

## 食品廃棄物分解菌の分離と分離株を用いたコンポスト

藤田藤樹夫 \*・鈴木孝典 \*\*・吉岡佐知子 \*\*\*・岸本憲明 \*\*\*

\* 近畿大学資源再生研究所、\*\* 赤門ウイントン株式会社、\*\*\* 近畿大学農学部農芸化学科

### Isolation and identification of bacteria from food wastes and examination of optimal conditions for composts using these isolated bacteria

Tokio FUJITA\*, Takanori SUZUKI\*\*, Sachiko YOSHIOKA\*\*\* and Noriaki KISHIMOTO\*\*\*

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kinki University, 3327-204  
Nakamachi, Nara 631-8505, Japan*

#### Synopsis

Eighty-seven bacteria were isolated from food wastes compost and approximately 60% of the isolated bacteria were identified as *Bacillus* spp. The other isolates were identified as the actinomycetes *Streptomyces* spp., the fungi *Aspergillus* spp. and the yeasts *Candida* spp.. Especially, three isolates, identified as *Bacillus coagulans*(No.120 and 132) and *Flavobacterium balustinum* No.108, produced enzymes containing amylase, protease, lipase and cellulase. Inoculation of these three isolates into food wastes produced a considerable reduction in the compost time and an improvement in the quality of the compost.

## 緒 言

有機性廃棄物の処理を巡っては、焼却に伴う炭酸ガスの増加や近年話題になっているダイオキシンなどの有害物質や環境ホルモンなどの発生、最終処理場の逼迫、処理コストの増加など多くの問題がある。有機性廃棄物は本来再資源化が可能であり、コンポスト等の利用が進められており、都市固形廃棄物や下水汚泥、家畜糞尿など様々な原料<sup>1-6)</sup>を用いたコンポスト化に関する研究は数多くされている。しかし、都市固形廃棄物や下水汚泥には重金属などの有害物質の危険性<sup>7)</sup>や、プラスチックやガラスなどの混入は製品としてのコンポストの品質を低下させるため、有効利用上の問題となっている。また、食品工業における廃棄物に関する研究は少なく、コーヒー抽出粕<sup>8-10)</sup>、ミカン搾汁粕<sup>11,12)</sup>のコンポスト化について検討されているが実用規模には達していない。しかしながら、食品産業由来の廃棄物は、有害物質の含有等の安全面でも問題が少ないため、コンポスト化への研究が今後さらに進むものと考えられ、コンポスト原料としての利用が増加する可能性は高い。これらのことからコンポスト化は良質な有機質肥料の供給を行うことによる土壌の改善・向上と、大量に排出される有機性廃棄物の処理と再資源化、周辺環境への負荷の低減の二面性を有していると思われる。

コンポストの生産では一般に2つの発酵段階に分けられる。まず原料となる有機性廃棄物へ分解を促進させるための種菌として有機質肥料や活性汚泥、市販の促進剤を加え、さらに水分調整のため藁やおがくず、木材チップを加えている。一次発酵では比較的分解されやすいデンプンやタンパク質が微生物によって分解され、この混合物は一斉に微生物の分解を受けるためその品温は60～80℃にも達する。この期間は一次発酵と呼ばれ約1ヶ月ほどあり、この高温により混合物中に存在する植物病原菌や雑草の種子、腸内細菌などが死滅し<sup>13)</sup>、作物にとって害の少ない、また衛生的なものとなる。二次発酵では品温が低下し、一次発

酵で分解されにくかったセルロースやリグニンなどが約1～4ヶ月かけて分解される。この発酵期間を短縮することは、有機性廃棄物の処理期間の縮小だけでなく、その処理量の増加にもつながるものと考えられる。発酵期間中では様々な微生物が活動し分解を行っていることから、発酵期間を短縮する一つの方法としてそこに生存する微生物が要求する水分、酸素量、温度制御などの環境が挙げられる。もう一つに分解を促進させる微生物の添加が考えられ、種菌として用いる有機質肥料や活性汚泥中に生存する微生物よりもさらに有機性廃棄物の分解力を持った微生物の添加をすることで、より発酵を活性化させ発酵期間を短縮させることが挙げられる<sup>14)</sup>。

食品廃棄物にはデンプン・タンパク質・脂質・セルロースが多く含まれていると考えられる。これらの分解能が高い微生物を種菌として使用すれば、廃棄物の処理期間の短縮や処理量の増大、環境負荷の低減が期待される。本研究では市販のコンポストからこれらの分解能の高い微生物の単離と、この微生物を用いたコンポスト製造における成分の変化及び発酵条件の検討を行った。

## 実験方法

### 1. 種菌のスクリーニング

有用菌のスクリーニングは、市販のコンポストを分離源として行った。コンポストは滅菌済生理食塩水にて10倍段階希釈を行い、細菌は普通寒天培地（日水製薬株式会社製）、放線菌はショ糖・硝酸塩寒天培地を用いて37℃、3日間培養した。糸状菌はPDA培地（日水製薬株式会社製）、酵母はMY寒天培地を用いて28℃、7日間培養した。生じたコロニーはそれぞれ同様の培地のスラントに植菌し培養後、供試菌株として用いるまで4℃で保存した<sup>15)</sup>。

### 2. アミラーゼテスト

デンプン分解菌の1次スクリーニングは、供試菌をTable 1に示す可溶性デンプンを炭素源とす

るスクリーニング用培地に一白金耳接種した<sup>15-17)</sup>。細菌と放線菌は培地にプロピオン酸ナトリウムを  $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  になるように加え、pH 7.2 で 37℃、3 日間培養した。糸状菌は培地にクロラムフェニコールを  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  になるように加え、pH 5.6 で 28℃、7 日間培養した。酵母は培地にプロピオン酸ナトリウムを  $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、クロラムフェニコールを  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  になるように加え、pH 5.6 で 28℃、7 日間培養した。培養後、ルゴール液を培地上に添加しヨードデンプン反応により分解部位の直径を測定し、分解部位の直径をコロニーの直径で割った値を分解率とした。

1 次スクリーニングで優良な 4 株は、ヨードデンプン法による  $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定した<sup>18-20)</sup>。滅菌済みの普通ブイヨン培地 100 ml にそれぞれ菌株の懸濁液 ( $10^8 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) を 1 ml 接種した。これを 37℃、3 日間、125 stroke/min で振盪培養し、その後培養液を遠心除去し、その培養上清液を粗酵素液 (E) とした。基質 (S) は可溶性デンプンを 0.25 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して 4% (w/v) に調整したものをを用いた。37℃ に保温したこの基質溶液 1.0 ml に得られた粗酵素液 1.0 ml を 37℃、7 分 30 秒正確に反応させた後、0.01 N ヨウ素液で発色させた (E S)。盲検 (B 1) は粗酵素液を沸騰水中で 30 分加温し失活させたものをを用い、0.01 N ヨウ素液で発色させた後 (E B 1)、分光光度計で ABS 660 nm における吸収を測定し、酵素反応による吸光度の減少を見た。本法では粗酵素液 100 ml が 37℃、30 分間でデンプン 10 mg を過不足なく分解したときの酵素活性が 1 unit となり、以下の計算式で培養液 1 ml 当たりの酵素活性を求めた。

Table 1. Composition of screening medium

|                 |         |
|-----------------|---------|
| Soluble starch  | 20 g    |
| Polypeptone     | 10 g    |
| Yeast extract   | 5 g     |
| NaCl            | 5 g     |
| Agar            | 20 g    |
| Distilled water | 1000 ml |

For bacteria and actinomyces, medium was adjusted pH 7.2, added  $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  propionic acid sodium salt. For fungi, it was adjusted pH 5.6, added  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  chloramphenicol. And for yeast, it was adjusted pH 5.6, added  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  chloramphenicol and  $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  propionic acid sodium salt.

$$\text{Activity (Unit} \cdot \text{ml}^{-1}) = \frac{E_{\text{BI}} - E_{\text{S}}}{E_{\text{BI}}} \times 800$$

Formula for  $\alpha$ -amylase activity

### 3. プロテアーゼテスト

タンパク質分解菌の 1 次スクリーニングとして、Table 2 に示すスキムミルクを栄養源とするスクリーニング培地に供試菌一白金耳接種した<sup>15-17)</sup>。細菌と放線菌は培地にプロピオン酸ナトリウムを  $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  になるように加え、pH 7.2 で 37℃、3 日間培養した。選択薬剤として、糸状菌は培地にクロラムフェニコールを  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、酵母は培地にプロピオン酸ナトリウムを  $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、クロラムフェニコールを  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  になるように加え、それぞれ pH 5.6 で 28℃、7 日間培養した。培養後、スキムミルクを分解した部位はクリアゾーンを形成することから、コロニーの直径とクリアゾーンの直径を測定し、クリアゾーンの直径をコロニーの直径で割った値を分解率とした。

Table 2. Composition of screening medium

|                  |         |
|------------------|---------|
| Skim milk powder | 10 g    |
| Polypeptone      | 0.5 g   |
| Yeast extract    | 0.25 g  |
| NaCl             | 5 g     |
| Agar             | 20 g    |
| Distilled water  | 1000 ml |

For bacteria and actinomyces, medium was adjusted pH 7.2, added  $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  propionic acid sodium salt. For fungi, it was adjusted pH 5.6, added  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  chloramphenicol. And for yeast, it was adjusted pH 5.6, added  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  chloramphenicol and  $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  propionic acid sodium salt.

1 次スクリーニングで優良な 4 株は、タンパク質分解後の除タンパク質剤による非沈殿性物質の測定によりプロテアーゼ活性を測定した<sup>20)</sup>。プロテアーゼ活性の測定は滅菌済みの普通ブイヨン培地 100 ml にそれぞれ菌株の懸濁液 ( $10^8$  CFU  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>) を 1 ml 接種した。これを 37℃、3 日間、125 stroke/min で振盪培養し、その後培養液を遠心機で菌体を除去し、その培養上清液を粗酵素液とした。基質としてカゼイン 3 g を 0.1 N NaOH 50 ml に溶解した後、蒸留水 150 ml と 0.05 N tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) 200 ml を加え、ついで 0.1 N HCl で pH 7.2 に調整し、最後に蒸留水で 500 ml とした。37℃に保温したこの基質溶液 5 ml に粗酵素液 1 ml を加え、正確に 10 分間反応させた。反応後、37℃に保温した除タンパク剤の T C A 混液 (50 % 三塩化酢酸 36 ml、1M 酢酸ナトリウム 220 ml、1M 酢酸 330 ml を混合し、蒸留水で 1L に定容したもの) 5 ml を加えて反応を停止し、37℃で 10 分放置した。ここで生じた沈殿を濾別し、この濾液を分光光時計で ABS 275 nm における吸収を測定した (OD<sub>y</sub>)。盲検として、粗酵素液を沸騰水中で 30 分加温し、失活させたものを用い、これを 1 ml に 30℃に保温した TCA 混液 5 ml 加え、さらに基質 5 ml を加えて 20 分間放置した。ここで生じた沈殿を濾別し、濾液の分光光時計で ABS 275 nm における吸収を測定し (ODB)、酵素反応における吸光度の増加を測定した。本法では 1 分間に 1  $\mu$  g のチロシン相当量を TCA 可溶性とする酵素力価をもって 1 unit とし、以下の計算式で培養液 1 ml 当たりの酵素活性を求めた。

$$\text{Activity (Unit} \cdot \text{ml}^{-1}) = (\text{OD}_y - \text{ODB}) \times 149$$

Fomula for protease activity

#### 4. リパーゼテスト

脂質分解菌の 1 次スクリーニングは、Table 3 に示すスクリーニング培地を用いた<sup>15-17)</sup>。基礎培地、1 % 塩化カルシウム水溶液、tween 80 はそれぞれ別にオートクレーブで 121℃、20 分間高圧蒸気滅菌を行い、基礎培地を 50℃内外に冷却後、まず

tween 80 を加え完全に溶解した後、塩化カルシウム溶液を加えて混和した。これを直ちにシャーレに流し込んだ。このスクリーニング培地に供試菌を一白金耳植菌した。細菌と放線菌は培地にプロピオン酸ナトリウムを 250 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> になるように加え、pH 7.2 で 37℃、3 日間培養した。糸状菌は培地にクロラムフェニコールを 100mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> になるように加え、酵母は培地にプロピオン酸ナトリウムを 250 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup>、クロラムフェニコールを 100 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> になるように加え、それぞれ pH 5.6 で 28℃、7 日間培養した。

Table 3. Composition of screening medium

|                          |                 |        |
|--------------------------|-----------------|--------|
| Basal medium             | Polypeptone     | 5g     |
|                          | Yeast extract   | 3g     |
|                          | Agar            | 20g    |
|                          | Distilled water | 1000ml |
| Tween 80                 |                 | 10ml   |
| 1% CaCl <sub>2</sub> aq. |                 | 10ml   |

For bacteria and actinomycetes, medium was adjusted pH 7.2, added 250 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> propionic acid sodium salt. For fungi, it was adjusted pH 5.6, added 100 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> chloramphenicol. And for yeast, it was adjusted pH 5.6, added 100 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> chloram-phenicol and 250 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> propionic acid sodium salt.

1 次スクリーニングで優良な上位 4 株について、分散法によりリパーゼ反応によって遊離した脂肪酸をアルカリ滴定で定量し、リパーゼ活性を求めた<sup>18)</sup>。滅菌済みの普通ブイヨン培地 100 ml にそれぞれ菌株の懸濁液 ( $10^8$  CFU  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>) を 1 ml 接種した。これを 37℃、3 日間、125 stroke/min で振盪培養し、その後培養液を遠心機で菌体を除去し、その培養上清液を粗酵素液とした (E)。0.01 M 塩化カルシウムを含む 1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) 5 ml に基質としてオリーブオイル 1 ml を加えた (S)。37℃に保温した基質溶液に同様に 37℃に保温した粗酵素液を 1 ml 加え、30 分間振盪させながら反応させた。反応終了後 20 ml のエタノールを加えて反応を停止させ、指示薬としてフェノールフタレイン 5 滴を加え、0.05 N NaOH で滴定した

(E S)。盲検 (B 1) として基質溶液を 37℃、30 分間加温後エタノール 20 ml 加え、ついで粗酵素液 1 ml を加え、指示薬としてフェノールフタレイン 5 滴を滴下し、0.05 N NaOH で滴定し、酵素反応による遊離脂肪酸の増加量を測定した (EB1)。本法では、37℃で基質のオリーブオイルから 1 分間に 1  $\mu$  M の脂肪酸を遊離する酵素量を 1 unit とし、以下の計算式で培養液 1 ml 当たりの酵素活性を求めた。

$$\text{Activity} = \frac{E_S - E_{Bl}}{\text{Incubation time (min)}}$$

Formula for lipase activity

## 5. セルラーゼテスト

セルロース分解菌の 1 次スクリーニングとして、Table 4 に示す重合度 (n) = 500、置換度 (DS) = 0.6 ~ 0.8 のカルボキシメチルセルロース・ナトリウム塩 (CMC-Na) を栄養源とするスクリーニング培地 (Hankin の培地) に供試菌を一白金耳接種した<sup>21)</sup>。CMC-Na を水に溶解させるため、ブレードのついたホモジナイザーで 10,000 rpm、5 分間程度処理した。細菌と放線菌は培地にプロピオン酸ナトリウムを 250 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> になるように加え、pH 7.2 で 37℃、7 日間培養した。糸状菌は培地にクロラムフェニコールを 100 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> になるように加え、酵母は培地にプロピオン酸ナトリウムを 250 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup>、クロラムフェニコールを 100 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> になるように加え、pH 5.6 で 28℃、7 日間培養した。それぞれ培養後、1 % セチルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTAB) 水溶液を 5 ~ 10 ml 平板に流し込み、CMC-Na を白濁沈殿させた。このとき CMC-Na を分解した部位はクリアゾーンを形成することから、コロニーの直径とクリアゾーンの直径を測定し、クリアゾーンの直径をコロニーの直径で割った値を分解率とした。

1 次スクリーニングでセルラーゼ活性の優良な上位 4 株について、Somogyi-Nelson 法によって CMC-Na の分解産物である還元糖の増加を測定す

ることにより活性を求めた<sup>22)</sup>。セルラーゼ活性の測定は滅菌済みの普通ブイヨン培地 100 ml にそれぞれ菌株の懸濁液 (10<sup>8</sup> CFU  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>) を 1 ml 接種した。これを 37℃、3 日間培養し、その後培養液を遠心除去し、その培養上清液を粗酵素液 (E) とした。CMC-Na を 500 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に加え均一に溶解したのち、さらに 11 に定容したものを基質溶液 (S) とした。100 ml 容三角フラスコに基質溶液を 0.2 ml とり、あらかじめ 37 度に加温してから同温度に加温した酵素液 0.2 ml を加え、30 分間反応させ、ついでアルカリ銅試薬 0.2 ml を加え反応を停止させた。ふたをしたのち、沸騰温浴中に 20 分間保ち、急冷し Nelson 試薬を 0.2 ml 加え発色させた。10 分以上放置したのち蒸留水で 10 ml に希釈し、分光光時計で ABS 560 nm における吸光度を測定し、あらかじめグルコースを用いて作成しておいた検量線から還元糖量を求めた (E S)。盲検は 100℃、5 分以上加熱し失活させたものを同様に行った (E B 1)。

Table 4. Composition of screening medium

|   |            |
|---|------------|
| CMC-Na  | 5g         |
| (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>                           | 2g         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                             | 4g         |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                            | 6g         |
| MgSO <sub>4</sub> $\cdot$ 7H <sub>2</sub> O                 | 200mg      |
| CaCl <sub>2</sub>   | 1mg        |
| Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> $\cdot$ 7H <sub>2</sub> O | 1mg        |
| Yeast extract   | 1g         |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                              | 10 $\mu$ g |
| MnSO <sub>4</sub>   | 10 $\mu$ g |
| ZnSO <sub>4</sub>   | 70 $\mu$ g |
| CuSO <sub>4</sub>   | 50 $\mu$ g |
| MoO <sub>3</sub>  | 10 $\mu$ g |
| Agar  | 20g        |
| Distilled water   | 1000 ml    |

For bacteria and actinomycetes, medium was adjusted pH 7.2, added 250 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> propionic acid sodium salt. For fungi, it was adjusted pH 5.6, added 100 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> chloramphenicol. And for yeast, it was adjusted pH 5.6, added 100 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> chloramphenicol and 250 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> propionic acid sodium salt.



本法では、37℃で基質の CMC-Na から 1 分間に 1  $\mu$  M の還元糖を生成する酵素量を 1 unit とし、以下の計算式で培養液 1 ml 当たりの酵素活性を求めた。

$$\text{Activity (Unit} \cdot \text{ml}^{-1}) = \frac{\text{ES } (\mu \text{ g}) - \text{EB1 } (\mu \text{ g})}{180.16 \times \text{incubation time}} \times 2$$

Formula for cellulase activity

## 6. 分離株の同定

得られた有用株の 3 株は、以下 Bargey's manual determinative bacteriology<sup>23)</sup>、Bergey's manual of systematic bacteriology vol.1・2<sup>24,25)</sup> に準拠し、医学細菌同定の手引き<sup>26)</sup>、微生物の分類と同定〈下〉<sup>27)</sup>、新細菌培地学講座 下 I・II<sup>16,17)</sup> を参考に同定を行った。

No.108 株の属の検索は、形態学的特徴として、栄養細胞の形態、運動性、芽胞の有無、コロニーの色、さらに生理学的特徴として、グラム反応、カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、発酵性、NaCl・pH についてそれぞれ行った。

No.120、132 株の属の検索は、形態学的特徴として、栄養細胞の形態、芽胞の有無、運動性、生理学的特徴として、グラム染色、カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、酸の生成、NaCl 要求性をそれぞれに基づいて行った。

No.108 株の種の検索は生理学的特徴として、酸の生成、カゼインの消化、エスクリンの加水分解、インドールの生成、硝酸塩・亜硝酸塩の資化性、デンプンの加水分解、ウレアーゼの生成、 $\beta$ -Galactosidase の生成、ゼラチンの分解、生育温度をそれぞれに従って行った。

No.120、132 株の種の検索は生育温度、生育 pH、クエン酸塩利用能、ブドウ糖ブイヨンにおける嫌気性発育、酸の生成、アセチルメチルカルビトールの生成、デンプン加水分解、硝酸塩の還元、インドールの生成、ゼラチン加水分解、カゼイン加水分解、ウレアーゼの生成、レシチナーゼの生成、リゾチーム感受性をそれぞれに基づいて行った。

## 7. コンポスの製造

### 1) 培養液の調製

*Fravobacterium balustinum* No.108 と *Bacillus coagulans* No.120 及び No.132 は滅菌済みの普通ブイヨン培地 100 ml の入った 500 ml 容坂口フラスコに一白金耳接種し、37℃、72 時間、125 stroke/min で前培養を行った。次にこの培養液から  $10^8$  CFU  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> になるように接種し同様の培地でそれぞれの菌株の培養液を 8 l ずつ用意しコンポスト製造に供した。

### 2) 原料の調製

コンポスト原料となる食品廃棄物には、食品会社の残飯、廃棄商品の弁当、パン工場の廃棄物を用いた。得られた食品廃棄物は雑夾物と食品とに分けた。これを試作コンポスト製造機内にいったん入れ攪拌、混合した原料の重量を測定し、有用株添加のものとコントロール（有用株無添加）とに分けた。

### 3) コンポスの製造条件

コンポスト製造における温度は 37℃に設定し、通気量は、風量計を用いて 100 L  $\cdot$  m<sup>-3</sup>  $\cdot$  min<sup>-1</sup> に設定した。攪拌は 24 時間行った。原料の水分含量は 60%と設定し、水分含量の測定では 60%を下回ったときに蒸留水を添加し、水分含量を維持させた。木材チップはコンポスの製造には広く用いられ、これは原料の水分含量の制御や、原料の物理的な空間を広げるためや、コンポスト製造中に増殖する微生物のすみかとなるためである。本実験においても木材チップを原料 60 kg に対してそれぞれ 10 kg 加えた。一般に水分含量が極端に低いと微生物の活性が低下し、また水分含量が高すぎると嫌気的条件となり、好気性微生物の活性が低下する。以上の操作により水分含量を維持させ好気的条件を満たしながら廃棄物の分解促進を試みた<sup>28)</sup>。

原料は 60 kg を用意し、有用株添加の原料には培養液を 20 l 添加した。コントロールには水分含量を有用株添加のものと同様にするため、同量の蒸留水を加えた。試料の採取はコンポスト製造から

1, 4, 8, 15, 22, 29 日目に行い、分析試料に用いた。

#### 4) 重量の測定

重量の測定は、コンポスト製造機と原料を加えた重量を量り、あらかじめ測定しておいたコンポスト製造機の重量を差し引いたものをコンポストの総重量とした。

#### 5) 温度の測定

温度の測定は、温度計（SATO SK-250WP）で測定した。コンポスト製造機内で無作為に 5 点の温度を測り、その平均をとった。この測定時に温度が 37℃を上下していた場合は必要に応じて温度制御を行った。なお、常に攪拌を行っているため、コンポスト製造機内の深さによる温度変化はないものと考えた。

#### 6) 水分含量の測定

水分含量の測定は、試料 20 g をあらかじめ秤量しておいた容器内に入れ、乾燥機で 24 時間、105℃で乾燥させた。デシケーター内で冷却後に秤量し重量を測定し、その減量を水分含量とした<sup>29)</sup>。

#### 7) pH の測定

pH の測定は、試料 10g に対して蒸留水もしくは 1N KCl を 25ml 加え、攪拌後 30 分間静置した。これを pH メーター（HORIBA D-23）でそれぞれの懸濁液の pH を測定した<sup>29)</sup>。

#### 8) 菌数の測定

菌数の測定は、10 倍段階希釈法により測定した。試料 1 g を正確に秤量し生理食塩水で希釈し、細菌と放線菌は普通寒天培地（日水製薬株式会社製）を用いて平板塗末後 37℃、3 日間培養した。糸状菌と酵母は PDA 培地（日水製薬株式会社製）を用いて平板塗末後 28℃、7 日間培養した。培養後それぞれの菌数を測定し、試料 1g 中の細胞数を求めた。

#### 9) 粗脂肪の測定

粗脂肪の測定は、抽出法により行った<sup>30)</sup>。試料 5 g を円筒濾紙に入れ脱脂綿で軽く栓をし、これにあらかじめ重量を測定しておいた抽出フラスコをつけたソックスレー（Soxhlet）油脂抽出器にかけ、100～200 ml のジエチルエーテルを用いて温浴中で 8 時間抽出を行った。抽出後フラスコ内のエチルエーテルをエバポレーターにて回収し、水分含量の測定と同様の方法で 105℃の乾燥器中で 24 時間乾燥させデシケーター内で冷却後重量を測定した。

#### 10) カリウムの測定

カリウム含量の測定は、イオンメーター（HORIBA D-23）で測定した。試料 10 g を 300 ml 容三角フラスコにとり、蒸留水 100 ml を加え攪拌し一昼夜静置した。この懸濁液中に溶出した水溶性のカリウムを  $K^+$  としてイオンメーターで測定し、乾燥重量あたりのカリウム含量を算出した。

#### 11) 硝酸態窒素の測定

硝酸態窒素含量は、イオンメーター（HORIBA D-23）で測定した。試料 10 g を 300 ml 容三角フラスコにとり、蒸留水 100 ml を加え攪拌し一昼夜静置した。この懸濁液に溶出した水溶性の硝酸態窒素を  $NO_3^-$  としてイオンメーターで測定し、乾燥重量あたりの硝酸態窒素含量を算出した。

#### 12) アンモニア態窒素の測定

アンモニア態窒素含量は、イオンメーター（HORIBA D-23）で測定した。試料 10 g を 300 ml 容三角フラスコにとり、蒸留水 100 ml を加え攪拌し一昼夜静置した。この懸濁液に水酸化ナトリウム水溶液を 50 ml 加え、この懸濁液の pH12 以上のアルカリ性とし、このとき懸濁液中のアンモニウムイオンはほぼ 100%アンモニアガスとなるため、このアンモニアガスを  $NH_4^+$  としてイオンメーターで測定し、乾燥重量あたりのアンモニア態窒素含量を算出した。

### 13) 全窒素の測定

全窒素量の測定では、まず試料 5 g をケルダール分解フラスコにとり分解促進剤（硫酸銅 1 + 硫酸カリウム 9） 5 g、濃硫酸 30 ml を加え約 30 分間徐々に加熱し有機物の分解が緩慢になった後強熱した。フラスコの内容は黒色→帯緑濁色を経て透明な青色となる。ここで分解を止め 200 ml 容メスフラスコで定容した。この分解溶液 10 ml を 100 ml 容メスフラスコにとり水酸化ナトリウム水溶液を加え pH 12 以上とし 100 ml に定容した。このときに発生するアンモニアガスをイオンメーター（HORIBA D-23）で  $\text{NH}_4^+$  としてイオンメーターで測定し、乾燥重量あたりのアンモニア態窒素含量を算出した<sup>29)</sup>。これに硝酸態窒素含量を加えたものを全窒素量とした。なお全窒素量から硝酸態窒素含量及びアンモニア態窒素含量を差し引いたものを有機態窒素含量とした。

### 14) リン酸の測定

リン酸含量の測定はバナドモリブデン酸法で測定した<sup>31)</sup>。全窒素量の測定で得られた分解液 10 ml を 50 ml の定容フラスコにとった。メタバナジン酸アンモニウム 2.5 g と濃硝酸 20 ml とを加え 1 l 容メスフラスコで定容した 0.25% メタバナジン酸アンモニウム溶液を 5 ml 加え、全量を 50 ml にした後よくかき混ぜ 30 分静置したものを分光光度計を用いて 440 nm における吸収を測定し、乾燥重量あたりのアンモニア態窒素含量を算出した。

### 15) 全炭素の測定

全炭素量の測定は、Tyurin 法で測定した<sup>29)</sup>。風乾させた試料を 0.5 mm 円孔ふるいに通し、0.01 g を 100 ml 容三角フラスコにとった。これに重クロム酸カリウム 40g を蒸留水加え、1 l 定容したものに 1 l の濃硫酸（比重 1.84）を加えた 0.4 N クロム酸・硫酸混液 10 ml を加えた。あらかじめ加温しておいたホットプレート（IWAKI GRASS PC-351）にのせ、フラスコの底から一様に泡が生じ始めてから正確に 5 分間煮沸を続けた後速やかに冷却した。これに N-フェニルアントラニル酸

0.2g を 0.2% 炭酸ナトリウム溶液で 100 ml に定容したフェニルアントラニル酸溶液を 5 滴入れた。ついで濃硫酸（比重 1.84）20 ml を含む蒸留水 1 L につき硫酸第一鉄アンモニウム（モール塩）40 g 含有する、0.1N 硫酸第一鉄アンモニウム溶液で滴定し、分解液の色が明緑色に変わる時を終点とした。盲検値は試料を加えないで同様に操作して求めた。0.1N 硫酸第一鉄アンモニウム溶液 1 ml は 0.3 mg の炭素に相当し、空試験滴定値との差から炭素量を求めた。同時に上で求めた全窒素量から C / N 比を算出した。

## 結果および考察

市販のコンポストから細菌 52 株、放線菌 13 株、糸状菌 12 株、酵母 10 株の合計 87 株をスクリーニングし、供試菌株として実験に用いた。

アミラーゼテストの 1 次スクリーニングの結果を Fig. 1 に示した。この結果から優良株として細菌 No.101、114、132、136 を選んだ。2 次スクリーニングの結果から、Fig.2 に示す No.132 のアミラーゼ活性が 12.3 units で最も高かった。プロテアーゼテストの 1 次スクリーニングの結果から優良株として細菌 No.105、132、136、139 を選んだ。さらに 2 次スクリーニングの結果から、Fig. 3 に示した No.132 のプロテアーゼ活性が 37.2 units で最も高かった。リパーゼテストの 1 次スクリーニングの結果から優良株として細菌 No.108、114、123、139 を選んだ。次に 2 次スクリーニングの結果から、No.108 のリパーゼ活性が 7.8 units で最も高かった（Fig. 4.）。セルラーゼテストの結果から優良株として細菌 No.120、139、141、152 を選び、その中でも、No.120 が高い活性を示した（Fig. 5.）。

以上の結果よりアミラーゼテストとプロテアーゼテストより No.132、リパーゼテストより No.108、セルラーゼテストより No.120 の 3 株をコンポスト製造における種菌とした。

本実験において糸状菌の活性は細菌に比べ著しく低いものであった。近年、コンポスト製造工場



に浮遊する糸状菌の孢子や分生子、菌糸体による従業員の健康への影響が論議されており<sup>32)</sup>、また mycotoxin の存在を報告するものもある<sup>33,34)</sup>。従って本実験では糸状菌を種菌として選ばなかった。また分離した酵母と放線菌は細菌に比べ活性が低かった。

コンポスト中に含まれる微生物の研究については多くの研究されている。その一つとしてこれら微生物が生産する酵素についての研究が挙げられる<sup>35)</sup>。多くの微生物が生産する多種多様な酵素によって原料中に含まれる様々な物質が分解されているものと考えられる。原料中には糖やデンプン、タンパク質の他に食用油、セルロースが多く含まれている。本実験ではデンプン・タンパク質・脂質・セルロースを分解する能力の高い微生物の単離・検索を行ったが、これらを分解する能力が高い微生物を単離・培養し種菌としてコンポストの製造に使用することは、より発酵期間の短縮が期待される。

No.108 株の属の同定に用いた試験項目及びその結果を Table 5 に示した。No.108 株はグラム陰性の桿菌 ( $0.5 \times 1.0\text{--}3.0 \mu\text{m}$ ) で芽胞は形成しない。運動性はなく、好気性である。また平板培地上に生育させるとそのコロニーは黄色から橙色の色素を生産する。カタラーゼ、オキシダーゼ共に陽性で、酸化により糖を分解する。60℃以上、また 5℃では発育せず、20 % NaCl の存在下でも生育しない。以上の結果から、No.108 株は *Flavobacterium* 属に同定した。

種の同定結果を Table 6 に示した。エタノールからは酸を生成するが、アラビノース、セロビオース、ラクトース、マンニトールなどからは酸を生成しなかった。カゼインを消化せず、エスクリンを加水分解しインドールを生成した。硝酸は還元するが、亜硝酸は還元できない。デンプンを加水分解し、ウレアーゼ、 $\beta$ -Galactosidase を生成しない。またゼラチンを分解し 42℃で発育できないことから、No.108 株は *Flavobacterium balustinum* に同定した。

No.120、132 株の属の同定結果を Table 7 に示した。No.120、132 株はグラム陽性の桿菌 ( $0.6\text{--}1.0 \times 2.5\text{--}5 \mu\text{m}$ ) で芽胞を形成し、運動性を有するカタラーゼ陽性で糖を発酵により分解し、嫌気的条件下で発育が可能で 2%以上での発育は認められなかった。このことから No.120、No.132 株はともに *Bacillus* 属に同定した。

種の同定結果を Table 8 に示した。No.120、132 株共に同様の結果が得られた。45℃において発育は見られたが、65℃においては見られず、pH 5.6 においては発育が見られた。クエン酸塩の利用能を有しブドウ糖ブイヨンによる嫌気的条件下においても発育が認められた。グルコース、アラビノース、キシロース、マンニトールから酸を生成し、アセチルメチルカルビトールの生成は pH 6 以下ではしなかった。カゼイン、デンプンは加水分解したが、ゼラチンではしなかった。硝酸塩は還元せず、インドールは生成しなかった。レシチナーゼ、ウレアーゼを生成せずリゾチーム存在下で発育が見られなかったことから、No.120、132 株は共に *Bacillus coagulans* に同定した。

Fig. 6 はコンポスト製造中における重量と水分含量の変化を示したものである。製造開始から重量は減少していき、15、22 日目で 60%を下回った。そのため、16、23 日目に水分の調整を行い重量がそれぞれ増加している。最終的にコンポスト製造中には種菌添加で 41.9 kg、コントロール（種菌無添加）で 44.7 kg 減少した。また pH の変化は製造期間を通して常にコントロールが低い pH 値を示した。Fig. 7,8 は製造中の細菌と酵母の菌数を示した。菌数は共に種菌添加の有無に関わらず減少していった。しかし種菌を添加したのもではコントロールに比べ細菌の減少が小さく、酵母の減少が大きかった。これらのことからコントロールでは原料のパン生地から由来する多くの酵母の生存により原料の pH が低下していくが、種菌の添加により pH の低下を妨ぐことになり、結果として pH の維持につながったものと考えられる。カリウム含量ははじめ 1.31 mg であったが 29 日後に種菌添加 2.18mg, コントロール 1.61 mg へとそれぞれ増

加した。またリン酸含量は 3.16 mg から 29 日後にそれぞれ 5.05 mg、4.12 mg へと増加した。これらの増加から種菌の添加で約 1.5 倍、コントロールで約 1.3 倍に濃縮された。Fig. 9 は粗脂肪の変化を示し、66.2mg の粗脂肪は 29 日後にそれぞれ 9mg、45mg に減少した。全窒素量・全炭素量・C/N 比の測定結果から、全窒素量の変化は共に著しい違いは見られないが、全炭素量は種菌の添加によりその減少量が大きく、Fig.10 に示した C/N 比は 35 から 24.5（種菌添加）と 32.3（コントロール）に比べ大きく低下した。これらの結果から、種菌添加により酵母による pH の低下を抑制し、微生物の活性が高まり、各種成分の変化からコンポスト化が促進され、種菌無添加時に比べコンポストの製造期間が短縮され、処理量の増加が可能であることを示唆した。

Table 5. Morphological and physiological of No. 108

| Characteristic  | No.108 |
|---|--------|
| Gram reaction   | +      |
| Cell shape:   |        |
| Rods  | +      |
| Cocci   | -      |
| Cell diameter (μm)  | 0.5    |
| Endospores produces   | -      |
| Motility in liquid media  | -      |
| Growth at 60°C or more  | -      |
| Growth at 5°C but not 37°C  | -      |
| Fluorescent pigment   | -      |
| Yellow colonies   | +      |
| Oxidase   | +      |
| Catalase  | +      |
| Acid from glucose   | +      |
| Indole from tryptophan  | +      |
| Fermentative in glucose O-F medium                                | -      |
| Growth in lean media between pH 2.0 and 5.9 but not 6.1 or higher | -      |
| Growth with 20% or more NaCl                                      | -      |

Table 6. Characteristics of the species of the genus *Flavobacterium*

| Characteristics                              |   |
|--|---|
| Acid produced aerobically from carbohydrates |   |
| Glucose                                      | + |
| Arabinose                                    | - |
| Cellobiose                                   | - |
| Ethanol                                      | + |
| Lactose                                      | - |
| Mannitol                                     | - |
| Raffinose                                    | - |
| Slain  | - |
| Sucrose                                      | - |
| Xylose                                       | - |
| Casein digestion                             | + |
| Esculin hydrolysis                           | + |
| Indole production                            | + |
| Nitrate reduction                            | - |
| Starch hydrolysis                            | - |
| Urease production                            | - |
| β-Galactosidase production                   | - |
| Gelatin hydrolysis                           | + |
| Growth at:                                   |   |
| 5°C  | - |
| 37°C   | + |
| 42°C   | - |

Table 7. Morphological and physiological properties of No.120, No 132

| Characteristics                | No.120  | No.132  |
|--------------------------------|---------|---------|
| Rod-shaped in young cultures   | +       | +       |
| Width of rod                   | 0.6-1.0 | 0.6-1.0 |
| Length of rod (μm)             | 2.5-5   | 2.5-5   |
| Endospore produced             | +       | +       |
| Motile                         | +       | +       |
| Stain gram positive            |         |         |
| at least in young culture      | +       | +       |
| Catalase                       | +       | +       |
| Oxidase                        | +       | +       |
| Marked of acidity of glucose   | +       | +       |
| Requires 3-12% NaCl for growth | -       | -       |

Table 8. Characteristics of the species of the genus *Bacillus* No. 120, 132

| Characteristics              | No.120 | No.132 |
|------------------------------|--------|--------|
| Growth at:                   |        |        |
| 45°C                         | +      | +      |
| 65°C                         | +      | +      |
| Growth at pH:                |        |        |
| 6.8                          | +      | +      |
| 5.7                          | +      | +      |
| Growth in NaCl               |        |        |
| 2%                           | +      | +      |
| 5%                           | -      | -      |
| Utilization of Citrate       | +      | +      |
| Anaerobic growth             | +      | +      |
| Acid form                    |        |        |
| glucose                      | +      | +      |
| arabinose                    | +      | +      |
| Xylose                       | +      | +      |
| Mannitol                     | +      | +      |
| pH in V-P broth              |        |        |
| <6                           | +      | +      |
| >7                           | -      | -      |
| Hydrolysis of                |        |        |
| Casein                       | +      | +      |
| Gelatin                      | -      | -      |
| Starch                       | +      | +      |
| Urea                         | -      | -      |
| Nitrate reduced to nitrite   | +      | +      |
| Egg-yolk lecithinase         | -      | -      |
| Growth with lysozyme present | -      | -      |

## 総合考察

短期間のコンポスト化を目的とした研究が数多くなされており<sup>1,31)</sup>、コンポスト化の分解促進に微生物を添加することは有用性がある<sup>36)</sup>。しかし、一部の市販微生物はコンポスト製造で有効性を唱えているが、作物生産に微生物が直接寄与する働きも殆どないとの反論がなされるなど<sup>37)</sup>、コンポスト化における微生物の添加と肥料としての長期保存型の添加が要求されつつある。有害物質が少なくコンポスト原料として優良な食品廃棄物には、デンプン・タンパク質・脂質・セルロースを多く含んでいることから、これらの分解能の高い有用菌株のスクリーニングにはコンポストから行い、コンポスト化における製造期間短縮に対する有効性を検討した。その結果、No.108、120、

132株が得られ、No.108株は*Fravobacterium balustinum*、No.120株、130株は共に*Bacillus coagulans*と同定された。これらの菌株を用いたコンポスト製造では製造期間の短縮が認められた。今後、高分解能を有する微生物の混合培養が更なる製造期間の短縮とコンポストの品質を左右するものとする。

## 引用文献

- 1) R.F. Herrmann, J.F. Shann: Microbial Community changes during the composting of municipal solid waste, Microb. Ecol., 33, 78-85, (1997)
- 2) Kiyohiko Nakasaki, Masayuki Sasaki, Makoto Shoda, Hiroshi Kubota: Effect of seeding during thermophilic composting of sewage sludge, Appl. Environ. Microbiol., 49, 724-726, (1985)
- 3) Arja H. Vuorinen, Maritta H. Saharinen: Evolution of microbiological and chemical parameter during manure and strage co-composting in a dram composting system, Agric. Ecosystems Environ., 66, 19-29, (1997)
- 4) Atallah T, Andreux F., Chone T.,Gras F.: Effect of storage and composting on the properties and degradability of cattle manure, Agric. Ecosystems Environ., 54, 203-213, (1995)
- 5) P.R. Warman, W. C. Termeer: Composting and evaluation of racetrack manure, grass clippings and sewage sludge, Bioresource Technol., 55, 95-101, (1996)
- 6) D.P.C. Stewart, K.C. Cameron, I. S. Cornforth: Inorganic-N release from spent mushroom compost under laboratory and field conditions, Soil Biol. Biochem., 30 (13) , 1689-1699, (1998)
- 7) 汚泥の農地等還元問題研究会: 汚泥の農地等への還元について, 1-43, (1983)

- 8) 若澤秀幸, 高橋和彦, 望月一男: コーヒー粕の施用が作物生育と土壤理化学性に及ぼす影響, 日本土壌肥料学会雑誌, 69(1), 1-6, (1998)
- 9) 若澤秀幸, 高橋和彦, 望月一男: コーヒー粕とバークの混合堆肥化, 日本土壌肥料学会雑誌, 69(1), 7-11, (1998)
- 10) Gloria Sanchez, Eugenia J. Olguin, Gabriel Mercado: Accelerated coffee pulp composting, Biodegradation, 10, 35-41, (1999)
- 11) Pham Thi Hien, Tatsuo Katoh and Yosaku Fujio: Isolation and identification of citrus-juice residue composting bacteria, J. Fac. Agr, Kyusyu Univ., 43(3-4), 425-432, (1999)
- 12) 前田久夫: 農産加工廃棄物のコンポスト化, 日本食品化学会誌, 45(1), 163-170, (1998)
- 13) I. Deportes, J. L. Benoit-Guyod, D. Zmirou and M.C. Bouvier: Microbial disinfection capacity of municipal solid waste (MSW) composting, J. Appl. Microb., 85, 238-246, (1998)
- 14) Strom P. F.,: Identification of thermophilic bacteria in solid waste composting, Appl. Environ. Microbiol., 50, 906-913, (1985)
- 15) 児玉徹: 微生物の単離法, R & D プランニング, (1986)
- 16) 田村和満, 吉崎悦郎, 三木寛仁: 新細菌培地学講座 - 下 I -, 近代出版, (1990)
- 17) 田村和満, 吉崎悦郎, 三木寛仁: 新細菌培地学講座 - 下 II -, 近代出版, (1990)
- 18) 小崎道夫, 相沢孝亮, 小野正之, 手塚隆久, 柳田藤治: 酵素利用ハンドブック, 地人書館, (1980)
- 19) Caraway, W. T: Am. J. Path., 32, 97-99, (1950)
- 20) 戸田安士, 早川哲夫 他: 日本臨床 (秋期増刊), 31, 558-569, (1973)
- 21) 土壌微生物研究会: 土壌微生物実験法, 養賢堂, 1975
- 22) 岩井和也: *Aspergillus fumigatus* No.232 による  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) -D-arabinogalactan の分解に関する研究, 近畿大学大学院 修士論文, 5, (1995)
- 23) Guido Fischer, Regina Schwalbe, Manfred Moller, Rene Ostrowski and Wolfgang Dott: Species-specific of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility, Chemosphere, 39 (5), 795-810, (1999)
- 24) L. Molhave: Indoor climate, air pollution, and human comfort, J. Expo, Environ. Epidemiol, 1, 63-81, (1991)
- 25) G. Fischer, R. Schwalbe, R. Ostrowski and W. Dott: Airborne fungi and their secondary metabolites on working places in compost facilities, 41 (9-10), (1998)
- 26) Sylvia Ayora, Per-eric Lindgren and Friedrich Gotz: Bioschemical properties of a novel metalloprotease from *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* involved in extracellular lipase processing, J. Bacteriol., 3218-3223, (1994)
- 27) John G. Holt et: Bergey's manual determinative bacteriology 9th, Williams & Wilkins, (1993)
- 28) Noel R. Krieg: Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 1, Williams & Wilkins
- 29) Peter H.A. Sneath: Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 2, Williams & Wilkins
- 30) S. T. Cowan 坂崎利一訳: 医学細菌の手引き, (株)近代出版, (1983)
- 31) 長谷川武治編著: 改訂版 微生物の分類と同定 <下>, 株式会社 学術出版センター, 99-153, (1985)
- 32) 堆肥化施設設計マニュアル策定事業策定委員会: 堆肥化施設設計マニュアル, 社団法人 中央畜産会, (1991)
- 33) 京都大学農学部農芸化学教室: 新改版 農芸化学実験書 第1巻, 産業図書, (1993)
- 34) 京都大学農学部農芸化学教室: 改訂新版 実験農芸化学 第三巻, 朝倉書店, (1974)
- 35) Finstein M.S., Morris M.L.: Microbiology of municipal solid waste composting, Adv.

- Appl. Microbiol., 19, 113-151, (1975)
- 36) Shashi S. Rajbanshi, Hidekazu Endo, Kazunori Sakamoto and Kazuyuki Inubushi: Stabilization of chemical and biochemical characteristics of grass straw and leaf mix during in-vessel composting with and without seeding material, Soil Sci. Plant Nutr., 44, (4) , 485-495, (1998)
- 37) 後藤逸夫, 小野剛志, 藤原俊六郎, 日本土壤肥料学会, 70 (5) , 698-706, (1999)