

〔生物工学会誌 第79巻 第12号 463-469. 2001〕

パンダから分離した耐熱性酵素群を産生する 高温細菌による生ゴミ処理の試み

田口 文章^{1,2*}・宗 国富^{1§}・張 光磊²北里大学大学院医療系研究科環境微生物学研究室,¹ 医療衛生学部臨床微生物学研究室²
〒228-8555 神奈川県相模原市1-15-1

(平成13年7月16日受付 平成13年11月12日受理)

Microbial Treatment of Kitchen Refuse with Enzyme-Producing Thermophilic Bacteria from Giant Panda Feces

FUMIAKI TAGUCHI,^{1,2*} SONG GUOFU,¹ and ZHANG GUANGLEI² (*Department of Environment Microbiology, Kitasato University Graduate School of Medical Sciences*¹ and *Department of Clinical Microbiology, Kitasato University School of Allied Health Sciences*,² Sagami-hara, Kanagawa 228-8555) *Seibutsu-kogaku* **79**: 463-469, 2001.

To establish an efficient method for the microbial treatment of kitchen refuse, experiments were performed to isolate heat-stable multi-enzyme-producing thermophilic bacteria and to verify functional activities of the isolates for the complete decomposition of kitchen refuse. Five *Bacillus* strains—*B. amyloliquefaciens* FTP148, *B. amyloliquefaciens* FTP2414, *B. subtilis* FTP237, *B. Licheniformis* FTP136, and *B. licheniformis* FTP2530—were successfully isolated from feces of the Giant Panda. The strains showed efficient growth at incubation temperatures between 45°C and 60°C and produced amylase, protease, and lipase. The highest activities of the amylase and protease produced by the strains at the optimal growth temperature were obtained at reaction temperatures between 50°C and 60°C. The amylase and protease activities were stable up to maximum temperatures of 75°C and 70°C, respectively; after incubation at 60°C for 3 h, 59% and 40%, respectively, of the initial activity remained. Using a commercial waste-treatment device, kitchen refuse was treated with the five strains with the following results. When 1 kg per day was treated for 4 weeks, a total of 24 kg of mixed refuse consisting of green vegetables and fish remains as well as raw and/or fried potatoes was reduced to only 0.98 kg and a final digestive rate of 96% was obtained. It is noteworthy that the internal temperature of the compost mass reached a peak of 72°C. These results indicate that the novel thermophilic bacterial strains isolated from Giant Panda feces may be useful for high-performance waste treatment at a high temperature of 65°C.

[Key words: waste-treatment, thermophilic bacteria, heat-stable enzymes, panda feces]

我が国では年間5千万トンを超える一般廃棄物が排出され、その約73%は焼却処理され、最終的にゴミ全体の約23%が埋め立てにより処分されてきた。¹⁾また東京都内からだけでも毎年総計5100万トンの廃棄物がゴミとして収集されているが、その半分は植物性廃棄物が占めると言われている。²⁾近年になって生ゴミなどを含む廃棄物の焼却処理によりダイオキシンのような有害物質が新たに生み出されることが次第に明らかにされてきた。

ダイオキシンなどの化学物質を排出しない焼却に代わる処理法として、微生物を利用した生ゴミ処理法が注目されてきている。微生物による生ゴミ処理は、特殊な大型装置を必要とせず、省エネルギー型であり、発酵後の残渣は堆肥として利用できるなどの利点があげられている。このような背景から生態系から得られた微生物を活用する生ゴミ処理機が開発され広く発売されている。

しかし、分解反応の中心的な役割を担う微生物の分離

* 連絡先, Corresponding author.

TEL. 042-778-8112 FAX. 042-778-9400 E-mail: taguchi@kitasato-u.ac.jp

§ 現, アビオ新規事業開発部 (岐阜市加納桜田町1-1)

やその性状については、ほとんど検討されていない。³⁻⁵⁾そこで我々は、これまでに培ってきた新規微生物の探索経験に基づき、⁶⁻⁷⁾生ゴミ処理に用いることができる微生物、特に何種類かの耐熱性酵素群を産生する高温菌を分離し、それら分離菌を用いる生ゴミ処理法の確立を目標に実験を開始した。これまでに動物の糞や昆虫などより基質分解能が高い好気性高温菌の分離を試みた結果、パンダの糞からプロテアーゼ、アミラーゼやリパーゼなどの酵素群を産生する高温菌を分離できた。これらの新規な高温細菌は、生ゴミを連日投入しても残渣をほとんど残さない成績を示したので、ここにその成果の一部を報告する。

実験方法

細菌の分離源 新規な微生物の分離源としてパンダ (*Ailuropoda melanoleuca*) の糞を用いた。パンダの糞は、恩賜上野動物園より正式な手続きをした後に恵与されたものを実験に供した。

培地 主にトリプトソイブイオン (栄研化学)、トリプトソイ寒天培地 (栄研化学) と 0.5% に肉エキスを加えたトリプトソイ寒天培地を用いた。

生ゴミ処理機 市販の家庭用生ゴミ処理機 (松下電工, 1200タイプ, EM452AH) を実験に供した。使用した生ゴミ処理機は、内容積が概ね 27 l で菌床の容量が 12 l の大きさで、攪拌は三枚のフィンにより毎分 2 回転の割合で 2 分間回転し、つづいて逆回転を 2 分間し、その後 60 分間休止するように設計されていた。この機種を加熱温度と回転時間を変更できるように一部改良して生ゴミ処理の実証試験に用いた。

生ゴミ 次のような組成のものを生ゴミとして用いた。「標準混合ゴミ」としては青野菜 (主にキャベツ) 300 g, 生ジャガイモ 200 g と魚屑 (骨や頭を含む魚のガラ) 500 g の混合した物、「高タンパク類生ゴミ」としては青野菜 300 g と魚屑 700 g, 「高デンプン類生ゴミ」は青野菜 300 g, 魚屑 200 g と生ジャガイモ 500 g および「高揚げ物類生ゴミ」は青野菜 300 g, 魚屑 200 g, 生ジャガイモ 200 g と揚げ物 (主にコロケ) 300 g などを混合したものを生ゴミとして用いた。青野菜と生ジャガイモは、数センチ角の大きさに切って使用した。魚屑と揚げ物は、そのまま使用した。

細菌の分離法 パンダの糞 10 g を滅菌生食塩水 90 ml に加えてよく攪拌した。この懸濁液を滅菌トリプトソイブイオンで 10 倍段階希釈をし、各希釈液から 0.1 ml を量り取り 0.5% 肉エキス加トリプトソイ寒天培

地の平板に接種した。37°C, 45°C, 55°C と 60°C の各温度で平板 4 枚宛て保温し、最長 1 週間まで培養した。形成されたコロニーを釣菌し、純培養になるまで分離を繰り返した。適当数の菌株が得られるまで、この分離操作を数回繰り返した。

分離菌の同定法 純粋培養した各菌株は、染色によりグラム染色性、菌体の形状と芽胞の有無を観察した。次に、オキソダーゼ試験、カタラーゼ試験、O/F 試験、運動性などの確認試験を行い、Cowan and Steel's 医学細菌同定の手引き⁹⁾の一次鑑別法に従い大まかな分類を行った。芽胞を有するグラム陽性桿菌の同定は、日本ビオメリユー製の API 50 CHB と API 20E を用いて行った。

分離菌の増殖温度の検討法 新鮮継代菌をトリプトソイ寒天培地に植え、37°C から 5°C 間隔で 60°C までの温度で 48 時間培養した。集落の形成を増殖可能温度とし、さらに集落の数と大きさが最大になる温度をその菌株の最適増殖温度と判断した。

基質利用能の検討法 分離菌の基質分解能を観るための一次定性試験は、肉片の分解試験にクックドミート培地 (OXOID), タンパク分解試験に 0.5% ゼラチン加トリプトソイ寒天培地と 1% カゼイン加寒天培地、リポド分解試験に 2% 卵黄加トリプトソイ寒天培地、さらにデンプンの分解能は 1% 可溶性デンプン加トリプトソイブイオンを用いた。

1% カゼイン寒天培地は、蒸留水 1000 ml にトリプトン 5.0 g, 酵母エキス 2.5 g, ブドウ糖 1.0 g, カゼインナトリウム 10.0 g, クエン酸三ナトリウム二水和 4.41 g, 塩化カルシウム二水和 2.94 g, 寒天 15.0 g を加えて作製した。1% 可溶性デンプントリプトソイブイオンは、1% 可溶性デンプンと 0.4% に pH 指示薬 (ブロムクレゾールブルー) を添加して調製した。

基質を加えたトリプトソイ寒天培地に新鮮継代菌を接種し、各菌株の最適増殖温度で 24 時間から 48 時間培養して、各基質の分解を判断した。肉片の分解能は、クックドミート培地に各菌株を接種し、1 週間まで培養した。肝臓片が消失するかまたは崩れた場合、肉片分解能陽性と判定した。デンプンの分解能は、1% 可溶性デンプン加トリプトソイブイオンに各菌株を接種し、最適温度で 24 時間から 48 時間培養した。培地の pH が酸性に傾いたらデンプン分解陽性と判断した。

酵素活性の測定法 酵素の誘導には、可溶性デンプン (和光純薬), カゼイン (アズウェル) とラード (雪印) を使用した。粗酵素液の調製は、基質 (1% 可溶性

デンプン, 1%カゼインまたは0.5%ラード)を添加したトリプトソイブイオンに接種した菌株を最適増殖温度で48時間から96時間培養し, 培養液を3000回転で30分間遠心した。遠心上清を採取し, 0.4 μm 孔径のメンブランフィルターでろ過した。ろ液を保存することなくそのまま粗酵素液として使用した。

酵素活性の測定は, 次のように行った。アミラーゼ活性は, 0.5%可溶性デンプン添加トリプトソイブイオンでの培養上清をネオ・アミラーゼテスト「第一化学」で発色させ, 波長 620 nm の吸光度から α -アミラーゼ活性を測定した。リパーゼ活性は, 0.5%ラードを加えたトリプトソイブイオンの培養上清をネスコート VN リパーゼ測定法でレシチナーゼ活性を測定した。添付されていた標準血清を陽性対照と菌未接種の培地を陰性対照として用いた。

プロテアーゼ活性は, 以下のような方法で測定した。0.5%カゼイン加トリプトソイブイオンの培養上清を0.5 ml ずつ二本の試験管に移して, 一本の試験管に1%カゼイン溶液 0.5 ml とブランク用一本に蒸留水 0.5 ml を加え, よく混和した後 45°C の恒温水槽で反応させた。反応直後に1.8%トリクロロ酢酸を 3.0 ml 加え数分間放置した。蒸留水 6.0 ml を加えた後, 3000回転20分間遠心し, その上清に Lowry-Folin 試薬を添加して発色させた。⁸⁾波長 720 nm で吸光度を測定した。カゼイン分解液の吸光度からブランクの吸光度を差引き, チロシンの標準曲線よりタンパク分解能を求めた。1分間にチロシン 1 μg 相当量の生成物を与える酵素量を 1 単位 (u/ml) とした。

酵素活性の反応温度および熱安定性の検討法 各菌株を24時間から120時間まで培養して粗酵素液を得た。5°C 間隔に設定した 45°C から 70°C までの水槽に粗酵素液と基質とを30分間保温してアミラーゼとプロテアーゼの活性を測定した。最大活性を示す反応温度と各菌株の酵素活性が最大になる培養時間を求めた。また粗酵素液を各設定温度に30分から5時間まで保温した後, 酵素活性を測定し酵素活性の熱安定性を調べた。なお, ネスコート VN リパーゼ測定キットに含まれる基質の熱安定性の関係から, リパーゼ活性の測定は 37°C でのみ行った。

生ゴミ処理の実証試験 細菌を定着させる菌床は, 生ゴミ処理機に添付されている菌床素材 1 kg と糞殻 1.5 kg の計 2.5 kg とした。菌床は高圧蒸気滅菌の後, 乾燥させてから用いた。それを生ゴミ処理機に移した後, 蒸留水を 1000 ml 加え, 処理機の温度を 40°C に設定し

て連続的に12時間攪拌して菌床に湿度を与えた。一晚攪拌と加熱を休止させた後, 200 ml のトリプトソイブイオンで一晚培養した 5 菌株 (後述) の菌液, 総計 1000 ml と100倍に希釈したトリプトソイブイオン 500 ml を菌床の上から振り注いだ。処理機の温度を 45°C に設定し, 12時間連続的に攪拌と加熱した後, 約36時間の間攪拌も加熱も休止させた状態に放置した。月曜日の朝菌床の重量は, ほぼ 2.5 kg であった。毎朝 1 kg の生ゴミを投入し, 処理機を 1 時間運転してよく攪拌混合させた後 2 時間休止させ, これを 4 回連続的に12時間繰り返す。その後は翌朝まで運転を休止させた。翌朝生ゴミを加える前に重量と処理機内の温度を測定した。

実験結果

有用細菌の分離 45°C から 60°C の培養温度で増殖する212株の細菌をパンダの糞から分離した。増殖温度域が高い菌株の基質分解能を観るための一次定性試験を最初に実施した。デンプン, 肉片, ゼラチン, カゼイン, 卵黄などすべての基質に対して反応陽性を示した菌株を選別し, 次いで酵素活性を調べた。その結果, 10株がアミラーゼ, プロテアーゼとリパーゼを産生することが判った。比較的酵素活性が高く 45°C から 60°C の温度域で増殖が良い FTR136 株, FTR148 株, FTR237 株, FTP2414 株と FTR2530 株の 5 菌株を選別し, 同定を試みた。

この 5 菌株は, 一次鑑別法の結果すべてグラム陽性芽胞桿菌で *Bacillus* 属の細菌であった。用いた同定キットの結果から FTR136 株は 99.9% の確率で *Bacillus licheniformis*, FTR148 株は少し確率が低い 69.9% で *Bacillus amyloliquefaciens*, FTR237 株は 83.4% の確率で *Bacillus subtilis*, FTR2530 株は 99.8% で *B. licheniformis* と同定された。しかし, FTP2414 株は, 同定確率の高い種は見つからなかったが, 候補種のうち ADH と DNase が陰性であることから低い確率であるが 40.9% で *B. amyloliquefaciens* と判定した。

5 株の細菌のうち各 2 株が *B. amyloliquefaciens* と *B. licheniformis* であったが, Table 1 に示す増殖温度域を含めたいくつかの性状が各株で異なることから, 各々別な株として以下の実験に用いた。

分離菌の産生する酵素活性の検討 45°C で72時間から96時間培養した培養液を用いて, 5 菌株の産生する3種類の酵素活性を測定した。アミラーゼとプロテアーゼの最大活性値を示す反応温度とその活性値およびリパーゼは 37°C での活性値を Table 2 に示した。アミラー

Table 1. Differential properties of isolated *Bacillus* strains.

| Property | Strain | | | | |
|------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------|
| | #136 | #148 | #237 | #2414 | #2530 |
| Aerobic growth | | | | | |
| 37°C | 4+ | 2+ | + | + | + |
| 45°C | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | + |
| 50°C | 2+ | + | + | 2+ | 2+ |
| 55°C | 2+ | — | + | — | 4+ |
| 60°C | — | — | — | — | + |
| Anaerobic growth | + | + | ± | ± | + |
| Utilization | | | | | |
| Galactose | + | — | — | — | — |
| Gentiobiose | + | — | + | + | — |
| Lactose | + | + | + | + | — |
| Melibiose | + | — | + | + | — |
| Rhamnose | + | — | — | — | — |
| Raffinose | + | + | + | + | — |
| Sorbose | + | — | — | — | + |
| Citrate | + | + | — | + | — |
| DNase production | + | — | + | — | + |
| Identification | <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> | <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> | <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> | <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> | <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> |

ゼとプロテアーゼの活性値が比較的低い菌株と比較的高い菌株とが存在することが判明した。

アミラーゼとプロテアーゼの熱安定性 96時間培養して得た培養液中のアミラーゼ活性とプロテアーゼ活性の熱安定性を検討した。その結果、Table 3 に示したように、比較的低活性値のアミラーゼを産生する FTP136 株と FTP2530 株のアミラーゼ活性は、酵素活性の最適温度である 60°C に 3 時間保温後でも 59% と 36% の活性を示した。FTR148 株、FTP2414 株と FTP237 株の高活性値のアミラーゼは、最適温度の 55°C に 60 分間保温すると活性は約 20% に低減した。

一方、プロテアーゼ活性は、Table 4 に示すように全体的に安定で、FTP2530 株のサンプルを除いて、FTP148 株、FTP2414 株、FTP237 株と FTP136 株では

Table 2. Activities of enzymes produced by isolated *Bacillus* strains.

| Strain | Amylase | | Protease | | Lipase activity ^a |
|---------|----------|-------|----------|-------|------------------------------|
| | Activity | Temp. | Activity | Temp. | |
| FTP136 | 35.4 | 60°C | 23.2 | 60°C | 10 |
| FTP148 | 329.6 | 55°C | 46.4 | 55°C | 7 |
| FTP237 | 239.2 | 60°C | 35.3 | 50°C | 9 |
| FTP2414 | 305.3 | 55°C | 50.4 | 55°C | 5 |
| FTP2530 | 12.2 | 60°C | 19.3 | 60°C | 16 |

^a Lipase activity (units/ml) was determined at 37°C.

50°C、55°C または 60°C に 3 時間保温した後も 30% から 40% 程度の酵素活性を示した。

次に、最高 75°C までの温度に 30 分間保温した場合の酵素の熱抵抗性を検討した。FTP148 株、FTR2414 株と FTR237 株のアミラーゼは、65°C に 30 分間保温後にはほぼ失活した。しかし、FTR136 株と FTR2530 株のアミラーゼは、75°C と 70°C に加熱しても各々約 56% と約 36% の活性が残存した (Table 5)。TFP148 株、TFP2414 株と TFP237 株のプロテアーゼは 65°C の加熱で失活したが、TFP2530 株は 65°C で約 48%、また TFP136 株では 70°C の加熱でも 87% および 75°C で 13% の活性が残存した (Table 6)。

Table 3. Heat stability of amylase at the optimal reaction temperature.

| Incubation time | Strain No. and amylase activity | | | | |
|-----------------|---------------------------------|-------------|--------------|-------------|------------|
| | FTP148 | FTP2414 | FTP237 | FTP136 | FTP2530 |
| 0 min | 298.7 (100) | 297.5 (100) | 320.1 (100) | 33.2 (100) | 11.9 (100) |
| 30 min | 88.4 (29.6) | 84.8 (28.5) | 145.5 (45.4) | 22.6 (68.1) | 9.5 (80.0) |
| 60 min | 61.8 (20.7) | 53.5 (18.0) | 94.0 (29.4) | 21.0 (63.3) | 5.3 (44.5) |
| 3 h | 2.0 (0.6) | 0.9 (0.3) | 5.2 (1.6) | 19.6 (59.0) | 4.2 (36.2) |

Activity: IU/ml. Numbers in parentheses indicate activity (%) relative to a non-heated control. Three samples of FTP148, FTP2414 and FTP237, and two samples of FTP136 and FTP2530 were incubated at 55°C and 60°C, respectively.

Table 4. Heat stability of protease at the optimal reaction temperature.

| Incubation time | Strain No. and amylase activity | | | | |
|-----------------|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | FTP148 | FTP2414 | FTP237 | FTP136 | FTP2530 |
| 0 min | 44.6 (100) | 41.8 (100) | 34.3 (100) | 23.3 (100) | 18.1 (100) |
| 30 min | 35.2 (79.0) | 25.2 (60.1) | 19.0 (55.4) | 21.1 (90.5) | 11.2 (61.6) |
| 60 min | 30.4 (68.2) | 27.7 (66.1) | 15.1 (44.2) | 10.2 (43.8) | 6.5 (35.7) |
| 3 h | 16.9 (38.0) | 17.3 (41.5) | 11.3 (32.9) | 9.9 (42.6) | 1.4 (7.6) |
| 5 h | 15.6 (34.9) | 17.1 (40.6) | 4.1 (12.1) | 3.2 (13.6) | NT |

Activity: u/ml. NT: not tested. Numbers in parentheses indicate activity (%) relative to a non-heated control. Two samples of FTP148 and FTP2414, one sample of FTP237, and two samples of FTP136 and FTP2530 were incubated at 55°C, 50°C, and 60°C, respectively.

分離菌による生ゴミ処理の実証試験 FTP136 株, FTP148 株, FTP237 株, FTP2414 株と FTP2530 株の分離菌を用いて生ゴミ処理の実証試験を行った。試験は、処理機の温度を 45°C に設定し、月曜日から土曜日まで行い、原則として日曜日は休止した。

その結果の概要を Fig. 1 に示した。標準混合ゴミとタンパク類ゴミを投入した時、重量の増加は認められず、分解率は 100% であった、しかし、継続投入したデンプン類ゴミと揚げ物類ゴミの分解率は多少低下した。生ゴミを総計 24 kg 投入し最終的には 0.95 kg の重量が増加

Table 5. Heat stability of amylase activity.

| Incubation temp. | Strain No. and amylase activity | | | | |
|------------------|---------------------------------|-------------|--------------|-------------|------------|
| | FTP148 | FTP2414 | FTP237 | FTP136 | FTP2530 |
| Control | 298.7 (100) | 297.5 (100) | 320.1 (100) | 33.2 (100) | 11.9 (100) |
| 55°C | 88.4 (29.6) | 84.8 (28.5) | 145.5 (45.5) | NT | NT |
| 60°C | 15.1 (5.0) | 13.7 (4.6) | 38.3 (12.1) | 24.3 (73.3) | 5.3 (44.5) |
| 65°C | 0.4 (0.1) | 1.7 (0.6) | 0.3 (0.1) | 24.3 (73.3) | 4.8 (40.0) |
| 70°C | NT | NT | NT | 20.8 (62.6) | 4.2 (35.6) |
| 75°C | NT | NT | NT | 18.5 (55.8) | 0 |

Activity: IU/ml. NT: not tested. Numbers in parentheses indicate activity (%) relative to a non-heated control. Three samples of FTP148, FTP2414 and FTP237, and two samples of FTP136 and FTP2530 were respectively incubated at temperatures ranging from 55°C and 60°C to 75°C for 30 min.

し、その分解率は約 96% であった。

処理槽内の温度変化を観察した結果、菌床温度は生ゴミを投入すると一度 40 数度まで下がるが 3 ~ 4 時間後から処理機内の温度は急激に上昇しはじめ、8 時間前後には最高 72°C まで上昇し、菌床から湯気が立ちのぼることが観察され、翌朝になっても 60°C 以上の高温が維持されていた（成績は示さず）。また朝処理機の上蓋を開けると、異臭はまったく感じられなかったが、菌床より上部の処理機の内壁と蓋の内側には、流れるほどにびっしりと水分が付着していた。この水分は毎朝ふき取った。

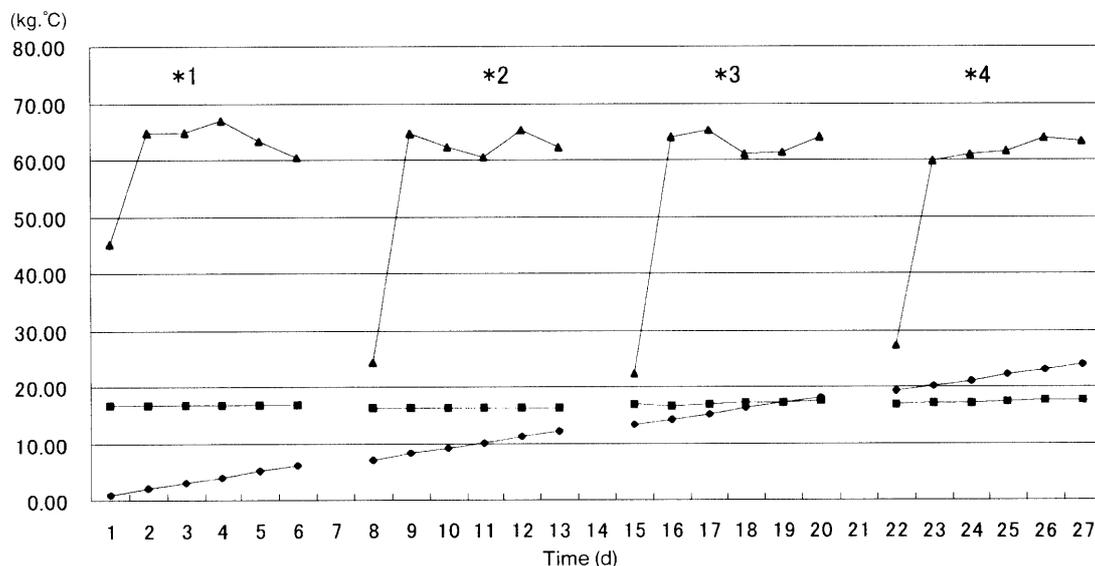


Fig. 1. Treatment of kitchen refuse with five new *Bacillus* strains. One kg/d mixed refuse was treated with the 5 isolated strains for 4 successive weeks. The symbols ●, ■, and ▲ respectively indicate the cumulative weight (kg), total weight (kg) including 2.5 kg of the bacterial feed, and the internal temperature (°C) of the compost mass. The weight and internal temperature of the compost mass were measured in the morning of the first 6 days of each week. On each of these days, 1 kg refuse was added as follows. 1st week (*1): green vegetables 300 g, raw potatoes 200 g, fish remains 500 g; 2nd week (*2): green vegetable 300 g, fish remains 700 g; 3rd week (*3): green vegetable 300 g, fish remains 200 g, raw potatoes 500 g; 4th week (*4): green vegetables 300 g, fish remains 200 g, raw potatoes 200 g, fried potatoes 300 g.

Table 6. Heat stability of protease activity.

| Incubation temp. | Strain No. and amylase activity | | | | |
|------------------|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | FTP148 | FTP2414 | FTP237 | FTP136 | FTP2530 |
| Control | 44.6 (100) | 41.8 (100) | 34.3 (100) | 23.3 (100) | 18.1 (100) |
| 50°C | 35.2 (79.0) | 25.2 (60.2) | 19.0 (55.4) | NT | NT |
| 55°C | 26.3 (58.9) | 17.1 (40.8) | 14.9 (43.4) | NT | NT |
| 60°C | 8.9 (20.2) | 11.6 (27.6) | 9.1 (26.5) | 21.1 (90.5) | 11.2 (61.6) |
| 65°C | 0 | 3.2 (7.6) | 0 | 20.5 (88.1) | 8.7 (47.8) |
| 70°C | NT | NT | NT | 20.2 (87.0) | 1.8 (9.9) |
| 75°C | NT | NT | NT | 3.0 (13.0) | 0.2 (0.8) |

Activity: u/ml. NT: not tested. Numbers in parentheses indicate activity (%) relative to a non-heated control. Two samples of FTP148 and FTP2414, one sample of FTP237, and two samples of FTP136 and FTP2530 were respectively incubated at temperatures ranging from 55°C, 50°C, and 60°C to 75°C for 30 min.

これらの結果から、パンダの糞から分離された5菌株を用いて成分の異なる生ゴミを効率的に分解できること、またこれらの菌株の発酵力で処理機内の温度を15時間程度は60°Cから65°Cの間に保持できることが判った。

考 察

現在数多く市販されている微生物を用いた家庭用生ゴミ処理機は、新聞社の調査結果などによると、投入された廃棄物を外気温の高い夏場でも最大で90%程度減容するに止まり、外気温の低い冬場では60%程度にまで処理能力が低下することもあると言われている。分解できなかった最終産物または発酵後の残渣は、堆肥としての利用が考えられている。しかし、今後堆肥として使用しきれない場合は、本来価値ある堆肥も二次産業廃棄物として焼却処理する必要が生じ、ダイオキシンなどの有害な副産物の発生につながる可能性が危惧される。

生ゴミを迅速にかつ完全に処理するには、分解反応の中心的な役割を担う微生物の増殖温度が高く耐熱性酵素群を産生し高い分解能を持つ細菌などの使用が望まれる。我々は、これまでに動物の糞や昆虫などから基質分解能を持つ細菌の分離を試みてきた。試行錯誤の結果、パンダの糞からグラム陽性芽胞桿菌が多数分離された。それらの菌株のなかから、増殖温度域が45°Cから60°Cで、アミラーゼ、プロテアーゼとリパーゼを産生し、アミラーゼとプロテアーゼの活性が50°Cから60°Cの温度域で最大になる5菌株を分離した。

Bacillus 属の5菌株は、比較的高値の酵素活性を示す *B. amyloliquefaciens* 148株、*B. subtilis* 237株と *B. amyloliquefa-*

ciens 2414株の3株と酵素活性の比較的低値の *B. licheniformis* 136株と *B. licheniformis* 2530株の2株に分かれた。*B. licheniformis* 136株と *B. licheniformis* 2530株が産生する比較的低活性値のアミラーゼとプロテアーゼは、他の3株が産生する高活性値のアミラーゼとプロテアーゼと比較して熱安定性が高い結果を示した。特に *B. licheniformis* FTP136株のアミラーゼとプロテアーゼは、75°Cと70°Cに30分間加熱しても約56%と87%の活性が残存する熱抵抗性を示した。Table 3と4に示した結果は、これらの菌株の産生する酵素群は、処理機内の温度が50°Cから60°Cに3時間程度維持されても、アミラーゼとプロテアーゼの活性はある程度残存することを示唆していると考えられる。

分離した5菌株を用いた生ゴミ分解の実証実験では、Fig. 1に示したように、4週間連続で生ゴミを投入した場合の最終分解率は約96%であった。魚屑として用いたアジやサバの骨や皮およびキャベツの芯などは消失していたが、カツオなどの比較的大型魚の太い骨は一部残存する傾向が観られた。総計24kgの生ゴミを処理し菌床重量が0.95kg増加したが、比較的大骨やウロコなどが未分解残渣として残った可能性が考えられる。生ゴミにある程度含まれる灰分が残存し、菌床重量が増加することが予測されるが、しかし、現在まで200kgほどの生ゴミを投入している段階では、全体として顕著な重量増加は見られていない(成績は示さず)。

試験に供した5菌株は、各々の特徴から識別が可能である。そこで、菌を定着させ生ゴミを投入する直前と生ゴミ処理を行った後、菌叢を構成する細菌の総菌数と優占菌の検討ならびに定着させた5菌株の残存と構成比率を確認する目的で、菌床から細菌の分離を試みた。結果は、各菌株の発育温度と増殖速度などの違いから、培養温度ごとに総菌数も各菌株と類推される集落数も異なり、さらに一培養条件下では集落の特色の識別も難しく目的を達成することはできなかった。しかし、異なる培養温度で増殖させた平板上には、外観的に目的菌とは異なる集落も観察され、少数ながら放線菌や真菌と推測される集落も観察されることがあった。

処理機内の温度と湿度は、生ゴミ処理の分解速度と分解率に重要な要因となる。¹⁰⁾今回使用した5菌株の産生する酵素の活性に対する最適pHは、検討しなかったので生ゴミ分解に対するpHの影響については現段階では判らない。しかし、5菌株を用いた生ゴミ分解実証実験では、処理機内菌床のpHは無調整であったが、異臭を放つこともなく、また結果として生ゴミ分解率にも悪影

響を示してないと考えられる。

パンダから分離した新規な5株の好気性高温菌の生ゴミ処理への利用は、次のような特徴が考えられる：高温菌であるため生ゴミ処理の時間が短縮できる、強い発酵力により処理機内の温度が72°Cにも達するため省エネルギーである、また処理機内菌床からの水分の発散率が高い、さらに生ゴミと共に混入して来る可能性のある病原性大腸菌や黄色ブドウ球菌などの一般病原性細菌群の殺滅または増殖抑制などが期待できるので安全性の確保が期待できる。

我々はこれまでに、シロアリから新規な水素生成菌を多数分離し、それらの菌株はセルロース、キシラン、デンプンなど、六炭糖や五炭糖の多くの糖分を水素に効率よく変換できることを報告してきた。^{6,7,11-14)}そこで、今後の問題として、シロアリから分離した水素生成菌で生ゴミから水素を回収し、その残渣をパンダからの新規な高温菌を用いて完全分解するエネルギー回収型生ゴミ処理システムの確立を目標に試験を展開している。近い将来これらの新技術をもって清浄な環境の保全に貢献できることを願っている。

要 約

台所からの廃棄物としての生ゴミを微生物により効率的に処理する方法を確立する目的で、高温で増殖し耐熱性酵素を産生する細菌の分離および分離菌による生ゴミ処理の実証試験を試みた。パンダの糞から分離した菌株のなかから、45°Cから60°Cの温度で増殖しアミラーゼ、プロテアーゼおよびリパーゼを産生する *Bacillus* 属の細菌5株を選別した。5菌株を最適増殖温度で培養した培養上清中のアミラーゼ、プロテアーゼおよびリパーゼなどの酵素活性を測定した。リパーゼの熱抵抗性は測定できなかったが、アミラーゼとプロテアーゼは、50°Cから60°Cの反応温度で最大活性を示し、アミラーゼは75°Cまで、プロテアーゼは70°Cまでの温度に30分間加熱しても安定であった。60°Cに3時間保温しても、保温前の活性値に対してアミラーゼは59%とプロテアーゼは40%の活性が残存した。市販の家庭用生ゴミ処理機と分離した5菌株を用いて、野菜、魚屑、生ジャガイモまたは油で揚げたジャガイモなどからなる生ゴミの処理を試みた。生ゴミは、毎日1kgを1週間に6日間、

連続的に4週間投入した。処理機内の温度は、生ゴミを投入すると40°C程度まで下がるが数時間後には最高72°Cまで上昇し、湯気が立ち上るようになった。翌朝の温度は60°C程度になり、処理機内部には流れるほどに水滴の付着が観察された。投入した24kgの生ゴミは、結果的に0.98kgに減少した。これらの結果は、耐熱性酵素を産生するパンダからの分離5菌株は、高温での生ゴミ処理に使用できる可能性を示唆するものと考えられる。

本研究に用いたパンダの糞は、恩賜上野動物園より恵与して頂いた。また本研究の一部は、株式会社電制からの研究助成金によって行われた。

文 献

- 1) 谷川 昇, 堤 紀子: 資源環境対策, **32**, 1041-1048 (1996).
- 2) 東京都環境局廃棄物管理情報 (2001)
<http://www.kankyo.metro.tokyo.jp/slim/haiki/sangyo.html>
- 3) Nakasaki, K., Sasaki, M., Shoda, M., and Kubota, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 42-45 (1985).
- 4) Strom, P. F.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 899-905 (1985).
- 5) Strom, P. F.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 906-913 (1985).
- 6) Taguchi, F., Chang, J. D., Takiguchi, S., and Morimoto, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 244-245 (1992).
- 7) Taguchi, F., Chang, J. D., Mizukami, N., Saito-Taki, T., and Hasegawa, K.: *Can. J. Microbiol.*, **39**, 726-730 (1993).
- 8) Lowry, D. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 9) 坂崎利一 (監訳): 医学細菌同定の手引き, 近代出版 (1993).
- 10) Fogarty, A. M. and Tuovinen, O. H.: *Microbiol. Rev.*, **55**, 225-233 (1991).
- 11) Taguchi, F., Mizukami, N., Hasegawa, K., and Saito-Taki, T.: *Can. J. Microbiol.*, **40**, 228-233 (1994).
- 12) Taguchi, F., Mizukami, N., Hasegawa, K., Saito-Taki, T., and Morimoto, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 565-567 (1994).
- 13) Taguchi, F., Mizukami, N., Yamada, H., Hasegawa, K., and Saito-Taki, T.: *Enzyme and Microbiol. Tech.*, **17**, 147-150 (1995).
- 14) Taguchi, F., Hasegawa, K., Saito-Taki, T., and Hara, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 178-180 (1996).