

食品廃棄物のメタン発酵（第2報）

— 油前処理効率化のための油分解菌の探索 —

環境科 室伏敬太 中島大介 太田良和弘
山梨罐詰株式会社 松村英功 望月光明

Methane fermentation of food waste (2nd Report)

— Isolation of oil degrading microorganisms for pretreatment of food waste —

Keita MUROFUSHI, Daisuke NAKASHIMA, Kazuhiro OHTARA, Hidenori MATSUMURA
and Mitsuaki MOCHIZUKI

Methane fermentation is a microbial reaction and a promising technique to create renewable energy from biomass such as food waste. However, the reaction was strongly prohibited when the biomass contains high levels of lipid. In this study, lipid degrading microorganisms were isolated from activated sludge to develop a lipid-degrading pretreatment system for efficient methane fermentation of lipid-rich food wastes. Strain-01, which was estimated as yeast *Yarrowia lipolytica*, showed high performance in soy bean oil and beef tallow degradation. It is expected that microbial pretreatment process using the Strain-01 enhance methane fermentation of lipid-rich food waste.

Keywords : Methane fermentation, wastewater sludge, oil degrading microorganisms.

キーワード：メタン発酵、排水汚泥、油脂分解微生物。

1 はじめに

メタン発酵は有機性廃棄物の分解とエネルギー回収の効果を併せ持ち、生ゴミや汚泥等の処理に広く用いられている。しかし、その反応は原料である有機性廃棄物の質に大きく左右され、特に油脂は分解効率が悪い。大量の油脂を直接メタン発酵槽へ投入すると発酵が阻害・停止してしまうことから、食品工場から排出される廃油や、油脂を高濃度に含む食品廃棄物のメタン発酵処理は困難である。

上記課題の解決を目的として、我々は食品廃棄物中の油脂の効率的な前処理方法の開発に取り組んでいる。これまでに、排水汚泥を用いた微生物処理で油脂が可溶化することや¹⁾、可溶化した油脂処理液は効率的にメタン発酵で処理できること²⁾を報告している。

本研究では、油脂前処理時間の短縮化を目的として、排水汚泥から油脂分解活性を有する微生物の分離および同定を試みたので、その手法および結果について報告する。

2 方法

2.1 油脂分解微生物の分離

100mL三角フラスコに、食品工場排水汚泥（山梨罐詰(株)の排水処理場で平成26年10月23日に採取したもの）45mLとダイズ油 5 mLを混合して、エアポンプにて 4 mL/minで通気を行いながら30℃で7日間振とうして集積培養を行った。生理食塩水で希釈した集積培養液を、LB培地にトリブチリンを添加したスクリーニング用寒天培地³⁾に塗布して30℃で4日間静置培養を行った。培地中のトリブチリンが分解され、ハローが観察されたコロニーを油脂分解微生物として分離した。

2.2 油脂分解微生物による油脂分解試験

分離した油脂分解微生物をLB培地で培養して、前培養液として調製した。次に、試験管にダイズ油又は牛脂0.2mL、LB培地0.8mL、1 Mリン酸緩衝液（pH 7.0）0.2mL、前培養液0.04mL、滅菌水2.76mLを加えて30℃で振とうした。反応液に残存する油脂をn-ヘキサンで抽出して重量を測定し、次式により油脂分解率を算出した。

$$\text{油脂分解率(\%)} = ((B-A)/B) \times 100$$

A: 回収した反応液のn-ヘキサン抽出重量(g)

B: 反応開始直後のn-ヘキサン抽出重量(g)

2.3 遺伝子解析による油脂分解微生物の微生物種の推定

油脂分解微生物の微生物種の推定は、日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」⁴⁾を参考として、以下の手法でリボソームRNA領域の遺伝子配列を解析することで行った。

LB寒天培地上に形成した単一コロニーを釣菌して、100 μ Lの50 mM Tris-HCl (pH 7.0) に懸濁させた。コロニー懸濁液を鋳型とするリボソームRNA領域遺伝子の増幅は、KOD-Plus-Neo (東洋紡(株)製)を用いて行った。PCR 反応条件は、変性を98℃で10秒、アニーリングを50℃で30秒、伸長を68℃で50秒、反応サイクルを30回で実施した。真菌の26SrRNA領域 (約500塩基長) の増幅にはNL1およびNL4プライマーセット、細菌の16SrRNA領域 (約1,500塩基長) の増幅には8Fおよび1492Rのプライマーセットを用いた (表1)。

表1 PCR反応で使用したDNAプライマー

	塩基配列 (5'→3')	増幅対象
8F	AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG	細菌
1492R	GGTACCTTGTACGACTT	16SrRNA
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	真菌
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	26SrRNA

エタノール沈殿で精製したPCR産物を鋳型として、サイクルシークエンス試薬キットBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing KitおよびDNAシークエンサーABI PRISM 310 (共にサーモフィッシャーサイエンティフィック(株)製)を用いて塩基配列を解析した。解析した遺伝子配列を、米国立生物工学情報センター (NCBI) が提供するデータベースに登録された微生物の遺伝子配列と比較し、上位にランクされた菌種を同一種として推定した。

2.4 メタン発酵試験に向けた油脂前処理液の調製および油脂分解状況の確認

300mL三角フラスコに、ダイズ油または牛脂2.5mL、LB培地20mL、1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 2.0mL、排水汚泥40mL、前培養液1.0mL、滅菌水34.5mLを加えて、エアポンプにて8 mL/minで通気を行いながら30℃で4日間振とうした。振とう後、油脂の分解状況を目視による観察で評価した。

3 結果および考察

3.1 油脂分解微生物の分離

集積培養液をスクリーニング用寒天培地に塗布したところ、ハローを形成するコロニーが多数確認された。無作為にコロニーを選び、油脂分解微生物として32株を分離した (Strain-01~32と命名)。

3.2 油脂分解微生物による油脂分解試験

分離した32株の試験管規模の牛脂分解試験で、特に分解率の高かったものを図1に示す。Strain-01、03および31の3株は7日間の処理でダイズ油および牛脂の30%以上が分解されていたため、油脂前処理用微生物の候補として選抜した。

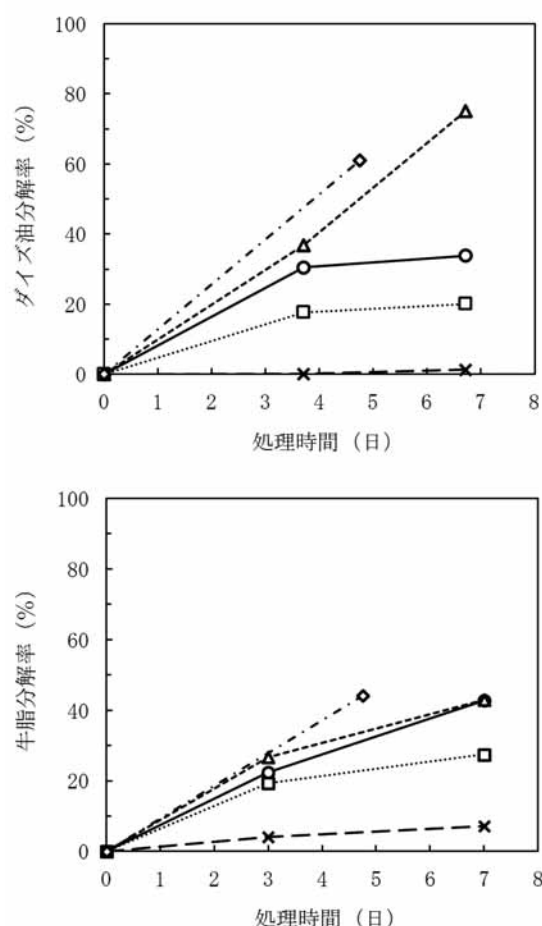


図1 分離した微生物のダイズ油および牛脂分解試験

○: Strain-01 △: Strain-03 □: Strain-14
◇: Strain-31 ×: 対照 (微生物添加なし)

3.3 遺伝子解析による油脂分解微生物の微生物種の推定

選抜した3株のリボソームRNA領域の遺伝子をPCR反応で増幅させたところ、Strain-01および03は真菌26SrRNA領域 (約500塩基長) のみが増幅され、Strain-31は細菌16SrRNA領域 (約1,500塩基長) の増幅が確認された (図2)。増幅した遺伝子の塩基配列を解析

【報告】

してデータベースと照合した結果を表2に示す。Strain-03および31はそれぞれ*Candida*属および*Serratia*属と遺伝子配列が完全一致したが、共にヒトへの感染例が報告されている微生物属である。特に*Serratia marcescens*は国立感染症研究所の病原性微生物等のバイオセーフティレベル分類⁵⁾においてレベル2に指定される微生物種であり、重大な災害となる可能性は低いものの、ヒト又は動物に病原性を有する可能性が強く疑われる。メタン発酵運転管理者への安全性を考慮して、以後の実験では*Yarrowia lipolytica*と推定された、Strain-01（写真1）を用いることとした。

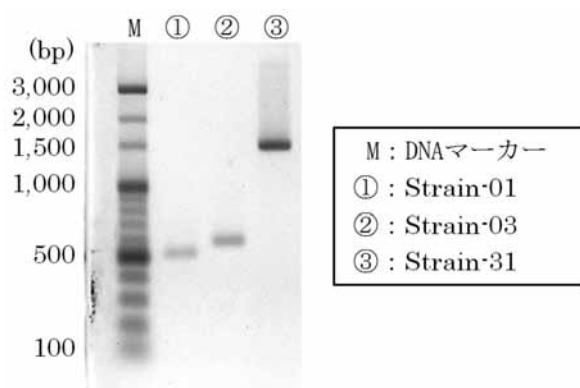


図2 各選抜株のリボソームRNA領域増幅PCR産物

表2 選抜した油脂分解微生物の遺伝子解析結果

選抜株名	遺伝子解析領域	データベースと一致した属種	一致率 (%)
Strain-01	真菌	<i>Yarrowia lipolytica</i>	99.8
Strain-03	26SrDNA	<i>Candida palmioleophila</i>	100.0
Strain-31	細菌 16SrDNA	<i>Serratia marcescens</i>	100.0

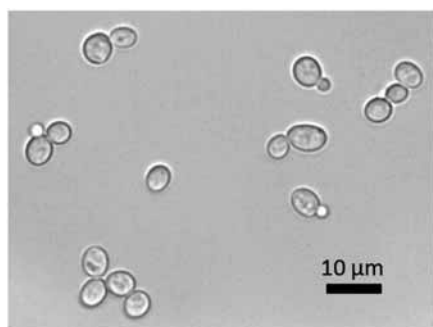


写真1 分離したStrain-01の顕微鏡観察写真

3.4 メタン発酵試験に向けた油脂前処理液の調製および油脂分解状況の確認

Strain-01を用いて調製した牛脂前処理液を写真2に示す。比較対照の活性汚泥のみを添加した系では牛脂の可溶化はほとんど観察されなかったが、Strain-

01の前培養液を添加することで固形状の牛脂はほぼ消失している状態が観察された。また、ダイズ油を用いた同様の実験では反応開始から3日経過した時点で油層が消失している状態が観察された。

*Yarrowia lipolytica*は油脂を資化する酵母として報告されている⁶⁾ことから、Strain-01を添加することによって油脂の前処理反応が大幅に促進したと推測された。

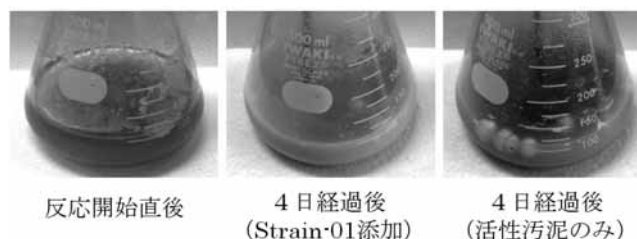


写真2 Strain-01を用いた牛脂前処理試験

4 まとめ

排水汚泥より分離した油脂分解微生物Strain-01の培養液を添加することで、油脂の前処理反応を高速化することが可能となった。本手法により、油脂を高濃度を含む食品廃棄物のメタン発酵が効率的に進むことが期待される。

参考文献

- 1) 酒井奨 他：中温メタン発酵のための廃食用油の前処理法の開発．第24回廃棄物資源循環学会研究発表会講演論文集，p.401-402，北海道（2013）．
- 2) 中島大介 他：メタン発酵の効率化を目的とした廃棄物中の油分の前処理方法の検討．第10回バイオマス科学会議講演論文集，p.75-76，茨城（2015）．
- 3) 松村英功 他：コンポスト化過程における油分の分解と油分解菌 *Geobacillus pallidus* L33-1株の単離．廃棄物資源循環学会論文誌，22(2)，p.141-148（2011）．
- 4) 厚生労働省：第十六改正日本薬局方，p.2029-2031，<http://jpd.b.nihs.go.jp/jp16/YAKKYOKUHOU16.pdf>（2011.3.24公表）．
- 5) 国立感染症研究所：国立感染症研究所病原体等安全管理規定別冊1「病原体等のBSL分類等」，http://www0.nih.go.jp/niid/Biosafety/kanrikitei3/Kanrikitei3_1006_1.pdf（2010.6公表）．
- 6) Pignede G. et al.：Characterization of an extracellular lipase encoded by *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology*, 182(10), p.2802-2810, (2000).