

2015 9/10

乳牛ふん尿メタン発酵残渣の糖組成 — 各種分解方法による比較

筒木 潔 (帯広畜産大学)

保井聖一(北海道エア・ウォーター株式会社)

廣永行亮 河原畑正也 塩飽宏輔 (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
- * 第5報：脂肪酸および糖組成定量法の改良
日本腐植物質学会2014年度東京大会
- * 第6報：全糖組成の変化
日本土壌肥料学会北海道支部2014年度秋季大会

目的

- * 飼料および敷きわら中の多糖類は乳牛ふん尿の主成分であり、メタン発酵における主要な基質でもある。
- * 乳牛ふん尿中の多糖類はヘミセルロース、セルロース、微生物由来の多糖類などからなり、これらの分解と生成経過を知ることは、各種メタン発酵システムの特徴を明らかにするうえで役に立つ。

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℃	>90%
② 中温・乾式	38℃	<85%
③ 高温・湿式	55℃	>90%
④ 高温・乾式	55℃	<85%

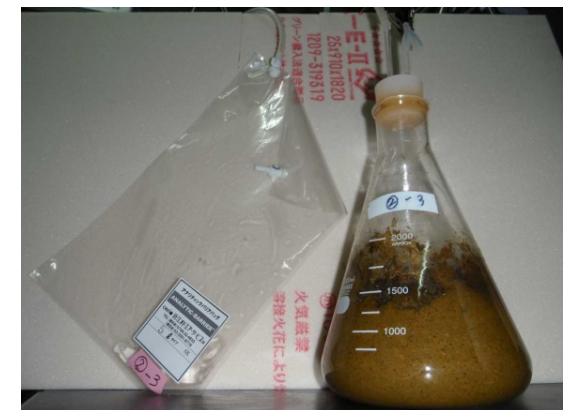
2. 原料投入割合

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



全糖組成の定量法

メタン発酵残渣（凍結乾燥後）15 – 20 mg

Blakeneyら(1983)

1本の試験管中で、
植物体の加水分解、
NaBH₄還元、アル
ジールアセチル化
を可能にした方法

12 M 硫酸 125 μ L 室温 45 min
純水 1.35 mL 添加、100°C 3 hr
ミオイノシトール 0.5 mg 添加
アンモニアで中和

2-プロパノール 9 mL 添加
遠心分離 10,000 rpm 10 min

本法での改良点

上澄液

濃縮乾固

2 % NaBH₄ / DMSO 1 mL 40°C 2 hr

酢酸:メタノール(1:10) 10 mL

濃縮乾固

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

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

0.5M および 12M 硫酸による 逐次加水分解法 (Oades et al 1970)

メタン発酵残渣 (凍結乾燥後) 15 – 20 mg

0.5 M 硫酸 1.5 mL 100°C 3 hr
デオキシグルコース 0.5 mg 添加(内標)

遠心分離

上澄液

易分解性糖

残渣
(凍結乾燥)

12 M 硫酸 125 μ L 室温 40 min
ミオイノシトール 0.5 mg 添加(内標)
純水 1.35 mL 100°C 3 hr

セルロース性糖

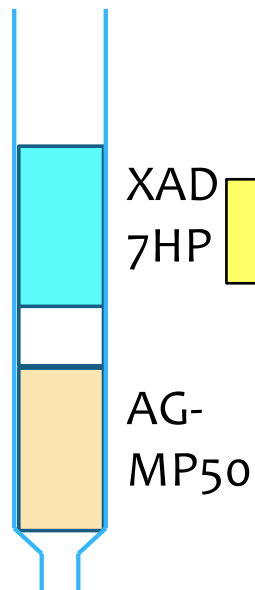
アンモニアで中和
2-プロパノール 添加・遠心分離
濃縮乾固
還元・アセチル化

キャピラリーガスクロ分析

4 Nトリフルオロ酢酸 (TFA) による ヘミセルロース加水分解法 (Amelung et al. 1996)

メタン発酵残渣 (凍結乾燥後) 約50 mg

4 Nトリフルオロ酢酸 5 mL 105°C 4 hr
ミオイノシトール0.5 mg 添加(内標)
遠心分離 10000 rpm 10 min



上澄液

プラスチック製イオン交換カラム(径10 mm)にBio-Rad AG-MP50を3cm、シリカウールを1cm、Amberlite XAD 7HP 3cm 下から順に充てんし、上澄み液を通過させる。

2-プロパノール 添加、減圧乾固
アンモニア水0.3 mL で中和
還元・アセチル化

キャピラリーガスクロ分析

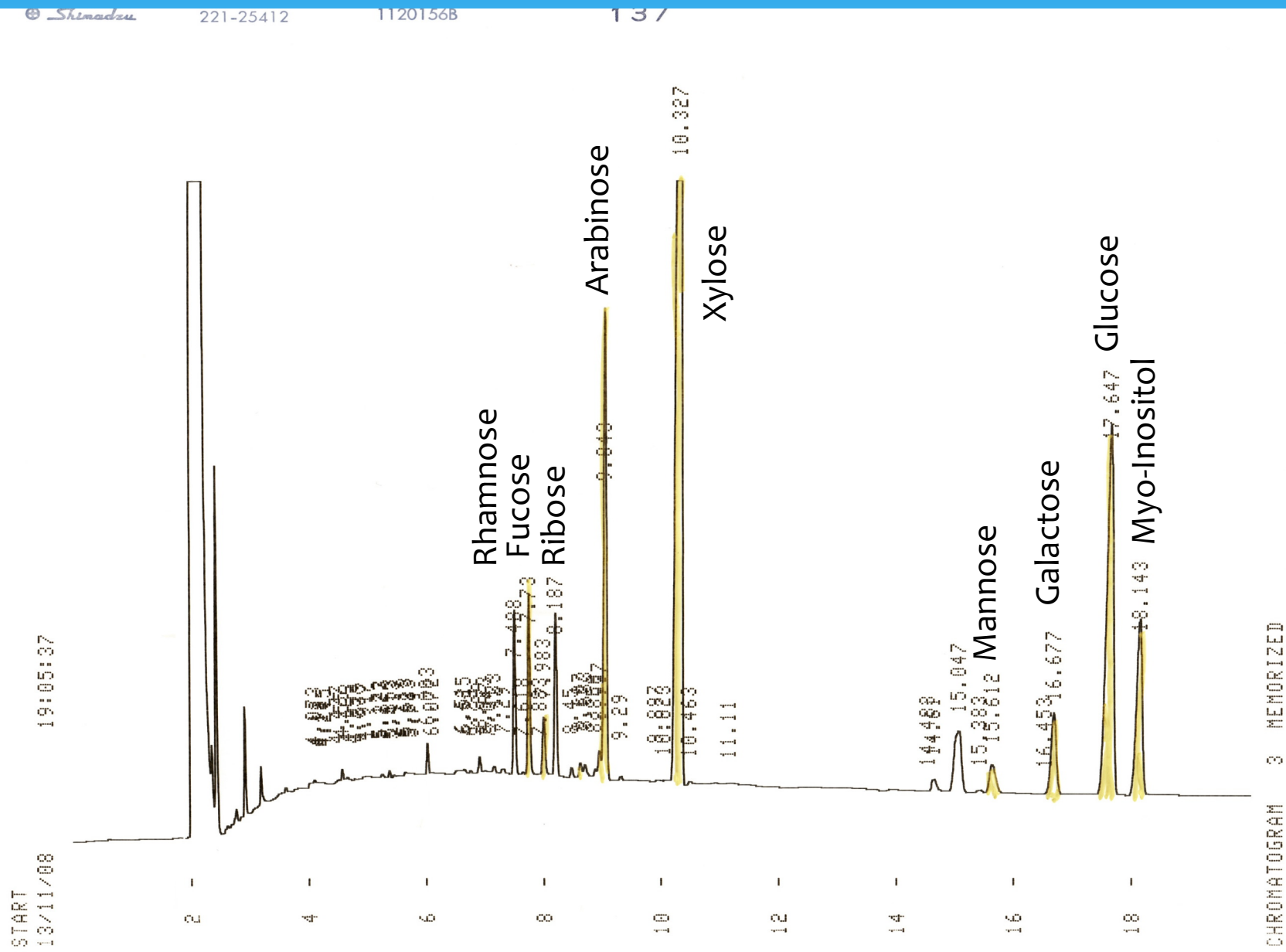
キャピラリーガスクロの方法

- * 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
- * 検出器: FID

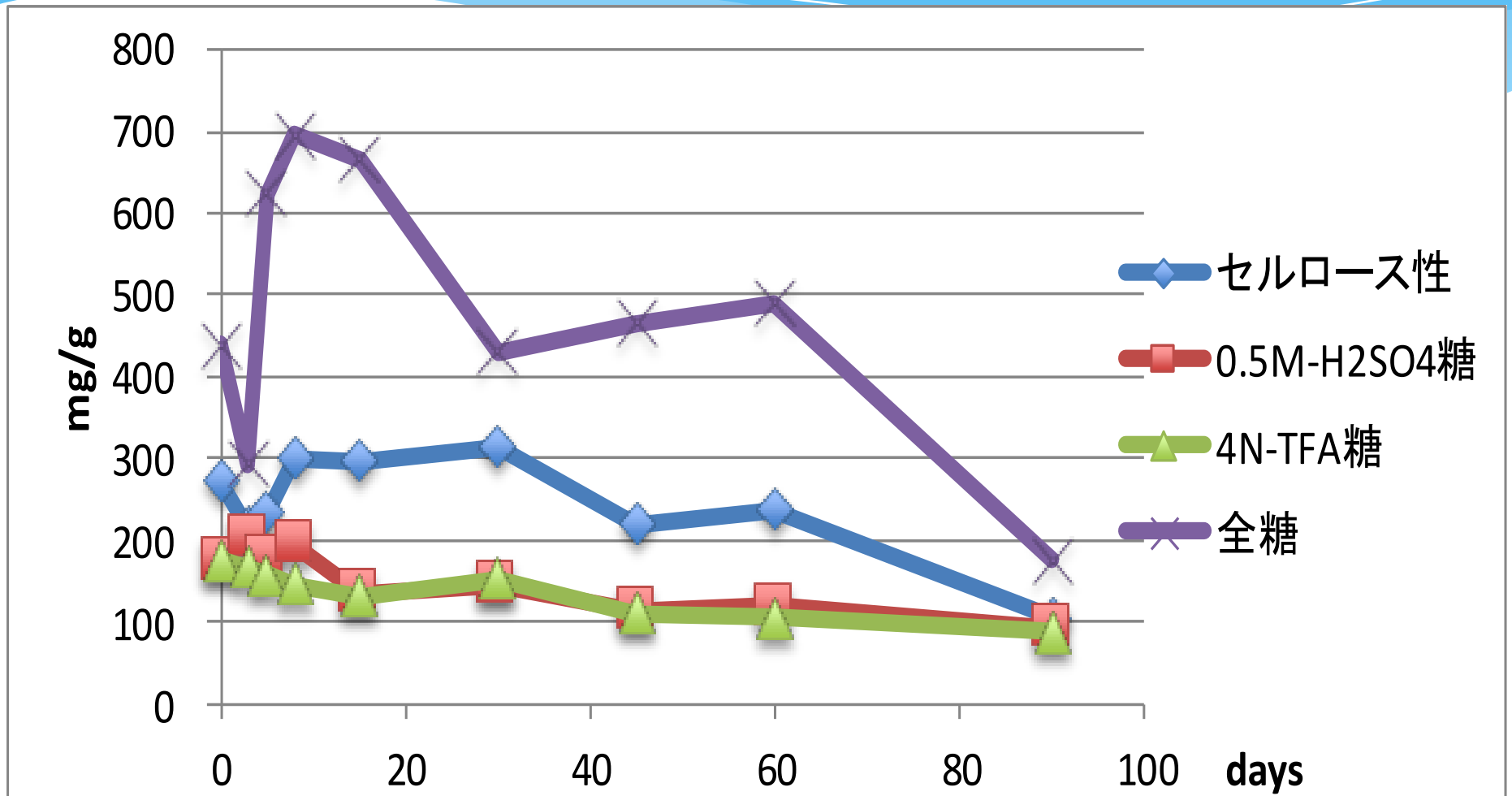


糖のガスクロマトグラム (中温乾式15日目)

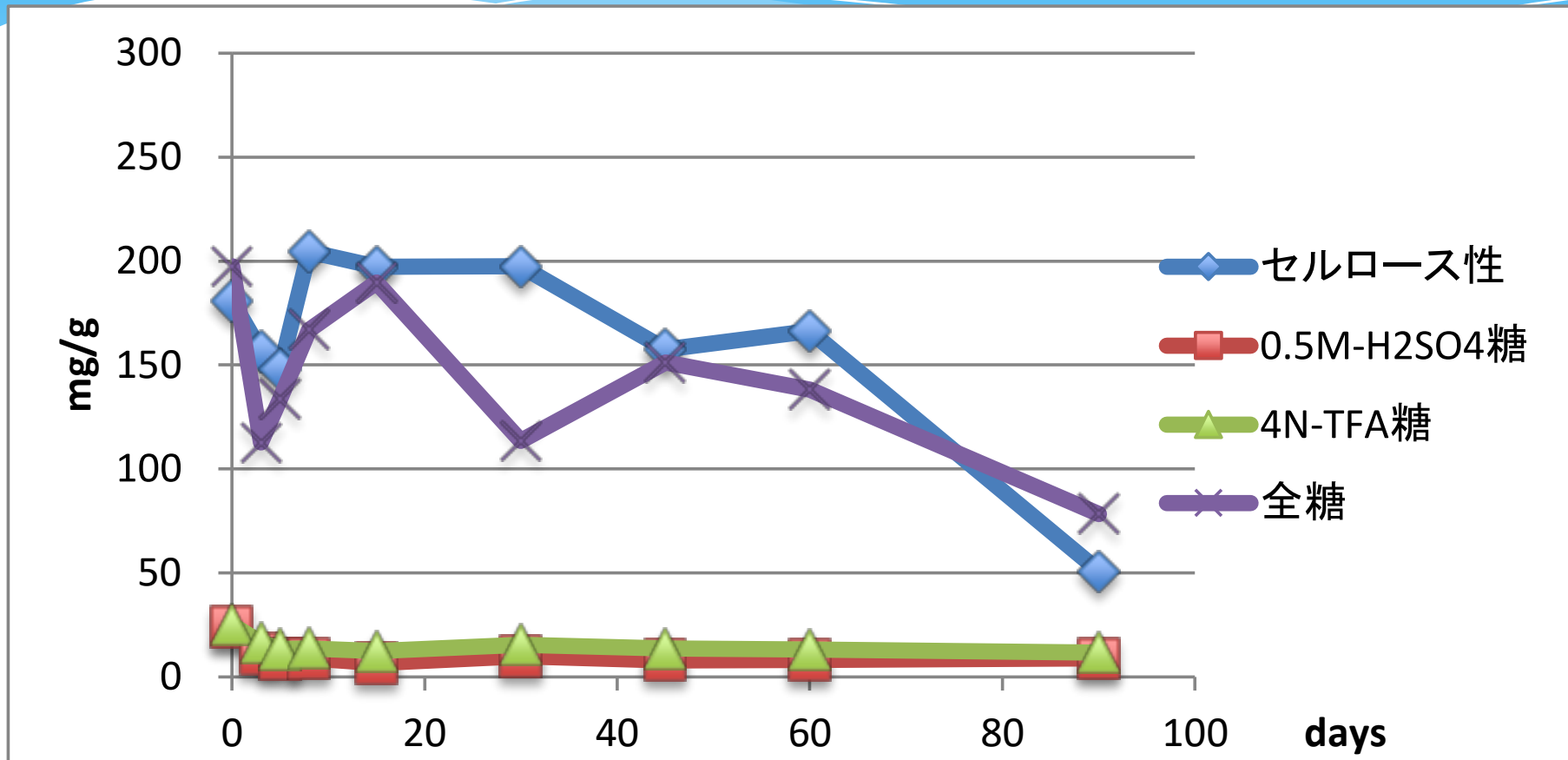
No.18 11/8



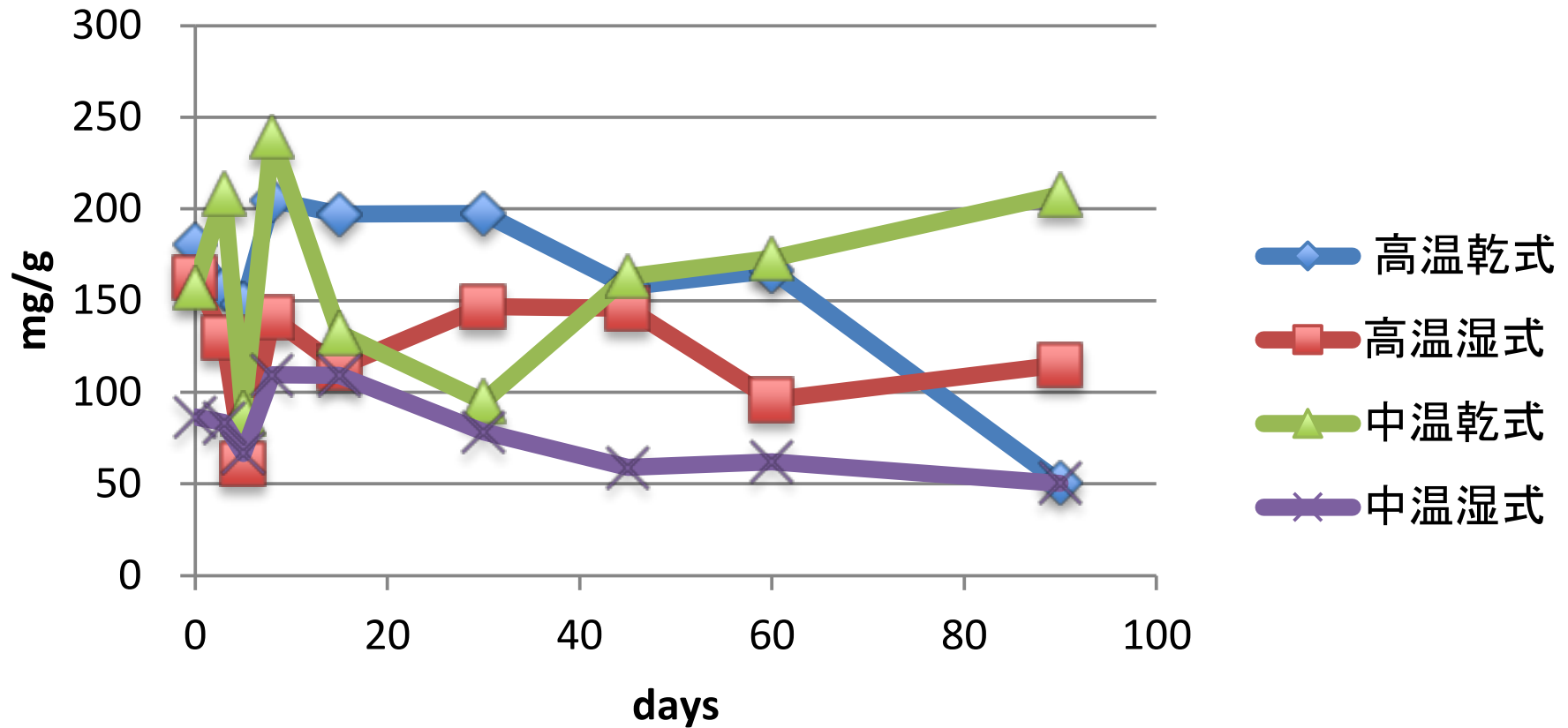
高温乾式発酵における糖合計の消長



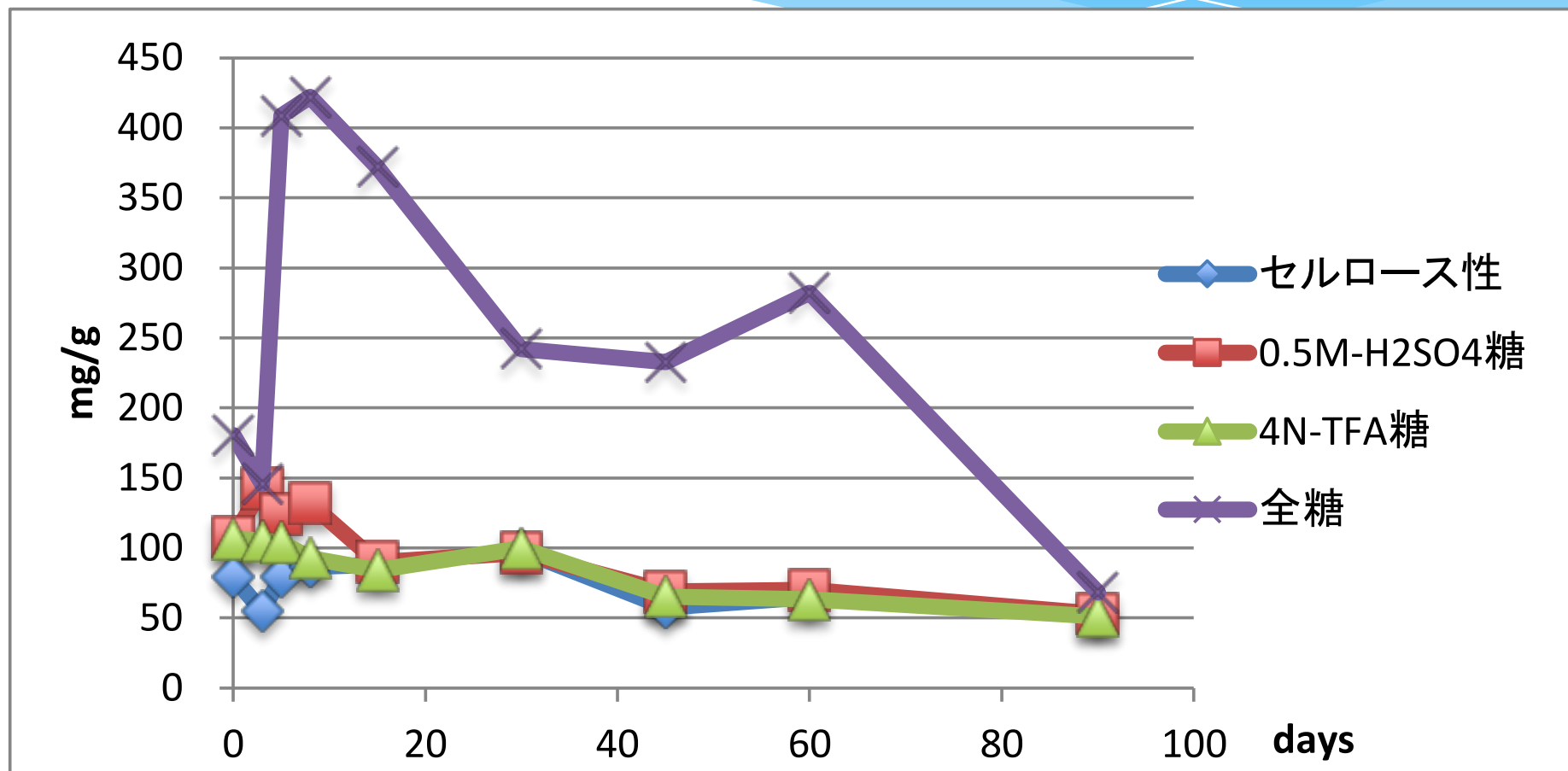
高温乾式発酵におけるグルコースの消長



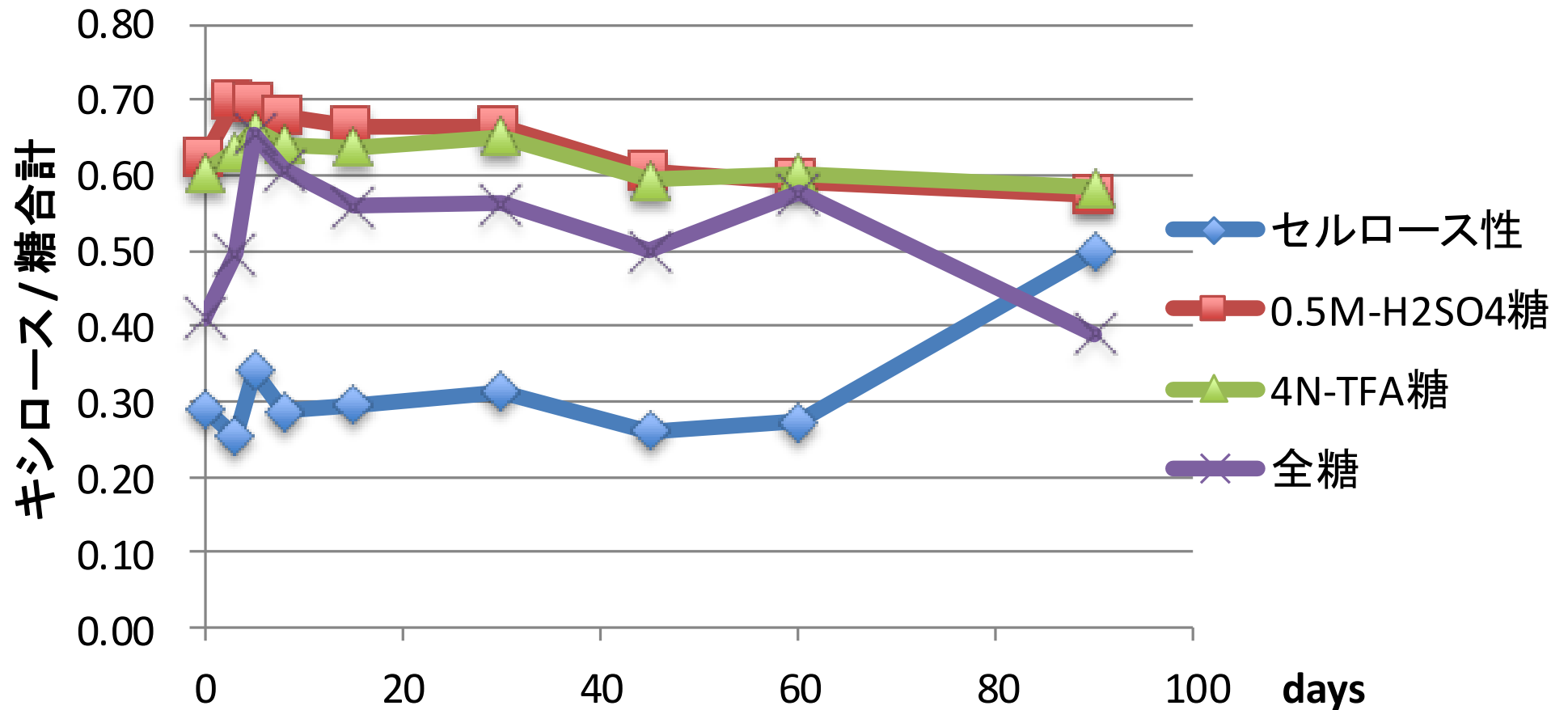
各種発酵過程における セルロース性グルコースの消長



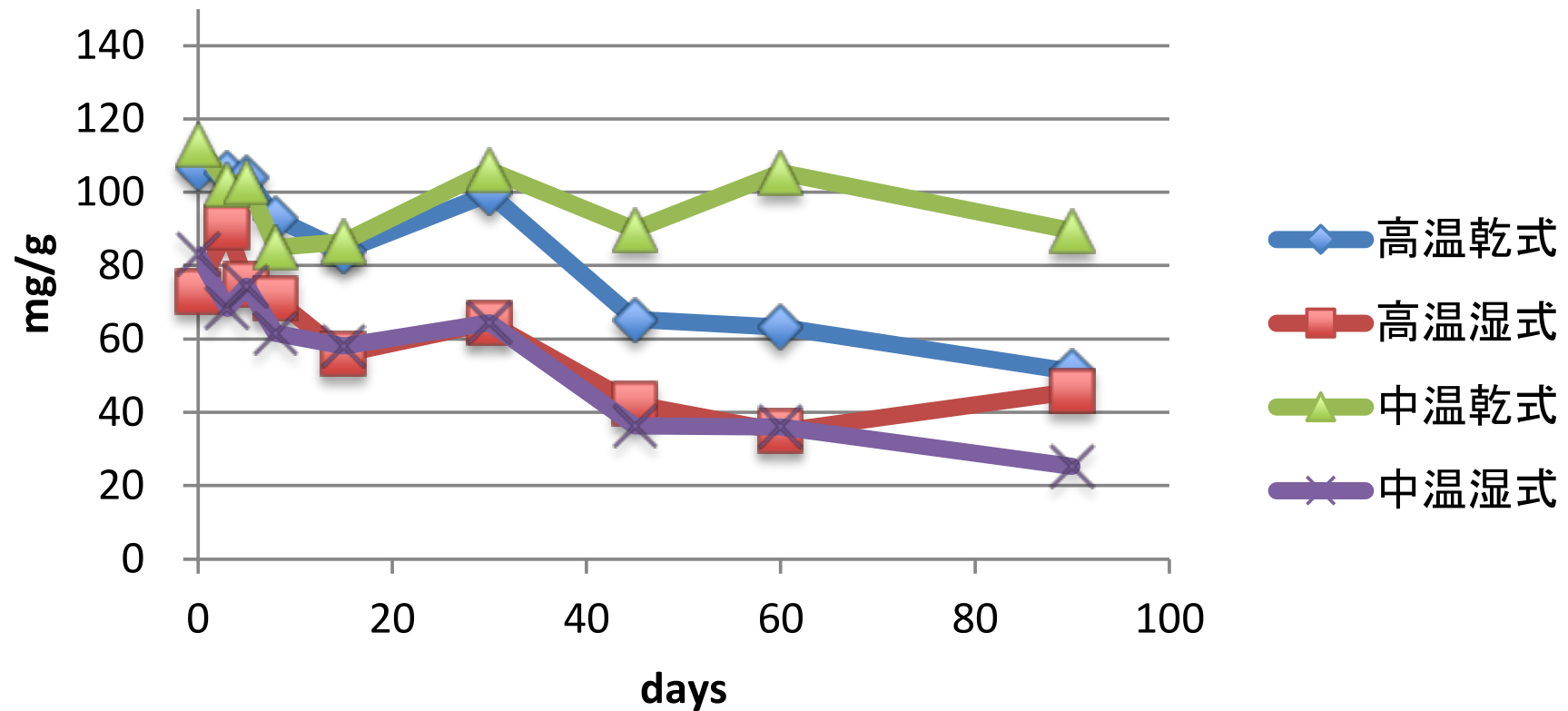
高温乾式発酵におけるキシロースの消長



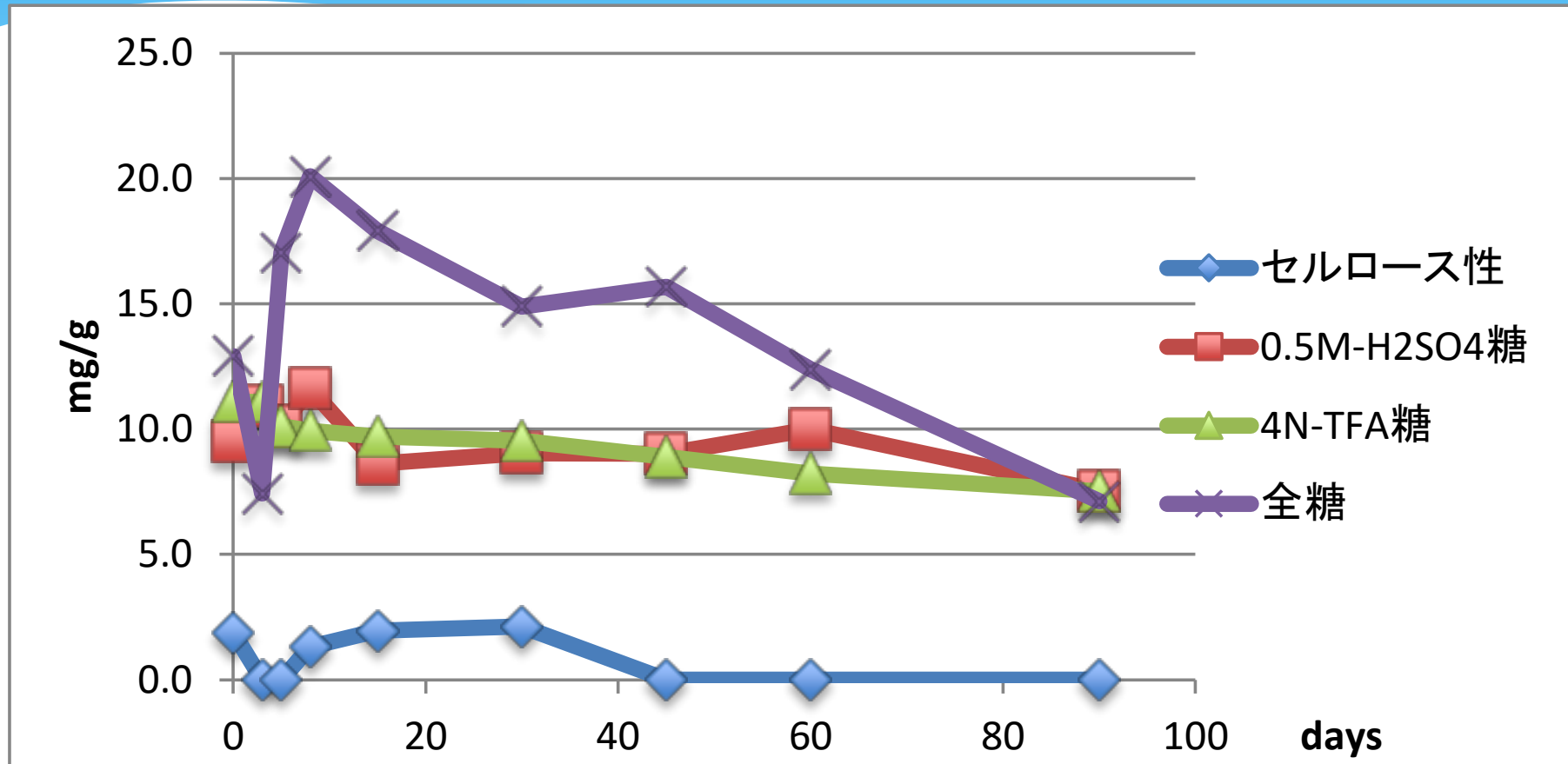
キシロースと糖合計の比率



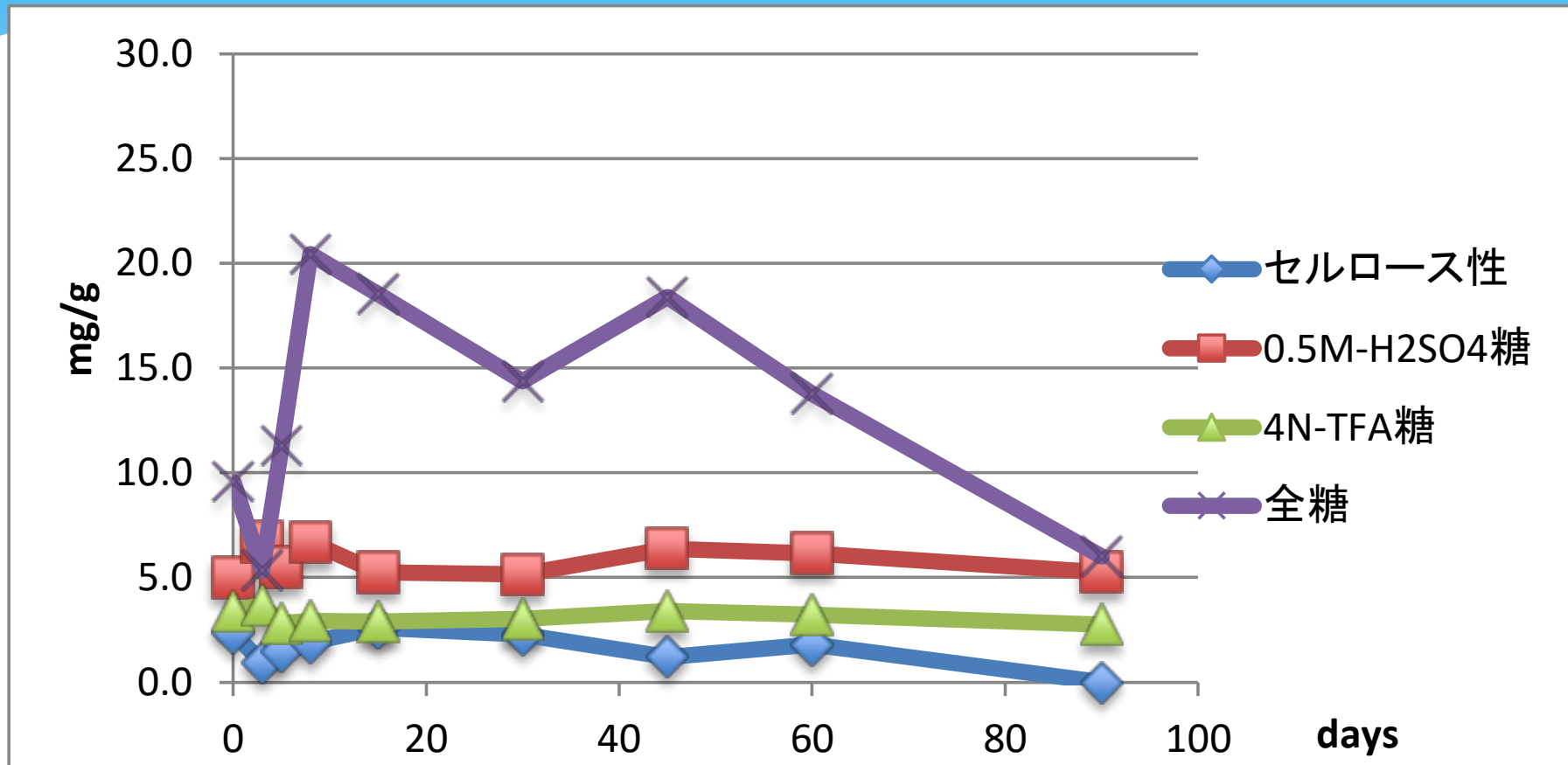
各種発酵過程における 4N TFA 分解性キシロースの消長



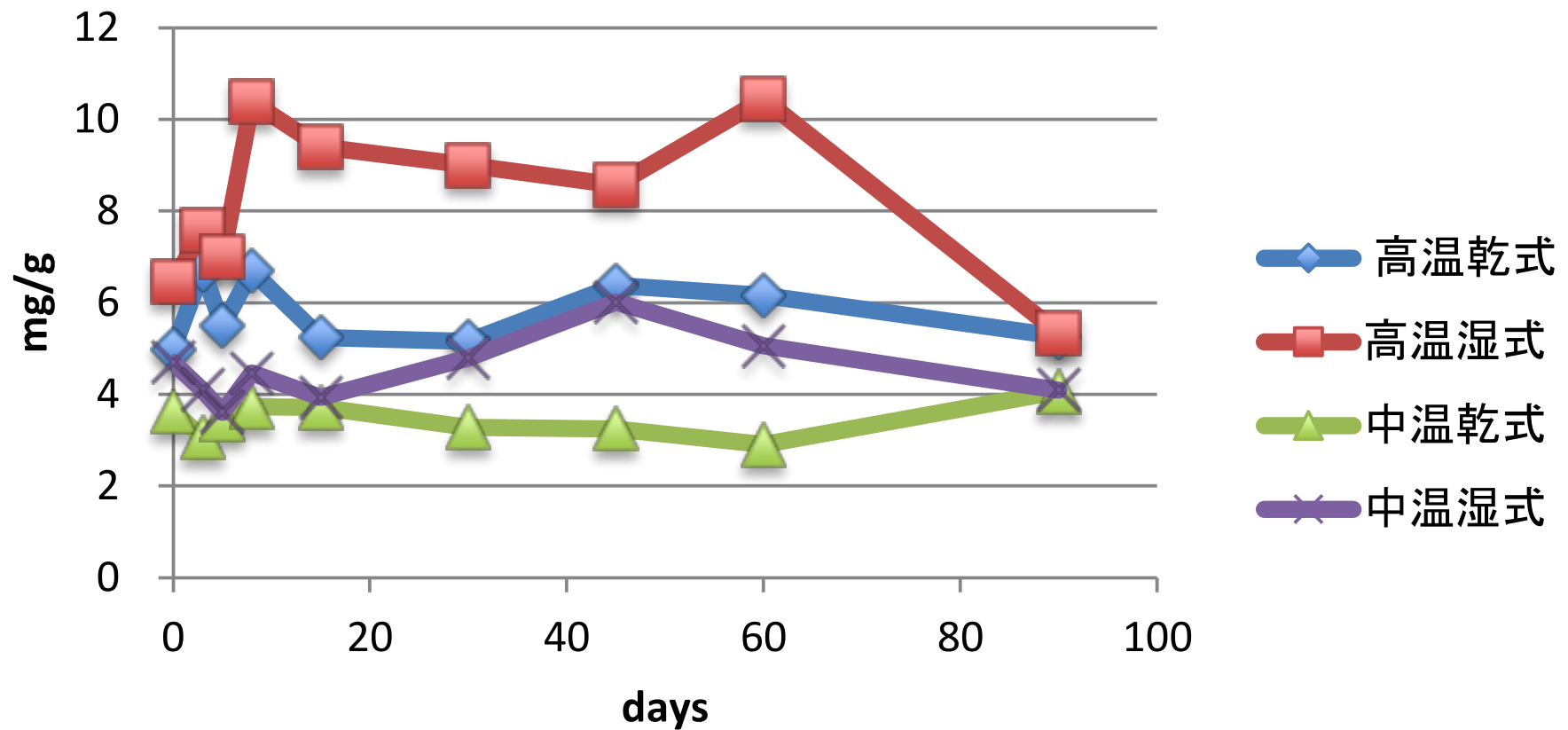
高温乾式発酵におけるガラクトースの消長



高温乾式発酵におけるラムノースの消長



各種発酵過程における 0.5 M 硫酸分解性ラムノースの消長



まとめ

各種分解方法による多糖類分解の特徴

- ①初期の易分解性成分の分解により、難分解性の糖の割合が高まり、多糖類はメタン発酵残渣中の主要成分となった。
- ②セルロース性糖は大部分がグルコースからなったが、一部安定なキシロースも含有した。
- ③ 0.5 M 硫酸および 4 M TFA による分解では、残渣中の非セルロース性糖が主として抽出された。

まとめ 2

各種分解方法による多糖類分解の特徴

④微生物由来の糖類(ラムノース、フコース、リボース、マンノース)は、0.5 M 硫酸分解により多く抽出された。

⑤高温湿式過程では微生物由来糖の割合が高く、中温乾式では低かった。他方、キシロースは高温湿式で早く分解され、中温乾式では長く残留した。