

原 著

## 嫌気性 LCFA 分解微生物群集添加による油脂のメタン発酵の効率化

松本悠暉、馮夢佳、福田康弘、中井裕、多田千佳

東北大学大学院農学研究科 989-6711 宮城県大崎市鳴子温泉蓬田 232-3

**要 約** 油脂のメタン発酵の効率を高めるために、嫌気性長鎖脂肪酸分解微生物群集の馴養を行い、オレイン酸分解によるメタンガス化の効果を確認した。長鎖脂肪酸分解に寄与する *Syntrophomonas* 属と古細菌が多く存在する長鎖脂肪酸分解微生物群集(LDMC)を作製でき、本 LDMC 添加による牛脂のメタン発酵では、LDMC 無添加のメタン発酵と比較して高い収率、且つ、3 倍速い速度でのメタンガス化が可能となった。さらに、本 LDMC 添加型メタン発酵を、食肉処理場の従来法である好気活性汚泥処理の前段に導入することについて試算した結果、年間の排水処理にかかる消費電力の 99.6%が削減でき、それに伴う CO<sub>2</sub> 排出量も年間 494.4 トンの削減が可能であることが示された。

キーワード: 嫌気性分解, 長鎖脂肪酸 (LCFA)、牛脂、LCFA 分解性微生物群集、メタン生産

受領日: 13.02.2018. 受理日: 20.04.2018.

日本畜産環境学会誌 No17 (1) pp46-57. 2018

### 緒 言

持続可能な社会構築の上で、廃棄物の有効活用による循環型社会システムへの移行が強く求められている。2015 年フランスで開催された COP21 では、2020 年以降の温室効果ガス排出削減等のための新たな国際枠組みを定めた「パリ協定」が採択され、これに伴い、バイオマス資源の再利用、エネルギー化が求められている<sup>1)</sup>。

バイオマス資源のエネルギー化、とくに含水率の高いバイオマスをエネルギー変換する技術としてメタン発酵がある。メタン発酵は多種多様な微生物が共生して段階的に有機物を分解し、その中間産物である水素、二酸化炭素、酢酸をメタンに変換する生物化学的方法である。

含水率の高いバイオマスの一つである食肉処理場廃棄物は高濃度の油脂を含み<sup>2, 3)</sup>、

油分解の好気性処理の困難さが課題となっている。食肉処理場の油脂の主成分は、長鎖脂肪酸 (long chain fatty acid, 以下 LCFA) とグリセロールのエステル結合からなる中性脂肪である。食肉および食肉処理場廃棄物中の代表的な LCFA としては、モノ不飽和脂肪酸であるオレイン酸 (C18 : 1) と飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (C16 : 0) などがあげられる。

しかし、油脂のメタン発酵プロセスでは、大きく 2 つの課題がある。つまり、① LCFA による酸生成細菌またはメタン生成古細菌への阻害、② バイオマス表面への油脂または LCFA の吸着による汚泥の浮上および菌体の流出、である<sup>4)</sup>。LCFA による嫌気性細菌への阻害は、細菌の細胞内外への物質輸送制限によると言われる<sup>5)</sup>。また、LCFA の吸着による阻害の影響は酸生成細菌群よりもメタ

## LCFA 分解菌群添加メタン発酵

ン生成古細菌に対して顕著であり、メタン生成古細菌の中では、酢酸資化性メタン生成古細菌の方が水素資化性メタン生成古細菌よりも LCFA 阻害の感受性が強いといわれている<sup>6, 7)</sup>。

LCFA の阻害毒性は炭素鎖数および飽和度に関係しており、飽和 LCFA よりも不飽和 LCFA の方がより毒性が強い<sup>8, 9)</sup>。LCFA の分子中の二重結合の増加とともに1分子あたりの表面積も増加するため、メタン生成古細菌表面に吸着した際に、飽和脂肪酸に比べ不飽和脂肪酸はより少ない分子数で菌体表面のより多くの感受性領域を覆ってしまう<sup>10)</sup>。したがって、不飽和脂肪酸であるオレイン酸はパルミチン酸よりもメタン生成菌に対して阻害毒性が強いことが知られている<sup>11, 12)</sup>。

LCFA は  $\beta$  酸化経路で酢酸と水素に分解される<sup>13)</sup>。しかし、LCFA の  $\beta$  酸化は熱力学的な理由から水素分圧が低い状態でのみ反応が進行する<sup>14, 15)</sup>。したがって、LCFA の  $\beta$  酸化分解には水素資化性メタン生成古細菌のような水素消費者と酸生成細菌との共生関係が不可欠である<sup>16)</sup>。嫌気条件下でメタン生成古細菌と共生関係を作り、LCFA を分解利用できる細菌種は Syntrophomonaceae 科<sup>16-21)</sup>、もしくは Syntrophaceae 科<sup>22)</sup>に分類される。嫌気発酵槽に油脂またはオレイン酸 Na などの LCFA を添加して長期間馴養をすることで発酵槽内の微生物群集における *Syntrophomonas* 属の割合が増加し、発酵系全体での LCFA 阻害に対する耐性の獲得とメタンガスへの変換効率の向上が可能になることも示されている<sup>23, 24)</sup>。

しかし、馴養した汚泥を種菌として添加した際の有効性については報告されていない。さらに、メタン発酵系における不飽和 LCFA の詳細な分解経路は明らかになっていない。

本研究では、不飽和 LCFA のメタン発酵における LCFA 分解性微生物群集(LCFA degradable

microbial community、以下 LDMC) の添加がもたらす効果を明らかにすることを目的とし、オレイン酸のメタン発酵におけるオレイン酸馴養種菌群集添加の有用性および *Syntrophomonas* 属を中心とした微生物変動について解析を行なった。さらに、牛脂のメタン発酵における LDMC 添加の効果を明らかにし、その結果を用いて、食肉処理場の排水処理へ LDMC 添加メタン発酵を導入する効果について試算して検討した。

### 材料および方法

#### 1 LCFA 分解種菌の馴養

LDMC は以下に示す 3 種類の原料から作製した。宮城県大崎市鳴子温泉地区で、食用油を多く使用する飲食店 A のグリーストラップからの排水、同じく食用油を多く使用する飲食店 B のグリーストラップからの排水、および鳴子温泉の家庭から排出される生ゴミを用いた中温メタン発酵槽(宮城県大崎市鳴子温泉)の消化汚泥を採取した。それらに、それぞれ Yeast extract 4.0 g/l, NaCl 3.0 g/l,  $\text{Na}_2\text{S}$  0.5 g/l, L-システイン 0.5 g/l, および基質として脂質高含有食品残渣を加え、35°C で 110 日間の嫌気性培養による馴養を行った。飲食店 A、飲食店 B、中温メタン発酵槽から採取した排水や消化液を馴養して得られた種菌群集をそれぞれ A、B、C とした。

#### 2 オレイン酸分解試験と化学成分分析

2.1 で得られた種菌群集 A、B、C をそれぞれ 10ml に、メタン発酵用種菌 90ml、オレイン酸 Na を 2mM になるように 100ml のバイアル瓶に投入し、窒素置換後、35°C で嫌気培養を行なった。培養過程において pH を測定した。メタン発生量は、バイオガス量をシリンジで測定し、得られたバイオガス組成は TCD 型検出器ガスクロマトグラフ(GC-8A、

## LCFA 分解菌群添加メタン発酵

(株)島津製作所)を用いて測定した。キャリアガスは窒素(牛脂試験ではアルゴン)を使用し、カラム温度 90 ° C、注入孔温度 100 ° C に設定した。カラムパックは Shincarbon ST(信和化工(株))、クロマトパックは C-R8A(株)島津製作所を使用した。

Chemical oxygen demand(COD)は、溶存性 COD(dCOD)は HACH Digestion Solution for COD 0-1500 ppm Range(HACH)および吸光光度計 DR/890(HACH)を用いて比色法で測定した。dCOD用のサンプルは孔径 0.45 μm のメンブレンフィルター(ADVANTEC)でろ過して使用した。

VFA 濃度はサンプルを孔径 0.45 μm のメンブレンフィルター(ADVANTEC)でろ過し、High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)(日本分光(株)、東京)を用いて測定した。カラムは RSpak KC-811 および RSpak KC-G(Shodex)、検出器には UV-2070 Plus(日本分光(株)、東京)を使用した。溶離液には 3 mM の HClO<sub>4</sub>、反応液には 0.2 mM の BTB および 15 mM のリン酸水素二ナトリウムの混合溶液を使用し、それぞれの流速は 1.0 ml/min、1.5 ml/min、カラム温度 60 ° C、波長 445 nm に設定した。

LCFA 分析は培養 0、2、4、9、14 日目に注射針を装着したシリンジを用いて発酵液約 3 ml をサンプルとして引き抜いた。引き抜いた発酵液サンプルを 15 ml チューブに入れ、-20 ° C で冷凍保存、凍結乾燥処理後に、One-step method をもとにしてサンプルに含まれる脂肪酸の抽出およびメチルエステル化を行った。まず遠沈管に凍結乾燥処理を施したサンプル、内部標準物質としてトリコサン酸(C23:0、(株)東京化成、東京) 1 ml、BF<sub>3</sub> メタノール 2 ml、およびヘキサン 4 ml を入れ、100 ° C のウォーターバスで 2 時間煮沸し、脂肪酸の抽出およびメチルエステル化を行った。室温で冷却し、ヘキサン 1 ml、

MilliQ 水 2 ml を加えて良く攪拌した後、838 G(2500 rpm)で 3 分間遠心分離を行い、脂肪酸メチルエステルを含むヘキサン層のみを回収し、分析試料とした。この分析試料をキャピラリーカラム(Select FAME, 0.25 mm, 100 m, Agilent, California)を装填したガスクロマトグラフィー(GC-2014、(株)島津製作所、京都)を用いて脂肪酸組成分析を行った。分析条件は 150°C 5 min、150-230°C/min、230°C 10 min、230-250 ° C-4°C/min の昇温プログラムで、キャリアガスにはヘリウムを用いた。標準物質にはスペルコ社製の spelco37, bacterial FA, PUFA-3 を用い、それぞれのリテンションタイムから各脂肪酸の同定を行った。

### 3 微生物解析

微生物解析は、培養 0 日目と 14 日目で行なった。発酵液サンプル 200 μl から DNA を抽出した。DNA 抽出には Power Soil DNA Isolation Kit(MO BIO Laboratory 社)を用いた。

培養過程前後の微生物群集について LCFA 分解に寄与すると報告されている、*Syntrophomonas* 属および古細菌群(メタン生成古細菌と近似)の定量を real-time PCR 法にて計測した。real-time PCR の分析には、Thermal Cycler Dice® Real Time System Single(タカラバイオ(株)、滋賀)を用いた。*Syntrophomonas* 属に特異的なプライマーは Forward プライマーに Synm678 (CCWGGTG TAGCGGT)、Reverse プライマーに Synm-738(TCAGGGYCAGTCCAG)を用い、Taqman プローブに Synm-696(TGCGTAGAAATCAGGAGG AAYACCAGT)を作成した<sup>23)</sup>。PCR 反応液量を 25 μl とし、Probe qPCR Mix(タカラバイオ(株)、滋賀) 12.5 μl、濃度 20 μM の Synm-678F, Synm-696, Synm-738R をそれぞれ 0.25 μl、滅菌 MilliQ 水 9.75 μl、抽出 DNA サンプル

## LCFA 分解菌群添加メタン発酵

2.0  $\mu\text{l}$  となるよう調整した。温度条件は  $95^\circ\text{C}$  10 分の加熱処理を行った後、熱変性の  $95^\circ\text{C}$  10 秒とアニーリング及び伸長反応の  $60^\circ\text{C}$  30 秒処理を 1 サイクルとして 35 サイクルを行った。古細菌は 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマー 1106F (TTW AGT CAG GCA ACG AGC) と 1378R (TGT GCA AGG AGC AGG GAC) を用いた<sup>25)</sup>。PCR 反応酵素液に MightyAmp™ for Real Time (SYBR® Plus) (タカラバイオ (株), 滋賀) 12.5  $\mu\text{l}$ 、濃度 10  $\mu\text{M}$  の 1106F, 1378R をそれぞれ 1.0  $\mu\text{l}$ 、滅菌 MilliQ 水 9.5  $\mu\text{l}$ 、抽出 DNA サンプル 1.0  $\mu\text{l}$  となるよう調整した。PCR 温度条件は  $95^\circ\text{C}$  10 分の加熱処理を行った後、熱変性の  $95^\circ\text{C}$  10 秒とアニーリングの  $57^\circ\text{C}$  10 秒、伸長反応を  $72^\circ\text{C}$  8 秒処理を 1 サイクルとして 50 サイクルを行った。PCR 反応後、融解曲線分析を行った。分析温度条件は初期熱変性  $95^\circ\text{C}$  15 秒、 $60^\circ\text{C}$  30 秒の後、 $60\text{--}90^\circ\text{C}$  まで  $0.5^\circ\text{C}$  ずつ上昇させ、各段階で 5 秒固定し、最後に  $90^\circ\text{C}$  15 秒として行った。

### 4 LDMCを用いた牛脂のメタン発酵

実際の現場状況に合わせて食肉処理場で排出される牛脂をメタン発酵することにした。牛脂中には、50%のオレイン酸、23%のパルミチン酸、8%のステアリン酸、7%のパルミトリン酸、12%のその他が含まれている。100 ml 容バイアル瓶に、メタン発酵用種菌 80 ml と牛脂 50  $\mu\text{l}$  を添加した。それに、本実験で作製した LCFA の分解効果が高い LDMC 20ml を添加し、 $35^\circ\text{C}$  で 6 時間の振とう培養をおこなった。また、無添加区ではイオン交換水 20ml を添加した。 $35^\circ\text{C}$  で 6 時間の振とう培養を行なった後、 $35^\circ\text{C}$  で 20 日間の静置培養を行い、LDMC 添加区と無添加区での培養過程におけるメタン生成量を比較した。

### 5 食肉処理場へのLDMCを活用したメタン発酵の導入効果の評価

食肉処理場排水のデータを参考に試算を行った<sup>26)</sup>。本食肉処理場では、最大 1800  $\text{m}^3/\text{日}$  の排水が流入し、その水質は BOD 1500mg/l、ノルマルヘキサン抽出物 500 mg/l となっている。好気性排水処理をする場合とメタン発酵を導入した場合の排水処理にかかる電力量を比較した。活性汚泥処理における排水処理コストは、東京都の下水処理にかかる電力の区部下水道 156kWh/ $\text{千m}^3$  と、区部の下水道の流入水 BOD (139mg/l) と処理後の BOD (2mg/l) 値から BOD 除去あたりの消費電力を試算して (1.1387kWh/lgBOD 除去) 用いた<sup>27)</sup>。本試算では排水の BOD と COD 値を同等と仮定した。発電能力は 60% のメタンガスを含むバイオガス  $1\text{m}^3$  あたりで 2 kWh 発電できるものとして試算した。また、メタン発酵については、 $1\text{m}^3$  のバイオガスを生産するために使用する消費電力量が 0.3559 kWh/ $\text{m}^3$  biogas を用いて試算した<sup>28)</sup>。消費電力に  $\text{CO}_2$  排出係数は、東京電力の 2016 年度の値の 0.474 kg $\text{CO}_2/\text{kWh}$  を用いた。また、消費電力コストは 20 円/kWh とした。比較条件は、①排水を全て好気性処理するもの、②排水を先に LDMC 導入メタン発酵でバイオガス発電して残りの排水を好気性排水処理するもの、③ LDMC 無添加メタン発酵で発電と好気性処理を行う、3 条件で比較した。

### 結果および考察

#### 1 LCFA 高含有食品で馴養した種菌群集添加によるオレイン酸のメタン発酵

Fig. 1 に培養前後の  $\text{COD}_{\text{cr}}$  減少量を示す。種菌群集 A と C をそれぞれ添加した区 (A 区、C 区) で、種菌無添加の対照区に比較して 2 倍以上多く COD が減少した。それに対して種菌群集 B を添加した B 区では、対照区に比較しても COD の減少が少なかった。

Fig. 2 に累積メタンガス量を示す。培養 14

## LCFA 分解菌群添加メタン発酵

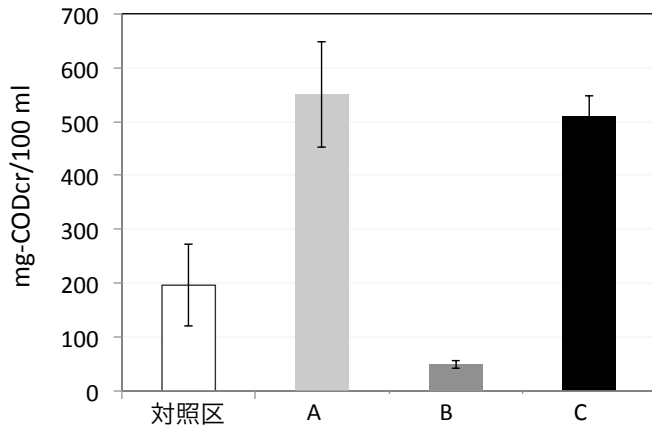


Fig.1 Decrease in COD after 14 days of anaerobic digestion for oleic acid.

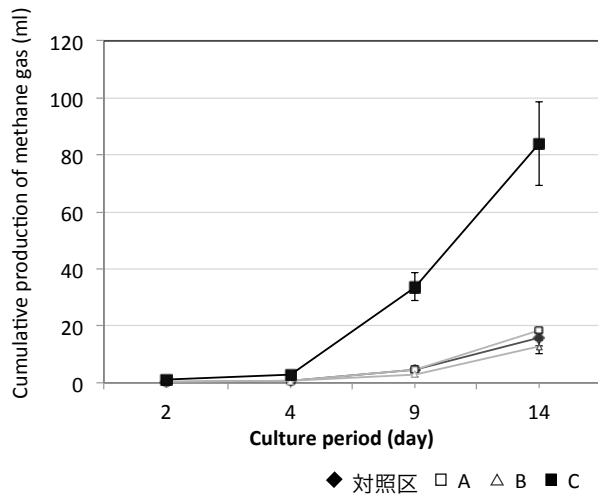


Fig.2 Cumulative methane production during anaerobic digestion for oleic acid.

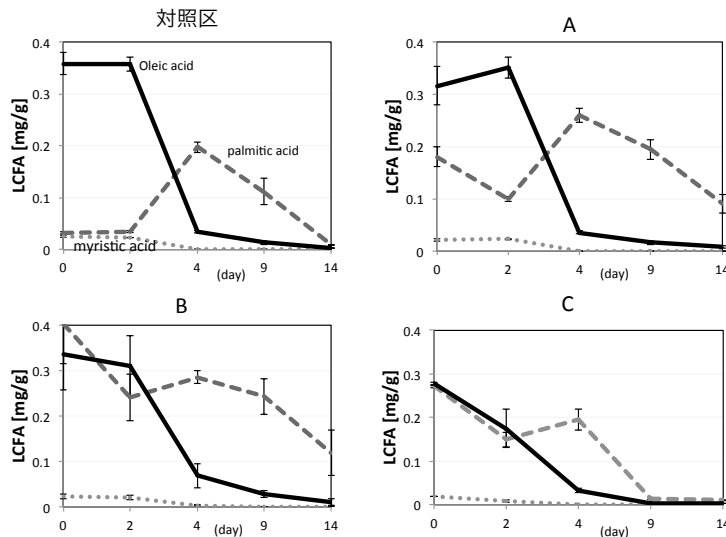


Fig.3 Degradation of LCFA during anaerobic digestion for oleic acid

日目までの累積メタン発生量はC区がもっとも高く、無添加の対照区に比較して約5倍高いメタンガスが発生した。また、C区ではメタンガス発生時期も早く、4日目以降急激にメタンガスが発生したのに対し、その他の区では、4日目以降も非常に緩やかにメタン生成が生じた。

Fig. 3にLCFA分解の結果を示す。オレイン酸の分解に伴い、パルミチン酸が検出され、その後パルミチン酸も分解された。C区では他区に比較してオレイン酸分解が培養2日目にすでに始まり、初期濃度の37%が減少したのに対し、対照区、A区、B区では、2日目ではオレイン酸の減少が見られなかった。培養4日目には、どの区もオレイン酸濃度は同程度に分解された。一方、パルミチン酸については、C区では培養9日目ではほとんど検出限界値に近づいたのに対し、対照区では0.11 mg/g 検出され、A区、B区でもそれぞれ0.19 mg/g、0.24 mg/g と存在した。よって、C区ではパルミチン酸の分解も他区に比べて早かった。

Fig. 4より、酢酸濃度は、A区では約3500 mg/Lの酢酸が蓄積し、対照区でも約2260 mg/Lの酢酸が検出された。一方、C区では、培養14日目に

## LCFA 分解菌群添加メタン発酵

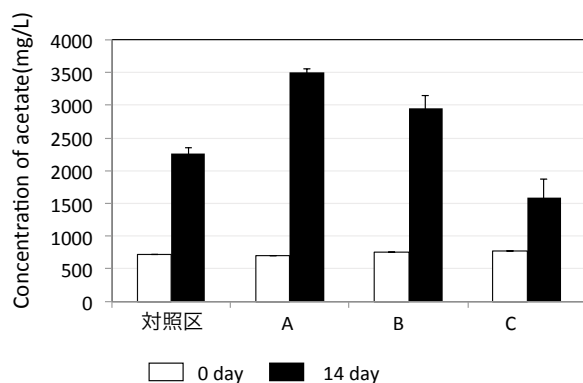


Fig.4 Concentration of acetate before and after anaerobic digestion for oleic acid.

において 1500 mg/L 検出され、他区に比べ最も低かった。A 区や対照区での酢酸の蓄積は、酢酸が速やかにメタンガス化していないことが原因と考えられる。

LCFA の吸着による代謝阻害の影響は、酸生成細菌群よりもメタン生成古細菌に対して顕著であり<sup>6)</sup>、とくに酢酸資化性メタン生成古細菌の方が水素資化性メタン生成古細菌よりも LCFA 阻害への感受性が強いといわれている<sup>29)</sup>。これらのことから、LCFA 分解が遅かった対照区や A 区では酢酸資化性メタン菌の LCFA による阻害が高かったことが考えられ、C 区では、オレイン酸やパルミチン酸の分解が早かったことから、酢酸資化性メタン菌の阻害が他区より少なく、酢酸の蓄積が最も低かったと考えられる。

既往研究では、オレイン酸の中間分解産物としてパルミチン酸の蓄積が確認されており<sup>30)</sup>、対照区や A 区、B 区と同様の結果となった。しかし、C 区ではパルミチン酸の分解も早かった。LCFA の  $\beta$  酸化分解には、水素資化性メタン生成古細菌のような水素消費者と酸生成細菌との共生関係が不可欠であることが知られる<sup>14)</sup>。また、メタンガス発生量の結果からも、C 区ではメタンガスの発生時期が早く、発生量も高かった。これらの結果より、C 区の種菌には、水素資化性メタ

ン生成古細菌が、その他の区に比較して多く存在した可能性が考えられた。

### 2 種菌群集 A、B、C の *Syntrophomonas* 属および古細菌の微生物量

Fig.5 に realtime PCR による *Syntrophomonas* 属および古細菌のコピー数の結果を示す。

これらの結果より、C 区では 14 日目の *Syntrophomonas* 属のコピー数が、他区に比較して高く、対照区の約 2 倍高かった。また、古細菌のコピー数についても C 区で最も高いことが明らかになった。この原因は、これまでの酢酸濃度の結果 (Fig. 4) やメタンガス量の結果 (Fig. 2) も踏まえると、C 区には酢酸資化性のメタン菌も存在し、それらが増殖したのに対し、他区では酢酸資化性メタン菌が LCFA の阻害を受けて増殖できなかった可能性が考えられた。また、オレイン酸分解やパルミチン酸分解には、*Syntrophomonas* 属と水素資化性メタン菌の共生関係が必要とされることから<sup>16, 18, 20)</sup>、オレイン酸分解の早かった C 区では、水素資化性メタン菌の数が多かった可能性も考えられた。以上より、C 区の微生物群集を、以後、LCFA 分解微生物群集として LDMC (LCFA degradable microbial community) とした。

### 3 LDMC を用いた牛脂のメタン発酵

Fig. 6 に牛脂を用いたメタンガス生成量を示す。オレイン酸を 50% 含む牛脂のメタン発酵でも、LDMC 無添加区に比べて LDMC 添加区においてメタンガス発生量が多くなり、ガス発生量の改善が見られた。無添加区では 5 日目まで、ほとんどメタンガスが発生しなかったのに対し、添加区では 3 日目にすでに

## LCFA 分解菌群添加メタン発酵

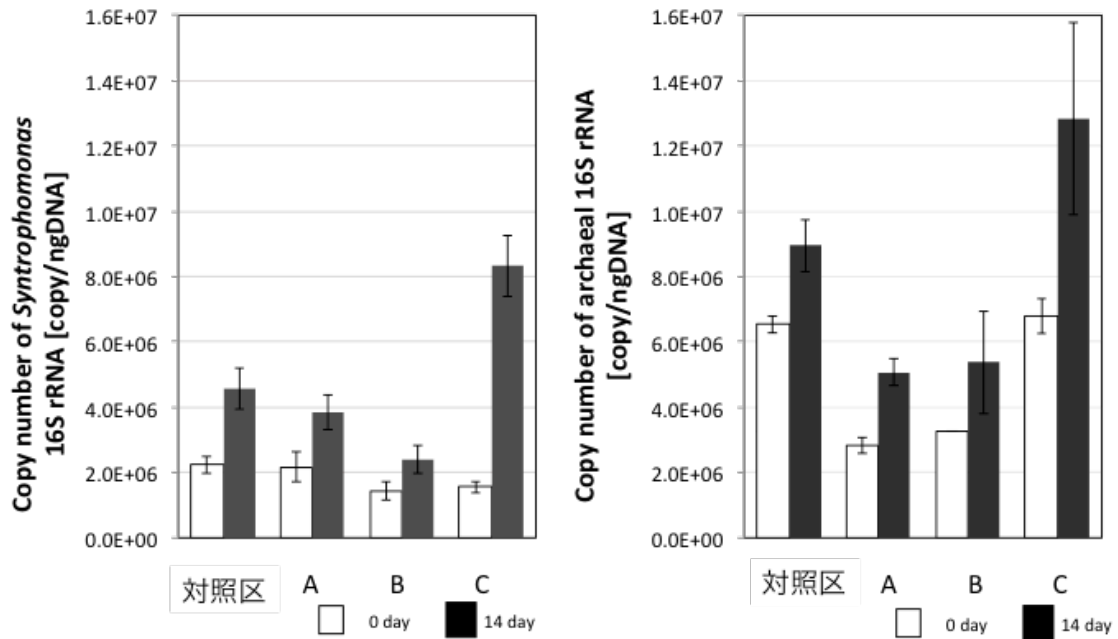


Fig.5 Number of *Syntrophomonas* and archaea during anaerobic digestion for oleic acid.

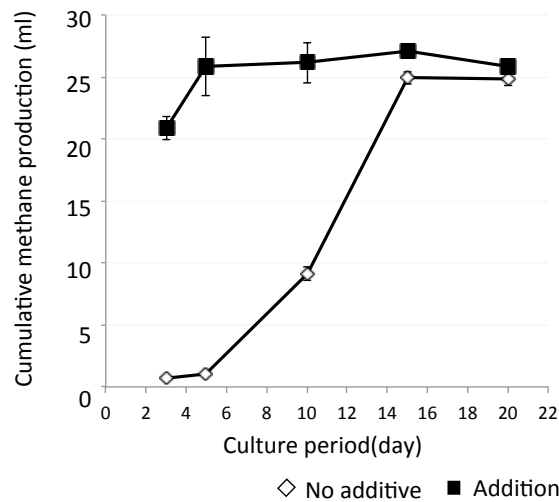


Fig.6 Cumulative methane production during anaerobic digestion for beef tallow.

高いメタンガスの発生量が認められている。両区の5日目までのメタン収率は、無添加区では2%であったが、LDMC添加区で50.45%であった。これより、LDMC添加区は、無添加区に比べてメタンガス発生速度も速いことがわかった。またFig.7の酢酸濃度の結果から、無添加区では徐々に酢酸が増加して培養10

日目には150 mg/lの酢酸の急激な増加が見られたが、LDMC添加区では酢酸の蓄積が見られなかった。

これらのことから、LDMC添加によってメタン発酵で課題となるラグフェーズの改善、酢酸の蓄積も抑制され、速やかなメタンガス化が可能になっていた。

## LCFA 分解菌群添加メタン発酵

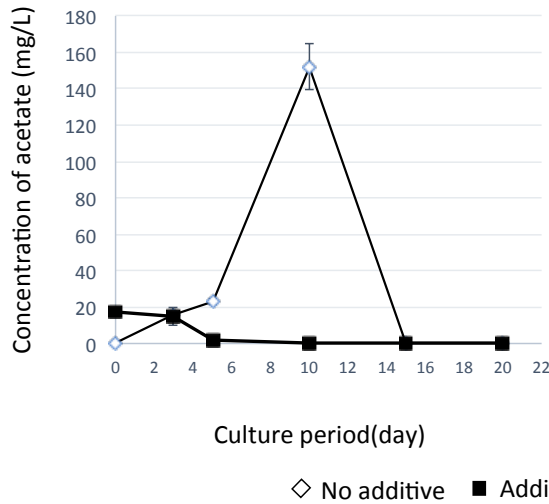


Fig.7 Concentration of acetate during anaerobic digestion for beef tallow.

牛脂の場合にはオレイン酸ナトリウムと異なり、可溶性ではなく水の上に浮き上がってスカムをつくりやすい。本研究で得られたLDMCは可溶性のオレイン酸ナトリウムに対してだけでなく、不溶性の油に対しても十分に効果を発揮することが明らかとなった。また、プラトーに達するまでの分解速度は、LDMC添加区では無添加区の約3倍速かったことから、リアクターの必要体積を3分の1に縮小することが可能であることが示された。

### 4 食肉処理場の排水処理におけるLDMC添加メタン発酵の導入効果

Table 1 に試算した評価結果を示す。食肉

処理場の 1800 m<sup>3</sup>/日の排水をすべて従来法の好気性処理で行う場合、1日のBOD負荷量(1500 mg/L)と処理目標 100mg/lより、除去しなければならないBOD量は、1800 × 10<sup>3</sup> l/日 ×

(1.5-0.1 g/l)=2520 × 10<sup>3</sup> g/日=2520 kgBOD/日となり、東京都下水道の実績より、1kgのBOD除去にかかる活性汚泥の消費電力量が1.1387 kWh/1kgBOD除去量であることからBOD除去にかかる電力は2520 kgBOD/日 × 1.1387 kWh/1kgBOD除去量=2869.5 kWh/日となり、それに伴うCO<sub>2</sub>排出量はCO<sub>2</sub>排出係数が0.474kg/CO<sub>2</sub>/kWh(東京電力)から2869.5 × 0.474=1360.14 kg CO<sub>2</sub>/日となった。一方、LDMC添加メタン発酵を導入する場合には、流入有機物 1800 × 10<sup>3</sup> l/日 × (1.5 g/l) kgBOD/日=2700 kgBOD/日の50.45%がバイオガス化して残り半分は好気性排水処理となる。バイオガス発電では、BOD=CODと仮定し、また、1kgCODあたりのメタンガス化は理論値が0.35 m<sup>3</sup>/1kgCODより1362.2 × 0.35=476.8

Table 1 Evaluation on introduction of anaerobic digestion to water treatment in a slaughterhouse.

	preconditions	power consumption (kwh/day)	CO <sub>2</sub> emission (kgCO <sub>2</sub> /day)	Cost of power consumption (yen/year)
①	Aerobic treatment	2869.5	1360.14	20,947,350
②	Anaerobic digestion with LDMC and aerobic treatment	12.1	5.74	88,330
③	Anaerobic digestion without LDMC and aerobic treatment	2756.2	1306.44	20,120,260



## LCFA 分解菌群添加メタン発酵

m<sup>3</sup>/日のメタンガスが生産される。通常、バイオガスはメタン濃度 60%、CO<sub>2</sub> 40%なので、実際に得られたバイオガス量は 476.8 m<sup>3</sup>/日 ÷ 0.6=794.6 m<sup>3</sup>/日となり、発電量は、1m<sup>3</sup>のバイオガスあたり 2kWh の発電量が得られることから 794.6×2=1589.2 kWh/日となる。バイオガス生産にかかる消費電力量の差引きが 1589.2-282.8=1306.4 kWh/日のプラスとなり、好気性排水処理にかかる消費電力量が 1318.4 kWh/日のマイナスとなることから、LDMC 添加メタン発酵と好気性排水処理における全体の消費電力量は 12.1 kWh/日と 99.6%の削減となり、CO<sub>2</sub> 排出量は 5.74 kgCO<sub>2</sub>/日となった。LDMC 無添加のメタン発酵の場合には、流入有機物の 2%しかバイオガス化できないので、2700×0.02=54 kgCOD 54×0.35÷0.6=31.5 m<sup>3</sup>/日 (バイオガス量)、31.5 m<sup>3</sup>/日×2 kWh/m<sup>3</sup>=63.0 kWh/日の発電量、31.5×0.3559 kWh/m<sup>3</sup>=11.2 kWh/日の運転電力消費量、さらにメタン発酵全体の生産電力と消費電力の差し引きは 63.0-11.2=51.8 kWh/日の生産量となる。よって、好気性排水処理にかかる電力は 2808.0kWh が消費され(マイナス)との関係で これらすべての合計の消費電力量は 2756.2kWh/日になり、CO<sub>2</sub> 排出量は 1306.44 kgCO<sub>2</sub>/日となった。年間の排水処理にかかる CO<sub>2</sub> 排出量は、従来法の好気性排水処理のみに比較すると、(1360.14 kgCO<sub>2</sub>/日 -5.74 kgCO<sub>2</sub>/日) × 365=494.356 kgCO<sub>2</sub>/年 ÷ 494.4 トン CO<sub>2</sub>/年削減可能であることが試算された。

従来の好気性排水処理のみの場合には、COD 除去にかかる電力コストは年間にすると 2869.5×365×20=20,947,350 円/年間であり、また、LDMC 無添加のメタン発酵では、2756.2×365×20=20,120,260 円/年間となるため、ほとんどメリットが出ない。一方、LDMC 添加メタン発酵の導入では、12.1×365×20=88,330 円/年間となった。よって、好気

性処理の前段に LDMC 添加メタン発酵を導入することで、年間の排水処理にかかる電力コストは、従来法の好気性排水処理のみに比較すると約 20,859,020 円 (99.6%) 削減可能であることが試算された。従来のメタン発酵システムの場合には、食肉処理場にメタン発酵を導入するメリットがなかった。しかし、LDMC 添加のメタン発酵によって、LCFA 分解の課題が解決されることで大きな経済的なメリットが生まれるとともに、排水処理にかかる CO<sub>2</sub> 排出量を大きく削減できる可能性が想定された。

### まとめ

本研究では、LCFA 分解嫌気性微生物群集 (LDMC) を作製し、油脂のメタン発酵における効果と食肉処理場の排水処理にメタン発酵を導入する効果を試算して検討した。

- 1) メタン発酵の消化液を馴養した種菌群集 C では、*Syntrophomonas* 属と古細菌の存在量が高いことがわかった。
- 2) 種菌群集 C をオレイン酸のメタン発酵や牛脂のメタン発酵に添加することで 無添加に比べて 5 倍高いメタン生成量を得たため、この種菌群集 C を LDMC とした。
- 3) 食肉処理場からの排水処理にメタン発酵を導入する場合には、LDMC 無添加のメタン発酵では排水処理にかかる消費電力量を大きく下回る発電量しか生産できなかったが、LDMC 添加メタン発酵では、好気性排水処理にかかる消費電力量とメタン発酵で得られる発電量がほぼ同等であると試算された。

以上より、LDMC 添加メタン発酵システムは油脂のメタン発酵の高収率化に有効であり、今後、現場適用に向けた利用法の検討により、油脂を含む排水処理のコストの低減、再生可能エネルギー生産、CO<sub>2</sub> 削減に大きく貢献できる可能性があるものと考えられた。

## LCFA 分解菌群添加メタン発酵

### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、東北大学大学院工学研究科環境生態工学研究室の皆様、LCFA 分析において分析機器の使用や分析手法の指導をしていただき、大変お世話になりました。ここに感謝申し上げます。

### 文 献

- [1] 農林水産省地球温暖化対策計画、平成 29 年 3 月 14 日、農水省([http://www.maff.go.jp/j/kanbo/kankyo/seisaku/s\\_ondanka/attach/pdf/senryaku-3.pdf#search=%27農林水産省地球温暖化対策計画%27](http://www.maff.go.jp/j/kanbo/kankyo/seisaku/s_ondanka/attach/pdf/senryaku-3.pdf#search=%27農林水産省地球温暖化対策計画%27))
- [2] Sayed S, van der Zanden J, Wijffels R, Hade C. (1988) Anaerobic degradation of the various fractions of slaughterhouse wastewater. *Biological Wastes* 323, 117-142
- [3] Salminen E, Rintala J. (2002) Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste-a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 13-26
- [4] Alves M. M, Pereira M. A, Sousa D. Z, Cavaleiro A. J, Picavet M, Smidt H, Stams A. J. (2009). Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long - chain fatty acids (LCFA). *Microbial biotechnology*, 2(5), 538-550
- [5] Pereira M. A, Sousa D. Z, Mota M, Alves M. M. (2004). Mineralization of LCFA associated with anaerobic sludge: kinetics enhancement of methanogenic activity and effect of VFA. *Biotechnology and bioengineering*, 88(4), 502-511
- [6] Pereira M. A, Cavaleiro A. J, Mota M, Alves M. M. (2003). Accumulation of long chain fatty acids onto anaerobic sludge under steady state and shock loading conditions: effect on acetogenic and methanogenic activity. *Water Science and Technology*, 48(6), 33-40
- [7] Lalman J. A, Bagley D. M. (2001). Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. *Water research*, 35(12), 2975-2983
- [8] Taylor R. J. (1965). *The Chemistry of Glycerides*. London, UK : Unilever Ltd.
- [9] Hwu, C. S., Tseng, S. K., Yuan, C. Y., Kuilk, Z., Lettinga, G. (1998) Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. *Water Research*, 32(5), 1571-1579
- [10] Lalman, J. A. & Bagley, D. M. (2001) Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. *Water research*, 35(12), 2975-2983
- [11] Lalman, J. A. & Bagley, D. M. (2002) Effects of C18 long chain fatty acids on glucose, butyrate and hydrogen degradation. *Water research*, 36(13), 3307-3313
- [12] Long, J. H., Aziz, T. N., Francis, L. & Ducoste, J. J. (2012). Anaerobic co-digestion of fat, oil, and grease (FOG): a review of gas production and process limitations. *Process Safety and Environmental Protection*, 90(3), 231-245
- [13] Weng C N, Jeris J S. (1976). Biochemical mechanisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids. *Water Research*, 10(1), 9-18
- [14] Mavrovouniotis, Michael L. (1991). Estimation of standard Gibbs energy changes of biotransformations. *Journal of Biological Chemistry*, 14440-14445.
- [15] Thauer, R. K., Jungermann, K. (1977). Decker K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria,

## LCFA 分解菌群添加メタン発酵

- Bacteriological Reviews, 41, 100-180
- [16] Sousa D Z, Smidt H, Alves M M, Stams A J. (2009). Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids. *FEMS microbiology ecology*, 68(3), 257-272
- [17] McInerney M J. (1992). The genus *Syntrophomonas* and other syntrophic bacteria. *The Prokaryotes*, 2048-2057
- [18] Zhao H, Yang D, Woese C R, Bryant M P. (1993). Assignment of fatty acid- $\beta$ -oxidizing syntrophic bacteria to *Syntrophomonadaceae* fam. nov. on the basis of 16S rRNA sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(2), 278-286
- [19] Hatamoto M, Imachi H, Fukayo S, Ohashi A, Harada H. (2007). *Syntrophomonas palmitatica* sp. nov., an anaerobic, syntrophic, long-chain fatty-acid-oxidizing bacterium isolated from methanogenic sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(9), 2137-2142
- [20] Sousa D Z, Smidt H, Alves M M, Stams A J. (2007). *Syntrophomonas zehnderi* sp. nov., an anaerobe that degrades long-chain fatty acids in co-culture with *Methanobacterium formicicum*. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(3), 609-615
- [21] Wu C, Dong X, Liu X. (2007). *Syntrophomonas wolfei* subsp. methylbutyratica subsp. nov., and assignment of *Syntrophomonas wolfei* subsp. saponavida to *Syntrophomonas saponavida* sp. nov. comb. nov. *Systematic and applied microbiology*, 30(5), 376-380
- [22] Jackson, B. E., Bhupathiraju, V. K., Tanner, R. S., Woese, C. R., McInerney, M. J. (1999). *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. *Archives of microbiology*, 171(2), 107-114
- [23] Ziels, R. M., Beck, D. A., Martí, M., Gough, H. L., Stensel, H. D., Svensson, B. H. (2015). Monitoring the dynamics of syntrophic  $\beta$ -oxidizing bacteria during anaerobic degradation of oleic acid by quantitative PCR. *FEMS microbiology ecology*, 91(4), 028
- [24] Ziels, R. M., Karlsson, A., Beck, D. A., Ejlertsson, J., Yekta, S. S., Bjorn, A., Stensel, H. D., Svensson, B. H. (2016). Microbial community adaptation influences long-chain fatty acid conversion during anaerobic codigestion of fats, oils, and grease with municipal sludge. *Water Research* 103, 372-382.
- [25] Watanabe, T., Kimura, M. & Asakawa, S. (2006) Community structure of methanogenic archaea in paddy field soil under double cropping (rice-wheat). *Soil Biol Biochem*, 38, 1264.
- [26] 武田勉 (2002) 食肉センター排水の窒素・リンの除去、神鉄鋼パンテック技報, 45(2), 59-64.
- [27] H20年度東京都下水道局環境報告書、平成21年12月、東京都下水道局
- [28] 亀岡俊則(2006)メタン発酵処理技術の現状と課題、畜産環境情報. 35, 3-9
- [29] Alves, M. M., Pereira, M. A., Sousa, D. Z., Cavaleiro, A. J., Picavet, M., Smidt, H. & Stams, A. J. (2009) Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA).

Microbial biotechnology, 2(5), 538–550  
[30] Pereira, M. A., Pires, O. C., Mota, M. & Alves, M. M. (2002) Anaerobic degradation of oleic acid by suspended and granular sludge: identification of palmitic acid as a key intermediate. Water Science and Technology, 45(10), 139–144

Original Paper

**Improvement of methane fermentation efficiency from fat and oils through addition of an anaerobic LCFA degradable microbial community**

Yuki MATSUMOTO, Mengjia FENG, Yasuhiro FUKUDA, Yutaka NAKAI, Chika TADA  
Graduate school of Agricultural Science, Tohoku University,  
232-3, Yomogida, Naruko-onsen, Osaki, Miyagi, 989-6711, Japan

To increase the efficiency of the methane fermentation of fats and oils, the effects of a long-chain fatty acid degradable anaerobic microbial community on methane production from oleic acid were investigated. It was possible to culture a long-chain fatty acid degradable microbial community (LDMC), with *Syntrophomonas* and archaea contributing to long-chain fatty acid decomposition. The methane production from beef tallow during anaerobic digestion with added LDMC was higher than that without LDMC. In addition, three times rapid methane production from beef tallow in anaerobic digestion with LDMC was obtained compared to that without LDMC. Furthermore, by introducing the methane fermentation system with LDMC before the conventional aerobic activated sludge wastewater treatment system in a slaughterhouse, the electricity consumption of the wastewater treatment system was decreased by 99.6%. Results showed that CO<sub>2</sub> emissions could be reduced by 494.4 tons per year.

**Key words : anaerobic digestion, LCFA, beef tallow, LCFA degradable microbial community, methane production**

**Corresponding:** Chika TADA [chika.tada.e1@tohoku.ac.jp](mailto:chika.tada.e1@tohoku.ac.jp)

Receipt of Ms: 13.02.2018. Accepted: 20.04.2018.  
Journal of Animal Production Environment Science No17 (1) pp46-57. 2017