

油分解能を有する微生物を用いた厨房廃水処理システム

Kitchen Wastewater Treatment System using Microorganisms Active in Oil Degradation

喜田義一* *Yoshikazu Kita* 近山憲幸* *Noriyuki Chikayama*
 富安雅樹* *Masaki Tomiyasu* 篠沢隆雄** *Takao Shinozawa*

厨房廃水処理に油分解能を有する微生物(油分解菌)を用いる方法は、油を分離するシステムであるグリストラップや加圧浮上装置よりも環境に配慮したシステムであると言われている。当社オリジナルのバイオ製剤「グリスパッカマン」は、土壌や河川水等を集積培養し、その培養液から単離した油分解菌N12-111を製品化したものである。N12-111の油分解性能が他の油分解菌や他社のバイオ製剤と比較して高いこと、同定試験や動物実験により生体に対して安全な細菌であることを確認した。

グリスパッカマンを用いた厨房廃水処理システムを加圧浮上装置が設置されていた実際の厨房廃水処理施設に導入した。その結果、産業廃棄物である油泥の堆積がほとんどないこと、その処理水が下水道排除基準を満足できる水質まで浄化されていることを実証した。また、オゾン曝気を併用することで、油分解性能が向上することを確認し、適用範囲を拡大させた。

Using microorganisms that are active in oil degradation for kitchen wastewater treatment is better for the environment than using grease traps and the dissolved air flotation method, which only separate oils. Our original bio-preparation, "Gurisu-pakkuman", uses oil-degrading bacteria N12-111 isolated from soil and river water. We confirmed the oil-degrading ability of N12-111 was higher than that of other oil-degrading bacteria isolated and prepared by other companies. Then we confirmed by identification, examination, and animal experimentation that N12-111 was safe for human contact. Kitchen wastewater treatment systems using "Gurisu-pakkuman" were introduced into actual wastewater treatment facilities that previously used the dissolved air flotation method. As a result, oil-sludge and industrial waste minimally accumulated, and the treated water qualified for the oil-degrading performance of our system using ozone aeration, and expanded the range of application.

〔1〕 緒 言

厨房や食品工場等から排出される廃水には、多量の油（ここでは動植物性油を示す）が混入しており、排出先の下水道の管路閉塞や浄化槽の水質悪化等の問題が起きている。一般的に、多量の油が混入すると予想されている廃水経路にはグリストラップや加圧浮上装置等の油を除去する施設（除害施設）が設置されている。しかし、グリストラップ等の小型の除害施設では、計画値を大幅に超える油の流入や、管理不良等の問題で、適切な処理が行われていないのが現状である¹⁾。

また、グリストラップや加圧浮上装置は、油を水との比重差を利用して分離する施設であり、分離された油泥（油と汚泥の固まり）を産業廃棄物として処分しなければならない。近年、ISO14001（国際標準化機構が認証する環境マネジメントシステムの基準）やゼロ・エミッションを推進する企業が

増加している中で、産業廃棄物の処理は大きな課題といえる。

厨房廃水等に含まれる油の除去に油分解能を有する微生物（油分解菌）を利用するシステムは、油を分解するという点で、従来の油を分離するシステムであるグリストラップや加圧浮上装置よりも、環境に配慮したシステムであると言われている。近年、当社でも他社のバイオ製剤（油分解菌や酵素等）を利用した廃水処理施設を維持管理することが多くなってきた。しかし、他社のバイオ製剤は全てブラックボックスに包まれており、適切な管理ができないのが現状である。そこで、当社オリジナルの油分解菌を用いた厨房廃水処理システムの開発に着手した。

本報は、高性能油分解菌の探索から、油分解菌の単離、細菌の安全性の確認、油分解性能の評価を経て、実施設での油分解性能を実証したグリスパッカマンを用いた厨房廃水処理システムの開発に関するものである。

*日立化成メンテナンス 開発技術部 **早稲田大学大学院教授（前群馬大学工学部教授）

〔 2 〕 油分解のしくみ

2.1 動植物油の構造

動植物油の大部分がトリアシルグリセロールの混合物，すなわちグリセリンの脂肪酸トリエステルで構成されており，非極性，水に不溶である。図1にトリアシルグリセロールの構造を示す。油の基本的な性質は，グリセリンと結合する脂肪酸の種類によって決まる²⁾。

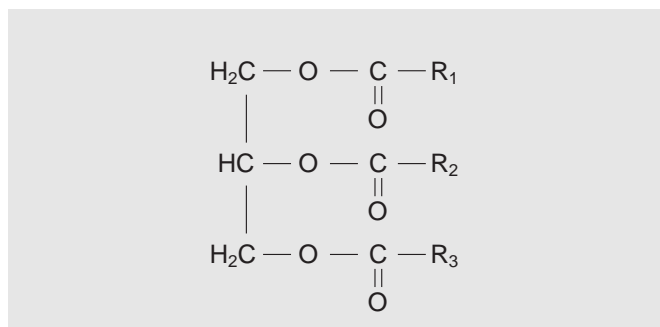


図1 トリアシルグリセロールの構造 Rはアルキル基を示す。

Fig. 1 Structure of triacylglycerol

2.2 トリアシルグリセロールの分解

トリアシルグリセロールは難分解性有機物であり，生物は酵素を産生して，トリアシルグリセロールをグリセリンと脂肪酸に分解する。グリセリンと脂肪酸は，最終的に水と二酸化炭素まで分解され，生物のエネルギー源となる。

〔 3 〕 高性能油分解菌の探索

3.1 集積培養法

油を効率よく分解する微生物を得るために集積培養法を用いた。集積培養法とは，微生物の混合集団を，特定の種の存在比を高めながら純培養に導いていく培養法である。例えば，培養液の炭素源をオリーブオイルのみに限定した培地に土壤等の微生物の混合集団を添加すると，徐々にオリーブオイルをよく資化する微生物の存在比が高くなる。

各地から土壌や河川水などの微生物の混合集団を採取し，油を分解する微生物の存在比を高める条件で集積培養を行った。

3.2 油分解菌の単離

集積培養法では，1個の菌体を分離（単離）することが困難であるため，集積培養法により油分解菌の存在比が高まった培養液から，寒天培地上に油分解菌のコロニーを形成させて，油分解菌を単離した。油分解菌を識別する培地として，従来はクリアゾーン形成培地（乳化させた油を混合した培地で，油分解能を有する微生物のコロニーの周囲は油が分解され，無色透明のクリアゾーンを形成する）を用いていたが，コロニーがクリアゾーンを形成するためには約1週間掛かるため，新たにVictoria Blue寒天培地を開発した。Victoria Blue寒天培地上に形成された油分解菌のコロニーの周囲は，油を分解してできる脂肪酸により青く呈色する³⁾。図2に油分解菌を植え付けたVictoria Blue寒天培地の呈色状況を示す。Victoria Blue寒天培地を用いることで，油分解菌のコロニーの識別が約24時間で可能となった。これらの結果，油分解能を有すると思われる菌株を約150種類単離した。



図2 油分解菌を植え付けたVictoria Blue寒天培地の呈色状況
培養温度30℃，培養時間24時間。コロニー周囲が青く呈色している。

Fig. 2 Color reaction of Victoria Blue agar plate with oil-degrading bacteria

The color around the colony became blue after culturing for 48 hours at 30℃.

〔 4 〕 油分解菌の性能評価

4.1 識別培地による油分解性能の評価

単離した油分解菌のうち，油分解性能が高いと思われる菌株を素早く選定するために，市販のサラダ油，バター，牛脂，ラードを基質とした，Victoria Blue寒天培地を用いて，コロニーの成長性，培地の呈色状況等から，油分解性能を評価した。表1に油分解菌によるサラダ油，バター，牛脂，ラードの分解性能を示す。その結果，N12-111等，油分解性能が高いと思われる菌株を10種類まで選定した。

表1 油分解菌によるサラダ油，バター，牛脂，ラードの分解性能

Table 1 Degradation activity of salad oil, butter, suet, and lard by oil-degrading bacteria

油分解菌名	サラダ油	バター	ラード	牛脂
BY16-111	+	+++	+++	+++
BY17-111	++	++	++	++
N12-111	+++	++	++	++
ST-211	++	++	++	++
SG-151	++	++	++	++
SG-411	+	++	++	++
SY2-511	+	++	++	++
SY4-111	+++	++	++	++
SY5-111	++	++	++	++
SY8-111	+	++	++	++

注) +++ 油分解性能が非常に優れている，++ 油分解性能が優れている，+ : 油分解性能がある

4.2 安全性の簡易判定

油分解菌を実際の廃水処理施設で使用するにあたり，病原性の微生物による環境汚染は，絶対に避けなければならない。まず，油分解菌の病原性を食中毒に起因する病原菌（大腸菌，サルモネラ菌，腸炎ビブリオ菌，黄色ブドウ球菌）の簡易細菌検出キットで評価した。その結果，SG-151，SG-411が黄色ブドウ球菌であることがわかった。次に，油分解菌の16SrDNA（沈降係数が16SのリボソームRNAをコードするDNA）の塩基配列を決定し，National Center for Biotechnology Information（NCBI）のデータベースに対しBLASTで相同性検索を行い，種族を推定することで安全性を評価した。その結果，SY2-511がCorynebacteriumに帰属する

細菌であることがわかった。Corynebacterium属には、日本細菌学界が示すバイオセーフティー指針に記載されている病原菌のバイオセーフティーレベル分類のレベル2に属する病原菌が含まれている。病原性の危険度は高い方から順にレベル4、レベル3、レベル2、レベル1（レベル2～4以外の細菌）に分類される。これらの結果から、レベル2～4に属さない菌株について、さらに詳しく油分解性能を調査した。

4.3 油分解性能の比較試験

油分解性能および安全性が高いと思われる菌株を実際の廃水処理施設を模倣して作製した模擬廃水処理装置に添加して、連続系での油分解性能を調査した。図3にN12-111, BY16-111, BY17-111のヘキサン抽出物質除去率の推移を示す。これらの結果、単離した菌株の中で、N12-111が最も高い油分解性能を示した。

次に、N12-111および他社のバイオ製剤がその環境に十分馴れた（馴養した）実施設の廃水を用いて、ヘキサン抽出物質除去率を比較した。図4にN12-111と他社のバイオ製剤のヘキサン抽出物質除去率を示す。その結果、N12-111を馴養させた廃水が最も高いヘキサン抽出物質除去率を示した。

これらの結果、N12-111は実際の廃水処理施設でも、高い油分解性能を示すことを確認した。

4.4 N12-111が産生する酵素の性能

p-Nitrophenyl Ester（以下PNPEと称す）を用いて、N12-111の酵素の性能を測定した。図5にPNPEの構造を示す。PNPEのエステル結合が酵素により加水分解されると、p-Nitrophenolが分離する。p-Nitrophenolは405nm付近の波長を吸収するため、吸光度からPNPE分解率を求めることができる⁴⁾。PNPEは脂肪酸とp-Nitrophenolがエステル結合した物質で、油の構造と類似している。また、脂肪酸の種類による酵素の特異性も調査することが可能である。図6にN12-111によるPNPEの炭素数別分解率の推移を示す。

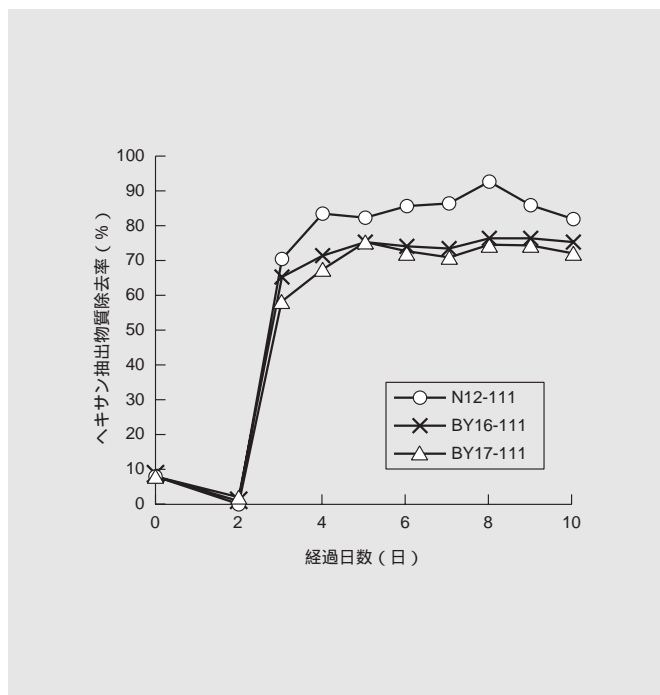


図3 N12-111, BY16-111, BY17-111のヘキサン抽出物質除去率の推移 水温20℃, 水槽容積10L(3室), 滞留時間18時間, 原水のヘキサン抽出物質含有量平均293mg/L

Fig. 3 Rejection ratio of hexane extract by N12-111, BY16-111, and BY17-111

PNPEにはp-Nitrophenyl Butyrate (C=4), p-Nitrophenyl Caprylate (C=8), p-Nitrophenyl Laurate (C=12), p-Nitrophenyl Myristate (C=14) を使用した。その結果、脂肪酸の炭素数が短いほど分解が早く進行することがわかった。また、脂肪酸の炭素数の長さに関わらずN12-111が産生する酵素は油分解能を示すことがわかった。

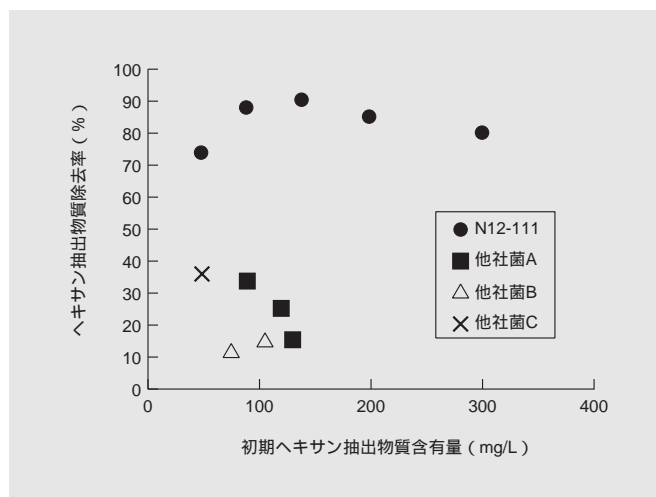


図4 N12-111と他社のバイオ製剤のヘキサン抽出物質除去率 水温20℃, 反応時間24時間。

Fig. 4 Rejection ratio of hexane extract by N12-111 and bio-preparations of the other companies

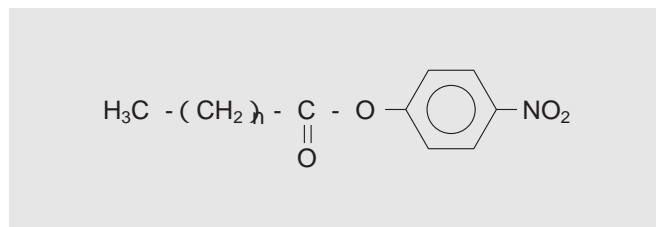


図5 PNPEの構造

Fig. 5 Structure of PNPE.

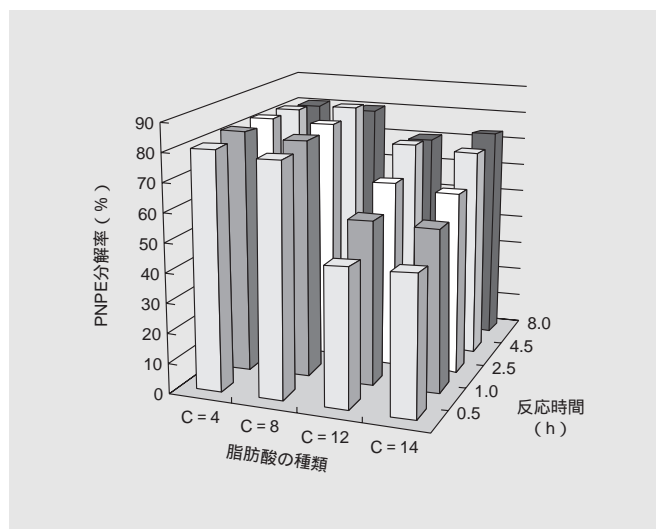


図6 N12-111によるPNPEの炭素数別分解率の推移

Fig. 6 Resolution rate of PNPE by N12-111 according to number of carbons

【 5 】 N12-111の安全性の確認

5.1 同定

油分解菌N12-111の同定と16SrDNAの塩基配列の解読による近縁種の解析を株式会社エヌシーアイエムビー・ジャパンに依頼した。図7にN12-111の菌体の電子顕微鏡撮影写真を、表2にN12-111の同定第1段階結果を、表3にN12-111の細菌同定第2段階結果を、図8にN12-111の16SrDNA塩基配列解読結果を、図9にN12-111の16SrDNA塩基配列解読結果を基に作成した近隣結合法による系統樹を示す（すべて株式会社エヌシーアイエムビー・ジャパン殿調査結果報告書より抜粋）。同定試験の結果、N12-111はAcinetobacter.spであると推定された。また、16SrDNAの解析結果から、N12-111はAcinetobacter genomospecies 10に帰属するものと推定された。Acinetobacter属はバイオセーフティーレベル1に属し、ヒトに疾病を起こし、或いは動物に獣医学的に重要な疾患を

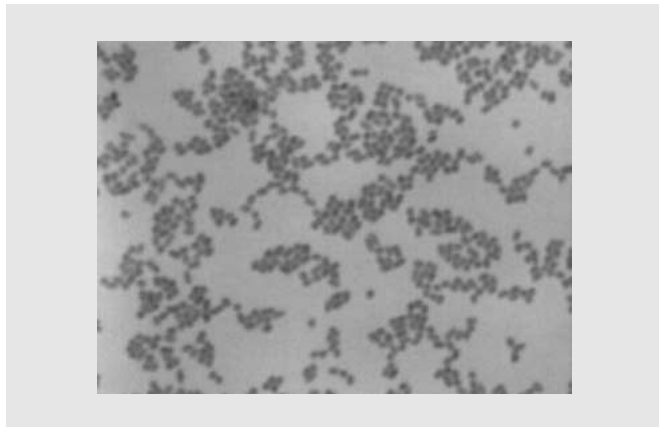


図7 N12-111の菌体の電子顕微鏡撮影写真

Fig. 7 Photograph of N12-111 taken with electron microscope

表2 N12-111の同定第1段階結果

Table 2 First stage identification results of N12-111

検体番号	N12-111	
培養温度	30	
細胞形態	桿菌 (0.8 × 1.0 ~ 1.2µm)	
グラム染色		
孢子		
運動性		
コロニー形態	培地：普通寒天 培養時間：48h 円形 周縁やや波状 低凸状 光沢 クリーム色	
培養温度	37	+
	45	-
カタラーゼ	+	
オキシターゼ	-	
OFテスト (グルコース)	-	
同定の結果	Acinetobacter	

+：陽性，-：陰性，W：反応弱

表3 N12-111の細菌同定第2段階管理

Table 3 Second stage identification results of N12-111

NO3 - TRP - GLU - ADH - URE - ESC - GEL - PNPG - GLUa - ARAa - MNEa - MANa - NAGa - MALa - GNTa - CAPa + ADIa + MLTa + CITa + PACa - OX

テスト項目	反応 / 酵素	テスト項目	反応 / 酵素
NO3	硝酸塩還元*	MANa	D-マンニトール**
TRP	インドール産生*	NAGa	N-アセチル-D-グルコサミン**
GLU	ブドウ糖 酸性化*	MALa	マルトース**
ADH	アルギニンジヒドロラーゼ*	GNTa	グルコン酸カリウム**
URE	ウレアーゼ*	CAPa	n-カプリン酸**
ESC	エスクリン加水分解*	ADIa	アジピン酸**
GEL	ゼラチン加水分解*	MLTa	dl-リノゴ酸**
PNPG	-ガラクトシダーゼ*	CITa	クエン酸ナトリウム**
GLUa	ブドウ糖**	PACa	酢酸フェニル**
ARAa	L-アラビノース**	OX	チトクロームオキシダーゼ*
MNEa	D-マンノース**		

* 生化学試験 ** 資化性試験

```

tqqaqagttt qatcctqqct caqattqaac gctqqcqqca qqcttaaac 50
atqcaagtcq agcqqqqqag attgcttcqq taaytqacct agcqqcqqac 100
qqqtqaqtaa tacttaqaaa tctqctatt aatqqqqac aacatctcga 150
aaqqgatqct aataccqcat acqccctacq qqqqaaaqca qqqgatcact 200
tqtqaccttq cqttaataqa tqaqcctaaq tcqqatatac taqttqqtqq 250
qqtaaaqqcc taccaaqqcc acqatctqta qcqqqtctqa qaqqatqatc 300
cqccacactq qqactqaac acqqcccaqa ctectacqqq aqqcaqcaqt 350
qqqqaatatt qqacaatqqq qqqaaccctq atccaqccat qccqctqtq 400
tqaaqaagq cttatqqtq taaaqcaact taagcqaqqa qqaqctctt 450
ttqqttaata cccaatqatq qtqqacqta ctcqcaqaat aaqcaaccqc 500
taactctgtg ccagcagcgc cggta
    
```

図8 N12-111の16SrDNA塩基配列解読結果

Fig. 8 16SrDNA base sequence mapping of N12-111

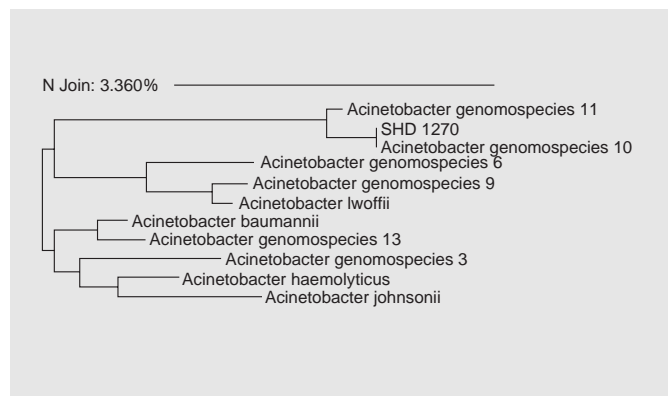


図9 N12-111の16SrDNA塩基配列解読結果を基に作成した近隣結合法による系統樹

Fig. 9 Evolutionary tree made by neighbor-joining method based on 16SrDNA base sequence mapping of N12-111

起こす可能性のないもの（日和見感染を含む）である。日和見感染とは体力や免疫力に問題がない場合には病気をおこすことのないような微生物が、体力や免疫力の弱まった人に感染して病気を起こすことである。

5.2 急性毒性試験

N12-111の安全性を実験用マウスによる急性毒性試験により確認した。N12-111の培養液を実験用マウスに与えて、その後の様子を観察した。投与後、マウスの性状に変化は見られなかった。N12-111に急性毒性がないことを確認した。

5.3 薬剤感受性試験

近年、Acinetobacterに帰属する細菌に多剤耐性菌が見つかったとの報告がなされた⁵⁾。多剤耐性菌とは、多種の抗菌剤に耐性を持った細菌のことで、多剤耐性菌に感染した場合Acinetobacter属等のバイオセーフティレベル1に属する細菌でも、重大な疾患を及ぼすこととなる。今回、薬剤感受性試験紙を用いてN12-111が一般に広く利用されている抗生物質のアンプシリン、ストレプトマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン30、クロラムフェニコールに対して感受性がある（耐性がない）ことを確認した。表4にN12-111の薬剤感受性試験結果を示す。その結果、N12-111は一般に広く使用されている抗生物質に感受性があり、多剤耐性菌ではないことがわかった。

〔6〕 システムの立上げ

N12-111を製品化したバイオ製剤「グリスバックマン」、油を分解するための反応時間を確保するバイオ反応槽、廃水の

表4 N12-111の薬剤感受性試験結果

Table 4 Medicine receptivity examination results of N12-111

項目	感受性
アンプシリン	+++
ストレプトマイシン	+++
カナマイシン	+++
ゲンタマイシン	+++
テトラサイクリン30	+++
クロラムフェニコール	++

注) +++:感受性が非常に強い, ++感受性が強い

溶存酸素が1mg/L以上になる様な曝気装置からなる厨房廃水処理システムを立上げた。(2001年特許出願)

〔7〕 実施設への導入例

加圧浮上装置が設置されていた実際の厨房廃水処理施設にグリスバックマンを用いた厨房廃水処理システムを導入した。図10にグリスバックマンを用いた厨房廃水処理システム導入前、導入後の廃水処理システムのフローを示す。本システムの性能は、処理水の水質と、油泥の堆積状況から評価した。図11に処理水のヘキサン抽出物質含有量の推移を示す。本システム導入後、油泥はなくなり、廃棄物処理量が削減された。また、グリスバックマン馴養後の処理水は下水道排除基準を満足する水質であることが実証された。

〔8〕 システムの高性能化

廃水中の油の濃度が高い施設や廃水量が多い施設では、比較的大きな生物処理槽が必要である。しかし、立地条件等の

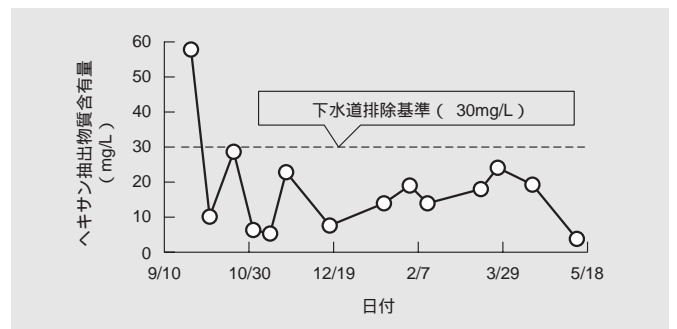


図11 処理水のヘキサン抽出物質含有量の推移 導入後1ヵ月間は馴養期間とする。

Fig. 11 Concentration of hexane extract in treatment water

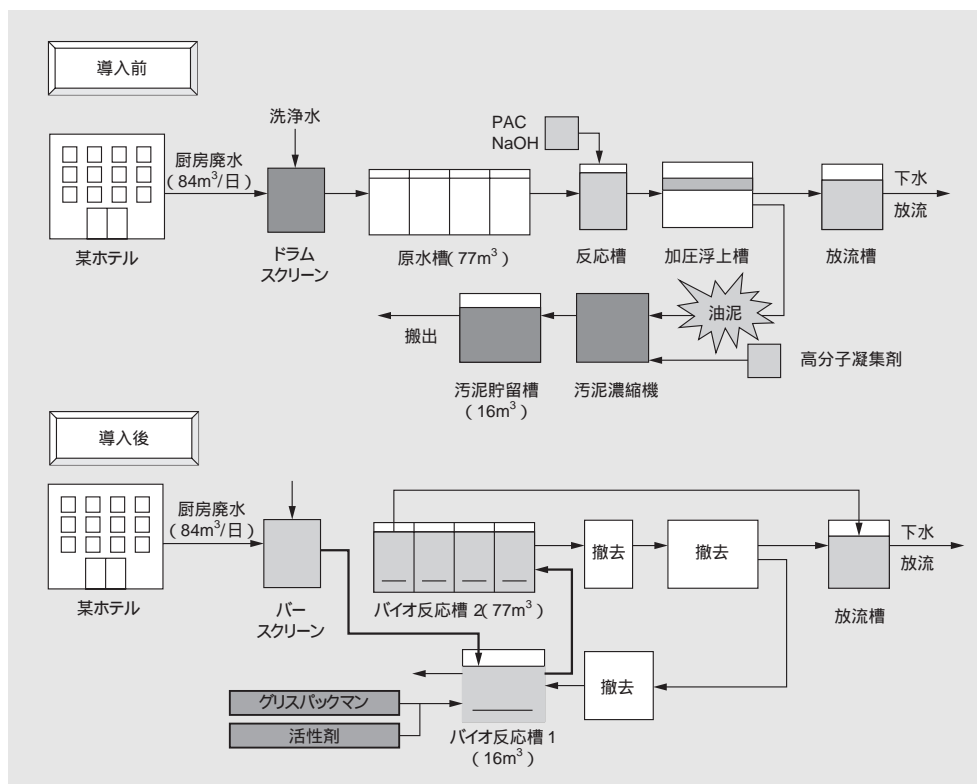


図10 グリスバックマンを用いた厨房廃水処理システム導入前、導入後の廃水処理システムのフロー 活性剤はグリスバックマンの油分解性能を補助する栄養塩である。

Fig. 10 Flow chart of kitchen wastewater treatment system before and after insatallation of "Grisupakkuman"

問題で、大掛かりな生物処理槽を設置できない施設もある。それらの施設にグリスバックマンを用いた厨房廃水処理システムを導入するため、グリスバックマンとオゾン曝気を併用した厨房廃水処理システムの導入を検討した。オゾンは酸化力が強く油を低分子化するため、グリスバックマンと組み合わせることで油の分解速度を速めることができる⁹⁾。図12にグリスバックマンが馴養された廃水での、オゾン曝気時と空気曝気時のヘキサン抽出物質除去率の推移を示す。その結果、オゾン曝気を併用することにより、油分解性能が向上することがわかった。

実際のグリストラップにグリスバックマンとオゾン曝気を併用した厨房廃水処理システムを導入した。図13に本システム導入前のグリストラップの状況を、図14にグリスバックマンとオゾン曝気を併用した厨房廃水処理システム導入3ヵ月後のグリストラップの状況を示す。本システム導入後は、グリストラップに油泥の堆積が見られなかった。これらの検討により、グリスバックマンを用いた厨房廃水処理システムの適用範囲が拡大した。これまでに、日立グループ各社に6件、日立グループ以外に30件、合計36件の納入実績がある。

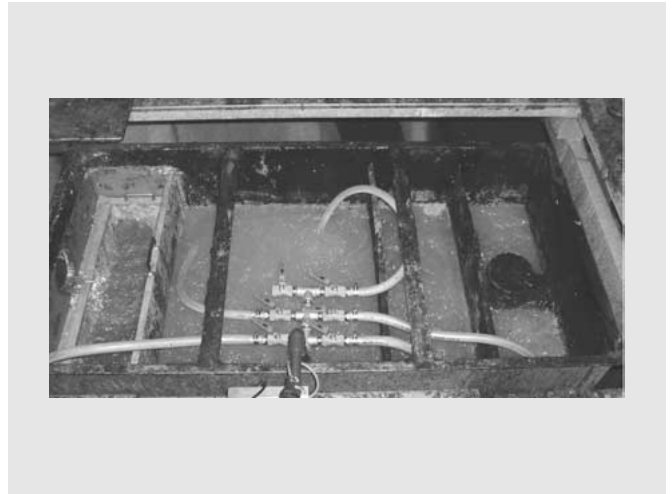


図14 グリスバックマンとオゾン曝気を併用した厨房廃水処理システム導入3ヵ月後のグリストラップの状況 3ヵ月間油泥の引抜きなし。

Fig. 14 Photograph of grease trap three months after installation of "Gurisupakkuman" with ozone aeration

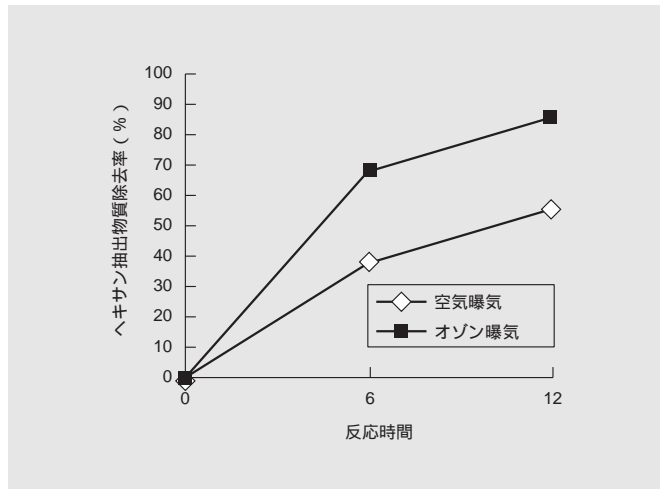


図12 グリスバックマンが馴養された廃水での、オゾン曝気時と空気曝気時のヘキサン抽出物質除去率の推移

Fig. 12 Rejection ratio of hexane extract by "Gurisupakkuman" with ozone aeration and air aeration

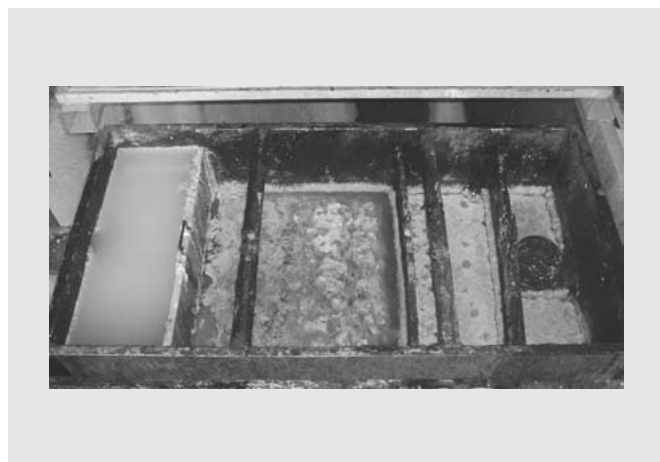


図13 本システム導入前のグリストラップの状況

Fig. 13 Photograph of grease trap before installation of our system

〔9〕 結 論

集積培養法により存在比を高め、Victoria Blue寒天培地により単離した油分解菌N12-111は、他社のバイオ製剤よりも優れた油分解性能を示した。また、N12-111は同定試験および16SrDNAの解析結果から、Acinetobacter属に帰属していると推定された。Acinetobacter属は日本細菌学界が示すバイオセーフティーレベル1に属する微生物である。次に、動物実験の調査結果よりN12-111には、急性毒性がないことがわかった。また、薬剤感受性試験の結果から、N12-111は多剤耐性菌ではないことがわかった。これらの結果、N12-111は油分解性能が高く、安全な微生物であるということを確認した。

N12-111を製品化したグリスバックマンを用いた厨房廃水処理システムを実際の廃水処理施設に導入したところ、産業廃棄物である油泥を減らし、その処理水は下水道排除基準を満足する水質であることが確認された。その結果から、グリスバックマンを用いた厨房廃水処理システムは、実施においても高い油分解性能を示すことが実証された。また、オゾン曝気を併用することにより、グリスバックマンを用いた厨房廃水処理システムの適用範囲が拡大された。

産業廃水等の排出規制は、環境問題がクローズアップされる中で、益々厳しくなっていくと予想される。今後も、油分解菌を用いた厨房廃水処理システムのさらなる高性能化を図り、適用範囲を広げていきたい。

参考文献

- 1) 伊与 亨：排水中の油の処理の現状，月間浄化槽，217，16～25，（1994）
- 2) Donaid Voet, Judith G. Voet：「脂質と膜」．ヴォート生化学（上）第二版，東京，株式会社東京化学同人，1999，p.238-239
- 3) 山本正和：「リパーゼ生産菌の分離」．微生物の分離法，東京，株式会社R&Dプランニング，1990，p.235-250
- 4) 伊藤 晋：油分解菌の活性とリパーゼ活性の測定，群馬大大学院工学部修士論文，（2001）
- 5) 朝日新聞，12月9日号，（2001）
- 6) 杉光 英俊：「オゾン利用技術」，オゾンの基礎と応用，東京，株式会社光琳，1996，p.193-211