うにあたり、北九州市環境科学研究所の藤野廣氏および村上能崇氏の尽力を得た。ここに記して感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 白井義人, 尾川博昭: 生ゴミの生分解性プラスチック化による都市ゴミ・ゼロエミッション, 九工大通信, 4, 6(2000)
- 2) Ohara, H.: Poly L-lactic acid as biodegradable plastic, Bioscience and industry, 52(8), 26-28(1994)
- 3) JISハンドブック10, 環境測定, 工業排水試験方法, 992-995(1995)
- 4) 守田栄, 洞沢勇, 白沢忠雄: 公害関係JIS要覧, 第三章水質汚濁, (株)新日本法規出版, JIS K0400-15-10(1998年制定)
- 5) 福井作蔵: 還元糖定量法, 学会出版センター, 45-47(1982)
- 6) 悪臭物質測定マニュアル, 環境庁大気保全局, 16-38(1994)
- 7) 食品微生物検査マニュアル, 栄研化学出版, 43-91 (1996)
- 8) Morichi,T.: Physiology and metabolism of lactic acid bacteria, Biseibutu, 6(1), 26-32(1990).
- 9) Benno,Y.: Identification and classification of lactic acid bacteria, Biseibutu, 6(1), 3-14(1990)
- 10) 石井泰造, 微生物制御実用事典, フジ・テクノシステム出版, p.29,p.63 (1993)
- 11) 成田純也, 汪群慧, 柿本幸司, 白井義人, 尾川博昭: 生ゴミからの乳酸原料の生成に関する研究—貯留過程における諸要因の検討—, 第10回環境工学総合シンポジウム2000講演論文集, 172-175(2000)
- 12) 松崎弘美, 園元謙二, 石崎文彬: 乳酸菌が生産する増殖阻害物質, バクテリオシン, 生物工学, 75(2), 125-133 (1997)
- 13) 相磯和嘉, 食品微生物学, 医歯薬出版, 306-307(1980)
- 14) 厚生省生活衛生局, 食品衛生検査指針-微生物編, 日本食品衛生協会出版, 239-255(1990)