

焼酎蒸留廃液中に増殖する細菌の特性

山下博史, ジェフリー F. モコレンサン, 山崎繁久, 尾上義夫

Characteristics of Bacteria Grown in *Shochu* Distillery Wastewater

Hirofumi Yamashita, Jeffrie F. Mokolensang, Shigehisa Yamasaki, and Yoshio Onoue

Keywords : *Shochu* distillery wastewater, *Acinetobacter-Moraxella*, *Flavobacterium*

Abstract

Three strains of bacteria, a white strain of *Acinetobacter-Moraxella* group I and yellow and pink strains of *Flavobacterium* group I, were separated from *shochu* distillery wastewater to investigate their biological properties. Proportions of three of these were 65% for the white, and 25% and 10% for the yellow and pink strains, respectively. The white and yellow strains showed the highest growth at 30°C, but the pink strains at 25°C. Comparison for the growth of these three strains was also made under various concentrations of total organic carbons.

Growth of all the strains was promoted with an increase of the carbon content up to 250 ppm. The best growth with a cell density of 29.7×10^5 cells mL⁻¹ was attained in the white strain under optimal conditions.

焼酎製造過程において特に問題となる焼酎蒸留廃液(以下、焼酎廃液と略記)は、サツマイモ、米麴、酵母菌、仕込み水からなるもろみを発酵させて単式蒸留器により蒸留し、エタノール、香気成分を取り出した蒸留残滓である。

この焼酎廃液中には原料由来のタンパク質(1.2%)、繊維(0.4%)、無機塩類(0.5%)、脂肪(0.2%)、可溶性無窒素物(3.2%)、水分(94.5%)などを含み、使用した麴の種類により黄色ないし黒灰色を示す¹⁾。

現在、海洋投棄は自主規制されているが、1999年酒造年度(1999年7月-2000年6月)では、南九州で136,000キロリットルの焼酎を生産し、234,562トンの焼酎廃液を排出し、この中の120,000トンが海洋投棄された²⁾。

焼酎廃液のリサイクルは家畜飼料の分野で広く研究されており¹⁾、水産分野ではコイの飼料開発が行われている^{3,4)}。

本研究では、焼酎廃液排出過程で混入し焼酎廃液に優

占的に増殖する細菌を分離同定し、その増殖特性を調べた。

材料および方法

材料

本実験には鹿児島県大口市のサツマイモ焼酎工場から入手した焼酎廃液を使用した。

焼酎廃液の前処理

焼酎廃液を4°C、3000rpmで20分間遠心分離し、得られた上澄液を50mL試験管に分注し冷凍庫に保存した。また、廃液の一部については、全有機炭素計(Shimadzu TOC-5000)を用いて炭素量を測定した。

細菌の分離培養と同定

細菌の分離培養

通気水道水を孔径0.45μmのミリポアフィルターを用いて減圧濾過した。この濾過水道水と焼酎廃液を全有機

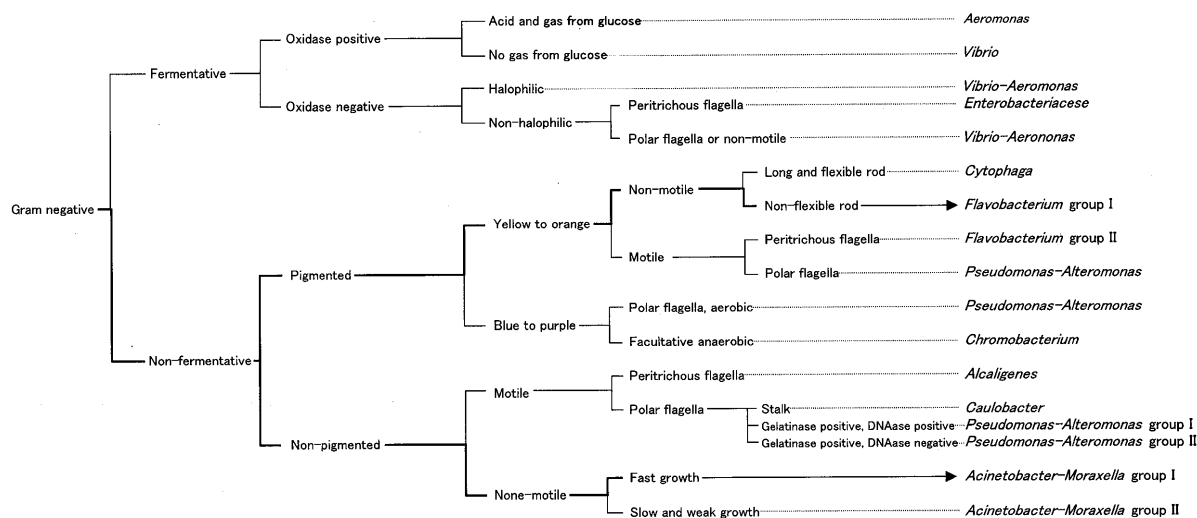


Fig. 1 Identification of bacteria grown in *shochu* distillery wastewater.

炭素濃度が 150ppm, 液量 500mL になるように添加し, 30℃で24時間培養した。この培養液の一部を秤取し, 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 倍に滅菌水道水で希釈後, NA 培地に接種して30℃, 2日間培養した。次に形成したコロニー (白色, 黄色およびピンクの3菌株) を分離して NA 培地で継代培養を行った。

細菌の同定

焼酎廃液から分離培養した3菌株のコロニーを清水 (1985)⁵⁾の方法に従ってグラム染色 (Huckerの変法)⁶⁾, 糖発酵試験 (Hugh-LeifsonのOF試験)⁷⁾, コロニーの色調, 運動性および走査型電子顕微鏡による形態の観察などを行い同定した (Fig. 1)。

焼酎廃液中の細菌増殖量の測定

細菌の前培養

本実験に使用する各菌株の前培養を行った。まず, 孔径0.45 μ mのミリポアフィルターで通気水道水を濾過した。次に, この通気濾過水道水と焼酎廃液を125mLの三角フラスコに入れ全有機炭素量が150ppm, 液量が100mLになるように調節し, 30℃で12時間培養した。

分離菌株の温度別増殖量

上記と同様に調製した培養液を試験管に15mLずつ分注し, オートクレーブ (121℃, 15分間) にかけて滅菌した。冷却後, 各試験管に前培養した細菌をキャピラリーで1滴加え, 15, 20, 25, 30, 35および40℃で42時間培養した。各温度別培養液中の細菌増殖量を測定するために, 分光光度計 (Hitachi U-1500) を用いて波長660nmにおける吸光度を42時間目まで3時間毎に測定した。

分離菌株の全有機炭素濃度別の増殖量

上記と同様に濾過水道水に全有機炭素量が0, 50,

100, 150, 200および250ppmになるように焼酎廃液を添加して, 各濃度培地を試験管に15mlずつ分注し, オートクレーブで滅菌後, 前培養液を加えて30℃で42時間培養し, その間の増殖量を3時間毎に求めた。

2菌株混合株の増殖量

焼酎廃液から分離した3菌株 (白色, 黄色およびピンク) について, 2菌株毎の組み合わせによる3種の混合株を調製し, 上述の方法に準じて増殖量を測定した。なお, 培養温度は30℃に, 全有機炭素濃度は150ppmに, そして培養時間は42時間に, それぞれ設定した。

細菌の増殖量の算定

温度別または濃度別増殖量は, 吸光度の測定に用いた培養液を 10^3 に希釈し, NA培地に接種した後, 形成されたコロニーを計数し, 培養液中の細胞数を算定した。なお, 吸光度0.010の増加に対して生菌数が 3×10^5 cells mL⁻¹の割合で増加した。

実験結果

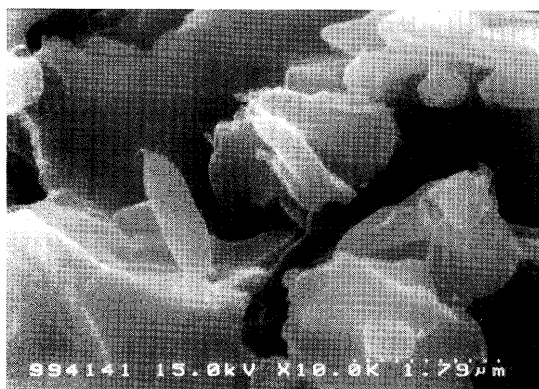
細菌の分離培養

NA培地による細菌の分離培養において, 白色, 黄色, ピンクの3つの色素をもつ3種の菌株が観察された。それぞれの出現率は64.4%, 25.4%, 10.2%であった。

細菌の同定

これら3菌株は以下の性状を示した。すなわち, グラム染色 (Huckerの変法) によって3菌株とも赤色に染色されたことから, グラム陰性と判定した。糖発酵性試験 (Hugh-Leifson O-F試験) に対して, 3菌株とも陰性を示すことから糖発酵性は無いものと判断した。光学顕微鏡による観察では, 3菌株とも鞭毛運動や滑走運動

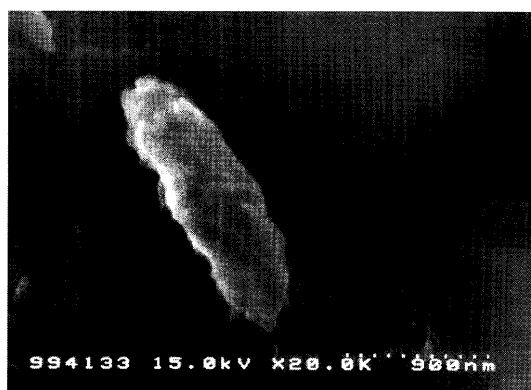
は認められなかった。走査型電子顕微鏡による形態観察でも菌形は桿状を示し、鞭毛や繊毛などは観察されなかった (Fig. 2)。コロニーの形成時間についてみると、白色株は約1日でコロニーを形成し、比較的速い増殖を示した。



Acinetobacter-Moraxella group I



Flavobacterium group I (yellow strain)



Flavobacterium group I (pink strain)

Fig. 2 Three strains of bacteria separated from *shochu* distillery wastewater.

以上のことから、白色株は *Acinetobacter-Moraxella* group I (fast-growing group) に、そして黄色株とピンク株は *Flavobacterium* group I にそれぞれ属すると思

われる。

分離菌株の温度別増殖量

Acinetobacter-Moraxella group I では、対数増殖期に至るまでの時間は15℃で12時間、20℃で9時間、25℃で3時間かかり30℃以上では適応期は全て3時間以下になった (Fig. 3)。30℃から40℃までの実験区では適応期が短く、温度上昇とともに増殖量も増加したが、対数増殖中期の6時間目から定常期に至る12時間目以降にかけて増殖は抑制された。増殖は30℃で最も活発になり、最大細胞密度は $27.0 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ に達した。

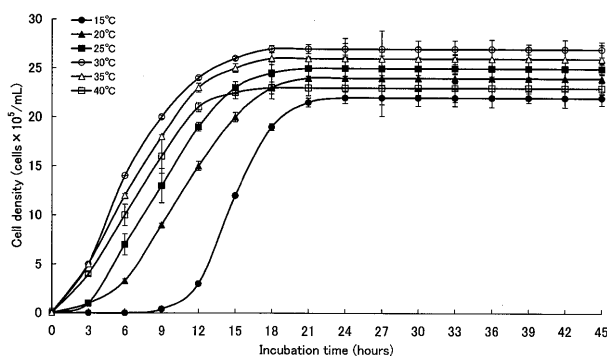


Fig. 3 Effects of temperatures on the growth of *Acinetobacter-Moraxella* group I in *shochu* distillery wastewater.

Flavobacterium group I (黄色株) では、対数増殖期に至るまでの時間は15℃で18時間、20℃で9時間、それ以上の高温では全て3時間以下になった (Fig. 4)。対数増殖初期には20℃から40℃までの実験区ではほぼ同様の増殖がみられたが、対数増殖中期から定常期に入る12時間以降には30℃実験区で増殖がもっとも活発になった (最大細胞密度, $27.0 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$)。

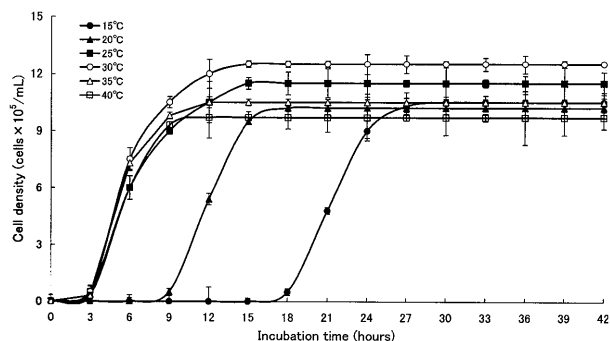


Fig. 4 Effects of temperatures on the growth of *Flavobacterium* group I (yellow strain) in *shochu* distillery wastewater.

Flavobacterium group I (ピンク株) では、対数増殖期に至るまでの時間は15℃で12時間、20℃で6時間、そ

れ以上の高温では全て3時間以下になった (Fig. 5)。25℃から40℃実験区では実験開始から9時間目までは同様な増殖を示したが、9時間目以降は35℃と40℃実験区で増殖が抑制され、最大細胞密度も適応期が長い15℃と20℃実験区よりも減少した。定常期に入った24時間目以降は25℃実験区がもっとも活発に増殖した (最大細胞密度、 $13.7 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$)。

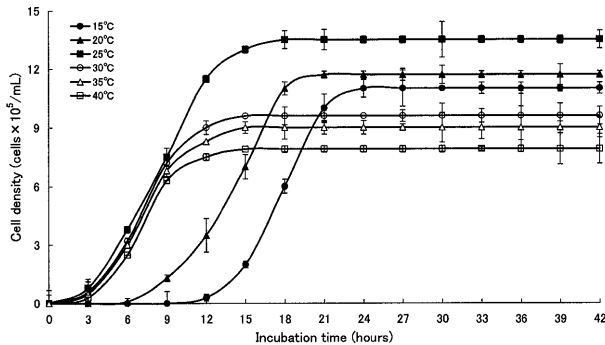


Fig. 5 Effects of temperatures on the growth of *Flavobacterium* group I (pink strain) in *shochu* distillery wastewater.

分離菌株の全有機炭素濃度別増殖量

Acinetobacter-Moraxella group I では、全有機炭素濃度が高くなるにつれて増殖も活発になった (Fig. 6)。適応期は全ての実験区において3時間以下になった。本株は12時間目に定常期に達し、有機炭素 250ppm 添加区における最大細胞密度は $29.7 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ になった。

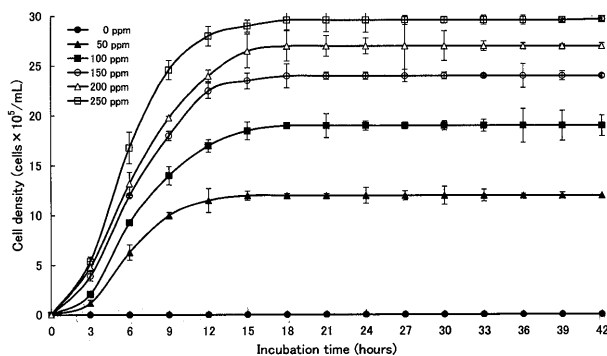


Fig. 6 Effects of total organic carbon contents on the growth of *Acinetobacter-Moraxella* group I in *shochu* distillery wastewater.

Flavobacterium group I (黄色株) においても全有機炭素濃度が増加すると増殖も活発になった (Fig. 7)。また、定常期における最大細胞密度は 250ppm 添加区で $17.7 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ になった。

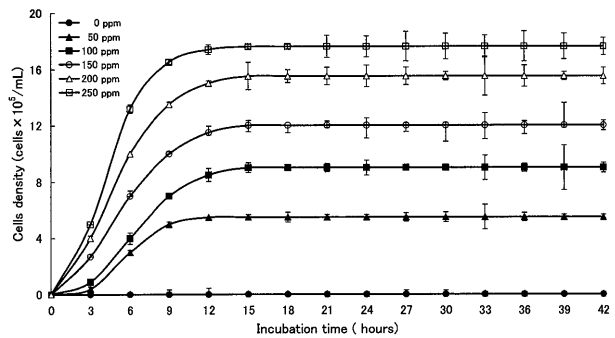


Fig. 7 Effects of total organic carbon contents on the growth of *Flavobacterium* group I (yellow strain) in *shochu* distillery wastewater.

Flavobacterium group I (ピンク株) の適応期は全有機炭素濃度 50ppm と 100ppm の添加区で3時間、150ppm 以上で3時間以下になった (Fig. 8)。本株の増殖も有機炭素量の増加にともなって活発になった。最大細胞密度は 250ppm において $13.1 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ に達した。

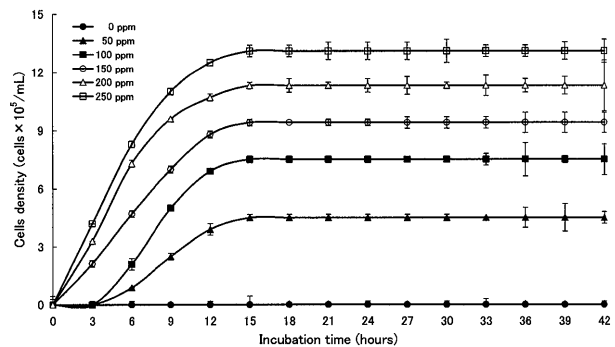


Fig. 8 Effects of total organic carbon contents on the growth of *Flavobacterium* group I (pink strain) in *shochu* distillery wastewater.

2菌混合株の増殖量

上記3菌株の2種混合株について増殖量を3菌混合株のそれと比較すると、白色・黄色混合株では、白色株の増殖が抑制された。一方、白色・ピンク混合株では、ピンク株の増殖が著しく抑制されたが、黄色・ピンク混合株ではピンク株の増殖が顕著になった。

考 察

本研究では、焼酎廃液中に含まれる細菌の増殖量を迅速に算定するために、分光光度計によって吸光度を測定し、その値から細菌数を換算する方法⁹⁾をとった。本法

では細菌の形状などの違いで吸光度から求めた増殖量と希釈法から求めた細菌数が必ずしも一致しない場合があるが、焼酎廃液から分離した3菌株, *Acinetobacter-Moraxella* group I (白色株), *Flavobacterium* group I の黄色株, および *Flavobacterium* group I のピンク株は菌体色素の違いはあるが全て桿菌であること, 細胞の大きさ (長径 $2\mu\text{m}$, 短径 $0.5\mu\text{m}$) もほぼ同じであること, 運動性も有しないことなどから同一波長を使用しても吸光度に大きな誤差が生じないことを前提に実験を行った。

焼酎廃液から分離・同定した白色株 (64.4%) と黄色株 (25.4%) およびピンク株 (10.2%) の出現率を Kruskal-Wallis 検定法¹⁰⁾による検定を行うと, それぞれの出現率に差異が認められた ($P < 0.05$)。白色株は単純な合成培地にも増殖することができ, 黄色株とピンク株に比べて栄養要求が低いために, このような差が生じたものと思われる¹¹⁾。

白色株, 黄色株およびピンク株を混合したもの (以下, 3菌混合株と略記) について温度別増殖量を測定したところ, 15°C と 20°C の実験区では, 個々の菌株で行ったものと比べて適応期に著しい差異が認められた (Fig. 9)。各菌株に対する Kruskal-Wallis 検定では, 白色株, ピンク株, 黄色株の順で適応期が伸びた。しかし, 同検定を定常期について行うと, 白色株, 黄色株, ピンク株の順で増殖量が減少した。

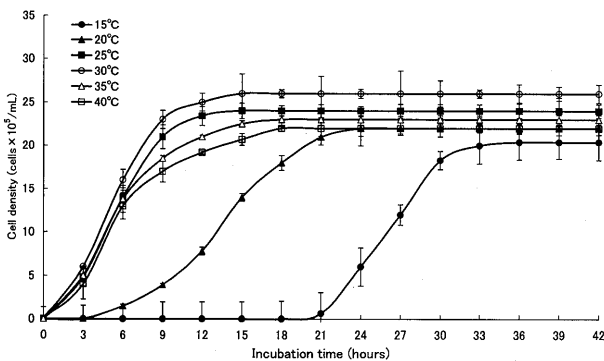


Fig. 9 Effects of temperatures on the growth of bacteria in shochu distillery wastewater.

同様に 15°C と 20°C の実験区について3菌混合株と白色株の増殖量をU検定¹²⁾によって比較したところ, 白色株の増殖量が高くなった。このことは混合株ではピンク株が白色株の増殖を抑制していることを示唆している。ピンク株は至適温度を 25°C に有するが, 比較的低温の 15°C でも活発に増殖した。

上述の如く, 各菌株と3菌混合株との間には適応期の長さ増殖量に差異が認められたことから, 3菌株につ

いて2株毎の組み合わせによる変化を観察したところ, 白色・黄色混合株では3菌混合株に比べて増殖量が低くなった。これは白色・黄色混合株では, 対数増殖期に入る前に両株間で競争が起こり白色株の増殖が抑制されることによるものと考えられる。

一方, 白色・ピンク混合株では, ピンク株の増殖が著しく抑制された。また, 黄色・ピンク混合株を用いた増殖試験では, ピンク株の影響が強く現れた。これら2菌混合株は黄色またはピンク単独株を培養したものと比べて増殖が活発であった。これは黄色株とピンク株との競争関係が白色株を含むものに比べて弱いためと考えられる。

謝 辞

焼酎蒸留廃液の入手にあたって, 鹿児島県酒造組合連合会の浜崎幸夫氏ならびに山元酒造株式会社の吉満公夫氏および大口酒造協同組合の上田和樹氏にご協力をいただいた。ここに厚くお礼申し上げる。

本研究は, 鹿児島大学学長裁量経費の援助を受けて行った。

参考文献

- 1) 鹿児島県本格焼酎技術研究会 (2000): 鹿児島県の本格焼酎. 春苑堂出版, 鹿児島, pp. 142-147.
- 2) 山下博史 (2002): 焼酎蒸留廃液中に増殖する細菌の特性. 鹿児島大学大学院水産学研究科修士論文, pp. 1-6.
- 3) 尾上義夫, 山崎繁久, 手島新一 (2000): 産業副産物 (焼酎蒸留廃液) の水産生物餌料への利用に関する研究. 大地・食・人間の健康を保全する環境革命への試行No. 3. 平成11年度鹿児島大学合同研究成果報告書, 鹿児島大学, 186-190.
- 4) 尾上義夫, 山崎繁久, 手島新一 (2001): 産業副産物 (焼酎蒸留廃液) の水産生物餌料への利用に関する研究. 大地・食・人間の健康を保全する環境革命への試行No. 4. 平成12年度鹿児島大学合同研究成果報告書, 鹿児島大学, 169-180.
- 5) 門田元, 多賀信夫 共編 (1985): 海洋微生物研究法. 学会出版センター, 東京, pp. 229-286.
- 6) 微生物研究法懇談会 (1975): 微生物学実験法. 講談社, 東京, pp. 76-86.
- 7) 協和発酵東京研究所編 (1986): 微生物実験マニュアル. 東京, pp. 9-85.
- 8) 天児和暢, 小池聖淳 共編 (1982): 電子顕微鏡実験法4—微生物学における電子顕微鏡技術(下). 学会出版センター, 東京, pp. 134-173.
- 9) 木村剛 (1998): 細菌を介した焼酎蒸留廃液のタマミジン

- コ生産能. 鹿児島大学大学院水産学研究科修士論文, pp. 5-13.
- 10) 市原清志 (1990): バイオサイエンスの統計学-正しく活用するための実践理論. 南江堂, 東京, pp. 90-159.
 - 11) 丸山晃 著 (1997): 原生生物の世界. 内田老鶴圃, 東京, pp. 126-136.
 - 12) 坪井達夫 (2001): Excel で学ぶ統計, 統計で学ぶ Excel. エーアイ出版, 東京, pp. 86-146.