

福岡工業大学 機関リポジトリ

FITREPO

Title	焼酎蒸留廃液資化菌を用いたBODセンサ
Author(s)	天田 啓
Citation	福岡工業大学研究論集 第40巻第2号 P209-P215
Issue Date	2008-2
URI	http://hdl.handle.net/11478/946
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	Publisher

Fukuoka Institute of Technology

焼酎蒸留廃液資化菌を用いた BOD センサ

嶋	津	友	彦	(物質生産システム工学専攻)
山	本	博	嗣	(機能材料工学専攻)
神	谷	英	和	(生命環境科学科)
天	田		啓	(生命環境科学科)
川	上	満	泰	(生命環境科学科)

Microbial BOD Biosensors Based on *Shochu* Distillery Wastewater-utilizing Yeast Strains

Tomohiko SHIMAZU (Material Science and Production Engineering, Graduate School of Engineering)

Hirotsugu YAMAMOTO (Functional Materials Engineering, Graduate School of Engineering)

Hidekazu KOYA (Department of Life, Environment and Materials Science)

Kei AMADA (Department of Life, Environment and Materials Science)

Mitsuyasu KAWAKAMI (Department of Life, Environment and Materials Science)

Abstract

Microbial biochemical oxygen demand (BOD) biosensors have been developed for rapid and reliable BOD estimation of the *shochu* distillery wastewater by employing the same wastewater-utilizing microorganisms isolated from activated sludge. These microorganisms, identified as two strains of *Candida* species and a strain of *Saccharomyces* specie, were found to grow more rapidly in a *shochu* wastewater medium as compared to *Trichosporon cutaneum* which has been adopted as the microorganism for BOD biosensors by the Japanese Industrial Standard Committee. BOD biosensors based on *shochu* wastewater-assimilating microbes yielded relatively high BOD values for the wastewater compared to the sensor based on *T. cutaneum*. This suggests that these sensors respond only to easily and fast assimilable substances for the microbes. The results obtained in the present work demonstrate the developed BOD sensor to be a promising device for BOD estimation of the *shochu* wastewater.

Keywords: *BOD, biosensor, shochu waste, immobilized microorganism*

1. はじめに

BOD (生物化学的酸素要求量) は、水環境の有機汚

濁を測る代表的な指標であり、水中の有機物が微生物の働きによって分解されるときに消費される酸素の量を意味する。BOD は、これまでおもに工場排水試験方法 JIS K 0102 に規定される 5 日間法 (BOD₅)¹⁾ により測定されてきたが、溶液の調製に手間がかかり、インキュベーションに 5 日間を要し、さらに再現性も良く

平成19年10月22日受付

ない等の問題があった。そこで、より迅速で信頼性のある BOD 測定法として Karube ら^{2,3)}は、酸素電極の先端に酵母菌 *Tricosporon cutaneum* を固定した微生物センサを開発し、これを用いた簡易溶解性 BOD (BODs) 測定器が、JIS にも採用された (JIS K 3602)⁴⁾。しかしながら、測定に用いる微生物によって代謝されにくい物質は測定値に含まれないことや、代謝活性を低下させる物質が含まれていると実際よりも低い BOD 値を示すなどの問題があり、*Tricosporon cutaneum*⁵⁻¹⁰⁾以外にも、*Bacillus subtilis*¹¹⁻¹³⁾や *Pseudomonas putida*¹⁴⁻¹⁶⁾などの細菌、*Hansenula anomala*¹⁷⁾、*Torulopsis candida*¹⁸⁾、*Arxula adeninivorans*¹⁹⁻²¹⁾などの酵母を用いたセンサが検討されてきた。BOD センサに用いる菌は、一般に基質の資化活性が高く、特異性が低いものが望ましいとされる。そこで、測定対象となる廃液等にさまざまな基質が含まれる場合には単一種の微生物でなく、複数種の微生物の混合物²²⁻²⁸⁾や活性汚泥²⁹⁻³¹⁾などを固定化して用いることが試みられている。

我が国固有の蒸留酒である焼酎には 2 種類あり、麦や芋、米などの農産物を原料として造られる乙類 (本格焼酎) の生産量は、平成 8 年の 32 万 kL から平成 17 年度には 51 万 kL に増大している。それとともに副産物である焼酎粕の排出量も増加しているが、最近、環境保全とのかかわりから従来行われてきた海洋投棄や畑などへの散布が禁止されたため、陸上処理への移行が急速に進められている。固形物を除いた焼酎蒸留廃液の陸上処理において BOD の評価は不可欠であり、焼酎廃液の信頼度の高い BOD 評価技術の開発が急務になっている。焼酎廃液には種々のタンパク質や糖質などが含まれており、pH は 3.5~4 とかなり酸性が強いことや、原液の BOD は原料によって異なるが、例えば麦焼酎では BOD₅ が 66,000~87,000 mg L⁻¹ 程度であることなどが報告されている。そこで本研究では、焼酎廃液のより正確な BOD 値を評価するために、焼酎蒸留廃液資化菌の分離とこれを用いた BOD センサの開発を試みた。

2. 実験方法

2.1 焼酎蒸留廃液資化菌の分離

焼酎蒸留廃液は、福岡県糟屋郡にある光酒造(株)の麦焼酎蒸留残渣を遠心分離してその上澄みを用いた。これを蒸留水で希釈した液体培地 (焼酎蒸留廃液培地)

に北九州市日明浄化センターで採取した下水汚泥を加えて 30°C で数週間振盪培養し、その後培養液を焼酎蒸留廃液-Gellan Gum 培地に植菌して 30°C で静置培養した。コロニーの形状や色などの違いから 3 種類の菌を分離し、それぞれ SH-1, SH-2, SH-3 株と名付けた。得られた菌体は、蒸留水に 1.0% glucose, 0.5% peptone, 0.3% malt extract, 0.3% yeast extract を加えて調製した YM 培地中で培養し、等量の 40% glycerol 溶液を加えて -80°C で保存した。また比較のために JIS K 3602 に規定されている *Tricosporon* sp. (NBRC 10466) を使用した。

2.2 BOD センサの作製

それぞれの菌を YM 培地中で振盪培養 (30°C) し、対数増殖期で培養液を採取した。遠心分離器にかけ、菌体を滅菌水で洗浄した後、再び滅菌水に懸濁し、PTFE 製メンブレンフィルター (Millipore 製 Omnipore, 孔径 1.0 μm) で吸引ろ過することにより膜上に

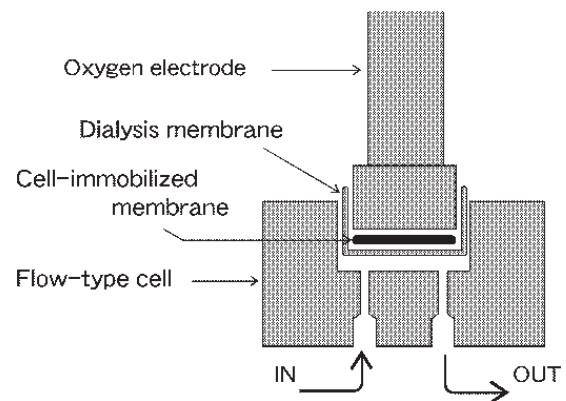


Fig. 1. Schematic of the BOD sensor and flow-type cell.

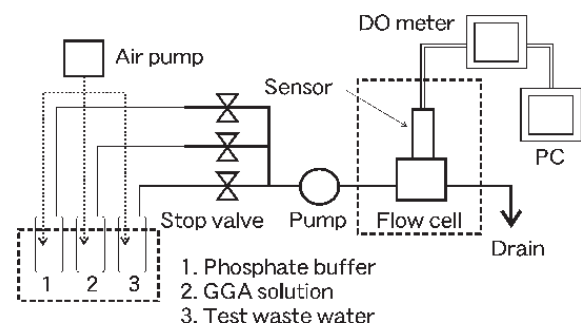


Fig. 2. Schematic of the flow-type BOD sensor system.

微生物を固定化させた。これを微生物が酸素電極 (TOA, OE-470BA) の酸素透過膜に接触するように重ね、最後に透析用セルロース膜で覆うことにより、バイオセンサを作製した (図 1)。

2. 3 測定装置および方法

センサとフローセルの構造ならびに測定装置の構成をそれぞれ図 1 および図 2 に示す。自作のポリプロピレン製フローセルにセンサをセットし、空気で飽和させた 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0)、BOD 標準液および検水 (焼酎廃液希釈液) をそれぞれ送液ポンプでセルに送り、溶存酸素計 (TOA, DO-55G) で DO 値の変化を測定した。なおフローセルと 3 種類の溶液は、それぞれ 30°C のインキュベーターおよび恒温水槽内に保持した。はじめにリン酸緩衝液を流してセンサからの DO 出力値が安定するのを待ち、BOD 標準液または検水に切換え、再び出力値が安定したら緩衝液に切換えた。DO 値の減少が BOD に比例するものとして、毎回標準液で校正することにより検水の BOD 値を求めた。液流量は 2.5 mL min^{-1} とし、標準液としては JIS K 0102 に規定されている GGA 標準液 (1 L 中にグルコースおよび L-グルタミン酸各 150mg を含む水溶液) を用い、その BOD 値を 220 mg L^{-1} とした。これらの水溶液の調製には、いずれも滅菌水を使用した。

3. 結果および考察

3. 1 焼酎廃液資化菌の同定

Fig.3 は、1/100 希釈焼酎廃液培地を用いて測定した各菌の増殖曲線を示したものである。図よりいずれの菌も焼酎廃液を資化することがわかる。また対数増殖期の傾きは $\text{SH2} \approx \text{SH3} > \text{SH1}$ となっており、SH1 の増殖速度が SH2 や SH3 に比べるとやや遅いことがわかる。

また菌の SEM 写真を Fig.4 に示す。SH-1 は卵型、SH-2 および SH-3 はそれよりやや長い楕円球で、長径はいずれも $2 \sim 5 \mu\text{m}$ であり、酵母であることが推察された。そこで BioMerieux 社の酵母様真菌同定キット ID32C アピを用いて同定を試みたところ、SH-1 は *S. cerevisiae* (ID 99.9%)、SH-2 および SH-3 はいずれも *Candida krusei* (ID 85.7% および 97.8%) に近い菌株と推定された。

3. 2 センサ応答曲線

センサ応答曲線の 1 例を Fig. 5 に示す。緩衝液から BOD 標準液あるいは検水 (焼酎蒸留廃液) に切換えると、いずれの場合も DO 値が急激に減少し、10~15min でほぼ定常値に達することがわかる。その後、緩衝液に切換えるときに装置上の欠陥によると思われる不自然な変化が見られたのちゆっくりと DO 値が回復していくのがみられる。得られた応答曲線より、BOD 標準液における DO 値の減少を $\text{BOD } 220 \text{ mg L}^{-1}$ とみなして、比例計算により検水の BODs を求めた。

3. 3 BOD 測定

焼酎蒸留廃液の希釈倍率を変えて BODs を測定した結果を Table 1 に示す。表より希釈倍率が高くなるほど BODs の測定値は高くなることからわかる。廃液濃度が高い場合には菌の代謝活動により溶存酸素濃度がかなり低下し、酸素不足の状態になるため、結果として低い BODs 値を生じるものと推察される。このことは、正確な BODs を測定するには適度な希釈が必要であることを示唆している。

用いた菌株の種類による影響を Table 2 に示す。JIS K 3602 で用いられている *T. cutaneum* (NBRC 1198)

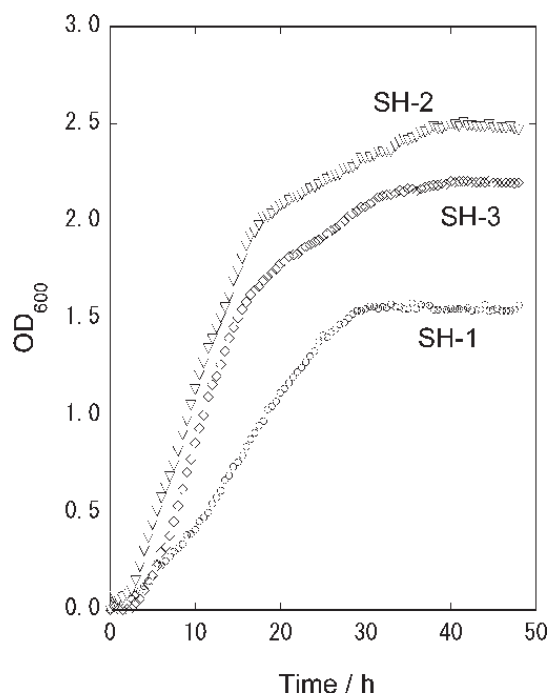
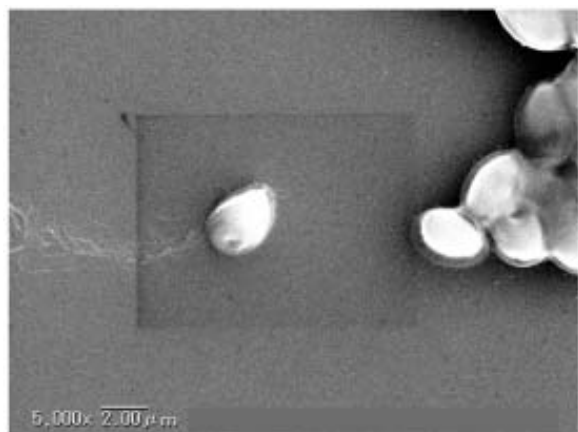


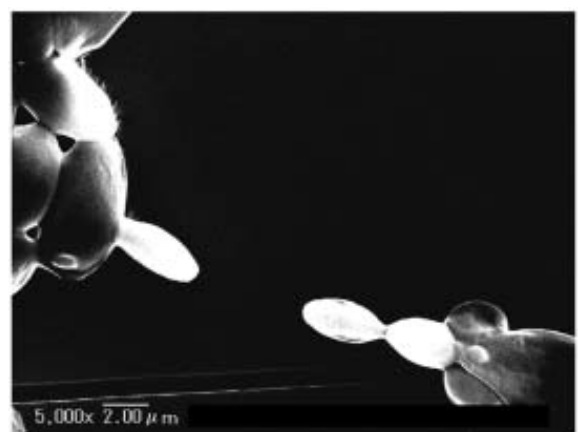
Fig. 3. Growth curves of the isolated strains in *shochu* distillery wastewater-medium.



(a) *Saccharomyces* sp. SH-1



(b) *Candida* sp. SH-2



(c) *Candida* sp. SH-3

Fig. 4. Photomicrographs of the isolated strains.

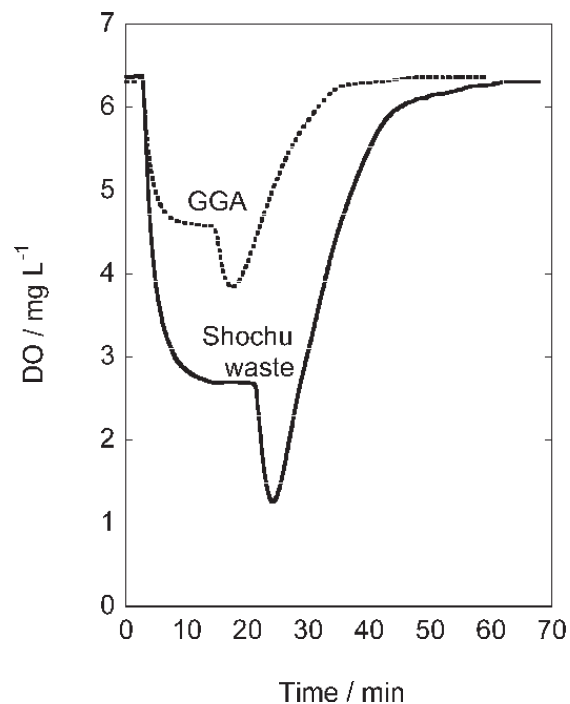


Fig. 5. Time courses of the response of a BOD sensor for GGA standard solution and *shochu* distillery wastewater.

Table 1. Effects of the dilution of shochu wastewater on BODs estimation. (strain SH-1 3.5mg)

Dilution rate	BODs/mg L ⁻¹
10	4,200
100	27,600
500	34,500

Table 2. Dependence of BODs estimation on the yeast strains employed for construction of sensors. (Dilution rate=100)

Strain	BODs/mg L ⁻¹
SH-1	27,600
SH-2	53,400
SH-3	30,000
<i>T. cutaneum</i>	13,000

(SH-1 3.5mg ; SH-2 1.0mg ; SH-3 1.1mg)

Table 3. Dependence of BOD₅ estimation on the yeast strains employed for measurements.

Strain	BOD ₅ /mg L ⁻¹
SH-1	57,300
SH-2	55,100
SH-3	61,600
<i>T. cutaneum</i>	49,700

に比べると、焼酎廃液資化菌である SH-1~SH-3 菌株ではいずれの場合においても高い BODs 値を示しており、より実際に近い値と推測される。また、得られた BODs 値は SH-2 > SH-3 > SH-1 の順になっており、Fig. 1 の増殖曲線の結果と考え合わせると、資化活性が低い菌では BODs 値が小さくなることが推察される。

比較のために各菌を用いて 5 日間法で測定した BOD₅ の結果を Table 3 に示す。SH-3 株でやや高く、一方、*T. cutaneum* ではやや低い BOD 値を示すが、菌の種類による BOD 値の差は小さいことがわかる。これは 5 日間の代謝活動による DO 値の減少を測定するため、菌による焼酎廃液の資化速度の差の影響を受けにくいことを示している。また Table 2 の結果と比較すると SH-2 株以外の菌では BODs 値は BOD₅ 値に比べてかなり低い値を示すことがわかる。これは多糖やタンパク質などの高分子物質の分解には時間がかかるため BODs に反映されにくいことが原因の一つと考えられる。また、表 2 の BODs の測定において、用いる焼酎廃液の希釈倍率を一律にしたことも原因の一つと考えられ、それぞれの菌株の資化活性に応じて適切な希釈が必要であることを示唆している。

4. おわりに

JIS に規定されている一般的な工場廃水中の BOD を測定するための BOD センサには、微生物として *T. cutaneum* が用いられるが、高 BOD で低 pH の焼酎蒸留廃液に対しては信頼性の高い BOD 値が得られない可能性がある。そこで本研究では、焼酎蒸留廃液の BOD を迅速にかつ精度良く測定するためのセンサの開発を試みた。まず焼酎廃液に対して高い資化活性を有する菌を探索した結果、下水汚泥から焼酎廃液資化菌として 3 種の酵母を単離することができた。さらにこれらの菌株を DO 電極と組合せて作製したセンサ

では、*T. cutaneum* を用いた場合に比べていずれも高い BOD 値を示し、より実際の BOD 値に近い測定値が得られることがわかった。センサの寿命や適切な希釈条件などの検討が今後の課題であるが、焼酎蒸留廃液の BOD を迅速に評価するセンサとして期待される。

5. 謝辞

本研究は、文部科学省より私立大学学術研究高度化推進事業ハイテクリサーチセンター (2005-2009) の助成を受けて行われた。

参考文献

- 1) JIS (1974) Testing methods for industrial wastewater. (JIS K 0102) Japanese Industrial Standards Committee, Tokyo
- 2) Karube I., Mitsuda S., Matsunaga T., Suzuki S. (1977); A rapid method for estimation of BOD by using immobilized microbial cells, *J. Ferment. Technol.* 55: 243-248.
- 3) Karube I., Matsunaga T., Mitsuda S., Suzuki S. (1977); Microbial electrode BOD sensors, *Biotechnol. Bioeng.* 19: 1535-1547.
- 4) JIS (1990) Apparatus for the estimation of biochemical oxygen demand (BODs) with microbial sensor. (JIS K 3602) Japanese Industrial Standards Committee, Tokyo
- 5) Hikuma M., Suzuki H., Yasuda T., Karube I., Suzuki S. (1979); Amperometric estimation of BOD by using living immobilized yeast, *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 8; 289-297.
- 6) Riedel K., Lange K.P., Stein H.J., Kuhn M., Ott P., Scheller F. (1990); A microbial sensor for BOD, *Water Res.*, 24: 883-887.
- 7) Praet E., Reuter V., Gaillard T., Vassel J.L. (1995); Bioreactors and biomembranes for biochemical oxygen demand estimation, *Trans. Anal. Chem.*, 14: 371-378.
- 8) Yang Z., Suzuki H., Sakai S., Karube I. (1996); Disposable sensor for biochemical oxygen demand, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46: 10-14.
- 9) Yang Z., Suzuki H., Sakai S., McNiven S., Karube I. (1997); Comparison of the dynamic transient-and

- steady-state measuring methods in a batch type BOD sensing system, *Sensors Actuators B*45: 217–222.
- 10) Reiss M., Heibges A., Metzger S., Hartmeier W. (1998); Determination of BOD-values of starch-containing waste water by a BOD-biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 13: 1083–1090.
 - 11) Riedel K., Renneberg R. (1985); An electrochemical method for determination of cell respiration, *J. Basic. Microbiol.*, 25: 51–56.
 - 12) Riedel K., Renneberg R., Kuhn M., Scheller F. (1988); A fast estimation of biochemical oxygen demand using microbial sensors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 316–318.
 - 13) Tan T.C., Qian Z. (1997); Dead *Bacillus subtilis* cells for sensing biochemical oxygen demand of waters and wastewaters, *Sensors Actuators B*40: 65–70.
 - 14) Ohki A., Shinohara K., Maeda S. (1990); Biological oxygen demand sensor using an arsenic resistant bacterium, *Anal. Sci.*, 6: 905–906.
 - 15) Chee G.J., Nomura Y., Karube I. (1999a); Biosensor for the estimation of low biochemical oxygen demand, *Anal Chim Acta*, 379: 185–191.
 - 16) Chee G.J., Nomura Y., Ikebukuro K., Karube I. (1999b); Development of highly sensitive BOD sensor and its evaluation using preozonation, *Anal Chim Acta*, 394: 5–71.
 - 17) Kulys J., Kadziauskiene K. (1980); Yeast BOD biosensor, *Biotechnol. Bioeng.*, 22: 221–226.
 - 18) Sangeetha S., Sugandhi G., Murugesan M., Murali Madhav V., Berchmans S., Rajasekar R., Rajaseker S., Jeyakumar D., Prabhakara Rao G., (1996); *Torulopsis candida* based sensor for the estimation of biochemical oxygen demand and its evaluation, *Electroanalysis*, 8: 698–701.
 - 19) Chan C., Lehmann M., Tag K., Lung M., Kunze G., Riedel K., Gruendig, B., Renneberg R. (1999); Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adenivorans* for a microbial sensor immobilized with poly (carbamoil) sulfonate (PCS), part I: construction and characterization of the microbial sensor, *Biosensors Bioelectron.*, 14: 131–138.
 - 20) Lehmann M., Chan C., Lo A., Lung M., Tag K., Kunze G., Riedel K., Gruendig, B., Renneberg R. (1999); Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adenivorans* for a microbial sensor immobilized with poly (carbamoil) sulfonate (PCS), part II: application of the novel biosensor to real samples from coastal and island regions, *Biosensors Bioelectron.*, 14: 295–302.
 - 21) Kim M.N., Park K.H. (2001); *Klebsiella* BOD sensor, *Sensors Actuators B*80: 9–14.
 - 22) Tan T.C., Li F., Neoh K.G. (1992); Microbial membrane modified dissolved oxygen probe for rapid biochemical oxygen demand measurement, *Sensors Actuators B*8: 167–172.
 - 23) Tan T.C., Li F., Neoh K.G. (1993); Measurement of BOD by initial rate of response of a microbial sensor, *Sensors Actuators B*10: 137–142.
 - 24) Li F., Tan T.C. (1994); Monitoring BOD in the presence of heavy metal ions using a Poly (4-vinylpyridine)-coated microbial sensor, *Biosens. Bioelectron.*, 9: 445–455.
 - 25) Li F., Tan T.C., Lee Y.K. (1994); Effect of precondition and microbial composition on the sensing efficacy of a BOD biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 9: 197–205.
 - 26) Heim S., Schnieder I., Binz D., Vogel A., Bilitewski U. (1999); Development of an automated microbial sensor system, *Biosens. Bioelectron.*, 14: 187–193.
 - 27) Suriyawattanakul I., Surareungchai W., Sritongkam P., Tanticharoen M., Kirtikara K. (2002); The use of co-immobilization of *Trichosporon cutaneum* and *Bacillus licheniformis* for a BOD sensor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 40–44.
 - 28) Jia J., Tang M., Chen X., Qi L., Dong S. (2003); Co-immobilized microbial biosensor for BOD estimation based on sol-gel derived composite material, *Biosens. Bioelectron.*, 18: 1023–1029.
 - 29) Jung J., Sofer S., Lakhwala F. (1995); Towards an on-line biochemical oxygen demand analyzer, *Biotechnol. Tech.*, 9: 289–294.
 - 30) Sakai Y., Abe N., Takeuchi S., Takahashi F. (1995); BOD sensor using magnetic activated sludge, *J. Ferment. Bioeng.*, 80: 300–303.
 - 31) Liu J., Bjornsson L., Mattiasson B. (2000); Immobilised activated sludge based biosensor for bio-

chemical oxygen demand measurement, *Biosens. Bioelectron.*, 14: 883-893.