

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21286

研究課題名（和文）海産バイオマス由来のメタン発酵残渣のカスケード的利用に向けた試み

研究課題名（英文）Cascade use of digestate from methane fermentation using marine biomass

研究代表者

黒田 桂菜（KURODA, Kana）

大阪府立大学・人間社会システム科学研究科・准教授

研究者番号：70708023

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：人間活動が盛んな都市部が隣接する大阪湾では、過栄養状態に起因する海産バイオマスの爆発的な増殖などが発生している。一方、南部や西部ではノリの色落ちが生じるなど貧栄養状態となり、いわゆる「栄養塩の偏在」が生じている。本研究は、海産バイオマス由来のメタン発酵残渣には、窒素やリンなどの栄養塩の他に、鉄などの微量金属が豊富に含まれていることに着目し、海産バイオマス由来のメタン発酵残渣を用いた色落ちノリの回復効果および循環利用によるメタン発酵促進効果を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

窒素やリンなどの栄養塩は、人間活動に欠かせないものであり、海洋環境の保全のためには栄養塩を適正に管理することが重要である。本研究成果により、栄養塩を適材適所に活用することが可能となり、社会的要請の高い「栄養塩の適正管理」の一助となる。また、メタン発酵は「再生可能エネルギー」「循環型社会の形成」に重要な役割を果たし、都市部での利用が急速に進んでいるものの、発酵残渣の利用に関する知見は乏しく、海を介した栄養塩循環の視点が欠けている。本研究成果は、海陸一体型の循環型社会の礎となる。

研究成果の概要（英文）：Ulva sp. (green seaweed) often proliferates explosively and piles up in shallows. This phenomenon is called "green tide," caused by increased nutrient flow into an enclosed sea area. This research proposes that the digestate from methane fermentation using mixed biomass (Ulva sp. and food waste) can be applied to the cultivation of Pyropia yezoensis (edible laver seaweed, nori in Japanese), which has recently suffered from decolored phenomena because of decreasing nutrients. The results highlight that the significant absorption of nutrients and color recovery occurred because of digestate utilization, indicating its positive effects on decolored nori. Also, digestate can be expected to promote methane production that may be caused by iron derived from Ulva sp..

研究分野：海洋環境学

キーワード：海産バイオマス メタン発酵 栄養塩の偏在 ノリの色落ち 鉄

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人間活動が盛んな都市部が隣接する大阪湾では、過栄養状態に起因する海産バイオマスの爆発的な増殖などが発生している。一方、南部や西部ではノリの色落ちが生じるなど貧栄養状態となり、いわゆる「栄養塩の偏在」が生じている。2015年に閣議決定された瀬戸内海環境保全基本計画において、水質保全に関して「水質の管理」が追記されたことを踏まえ、栄養塩の適切な管理に対する社会的要請が高まっている。

本研究では、爆発的に発生する海藻などの海産バイオマスのメタン発酵に着目する。これにより、海産バイオマスを回収することによる海洋環境改善だけでなく、カーボンニュートラルである未活用の海産バイオマスのエネルギー(メタン)利用とメタン発酵残渣の肥料利用の一石三鳥の効果が期待できる。メタン発酵残渣の肥料としての利用は、都市部では需要が限られていることが課題として浮き彫りになっている。また、海産バイオマスは水分が多く、発酵槽が必然的に大きくなることも課題といえる。

メタン発酵残渣には、窒素やリンなど光合成に必要な栄養源が豊富に含まれており、貧栄養海域に散布することで、海洋肥沃化が期待できる。さらに、海産バイオマス由来のメタン発酵残渣には、窒素やリンに加えて鉄などの微量元素が豊富に含まれていることから、メタン発酵を促進する効果が期待できる。このように、メタン発酵残渣をカスケード的に利用することで、栄養塩偏在の解消に向けた「海洋肥沃化」「メタン発酵促進」が可能となる。

### 2. 研究の目的

本研究では、海産バイオマス由来のメタン発酵残渣には、窒素やリンなどの栄養塩の他に、鉄などの微量元素が豊富に含まれていることに着目し、メタン発酵残渣の貧栄養海域における海洋肥沃化効果を明らかにするとともに、鉄を含む海産バイオマス由来の発酵残渣の循環利用によるメタン発酵促進剤としての有効性を明らかにすることを目的とした。具体的には、(1)海産バイオマス由来のメタン発酵残渣による栄養塩吸収効果(2)鉄および海産バイオマス由来のメタン発酵残渣の添加によるメタン発酵促進効果について検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 海産バイオマス由来のメタン発酵残渣による栄養塩吸収効果

##### メタン発酵残渣成分の均質性・安全性の検証

海産バイオマス由来のメタン発酵残渣に含まれる重金属や投入物による成分の変動を確かめるために、回分式メタン発酵実験を行った。試料は乾燥海苔、アオサ、タイ、レタスとキャベツを混ぜた葉物ミックスの4種類である。使用したメタン発酵汚泥は、下水処理場より入手した汚泥を、35℃で馴養し実験開始2週間前より試料を与えず飢餓状態にしたものを用いた。100mlのバイアル瓶に汚泥を60ml入れ、有機物負荷量を3g-VS/Lとなるように試料を投入した。試料を投入しないブランクを含めた5検体について、35℃、60rpmで1ヶ月間メタン発酵させたものを、4000rpmで3時間遠心分離を行い固液分離した。その後1.2μmのろ紙を使い吸引濾過を行った。分析項目は溶存無機態リンDIP(PO<sub>4</sub>-P)、溶存無機態窒素DIN(NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N)、およびヒ素である。

##### メタン発酵残渣を用いたノリ色落ち回復実験

色落ちノリの培養実験を通して、栄養塩の吸収量と生長の関係および色調回復の有効性について調べた。培地となる人工海水についてはアマノリ用に調製されたM-ESWA培地を参考にして調製した。窒素源が異なる3種類の培地(硝酸態窒素、アンモニア態窒素、発酵残渣)を用いて、培養は人工気象器(NK-SYSTEM, LH-241S)の中で行い、温度18℃、光量60μmol/m<sup>2</sup>s、光周期(明11h、暗13h)の条件で通気培養した。アオサ、タイ、葉物ミックスの混合バイオマスのメタン発酵残渣を用いた。培養容器は1Lの球形平底の枝付きフラスコを用いた。色落ち回復実験については、低栄養塩の条件下で数日培養を行うことで色落ちさせたノリを3つに等分し、それぞれを上記3種類の培地で培養した。培養前後の海苔の色を分光測色計(KONICA MINOLTA, CM-700d)を用いてD65光源、10°視野、SCI方式の条件で測定し、L\*a\*b\*表色系のL\*値を用いて色の変化を比較した。

#### (2) 鉄および海産バイオマス由来のメタン発酵残渣の添加によるメタン発酵促進効果

##### 鉄の添加によるメタン発酵促進メカニズムの解明

鉄の添加量を変化させたメタン発酵実験を行い、発生したバイオガス及び発酵中の汚泥を分析することで、鉄の添加がメタン発酵プロセスに及ぼす影響を調べた。用いた下水汚泥は(1)

同様の処理を行った後、1Lの3つ口フラスコに汚泥を720mL、試料としてグルコースを有機物濃度が3.0g-VS/Lになるように投入し、それぞれ異なる濃度の塩化鉄(II)四水和物(FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O)の水溶液を60mL添加した。検体に添加した鉄の濃度は0、1.2、48mg/mLの3種類であり、37℃、100rpmでメタン発酵させた。発生したバイオガス量及びバイオガス組成の測定および汚泥の採取(20mL/日)を行った。発生したバイオガスはアルミニウムバッグに収集し、バイオガス組成の分析は、TCD-ガスクロマトグラフ(SHIMADZU, GC-8A)を用いた。また、汚泥中の有機酸濃度および細菌組成は、それぞれ高速液体クロマトグラフ(SHIMADZU, LC20)、Next Generation Sequencing(Illumina, Miseq)を用いた。

#### メタン発酵残渣の循環利用によるメタン発酵促進効果の検証

メタンガスの生成量・生成速度に着目し、アオサ由来のメタン発酵残渣（固相、液相、残渣そのもの）の添加効果を調べた。メタン発酵容量 100 mL のバイアル瓶に汚泥を 60 mL、試料としてグルコース（VS: 100 %）を有機物濃度が 3.0 g-VS/L になるように投入した後、アオサ由来の残渣を 3.27 g-wet 添加した。検体は試料及び残渣を添加しないブランクと、試料のみを添加するもの（Glucose）を含めた 5 種類を 3 本ずつ用意した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 海産バイオマス由来のメタン発酵残渣による栄養塩吸収効果

###### メタン発酵残渣成分の均質性・安全性の検証

タイ由来の残渣において  $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度が最も大きく増加し、アオサ由来の残渣において  $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度が減少した。タイは他の試料に比べタンパク質を多く含み、投入した全窒素が他の試料に比べ多いことから、 $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度が大きく増加したのと考えられる。次に、アオサ由来の発酵残渣の  $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度の減少について、アオサに多く含まれている鉄やマグネシウムなどの金属成分とリンが結合したことが考えられる。肥料成分として重要なリンが減少してしまうことは栄養塩偏在の解消にとってデメリットであるものの、大阪湾におけるノリの色落ちや窒素不足が原因とされていることや他のバイオマス（特に魚）と混合することで、リン減少の影響を軽減できると考える。

次に、発酵残渣を遠心分離した後の液相と固相におけるヒ素濃度において、ヒ素の大部分が固相に含まれていることがわかった。すべての試料において、液相中の濃度が海洋投入処分に關する重金属規制の基準値を超えており、特にノリ由来の残渣において 0.24mg/L と最も高かった。一方、固相におけるノリ由来のヒ素の濃度は試料中で最も低かったことから、ノリ由来のヒ素は液相に移りやすいことがわかった。これらのことから、海域への散布には、法令上の問題は別として希釈する必要があることや試料によって重金属の濃度が変動することが明らかになった。

###### メタン発酵残渣を用いたノリ色落ち回復実験

単位重量当たりのノリの栄養塩吸収速度を把握するため、21 日間培養したノリについて、7 日毎に海水の栄養塩濃度の変化を測定した（図 1）。人工海水で培養したノリよりも残渣を添加した海水で培養したノリの方が、栄養塩の吸収速度が約 2 倍速いことがわかった。先行研究より、硝酸態窒素に比べ、アンモニア態窒素には即効性がありノリが効率よく窒素を吸収することがわかっており、発酵残渣に多く含まれるアンモニア態窒素が寄与した結果といえる。リンの栄養塩濃度の変化も窒素と同様の結果となった。

ノリの色落ちの目安となる  $L^*$  値は、60 以上で色落ちの初期的兆候、73 以上で重度の色落ちの目安となるとされている。3 種類の培地（硝酸態窒素、アンモニア態窒素、発酵残渣）で培養させたノリの  $L^*$  値、 $a^*$  の変化（表 1）から、残渣を添加した培地では重度の色落ちである 80 から通常値である 53 にまで  $L^*$  値が減少しており、色落ちが完全に回復したことを確認できた。一方、自然海水に近い硝酸態窒素では、 $L^*$  値が 75 のまま変化がなく色調が回復した兆候はみられなかった。 $a^*$  については、アンモニア態窒素および発酵残渣で色の改善がみられた。 $a^*$  は、海藻に含まれるクロロフィル等の色素が関連する指標であることから、アンモニア態窒素が色素の生成に何らかの効果をもたらしていることが示唆された。また、 $L^*$  の改善に大きく寄与したのは、発酵残渣のみであることから、本実験結果は、アンモニア態窒素以外に何らかの要素がはたらいたことを示す興味深い発見である。アオサ由来の鉄などの微量元素が作用したと推察できるが、結論付けるにはさらなる実験が必要である。

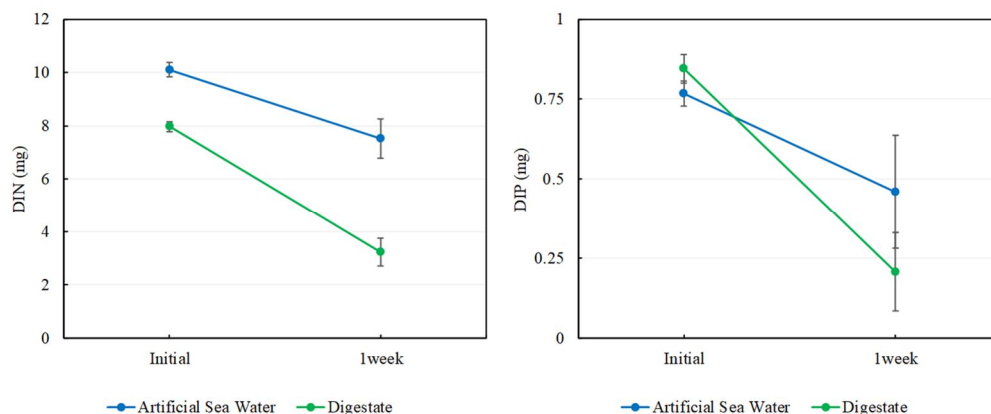


図 1 栄養塩濃度の変化（左：DIN，右：DIP）

表 1 色相の変化

	Initial condition				After 1 week			
	L*		a*		L*		a*	
	Ave.	SD	Ave.	SD	Ave.	SD	Ave.	SD
NaNO <sub>3</sub>	75.2	0.11	9.8	0.033	74.7	0.24	10.3	0.13
NH <sub>4</sub> Cl	78.1	0.49	8.7	0.11	70.6	0.76	14.2	0.43
Digestate	80.0	0.022	8.0	0.00	52.6	0.24	14.5	0.25

AVE. は平均, SD は標準偏差

(2) 鉄および海産バイオマス由来のメタン発酵残渣の添加によるメタン発酵促進効果

鉄の添加によるメタン発酵促進メカニズムの解明

各検体のメタン・二酸化炭素の累積発生量から, 1.2 mg/mL ではメタン生成の増加が確認できた。一方, 48 mg/mL では, メタンの生成量が減少したことから, 過剰な鉄の添加は逆効果になることが明らかになった(図2)。メタンの生成過程で水素は速やかに消費されるが, 鉄の添加量に伴って, 特に 48 mg/mL で水素の発生速度が増加したことから, 鉄の添加は水素の発生を促す, あるいは水素の消費を滞らせることが示唆された。

メタン生成を担う古細菌の組成(図3)から, どの検体も酢酸資化性メタン生成細菌である#1 *Methanosaeta* が最も多く占めていた。次に, #2 の水素資化性メタン生成細菌である *Methanoculleus* が多く占めていたが, 1.2 mg/mL の 2 日目では他の検体に比べ少ない割合となった。48 mg/mL では他の検体と比べ, 酢酸資化性メタン生成細菌である#4 *Methanosarcina* が存在していた。#1, #4 はいずれも酢酸を基質とする競合関係にあり, 70 mg/L 以上であれば#4 が優占し競合上有利になるとされているが, いずれの検体も#1 が優占していた。一方 48 mg/mL の検体では, #1 が優占しているものの, #4 が一定数存在した。これらのことから, 鉄の添加が#1 と#4 の優占度合いに影響し, 特に 1.2 mg/mL では#1 の増加に大きく寄与したと考えられる。また, 48 mg/mL の検体は, 酢酸濃度が他の検体より低かったことから, メタン生成速度の増加は, 酢酸消費によるものであると考えられる。以上のことから, 鉄の添加は発酵経路にも影響することがわかった。

メタン発酵残渣の循環利用によるメタン発酵促進効果の検証

残渣を添加した際のバイオガス発生速度及び累積発生量は, 残渣由来のガス発生量を考慮したとしても, 増加傾向が確認できた(図4)。このことから, 残渣の添加はメタン発酵, 特にメタンの生成に何らかの影響を及ぼすことがわかった。特に, 残渣の固相を添加した際に, メタンおよび二酸化炭素の発生量が増加したことから, 残渣の固相部分にメタン発酵を促す要因が含まれていることが示唆された。

このように, メタン発酵残渣は, 貧栄養海域における海洋肥沃化効果が十分見込めることが明らかになった。さらに, 海産バイオマス由来のメタン発酵残渣は, ノリの色調回復に大きく寄与するとともに, 発酵残渣の循環利用によるメタン発酵促進にも効果が見込めることがわかった。しかしながら, 海産バイオマス由来の微量金属がもつ特殊性や重金属リスクについては, 実験規模の検討も含め今後詳しく検討する必要がある。

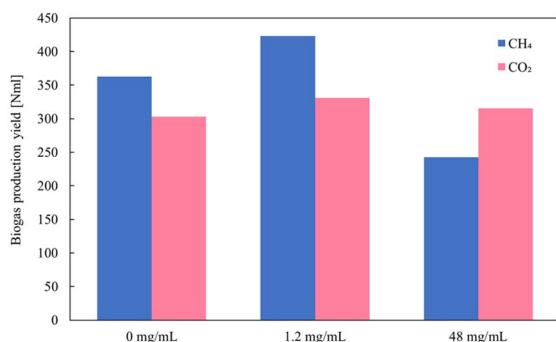


図2 鉄の添加とバイオガス発生量

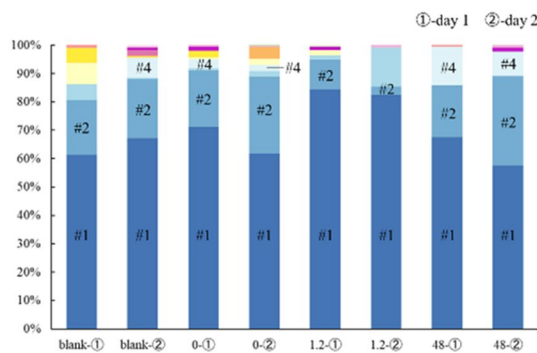


図3 古細菌の割合

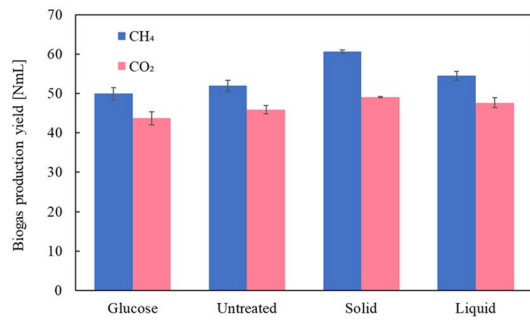


図4 残渣の添加とバイオガス発生量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 黒田桂菜, 西川亮, 大塚耕司	4. 巻 38
2. 論文標題 海産バイオマスを用いた連続メタン発酵の実現可能性検討	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Japan Society of Energy and Resources	6. 最初と最後の頁 28-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中谷直樹, 渡辺志郎, 黒田桂菜
2. 発表標題 海産バイオマスを用いたメタン発酵消化液からのリン回収手法の検討
3. 学会等名 日本船舶海洋工学会春季講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Kuroda, K. Fujii, M. Akase
2. 発表標題 Experimental study of hydrogen fermentation of seaweeds for efficient operation
3. 学会等名 Techno-Oceans/OCEANS 2018 MTS/IEEE Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤早希, 黒田桂菜
2. 発表標題 微量金属を用いたメタン発酵促進に関する基礎的調査
3. 学会等名 第27回海洋工学シンポジウム講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田桂菜
2. 発表標題 海産バイオマス由来のメタン発酵残渣を 用いた色落ちノリの回復実験
3. 学会等名 日本船舶海洋工学会海洋工学・海洋環境合同研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Kuroda
2. 発表標題 Effect of digestate from methane fermentation for the recovery of decolored laver seaweed
3. 学会等名 2nd International Conference Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts, and Environmental Sustainability (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kana Kuroda
2. 発表標題 Hydrogen fermentation of waste marine biomass
3. 学会等名 日本船舶海洋工学会春季講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kana Kuroda
2. 発表標題 Experimental study of hydrogen fermentation of waste marine biomass
3. 学会等名 The 8th East Asian Workshop for Marine Environment and Energy (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	西川 亮  (NISHIKAWA Ryo)	大阪府立大学・人間社会システム科学研究科・博士前期課程  (24403)	
研究協力者	伊藤 早希  (ITO Saki)	大阪府立大学・人間社会システム科学研究科・博士前期課程  (24403)	