

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05842

研究課題名(和文)セルロース系家畜糞尿バイオマスの新規循環プロセスの創成と黒毛和牛生産への展開

研究課題名(英文)Creation of new recycling process of cellulosic dairy manure biomass and its application to the production of Japanese black beef.

研究代表者

梅津 一孝(Umetu, Kazutaka)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：20203581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小規模畜産農家のつなぎ飼育牛舎から排出される乳牛排泄物は、分解率の低い麦稈等の敷料が多く混合するためメタン発酵処理ではメタンガスの回収率が低い。さらに、発酵残渣の再生敷料としての利用では細菌や薬剤耐性菌の残存が懸念される。本研究課題では、ラボスケールで乳牛糞尿の乾式メタン発酵を実施し、さらに有機物分解率とメタン生成量の向上を目的として発酵残渣からリグニン分解嫌気性菌およびセルロース分解嫌気性菌の分離株を取得した。しかしこれらは分解性が低く、エネルギー生産の高効率化には至らず課題として残された。一方、発酵残渣の細菌数、薬剤耐性菌数の減少が示され、再生敷料の安全性・有効性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セルロース系乳牛糞尿の乾式メタン発酵の特性を明らかにし、発酵残渣固形分の分離方法、分離後の乾燥方法と細菌残存数の関係を提示したことは、再生敷料の衛生管理手法を確立する上で重要な知見であるとともに、酪農生産者にとって敷料購入費の負担軽減につながり、家畜糞尿のバイオガス化の大きなインセンティブとなる。発酵残渣由来の再生敷料の有効性の実証は、セルロース系家畜糞尿に対して堆肥化以外の新たな資源循環プロセスの選択肢の実現につながり、得られた知見はつなぎ飼育酪農だけでなく、生産性向上が強く望まれる黒毛和牛(但馬牛)の持続可能な畜産経営に大きく寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Dairy cow manure from tie-stall barns on small-scale livestock farms contains a large amount of bedding material such as wheat straw, which has a low decomposition rate, and therefore the recovery rate of methane production in anaerobic digestion is low. Furthermore, there is concern that residue of pathogenic bacteria and antibiotic-resistant bacteria (ARB) when using the solid fraction of digestate as recycled bedding. In this research project, we carried out lab-scale dry anaerobic digestion of dairy cow manure, and isolated lignin-decomposing and cellulose-decomposing anaerobic bacteria from the digestate to improve the high decomposition rate of organic compound and increase of methane production. However, the isolates had low decomposition rate, and the efficiency of energy production was not improved, which remains an issue. On the other hand, the number of bacteria and ARB in the digestate was reduced, demonstrating the safety and effectiveness of recycled bedding.

研究分野：畜産バイオマス

キーワード：畜産バイオマス バイオプロセッシング 再生可能エネルギー 循環型社会 畜産廃棄物の利用 資源リサイクル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のバイオガスプラントは 500 ~ 1,000 頭規模の乳牛を飼養する大規模酪農家に向けた大型プラントや複数の酪農家から排泄物を回収して処理を行う集中型プラントが多く普及しており、小規模酪農家向けの中小規模のプラントの実用化が望まれる。小規模酪農家のつなぎ飼いの牛舎から回収される乳牛ふん尿には敷料が多く混合するため、バイオガスプラントで処理する場合の発酵方式は固形分濃度の高い原料を処理することが可能な乾式発酵となる。さらに、中小規模のプラントの採算性を考えた場合、プラントの付加価値としての再生敷料の生産を欠かすことができない。これはプラントから排出された消化液を固液分離し、未消化の敷料を再利用するものである。しかし、乾式メタン発酵に関しては知見が乏しく、乾式メタン発酵の特性、エネルギー回収量、再生敷料の安全性についての検討が必要である。

2. 研究の目的

1) 高効率エネルギー回収手法の確立

乾式メタン発酵のエネルギー効率を評価し、至適条件となる運転パラメーターの検討を行う。さらに、固分(敷料)を効率的に消化する細菌、特にセルロース分解菌とリグニン分解菌を乳牛糞尿または発酵消化液から分離し、発酵槽へ添加した場合のエネルギー効率を評価する。

2) 発酵残渣を用いた新規再生敷料の開発

未消化の敷料を再生敷料として利用するための検討を行う。乾式メタン発酵消化液を固液分離し、得られた固分(未消化の敷料)の細菌含有量(薬剤耐性菌および菌叢解析を含む)等を測定し、再生敷料としての安全性・有効性を評価する。

3. 研究の方法

ラボスケールの発酵槽を利用して乾式メタン発酵試験を行った。乳牛糞尿と敷料(未使用の麦稈)を混合して固形分濃度を 15% に調整し、有効容積 10 L のメタン発酵槽に入れ 55 °C でバイオガスの生成が停止するまでの期間発酵を行った。発酵終了後に消化液を固液分離し、分離した固分を堆肥化処理または乾燥処理した。さらに、分離液分をリグニン(リグニンスルホン酸、関東化学株式会社)またはセルロース(カルボキシメチルセルロースナトリウム、富士フィルム和光純薬株式会社)を唯一の炭素源とする低栄養培地を用いて嫌気培養し、リグニン分解菌とセルロース分解菌を各 10 株分離し、リグニン分解活性またはセルロース分解活性を確認した。

4. 研究成果

(1) ラボスケールバッチ式乾式メタン発酵におけるバイオガス生成量、有機物分解率

ラボスケールの発酵槽から排出されるバイオガスの量を経時的に測定し結果を図 1(a)に、発酵期間 21 日間の累積バイオガス生成量を図 1(b)に示した

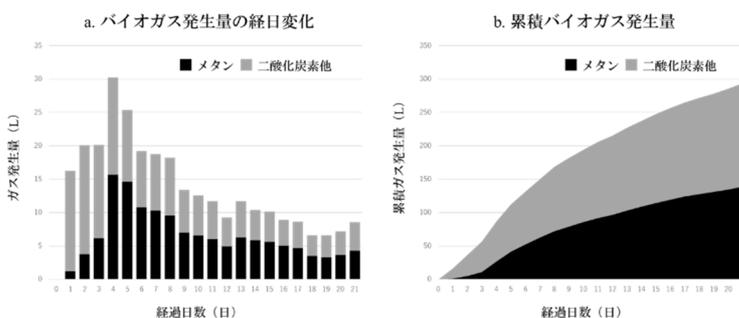


図 1 ラボスケール乾式メタン発酵におけるバイオガス生成量
混合原料 10 kg から生成したバイオガスは 21 日間の累積値で 294.07 L、メタンの累積生成量は 152.36 L で、平均メタン濃度は 51.8% であった。また、発酵前後の固形物 (TS) 濃度、有機物 (VS) 濃度および分解率を表 1 に示した。

混合原料 10 kg から生成したバイオガスは 21 日間の累積値で 294.07 L、メタンの累積生成量は 152.36 L で、平均メタン濃度は 51.8% であった。また、発酵前後の固形物 (TS) 濃度、有機物 (VS) 濃度および分解率を表 1 に示した。

表 1 乾式メタン発酵後の TS, VS の変化

	発酵前	発酵後	分解率
TS	9.16%	7.38%	23.05%
VS	7.10%	5.26%	29.29%

乳牛糞尿と敷料それぞれから生成されたバイオガスおよびメタンの量を計算した結果を表 2

に示した。

表2 混合原料の各成分からのメタン生成量

	処理量 (kg)	VS 分解率 (%)	メタン生成量 (L)
混合原料	30 ¹⁾	29.29 ¹⁾	457.08
乳牛糞尿	14.42	41.22	217.93 ³⁾
敷料	1.15 ²⁾	54.63	239.15 ³⁾

1) 種汚泥 (消化液) を含む, 2) 乾物重量, 3) 分解 VS 当たりの産生量を 0.460 L/g-分解 VS とし計算

(2) ラボ実験と実稼働バイオガスプラントの比較

表3に今回の実験結果とこれまでの知見の比較を示した。一般的に発酵温度が高いほど原料重量当たりのメタン生成量は多くなるが、乾式メタン発酵試験 (55℃) では湿式 (38℃) よりも低い値であった。一方、HRT が長いほどメタン生成量が多く、原料重量当たりのバイオガス生成量、メタン濃度も高い傾向であった。乾式と湿式の比較では乾式メタン発酵で原料の VS 分解率が低い傾向であったが、これは原料に含まれる敷料の分解率が低いためではなく (表2)、乾式発酵では乳牛糞尿の分解率が低下するためと考えられた。

表3 バイオガスプラントとラボスケールメタン発酵の比較

	発酵温度 °C	HRT days	バイオガス 生成量 m ³ /t	メタン 濃度 %	メタン 生成量 m ³ /t	VS 分解率 %
ラボスケール乾式バッチ式 発酵試験	55	21	29.4	51.8	15.2	29.3
ラボスケール湿式連続 発酵試験 ¹⁾	38	28.8	35.3	56.8	20.0	51.5
乾式バイオガスプラント [保井ら, 2019]	50	17.3	36.2	58.0	19.0	9.56
湿式バイオガスプラント ²⁾	55	15	30.0	56.0	16.8	30.0

1) 岩崎ら (2016) 未発表データ 2) 国立大学法人帯広畜産大学バイオガスプラントのデータ, 不足データは参考資料「メタン発酵」を参照。

(3) 乾式メタン発酵処理による細菌, 薬剤耐性菌の減少, および菌叢解析の結果

表3の乾式バイオガスプラントでは乳牛糞尿に含まれる大腸菌, 大腸菌群数が大きく減少した (図2)。年に4回測定を行った結果では消化液の分離固分と液分のいずれにおいても大腸菌, 大腸菌群数は減少していたが, 固分では分離後に堆積している間に大腸菌群が増加する場合があった。また, セファゾリン耐性大腸菌, 大腸菌群も同様に消化液では減少していた。

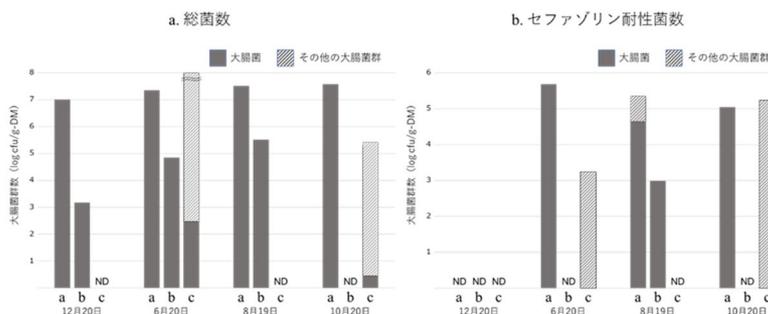


図2 乾式バイオガスプラントから採取した試料の細菌数測定結果
a: 乳牛糞尿, b: 消化液固液分離液分, c: 消化液固液分離固分

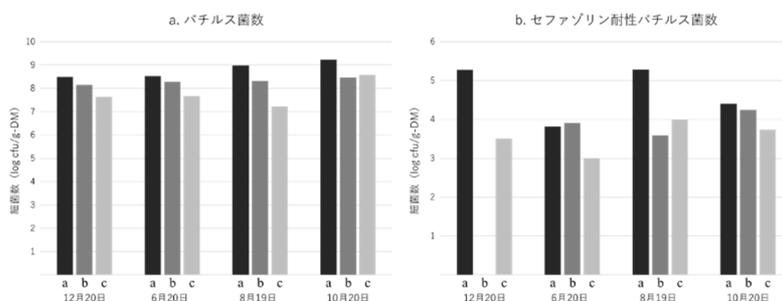


図3 乾式バイオガスプラントから採取した試料のバチルス菌数測定結果

一方、代表的な芽胞形成細菌であるバチルスは、発酵処理を行ってもこのような減少は認められず、消化液に残存する傾向が見られた（図3）。

ラボスケールの乾式メタン発酵試験においても同様の結果が得られ、大腸菌は消化液に残存していたが、その他の大腸菌群は検出されなかった。それぞれの対数減少値（Log reduction value, LRV）は大腸菌が 3.15 ,その他の大腸菌群が > 4.86 ,バチルスが 2.17 という結果であった（表4）。

表4 乾式バイオガスプラントとラボスケール乾式高温メタン発酵の比較

	LRV					
	大腸菌	その他の大腸菌群	バチルス	セファゾリン耐性菌		
				大腸菌	その他の大腸菌群	バチルス
乾式プラント	1.99 ~ 7.48	2.07 ~ 6.88	0.24 ~ 0.76	1.52 ~ 5.51	5.05 ~ 5.25	0.15 ~ 5.28
ラボスケール	3.15	> 4.86	2.17	2.56	3.96	0.91

(4) 再生敷料作製方法の比較

実験装置「かぐやひめ」（富士平工業株式会社）による分離固分の堆肥化を実施したが、堆肥の温度上昇が認められなかった。これは開始前の分離固分の含水率が堆肥化の最適値である 55 ~ 72% よりも高かったためと考えられた。一方、乾燥処理は順調に進行し、2週間後には含水率が 32.9% に低下した（表5）。

表5 分離固分の含水率の変化

	処理前	1週間後	2週間後
堆肥化処理	83.7%	83.2%	83.6%
乾燥処理	83.7%	76.8%	32.9%

4-1 細菌数の変化

分離固分の堆肥化および乾燥処理の間の細菌数の変化を図4に示した。前述のように堆肥化処理は上手くいかなかったが、固分に連続的に空気を吹き込むことで1週間後には大腸菌数が減少し、2週間後には検出されなくなった。乾燥処理では1週間後には大腸菌数は検出限界以下にまで減少した。大腸菌以外の大腸菌群は分離固分では検出されず、その後の処理でも増殖することはなかった。一方、バチルスは堆肥化処理では細菌数の変化が認められず、乾燥処理では乾燥が進むに従い細菌数は減少したが2週間後でも残存が認められた。

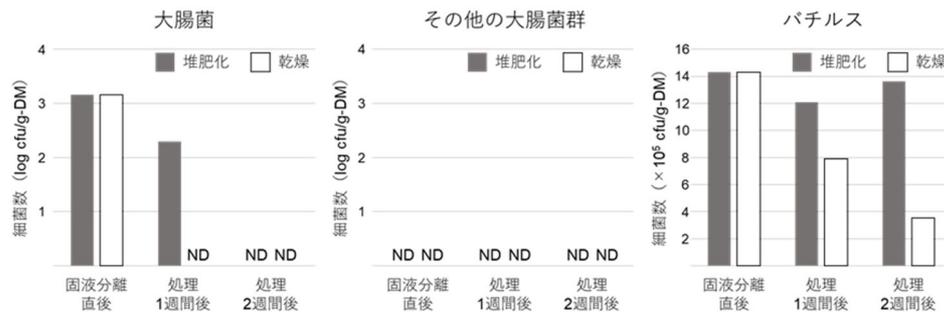


図4 消化液分離固分の堆肥化処理，乾燥処理による細菌数の変化

一方、セファゾリン耐性菌大腸菌，大腸菌群は分離固分には検出されなかった（図5）。セファゾリン耐性バチルスはバチルスの総菌数と同様の傾向で、乾燥処理によって減少するが、2週間後でもわずかに検出された。

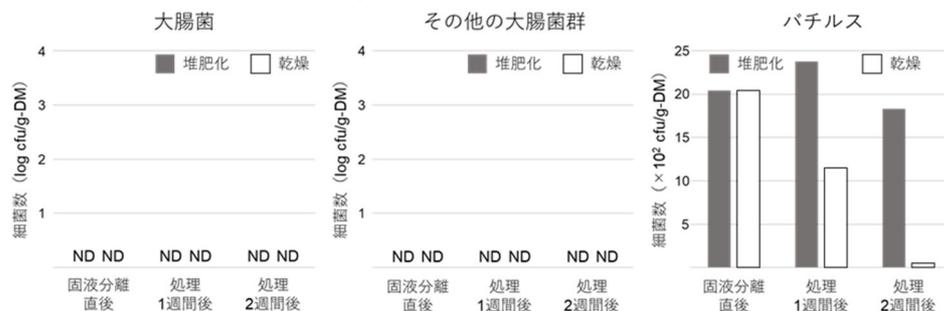


図5 消化液分離固分の堆肥化処理，乾燥処理によるセファゾリン耐性菌数の変化

(6) 分解菌分離株の取得

乾式メタン発酵消化液を固液分離した液分からリグニン分解菌とセルロース分解菌の分離を試みた。はじめに消化液分離液分をリグニンまたはセルロースを唯一の炭素源とする低栄養液体培地(ミニマル培地)で培養することでリグニン分解菌,セルロース分解菌のセレクション(馴致培養)を行い,この培養液をそれぞれリグニンミニマル寒天培地,セルロースミニマル寒天培地に塗抹して55℃にて7日間培養を行った。図6に培養後のコロニー増殖の結果を示した。

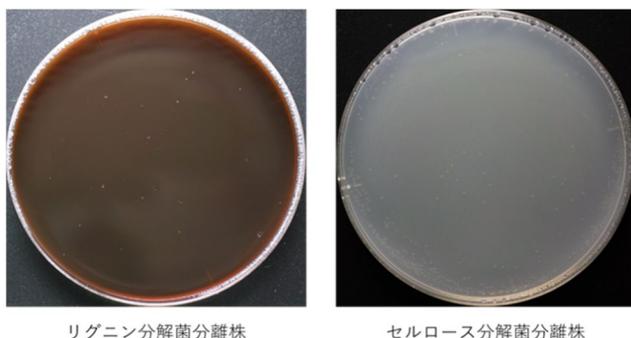


図6 リグニン分解菌およびセルロース分解菌の取得

これらの寒天培地からコロニーをそれぞれ10株分離し,以下の方法で分離株のリグニンおよびセルロースに対する分解活性を確認した。リグニン分解菌のコロニーをメチレンブルー寒天培地で培養し,培地の脱色(クリアゾーンの形成)を確認した。セルロース分解菌のコロニーはセルロース寒天培地で培養し,その後培地をコンゴレッドで染色してセルロース分解によるクリアゾーン形成の確認を行った。いずれも選択したコロニーに明確なクリアゾーンの形成が確認されなかった。

続いて,上記で確認した各コロニーを5mm四方程度の木片またはセルロース片を入れたGAMブイヨン液体培地で1週間程度嫌気培養し,木片,セルロース片の分解とそれに伴う水素気泡の発現を目視で確認した。しかしこの方法によっても明確な分解反応は確認されなかった。

5. 総括

小規模畜産農家向けの中小規模バイオガスプラントの実用化を目指し,乳牛排泄物のメタン発酵処理の高効率化に関する検討を行った。小規模畜産農家のつなぎ飼料牛舎から排出される乳牛排泄物は,処理可能な原料の含水率のレンジは広く,処理糞尿の固形分濃度を調整する必要が少ない乾式メタン発酵処理が適していると考えられるが,一方で,これらの排泄物には麦稈等の敷料が多く混合し,その主成分であるリグノセルロースは微生物による分解率が低く,そのため有機物負荷量に反してメタンガスの回収率が低い。さらなる高効率化を目指すためには微生物による固形分の効率的な分解が必要と考えられる。すなわち,メタン発酵におけるリグノセルロースの分解を効率的に行うための嫌気性菌あるいは通性嫌気性菌を利用したバイオオーグメンテーションが不可欠である。

本研究課題では,ラボスケールで乳牛糞尿の乾式メタン発酵を実施し,有機物分解率,メタン生成量を測定した。その結果,湿式メタン発酵と同等のエネルギー回収率であることが示され,さらに乳牛糞尿に混合した敷料の有機物分解率,メタン生成量は乳牛糞尿よりも高いことが示された。しかし,乾式メタン発酵の至適条件となる運転パラメーターの検討には至らなかった。発酵残渣を用いた新規再生敷料の開発では,乾式メタン発酵処理による乳牛糞尿中の細菌数,薬剤耐性菌数が減少することが示されたと同時に,発酵残渣の固液分離後の固分の処理方法の違いによる細菌,薬剤耐性菌の減少を示すことができ,再生敷料の安全性・有効性について示すことができた。しかし,固液分離固分の堆肥化を行う場合には含水量の適切な調整が必要であり,ラボ実験では十分な脱水が困難であったため堆肥化の有効性を示すことができなかった。

次に,バイオオーグメンテーションを目的とした細菌分離株の取得を試みた。乳牛糞尿のメタン発酵残渣(消化液)からリグニン分解嫌気性菌およびセルロース分解嫌気性菌を取得するため,リグニンおよびセルロースを高濃度を含む培地を用いた分離培養を試みた。得られた分離株の中から比較的増殖速度が速いと考えられた10株ずつを選別し,分離株懸濁液に木片,セルロース紙片を投入して14日間の高温嫌気培養を行って水素(気泡)生成の有無を確認したが,いずれの分離株も当該条件における分解性は低い傾向にあった。本結果は,乾式メタン発酵のリグニンおよびセルロース分解能を否定するものではなく,優れたリグノセルロース分解菌の検出に課題があったと考えられ,エネルギー生産の高効率化が課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fetra J. Andriamanohiarisoamanana, Ikko Ihara, Gen Yoshida, Kazutaka Umetsu	4. 巻 310
2. 論文標題 Comparative effects of ferric hydroxide and (semi) conductive iron oxides on the anaerobic digestion of oxytetracycline-contaminated dairy manure.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Management	6. 最初と最後の頁 114731 (online)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jenvman.2022.114731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mohamed Farghali, Ahmed I. Osman, Kazutaka Umetsu, David W. Rooney	4. 巻 20
2. 論文標題 Integration of biogas systems into a carbon zero and hydrogen economy: a review.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environmental Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2853-2927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10311-022-01468-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fetra Jules Andriamanohiarisoamanana, Tiana Navalona Randrianantoandro, Holy Farahanta Ranaivoarisoa, Hiroichi Kono, Gen Yoshida, Ikko Ihara, Kazutaka Umetsu	4. 巻 164
2. 論文標題 Integration of biogas technology into livestock farming: Study on farmers' willingness to pay for biodigesters in Madagascar.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomass and Bioenergy	6. 最初と最後の頁 106557 (online)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biombioe.2022.106557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Farghali Mohamed, AP Yuhendra, Mohamed Israa M.A., Iwasaki Masahiro, Tangtaweewipat Suchon, Ihara Ikko, Sakai Ryuichi, Umetsu Kazutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Thermophilic anaerobic digestion of Sargassum fulvellum macroalgae: Biomass valorization and biogas optimization under different pre-treatment conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Chemical Engineering	6. 最初と最後の頁 106405 ~ 106405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jece.2021.106405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 梅津一孝 他共著	4. 発行年 2023年
2. 出版社 株式会社コロナ社	5. 総ページ数 314
3. 書名 農業・食料生産分野におけるバイオマス利用工学 循環型社会のための生物資源利用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------