

# H27 年度 卒業論文

---

中性糖組成による乾式・湿式メタン発酵の追跡

環境農学ユニット所属 高見昂平

## 第1章 目的

メタン発酵は都市から廃棄される生ごみや下水汚泥、農畜産業では畜舎から排出される家畜ふん尿などの有機物を用いてバイオガスとして再利用可能にする技術であり、生成したメタンガスは電力・熱エネルギーとして利用できることからカーボンニュートラルとして近年世界的にも注目されている。

湿式発酵では水分含量の高い有機物を嫌気発酵により処理することが可能であり、畜舎から出る糞尿汚水の発酵に適しており、消化液は堆肥として農業利用ができる。しかし、繋ぎ飼い農家では敷料の割合が高く、低水分の糞尿が発生するため導入が難しい。乾式発酵では固形成分濃度の高い有機物を投入できるため、この難点を解決することが可能である。また、発酵処理に大量の水を必要としないため、施設のコンパクト化と低廉化を期待することができる。乾式発酵技術の有用性が確立されれば、このような農家にもメタン発酵施設を導入することが可能となる。

本研究では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、乾式・湿式発酵における中性糖組成の変化をセルロース・非セルロース性糖の定量により追跡した。

## 第2章 試料および方法

### (1) 供試試料

試料はズコーシャ様から提供して頂いたものを使用し、メタン発酵原料投入割合は乳牛糞8：種汚泥2の割合とし、試験区を4つに分けた。

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) 試験方法

#### (2-1) 非セルロース糖の抽出・分析方法

##### ① 硫酸化加水分解

10ml ネジロガラス試験管に供試試料20mgをとり、1M硫酸1.5mlを添加し、1時間放置後、テフロンパッキン入りスクリュウキャップで密栓して100℃で3時間加熱した。水道水で冷却後、15Mのアンモニア溶液0.3ml添加し、アンモニア濃度を1Mとした。その後、内部標準としてミオイノシトール(5mg/mL)溶液を0.1ml添加した。

##### ② 硫酸塩除去

ここに2-プロパノール9mlを添加し、内容物を12ml用高速遠心管に移し、10000回転で10分間遠心分離した。遠心分離後の上澄み液を100mlのナスフラスコに移し、沈殿残渣はセルロース性糖抽出のために冷蔵庫に保存した。その後、上澄み液をロータリーエバポレーター40℃で蒸発乾固し、蒸発後残渣に2%水素化ホウ素ナトリウム-DMSO溶液を1ml添加し、40℃の恒温乾燥器中で1時間以上還元した。

##### ③ 標準単糖類溶液の調整

内部標準：2-デオキシグルコース 50mg/50ml

単糖溶液：キシロース、グルコース、ラムノース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、リボース、フコース、各50mg/50ml

これらを(表1)のように調整し、スタンダードとした。

表 1

	内部標準	単糖類混液
Std0.5	0.50ml	0.25ml
Std1.0	0.50ml	0.50ml
Std1.5	0.50ml	0.75ml
Std2.0	0.50ml	1.00ml

## ④ ほう酸のメチル化による除去及びアセチル化

高温乾燥器から取り出し、18M 酢酸とメタノールの混液(1:10)を 10ml 添加して過剰の水素化ほう素ナトリウムを分解し、エバポレーターを用いて 40°C で濃縮乾固した。その後、水素化ほう素ナトリウム還元した試料液に 1 メチルイミダゾール 0.3ml 及び、無水酢酸 3ml を添加した。40°C の高温乾燥器中で 1 時間加熱した。

## ⑤ 反応液の精製

無水酢酸によるアセチル化後の溶液を 18ml ガラス試験管に移し、9ml 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 層に分かれ、上層にエチルエーテルでアセチル化した糖が抽出されているので、下層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てここに超純水 5ml を添加した。再度ボルテックスミキサーで攪拌したのち、水層を除去した。試験管中に残ったエチルエーテル溶液に 5ml の 2-プロパノールを添加して 10ml ナシ型フラスコに移してロータリーエバポレータで蒸発留去し、その後蒸発残渣を 500  $\mu$ l のアセトンに溶解し、2  $\mu$ l をキャピラリーガスクロに注入してピーク面積を測定した。

## (2-2) ガスクロの分析条件

ガラスキャピタリグラム Chrompack CP-Sil 43CB (内径 0.25mm $\times$ 25m 膜厚 0.2  $\mu$ m) を使用したスプリットモードで 1  $\mu$ 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 10mm/min とした。検出器の感度は range1 で atten2 でも十分なピークの高さが得られた。

## (2-2) セルロース性糖抽出・分析方法

非セルロース性糖抽出における硫酸加水分解後の残渣に 72%硫酸(w/w)125  $\mu$ l を添加して 1 時間放置後、1.35ml の水を加え、硫酸濃度を 1M としたのち、

100°Cで3時間加熱した。冷却後、15Mのアンモニア溶液0.3mlを添加して、アンモニア濃度を1Mとした。その後、内部標準として2-デオキシグルコース溶液を1ml添加した。その後の操作は非セルロース性糖抽出と同様に行った。

#### (2-3)全糖抽出・分析方法(筒木.2014)

全糖の分析結果は2014年度における筒木の「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」を参考にした。

#### (2-4)トリフルオロ酢酸分解

非セルロース性糖抽出はAmelungら(1996)に従い4N-トリフルオロ酢酸による加水分解も行った。

10mlネジロガラス試験管に試料50mgをとり、内部標準としてミオイノシトール0.1mlを加え、その後4N-トリフルオロ酢酸5mlを添加してテフロパッキンを入れたネジ栓で密栓し100°Cで4時間過熱した。内容物を12ml高速遠心管に移し、10000rpmで10分間遠心分離した。

イオン交換樹脂BioRad社AGMP50、Amberlite社XAD-7HPを使用してカラムを調整した(図1)。

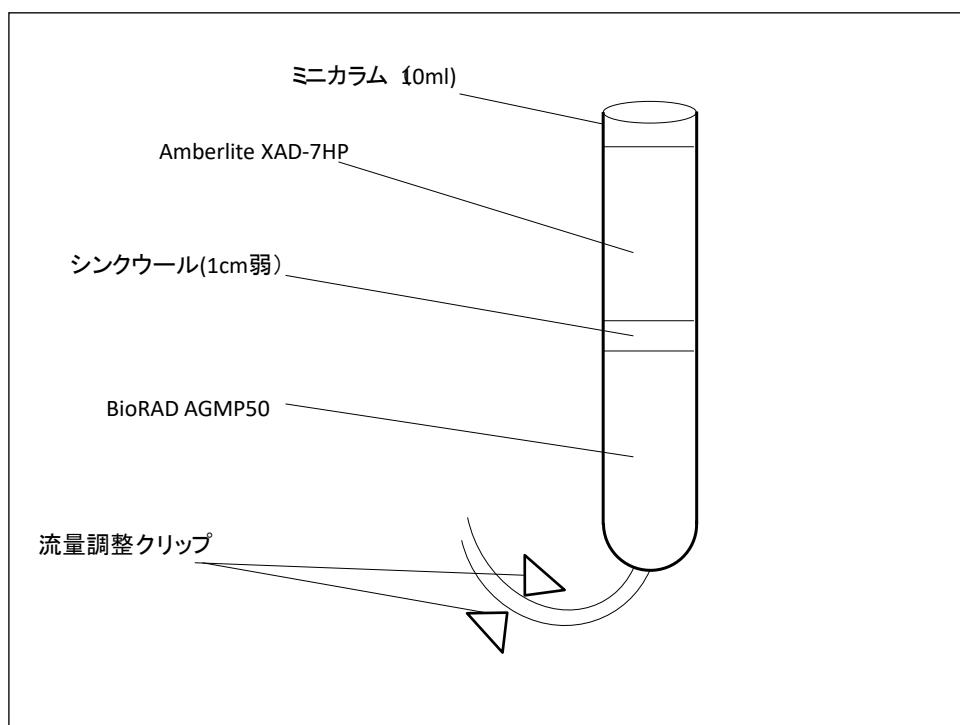


図 1

遠心分離後の上澄みをカラムに流し込み、XAD-7HPにより腐食物質を除去した後、AG-MP50によりアミノ糖を除去した。残渣の入った高速遠心管に超純水 5ml を添加し、10000rpm で 10 分間遠心分離し、再度上澄みをカラムに流しこんだ。その後、カラムに純水 5ml を 4 回添加し、ろ液を 30ml にして 30ml 共栓付きフラスコに保存した。また、使用後カラムについても冷凍庫中に保存した。

保存しておいたろ液 30ml から 15ml をマイクロピペットで 100ml ナスフラスコに移し、ロータリーエバポレーターで蒸発乾固後、アンモニア水 0.3ml 添加した。その後 2%水素化ホウ素ナトリウム-DMSO を 1ml 添加して 40℃の高温乾燥機中で一夜放置した。その後の操作は非セルロース性糖抽出(③以降)と同様に行った。標準単糖類溶液は以下に記載する。

#### (2-5)標準単糖類溶液の調整

内部標準：ミオイノシトール 50mg/50ml

単糖溶液：キシロース、グルコース、ラムノース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、リボース、フコース、各 50mg/50ml

これらを（表 2）のように調整し、スタンダードとした。

表 2

	内部標準	単糖類混液
Std0.5	0.50ml	0.25ml
Std1.0	0.50ml	0.50ml
Std1.5	0.50ml	0.75ml
Std2.0	0.50ml	1.00ml

### 第3章 結果及び考察

メタン発酵残渣からはセルロース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、フコース、リボースが検出された。本論文では各抽出糖の発酵様式ごとの組成変化を比較し考察する。比較には本研究で抽出したセルロース性糖、非セルロース性糖、TFA 分解糖及び、昨年度の指導教員による研究で抽出した全糖を使用した。

#### (1) グルコース

植物・微生物双方由来の糖であるグルコースはセルロース性糖の含有量が他糖に比べて高く、また非セルロース糖も多く含まれている。グルコースは全ての様式において0~5日目にかけてセルロース性糖及び非セルロース性糖の初期分解が顕著に見られ、高温湿式ではそれが特に顕著であった。これは分解されやすい多糖類に含まれるグルコースが発酵初期に微生物の基質となり、非セルロース性糖およびセルロース性糖の易分解性部分が発酵初期に急激に分解されたためであると考えられる。セルロース性糖はその後発酵中期に高温様式において大幅な濃度増加が起こっており、高温様式において他糖の分解が中温様式に比べ進行したと考えられる。

全糖の最終的なグルコースの分解量は高温湿式が最も多く、次いで中温湿式であった。乾式様式では非セルロース性糖の初期分解は湿式様式と同程度進んでいたためセルロース性糖の分解が遅れたと考えられる。

1M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>分解糖及びTFA分解糖は発酵初期に分解した後、濃度変化があまり見られないため、初期に非セルロース性糖の易分解性部分が分解された後、難分解性部分は発酵プロセスにおいて微生物の分解をあまり受けなかったものと考えられる。

#### (2) キシロース

キシロースはヘミセルロースの主成分であるキシランを構成するものとして植物に普遍的に存在しており、植物由来の糖であるためセルロース性糖が多く検出され、非セルロース性糖の割合も大きい。

キシロースは全糖分解において初期の5~15日において大きな濃度増加が見られ、発酵初期において糖分解が遅れていることがわかる。同時期にセルロース性糖の濃度増加が起きたことから、セルロース性糖の分解の遅れが全糖の濃度増加を反映したものであると考えられる。1M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>分解糖は初期の分解の後、中温乾式以外の様式では濃度低下が見られ、順調に分解が進行している。中温乾式では分解の遅れが見られるが、TFA分解糖では他様式と同様に分解が

進行しているので、計測値の誤差が発生したものと考えられる。

セルロース性糖は様式においても初期分解の後、中期で濃度増加、その後減少が起こっている。40日目以降は中温乾式において大きく濃度増加が確認できる。非セルロース性糖がどの様式においても同程度の分解が起こっていること、中温乾式の全糖分解が最も小さいことを考慮すると、キシロースの分解における各様式の差はセルロース性糖分解の進行差が大きく反映されていると考えられる。

### (3) アラビノース

アラビノースはキシロースと同様にヘミセルロースの構成糖であり、非セルロース糖の割合がセルロース糖よりも高い結果となった。

全糖においては初期分解の後、3~15日にかけて全様式で濃度上昇が起こっており、グルコース、キシロースなどの主要糖の分解よりも遅れていることが確認できる。その後は濃度減少が見られ、高温湿式で最も分解が大きく、次いで中温湿式が大きかった。1M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>分解糖では初期分解後、濃度増加せずにそのまま減少していくという経過を辿っており、非セルロース性糖の分解が比較的早かったのではないかと考えられる。例外的に高温乾式では発酵前期に濃度増加が確認できるが、TFA分解糖では多様式と同様に濃度減少していることから誤差であると考ええる。

セルロース性糖は高温様式においては初期分解の割合が大きかったが、中温様式では小さく、中温様式において糖分解が遅れていたと考えられる。

### (4) ラムノース

ラムノースの非セルロース糖は初期に増加して、中期に減少後、再度増加するという傾向を示した。ラムノースは微生物由来の糖の割合が高く、微生物活性が現れたものであると思われる。高温様式では濃度増加が顕著に見られることから、微生物の増殖が中温様式より活発に起こったと推測される。ラムノースに対するキシロースの比率では、発酵日数を経た後期に非セルロース糖の比率増加が見られ、分解されやすい植物由来の糖であるキシロースが減少し、微生物由来の糖であるラムノースが増加したものであると思われる。しかし、中温乾式では比率変化が乏しく、微生物活性が低いためにキシロースの分解があまり行われなかったのではないかと考える。

### (5) マンノース

マンノースは微生物の細胞壁に由来しているといわれ、ラムノースと近似した濃度変化となっており、微生物活性を表したものとなっている。キシロースに



対するマンノースの比率では後期に非セルロース糖の上昇が見られ、キシロースの分解が行われたことを示唆している。また、中温湿式ではセルロース型糖の比率が上昇していることから、キシロースの分解がマンノースよりも早いことが分かる。中温乾式ではラムノースと同様に比率変化が乏しく、微生物活性の低さが現れている。

#### (6)糖合計

どの様式においても全糖では前期の初期分解後、中期に濃度上昇して後期に減少するという経過をとった。これは糖の多くを占めるグルコース、キシロースも同様である。分解が最も大きかったのは高温湿式であり、次いで中温湿式、高温乾式、中温乾式の順となった。中温乾式は中期における濃度増加が他様式に比べ大きく分解が遅れたことがわかる。1M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>分解糖、TFA分解糖はどの様式でも同程度の分解がみられたが、セルロース糖では後期における著しい濃度増加が中温乾式において確認された。ここから、セルロース性糖の分解がメタン発酵のにおける各様式の糖分解速度にとって重要であると考えられる。

糖組成では初期のセルロース、ヘミセルロースの濃度上昇後、中期以降に濃度の低下が見られた。中でも主要糖であるグルコース、キシロースは他糖と比較して分解が早く起こっていた。湿式様式ではこれらの糖の分解がよく進み、微生物が活発に機能したと思われる。乾式様式では中温乾式においては糖分解があまり進行せず、微生物起源のアラビノース、マンノースの濃度増加も乏しかったことから、微生物活性が低かったと考えられる。しかし、高温乾式ではセルロース及びヘミセルロースの分解が進み、セルロースにおいては中温乾式と同程度の分解がみられたことから、糖分解においては湿式様式と同様に有用性が認められるものと考えられる。

本研究で定量したセルロース糖及び1M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>分解糖、TFA分解糖と前年度に定量した全糖では数値に大幅な差が見られることから、本研究の加水分解では抽出ができなかった糖が存在する可能性がある。今後の研究でそれらの糖を抽出することが可能になれば、より正確な比較が可能となる。

#### 第4章 参考文献

筒木潔「乳牛ふん尿メタン発酵の脂質・炭水化物およびリグニン組成.2014」

日本土壌肥料学会「土壌のバイオマスー土壌の量と代謝」

西尾道徳「土壌微生物の基礎知識」

Xudong Zhang,Wulf Amelung.1996

野池達也 「メタン発酵」

(1) グルコース

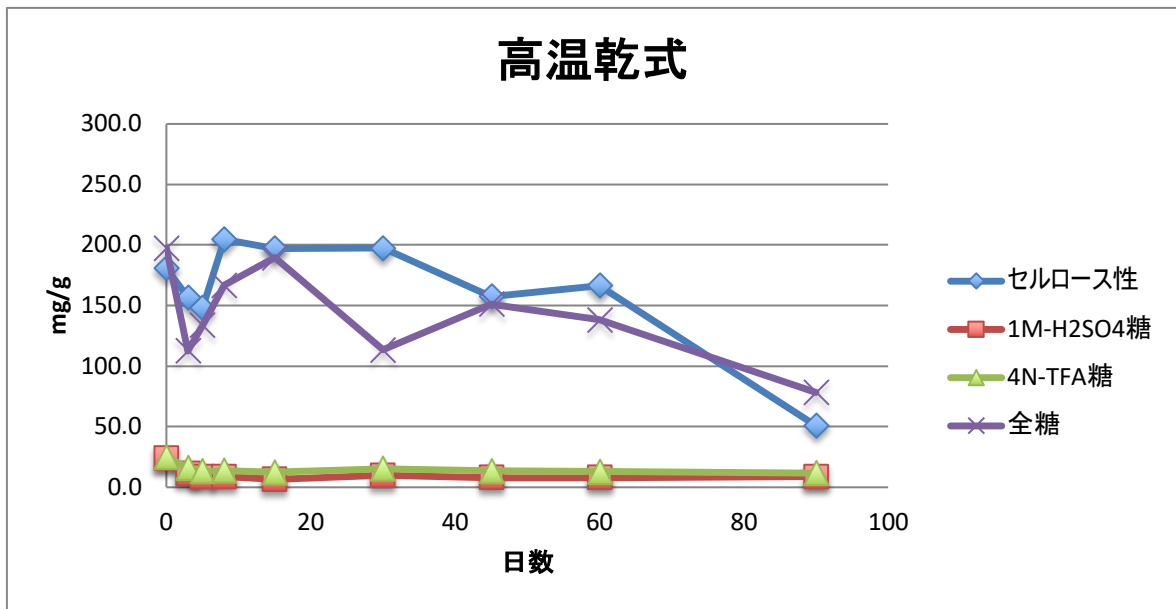


図 2-1 グルコースの消長 (高温乾式)

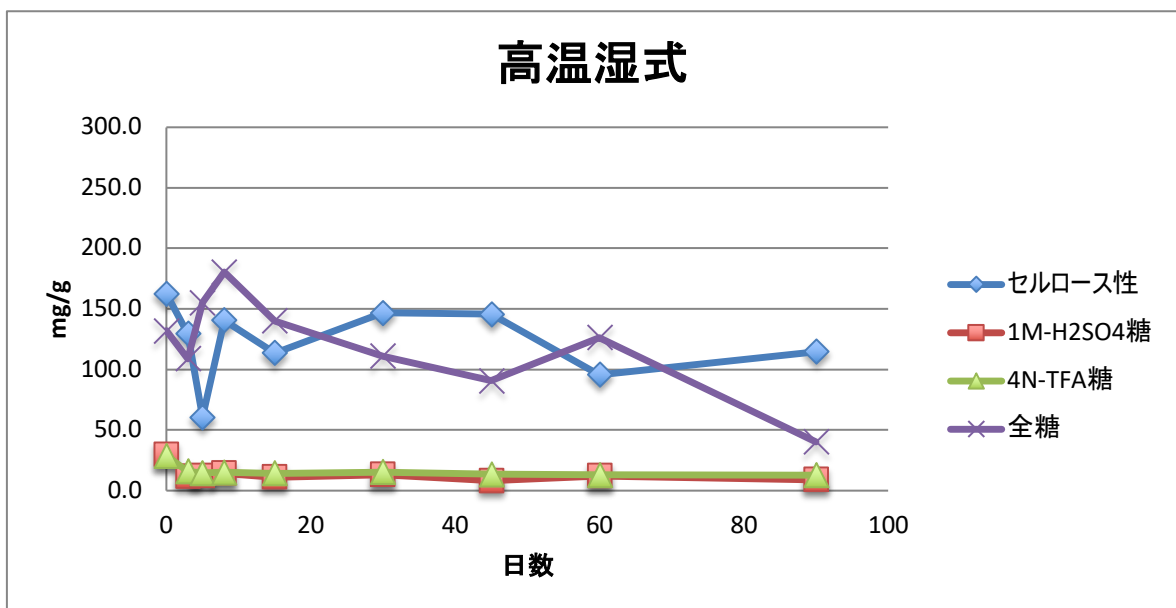


図 2-2 グルコースの消長 (高温湿式)

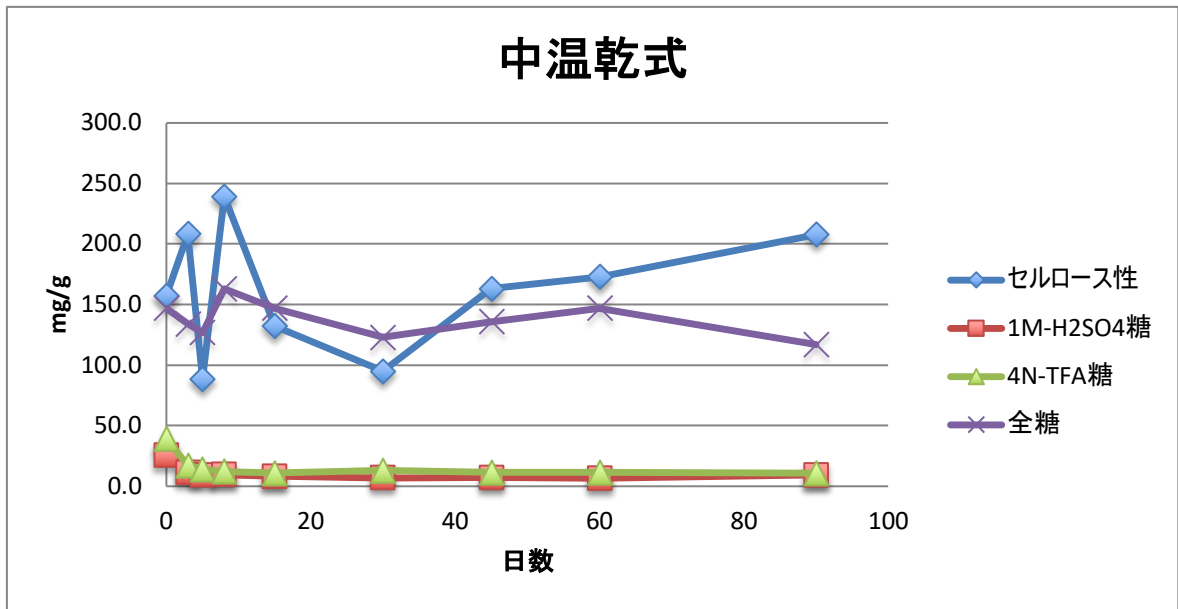


図 2-3 グルコースの消長 (中温乾式)

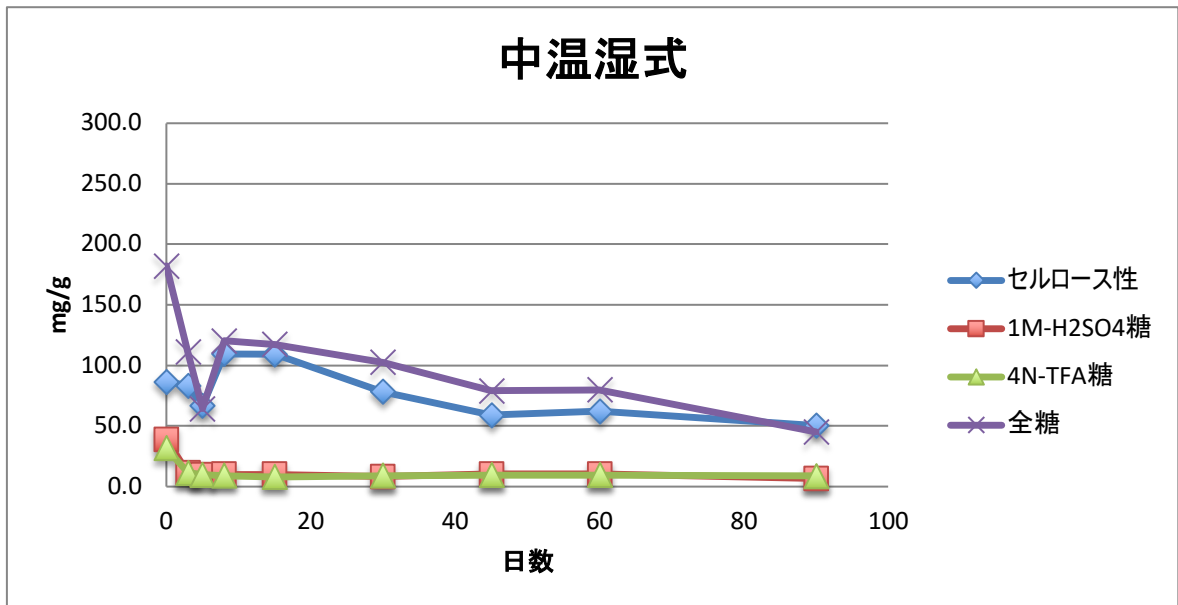


図 2-4 グルコースの消長 (中温湿式)

(2) キシロースの消長

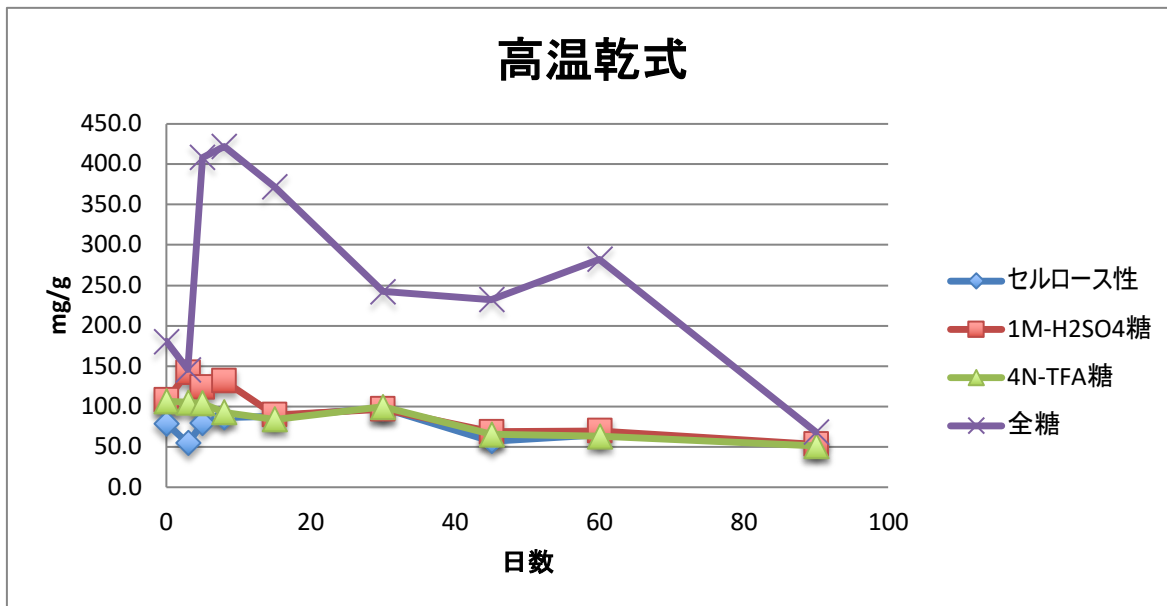


図 3-1 キシロースの消長 (高温乾式)

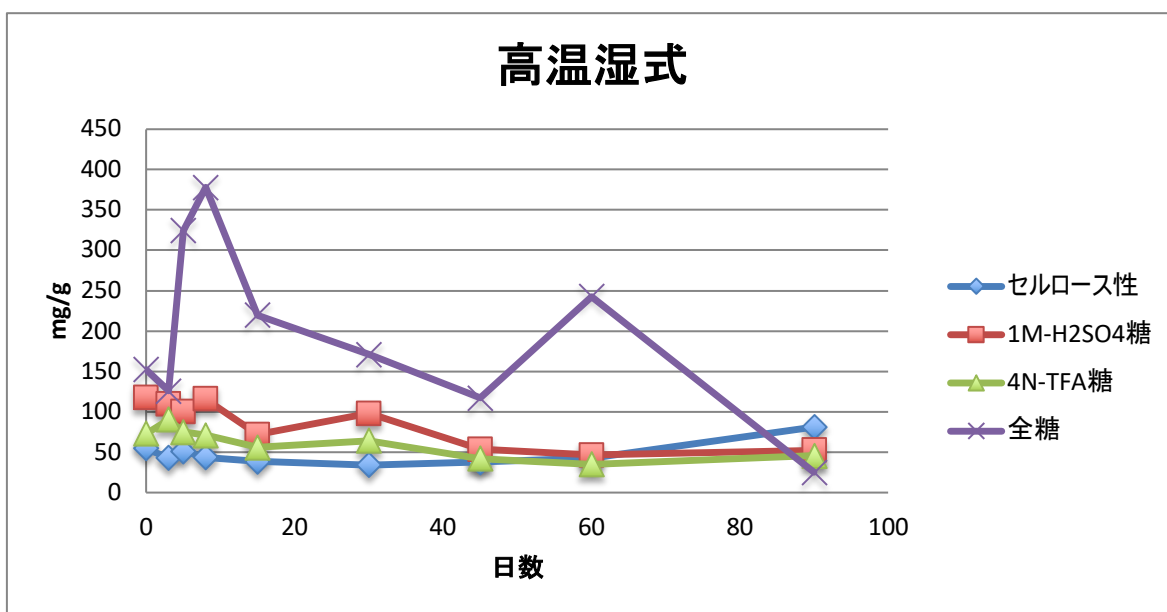


図 3-2 キシロースの消長 (高温湿式)

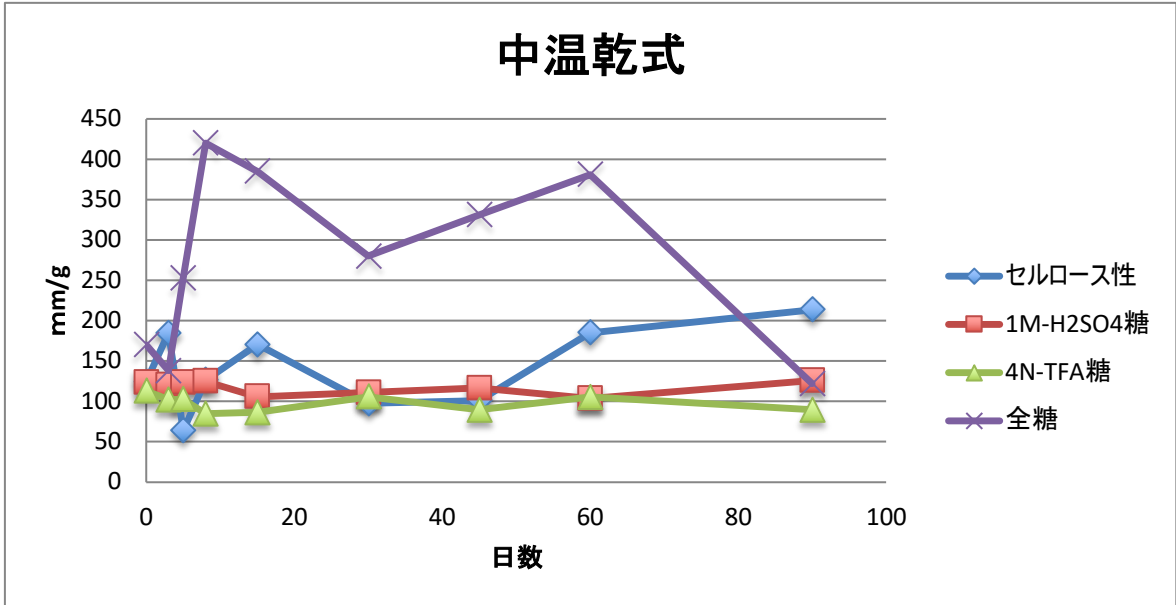


図 3-3 キシロースの消長 (中温乾式)

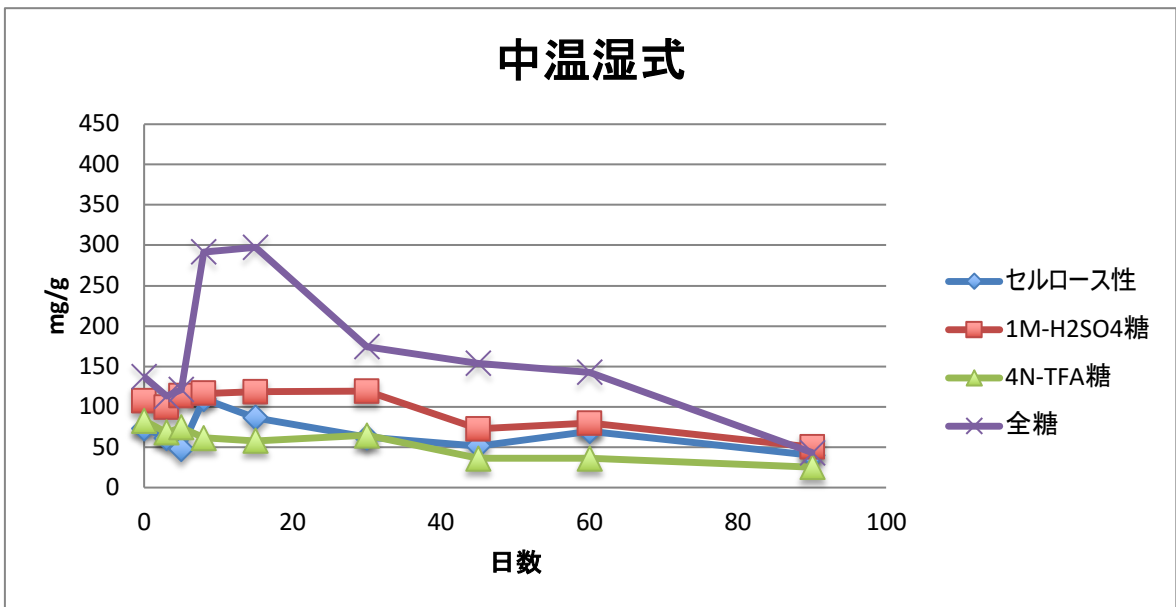


図 3-4 キシロースの消長 (中温湿式)

(3) アラビノースの消長

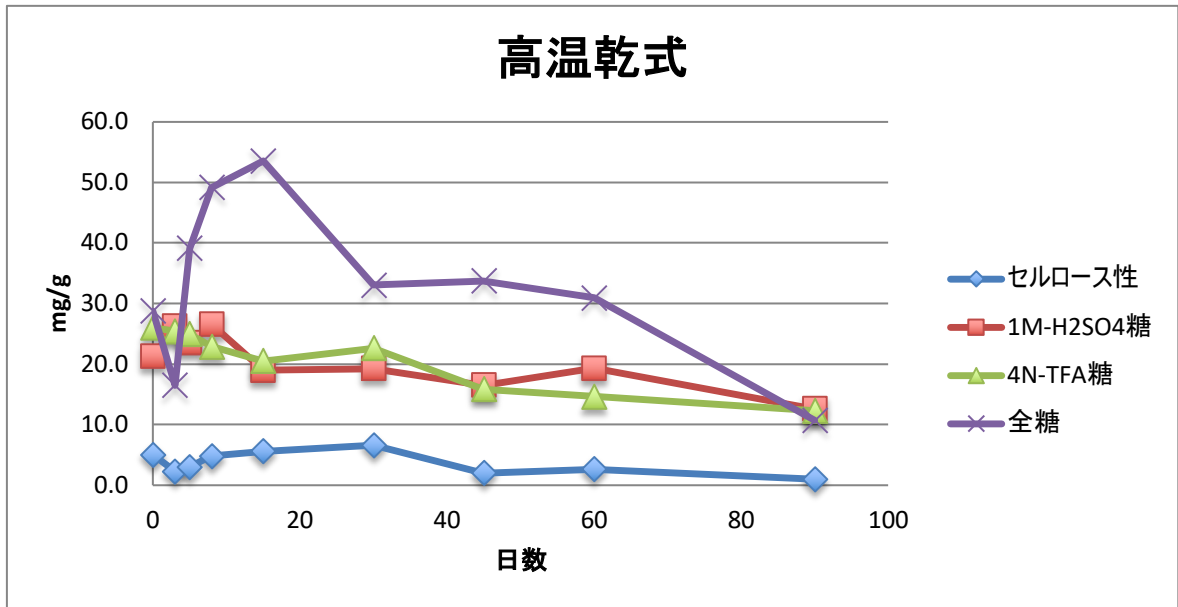


図 4-1 アラビノースの消長 (高温乾式)

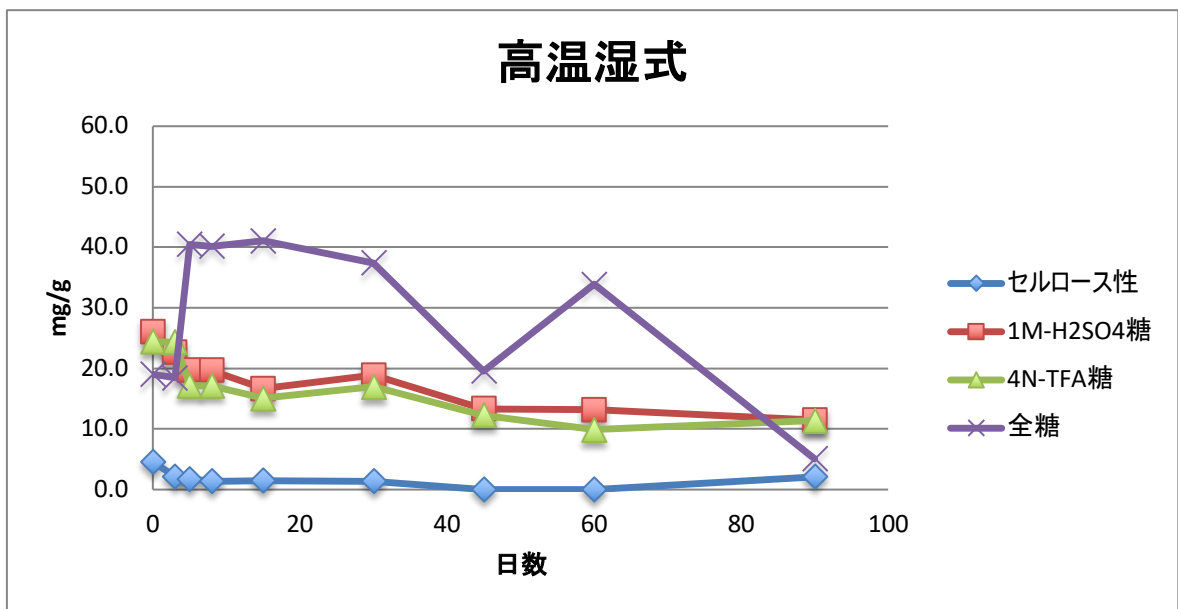


図 4-2 アラビノースの消長 (高温湿式)

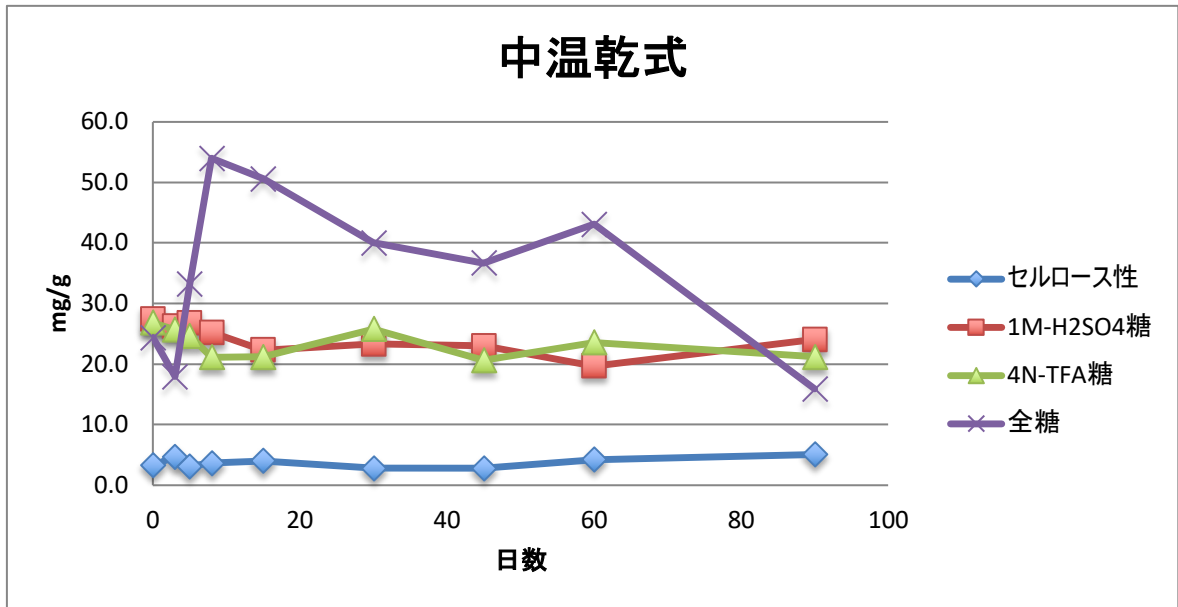


図 4-3 アラビノースの消長 (中温乾式)

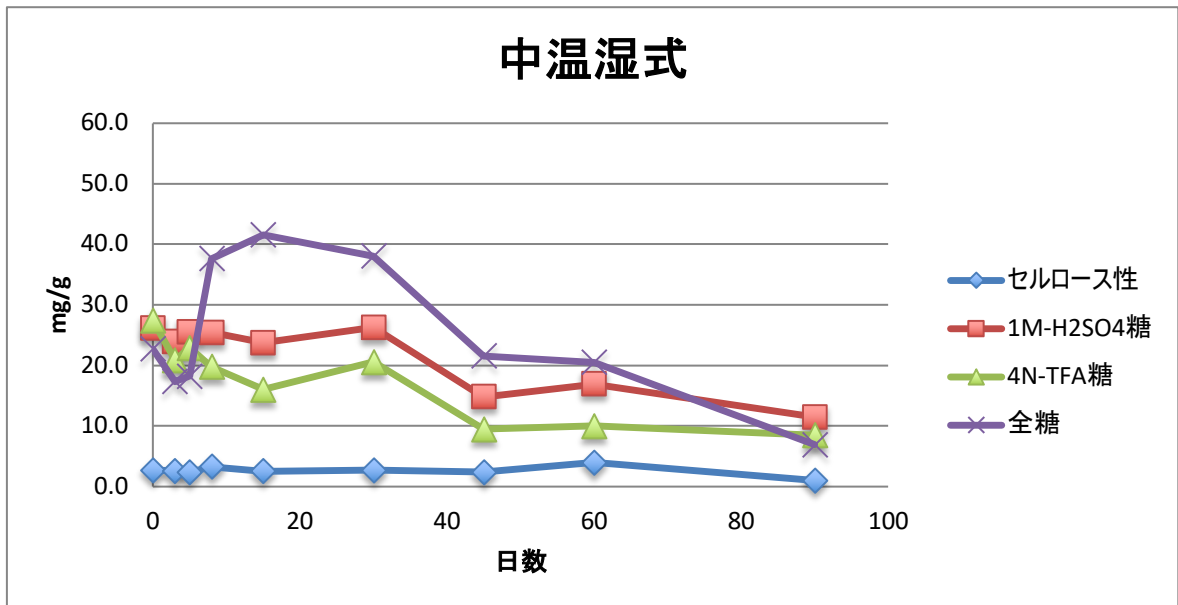


図 4-4 アラビノースの消長 (中温湿式)



(3) ラムロースの消長

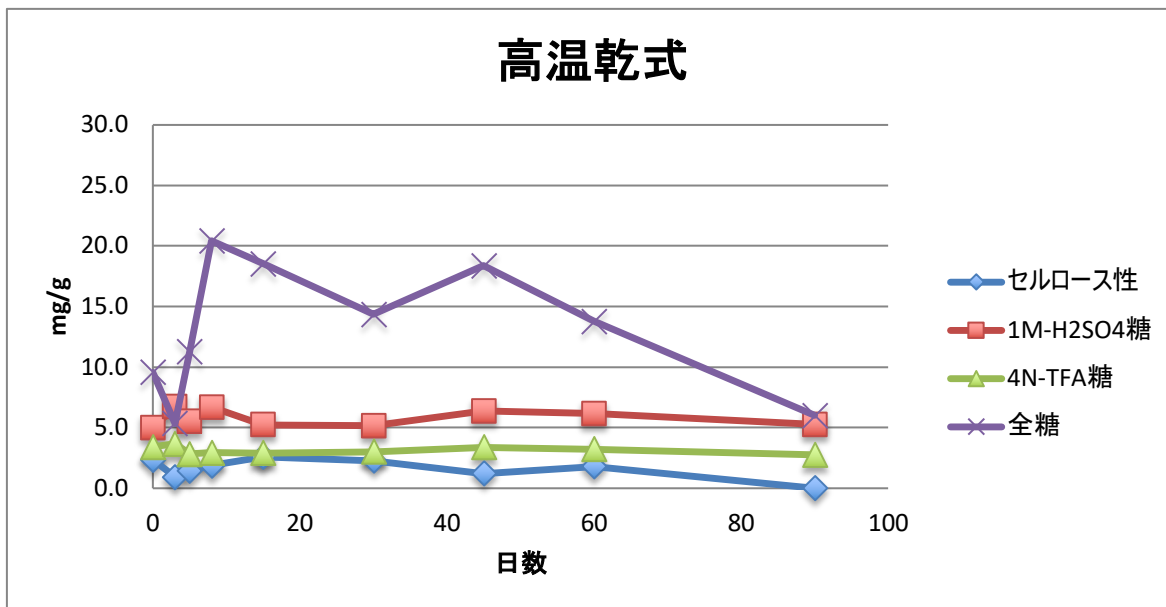


図 5-1 ラムロースの消長(高温乾式)

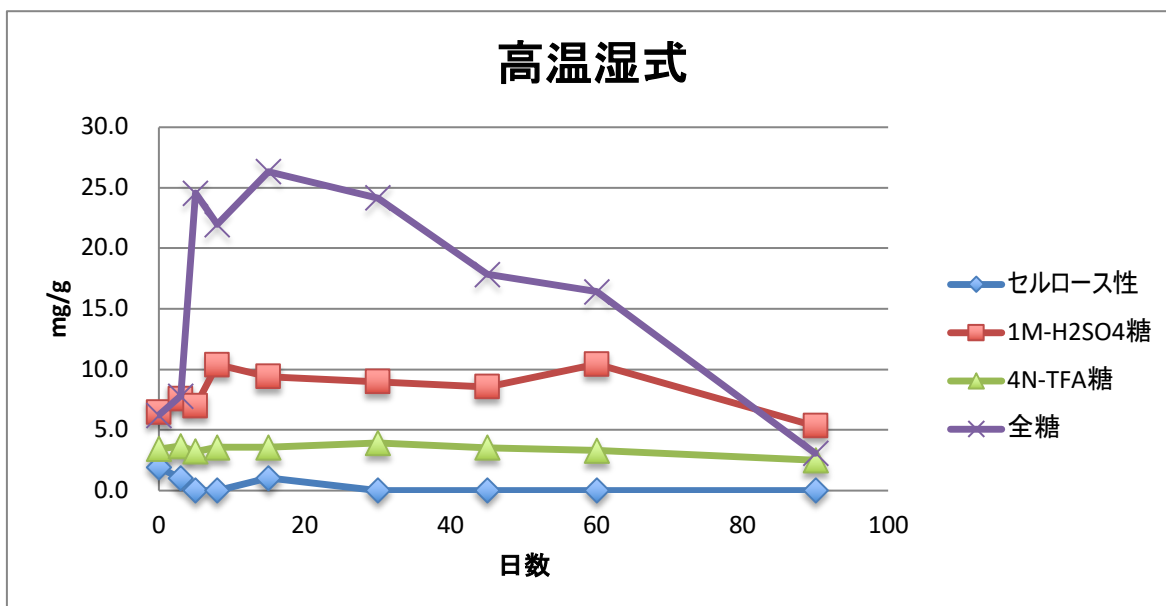


図 5-2 ラムロースの消長(高温湿式)

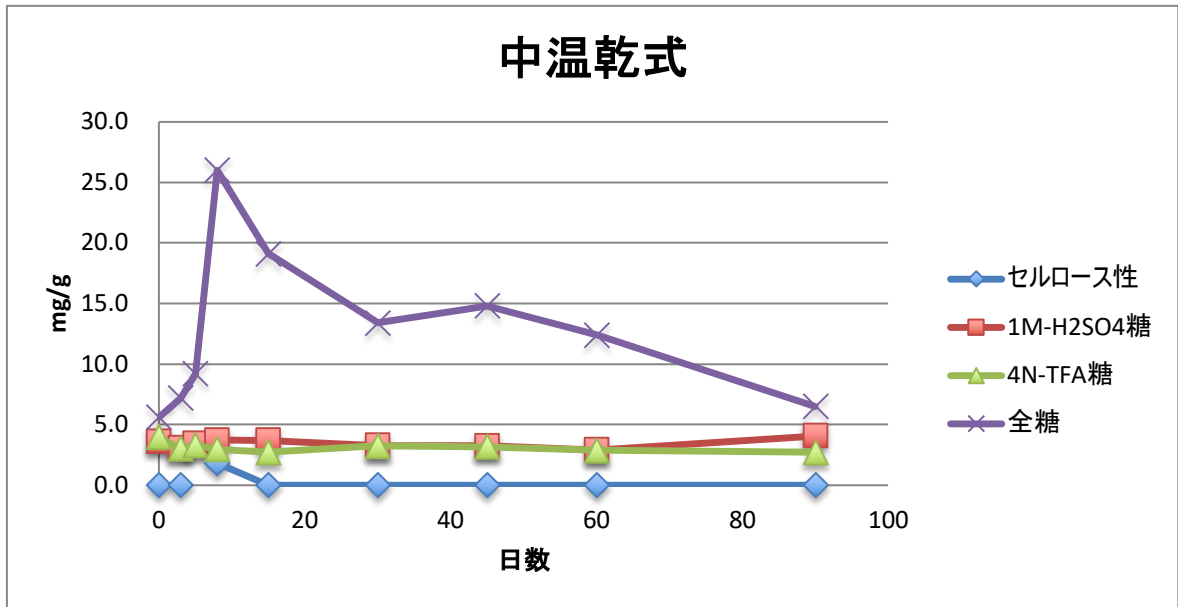


図 5-3 ラムローズの消長(中温乾式)

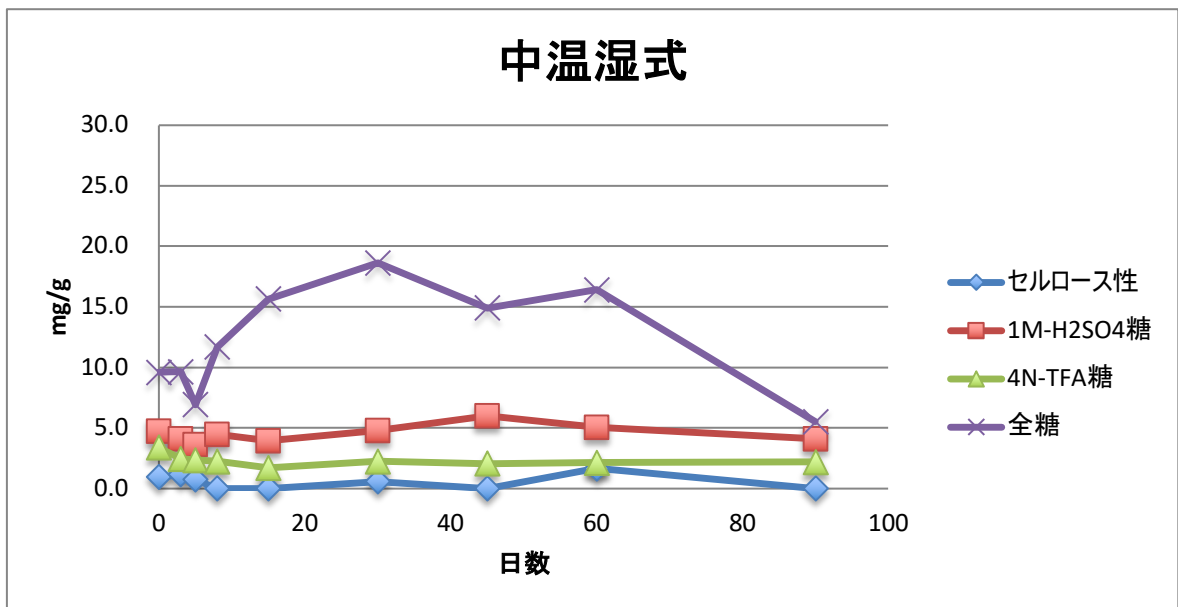


図 5-4 ラムローズの消長(中温湿式)

(4) マンノースの消長

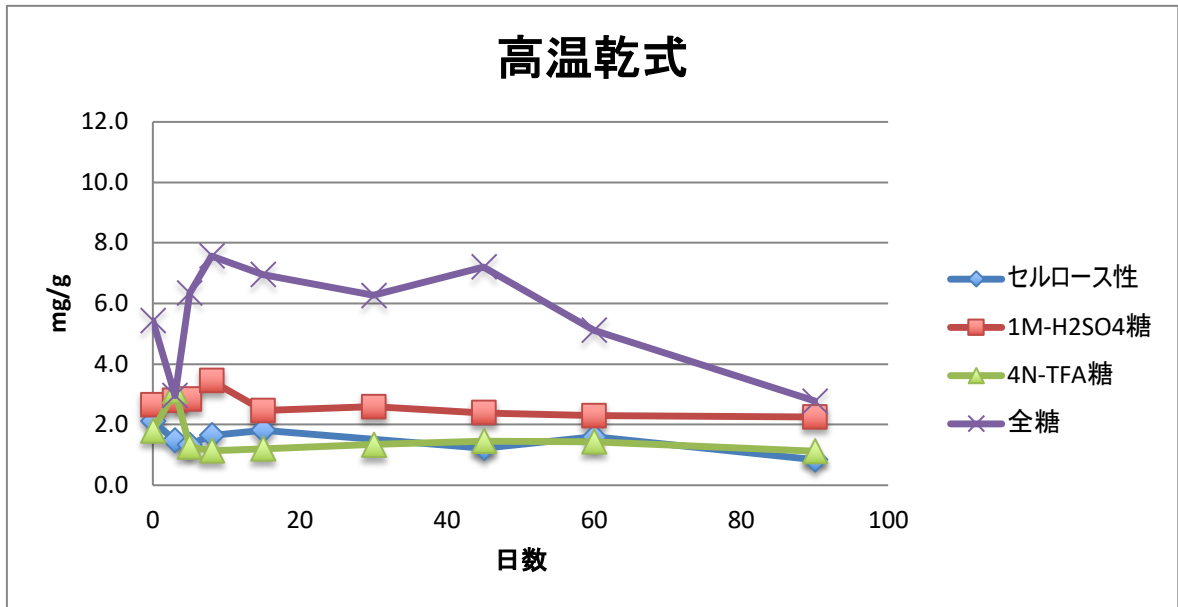


図 6-1 マンノースの消長 (高温乾式)

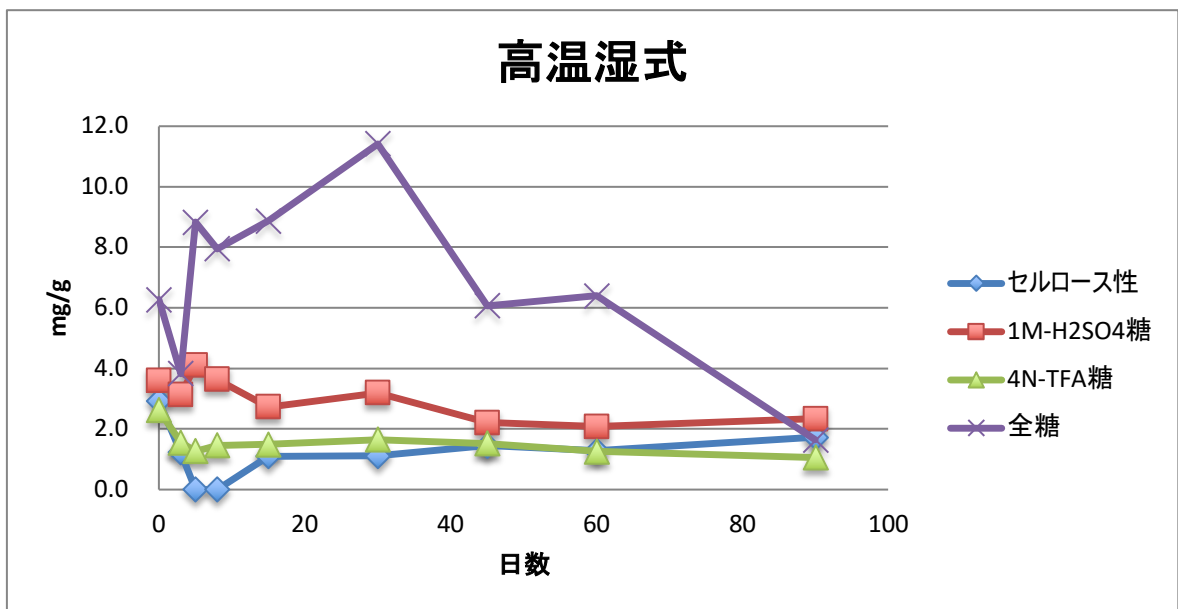


図 6-2 マンノースの消長 (高温湿式)

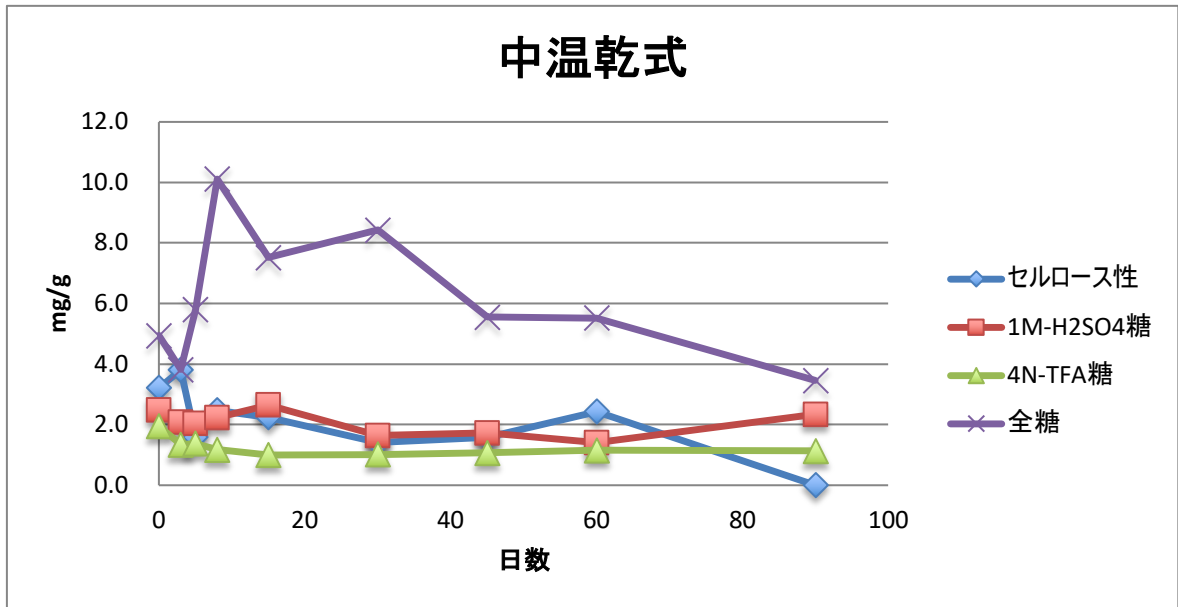


図 6-3 マンノースの消長 (中温乾式)

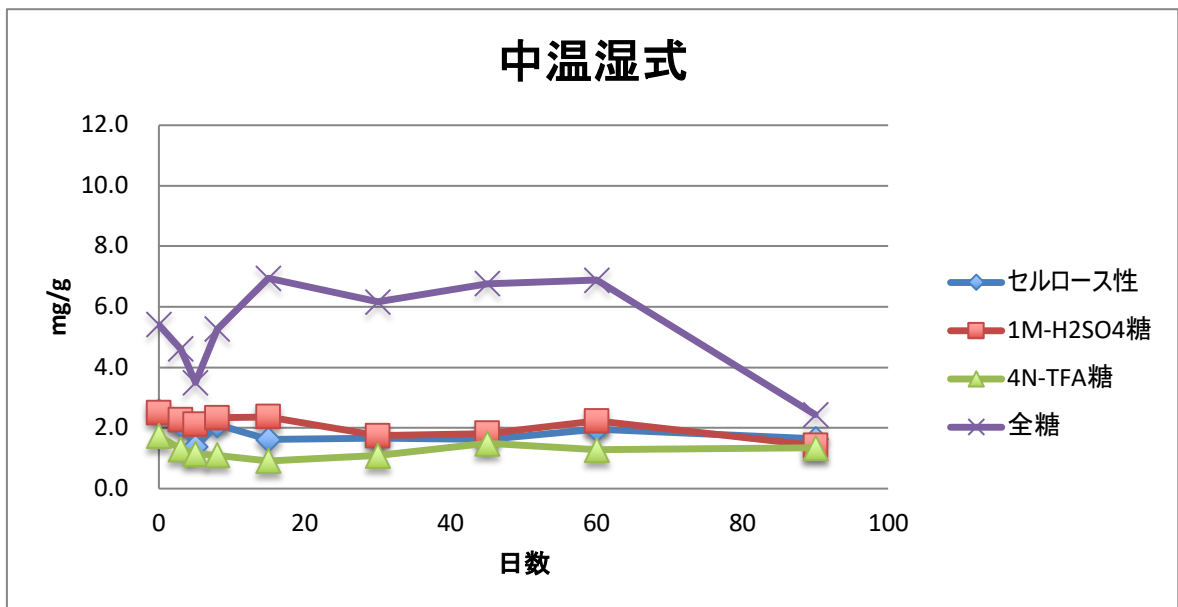


図 6-4 マンノースの消長 (中温湿式)

(5) ガラクトースの消長

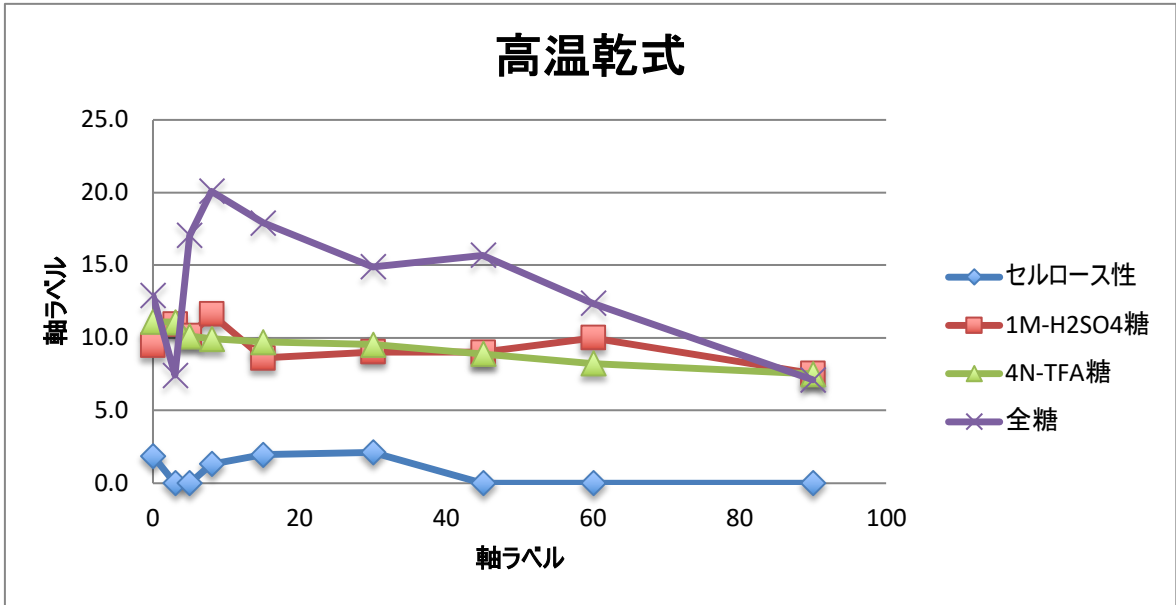


図 7-1 ガラクトースの消長 (高温乾式)

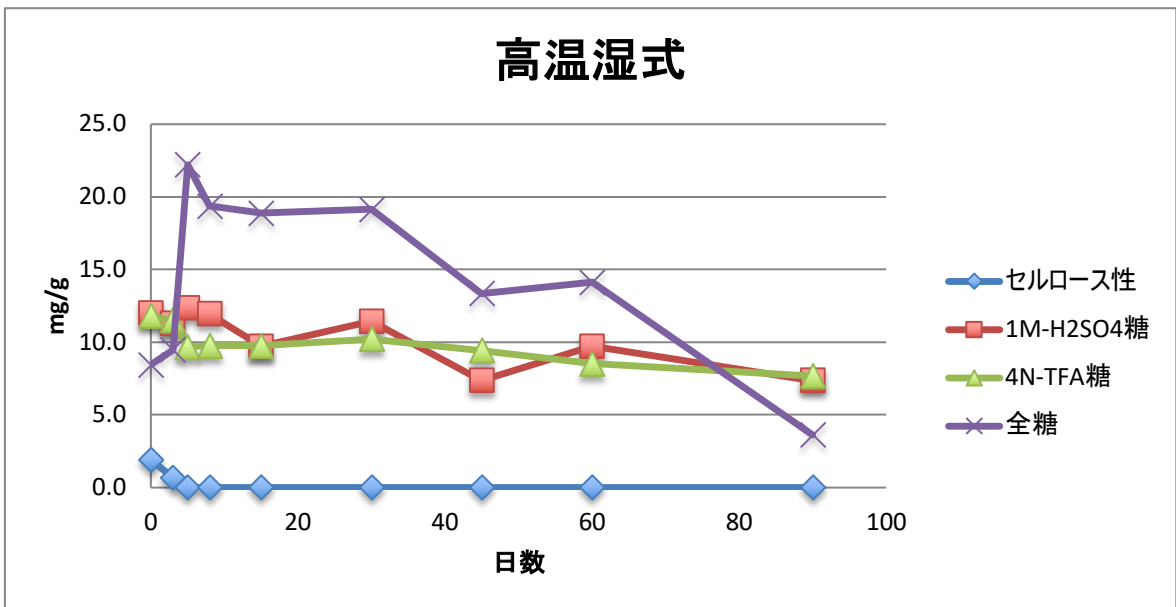


図 7-2 ガラクトースの消長 (高温湿式)

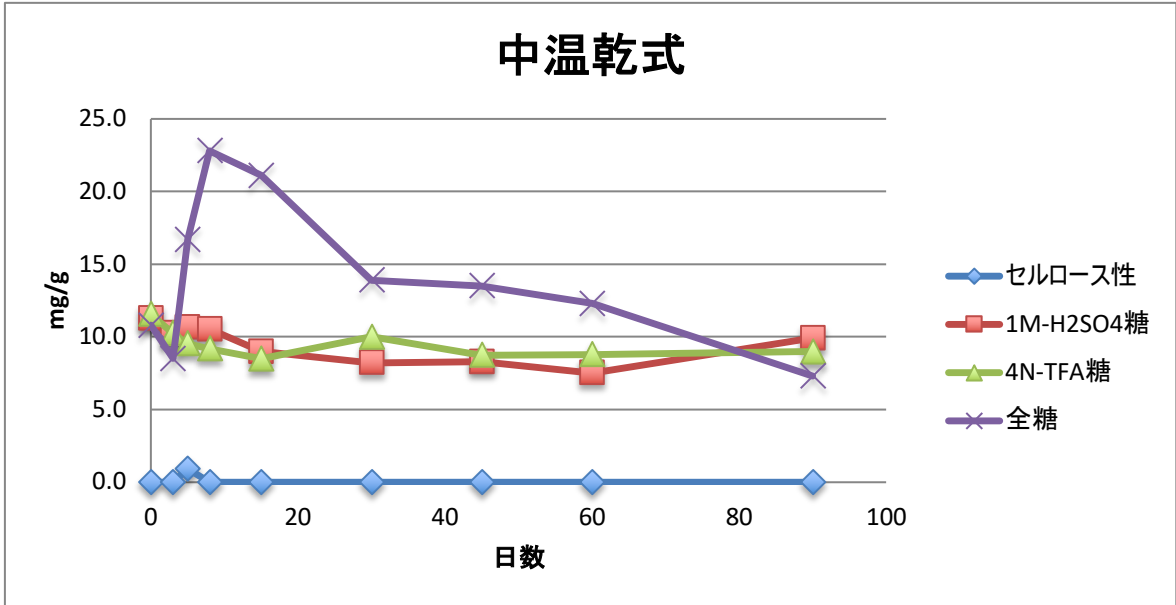


図 7-3 ガラクトースの消長 (中温乾式)

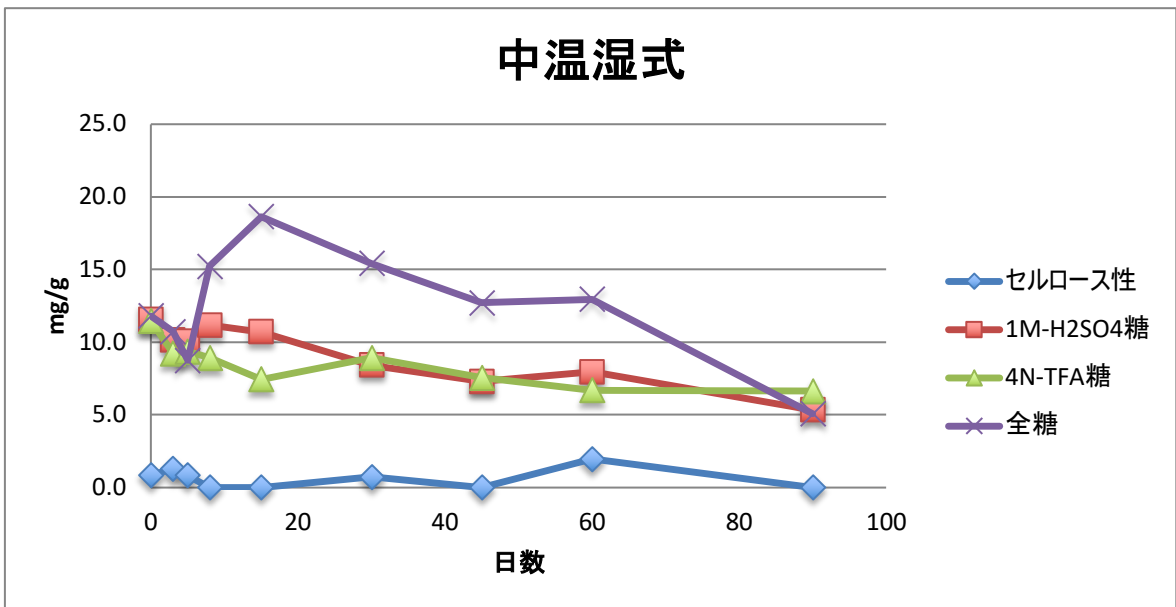


図 7-4 ガラクトースの消長 (中温湿式)

(6) 糖合計の消長

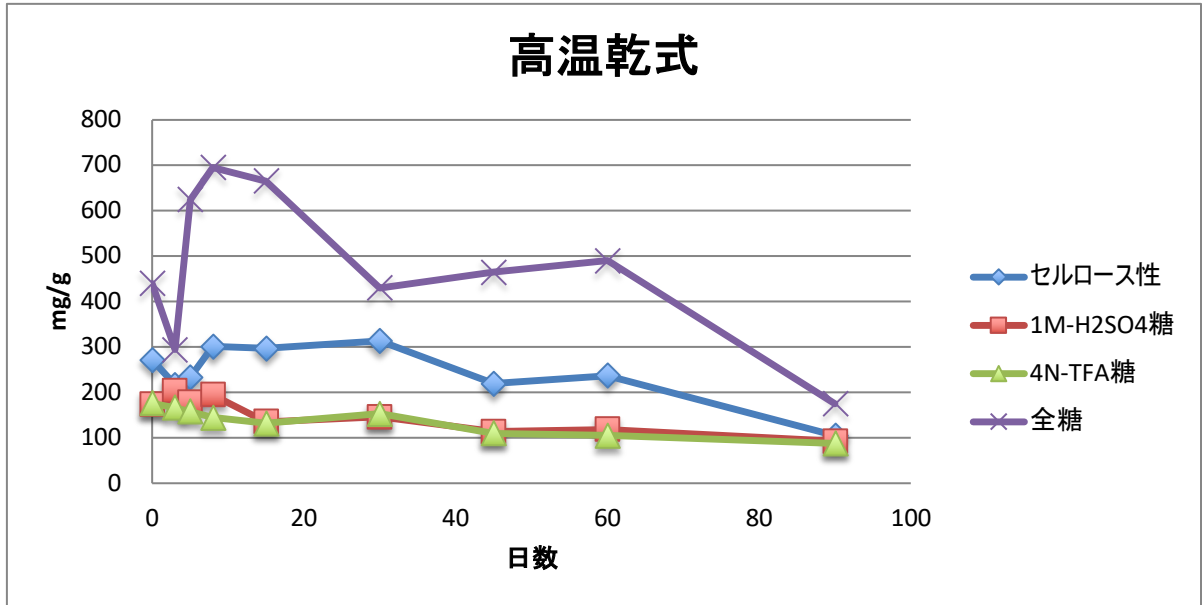


図 8-1 糖合計の消長 (高温乾式)

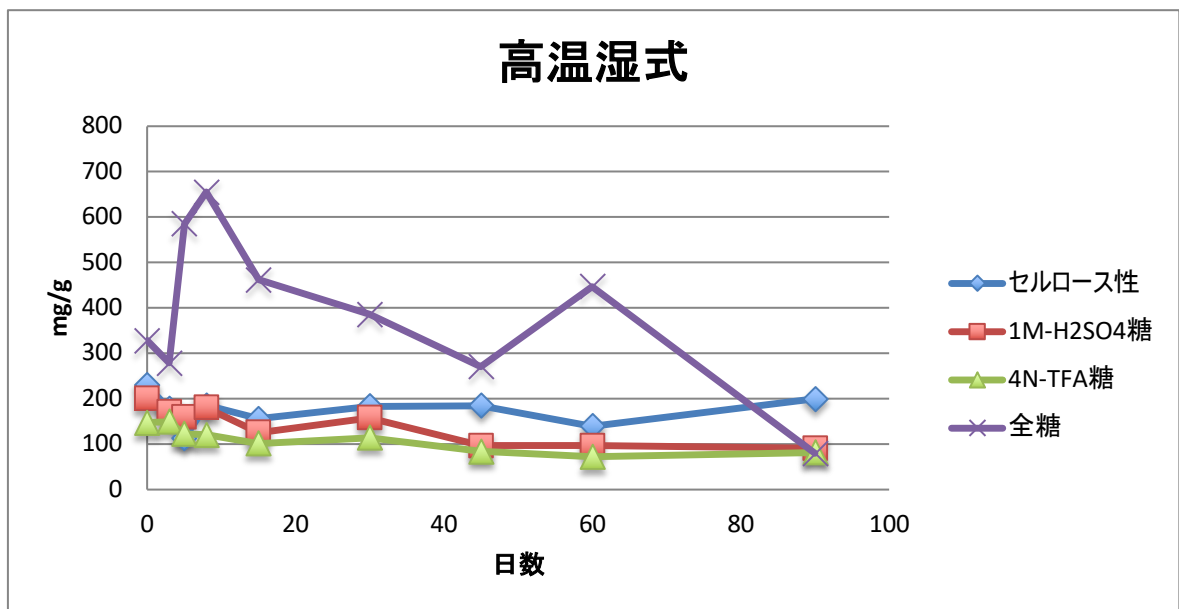


図 8-2 糖合計の消長 (高温湿式)

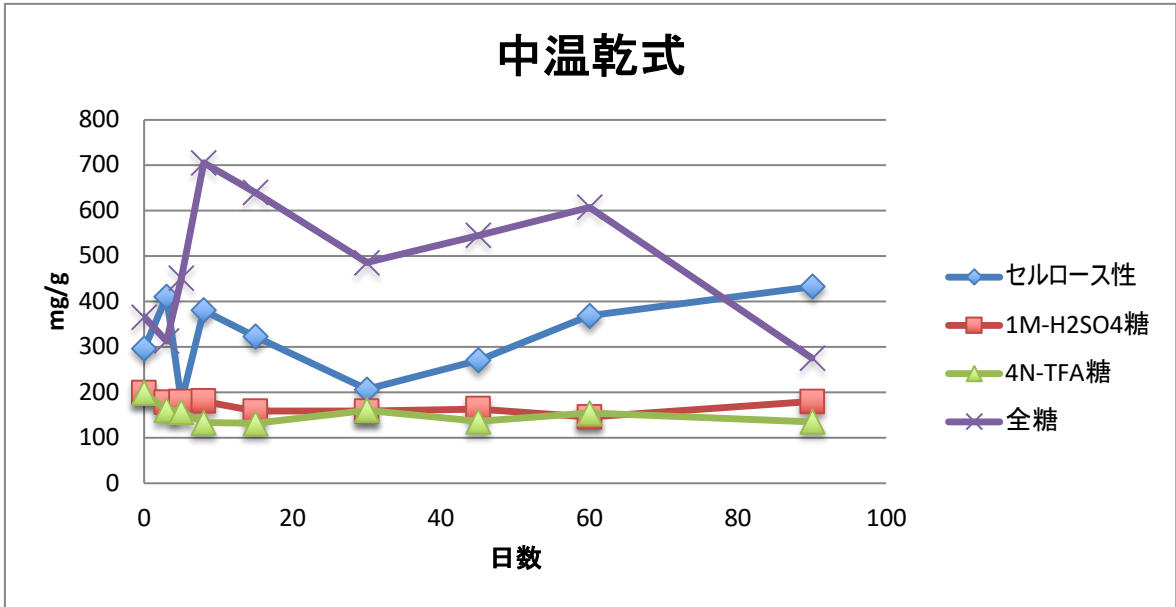


図 8-3 糖合計の消長 (乾式)

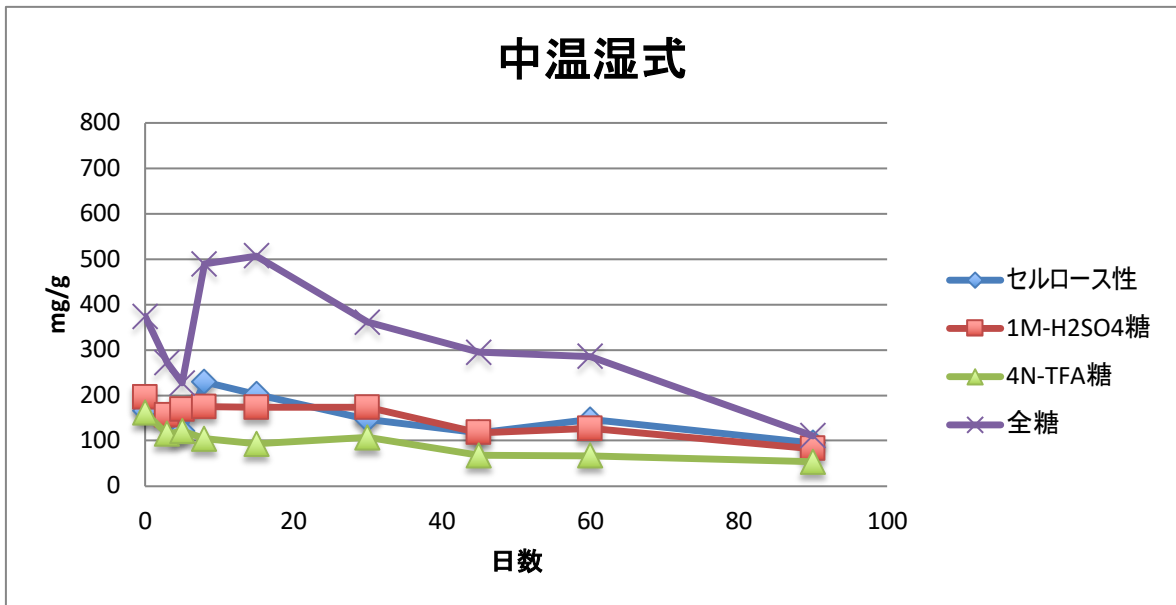


図 8-4 糖合計の消長 (中温湿式)