

平成 24 年度 新エネルギーベンチャー技術革新事業（バイオマス）

低水分乳牛糞尿の高速乾式メタン発酵システムによる高純度メタン製造の技術開発
発酵残渣の化学分析

帯広畜産大学 筒木 潔

I. 目的

家畜糞尿を農耕地で使用できる有用な肥料として資源化し、またエネルギーにも変換できる技術として、メタン発酵バイオガスプラントが脚光を浴び、普及されてきた。しかしこの技術は、主として乳牛や肉牛などの家畜をフリーストール形式で多数頭飼っている農家にのみ利用されてきた。さらにバイオガスプラントは大規模な設備であり、その導入には多額の資金が必要である。また、メタン発酵は嫌氣的なプロセスであり、家畜糞尿は液体状態で処理されるため、多量の消化液が発生する。消化液は有用な肥料として利用できるが、その散布には多大な労力が必要である。

北海道の酪農家の約 75%を占めるつなぎ飼い農家では、発生する糞尿は堆肥化する他なかったが、堆肥状態の糞尿でもメタン発酵に利用できることが保井ら(ズコーシャ)の研究により明らかとなった。この新しい乾式メタン発酵技術を応用した設備は、小規模なプラントとして設計できるため、導入コストを低く抑えられる。また、家畜糞尿からメタンとしてエネルギーを取り出した残渣は、安全で肥料としての価値の高い堆肥として農地に還元できる。発生する残渣の量も湿式メタン発酵と比べればはるかに少ない。

したがって、乾式メタン発酵技術を実用化することにより、今までエネルギーとして利用されてこなかった小規模経営の畜産農家から発生する家畜糞尿をエネルギーとして資源化することが可能になり、つなぎ飼い農家にとって福音となる。

本研究では、乾式メタン発酵技術を実用化する前の基礎研究として、発酵温度および乾式と湿式の違いがメタン発酵の進行にどのような影響を及ぼし、また発酵残渣が農地で利用できる安全な資材として変化しているかを解明した。

II. 試料および方法

室内実験による発酵条件の検討

以下の原料および種汚泥を5Lフラスコ中に所定量投入し、水分含量を調整したのち、以下の4種類の条件下で嫌気的な発酵を開始した。

発酵様式の詳細はズコーシャからの報告書を参照されたい。

原料

原料生糞： 士幌町山下牧場

種汚泥（消化液）

中温発酵用 中鹿追環境保全センター

高温発酵用 足寄新妻牧場

発酵様式

① 中温（38℃）湿式

原料水分 > 90% 種汚泥（消化液）混合割合 20%

② 中温（38℃）乾式

原料水分 < 85% 種汚泥（消化液）混合割合 20%

③ 高温（55℃）湿式

原料水分 > 90% 種汚泥（消化液）混合割合 20%

④ 高温（55℃）乾式

原料水分 < 85% 種汚泥（消化液）混合割合 20%

試料採取

9月24日 発酵開始、9月27日（3日目）、
9月29日（5日目）、10月2日（8日目）、
10月9日（15日目）、10月24日（30日目）、
11月8日（45日目）、11月23日（60日目）、12月23日（90日目）

分析方法

1) 揮発性脂肪酸（VFA）分析

- ① フリーザー中で冷凍保存しておいた試料を、4℃の冷蔵庫中に1晩静置し解凍した。
この試料約5gを各試料2連で50mL容高速遠心管中に0.01gの桁まで正確に計り取った。
- ② 純水20mLを加えて、遠心管にキャップをし、5分間振とうした。
- ③ 遠心管のバランスを取り、高速冷却遠心機で10000rpmで10分間、4℃以下で遠心分離した。

- ④ 上澄液を Advantec No.6 ろ紙でろ過しつつ、50 mL ガラスメスフラスコに移した。
- ⑤ さらに 10 mL ずつの純水で 2 回残渣を洗浄し、遠心分離し、上澄み液を Advantec No.6 ろ紙でろ過しつつ 50mL ガラスメスフラスコに移した。
- ⑥ 内部標準化合物として、2-エチル酪酸 (2000 ppm 水溶液)を 2.5 mL メスフラスコ中に添加した。
- ⑦ メスフラスコを純水で 50 mL にフィルアップした。
- ⑧ ここから 1 mL をマイクロピペットで採取しマイクロチューブ(2mL)に移し、トリフルオロ酢酸 0.1 mL を添加した。
- ⑨ 15000 rpm で 10 分間遠心分離した。
- ⑩ 上澄み液を 0.45 μ m セルロースアセテートメンブランフィルターユニット(Advantec DISMIC 13) でろ過した。
- ⑪ 1 μ L をガスクロマトグラフにインジェクトした。
- ⑫ 検量線は、酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸を 0~100 ppm の範囲で 20ppm 間隔で調製し測定した。
- ⑬ ガスクロマトグラフィーの条件は以下の通りである。

カラム : Stabilwax-DA, Restek Corporation, USA

(15 meter, 0.53 mm ID, 1 μ m df ワイドボアカラム)

Initial Temp. : 100 °C

Initial Time : 3 min

Prog. Rate 1 : 5 deg/min

Final Temp 1 : 140 °C

Final Time 1 : 0 min

Prog. Rate 2 : 20 deg/min

Final Temp 2 : 240 °C

Final Time 2 : 0 min

2) 発酵残渣水抽出液の成分

以下の分析は全て揮発性脂肪酸 VFA 抽出液を 15000rpm で 10 分間遠心分離したものについて行った。

- ① アンモニウム態窒素 : インドフェノール吸光光度法で測定した。

試料溶液 1 mL、インドフェノール緩衝液 3 mL、ニトロプルシッドサリチル酸ナトリウム溶液 0.4 mL、8 倍希釈次亜塩素酸ナトリウム溶液 0.5mL をこの順に混合し、650 nm の吸光度を測定した。アンモニウム態窒素の濃度が 0~4 ppm の範囲にはいるように検量線濃度および試料希釈率を調整した。

- ② 硝酸態窒素 HORIBA LAQUA twin 硝酸イオンメーターB-742型により測定した。

- ③ カリウムイオン HORIBA LAQUA twin カリウムイオンメーター B-731型により測定した。
- ④ 溶存有機態炭素：重クロム酸カリ-濃硫酸溶液酸化、吸光光度法により測定した。
- ⑤ 水溶性フェノール：フォルインチオカルトのフェノール試薬との反応により吸光光度法で測定した。
- ⑥ 紫外・可視部吸光度
水抽出液 0.5 mL に 0.1 N NaOH 2.0 mL を添加混合し、600, 500, 400, 300, 280 nm の吸光度を紫外可視分光光度計島津 UV-1240 型により測定した。

3) 元素分析およびアミノ酸分析

揮発性脂肪酸抽出用に取り分けた試料の残り約 40 g を 500mL ナス型フラスコに移し、凍結乾燥した。乾燥後に重量を測定し、試料中の水分を計算により求めた。乾燥した残渣はミニブレンダーで粉碎し、試料ビン中に密閉し、デシケータ中で保存した。この試料の一部を、北海道大学創成研究機構共通機器管理センター元素分析室およびアミノ酸分析室に送付し、元素組成およびアミノ酸組成の分析を依頼した。

3) 近似分析

脂質画分、熱水抽出画分、リグニン画分、ヘミセルロース画分、セルロース画分、灰分を順次溶解ないし分解法により測定した。

① 脂質画分

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計り取った。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。

② 熱水抽出画分

エーテル抽出後の試料を、ガラス濾過器ごと 100 mL のガラスビーカー中に入れ、純水をろ過器の内部と外部ともに水面がろ過器の高さの 7 割程度に達するまで加えた。これをホットプレート上に置き、穏やかにふっとうさせながら 1 時間加熱した。放冷し、抽出液は吸引濾過した。吸引濾過した残渣は再び熱水で 1 時間加熱したのち、吸引濾過した。吸引濾過した残渣はガラス濾過器ごと 50℃で 1 晩乾燥したのち、真空デシケータ

に移し、さらに1晩真空乾燥したのち重量を測定した。抽出前後の重量の差し引きにより、熱水抽出画分の重量を求めた。

③ リグニン画分

熱水抽出後の残渣をガラス濾過器ごと 100 mL ガラスビーカー中に移し、50 mL の純水を添加した。これに 10% 酢酸 3 mL と亜塩素酸ナトリウム 1.0 g を添加し、ホットプレート上で約 75 °C で1時間加熱後、さらに 10% 酢酸 3 mL と亜塩素酸 1.0 g を添加し、75°C で2時間加熱した。放冷後、試料は吸引濾過し、残渣は水で5回、アセトンで2回、エーテルで1回吸引洗浄し、ドラフト中で乾燥後、50°C の乾燥機中で1晩乾燥させ、さらに真空デシケータ中で1晩乾燥させてから重量を測定した。処理前後の重量変化からリグニン含量を計算した。

④ ヘミセルロース

リグニン抽出残渣をガラス濾過器ごと 100 mL のガラスビーカー中に入れ、24 % の KOH 40 mL を添加し、ガラス棒で残渣をほぐした後室温で2時間静置した。KOH 処理後、吸引濾過し、残渣は純水で5回、5% 酢酸で1回、水で1回、アセトンで1回、エーテルで1回洗浄しろ過した。ドラフト中で乾燥後、50°C の乾燥機中で1晩乾燥させ、さらに真空デシケータ中で1晩乾燥させてから重量を測定した。処理前後の重量変化からヘミセルロース含量を計算した。

⑤ セルロース

ヘミセルロースを除去した残渣の一部を正確に磁製ルツボ中に計り取り、550°C で1晩灰化後、灰分含量を求めた。灰分を残渣重量から差し引きしてセルロース含量を求めた。

4) 腐植組成

① 0.1 N NaOH 抽出

凍結乾燥し粉碎したメタン発酵残渣 250 mg を正確に 50 mL 高速用遠心管中に計り取った。これに 0.1 N NaOH 溶液 30 mL を添加し、窒素ガスで気相を置き換えたのち蓋をし、4時間振とうした。その後 6000 rpm で20分間遠心分離した。

上澄液は静かに別の遠心管に移し、有機炭素濃度測定および紫外可視部吸光度測定用に 2.0 mL をマイクロチューブに取りわけて、さらに 15,000 rpm で10分間遠心分離した。

② 腐植酸（フミン酸）の分離

0.1 N NaOH 抽出液に濃硫酸 0.2 mL を添加して腐植酸を沈殿させた。1晩静置後 6000 rpm で10分遠心分離した。上澄液は別の容器に移し、ここからフルボ酸画分の収率測定

のため 2mL を取り分けた。

③ 腐植酸（フミン酸）の溶解

遠心管中の沈殿部（腐植酸画分）は純水 30 mL で 2 回洗浄したのち、0.1N NaOH 25 mL を添加して溶解した。腐植酸溶液中の 1.0 mL は炭素の定量に、0.5 mL は紫外・可視部吸収スペクトルの測定に用いた。

④ XAD-8 樹脂によるフルボ酸の吸着

プラスチックカラムにあらかじめ 0.1 N NaOH および各種有機溶媒で洗浄した XAD-8 樹脂(Aldrich 社製 DAX-8) を 5 mL 充填した。これに未分画フルボ酸溶液を毎分 1 mL のスピードでペリスタポンプにより流した。フルボ酸溶液を負荷したのち、純水 50 mL でカラムを洗浄した。XAD-8 カラムに吸着したフルボ酸は、続いて 0.1 N NaOH を約 25 mL 流して溶離した。溶離した XAD-8 吸着フルボ酸の収量を重クロム酸カリ酸化-吸光光度法で測定し、紫外可視吸収スペクトルを 500 – 220 nm の範囲で測定した。

⑤ 重クロム酸カリウム酸化-吸光光度法による溶存有機炭素の定量

特級試薬重クロム酸カリウム 2.0 g を 500 mL の濃硫酸に溶解し、酸化試薬とした。検量線用の標準液としては、ショ糖 0.375 g を 500 mL の純水に溶解した溶液を、0.2 倍、0.4 倍、0.6 倍、0.8 倍、1.0 倍に希釈した。

試料溶液 1.00 mL をマイクロピペットで、10 mL 用ネジ栓付ガラス試験管中にとり、重クロム酸カリウム-硫酸溶液 2.0 mL を添加し、ネジ栓をした後ボルテックスミキサーでよく混合した。この試験管を 100 °C に調整したアルミブロックヒーター中で 30 分加熱した。その後、試験管は 50 °C に調整した恒温器中で 1 晩静置した。翌日、試験管を室温に放冷したのち、発色溶液を標準ディスポセルに移し、645 nm の吸光度を分光光度計で測定した。

III. 実験結果および考察

1. 発酵に伴う乾物率の変化

図1に、各種発酵過程における乾物率の変化を示した。

実験開始時における原料糞尿と消化液（種菌）混合物の乾物率は、乾式発酵では15～17%、湿式発酵では9.5～10%に調節した。

中温湿式発酵においては、発酵開始15日目までの乾物率の減少はわずかであったが、その後は乾物率の減少が進行し、90日目に5.7%まで減少した。高温湿式発酵では、発酵開始後5日間の間に乾物率7.5%まで急激に分解が進行し、5日目から15日目までは分解が停滞したのち、15日目以降は再びコンスタントに分解が進行し、90日目には約3.4%に達した。

中温乾式発酵では、発酵開始後5日目までに乾物率が17%から14%まで急激に減少したがその後はほとんど乾物率の減少が認められず、90日目の乾物率も14.9%と非常に高かった。高温乾式発酵の最初の5日間における乾物率の減少は、原料に混入した空気による好氣的分解によると考えられるが、後半は嫌氣的分解が進行しなかったため、乾物率の減少が起こらなかつたと考えられる。

これに対し高温乾式発酵では、発酵開始後15日目までは乾物率の減少がほとんど認められなかつたが、その後は分解が進行し、90日目には乾物率が11.3%に達していた。これは、高温の発酵条件下で15日目以降に嫌氣的分解が進行したことを示している。

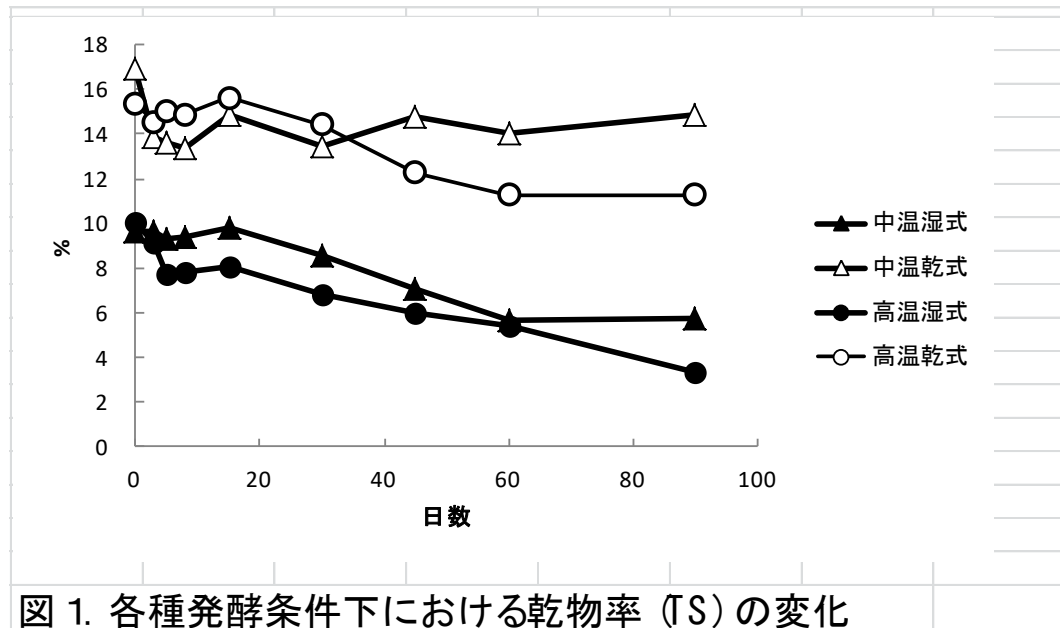


図1. 各種発酵条件下における乾物率 (TS) の変化

2. 各種発酵過程における揮発性脂肪酸 (VFA) の変化

図2に、各種発酵過程における揮発性脂肪酸生成量の変化を示した。

発酵過程で生成した主なVFAは酢酸、プロピオン酸、酪酸で、その他、イソ酪酸、イソ吉草酸および吉草酸も検出された。

中温条件と高温条件を比較すると、中温条件の方がVFAの生成量が多かった。中温湿式条件下では5日目から15日目にかけて11~13 mg/g (11,000~13,000 ppm)のVFAが検出されたが、その後は急激に減少し、45日目~60日目には1 mg/g (1,000 ppm)以下となった。他方、中温乾式条件下では発酵5日目にVFAが12 mg/g (12,000 ppm)に達したのちは減少傾向を示さず、60日目においても15 mg/g (15,000 ppm)以上であった。このことから、中温乾式発酵ではVFAがさらに分解されなかったことを示している。

高温発酵条件下ではVFAの生成量は低く、特に高温湿式条件下では発酵開始後8日目までは3,000から4,000 ppmのVFAが検出されたものの、15日目以降には500 ppm以下に減少していた。他方、高温乾式条件下では、VFAの生成量は8日目に約100,000 ppmまで達したが、その後は減少を始め、60日後には高温湿式条件と同様に500 ppm以下に達していた。

発酵開始後90日目には、中温乾式条件下においてのみ60日目以前とほぼ同量のVFA生成が認められた。その他の条件下では微量な酢酸の生成が認められ、その他のVFAは検出限界以下であった。

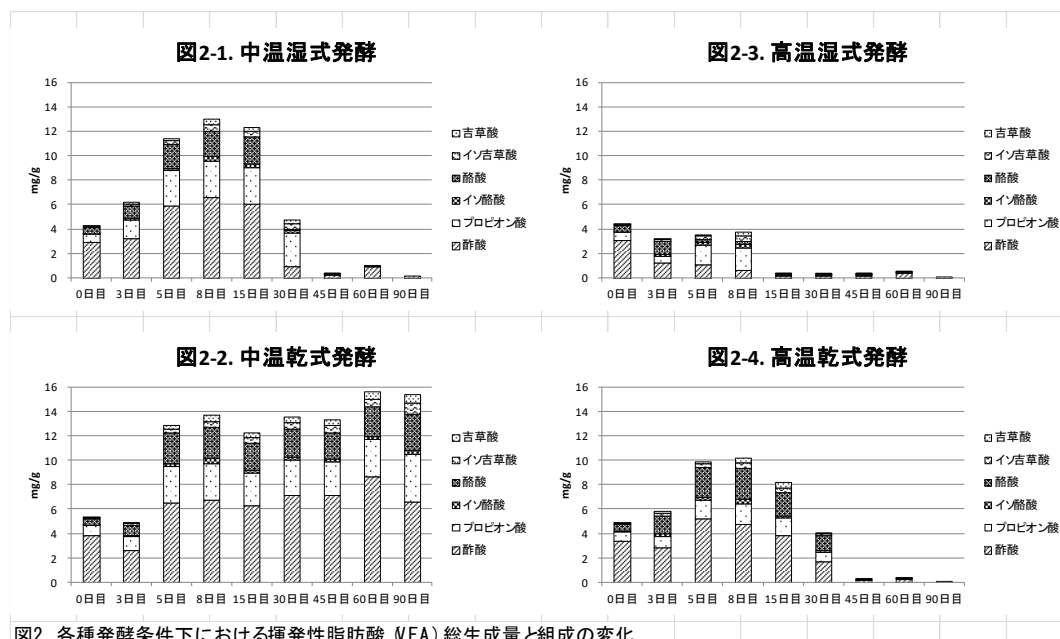


図2. 各種発酵条件下における揮発性脂肪酸 (VFA) 総生成量と組成の変化

図3に個々の揮発性脂肪酸の変化を示した。

酢酸(図3-1)は中温湿式と中温乾式条件下で8日目にピークの6 mg/gに達した。中温湿式条件下ではその後減少したが、中温乾式条件下では90日目になっても高濃度の酢酸が検出された。

高温湿式条件下では、酢酸は発酵開始時に3 mg/gあったものの、その後は急激に減少し、15日目以降は100 ppm以下となり非常に低かった。高温乾式条件下では、酢酸は5日目に約5 mg/gまで増加したもののその後は徐々に減少し、45日後にはほとんど検出されなかった。

プロピオン酸(図3-2)の生成量は、それぞれの条件下で酢酸の生成量の約半分程度の量であったが、生成のピークに達する時期が酢酸よりも遅かったため、たとえば高温湿式条件下では5日目と8日目には酢酸の生成量よりも高くなった。中温湿式条件下でもプロピオン酸は30日目までは高いレベルで推移し、その後減少を始めた。中温乾式条件下ではプロピオン酸は減少傾向を示さず、60日目以降も増加を続けた。

酪酸(図3-3)は高温湿式条件下では3日目に1 mg/gに達した以降はほとんど生成しなかったが、他の条件下では長い期間にわたって生成が認められた。中温乾式条件下では90日目でも3 mg/gの生成量が認められたが、高温乾式、中温湿式、高温湿式条件下では45日目にはほとんど生成が認められなかった。

このように酢酸、プロピオン酸、酪酸の間では、消長および残留期間に違いが見られたため、プロピオン酸と酢酸、および酪酸と酢酸の比率にも増減が認められた。

プロピオン酸と酢酸の比率(図3-4)は、乾式条件下では実験期間を通じてひくいレベル(<0.5)で推移したが、湿式条件下ではピークを示した。高温湿式条件下では8日目にピークが認められたが、中温湿式条件下では30日目にピークが認められ、中温湿式条件下ではプロピオン酸が長く残留することが示された。中温乾式条件ではこの比が45日目以降90日目にかけて徐々に増大した。

酪酸と酢酸の比率(図3-5)は、プロピオン酸とは異なり、乾式条件下で湿式条件下よりもわずかに高い傾向が認められた。高温乾式条件下では30日目にこの比率が最大となったが、その後は減少し、45日目にはほとんどゼロとなった。中温乾式条件下ではこの比率が約0.35で一定であり、60日目から90日目にかけてはさらに増大した。

高温湿式条件下では3日後に0.8と高い比率になったが、その後は急速に減少した。中温湿式条件下では15日目に約0.35のピークに達した後は急速に減少した。

本研究で主要な検討対象としている高温乾式の条件下では、いずれのVFAも8日目には生成のピークに達し、その後は減少した。プロピオン酸と酢酸の比率も実験期間中一貫して低かった。酪酸と酢酸の比率のみが30日目にピーク値(0.7)に達したが、その後は急速に減少した。これらのことから、高温乾式条件下ではVFAの生成と消長は円滑に進行し、メタン生成にも貢献したと考えられる。

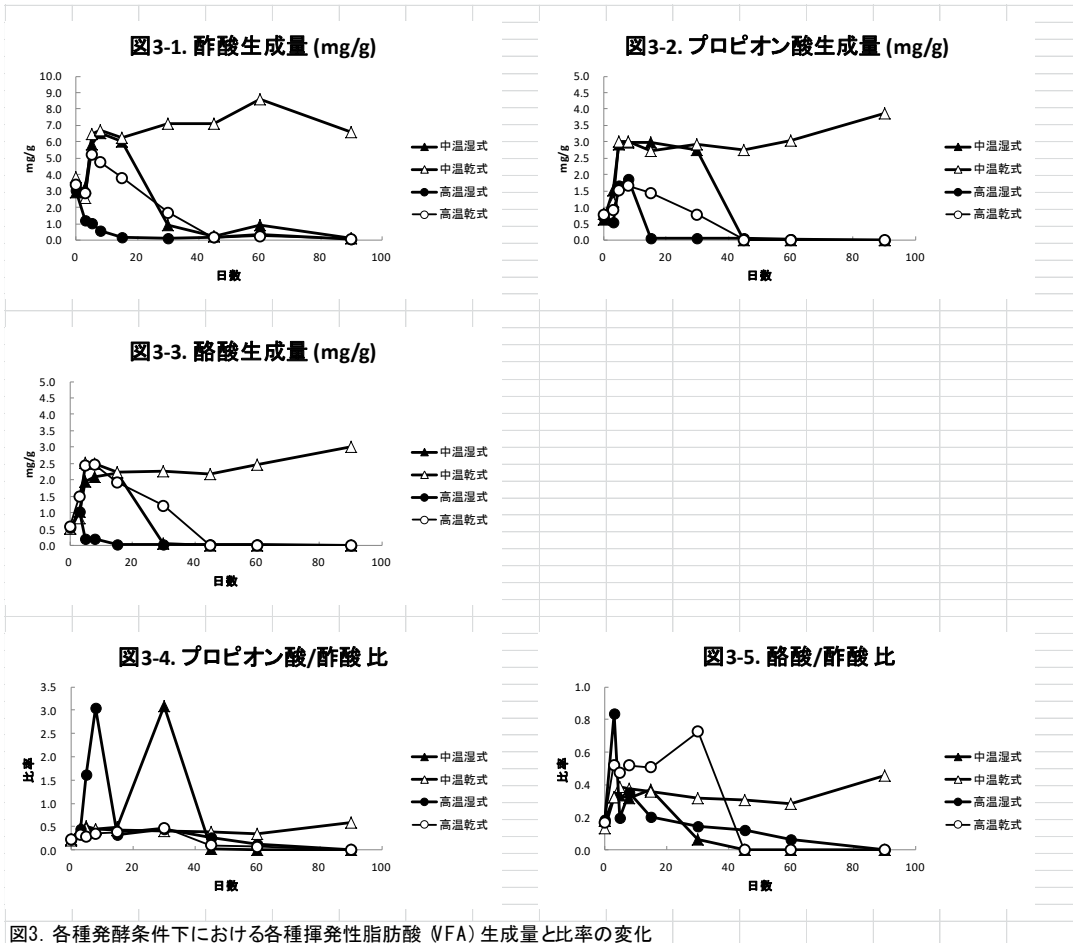


図3. 各種発酵条件下における各種揮発性脂肪酸 (VFA) 生成量と比率の変化

3. 発酵残渣水抽出液の可視部および紫外部吸光度特性と水抽出成分

各種条件下でのメタン発酵の進行に伴って、VFA を抽出した際の抽出液の色の褐色味が強くなっていった。また粘度や臭気などの五感で感じられる性質も発酵様式の違いと時間の経過とともに変化していた。このことから、発酵残渣水抽出液の紫外部吸光度特性と水抽出成分について測定および定量を行い、発酵様式との関連を検討した。

1) 発酵残渣水抽出液の可視部および紫外部吸光度

発酵残渣水抽出液を 0.1 N NaOH で 5 倍に希釈した溶液の可視部および紫外部吸光度を測定し、発酵残渣 5 g から 50 mL の水抽出液を得た際の吸光度と、炭素濃度として 1mg/mL 相当の溶液の吸光度に換算して、発酵様式ごとの変化を表した。

図 4 には、600 nm、400 nm、280 nm の吸光度を 5 g/50 mL 抽出液当りと炭素 1 mg/mL 当りに換算した値および、400 nm と 600 nm の吸光度比とその対数を示した。400 nm と 600 nm の吸光度比は、溶液の暗色度が増すほどこの値が小さくなることから、腐植化度の指標として、腐植化学の分野でよく用いられている。

600 nm の吸光度 (図 4-1) は、中温条件下では湿式でも乾式でも 30 日目まではほとんど増加しなかった。中温乾式の条件下ではさらに 60 日目になっても 600 nm 吸光度は増加しなかったが、中温湿式条件下では 45 日目に著しい増大が認められた。

高温条件下では、中温条件下よりも 600 nm 吸光度はより早く、より高く変化した。高温湿式条件下ではすでに 5 日目には開始期の吸光度の 2 倍以上に増大していた。高温乾式条件下では、中温条件よりも吸光度が高く推移したが、30 日目までは高温湿式条件よりも低い吸光度で推移した。45 日目になると 600 nm の吸光度は高温湿式条件よりも高くなった。

600 nm の吸光度を炭素 1 mg/mL 当りに換算した場合 (図 4-2)、発酵条件ごとの吸光度変化の特徴がより明らかとなった。高温湿式では 600 nm 吸光度は急速に増大し、その後も各種発酵様式のなかで最も高い吸光度を維持した。他方、中温乾式条件下では 600 nm 吸光度は 60 日目になってもほとんど増加しなかった。高温乾式と中温湿式における吸光度変化の推移は互いに非常によく似ていた。いずれも発酵開始 15 日目までは単位炭素濃度当りの 600 nm 吸光度はほとんど増加しなかったが、その後 30 日目には明らかな増加を示し、45 日目と 60 日目には、高温湿式条件と匹敵する吸光度を示した。600 nm の吸光度は腐植物質中の共役二重結合が長くなるほど増加するものであり、腐植化の進行の程度を反映している。

400nm および 280nm の吸光度 (図 4-3, 4-4, 4-5, 4-6) も 600nm の吸光度とほぼ同様の変化を示した。

400 nm の吸光度と 600 nm の吸光度の比率(E_{400}/E_{600}) およびその対数値の変化を図 4-7 と 4-8 に示した。この吸光度比はいずれの発酵様式のもとでも、発酵開始直後から 15 日目までの間に著しく減少した。このことから、この期間にも有機物の褐変化反応

が進行していることが明らかとなった。高温湿式条件下では、この比率が最も大きく減少したが、その後の変化はあまり怒らなかった。高温乾式および中温湿式条件下では30日目から45日目にかけて再びこの比率の減少が認められた。初期の褐変とはことなつた腐植化の過程がこの時期に起こつたことが示された。中温乾式条件下では、15日目以降この吸光度比はほとんど変化せず、45日目以降は各種の発酵様式のなかで最も高い値を示した。

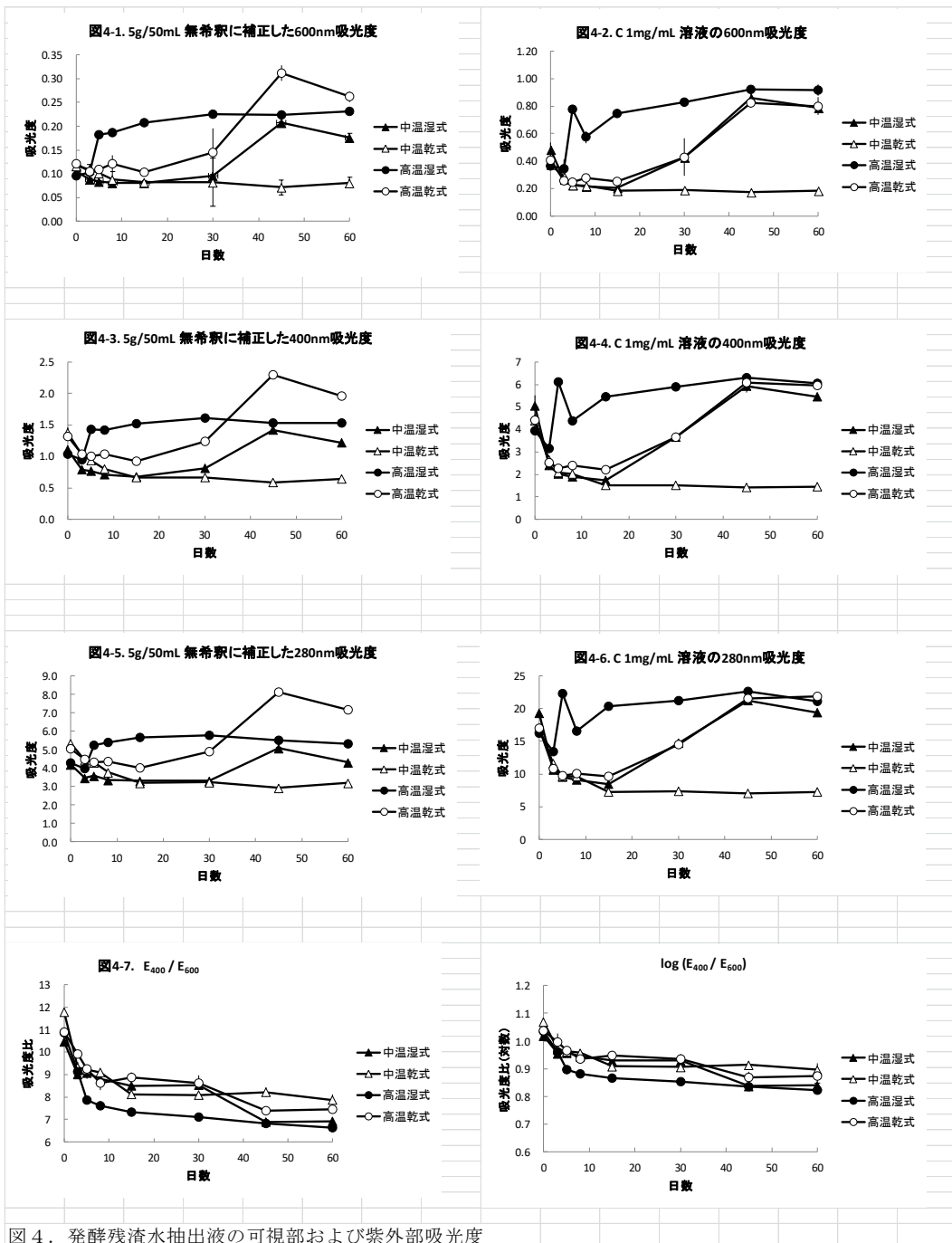


図4. 発酵残渣水抽出液の可視部および紫外外部吸光度

2) 水溶性成分

図5に、水溶性有機炭素含有率、水溶性フェノール、水溶性アンモニウム態窒素、硝酸イオン態窒素、およびカリウムイオンの含有率の変化を示した。

水溶性有機炭素の含有率(図5-1)は、残渣中に2 mg から4.5 mg/g の範囲であり少量であった。発酵の進行に伴って、15 日以内の期間にいったん増大し、その後発行条件によって徐々に減少する場合と、ほとんど変化しない場合が認められた。

発酵があまり進行しなかった中温乾式条件下では、水溶性有機炭素含有率が各種発行条件のなかで最も高く、60 日たってもほとんど減少しなかった。その他の発酵条件下では、15 日目以降水溶性有機炭素含量は徐々に減少し、高温湿式および中温湿式条件下で減少が著しかった。高温乾式条件下では、5 日目にいったん4.5mg/g まで増加した水溶性有機炭素が60 日目には約3.5 mg/g まで減少していた。

水溶性フェノールの含有率(図5-2)は、水溶性有機炭素とは異なった挙動を示した。発酵があまり進行しなかった中温乾式条件下では、水溶性フェノール含有率は最も低く、他方、高温乾式条件下では水溶性フェノール含有率が最も高く、45 日目にピークが認められた。発酵が最もよく進行した高温湿式条件下では、水溶性フェノールは8 日後にピークに達したのち、ふたたび徐々に減少した。中温湿式条件下では45 日目にピークに達し、60 日目にはわずかに減少しており、高温乾式条件下とよく似たパターンを示したが、生成量は高温乾式の場合よりも少なかった。これらの傾向から、水溶性フェノールは牛糞中の成分の中間分解生成物と考えられる。

アンモニウム態窒素(図5-3)は、いずれの発酵条件下でも15 日まで急速に増大したのちは、発酵条件によって異なった消長を示した。高温湿式と中温乾式条件下ではアンモニウム態窒素は30 日目まで増加しつづけ、その後は減少傾向を示した。高温乾式条件下では、初期の急激な生成の後には30 日目までは停滞し、その後再び増大して45 日目にピークに達した。これらの傾向からアンモニウムの生成はメタン発酵とは異なるプロセスで起こっていることが推察された。

硝酸イオン態窒素(図5-4)は、発酵条件によって生成パターンが異なっていた。メタン発酵があまり進行しなかった中温乾式条件下では硝酸イオン態窒素はほとんど増加しなかった。他の条件下ではいずれも発酵の日数経過に伴って増加する傾向を示した。高温湿式条件下で生成量は最も大きく、高温乾式がこれに次ぎ、中温湿式条件下では、増加は認められたものの、高温条件下よりも低い生成量であった。この結果からは、アンモニウムイオンよりも硝酸イオンの生成の方がメタン発酵の進行と対応しているように考えられる。しかし硝酸イオンは窒素の酸化によって生成したものであるので、嫌氣的なプロセスであるメタン発酵とどのようなメカニズムに関連しているのかは、今後解明の必要がある。

カリウムイオン(図5-5)は、発酵期間中の量の変化が最も少なかった。これはカリウムイオンが化学的变化を受けにくいためである。

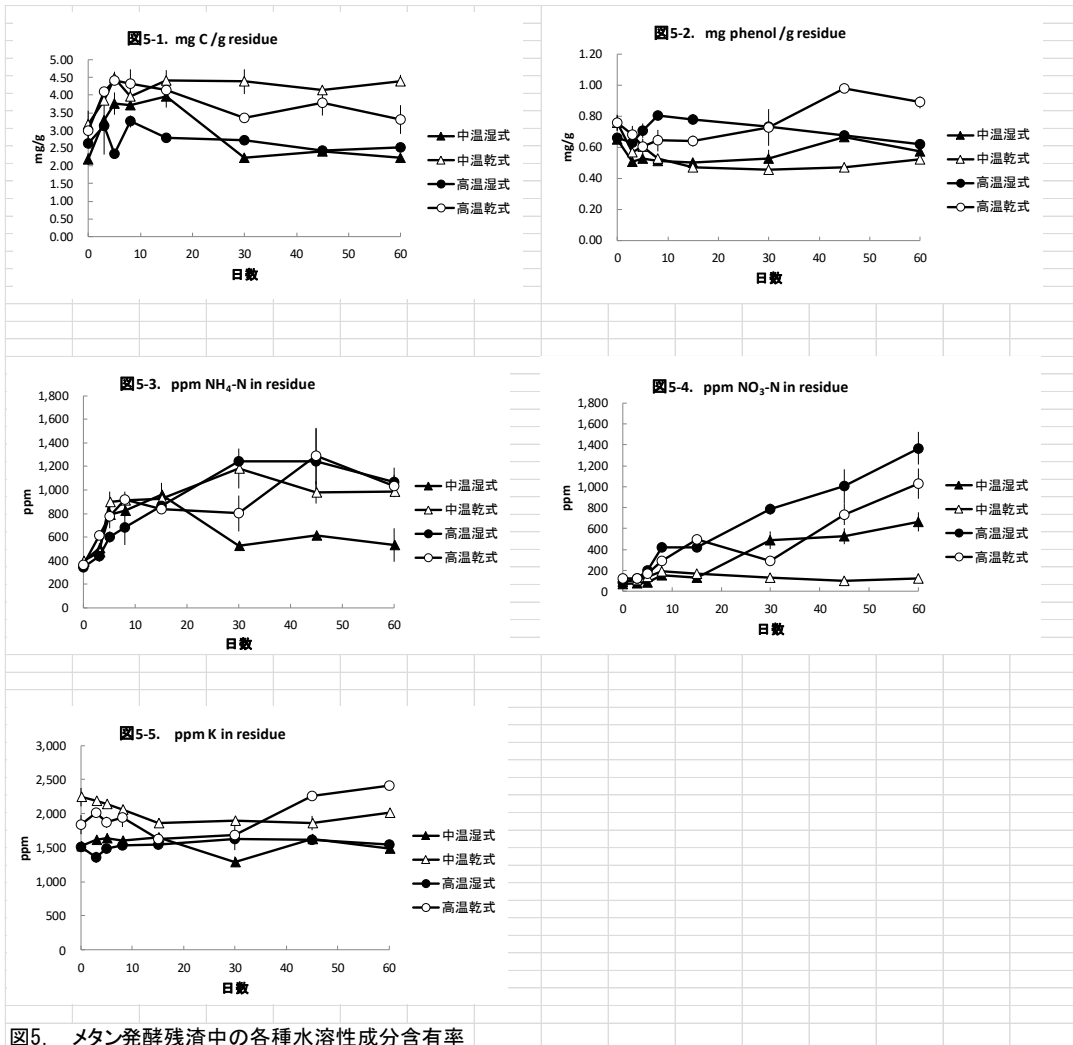


図5. メタン発酵残渣中の各種水溶性成分含有率

4. メタン発酵残渣の有機成分組成 (近似分析)

Harper and Lynch (1981) が麦わらおよびその分解過程における有機成分組成の分析に用いた方法に準拠して、メタン発酵残渣の有機成分組成を分析した。ただし、Harper and Lynch (1981) は脂質の分析を省略していたが、本研究では脂質の定量も行った。

発酵過程における有機成分組成の変化を図 6 に示した。

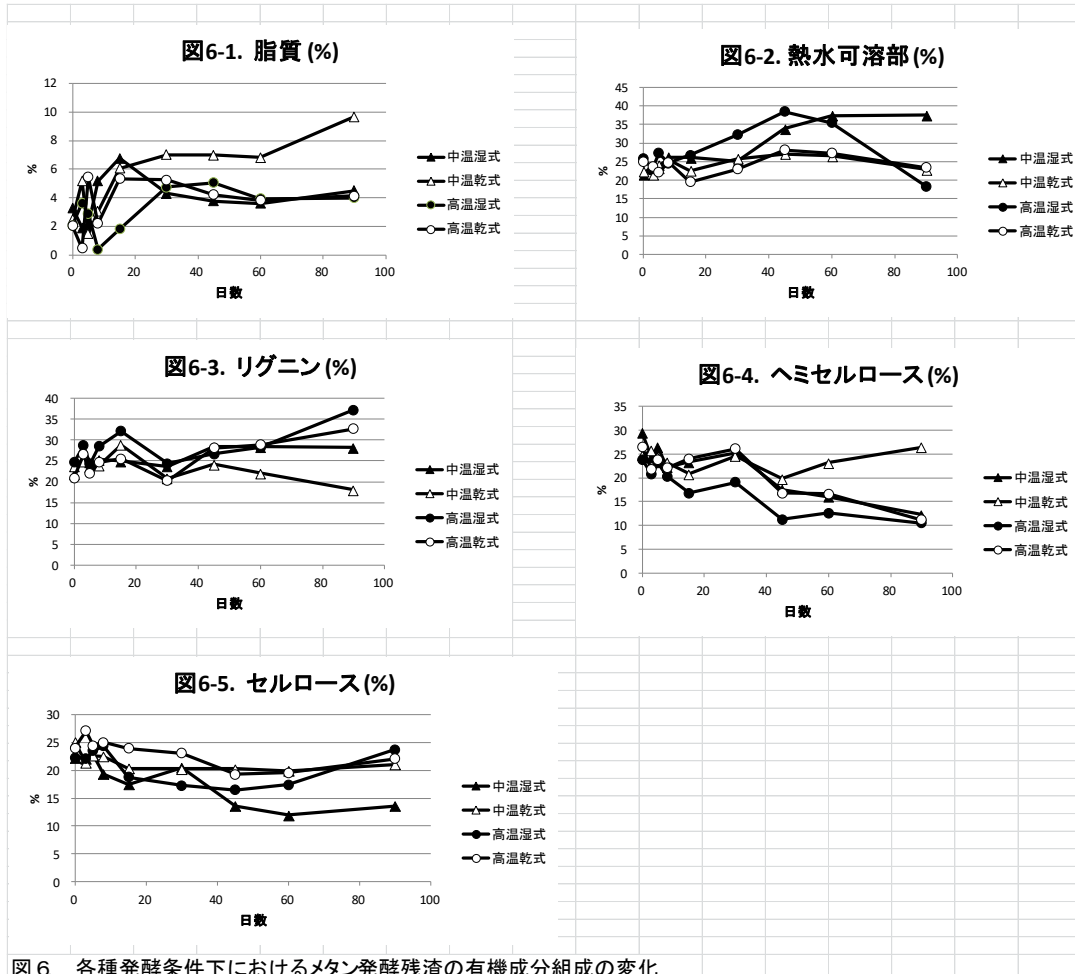


図 6. 各種発酵条件下におけるメタン発酵残渣の有機成分組成の変化

メタン発酵残渣中の脂質含有率は発酵開始 8 日後までは複雑な変化を示したが、その後は発酵条件と対応した特徴的な変化のパターンを示した。メタン発酵があまり進まなかった中温乾式条件下では、30 日目以降の脂質含量がほぼ 7% で一定となり各種発酵条件のなかでは最も高く、さらに 90 日目には 10% 近くまで増大していた。これは、脂質を含めた有機成分の分解が中温乾式条件下であまり進行しなかったことを示している。

高温乾式および中温湿式条件下では 2 回目の脂質含有率のピークが 15 日目に認められ、その後は再び徐々に減少した。高温湿式条件下では 2 回目の脂質含有率のピーク

は 45 日目に認められた。その後脂質含有率は再び減少し、60 日目および 90 日目における脂質含有率は、中温乾式以外の 3 条件ではほぼ等しく約 4 %まで減少した。

熱水可溶部の割合 (図 6-2) は、湿式発酵条件で高くなる傾向が認められた。高温湿式における増加率が最も高かったが、60 日目においては高温湿式も中温湿式もほぼ等しい熱水可溶部の割合を示した。しかし高温湿式条件では 90 日目における熱水可溶部が著しく減少していた。乾式発酵においては熱水可溶部の増加はわずかであり、高温乾式でも中温乾式でもほぼ同様の割合を示した。

メタン発酵の進行にともなうリグニン成分の変化は、いずれの発酵様式のもとでも非常に少なかった。メタン発酵がうまく進行しなかった中温乾式条件下におけるリグニン含量が最も低く、その他の発酵様式ではほぼ等しいリグニン含量を示した。ただし 90 日目には各種発酵様式の間で差が認められ、高温湿式 > 高温乾式 > 中温湿式 > 中温乾式の順であった。変化が少なかったのは、リグニンが植物成分のなかでは非常に難分解性の成分であるためである。また中温乾式条件下でリグニン含量が低かったのは、リグニン以外の成分の分解が遅れていたためである。

ヘミセルロース (図 6-4) は、いずれの発酵様式のもとでも日数の経過とともに減少した。減少の程度は高温湿式条件下で最も著しく、高温乾式と中温湿式ではほぼ等しく、中温乾式条件では最も減少率が低かった。90 日目において中温乾式条件のヘミセルロース含量は約 25 %であったが、その他の条件では 10~13 %に減少していた。ヘミセルロースはセルロースよりも容易に分解を受けるため、メタン発酵においても主要な基質であると考えられる。

セルロース (図 6-5) は、ヘミセルロースよりも減少率が低かった。中温乾式条件下では 15 日目以降のセルロース含有率はほぼ一定であった。中温湿式条件下ではセルロースの減少率が最も大きく、初期に 22 %程度であったものが 90 日目には約 13 %まで減少していた。その他の発酵様式の下では発酵開始期から 60 日目までに高温湿式条件下では 22.5 %から 17.5 %まで減少し、高温乾式および中温乾式条件下では 24 %から 20 %まで減少した。しかし 60 日目から 90 日にかけて特に高温湿式条件でのセルロース含有率が 24 %近くまで再び増大していた。この増大は熱水可溶部の割合の減少と対応しており、この期間により分解されやすい成分の分解が進行したためと考えられる。

5. 各種発酵過程におけるメタン発酵残渣の元素組成の変化

有機物の元素組成は、酸化的变化および還元的変化、微生物による分解などを反映して変化するため、発酵の進行過程をあらわす良い指標となる。

図 7 に、各種条件下におけるメタン発酵残渣の元素組成の変化を示した。炭素含有率 (図 7-1) と水素含有率の変化 (図 7-2) は、互いに良く似た変化のパターンを示した。すなわち、高温湿式条件下で最も減少率が大きく、中温乾式条件下では

ほとんど変化しなかった。これは、高温湿式条件下で有機物の分解が最も著しく進行し、中温湿式条件下では有機物の分解がほとんどおこらなかったことを反映している。

高温乾式条件下では、発酵開始 15 日目までほとんど変化がなかったが、その後著しく減少した。水素含有率は 60 日目には高温湿式条件とほぼ等しいレベルまで減少した。

中温湿式条件下では、炭素および水素含有率は 15 日目まではいったん増加し、その後急速に減少するという、他の条件とは異なる変化のパターンを示した。

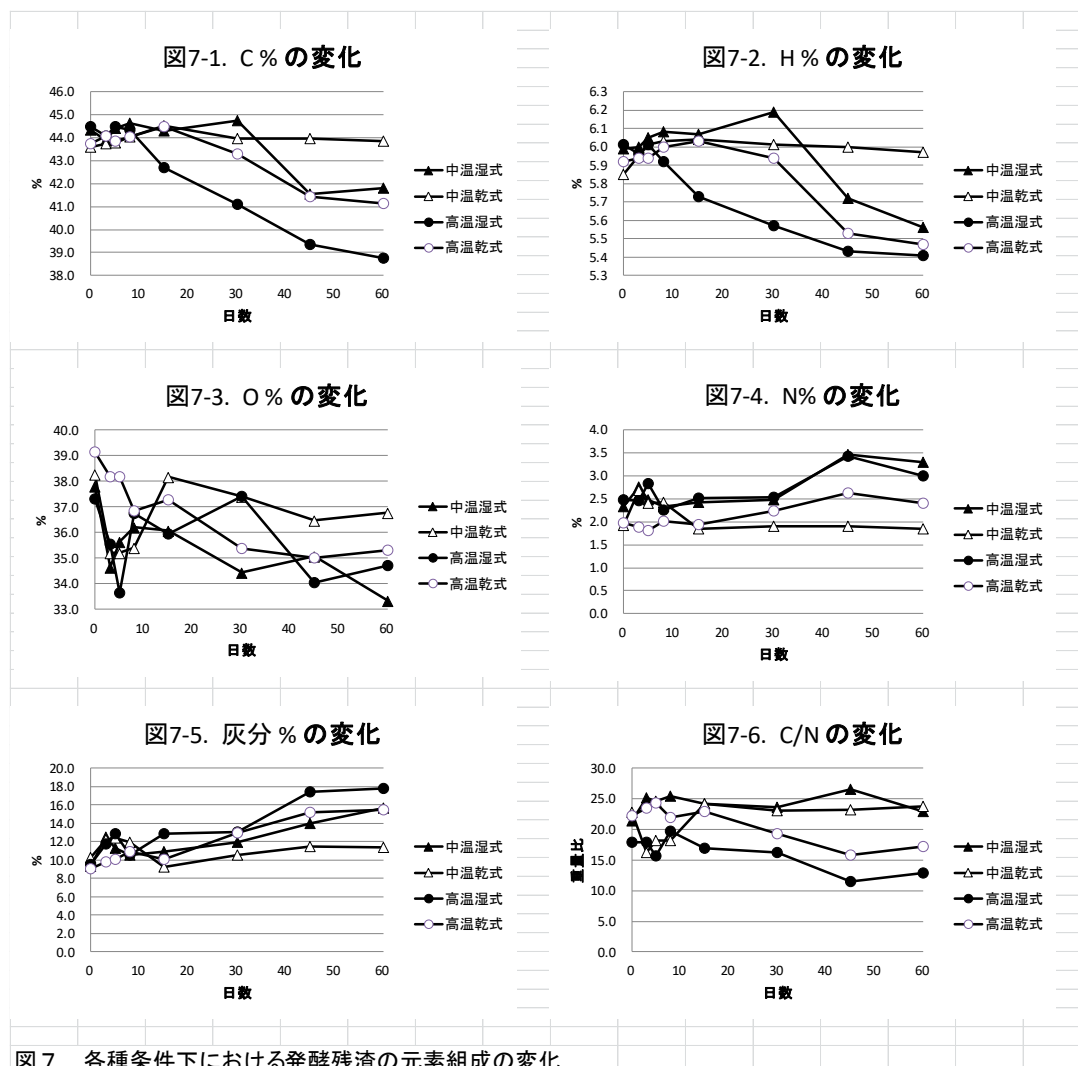


図 7. 各種条件下における発酵残渣の元素組成の変化

酸素含有率（図 7-3）は、8 日目までにいったん急激に減少した後再び増大し、その後再び減少するという複雑な変化を示した。高温条件、中温条件ともに湿式の方が乾式よりも酸素含有率の低下が著しかった。中温乾式条件下では、酸素含有率の変化が最も少なかった。

窒素含有率（図 7-4）は、中温乾式条件下ではほとんど変化しなかったが、その他の条件下では発酵の進行とともに増大した。湿式条件の方が乾式条件よりも窒素含有率

の増加率が高かった。

灰分含有率 (図 7-5) は、いずれの条件下でも発酵の進行とともに増大した。増加率は、高温湿式条件下で最も高く、高温乾式がこれに次ぎ、中温湿式がこれよりわずかに少なく、中温乾式条件下での変化が最も少なかった。

炭素と窒素の含有率の比率 (炭素率) (図 7-6) は、中温条件では変化が少なく、高温条件下では著しく減少した。

図 8 に、発酵残差の元素の原子数比の変化を示した。

H/C (図 8-1) は発酵様式によって著しく異なる変化のパターンを示した。発酵開始初期の複雑な変化を除外すれば、高温湿式条件下では H/C は単調に増大し、高温乾式および中温湿式条件下ではいったん増大したのちに減少した。中温乾式条件下では変化に乏しかった。

O/C (図 8-2) は中温乾式と高温乾式条件下では変化に乏しかったが、中温湿式と高温湿式条件下では複雑な変化を示した。また、高温湿式の方が中温湿式よりも O/C 比が高かった。

N/S (図 8-3) はいずれの発酵様式でも発酵期間中の変化に乏しかったが、中温湿式条件下においてのみ、15 日目から 30 日目にかけてこの比率が著しく減少した。

C/S (図 8-4) は発酵の進行とともに減少する傾向を示した。最も減少率が著しかったのは高温湿式であり、中温湿式がこれに次ぎ、高温乾式ではこれよりわずかに減少の開始が遅れ、中温乾式ではかえって比率がわずかに増大傾向にあった。

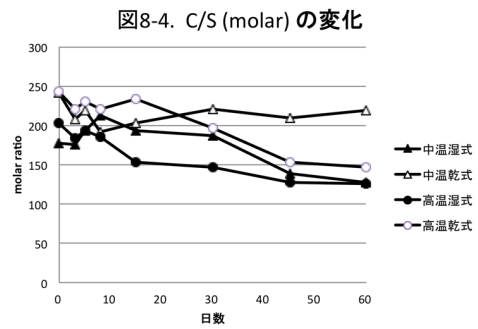
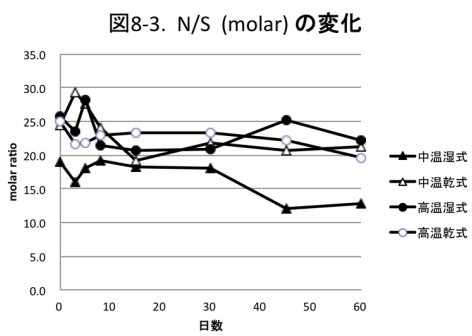
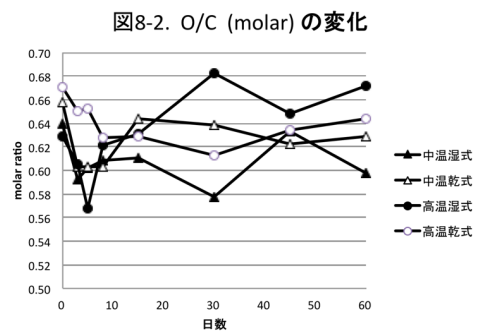
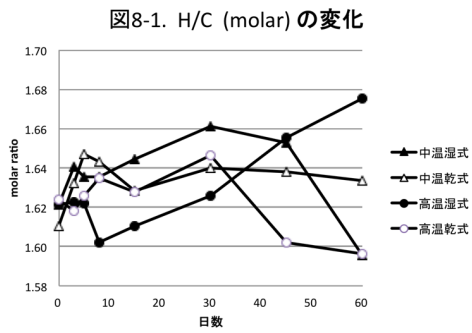


図8. 各種条件下における発酵残渣の原子数比の変化

6. 各種発酵過程におけるアミノ酸組成の変化

アミノ酸はタンパク質の構成成分であることから、原料としての牛ふん尿中の有機物が微生物に食べられて微生物タンパクに変化する過程で、アミノ酸組成も変化することが期待された。そのため、0日目、30日目、60日目の発酵残渣について、アミノ酸組成を測定し比較した。

図9に各種条件下におけるメタン発酵残渣のアミノ酸組成を0、30、60日目で比較した。30日目から60日目にかけて、アミノ酸の含有率は全体的に増大した。アミノ酸組成は採取時期ごとに異なっていたが、組成の変化は複雑であるため、この図のみでどのような変化であるかを説明することは困難である。ただし、中温乾式条件下では60日目のアミノ酸含有率が他の発酵様式と比較して著しく低かった。これは、微生物による分解の程度が低いことを反映したものと考えられる。

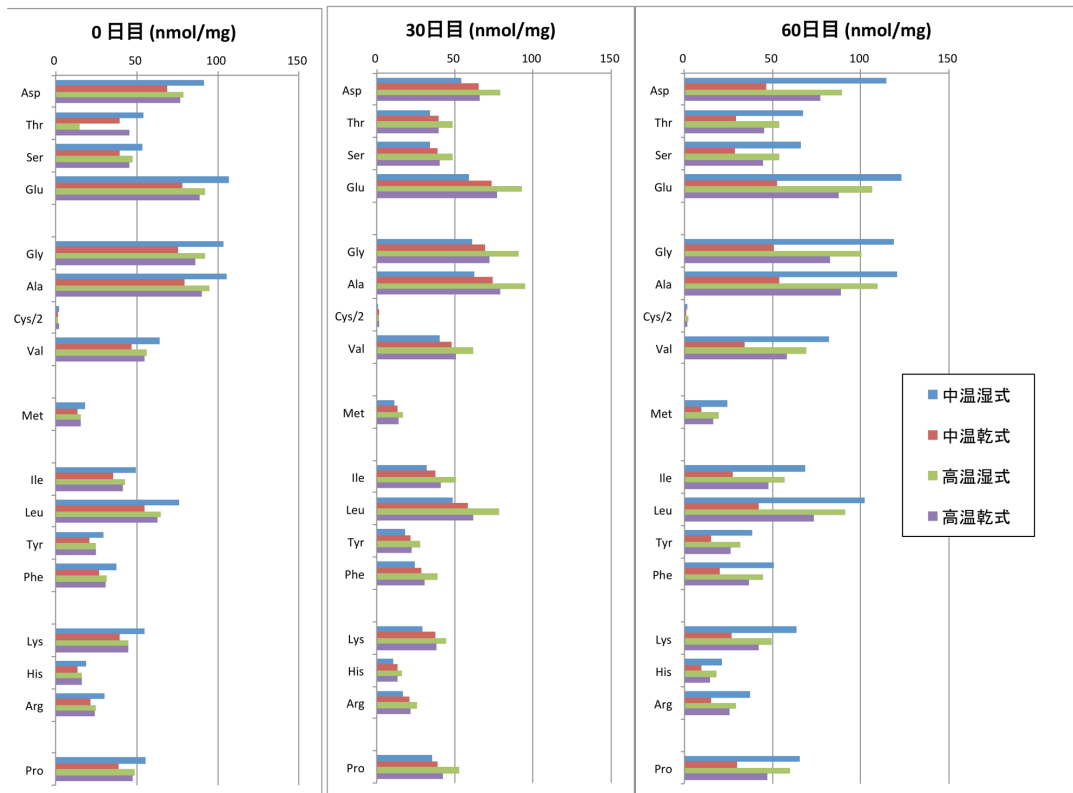


図9. 各種条件下におけるメタン発酵残渣のアミノ酸組成

アミノ酸組成の主成分分析を行ったところ、メタン発酵残渣のアミノ酸組成は第1主成分のみで変動の傾向をよく説明できることがわかった。そして、第1主成分は2つのグループのアミノ酸がそれぞれ+と-の固有値をもっていた。図10は、この2つのグループのアミノ酸によって、発酵の進行にともなうアミノ酸組成の変化を説明したものである。

発酵の日数経過に伴って、いずれの発酵様式においても、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、アラニン、リシンからなるグループの割合（負荷電あるいは正荷電を持ち、あるいは極性の高いアミノ酸）が減少し、バリン、イソロイシン、ロイシンからなるグループの割合（疎水性の大きいアミノ酸）が増大した。0日目から30日目にかけての変化が大きく、30日目から60日目にかけてのアミノ酸組成の変化は少なかった。また、中温乾式条件でのアミノ酸組成の変化は他の条件と比べて少なかった。他方、高温湿式条件下では0日目から30日目にかけての変化が他の発酵様式と比較して最も大きく、30日目から60日目にかけてはほとんど変化がなかった。これはこの条件において発酵が最も早く進行したことを反映している。中温湿式および高温乾式条件下では30日目までの変化の割合が中間的であったが、60日目のプロットは高温湿式条件のプロットの位置とほぼ等しく、60日目までにはほぼ同程度の発酵が進んだことを示していた。

また、0日目の高温湿式条件のプロットが他の条件のプロットから少し離れていたが、主成分分析においても高温湿式0日目のプロットは第2主成分の貢献により他のプロットから離れていた。第2主成分においてはトレオニンとシステインがマイナスのファクターとして、メチオニンがプラスのファクターとして大きく貢献していた。

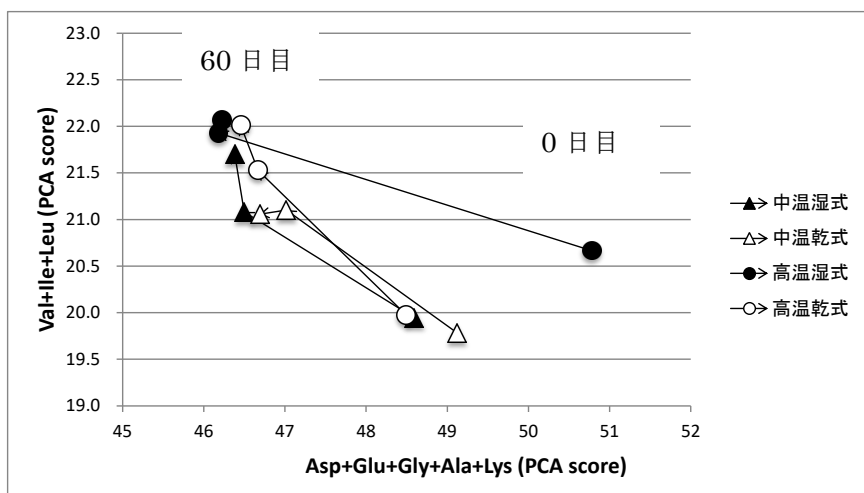


図10. メタン発酵残渣アミノ酸組成の主成分分析による解析

8. 発酵過程における腐植様物質の生成

未熟な糞尿は、農耕地に施用した場合、植物病原菌の生育助長、発芽および初期生育阻害、悪臭などによって、作物にかえって悪影響を及ぼす。家畜糞尿を堆肥化あるいはメタン発酵させると、家畜糞尿中の炭水化物やタンパク質などの易分解性成分が分解されるいっぽう、腐植様物質が生成し有機物が安定化することによって、作物生育に役立つ物質へと変化する。

腐植様物質は、アルカリ可溶・酸不溶の腐植酸画分と、酸・アルカリ可溶のフルボ酸画分に分けて取り扱われ、フルボ酸画分はさらに XAD-8 (DAX-8) などの樹脂に吸着する画分と吸着しない画分に分けられる。XAD-8 樹脂に吸着する画分は、より腐植物質としての性質が強いと考えられている。

腐植酸は腐植化が進行するほど、その可視部の吸光度が増大し、褐変あるいは暗色化が進行する。紫外可視吸収スペクトルには特定の物質に由来する吸収ピークがみとめられなくなり、指数関数状のなめらかで単純な形状となり、対数軸を使用すれば直線状のスペクトルとなり、腐植化の進んだ腐植酸ほど吸収曲線の傾きが緩やかになる。

図 11 に、メタン発酵の進行に伴う各腐植画分の収率の変化を示した。

0.1 N NaOH によって抽出される有機炭素が発酵残渣中の全有機炭素に占める割合を示した (図 11-1)。この量は腐植酸画分とフルボ酸画分の総量に相当し、発酵過程の進行に伴って、5 日目から 15 日目にかけて第 1 のピークを示したのち、45 日目頃に第 2 のピークを示した。第 1 のピークは主としてフルボ酸画分の増加を、第 2 のピークは腐植酸画分の増加を反映したものである。

腐植酸画分の炭素が全炭素に占める割合 (図 11-2) も、全可溶性腐植 (図 11-1) と同様に 2 つのピークを示したが、そのピークはより小さなものであり、前半よりも後半のピークが著しかった。各種発酵様式のなかでは中温湿式条件における腐植酸画分の生成が最も多く、高温湿式と高温乾式がほぼ等しい割合でこれに続き、中温乾式条件下では腐植酸炭素の割合が最も低く、また発酵期間中の変化もほとんどなかった。中温乾式条件下では最もメタン発酵の進行が遅かったことから、腐植酸の割合の増加は、メタン発酵の進行を反映していると考えられた。

全フルボ酸画分の炭素が全炭素に占める割合 (図 11-3) は、発酵開始後 5 日目から 15 日目に最大ピークに達した。その後は中温乾式条件下ではそのまま高い割合で推移したが、その他の条件下では徐々に減少する傾向を示した。高温湿式条件下のその割合は 30 日目に極小値に達し、その後再びわずかに増大した。高温乾式条件下では 15 日目以降フルボ酸の割合は減少し続けて 60 日目には最小値に達した。中温湿式条件下では高温乾式とよく似た変化のパターンを示したが、60 日目のフルボ酸割合は高温乾式よりもわずかに高かった。

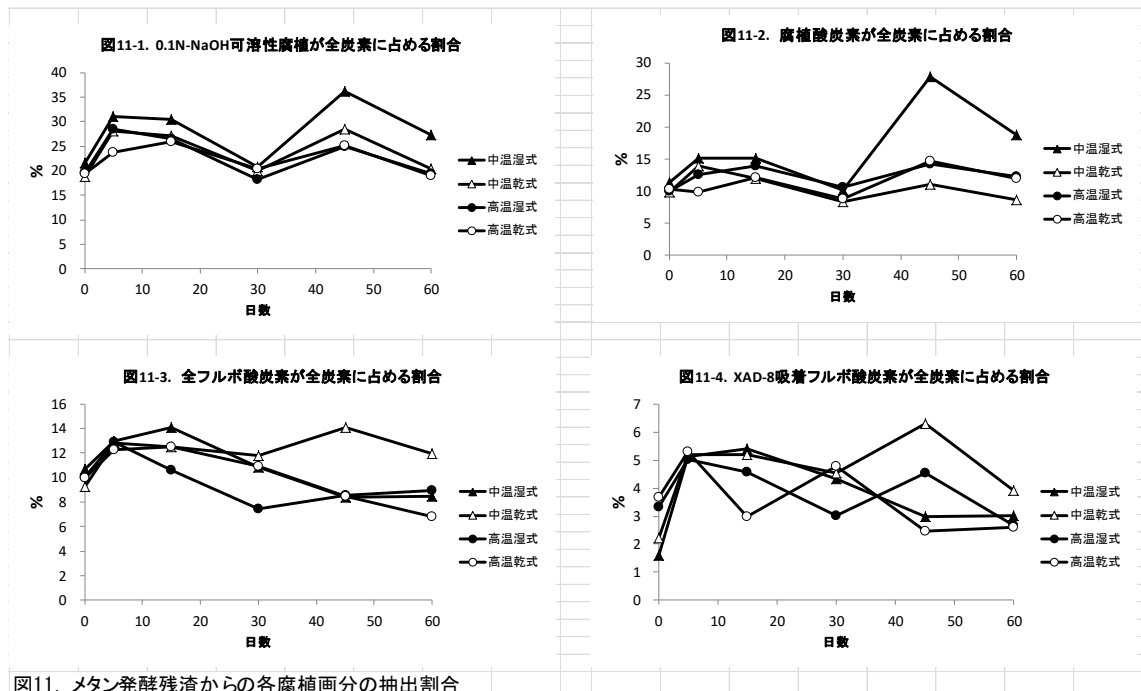


図11. メタン発酵残渣からの各腐植画分の抽出割合

フルボ酸 XAD-8 樹脂吸着画分の炭素が全炭素に占める割合 (図 11-4) は、発酵開始時には高温発酵条件の方が中温発酵条件より高い傾向を示した。これは種菌として使用した消化液の給源が高温発酵と中温発酵で異なっていたためである。その後 5 日目までにいずれの発酵条件下でもピークに達し、その後は中温乾式条件下では高い割合のまま推移し、その他の条件下ではおおむね減少傾向を示した。

中温乾式条件ではあまりメタン発酵が進まなかったことから、発酵が進まない条件下ではフルボ酸は高い割合を示すことが示された。発酵が進行する条件下では、いったん生成したフルボ酸も再び分解を受けてその割合が減少していった。

図 12 に抽出された腐植酸画分およびフルボ酸 (XAD-8 吸着画分) の可視部吸光度 (600 nm および 400 nm) の変化を示した。

腐植酸画分の 600 nm 吸光度 (炭素 1mg/L 当り) は、発酵の進行とともに徐々に増加する傾向を示した (図 12-1)。また高温と中温にかかわらず湿式条件の方が乾式条件よりも 600 nm 吸光度の増加が早く進行した。湿式および乾式条件内では高温の方が中温よりも早く 600 nm 吸光度が増大した。この結果、600 nm 吸光度の増大は、高温湿式 > 中温湿式 > 高温乾式 > 中温乾式の順となった。

腐植酸画分の 400 nm 吸光度 (炭素 1mg/L 当り) も、発酵の進行とともに徐々に増加する傾向を示したが、600 nm 吸光度とはやや異なった変化のパターンを示した (図 12-2)。400 nm 吸光度はいずれの発酵条件下でも 30 日目にピークに達し、その後 45 日目にかけてわずかに減少し、60 日目には再び増大していた。各種発酵条件のなかでは、高温湿式条件における増加が最も著しかったが、高温乾式条件における増加もこ

れに次ぎ、60日目には高温湿式と高温乾式条件下における腐植酸の400 nm 吸光度がほぼ等しくなっていた。

腐植酸の400 nm および600 nm の吸光度の比率の対数を図12-3に示した。この値は対数軸で表した吸収曲線の傾きを示し、この値が低いほど腐植化が進行していることを示している。この比率は湿式条件下で乾式条件下よりも低く推移していた。そのため、湿式条件の方が腐植酸の暗色化を促進しやすいことを示している。

図12-4にフルボ酸XAD-8吸着画分の400 nm 吸光度の変化を示した。この吸光度は発酵開始期において高温発酵条件の方が中温発酵条件よりも著しく高く、これは種菌として使用した消化液の違いを反映したものである。発酵開始後5日目には初期の吸光度は各種発酵条件下でほぼ同レベルにまで減少した。その後、発酵がうまく進行しなかった中温乾式条件下では400 nm 吸光度は低いまま推移したが、その他の条件下ではわずかに増加する傾向を示した。各種条件の間では高温湿式と中温湿式条件下における吸光度増加が大きかったが、腐植酸の600 nm 吸光度の場合ほど著しい変化ではなかった。

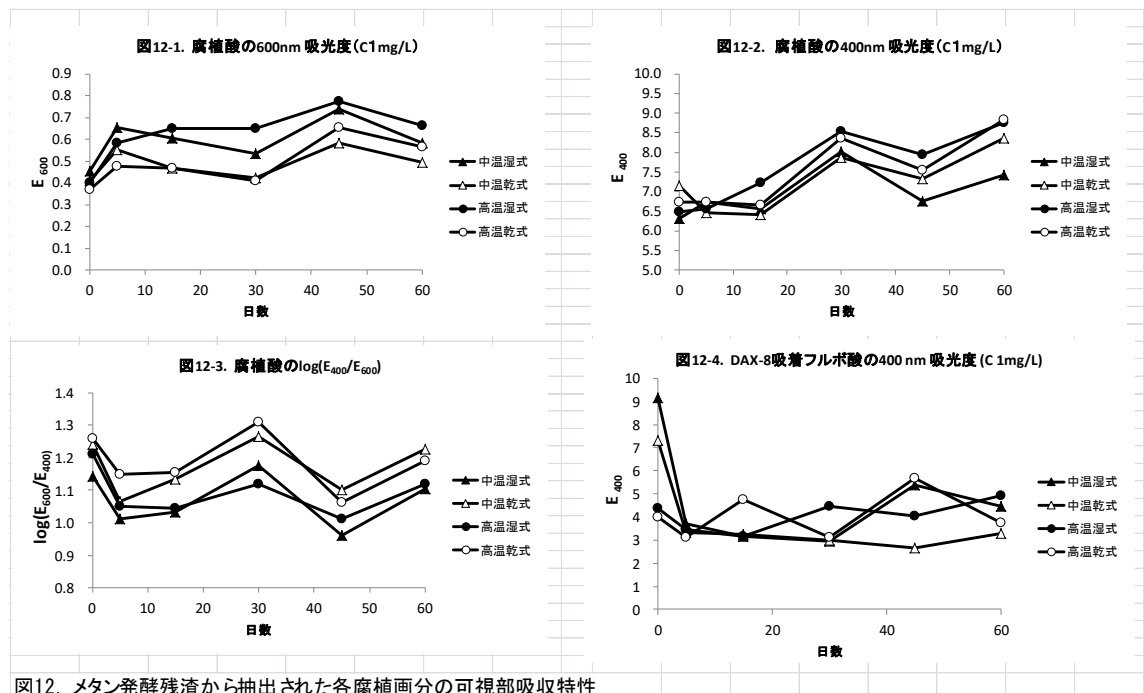


図12. メタン発酵残渣から抽出された各腐植画分の可視部吸収特性

図13に各種発酵条件下における腐植酸の紫外可視吸収スペクトルの経時変化を示した。

腐植酸の紫外可視吸収スペクトルは特徴に乏しかったが、発酵開始時から15日目までにかけては、660 nm および430 nm 付近のクロロフィルの吸収および280 nm から360 nm にかけてのリグニン由来のフェノール性化合物の吸収が顕著に認められた。

中温乾式条件下（図 13-2）ではこれらのクロロフィルやリグニンに由来する吸収が 60 日目になってもかなり残留していた。中温湿式条件下(図 13-1)でもこれらの成分の分解は遅く、60 日目までスペクトルにその特徴が認められた。高温湿式および高温乾式条件下では（図 13-3,4）これらの成分の分解が早く進行し、30 日目においてリグニン由来の吸収は認められたものの、クロロフィルによる吸収はほとんど消失していた。

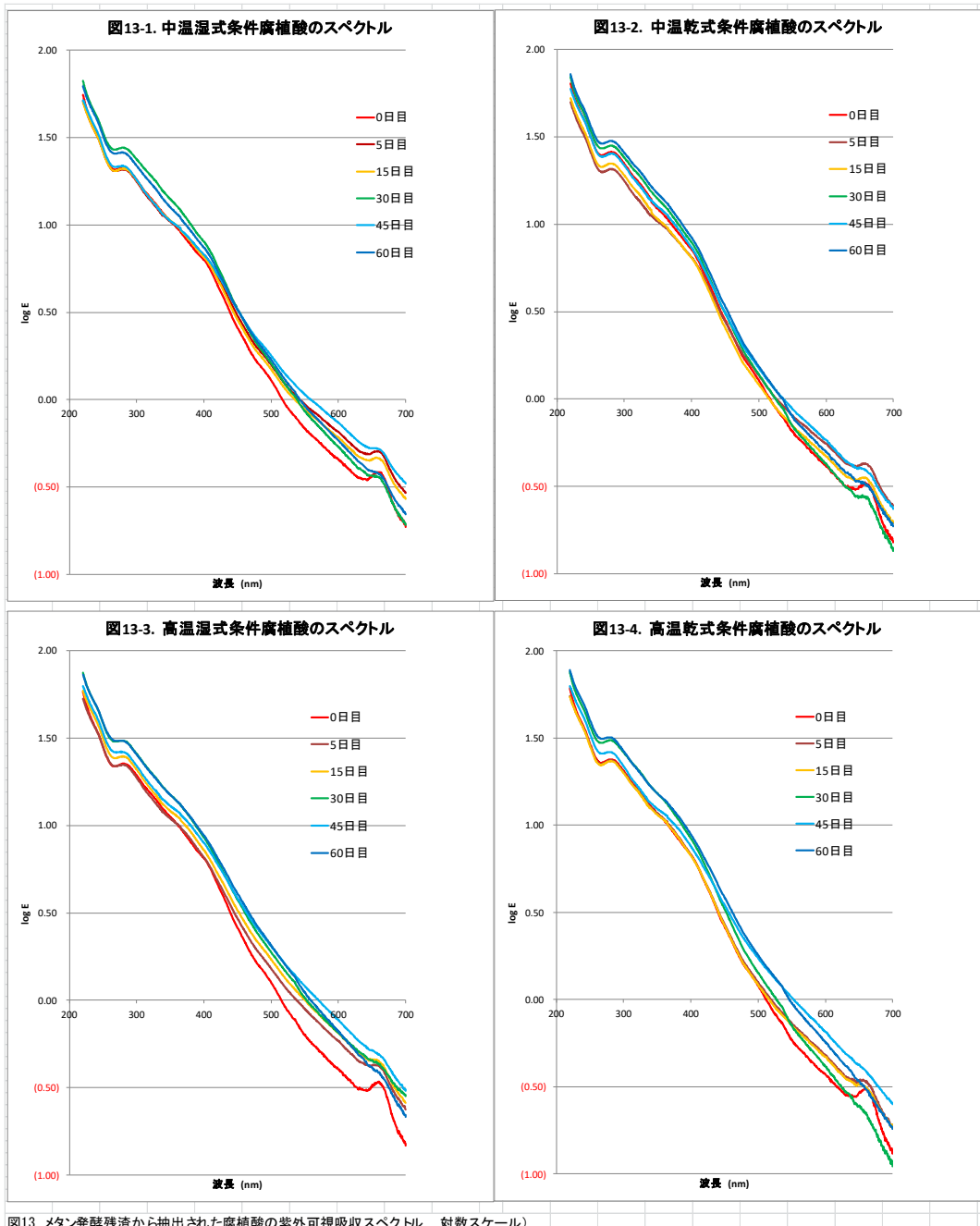


図13. メタン発酵残渣から抽出された腐植酸の紫外可視吸収スペクトル 対数スケール)

図 14 にメタン発酵残渣から抽出されたフルボ酸 XAD-8 吸着画分の紫外可視吸収スペクトルを示した。

フルボ酸 XAD-8 吸着画分の紫外可視吸収スペクトルは、280 nm 付近および 340 nm 付近に吸収極大を示した。これらの吸収はリグニンの分解によって生成したフェノールおよび側鎖の二重結合と共役したフェノールによるものと考えられる。

発酵開始時 (0 日目) のスペクトルが、いずれの発酵条件においても吸収強度が大きく、ピークの形状もはっきりしていた。発酵開始 5 日目には吸収強度自体はかなり低下したが、2つのピークは明らかに認められた。

腐植酸の紫外可視吸収スペクトルの場合と同様に、中温条件では分解が遅れ、60 日目になっても2つのピークが明らかに残存していた (図 14-1, 2)。とくに中温乾式条件下でその傾向が著しかった (図 14-2)。

他方、高温湿式条件 (図 14-3) では、30 日目において 340 nm の吸収はほとんど認められず、280 nm の吸収は 45 日目と 60 日目にはかなり低下していた。

高温乾式条件下 (図 14-4) では高温湿式条件とは異なり、15 日目に 340 nm の吸収が増大していたが、その後 45 日目と 60 日目にはかなり低下していた。

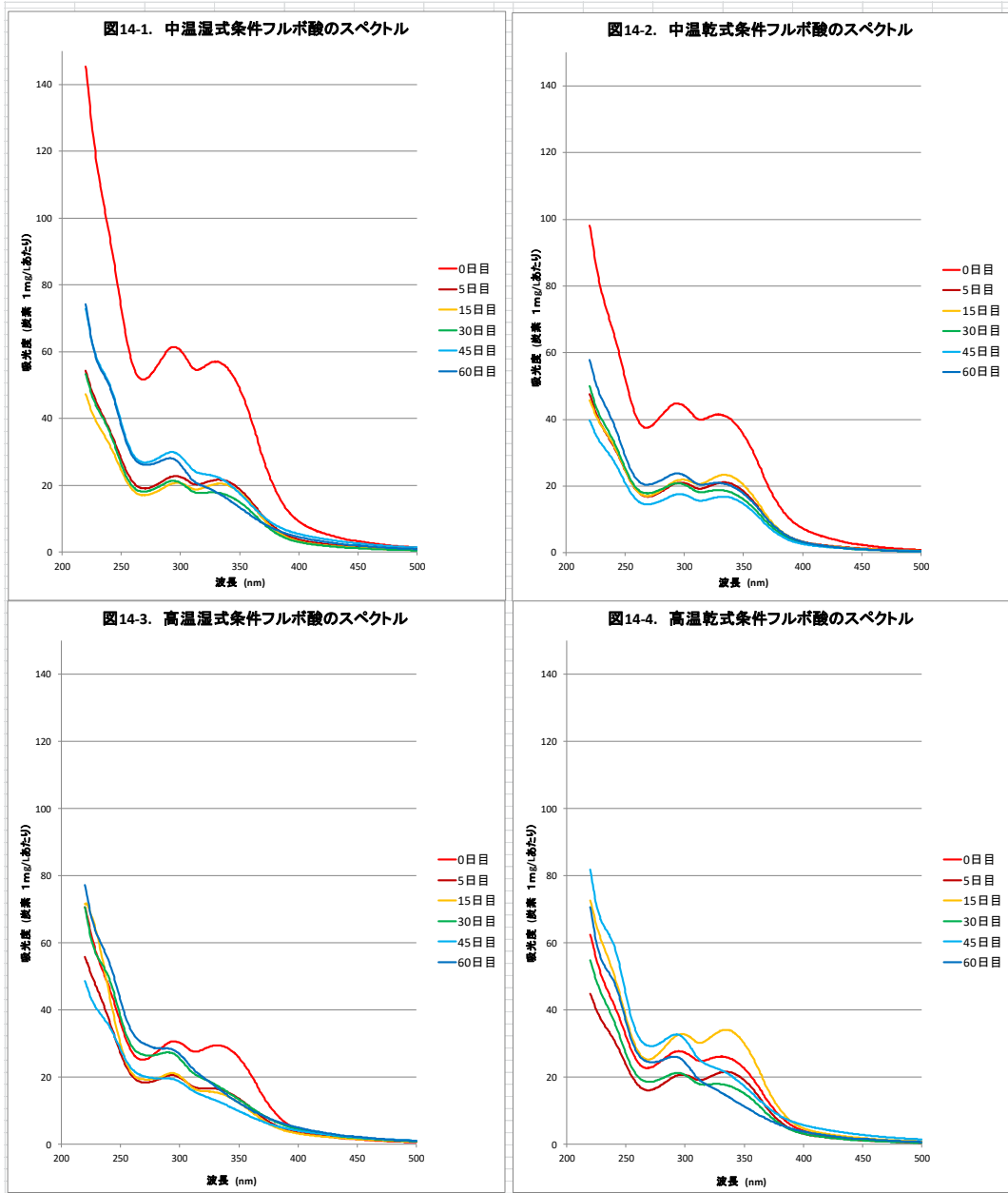


図14. メタン発酵残渣から抽出されたフルボ酸 (AD-8 吸着画分) の紫外可視吸収スペクトル

IV. 結論

検討した4種類のメタン発酵条件のなかで、メタン発酵が最も効率的に進行したのは高温湿式過程であった。これは、液体中で発酵させることにより、メタン発酵に必要な嫌氣的な条件を維持しやすかったことと、高温状態に適合したメタン発酵菌が効率的に有機物を分解したためと考えられる。高温乾式条件では発酵開始後15日目まではメタン発酵も遅れ、揮発性脂肪酸も高レベルに滞留していたが、その後は急速にメタン発酵が進行し、揮発性脂肪酸が減少し、元素組成、有機物組成(近似分析)、腐植物質組成などにも急激な変化が現れ、有機物分解が好ましい方向に進行し、安全な発酵残渣が生成していることが示された。高温乾式状態で高温湿式状態よりもメタン発酵の進行が遅れたのは、初期の原料中に空気が含まれており、空気中の酸素が消失するのに時間がかかったことと、実験期間中、初期には短い間隔で分析用試料の取り出しを行ったことにより、その際に空気の混入があったためと考えられる。湿式条件ならば液体中の空気の拡散速度は遅いので、嫌氣的な条件が維持できたものであろう。

中温湿式条件と高温乾式条件を比較すると、どちらもほぼ同程度の効率でメタン発酵と有機物分解が進行していた。中温湿式条件におけるメタン発酵システムは広く普及しているので、高温乾式条件でも同程度の発酵が進んだことから、実用レベルでも高温乾式でのメタン発酵が十分経済的に進行することが期待される。

有機物組成の分析および腐植物質組成の分析から、高温乾式発酵においても易分解性の有機成分が消失し、腐植化の進んだ有機物が生成していたので、農耕地に散布しても安全な残渣が生成したと考えられる。

別実験で行った植害試験および雑草種子活性試験においても、高温乾式メタン発酵によって生成した残渣は作物(コマツナ)の発芽と初期生育を阻害せず、また雑草種子(エゾノギシギシ)を発酵期間中に殺していた。

これらのことから、高温乾式メタン発酵システムはメタン発酵の進行および安全な発酵残渣の生産という観点から有用なシステムであることが明らかとなった。

謝辞

本研究の遂行を支援して頂いた下記の機関に感謝する。

- 1) 独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構：研究の財政的支援
- 2) 北海道大学共通機器管理センター元素分析室およびアミノ酸分析室：元素分析およびアミノ酸分析の受託
- 3) 北海道バイオマスリサーチ株式会社：植害試験および雑草種子活性試験の受託
- 4) 株式会社ズコーシャ：研究の共同遂行