

ブドウ搾り滓を活用した家畜排せつ物の堆肥化 および環境負荷低減化技術の開発 (その3)

¹環境科学研究所・²畜産試験場・³総合農業技術センター・⁴富士工業技術センター・⁵山梨大学
長谷川達也¹・森 智和¹・吾郷 健一¹・菊嶋 敬子²・山崎 修平³・上垣 良信⁴
寺澤 章裕⁴・御園生 拓⁵・金子 栄廣⁵・早川 正幸⁵

Composting of Livestock Waste and Reduction of Environmental Load Using Wine Compression Residues (3rd report)

¹Institute of Environmental Sciences, ²Livestock Experiment Station, ³Agricultural Technology Center,
⁴Fuji Industrial Technology Center, ⁵University of Yamanashi
Tatsuya HASEGAWA¹, Tomokazu MORI¹, Ken-ichi AGO¹, Noriko KIKUSHIMA², Shuhei YAMASAKI³,
Yoshinobu UEGAKI⁴, Akihiro TERASAWA⁴, Taku MISONOU⁵, Hidehiro KANEKO⁵ and Masayuki HAYAKAWA⁵

要 約

今年度は、堆肥の原料となる「豚ふん」を昨年度の2倍量(2,500kg)に増やし堆肥を作製した。このとき、ワイン製造にともなって生じるブドウ搾り滓(ワイン圧搾残渣)を嫌気発酵させ「発酵ブドウ搾り滓」を作製し、これを豚ふん1に対して0.2の割合で加えることにより、発生する悪臭物質を低減できることが再現できた。ブドウ搾り滓を嫌気発酵させることにより糖が分解され有機酸が合成されてpHが減少し、保存性に優れることが確認された。一方、発酵ブドウ搾り滓添加による悪臭物質低減作用に2種の放線菌(*Thermobifida fusca*, *Saccharomonospora viridis*)の関与が示唆されている。そこで、小型堆肥化実験装置を用いて、これら2種類の放線菌株を直接豚ふんに加え悪臭低減効果について検討した。その結果、これら放線菌の増殖により悪臭物質の発生が低減されることが示された。さらに、堆肥舎でこれら放線菌の増殖について検証した結果、発酵ブドウ搾り滓を豚ふんに加えて堆肥を作製すると、豚ふんのみで堆肥を作製した場合に比べ、これら放線菌の増殖が促進されることが明らかとなった。一方、発酵ブドウ搾り滓に含まれているポリフェノール類が堆肥発酵過程の初期において、悪臭物質発生の低減作用に関連していることが示唆された。スイートコーンとナスを豚ふん+ブドウ搾り滓堆肥を使って栽培した結果、この堆肥の施肥効果は他の堆肥と比べて劣ることはなかった。スイートコーンとナス栽培圃場の畦間土壌ならびにナス根圏土壌中の微生物相を解析した結果、豚ふん+ブドウ搾り滓堆肥を施用した区画では放線菌やバクテリアが多く、カビが少ない傾向が認められた。ライフサイクルアセスメント(LCA)手法を用いて、ブドウ搾り滓と豚ふんを処理する過程で発生する温暖化ガスと消費されるエネルギー、富栄養化に関する環境影響評価を行った。ブドウ搾り滓を産業廃棄物として焼却処分するシナリオと、ブドウ搾り滓を豚ふんに混ぜて堆肥を作製するシナリオを想定し、それぞれについて環境影響を解析・比較した結果、ブドウ搾り滓を豚ふんに混ぜる方が地球温暖化、エネルギー消費に関する負荷が小さくなると考えられた。また、発酵ブドウ搾り滓添加によっても低減しきれない悪臭は、セラミック電気管状炉を使用した金属酸化触媒式分解装置でほとんど完全に分解することができた。

1. 緒 言

山梨県は現在県内に約80社のワイナリーを有する日本一のワイン産地であり、その生産量は国内生産量の約4割を占める。特に最近では、この山梨県産ワイン(甲州ワイン)の輸出も積極的に進められている。しかしそれに伴って生じる大量のブドウ搾り滓の活用法はあまり開発されておらず、一部は滓とりブランデー製造や飼料、あるいは堆肥として使用されているものの、その大部分は有用な利用法もなく処分されているのが現状である。

しかし昨今の健康食品ブームにおいて、ブドウ搾り滓に含まれる機能性成分、特にポリフェノール類の抗菌作用や抗酸化作用、消臭作用への注目が集まり、その有用性を評価する動きが高まっている。

一方、畜産業においては、宅地開発などによって畜産農家と周辺住民との混住化が進み、悪臭を始めとする環境問題の解決が重要な課題となっている。これらの問題への対策は国や県によって講じられてはいるが、抜本的解決には至っていない。

このことから我々はブドウ搾り滓に着目し、これを豚ふんを原料として作られる堆肥の発酵過程に加えた^{1, 2)}。

その結果、発酵過程で発生する悪臭を低減することができ、さらにこの堆肥の施肥効果は化学肥料と同等であった。今年度は、昨年の研究で明らかとなった悪臭分解微生物の解析、ならびにこれら微生物の土壌への影響を検討した。また、昨年度と同様にブドウ搾り滓を加えた堆肥の施肥効果をスイートコーンとナスで検討した。今年度は昨年の堆肥発酵過程における温暖化ガス発生に加え、エネルギー消費量・富栄養化を基に環境影響評価を行った。さらに、ブドウ搾り滓添加によっても低減しきれない悪臭への対策として、新たに構築した悪臭分解装置を堆肥舎に設置して、その効果を検証した。

2. 実験方法

2-1 ブドウ搾り滓および豚ふん

ブドウ搾り滓：山梨県内のワインメーカー提供によるワイン製造過程で生じるブドウ搾り滓（ワイン圧搾残渣）を用いた。ブドウの品種には「甲州」を使用した。このブドウ搾り滓は、野外でビニールシートを掛け大気との接触を少なくし、46日間発酵させたもの（発酵ブドウ搾り滓）を用いた。なお、発酵過程のブドウ搾り滓



写真-1 収穫した甲州ブドウ



写真-2 ブドウ搾り滓の発酵



写真-3 46日間発酵させたブドウ搾り滓

の中心温度をデータロガーで記録し、糖度、有機酸量およびpHの測定を行った。

豚ふん：山梨県畜産試験場の豚房より採取したものをを用いた。

2-2 発酵ブドウ搾り滓の分析

糖度：試料25gに蒸留水75mLを加え粉碎後、その遠心上清をアタゴ式屈折計で測定して糖度を求めた。

有機酸：試料50gに50%エタノール400mLを加え粉碎した後、その遠心上清を4倍希釈（エタノールを12.5%に調整）して、高速液体クロマトグラフィー（ST3-R試薬を用いたポストカラム法）で有機酸（クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、酢酸）を分析した³⁾。

pH：試料25gに蒸留水75mLを加えてホモジナイズし、遠心して得られた上清をガラス電極法で測定した。

2-3 堆肥作製

昨年と同様に山梨県畜産試験場の堆肥舎で豚ふんに発酵ブドウ搾り滓を1:0.2の割合で加えて堆肥を作製し、発生する臭気の実験を行った²⁾。原料に使用した豚ふんはオガクズを加え、水分含量が70%になるように調整



写真-4 発酵ブドウ搾り滓で豚ふんを覆っている様子

した。実験には二つの試験区を設定し堆肥化を行った。

第1区：豚ふんのみ、豚ふん2,500kgを原料とした。

第2区：豚ふん＋発酵ブドウ滓Cover, 豚ふん2, 500kgを発酵ブドウ搾り滓(500kg)で覆った。ただし、最初の切り返し以降は豚ふんとブドウ搾り滓は混合される。

堆肥化開始日を0日として、定期的に(7日, 21日, 36日目)重機(ホイールローダー)で切り返しを行い、50日間堆肥化を行った。切り返し時に、検知管でアンモニアを直接測定し、ニオイセンサ測定用サンプルをテドラバックに採取した。また同時に発酵途中の堆肥の一部を採取し、発酵過程一堆肥サンプルとした。堆肥の発酵状況を把握するため堆肥中心部と表面の温度をデータロガーで記録した。

2-4 堆肥発酵過程における堆肥の発熱量

発酵過程一堆肥サンプルを105℃で乾燥させた後、1gを熱量計(燃研式自動ボンベ熱量計 CA-4AJ, 島津)で測定し、高位発熱量を算出した。

2-5 アンモニアの測定

直接法：検知管を用いて直接測定した。

2-6 ニオイセンサによる測定

ニオイセンサ(XP-329ⅢR, 新コスモス電機)で臭気試料を直接測定し、臭気レベルを読み取った。

2-7 堆肥発酵過程における堆肥のpH

発酵過程一堆肥サンプル30gをそれぞれ300mLの蒸留水に懸濁させ、ガラス電極を用いてpHを測定した。

2-8 *Thermobifida fusca*および*Saccharomonospora viridis*孢子懸濁液の作製

Thermobifida fusca 5-1-1および*Saccharomonospora viridis* 5-1-2をそれぞれCMYCプレートに画線接種して前培養を行った。前培養をおこなった2種の菌株をガラスビーズと滅菌蒸留水の入った試験管に白金耳でかきとり、十分に懸濁した。

作製した孢子懸濁液についてはヘマサイトメーターを使用して放線菌孢子数を計測し、2種の菌株のオーダーが等しくなるように滅菌蒸留水で希釈した。

2-9 小型堆肥化実験装置での放線菌の悪臭低減効果

豚ふん2kgを原料として、小型堆肥化実験装置⁴⁾(かぐやひめ)で堆肥を作製した。このとき、悪臭低減効果のあることが確認された2種類の放線菌分離株、*Thermobifida fusca* 5-1-1および*Saccharomonospora viridis* 5-1-2の孢子懸濁液50mLをそれぞれ豚ふんに加えて21日間堆肥化を行った。堆肥作製期間中毎日発生するアン

モニアを検知管で測定した。7日目, 14日目に切り返しを行い、堆肥の一部をサンプリングして放線菌数を分離して計測した。

第1区：豚ふん

第2区：豚ふん＋*Thermobifida fusca* 孢子懸濁液

第3区：豚ふん＋*Saccharomonospora viridis* 孢子懸濁液

2-10 *Thermobifida fusca*および*Saccharomonospora viridis*の分離・計測

*Thermobifida fusca*および*Saccharomonospora viridis*の分離・計測は、シクロヘキシミドとナリジキシン酸を含むHV平板培地を用いて50℃で培養し、出現したコロニーを計測し、さらに肉版および光学顕微鏡で形態観察して属を暫定的に決定した。必要に応じてコロニーをCMYCスラントで純粋分離した。

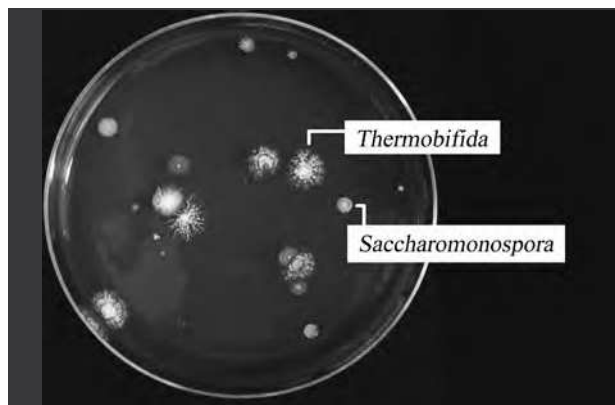


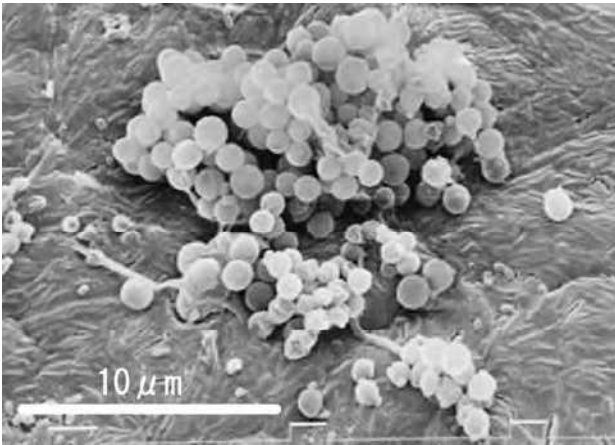
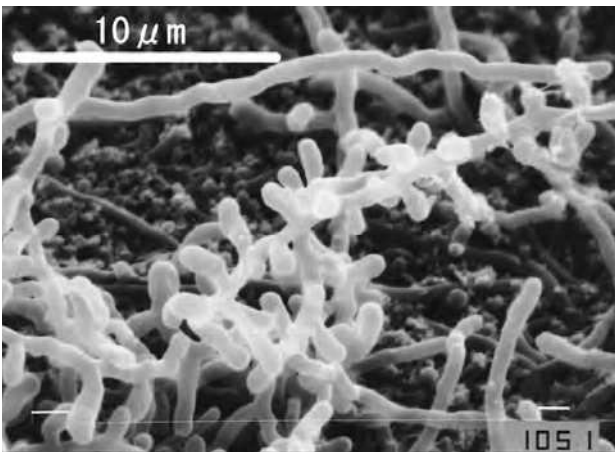
写真-5 放線菌の分離プレート

2-11 *Thermobifida fusca*および*Saccharomonospora viridis*の16S rDNAに特異的なプライマーの作製⁵⁾

*Thermobifida*属と*Saccharomonospora*属の標準株と対照となるそれぞれの近縁属の16S rDNAの塩基配列のデータを日本DNAデータバンクから収集し、当該2属の分離株の16S rDNAの塩基配列とあわせて、*Thermobifida fusca*と*Saccharomonospora viridis*に特異的な配列を基に、それぞれの種についてプライマーの検索を行った。検索されたプライマーの配列をDDBJのBLAST Searchで調査し、他属種に類似した塩基配列が存在しないことを確認した。このデータを基に*Thermobifida fusca*のプライマーをインビトロジェン社に、*Saccharomonospora viridis*のプライマーをOperon社に発注した。

2-12 発酵ブドウ搾り滓添加堆肥作製過程における*Thermobifida fusca*および*Saccharomonospora viridis*のDNA相対量⁵⁾

発酵過程一堆肥サンプルから糞使用DNA抽出キットを用いて堆肥中のDNAを抽出した。必要に応じ

写真-6 *Thermobifida* sp.の走査型電子顕微鏡写真写真-7 *Saccharomonospora* sp.の走査型電子顕微鏡写真

てPCRでDNAを増幅させ、*Thermobifida fusca*および*Saccharomonospora viridis*の16S rDNAに特異的な塩基配列を持つプライマーを用い、二種類の放線菌のDNA量をリアルタイムPCRで測定した。

2-13 ポリフェノール類の悪臭低減効果

二次発酵済みコンポスト（ドッグフードと木くずの混合物を原料として、家庭用生ごみ処理機で一次発酵させたものを、さらに2年以上ポリバケツ内で保存したもの）に尿素3.3%を加え、含水率を60%に調整後、45℃で3日間培養してアンモニア臭気発生コンポストを作製した。

発酵ブドウ搾り滓は、昨年度、畜産試験場で発酵させた発酵ブドウ搾り滓を乾燥、破碎したものを使用した。茶殻は家庭から排出された緑茶殻を乾燥、破碎したものを使用した。

容量500mLのマヨネーズびんを用意し、それぞれにアンモニア臭気発生コンポスト15gを入れた後、発酵ブドウ搾り滓または茶殻を0, 0.5, 2.0, 4.0g添加して混合した。マヨネーズびんを密閉して45℃で3時間加温

し、気相中のアンモニアガス濃度（検知管法）を測定した。さらに三点比較式臭袋法による官能試験を行い臭気濃度を算出した⁶⁾。

2-14 ポリフェノール類の測定

サンプルを乾燥重量で2.5~10%になるように、50%エタノール溶液にて調整し全体で20mLとし、これを恒温震とう器（BW200, ヤマト）に設置し、60℃で100rpm震とうさせて約24時間抽出を行った。この抽出液中のポリフェノール類をペルオキシダーゼ・過酸化水素センサー法によるポリフェノール測定装置（PA20, 東洋紡エンジニアリング）で測定した。測定されたポリフェノール類の量はカテキン量に換算して示した。

2-15 栽培試験（ライシメーター）

昨年と同様にライシメーターを用いた栽培試験を総合農業技術センター（標高312m）で実施した。ライシメーターには灰色低地土を表層から70cmまで充填し、その下層には砂層と礫層を40cmずつ充填した。試験規模は1区25㎡、反復なしとした。春作として一重トンネルスイートコーン（甘々娘）、夏作として抑制ナス（千両2号）を作付けした。スイートコーンの耕種概要は、施肥：2009年2月16日、播種：3月3日、第1回追肥：4月23日、第2回追肥：5月13日、収穫調査：6月12日であった。ナスの耕種概要は、施肥：6月23日、定植：7月1日、収穫開始：7月21日、収穫終了：11月20日であった。ナスの収穫期間中は毎週月・水・金曜日に収穫調査を行った。

各作の施肥量は堆肥を乾物相当量で1t/10a施用し、堆肥から供給される養分量を考慮して県施肥基準量になるように化学肥料で加減した。

ライシメーターの浸透水は貯水槽に集水し、浸透水量を測定するとともに、一定量ごとにプラスチック製容器に保存した。硝酸態窒素濃度の測定は浸透水サンプルを定量ろ紙でろ過し、ECが0.1mS/cm以下になるよう脱イオン水で希釈し、さらに0.2μmのメンブランフィルターでろ過した後、イオンクロマトグラフィーを用いて測定した⁷⁾。硝酸態窒素溶脱量は、浸透水の硝酸態窒素濃度に浸透水量を乗じて求めた。

2-16 土壌中微生物相の解析⁸⁾

ライシメーターでスイートコーンおよびナスを栽培した畦間土壌（株と株の間）を採取し（スイートコーン栽培12週目、ナス栽培9週目）1週間日陰で風乾させ、放線菌、バクテリア、カビをそれぞれの選択培地（放線菌：0.1%SDS処理後HV培地、バクテリア：TS培地、カビ：PDA培地）で培養してコロニー数をカウントした。なお、培養は30℃で行った。

2-17 根圏土壌の微生物相の比較

ナス栽培12週目にナス根の周りの土を崩さないように抜き取った。つぎに、根を覆っている余分な土壌を除去し、ついで空中で緩やかに振とうしながら根と根の間に残存する非根圏土壌を除去した。根に大きな団粒が付着している場合はピンセットなどで取り除いた⁹⁾。3サンプル分の根圏土壌の付着した根をピーカーに入れた100mL滅菌水中に移し、10分間攪拌することにより第一次希釈懸濁液を得た。その懸濁液を、放線菌は 10^3 , 10^4 , 10^5 倍、バクテリアは 10^3 , 10^4 , 10^5 倍、カビは 10^2 , 10^3 , 10^4 倍に希釈しそれぞれHV寒天培地, TS寒天培地, PD寒天培地に10枚ずつにスプレッドした。30℃と50℃で培養を行い、バクテリア、カビに関しては菌数の確認、放線菌は肉眼によるコロニー観察と光学顕微鏡による大まかな属の同定により菌数の確認を行ってから分離を行った。

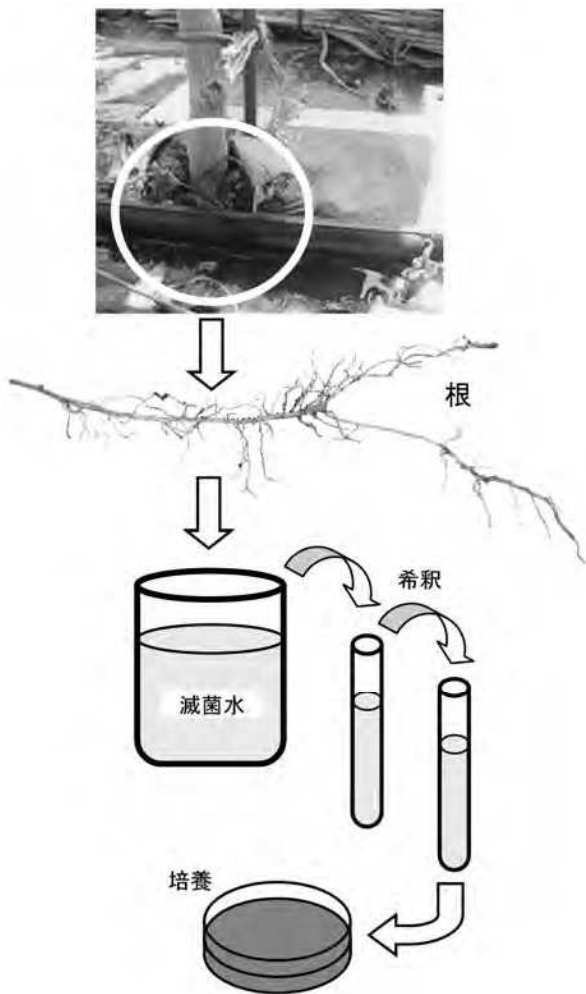


写真-8 根圏土壌微生物の分離・培養

2-18 根圏土壌の微生物相の同定⁸⁾

16S rDNA塩基配列に基づく系統解析により同定を行った。すなわち、分離した放線菌株からDNAを抽出

し、これを鋳型にしてユニバーサルプライマーを用いてPCRでそれぞれの分離株の16S rDNAを増幅した。増幅した16S rDNAは精製後、NITE (製品評価技術基盤機構) に委託し、ダイレクトシークエンスを行って塩基配列を決定した。分離株の16S rDNA塩基配列はDDBJ (BLAST) で相同性検索を行い、98.5%以上のものを既知種として同定した。

2-19 根圏土壌放線菌分離株の抗カビ活性試験¹⁰⁾

根圏土壌から分離した放線菌をISP2培地で充分生育させ、放線菌胞子懸濁液を作製した。その胞子懸濁液をNutrient培地 (CM0003) に一滴点接種し、30℃で5日間培養を行いコロニーを形成させた。非試験菌株である *Aspergillus niger* (黒カビ) はPDA培地で前培養後YEPD 0.7%寒天培地に接種した。 *Aspergillus niger* が均一に混ざった寒天培地をコロニーを形成させた放線菌株のプレート上に重層し、48時間培養後生育阻止帯の有無により抗菌活性の評価を行った。

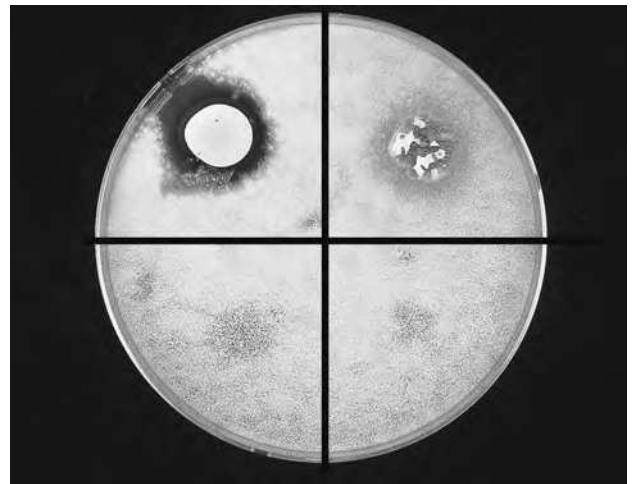


写真-9 抗カビ活性試験

左の上の菌株でカビの増殖が阻害されている

2-20 根圏土壌放線菌分離株のリン酸可溶性能試験^{11, 12)}

根圏土壌から分離した放線菌をISP2培地で充分生育させ、放線菌胞子懸濁液を作製した。その胞子懸濁液をPVK培地 (リン酸カルシウムが含まれている) 一滴点接種し、30℃で10日間培養を行い、コロニーの周りのハローの有無からリン酸可溶性能の評価を行った。

2-21 ブドウ搾り滓と豚ふんを処理する過程で発生する温暖化ガスと消費されるエネルギー、栄養化に関するライフサイクルアセスメント (LCA)

LCAによる検討は、畜産試験場の豚房より発生した豚ふんを堆肥化する際、ブドウ搾り滓を添加して堆肥化

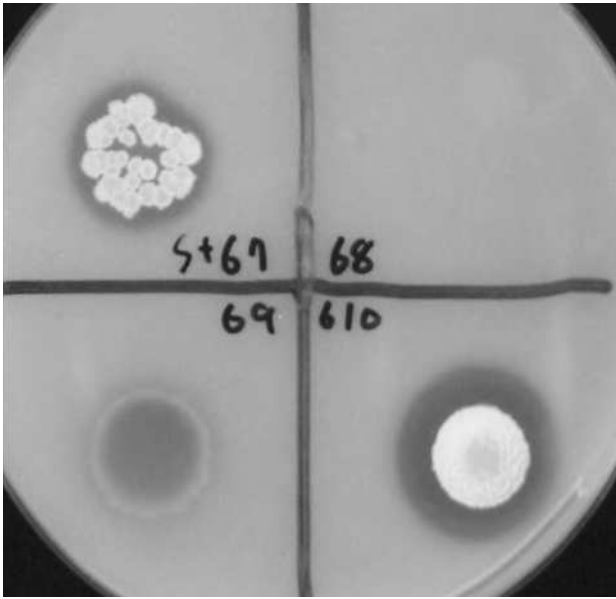


写真-10 リン酸可溶化能試験

白濁しているリン酸カルシウムの可溶化を評価する

した場合（ブドウ搾り滓添加シナリオ）と、ブドウ搾り滓を添加せずに従来の方で堆肥化した場合（従来シナリオ）の2つを想定して、それぞれの環境影響についてJEMAI-LCA PRO Ver.2を用いて検討を行った。

昨年の解析では、小型堆肥化実験装置での検討を基に計算を行った。今回は、堆肥舎での実験スケールである豚ふん2,500kg、ブドウ搾り滓500kgを基に、豚ふん1,000kgあたりに換算して計算を行った。従って、堆肥化処理システムの機能単位は、豚ふん1,000kg、ブドウ搾り滓200kg、50日間で処理するものとした。従来シナリオとブドウ搾り滓添加シナリオについて、評価の対象とするシステム境界をそれぞれ図-1および図-2に示した。図中の破線で囲った内部の各プロセスについて、環境影響評価を行う。ここで、従来シナリオでは200kgのブドウ搾り滓を焼却によって処理しているため、焼却処理プロセスを追加して環境負荷の評価を行った。

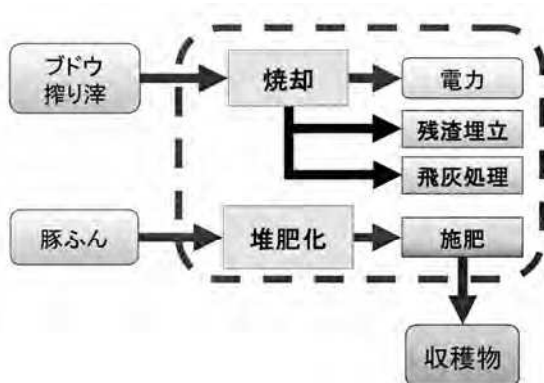


図-1 従来シナリオのプロセスフロー

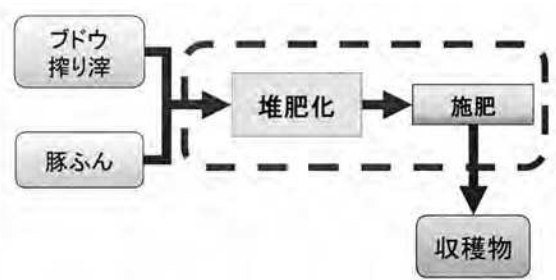


図-2 ブドウ搾り滓添加シナリオのプロセスフロー

評価する環境影響領域は地球温暖化、エネルギー消費、富栄養化とした。それぞれのインベントリデータは、堆肥化プロセス・施肥プロセスについては主に実測データを用い、得られなかった部分は文献^{13, 14}、聞き取りから推算した値を用いた。また、焼却プロセスについては県内の焼却場への聞き取りや文献を基に推定した値を用いた。

2-22 工学的手法による悪臭物質の分解

銅-クロム酸化物触媒 (N201, 日揮化学) 270g (27mL) を充填した石英管 (直径33mm, 全長300mm) をセラミック電気管状炉 (ARF-30M, アサヒ理化製作所) にセットしてセラミック電気管状炉-金属酸化触媒式分解装置を構築した。

2-22-1) 小型堆肥化実験装置での検討

小型堆肥化実験装置 (かぐやひめ) の臭気排気ダクトに、セラミック電気管状炉-金属酸化触媒式分解装置をつなげた。分解装置の前後でのアンモニア濃度を検知管で測定した。なお、豚ふんは2kgを原料として、流量は2L/minに設定した。実験は悪臭が発生している9日目 (一回目の切り返しは7日目) に行った。



写真-11 セラミック電気管状炉-金属酸化触媒式分解装置