九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

ミカン廃棄物のコンポスト化と酵母の選択的増殖

森，正嗣
九州大学大学院生物資源環境科学府植物資源科学専攻土壌微生物学研究室

中村，正和
株式会社エコアップ

岩見，裕子
大分大学工学部応用化学科

酒井，謙二
九州大学大学院農学研究院植物資源科学部門植物生産科学講座土壌微生物学研究室

https://doi.org/10.15017/13903

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 64 (1), pp.23-29, 2009-02-27. 九州大学大学院農学研究院
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

九大農学芸誌（Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.）
第64巻　第1号　23-29　(2009)

ミカン廃棄物のコンポスト化と酵母の選択的増殖

森　　正嗣[1]・中村正和[2]
岩見裕子[3]・酒井謙二[4]
九州大学大学院農学研究院植物資源科学部門植物生産科学講座土壌微生物学研究室

(2008年11月14日受付，2008年12月5日受理)

Selective Proliferation of Yeast on Composting of Citrus Processing Wastes

Masatsugu MORI[1], Masakazu NAKAMURA[2], Yuuko IWAMI[3] and Kenji SAKAI[4]
Laboratory of Soil Biology & Biochemistry, Division of Soil Science & Plant Production, Department of Plant Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

はじめに

わが国においてミカンは年間平均100万トン以上収穫されている．この約1割が収穫地域の工場にてジュース，缶詰，調味料などに加工されるが，同時に加工残さとして搾汁果皮が大量に排出される．また，加工残さだけでなく落下した果実や政府の需給調整対策により幼果期に摘果された果実等の廃棄ミカンも発生する．その一部は，高額の燃料をかけて乾燥し，家畜飼料などとして利用されるが，大部分は埋設や焼却により処分されている．これら利用されていないミカン加工残さや廃棄ミカンは，従来処理による環境負荷の問題解決や食品リサイクル法の施行に対応するための，適切な有効利用法が求められているのは一般的な食品廃棄物と同様である．その一つとしてオンサイトで処理可能な肥料化が考えられるが，元来，ミカンは高含水量，低pH，高い有機酸含量から，植物に対する毒性が強く，発芽阻害などをひきおこすため，肥料として直接利用出来ない．この改善策として適当な条件下において，微生物による発酵変換を促進させ，毒性を軽減するコンポスト化技術の導入は，安定な有機肥料の製造を可能とする点で有効である．一般の生ゴミを対象としたコンポスト化の事例は多く報告されている（原田ら，1982；Haruta *et al.*, 2005；Stabnikova *et al.*, 2005など）．また，我々は発酵槽の独自の工夫によって，温度，通気，撹拌を制御することで，中等度の高温で生育するグラム陽性桿菌群を優勢に増殖させ，生ゴミの高速コンポスト化が可能であることを明らかにしてきた（酒井，2007）．しかし，ミカン加工残さや廃棄ミカン対して同じ条件を適用してコンポスト化を

[1]九州大学大学院生物資源環境科学府植物資源科学専攻土壌微生物学研究室
[2]株式会社エコアップ
[3]大分大学工学部応用化学科
[4]九州大学大学院農学研究院植物資源科学部門植物生産科学講座土壌微生物学研究室
[1]Laboratory of Soil Biology & Biochemistry, Department of Plant Resources, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University
[2]Ecoup Co., Ltd
[3]Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Oita University
[4]Laboratory of Soil Biology & Biochemistry, Division of Soil Science & Plant Production, Department of Plant Resources, Agriculture, Kyushu University
*Corresponding author（E-mail: kensak@agr.kyushu-u.ac.jp）

検討したところ，低 pH と高い有機酸含量により細菌群の生育は抑制され，安定な処理が進行せず，植物の発芽に対する毒性は残存したままであった．そこで本研究においては中等度好熱菌群とは異なる増殖条件を再度検討し，植物に対する毒性を軽減し，安定なコンポスト化を促進する方法を検討した．結果として，より低温において一群の酵母が選択的に増殖し，発酵が進行することが分かったのでそれらの酵母について分離・同定を行った．

材料と方法

1．高温好気発酵

コンポスト化は縦軸撹拌，軸貫通型通気，周囲加温方式に特徴を有する 2 機の発酵槽で構成される日量500kg 処理能の処理装置（エコアップ社製）を用いた．第 1 発酵槽内温度37～42℃，第 2 発酵槽内温度55℃，また両発酵槽ともに撹拌速度 1 rpm，通気量 5 m^3/min にて運転を行った．ミカン加工残さ及び廃棄ミカンとして大分県津久見市で10月～ 1 月に収穫される温州ミカン，ポンカン，ネーブルの混合物を用いた．これら混合物を粗粉砕し，第 1 槽に約500kg 投入し，24時間滞留後，第 2 槽に半量を移動し，さらに24時間処理した後に排出し，発酵物を得た．

2．成分分析

水分含量の測定は，乾熱法（105℃）にて測定した．CHN 元素分析器（PE2400シリーズⅡ　CHNS/O アナライザ；㈱パーキンエルマージャパン）により C，N を，ICP（ICPS-7000；島津製作所）により P，K の分析を行った．pH は，乾燥重量比で 1 ：10（試料：蒸留水）となるように試料を懸濁後，遠心して得た上澄み部をガラス電極 pH メーター（HORIBA F-22）にて測定した．クエン酸，乳酸，酢酸は HPLC 分析装置（有機酸分析装置，カラム，Shim-pack SCR 102H；島津製作所）により測定した．

3．小松菜を用いた植害試験

小松菜を用いたコンポストの植害試験は，簡易植害試験法「植物に対する害に関する栽培試験の方法（昭和59年 4 月18日付け59農蚕第1943号農林水産省農蚕園芸局長通知（抄））」に従って管理し，播種から 1 週間後の発芽率と 4 週間後の葉長及び生体重を調査した．小松菜の種は，江戸の祭（株式会社日本農林社）を使用した．試験用器は内径11.3cm，高さ6.5cm のノイバウエルポットを用い，発酵物中の窒素含量分析値から50mg-N/ポットを基準量として500ml の供試土壌と発酵試料を混合充填した（基準量区）．また，発酵試料の 3 倍量区は150mg-N/ポットとなる様に試験試料と土壌を混合準備した．対照区として，肥料を施用しない基礎量区，原料ミカンを施用したミカン区，硫酸アンモニウム，過リン酸石灰，塩化カリウムを用いて N，P，K がそれぞれ基準量区と同等の含量になる様に調製した化成肥料区及び市販有機配合肥料（N：P：K＝5：5：5）を50mg-N/ポットとなるように施用した市販有機配合肥料区を準備した．

4．発酵関与微生物の分離

ミカン発酵物から発酵に関与する微生物の分離は次の方法で行った．ミカン発酵物 1 g を滅菌生理食塩水で10倍に希釈し，ミカン寒天培地（ミカン破砕物50％，寒天1.5％；pH3.5）に200 μl 塗沫し，好気条件下で40℃，50℃，60℃にて 3 日間培養した．培養後，形成したコロニーの内，形態の異なる 9 株を釣菌し，ミカン寒天培地にて分離培養を行った．

5．発酵関与微生物の形態学的および生化学的分析

分離された発酵関与微生物の形態学的，生化学的分析は基本的に長谷川の成書「微生物の分類と同定（上）」に従った．即ち，YM 培地（グルコース0.1％，ペプトン0.05％，酵母エキス0.03％，麦芽エキス0.03％，pH5.6）にて37℃で培養し，栄養細胞の形態，増殖形式，菌糸および偽菌糸の形成，胞子形成の有無を直接顕微鏡観察した．また，硝酸塩同化試験と API20C AUX（BIOMERIEUX）を用いた糖資化能試験により生化学的分析を行った．これらの結果から Barnett らの成書「YEASTS」を参考にして同定を行った．

6．発酵関与微生物の18S rDNA 分析

平板培地上の 1 コロニーを TE バッファーに懸濁し，煮沸により分離株の DNA を抽出した．PCR Protocols (1990) に従って，NS5 (5-AACTTAAAGGAATTGACGGAAG-3') 及び NS6 (5'-GCATCACAG ACCTGTTATTGCCTC-3') をプライマーとし，Ex Taq kit（TaKaRa）を用いて PCR 反応を行った．PCR 反応条件は，95℃で 3 分変性反応後，95℃ 1 分，50℃ 1 分，72℃ 1 分のサイクルを35サイクル行い，最終伸長反応を72℃ 5 分とした．増幅確認後，PCR 産物を SUPREC-02（TaKaRa）を用い精製し，BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）によりサイク

ルシークエンス反応を行った後，ABI PRISM 310A Genetic Analyzer（Applied Biosystems）により塩基配列を決定した．得られた配列は DNA Data Bank of Japan サイト内（http://www.ddbj.nig.ac.jp/）の FASTA 検索により，近縁菌株を決定した．

結果および考察

1．ミカン廃棄物の好気発酵

一般的な生ゴミの高温好気発酵においては，撹拌，通気を行いながら発酵槽内温度を55℃で保持することで *Bacillus* 属を始めとする中等度高温菌が優勢に増殖するが，ミカン加工残さやミカン廃棄物において同条件を適用した際，プレートカウント法による微生物の増殖はほとんど確認できなかった．一方，発酵槽内温度を37℃～42℃に保持した場合，図 1 に示すように大型の酵母様細胞の増殖（3.7×10^7cells/g wet w）が観察された．これにより取得されたミカン発酵物の成分組成を原料と比較したのが表 1 である．当初80％以上あった水分含量は，発酵と乾燥工程により14.8％に低下した．発酵により易分解有機炭素が分解，消失されたことで相対的に窒素含量が増加し，結果として C/N 比が低下した．原料ミカンには植物の発芽阻害の主要因として挙げられるクエン酸が多く含まれていたが，発酵物中にも分解されずに残存していた．しかしながら，クエン酸/窒素比は有意に減少しており，窒素肥料として利用する場合において，植物に対する毒性を軽減する事が出来ると考えられた．

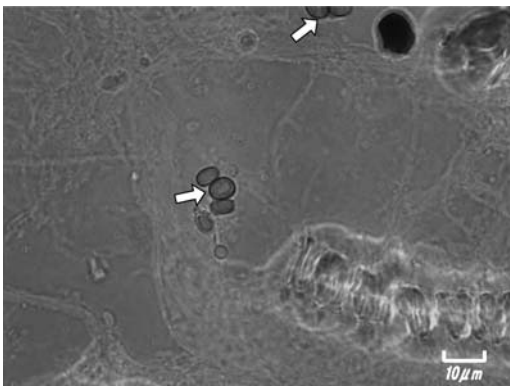

図 1　ミカン発酵物の位相差顕微鏡写真

2．発酵物の小松菜発芽に及ぼす影響

表 2 に示すように，発酵前のミカンは 3 倍量施用区で強い発芽毒性を示したが，ミカン廃棄物を高温好気発酵を行うことで，3 倍量施用区でも基準量区と同等の発芽率を示し，窒素肥料として小松菜の発芽に対する毒性は軽減された．しかしながら，小松菜の播種から 4 週間後の葉長及び生体重は，直接ミカン廃棄物を施用した区画と同様に低く，生育が抑制あるいは遅延されることが分かった．これは，残存するクエン酸や pH による影響の他に，例えば，Kato-Noguchi ら（2003）が報告しているアブシジン酸などの生育阻害物質による影響と考えられた．また，Fujihara ら（2003）によると施用量や作物に応じて発芽，生育抑制の程度は異なるとされており，今後，その他肥料資材との混合等，利用方法を含めた改善が必要である．

表 1　ミカン廃棄物の好気発酵による成分変化

	ミカン廃棄物	ミカン発酵物
含水率［%］	82.9	14.8
pH	4.50	3.69
灰分［% dry weight］	2.92	7.04
全炭素［g/kg dry weight］	445	464
全窒素［g/kg dry weight］	9	20
全加里［mg/kg dry weight］	3459	11201
全リン［mg/kg dry weight］	115	261
クエン酸［g/kg dry weight］	80.8	76.3
酢酸［g/kg dry weight］	−	−
乳酸［g/kg dry weight］	−	27.6
C/N ［-］	49.4	23.2
クエン酸/N ［-］	8.98	3.82

−：検出されず

表2　ミカン発酵物の小松菜の発芽及び幼少期生育に及ぼす影響*

試験区	発芽率 (%)	葉長 (cm)	生体重 (g/ポット)
基礎量区	97.5	1.13	2.1
ミカン基準量区	97.5	0.57	0.8
ミカン3倍量区	57.5	0.47	0.6
ミカン発酵物基準量区	97.5	0.60	0.9
ミカン発酵物3倍量区	97.5	0.54	0.8
市販コンポスト	52.5	2.57	3.9

*発芽率，葉長及び生体重について，播種後それぞれ7日後，28日後及び28日後の測定値の2連の平均値を示した．

3．発酵関与微生物

ミカン発酵物をミカン寒天培地に塗沫し，40℃，50℃，60℃で3日間培養した結果，40℃でのみコロニーの形成が確認された．得られたコロニーを形態から分類し，No.1～8の8種類の菌株を単離した．このうち栄養細胞の直接顕微鏡観察（図2）から，酵母様細胞であった6株について形態学的および生化学的分析を行った結果，表3に示すA（No.1，5），A'(No.7)，B（No.2），C（No.3，8）の4つの異なるグループに再分類された．Group AおよびA'は楕円形の細胞で，多極出芽による増殖を行い，胞子の形成が認められなかった．またGroup AおよびA'はラフィノース資化性のみが異なるが，硝酸塩の非同化性など他の生理学的性質は相同であり，両者は近縁であると考えられた．Group Bは卵形細胞で，多極出芽による増殖を行い，*Pichia* 属に特徴的な半円形の胞子形成が認められた．糖利用性について，APIデータベースおよびYEASTSにおける記載と比較することにより，*P. membranifaciens* と考えられた．Group Cは円筒形の細胞で，分裂による増殖を行い，球形の胞子形成が認められたことから *Schizosaccharomyces* 属の酵母と考えられた．さらに，グルコースとスクロースの資化性，偽菌糸の形成が確認されないことから，*S. pombe* と考えられた．

NS5，NS6プライマーセットを用いたPCRにより増幅された各菌株の18S rDNA部分配列（約280bp）をFASTAを用いて検索することにより高い相同性を示した株との系統解析を図3に示した．No.1，5（Group A），No.7（Group A'），No.2（Group B）は全く同一の部分配列を有しており，それは *P. manshurica*（ac.no. EF550361），*P. membranifaciens*（ac.no. X96451）と完全に一致した．No.3，8（Group C）においては，*S. pombe*（ac.no. X58056）と完全に一致した．これらの分子系統学的情報から得られた結果はいずれも，表3で示された表現型による同定結果を支持するものであった．

以上の様に，ミカン廃棄物の通気，撹拌及び加温を行った好気発酵には酵母 *P. manshurica*，*P. membranifaciens*，*S. pombe* が主に関与することが示された．ミカン搾汁粕の微生物処理において，Hienら（1999）や三宅ら（1991）により，本実験系とは異なる加熱（60℃），通気条件（300ml/min）では，*B. stearothermophilus*，*Thermus* sp.，*Thermoactinomyces* sp. などの細菌と共に，*Hansenula* sp.，*Candida* sp. の酵母が分離されている．今後，得られた酵母の生育条件の検討を行い，有用菌を組み合わせた複合微生物系を用いて発酵条件を整えた制御を行うことにより，発酵変換の効率化や製品の高付加価値化が期待される．

ま　と　め

ミカン加工残さやミカン廃棄物の通気，撹拌及び中温での加温を行った好気発酵により，易分解有機炭素の分解が促進され，相対的に窒素が増加し，結果としてC/N比およびクエン酸/窒素比が低下した．発酵により，ミカン発酵物は，小松菜の発芽に対する毒性を軽減する事が出来たが，初期生育が抑制され，上記処理では分解されない生育阻害物質の存在が考えられた．今後，発酵条件やミカン発酵物の利用方法の検討を含めて更なる改善が必要である．

ミカン廃棄物の直接好気発酵に関与する微生物として，酵母が集積されており，細菌はほとんど検出されなかった．集積された酵母の形態学的，生化学的および18S rDNA部分配列から，*P. manshurica*，*P. membranifaciens*，*S. pombe* であることが分かった．

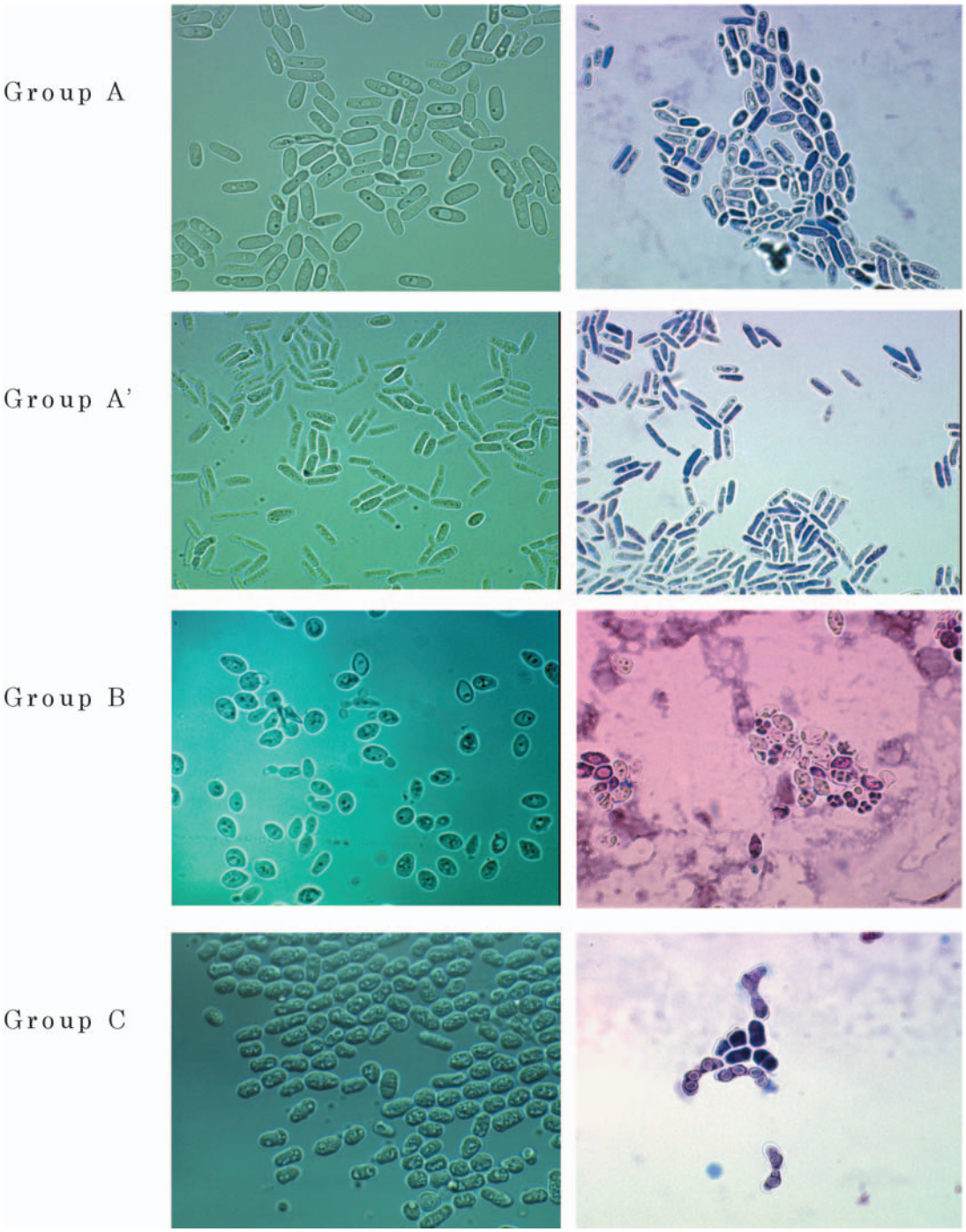

図 2　分離株の顕微鏡写真
左：無染色位相差図，右：子のう胞子染色図

表 3　分離株の形態および生化学的特徴

	Group A	Group A'	Group B	Group C
Strain No.	1, 5	7	2	3, 8
細胞形態	楕円形	楕円形	卵形	円筒形
分裂形成	多極出芽	多極出芽	多極出芽	分裂
子のう胞子形成	−	−	半球形(4)	球形(4)
偽菌糸の有無	−	−	単純な偽菌糸	−
硝酸塩の同化	−	−	−	−
細胞の大きさ[μm]	8.3×3.0	7.2×2.4	5.7×4.3	6.6×4.0
生育温度	～39℃	～39℃	NT	～39℃
糖の利用性				
D-glucose	+	+	+	+
glycerol	−	−	−	−
2-ketogluconate	−	−	−	−
L-arabinose	−	−	−	−
D-xylose	−	−	−	−
ribitol	−	−	−	−
xylitol	−	−	−	−
D-galactose	−	−	−	−
myo-inositol	−	−	−	−
D-glucitol	−	−	−	−
Me-α-glucoside	−	−	−	−
cellobiose	−	−	−	−
N-acetyl-D-glucosamine	−	−	−	−
lactose	−	−	−	−
maltose	−	−	−	−
sucrose	−	−	−	+
α, α-trehalose	−	−	−	−
melezitose	−	−	−	−
raffinose	−	+	−	−

NT：not tested

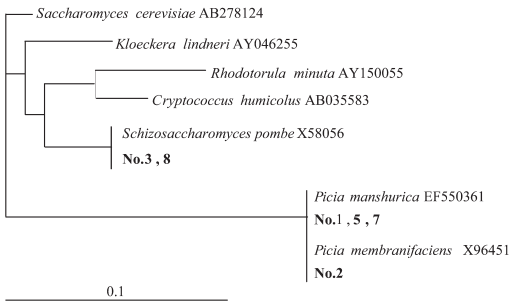

図 3　ミカン発酵物から分離された酵母の18S rDNA 部分配列（300bp）による系統樹

文　　献

Fujihara, S. and Shimizu, T. 2003 Growth inhibitory effect of peel extract from *Citrus junos*. *Plant Growth Regulation* **39**: 223-233

原田靖生，井ノ子昭夫，菅原和夫，宮松一夫，伊澤敏彦　1982　都市生ごみコンポストの有機成分組成の特徴と腐熟度の判定．日本土壌肥料学雑誌，**53**(2): 116-122

長谷川武治編著　1984　微生物の分類と同定（上）学会出版センター　東京

Hien, P. T., Katoh, T., Fujio, Y. 1999 Isolation and identification of citrus-juice-residue composting bacteria. *J. Fac. Kyushu Univ.*, **43**: 425-432

J. A. Barnet, R. W. Payne and D. Yarrow 2000 *Yeast: Characteristics and identification* 3rd ed. Cambridge Univ. press Cambridge (UK)

Kato-Noguchi, H and Tanaka, Y. 2001

Allelopathic potential of citrus fruit peel and abscisic acid-glucose ester. *Plant Growth Regulation*, **40**: 117-120
三宅正起，稲葉伸也，中山公彦，前田久夫，伊福　靖 1991 ミカン搾汁粕の乾燥および少容量化に有効な微生物の検索．日本食品工業学会誌，**38**: 398-404
Olena Stabnikova Hong-Bo Ding Joo-Hwa Tay Jing-Yuan 2005 Wang Biotechnology for aerobic conversion of food waste into organic fertilizer. Waste Manage Res, **23**: 39-47
酒井謙二　2007　化成品生産を伴う炭酸ガス非排出型生ゴミコンポスト化の試み．土と微生物，**61**(2): 103-110
Shin Haruta, Toru Nakayama, Kohei Nakamura, Hisashi Hemmi, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi, and Tokuzo Nishino 2005 Microbial Diversity in Biodegradation and Reutilization Processes of Garbage. Journal of Bioscience and Bioengineering, **99**(1): 1-11
T. J. white, T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* "PCR Protocols", pp315-322

Summary

Composting of the citrus processing waste was carried out using a plant scale composter, with controlling agitation (1rpm), aeration ($5m^3$/min) and temperature (37-42℃). After the fermentation, the C/N ratio of compost decreased from 49.4 to 23.2 and thus concentration ratio of citric acid to nitrogen was reduced from 8.98 to 3.82. When the compost was used as fertilizer for Komatsuna, the germination inhibition was improved by composting of the citrus waste.

During the composting process, proliferation of yeast was observed under a microscope, while no viable bacterial species was isolated. Six kinds of yeasts were isolated from the compost and were identified by their phenotypic (morphological, biochemical and physiological characterization) and genotypic (sequencing of 18S rDNA) characteristics. They were identified as *Pichia manshurica*, *P. membranifaciens* and *Schizosaccharomyces pombe*.