

(株)西原環境衛生研究所 ○山本菜穂子 長谷川太郎 千種 薫
 日清製油(株) 大内 浩生 前田 一成
 山崎製パン(株) 中村喜久男 吉川 恵則

1. はじめに

従来、油脂含有排水の処理は、前処理として加圧浮上装置等により油を物理化学的に除去した後、生物処理を行っている。そこで、前処理を不要とする油脂含有排水処理プロセスの開発を目指して、高い油脂分解能を持つ微生物の分離を試みた。今回、製菓工場揚げ物排水と製油工場排水中から油脂分解酵母を分離同定し、直接生物処理できる可能性を認めた。さらに、その油脂分解能ならびにリパーゼの性質について若干の知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2. 1 油脂分解酵母の分離

高濃度に油脂を含有する製菓工場揚げ物排水ならびに製油工場排水に対して、高い資化性を持つ微生物を得るため、それぞれの排水を用いて集積培養を行った。製菓工場揚げ物排水は、かりんとうの揚げ油とその原料である小麦粉、卵、砂糖、オリゴ糖等を含有しており、また製油工場排水は油脂製造工程から排出される廃油を主に含有している。表-1に各排水の水質分析値を示す。

集積培養は30℃、振とう数130stroke/minの条件で、Fill and Draw方式を用い毎日排水を取り替えて行った。20日後、Y M寒天培地等で集積された微生物を単離し、優占種が酵母であることを確認した後、同定した。

次に、分離した酵母の分離源排水に対するn-ヘキサン抽出物質除去性能を調査するため、各酵母を1白金耳量添加して、30℃、130stroke/minの条件によるフラスコ規模の処理実験を行い、n-ヘキサン抽出物質の経日変化を測定した。

2. 2 油脂分解能試験

分離した酵母の油脂分解能ならびにリパーゼの性質について調査するため、表-2の大豆油20000mg/lを唯一の炭素源とする合成排水を用い、上記の条件で処理実験を行った。7日後、処理水をn-ヘキサンで抽出した後、その抽出部の重量測定および酸価、ケン化価の測定を行い、酵母処理による大豆油の推移について調査した。また、最も油脂分解率の高い菌株について、薄層クロマトグラフ(TLC)およびガスクロマトグラフ(GLC)による分析を行い、油脂と脂肪酸との組成の判定を行った。

表-1 分離源排水の水質

	製菓工場 揚げ物排水	製油工場 排水
n-hexane(mg/l)	5,640	4,705
CODcr(mg/l)	195,000	13,400
BOD (mg/l)	71,900	6,230
Tk-N (mg/l)	308	436
T-P (mg/l)	42	226
pH	5.5	5.0

表-2 合成排水組成¹⁾

	2	%
大豆油	2	%
NH ₄ NO ₃	0.4	
KH ₂ PO ₄	0.47	
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.03	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.001	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.001	
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.001	
酵母エキス	0.01	
pH	5.5	

表-3 分離酵母

菌株No	分離源排水	酵母種名
N1	製菓工場揚げ物排水	<i>Hansenula anomala</i>
N2	"	<i>Candida intermedia</i>
N3	"	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
N4	製油工場排水	<i>Candida hellenica</i>
N5	"	<i>Candida viswanathii</i>
N6	"	<i>Candida fluvialis</i>
N7	"	<i>Candida schatavii</i>
N8	"	<i>Candida tropicalis</i>
N9	"	<i>Candida pseudolambica</i>

表-4 酵母同定試験結果

	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9		N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9
形態学的性質										資化性									
栄養細胞の形	楕円形	楕円形	楕円形	楕円形	楕円形	楕円形	楕円形	楕円形	楕円形	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
大きさ(μm)	3~6	2.5~5	4~6	3~10	5~7.5	3~6	3~7	5~7.5	2.5~7.5	Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
栄養増殖										D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
偽菌糸の形成	+	+	-	+	+	-	+	+	+	D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
液体培養での沈殿	+	+	+	+	+	+	+	+	+	L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
皮膜	-	+	-	-	-	+	-	-	-	L-Rhamnose	-	+	D	-	-	-	-	-	-
胞子形成	帽子型	-	+	-	-	-	-	-	-	Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
生理的性質										Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
発酵性										Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	D	+	D	D	+	+	Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	-	+	-	-	+	-	Lactose	-	+	+	-	+	+	-	-	-
Maltose	+	+	+	-	+	-	-	+	-	Raffinose	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	D	D	-	-	+	-	Starch	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Erythritol	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Ribitol	+	+	D	+	+	+	+	+	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
アルブチン分解	+	+	-	-	+	+	+	-	-	Inositol	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ビタミンフリー	+	+	-	-	-	-	+	-	+	Succinic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 37°C	+	+	+	+	+	+	-	+	-	Citric acid	+	+	-	+	+	+	+	+	+
										Nitrate	+	-	-	-	-	-	-	-	-
										Nitrite	+	-	-	-	-	-	-	-	-
										Ethylamine	+	+	W	+	+	+	+	+	+
										Cadaverine	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3. 実験結果及び考察

3.1 油脂分解酵母の分離

各排水による集積培養で優占した微生物は全て酵母であり、製菓工場揚げ物排水から3株、製油工場排水から6株の酵母が分離された。これらの酵母を分離源排水とともに表-3に示し、同定結果を表-4に示す。表-3より、7株がCandida属の酵母であることが認められた。ところで、分離源排水は油脂のみを含有しているわけではないので、集積された酵母が油脂以外の基質により集積された場合もあり得る。そこで各菌株の分離源排水に対するn-ヘキサン抽出物質除去性能を調査し、その結果を図-1に示した。図-1より、全ての酵母が油脂分解能を持つことが認められ、これらを使用すれば各排水中のn-ヘキサン抽出物質を85%以上除去できる可能性のあることが判明した。

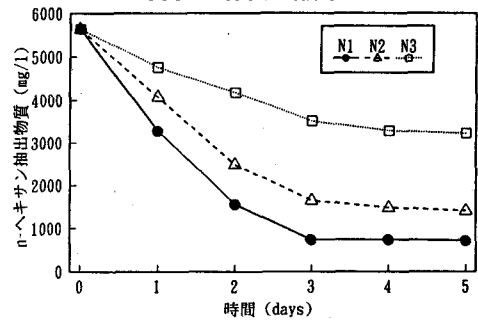
3.2 油脂分解特性について

n-ヘキサンには、油脂すなわちグリセリドだけではなく遊離脂肪酸も抽出される。この遊離脂肪酸は、リパーゼの作用により油脂から生じた加水分解産物である。n-ヘキサン抽出物質中の遊離脂肪酸の割合すなわち加水分解率は、次式により算出した。

$$\text{加水分解率}(\%) = \frac{\text{酸価}}{\text{ケン化価}} \times 100$$

図-2は、大豆油20000mg/l流加実験での7日目の処理水を各酵母ならびに全酵母混合区について比較したものである。図-2より、N1株のHansenula anomalaは9株の酵母の中で最もn-ヘキサン除去量が大きく、除去率として70%であった。しかし、グリセリドは1600mg/lにまで減少していることから、リパーゼのよる油脂分解率は92%になる。従って、N1株は高いリパーゼ活性を持つ酵母であるといえる。しかし、N1株は遊離脂肪酸

製菓工場揚げ物排水



製油工場排水

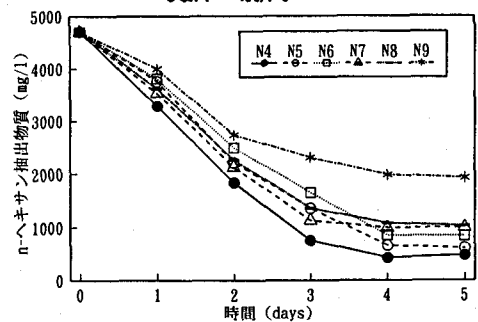


図-1 分離源排水におけるn-ヘキサン抽出物質の除去

の残留量が多く、リパーゼ活性に比べて遊離脂肪酸の酸化が律速する傾向が認められた。このような傾向は、N4株の *Candida helvetica* および N7 株の *Candida schatavii* にも同様にみられたが、それ以外の菌株においては遊離脂肪酸はほとんど存在しなかった。つまり菌株によって能力に差があり、リパーゼ活性は高いが酸化が追いつかない菌株、リパーゼ活性はそれほど高くはないが遊離脂肪酸を速やかに酸化する菌株等特徴があり、混合区の結果からも分かるように、酵母も活性汚泥と同様に混合菌株で使用する方が処理性能が向上することが判明した。

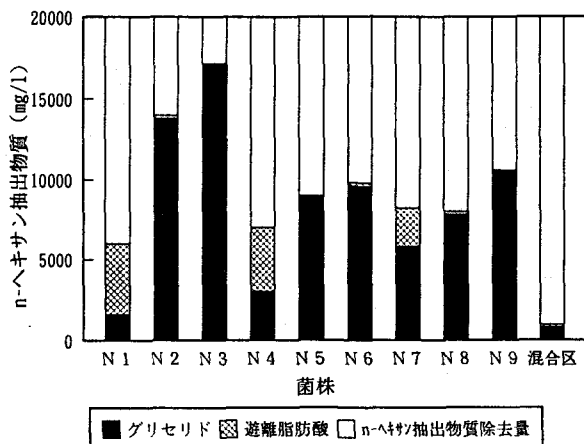


図-2 各菌株による大豆油分解特性

3.3 N1株のリパーゼの位置特異性および脂肪酸除去特性

最も油脂分解能の高い菌株であったN1株についてTLCおよびGLC分析を行った。図-3に、TLCにより油脂組成を調査した結果を示す。処理水には、1,2-ジグリセリドおよび1,3-ジグリセリドが存在することから、N1株のリパーゼは1, 2, 3位全てのエステル結合に作用することが判明した。これより、N1株の酵素リパーゼは位置特異性を持たないといえる。

次いでGLCを用いて、n-ヘキサン抽出物質中の脂肪酸組成を分析した。図-4に各脂肪酸に対する除去性を調べた結果を示す。大豆油は5種類の高級脂肪酸により成り立っているが、脂肪酸の種類によって除去速度が異なっており、炭素数18の脂肪酸についてみると、二重結合の数が増加するにつれて除去率が高くなっている。つまり不飽和度の高い脂肪酸ほど若干酸化が早い傾向が認められた。

4. まとめ

製菓工場揚げ物排水と製油工場排水より油脂分解酵母9株が分離され、分離源排水中のn-ヘキサン抽出物質を85%以上除去する可能性のあることが認められた。次いで、大豆油を用いて油脂分解能を調査したところ、菌株によって差が認められ、混合菌株の方が処理効果は上がることが判明した。また最も高い油脂分解能を持つN1株の *H. anomala* のリパーゼの位置特異性ならびに脂肪酸除去特性についても明らかにした。

この研究は、農水省食品産業クリーンエコシステム技術研究組合の助成を受けて行ったものである。

(参考文献) 1) J. Kou, T. Kodama and Y. Minoda, *Agric. Biol. Chem.*, 47(6), 1207-1212, 1983

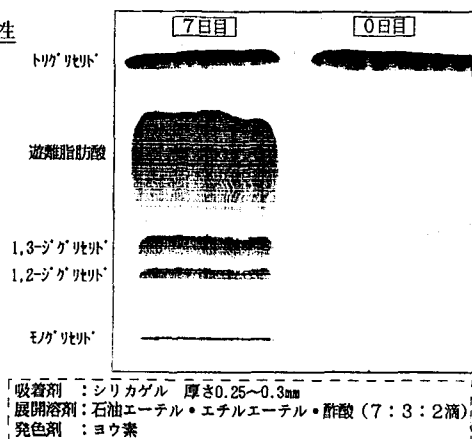


図-3 N1株のTLC分析結果

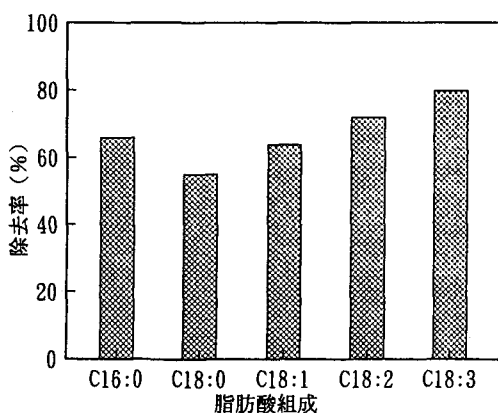


図-4 N1株の大豆油中の各脂肪酸に対する除去率