

## メタン発酵における食品原料が発生ガス及び菌叢に与える影響

村山正樹\*, 矢田喜大\*, 前川明弘\*, 橋本典嗣\*\*,  
辻本斐奈子\*\*\*, 浮並孝介\*\*\*, 神寄康之\*\*\*

### Effects of Variation of Food Waste on Generated Gas and Bacterial Flora in Methane Fermentation

Masaki MURAYAMA, Yoshihiro YADA, Akihiro MAEGAWA, Noritsugu HASHIMOTO,  
Hinako TSUJIMOTO, Kousuke UKINAMI and Yasuyuki KANZAKI

Various samples of food wastes as carbon sources for mesophilic methane fermentation were examined. The amounts of methane formation were nearly equal for the various samples. On the other hand, the amount of hydrogen sulfide formation varied greatly depending on the type of food waste. According to the results of microbial flora analyses and pH measurements, the compositions of the digestive liquids were stable for the changes of the carbon sources.

Keywords: Food Waste, Carbon Source, Mesophilic Methane Fermentation, Bacterial Flora Analysis, Digestive Liquid

#### 1. はじめに

バイオマス原料として食品廃棄物を利用することは、廃棄物処理量を削減できるばかりでなく、資源の有効利用、ひいては循環型社会の構築に向けて有用である。食品廃棄物を発酵させてメタンを得る技術は、1960年代からアメリカ合衆国で検討が始まったとされており<sup>1)</sup>、我が国においても1965年の研究が報告されている<sup>2)</sup>。その後、21世紀に入り、各地で活発に研究開発が進められるようになってきた<sup>3-6)</sup>。発酵により得られたメタンを発電に用いるバイオガス発電所は、固定価格買取制度（FIT法）におけるバイオマス発電の中の一つの方法として全国で普及が進み<sup>7)</sup>、今後も更なる発展が期待されている。三重県においても、平成30年に県内で初めてとなる、食品廃棄物を活用したバイオガス発電所が稼働を開始した。我々は、この発電所の稼働前の事前検討から、稼働後の安定操業に至る段階まで種々の課題について研

究を続けてきた<sup>8-16)</sup>。

発電所では、高い稼働率を維持することが課題であり、バイオガス発電所においても発電機の定格近くの発電電力量を維持する必要がある。そのためには、消化液による食品廃棄物の発酵が安定し、発生するメタンの量がほぼ一定に保たれることが重要である。実際の運転では、発酵により発生するガスには多少の季節変動がみられた。特に硫化水素の発生量には比較的大きな変動があった。硫化水素については既報においてもその発生量の制御が課題となっており<sup>11)</sup>、濃度が上がり過ぎるとメタン発酵を阻害する可能性があるため<sup>17)</sup>、注意が必要である。発酵槽は定温に保たれていることから、この変動の要因は温度ではなく、投入する発酵原料である食品廃棄物の違いによるものと考えられた。そこで今回、発酵槽に投入する原料が発生ガス及び消化液の菌叢にどのように影響するのかを、ラボスケールでの発酵実験により検討したので報告する。

\* ものづくり研究課

\*\* 窯業研究室

\*\*\* 株式会社大栄工業

#### 2. 実験方法

##### 2.1 食品原料の選定

メタン発酵に用いる原料として、次の9種の食品廃棄物を選定した。

- ①とり肉, ②ゆで卵, ③おから, ④魚肉,
- ⑤じゃがいも, ⑥小麦, ⑦玉ねぎ, ⑧大根,
- ⑨かぼちゃ

①～④はタンパク質系の食品であり、発酵時の硫化水素の発生が多いと想定して選定した。これらとの比較のため、デンプン質系の食品として⑤をいも類から、⑥を穀物から選んだ。また野菜のうち⑦は刺激物質である硫化アリルを含むことから発酵時の硫化水素の発生が多いと予想し、⑧、⑨は搬入量に季節変動がありその影響をみるため、それぞれ選定した。

## 2.2 発酵実験

発酵実験は既報<sup>14)</sup>と同様に、密封した実験系を20～30日間、37℃の恒温槽に設置して行った。図1にその模式図を示す。2.1節で選定した食品原料について予め固形分量を求め、それぞれ固形分量が16gになるようにサンプリングし、水を加えて全体を400mLとした後、ミキサーで攪拌することでペースト状に調製した。ここで、食品原料なしの、水400mLのみのもを⑩ブランクとした。これらのペースト状サンプルと消化液1200mLを合わせ、3L三角フラスコに入れて密封し、内部を窒素ガスで置換した。消化液は、実際のバイオガス発電所で余剰分として排出されるものを採取して用いた。密封した実験系を37℃の恒温

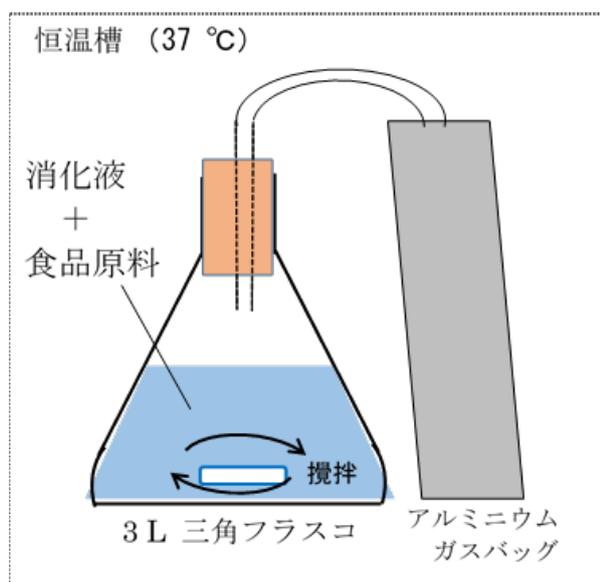


図1 発酵実験の模式図

槽に設置し、マグネチックスターラーで攪拌しながら発生するガスをアルミニウムガスバッグに捕集した。ガス発生とともに膨張するガスバッグを随時交換し、回収したガスバッグ中のガス量及びガス組成を計測・分析した。ガス組成分析では、硫化水素(H<sub>2</sub>S)濃度は検知管(No.4H及びNo.4HH, (株)ガステック)を用いて測定し、それ以外のガスは、TCDガスクロマトグラフ(GC-2014, (株)島津製作所)にて定量した。

発酵実験は、新たなガスの発生がほぼなくなり、ガス発生量が測定できなくなった時点で終了とした。また発酵実験終了時の消化液のpHを、pH試験紙により測定した。

## 2.3 菌叢解析

発酵実験終了後の消化液中の菌叢解析を行った。前報<sup>16)</sup>と同様に、消化液中の細胞をビーズミルにより破碎し、DNAを抽出した。得られたDNAを鋳型として、16SrRNA遺伝子のV3-V4領域を含む460塩基対を標的にPCR増殖及び精製を行った。精製DNAにindexを付加し再度精製した後、次世代シーケンサーMiseq (Illumina)を用いて微生物叢の塩基配列を読み取り、MacQIIMEにより微生物群集解析を行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 ガス発生量

図2に、各種食品原料に対するガスの累積発生量の時間変化を示す。いずれの原料を投入した場合でも、消化液のみの⑩ブランクに比べ、明らかに多くのガスが発生した。このことは、投入した原料が消化されていることを示している。ガス発生量は15～20日程度の間で概ね飽和する傾向がみられ、この期間で発酵がほぼ終了していると言える。図3に①とり肉の場合の発酵実験中の液面の様子を示す。実験開始2日後及び8日後の液面には気泡を伴う層が見られ、発酵が進みガスが発生していることを示している。15日後にはこの層が殆ど消失し、投入した原料が消化され発酵がほぼ終了した状態であると考えられる。

### 3.2 ガス組成

ガスクロマトグラフにて検出されたガスは、メタン(CH<sub>4</sub>)、二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)、窒素(N<sub>2</sub>)及び1%未満の微量の酸素(O<sub>2</sub>)であり、水素(H<sub>2</sub>)や一酸化炭素(CO)は検出されなかった。また検

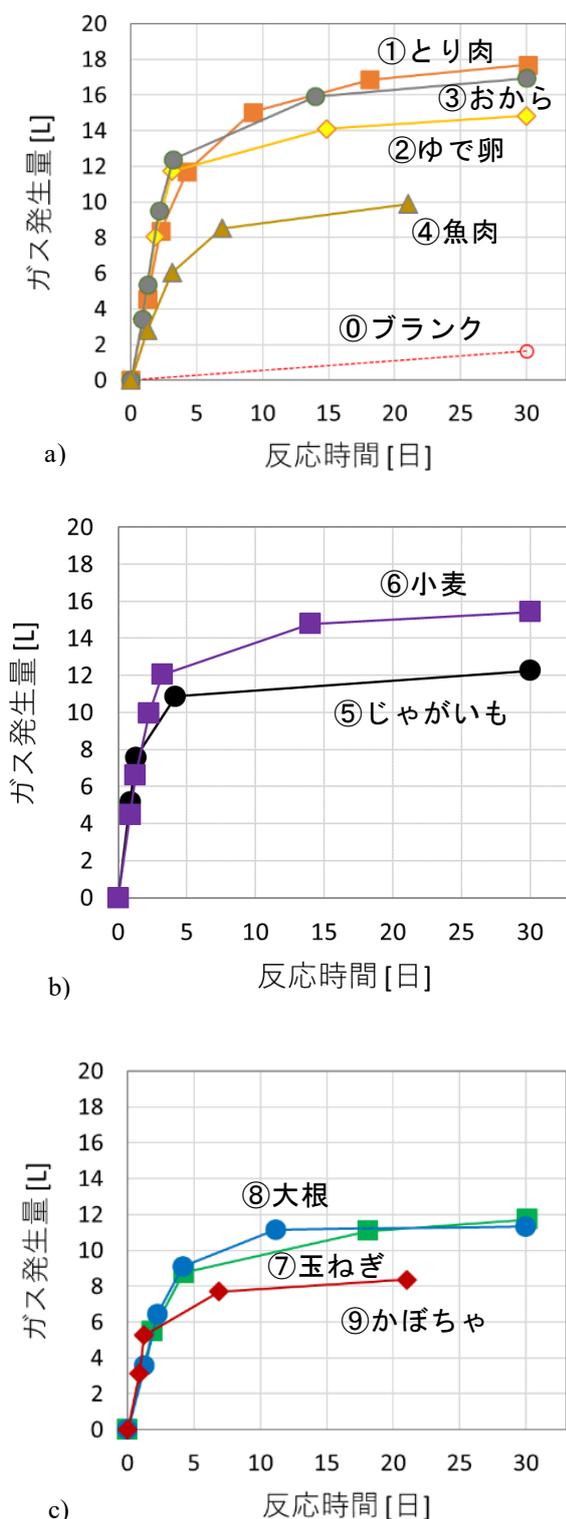


図2 ガスの累積発生量と反応時間との関係  
 a) : タンパク質系およびブランク  
 b) : デンプン質系  
 c) : 野菜系

知管により、1%未満の微量の硫化水素 (H<sub>2</sub>S) が検出された。このうち窒素は最初に実験系をガス置換する際に用いた不活性ガスであり、その分を除くと発酵に伴う発生はないか、あってもわずかであると考えられる<sup>8)</sup>。また微量の酸素が発生するという報告は、これまでの我々の研究<sup>8)</sup>や、他の研究<sup>18)</sup>でもみられる。これらのガスを除く、メタン及び二酸化炭素が発酵による主要な発生ガスであると言える。

図4に各種原料から発生したガスの総量、及び発生ガスの主要成分であるメタン・二酸化炭素の量を示す。ここで、酸素及び硫化水素は発生量が僅かであり図に表せないため示していない。また窒素についても発酵に伴う発生はないとして除外した。発生したガスの総量は原料間の差が大きく、例えば①とり肉や③おからなどタンパク質系の原料でガス発生が多い一方、同じタンパク質系でも④魚肉ではガス発生量が少なかった。また、糖質が主で消化されやすいと思われた⑨かぼちゃでもガス発生量が少なく、その理由として繊維質など未消化の部分の比率が大きいことが考えられた。食材・食品の原料サンプルにおいては、このような不均質性が課題となり得ることが判明した。

そこで、不均質性が顕著な原料の代表として、⑦玉ねぎについて、当初発酵試験に供した皮や根の部分を含むサンプルに加え、可食部だけの⑦'玉ねぎとして皮や根の部分を取り除いたサンプルにて別途発酵試験を行い、ガスを分析した。その結果を⑦玉ねぎと比較したものを図5に示す。この図に見られるように、⑦'玉ねぎ(可食部のみ)からは、⑦玉ねぎより多くのガスが発生した。しかしその一方で、メタン発生量/発生ガス総量は⑦玉ねぎで 0.57 に対し⑦'玉ねぎ(可食部のみ)で 0.58 と、両者のガス組成比はほとんど変わっていない。この原因として、以下のような可能性が考えられる。

(a) 可食部以外の部分は乾燥による重量減少が可食部より小さく、固形分量  $\alpha$  (=乾燥重量/通常の状態での重量) が大きくなることで、発酵実験に投入するサンプルの総量 (16/ $\alpha$  g) が小さくなった

(b) 主に可食部が消化されてガスを発生し、消化されにくい皮や根などの部分は、少なくとも発酵実験期間内においてはガス発生にあまり寄与して

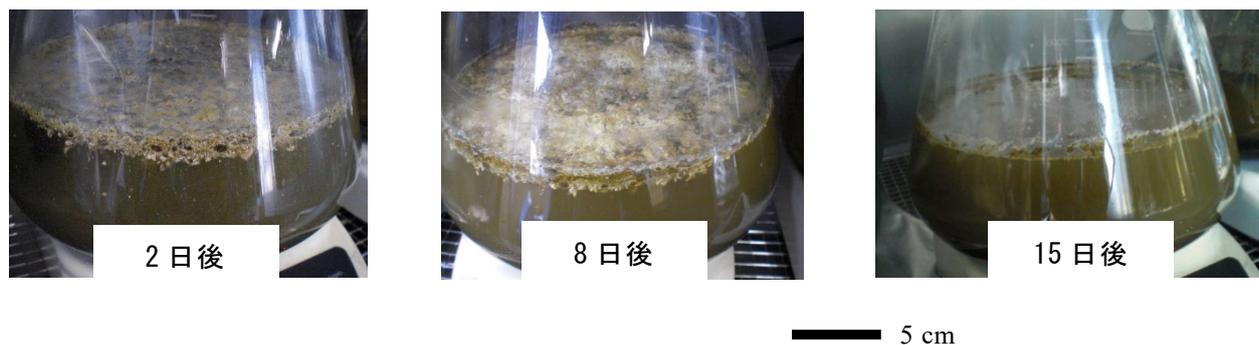


図3 発酵実験時の液面の様子（一例として、①とり肉の場合を載せる）

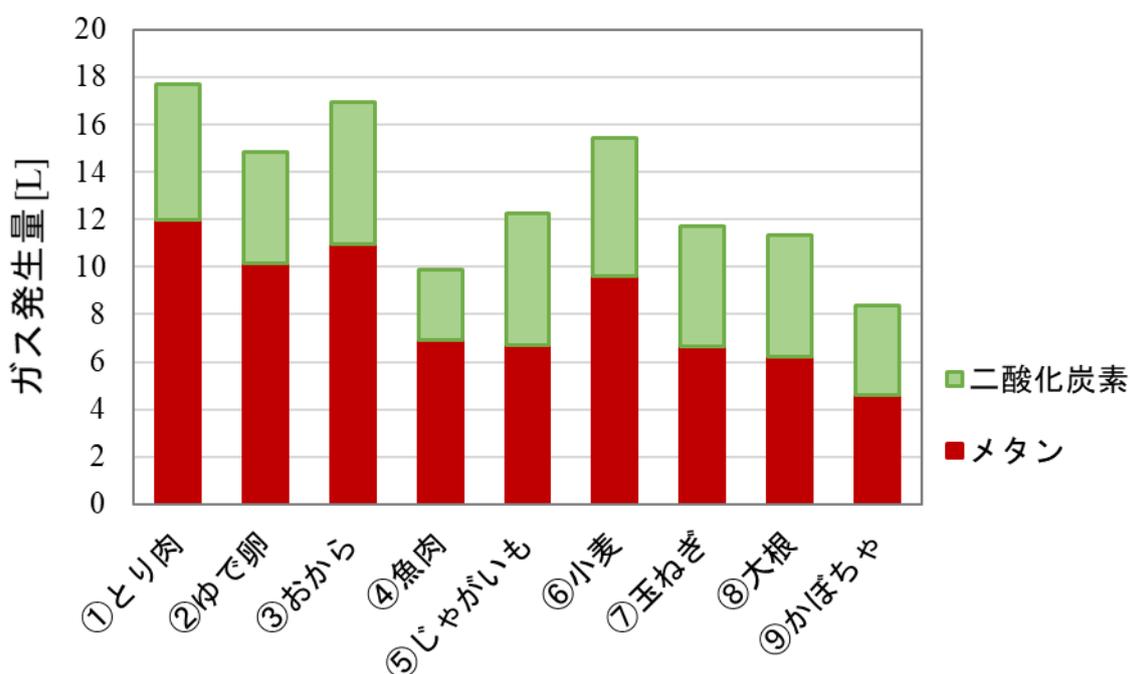


図4 各原料から発生したガスの総量、及びその組成（酸素、硫化水素については少量のため、図示せず）

いない

このように、食材・食品を中心とする原料サンプルに対する図4に示す発生ガス量のデータにおいて、可食部と非可食部とで均質でない原料においては、発生ガス量が部位によりいくらか異なることが明らかになった。とはいえ、図5に示すように、発生ガス総量に占める主要なガスの比はほぼ一定であることから、個別のガス発生量を発生ガス総量で規格化することで、各サンプルをグループ分けできると考えられた。そこで以降では、バイオガス発電の基となるメタン、及び発酵阻害

の可能性がある硫化水素について、それらの発生量を発生ガス総量で規格化して比較することとした。

図6に、発生ガス総量とメタン発生量の関係を示し、図7に同様に発生ガス総量と硫化水素発生量の関係を示す。両図において、原点と各原料の点を結んだ直線の傾きが大きいほど、その原料から相対的に多くのメタンまたは硫化水素の発生する割合が高いことを示すことになる。

図6より、発生ガス総量に占めるメタンの割合は、原料間で概ね一定であるように見える。そこ

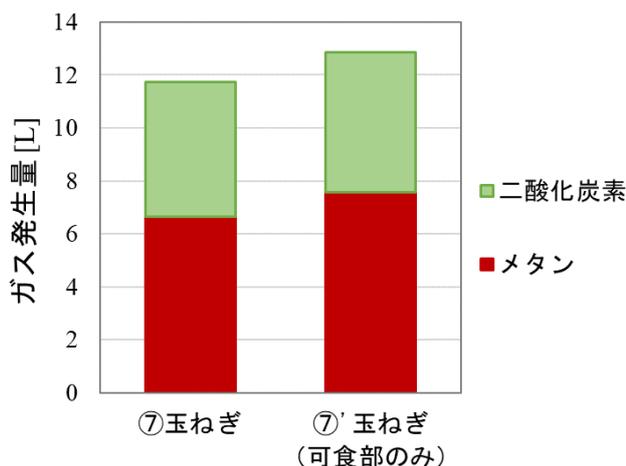


図5 サンプルの採取部分を変えた場合の発生したガスの総量、及びその組成（酸素、硫化水素については少量のため、図示せず）

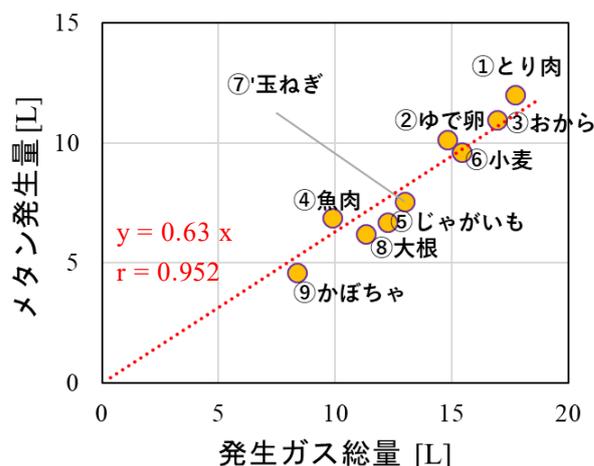


図6 メタン発生量と発生したガスの総量との関係。点線は切片なしの回帰直線

で、データを切片なしの直線に回帰した。得られた回帰係数に関し t 値に基づいて回帰の有意性の検定を行ったところ、統計量の有意確率が  $6.11 \times 10^{-11}$  ( $< 0.05$ ) であったことから、回帰が有意である、すなわち、発生ガス総量のメタンに対する相関は有意であると認められた。

一般にメタン発生比率は、原料の脂質含有率が上がると増大し、炭水化物含有率が上がると低下するとされる<sup>4)</sup>。これは化学量論的な理論計算<sup>19)</sup>によっても裏付けられており、純粋な脂質から発生するメタン比率(70%)は、純粋な炭水化物から発生するメタン比率(50%)の1.4倍にも達することになる。これに対し本研究では、図6のようにメタン発生比率に大きな差は見られなかった。これは、個別の食品原料とはいえ純粋な炭水化物または純粋な脂質でできている訳ではなく、例えばデンプン質系の食品原料であってもある程度のタンパク質・脂質を含む混合物であることから、メタン発生比率に大きな差がつかなかったためと考えられる。食品原料の配合比を変え、その炭素対窒素(C/N)比に注目した Kazimierowicz らの研究<sup>20)</sup>においても、原料のタンパク質含有比が増加し C/N 比が低下すると、バイオガス全体の発生量は増加するとしているが、バイオガス中のメタン比率についてはほぼ一定(66.6% ~ 68.6%)であるとしており、本研究の結果もこれと整合する。

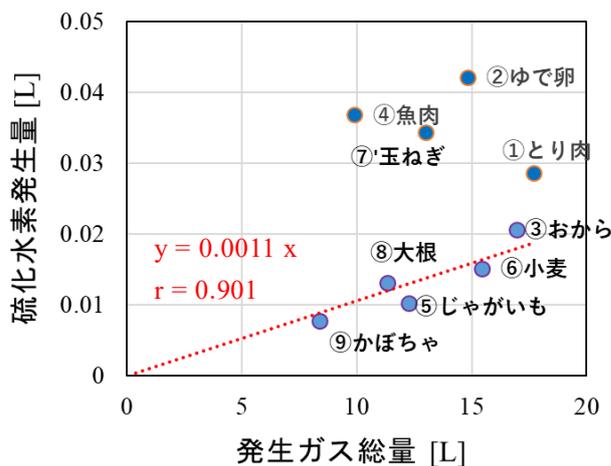


図7 硫化水素発生量と発生したガスの総量との関係。点線は5点(③おから、⑤じゃがいも、⑥小麦、⑧大根、⑨かぼちゃ)のみでフィッティングした切片なしの回帰直線

これに対し、硫化水素の発生割合は原料間で大きな開きがあった。そのため、図7では5点(③おから、⑤じゃがいも、⑥小麦、⑧大根、⑨かぼちゃ)に対する切片なしの回帰直線を示してある。ここで、回帰係数の t 値の有意確率は 0.000124 であり、回帰は有意であると認められた。この回帰直線から上に外れる、①とり肉、②ゆで卵、④魚

肉及び⑦'玉ねぎ(可食部のみ)で、硫化水素の発生割合が多いと言える。前3者はタンパク質系の原料であり硫黄分を多く含み、また玉ねぎは刺激物質である硫化アリルをはじめ硫黄含有物質が豊富であることから、硫化水素の発生につながったものと考えられる。一方タンパク質系の原料でも③おからや、野菜で硫黄化合物系刺激物質アリルイソチオシアネートを含む⑧大根は、他の野菜や穀物と比べ硫化水素発生割合に大きな差はなかった。

### 3.3 消化液の pH

発酵実験終了後の消化液の pH は、いずれの原料においても 8~9 程度の値を示した。この値は元の消化液並びにブランク実験終了後の消化液の pH 値と同じであった。Tanimu らは、中温メタン発酵において C/N 比が小さくなると緩衝効果が低減し pH 安定性が悪くなる傾向を示している<sup>21)</sup>が、本研究の範囲では個別の特徴的な食品原料を用いた発酵実験においても消化液の pH に変化はなく、酸敗がないことを確認した。

### 3.4 菌叢解析

図 8 に、生物の分類階級における目のレベルで集計した、各原料サンプルの菌叢解析の結果を示す。①ブランクでは、Clostridiales 目から Anaerolineales 目の順に存在比率が高く、他の原料サンプルにおいても同様の並びでグラフ化した。各種原料を投入した場合、①、⑦以外はブランクに比べて主たる菌叢である Clostridiales 目が減少し、また全ての原料でブランクに比べその他の菌叢が増加しているなど、概して菌叢の多様性が増加するような傾向を示した(但し、その他に属する個々の目の存在比率は多くても 2% を超えることはなかった)。これは原料を投入したことにより、その原料を好んで消化する菌叢が増えることを示唆している。例えば、④魚肉では、Cloacimonadales 目が増加しているが、この目の主要な科 Cloacimonadales\_W27 は長鎖脂肪酸を分解すること<sup>22)</sup>が知られており、魚にはドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)等の長鎖脂肪酸が多く含まれていることを反映していると考えられる。

このような菌叢の変化はあるものの、その変化は一定の範囲内に収まっている。すなわち、主要な菌叢の存在比の順が前後するだけであり、全く

別の菌叢が出現していたり、菌種組成全体が大きく変化している訳ではない。これは硫化水素発生量の多いサンプル(①, ②, ⑦等)でも同様で、こういった原料を投入しても消化液が安定に保たれていることを示している。このことは、3.3 節で述べた、食品原料を変えても消化液の発酵実験終了前後の pH が変化せず酸敗が起こっていないことと整合する。

メタン発酵に直接かかわる菌として、Methanosarcinales 目に属する Methanosaeta 属、Methanobacteria 目の Methanobacterium 属、及び Methanomicrobiales 目の Methanospirillum 属が同定された。メタン発酵槽では酸生成に関与する細菌グループが主流であり、メタン生成に関与する細菌グループはそれより 2 桁程度少ないのが一般的とされ<sup>23)</sup>、本研究における菌叢もこの 3 つの属を合わせて全体の 5% 未満の存在比であった。この 3 つの属の中では、酢酸資化性メタン生成菌である Methanosaeta 属が圧倒的に多く、水素資化性メタン生成菌である Methanobacterium 属及び Methanospirillum 属は、Methanosaeta 属の 0.5% 未満の存在比であった。これら水素資化性メタン生成菌の存在割合が小さいため図 8 には Methanosarcinales 目しか図示されていない。そこで、

(Methanobacterium 属 + Methanospirillum 属) /  
(Methanosaeta 属) 比

をとったプロットを図 9 に示す。

酢酸資化性メタン生成菌の存在割合が水素資化性メタン生成菌のそれより圧倒的に多いことから、本研究で用いた消化液によるメタン生成は、酢酸を経由してのものが主流であると言える。これは発酵時に発生するガス組成の分析において、水素が検出されなかったこととも整合する。一般的な食品廃棄物の混合物をメタン発酵した場合は Methanosaeta 属が優勢であり、これに牛糞を加えると Methanobacterium 属も Methanosaeta 属と同程度まで増加するとの報告<sup>24)</sup>がある。その場合、図 9 の存在比は 1 近くに増大することになる。本研究ではこのような Methanobacterium 属の大幅な増加がみられなかったことから、個別の特徴的な食品廃棄物を投入した場合でも、メタン発酵に関わる菌叢は一般的な食品廃棄物の混合物の場合と同様の状態を維持していると言える。

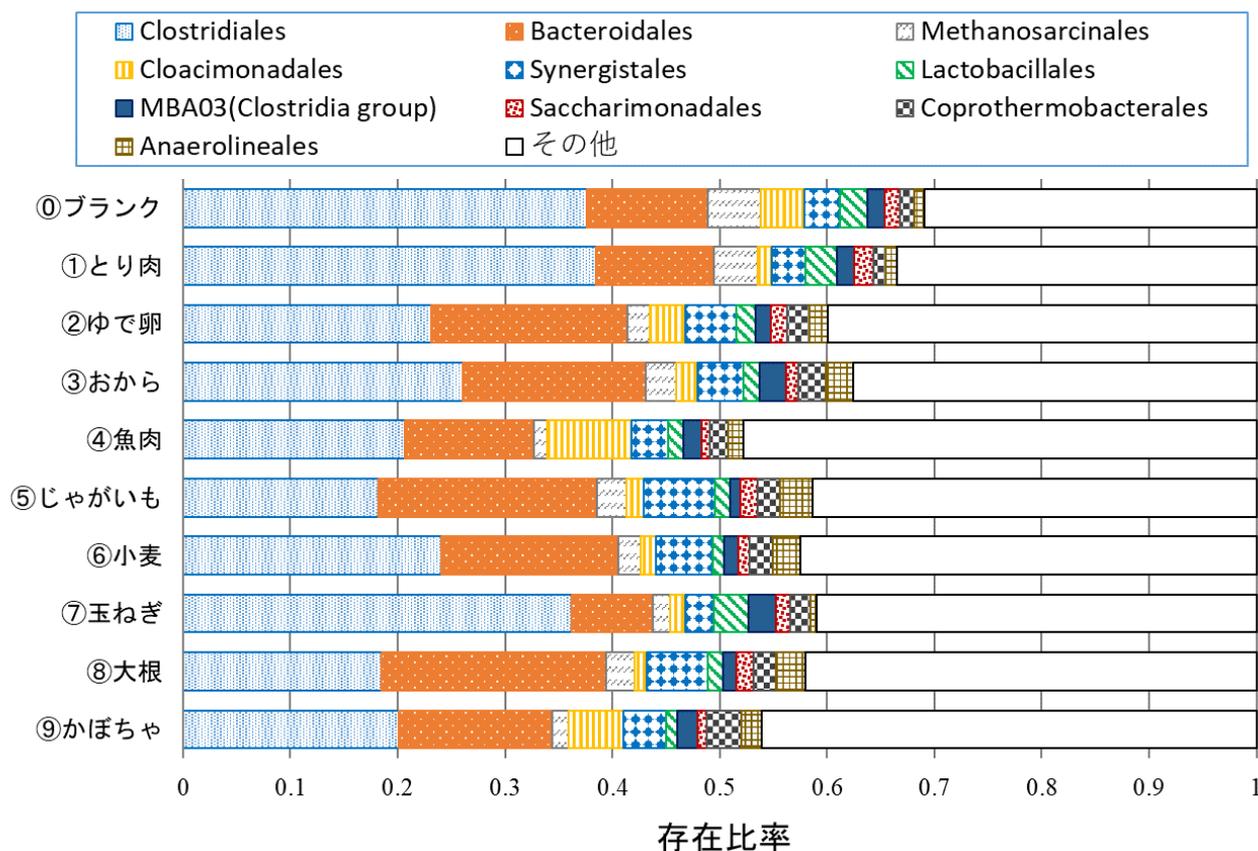


図 8 菌叢解析結果

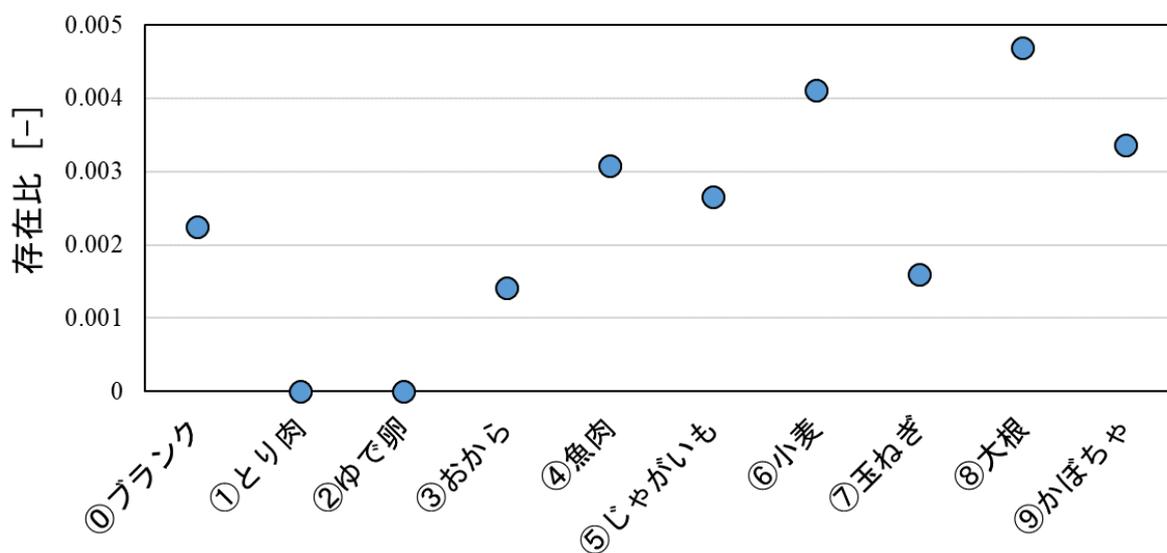


図 9 資化性の異なるメタン生成菌の存在比. 各食品原料について、水素資化性メタン生成菌 (Methanobacterium 属 + Methanospirillum 属) / 酢酸資化性メタン生成菌 (Methanosaeta 属) の比率をプロット

以上のように、消化液の性質は酢酸を経由してメタンを発生する発酵経路で安定しており、硫化水素を多く発生させるような原料を投入した場合

でも、消化液のメタン発酵能力が不可逆的に損なわれるようなことはないと考えられた。

#### 4. まとめ

本研究により、以下のことが明らかになった。

- 1) 発生ガス総量に占めるメタンの割合は、投入する原料を変えてもほぼ一定であった
- 2) 硫化水素の発生割合は、原料によって差がみられた。タンパク質系の原料で硫化水素の発生が多く、野菜系の原料で少なかったが、それぞれの系の原料間でも違いがみられた
- 3) 主要な菌叢は、原料によって存在比の変動がみられたが、全体構成が大きく変わるようなことはなかった
- 4) メタン発酵に直接かかわる菌叢としては、酢酸資化性メタン発酵菌が水素資化性メタン発酵菌より卓越しており、原料を変えた場合でもメタン発酵能力は安定していた

#### 謝辞

本研究の実施にあたり、大阪府立大学 理学系研究科 徳本 勇人 講師には菌叢解析に関するご助言・ご協力をいただきました。付記して謝意を表します。

#### 参考文献

- 1) 野池達也ほか：“メタン発酵”。技法堂出版。p10 (2009)
- 2) 園田順和ほか：“中温メタン発酵における sludge の影響”。醗酵工学, 43, p396-403 (1965)
- 3) 三津橋浩行ほか：“有機性廃棄物のメタン発酵処理特性”。北海道立工業試験場報告, 305, p45-50 (2006)
- 4) 小林拓朗ほか：“生ごみ嫌気発酵によるメタンおよび水素発生ポテンシャル”。環境技術, 40, p31-38 (2011)
- 5) 中島大介ほか：“食品廃棄物のメタン発酵 — 油前処理の有効性検討—”。静岡県工業技術研究所研究報告, 8, p7-11 (2016)
- 6) G. Kumar et al. : “Anaerobic digestion of food waste to methane at various organic loading rates (OLRs) and hydraulic retention times (HRTs): Thermophilic vs. mesophilic regimes”. Environ. Eng. Res., 21, p69-73 (2016)
- 7) (国研)新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 新エネルギー部：“バイオマスエネルギー地域自立システムの導入要件・技術指針 メタン発酵系バイオマス編”。p17 (2020)
- 8) 前川明弘ほか：“有機系廃棄物を利用したメタン発酵に関する基礎的研究”。三重県工業研究所研究報告, 41, p54-59 (2017)
- 9) 西川奈緒美ほか：“中温メタン発酵技術を用いた食品廃棄物の有効利用に関する基礎的研究”。日本化学会第 98 春季年会, 2B5-14 (2018)
- 10) 久保智子ほか：“中温メタン発酵技術を用いた食品系廃棄物の有効利用に関する基礎的研究”。第 29 回廃棄物資源循環学会研究発表会, p263-264 (2018)
- 11) 久保智子ほか：“有機系廃棄物を利用したメタン発酵に関する基礎的研究 (第 2 報)”。三重県工業研究所研究報告, 42, p79-83 (2018)
- 12) 久保智子ほか：“メタン生成菌固定化のため担体に関する基礎的研究”。日本化学会第 99 春季年会, 3G2-11 (2019)
- 13) 久保智子ほか：“竹炭と牡蠣殻を担体として用いたメタン菌の固定化および増殖に関する基礎的研究”。三重県工業研究所研究報告, 43, p124-127 (2019)
- 14) 前川明弘ほか：“中温メタン発酵技術を用いた有機性廃棄物の有効利用”。三重県工業研究所研究報告, 43, p140-146 (2019)
- 15) 松浦真也ほか：“中温メタン発酵技術を用いた有機性廃棄物の有効利用における可溶性評価と菌叢解析”。第 30 回廃棄物資源循環学会研究発表会, p257-258 (2019)
- 16) 松浦真也ほか：“メタン発酵消化液中に含まれる窒素成分の低減化に関する研究”。三重県工業研究所研究報告, 44, p118-124 (2020)
- 17) 木田建次：“メタン発酵の基礎と基盤技術開発および実証試験・実プラント・資源循環型まちづくりの紹介 (前編)”。醸協, 115, p570-583 (2020)
- 18) P. Vindis et al. : “The impact of mesophilic and thermophilic anaerobic digestion on biogas production”. J. Achievements Mater. Manufacturing Eng., 36, p192-198 (2009)
- 19) 李 玉友：“バイオマス利活用 (その 3) —メタン発酵技術—”。農業土木学会誌, 73, p739-744 (2005)
- 20) J. Kazimierowicz et al.: “Optimisation of methane fermentation as a valorization method for food

- waste products”. *Biomass and Bioenergy*, 144, 105913(10p) (2021)
- 21) M.I. Tanimu et al.: “Effect of carbon to nitrogen ratio of food waste on biogas methane production in a batch mesophilic anaerobic digester”. *Intern. J. Innov. Manage. Tech.*, 5, p116-119 (2014)
- 22) S.S. Yekta et al.: “Sulfide level in municipal sludge digesters affects microbial community response to long-chain fatty acid loads”. *Biotechnol. Biofuels*, 12, 12:259(15p) (2019)
- 23) 李 玉友 : “メタン発酵技術の概要とその応用展望”. *JEFMA*, 53, p4-18 (2005)
- 24) M. Zamanzadeh et al. : “Biogas production from food waste via co-digestion and digestion-effects on performance and microbial ecology”. *Scientific Reports*, 7, 17664(10p) (2017)