

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：55402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12276

研究課題名(和文)新規単離藻類Chlorococcum sp.を用いた高率バイオ燃料生産系の構築

研究課題名(英文)Development of a high-rate biofuel production system using a newly isolated alga, Chlorococcum sp.

研究代表者

大沼 みお (Ohnuma, Mio)

広島商船高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：70594076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究で開発した油脂高生産と細胞増殖の両立を可能にする培地を用いて、油脂生産能・細胞増殖能の高い緑藻Chlorococcum sp.から藻類バイオ燃料を得るための野外培養系の構築を行った。野外培養に植藻するための前培養の方法を改良し、改良前の約2倍の濃度の細胞の維持が可能になった。野外培養系として、開放培養系(100 L)、閉鎖海上培養系(10 L)の開発を行った。Chlorococcum sp.は細胞沈降性を持つため、沈降速度の測定を行い、細胞収穫時の一次濃縮に自然沈降を利用できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

藻類バイオ燃料を社会実装化するには、低コスト野外培養系の構築が必須である。本研究で、Chlorococcum sp.は、油脂生産能・増殖能が高いだけでなく、細胞沈降性があることが明らかになった。一般に、微細藻類の細胞を収穫するときは、遠心分離や濾過などコストの高い方法が取られることが多いが、第一段階の濃縮を沈殿によって行うことにより、大幅なコストカットが可能と考えられる。本藻を用いて野外大型培養のさらなる改良を行うことは、藻類バイオ燃料の社会実装化に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A field culture system was developed to obtain algal biofuel from the green alga Chlorococcum sp., which has high oil production and cell proliferation capacity. A culture medium developed in a previous study that allows high oil production and cell proliferation was used. Improved pre-culture methods for field culture have made maintaining cells at approximately twice their concentration possible before the improvements were made. We developed an open culture system (100 L) and a closed sea culture system (10 L) as field culture systems. Since Chlorococcum sp. has cell-sedimentation properties, sedimentation rates were measured. The result indicated that spontaneous sedimentation can be used for primary enrichment during cell harvest.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：微細藻類 バイオ燃料 細胞培養 油脂生産 野外培養

1. 研究開始当初の背景

地球の温暖化抑制および枯渇性資源代替の一つとして、バイオ燃料（エタノール、ディーゼル、ジェット燃料、メタン等）が利用されつつある。微細藻類は、単位面積あたりの油脂生産効率が高く（ダイズ等の油脂生産植物の数十~数百倍）、耕作不適地で培養が可能で、食料・飼料生産に影響しないため、次世代再生可能エネルギーの原料として期待されている。しかし藻類バイオ燃料の普及のためには、石油等の既存燃料と同等以下にまで生産コストを下げる必要がある。これを実現するには、微細藻類の油脂高生産状態を維持したまま、大量に藻細胞を得ることが必須条件となる。ところが一般に、①窒素欠乏等、既知の油脂量が增大する培養法では、細胞増殖が阻害され、逆に②増殖率の高い培地では、油脂量が少なく、油脂高生産と細胞増殖を両立するのは困難である。研究代表者らは、以前、好酸単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* において、細胞増殖の阻害を起さずに油脂を生産・蓄積させることに成功した。

本研究課題開始までに研究代表者らは、愛媛県鈍川温泉より、耐アルカリ性の増殖能、油脂生産効率の高い単細胞藻類 *Chlorococcum* sp. Nibukawa HS-A を得た。*C. merolae* の、増殖阻害を起さずに油脂を生産・蓄積させる培養条件を参考に、細胞増殖を維持しながら油脂を高生産させることのできる培地を開発した。この培地を用いると、本藻は、2週間という短い培養期間で、細胞増殖を維持したまま、油脂を細胞内に多量に蓄積することを固形培養系、液体培養系（最大 500 mL）で確認していた。

2. 研究の目的

藻類バイオ燃料は、化石燃料の代替として、地球温暖化対策として注目されているが、未だ生産コストが高く、普及にはいたっていない。当研究室では、愛媛県鈍川温泉から、増殖性と油脂生産性の高い単細胞緑藻類 *Chlorococcum* sp. を新たに単離し、微細藻類ではトレード・オフの関係と考えられていた細胞増殖と油脂生産を両立させることに成功している。

本研究では、本研究は、本藻の油脂高生産を維持した状態での低コスト大量培養系を構築し、バイオ燃料の普及・発展に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Chlorococcum* sp. の大量培養系の開発

細胞増殖と油脂生産を両立させることのできる油脂生産培地を用いて、小規模（～1 L）の屋内閉鎖培養系を確立した。続いて中規模程度（～10 L）の系で屋内開放培養系を確立した。1 L および 10 L の培養を、植種藻培養として、得られた細胞を野外培養に用いて開放培養系（100 L）、海上培養系（10 L）の開発を行った。

(2) *Chlorococcum* sp. の沈降速度の測定

Chlorococcum sp. は細胞沈降性を持つため、沈降速度の測定を行った。

(3) 微細藻類の脂質分析系の開発

C. merolae を用いて GC-MS による脂質分析を行った。

4. 研究成果

(1) *Chlorococcum* sp. の大量培養系の開発

《植種藻培養系の開発》

本研究では、野外大量培養系の確立を目指す前段階として、まず容量約 20 L の水槽を用いた水量 10 L の開放系通気培養で、安定して油脂生産が誘導できる系を開発した（図 1 左）。この系では、通気の際に空気をフィルター滅菌し、その空気を乾燥防止トラップで滅菌水道水を通すことで培養液の蒸発を防止し、それでも蒸発してしまう分は、適宜水道水を補給した。培地は先行研究で開発した油脂生産培地を水道水で調整して未滅菌のまま用いた。その結果、この系で培養した細胞中に油脂の蓄積が見られ、10 L スケールにおいても油脂の生産誘導に成功した。培養中に問題となるようなコンタミネーションは見られなかった。また、この培養で得られた細胞を、野外大量培養系の植種藻として利用した。

しかし、この系では細胞増殖速度が遅く、この培養で得られた細胞を植種した野外大量培養系（100L プール培養系と 10L 海上培養系）では、(1) 試行ごとに細胞収量が安定しない、(2) 野外大量培養を始めるまでの準備期間が長いという 2 点が問題であった。野外大量培養で高い細胞収量を安定的に得るには、野外大量培養直前の段階（前培養）で、「状態の良い細胞」を「いつでも」供給できるようにすることが求められた。そこで、インキュベーターの側面からの光を効率的に取り入れることのできる、10 L メスシリンダーを培養槽として、長期間細胞濃度の濃い状態を維持できる培養系を構築した。

10 L メスシリンダーに水道水で調整した油脂生産培地と藻細胞を入れ、容器下部からバブリングして、通気と攪拌をおこなった（図 1 中）。細胞の増殖と生理状態を確認するため、濁度

(OD_{750})・pH・乾燥重量を測定した。20 L水槽を用いた10 L培養では、450-750 mg/Lの細胞収量であったのに対して、本培養では、25日間、1000 mg/Lを超えた状態が続き、高濃度で細胞を維持することができた。また同時に様々な細胞濃度において、 OD_{750} と乾燥重量で相関グラフを作成し、簡便な濁度 (OD_{750}) の測定で、収穫できる微細藻のバイオマス量が予測可能になった (図1右)。

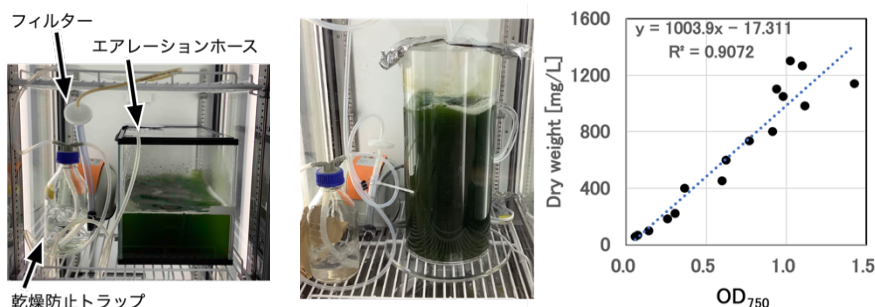
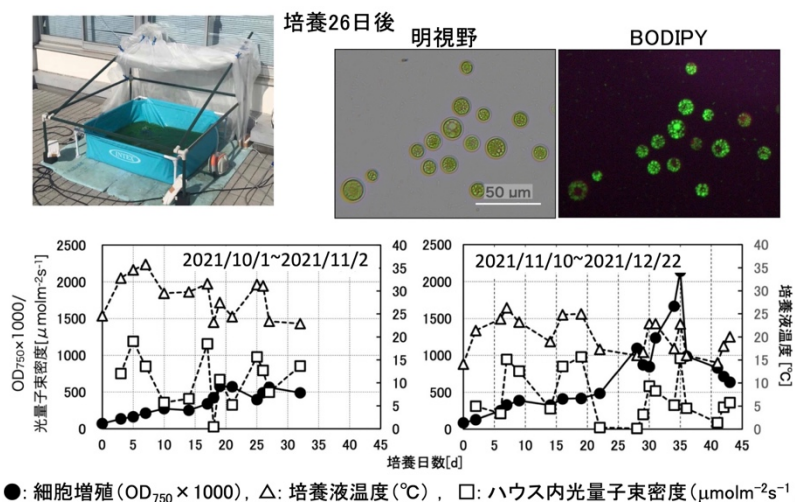


図1 *Chlorococcum* sp.の10 L培養の様子 (左: 20 L水槽使用、中: 10 Lメスシリンダー使用) と OD_{750} -乾燥重量相関グラフ (右)

また、本藻は細胞濃度の濃い状態まで培養しても、一部発泡はするが、泡切れがよく、微細藻類の大型培養で問題になることのある、泡による増殖阻害は見られなかった。従って、消泡剤などの添加も必要なく、この点からも本藻は大型培養に向いていると考えられる。

《野外開放培養系の開発》

オープンポンド式の培養系の開発には、屋外 (校舎屋上) に塩化ビニル樹脂を主の材質とする小型プール (容量約300 L) を設置し、水量100 Lにおいて、野外開放系培養プールを製作した (図2)。一度に大量の培養液を使用すること、プール設置場所が限られていることから、複数の条件を一度に比較できないため、試行ごとに改良を加えていった。プールの下には、ポリスチレン製断熱材 (熱伝導率0.036W/m・K) を敷いて地熱を防ぎ、プールの周りに金属製のフレームを設置して、培養液に触れないように農業用の不織布で覆って、異物混入と過度な温度上昇を防いだ (図2左上)。また、2021年7月から2021年12月にかけて3回の培養は、エアレーションポンプにより通気した。環境情報として、気温・培養液温度・明るさ (光合成量子束密度)・細胞の濃度 (OD_{750}) を定期的に観測し、培地の蒸発分は適宜水道水を足した。2021年7月の培養では、培養液が50°Cを超える高温になり細胞が死滅したが (データ示さず)、2021年10月 (培養液温度23-36°C)、2021年11月 (培養液温度14-26°C) に開始した培養では、実験開始から約1ヶ月で細胞が約10-20倍増加し (図2下)。細胞を油脂染色試薬 (BODIPY) で染色して顕微鏡観察すると、全細胞中の約80%以上の細胞が油脂を高生産していた (図2右上)。その後、コストダウンのためにエアレーションポンプの代わりに水循環ポンプにより培養液を攪拌することによる通気に変更した結果、培養速度が増した。



●: 細胞増殖 ($OD_{750} \times 1000$), Δ : 培養液温度 (°C), □: ハウス内光量子束密度 ($\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)

図2 *Chlorococcum* sp.の100 L培養の様子 (左上)、培養26日目の油脂蓄積 (右上)、細胞増殖 (OD_{750}) と環境情報のグラフ (下)

《海上培養系の開発》

生産コストを下げる微細藻類の培養法として、海洋の力を利用した培養法を開発している。海洋の力を利用することによって、以下の4点でコストダウン出来ると考えている。

- ①排他的経済水域 (EEZ) の有効活用することにより、用地確保のコストを下げられる。
- ②浮力を利用することにより、低額・易操作性の簡易な培養器を利用でき、培養器の設備投資費をカットすることができる。
- ③海水温が昼夜/季節で変化が少ないため、通年の安定収穫が見込め、温度調整費をカットすることができる。
- ④波力を利用することにより、培養液を攪拌することができれば、動力が不要で省エネとなる。

まず、本藻が海上で培養して増殖可能かどうかを確認した。海上培養に使う培養器は、10 L の培養液を入れた 20 L サイズのプラスチック製の培養パックをステンレス製 (後にプラスチック製に変更) のかごに入れ、カゴ上部の周りに 65 φ の塩ビ管でフレームを作り、ウレタンを巻いた。日当たりのよい海域に浮上させ、エアレーションポンプにより通気した (図 3 左上)。環境情報としては気温・海水温・明るさを定時観測した。実験開始から培養 14 日には、OD₇₅₀ は、0.077 から 0.564 へ 7.3 倍に増加し、細胞増殖が確認できた。これは、培養器が波によって、しっかりと攪拌され、海水温が約 15-18°C と本藻類の増殖に適する範囲に維持されたためと考えられる。同時期の 100 L 培養の水温と比較すると海水の恒温性が顕著であった (図 3 下)。細胞を油脂染色試薬 (BODIPY) で染色して顕微鏡観察すると、全細胞中の 90% 以上の細胞が油脂を高生産していた (図 3 右上)。

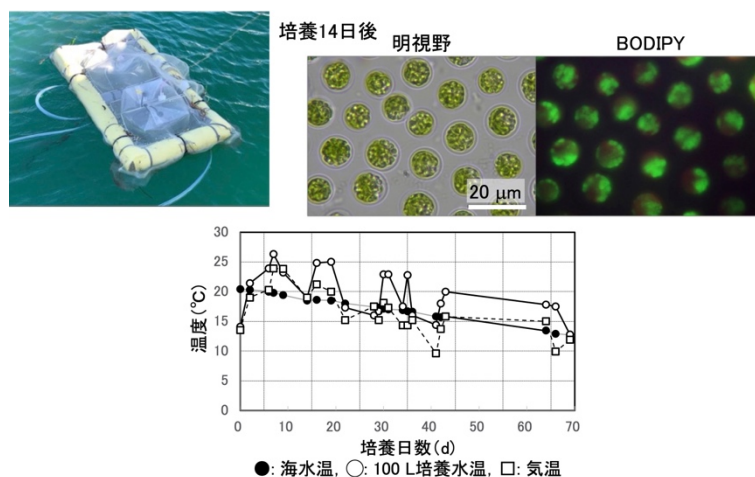


図 3 *Chlorococcum* sp. の海上培養の様子 (左上)、培養 14 日目の油脂蓄積 (右上)、海水温、100 L 培養槽水温、気温のグラフ (下)

野外大型培養では、培養 30 日間で、安定な 1500 mg/L のバイオマス生産を目指している。図 1 で示した OD₇₅₀—乾燥重量相関グラフを用いると、現在の 10 L 海上培養で、最高 1300-1500 mg/L の増殖が見られ、10 L の系では目標値を達成できた。現在、コストダウン可能な項目④の波力を利用できる培養器を考案して (特願 2022-154565)、試作器を作成し、その攪拌効果を検討している。今後は、培養器の詳細な設計、培養の大型化と最適化を行っていく。

(2) *Chlorococcum* sp. の沈降速度の測定

本藻は静置により細胞が沈降する現象は確認されていたが、その速度について詳細な解析は行っていなかった。そのため、細胞を沈降させるのに必要な時間を知るために、細胞の沈降速度を測定した (図 4)。培養液を入れた試験管を静置して、細胞が沈降の様子を観察した。静置開始後 0 分、5 分、10 分、20 分、40 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、24 時間後の界面の位置を測定したところ、沈降開始 5 時間後に定速沈降から圧密沈降へと変化し、8 時間後には元の約 1/40 の体積にまで濃縮された。

本藻類は、培養液を静置することによって細胞が沈殿し、濃縮できることが分かった。微細藻類の細胞を収穫するときは、遠心分離や濾過などコストの高い方法が取られることが多いが、第一段階の濃縮を沈殿によって行うことにより、大幅なコストカットが可能と考えられる。また、一定期間の培養後、細胞を沈降させて古い培地を取り除き、新しい培地を添加することで、その都度細胞を希釈して培養を開始するよりも高濃度の細胞を維持することのできる半連続培養法の適応が可能であることが分かった。任意の生理状態を維持することが可能な連続培養法の確立を最終目標として、今後はその前段階として、半連続培養法の開発を進めていく。

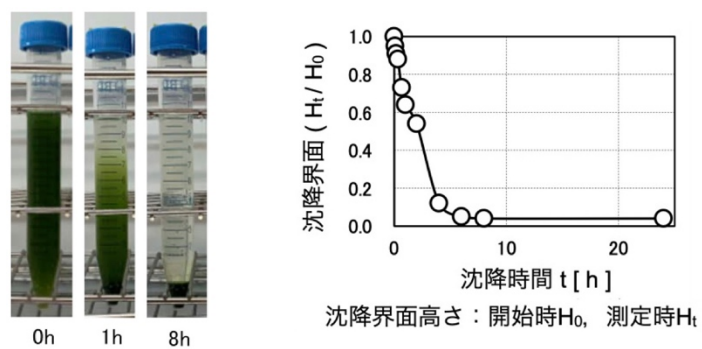


図4 *Chlorococcum* sp. の細胞沈降の様子（左）と細胞沈降曲線（右）

(3) 微細藻類の脂質分析系の開発

微細藻類に共通する脂質合成誘導条件時（窒素欠乏）において、*C. merolae* を用いて GC-MS による脂質分析を行った。その結果、窒素欠乏時には、油滴中の脂肪酸の不飽和化が亢進することを GC-MS によって確認した。また、不飽和化された脂肪酸を GC-MS において定性・定量化する手法についても検討を行い、その分析方法を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 3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 Takusagawa Mari, Kato Shoichi, Matsunaga Sachihoro, Maruyama Shinichiro, Tsujimoto-Inui Yayoi, Nozaki Hisayoshi, Yagisawa Fumi, Ohnuma Mio, Kuroiwa Haruko, Kuroiwa Tsuneyoshi, Misumi Osami	4. 巻 -
2. 論文標題 Complete Mitochondrial and Plastid DNA Sequences of the Freshwater Green Microalga <i>Medakamohakoo</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
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 無
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 大沼みお	4. 巻 50
2. 論文標題 〔解説〕 脱炭素社会へ向けて微細藻類の利用 燃料・飼料・食材などの生産	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 環境技術学会 / 環境技術	6. 最初と最後の頁 28-32
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 無
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 Hirooka Shunsuke, Tomita Reiko, Fujiwara Takayuki, Ohnuma Mio, Kuroiwa Haruko, Kuroiwa Tsuneyoshi, Miyagishima Shin-ya	4. 巻 10
2. 論文標題 Efficient open cultivation of cyanidialean red algae in acidified seawater	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~12
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 -
1. 著者名 Kuroiwa Tsuneyoshi, Ohnuma Mio, Imoto Yuuta, Yagisawa Fumi, Misumi Osami, Nagata Noriko, Kuroiwa Haruko	4. 巻 257
2. 論文標題 Evolutionary significance of the ring-like plastid nucleus in the primitive red alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i> as revealed by drying	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protoplasma	6. 最初と最後の頁 1069~1078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00709-020-01496-y	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 Yagisawa Fumi, Fujiwara Takayuki, Takemura Tokiaki, Kobayashi Yuki, Sumiya Nobuko, Miyagishima Shin-ya, Nakamura Soichi, Imoto Yuuta, Misumi Osami, Tanaka Kan, Kuroiwa Haruko, Kuroiwa Tsuneyoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 ESCRT Machinery Mediates Cytokinetic Abscission in the Unicellular Red Alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00169	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 大沼みお, 村上定瞭, 廣岡俊亮, 黒岩常祥	4. 巻 22nd
2. 論文標題 微細藻類のバイオ燃料に関する研究(1) -温泉由来緑藻の高油脂生産性培養系の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 環境技術学会年次大会予稿集	6. 最初と最後の頁 97-98
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 無
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 村上定瞭, 岸 拓真, 八木沢英美, 三角修己	4. 巻 22nd
2. 論文標題 微細藻類のバイオ燃料に関する研究(2) -油脂生産性微細藻の海上培養系の設計と運転	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 環境技術学会年次大会予稿集	6. 最初と最後の頁 99-100
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 無
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 岸拓真, 大沼みお, 奥田悠希	4. 巻 34
2. 論文標題 海上での微細藻類培養手法に関する基礎的研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本沿岸域学会研究討論会講演概要集	6. 最初と最後の頁 ROMBUNNO.1-5
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 無
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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂本 岳人、宮前 俊彦、奥田 悠希、八木沢 芙美、廣岡 俊亮、藤原 崇之、宮城島 進也、黒岩 晴子、黒岩 常祥、眞田 宣明、三角 修己、田多 一史、広兼 元、岸 拓真、大沼 みお
2. 発表標題 愛媛県純川温泉由来高油脂生産藻類の開放系培養構築の試み
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣岡俊亮、富田麗子、藤原崇之、大沼みお、黒岩晴子、黒岩常祥、宮城島進也
2. 発表標題 単細胞紅藻イデココゴメ類の海水を用いた培養技術開発
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒岩常祥、黒岩晴子、永田典子、八木沢芙美、三角修己、藤原崇之、乾弥生、松永朋子、加藤翔一、井元祐太、田草川真理、吉田大和、松永幸大
2. 発表標題 真核細胞の細胞小器官の分裂情報を細胞質分裂に伝達する機構のゲノム形態学による解明
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸拓真、大沼みお、奥田悠希
2. 発表標題 海上での微細藻類培養手法に関する基礎的研究
3. 学会等名 2022年度日本沿岸域学会 研究討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西浦周, 坂本岳人, 宮前俊彦, 奥田悠希, 八木沢芙美, 廣岡俊亮, 藤原崇之, 宮城島進也, 黒岩晴子, 黒岩常祥, 眞田宣明, 三角修己, 月坂明広, 広兼元, 岸 拓真, 大沼みお
2. 発表標題 愛媛県鈍川温泉由来高油脂生産藻類の野外大量培養系構築の試み
3. 学会等名 日本植物学会第 86 回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大沼みお, 村上定瞭, 廣岡俊亮, 黒岩常祥
2. 発表標題 微細藻類のバイオ燃料に関する研究(1) -温泉由来緑藻の高油脂生産性培養系の開発
3. 学会等名 第 22 回環境技術学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上定瞭, 岸拓真, 八木沢芙美, 三角修己
2. 発表標題 微細藻類のバイオ燃料に関する研究(2) -油脂生産性微細藻の海上培養系の設計と運転
3. 学会等名 第 22 回環境技術学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大沼みお, 岸拓真, 月坂明広, 広兼元
2. 発表標題 油脂生産微細藻の海上培養に関する実証実験
3. 学会等名 超異分野学会 東京大会2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 バイオ燃料用油脂を生産する微細藻類の培養方法	発明者 大沼みお, 岸拓真, 月坂明広, 広兼元	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-154565	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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 分担者	三角 修己 (Misumi Osami) (90583625)	山口大学・大学院創成科学研究科 ・教授 (15501)	

	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	黒岩 常祥 (Kuroiwa Tsuneyoshi)		
研究 協力者	黒岩 晴子 (Kuroiwa Haruko)		
研究 協力者	藤原 崇之 (Fujiwara Takayuki)		
研究 協力者	廣岡 俊亮 (Hirooka Shunsuke)		

6. 研究組織（つづき）

	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	八木沢 芙美 (Yagisawa Fumi)		
研究協力者	岸 拓真 (Kishi Takuma)		

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