

平成 25 年度
環境研究総合推進費補助金 研究事業
総合研究報告書

好熱菌の油脂分解酵素の特性解明と
廃食用油を添加した好気性発酵システムへの応用
(3K122014)

平成 26 年 3 月

東京大学 伏信 進矢

補助事業名 環境研究総合推進費補助金研究事業（平成 24 年度～平成 25 年度）

所管 環境省

国庫補助金 47,582,000 円（複数年度の総計）

研究課題名 好熱菌の油脂分解酵素の特性解明と廃食用油を添加した
好気性発酵システムへの応用

研究期間 平成 24 年 6 月 8 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者名 伏信進矢（東京大学）

目 次

総合研究報告書概要	1
本文	
1. 研究背景と目的	12
1.1 研究背景	12
1.2 研究目的	12
2. 研究方法	15
2.1 実証試験機を用いたシステム開発	15
2.1.1 実証試験機の概要	15
2.1.2 オカラと廃食用油の受け入れ	16
2.1.3 計測器	16
2.1.4 実証試験機の処理工程と運転方法	17
2.1.5 槽内乾物量の算定	18
2.1.6 オカラおよび発酵乾燥物の性状分析	18
2.1.7 廃白土混合コンポストについて	18
2.1.8 生成飼料の家畜への供与試験	19
2.1.1 実証試験機の概要	19
2.2 微生物添加効果の検証	19
2.2.1 各種分析法	19
2.2.2 微生物群集解析	20
2.3 好熱性油脂分解菌の探索と性質解明	21
2.3.1 廃食用油を炭素源とした集積培養からの油脂分解菌の単離	21
2.3.2 50°C と 60°C で生育する油脂分解菌の単離	22
2.3.3 単離された油脂分解菌の 16S rRNA 遺伝子による系統学的解析	23
2.3.4 単離された好熱性油脂分解菌由来のリパーゼの酵素学的性質解析	23
2.3.5 油脂分解菌の実証試験機への投入	23
2.4 脂質の分析手法の開発	25
2.4.1 HPLC による分析法の開発	25
2.4.2 TLC による分析法の開発	26
2.4.3 GC による分析法の開発	27
3. 結果と考察	29
3.1 実証試験機を用いたシステム開発	29
3.1.1 試験に用いたオカラの性状	29

3.1.2	試験の内容と工程	29
3.1.3	70°Cでの試験	30
3.1.4	廃白土混合コンポスト添加での試験結果	33
3.1.5	油無添加週と比較した廃白土混合コンポストの効果	38
3.1.6	本システムでの有機物分解による発酵熱の寄与	39
3.1.7	発酵日数10日としたときの予想熱収支	40
3.1.8	家庭系廃食用油の添加試験	41
3.1.9	連続安定運転	42
3.1.10	メタンガス発生の有無の検討	42
3.1.11	脱臭器の設置と効果	42
3.1.12	生成飼料の家畜への供与試験	43
3.1.13	副資材の不要化	43
3.1.14	廃食用油を添加した高温好気性発酵乾燥システムのメリット	44
3.2	微生物添加効果の検証	45
3.2.1	分解・蒸発量の分析	45
3.2.2	コントロール条件	46
3.2.3	NB501株添加1回目	47
3.2.4	NB501株添加2回目	48
3.2.5	廃白土混合コンポスト添加	49
3.2.6	好熱性油脂分解微生物群集の添加	50
3.2.7	次世代シーケンサーによる群集解析	51
3.3	好熱性油脂分解菌の探索と性質解明	53
3.3.1	廃食用油を唯一の炭素源とした集積培養	53
3.3.2	40°Cで生育する油脂分解菌の単離と系統的解析	54
3.3.3	50°Cで生育する油脂分解菌の単離と系統的解析	58
3.3.4	60°Cで生育する油脂分解菌の単離と系統的解析	59
3.3.5	単離された油脂分解菌由来の細胞外リパーゼの性質	62
3.3.6	油脂分解菌の実証試験機への投入	65
3.4	脂質の分析手法の開発	72
3.4.1	HPLCによる分析法の開発	72
3.4.2	TLCによる分析法の開発	73
3.4.3	GCによる分析法の開発	79
4.	結論	81
4.1	実証試験機を用いたシステム開発	81
4.2	微生物添加効果の検証	81
4.3	好熱性油脂分解菌の探索と性質解明	82
4.4	脂質の分析手法の開発	82

4.5	研究期間終了後の展開の可能性	83
4.5.1	スケールアップについて	83
4.5.2	生ごみへの応用について	84
5.	参考文献	86
6.	研究発表	88
7.	知的財産権の取得状況	89
8.	研究概要図	90
9.	英文概要	91

概要

環境研究総合推進費補助金 研究事業 総合研究報告書 概要

研究課題名：好熱菌の油脂分解酵素の特性解明と廃食用油を添加した好気性発酵システムへの応用

研究番号 : 3K122014

国庫補助金清算所要額：47,582,000 円（複数年度の総計）

研究期間：平成24年6月8日～平成26年3月31日

研究代表者名：伏信進矢（東京大学）

研究目的

高含水率の食品加工残渣はビール粕、馬鈴薯澱粉粕、オカラ、果汁絞り粕等として約500万トン/年が排出されているが、飼料としての再生利用率は50%程度に留まっている。これは食品加工残渣が高い含水率により腐敗しやすく、乾燥や輸送のコストもかかるためである。従って、高温好気性発酵処理を用いて高含水率の食品加工残渣を乾燥させれば腐敗が防止でき、大幅に減量するので輸送コストも低減できる。高温好気性発酵は菌体増殖が速いため発酵日数が短くて済む、乾燥速度が速い、病原菌が死滅して安全性が高まり、雑草種子も不活化されるのでコンポスト利用においても有利、などの特徴がある。

一方、天ぷら油などの食用油は年に237万トン消費されており、そのうち45万トンが廃食用油として回収され、飼料や燃料などに再利用されているが、18万トンが未利用で埋め立てなど処分されている。

これまで、廃食用油を添加した食品加工残渣の好気性発酵処理は、発酵温度の上昇や有機物の分解率向上などの有効性が示されているものの、高温域で分解効率が低下する点が問題点として残っていた。また、40℃程度の中温でのリパーゼ生産能が高い菌は多く見出されているが、60℃以上の高温でリパーゼ生産能が高い菌は見出されておらず研究事例も少ない。高温好気性発酵温度の60℃程度で油脂分解酵素の生産能が高い好熱菌が見出されれば、廃食用油を微生物発酵の炭素源として添加することで有機物分解率の向上による外部熱源量の低減が見込まれる。併せて未利用処分されている廃食用油の再利用が可能になる。

本研究では、廃棄物として大量に排出されている高含水率の食品加工残渣や生ごみに廃食用油を添加し、高温で生育する油脂分解酵素生産好熱菌を利用した発酵により外部熱源を低

概要

減させつつ乾燥させ、飼料や燃料へと再生利用する、費用対効果の優れた新規なシステムの構築を目指した。60℃以上で生育する新規な油脂分解酵素生産好熱菌をスクリーニングにより取得し、その特性の解明を行うとともに、実際の発酵乾燥飼料化装置にて実証を行い、廃食用油を用いてエネルギー回収効率を高度化した新規な好気性発酵システムを構築することを目的とする。本研究は以下の4項目からなる。

① 実証試験機を用いたシステム開発

実証試験機を用いて、オカラに、油揚げ製造時に発生する廃食用油を添加した、高温発酵と好熱菌による高温好気性発酵のシステムを確立する。

- ・長期間安定して好気性発酵が持続するシステムを開発する。
- ・高温好気性発酵に適した温度条件を検討する。
- ・廃白土混合コンポストや項目③で得られた油脂分解微生物群集および NB501株など、各種微生物資材を添加した運転を行い、その効果を検証する。
- ・本システムでの有機物分解による発酵熱への寄与（熱収支）を算出する。
- ・油揚げ製造廃食用油以外にも、家庭系廃食用油を用いた運転を行い、その効果を検証する。

② 微生物添加効果の検証

項目①のデータは、粗脂肪分と粗灰分の委託分析値を元にして得られたものであり、各種の添加運転のうち、最も高い性能が得られたと判断した廃白土混合コンポストの添加結果を中心に分析を行っている。そこで、本項目では、油脂分解微生物群集および NB501株なども含めて数回の添加運転の結果について、当研究室の実験室において総脂質、灰分、含水率を高精度で再分析を行う。さらに、水分の蒸発や有機物の分解により変動しない数値である灰分測定値を元にして全体の収支を計算しなおし、油脂分解、乾物分解、CO₂発生量、pH変化などの各種の分析値から多面的な検証を行う。さらに、廃白土混合コンポストの添加実験における微生物の群集構造の変遷を調べるために次世代シーケンサーを用いて群集構造解析を行う。

③ 好熱性油脂分解菌の探索と性質解明

高温域（60℃以上）での微生物による油脂分解活性は、中温域（40℃）と比較して分解効率が低下する。油脂分解酵素（リパーゼ等）を生産する微生物は中温で生育するものが多く報告されており、高温で生育するものは中温のものに比べて極めて少ないことがその原因の一つとして考えられる。そこで本研究では、60℃以上で生育する新規な好熱性油脂分解菌の取得およびその微生物が生産する油脂分解酵素の性質を解明することを目的とした。併せて、実証試験機内への投入実験のために、単離した油脂分解菌 NB501株および複数種の微生物が共存する油脂分解微生物群集の大量培養条件を確立した。さらに、集積過程における微生物の群集構造の変遷を調べるために次世代シーケンサーを用いて群集構造解析を行う。

④ 脂質の分析手法の開発

本研究において油脂分解過程を評価する為に、添加した廃食用油の主成分であるトリアシルグリセロールと、その加水分解物であるジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、そして

概要

遊離脂肪酸の分解過程を経時的に定量する分析法を開発する。

研究方法

①実証試験機を用いたシステム開発

千葉県豆腐商工組合内に実証試験機（計画能力：オカラ 100 kg/日＝豆腐 800 丁程度を生産する際のオカラ量とされる）を設置した。工場から排出されるオカラの一部を 1 箱 10 kg 入りの容器に入れて毎日取り出し、試験に用いた。また油揚げ製造時に使用された廃大豆油を試験に用いた。オカラは容器ごとに 10 kg 充填した。廃食用油はオカラに対して 3～7.5% 投入し、投入重量を測定し、記録した。各種計測器により、温度、含水率、pH、排気風量、排気 CO₂ 濃度、排気アンモニア濃度、ヒーター電力などを記録した。

処理工程は、①投入、②発酵乾燥（攪拌機、通気循環ファン、加温ヒーターを作動し所定の温度を維持して発酵と乾燥を促進させる）、③乾燥（投入を停止して乾燥を促進）、④排出（側壁に設けた排出口を開けて行う。排出は内容物をすべて排出するのではなく含水率調整のため一部を残す。）からなる。排出終了後は投入工程に戻る。

運転方法：火曜日から土曜日までオカラの投入量を 100 kg/日とし、発酵乾燥を行った。日曜日、月曜日は投入せず乾燥運転とし、火曜日の朝に排出した。週の 2 日間は原料の投入をせず乾燥工程としたため、平均発酵日数は 5 日間となる。

オカラは午前中 3 回 1 時間毎に各 20 kg 投入し、午後は 2 回 1 時間程度の間隔で各 20 kg 投入した。

発酵槽内の温度は約 60°C となるようにヒーターを制御し、微生物脱臭装置を設置する前は、10%クエン酸溶液の添加により、発酵オカラの pH が 7.0-7.5 となるように調整した。微生物脱臭装置の設置後は、クエン酸の添加による pH のコントロールは行っていない。

粗脂肪、粗灰分を必要に応じて分析した。分析は外部機関（千葉県農林総合研究センター）に委託し、分析方法は飼料分析基準（平成 20 年 4 月 1 日・19 消安第 14729 号 農林水産省消費・安全局長通知）に準拠し、粗脂肪はジエチルエーテル抽出法、粗灰分は加熱灰化法により行った。

今回、油脂分解微生物群の資材および分離源として千葉県 I 酪農由来の廃白土混合コンポストを用いた。廃白土とは、油脂の脱色、精製に使用した活性白土の残渣（廃棄物）であり、脂質を多く含む。また、コンポスト化の副資材として用いられる。本研究では、このようにコンポストを用いた集積培養により構築された微生物群集を、廃白土混合コンポストとした。

生成飼料の家畜への供与試験として、C 県畜産総合研究センターのご協力により鶏、豚への給与試験を行った。

② 微生物添加効果の検証

オカラおよび発酵乾燥物の pH、含水率、灰分、総脂質の値を、実験室において精密に再分析した。灰分測定は電気炉を用いた加熱灰化法で、総脂質測定法は Bligh-Dyer 法をベー

概要

スとし、有機溶媒の使用量を減らすために改変を加えた方法を用いた（クロロホルム：メタノールによる2回抽出の後、重量測定）。

オカラおよび発酵乾燥物の重量から、水分量、灰分量、総脂質量を引いた値を差分基質（脂質を除く有機物）とした。

微生物群集解析は、東京大学大学院新領域創成科学研究科・服部正平教授および須田互博士に依頼し、次世代シーケンサーを用いた V1-2 領域アンプリコン解析を行った。

③ 好熱性油脂分解菌の探索と性質解明

実証試験機内の発酵オカラを単離源とし、このオカラを、廃食用油を唯一の炭素源とした液体集積培養培地に添加し集積培養を行うことにより、油脂分解菌の獲得を目指した。

培地として、LB 培地、NB 培地、トリプトソーヤ培地、ペプトン培地、トリプトン-イースト培地、TBS 培地、およびそれらを希釈した培地を用いた。液体培地を用いて 40～60℃ で5回の振盪培養を行った。その際、気相部に存在する酸素の減少と二酸化炭素の増加をガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）により測定した。集積培養液をプレート上の固体培地に塗布して 40～60℃ で培養して油脂分解菌の単離を行った。油脂分解能の指標として、廃食用油を含んだプレート培地におけるクリアハロー形成も確認した。単離された油脂分解菌の 16S rRNA 遺伝子による系統学的解析を行い、その系統学的位置を調べた。さらに、次世代シーケンサーを用いて集積培養で得られた好熱性油脂分解微生物群集の群集解析を行った。

単離された好熱性油脂分解菌の培養液を限外ろ過膜を用いて濃縮しそのリパーゼ活性を、pNP-palmitate (C16) を基質として測定した。

実証試験機への投入試験のために、NB501 株および好熱性油脂分解微生物群集を 8～20L の培地で培養して、遠心機により濃縮した。

④ 脂質の分析手法の開発

脂質の分析法として、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、薄層クロマトグラフィー (TLC)、ガスクロマトグラフィー (GC) を用いた検討を行った。HPLC にはカラム CAPCELL PAK C18 UG120 S3 (2.0 mm×150 mm) を用いた。TLC には LC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA) および HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA) を、その展開溶媒には、ヘキサン、ジイソプロピルエーテル、酢酸を用いた。TLC 分析は油脂分解菌による廃食用油の分解評価にも適用した。GC 分析については、東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科海洋科学系食品生産科学部門准教授の後藤直宏博士に協力を依頼し、共同研究の形で脂質分析法の開発を行った。

概要

結果と考察

①実証試験機を用いたシステム開発

試験内容

24年度は安定した運転条件の確立を行い、さらに、予備実験として各種の菌を添加してそれらの効果を調べた。

25年4月から5月にかけて70℃での運転試験を行った。以後は60℃での運転を継続した。

25年6月～26年2月の期間には、以下のとおり、添加試験を行った。

- ・6月11日～6月25日（2週間）：コントロール条件（菌を添加しない条件）
- ・6月25日～7月16日（3週間）：NB501株添加1回目（40 g）
- ・7月23日～8月13日（3週間）：NB501株添加2回目（100 g）

・11月5日～11月12日（1週間）：コントロール週（廃白土コンポスト添加前週）

・11月12日～12月10日（4週間）：廃白土コンポスト添加

・12月10日～12月24日（2週間）：好熱性油脂分解微生物群集添加1回目（4.7 g）

・2月4日～2月18日（2週間）：好熱性油脂分解微生物群集添加2回目（10 g:未分析）

なお、25年3月末（70℃運転前）に *Geobacillus zalihae* の添加試験を行ったが、良好な結果は得られなかった。

26年3月には、家庭から排出された廃食用油を用いた試験を行った。

70℃での試験

70℃から60℃に切り替えて試験を行った結果、70℃では熱効率が高くなるものの、微生物活性が60℃に比べて若干下がることから、60℃が最適温度であると判断した。

廃白土混合コンポスト添加での試験結果

他の試験と比べて、もっとも高い油脂分解効果が得られた。添加前週（コントロール週）では油分分解量が3.6 kg/週、乾物分解量が14 kg/週だったのに対し、廃白土混合コンポスト添加後第2週から第4週にかけて、油分分解量は6.6→5.7→8.8 kg/週、乾物分解量は28→24→29 kg/週と、長期にわたって高い活性が維持された。1日当たりの分解率は乾物、油分ともに4%程度であり、既報告事例と比べても乾物では同等か高い結果が、また油分では畜ふん+生ごみでの事例と比し大幅に高い結果が得られた。

既報では、廃食用油を添加した高温好気法による実験で60℃の高温域では40℃に比べて著しく油分分解率が低下すると報告している。40℃では日当たり4%程度が得られたが、60℃では同2%程度であった。リパーゼなどの油脂分解酵素の生産能が高い菌は中温菌が多いためとされているが、本試験では60℃で高い油脂分解酵素生産能を持つ菌の添加効果により60℃において日当たり4.2%の分解率が得られている。また既報では廃食用油の分解が遅いため蓄積し、粘性を増加させて通気不良になり発酵が停止することを報告している。本試験では全期間を通じてそのようなことは見られなかった。

概要

pHは第3週を除き8前後で推移した。アンモニアも高い濃度で生成した。油脂分解効果が高い高温菌はpHに大きく活性が影響され、活性が高いpH域は8前後で、それより下の中性域、酸性域では急速に活性が低下することが明らかになった。

発酵乾燥方式における光熱費の低減効果

廃白土混合コンポスト添加第4週における、本システムでの有機物分解による発酵熱の寄与を計算した。入熱は乾物分解熱+粗脂肪分解熱+ヒーター電力とし分析値および測定値から求めた。出熱は排気が持ち去る熱量+放熱損失とし、排気が持ち去る熱量を排気ガス量、温度、湿度からエンタルピーを算出して求めた。放熱損失は入熱と出熱を等しいとして入熱合計値から排気が持ち去る熱量を差し引いて求めた。発酵による発熱量は全体の39%であり5日間の発酵時間でのシステムとしては大きい値といえる。物理的な乾燥方式では発酵熱の寄与が全くないのでこの分外部熱源を多く必要とすることになる。出熱項目のうち放熱量に関し、用いた実証試験機は断熱材の劣化やはく離がみられ断熱性が十分ではなく放熱損失が大きい。断熱を良くすれば放熱量が低減しヒーター電力がさらに小さくて済む可能性が大きい。分解率は発酵日数に大きく影響されることと、5日間の発酵日数では添加した油の一部しか利用していないことから、倍の10日間とすることで必要熱量のうち70%近くを発酵熱で賄うことができる可能性がある。物理的な乾燥方式では発酵熱の寄与は0であるため、発酵乾燥方式における光熱費の低減効果は大きい。

家庭系廃食用油の添加試験

家庭から排出される廃食用油を用いた試験を行った。油揚げ製造時の廃食用油を用いた集積培養菌添加試験での結果と比較したところ、同等の結果が得られた。従って、工場などの業務用廃食用油の他に家庭から排出される廃食用油でも同等の効果が得られることが確認できた。不純物の混入が少ない廃食用油はBDFや灯油混合燃料などに再生利用されているが、本研究で新たに高含水率有機性廃棄物の発酵処理における水蒸発の熱源として利用可能なことが明らかになった。BDFや灯油混合燃料では不純物はできるだけ避けなければいけない。そのために排出側での異物混入防止の配慮や再生利用側でも前処理でそれらを取り除く必要がある。本システムの場合、微生物が分解できる食品カスなどの異物や水分が混入しても影響はないのでそのまま利用することができる。

連続安定運転

25年9月24日から12月24日まで安定した運転を継続した。オカラは100kg/日、廃食用油は油無添加週を除いて5kg/日投入した。この間、内容物の塊状化や通気性の不良による嫌気性化は無かった。廃食用油の添加による粘性の増加はなく、高含水率のオカラと廃食用油のみを用いて安定した運転が可能であった。これは攪拌の効果と高温好気性発酵の特長である乾燥速度が速いことによるものと考えられる。なおこの期間以外でも安定した運転が行えた。

概要

メタンガス発生の有無の検討

発酵槽内のメタンガス発生量は検出限界の 0.1% (v/v) 以下であった。従って、メタン菌によるメタンガスが生成しておらず、爆発限界 (5.3~14%) より十分低いいため、本装置の発酵による爆発などの危険性はないことが明らかになった。

脱臭器の設置と効果

25 年 9 月に脱臭器を設置した。それまでは発酵乾燥物の pH を 7 前後に抑えてアンモニアの発生を抑制する運転を行っていたが、弱アルカリ域での活性が高いと思われる微生物試験には適していなかった。脱臭器設置後はアンモニアが生成しても環境に放出するおそれがないので pH 8 程度の弱アルカリ域での長期試験が可能になった。脱臭方式は微生物脱臭を採用した。11 月中頃から高いアンモニアが生成したが脱臭器出口ではほぼ 0 ppm であった。油脂分解効果の高い微生物は弱アルカリ域で活性が高いことが、NB501 株や廃白土混合コンポストで明らかになった。弱アルカリ域ではタンパク質の分解に伴って必然的にアンモニアが高濃度で生成するので、本システムでは乾燥発酵槽と脱臭器の組み合わせが必要である。脱臭方式はさまざまな方式が用いられているが、本研究で用いた微生物脱臭方式は簡易な構成であり、微生物担体に付着した硝化菌がアンモニアを酸化して硝酸態にするので担体の交換は必要が無く、微生物の乾燥防止と硝酸態窒素の排出のため少量の給水が必要だけで安価な脱臭装置である。

生成飼料の家畜への供与試験

24 年度に鶏・豚への発酵乾燥飼料の供与試験を行った。5%、10%混合区では対照区と大差なかった。20%混合区では鶏の場合やや産卵量が低下し、豚ではと畜日齢が長くなる傾向があった。

副資材の不要化

すべての試験期間中において、従来水分調整や通気性改良材として必要とされた木質チップ、もみ殻などの副資材は用いていない。飼料化の場合に乾材として必要であった米ぬか、小麦ふすま、パンくずなどの副資材も使用していない。内容物の塊状化や通気性の不良による嫌気性化は無かった。廃食用油の添加による粘性の増加も無かった。高含水率のオカラと廃食用油のみを用いて安定した運転が可能であった。これは攪拌の効果と高温好気性発酵の特長である乾燥速度が速いことによるものと考えられる。

副資材は従来必須のものとされていたが、木質系の副資材を用いれば飼料としては使えず、また木質は分解しにくいので減量効果も低い。副資材を用いずに発酵乾燥することで、本システムは飼料化の他に減量化、乾燥の用途にも適用できる。熟成工程を付加すれば堆肥化用途にも適用できる。

廃食用油を添加した高温好気性発酵乾燥システムのメリット

本研究において次に示すメリットを確認できた。

概要

- (1) 短期間の発酵日数で乾物、油脂ともに高い分解効果が得られた。
- (2) 廃食用油の添加でヒーター等の外部入熱を少なくすることができた。
- (3) 高含水率のオカラの発酵乾燥処理において副資材が不要であった。
- (4) 副資材を用いないので発酵日数を長くとれた。
- (5) 乾燥速度が速く、内容物の塊状化や嫌気性化はなかった。
- (6) 60°Cで油脂分を分解する高温好気性菌によりオカラを発酵乾燥させ飼料として用いることができた。減量化、乾燥等に用いることも可能である。
- (7) 添加する廃食用油は家庭などから排出されるものでも同等の効果であった。家庭やレストランなどでは不純物が混入しやすいのでそれらの再利用に適する。
また一般的に次に示すメリットもある。
- (8) 生肉が混入した生ごみ等の飼料化においてはエコフィードガイドラインに定める 70°C 30 分間以上の加熱処理が必要であるが、高温発酵では常時 60°C程度での発酵温度なのでガイドラインは容易に達成できる。
- (9) 熟成工程を付加すれば堆肥に利用できる。
- (10) 必要な水分を蒸発させる際に排気が持ち出す熱量は中温発酵より少ない。
- (11) 病原菌や雑草の種子が死滅、不活化する。
- (12) ハエや小虫が発生しない。

②微生物添加効果の検証

実証試験装置に各種の微生物を添加した結果の検証として、以下の5回の投入試験において、高精度の分析を行った。

- (1) コントロール条件
- (2) NB501 株添加 1 回目 (40 g)
- (3) NB501 株添加 2 回目 (100 g)
- (4) 廃白土コンポスト添加 (コントロール週も含めた5週間のモニタリング)
- (5) 好熱性油脂分解微生物群集添加

コントロール条件においては1週間で約4 kg程度の脂質と、20 kg弱程度の差分基質(脂質以外の有機物:前項で「乾物」としたものに当たる)が分解されており、高温好気発酵において、微生物による分解が起こっていることが確認された。本研究で単離したリパーゼ生産菌 *B. thermoamylovorans* NB501 株を添加した結果、1回目(40 g)では効果が見られなかったのに対し、湿菌体重量で2倍以上の100 gを投入した2回目では、2週間の間、脂質分解量が5.6~5.8 kgと上昇し、CO₂発生量も増加した。しかし、3週目では逆に脂質分解量が低下し、微生物活性が低下した。好熱性油脂分解微生物群集(60°Cで油脂を炭素源として集積培養を行った微生物資材)を4.7 g添加した場合も、1週目は脂質分解量(6.6 kg)とCO₂発生量の増加が見られたが、やはり2週目から活性が低下した。

しかし、微生物資材として、廃白土混合コンポストを7.1 kg投入した結果、脂質分解量は6.6 kg(2週目)→8.5 kg(4週目)と持続的に上昇し、CO₂発生量も継続的に高くなった。約1ヶ月の間、高活性が維持されたことから、廃白土混合コンポストの投入が本システ

概要

ムの高機能化に有用であったことになる。

廃白土混合コンポスト添加における微生物群集解析を、次世代シーケンサーを用いて行った結果、*B. thermoamylovorans* NB501 株にごく近縁の *B. thermolactis* が増加していたことが分かった。

本研究で添加した NB501 株や好熱性油脂分解微生物群集の量は、湿菌体重量で 100 g 以下であり、廃白土混合コンポストの添加量より大幅に少ない。実験室レベルの培養で kg 単位の菌体の添加を行うことは難しいが、廃白土混合コンポストの添加において効果を示している（リパーゼの生産に寄与している）微生物は、NB501 株に近縁の微生物である可能性が高いといえる。

③好熱性油脂分解菌の探索と性質解明

実証試験機の発酵オカラまたは廃白土混合コンポストを単離源として、廃食用油、トリオレイン、大豆油など多様な油脂を NB や TSB などの培地をそれぞれ組み合わせたことにより、40℃、50℃ さらには 60℃ で生育する 5 種類の好熱性油脂分解菌の単離に成功した。40℃ では *Acinetobacter baumannii* と *Cronobacter sakazakii*、50℃ では *Bacillus thermoamylovorans*、60℃ では *Geobacillus galactosidasius* と *Geobacillus thermodenitrificans* を単離した。また、*B. thermoamylovorans* と *G. thermodenitrificans* については、そのリパーゼの性質を調査し、それぞれ 60℃ と 70℃ が至適温度となることと、どちらも高い耐熱性を有することを明らかにした。上記の微生物の中でも特に高温域 60℃ で生育可能であり、生産するリパーゼの至適温度が 60℃ 以上の油脂分解酵素活性を示す微生物に関しては、実証試験機内において廃食用油の分解に関与していると考えられる。次世代シーケンサーを用いた群集解析からは、60℃ における集積培養において、*Geobacillus* 属に属するいくつかの種が多く集積されていることが示された。

④脂質の分析手法の開発

廃食用油の主成分であるトリアシルグリセロールの分解過程を経時的に定量することを目的として、HPLC、TLC、GC を用いた分析法の開発を検討した。HPLC を用いた定量に関しては、予備検討の段階で困難であることが明らかになり、検討を終了した。TLC を用いた脂質の分析法に関しては、展開溶媒の安全性を向上させつつ、高分解能で、廃食用油の主成分であるトリアシルグリセロールと、その分解生成物であるモノ、ジアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸のスポットが形状よく、良好に分離する条件を確立した。さらに、脂質の抽出法を組み合わせることで、単離した油脂分解菌の廃食用油分解能の評価や、オカラの好気高温性発酵システムにおける廃食用油処理能の評価への応用が可能である。GC を用いた脂質の定量分析においては、共同研究の形で開発を行った。カラムの選定においては、耐熱性に優れる金属キャピラリータイプのカラムを含め検討を行い、汎用性の高い微極性溶融石英キャピラリーカラムの中でも耐熱性の高いカラムを用いることで、沸点の高いトリアシルグリセロールを良好に検出する条件を確立した。また、ジアシルグリセロールについても誘導体化することで検出が可能であった。しかし、モノアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸の誘導

概要

体を同定するには至らなかった。

環境政策への貢献

本システムは、廃食用油への水や不純物の混入に強く、廃食用油の回収率の向上につながる点が最大のメリットである。焼酎粕、果汁搾り粕、澱粉粕、調理残渣などの、様々な食品加工残渣の飼料としての再利用や、生ごみの飼料化・堆肥化、減量・乾燥への適用の可能性が広がる。水や不純物の混入に強い低コストの発酵乾燥システムが普及すれば、現状で回収利用に適さないような廃食用油も回収できるようになる。よって、生活排水への廃食用油の流入が減少し環境負荷が低減される、発酵乾燥に用いる外部熱源の低減によりエネルギー使用量が減るなどの波及効果も期待できる。

他の処理方法に対する優位性：

- ・家庭やレストランなどからの廃食用油には水や揚げカスなどの不純物が混入しやすく、BDF（バイオディーゼル燃料）などの回収再利用に適さないものがある。しかし、本システムはそれらが混入しても大きな影響はないため、回収率の向上が見込める。
- ・攪拌しながら熱風を通気するために乾燥速度、処理速度が早い。
- ・熱に弱い病原菌は死滅し雑草種子も不活化するので飼料およびコンポストとしての利用の安全性が高まる。生肉が混入した生ゴミなどの飼料化においてはエコフィードガイドラインに定める 70°C30 分以上の加熱処理が必要であるが、高温発酵では常時 60～70°Cなのでガイドラインは容易に達成できる。
- ・多くの発酵乾燥システムでは、飼料化の場合には乾材として米ぬか、小麦ふすま、パンくずなどが、堆肥化の場合には水分調整および通気性改良材として木材チップ、おがくず、もみ殻などの副資材の投入を必要とするが、本システムでは、連続的に攪拌を行なって高温好気性発酵をさせるため、必要ない。
- ・物理的乾燥法では発酵熱の寄与が 0 であるのに対し、本システムでは必要熱量の約 4 割を発酵熱により賄うことができる。

また、本研究で確立した脂質の抽出・分析手法は、危険性の高い溶媒や健康に悪影響のある溶媒の使用量を減少させつつ良好な結果が得られる方法であり、環境負荷の低減に貢献できると期待される。

研究成果の実現可能性

高含水率の食品加工残渣や生ごみなどを飼料化・堆肥化・減量化および乾燥ができる好熱性油脂分解菌を利用した廃食用油添加型高温好気性発酵処理システムを開発できたことにより、食品加工残渣を排出する食品メーカー等においては再生利用設備として飼料化等、スーパーやホテル・レストランなどにおいては業務用生ごみ処理機として飼料・堆肥としての再生利用や減量・乾燥を目的とした適用が可能である。

概要

排出事業者にとっては廃棄物としてでる廃食用油を発酵乾燥の熱源の一部として利用でき、外部熱源も低減できることからコスト低減のメリットがある。

豆腐と油揚げの製造で同時に排出される、オカラと廃食用油を同時に処理するシステムは、オカラを産業廃棄物として有料で処理している中規模以上の工場で導入される可能性がある。

実証試験機では 100kg/日の小型装置を用いているが、1,000kg/日のような大型機、20t/日のようなプラント型も可能であると考えており、大型化による費用低減効果も期待できる。特に、廃食用油への水や揚げカスなどの不純物の混入に強いいため、家庭やレストランなどから排出されるもののなかで、BDF などの回収再利用に適さないような廃食用油も利用可能な点が重要であり、廃食用油の回収率の向上につながることを期待できる。

結論

実証試験機を用いたシステム開発では、

- (1) 廃白土混合コンポストを添加して発酵日数 5 日間で油分分解率は 21%であった。これは従来にない高い値であった。
- (2) 廃食用油を添加することでヒーター電力を 26%低減できた。
- (3) 乾物と油分の分解熱で必要熱量の 39%を賄うことができた。
- (4) 油分分解効果が高い高温菌は活性が pH に大きく影響され、活性が高い pH 域は 8 前後であり、それより下の中性域、酸性域では急速に活性が低下することが明らかになった。
- (5) 油分の分解は弱アルカリ域で効果が高く、そのためアンモニアも高濃度で生成する。簡易な構成の微生物脱臭器を用いて高い効率でアンモニアを除去できた。
- (6) 副資材を用いずに高含水率のオカラと廃食用油を 5%添加して 3ヶ月間安定した運転が可能であった。
- (7) 家庭から排出される廃食用油を用いても同等の効果が得られた。
- (8) 発酵槽内は連続通気と連続攪拌により好気的な条件が保たれているが、念のためメタンガスの分析をしたところ検出限界の 0.1%(v/v)以下であった。

以上のことから高含水率の食品加工残渣や生ごみなどを飼料化・堆肥化・減量化および乾燥ができる好熱性油脂分解菌を利用した廃食用油添加型高温好気性発酵処理システムを開発できた。

概要版：ここまで

総合研究報告書 本文

1. 研究背景と目的

1.1 研究背景

高含水率の食品加工残渣はビール粕、馬鈴薯澱粉粕、オカラ、果汁絞り粕等として約 500 万トン/年が排出されているが、飼料としての再生利用率は 50%程度に留まっている。これは食品加工残渣が高い含水率により腐敗しやすく、乾燥や輸送のコストもかかるためである。従って、高温好気性発酵処理を用いて高含水率の食品加工残渣を乾燥させれば腐敗が防止でき、大幅に減量するので輸送コストも低減できる。高温好気性発酵は菌体増殖が速いため発酵日数が短くて済む、乾燥速度が速い、病原菌が死滅して安全性が高まり、雑草種子も不活化されるのでコンポスト利用においても有利、などの特徴がある。

一方、天ぷら油などの食用油は年に 237 万トン消費されており、そのうち 45 万トンが廃食用油として回収され、飼料や燃料などに再利用されているが、18 万トンが未利用で埋め立てなど処分されている。

これまで、廃食用油を添加した食品加工残渣の好気性発酵処理は、発酵温度の上昇や有機物の分解率向上などの有効性が示されているものの、高温域で分解効率が低下する点が問題点として残っていた。また、40°C程度の中温でのリパーゼ生産能が高い菌は多く見出されているが、60°C以上の高温でリパーゼ生産能が高い菌は見出されておらず研究事例も少ない。高温好気性発酵温度の 60°C程度で油脂分解酵素の生産能が高い好熱菌が見出されれば、廃食用油を微生物発酵の炭素源として添加することで有機物分解率の向上による外部熱源量の低減が見込まれる。併せて未利用処分されている廃食用油の再利用が可能になる。

1.2 研究目的

本研究では、廃棄物として大量に排出されている高含水率の食品加工残渣や生ごみに廃食用油を添加し、高温で生育する油脂分解酵素生産好熱菌を利用した発酵により外部熱源を低減させつつ乾燥させ、飼料や燃料へと再生利用する、費用対効果の優れた新規なシステムの構築を目指した。60°C以上で生育する新規な油脂分解酵素生産好熱菌をスクリーニングにより取得し、その特性の解明を行うとともに、実際の発酵乾燥飼料化装置にて実証を行い、廃食用油を用いてエネルギー回収効率を高度化した新規な好気性発酵システムを構築することを目的とする。本研究は以下の 4 項目からなる。

① 実証試験機を用いたシステム開発

実証試験機を用いて、オカラに、油揚げ製造時に発生する廃食用油を添加した、高温発酵と好熱菌による高温好気性発酵のシステムを確立する。

本文

- ・ 長期間安定して好気性発酵が持続するシステムを開発する。
- ・ 高温好気性発酵に適した温度条件を検討する。
- ・ 廃白土混合コンポストや項目③で得られた油脂分解微生物群集および NB501 株など、各種微生物資材を添加した運転を行い、その効果を検証する。
- ・ 本システムでの有機物分解による発酵熱への寄与（熱収支）を算出する。
- ・ 油揚げ製造食用油以外にも、家庭系廃食用油を用いた運転を行い、その効果を検証する。

② 微生物添加効果の検証

項目①のデータは、粗脂肪分と粗灰分の委託分析値を元にして得られたものであり、各種の添加運転のうち、最も高い性能が得られたと判断した廃白土混合コンポストの添加結果を中心に分析を行っている。そこで、本項目では、油脂分解微生物群集および NB501 株なども含めて数回の添加運転の結果について、当研究室の実験室において総脂質、灰分、含水率を高精度で再分析を行う。さらに、水分の蒸発や有機物の分解により変動しない数値である灰分測定値を元にして全体の収支を計算しなおし、油脂分解、乾物分解、CO₂発生量、pH 変化などの各種の分析値から多面的な検証を行う。さらに、廃白土混合コンポストの添加実験における微生物の群集構造の変遷を調べるために次世代シーケンサーを用いて群集構造解析を行う。

③ 好熱性油脂分解菌の探索と性質解明

高温域（60℃以上）での微生物による油脂分解活性は、中温域（40℃）と比較して分解効率が低下する。油脂分解酵素（リパーゼ等）を生産する微生物は中温で生育するものが多く報告されており、高温で生育するものは中温のものに比べて極めて少ないことがその原因の一つとして考えられる。そこで本研究では、60℃以上で生育する新規な好熱性油脂分解菌の取得およびその微生物が生産する油脂分解酵素の性質を解明することを目的とした。併せて、実証試験機内への投入実験のために、単離した油脂分解菌 NB501 株および複数種の微生物が共存する油脂分解微生物群集の大量培養条件を確立した。さらに、集積過程における微生物の群集構造の変遷を調べるために次世代シーケンサーを用いて群集構造解析を行う。

④ 脂質の分析手法の開発

本研究において油脂分解過程を評価する為には、添加した廃食用油の主成分であるトリアシルグリセロール(TG)と、その加水分解物であるジアシルグリセロール(DG)およびモノアシルグリセロール(MG)、そして遊離脂肪酸(FA)を経時的に定量する必要がある(図1-1)。

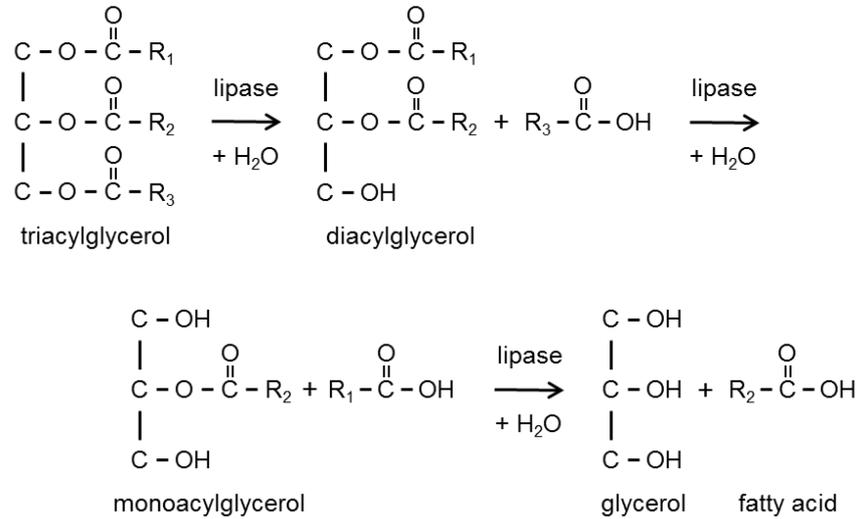


図1-1 トリアシルグリセロールの加水分解反応の模式図

しかし、上記化合物群を総合的に定量、評価するためには、下記に示す問題点がある。

- (1)各化合物群の沸点が非常に高い
- (2)主成分と分解物の極性が大きく異なる
- (3)各化合物群により、水酸基の数が異なる
- (4)構成する脂肪側鎖の二重結合の数の組み合わせが複雑である
- (5)同じ化合物群においても、構成する脂肪側鎖の構造が多種多様であり、複雑な混合物である

以上のような問題点から、機器分析による各化合物群の一斉定量は困難であり、オカラ固体培養のような複合培地を用いた好気発酵における、トリアシルグリセロールの分解過程を経時的に追跡した報告例はない。そこで、廃食用油の主成分であるトリアシルグリセロールの分解過程を経時的に定量する分析法を開発する。

本文

2. 研究方法

2.1 実証試験機を用いたシステム開発

千葉県豆腐商工組合は千葉県内豆腐製造販売者 約 200 名の組合員で構成され、あぶら揚げなどの豆腐関連商品の生産と販売を行っている。同組合工場敷地に設置済みの実証試験機を用いた。

2.1.1 実証試験機の概要

場所：千葉市稲毛区長沼原町 656-1 千葉県豆腐商工組合内
環清技研エンジニアリング(株) 実証試験室

方式：発酵と通気乾燥の併用方式

計画能力：オカラ 100 kg/日 (豆腐 800 丁程度を生産する際のオカラ量とされる)

装置寸法：長さ 2280mm 幅 1200mm 高さ 1870mm

発酵乾燥槽有効容量：0.9m³

動力：攪拌機 3.7 kW 通気循環ファン 0.75 kW 加熱ヒーター 4.5 kW

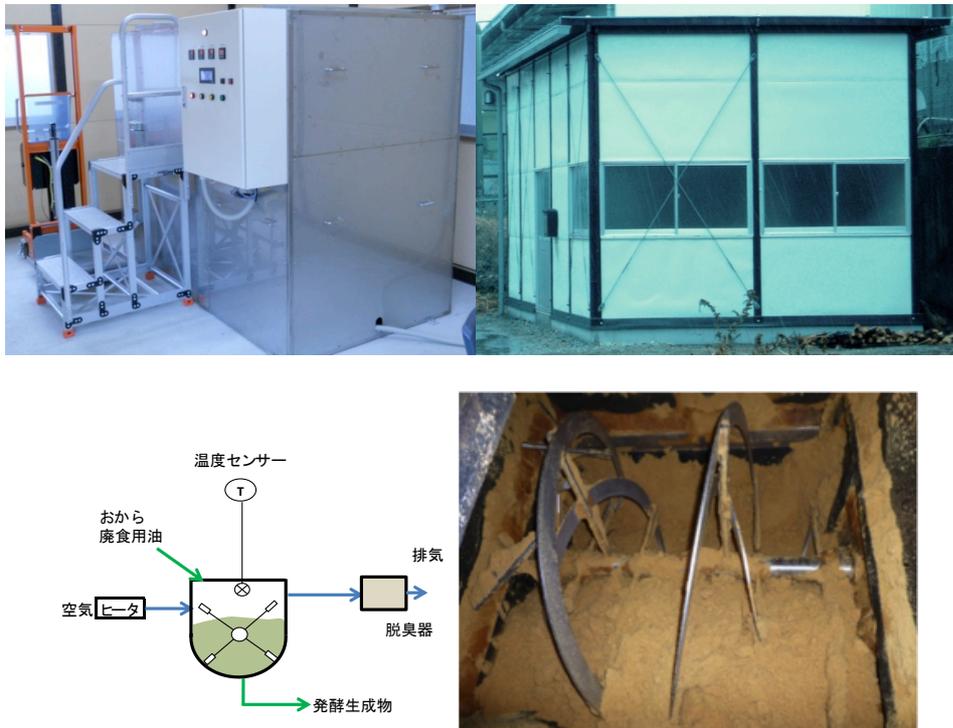


図 2-1 試験機の外観 (左上)、試験室 (右上)、試験機のフロー図 (左下)、発酵乾燥槽内の様子 (右下)

本文

2.1.2 オカラと廃食用油の受け入れ

工場からは1～2t/日程度のオカラが排出され、現状では産業廃棄物として委託処分しているが、絞り機から排出されるオカラの一部を1箱10kg入りの容器に入れて毎日取り出し、試験に用いた。また油揚げ製造時に使用された廃大豆油を試験に用いた。



図2-2 投入オカラと試験機（左上）、投入の様子（右上）、
廃大豆油（左下）、発酵生成物一時保管（右下）

オカラは容器ごとに10kg充填した。廃食用油はオカラに対して3～7.5%投入し、投入重量を測定し、記録した。

なお、本装置では副資材は用いない。従来の発酵乾燥装置に必要とされた小麦ふすま、米ぬか、パンくずなどの乾燥材料および木質チップ、もみ殻なども用いない。

内容物に分散性と通気性を発現させるために、発酵乾燥物をすべて取出さずに一部を残しオカラ投入後の槽内物含水率を概ね50%以下に維持した。

2.1.3 計測器

温度 : 発酵槽内温度計 T1、T2 およびヒーター出口熱風温度 T3、排気温度 T5 を熱電対温度計により測定

含水率 : 赤外線加熱式含水率計 OHAUS 社 MB23

pH : ガラス電極式 ライン精機 EH-1000

排気風量 : 熱線式風速計 AIRFLOW 社 TA410

本文

排気 CO₂ 濃度：非分散型赤外線式 (NDIR) E&E 社 EE85

排気アンモニア濃度：ガス検知管

ヒーター電力計：オムロン 電力ロガー ZN-CTX21

記録 : 温度、CO₂ 濃度はデータロガーにて記録した。

2.1.4 実証試験機の処理工程と運転方法

処理工程

投入 : 槽上部の投入口より行う。1回の作業時間は10分間程度である。

発酵乾燥 : 攪拌機、通気循環ファン、加温ヒーターを作動し所定の温度を維持して発酵と乾燥を促進させる。

乾燥 : 投入を停止して乾燥を促進させる。含水率が低下するので発酵は徐々に低下して最終的に停止する。機械の作動は発酵乾燥工程と同じである。

排出 : 槽側壁に設けた排出口を開けて行う。排出は内容物をすべて排出するのではなく含水率調整のため一部を残す。残存量は目視にてできるだけ毎回同じ程度になるようにした。

1回の作業時間は20分間程度である。 排出終了後は投入工程に戻る。

運転方法

火曜日から土曜日までオカラの投入量を100 kg/日とし、発酵乾燥を行った。日曜日、月曜日は投入せず乾燥運転とし、火曜日の朝に排出した。週の2日間は原料の投入をせず乾燥工程としたため、平均発酵日数は5日間となる。

オカラは午前中3回1時間毎に各20 kg投入し、午後は2回1時間程度の間隔で各20 kg投入した。廃食用油はオカラに所定の比率を混合したうえ投入した。攪拌機、通気循環ファンは発酵乾燥工程、乾燥工程中は連続運転。攪拌機の回転数は1回転/分程度とした。加温ヒーターは温度調節計により自動ON・OFF運転。

pHは朝オカラの投入前に発酵物を5 g採取し、100gの純水を加え30分間攪拌後に測定した。内容物の含水率は朝(オカラ投入前)、昼(午前中のオカラ投入後1.5時間後)、午後(全オカラ投入後1.5時間後)の3回測定した。

発酵槽内の温度は約60°Cとなるようにヒーターを制御し、微生物脱臭装置を設置する前は、10%クエン酸溶液の添加により、発酵オカラのpHが7.0-7.5となるように調整した。微生物脱臭装置の設置後は、クエン酸の添加によるpHのコントロールは行っていない。

アンモニアは朝、排気管の測定口で検知管により測定した。

生成物は20 kg入り袋に充填し、室内常温で一時保管した。

本文

2.1.5 槽内乾物量の算定

槽内の乾物量は、午前中の3回目投入終了後の含水率と5回目投入終了後の含水率および投入オカラ、投入廃食用油の重量から物質収支を算定して求めた。収支式内で必要な蒸発水分量は5回目投入後の含水率測定時から翌朝の含水率測定時までの含水率変化と槽内乾物量から時間当たり蒸発水分量を算出した。

実証試験機では構造上、槽内に残る発酵物量を毎回同じ量にはできない。槽内残存物量が初期投入物として分解量などの算出に必要なため、槽内の乾物量を午前中の3回目投入終了後の含水率と5回目投入終了後の含水率および投入物の重量から物質収支により求めた。

5回目投入後の物質収支

$$A1/(1-w1)+(P-V+F)=(A1+F+P((1-w0)))/(1-w2)$$

表2-1 発酵槽内初期乾物量 A0 の算出例

A0:1回目投入前の乾物量 (kgDS)

A1:3回目投入後の乾物量 (kgDS)

A2:5回目投入後の乾物量 (kgDS)

w1:3回目投入後の含水率 (%)

w2:5回目投入後の含水率 (%)

w3:翌朝の含水率 (%)

w0:オカラの含水率 (%)

P:4~5回目投入オカラ量 40 kg

F:4~5回目投入廃食用油 2.0 kg

V:w1~w2の経過時間における水分蒸発量 (kg)

t1:w1~w2の経過時間 (h)

t2:w2~w3までの経過時間 (h)

※1: w1~w2間での乾物分解量は無視した

※2: Vはt2間の時間当たり水分量がt1間で同じとして算出した

		11/26	27
		火	水
おから投入量	kg	100	
廃食用油投入量	kg	5	
おから含水率 w0	%	80.4	
内容物含水率(朝) w3	%	14.0	33.9
攪拌混合後含水率 w1	%	36.9	
経過時間 t1	h	2.48	
水分蒸発量(仮置き)	kg/h	1.8	
攪拌混合後含水率 w2	%	43.8	
廃食用油投入量 F	kg	2.0	
発酵槽内 乾物量 A0	kgDS	88	
発酵槽内 乾物量 A1	kgDS	103	
作業終了後 乾物量 A2	kgDS	112	
経過時間 t2	h	16.5	
水分蒸発量(計算値)	kg/h	1.8	

2.1.6 オカラおよび発酵乾燥物の性状分析

粗脂肪、粗灰分を必要に応じて分析した。分析は外部機関(千葉県農林総合研究センター)に委託し、分析方法は飼料分析基準(平成20年4月1日・19消安第14729号 農林水産省消費・安全局長通知)に準拠し、粗脂肪はジエチルエーテル抽出法、粗灰分は加熱灰化法により行った。

2.1.7 廃白土混合コンポストについて

今回、油脂分解微生物群の資材および分離源として千葉県I酪農由来の廃白土混合コンポ

本文

ストを用いた。廃白土とは、油脂の脱色、精製に使用した活性白土の残渣（廃棄物）であり、脂質を多く含む。また、コンポスト化の副資材として用いられる。これはコンポスト化の過程で集積培養により構築された微生物群集とみなすことができる。本研究では、このコンポストを、廃白土混合コンポストとした。

2.1.8 生成飼料の家畜への供与試験

C 県畜産総合研究センターのご協力により鶏、豚への給与試験を行った。

2.2 微生物添加効果の検証

2.2.1 各種分析法

オカラおよび発酵乾燥物の pH、含水率、灰分、総脂質の値を、実験室において精密に再分析した。分析方法は堆肥分析法に準拠した。

pH 測定法： サンプリングした試料約 10 g をガラスビーカーにとり、蒸留水 200 ml を添加した後、30 分間攪拌し、pH メーターにより測定した。

含水率測定法： 灰皿に試料を約 3 g 取り、オーブンをういて 100°C で 5 時間加熱し、重量の減少分を水分とした。

灰分測定法（加熱灰化法）： 灰皿に試料を約 3 g 取り、オーブンをういて 100°C で約 2 時間加熱乾燥した後、電気炉（ヤマト科学株式会社 F0310 型）にて 700°C で 4 時間以上加熱し十分に灰化させ、残分を灰分とした。

総脂質測定法： Bligh-Dyer 法をベースとし、有機溶媒の使用量を減らすために改変を加えた以下の方法を用いた（クロロホルム：メタノールによる 2 回抽出の後、重量測定）。

- ・ガラス試験管 A に試料を採取（湿潤重量 0.2 g 以下）
- ・メタノール 1.5 ml 添加
- ・ガラス棒で試料の塊をくずす
- ・ボルテックスミキサーにより攪拌（1 分）
- ・クロロホルム 3.0 ml 添加（抽出 1 回目）
- ・ボルテックスミキサーにより攪拌（1 分）
- ・遠心（4000×g、20°C、20 分）
- ・上清を試験管 B に移す
- ・試験管 B に純水 0.9 ml 添加
- ・ボルテックスミキサーにより攪拌（5 分）
- ・遠心（4000×g、20°C、20 分）

本文

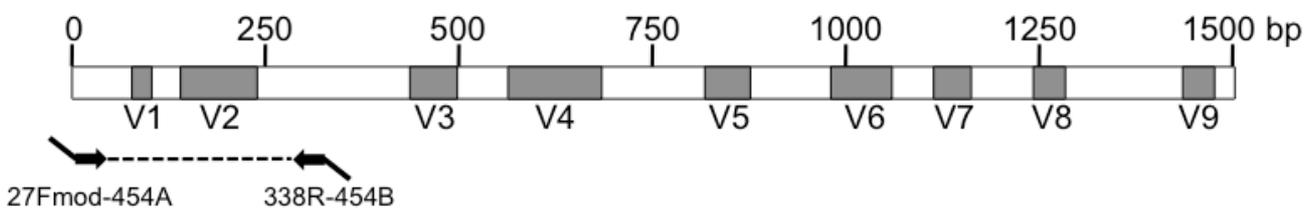
- ・ 上清を試験管 C に移す
- ・ 試験管 A にクロロホルム：メタノール = 2:1 (v/v) 混液 4.5 ml 添加 (抽出 2 回目)
- ・ 同様の手順で分液し、上層を試験管 C に、下層を試験管 B に混合
- ・ 試験管 C を遠心し、下層を試験管 B に混合
- ・ 試験管 B を遠心し、上層を除去
- ・ 遠心エバポレーターにより溶媒を留去
- ・ 抽出物の重量測定、分析

オカラおよび発酵乾燥物の重量から、下記の分析値に基づく水分量、灰分量、総脂質量を引いた値を差分基質（脂質を除く有機物）とした。

$$\text{オカラおよび発酵乾燥物量} = \text{水分量} + \text{灰分量} + \text{差分基質量 (脂質を除く有機物)} + \text{総脂質量}$$

2.2.2 微生物群集解析

微生物群集解析は、東京大学大学院新領域創成科学研究科・服部正平教授および須田互博士に依頼し、次世代シーケンサー（ロシュ 454 GS Junior）を用いた V1-2 領域アンプリコン解析を行った。16S rRNA 遺伝子の V1、V2 領域を含む配列を PCR により増幅して（図 2-3）16S 解析パイプライン解析に用いた。シーケンシングで得られたリードから、F&R プライマー配列を正確に持ち、平均 Quality value が 25 以上のリードをその後の解析に供与した。菌種の多様性の指標になる Operational Taxonomic Unit (OTU) は、上記の Quality check を経たリード（各サンプル 1,300 リード）を用いて、id = 96% でクラスタリングし OTU を作製した。その後、作成された OTU を既知の 16S データベースと照会して、菌種帰属を行い、さらに Phylum、Genus の帰属を行った。



27Fmod-MID-454Seqプライマー

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG MID **agrgtttgatymtgctcag**
アダプター配列 (A) 16Sユニバーサル配列

338R-454Seqプライマー

CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG **tgctgcctcccgtaggagt**
アダプター配列 (B) 16Sユニバーサル配列

図 2-3 16S rRNA 遺伝子の V1-2 領域アンプリコン解析

2.3 好熱性油脂分解菌の探索と性質解明

2.3.1 廃食用油を炭素源とした集積培養からの油脂分解菌の単離

60 ~ 70°C で運転を行っている実証試験機内の発酵オカラを単離源とし、このオカラを、廃食用油を唯一の炭素源とした液体集積培養培地に添加し集積培養を行うことにより、油脂分解菌の獲得を目指した。集積培養培地の組成を表 2-2 に示す。

表 2-2 廃食用油を唯一の炭素源とした液体集積培養培地の組成

培地組成	
廃食用油	2%, NaCl 0.2%, MgSO ₄ ·7H ₂ O 4.0×10 ⁻² %, MgCl ₂ ·6H ₂ O 7.0×10 ⁻² %, CaCl ₂ ·2H ₂ O 5.0×10 ⁻² %, KH ₂ PO ₄ 3.0×10 ⁻² %, K ₂ HPO ₄ 3.0×10 ⁻² %, (NH ₄) ₂ SO ₄ 5.0×10 ⁻² %, FeSO ₄ ·7H ₂ O 1.0×10 ⁻³ %, FeCl ₃ ·6H ₂ O 1.0×10 ⁻³ %, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 2.0×10 ⁻⁴ %, CuSO ₄ ·5H ₂ O 4.0×10 ⁻⁴ %, NaMoO ₄ ·2H ₂ O 5.0×10 ⁻⁵ %, MnCl ₂ ·4H ₂ O 1.0×10 ⁻⁵ %, H ₃ BO ₄ 1.0×10 ⁻⁵ %, Na ₂ SeO ₃ 2.0×10 ⁻⁵ %

培養には振とうにより油と水溶液が混合しやすいように 27 ml 容 L 字試験管を用い、L 字試験管に培地を 5 mL 入れ、培養温度は 40°C または 50°C または 60°C、振とう速度は 200 rpm で培養を行った。液体集積培養での油脂分解菌の増殖の確認方法として、濁度やビクトリアブルーやブロモチモールブルー等の指示薬の添加を検討したが、それらは有用な方法とはいえず、最終的に、L 字試験管をブチルゴム栓で密閉して、気相部に存在する酸素の減少と二酸化炭素の増加をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) により経時変化を測定することで油脂分解菌の存在の有無を確認した。試験管の気相部の酸素がほとんど消費されたことを確認したのち、新しい集積培養培地に培養液の 1% 分 (50 μL) を植菌して次の集積培養を行った。この操作を 5 回繰り返した。5 回目の集積培養時には、コントロールとして、廃食用油を添加していない集積培養培地に 4 回目の集積培養液を植菌して同時に培養を行い、同様に GC-MS で気相部の酸素の減少と二酸化炭素の増加をモニタリングした。

続いて、5 回目の集積培養液を Luria-Bertani (LB) プレート培地と Nutrient broth (NB) プレート培地 (表 2-3) に塗布して 40°C または 50°C または 60°C で培養して油脂分解菌の単離を行った。

表 2-3 油脂分解菌の単離に用いた培地の組成

培地	組成
LB 培地	Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 1%

本文

1/2LB 培地	Tryptone 0.5%, Yeast extract 0.25%, NaCl 0.5%
1/5LB 培地	Tryptone 0.2%, Yeast extract 0.1%, NaCl 0.2%
NB 培地	Peptone 0.5%, Yeast extract 0.3%
1/2NB 培地	Peptone 0.25%, Yeast extract 0.15%
1/5NB 培地	Peptone 0.1%, Yeast extract $6.0 \times 10^{-2}\%$
トリプトソーヤ培地	Peptone 1.5%, Soy peptone 0.5%, NaCl 0.5%
1/5 トリプトソーヤ培地	Peptone 0.3%, Soy peptone 0.1%, NaCl 0.1%
ペプトン培地	Peptone 0.2%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.1%, NaCl 0.25%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $4.0 \times 10^{-2}\%$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $4.0 \times 10^{-2}\%$
トリプトン-イースト培地	Tryptone 0.8%, yeast extract 0.4%, NaCl 0.3%
TBS 培地	Bacto™ Tryptic Soy Broth 3%
1/2TBS 培地	Bacto™ Tryptic Soy Broth 1.5%

40°C に関して LB 培地や NB 培地において多くのコロニーを形成したので、LB 培地・NB 培地各々から 32 個のコロニーを選んだ。単離株計 64 株に関して油脂分解能の有無を確認した。確認方法として、集積培養方法と同じく、廃食用油を唯一の炭素源とした培地を用いた培養を行い、気相部の酸素の減少と二酸化炭素の増加をモニタリングすることと、廃食用油を含んだプレート培地におけるクリアハロー形成、の 2 つを行った。

2.3.2 50°C と 60°C で生育する油脂分解菌の単離

廃食用油を唯一の炭素源とした培地での集積培養で獲得に至らなかった 50°C と 60°C の油脂分解菌に関しては、廃食用油を 2% 添加した LB 培地や NB 培地など 12 種類の培地を用いて集積培養を行った。12 種類の培地の組成は上の表に示した。単離源として、実証試験機内の発酵オカラだけでなく廃白土混合コンポストを用いた。また、廃食用油だけでは単離される分解菌が限られる可能性があるため、廃食用に加え、大豆油またはトリオレインを添加した集積も同様に行った。集積培養方法は上記に記載した方法と概ね同じで、異なる点として、ブチルゴム栓で密閉せずに好気条件で 4~5 日培養を行い、新しい集積培養培地に培養液の 1% 分 (50 μL) または 10% 分 (500 μL) を植菌して次の集積培養を行うという操作を 5 回繰り返した。

本文

この集積培養液を各々の集積培養で用いた培地に 2% トリブチリンを加えたプレート培地に塗布し、50°C または 60°C で 1 日培養し、周囲に透明なクリアハローを形成したコロニーを油脂分解菌として単離した。単離株に関しては再度同じ培地でクリアハロー形成の確認を行った。クリアハローの有無を判別し易くするために、培地作製の際に特開 2006-230303 の方法を参考にした¹⁾。1.5%の寒天の入った培地組成をオートクレーブした後、50 mL のファルコンチューブに培地を 25 mL、トリブチリンを 125 μ L 加え、蓋をしめ、トリブチリンの粒が見えなくなるまで振り、シャーレに注いで固まったものを使用した。トリブチリン含有プレートは均一に白く濁っており、分解微生物の周辺はトリブチリンの分解により透明となるためクリアハロー形成の確認が容易となった。純化した単離株に関しては再度同じ培地でクリアハロー形成の確認を行った。

2.3.3 単離された油脂分解菌の 16S rRNA 遺伝子による系統学的解析

40°C、50°C、60°C でそれぞれ単離した油脂分解菌の菌体から DNA 抽出を行った。抽出した DNA をテンプレートとして、16S rRNA 遺伝子配列を増幅するために 2 つのユニバーサルプライマー (27F-1541R) を用いて以下の温度条件にて PCR を行った。

95°C 2 min

(95°C 40 sec, 52°C 30 sec, 72°C 90 sec) \times 25 cycle

72°C 7 min

PCR 産物を精製し、増幅した 16S rRNA 遺伝子配列を DNA シーケンサーにより決定した。BLAST から得られた近縁種の 16S rDNA 配列とともにアラインメントを行い、近隣結合法を用いて系統樹を作成し、その系統学的位置を調べた。

2.3.4 単離された好熱性油脂分解菌由来のリパーゼの酵素学的性質解析

単離した好熱性油脂分解菌を油無添加の培地で 2 日間培養して、細胞外に分泌されたリパーゼを含む培養液を遠心して上清のみを回収した。その上清を限外ろ過膜 (ミリポア) を用いて濃縮し、それを酵素液としてリパーゼ活性の測定に供した。リパーゼ活性の測定方法は 50 mM Tris-HCl (pH8) を 400 μ L、20 mM pNP-palmitate (C16) を 50 μ L、酵素液を 50 μ L 添加し混合し、反応液とした。反応液を 60°C または様々な温度で反応させた後、10 mM Na₂CO₃ を 125 μ L 添加して反応を止めた。反応後、残存している沈殿物が吸光度測定に影響を及ぼさないように遠心して沈殿物を除いた後に、その上清を吸光度測定に供した。酵素反応によって遊離した pNP (4-nitrophenol) を 410 nm の吸光で検出した。また、SDS-PAGE は 12%アクリルアミドゲルを用いて行った。

2.3.5 油脂分解菌の実証試験機への投入

・好熱性リパーゼ生産菌 *Geobacillus zalihae* NBRC101842^T

近年、パーム油廃液を単離源としてオリーブオイルを唯一の炭素源として 60°C で集積培養したのちに単離された、強い好熱性リパーゼ活性を有すると報告されている *Geobacillus zalihae* NBRC101842^T ²⁾ を、実際に実証試験機へ投入して発酵オカラの油脂分解能の効果を検証した。

培養には表 2-4 で示した培地を用い、試験管 5 mL に *Geobacillus zalihae* NBRC101842^T を植菌し、50°C で 1 日振とう培養を行い、500 mL 容フラスコに入っている新しい培地 200 mL にその量の 1% 分の培養液 (2 mL) を植菌して同じく 50°C で 1 日培養を行った。さらに、5 L 容フラスコを 4 本用いて、培地 10 L に 1% 分の培養液 (100 mL) を植菌し、50°C で 1.5 日培養を行った。培養液を遠心して約 300 mL に濃縮して、実証試験機に投入した。

表 2-4 *Geobacillus zalihae* NBRC101842^T 培養用の培地組成

培地組成
Polypeptone 1.0%, Yeast extract 0.2%, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.1%

・単離された好熱性油脂分解菌 *Bacillus thermoamylovorans* NB501 株

50°C で単離した *Bacillus thermoamylovorans* NB501 株を実証試験機への投入に向けて、生育良好な培地組成の検討および生育至適温度を調べた。培地は表 2 に記載してある 2 種類 (NB 培地と TSB 培地) を用い、培養温度は 40 °C から 60 °C までの条件下で培養した。試験管 5 mL に前培養した培養液を 10% 分 (500 μL) 植菌し、振とう培養を行い、660 nm の吸光度で濁度をモニタリングした。

NB501 株を発酵槽に投入するため大量培養を行った。まず、培地 500 mL にその量の 5% 分の培養液 (25 mL) を植菌して 60°C で 2 日培養を行った。さらに、5 L 容フラスコ 4 本用いて、培地 10 L に 5% 分の培養液 (500 mL) を植菌して、60°C で 2 日培養を行った。その培養液を遠心して約 300 mL に濃縮して、廃食用油添加型好気性発酵システムの実証試験機に投入した。それに加え、培養液量を 2 倍に増やし、菌体回収量を 2 倍に増加させた投入実験も同様に行った。

・好熱性油脂分解微生物群集の構築 (1 回目)

本文

2種類の培地（NBとTSB）および2種類の微生物源（発酵オカラと廃白土混合コンポスト）を用い、2%の大豆油を添加し、実証試験機内と同じ温度である60°Cで培養し、油分解微生物群集の構築を試みた。油分解微生物群集が構築されている指標として、一般的に油脂分解能の指標として用いられる方法であるクリアハロー形成を用いた。クリアハローを形成する微生物とクリアハローを形成しない微生物が共存する油脂分解微生物群集の構築を試みた。また、集積過程でどのような微生物群集が構築されているのかを調べるために次世代シーケンサーを用いて群集構造解析を行った。

集積した油脂分解微生物群集を実証試験機に投入するため大量培養を行った。まず、培地800 mL（200 mL×4）にその量の10%分の培養液（20 mL×4）を植菌して60°Cで3日培養を行った。さらに、5 L容フラスコ4本用いて、培地8 L（2 L×4）に10%分の培養液800 mL（200 mL×4）を植菌して、60°Cで3日培養を行った。その培養液を遠心して約300 mLに濃縮して、廃食用油添加型好気性発酵システムの実証試験機に投入した。

・好熱性油脂分解微生物群集の構築（2回目）

6種類の培地（TSB, 1/2TSB, NB, 1/2NB, LB, 1/2LB）にリン酸バッファー（ KH_2PO_4 , 0.3 g/L; K_2HPO_4 , 1 g/L）を添加した集積培地を用いて、廃白土混合コンポストを微生物源として用い、2%の大豆油を添加して、油分解微生物群集の構築を試みた。集積を構築する際に、上記のクリアハローの形成の有無とリパーゼ活性が高いことを指標とした。その微生物群集を発酵槽に投入するため大量培養を行った。その培養液を遠心して培養液を約300 mLに濃縮して、廃食用油添加型好気性発酵システムの実証試験機に投入した。また、集積過程における微生物の群集構造の変遷を調べるために次世代シーケンサーを用いて群集構造解析を行った。

2.4 脂質の分析手法の開発

2.4.1 HPLCによる分析法の開発

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いたアシルグリセロール類および脂肪酸の分析については、株式会社資生堂フロンティアサイエンス事業部 LC アプリケーションセンターに予備的な検討を依頼した。標準試料として、トリオレイン標準品（食品分析用、和光純薬工業）、オレイン酸（生化学用、和光純薬工業）、1-Oleoyl-*rac*-glycerol（Sigma-Aldrich）を用い、表2-5に示す条件を基本として検討が行われた。

表 2-5 HPLC を用いた検討における基本的な条件

カラム	: CAPCELL PAK C18 UG120 S3 (2.0 mm×150 mm)
流速	: 200 μ l/min
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C
試料注入量	: 5 μ l

2.4.2 TLC による分析法の開発

2.4.2a TLC によるアシルグリセロール類および脂肪酸の分離分析条件の確立

薄層クロマトグラフィー (TLC) による分離分析条件の検討には、TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA) および HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA) を用い、オーブンにて 110 $^{\circ}$ C で 60 min 加熱し活性化した後、デシケーター内で冷却、保存したものを使用した。展開溶媒には、ヘキサン、ジイソプロピルエーテル、酢酸を、脂質の希釈にはクロロホルム：メタノール=2：1 (v/v) 溶液を用いた。脂質の標準試料として、ジアシルグリセロール油 (花王)、大豆油 (和光一級、和光純薬工業)、モノオレイン (東京化成工業) を用いた。また、千葉県豆腐商工組合において油揚げの製造により排出された廃大豆油を試料として用いた。

展開槽内に深さがおよそ 1 cm になるように展開溶媒を入れ、厚手のろ紙を展開溶媒に浸るように内壁に貼り付け、蓋をして 1 hr 静置することにより展開槽内に溶媒蒸気を充満、安定化させた。そこに、試料を着点した TLC プレートを手静かに入れ、蓋をして 7.5 cm 展開後に取り出し、ドラフト内で風乾した。

脂質スポットの検出にはリンモリブデン酸法を用いた。12 モリブド(VI)りん酸 n 水和物 10 g を 200 ml のエタノールに溶かし、過塩素酸 (60%) を 2 ml 加え、リンモリブデン試薬を調製した。この試薬溶液に展開後の TLC を浸した後、余分な試薬溶液を除去し、オーブンを 110 $^{\circ}$ C で 8 min 加熱しスポットを発色させた。

なお、特に記載のない試薬は全て、和光純薬工業製の試薬特級グレードを用いた。

2.4.2b 油脂資化菌による廃食用油の分解評価への応用

純水および培養前の Luria-Bertani (LB) 培地 (Difco LB Broth, Miller, Becton, Dickinson and Company) を用いて、脂質抽出の検討を行った。総脂質の抽出には Bligh-Dyer 法をベースとし、有機溶媒の使用量を減らすために改変を加えた方法を用いた。総脂質の抽出法を以下に記す。

- ① 溶液 1 容に対しメタノール 0.8 容を添加
- ② ボルテックス 1 min
- ③ クロロホルム 2 容添加
- ④ 同様の手順で下層を分取 (二回目抽出)
- ⑤ 各抽出液を 2,000 x g、10 min 遠心
- ⑥ 上層を除去

本文

- | | |
|------------------|-------------------|
| ④ボルテックス 1 min | ⑪遠心エバポレーターにて溶媒を留去 |
| ⑤室温で 10 min 静置 | ⑫減圧下で一晩静置 |
| ⑥下層を分取（一回目抽出） | ⑬抽出物の重量測定 |
| ⑦残液にクロロホルム 2 容添加 | （溶媒：試薬特級、和光純薬工業） |

純水および LB 培地 5 ml をコントロールとし、それぞれに廃食用油 100 mg を添加した溶液を調製した。各溶液から総脂質を抽出し、添加した廃食用油の重量と、二回の抽出により得られた抽出物重量の和から、回収率を算出した。また、抽出物を TLC により脂質を分析した。

次に、リパーゼを用いて大豆油を加水分解し、総脂質を抽出した後、TLC による分析を行った。Lipase, from *Candida rugosa* (Sigma-Aldrich) を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 40 °C) 緩衝溶液に溶解し、0.5、0.05、0.005 mg/ml リパーゼ溶液を調製した。50 mM Tris-HCl 緩衝溶液と各リパーゼ溶液 2 ml に大豆油（和光一級、和光純薬工業）40 mg を添加し、40 °C で 1 hr インキュベートした後、総脂質を抽出し、回収率を算出した。また、抽出物を TLC により分析し、大豆油の加水分解が評価可能であることを確認した。

続いて、TLC による脂質分析を用いた、油脂資化菌による廃食用油の分解評価への応用を試みた。培養温度 40 °C の条件下で廃食用油を唯一の炭素源として集積培養後に単離された株の中から、*Cronobacter* 属に属しクリアハローが観察された NB18 株と LB1 株、*Acinetobacter* 属に属する LB2、LB17 株を検討に用いた。1/5 LB 培地 5 ml に廃食用油 100 mg を添加した培養液を調製し、何も植菌しないネガティブコントロールと、上記菌株を植菌したものを 40 °C で培養し、その培養液から総脂質の抽出を行い、回収率を算出した。また、抽出物を TLC により分析し、廃食用油が分解されていることを確認した。

2.4.3 GC による分析法の開発

ガスクロマトグラフィー (GC) を用いたアシルグリセロール類および脂肪酸の分析については、東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科海洋科学系食品生産科学部門准教授の後藤直宏博士に協力を依頼し、共同研究の形で脂質分析法の開発を行った。

廃食用油含有オカラ好気発酵物からの脂質の抽出は以下の手順に従った。オカラ発酵物 0.5 g をガラス製遠沈管に入れ、クロロホルム：メタノール=2：1 (v/v) 溶液 3 ml を添加し、ボルテックス後 1,400 x g で 5 min 遠心分離した。液相をナス型フラスコに回収した後、残渣に再度クロロホルム：メタノール=2：1 (v/v) 溶液 3 ml を添加し、同様の手順により液相を回収した。ナス型フラスコに回収した脂質抽出液をエバポレーターにかけ溶媒を留去し脂質抽出物とした。続いて、脂質抽出物のトリメチルシリル化を以下のように行った。脂質抽出物 10 から 20 mg をバイアル瓶に入れ、Tri-Sil TP 溶液（和光純薬工業）を 1 ml 加え攪拌後、60 から 70 °C で湯せんした。加温後 15 sec ボルテックスし、ヘキサン：水=1：1 (v/v) を加え、再び 15 sec ボルテックスし、静置後に上層を分取してトリメチルシリル化脂質抽出物溶液とした。

本文

続いて、アシルグリセロール類および脂肪酸の GC 分析に使用するキャピラリーカラムの検討と、昇温条件などの分析条件の検討を行った。

なお、有機溶媒は全て、国産化学製の特級グレードを用いた。

3. 結果と考察

3.1 実証試験機を用いたシステム開発

3.1.1 試験に用いたオカラの性状

オカラは工場で排出されたものを取出し、その日のうちに用いた。性状を表3-1に示す。含水率は25年11月までは85%前後で推移したがそれ以後は80%程度であった。

表3-1 オカラの性状

		24年				25年							
		7/30	8/9	11/12	12/13	1/24	3/11	4/5	5/21	7/2	7/16	7/23	7/30
含水率	%	85.7	85.6	84.0	85.2	85.3	83.0	82.0	81.4	83.6	85.9	85.0	83.9
粗灰分(DSあたり)	%	3.7	3.6	3.4	3.5	3.4	3.7	3.4	3.4	3.8	3.8	3.8	3.7
粗脂肪(DSあたり)	%	14.9	14.7	16.1	19.1	17.7	18.3	18.1	17.7	14.1	14.8	13.3	17.0

		25年							26年	平均
		8/6	11/5	11/19	11/26	12/3	12/10	12/17	3/4	
含水率	%	85.2	84.6	77.8	79.4	78.8	78.3	79.3	80.7	84.2
粗灰分(DSあたり)	%	3.9	3.4	3.1	3.1	3.0	3.0	3.3	3.6	3.6
粗脂肪(DSあたり)	%	16.8	16.7	13.8	13.6	15.4	12.9	12.2	13.2	16.3

3.1.2 試験の内容と工程

試験の内容と工程を表3-2に示す。

表3-2 試験の内容と工程

項目	平成24年度	平成25年										平成26年		
		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	
試験項目	予備試験	菌添加効果確認試験					連続安定運転期間(3ヶ月間)					家庭系廃食用油試験		
温度	40~70℃	70℃試験					60℃試験							
pH	6~7.5	pH 中性域制御					弱アルカリ域 pH							
添加菌種	市販牛・馬糞堆肥 市販牛ふん発酵堆肥 市販高温菌 廃白土混合コンポスト G. zalihae	Geobacillus zalihae					NB 501 株					廃白土混合コンポスト 油脂分解微生物群集		
廃食用油添加率	3~7.5%	5%	3%	5%			5%	0%		5%				

本文

運転条件の概要

24年度は安定した運転条件の確立を行い、さらに、予備実験として各種の菌を添加してそれらの効果を調べた。

25年度は本試験として、NB501株、廃白土混合コンポスト、また60℃で集積培養した好熱性油脂分解微生物群集の添加試験を行った。

9月中頃まではアンモニアの抑制のためpHが7.5を超えるような場合はクエン酸を適宜添加して中性域に制御して試験した。しかし油脂分解活性が高い菌は弱アルカリ域が適性であることから脱臭装置を新たに設置し、それ以降はpHを制御せずに弱アルカリ域での運転とした。

9月中頃から12月後半まで連続安定運転期間として安定した運転が継続できることの確認を行った。

試験内容

4月から5月にかけて70℃での運転試験を行った。以後は60℃での運転を継続した。

25年6月～26年2月の期間には、以下のとおり、添加試験を行った。

- ・6月11日～6月25日（2週間）：コントロール条件（菌を添加しない条件）
- ・6月25日～7月16日（3週間）：NB501株添加1回目（40g）
- ・7月23日～8月13日（3週間）：NB501株添加2回目（100g）
- ・11月5日～11月12日（1週間）：コントロール週（廃白土コンポスト添加前週）
- ・11月12日～12月10日（4週間）：廃白土コンポスト添加
- ・12月10日～12月24日（2週間）：好熱性油脂分解微生物群集添加1回目（4.7g）
- ・2月4日～2月18日（2週間）：好熱性油脂分解微生物群集添加2回目（10g:未分析）

なお、25年3月末（70℃運転前）に *Geobacillus zalihae* の添加試験を行ったが、良好な結果は得られなかった。

26年3月には、家庭から排出された廃食用油を用いた試験を行った。

3.1.3 70℃での試験

高温発酵では排気の温度・絶対湿度が高く、したがってエンタルピーも高いが、それ以上に排気量が少なくて済むため排気が持ち出す熱量（排気損失）は中温発酵より少ない。図3-1、表3-3に排気温度が中温発酵領域である40℃の排出熱量を1.0としたときの各温度での排気損失を示す。

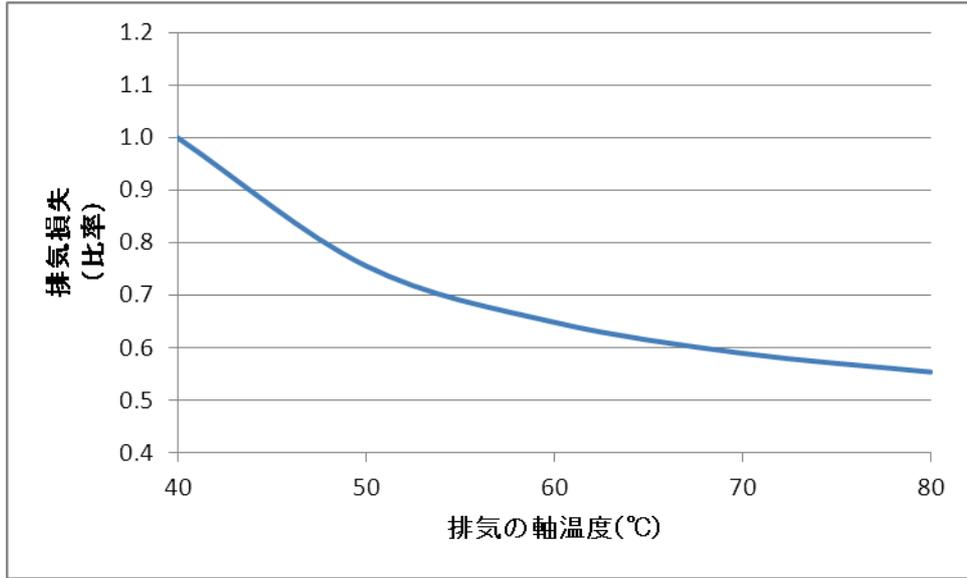


図 3-1 単位水分量を排気が持ち出す際の熱量 (排気の損失)

単位水分を持ち出すのに必要な排気量 (kgDA/kg 水) = $1 \div (\chi_{\text{排気}} - \chi_{\text{給気}})$
 (kg/kgDA)
 排気のエンタルピー (kJ/kgDA) = $4.186 \times \{0.240t + (597.3 + 0.441t) \chi\}$
 排気の損失 (kJ/kg 水) = 排気量 (kgDA/kg 水) × 排気のエンタルピー (kJ/kgDA)
 t : 乾球温度 (°C) χ : 絶対湿度 (kg/kgDA)

表 3-3 温度と単位水分を持出すのに必要な熱量 (排気損失)、排気量、エンタルピー

排気の温度	°C	40	50	60	70	80
排気損失	—	1.00	0.76	0.65	0.59	0.55
排気損失	kJ/kg水	5,198	3,931	3,374	3,068	2,883
排気量	kgDA/kg水	31.7	14.4	7.4	3.9	1.9
排気のエンタルピー	kJ/kgDA	164	273	457	796	1,524

従って微生物活性が高く保てるのであれば高温の方が効率が良いことから、70°Cでの試験を行った (図 3-2)。

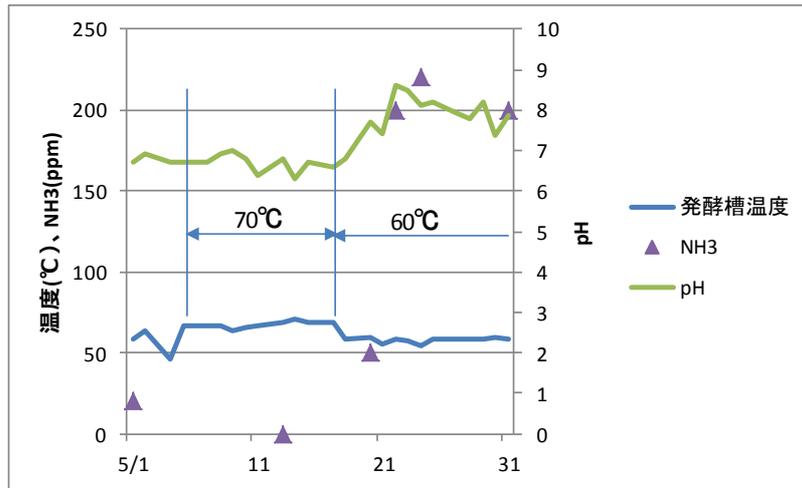


図 3-2 70°Cでの pH 推移とアンモニア生成濃度

70°C試験では pH が 7 を下回り弱酸性域に留まった。アンモニアもほとんど生成せず、微生物活性は低い状態で推移した。その後に行った 60°C試験では pH は 8 前後の弱アルカリ性になり、アンモニアも高い濃度で生成した。さらに、NB501 株由来細胞外リパーゼ活性の至適温度は 60°Cであることも判明した（図 3-3：詳しくは次節参照）。以上の結果をまとめたのが表 3-4 である。したがって、以後の試験は 60°Cで行った。

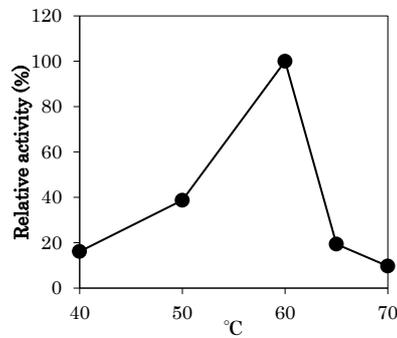


図 3-3 NB501 株由来細胞外リパーゼ活性の至適温度

表 3-4 温度による熱効率と微生物活性

	50°C	60°C	70°C
熱効率	低い	→	高い
微生物活性※	低い	最適	低い

※NB501株

3.1.4 廃白土混合コンポスト添加での試験結果

他の試験と比べて、もっとも高い油脂分解効果が得られた（詳細は次節を参照のこと）、廃白土混合コンポスト添加の結果を示す。廃白土混合コンポストとは、油脂の脱色、精製に使用した活性白土（油脂を多く含む）を副資材として作成されたコンポストである。この前々週は油を添加しない週であり、添加前週（コントロール週）から第4週までの結果を一連の添加実験とみなすことができる。

表3-5に分解量と分解率（粗分析値による概算）の推移を示す。添加週は分析値に異常があったので示していない。表3-6に平均発酵日数を5日間として1日当たりの分解率を示す。無添加週の油分分解率が高い値を示しているのは、廃食用油を添加していないので見かけ上高いが、分解量では多くない。

表3-5 廃白土混合コンポスト添加試験の分解量と分解率

		油無添加週	コントロール週	廃白土混合コンポスト添加第1週	〃第2週	〃第3週	〃第4週	
分解量	乾物分解量	kg/週	14	14	-	28	24	29
	油分分解量	kg/週	3.3	3.6	-	6.6	5.7	8.8
分解率	乾物分解率	%/週	19	13	-	21	19	22
	油分分解率	%/週	26	10	-	16	15	21

表3-6 一日あたり乾物と油分の分解率

		油無添加週	コントロール週	廃白土混合コンポスト添加第1週	〃第2週	〃第3週	〃第4週	
分解率	乾物分解率	%/日	3.8	2.6	-	4.2	3.8	4.4
	油分分解率	%/日	5.2	2	-	3.2	3.0	4.2

したがって、1日当たりの分解率は乾物、油分ともに4%程度であり、既報告事例と比べても乾物では同等か高い結果が、また油分では以下に示すように畜ふん+生ごみでの事例と比し大幅に高い結果が得られた。

この期間の試験結果の詳細を表3-7に示す。

本文

表3-7 廃白土混合コンポスト添加試験結果

25年11月～12月		油無添加										コントロール週										廃白土混合コンポスト投入									
		10/29	30	31	11/1	2	3	4	週計	5	6	7	8	9	10	11	週計	12	13	14	15	16	17	18	週計						
		火	水	木	金	土	日	月	kg	火	水	木	金	土	日	月	kg	火	水	木	金	土	日	月	kg						
おから投入量	kg	100	100	100	100	100	0	0	500	100	100	100	100	100	0	0	500	100	100	100	100	100	0	0	500						
廃食用油投入量	kg	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	0	0	25.0	5	5	5	5	5	0	0	25.0						
おから含水率	%	84.6	84.6	84.6	84.6	84.6				84.6	84.6	84.6	84.6	84.6			85.8	77.8	77.8	77.8	77.8										
おから	おから乾物量	kg	15.4	15.4	15.4	15.4			77	15.4	15.4	15.4	15.4	15.4			77	14.2	22.2	22.2	22.2	22.2			103						
	#粗灰分(湿物あたり)	%	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52			0.52	0.52	0.52	0.52	0.52			0.52	0.69	0.69	0.69	0.69										
	#粗脂肪(#)	%	2.58	2.58	2.58	2.58	2.58			2.58	2.58	2.58	2.58	2.58			2.58	3.07	3.07	3.07	3.07										
	#粗灰分(DSあたり)	%	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4			3.4	3.4	3.4	3.4	3.4			3.7	3.1	3.1	3.1	3.1										
	#粗脂肪(#)	%	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7			16.7	16.7	16.7	16.7	16.7			18.2	13.8	13.8	13.8	13.8										
廃(おから+食用油)投入原料	全乾物量	kg	15.4	15.4	15.4	15.4			77	20.4	20.4	20.4	20.4	20.4			102	19.2	27.2	27.2	27.2	27.2			128						
	全油分量	kg	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6		12.9	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6			37.9	7.6	8.1	8.1	8.1	8.1			39.9						
	投入原料灰分(DSあたり)	%	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4			2.5	2.5	2.5	2.5	2.5				2.7	2.5	2.5	2.5	2.5									
	投入原料粗脂肪(DSあたり)	%	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7			37.1	37.1	37.1	37.1	37.1				39.5	29.7	29.7	29.7	29.7									
	#含水率	%	13.1							32.6	39.0	39.5	43.6	44.0				20.2													
発酵後	#粗灰分(湿物あたり)	%	3.6						2.8	2.3	2.3	2.0	2.0				2.8														
	#粗脂肪(#)	%	29.5						17.7	17.4	17.7	17.3	17.5				26.0														
	#粗灰分(DSあたり)	%	4.1						4.1	3.8	3.7	3.6	3.6				3.5														
	#粗脂肪(#)	%	33.9						26.3	28.5	29.3	30.6	31.2				32.6														
	取出し量	kg	80						92								86														
	#乾物量	kg	70						62								68														
	#油分量	kg	24						16								22														
	残存量	kg	105						126								97														
	#乾物量	kg	91						85								77														
	#灰分量	kg	3.7						3.5								2.7														
#油分量	kg	30.8						22.3								25.1															
発酵槽内累積灰分量	kg	3.7	4.2	4.8	5.3	5.8	6.3	6.3	6.3	6.3	3.5	4.0	4.5	5.1	5.6	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	2.7	3.2	3.9	4.6	5.3	6.0	6.0	6.0	6.0		
発酵槽内乾物量計算値	kg	91							154	85						174	77											138			
#油分量	kg	31							40	22						57	25											44			
分解量	乾物分解量	kg							14							14															
	油分解量	kg							3.3							3.6															
分解率	乾物分解率	%							19							13															
	油分解率	%							26							10															
水分蒸発量	kg								363							420															
ヒーター電力量	KWh		52	47	52	64	76	61	59	411						415												352			
ヒーター電力量/蒸発量	KWh/kg								1.13							0.99															

25年11月～12月		廃白土混合コンポスト第2週										#第3週										#第4週									
		19	20	21	22	23	24	25	週計	26	27	28	29	30	12/1	2	週計	3	4	5	6	7	8	9	週計	10					
		火	水	木	金	土	日	月	kg	火	水	木	金	土	日	月	kg	火	水	木	金	土	日	月	kg	火					
おから投入量	kg	100	100	100	100	100	0	0	500	100	100	100	100	100	0	0	500	100	100	100	100	100	0	0	500						
廃食用油投入量	kg	5	5	5	5	5	0	0	25.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	0	0	25	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	0	0	25						
おから含水率	%	77.8	77.8	77.7	77.7	77.6				79.4	79.4	79.4	79.4	79.4				78.8	78.8	78.8	78.8	78.8									
おから	おから乾物量	kg	22.2	22.2	22.3	22.3	22.4		111	20.6	20.6	20.6	20.6	20.6			103	21.2	21.2	21.2	21.2	21.2				106					
	#粗灰分(湿物あたり)	%	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69			0.64	0.64	0.64	0.64	0.64				0.63	0.63	0.63	0.63	0.63									
	#粗脂肪(#)	%	3.07	3.07	3.07	3.07	3.07			2.8	2.8	2.8	2.8	2.8				3.25	3.25	3.25	3.25	3.25									
	#粗灰分(DSあたり)	%	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1			3.1	3.1	3.1	3.1	3.1				3.0	3.0	3.0	3.0	3.0									
	#粗脂肪(#)	%	13.8	13.8	13.8	13.8	13.7			13.6	13.6	13.6	13.6	13.6				15.4	15.4	15.4	15.4	15.4									
廃(おから+食用油)投入原料	全乾物量	kg	27.2	27.2	27.3	27.3	27.4		136	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6			128	26.2	26.2	26.2	26.2	26.2				131					
	全油分量	kg	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1		40.4	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8			39	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3				41					
	投入原料灰分(DSあたり)	%	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5			2.5	2.5	2.5	2.5	2.5				2.4	2.4	2.4	2.4	2.4									
	投入原料粗脂肪(DSあたり)	%	29.7	29.6	29.6	29.5	29.5			30.5	30.5	30.5	30.5	30.5				31.5	31.5	31.5	31.5	31.5									
	#含水率	%	16.7							14.1								21.9									15.3				
発酵後	#粗灰分(湿物あたり)	%	3.6						3.2								2.6									2.7					
	#粗脂肪(#)	%	26.8						27.2								24.9									27.1					
	#粗灰分(DSあたり)	%	4.3						3.7								3.4									3.2					
	#粗脂肪(#)	%	32.2						31.6								31.9									31.9					
	取出し量	kg	112						98								118									113					
	#乾物量	kg	93						84								92									96					
	#油分量	kg	30						27								29									31					
	残存量	kg	96						102								117									94					
	#乾物量	kg	80						88								91									80					
	#灰分量	kg	3.5						3.2								3.1									2.6					
#油分量	kg	25.8						27.8								29.0										25.6					
発酵槽内累積灰分量	kg	3.5	4.2	4.8	5.5	6.2	6.9	6.9	6.9	3.2	3.9	4.5	5.2	5.8	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	3.1	3.7	4.3	4.9	5.6	6.2	6.2	6.2			
発酵槽内乾物量計算値	kg	80							188	88						192	91										193				
#油分量	kg	26							59	28						61	29										61				
分解量	乾物分解量	kg							28							24											29				
	油分解量	kg							6.6							5.7											8.8				
分解率	乾物分解率	%							21							19											22				
	油分解率	%							16							15											21				
水分蒸発量	kg								374							358										385					
ヒーター電力量	KWh		49	49	49	53	54	50	47	350						351											304				
ヒーター電力量/蒸発量	KWh/kg								0.94							0.98											0.79				

注：分解率は投入原料に対する分解量の比として算出している。

オカラを用いた乾物分解率の既報告事例では神奈川県農政部が密閉型発酵槽を用いて温度70℃程度、10日間で50%であったとしている³⁾。(日当たりに換算すれば5%/日)。

生ごみ(食堂残飯)を用いたコンポスト化試験で野呂瀬らは温度60~70℃、pHを7.5~8程度の条件で10日間で乾物分解率が35%、pHが5~6では同5%と報告している⁴⁾。(日当たりに換算すればpH7.5~8の時3.5%/日、pH5~6の時0.5%/日となる)

オカラを用いた粗脂肪分解の既報告事例は見当たらないが、畜ふん+生ごみでの事例を図3-4に示す⁵⁾。本事例では6週目で60~80%の減少を示している(日当たりに換算すれば1.4~1.9%程度)。

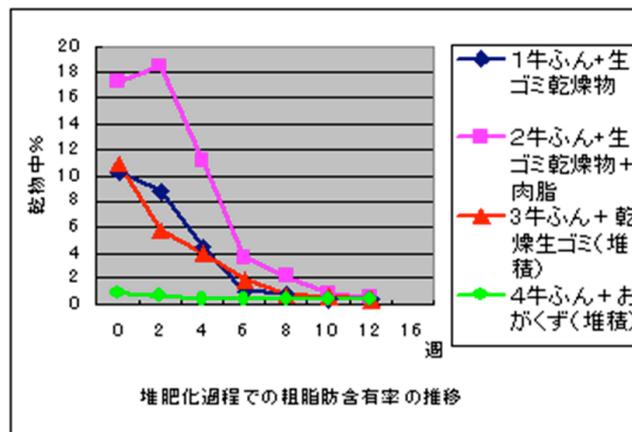


図3-4 畜ふんに生ごみを混合した堆肥化試験での粗脂肪分の変化⁵⁾

松田らは廃食用油を添加した高温好気法による実験で60℃の高温域では40℃に比べて著しく油分分解率が低下すると報告している(図3-5)⁶⁾。40℃では日当たり4%程度が得られたが、60℃では同2%程度であった。リパーゼなどの油脂分解酵素の生産能が高い菌は中温菌が多いためとされているが、本試験では60℃で高い油脂分解酵素生産能を持つ菌の添加効果により60℃において日当たり4.2%の分解率が得られている。

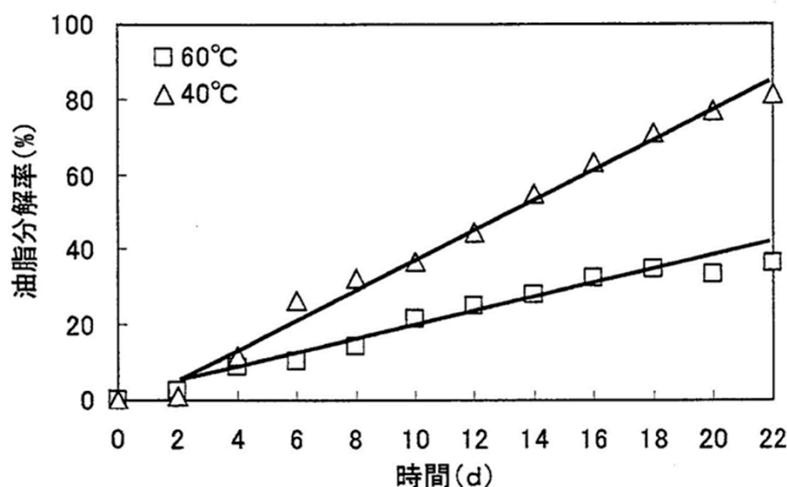


図3-5 40℃と60℃における油脂分解率⁶⁾

本文

また松田らは廃食用油の分解が遅いため蓄積し、粘性を増加させて通気不良になり発酵が停止することを報告している。本試験では全期間を通じてそのようなことは見られなかった。

分解量と水蒸発量当たりヒーター電力量の推移を表3-8、図3-6に示す。乾物分解量、油分分解量とも第3週を除いて週ごとに増加した。水蒸発量当たりヒーター電力量も分解量と一致して増減している。第3週に一時分解量が下がったのは、排気弁を絞って排気量を少なくしたためで異常に気づき排気弁開度を元に戻したところ第4週は回復した。この事例では高温発酵菌は一時的に活性が低下しても条件が良ければ回復が速いことを示唆している。

表3-8 廃白土混合コンポスト試験中の分解量と水蒸発量当たりヒーター電力

	油無添加週	コントロール週	廃白土混合コンポスト投入週	〃第2週	〃第3週	〃第4週	
乾物分解量	kg/週	14	14	-	28	24	29
油分分解量	kg/週	3.3	3.6	-	6.6	5.7	8.8
ヒーター電力/蒸発量	kWh/kg	1.13	0.99	-	0.94	0.98	0.79

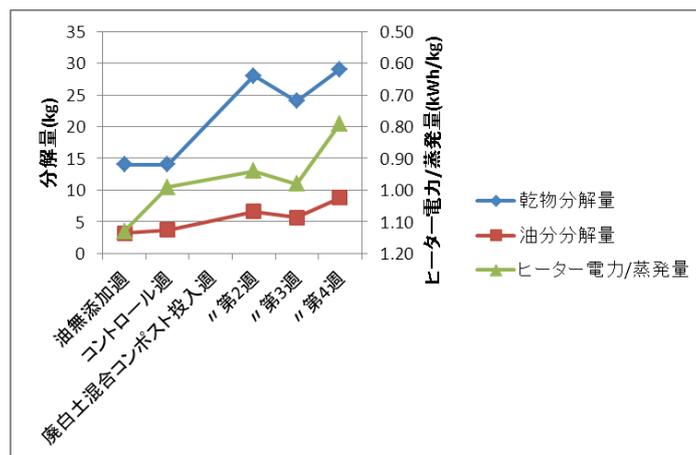


図3-6 廃白土混合コンポスト試験中の分解量とヒーター電力/蒸発量

本文

図3-7に pH、アンモニアの推移を示す。pHは第3週を除き8前後で推移した。アンモニアも高い濃度で生成した。油脂分解効果が高い高温菌は pH に大きく活性が影響され、活性が高い pH 域は8前後で、それより下の中性域、酸性域では急速に活性が低下することが明らかになった。

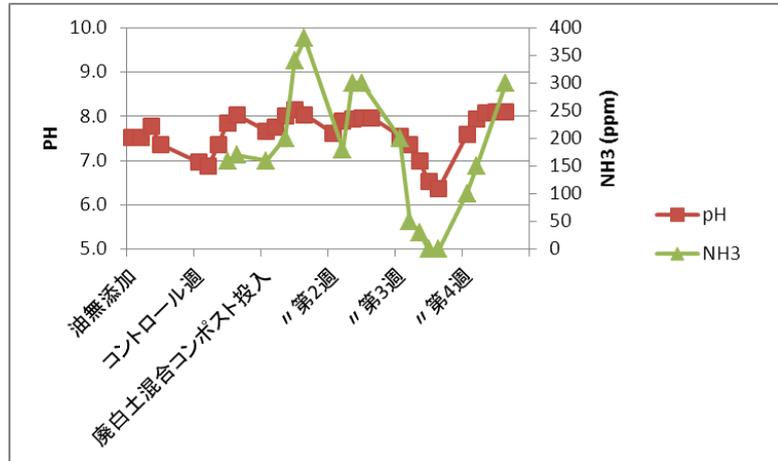


図3-7 廃白土混合コンポスト試験中の pH、NH₃ の推移

図3-8に廃白土混合コンポスト第4週の物質収支を示す。(発酵乾燥物の取出し量は一定でないため投入物と取出し物の収支は厳密には一致していない)

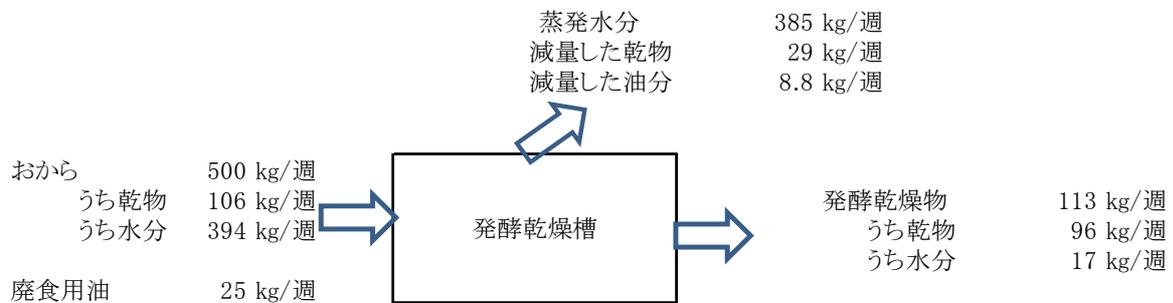


図3-8 廃白土混合コンポスト添加第4週の物質収支図

本文

3.1.5 油無添加週と比較した廃白土混合コンポストの効果

原料が持ち込む熱量と取出し物が持ち去る熱量は小さく無視できるので入熱と出熱は以下により示される。

入熱：乾物分解熱＋粗脂肪分解熱＋ヒーター電力

出熱：排気が持ち去る熱量＋放熱損失

期間中の出熱を一定とみなせばヒーター電力の減少は分解熱の増加に等しい。

表 3-9 オカラ乾物と粗脂肪分の発熱量

	粗タンパク質	粗脂肪	NFE	粗繊維	粗灰分	合計
おからの成分割合 %	26	11	43	16	4	100
成分ごと発熱量 kJ/kg	23,500	40,400	18,300	21,200	0	
おから発熱量 kJ/kg	6,100	4,500	7,800	3,400	0	21,800
〃(粗脂肪分を除く) kJ/kg	6,100	0	7,800	3,400	0	17,300

※日本標準飼料成分表(2001年)より作成

表 3-10 油無添加週と第4週における分解量とヒーター電力の差

	油無添加週	〃第4週	差
乾物分解量 kg/週	14	29	
うち油分を除く乾物分解量 kg/週	10.7	20.2	9.5
油分分解量 kg/週	3.3	8.8	5.5
ヒーター電力量 kWh/週	411	304	-108

分解量から算出した油無添加週と第4週の発熱量の差

$$9.5\text{kg/週} \times 17,300 \text{ kJ/kg} + 5.5\text{kg/週} \times 40,400 \text{ kJ/kg} = 386,550 \text{ kJ/週}$$

$$= 107 \text{ kWh/週}$$

ヒーター電力量の差 108 kWh/週とほぼ合致する。

廃食用油の投入と廃白土混合コンポストの添加によりヒーター電力を油無添加週と比較して26%低減できた。

$$108 \text{ kWh/週} \div 411 \text{ kWh/週} \times 100 = 26\%$$

本文

3.1.6 本システムでの有機物分解による発酵熱の寄与

廃白土混合コンポスト添加第4週における入出熱内訳を表3-11、図3-9に示す。入熱は乾物分解熱+粗脂肪分解熱+ヒーター電力とし分析値および測定値から求めた。出熱は排気が持ち去る熱量+放熱損失とし、排気が持ち去る熱量を排気ガス量、温度、湿度からエンタルピーを算出して求めた。放熱損失は入熱と出熱を等しいとして入熱合計値から排気が持ち去る熱量を差し引いて求めた。

発酵による発熱量は全体の39%であり5日間の発酵時間でのシステムとしては大きい値といえる。物理的な乾燥方式では発酵熱の寄与が全くないのでこの分外部熱源を多く必要とすることになる。

出熱項目のうち放熱量に関し、用いた実証試験機は断熱材の劣化やはく離がみられ断熱性が十分ではなく放熱損失が大きい。断熱を良くすれば放熱量が低減しヒーター電力がさらに小さくて済む可能性が大きい。

表3-11 廃白土混合コンポスト投入第4週の入出熱内訳

	分解量 kg/週	分解量 kg/日	単位発熱量 MJ/Kg	発生熱量 MJ/日	比率 %
油分	8.8	1.3	40.4	51	20
乾物	20.2	2.9	17.3	50	19
ヒーター	使用電力量 kWh/週	使用電力量 kWh/日	単位発熱量 MJ/kWh	発生熱量 MJ/日	
	304	43.4	3.6	156	61
合計				257	100

	排出熱量 MJ/日	比率 %
排気が持ち去る熱量	219	85
放熱量	38	15
合計	257	100

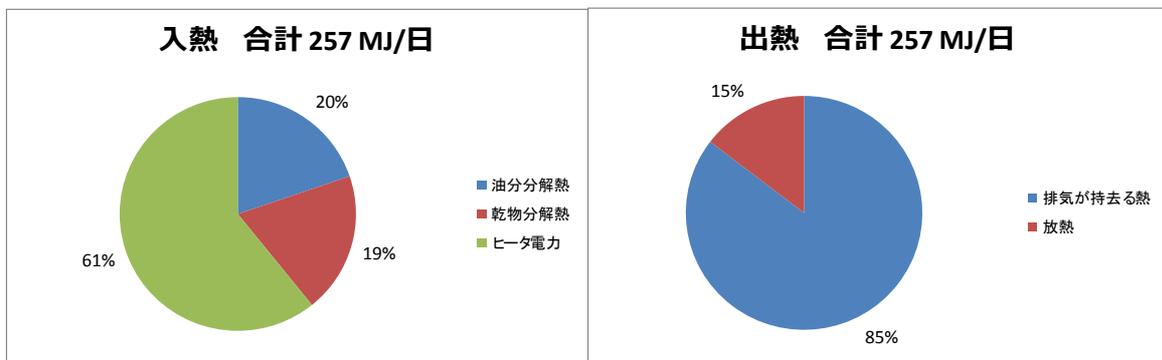


図3-9 廃白土混合コンポスト投入第4週の入出熱内訳比率

本文

3.1.7 発酵日数 10 日としたときの予想熱収支

分解率は発酵日数に大きく影響されることと、5 日間の発酵日数では添加した油の一部しか利用していないことから、倍の 10 日間とすることで必要熱量のうち 70% 近くを発酵熱で賄うことができる可能性がある (図 3-10)。物理的な乾燥方式では発酵熱の寄与は 0 であるため、発酵乾燥方式における光熱費の低減効果は大きい。

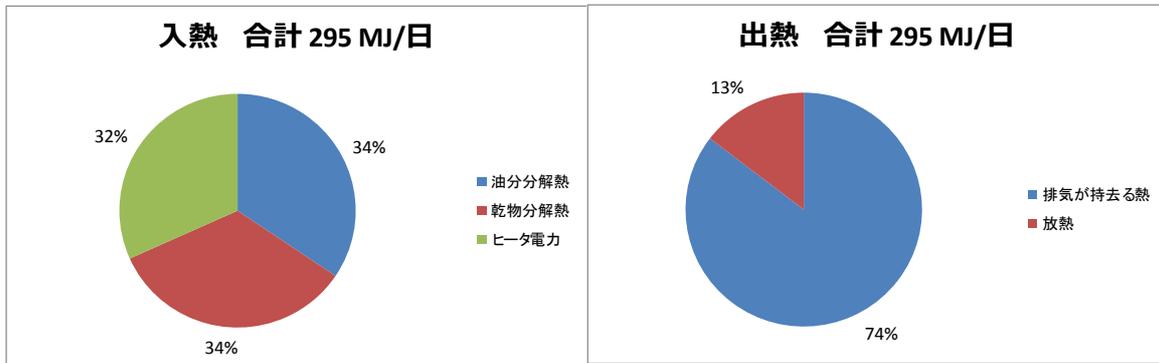


図 3-10 発酵日数を 10 日間としたときの予想熱収支

3.1.8 家庭系廃食用油の添加試験

家庭から排出される廃食用油を用いた試験を行った。廃食用油は千葉県柏市の NPO 法人が主に家庭から収集したものをそのまま用いた。油揚げ製造廃食用油は使用終了時点からかなり日数が経ており色相は黒褐色であった。家庭系はそれよりやや薄く、劣化の程度はより少ないとみられた。微小粒子状の混入物が見られた。添加試験ではそのまま用いたが、性状分析に際しては 45 μ m のメッシュを通したものをを用いた。廃食用油の性状として劣化の一指標であるカルボニル価を測定した。表 3-12 に示す。

表 3-12 廃食用油の性状

	カルボニル価※	水分
	-	%
油揚げ廃食用油	20	< 0.1
家庭系廃食用油	18	< 0.1

※基準油脂分析試験法

参 1.29-2013 (日本油化学会編)



図 3-11 左 油揚げ製造廃食用油
右 家庭系廃食用油

本文

表3-13に試験結果の詳細を示す。比較のため油揚げ製造時の廃食用油を用いた集積培養菌添加試験での結果と合わせて示す。表3-14にまとめたように同等の結果が得られた。

工場などの業務用廃食用油の他に家庭から排出される廃食用油でも同等の効果が得られることが確認できた。不純物の混入が少ない廃食用油はBDFや灯油混合燃料などに再生利用されているが、本研究で新たに高含水率有機性廃棄物の発酵処理における水蒸発の熱源として利用可能なことが明らかになった。

表3-13 家庭系廃食用油を用いた試験結果

25年12月～26年2月	集積培養菌添加第1週										集積培養菌添加第2週										家庭系廃食用油添加											
	12/10	11	12	13	14	15	16	週計	17	18	19	20	21	22	23	週計	24				3/4	5	6	7	8	9	10	週計	11			
	火	水	木	金	土	日	月	kg	火	水	木	金	土	日	月	kg	火				火	水	木	金	土	日	月	kg	火			
おから投入量	kg	100	100	100	100	100	0	0	500	100	100	100	100	100	0	0	500				100	100	100	100	100	0	0	500				
廃食用油投入量	kg	5	5	5	5	5	0	0	25	5	5	5	5	5	0	0	25.0				5	5	5	5	5	0	0	25.0				
おから含水率	%	78.3	78.3	78.3	78.3	78.3				79.3	79.3	79.3	79.3	79.3							80.7	80.7	80.7	80.7	80.7							
おから	おから乾物量	kg	21.7	21.7	21.7	21.7	21.7		109	20.7	20.7	20.7	20.7	20.7			104				19.3	19.3	19.3	19.3	19.3						97	
	#粗灰分(湿物あたり)	%	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66			0.68	0.68	0.68	0.68	0.68							0.70	0.70	0.70	0.70	0.70							
	#粗脂肪(＃)	%	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8			2.52	2.52	2.52	2.52	2.52							2.54	2.54	2.54	2.54	2.54							
	#粗灰分(DSあたり)	%	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0			3.3	3.3	3.3	3.3	3.3							3.6	3.6	3.6	3.6	3.6							
	#粗脂肪(＃)	%	12.9	12.9	12.9	12.9	12.9			12.2	12.2	12.2	12.2	12.2							13.2	13.2	13.2	13.2	13.2							
から投入原料(廃食用油)	全乾物量	kg	26.7	26.7	26.7	26.7	26.7		134	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7			129				24.3	24.3	24.3	24.3	24.3						122	
	全油分量	kg	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8		39.0	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5			37.6				7.5	7.5	7.5	7.5	7.5						37.7	
	投入原料灰分(DSあたり)	%	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5			2.6	2.6	2.6	2.6	2.6							2.9	2.9	2.9	2.9	2.9							
	投入原料粗脂肪(DSあたり)	%	29.2	29.2	29.2	29.2	29.2			29.2	29.2	29.2	29.2	29.2							31.0	31.0	31.0	31.0	31.0							
発酵後	#含水率	%	15.3							19.3											13.7											24.6
	#粗灰分(湿物あたり)	%	2.7							2.6											2.7											2.6
	#粗脂肪(＃)	%	27.1							25.4											27.6											25.9
	#粗灰分(DSあたり)	%	3.2							3.2											3.2											3.4
	#粗脂肪(＃)	%	31.9							31.4											32.0											34.4
	取出し量	kg	113							118											107											129
	#乾物量	kg	96							95											92											97
	#油分量	kg	31							30											29											33
	残存量	kg	94							113											122											92
	#乾物量	kg	80							91											105											69
#灰分量	kg	2.6							2.9											3.3											2.4	
#油分量	kg	25.6							28.6											33.6											23.7	
発酵槽内累積灰分量	kg	2.6	3.2	3.9	4.6	5.2	5.9	5.9	5.9	2.9	3.6	4.3	4.9	5.6	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	3.3	3.5	4.2	4.9	5.6	6.3	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0		
発酵槽内乾物量計算値	kg	80							184	91										200	105										204	
#油分量	kg	26							58	29										64	34										70	
分解量	乾物分解量	kg							30											19											22	
	油分分解量	kg							6.7											2.2											3.8	
分解率	乾物分解率	%							22											15											18	
	油分分解率	%							17											6											10	
水分蒸発量	kg								362											386											370	
ヒーター電力量	KWh	43	39	41	45	47	47	44	306	55	59	49	52	53	48	40	357				38	47	46	49	48	46	35	307				
ヒーター電力量/蒸発量	KWh/kg								0.84											0.92											0.83	

注：分解率は投入原料に対する分解量の比として算出している。

表3-14 家庭系廃食用油添加試験と集積培養菌添加週との比較

	油分分解率 %	ヒーター電力量/蒸発量 kWh/kg
家庭系廃食用油	10.0	0.83
集積培養菌添加第1週	17.3	0.84
集積培養菌添加第2週	6.0 ₄₁	0.92

本文

BDF や灯油混合燃料では不純物はできるだけ避けなければならない。そのために排出側での異物混入防止の配慮や再生利用側でも前処理でそれらを取り除く必要がある。本システムの場合、微生物が分解できる食品カスなどの異物や水分が混入しても影響はないのでそのまま利用することができる。

3.1.9 連続安定運転

25年9月24日から12月24日まで安定した運転を継続した。オカラは100kg/日、廃食用油は油無添加週を除いて5kg/日投入した。この間、内容物の塊状化や通気性の不良による嫌気性化は無かった。廃食用油の添加による粘性の増加はなく、高含水率のオカラと廃食用油のみを用いて安定した運転が可能であった。これは攪拌の効果と高温好気性発酵の特長である乾燥速度が速いことによるものと考えられる。

なおこの期間以外でも安定した運転が行えた。

3.1.10 メタンガス発生の有無の検討

発酵槽内は連続通気と連続攪拌により好気的な条件が保たれているが、部分的にデッドスペースもあるので念のためメタンガスの発生の有無について検討した。

サンプリングは排ガスラインから行った。分析機器はGC-MS (GC-17A-QP5050; Shimadzu, Japan)を用いた。結果は検出限界の0.1% (v/v)以下であった。攪拌羽根の周辺で嫌気性の部分があったとしてもメタン菌によるメタンガスが生成していないことが確認できた。メタンガスの爆発限界は5.3~14%であり、本装置の発酵による爆発などの危険性はないことが明らかになった。

3.1.11 脱臭器の設置と効果

25年9月に脱臭器を設置した。それまでは発酵乾燥物のpHを7前後に抑えてアンモニアの発生を抑制する運転を行っていたが、弱アルカリ域での活性が高いと思われる微生物試験には適していなかった。脱臭器設置後はアンモニアが生成しても環境に放出するおそれがないのでpH8程度の弱アルカリ域での長期試験が可能になった。脱臭方式は微生物脱臭を採用した。11月中頃から高い濃度のアンモニアが生成したが脱臭器出口ではほぼ0ppmであった。

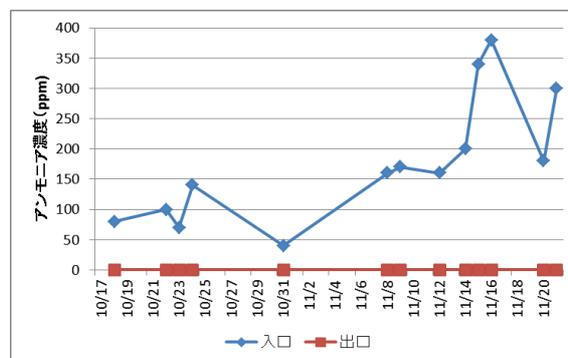


図3-12 脱臭器の効果

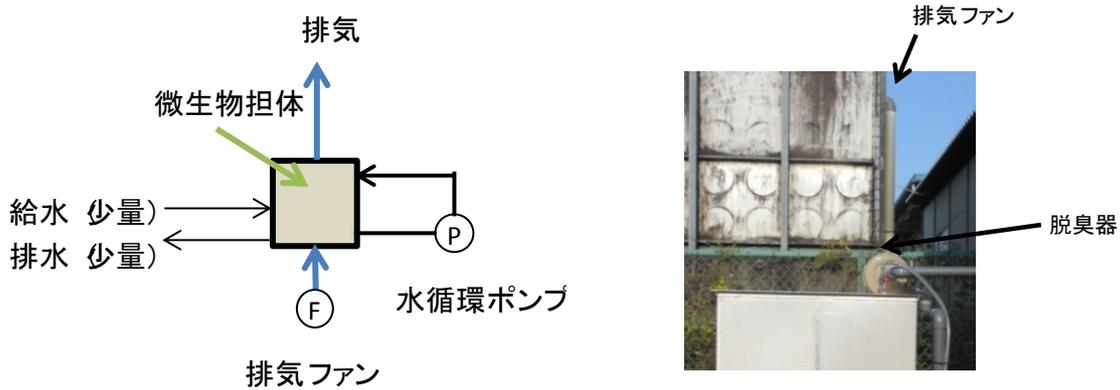


図 3-1 3 脱臭器の構成 (左) と外観 (右)

油脂分解効果の高い微生物は弱アルカリ域で活性が高いことが、NB501 株や廃白土混合コンポストで明らかになった。弱アルカリ域ではタンパク質の分解に伴って必然的にアンモニアが高濃度で生成するので、本システムでは乾燥発酵槽と脱臭器の組み合わせが必要である。脱臭方式はさまざまな方式が用いられているが、本研究で用いた微生物脱臭方式は図に示すように簡易な構成であり、微生物担体に付着した硝化菌がアンモニアを酸化して硝酸態にするので担体の交換は必要が無く、微生物の乾燥防止と硝酸態窒素の排出のため少量の給水が必要だけで安価な脱臭装置である。留意点としては硝化菌の温度活性は 38℃程度が上限であり、高温発酵では 60℃程度の排ガスが排出されるので、冷却が必要である。高温発酵方式は排ガス量が少ないので試験機では最も簡便な外気で希釈冷却する方式とした。

3.1.12 生成飼料の家畜への供与試験

24 年度に鶏・豚への発酵乾燥飼料の供与試験を行った。5%、10%混合区では対照区と大差なかった。20%混合区では鶏の場合やや産卵量が低下し、豚ではと畜日齢が長くなる傾向があった。

3.1.13 副資材の不要化

すべての試験期間中において、従来水分調整や通気性改良材として必要とされた木質チップ、もみ殻などの副資材は用いていない。飼料化の場合に乾材として必要であった米ぬか、小麦ふすま、パンくずなどの副資材も使用していない。内容物の塊状化や通気性の不良による嫌気性化は無かった。廃食用油の添加による粘性の増加も無かった。高含水率のオカラと廃食用油のみを用いて安定した運転が可能であった。これは攪拌の効果と高温好気性発酵の特長である乾燥速度が速いことによるものと考えられる。

副資材は従来必須のものとしていたが、木質系の副資材を用いれば飼料としては使えず、また木質は分解しにくいので減量効果も低い。副資材を用いずに発酵乾燥することで、本システムは飼料化の他に減量化、乾燥の用途にも適用できる。熟成工程を付加すれば堆肥化用途にも適用できる。

3.1.14 廃食用油を添加した高温好気性発酵乾燥システムのメリット

本研究において次に示すメリットを確認できた。

- (1) 短期間の発酵日数で乾物、油脂ともに高い分解効果が得られた。
- (2) 廃食用油の添加でヒーター等の外部入熱を少なくすることができた。
- (3) 高含水率のおからの発酵乾燥処理において副資材が不要であった。
- (4) 副資材を用いないので発酵日数を長くとれた。
- (5) 乾燥速度が速く、内容物の塊状化や嫌気性化はなかった。
- (6) 60℃で油脂分を分解する高温好気性菌によりおからを発酵乾燥させ飼料として用いることができた。減量化、乾燥等に用いることも可能である。
- (7) 添加する廃食用油は家庭などから排出されるものでも同等の効果であった。家庭やレストランなどでは不純物が混入しやすいのでそれらの再利用に適する。

また一般的に次に示すメリットもある。

- (8) 生肉が混入した生ごみ等の飼料化においてはエコフィードガイドラインに定める 70℃ 30 分間以上の加熱処理が必要であるが、高温発酵では常時 60℃程度での発酵温度なのでガイドラインは容易に達成できる。
- (9) 熟成工程を付加すれば堆肥に利用できる。
- (10) 必要な水分を蒸発させる際に排気が持ち出す熱量は中温発酵より少ない。
- (11) 病原菌や雑草の種子が死滅、不活化する。
- (12) ハエや小虫が発生しない。

本文

3.2 微生物添加効果の検証

前節で用いたデータは、粗脂肪分と粗灰分の委託分析値を元にして得られたものであり、各種の添加運転のうち、最も高い性能が得られたと判断した廃白土混合コンポストの添加結果を中心に分析を行っている。そこで、本項目では、本研究で行った他の添加運転の結果についても、当研究室の実験室において総脂質、灰分、含水率を高精度で再分析を行った。本節では、水分の蒸発や有機物の分解により変動しない数値である灰分測定値を元にして全体の収支を計算しなおし、油脂分解、乾物分解、CO₂発生量、pH変化などの各種の分析値から多面的な検証を行った。さらに、廃白土混合コンポストの添加実験における微生物の群集構造の変遷を調べるために次世代シーケンサーを用いて群集構造解析を行った。

25年6月～12月の期間に行った以下の添加試験について分析した結果を示す。

- (1) 6月11日～6月25日（2週間）：コントロール条件（菌を添加しない条件）
- (2) 6月25日～7月16日（3週間）：NB501株添加1回目（40g）
- (3) 7月23日～8月13日（3週間）：NB501株添加2回目（100g）
- (4) 11月5日～11月12日（1週間）：コントロール週（廃白土コンポスト添加前週）
11月12日～12月10日（4週間）：廃白土コンポスト添加
- (5) 12月10日～12月24日（2週間）：好熱性油脂分解微生物群集添加（1回目のみ）

3.2.1 分解・蒸発量の分析

脂質分解量の計算法

コントロール条件第1週（6月11日～6月18日）の結果を用いて説明する（図3-14）。

実証試験機の槽内には、前週からの持ち越し量に加え、廃食用油を5回にわたって添加するため、脂質量が累積していく（図左：赤実線）。その値から、槽内からサンプリングした試料の脂質分析値（図左：青点線）を引いた値を累積していったものを、1週間の間に分解された脂質の総量とした。

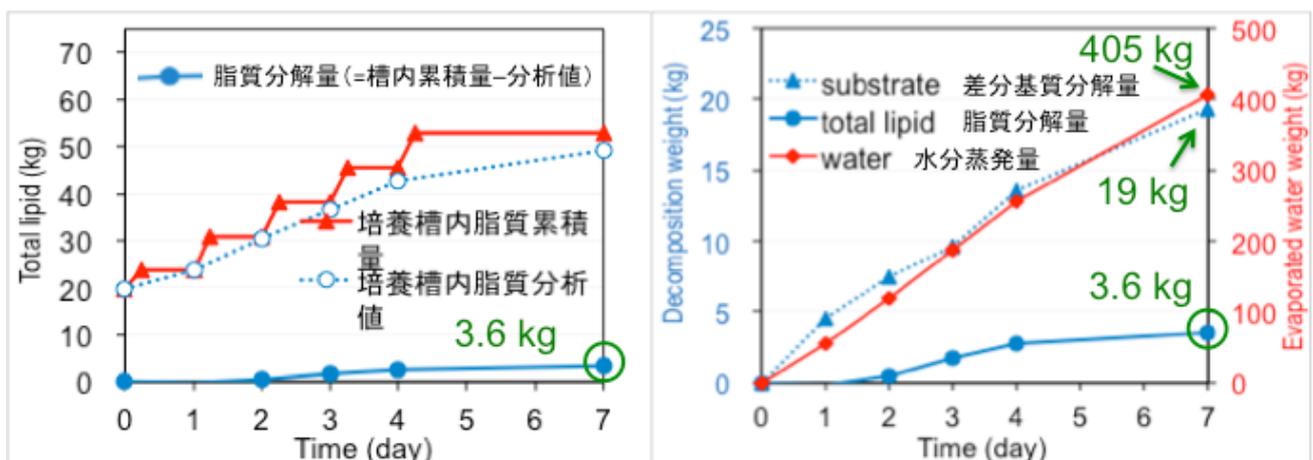


図3-14 分解・蒸発量の分析例（コントロール条件第1週）

差分基質分解量、水分蒸発量の計算法

装置から取り出した産物は、水分、灰分、有機物からなるが、有機物のうち脂質以外のものを「差分基質」とする。これは微生物の炭素源として分解されCO₂などとして排出される有機物（脂質を除く）であり、前節で「乾物」とした部分をより精密に分析した値となる。

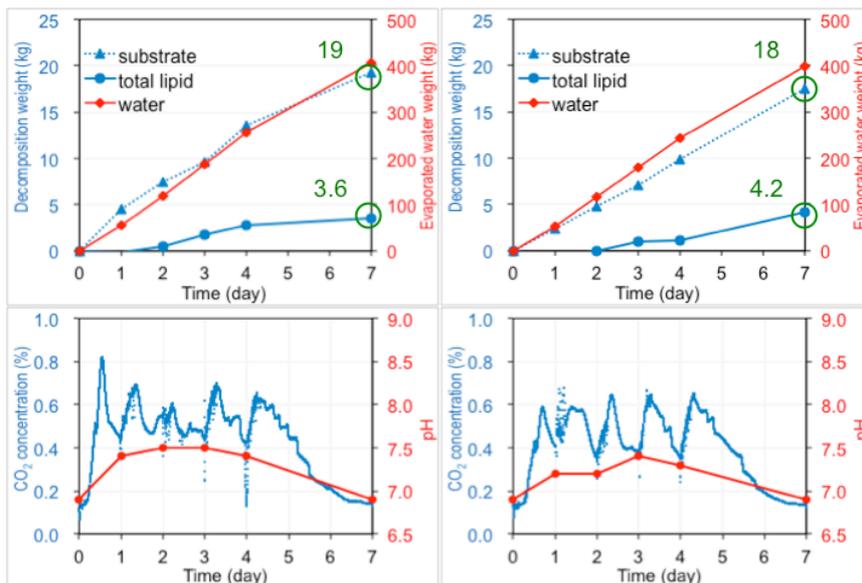
$$\text{オカラおよび発酵乾燥物重量（産物総量）} = \text{水分量} + \text{灰分量} + \text{有機物量（差分基質量+脂質量）}$$

高温好気性発酵処理によって、水分は乾燥により蒸発して重量が大幅に減り、さらに有機物（差分基質+脂質）も微生物分解（発酵）により減少する。そのため、量の増減がない灰分量を基準として計算した。水分蒸発量は含水率測定より、差分基質（脂質以外の有機物）の分解量は、その他の分析値の差分より、それぞれ計算した。

$$\text{差分基質量} = \text{産物総量} - \text{水分量} - \text{灰分量} - \text{脂質量}$$

コントロール条件

菌を添加しない条件として2週間の運転を行った。油脂分解量は3.6~4.2 kg であり、差分基質の分解量は19~18 kg であった。pHは7.0~7.5の間を推移し、微生物活動の指標となるCO₂発生量は、オカラと油脂の投入が行われ発酵が活発となる1日目~5日目では0.4~0.6%の値を示したが、乾燥期間である6, 7日目では低下した。



コントロール条件第1週(6/11-6/18) コントロール条件第2週(6/18-6/25)

図3-15 コントロール条件の分析結果

3.2.3 NB501 株添加 1 回目

本研究で単離したリパーゼ生産性好熱菌 *B. thermoamylovorans* NB501 株を湿菌体重量で 40 g 添加し、その効果を 3 週間モニタリングした。油脂分解量は 4.2~4.4 kg であり、コントロール条件と比べてわずかに上昇したが、差分基質の分解量は 3 週目で大幅に低下して 9 kg となった。CO₂ 発生量も 0.4~0.6% であり、コントロール条件と比較しても大きな差は見られなかった。

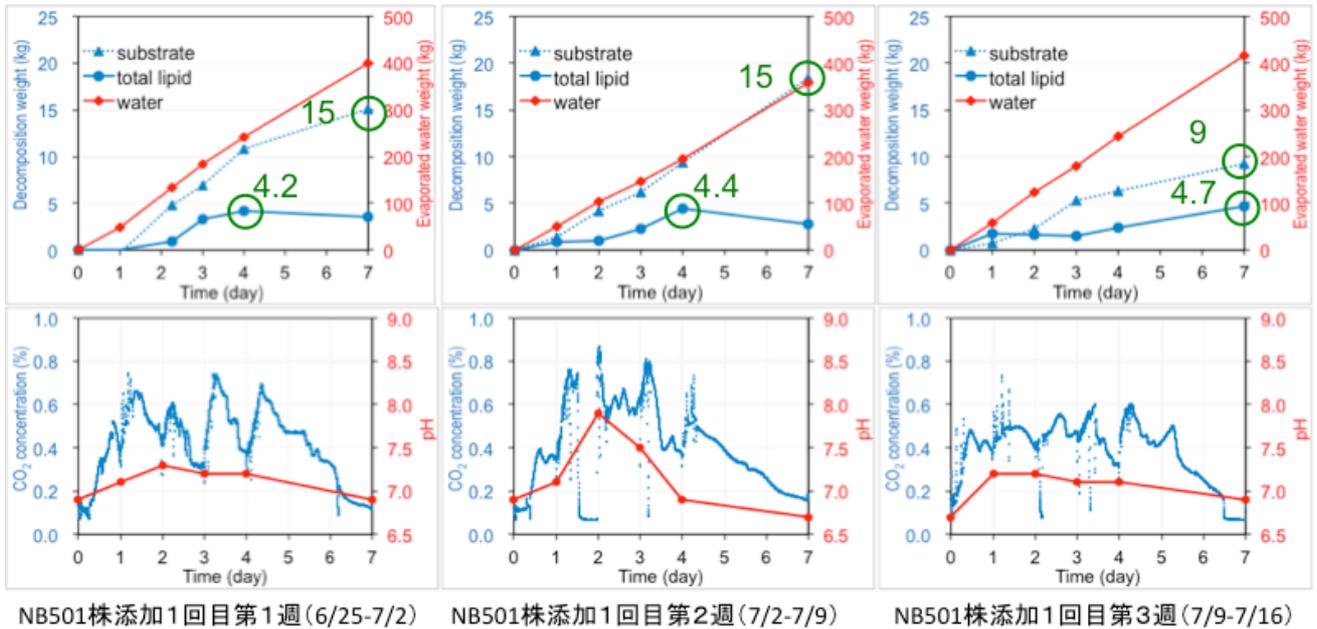


図 3-1 6 NB501 株添加 1 回目の分析結果

本文

3.2.4 NB501 株添加 2 回目

NB501 株の添加量を湿菌体重量で 100 g と増加させ、その添加効果を再び検証した。油脂分解量は当初 5.8~5.6 kg となり、CO₂ 発生量も 0.6%を超えたが、3 週目には油脂分解量が 2.6 kg と急激に落ち込み、CO₂ 発生量も 0.5%程度に抑えられていた。微生物活性が高くなると一般的に pH は上昇する傾向にあるが、この添加条件では pH がさほど上がらず、7.0 付近を推移していた。すなわち、NB501 株の添加においては、2 週間ほどまではある程度の添加効果が見られたが、継続的な微生物活動が見られず、その後終息したと考えられる。

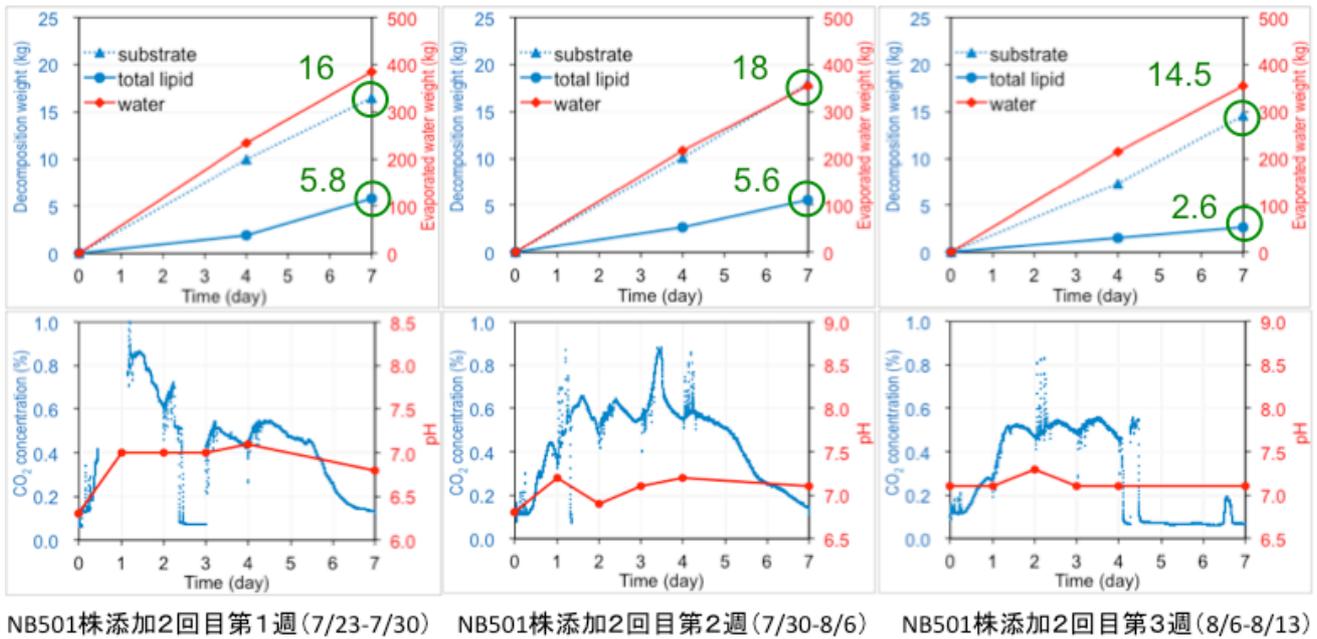
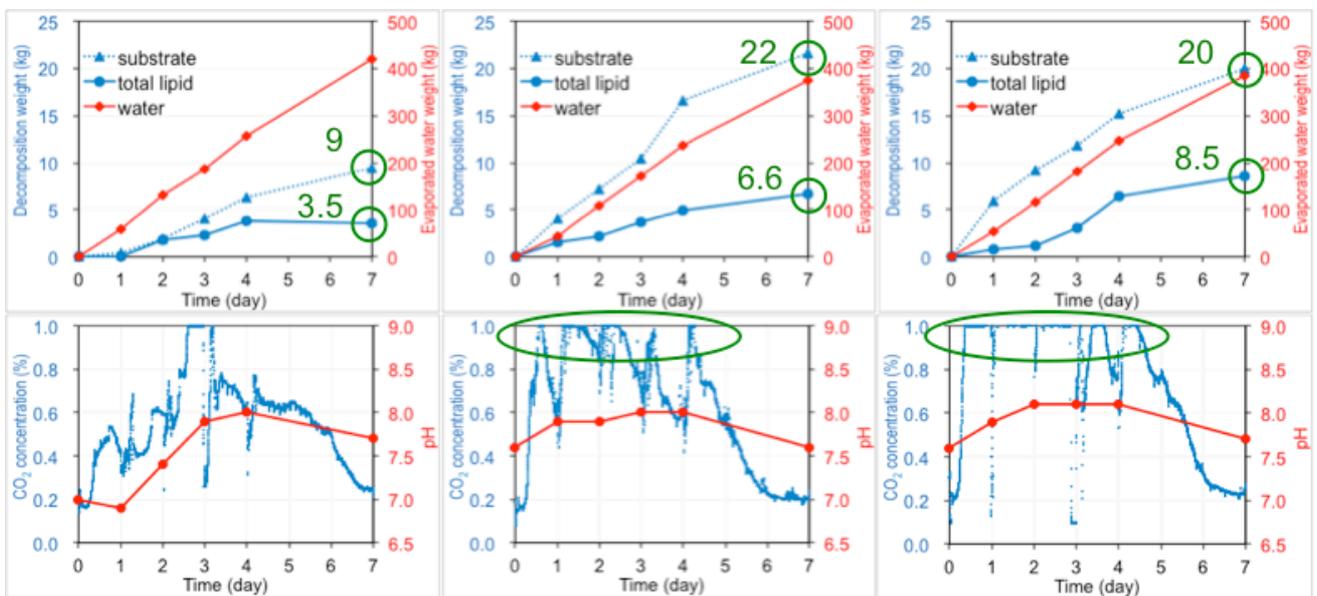


図 3-1 7 NB501 株添加 2 回目の分析結果

本文

3.2.5 廃白土混合コンポスト添加

廃白土混合コンポストを、11月12日に7.1 kg 投入した。その前週はコントロール週として位置づけ、添加後は4週間のモニタリングを行った。コントロール週、添加後第2週、添加後第4週の分析結果を示す。コントロール週では油脂分解量は3.5 kg、差分基質の分解量は9 kg、CO₂発生量は0.6%付近であり、3.1.4のコントロール条件とほぼ同程度であった。ここに廃白土混合コンポストを添加したところ、油脂分解量は2週間目には6.6 kg、4週間目には8.5 kg までと大幅に向上した。また、差分基質の分解量も20~22 kg と高い水準を維持し、CO₂発生量も1%をしばしば超えるほど高かった。pHの変化も7.5~8.0 と高くなっており、微生物活動が活発になり、高い油脂分解も約1ヶ月間の間、持続したことになる。



添加前コントロール週(11/5-11/12) 廃白土混合コンポスト添加第2週(11/19-11/26) 添加第4週(12/3-12/10)

図 3-1 8 廃白土混合コンポスト添加の分析結果

本文

3.2.6 好熱性油脂分解微生物群集の添加

本研究（次節）では、NB501 株のように単離された単一の菌株だけでなく、60°Cで油脂を炭素源として集積培養を行った好熱性油脂分解微生物群集も用意して、添加試験を行った。添加量は湿菌体重量で 4.7 g であった。第 1 週では油脂分解量が 6.6 kg、差分基質の分解量も 20~23 kg と高い水準を維持し、CO₂ 発生量も 1%を超えたことから、添加効果が見られたと考えられた。しかし、2 週目には油脂分解量も差分基質の分解量も急激に落ち込んだことから、油脂分解微生物群集の添加も、NB501 株の添加と同様、継続的な効果が得られなかったといえる。

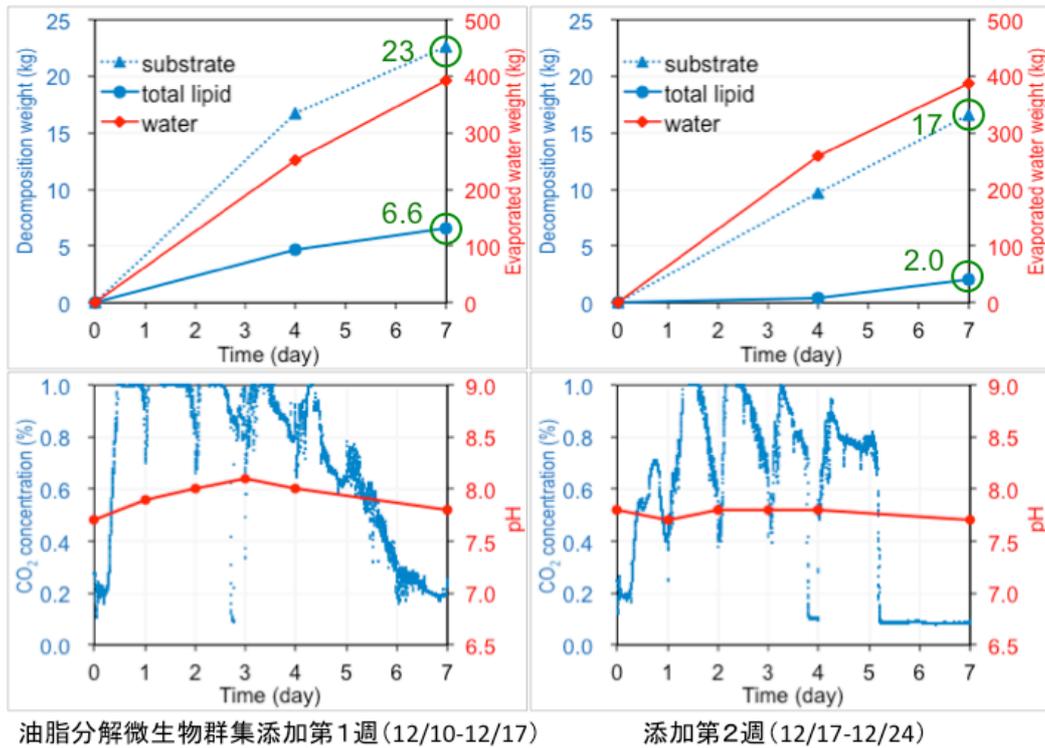


図 3-9 油脂分解微生物群集添加の分析結果

以上の結果より、各種の添加実験においては、廃白土混合コンポストの添加が最も効果が高く、持続性も高かったことが明らかとなった。

本文

3.2.7 次世代シーケンサーによる群集解析

廃白土混合コンポスト添加における、(1) コントロール週 (添加前週)、(2) 添加1週間後、(3) 添加4週間後 (最も活性の高かった週) から採取したサンプルに対して、次世代シーケンサー (ロシュ 454 GS Junior) による 16S rRNA 遺伝子の V1-2 領域アンプリコン解析を通じた科 (Family)、属 (Genus)、種 (Species) レベルまでの同定を行った結果に関して、上位 25 までの Operational Taxonomic Unit (OTU) を示す。なお、本解析には、オカラ由来と思われる、大豆 (*Glycine max*) の遺伝子も検出されたが、その他は全て微生物 (細菌) 由来であった。

表 3-15 廃白土混合コンポスト添加における群集解析

OTU	添加前	添加1週間後	添加4週間後	Family	Genus	Species	Identity (%)
1	815	1069	1048	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus thermolactis</i>	100
2	49	44	49	<i>Bacillaceae</i>	<i>Virgibacillus</i>	<i>Virgibacillus</i> sp.	90
3	95	4	1	<i>Planococcaceae</i>	<i>Ureibacillus</i>	<i>Ureibacillus suwonensis</i>	100
4	29	24	10	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.	97
5	52	6	1	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100
6	40	7	2	<i>Planococcaceae</i>	<i>Kurthia</i>	<i>Kurthia gibsonii</i>	97
7	5	9	29	<i>Fabaceae</i>	<i>Glycine</i>	<i>Glycine max</i>	100
8	1	19	20	<i>Bacillaceae</i>	<i>Gracilibacillus</i>	<i>Gracilibacillus</i> sp.	91
9	17	1	21	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	100
10	29	2	1	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	96
11	10	10	10	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	93
12	13	5	10	<i>Bacillaceae</i>	<i>Cerasibacillus</i>	<i>Cerasibacillus quisquiliarum</i>	99
13	15	4	1	<i>Planococcaceae</i>	<i>Kurthia</i>	<i>Kurthia gibsonii</i>	98
14	4	10	3	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	92
15	6	4	2	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	95
16	9	3	0	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus equinus</i>	100
17	2	2	6	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	98
18	3	4	2	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus methanolicus</i>	93
19	3	4	1	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium nuruki</i>	99
20	5	0	2	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Aneurinibacillus</i>	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	100
21	2	0	5	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	95
22	4	1	1	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	94
23	2	3	1	<i>Bacillaceae</i>	<i>Virgibacillus</i>	<i>Virgibacillus</i> sp.	88
24	1	3	2	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus methanolicus</i>	91
25	2	0	3	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	98
Total	1213	1238	1231				

添加前には群集の多様性が高かったのに対し、添加後は低下している。特に、添加前には豊富に存在していた *Ureibacillus suwonensis*、*Streptococcus thermophilus*、*Kurthia gibsonii* などが減少していることが分かる。本システムにおいては *Bacillaceae* 科が常に優占的に存在しているが、その中でも特に、*Bacillus thermolactis* が多い。*B. thermolactis* は、廃白土混合コンポスト添加後に増加し、4週間後にも減少していなかった。本研究では、実証試験機の発酵乾燥産物から、好熱性リパーゼ生産菌として *Bacillus thermoamylovorans* 501 株を単離している (次節参照)。群集解析においては、*B. thermoamylovorans* の占める割合は低いが、添加前で2リード、添加4週間後に3リード検出されている。大豆油添加条件において 60°C で集積培養した油脂分解微生物群集では *Geobacillus* 属細菌が多数を占め

本文

ていたが（次節）、今回は検出されなかった。

B. thermolactis は 2011 年に提案された新しい種であり、40℃～50℃で生育する中度好熱菌として主に牛乳などから単離されている⁷⁾。リパーゼ生産の報告は今のところはないが、*B. thermoamylovorans* と最も近縁の種であるため（16S rRNA 遺伝子の id = 93%）、ここで *B. thermolactis* と同定された株にリパーゼ生産株が含まれている可能性は高いと考えられる。また、全期間を通じて種レベルで新規な微生物（既知の配列と 95%以下の低い相同性を示すもの）も一定の割合で存在するため、これらの微生物が脂質分解に寄与している可能性もある。

3.3 好熱性油脂分解菌の探索と性質解明

3.3.1 廃食用油を唯一の炭素源とした集積培養

廃食用油を唯一の炭素源とした培地を用いた集積培養における気相部の酸素と二酸化炭素のモニタリングでは、40°Cでの培養に関しては1~5回目を通して一貫して酸素の減少とそれに伴う二酸化炭素の増加が確認された(図3-10)。しかし、50°Cと60°Cに関しては、1回目の集積培養においては酸素の減少とそれに伴う二酸化炭素の増加は確認されたが、2回目の集積培養以降は酸素の減少は確認されたものの、二酸化炭素の増加はほとんど確認されなかった。

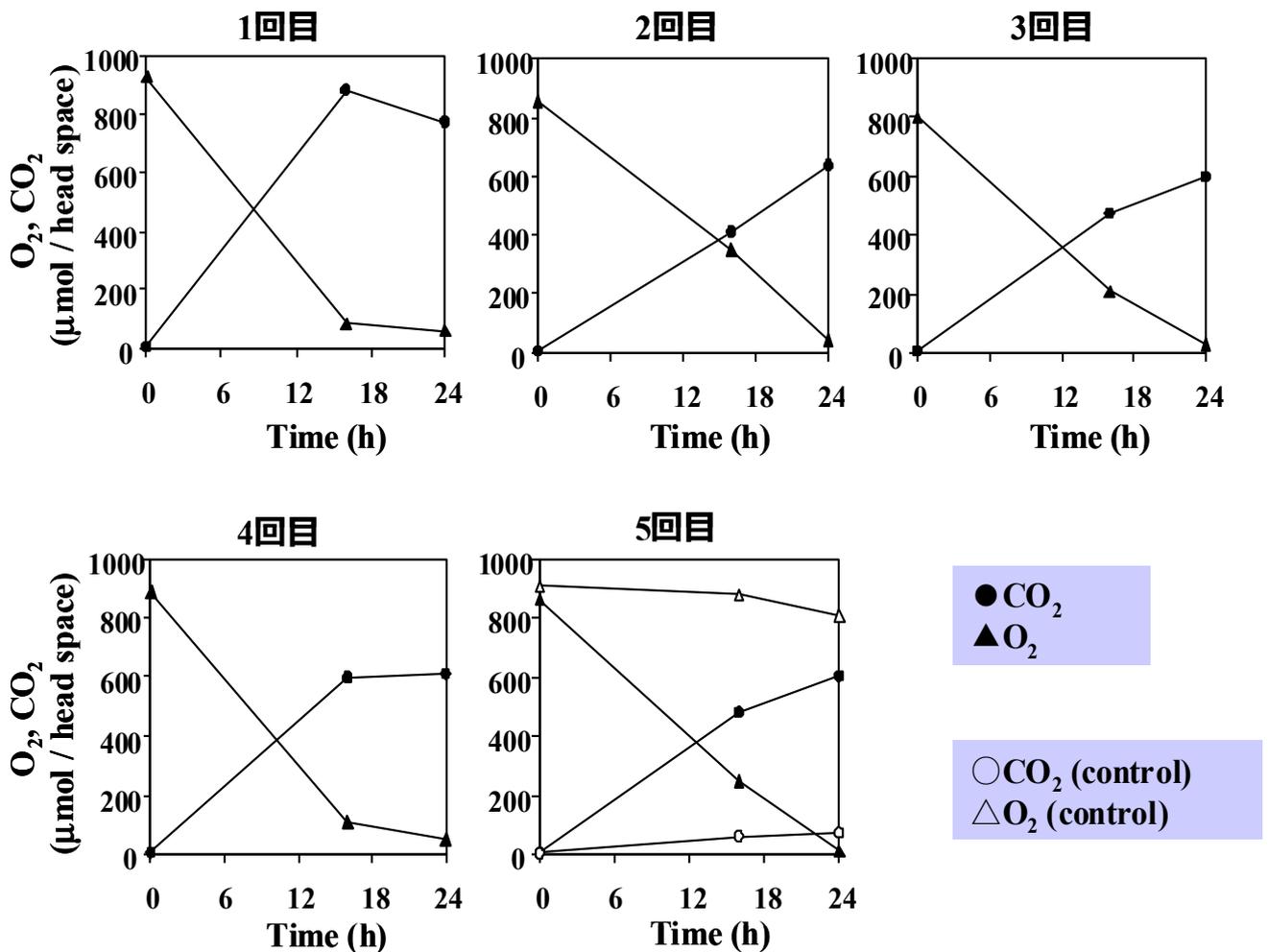


図3-10 40°Cでの1~5回目の集積培養における気相部のモニタリング結果

コントロールは廃食用油を添加していない集積培養培地に4回目の集積培養液を植菌した際の気相部の状況

本文

廃食用油を唯一の炭素源とした培地を用いた集積培養において、40°Cでは気相部の酸素の減少とそれに伴う二酸化炭素の増加が確認され、微生物の生育が示唆された。特に、5回目の集積培養においてコントロールでは酸素の減少と二酸化炭素の増加がほとんどみられないことは、集積培養において、廃食用油を利用して生育する微生物が集積していることを意味するものである。しかし、50°Cと60°Cにおいては気相部の酸素の減少はみられるものの、二酸化炭素量の増加はみられず、最終的にこの培地を用いた油脂分解菌の獲得には至らなかった。酸素の減少は、おそらく酸素が廃食用油の酸化に利用されたことによると考えられる。酸化した油脂は有毒であり生育に影響を大きく与えるとされ、高温になればなるほど廃食用油の酸化は進むとされる。50°Cと60°Cで油脂分解菌を獲得できなかった理由の1つに廃食用油の酸化が進んだことが挙げられる。また、そもそもこの培地の成分では好熱菌の生育には足りない可能性も挙げられる。このような理由もあり、50°Cと60°Cに関しては培地を変更して油脂分解菌の単離を試みた。

3.3.2 40°Cで生育する油脂分解菌の単離と系統学的解析

40°Cにおける集積培養液をLB培地とNB培地に塗布して40°Cで1日培養を行ったところ、多くのコロニーを形成した(図3-11)。しかし、50°Cと60°Cに関しては3回目の集積培養液を用いて単離を試みたが、全くコロニーを形成しなかった。

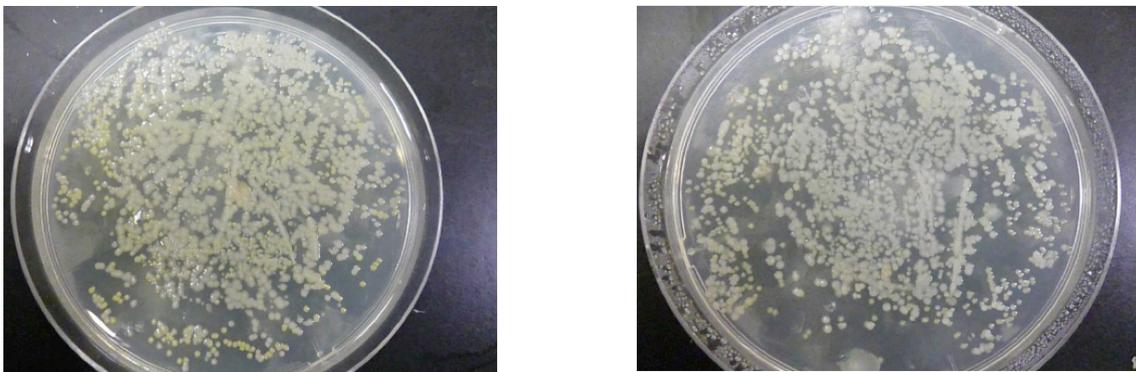


図3-11 40°Cで単離された油脂分解菌の単離
(左図：LB培地での単離、右図：NB培地での単離)

集積培養と同じような培養方法で廃食用油を唯一の炭素源とした培地を用いて気相部の経時変化を追ったところ、全ての単離株において集積培養の時と同じように、酸素の減少とそれに伴う二酸化炭素の増加が確認された。また、一般的に油脂分解能の指標として用いられる方法であるクリアハロー形成においては、廃食用油を含んだプレート培地を用いて行ったところ、単離株64株中、10株程度の単離株でクリアハローの形成が確認された、その中でも、NB培地で単離されたNB32株のクリアハローは非常に大きく(図3-12)、強い油

本文

脂分解能を有することが示唆された。クリアハローを形成した単離株は、図 3-1 3、図 3-1 4 の系統樹の赤字で示す。

16S rRNA 遺伝子による系統学的解析では、40°C で単離された油脂分解菌は大きく 2 つのグループに大別された。1 つはガンマプロテオバクテリア綱腸内細菌目腸内細菌科に属するクロノバクター属のグループ (図 3-1 3)、もう 1 つはガンマプロテオバクテリア綱シュードモナス目モラクセラ科に属するアシネトバクター属のグループ (図 3-1 4) である。クロノバクター属に属する単離株はすべて *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 の 16S rRNA 遺伝子配列と 99.0%以上の相同性があり、アシネトバクター属に属する単離株はすべて *Acinetobacter baumannii* DSM30007 の 16S rRNA 遺伝子配列と 99.5%以上の相同性があった。*Acinetobacter baumannii* の 2 株 (NB6、NB9) は特に大きなクリアハローを形成し (図 3-1 2)、強い油脂分解能を有することが示唆された。クリアハローを形成した単離株は、図 3-1 3、図 3-1 4 の系統樹に赤字で示した。

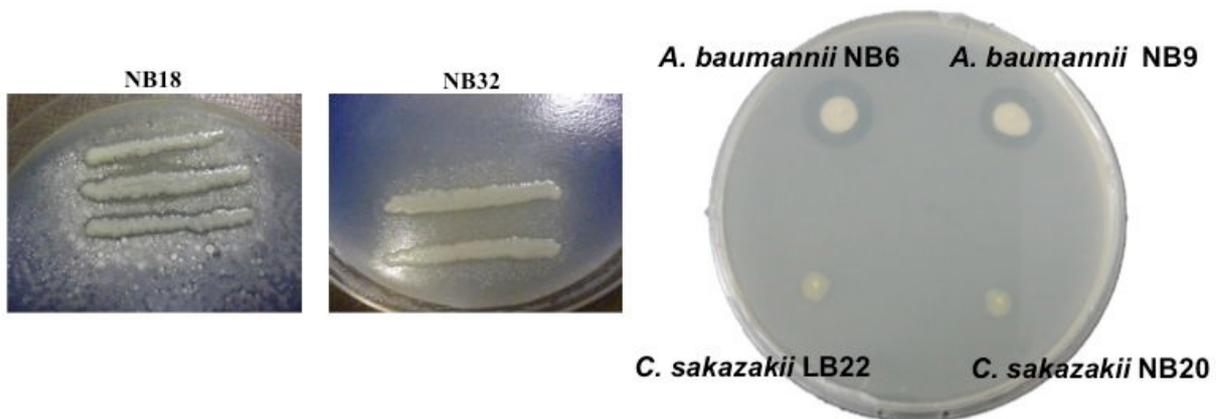


図 3-1 2 40°C で単離された油脂分解菌 *Acinetobacter baumannii* と *Cronobacter sakazakii* のクリアハロー形成

40°C で単離した油脂分解菌は、廃食用油を利用して生育することが確認された。16S rRNA 遺伝子による系統学的解析からは、これらの単離株はクロノバクター属のグループとアシネトバクター属のグループに大別されたが、アシネトバクター属のグループに属する単離株と非常に近縁な関係にあった *Acinetobacter baumannii* においてはリパーゼに関する報告は非常に多い。*Acinetobacter baumannii* DSM 30007 はゲノムが解読されておりリパーゼ遺伝子を有することが分かっている⁸⁾。また、*Acinetobacter baumannii* のある株ではリパーゼに関してクローニング・精製・機能解析はすでに行われている⁹⁾。このことは、アシネトバクター属グループに属する単離株でクリアハローを形成するものは少なかったも

本文

の、クリアハローを形成しなかった株も含めて油脂分解能を有する可能性を大きく示唆する。

クロノバクター属のグループに属する単離株と非常に近縁な関係にあった *Cronobacter sakazakii* に関しては現在のところリパーゼの研究報告はされていないが、2010 年に *Cronobacter sakazakii* のある株のゲノムが解読され、リパーゼと推測される遺伝子を有していることが分かっている¹⁰⁾。実際に、本研究では、クロノバクター属のグループに属する単離株でクリアハローを形成する株が多かったことや、なかでも NB32 株のような大きなクリアハローを形成した株もあることから、クロノバクター属グループのリパーゼの機能に関する研究は非常に興味を持たれる。

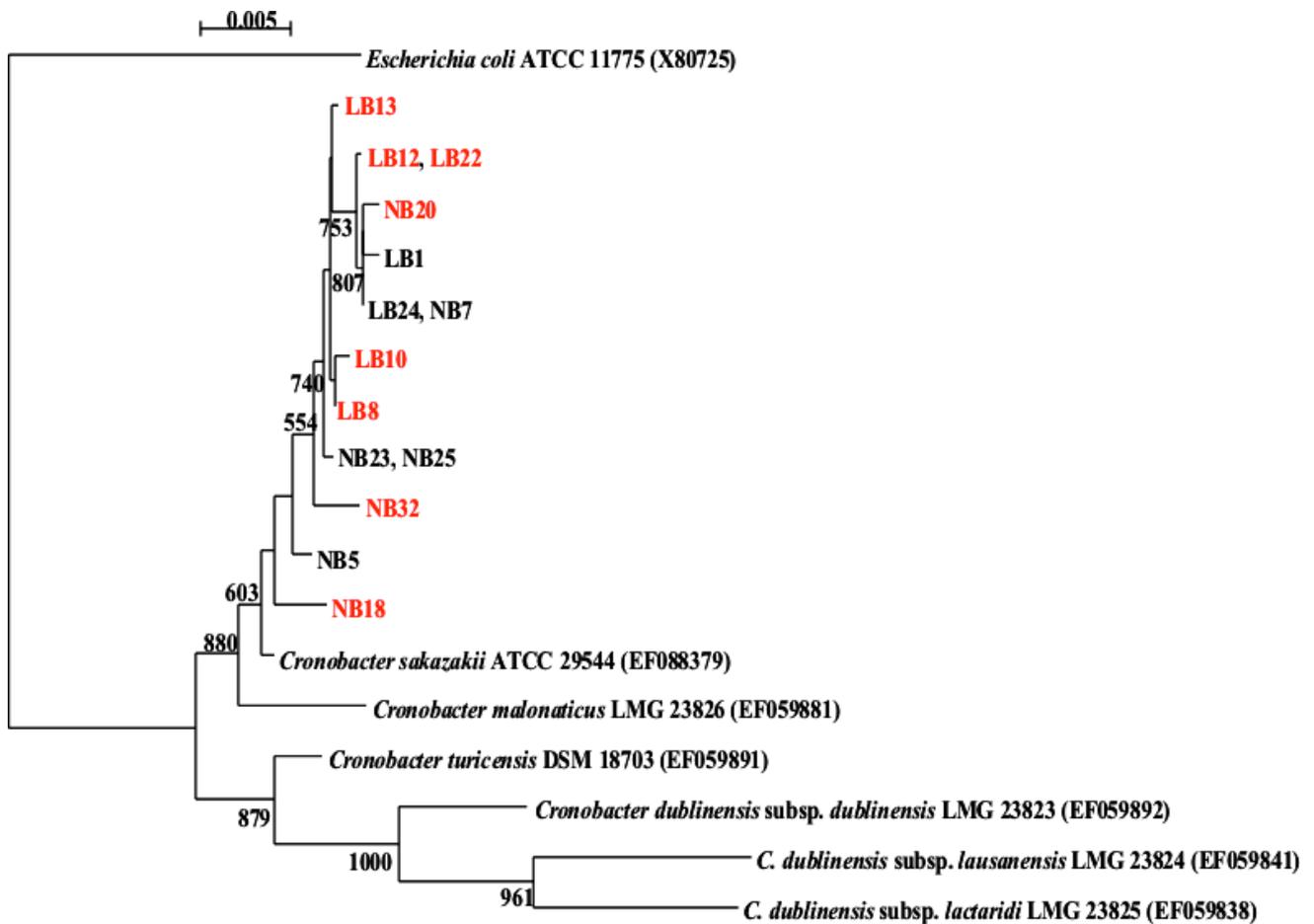


図 3-1 3 40°C で単離された油脂分解菌の 16S rDNA 遺伝子による系統学的解析 (1)
赤字はクリアハローを形成した単離株

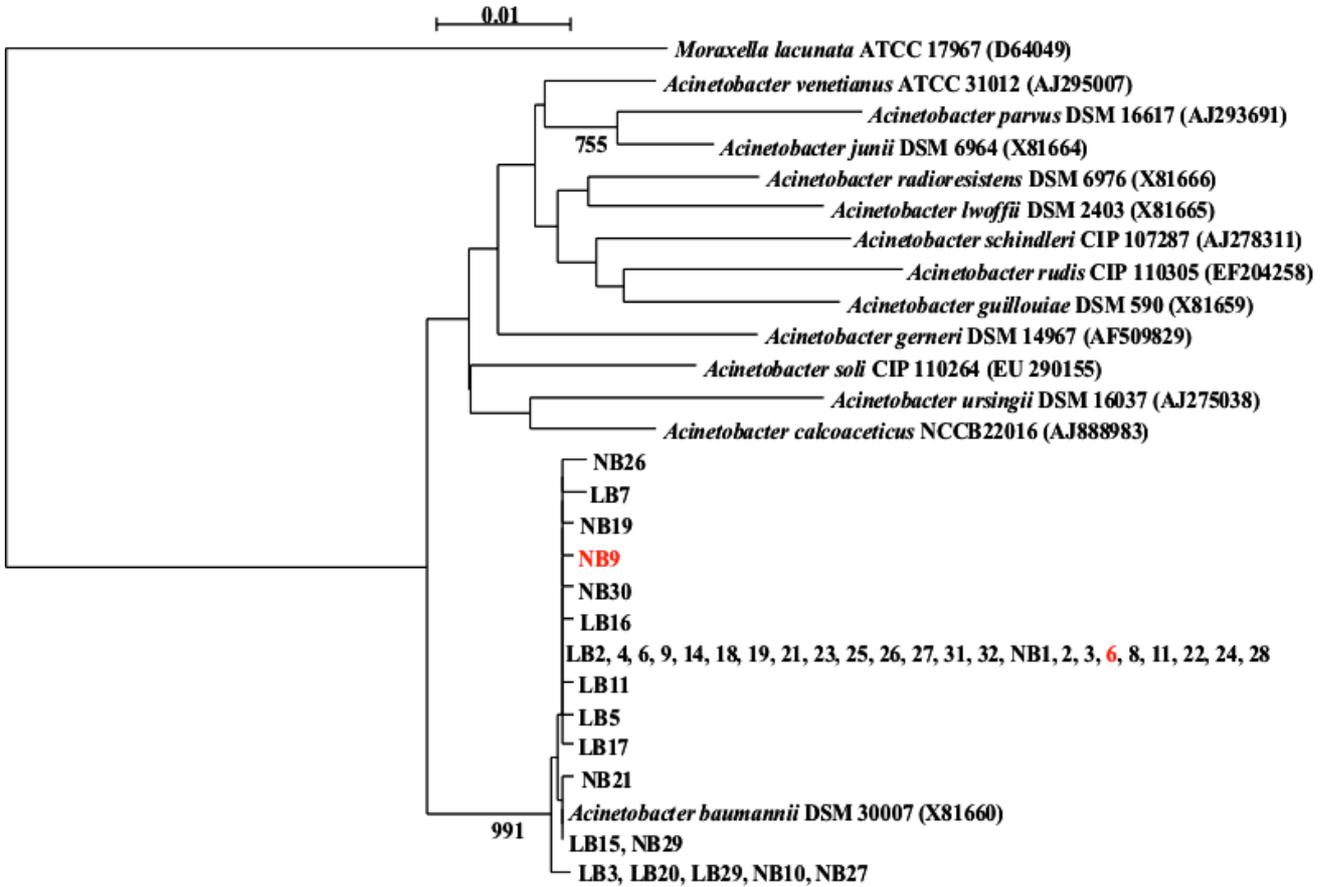


図 3-1 4 40°C で単離された油脂分解菌の 16S rRNA 遺伝子による系統学的解析 (2)
赤字はクリアハローを形成した単離株

本文

3.3.3 50°C で生育する油脂分解菌の単離と系統学的解析

これまで廃食用油を唯一の炭素源とした培地を用いて単離を行ってきた。しかし、40 °C で単離に成功していたが、50°C と 60°C では単離に至っていなかった。その原因の一つとして、培地成分の不足が考えられた。そこで、8 種類の培地 (LB、1/5LB、NB、1/5NB、トリプトソーヤ、1/5 トリプトソーヤ、ペプトン、トリプトン-イースト) を用いて廃食用油 2%を添加して集積培養を行い、50°C と 60°C で生育する油脂分解菌の単離を試みた。その結果トリブチリン入りの NB プレート培地において、周囲に大きなクリアハローを形成している 2 種類のコロニーが確認された (図 3-1 5)。NB プレート培地上で単一のコロニーになるように何度も植菌を繰り返すことで純化し、再度トリブチリン入りの NB プレートにおいてクリアハローを形成するかどうか確認した。

16S rRNA 遺伝子による系統学的解析 (図 3-1 6) では、50°C で単離された油脂分解菌 NB501 株と NB502 株は、ファーミキューテス門バシラス綱バシラス目バシラス科に属する *Bacillus thermoamylovorans* LMG 18084 の 16S rRNA 遺伝子配列と 99%以上の相同性があったことから、*Bacillus thermoamylovorans* と同定された。

50°C または 60°C で生育する油脂分解菌に関しては、廃食用油入りの様々な培地を用いてスクリーニングした結果、トリブチリン入りの NB 培地において 50°C で生育する油脂分解菌の獲得に成功した。50°C だけでなく 60°C で数日培養しただけで大きなクリアハローを形成したことから (図 3-1 5)、この 2 株は peptone や yeast extract に含まれている炭素源と同等なレベルで油脂を資化しやすいと考えられる。16S rRNA 遺伝子による系統学的解析では、*Bacillus thermoamylovorans* LMG 18084 と最も近縁な関係にあることが分かったが、*Bacillus* 属、そして *B. thermoamylovorans* のリパーゼの研究は多くなされ、応用への期待もてるリパーゼ特性を有しているという報告もされている¹¹⁾。NB501 株と NB502 株への期待は高いといえる。

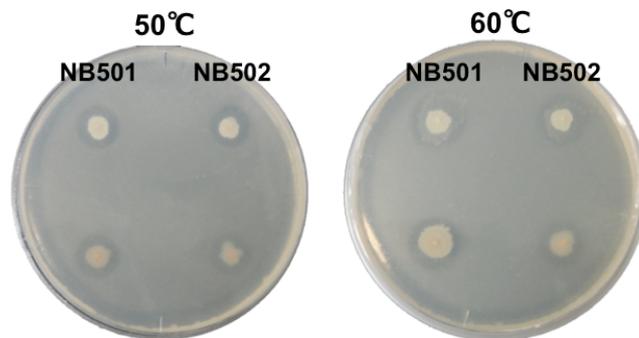


図 3-1 5 50°C で単離された油脂分解菌 *Bacillus thermoamylovorans* NB501 株と NB502 株の 50 °C および 60 °C で形成されるクリアハロー

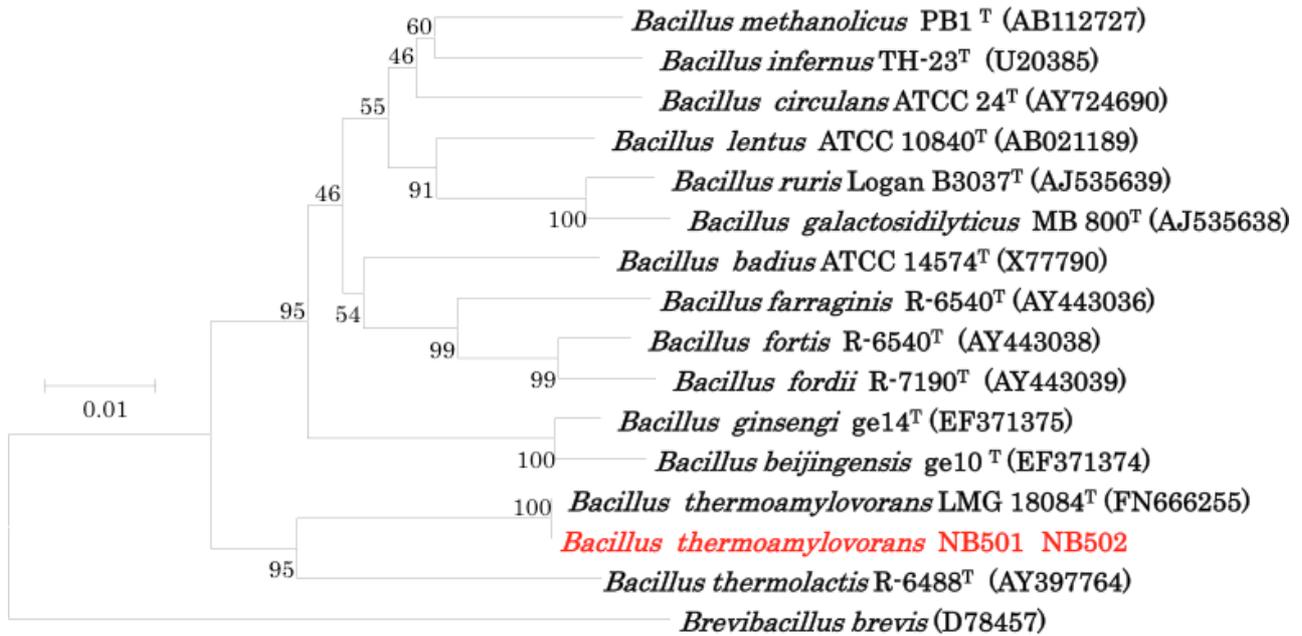


図 3-16 50°C で単離された油脂分解菌の 16S rRNA 遺伝子による系統学的解析

3.3.4 60°C で生育する油脂分解菌の単離と系統学的解析

50°C または 60°C で生育する油脂分解菌として、廃食用油を添加して単離したものは、1 種類のみであった。その原因として、スクリーニングの際に酸化が進んだ廃食用油を用いたことでバイアスがかかったと考えられた。そのためスクリーニングの際には新鮮な油脂であるトリオレインや大豆油を廃食用油の代わりに用いて再度単離を試みた。

発酵オカラを単離源として、NB 培地にトリオレイン、大豆油を 2% 添加した培地を用いて集積培養を行い、60°C で生育する油脂分解菌の単離を試みた。その結果、0.5% トリブチリン入りの NB プレート培地において、クリアハローを形成するコロニーが観察された。いくつかのコロニーをピックアップし、再度クリアハロー形成することを確認した (図 3-17)。

16S rRNA 遺伝子による系統学的解析では、60°C で単離された油脂分解菌 NB601、NB602、NB603、および NB604 株は、ファーミキューテス門バシラス綱バシラス目バシラス科に属する *Geobacillus galactosidasius* CF1B^T の 16S rRNA 遺伝子配列と 100% の相同性を示したことから、*G. galactosidasius* と同定した。これまで *Geobacillus* 属に属するいくつかの種がリパーゼ活性を有するという報告がなされている^{2), 12)}。しかし、*G. galactosidasius* には、これまでリパーゼ活性を有するという報告がないことから、新規なリパーゼを有している可能性が期待される。

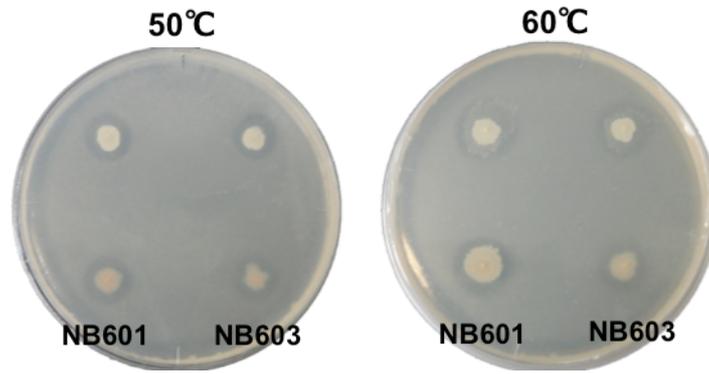


図 3-1 7 60°C で単離された *Geobacillus galactosidasius* NB601, NB603 の 50 °C および 60 °C で形成されたクリアハロー

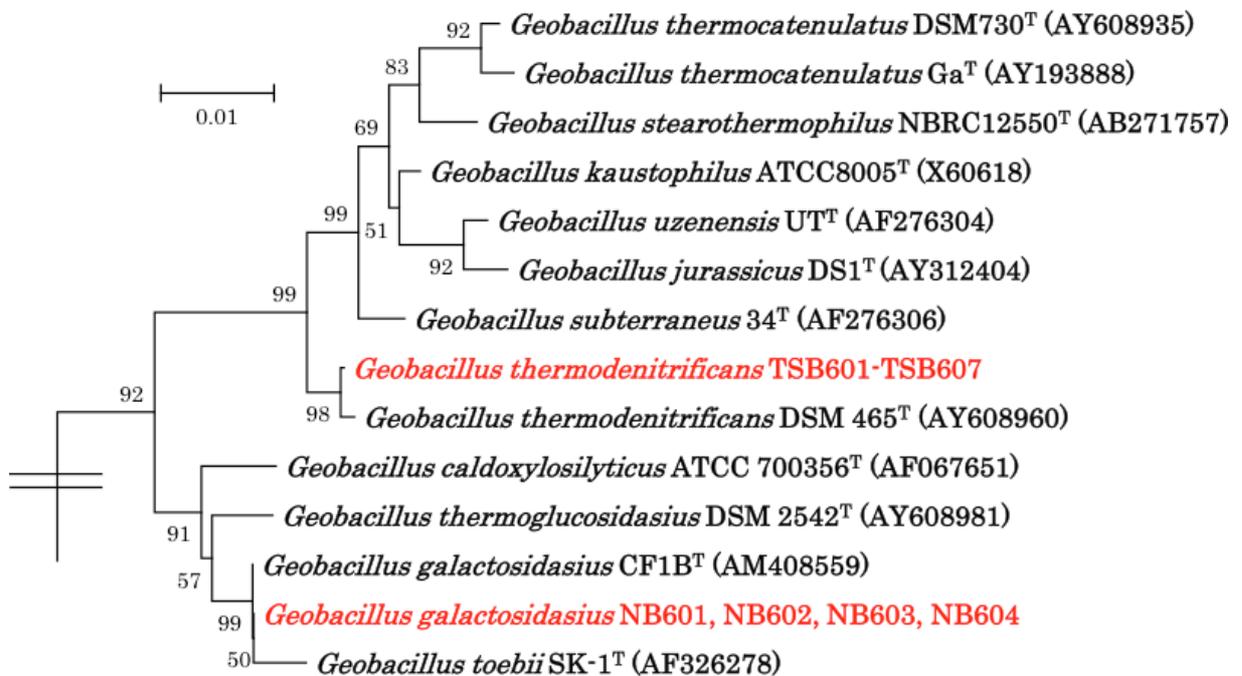


図 3-1 8 60°C で単離された 2 種類の油脂分解菌の系統学的解析

次に、廃白土混合コンポストを単離源として、TSB 培地に大豆油を 2% 添加した培地を用いて集積培養を行い、60°C で生育する油脂分解菌の単離を試みた。その結果、トリブチリン入りの TSB プレート培地上において 60°C で 1 日培養した後、大きなクリアハローを形成するコロニーがいくつか確認された。その中から 7 つのコロニーをピックアップした (図 3-1 9)。これまでに単離された *B. thermoamylovorans* NB501 株などや *G. galactosidasius* NB601 株などが形成するクリアハローよりも、大きなクリアハローを形成した。

本文

16S rRNA 遺伝子による系統学的解析では、60°C で単離された油脂分解菌 TSB601-TSB607 の 7 株はファーミキューテス門バシラス綱バシラス目バシラス科に属する *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465 の 16S rRNA 遺伝子配列と 100%の相同性を示したことから、*G. thermodenitrificans* と同定した (図 3-18)。

近年、*G. thermodenitrificans* は石油貯蔵タンクから単離され、長鎖のアルカン分解能を有するという報告があり、全ゲノムが解読、公開されている¹³⁾。そのゲノム情報を基に、短鎖脂肪酸の油脂を分解する酵素(エステラーゼ)をコードする遺伝子を数種有していることが明らかにされており、その内、一部のエステラーゼは新規性が高く、それらの性質解明が行われている^{14, 15)}。エステラーゼ以外にも長鎖脂肪酸の油脂を分解するリパーゼ活性を有しているという報告があり、実際に大豆油やオリーブ油、パーム油を分解可能であることが明らかにされている¹⁶⁾。それらの既知の情報を鑑みると、*G. thermodenitrificans* は実証試験機内で廃食用油を分解していること期待される。次節では、実際に本研究で単離された *G. thermodenitrificans* TSB602 株由来のリパーゼ活性を確認した。

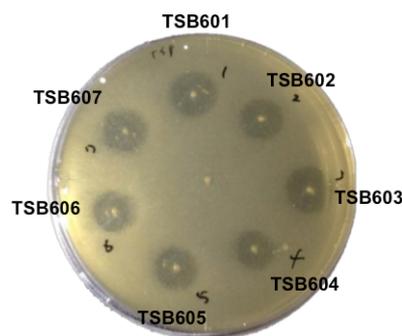


図 3-19 60°C で単離された *Geobacillus thermodenitrificans* TSB601-607 株の
クリアハロー形成

本文

3.3.5 単離された油脂分解菌由来の細胞外リパーゼの性質

3.3.5a 50°C で単離された *Bacillus thermoamylovorans* NB501 株由来

50°C で単離した *B. thermoamylovorans* NB501 株が生産するリパーゼの特性を調べた。NB501 株を培養して細胞外に分泌されたリパーゼを含む培養液を限外ろ過膜 (Amicon Ultra Centrifugal Filters-30K, ミリポア) で 28 倍に濃縮したものを酵素液としてリパーゼ活性を測定した (図 3-20)。その結果、60°C でリパーゼ活性が最大となり、至適温度は 60°C であることが示された。また、pH は 8 とアルカリ条件で活性が最大となり、至適 pH は 8 であることが示された。さらに耐熱性試験を行った結果、60°C で 48 時間処理後、活性が 57% 残存していることが示された。既知の耐熱性リパーゼは通常 65°C で、たった 30 分処理するだけで 50% 以上の活性が失われるという報告がされている¹⁷⁾。それと比較して NB501 株由来のリパーゼは高い耐熱性を有していることが示された。

また、その酵素液を SDS-PAGE に供したところ、およそ 40 k Da の位置に単一のバンドがみられた。*B. thermoamylovorans* 由来のリパーゼはアミノ酸配列が既に明らかになっており、Accession No. BAH70300 としてデータベース上に登録されている。385 個のアミノ酸からなり、およその予想分子量と SDS-PAGE の位置が一致していることが示された。その詳細なリパーゼの性質や立体構造は未だ明らかにされていないため、今後明らかにする予定である。以上の結果から、NB501 株由来のリパーゼは、耐熱性が高く、60°C が至適温度であることが示された。実証試験機内の温度 60°C 前後で油分解酵素として機能している可能性を示した。

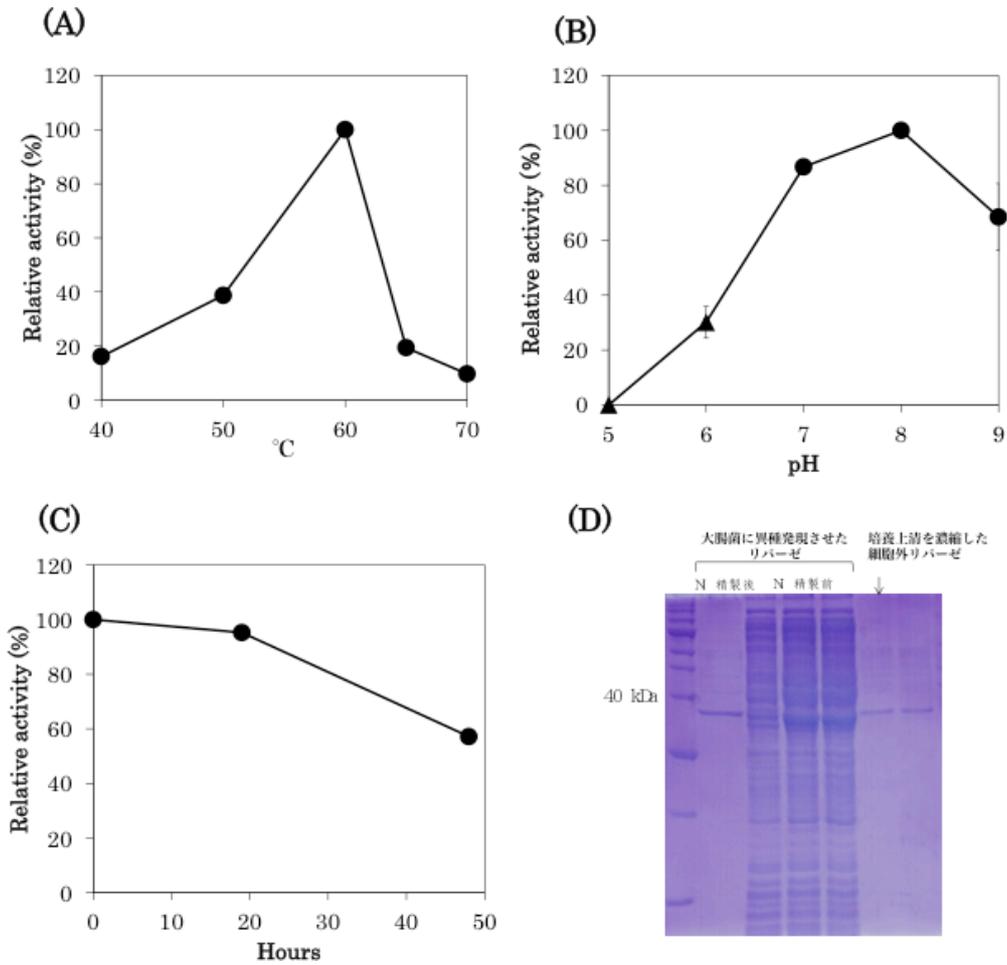


図 3-20 *Bacillus thermoamylovorans* NB501 株由来細胞外リパーゼ活性の性質
 A:至適温度, pH 8 で測定、B:至適 pH, 40 mM MES-NaOH (▲), 50 mM Tris-HCl (●)をバッファとして用いて 60°Cで測定、C: 耐熱性試験, 60 °C で各時間処理、D: SDS-PAGE (アクリルアミド 12%)

本文

3.3.5b 60°C で単離された *Geobacillus thermodenitrificans* TSB602 株

60°C で単離した *Geobacillus thermodenitrificans* TSB602 株が生産するリパーゼの性質を調べた。TSB602 を培養して細胞外に分泌されたリパーゼを含む培養液を限外ろ過膜

(Amicon Ultra Centrifugal Filters-10K, ミリポア) を用いて、16 倍に濃縮したものを酵素液として、そのリパーゼ活性を測定した (図 3-2 1)。その結果、70 °C でリパーゼ活性が最大となり、至適温度は 70 °C であることが示された。また、pH は 9 とアルカリ側で活性が最大となり、至適 pH は 9 であることが示された。さらに耐熱性試験を行った結果、65 °C で 3 時間処理後、53%活性が残存していた。既知の耐熱性リパーゼでは通常 65°C で、たった 30 分処理するだけで 50%以上の活性が失われるという報告がされている¹²⁾。それと比較して TSB602 株由来のリパーゼは比較的高い耐熱性を有していることが示された。

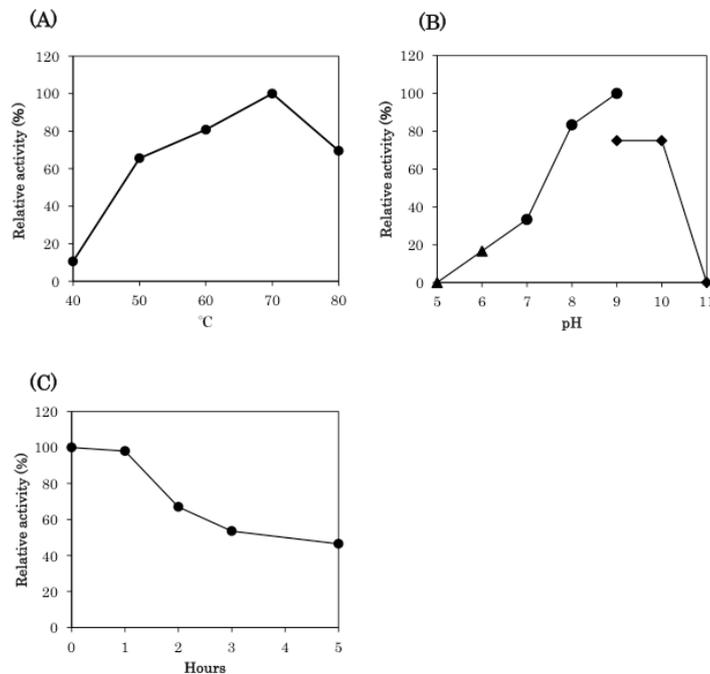


図 3-2 1 *Geobacillus thermodenitrificans* TSB602 株由来細胞外リパーゼ活性の性質
A:至適温度, pH 8 で測定、B:至適 pH, 40 mM MES-NaOH (▲), 50 mM Tris-HCl (●), 50 mM CAPS-NaOH (◆),をバッファーとして用いて 50°C で測定、C: 耐熱性試験, 65 °C で各時間処理

3.3.6 油脂分解菌の実証試験機への投入

3.3.6a 50°C で単離された *Bacillus thermoamylovorans* NB501 株

油脂分解菌として有望な候補株、*B. thermoamylovorans* NB501 株を油脂分解向上させることを目的として、実証試験機に投入するために、まず、投入に向け、可能な限り菌体量を多く回収するため、至適培養条件などの生育特性を調べた。その結果、培地は TSB 培地を用いたとき、温度は 50°C で培養したときに最も生育が良好であることが示された（図 3-2 2）。また、50°C だけでなく 60°C においても生育することが確認されたことから、60°C 前後で運転されている実証試験機内において生育可能であることが示された。以上の結果から、NB501 株を大量培養する際に、TSB 培地を用いて 50°C で培養するという培養条件が確立された。

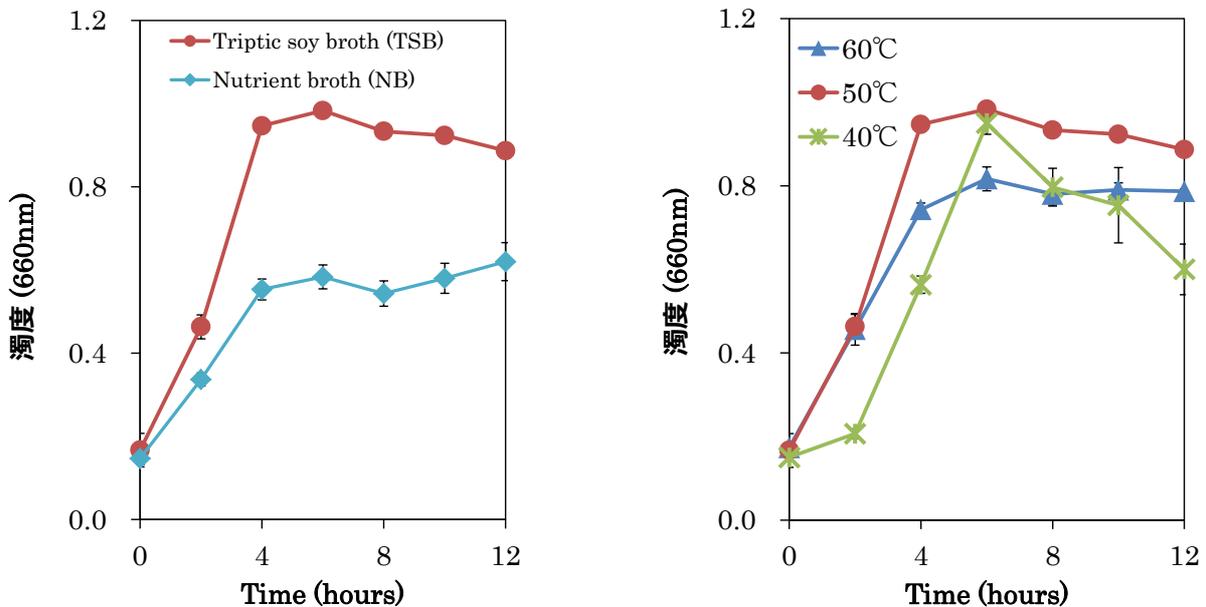


図 3-2 2 *B. thermoamylovorans* NB501 株の至適培養条件の検討

培養条件検討の結果から、NB501 株は 50°C だけでなく 60°C においても生育可能であり、また上述した NB501 株由来のリパーゼ活性測定結果からも、活性の至適温度が 60°C であることが示された。従って NB501 株は 60°C で運転している実証試験機において有効に作用すると期待された。

次に NB501 株を実証試験機へ投入するために大量培養を行った。培養条件検討の結果から、培地は TSB 培地を用いて、培養温度は 50°C で行った。最終的に 10 L にまでスケールアップし、湿菌体重量で約 40 g 回収した。それを少量の培地に懸濁して濃縮し実証試験機

本文

内に投入した（第1回目の投入）。投入後の油分解に対する効果をモニタリングしたが、油分解の向上効果は観察できなかった（前節）。その原因の一つとして、投入した菌体量が少量であったため効果がみられなかったと考えられた。そこでさらに、投入する菌体量を増加させるために2倍量、つまり20 L規模で大量培養を行い、最終的に2.5倍量の湿菌体重量で約100 g回収した（第2回目の投入）。それを少量の液体培地に懸濁して濃縮し実証試験機内に投入した。第2回目の投入においては、初期に油分解の向上効果は見られたものの、継続的な効果はみられなかった。

NB501株の添加による継続的な油分解の向上がみられなかった原因として、NB501という1種類の単離菌株のみを添加したからではないかと考えられた。自然環境や排水処理現場において生じている油分解反応は、油脂分解活性を有する1種類の微生物によるものではなく、複数種の微生物が共存することによって、効率的に分解されていると考えられる。そこで、次に複数種の微生物が共存して油分解を行っている油脂分解微生物群集を実証試験機へ投入することを試みた。

3.3.6b 複数種が共存した油脂分解微生物群集

複数種の微生物が共存して油分解を担う油脂分解微生物群集を実証試験機へ投入することを目的とし、実証試験機内の運転温度と同じ60°Cにおいて油分解微生物群集の集積を試みた。実証試験機への油分解微生物群集の投入試験は合計2回行った。

1回目の油脂分解微生物群集の構築では、2種類の微生物源（発酵オカラ、廃白土混合コンポスト）とし、2種類の培地（NBとTSB）を用いて集積培養を試みた。油脂分解微生物群集が構築されているという判断の指標として、一般的に油脂分解能の指標として用いられる方法であるクリアハロー形成を用いた。

その結果、発酵オカラを微生物源とし、NB培地を用いた集積系では、1回目の植継ぎでクリアハローが見られなくなった。TSB培地を用いた場合、1回目の植継ぎでクリアハロー形成が確認されたが、2回目以降、確認されなかった。一方、廃白土混合コンポストを微生物源とした集積系では、NB培地を用いたとき、3回の植継ぎに成功し、TSB培地を用いた時は、4回植継いでもクリアハローの形成が継続的に観察された（表3-16、図3-23）。

表 3-1 6 集積過程における油脂分解微生物群集のクリアハロー形成の有無

微生物源	培地	植継ぎの回数			
		1回目	2回目	3回目	4回目
廃白土混合コンポスト	TSB	+	+	+	+
	NB	+	+	+	-
発酵オカラ	TSB	+	-	-	-
	NB	-	-	-	-

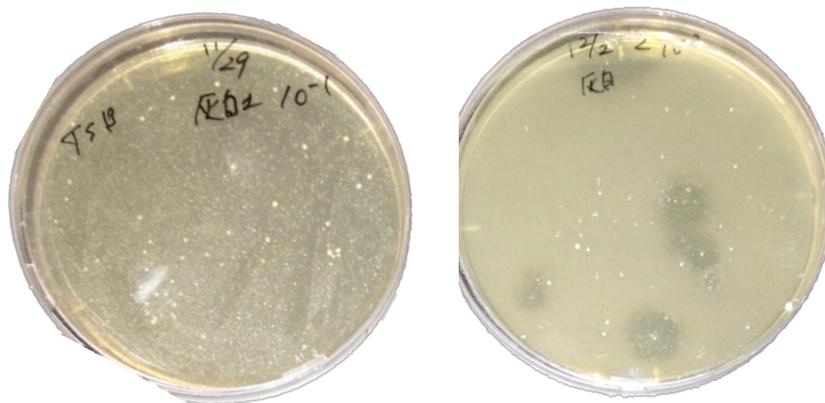


図 3-2 3 集積された油脂分解微生物群集によるクリアハロー形成能の確認

さらに、TSB 培地を用いて集積された微生物群集構造を次世代シーケンサーによって解析した。その結果、*Geobacillus* 属に属するいくつかの種が多く集積されていることが示された（表 3-1 7）。最終的に投入した微生物群集では、*G. thermodenitrificans*, *G. thermoglucosidasius* に高い相同性を示すクローン配列が多く検出された。*G. thermodenitrificans* および *G. thermoglucosidasius* について、単離に成功しておりクリアハロー形成能が確認されていることから、油脂分解能を有していると考えられる。*G. thermodenitrificans* に関しては油脂分解酵素リパーゼの性質も明らかにしている。それらが油脂分解を行うことが大いに期待される。

その集積培養液をスケールアップして 10 L の大量培養を行った際に、2 L のフラスコ 4 本中、3 本で培地の酸性化が見られ、微生物の増殖がみられなくなった。油添加し、60 °C という高温で培養したことで、油の熱酸化により生成された短鎖脂肪酸などが pH の低下を引き起こしたと考えられる。このような影響によって、中温よりも高温での油分解微生物の報告が少ない原因なのではないかと考えられた。最終的に 2 L のフラスコ 1 本分の湿菌体重量 4.7 g を回収し、少量の液体培地に懸濁して濃縮し実証試験機に投入した。

表 3-1 7 TSB 培地を用いて集積した微生物群集構造解析結果

OUT	植継ぎ1回目	植継ぎ4回目	スケールアップ後 投入したもの	Family	Genus	Species	Identity (%)
1	13	1289	962	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70	100
2	24	3	26	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	100
3	20	0	1	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	100
4	4	0	109	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i> sp. GHH01	93
5	19	0	0	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	89
6	1	0	18	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70	96
7	8	1	10	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i> sp. GHH01	91
8	5	0	38	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	93
9	0	0	16	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70	95
10	0	0	10	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC52	91
11	0	2	13	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70	95
12	0	3	33	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70	95
13	0	1	24	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70	96
14	2	0	0	<i>Bacillaceae</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	91
Total	96	1299	1260				

1 回目の集積系をスケールアップする際、熱による油の酸化で培地中の pH が酸性になり、微生物の増殖が悪化した。培地の酸性化を防ぐための改善点として、2 回目の集積では、表 2-3 のそれぞれの培地組成に加えリン酸バッファーをさらに添加し集積を行った。6 種類の培地 (NB, 1/2 NB, TSB, 1/2 TSB, LB, 1/2 LB) にリン酸バッファーを添加した培地を用いて、2%大豆油を添加したものを集積培地とした。微生物源として、1 回目の集積で良好な結果が得られた廃白土混合コンポストを接種し、1 回目と同様の培養条件で集積培養を行った。油分解微生物群集が構築されているという判断の指標として、1 回目に用いた方法であるクリアハロー形成の有無に加え、2 回目では培養上清のリパーゼ活性を経時的に測定し、新鮮培地への植継ぎのタイミングをはかった。

培養上清のリパーゼ活性を経時的に測定した結果から、3 日目以降にリパーゼ活性が高くなり、1 日や 2 日間という短期間の培養では、まだ培養上清のリパーゼ活性が低いことが示された (図 3-2 4)。このことから集積する際に、新鮮培地に植継ぐタイミングとして 3 日~5 日培養した後に新鮮培地への植継ぎを行うべきことが示された。

TSB と 1/2 TSB を用いた 2 つの集積培養条件で、継続的にリパーゼ活性とクリアハロー形成が観察された (図 3-2 5)。その内、1/2 TSB では TSB よりも高いリパーゼ活性がみられた。TSB 培地には、Tryptone が 17 g/L 含有されており、栄養に富んだ組成をしている。そのため、微生物が TSB 培地由来の栄養と同等に油脂を栄養源として資化するように、TSB を 2 倍希釈した 1/2 TSB 培地を用いた。その 1/2 TSB 培地を用いた条件において TSB 培地を用いた条件よりも高いリパーゼ活性が検出されたことから、油脂分解群集が構築されていることが示唆される。

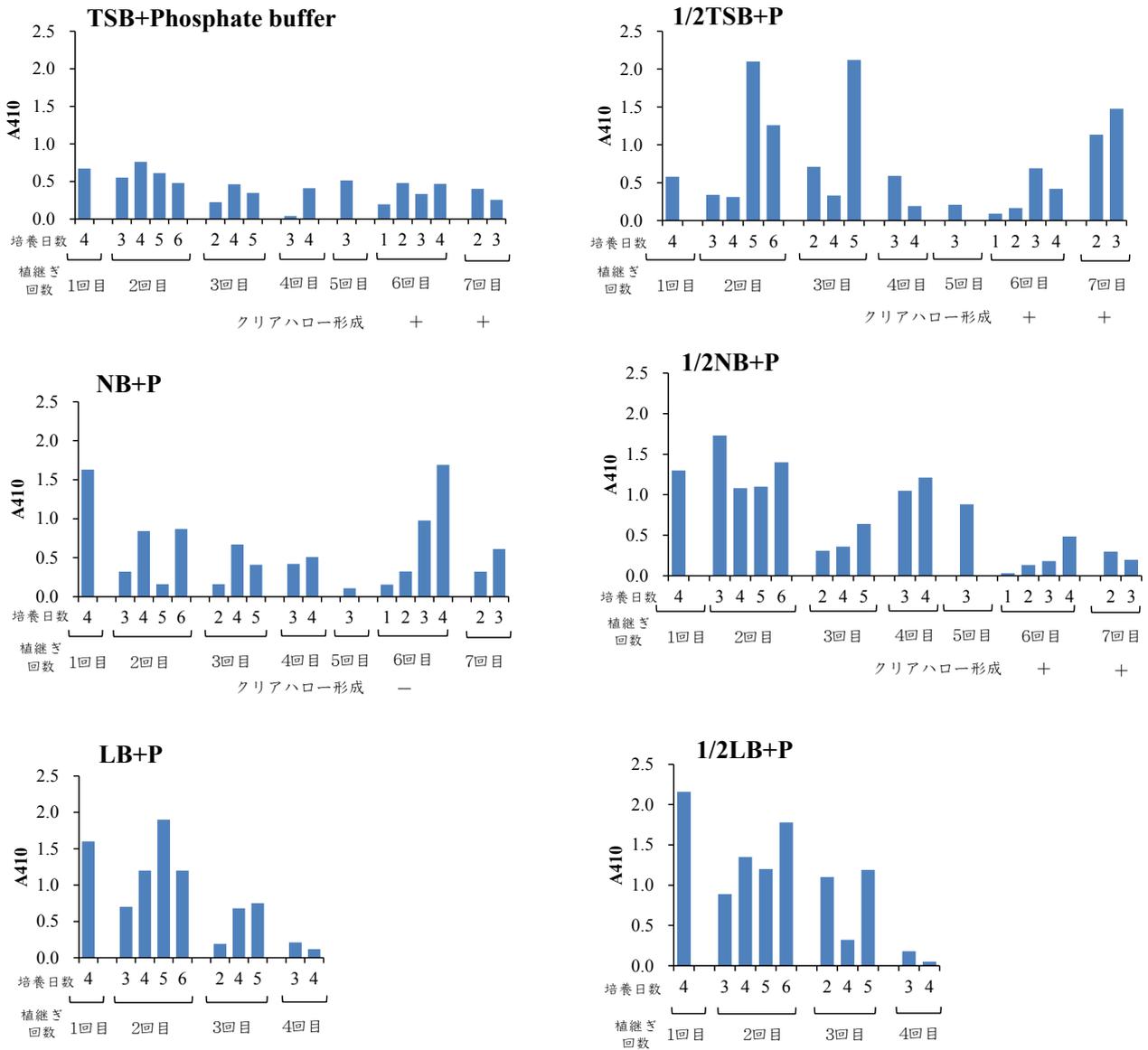


図3-24 様々な培地を用いた集積過程における培養上清のリパーゼ活性とクリアハロー形成の有無

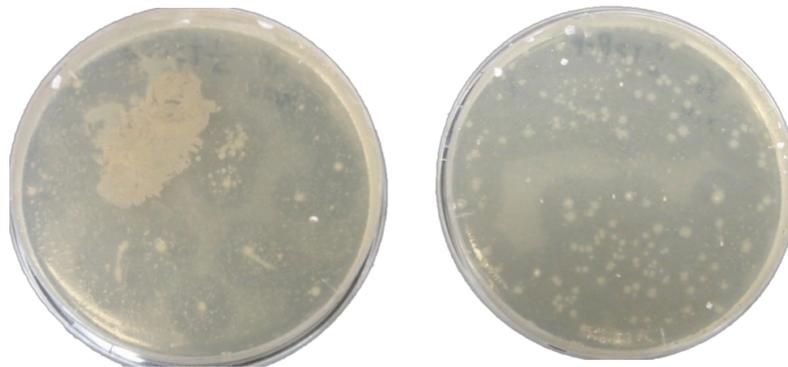


図3-25 集積した油脂分解微生物群集によるクリアハロー形成能の確認

本文

1/2 TSB 培地を用いて集積された微生物群集構造を次世代シーケンサーによって解析した。その結果、*Geobacillus* 属に属するいくつかの種が多く集積されていることが示された (表 3-18)。*G. thermoglucosidasius* に高い相同性を示すクローン配列が検出されており、さらに、1 回目の集積では検出されなかった *Symbiobacterium thermophilum* が検出されていた。*S. thermophilum* はコンポストから発見されており、好熱性共生細菌として報告されている¹³⁾。二酸化炭素やペプチドなどの低分子化合物を生育に要求し、それらを供給する *Bacillus* sp. と共培養することで、初めて増殖可能となる。*S. thermophilum* は、今回の解析で多く検出されている *Geobacillus* 属の種と共生関係を構築していることが考えられる。しかしながら *S. thermophilum* の存在比率は全体の 5% 程度と少ないことから、油脂分解への寄与は不明である。一方、検出されている *G. thermoglucosidasius* は単離に成功しておりクリアハロー形成能が確認されていることから、油脂分解能を有していると考えられる。また、他の *Geobacillus* 属に属するいくつかの種も油脂分解能を有している可能性があり、それらを主とした油脂分解群集が構築されたことが示された。

表 3-18 1/2 TSB 培地を用いて集積した微生物群集構造解析結果

OUT	植継ぎ回数				スケールアップ	投入したもの	Family	Genus	Species	Identity (%)
	1回目	2回目	3回目	5回目						
1	6	2	0	1	31	235	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus sp. WCH70	100
2	0	24	3	28	87	558	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus sp. GHH01	93
3	109	36	1	391	302	2	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus sp. WCH70	88
4	242	0	3	0	0	0	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus thermodenitrificans	89
5	3	363	8	97	1	44	Clostridiales	Symbiobacterium	Symbiobacterium thermophilum	99
6	0	0	0	6	0	0	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus sp. HYC-10	91
7	3	29	0	21	87	45	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus sp. GHH01	91
8	3	45	0	53	271	174	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus thermoglucosidasius	93
9	0	2	0	2	12	33	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus sp. GHH01	91
10	0	51	0	94	175	0	Bacillaceae	Caldalkalibacillus	Caldalkalibacillus thermarum	90
11	0	0	0	0	0	0	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus thermodenitrificans	91
12	0	0	0	1	1	13	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus sp. WCH70	94
13	0	3	0	5	10	48	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus sp. Y412MC52	91
14	37	3	1	91	76	0	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus sp. WCH70	87
15	1	0	1	0	23	15	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus thermoglucosidasius	92
16	1	1	0	4	4	14	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus sp. WCH70	95
17	0	0	0	0	1	14	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus sp. WCH70	95
18	5	389	4	84	0	20	Clostridiales	Symbiobacterium	Symbiobacterium thermophilum	96
19	0	0	0	0	3	0	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus thermodenitrificans	91
20	0	4	0	3	36	21	Bacillaceae	Geobacillus	Geobacillus sp. Y4.1MC1	92
Total	410	952	21	881	1120	1236				

廃白土混合コンポストを微生物源として、1/2 TSB で集積した群集をスケールアップして大量培養を行った。最終的に湿菌体重量で 10 g 回収し、少量の液体培地に懸濁して濃縮し実証試験機に投入した。今回の集積では、改善点である、バッファー添加を行ったことで、急激な pH の低下はみられなかった。

今回、油脂分解微生物群集が構築されているという判断の指標として上記の 2 つの方法、クリアハロー形成の有無と培養上清のリパーゼ活性を用いた。容易な指標を用いることで、迅速に植次ぎを行うかどうかの判断が可能となる。それ以外の指標として、実際の油分解量を測定する必要があるが、振とう培養中に添加した油がシリコンキャップに付着して定量の際に抽出が困難であること、液体培養液からの抽出効率の問題が残された。培養上清のリパ

本文

一ゼ活性は簡易に測定可能であるため、一つの指標として有用であると考えられる。今後、油分解量の定量に関するそれらの問題を克服し、油分解の定量結果も合わせて指標とすることで、高効率な油脂分解微生物群集の構築を評価することが重要だと考えられる。

3.4 脂質の分析手法の開発

3.4.1 HPLC による分析法の開発

まず、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析法の開発を目指した。移動相としてアセトンとアセトニトリルを用い、その比率を変えた際の、波長 210 nm における吸光により試料を検出したクロマトグラムを図 3-2 6 に示す。アセトンとアセトニトリルの比を 50 : 50 (v/v) とすることで 1-Oleoyl-*rac*-glycerol (モノアシルグリセロールの一種) とオレイン酸 (脂肪酸の一種) のピークが分離したが、トリオレイン (トリアシルグリセロールの一種) の保持時間が長くなることでピークがブロードになり、検出感度が大きく低下した。ここで、波長 210 nm における吸光を各試料の検出に用いているが、これは化合物中の二重結合の数によりその強度が変化してしまうため、二重結合数の組合せが複雑な廃食用油およびその加水分解物の定量には用いることができない。それに対し、示差屈折計による検出は、感度が劣るものの化合物の構造による影響を受けにくい特徴を有する。

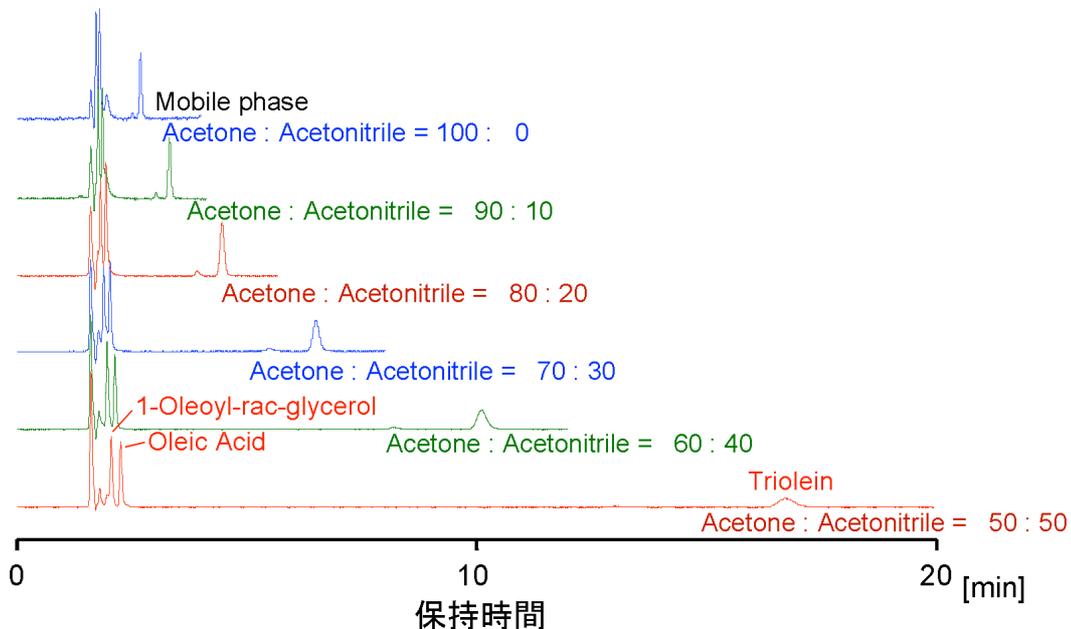


図 3-2 6 移動相の比率を変えた際の HPLC クロマトグラム

試料濃度 : 500 ppm (アセトン溶液)、検出 : UV 210 nm

そこで、移動相をアセトン : アセトニトリル = 50 : 50 として示差屈折計により測定した結果を図 3-2 7 に示す。示差屈折計を用いた結果、大きな問題点が生じた。まず、夾雑物質に由来すると考えられるピークが現れ、これが 1-Oleoyl-*rac*-glycerol およびオレイン酸のピークと重なってしまい、本条件が定量に適さないものとなった。さらに、検出感度の低下により、試料濃度を先の 210 nm における吸光測定の場合の 3 倍にしても関わらず、トリオレインが検出限界以下となった。

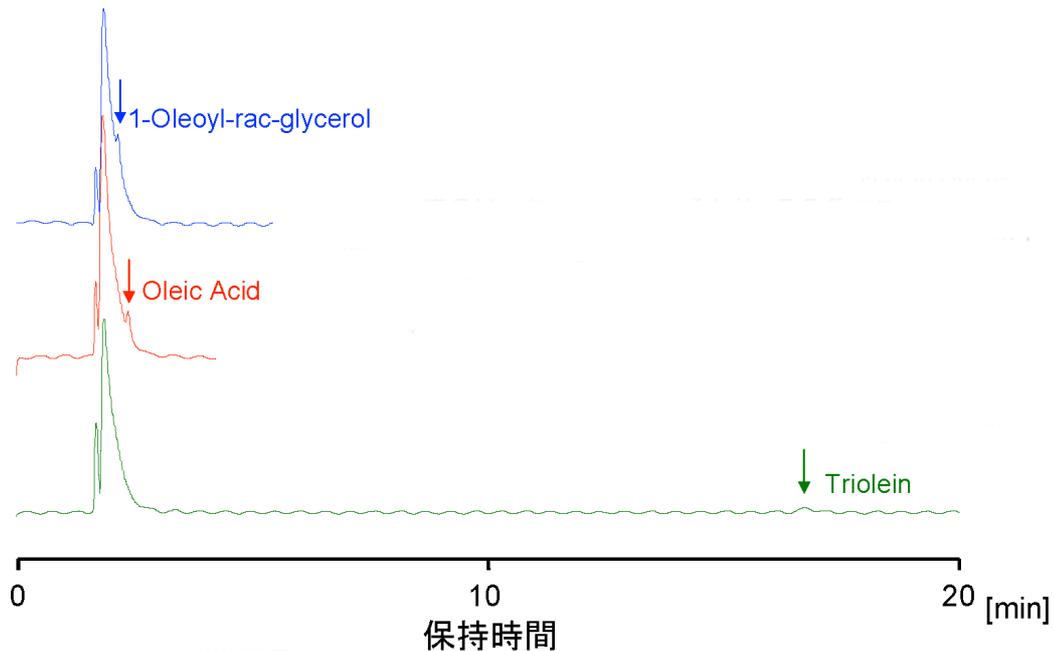


図 3-2 7 検出器として示差屈折計を用いた際の HPLC クロマトグラム
試料濃度 : 1, 500 ppm (アセトン溶液)、移動相 : アセトン : アセトニトリル = 50 : 50 (v/v)

HPLC を用いたアシルグリセロール類および脂肪酸の定量分析については、分析前処理が必要ないという利点があるものの、予備的な検討において下記に示す問題点が明らかとなった。

- ・イソクラティックモード（移動相の組成を一定の値に固定して分析する手法）では、アシルグリセロール類および脂肪酸の保持時間に大きな差があり、一斉検出が難しい
- ・検出器として示差屈折計を用いなければならないが、示差屈折計はイソクラティックモードでしか利用できない
- ・示差屈折計を用いると、感度が著しく低下するのみならず、夾雑物に由来すると思われるピークにより、定量能が失われる

以上の問題点より、HPLC を用いた廃食用油およびその加水分解物の一斉定量は困難であることが明らかとなった。よって HPLC を用いたアシルグリセロール類および脂肪酸の定量分析に関する検討を終了とした。

3. 4. 2 TLC による分析法の開発

3. 4. 2a TLC によるアシルグリセロール類および脂肪酸の分離分析条件の確立

薄層クロマトグラフィー(TLC)のプレートとして TLC Silica gel 60 F₂₅₄ を用い、展開溶媒をヘキサン (Hex) : ジイソプロピルエーテル (IPE) : 酢酸 (AA) = 60 : 40 : 1 (v/v/v、以下同じ) として、100 mg / ml ジアシルグリセロール (DG) 油 1 μ l、同 0.5 μ l、20 mg / ml DG 油 1 μ l、同 0.5 μ l をプレートに着点し展開した。結果を図 3-2 8 に示す。DG に由来す

本文

るスポットに加え、DG 油に含まれるトリアシルグリセロール (TG) およびモノアシルグリセロール (MG) に由来するスポットも確認できた。しかし、DG の二つの構造異性体である 1,2-DG と 1,3-DG のスポットが十分に分離せず重なっていた。また MG についてはほとんど展開されなかった。TLC プレートへの試料の供与量については、脂質濃度 20 mg / ml の溶液を 0.5 μ l 着点した条件において、スポットの形状、大きさ、濃度が適当であると判断した。

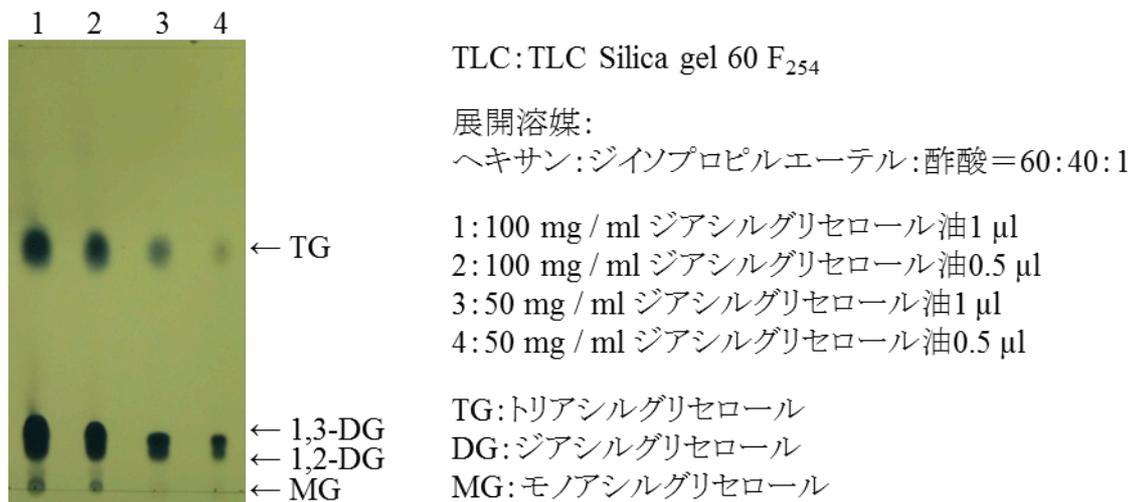


図 3-2 8 TLC を用いた脂質の分離分析

続いて、展開溶媒の組成を極性が高くなるよう変化させ、分離分析条件の改善を試みた。検討の結果、図 3-2 9 に示すように、Hex : IPE : AA = 50 : 50 : 1 とした時に 1,2-DG と 1,3-DG のスポットが分離し、MG もわずかに展開された。MG の移動度はわずかであるが、これにより、リン脂質や糖脂質といった極性の高い脂質が抽出液に混入した場合でも分離分析が可能となる。また、異なる試料として、DG 油の他に大豆油とモノオレインも同時に分析した。その結果、大豆油の主成分である TG や、モノオレイン中の MG も良好なスポットを形成した。

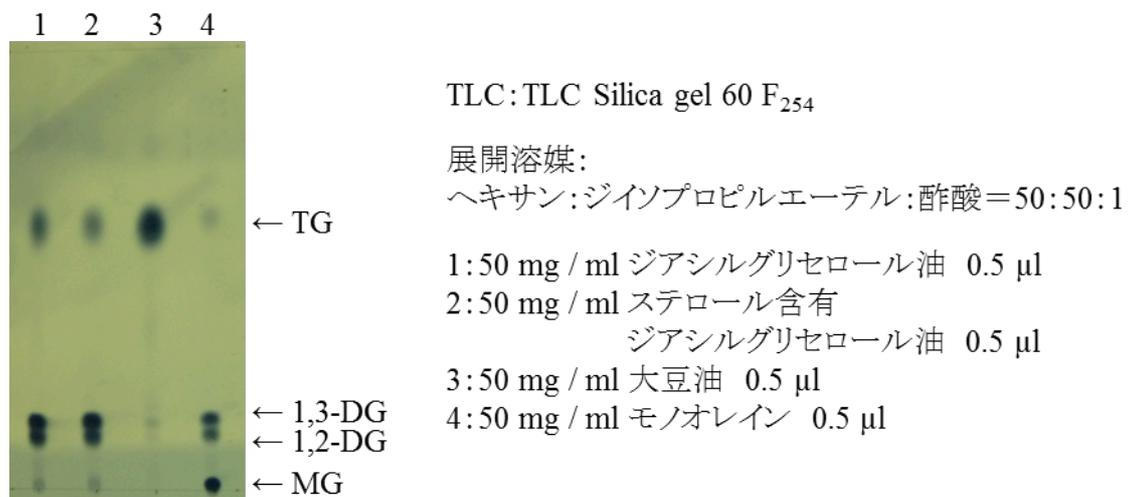


図 3-2 9 最適化条件における脂質の TLC 分析

本文

さらに、TLC プレートとして HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ を用い、先の図と同じ条件にて、DG 油、大豆油、廃食用油、モノオレインの分析を行った (図 3-30)。その結果、移動度の大きい TG のスポット形状が大きく改善され、1,2-DG と 1,3-DG のスポットの分離も良くなった。また、廃食用油の分析においても良好な分離を示し、遊離脂肪酸の含有も確認された。



図 3-30 最適化条件における脂質の HPTLC を用いた分析

以上の検討により、TLC によるアシルグリセロール類および遊離脂肪酸の分離分析において、スポットの形状がよく、良好に分離する条件を確立し、廃食用油の分析にも適用が可能であることを確認した。

3.4.2b 油脂資化菌による廃食用油の分解評価への応用

培養液からの脂質の抽出法を確立するための予備検討として、純水および培養前の LB 培地を用いて脂質抽出の検討を行った。総脂質の抽出は、もっとも汎用されている抽出方法の一つである Bligh-Dyer 法をベースとし、有機溶媒の使用量を減らすために若干の改変を加えた。通常はメタノールとクロロホルム、そして水を添加して脂質を抽出するが、水の添加を行わないことにより、メタノールの使用量を 1/3 に、クロロホルムの使用量を 4/5 に減少させた。その他は定法に従い、脂質をクロロホルム層に抽出し分取した後、再度クロロホルムを添加して二回目の抽出を行い、抽出効率、回収率を確認した。脂質抽出の結果を表 3.1 に、抽出した脂質の TLC による分析結果を図 3-31 に示す。純水、あるいは LB 培地に廃食用油を添加した系における回収率は、ともにほぼ 100%と良好な結果であった。さらに、各抽出とも、一回目の抽出において添加した廃食用油がほぼ回収されていた。また、LB 培地からの脂質抽出においては、抽出量にわずかな正の誤差を与えたが、TLC による分析には影響を与えないことを確認した。

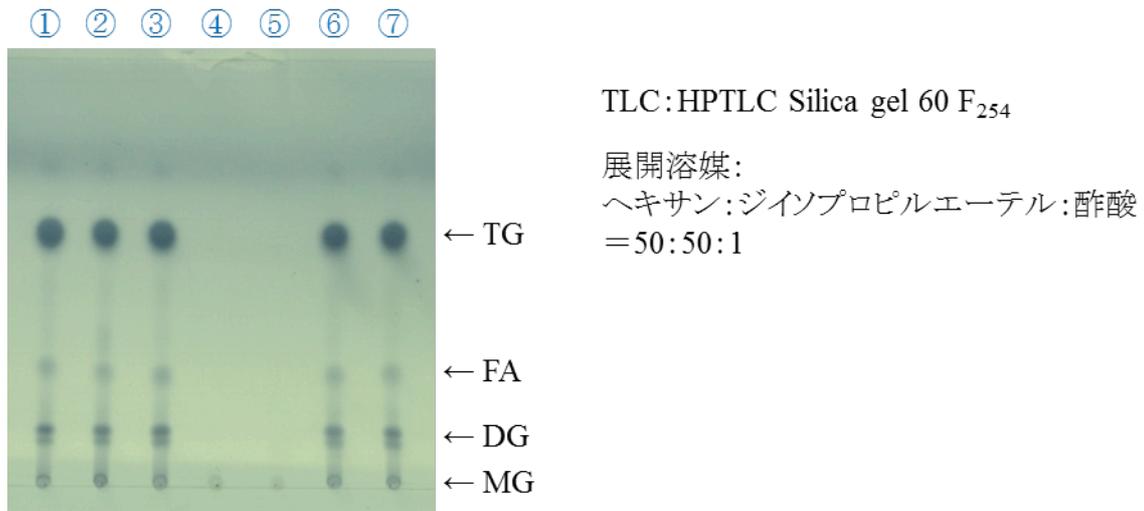


図 3-3 1 廃食用油を添加した純水および LB 培地からの脂質抽出物の TLC 分析

次に、確立した TLC による脂質の分析法を用いることで、廃食用油の主成分であるトリアシルグリセロール (TG) の加水分解を評価することが可能であるかを確認した。市販されている *Candida rugosa* 由来のリパーゼを用いて大豆油を加水分解した後、総脂質を抽出し、TLC により脂質の分析を行った。結果を表 3-1 9 および図 3-3 2 に示す。図より、リパーゼの濃度が高くなるに従い、抽出物中の TG が減少し、加水分解により生成されるジアシルグリセロール (DG)、モノアシルグリセロール (MG) および遊離脂肪酸 (FA) の濃度が増加することを確認した。なお、表 3.2 より、リパーゼを添加していない系を含め、脂質の回収率は 102 から 103%とわずかに正の誤差を示した。これは、リパーゼによる加水分解反応を安定化させるために用いた緩衝溶液の成分であるトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンが、脂質抽出液にごく微量混入したためである。

表 3-1 9 実験条件と抽出物の重量 (単位 : mg) および回収率 (丸数字は図に対応)

条件	油添加量	1回目抽出量	2回目抽出量	総抽出量	回収率(%)	
0.5 mg/mlリパーゼ溶液2 ml	46	44	①	2	47	102
0.05 mg/mlリパーゼ溶液2 ml	39	39	②	1	40	103
0.005 mg/mlリパーゼ溶液2 ml	37	37	③	1	38	103
50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 2 ml	39	39	④	1	40	103

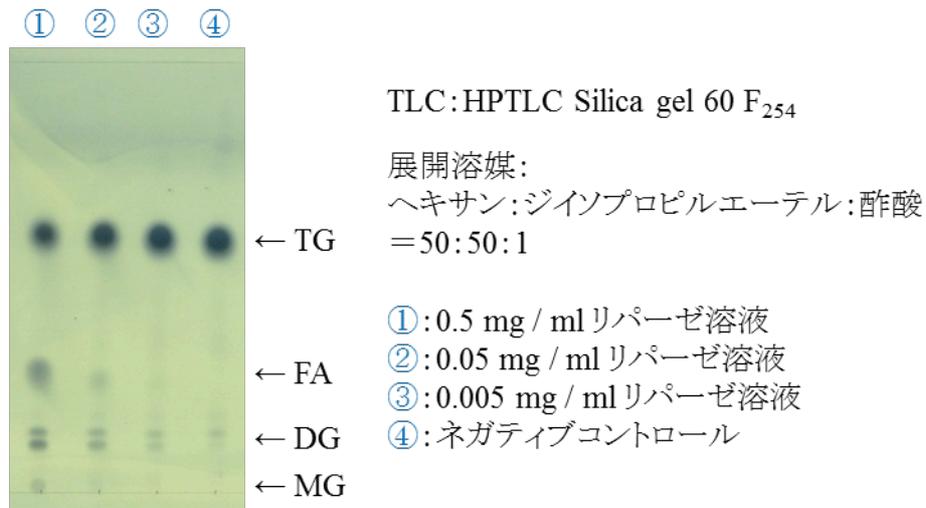


図 3-3 2 リパーゼを作用させた大豆油からの脂質抽出物の TLC 分析

以上の検討の結果を踏まえ、廃食用油を添加した培養液からの脂質の抽出と、TLC 分析を用いた油脂資化菌による廃食用油の分解を評価した。油脂資化菌のスクリーニングにおいて単離された菌株の中から、*Cronobacter* 属に属し、プレートアッセイにおいて最もクリアハローが観察された NB18 株と、同じ属に属する LB1 株、そして *Acinetobacter* 属に属する LB2 および LB17 株を用い、廃食用油を添加した LB 培地で培養し、脂質の抽出および TLC による分析により、廃食用油の分解を確認した。脂質を抽出するために、菌体培養液にメタノールおよびクロロホルムを添加し攪拌したところ、予備検討では見られなかったエマルジョン層が形成され、二層に分離しなかった。そこで遠心分離を行うことにより上層および下層が形成されたが、生育活性の高かった LB2 および LB17 株の培養液においては、タンパク質の凝集塊と思われる中間層が、他に比べより多く確認された。脂質抽出の結果を表 3.3 に示す。LB 培地に菌を植菌していないネガティブコントロールにおいて、脂質の回収率が 91%と約 1 割減少した。これはインキュベート中に脂質の一部が過酸化された結果であると考えられる。さらに LB2、LB17 株を培養した系において回収率がそれぞれ 70%、63%となり、明らかにネガティブコントロールの値よりも低くなったことから、添加した廃食用油の分解が期待された。しかし、TLC の分析 (図 3-3 3) においてスポットのパターンが他と同じであったことから、TG が分解したとは考えにくく、脂質の抽出工程においてタンパク質の凝集塊と思われる中間層が形成されたことによって、抽出効率が低下した結果であると判断した。しかし、単離菌を培養したすべての系において、廃食用油に含まれる遊離脂肪酸を示すスポットが消失しており、単離菌の培養により資化されていた。

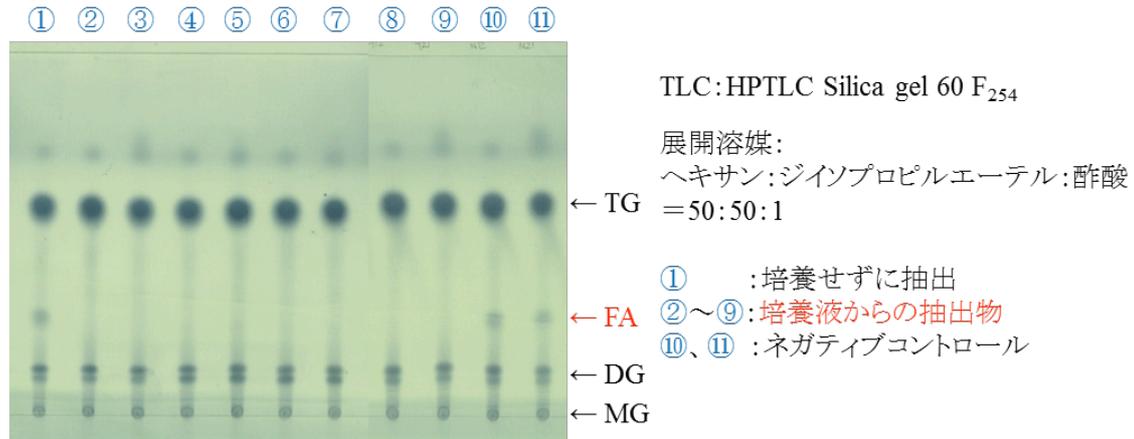


図 3-3 3 脂質資化菌の廃食用油含有培地の培養液からの脂質抽出物の TLC 分析

TLC は脂質の分離や分析を行う上で有用な手段として用いられてきた。しかし、TLC プレートと展開溶媒の組合せは、研究の目的に応じて慎重に選択する必要がある。これまで、アシルグリセリド類および脂肪酸の分離分析においては、石油エーテル、ジエチルエーテル、酢酸の組合せが展開溶媒として用いられてきた。しかし、石油エーテルはペンタン、イソペンタン、ヘキサンを主成分とした混合物であり、再現性に問題があるだけでなく、大きな割合を占めるペンタン、イソペンタンは沸点が非常に低く引火しやすいことから、特殊引火物に指定されている。同様に、ジエチルエーテルも特殊引火物であり、さらに経時変化により爆発性の過酸化物を生成することから、東京大学においては排出が制限されている。そこで、展開溶媒の組合せをより沸点が高いヘキサン、ジイソプロピルエーテル、酢酸とし、脂質の TLC による分離条件を検討した。また、試料の濃度および分析に供する液量についても検討を行った。その結果、希釈濃度を抽出物 20 mg / ml 希釈溶媒、分析に供する液量を 0.5 μ l とし、展開溶媒をヘキサン:ジイソプロピルエーテル:酢酸=50:50:1 (v/v/v) にすることで、アシルグリセリド類および遊離脂肪酸のスポットが形状よく、良好に分離する条件を確立した。さらに TLC として、粒子径が小さく特殊なシリカゲルでコーティングされている高分解能 TLC (high-performance TLC : HPTLC) を用いることで、分離分解能およびスポット形状が改善された。そして、確立した条件において、廃食用油およびその加水分解物の分析が可能であることを確認した。次に、培養液からの総脂質の抽出法を検討した。総脂質の抽出は、もっとも汎用されている抽出方法の一つである Bligh-Dyer 法をベースとし、改変を加えることでメタノールの使用量を 1/3 に、クロロホルムの使用量を 4/5 に減少させた。有機溶媒の使用量は、その廃棄量だけでなく大気への蒸発量へも直接関係するため、昨今の有機溶媒の使用に関する環境を鑑みると、有用な改変であると考えられる。続いて、培養液からの総脂質の抽出法と TLC による脂質の分析法を組合せることで、大豆油の主成分であるトリアシルグリセロールのリパーゼによる分解の評価を試みた。その結果、酵素の添加量に応じて、トリアシルグリセロールに対応するスポットが減少、縮小し、分解生成物であるモノ、ジアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸のスポット濃度が増加した。この結果から、培養液に添加した廃食用油の分解を評価できることを確認した。なお、TLC 上の脂質スポッ

本文

トの検出には、リンモリブデン酸試薬を用いた染色法を用いており、デンシトメトリー定量（スポットの大きさと濃度の比較による定量法）により、廃食用油の主成分であるトリアシルグリセロールの分解を追跡することができる。以上の検討結果をもとに、油脂資化菌のスクリーニングにより単離された菌を用いて、廃食用油の分解評価を行った。残念ながら、単離菌の液体培養による検討では、廃食用油は分解されていなかった。しかし、廃食用油に含まれる遊離脂肪酸が資化されていることが明らかとなった。これは新たな知見であり、油脂分解菌の集積培養法とスクリーニング法を構築するにあたり、非常に重要なものである。本検討において確立した TLC による脂質の分析法は、展開溶媒の安全性を向上させつつ、高分解能でアシルグリセロール類および遊離脂肪酸の分離分析が可能であり、培養液からの総脂質の抽出法と組み合わせることにより、単離した油脂分解菌の廃食用油分解能の評価や、オカラの好気高温性発酵システムにおける廃食用油処理能の評価に、大いに活用できる。

3.4.3 ガスクロマトグラフィー（GC）による定量法の開発

廃食用油含有オカラ好気発酵物中の脂質は、最も一般的なクロロホルム：メタノール＝2：1 (v/v) 溶液を用いて抽出した。また、抽出を二回繰り返すことで脂質は十分に抽出された。抽出した脂質には、トリアシルグリセロールの加水分解により生成されるモノ、ジアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸が含まれるが、これらは分子内に水酸基を有するため、そのままでは GC による分析は難しい。そこで、トリメチルシリル（TMS）化試薬である Tri-Sil TP 溶液を用いて誘導体化した。

GC 分析に使用するカラムについては、耐熱性に優れる金属キャピラリータイプのカラムを含め検討を行った。その結果、耐熱性では金属キャピラリータイプのカラムには劣るものの、扱いやすさの点から熔融石英キャピラリータイプを選択し、その中でも耐熱性に優れる SLB-5ms Capillary GC Column (Sigma-Aldrich) を用いることとした。さらに、カラムの昇温条件についても種々検討を行い、表 3-20 に示す条件において、沸点が高いトリアシルグリセロールを良好に検出した。なお、検出には C-H 結合を持つ化合物に対して高い感度を有する水素炎イオン化検出器（Flame Ionization Detector：FID）を用いた。

表 3-20 GC による脂質抽出物の分析条件

カラム	: SLB-5ms Capillary GC Column (Sigma-Aldrich) (L x I.D. 30 m x 0.25 μ m、df 0.25 μ m)
キャリアガス	: ヘリウム
試料注入量	: 1 μ l
検出器	: 水素炎イオン化検出器 (FID)
注入口温度	: 355 $^{\circ}$ C
カラム温度	: 200 $^{\circ}$ C (5 min) \rightarrow 3 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 350 $^{\circ}$ C \rightarrow 1 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 365 $^{\circ}$ C (10 min)
検出器温度	: 355 $^{\circ}$ C

次に、確立した抽出法および GC による分析法を用いて、廃食用油含有オカラ好気発酵物から TMS 誘導体化脂質抽出物を調製し、GC-FID 法により分析した (図 3-3 4)。その結果、トリアシルグリセロールと、TMS 誘導体化されたジアシルグリセロールを検出することができた。しかし、モノアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸を同定するには至らなかった。

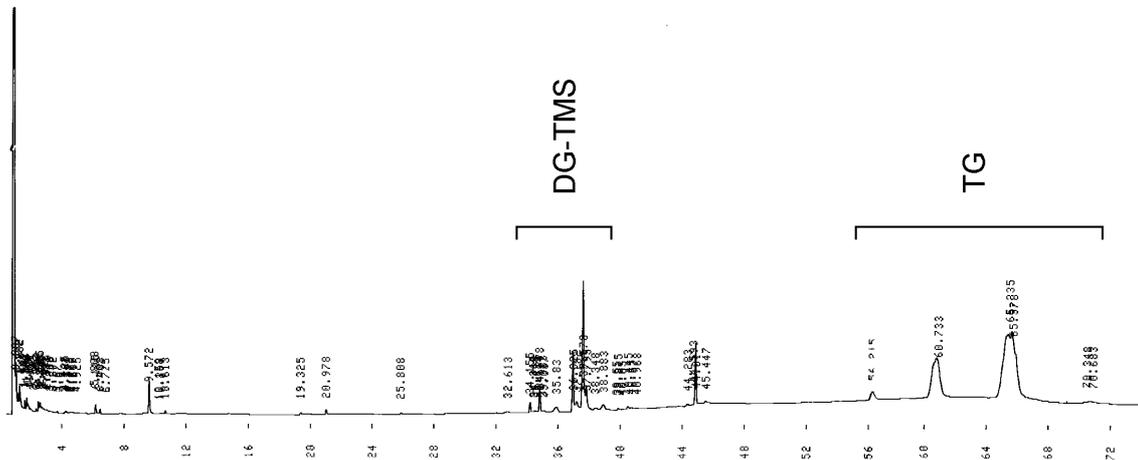


図 3-3 4 オカラ好気発酵物から調製した脂質抽出物のトリメチルシリル誘導体化物の GC-FID クロマトグラム

DG-TMS : ジアシルグリセロールトリメチルシリル誘導体、TG : トリアシルグリセロール

GC による分析は、原則として分析対象物が気化する物質で無ければ分析出来ない。そのため、廃食用油の主成分であるトリアシルグリセロール (TG) といった沸点の高い化合物の、GC による分析は非常に困難である。しかし近年、超耐熱性のキャピラリーカラムが開発され、高温条件下での GC 分析が検討されつつある。そこで本検討においては、耐熱性に優れた金属キャピラリータイプのカラムを含め検討を行った。検出器については、近年、高感度な質量分析計を用いた分析が、脂質分析に限らず多く報告されている。しかし、TG を構成する脂肪酸側鎖中の二重結合の数が異なるとイオン化強度も異なる。そのため、本検討において、質量分析計は検出器として適さない。これに対し、水素炎イオン化検出器 (Flame Ionization Detector:FID) は C-H 結合を持つ化合物に対して高い感度を有するだけでなく、類似化合物に対し二重結合の数に依存せず同等のイオン強度を示すため、本検討において有効的な検出器である。GC-FID による分析条件検討の結果、TG およびジアシルグリセロール (DG) のトリメチルシリル (TMS) 誘導体化物を示すピークを検出することが可能となった。なお、TG を示すピークが複数現れているのは、TG を構成する脂肪酸の炭素鎖長の総和に由来している。最も大きなピークは、炭素鎖長が 18 (C18) の脂肪酸 3 本により構成されている TG を示しており、これは、大豆油に含まれる脂肪酸の 50%以上がリノール酸 (C18) であることに関係している。DG-TMS のピークがさらに複雑に分離しているのは、上記の TG と同様の理由に加え、1, 2-DG と 1, 3-DG でさらにピークが分かれることに由来する。以上のように、TG および DG-TMS を検出することが可能となったが、モノアシルグリセロール (MG) および遊離脂肪酸 (FA) の TMS 誘導体を同定するには至らなかった。

4. 結論

4.1 実証試験機を用いたシステム開発

- (1) 廃白土混合コンポストを添加して発酵日数 5 日間で油分分解率は 21%であった。これは従来にない高い値であった。
- (2) 廃食用油を添加することでヒーター電力を 26%低減できた。
- (3) 乾物と油分の分解熱で必要熱量の 39%を賄うことができた。
- (4) 油分分解効果が高い高温菌は活性が pH に大きく影響され、活性が高い pH 域は 8 前後であり、それより下の中性域、酸性域では急速に活性が低下することが明らかになった。
- (5) 油分の分解は弱アルカリ域で効果が高く、そのためアンモニアも高濃度で生成する。簡易な構成の微生物脱臭器を用いて高い効率でアンモニアを除去できた。
- (6) 副資材を用いずに高含水率のオカラと廃食用油を 5%添加して 3ヶ月間安定した運転が可能であった。
- (7) 家庭から排出される廃食用油を用いても同等の効果が得られた。
- (8) 発酵槽内は連続通気と連続攪拌により好気的な条件が保たれているが、念のためメタンガスの分析をしたところ 0.1%(v/v)以下であった。

以上のことから、高含水率の食品加工残渣や生ごみなどを飼料化・堆肥化・減量化および乾燥ができる好熱性油脂分解菌を利用した廃食用油添加型高温好気性発酵処理システムを開発できた。

4.2 微生物添加効果の検証

実証試験装置に各種の微生物を添加した結果の検証として、以下の 5 回の投入試験において、高精度の分析を行った。

- (1) コントロール条件
- (2) NB501 株添加 1 回目 (40 g)
- (3) NB501 株添加 2 回目 (100 g)
- (4) 廃白土コンポスト添加 (コントロール週も含めた 5 週間のモニタリング)
- (5) 好熱性油脂分解微生物群集添加

コントロール条件においては 1 週間で約 4 kg 程度の脂質と、20 kg 弱程度の差分基質 (脂質以外の有機物) が分解されており、高温好気発酵において、微生物による分解が起きていることが確認された。本研究で単離したリパーゼ生産菌 *B. thermoamylovorans* NB501 株を添加した結果、1 回目 (40 g) では効果が見られなかったのに対し、湿菌体重量で 2 倍以上の 100 g を投入した 2 回目では、2 週間の間、脂質分解量が 5.6~5.8 kg と上昇し、CO₂ 発生量も増加した。しかし、3 回目では逆に脂質分解量が低下し、微生物活性が低下した。

本文

好熱性油脂分解微生物群集（60℃で油脂を炭素源として集積培養を行った微生物資材）を4.7 g 添加した場合も、1週目は脂質分解量（6.6 kg）とCO₂発生量の増加が見られたが、やはり2週目から活性が低下した。

しかし、微生物資材として、廃白土混合コンポストを7.1 kg 投入した結果、脂質分解量は6.6 kg（2週目）→8.5 kg（4週目）と持続的に上昇し、CO₂発生量も継続的に高くなった。約1ヶ月の間、高活性が維持されたことから、廃白土混合コンポストの投入が本システムの高機能化に有用であったことになる。

廃白土混合コンポスト添加における微生物群集解析を、次世代シーケンサーを用いて行った結果、*B. thermoamylovorans* NB501 株にごく近縁の *B. thermolactis* が増加していたことが分かった。

本研究で添加したNB501 株や好熱性油脂分解微生物群集の量は、湿菌体重量で100 g 以下であり、廃白土混合コンポストの添加量より大幅に少ない。実験室レベルの培養でkg 単位の菌体の添加を行うことは難しいが、廃白土混合コンポストの添加において効果を示している（リパーゼの生産に寄与している）微生物は、NB501 株に近縁の微生物である可能性が高いといえる。

4.3 好熱性油脂分解菌の探索と性質解明

実証試験機の発酵オカラまたは廃白土混合コンポストを単離源として、廃食用油、トリオレイン、大豆油など多様な油脂をNBやTSBなどの培地をそれぞれ組み合わせたことにより、40℃、50℃さらには60℃で生育する5種類の好熱性油脂分解菌の単離に成功した。40℃では *Acinetobacter baumannii* と *Cronobacter sakazakii*、50℃では *Bacillus thermoamylovorans*、60℃では *Geobacillus galactosidasius* と *Geobacillus thermodenitrificans* を単離した。また、*B. thermoamylovorans* と *G. thermodenitrificans* については、そのリパーゼの性質を調査し、それぞれ60℃と70℃が至適温度となることと、どちらも高い耐熱性を有することを明らかにした。上記の微生物の中でも特に高温域60℃で生育可能であり、生産するリパーゼの至適温度が60℃以上の油脂分解酵素活性を示す微生物に関しては、実証試験機内において廃食用油の分解に関与していると考えられる。次世代シーケンサーを用いた群集解析からは、60℃における集積培養において、*Geobacillus* 属に属するいくつかの種が多く集積されていることが示された。

4.4 脂質の分析手法の開発

廃食用油の主成分であるトリアシルグリセロールの分解過程を経時的に定量することを目的として、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、ガスクロマトグラフィー（GC）を用いた分析法の開発を検討した。HPLC を用いた定量に関しては、予備検討の段階で困難であることが明らかになり、検討を終了した。TLC を用いた脂質の分析法に関しては、展開溶媒の安全性を向上させつつ、高分解能で、廃食用油の主成分で

本文

あるトリアシルグリセロールと、その分解生成物であるモノ、ジアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸のスポットが形状よく、良好に分離する条件を確立した。さらに、脂質の抽出法を組み合わせることで、単離した油脂分解菌の廃食用油分解能の評価や、オカラの好気高温性発酵システムにおける廃食用油処理能の評価への応用が可能である。GC を用いた脂質の定量分析においては、共同研究の形で開発を行った。カラムの選定においては、耐熱性に優れる金属キャピラリータイプのカラムを含め検討を行い、汎用性の高い微極性溶融石英キャピラリーカラムの中でも耐熱性の高いカラムを用いることで、沸点の高いトリアシルグリセロールを良好に検出する条件を確立した。また、ジアシルグリセロールについても誘導体化することで検出が可能であった。しかし、モノアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸の誘導体を同定するには至らなかった。

4.5 研究期間終了後の展開の可能性

4.5.1 スケールアップについて

本システムはオカラだけでなく他の食品加工残渣（ビール粕、焼酎粕、果汁絞り粕など）や生ごみにも適用できる。ただし醤油絞り粕は含水率が低く塩分が高いため検討が必要である。

オカラの場合は年間70万トンが排出されている¹⁸⁾。豆腐製造業者は小～中規模事業者が多いとみられるが、大規模事業者も存在している。神奈川県における豆腐製造業者のアンケート¹⁹⁾では図4-1に示すように50～100 kg/日程度のオカラ量の事業者が最も多く、これらは実証試験機の規模に相当する。1 t/日程度の大規模事業者もおられるので、スケールアップにより対応する。

本システムは密閉構造の発酵乾燥方式で、横軸の攪拌機構を備えているので軸長軸径の制約から装置ユニットとしてはスケールアップに限界がある。現在のところ1 t/日程度までスケールアップ可能であると考えており、それ以上は多軸の横型攪拌機を設けた現地組み立て型（プラント型）で対応できる。

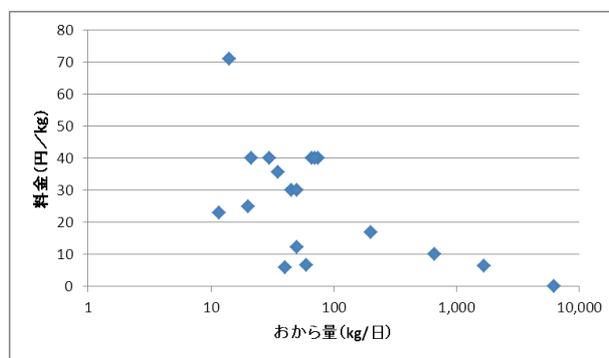


図4-1 神奈川県における事業者毎オカラ発生量と処分料金¹⁹⁾

本文

4.5.2 生ごみへの応用について

生ごみは成分変動が大きい原料であるが易分解性の有機物が多く含まれており、多くの実験報告や堆肥化施設での運転データ等から好気性微生物によって分解しやすい性状であることが明らかなので、本システムにおいても問題はないと考えられる。ただし有機酸が生成して低 pH になり易い特性もあることから、アルカリを添加して pH コントロールすることが必要とみられ、本システムを適用するには実証により確認することも必要である。

分別が良い調理残渣などは発酵処理後に飼料として用いることができる。分別が不十分なものは発酵処理後の異物除去と熟成工程を付加させることで堆肥に使用できる。最終的に焼却処分するとしても乾燥と発酵による減量効果が大きく、常温保管ができ、輸送コストが低減でき、焼却炉のインフラ建設コストも低減できる。

一方、従来の生ごみ処理機には問題が多く、発火事故や悪臭・発酵不良などのトラブルがしばしば報告されている。本システムでは発火しやすい廃食用油を用いても発火せず安全に稼働し、アンモニアによる悪臭の発生は微生物脱臭器で解消している。発酵不良は低 pH 時に活性が低下することと高含水率による通気性の悪化が主な原因なので、pH 制御をおこない、高温発酵で乾燥を促進することで解消される。このように、従来の生ごみ処理機で問題が多かった発火事故や悪臭・発酵不良が解決できていることから、生ごみへの応用についても十分に可能である。スケールアップについても前項で記載したように対応可能である。

本システムを用いたときの再資源化ルートの可能性を図 4-2 に示す。このことにより循環型で低炭素化社会の実現に貢献できると考えている。

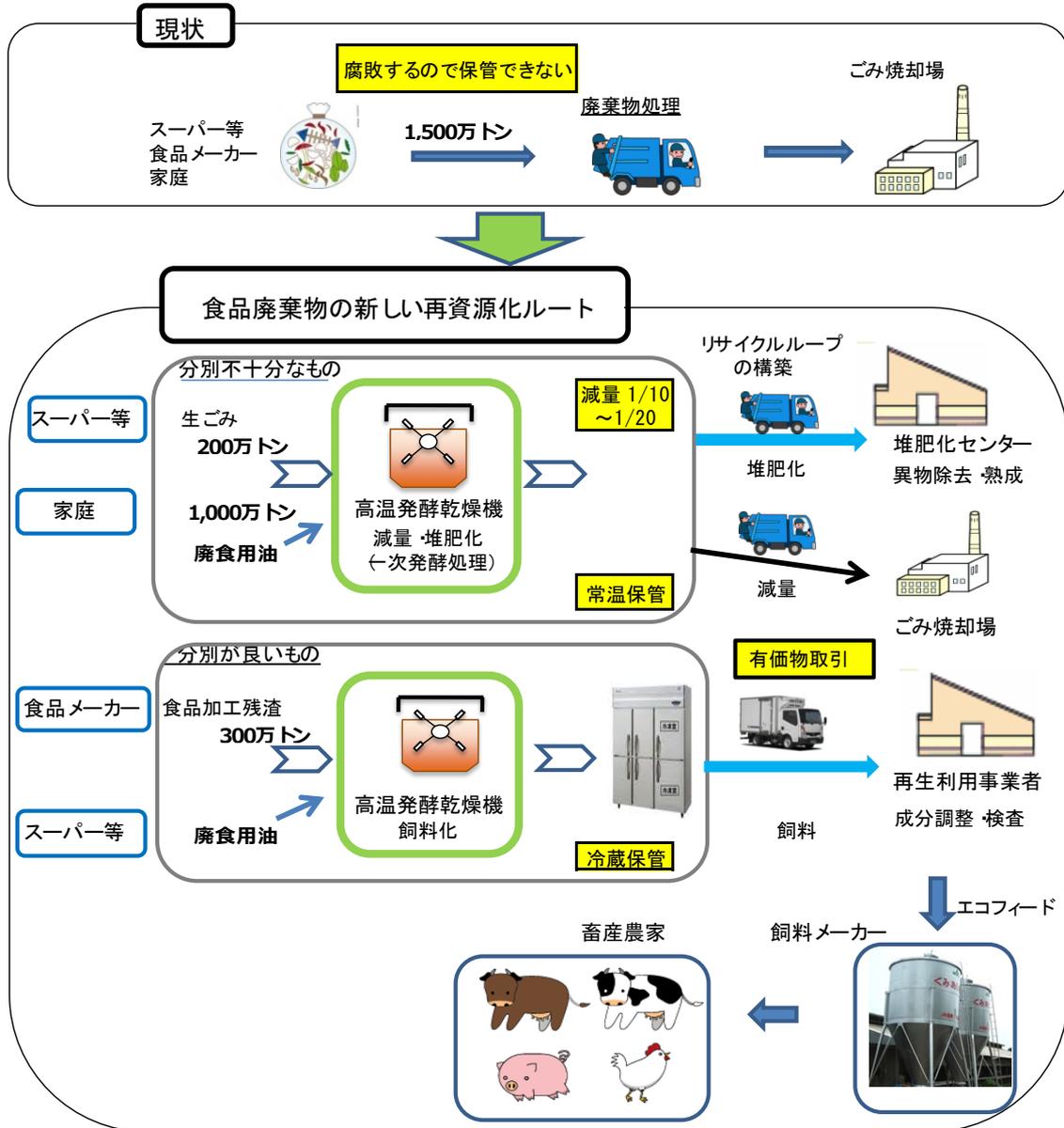


図 4-2 生ごみ等食品廃棄物の新しい再資源化ルート²⁰⁾

本文

5. 参考文献

- 1) 特許文献 2006-230303.
- 2) Abd Rahman RN, Leow TC, Salleh AB, & Basri M (2007) *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. *BMC Microbiol.* 7:77.
- 3) 神奈川県農政部：未利用資源たい肥化マニュアル、H22年3月
- 4) 野呂瀬幸政、岩淵和則、池田喜雄、倉島太一、宮竹史仁：食品廃棄物のコンポスト化における反応特性、農業施設 39 巻 4 号 (2009)
- 5) 井上雅美、羽成 勤、吉尾卓宏、相沢博美：未利用資源利用による家畜ふんの堆肥化、茨城県畜産センター研究報告 第 37 号 (2004)
- 6) 松田従三：高温好気法による有機性廃棄物の分解、H11～13 年度科学研究費補助金（基盤(B)(2)研究成果報告書)
- 7) Coorevits A, Logan NA, Dinsdale AE, Halket G, Scheldeman P, Heyndrickx M, Schumann P, Van Landschoot A, De Vos P (2011) *Bacillus thermolactis* sp. nov., isolated from dairy farms, and emended description of *Bacillus thermoamylovorans*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61(8):1954-1961.
- 8) Smith MG, *et al.* (2007) New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev.* 21(5):601-614.
- 9) Choi Y-L (2009) Gene cloning, purification, and characterization of a cold-adapted lipase produced by *Acinetobacter baumannii* BD5. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(2):128-135.
- 10) Kucerova E, *et al.* (2010) Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. *PloS one* 5(3):A51-A60.
- 11) Deive FJ, Alvarez MS, Moran P, Sanroman MA, & Longo MA (2012) A process for extracellular thermostable lipase production by a novel *Bacillus thermoamylovorans* strain. *Bioprocess Biosyst Eng* 35(6):931-941.
- 12) Jiang Y, Zhou X, & Chen Z (2009) Cloning, expression, and biochemical characterization of a thermostable lipase from *Geobacillus stearothermophilus* JC. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(4):747-751.
- 13) Feng L, *et al.* (2007) Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(13):5602-5607.

本文

- 14) Charbonneau DM, Meddeb-Mouelhi F, & Beauregard M (2010) A novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus thermodenitrificans*: evidence for a new carboxylesterase family. *Journal of biochemistry* 148(3):299-308.
- 15) Yang Z, *et al.* (2013) Cloning, expression and biochemical characterization of a novel, moderately thermostable GDSL family esterase from *Geobacillus thermodenitrificans* T2. *J. Biosci. Bioeng.* 115(2):133-137.
- 16) Balan A, Ibrahim D, Abdul Rahim R, & Ahmad Rashid FA (2012) Purification and characterization of a thermostable lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra. *Enzyme research* 2012:987523.
- 17) Kim HK, Park SY, Lee JK, & Oh TK (1998) Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 62(1):66-71.
- 18) (財) 日本環境衛生センター 資料
- 19) 佐伯真魚、丹羽美次：平成 20 年度国産飼料資源活用促進総合対策事業（地域エコフイード利用体制確立支援）に係る地域情報調査分析（アンケート調査）報告書、(社)神奈川県畜産会
- 20) 環清技研エンジニアリング(株) 資料

本文

6. 研究発表

学会発表 5 件

1. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台)、2013 年 3 月 25 日 (演題番号 2C11a07)

演題: オカラ好気高温固体培養を利用した廃食用油処理システムの構築を目指した評価系の確立

発表者: 岩瀬徳康¹、松岡真生¹、西田茂雄²、若松敏幸³、祥雲弘文¹、若木高善¹、後藤直宏⁴、伏信進矢¹

所属: ¹東大院農生科、²環清技研エンジニアリング、³東京海洋大海科、⁴東京海洋大院海科技

2. 東京大学生命科学シンポジウム (東京)、2013 年 6 月 8 日 (ポスター番号 26)

演題: 廃食用油とオカラを用いた好気高温固体発酵システムへの応用を目指したリパーゼ生産性好熱菌の探索

発表者: 岩瀬徳康¹、山田千早¹、松岡真生¹、西田茂雄²、祥雲弘文¹、若木高善¹、伏信進矢¹

所属: ¹東大院農生科、²環清技研エンジニアリング

3. 第 65 回日本生物工学会大会 (2013) (広島)、2013.9.19 (演題番号 2P-052)

演題: 好気高温固体発酵システムから単離した好熱性リパーゼ産生菌とその酵素学的性質の解析

発表者: 山田千早¹、松岡真生¹、岩瀬徳康¹、西田茂雄²、祥雲弘文¹、若木高善¹、伏信進矢¹

所属: ¹東大院農生科、²環清技研エンジニアリング

4. 第 65 回日本生物工学会大会 (2013) (広島)、2013.9.20 (演題番号 3P-184)

演題: オカラと廃食用油を用いた好気高温固体発酵システムへの好熱性油脂分解菌の添加効果

発表者: 岩瀬徳康¹、山田千早¹、松岡真生¹、西田茂雄²、祥雲弘文¹、若木高善¹、伏信進矢¹

所属: ¹東大院農生科、²環清技研エンジニアリング

5. 日本農芸化学会 2014 年度大会 (東京)、2014.3.30 (演題番号 4D03a04)

演題: オカラと廃食用油を用いた好気高温固体発酵システムへの油脂分解能を有する微生物群の添加効果

本文

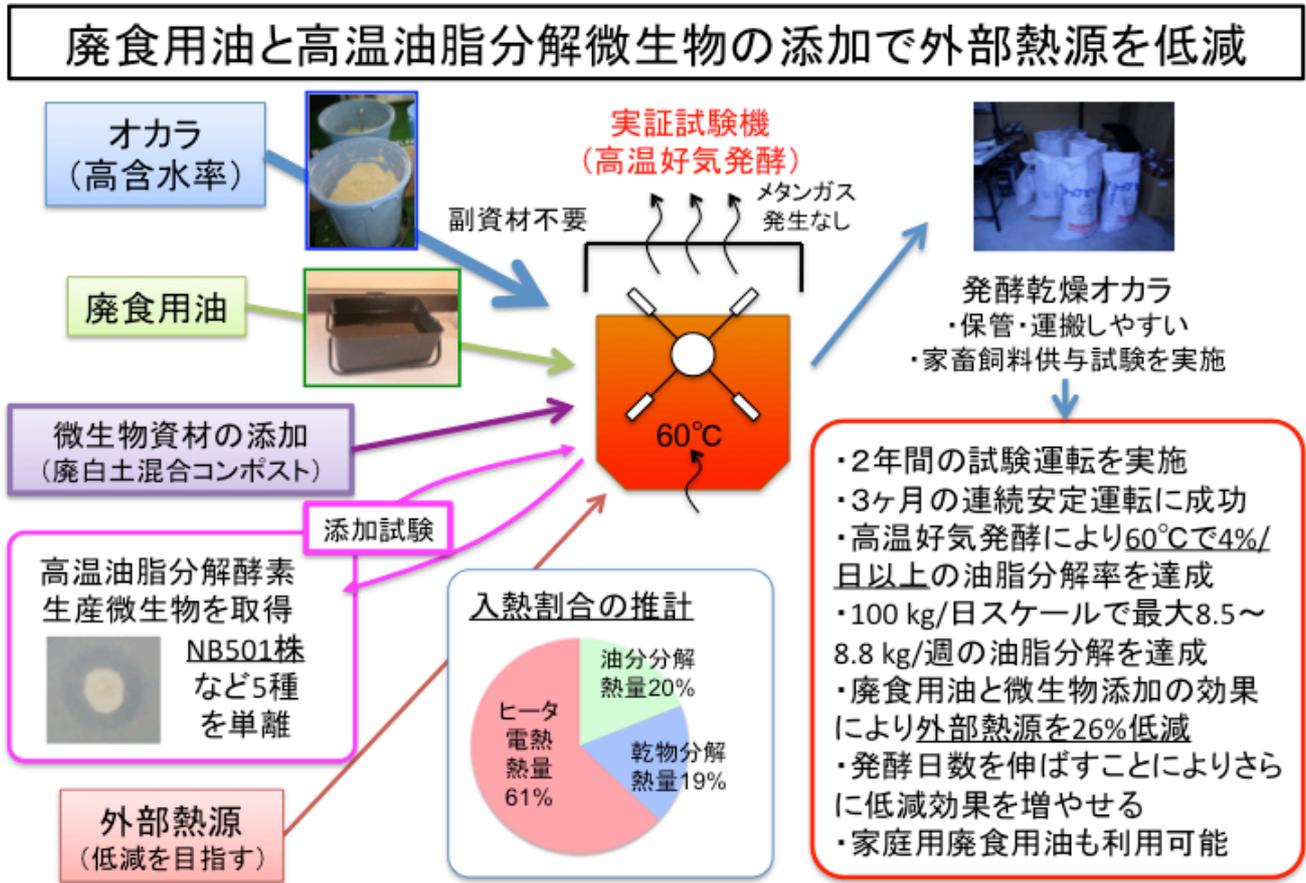
発表者：岩瀬徳康¹、山田千早¹、西田茂雄²、松岡真生¹、須田亙³、服部正平³、祥雲弘文¹、
若木高善¹、伏信進矢¹

所属：¹東大院農生科、²環清技研エンジニアリング、³東大院新領域

7. 知的財産権の取得状況

・特許 実用新案登録：なし

8. 研究概要図



9. 英文概要

A novel high-temperature aerobic solid-state fermentation system that converts high moisture containing food wastes into feeding stuffs was developed. Used cooking oil that is discarded due to deterioration, or contamination of waters or food particles is fed in the system in order to facilitate the fermentation. The used cooking oil-fed aerobic high-temperature fermentation system of food wastes has been shown to have advantages such as increase of fermentation temperature and improvement of organic compound degradation. However, at high temperatures (around 60°C), the degradation rate decreases because lipase (oil-degrading enzyme)-producing microbes are generally active only at temperatures below 40°C. Therefore, in this study, we aimed to establish a novel high-temperature aerobic fermentation system by using lipase-producing microbes that are active at a high temperature. The novel system is expected to be cost-effective because the fermentation heat improves the energy recovery efficiency and reduces the external heat source (electricity heater or fuel).

At first, we constructed a pilot-scale system that can process 100 kg/day of *tofu* refuse (*okara*) in a site of *tofu* factory. Used cooking oil was obtained from soybean oil that has been used for fried *tofu* production. Novel thermophilic lipase-producing microbes were screened from the system, and we obtained several promising bacteria from enrichment cultures using soybean oil as the sole carbon source. *Bacillus thermoamylovorans* strain NB501 and *Geobacillus* species were obtained at 50°C and 60°C, respectively. Strain NB501 was the most promising bacteria because it could grow at 60°C and its lipase has the optimum temperature at 60°C, at where our system being operated with a best result.

The pilot-scale system was operated for 2 years with no serious trouble, and could be continuously operated for 3 months with a high fermentation activity. The oil-degrading rate was more than 4%/day under its best condition with an addition of waste white clay-mixed compost. In the 100 kg/day scale system, the oil degradation was up to 8.5 ~ 8.8 kg/week. Under the best condition, percentages of the heat intake were estimated: heat from electric heater, oil degradation, and organic compounds (except oil) degradation were 61%, 20%, and 19%. The additions of used cooking oil and the microbial materials reduced the external heat by 26%, and it can be more effective if the fermentation time period is elongated. Household-used cooking oil was also shown to be a good additive of this system. Moreover, the product of this system (dried *okara* by high-temperature fermentation) was examined by feeding to pigs and chickens, and its safety and effectiveness as a livestock feed were verified.