

日本腐植物質学会2014年度東京大会

2014 11/22

# 牛ふんメタン発酵残渣中の 中性糖および脂肪酸組成 定量法の改良

筒木 潔 (帯広畜産大学)

保井聖一 (株式会社ズコーシャ)

# 研究発表の経過

- \* バイオガスおよび揮発性脂肪酸の生成量  
日本土壌肥料学会2013年度名古屋大会
- \* 第2報：近似分析および元素分析  
日本土壌肥料学会北海道支部2013年度秋季大会
- \* 第3報：腐植組成  
日本腐植物質学会2013年度佐賀大会
- \* 第4報：脂肪酸組成  
日本土壌肥料学会2014年度東京大会

# 試験方法

## 1. 試験区 (3反復: バッチ式)

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

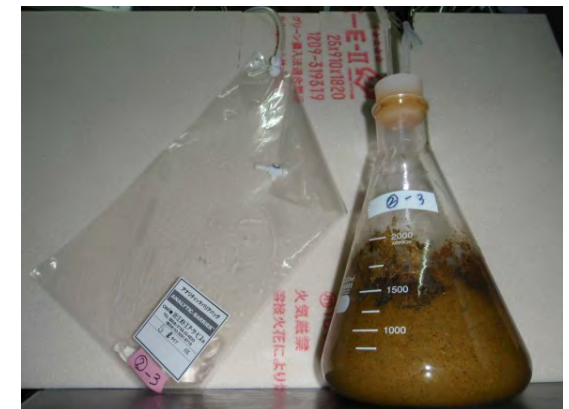
## 2. 原料投入割合

乳牛ふん尿8 : 種汚泥(消化液)2

## 3. サンプルング

試験開始: 平成24年9月24日

試料採取: 0、3、5、8、15、30、45、60、90日後



# 脂質画分分析方法

メタン発酵残渣（凍結乾燥後）1 g

HClメタノール  
直接メチル化

エーテル 30 mL  
室温で24時間抽出

ガラスフィルター(G2)で  
ろ過

エーテル 15 mLで  
2回洗浄

TMAHメチル化

残渣

抽出液

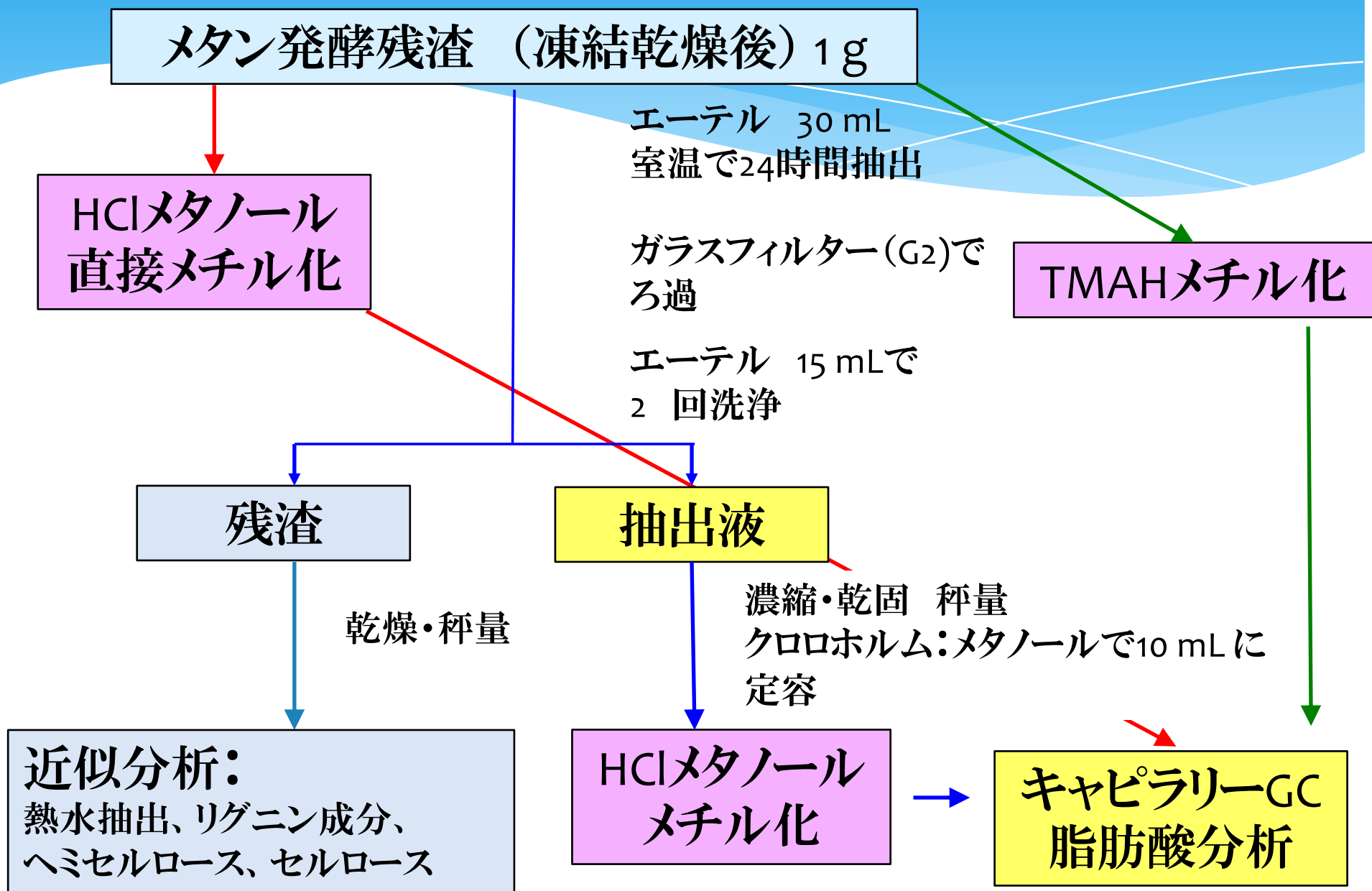
乾燥・秤量

濃縮・乾固 秤量  
クロロホルム:メタノールで10 mLに  
定容

近似分析:  
熱水抽出、リグニン成分、  
ヘミセルロース、セルロース

HClメタノール  
メチル化

キャピラリーGC  
脂肪酸分析



# エーテル抽出画分のメチル化法

- \* **脂質画分抽出液** 10mLから1mLを窒素ガスで**乾固**。
  - トルエン 0.2 mL 添加
  - メタノール 1 mL 添加
  - ヘプタデカン(nC17)酸(内部標準) 10  $\mu$ g 添加
  - 1 N HCl メタノール 0.6 mL 添加
- \* 密栓し、オーブン中**45 °C**で**18時間保温静置**
  - 水1mLとエーテル2mLを添加、密栓して混合
  - 上部のエーテル相を採取し、エーテル2mLで再抽出
  - エーテル抽出部を窒素ガスで**乾固**
- \* **ヘキサン**100  $\mu$ Lに溶解
  - 1  $\mu$ Lを**キャピラリーガスクロ分析**

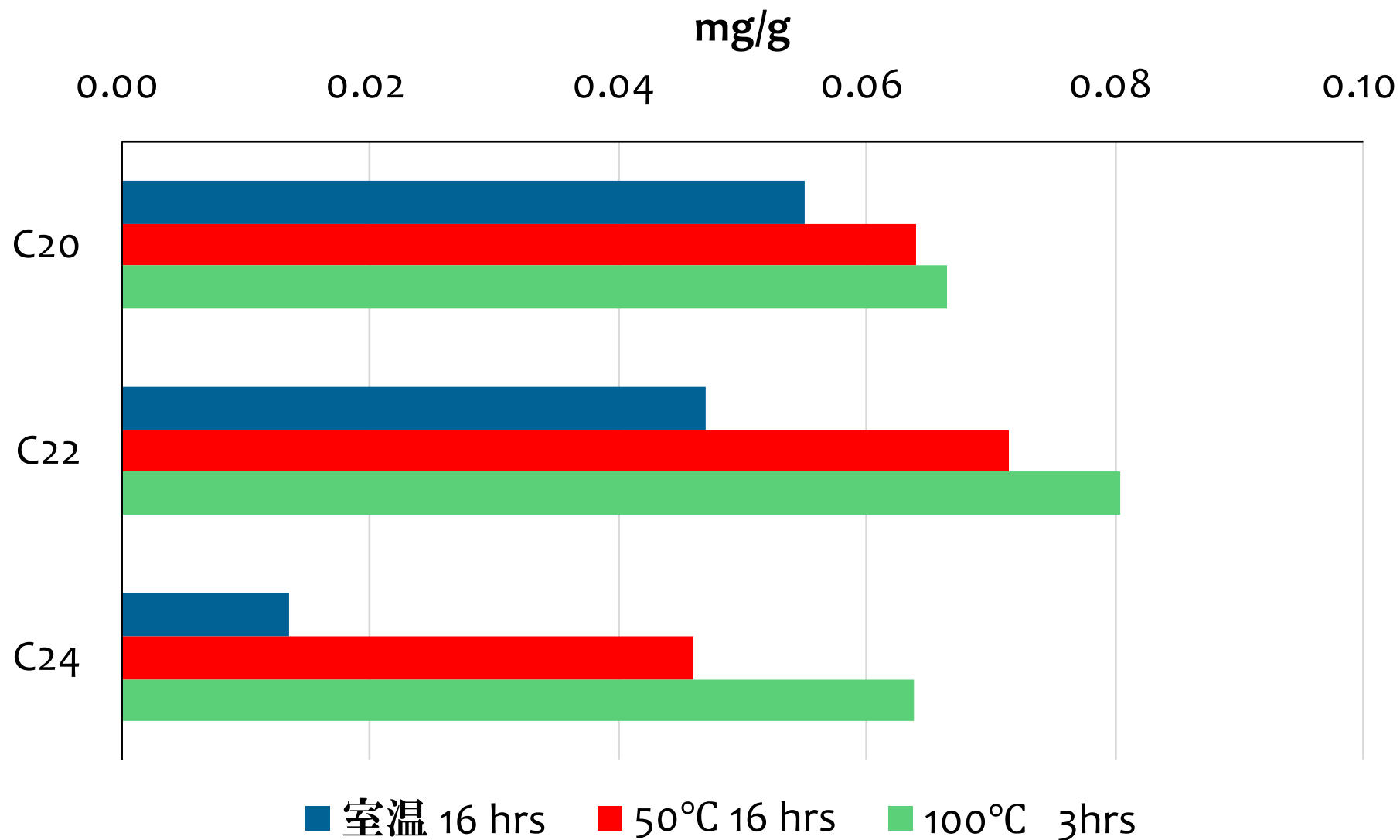
# メタン発酵残渣の直接メチル化法

- \* **メタン発酵残渣(凍結乾燥物)** 100mgをとる。
  - トルエン 0.2 mL
  - メタノール 1.0 mL
  - ヘプタデカン(nC<sub>17</sub>)酸(内部標準) 10 μg 添加
  - 1 N HCl メタノール 1.0 mL 添加
- \* 密栓し、オーブン中**45 °C**で**18時間保温静置**
  - 水1mLとヘキサン2mLを添加し、遠心分離
  - 上澄み 2mLをパスツールピペットで採取
  - 窒素ガスで**乾固**
- \* **ヘキサン**100μl に溶解
  - 1 μLを**キャピラリーガスクロ分析**

# Tetramethyl ammonium hydroxide によるメチル化法

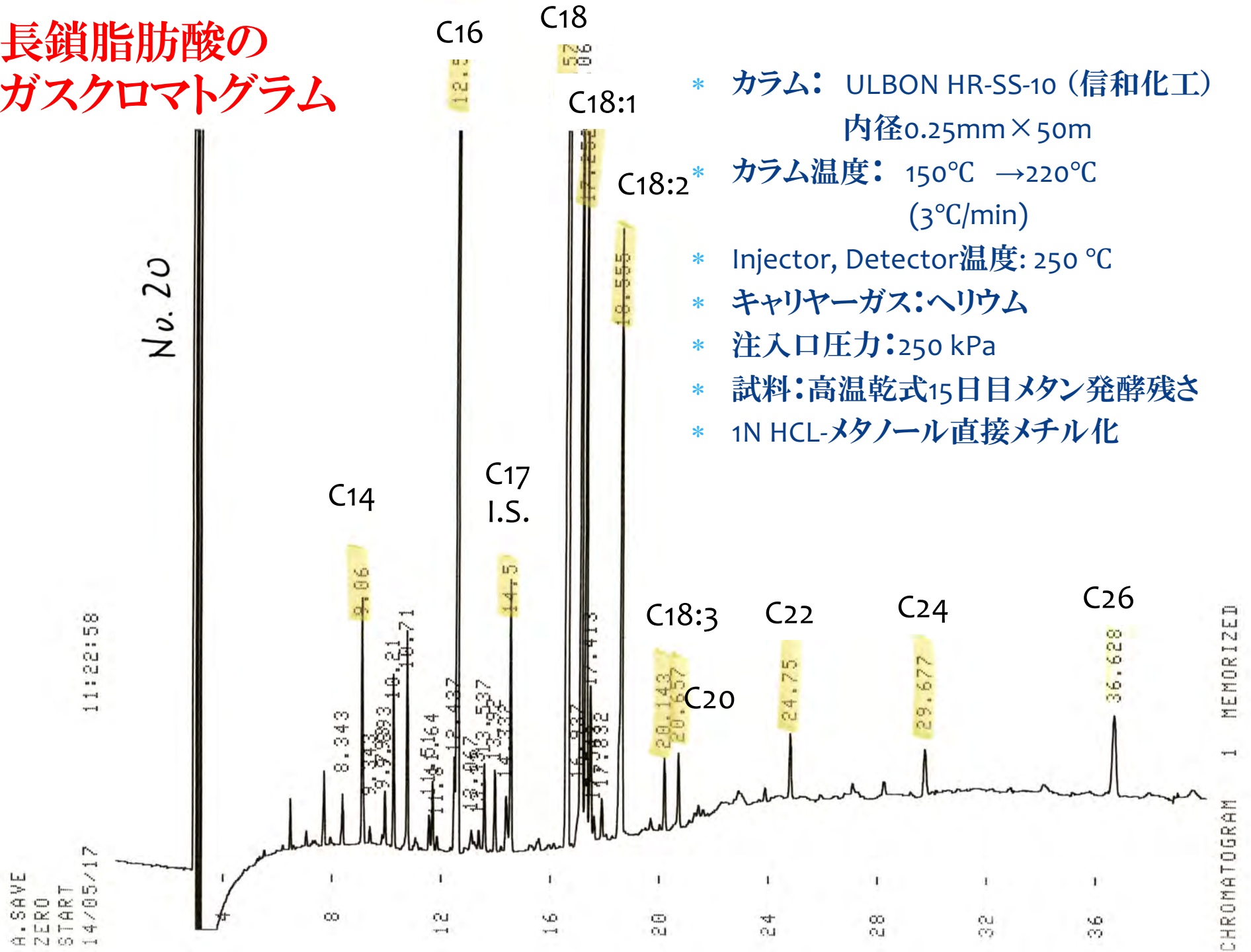
- \* **メタン発酵残渣(凍結乾燥物)** 30 – 40 mgをとる。
  - トルエン 0.2 mL
  - ヘキサン 2.0 mL
  - ヘプタデカン(nC<sub>17</sub>)酸(内部標準) 10 µg 添加
  - 0.2 M TMAH メタノール溶液 0.5 mL 添加
- \* 密栓し、アルミブロックヒーター上**100 °Cで3時間加熱**  
さらに**ヘキサン**2mLを添加し、混合後15分静置  
上澄み 3mLをパスツールピペットで採取  
窒素ガスで**乾固**
- \* **ヘキサン**200µl に溶解  
→ 1 µLを**キャピラリーガスクロ分析**

# TMAHメチル化条件の検討(C20 - 24 飽和脂肪酸)

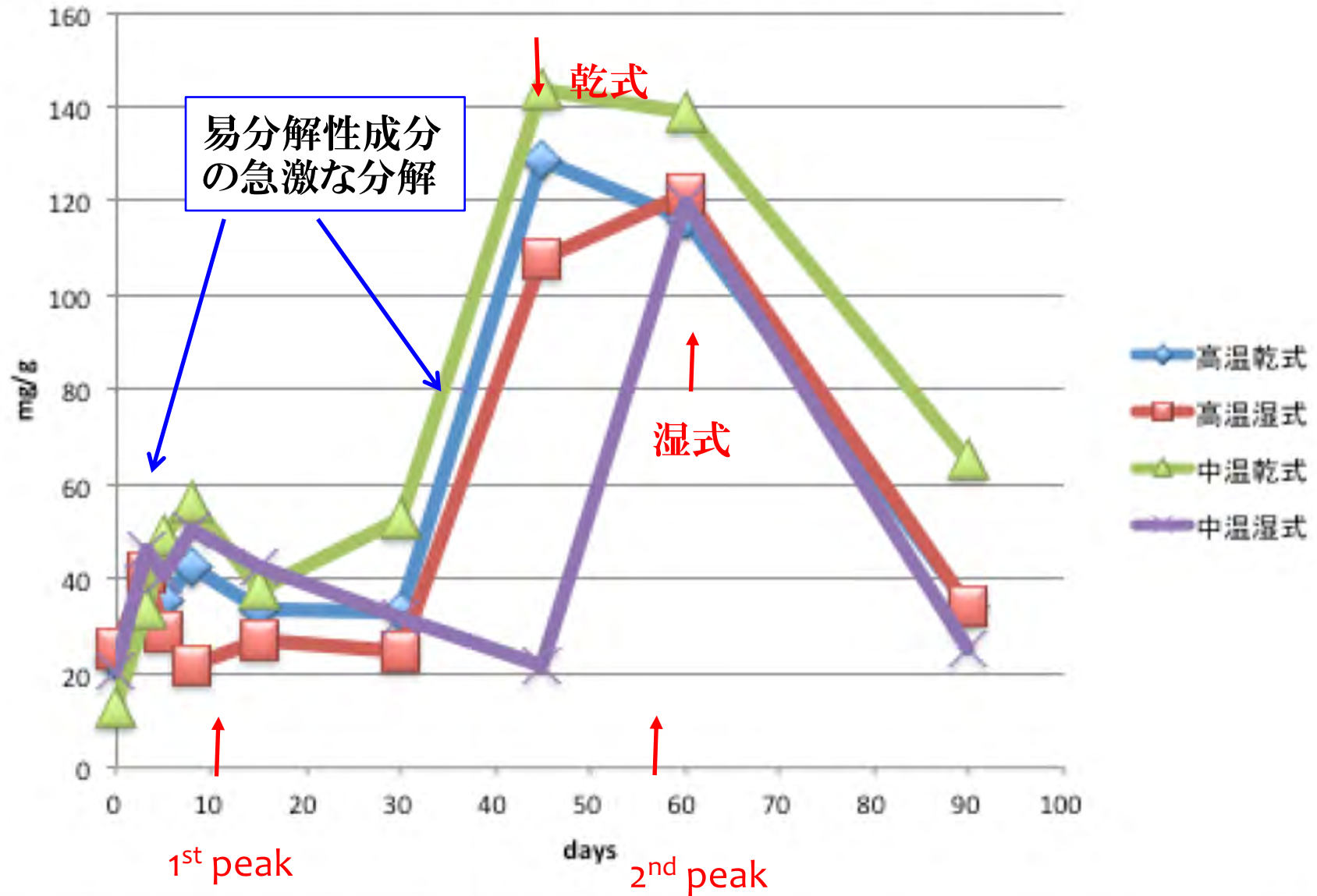




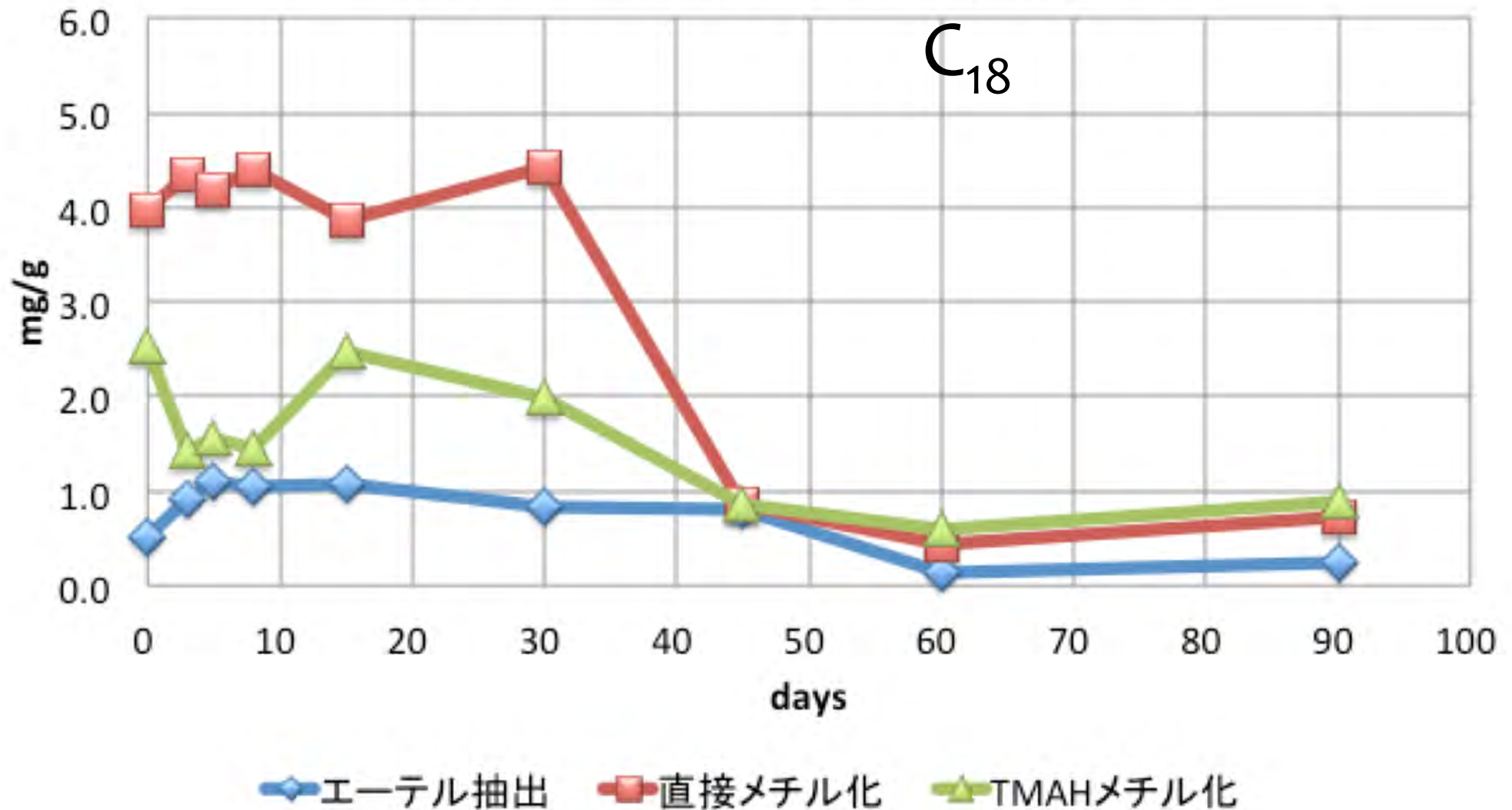
# 長鎖脂肪酸の ガスクロマトグラム



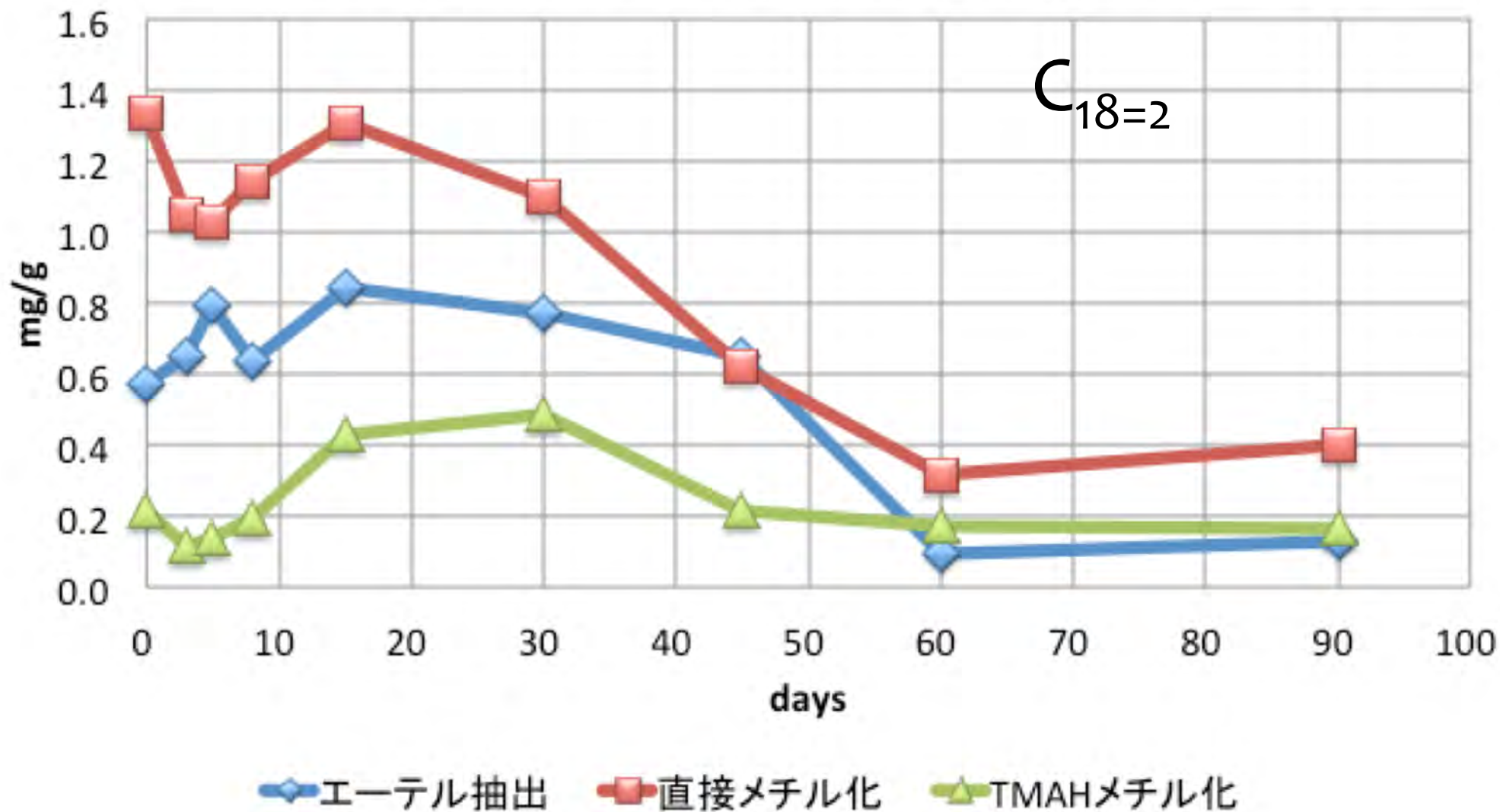
# エーテル抽出脂質含有率 (mg/g)



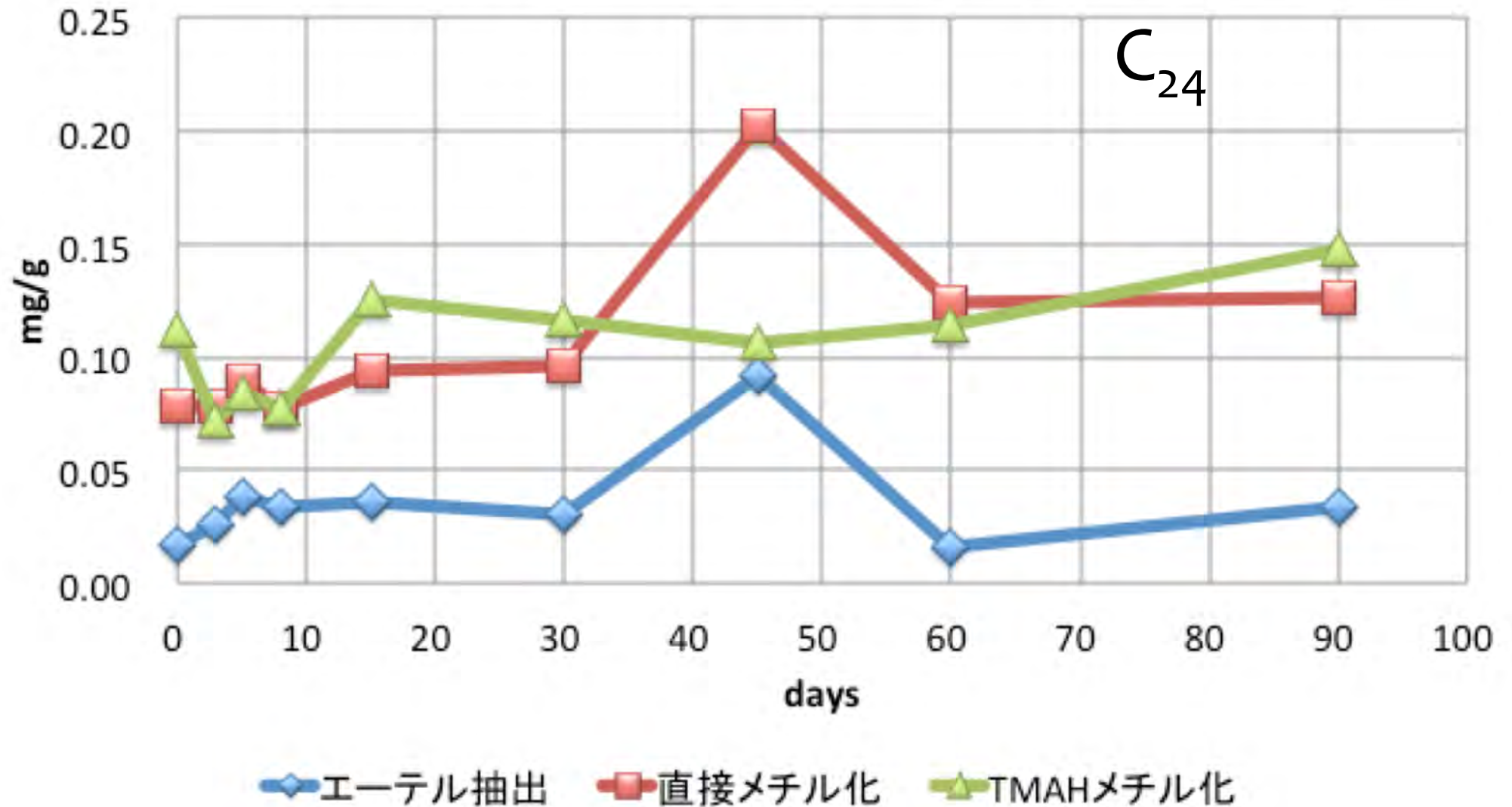
# 高温乾式発酵におけるステアリン酸の変化



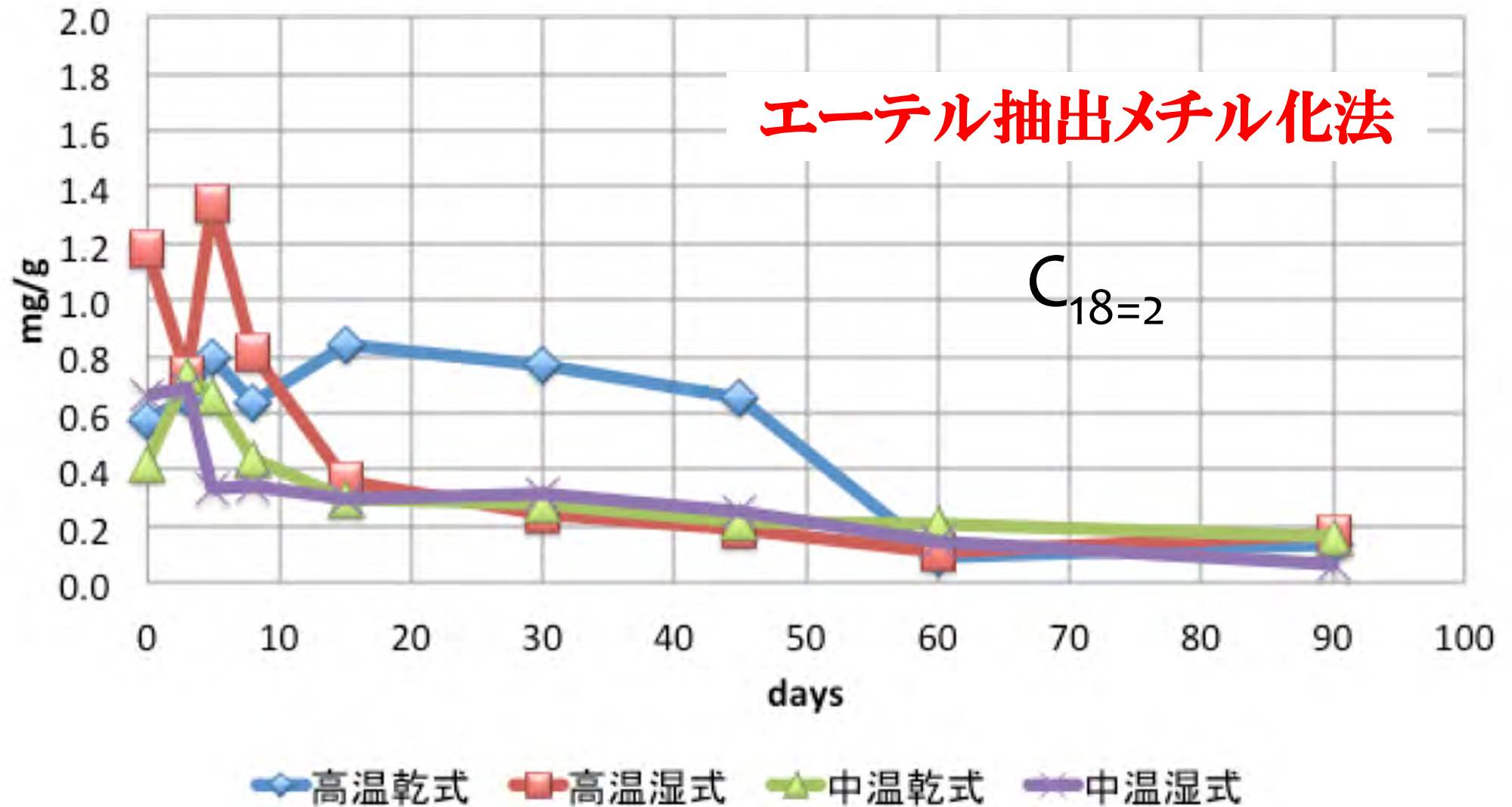
# 高温乾式発酵におけるリノール酸の変化



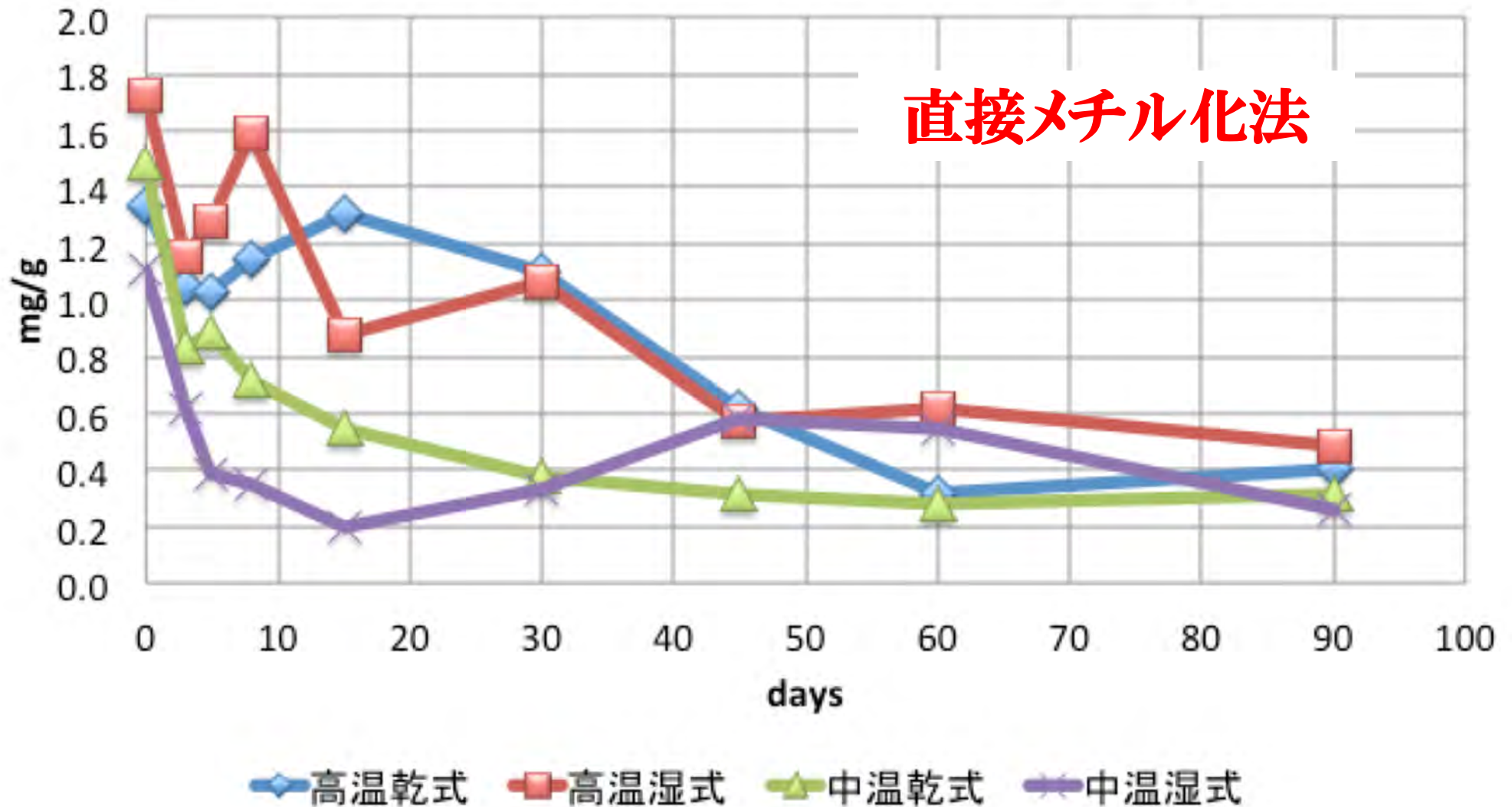
# 高温乾式発酵におけるリグノセリン酸の変化



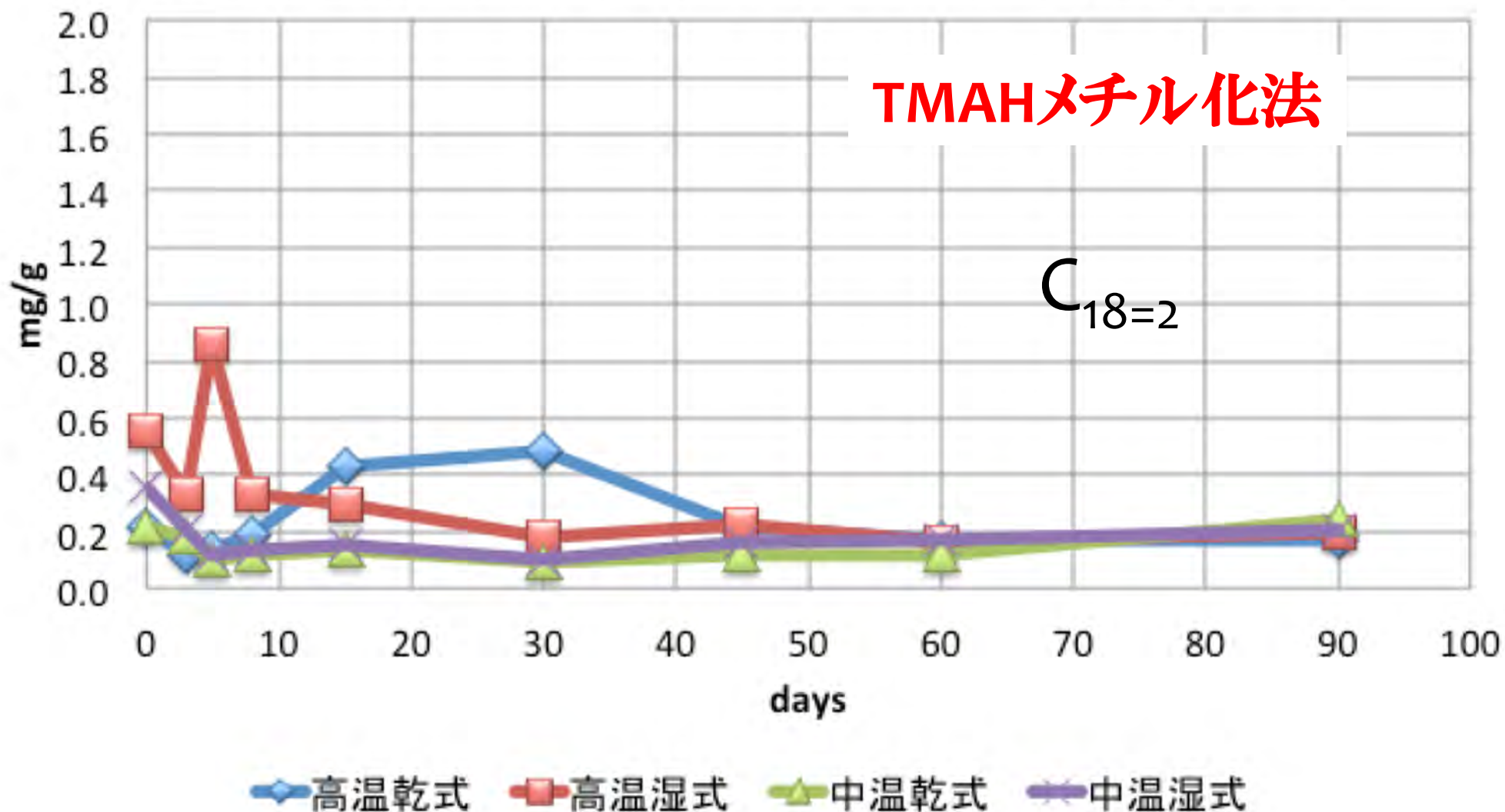
# 各種発酵様式におけるリノール酸の変化



# 各種発酵様式におけるリノール酸の変化

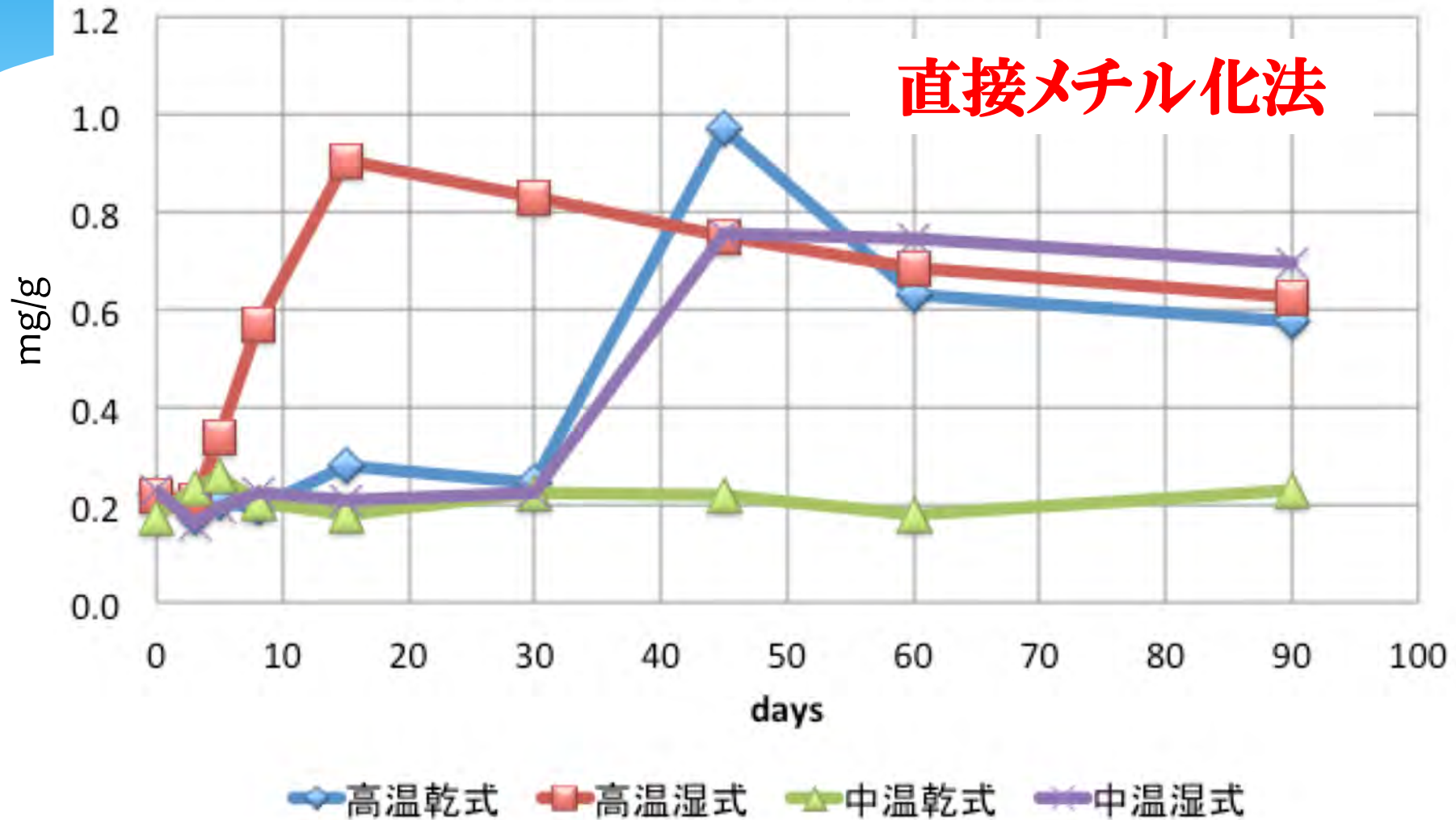


# 各種発酵様式におけるリノール酸の変化



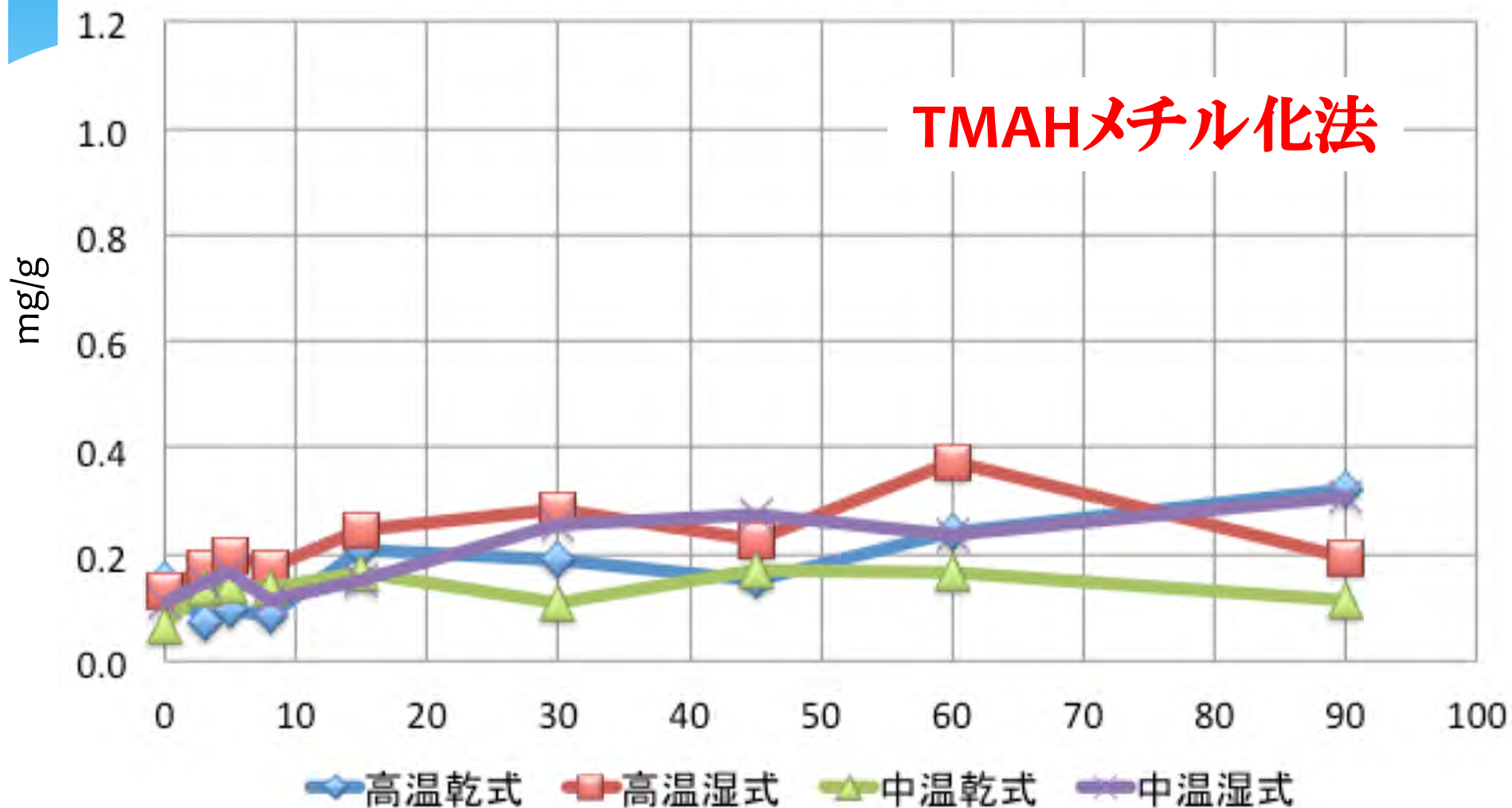


# 各種発酵過程におけるセロチン酸 (nC26) の変化



# 各種発酵過程におけるセロチン酸 (nC<sub>26</sub>) の変化

TMAHメチル化法



# 脂肪酸分析まとめ

- \* メタン発酵残渣からの飽和脂肪酸の収率は、  
HCl-メタノール直接メチル化 > TMAH直接メチル化 >  
エーテル抽出メチル化の順に減少した。
- \* 不飽和脂肪酸の収率はTMAH直接メチル化法で最も低かった。
- \* 各種脂肪酸の変化は、メタン発酵の様式によって大きく異なった。特に長鎖脂肪酸(C20-C26)の変化を調べるためにはHCl-メタノール直接メチル化法が適していた。

# 中性糖組成分析法の改良

メタン発酵残渣 (凍結乾燥後) 15 – 20 mg

## 筒木の従来法

硫酸による分解  
XAD-7HPで脱色  
Ba(OH)<sub>2</sub>で中和  
ろ過

28% アンモニア 0.3 mL、  
NaBH<sub>4</sub> 50mg、室温18時間  
2.5%酢酸でNaBH<sub>4</sub>を分解  
Dowex HCR W2 H<sup>+</sup>型カラム通過  
酢酸:メタノール(1:10) 減圧濃縮  
乾固2回、メタノール1回  
無水酢酸 2 mL+Nメチルイミダ  
ゾール 0.2 mL 2 hr 純水 5 mL

ジクロルメタン抽出  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で脱水

12 M 硫酸 125 μL 室温40 min  
1 M 硫酸 1.5 mL 100°C 3 hr  
ミオイノシトール 0.5 mg 添加  
28% アンモニア 0.3 mLで中和  
2-プロパノール 9 mL 添加  
遠心分離 10,000 rpm 10 min

Blakeneyら (1983)  
を参考とした。

本法での改良点

上澄液

## 濃縮乾固

2% NaBH<sub>4</sub> / DMSO 1 mL 40°C 2 hr

酢酸:メタノール(1:10) 10 mL

減圧濃縮乾固1回

無水酢酸 3 mL + Nメチルイミダゾール 0.3 mL

40°C 2 hr 純水 5 mL 添加 無水酢酸分解

エーテル抽出・2-プロパノールで水分除去

キャピラリーガスクロ分析

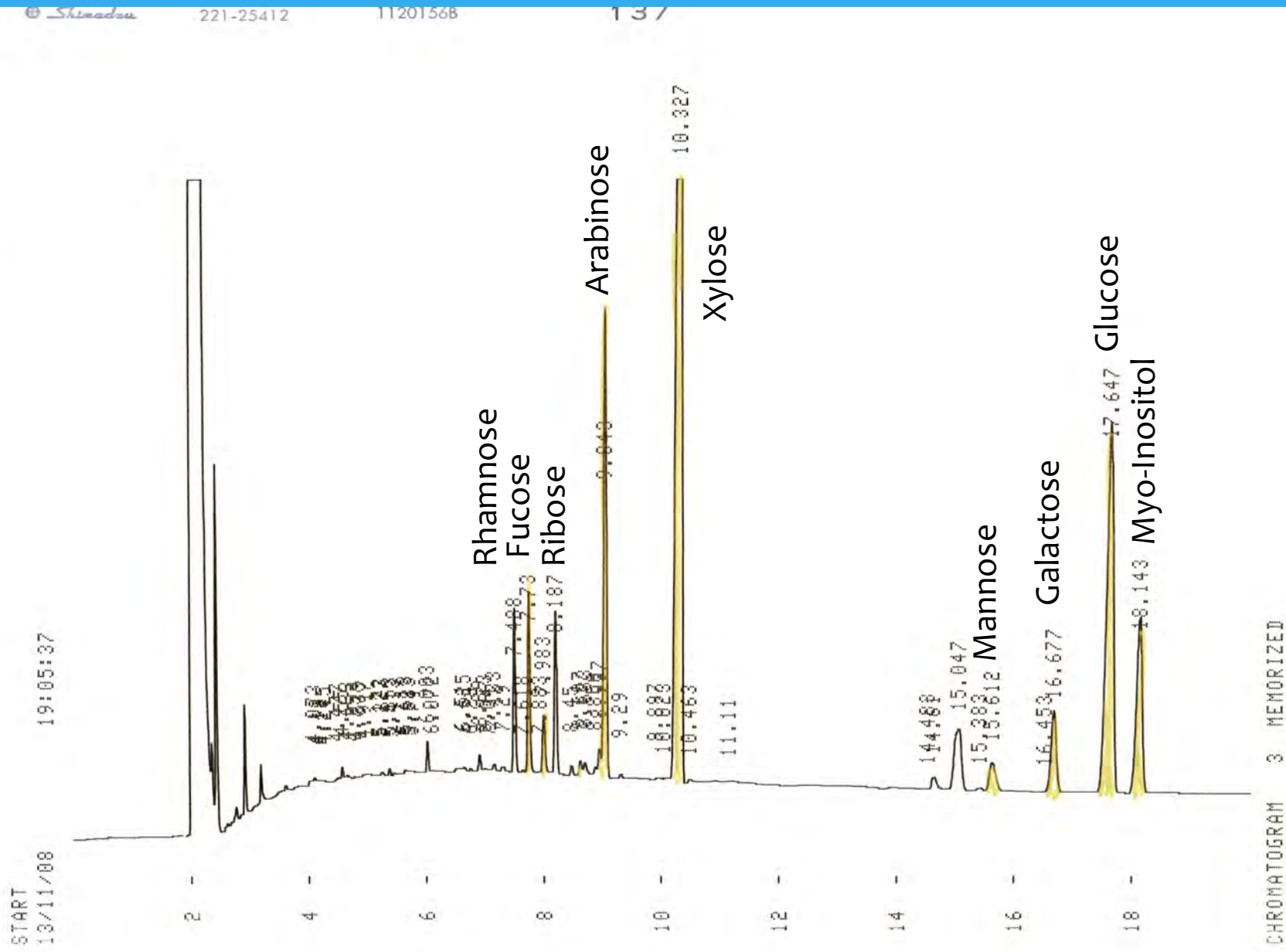
# キャピラリーガスクロによる中性糖分析の方法

- \* カラム: InertCap 225 (ジーエルサイエンス)  
内径 0.25mm × 30m 膜厚 0.25 μm
- \* カラム温度: 210°C → 240°C (5°C/min) 240°C 14 min
- \* Injector, Detector温度: 250 °C
- \* キャリヤーガス: ヘリウム
- \* 注入口圧力: 130 kPa

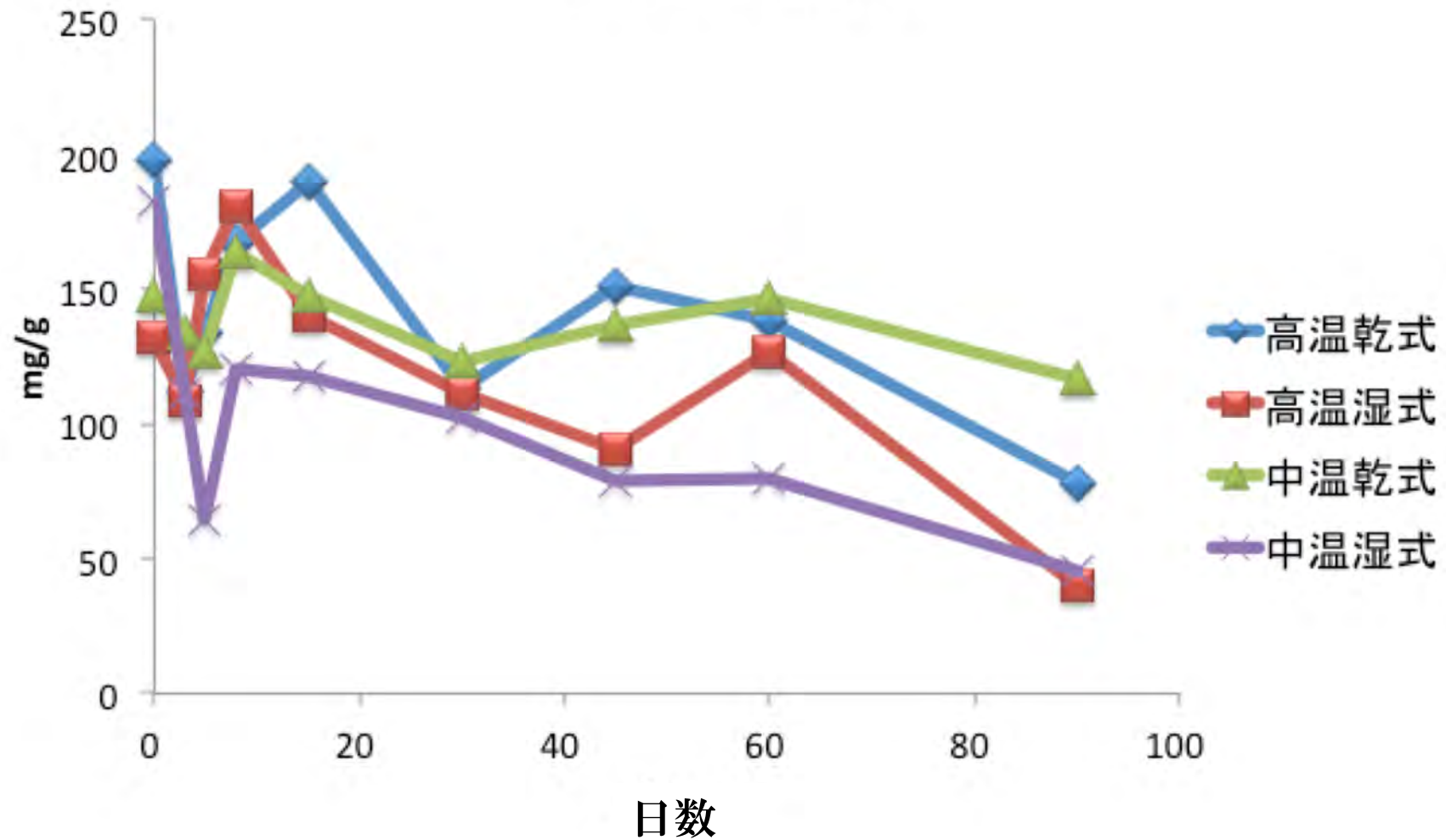


# 糖のガスクロマトグラム (中温乾式15日目)

No.18 1/8



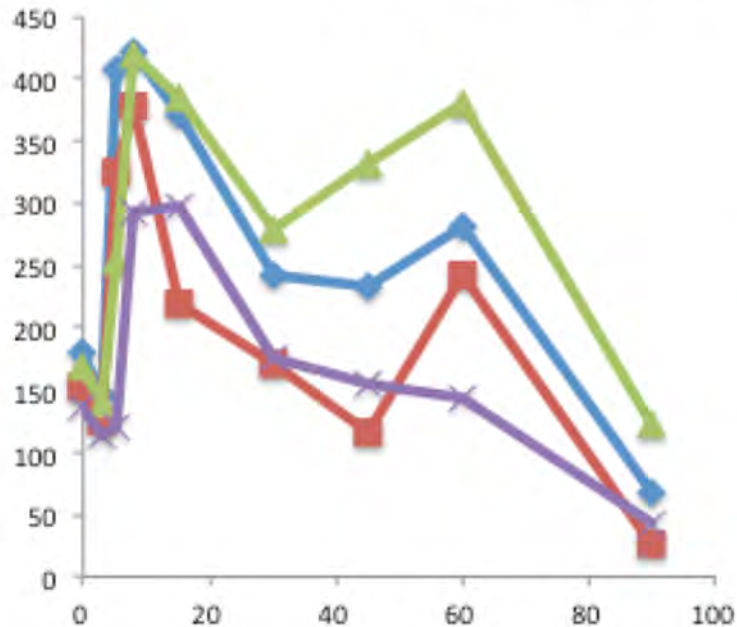
# 各種発酵様式におけるグルコースの消長



# ヘミセルロース糖の消長

mg/g

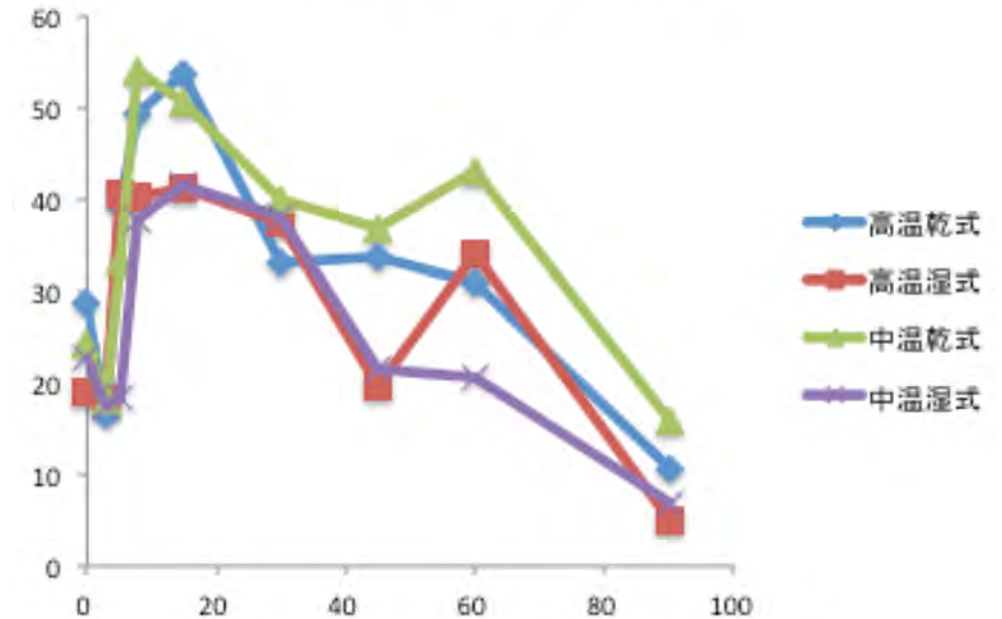
## キシロースの消長



日数

mg/g

## アラビノースの消長



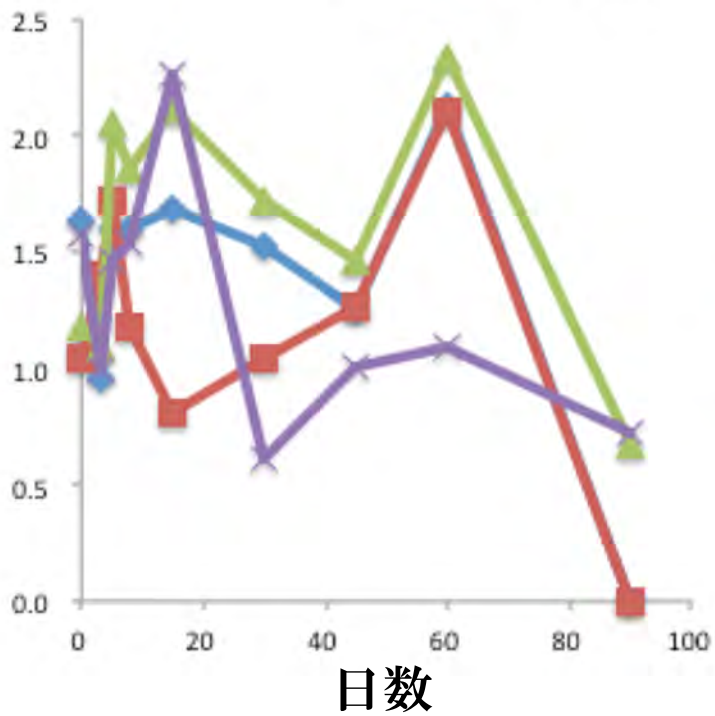
日数



# 微生物由来糖の消長

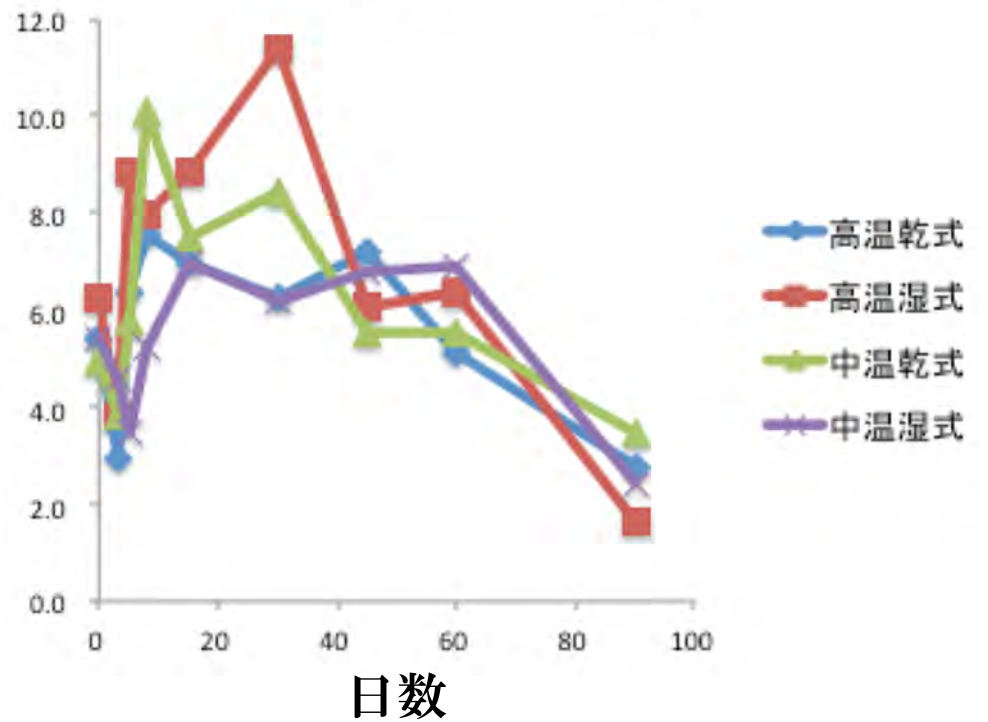
mg/g

## リボースの消長

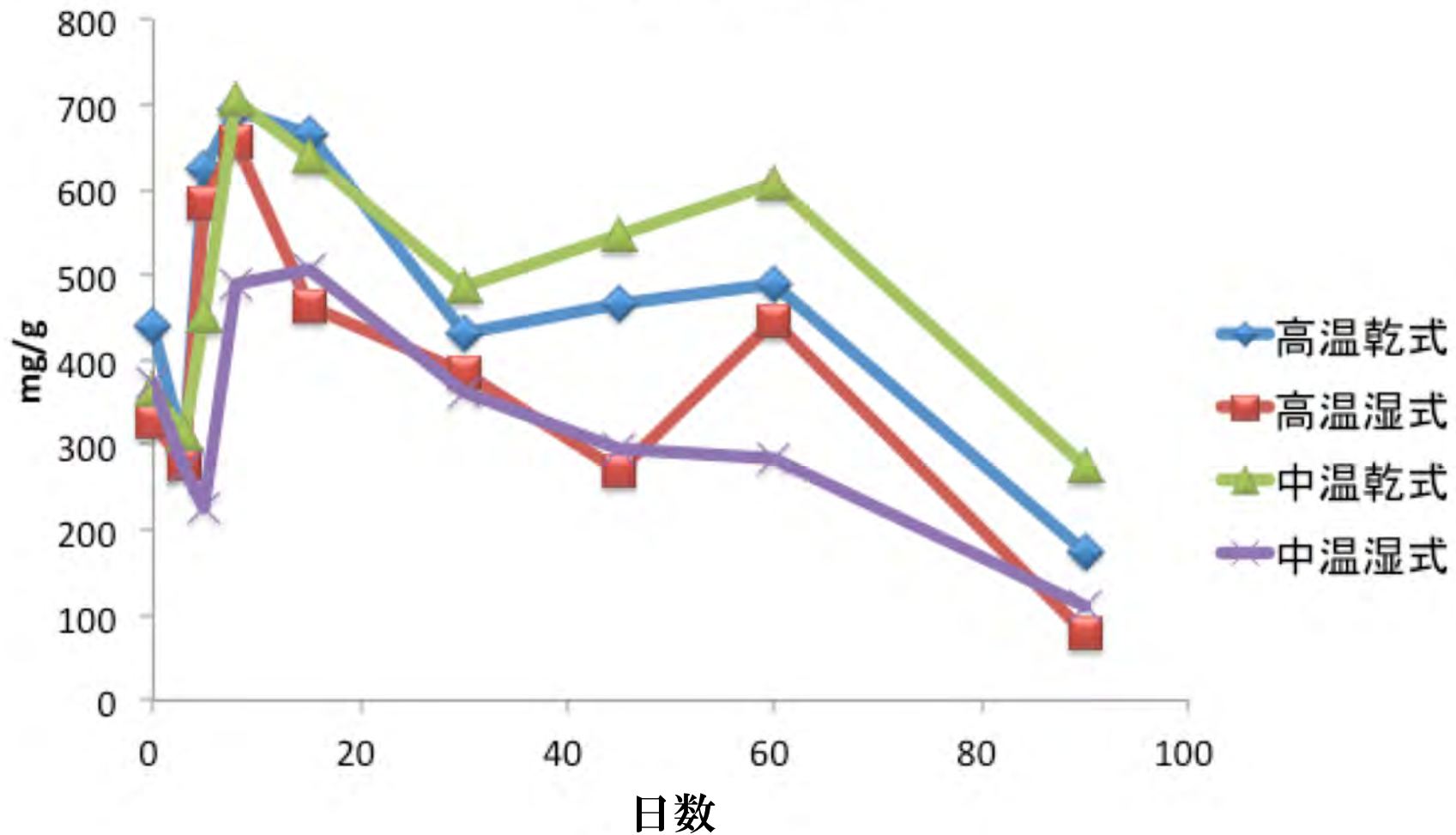


mg/g

## マンノースの消長



# 各種発酵様式における糖合計の消長



# 中性糖分析まとめ

- \* アルジトールアセテート分析において、**硫酸塩、ホウ酸塩、DMSO、水分の除去**は必要と考えられた。
- \* **2-プロパノール**の使用により、試料からの**水分、硫酸塩の除去**を効率的に行うことができた。
- \* **ホウ酸塩の除去**は**酢酸メタノール**による**メチル化と減圧乾固**により行った。
- \* **エーテル抽出**はジクロルメタンよりも**DMSOの除去**に効果的であった。
- \* **中性糖組成**は**メタン発酵の様式の違い**を良く反映した。