

2014 年度受託研究

乳牛ふん尿メタン発酵残渣の脂質・
炭水化物およびリグニン組成

帯広畜産大学
地域環境学研究部門

筒木 潔

第1章 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。

昨年度は、揮発性脂肪酸組成、有機成分の近似分析、腐植物質組成、元素組成、アミノ酸組成等を研究し、乾式メタン発酵においてバイオガス生産が活発に進行する一方で、残さの有機物組成も分解が進み、安定な腐植化過程をたどることを明らかにした。

本年度は、メタン発酵残さの有機物組成をさらに詳細に明らかにするため、脂質画分の脂肪酸組成、炭水化物画分中の糖組成、リグニン画分中のフェノール性化合物組成を分析し、発酵過程におけるその変化の様子を発酵過程毎に比較した。

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：150 °C

昇温速度：3 °C/min

カラム最終温度：220 °C

注入口温度：250 °C

検出器温度：250 °C

キャリアーガス：ヘリウム

注入口圧力：250 kPa

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 のミニバイアルに移した。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。

④ 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で乾固してから、NaBH₄ /DMSO 溶液 1 mL を添加し、40°C の恒温乾燥機中で 90 分還元した。

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。

以下の操作は試料、標準液ともに同様に行った。

⑤ ホウ酸のメチル化による除去

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。

⑥ 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。

⑦ 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、9 mL のエチルエーテルを加え、密栓してボルテックスマキサーで攪拌した。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。下の水相をテフロンチューブを接続したガラスシリンジで除去し、ここに 10mL の水を加えた。ボルテックスマキサーで攪拌したのち、再び水層を除去した。残ったエーテル相に 5 mL の 2-プロパノールを添加し、10 mL のナス型フラスコに移した。

これを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。

⑧ ガスクロ分析

方法 1

ガラスキャピリカラム Chrompack CP-Sil 43CB（内径 0.25 mm×25 m 膜厚 0.2 μ m）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

ガラスキャピリカラムはジーエルサイエンス社製 InertCap 225（内径 0.25 mm×30

m 膜厚 0.25 μ m) 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。キャピラリガスはヘリウムで注入部の圧力は 130 kPa とした。オーブンの温度は 210°C から 240°C まで 5°C/min で昇温させ、240°C で 14 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 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。

4) フェノール性化合物の分析方法

① 試料の前処理

メタン発酵残渣 23 mg ~ 33 mg を 18 mL のテフロンパッキンで裏打ちしたネジ栓付ガラス試験管中に電子天秤で精密に秤り取った。これにジエチルエーテル 20 mL を添加し、超音波洗浄機中で 10 分間超音波処理したのち一夜放置した。その後、パスツールピペットで上澄みを除去した。これは、試料から脂質成分を除去するためである。

② 酸化銅アルカリ分解

粉状酸化銅をソックスレー抽出器に入れ、ジクロロメタンで還流洗浄した。還流後酸化銅にしみ込んだジクロロメタンはドラフト中で乾燥させて除去した。この洗浄した酸化銅 250 mg を秤り取り、エーテル洗浄したメタン発酵残渣と試験管中で混ぜた。これにエチルエーテル 10 mL を添加し、一夜放置した。

一夜放置後、エチルエーテルをパスツールピペットで除去し、ドラフト中で乾燥させた。ここに硫酸第一鉄アンモニウム（モール塩）50 mg を添加した。

さらに 2 N NaOH 2 mL を添加し、ゆるくキャップをした後、真空デシケータ中に移し、ダイアフラムポンプで脱気した。2 N NaOH が突沸する前に 0.05MPa で脱気をやめ、窒素ガスを大気圧まで導入した。この窒素ガスを脱気して除去し、再び窒素ガスを導入した。窒素ガスの脱気と導入をもう一度繰り返した。その後、窒素で飽和された状態で一晩真空デシケータ中に放置した。

試験管を真空デシケータから取り出し、ネジ栓をしっかりと締めた。これをアルミブロックヒータに移し、150℃で6時間加熱した。

③ 抽出・精製

放冷後、内部標準としてフェノキシ酢酸 (50 mg / 50 mL) を 50 μL およびエチルバニリン (50 mg / 50 mL) を 50 μL 添加した。試験管中のけんだく液を 12 mL 容のナルゲン高速遠心管中に移し、さらに純水 2 mL で2回洗い出した。

この試験管のバランスを取ったのち、高速遠心ロータに移し、10,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを別の高速遠心管に移した。

これに 2N HCl 2 mL を添加し、一夜放置後、再び 10,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを別の高速遠心管に移した。

この状態で上澄み溶液の pH を測定したところ 1 以下であったため、2 N NaOH を約 0.4 mL 添加し、pH を 1.5 から 1.8 に調節した。

Sep-Pak C18 Plus をメタノール 6mL と純水 6mL でコンディショニングしたのち、pH を調節した上澄み液を通過させ、純水 3mL を流して Sep-Pak Plus カラムを洗浄した。

この Sep-Pak C18 Plus カラムに窒素ガスを通過させながらドライヤーで 3 分以上加熱し乾燥させた。

その後、Sep-Pak C18 Plus カラムを酢酸エチル 2 mL で溶離し、5mL 容ミニバイアルに受けた。

窒素ガスを吹き付けて酢酸エチルを除去したところ、微量の水分が残ったため、冷凍庫中で凍らせたのち、凍結乾燥機に入れて乾燥した。

④ シリル化およびキャピラリーガスクロマトグラフィー

凍結乾燥した抽出物に、高純度ピリジン 50 μ L とシリル化剤 BSTFA 50 μ L を添加し、ミニバイアルのキャップをして、80 $^{\circ}$ C に調節したホットプレート上に乗せ、1 時間加熱した。加熱後、放冷し、ここから 1 μ L をガスクロマトグラフにインジェクトした。

キャピラリーガスクロマトグラフィーの条件は、ジーエルサイエンス社製 InertCap1 カラム(内径 0.25 mm \times 50 m 膜厚 0.25 μ m) を使用し、初期温度 100 $^{\circ}$ C、昇温速度 5 $^{\circ}$ C/min、最終温度 250 $^{\circ}$ C、最高温度保持時間 10 分とした。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。キャピラリーガスはヘリウムで注入部の圧力は 260 kPa とした。

⑤ 標準化合物および検量線

標準化合物および内部標準物質として、以下の化合物を用意し、それぞれの化合物を約 50mg ずつ正確に秤取り、メスフラスコ中でアセトン 50 mL に溶解した。

これらの標準化合物溶液を A グループと B グループに分けて、標準混合液とした。

標準混合液には一次標準溶液を 3 mL ずつ混合し、50 mL に希釈した。

ここから 250 μ L をミニバイアル中にとり、窒素ガスを吹き付けて乾燥させ、ピリジン 50 μ L および BSTFA 50 μ L を添加し、80 $^{\circ}$ C で 1 時間加熱後、キャピラリーガスクロマトグラフィーで分析した。

以下の化合物はリテンションタイムの順に記載した。

安息香酸

p-OH ベンズアルデヒド

フェノキシ酢酸 (内部標準 1)

p-OH アセトフェノン

バニリン

エチルバニリン (内部標準 2)

アセトバニロン

pOH 安息香酸

シリングアルデヒド

アセトシリンゴン

バニリン酸

シリング酸

p-クマル酸

フェルラ酸
シナピン酸

A グループ混合液

安息香酸
フェノキシ酢酸 (内部標準 1)
p-OH アセトフェノン
エチルバニリン (内部標準 2)
アセトバニロン
シリングアルデヒド
バニリン酸
p-クマル酸
シナピン酸

B グループ混合液

p-OH ベンズアルデヒド
フェノキシ酢酸 (内部標準 1)
バニリン
エチルバニリン (内部標準 2)
pOH 安息香酸
アセトシリンゴン
シリング酸
フェルラ酸

その他、コハク酸、グルタル酸、フロログルシノール、プロトカテク酸などを分析したが、メタン発酵残さ中には含まれていなかった。

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不飽和脂肪酸は急速に減少する傾向を示した。

高温・乾式条件下では他の発酵様式と異なり、15日目から45日目頃まで不飽和脂肪酸は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15日目から45日目頃まで高かったのは、この期間に微生物分解活動が盛んであった可能性が考えられる。

飽和脂肪酸

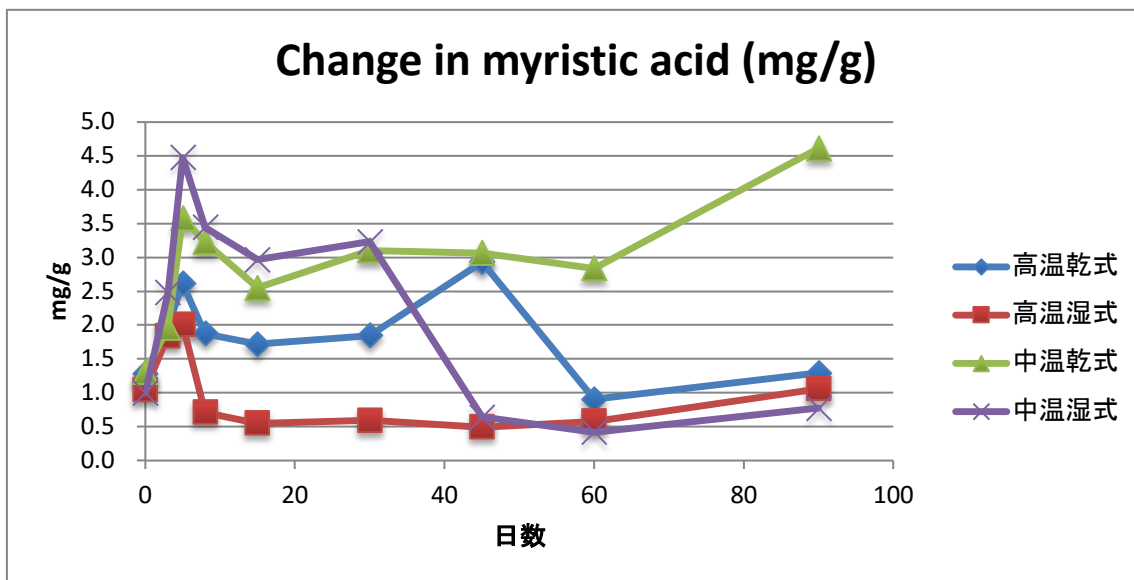


図 2-1 ミリスチン酸の消長

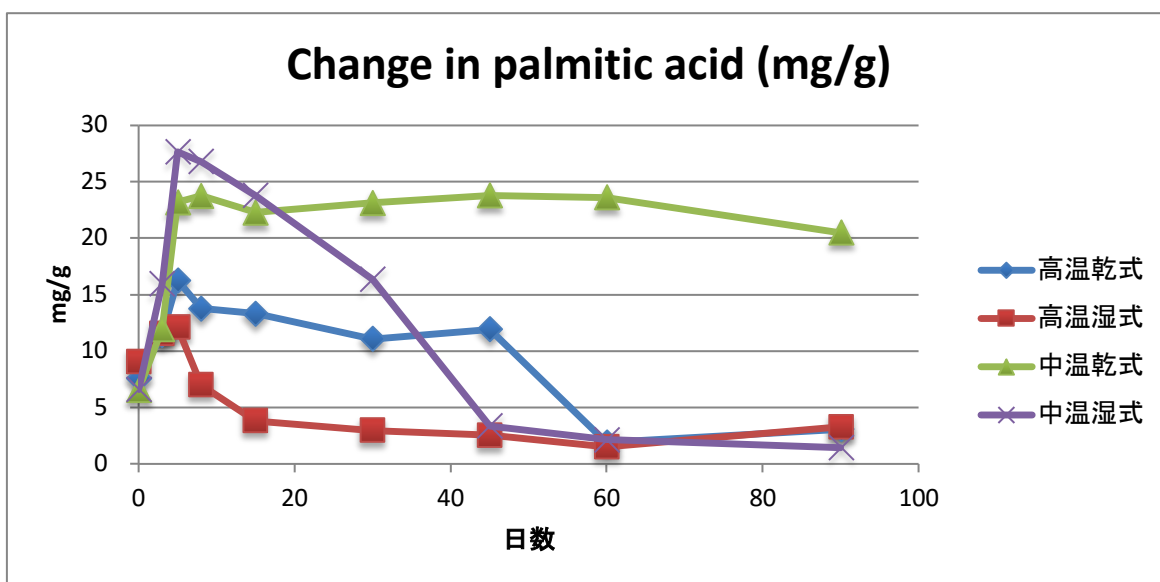


図 2-2 パルミチン酸の消長

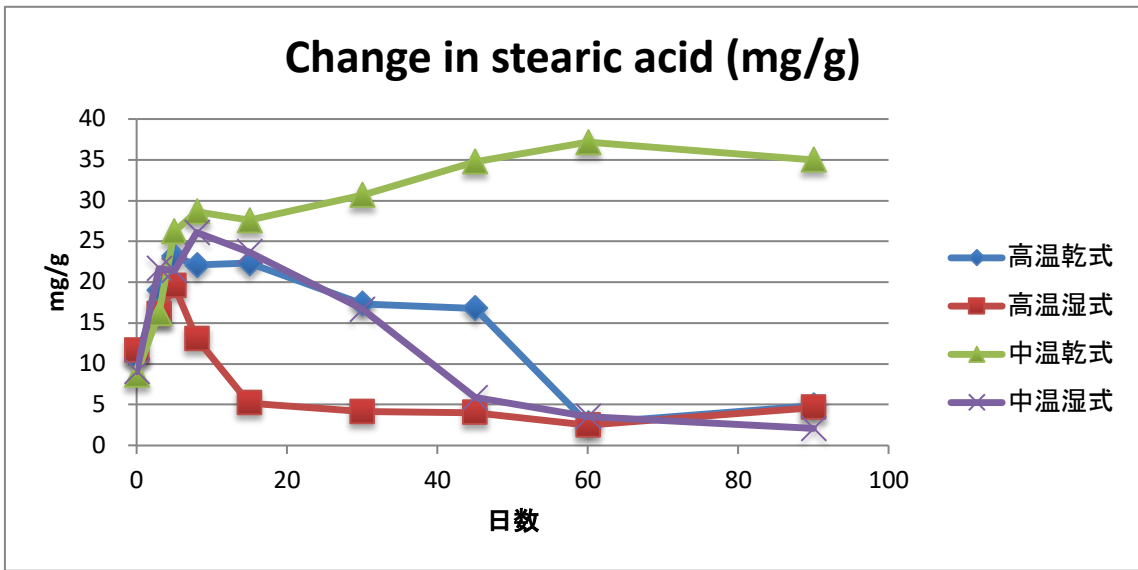


図 2-3 ステアリン酸の消長

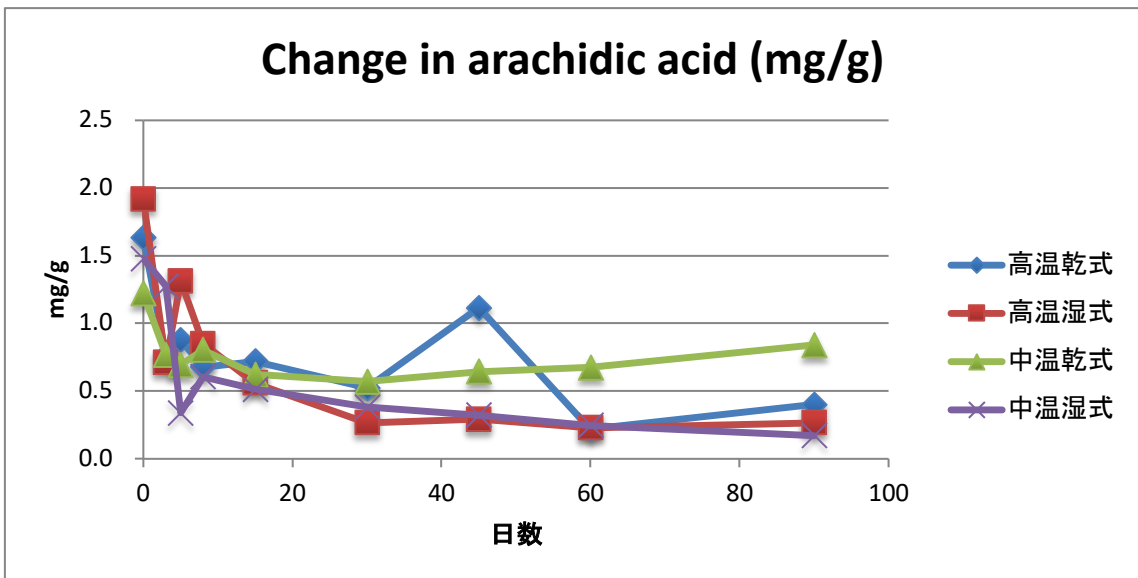


図 2-4 アラキジン酸の消長

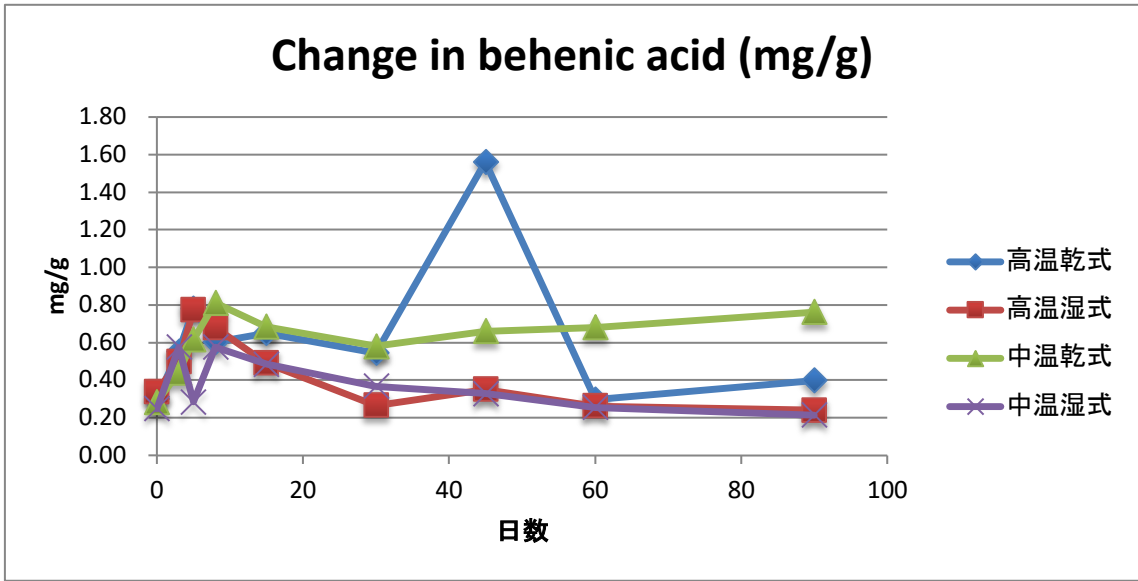


図 2-5 ベヘン酸の消長

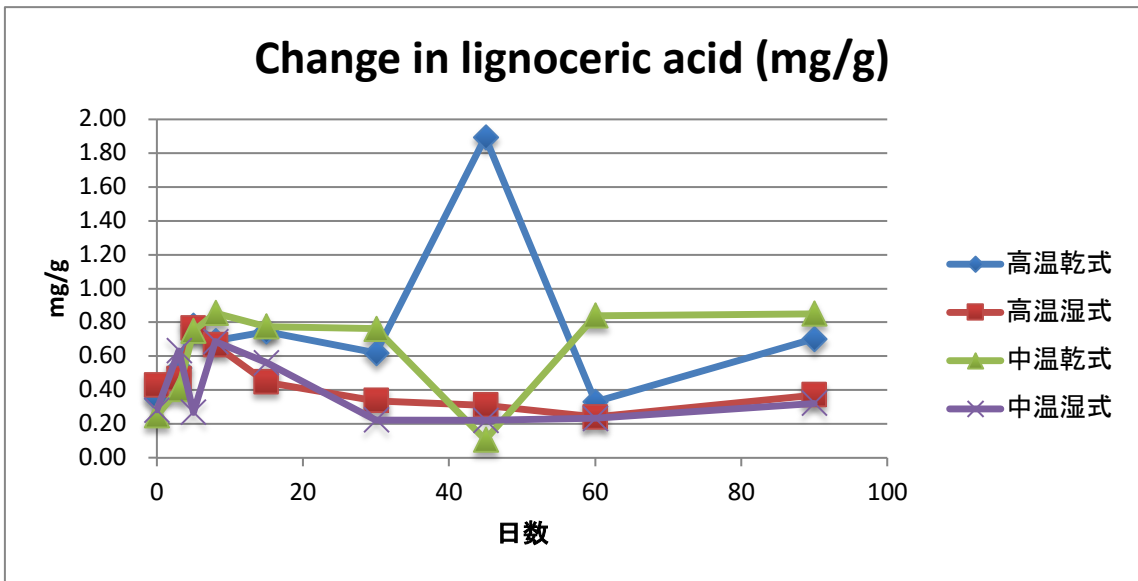


図 2-6 リグノセリン酸の消長

不飽和脂肪酸

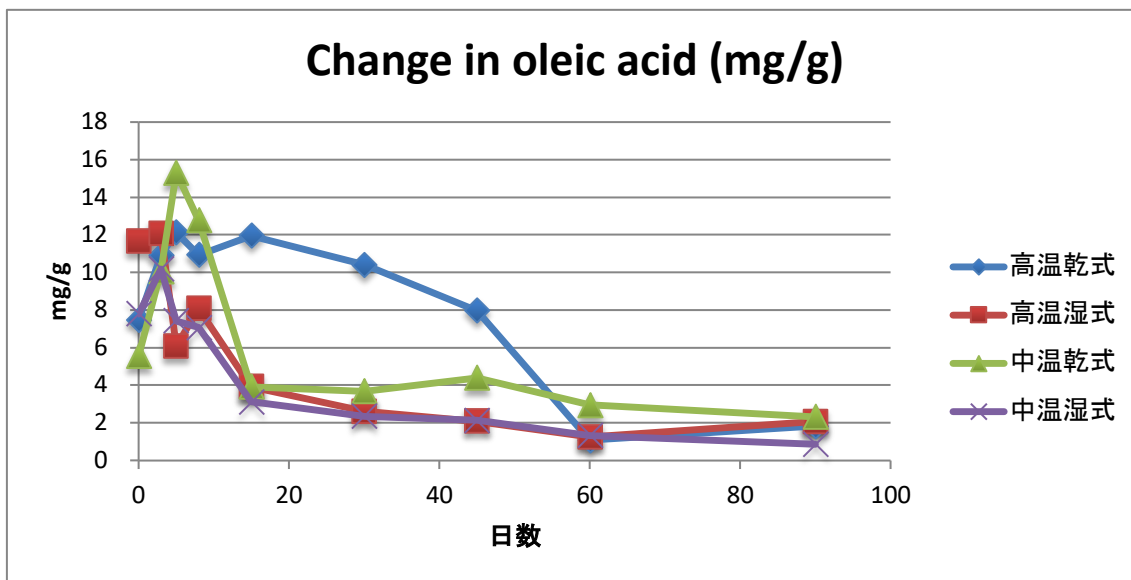


図 2-7 オレイン酸の消長

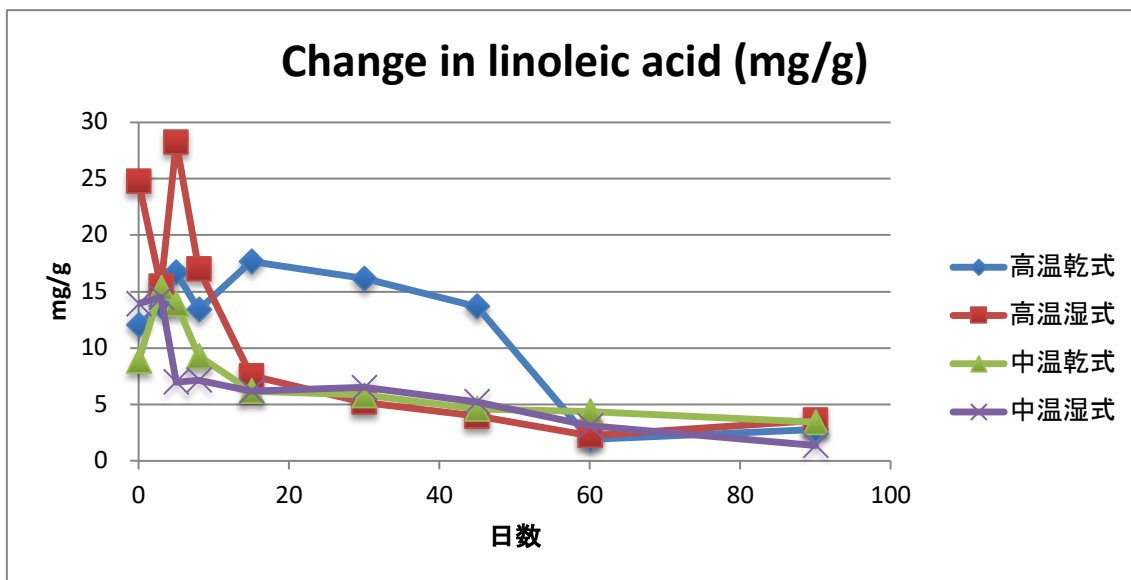


図 2-8 リノール酸の消長

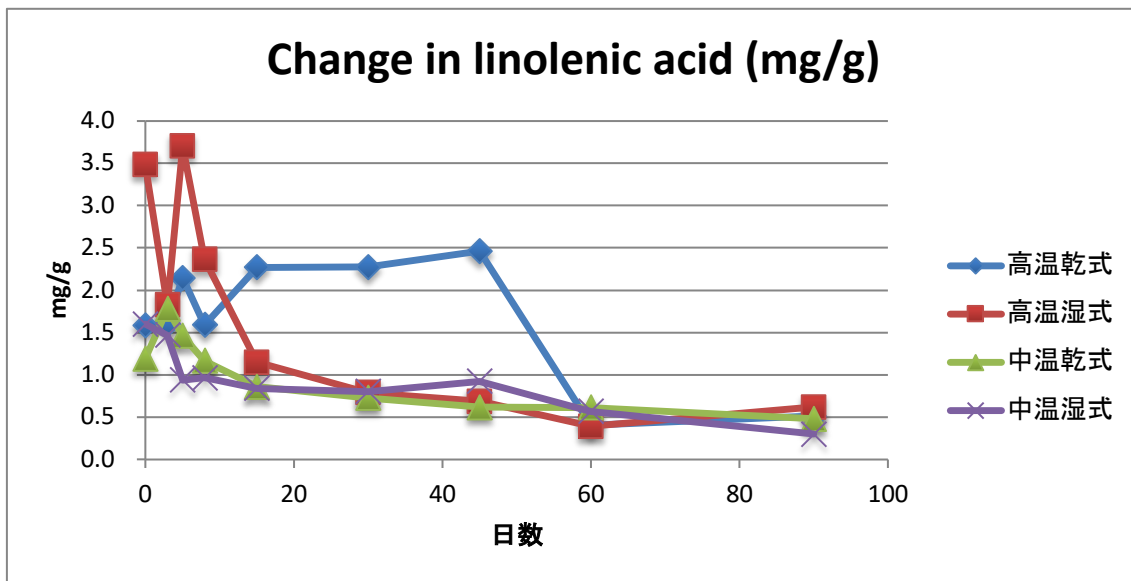


図 2-9 リノレン酸の消長

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生成量が少なかった。糖合計の消長(図 3-7)も示した。

また、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。グルコースに対するキシロースの比率は図 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。キシロースに対するアラビノースとマンノースの比率は図 3-9 と図 3-10 に示した。

メタン発酵残さの酸加水分解物中に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(図 3-1、3-2)。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(図 3-3)。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日目には非常に減少していた(図 3-4、3-5、3-6)。

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。

キシロースおよびグルコースのような主要な糖においては、乾式過程の方が湿式過程よりも減少が遅れる傾向が認められた。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。

Xyl/Glc 比は中温乾式様式では他の様式よりも高く推移し、ヘミセルロースの分解が遅れていることを示唆した(図 3-8)。

アラビノースとキシロースは、いずれもヘミセルロースの主要な構成糖であるため、両者の比率 Ara/Xyl (図 3-9)は他の比率と比べて変化が少なかったが、高温湿式および中温湿式過程において、他の乾式過程よりも高い値を示した。これは、湿式過程においてキシロースの分解がよく進むことを示唆している。

他方、Man/Xyl の比率(図 3-10)は中温・乾式で最も低く、高温・乾式もこれに続き、高温湿式および中温湿式では高い値を示した。マンノースは微生物菌体成分に由来するもの

が多いといわれているので、Man/Xyl の比率も微生物活性を反映したものと推察される。

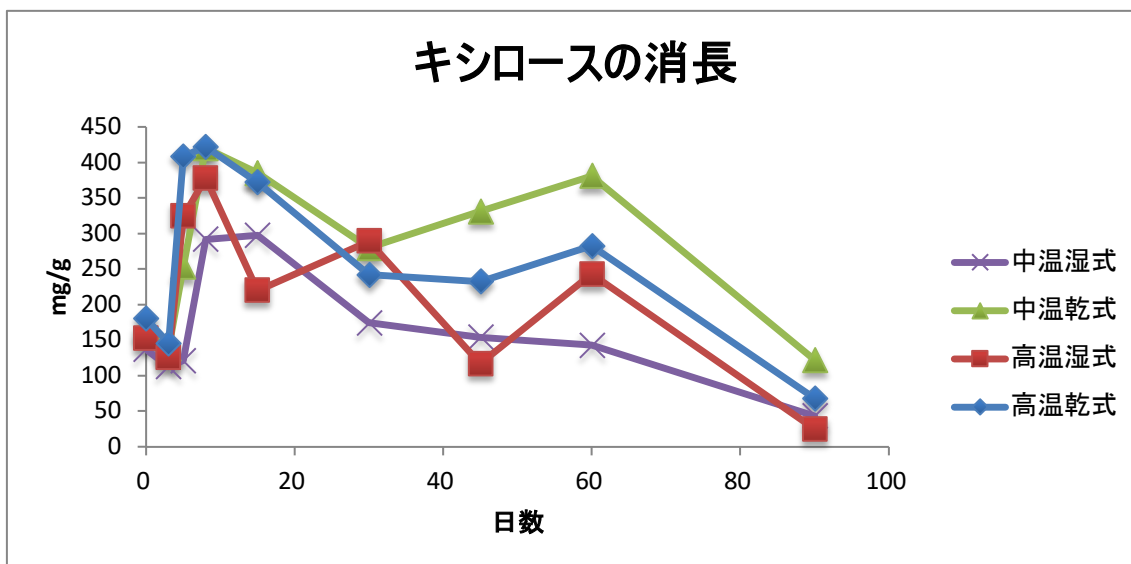


図 3-1 キシロースの消長

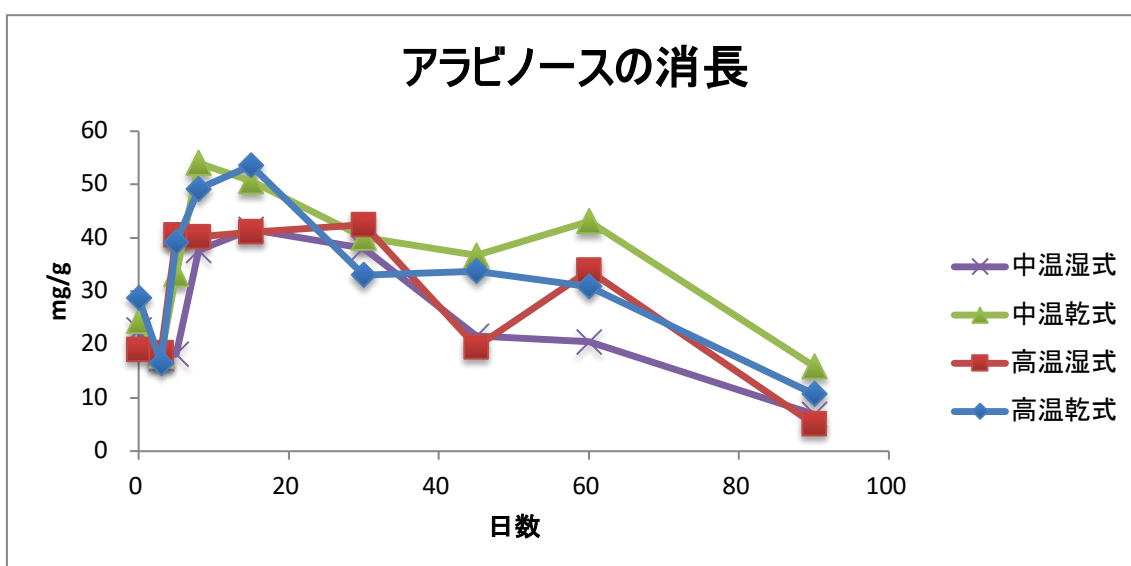


図 3-2 アラビノースの消長

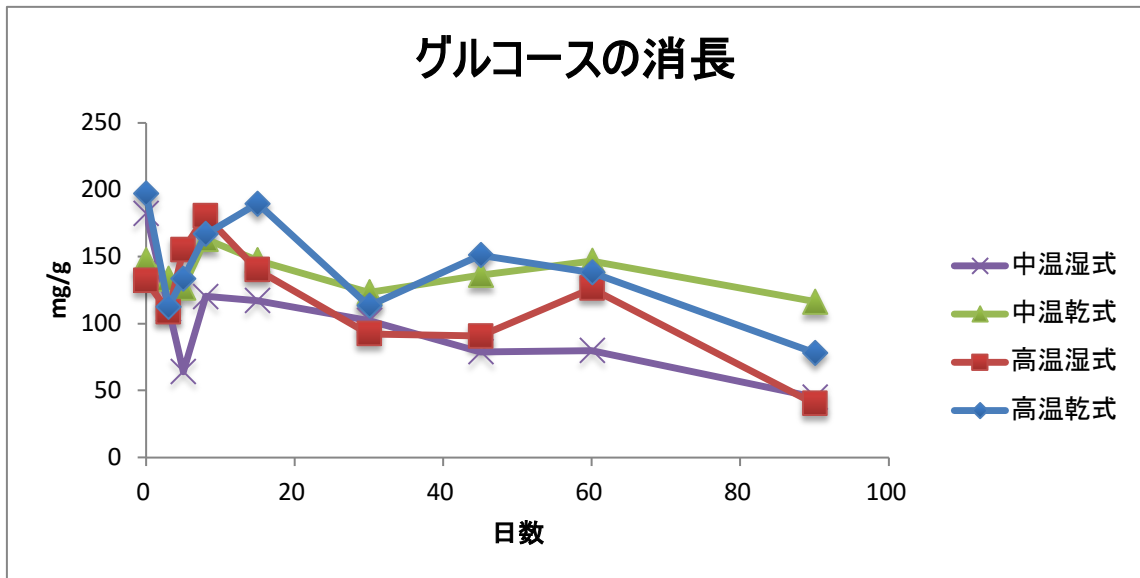


図 3-3 グルコースの消長

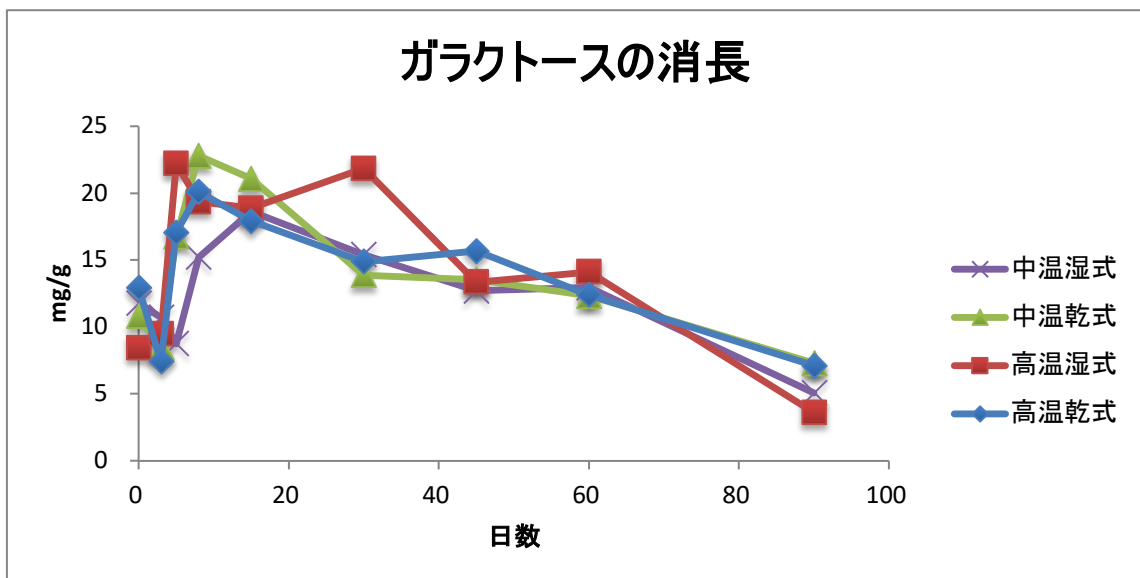


図 3-4 ガラクトースの消長

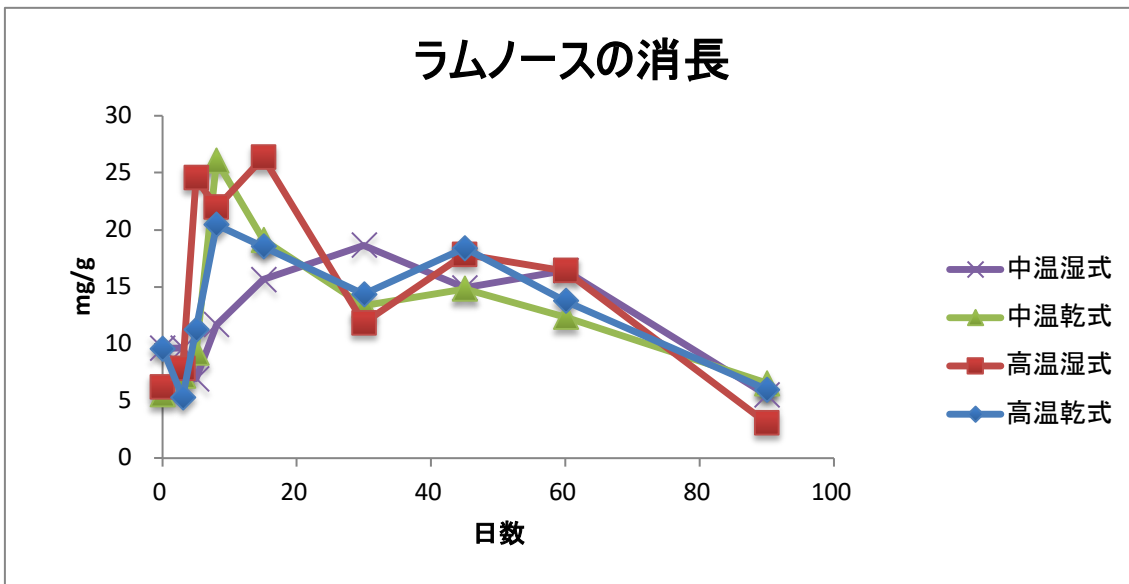


図 3-5 ラムノースの消長

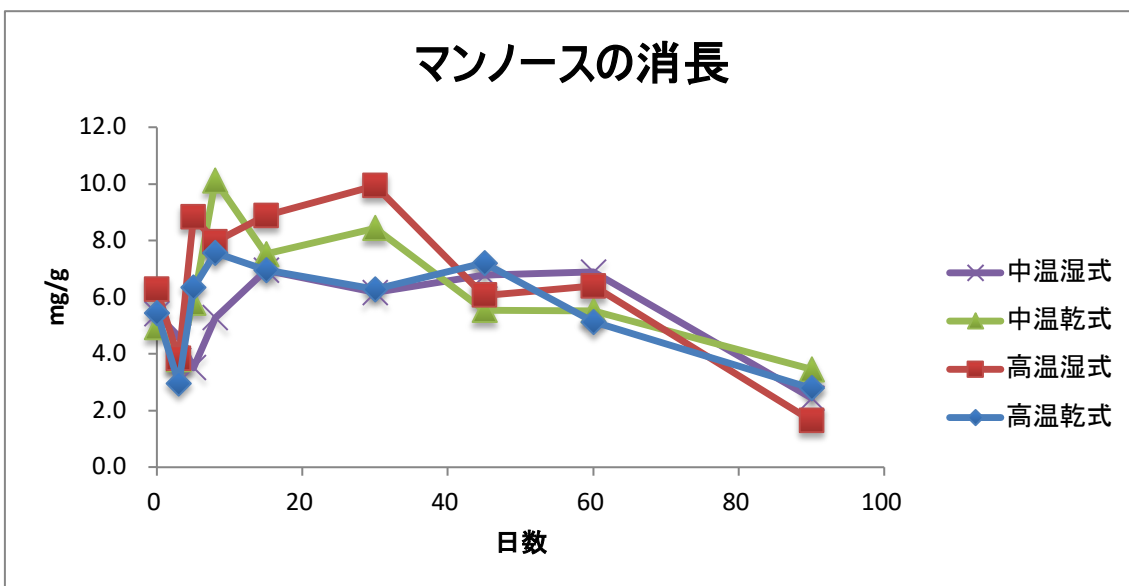


図 3-6 マンノースの消長

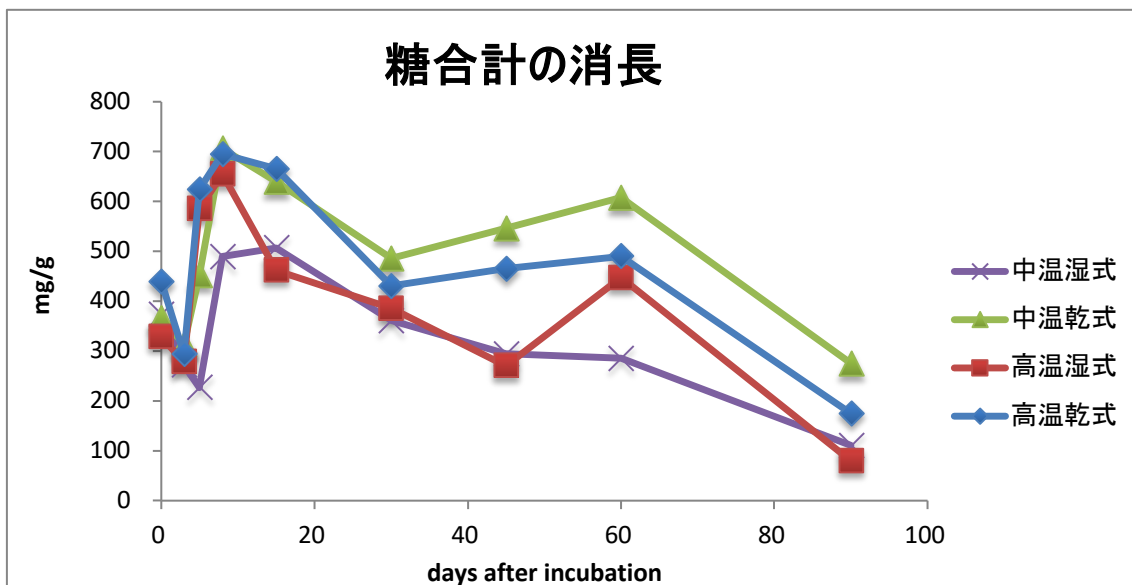


図 3-7 糖合計の消長

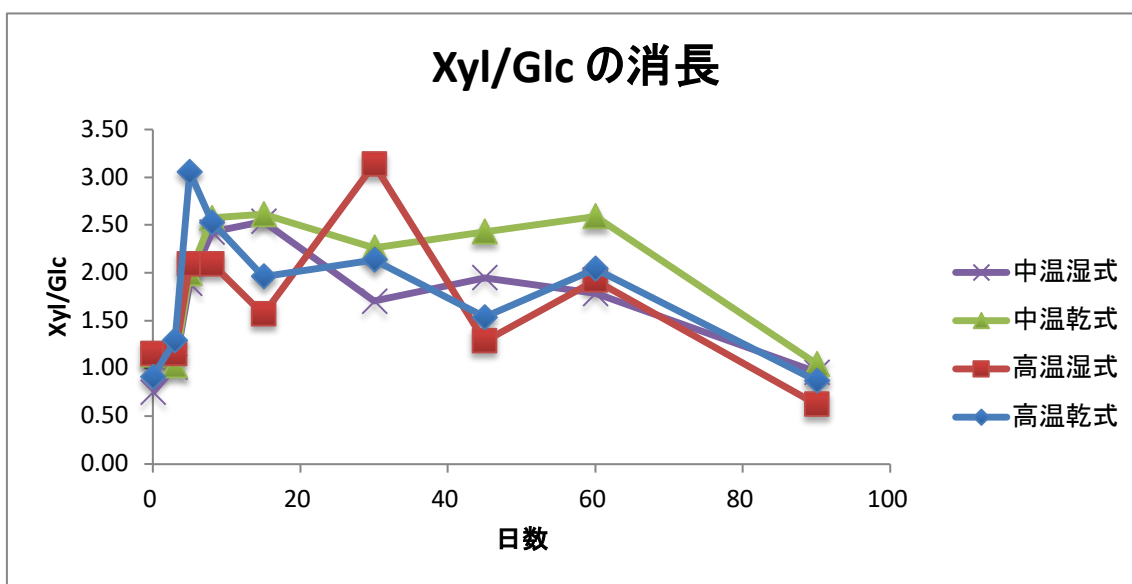


図 3-8 グルコースに対するキシロースの比率

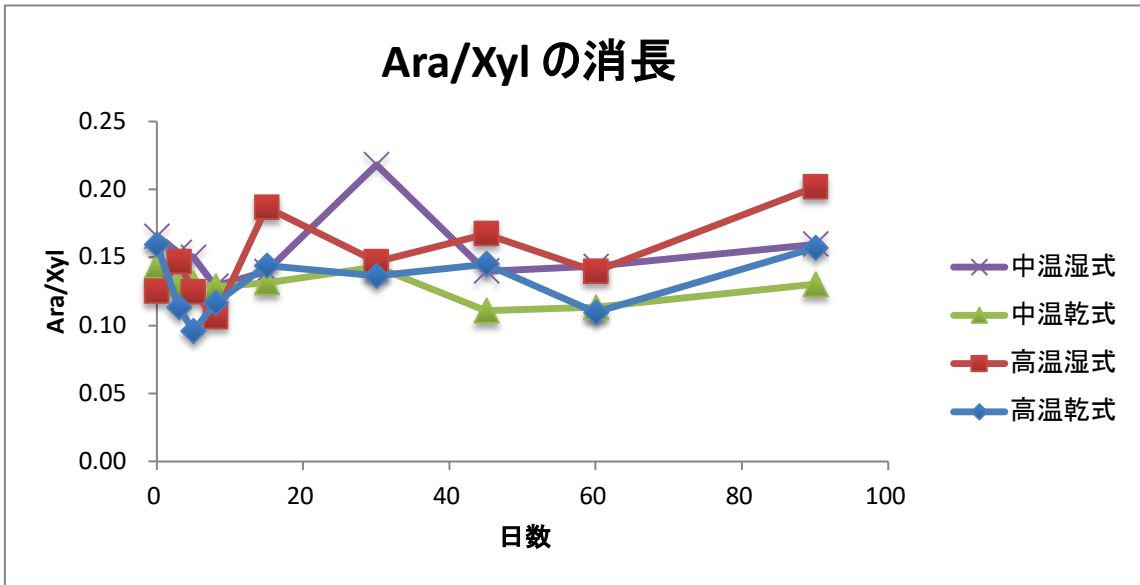


図 3-9 キシロースに対するアラビノースの比率

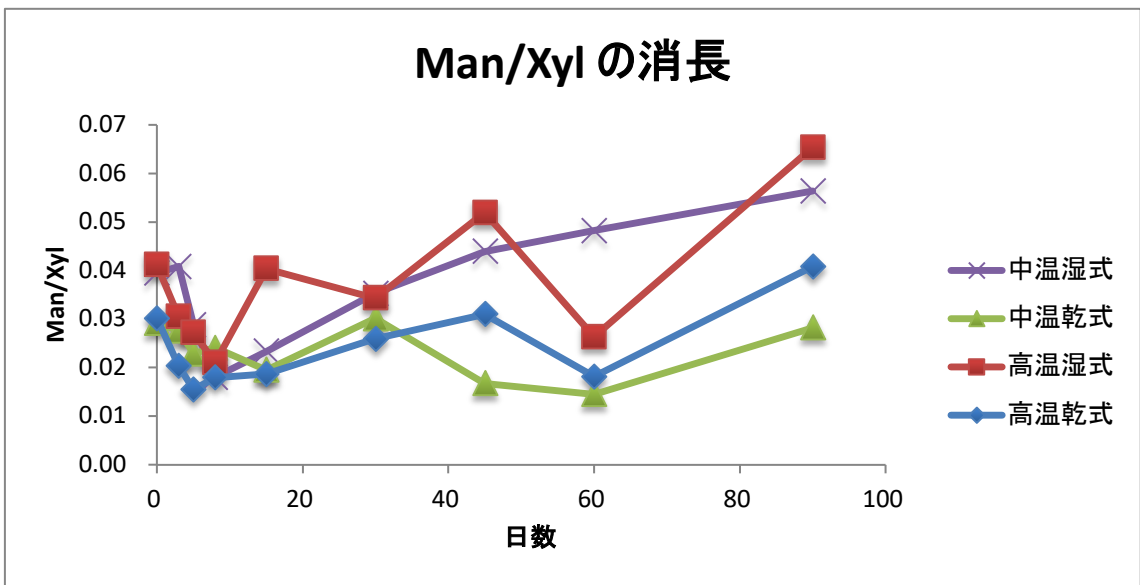


図 3-10 キシロースに対するマンノースの比率

3.3 リグニン由来のフェノール性化合物

リグニン由来のフェノール性化合物は、*p*-ヒドロキシフェニル化合物、バニリル化合物、シリンジル化合物、シンナミル化合物（桂皮化合物）に分類され、リグニンの由来毎に特徴がある。

バニリル化合物はすべての種類のリグニンから検出される。

シリンジル化合物は、被子植物の木質および非木質リグニンから検出される。

シンナミル化合物は、裸子植物および被子植物の非木質（草本類）リグニンからのみ検出される。

p-ヒドロキシフェニル化合物は、被子植物の木質リグニンからは検出されないなどの特徴がある。

これらのことから、メタン発酵残さの酸化銅アルカリ分解によって生成したフェノール性化合物を分類ごとに整理してその消長を比較した。

フェノール性化合物の総生成量（図 4.1）は、メタン発酵の初期に増大する傾向を示した。このことは、リグニンが各種の植物体構成有機成分のなかでも相対的に安定であることを反映している。しかし、フェノール性化合物の生成量が最大に達した時期は発酵過程によって異なり、中温湿式過程では 15 日後、高温湿式および中温乾式過程では 30 日後、高温乾式過程では 45 日後に最大値に達した。遅く最大値に達した過程ほど、ピークでのフェノール性化合物の生成量は高かった。ピークに達した後は、いずれの発酵過程でもフェノール性化合物の収量は減少したが、分解消失するのではなく、一定の収量に収束した。これは、リグニン成分のなかでも特に難分解性の部分が残されたことを示している。高温乾式過程で、45 日目のフェノール性化合物の生成量が最も高かったのは、その時期までリグニン以外の成分が活発に分解されたことを示している。

バニリル化合物はすべての種類のリグニンに含まれている一般的なフェノール性化合物である。バニリル化合物の生成量（図 4.2）も、高温乾式過程で最も多く、30 日目から 45 日目にかけてピークを示した。高温湿式過程でのバニリル化合物の生成量は、高温湿式過程の次に多かった。高温でのメタン発酵は有機物の分解がより活発に進行すると考えられることから、フェノール性化合物の生成量の増加は、リグニン以外の成分が分解されて減少したことの反映と考えられる。

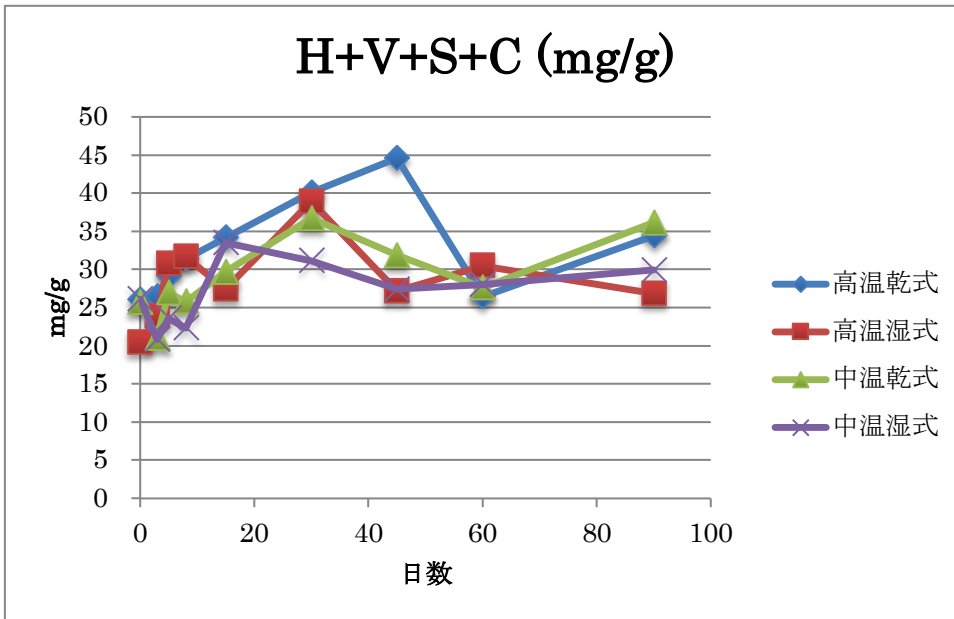


図 4.1 フェノール性化合物の総生成量

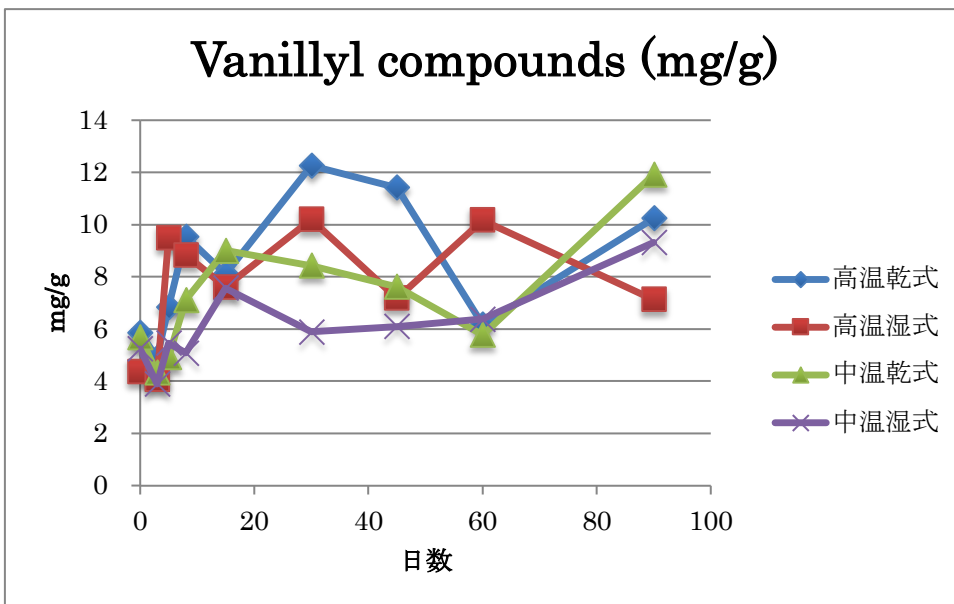


図 4.2 バニリル化合物の総生成量

シリンジル化合物は、被子植物のリグニンのみから生成する。乳牛ふん尿のメタン発酵においては、牧草やわらを与えた乳牛のふんと敷き藁が主な発酵の原料であるから、シリンジル化合物が多く生成することは当然である。シリンジル化合物の総生成量（図 4.3）は、各種のフェノール性化合物の中で最も多かった。また、高温乾式過程における生成量が最も多く、45 日目にピークを示したが、その他の発酵過程におけるシリンジル化合物の消長はほぼ類似していた。このことも特に高温乾式過程において有機物の分解が活発に進行したことを示唆している。

シンナミル（桂皮）化合物は、非木質リグニンからのみ生成するフェノール性化合物である。乳牛は非木質の草本を主なえさとして与えられているから、そのふん尿のメタン発酵残さからはシンナミル化合物が多く検出されるはずである。シンナミル化合物の総生成量（図 4.4）においては、他のフェノール性化合物における傾向と異なり、高温乾式過程よりもその他のメタン発酵過程のほうがシンナミル化合物の生成量が多かった。生成量のピークはいずれも 30 日目に認められた。また、発酵初期にいったん減少し、30 日目にかけて再び増大した。これはシンナミル化合物が二重結合を伴う炭素数 3 個の側鎖を持っており、この側鎖が分解を受けやすいためと考えられる。そのため有機物分解が活発な発酵初期にシンナミル化合物自身も分解を受け、その後リグニン以外の成分の分解に伴いシンナミル化合物の割合は増大するものの、有機物分解が最も活発な高温乾式過程においてはシンナミル化合物の分解も引き続き進行したため、その生成量が他の過程よりも少なくなったものと考えられる。

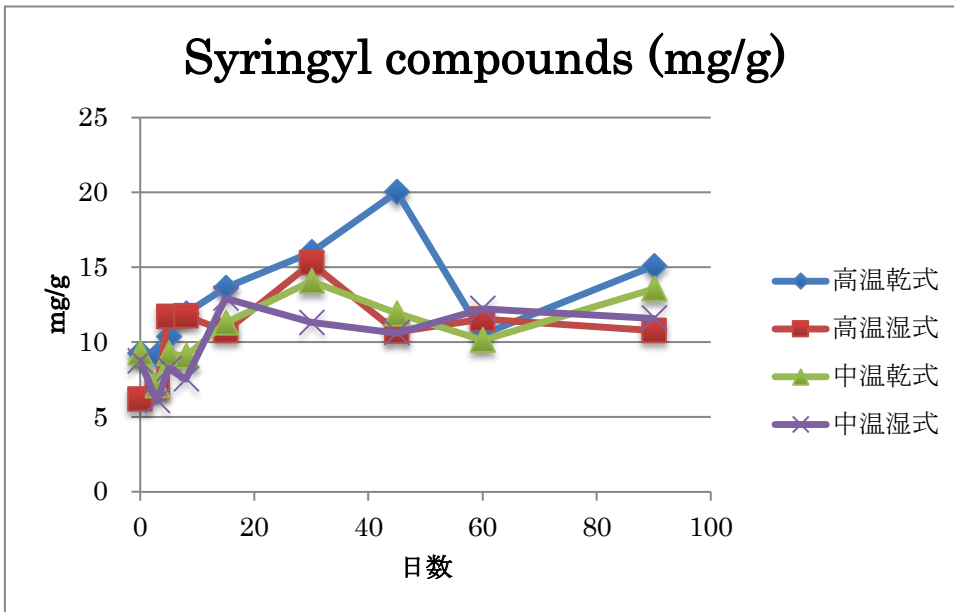


図 4.3 シリンジル化合物の総生成量

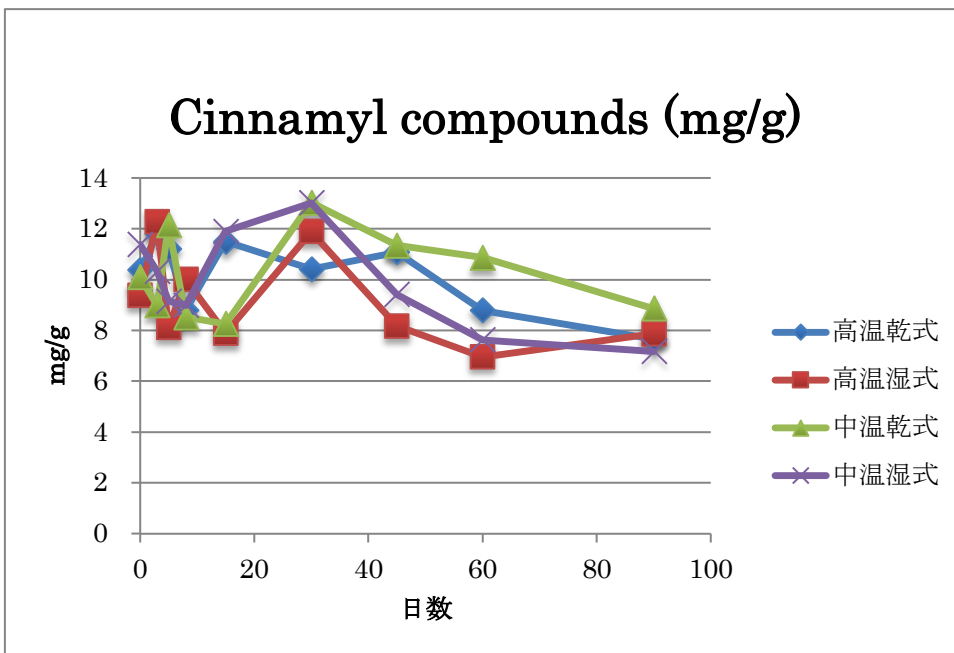


図 4.4 シンナミル（桂皮）化合物の総生成量

各種フェノール性化合物のバニリル化合物に対する生成量の比率を図 4.5 – 4.7 に示した。

p-ヒドロキシ化合物のバニリル化合物に対する比率 (図 4.5) は 0.1 – 0.3 と低かった。その中で、中温湿式過程のみが他の過程より高い比率を示し、また 60 日目まで増加しつづけ、60 日目にピークを示した。

その他の過程では比率が 0.15 前後で、メタン発酵のインキュベーション期間を通じて変化に乏しく、また、よく似た値を示した。

シリンジル化合物のバニリル化合物に対する比率 (図 4.6) は 1.5 前後であり、p-ヒドロキシフェニル化合物の場合と比べて非常に高かった。また、メタン発酵のインキュベーション期間を通じて変化に乏しかった。各種のメタン発酵過程の中では中温湿式過程でその比率が最も高かった。

この傾向は、p-ヒドロキシフェニル化合物の場合と同様であった。

シンナミル (桂皮) 化合物のバニリル化合物に対する比率 (図 4.7) は、初期に 2~3 と非常に高かったが、メタン発酵の初期に急激に減少する傾向を示した。また 30 日目には中温湿式過程でその比率が最も高くなり、60 日目には中温乾式過程で比率が最も高くなった。

中温湿式過程では、p-ヒドロキシフェニル化合物やシリンジル化合物の比率も高かった。これは、中温湿式および中温乾式過程において、リグニン構造の分解があまりおこらなかったことを示している。

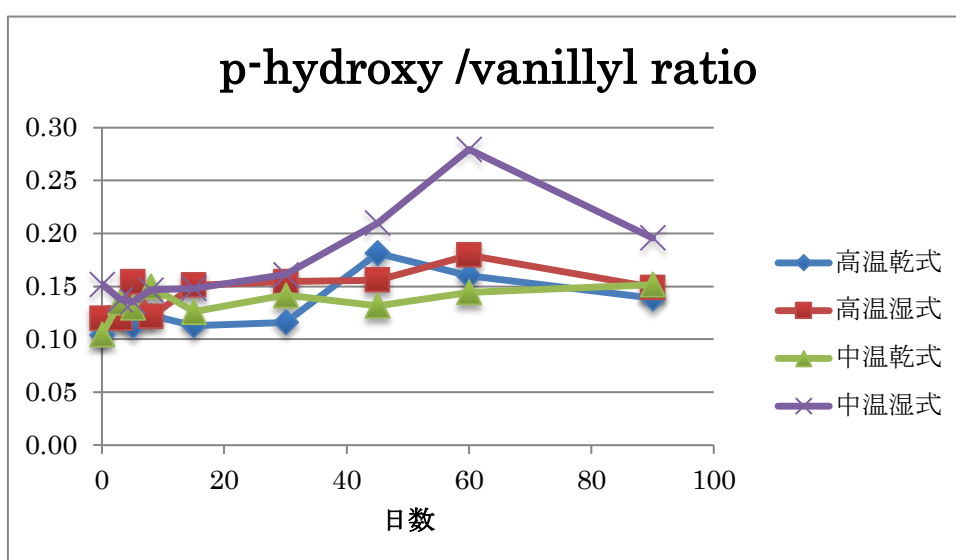


図 4.5 p-ヒドロキシフェニル化合物のバニリル化合物に対する比率

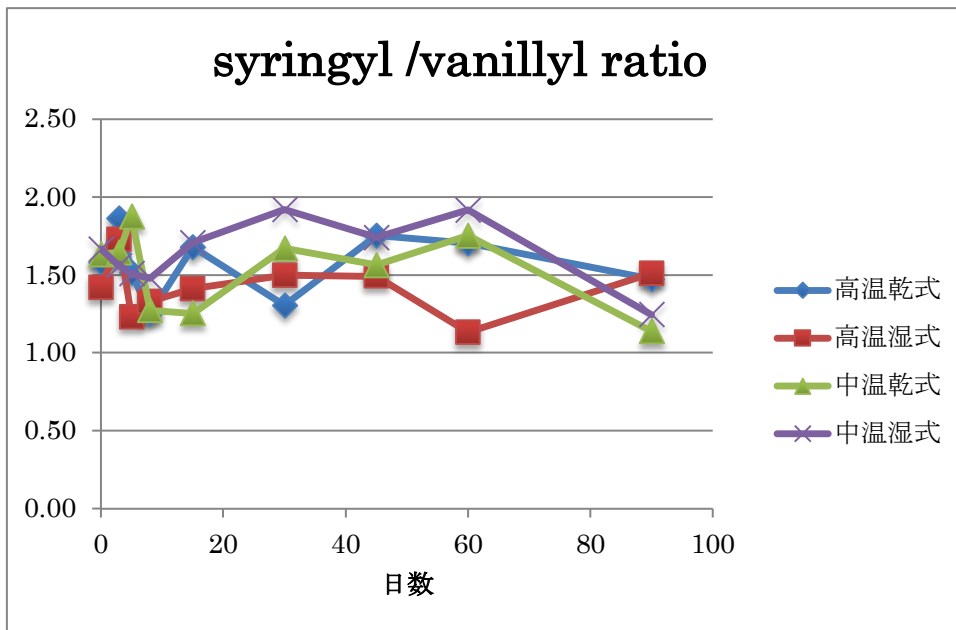


図 4.6 シリンジル化合物のバニリル化合物に対する比率

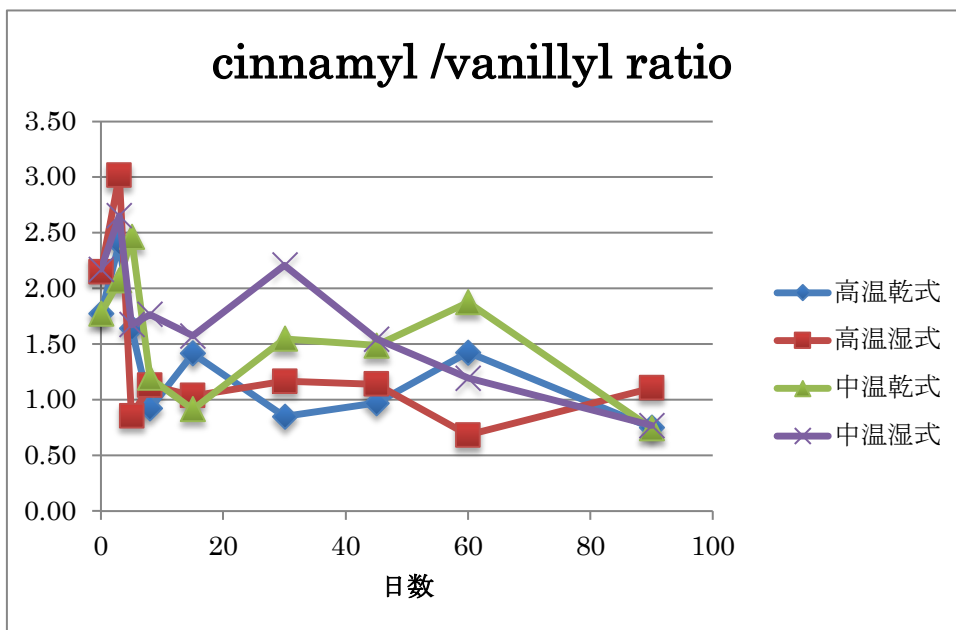


図 4.7 シンナミル（桂皮）化合物のバニリル化合物に対する比率

第4章 まとめ

脂質中の C14 – C18 飽和脂肪酸は非常に安定であり、とくに中温・乾式過程においてはほとんど減少せず、メタン発酵のインキュベーション期間を通じて増大しつづけた。中温・乾式以外の発酵過程では、脂質以外の易分解性成分の急激な分解が起こるとともに一旦増加したが、その後は減少していた。特に高温湿式過程で減少が速く進行した。高温乾式過程では 45 日目頃までは飽和脂肪酸の生成量が高かったが、それ以降は低いレベルまで減少した。

不飽和脂肪酸は飽和脂肪酸とは異なり速く分解が進行したが、初期から中期にかけての増加が伴っていた。これは不飽和脂肪酸の一部が微生物によって生産されたためと考察した。

糖組成は、高温湿式および中温湿式メタン発酵過程で炭水化物の分解が最も早く進行することを示した。中温乾式過程では炭水化物の分解が最も遅かった。高温乾式過程では中温乾式と高温湿式の間で分解が進行していた。ヘミセルロースを構成するキシロースおよびアラビノースはメタン発酵のインキュベーションの初期に著しく増大した。グルコースは安定なセルロース中にも易分解性の炭水化物にも多量に含まれる。易分解性の炭水化物はインキュベーション初期に急速に分解を受けるため、グルコースはキシロースのような増大傾向を示さず、その後はセルロースの難分解性を反映してあまり減少しなかった。

乳牛ふん尿メタン発酵残渣の酸化銅アルカリ分解によって生成するフェノール性化合物は、被子植物、非木本の牧草やワラに含まれるリグニンに由来することから、シリンジル化合物およびシンナミル（桂皮）化合物の割合が高かった。フェノール性化合物はフェノールの種類毎に特徴的な変化を示した。リグニン構造は比較的安定なことから、メタン発酵のインキュベーション初期に増大しその後はあまり減少しなかった。しかしシンナミル（桂皮）化合物は分解を受けやすいことから、インキュベーション初期に減少した。また、中温乾式および中温湿式でのメタン発酵過程ではリグニンの分解が遅れ、乾式あるいは湿式に関わらず高温発酵の方がリグニンの分解に有利であることが示された。