

2014 年度 卒業論文

乳牛ふん尿メタン発酵残渣の脂肪酸
および糖組成

帯広畜産大学畜産学部
畜産学科環境農学ユニット

22175

中村 和貴

(指導教員：筒木 潔)

目次

	頁
第1章 緒論	3
1.1 研究の背景	3
1.2 研究の目的	3
第2章 試料および方法	4
第3章 結果	10
3.1 脂肪酸組成	10
3.2 糖組成	16
第4章 結論	23
参考文献	23

第1章 緒論

1.1 研究の背景

近年、世界的に家畜ふん尿処理におけるメタン発酵法が注目されていて、日本のメタン発酵施設の大部分は酪農のふん尿スラリーを原料としたものであり、消化液は牧草地へ液肥として利用されている。家畜排泄物は、畜舎で大量の洗浄水を用いてピットに貯めているため、含水率は95%程度に希釈されたものが回収されてバイオガスの原料となっている。一方で、生ゴミ等の固形有機性廃棄物は、原料として回収されたものに水を加えてすりつぶした後、水溶性成分のみをメタン発酵するという技術が現在の主流であり、これらの固形有機性廃棄物を対象としたメタン発酵技術を湿式法と称している。ちなみに原料段階で分別回収された固形残渣は堆肥にするケースが多い。液肥として利用できない場合は、固形原料に水を加えるために処理量が多くなるだけでなく、メタン発酵を終えた排水中にはまだ高濃度のBOD(生物化学的酸素要求量)や窒素、リンならびに色素が含まれているおり、これらを取り除かなければ下水や河川へ放流することが出来ないので浄化処理が必要となる。そのため、高度な二次処理設備が必要となっている。その場合、消化液中には窒素が無機化されてそのまま高濃度で残存しているため、活性汚泥処理では脱窒や脱色の高度処理を行うことになり処理経費が嵩む要因となっている。このような背景から、現在のバイオガス施設は、他の処理方法と比較して建設費および維持費(電気代や二次処理に必要な薬品代等)ともに高価になってしまう傾向がある。

1.2 研究の目的

湿式メタン発酵法の短所を克服する技術として、近年注目されているのが乾式メタン発酵法である。固形有機性廃棄物は、含水率によってその物性は変化する。とくに、粘性に関しては含水率が90%以下になると急激に上昇する。また、容積も大きく変化し、含水率95%のものが同85%に変化すると約1/3の容積に減容することになる。このことは、メタン発酵施設全体のコンパクト化と低廉化に結びつく。

畜産酪農業においてもバイオガスプラントによる家畜糞尿処理は大規模な設備が必要となるため、経営資金の不足する中小の農家や敷料の割合が多い低水分の糞尿が発生するつなぎ飼いの農家には導入が難しかった。乾式メタン発酵により、小規模なプラントで固形分の割合が高い糞尿を処理することが可能になれば、中小の酪農家における家畜糞尿のエネルギー転換が可能となる。また、発生する発酵残さも水分含量が低いため、圃場への還元がより容易になる可能性がある。

本研究では、とくにメタン発酵残渣の農業利用における安全性と有効性を検証するため、各種の発酵条件下におけるメタン発酵の進行に伴う家畜糞尿の有機物組成の変化を追跡することを目的とした。

第2章 試料および方法

1) 供試試料

平成24年9月24日より試験を開始し、試料は発酵0日目から90日目までの各時期に採取した。なお試料はブローシャで調整したものを分けて頂いた。各種の分析をすでにブローシャと指導教員が行っているため本卒論では長鎖脂肪酸組成(脂質)および糖組成(炭水化物)の分析を行った。メタン発酵原料の投入割合は乳牛ふん尿 8:種汚泥 2とした。試験区を4つ設けた。試験区については表1に記載する。

表1 検討した発酵様式

試験区	発酵温度	原料水分
① 中温・湿式	38℃	>90%
② 中温・乾式	38℃	<85%
③ 高温・湿式	55℃	>90%
④ 高温・乾式	55℃	<85%

2) 脂肪酸分析の方法

凍結乾燥し粉碎したメタン発酵残渣 1 g を共栓つき 50mL 三角フラスコ中に正確に秤り取った。これにエーテル 30 mL を添加し、共栓をし、ときどき手で振とうしながら 48 時間静置した。静置後、フラスコ内容物をガラス濾過器(G2) に移し濾過した。抽出残渣はさらに 15 mL のエーテルで 2 回洗浄し、洗浄エーテル液はガラス濾過器を通し、最初の抽出液と合わせた。抽出したエーテル液は、あらかじめ空の重量を測定しておいたナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレータでエーテルを留去した。エーテルを留去後、さらに真空デシケータ中で乾燥し、乾燥後の重量を測定し、風袋との差し引きによりエーテル抽出画分(脂質画分)の収量を求めた。乾固した脂質画分はクロロホルム・メタノール(1:1) 10 mL に溶解した。この脂質抽出液 10 mL から 1 mL をとり内部標準(ヘプタデカン酸 200 ppm メタノール溶液) 0.1 mL を添加したのち、窒素ガスにより溶媒をとばした。溶媒をとばした試料にトルエン 0.2 mL、メタノール 1.0 mL、メタノール・HCl 0.6 mL を加え、45°C インキュベータで 1 晩加熱しメチル化した。反応後の溶液に水 1.0 mL ヘキサン 1 mL を加えよく振り、パスツールピペットで上層のヘキサン層をとり 5 mL のミニバイアルに移す。そして、脱水のため 0.25 mL の 2,2-ジメトキシプロパンを添加しよく振る。そしてもう 1 度窒素ガスで溶液を飛ばした後ヘキサンを 100 μ L 添加し、そこから 1 μ L をガスクロマトグラフィーにインジェクトした。

使用したガスクロマトグラフは、脂肪酸分析、糖分析ともに島津 GC-14B である。

キャピラリーガスクロ用カラムは ULBON HR-SS-10 Φ 0.25mm x 50m を使用した。分析条件は以下のとおりである。

カラム初期温度：100 °C

昇温速度：5 °C/min

カラム最終温度：250 °C

注入口温度：250 °C

検出器温度：250 °C

なお、標準試料として、下記のジーエルサイエンス FAME 定量用混合キット 2 種類を用いた。

① FAME Quantitative Mix. 1021-58110

(C16 飽和, C18 飽和・C18 不飽和脂肪酸を含むセット)

Methyl Palmitate (パルミチン酸メチル) 16.64 %

Methyl Stearate (ステアリン酸メチル) 19.35 %

Methyl Oleate (オレイン酸メチル) 21.31 %

Methyl Linoleate (リノール酸メチル) 21.33 %

Methyl Linolenate (リノレン酸メチル) 21.37 %

② FAME Quantitative Mix. 1021-58106

(C14 - C24 飽和脂肪酸を含むセット)

Methyl Myristate	(ミリスチン酸メチル)	10.50 %
Methyl Palmitate	(パルミチン酸メチル)	12.85 %
Methyl Stearate	(ステアリン酸メチル)	16.96 %
Methyl Arachidate	(アラキジン酸メチル)	16.84 %
Methyl Behenate	(ベヘン酸メチル)	19.30 %
Methyl Ligocerate	(リグノセリン酸メチル)	23.55 %

いずれのキットも全量が 100 mg なので、これをクロロホルム・メタノール(1:1) 混液 50 mL に溶解した。

標準物質のクロマトグラムを得るためには、内部標準のヘプタデカン酸 200 ppm 溶液 100 μ L と上記の標準脂肪酸溶液 100 μ L を混合し、窒素ガスを吹き付けてドライアップしたのち、トルエン 0.2 mL、メタノール 1 mL、塩酸・メタノール(1 N) 0.6 mL を混合し、45°Cで1晩加熱した後、試料と同様に、水 1.0 mL ヘキサン 1 mL を加えよく振り、パスツールピペットで上層のヘキサン層をとり 5 mL のミニパイアルに移した。これに、脱水のため 0.25 mL の 2,2-ジメトキシプロパンを添加し、窒素ガスで溶液を飛ばした後ヘキサンを 100 μ L 添加し、そこから 1 μ L をガスクロマトグラフィーにインジェクトした。

3) 糖分析の方法

① 硫酸加水分解

テフロンでコーティングしたキャップ付きの 10mL ガラス試験管に細胞壁試料 10mg をとり、72%硫酸(w/w) 125 μ L を添加。窒素で空気を置換。攪拌して溶解を助ける。72%硫酸(w/w) (=13 M) は、14mL の水と 19.55mL の濃硫酸を混合して調製した。流水で容器を冷却しながら、水の中に濃硫酸を添加した。

室温で 45 分放置したあと、1.35 mL の水を加え、硫酸濃度を 1 M にした。キャップをして、100°C で 3 時間 加熱した。

(加水分解の温度と時間は、検討の結果「100°C で 3 時間」が最も良い結果を与えた。) 冷却したのち、15 M のアンモニア溶液 (市販の 28%アンモニア) 0.3 mL を添加し、アンモニア濃度を 1M とした。

内部標準として、ミオイノシトール(5 mg/mL)溶液を 0.1 mL (100 μ L) 添加した。ガラス棒に試料液をつけて、pH 試験紙で pH を確認した。アルカリ性になっていなければ、50 μ L のアンモニア溶液を追加して加えた。

② 硫酸塩の除去

ここに、2-プロパノール 9 mL を添加し、内容物を 12 mL 用高速遠心管に移し、10000 回転で 10 分間遠心分離した。2-プロパノールの添加により、中和によって生成した硫酸アンモニウムが沈殿するので、遠心分離によって除去した。

遠心後の上澄み液を 100 mL のナスフラスコに移し、ロータリーエバポレータを用い 40°C で蒸発乾固した。水分と 2-プロパノールは共沸混合物を形成するので、水分はこの操作により除去される。この際、長時間エバポレーターにかけすぎると、蒸発残渣が黒くなり、成分も変質する。フラスコ内部がまだ濡れている状態で取り外して良い。

この残渣に 2%水素化ナトリウム-DMSO 溶液を 1 mL 添加し、40°C の恒温乾燥機中で 90 分還元した。

③ 標準単糖類溶液の調製

スタンダードは以下のように調整した。

ミオイノシトール 50 mg/10mL 溶液を 100 μ L に対し、グルコース、ガラクトース、マンノース 各 50 mg/10mL 混合溶液を 50, 100, 200 μ L、キシロース、アラビノース 各 50 mg/10mL 混合溶液を 50, 100, 200 μ L、ラムノース、フコース、リボース 各 50 mg/10mL 混合溶液を 50, 100, 200 μ L 添加し、さらに水を加えて、溶液の総量を 1.7 mL とした。

ここに 9 mL の 2-プロパノールを添加した。

③ 糖の水素化ホウ素ナトリウム還元によるアルジトール化

これらの標準物質混合液をロータリーエバポレーターで乾固してから、NaBH₄ /DMSO 溶液 1 mL で還元した。

水素化ホウ素ナトリウムはあらかじめ 0.3 g を 15 mL の高純度ジメチルスルホキシドに

溶解した。容器は共栓付きの 50 mL 三角フラスコを用いた。室温で溶解するが、超音波洗浄機を使用して溶解を早めた。試薬の調製は還元を行う日に必要量だけ行った。

③ ホウ酸のメチル化による除去

以下の操作は試料、標準液ともに同様に行った。

反応の後、過剰の水素化ホウ素ナトリウムは、18M 酢酸（市販の特級酢酸原液）とメタノールの混液(1:10) を 10mL 添加して分解し、エバポレーターを用い 40°C で濃縮乾固した。メタノールと反応させることによりホウ酸がメチル化されて除去される。

DMSO が反応液に含まれているので、ナス型フラスコ内の液が完全には乾かないが、そのまま次の操作に移った。

⑤ アセチル化

ナス型フラスコ中で水素化ホウ素ナトリウム還元した試料液に 1 メチルイミダゾール 0.3 mL および無水酢酸 3 mL を添加した。40°C の恒温乾燥機中で 30 分間以上加熱したのち、純水 10 mL を加えて、過剰の無水酢酸を分解した。発熱するので、室温で放冷した。無水酢酸が完全に分解するまで 1 時間以上放置した。

⑥ 反応液の精製

無水酢酸分解後の溶液をテフロンパッキンネジ栓付 18 mL ガラス試験管に移し、5 mL のエチルエーテルを加え、密栓してボルテックスミキサーで攪拌した。静置すると 2 相に分れ、上の相がエチルエーテルでアセチル化糖が抽出されている。上のエチルエーテル相をパスツールピペットで採取し、10 mL のナス型フラスコに移した。エーテルは一部水に溶けるので、エーテルの量は約 3mL に減少している。

試験管中の抽出残渣液にさらに 3 mL のエチルエーテルを加え密栓して振とうし、パスツールピペットで採取し、10 mL のナス型フラスコに移した。

ここに 4 mL の純水を添加した。共栓をしてからよく振って混合したのち、下層の水をパスツールピペットで除去しエーテルのみを残す。さらに 2 回、水の添加と除去をくりかえし、エーテル抽出液に含まれる DMSO および酢酸を水相に移して除去した。

その後、エーテル抽出液に 2-プロパノールを 3 mL 添加し、エバポレータに取り付け、溶媒をほとんど留去した。スピッツ管中の蒸発残渣を 200 μ L のアセトンに溶解し、2 μ L をキャピラリーガスクロに注入した。

⑦ ガスクロ分析

方法 1

ガラスキャピラリカラム Chrompack CP-Sil 43CB 0.25 mm \times 25 m 内径 0.5 mm を使用した。スプリットモードで 1 μ l をインジェクトした。検出器は FID を使用した。オーブンの温度は 195°C から 225°C まで 6°C/min で昇温させ、225°C で 15 分保持した。インジェクター温度は 250°C、検出器温度は 250°C とした。チャートスピードは 10 mm/min とした。検出器の感度は range 1 で atten 2 でも十分なピーク高さが得られた。

このカラムは、分析方法の開発検討段階で使用し、試料のルーチン分析段階では下記の

方法を使用した。

方法 2

ガラスキャピラリカラム InertCap 225 0.25 mm×30 m 内径 0.5 mm を使用した。スプリットモードで 1 μl をインジェクトした。検出器は FID を使用した。

オーブンの温度は 210℃から 240℃まで 5℃/min で昇温させ、240℃で 14 分保持した。

インジェクター温度は 250℃、検出器温度は 250℃とした。チャートスピードは 10 mm/min とした。検出器の感度は range 2 で十分なピーク高さが得られた。

クロマトグラムの記録は島津クロマトパックにより行い、クロマトパックの設定を調節して、微小なピークも計測できるようにした(Minimum area = 50, Slope=200~500)。

Slope が小さいほど小さなピークまで検出するが、必要最小限のピークを拾うように調節した。クロマトデータをセーブしておく、あとで再解析できる (ASAVE, n n は分析の回数)。メモリー容量の制限から、20 分間のクロマトグラムの場合、n は 8 以下にしておくが良い。

内部標準 (ミオイノシトール) に対するその他の糖の比率は 0.1 倍から 10 倍までの範囲で、検量線が直線的になることを確認した。

第3章 結果

3.1 脂肪酸組成

メタン発酵残渣の脂質画分からは飽和脂肪酸に分類されるミリスチン酸(図 2-1)、パルミチン酸(図 2-2)、ステアリン酸(図 2-3)、アラキジン酸(図 2-4)、ベヘン酸(図 2-5)、リグノセリン酸(図 2-6)、不飽和脂肪酸に分類されるオレイン酸(図 2-7)、リノール酸(図 2-8)、リノレン酸(図 2-9)が検出された。

中温・乾式発酵条件下では飽和脂肪酸に分類される脂肪酸がほとんど減少せず、ミリスチン酸、ステアリン酸などは、発酵期間の経過とともにかえって増大する傾向を示した。脂質は植物成分中でも安定な成分であり、特に長鎖飽和脂肪酸はワックス成分や樹脂成分を構成する安定な脂質を構成しているので、相対的に分解が遅れるものと考えられる。

すべての発酵様式のもとで、発酵初期に飽和脂肪酸の含量が増大しているのは、脂質が他の植物体構成成分と比べて分解されにくいことを反映している。

高温・乾式や中温・湿式条件下でも30日目くらいまで脂肪酸含量は増大していたが、その後は減少し始めた。また、高温・湿式条件下では早くも発酵5日後くらいから脂肪酸の生成量が減少していた。これらのことは、嫌氣的条件下でも好適な条件が整えば脂質の分解が進行することを示している。

高温・乾式条件化では、発酵45日目にミリスチン酸、アラキジン酸、ベヘン酸およびリグノセリン酸が急激に増加していたが、このことの原因は不明である。生成量の多いステアリン酸やパルミチン酸は高温・乾式条件下でも減少傾向下にあるので、脂質画分全体としては減少していると考えられる。

不飽和脂肪酸は長鎖飽和脂肪酸とは全く異なる傾向を示した。飽和脂肪酸がほとんど分解されなかった中温・乾式条件下においても、不飽和脂肪酸は5日目頃までいったん増加したもののその後減少傾向を示した。中温および高温の湿式条件下では飽和脂肪酸は急速に減少する傾向を示した。高温・乾式条件下では30日目頃まで高いレベルを維持した後に減少した。不飽和脂肪酸は細胞膜成分などとして重要な成分であり、植物成分ばかりでなく、それを分解して増殖する微生物菌体の構成成分としても存在する。そのため、高温・乾式条件下で不飽和脂肪酸含量が30日目頃まで高かったのは、この条件下で長期間にわたって微生物分解活動が盛んであったことを反映している可能性も考えられる。

飽和脂肪酸

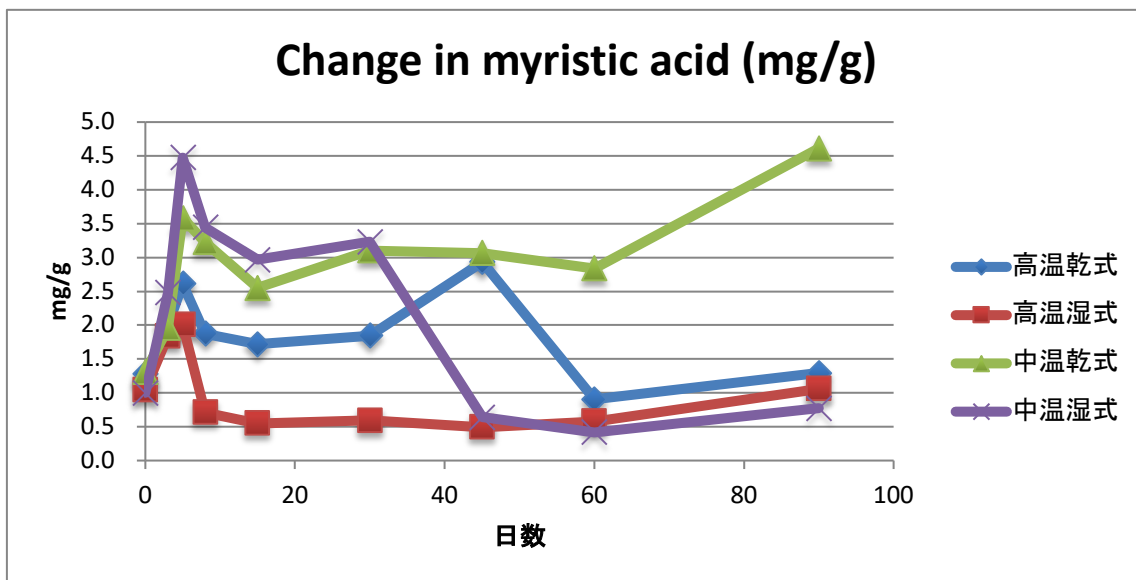


図 2-1 ミリスチン酸の消長

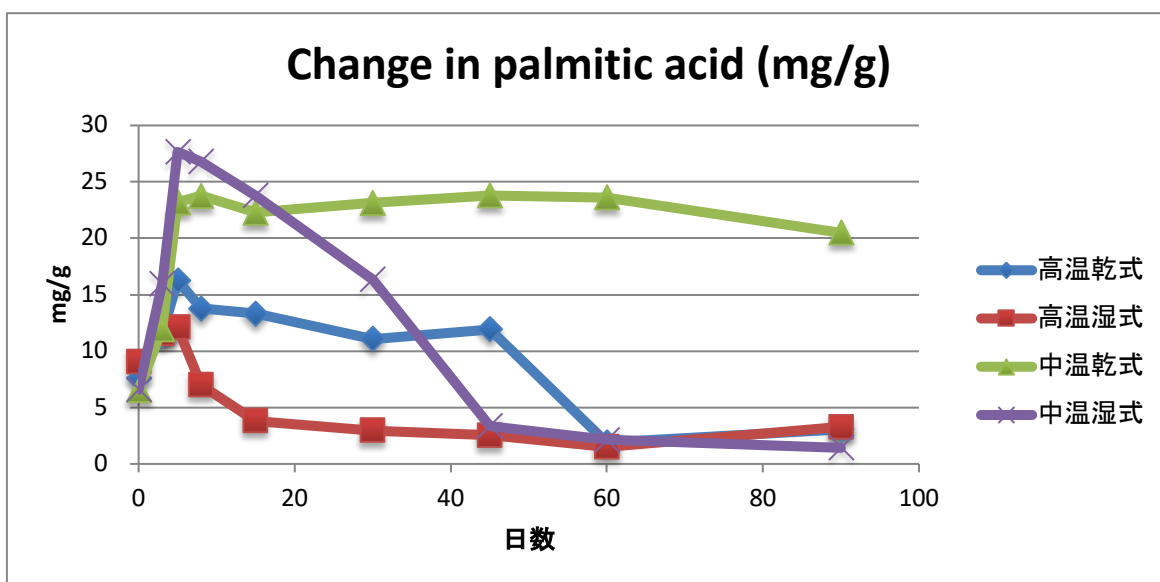


図 2-2 パルミチン酸の消長

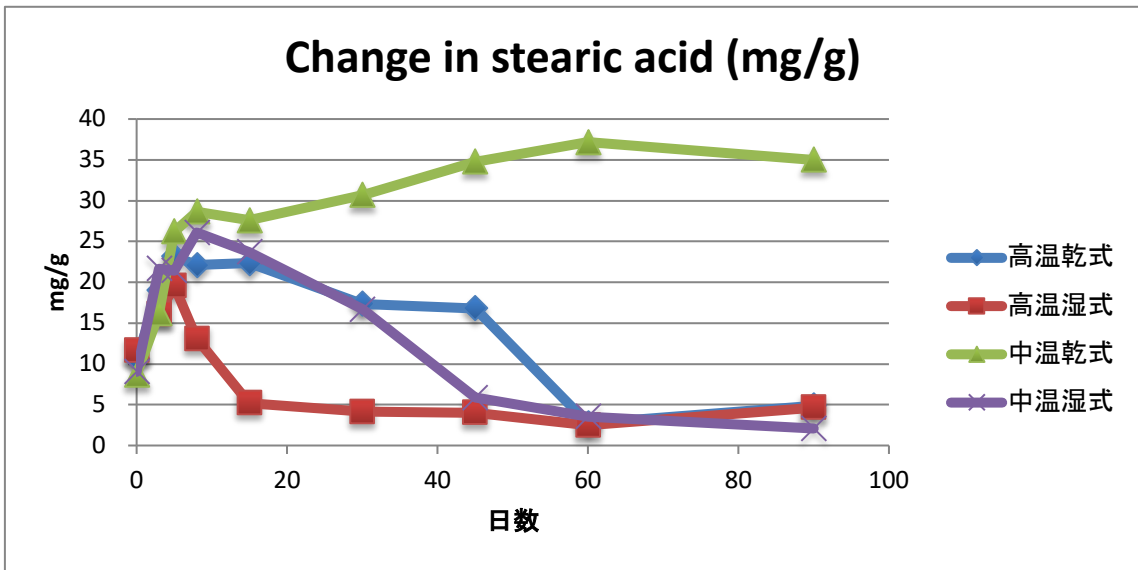


図 2-3 ステアリン酸の消長

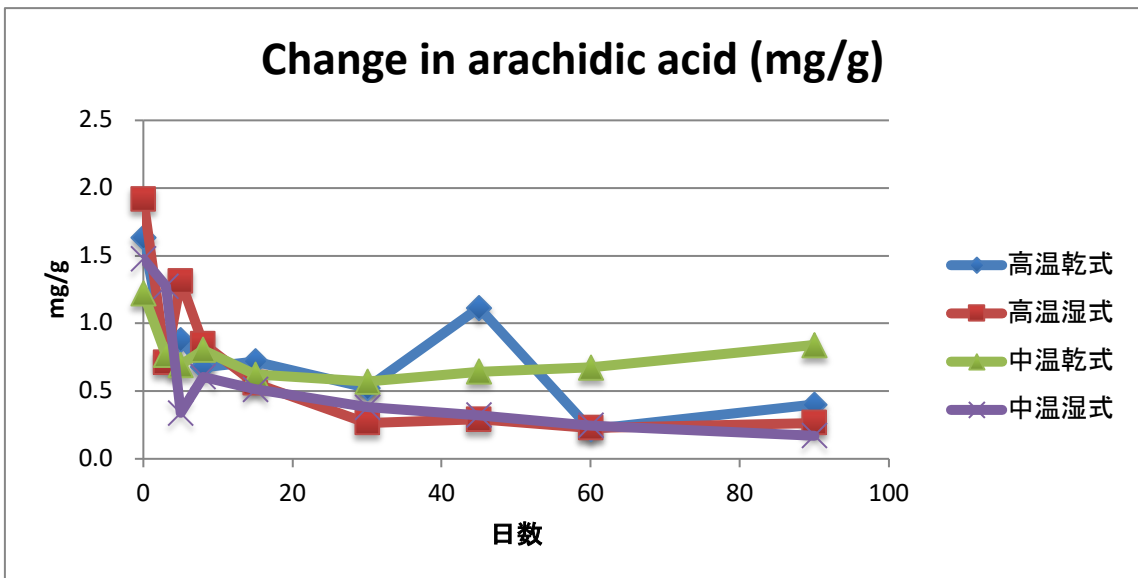


図 2-4 アラキジン酸の消長

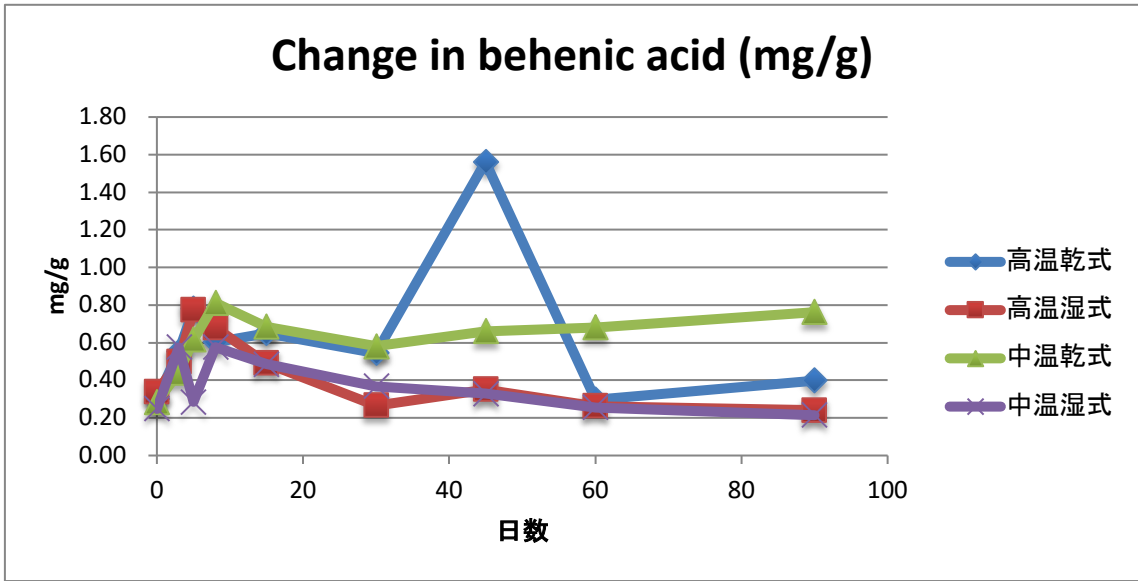


図 2-5 ベヘン酸の消長

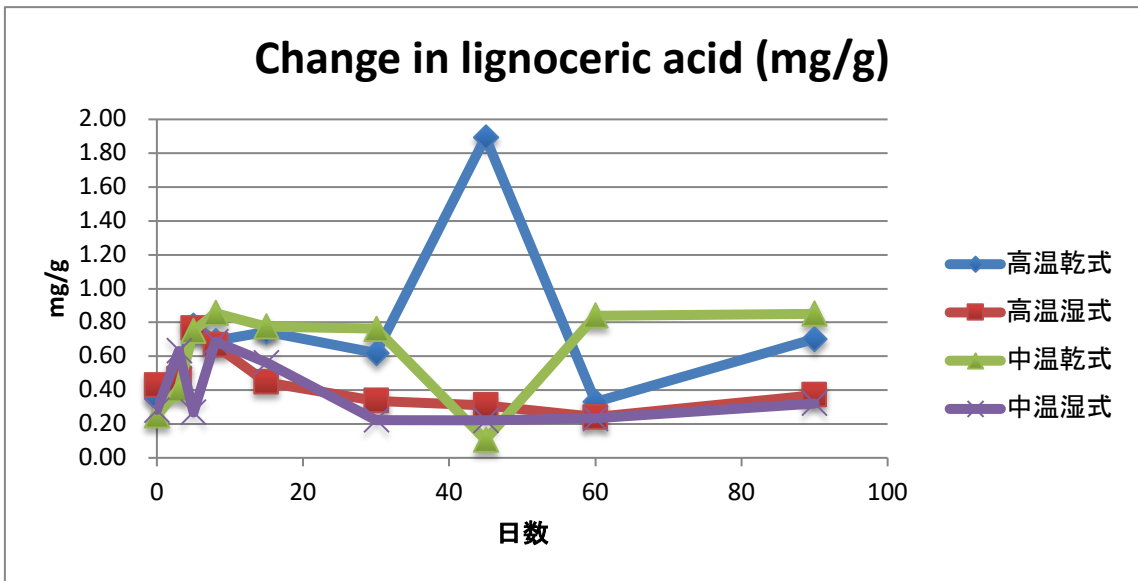


図 2-6 リグノセリン酸の消長

不飽和脂肪酸

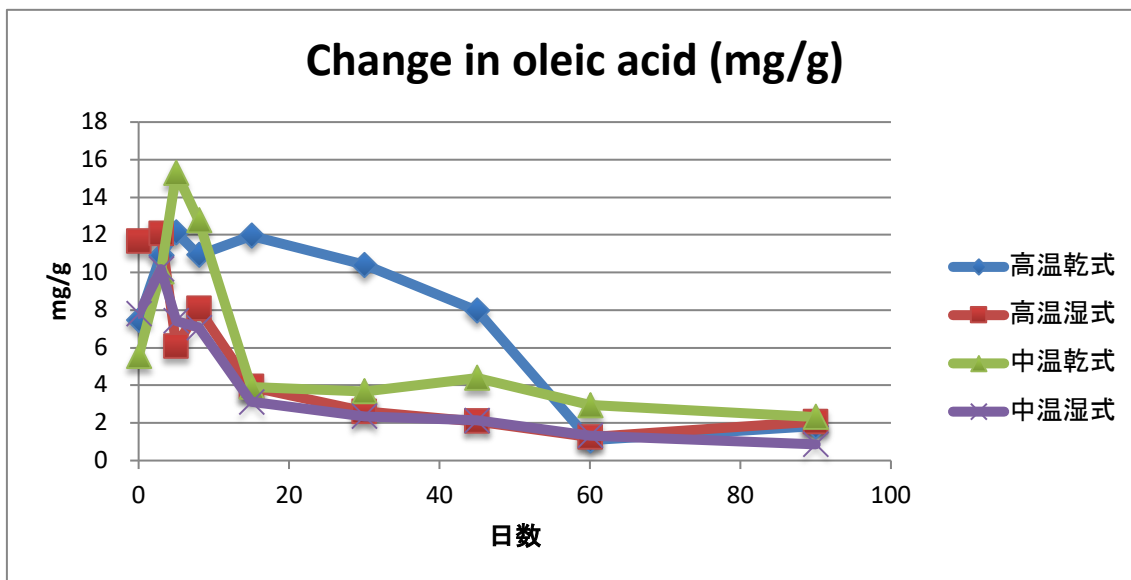


図 2-7 オレイン酸の消長

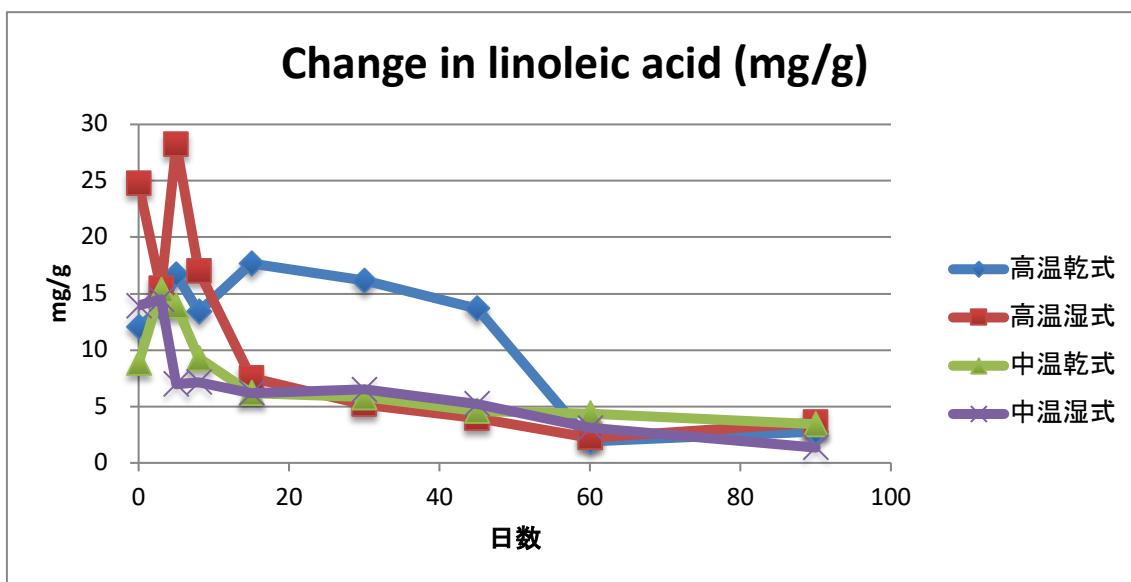


図 2-8 リノール酸の消長

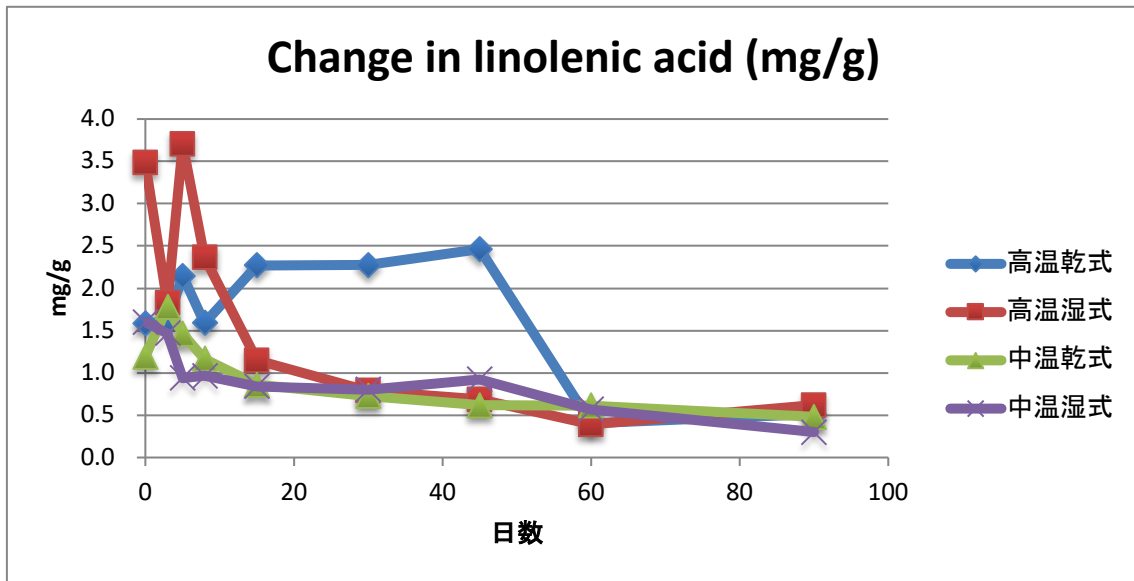


図 2-9 リノレン酸の消長

3.2 糖組成

メタン発酵残渣からはペントースに分類されるキシロース(図 3-1)とアラビノース(図 3-2)、ヘキソースに分類されるグルコース(図 3-3)とガラクトース(図 3-4)、デオキシヘキソースに分類されるラムノース(図 3-5)およびフコースが比較的多く検出された。微生物菌体成分に多く含まれるリボースおよびマンノース(図 3-6)はいずれの発酵条件下でもあまり検出されなかった。糖合計の消長(図 3-7)も示した。

今回の実験ではグルコースに対するラムノース、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトースの比率を求めた。キシロースの消長は図 3-8 に示した。

また、キシロースに対するラムノース、アラビノース、マンノース、ガラクトースの比率も同様に求めた。アラビノースとマンノースの消長は図 3-9 から図 3-10 に示した。

今回検出された糖の中で最も量が多かったものはキシロースであり、次いでグルコースであった。

ヘミセルロースの構成糖であるキシロースおよびアラビノースは3日目から8日目にかけて急激に増大した。また、ガラクトース、ラムノース、フコースもよく似た傾向を示した。このことは、ヘミセルロースおよびそれに付随する成分が植物体成分中である程度安定な構成成分であるため、他のもっと分解されやすい成分が分解を受ける際にヘミセルロースの割合が増えることを示している。

グルコースはキシロースとは異なり、発酵初期における急激な増大傾向を示さなかった。これは、グルコースが易分解性の多糖類にも多量に含まれるため、発酵初期に急激に分解を受けて減少するためと考えられる。その後は安定なセルロース画分に含まれるグルコースの割合が増大するため、ゆっくりとした減少傾向を示した。

キシロースとグルコース以外の糖は90日目にはほとんどなくなっていた。

各種の発酵過程を比較すると、中温・乾式過程においては、キシロース、アラビノース、グルコースなどの減少が最も遅く、高温・乾式過程もそれについて遅かった。その他の少量の糖においてはメタン発酵条件の違いは減少パターンに著しい違いをもたらさなかった。

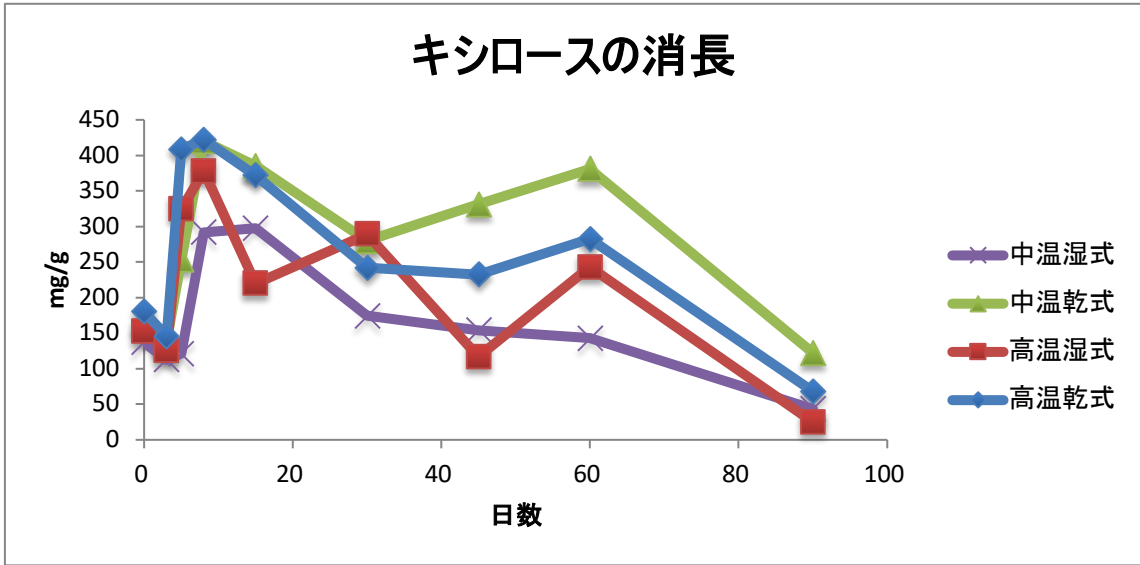


図 3-1 キシロースの消長

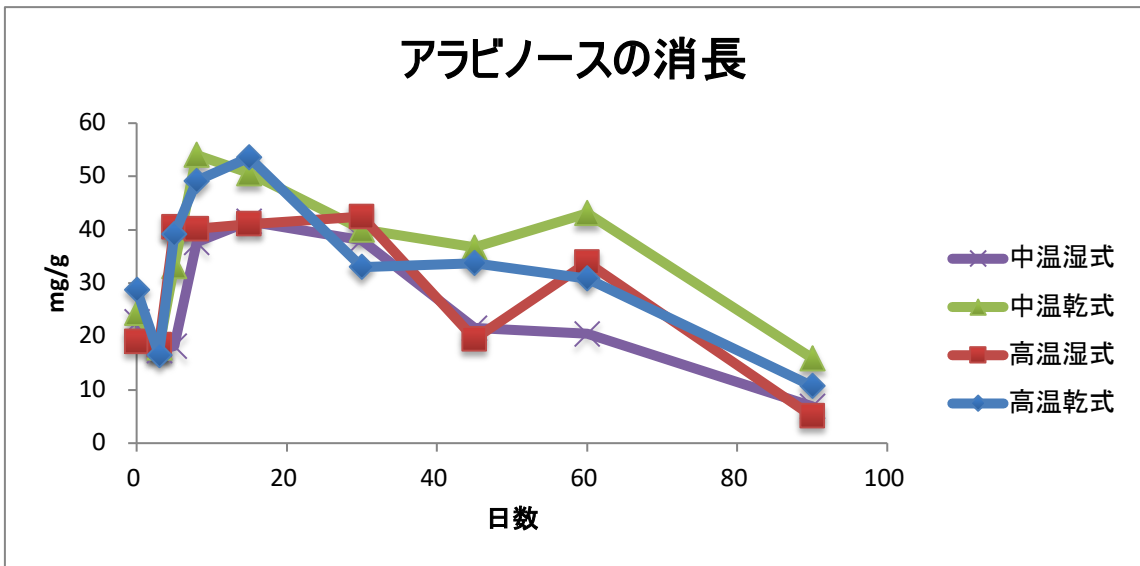


図 3-2 アラビノースの消長

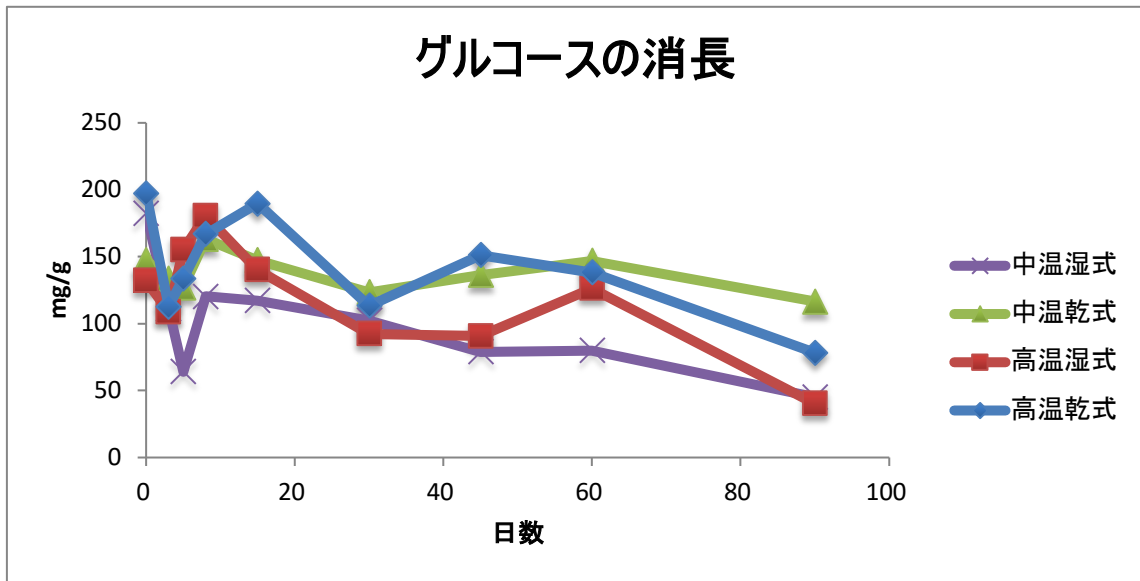


図 3-3 グルコースの消長

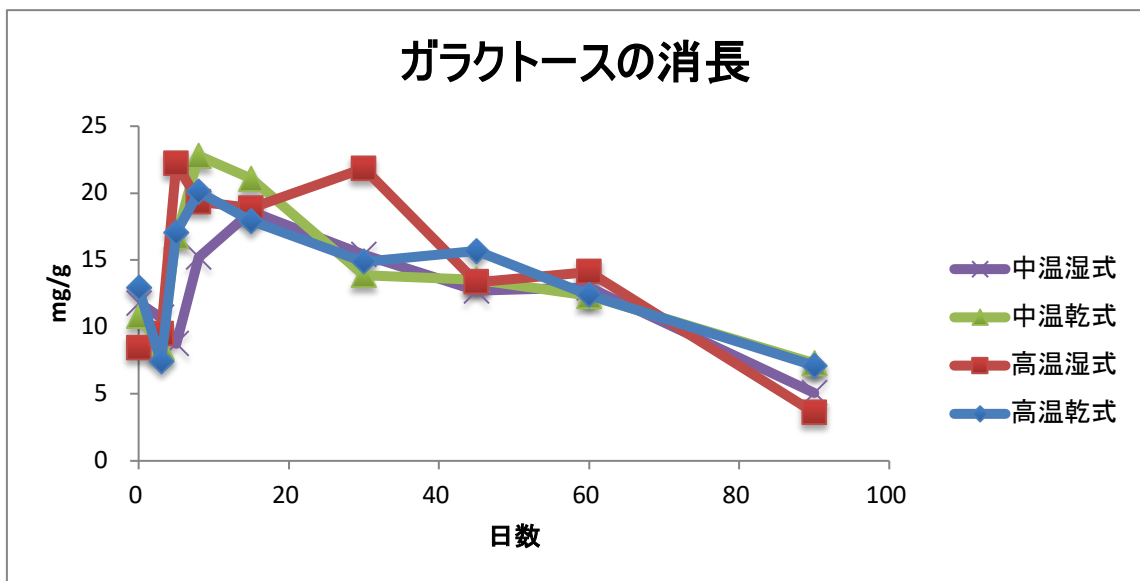


図 3-4 ガラクトースの消長

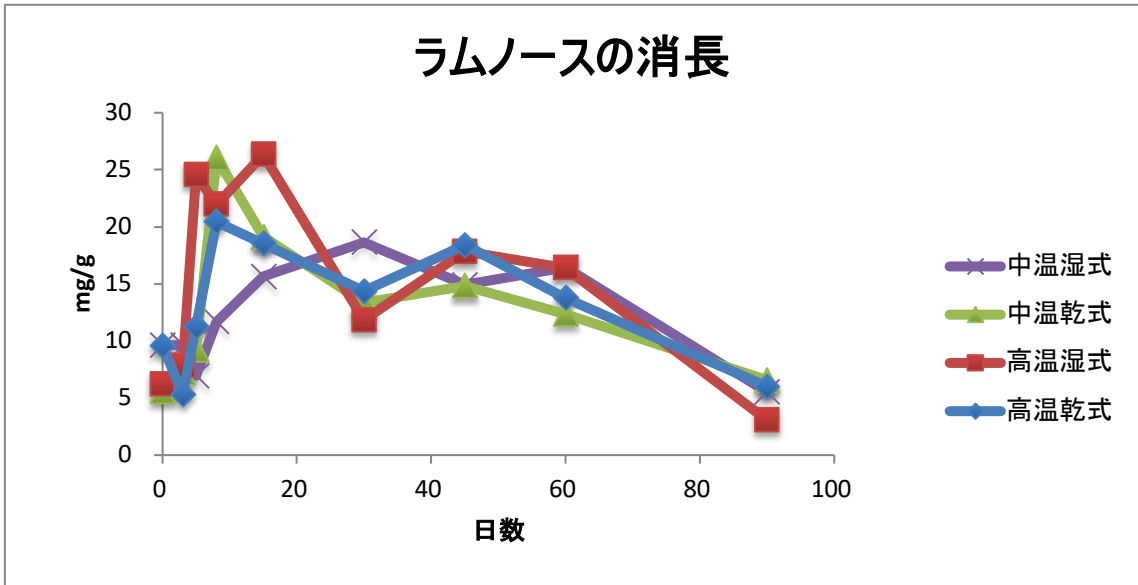


図 3-5 ラムノースの消長

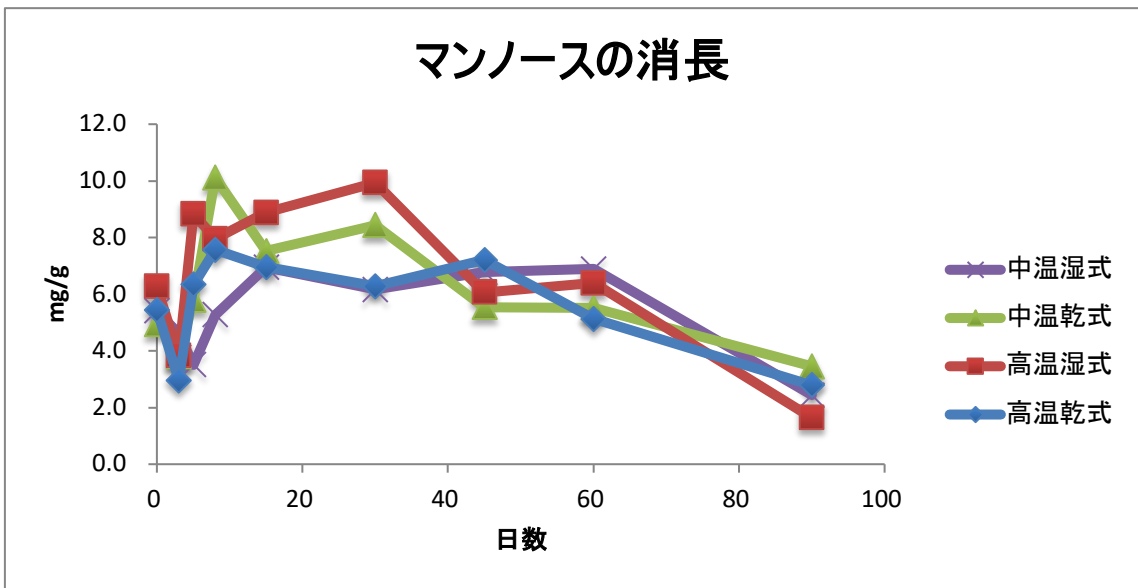


図 3-6 マンノースの消長

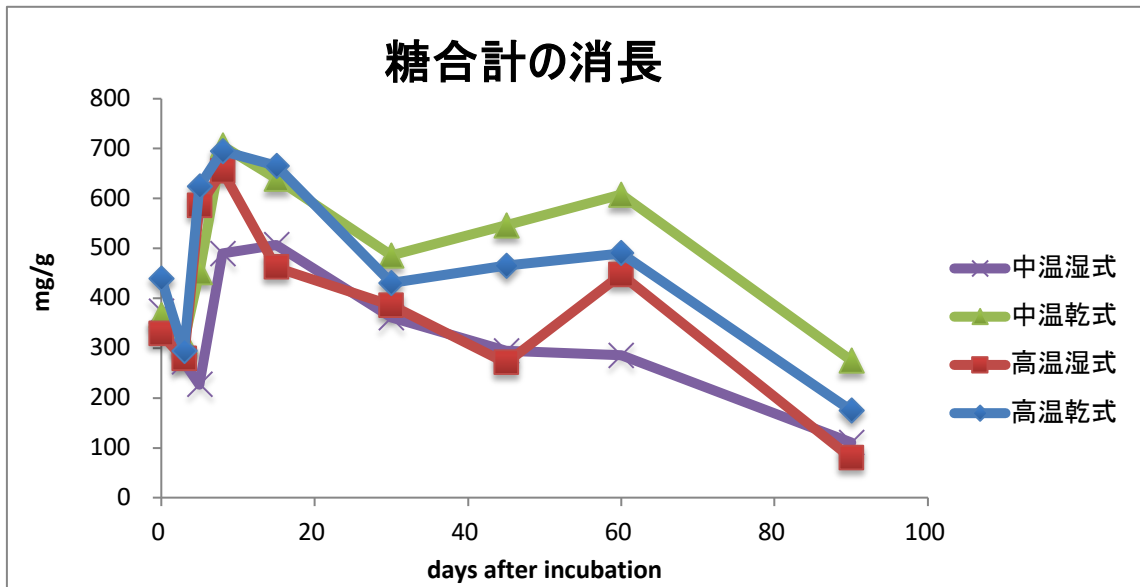


図 3-7 糖合計の消長

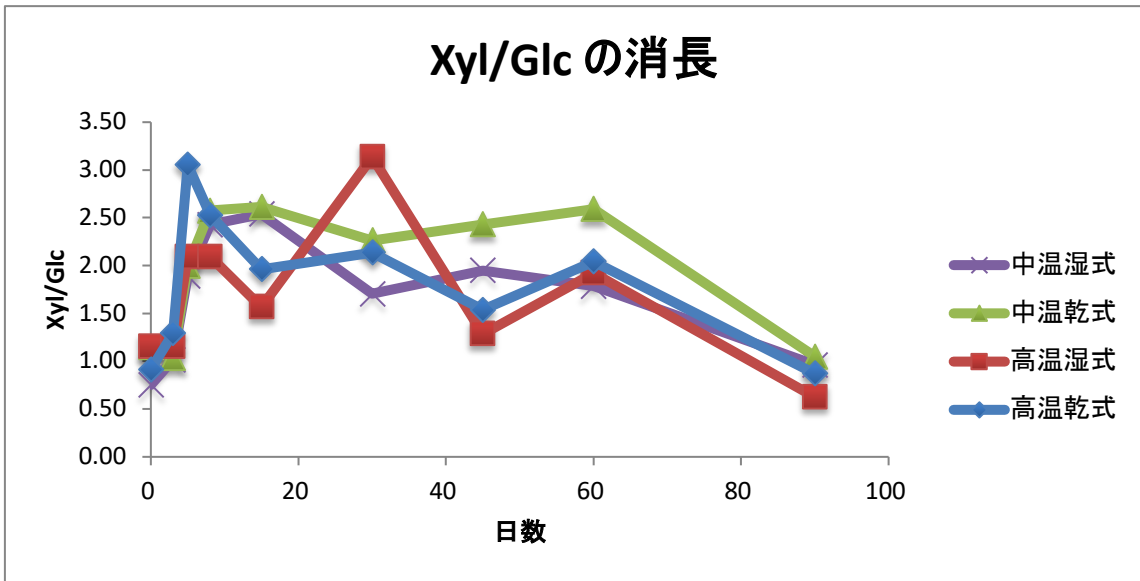


図 3-8 グルコースに対するキシロースの比率

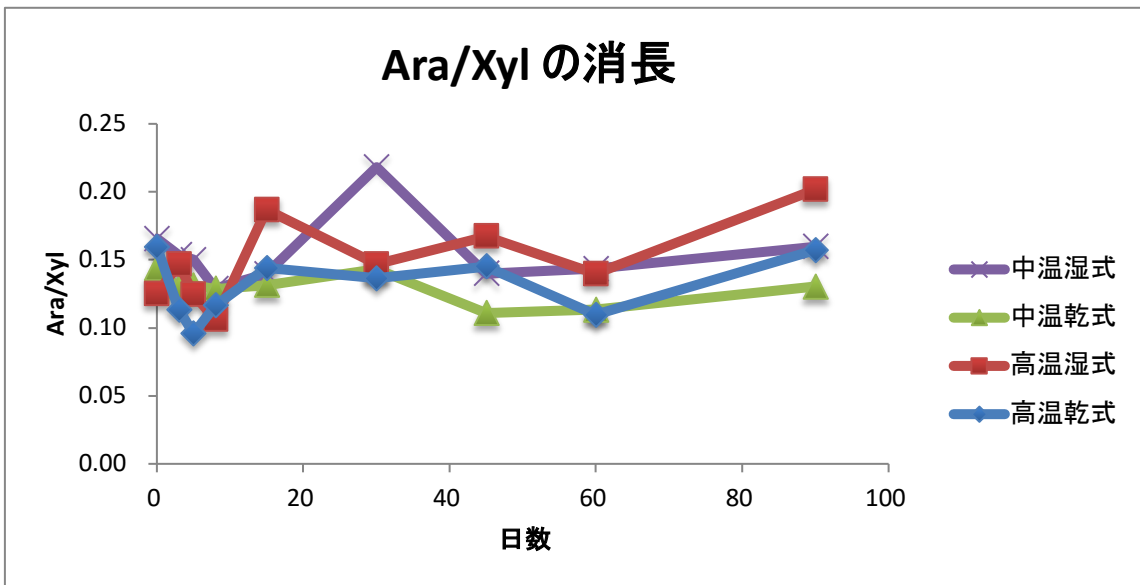


図 3-9 キシロースに対するアラビノースの比率

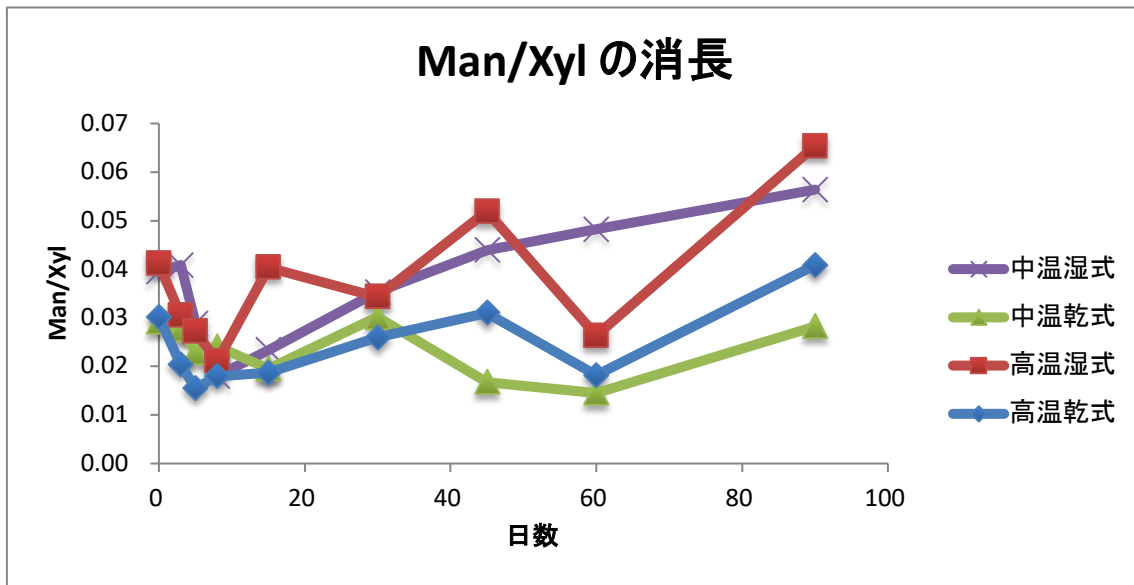


図 3-10 キシロースに対するマンノースの比率

第4章 結論

脂肪酸組成においては、飽和脂肪酸は中温・乾式ではあまり減らなかった。

中温・乾式以外では一旦増加した後に減少していた。不飽和脂肪酸では飽和脂肪酸とは異なり、中温・乾式でも減少していた。初期から中期にかけて増加しているということがわかった。これは微生物によって脂肪酸が合成されたからではないかと考える。

糖組成においては、高温・乾式および中温・湿式で炭水化物の分解が最も早く進行していた。中温・乾式では分解が最も遅かった。高温・乾式では中温・乾式、中温、高温・湿式の間での速度で分解が進行していた。

乾式メタン発酵を行う場合、中温ではなく高温発酵が必要であるということがわかった。

高温・乾式では脂質および炭水化物の分解が湿式に劣らず進行していた。

そして乾式メタン発酵よりでた発酵残渣は作物の発芽と初期生育を阻害せず、また雑草種子を発酵期間中に殺しており、農耕地に散布しても安全な残渣が生成されたと考えられる。

参考文献

- ・メタン発酵処理技術の現状と課題
- ・メタン発酵の研究開発の現状と課題
- ・藤野安弘：脂肪酸分析法入門,学会出版センター
- ・渡辺 彰：腐食物質分析ハンドブック,三恵社