

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22760647

研究課題名（和文） 低炭素社会実現に向けた機能性微細藻類による
非食バイオ燃料生産と培養精製技術の開発研究課題名（英文） Biofuel production from photoautotrophic cultivation
of multifunctional microalgae

研究代表者

大田 昌樹 (OTA MASAKI)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：50455804

研究成果の概要（和文）：

昨今、微細藻類由来のバイオ燃料生産に関心が集まっている。この推進には培養・抽出工程の課題克服が不可欠とされており、本申請では細胞増殖と得られる代謝成分の分離生産の向上を目的とした研究を実施した。結果として新たに導入した LED 支援通気振盪培養システムからは無機炭素とこれ以外の無機・有機源を原料とするハイブリッド培養法に関する基礎知見を得た。分離生産については、超臨界二酸化炭素に希ガスを添加した系においてカロテノイド中のキサントフィル類の選択的除去が達成された。

研究成果の概要（英文）：

Effects of organic and inorganic sources on biofuel production from microalgae were examined under photoautotrophic conditions. The growth rate and fatty acid production were regulated by dissociation of inorganic carbon and metal ions for using a new LED culture system. In supercritical fluid extraction with inert gas entrainer, carotenoids were separated from xanthophylls.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学・地球資源システム工学

キーワード：微細藻類, 超臨界抽出, 光合成, 分泌代謝物, 二酸化炭素

1. 研究開始当初の背景

近年の石油価格の高騰や食と競合するバイオ燃料の問題を背景に非食バイオマスへの関心が高まっている。中でも、優れた二酸化炭素固定能を有する微細藻類は非在来型バイオマスの最有力候補の1つとして期待されている。微細藻類から得られるバイオ燃料

は草本木質系、ナタネ、トウモロコシなどの在来型バイオマスに比べて実に多様で、現在提案されているだけでも種にもよるが、石油代替燃料、ディーゼル燃料、エタノール燃料、水素・メタン燃料などがある。今後の実用化プロセスへの展開を占う上でこのような機能性の高いバイオマスを目的に合わせ

かに効率よく生産し経済的に活用できるかが極めて重要なポイントとなる。

ところで、微細藻類由来の代謝物の中で糖類は Calvin 回路を通して最もシンプルな光合成系で生産される第1の代謝物であり、その後の TCA サイクルや脂質代謝などを通してタンパク質や脂質などの代謝物は生産されている。これまでの研究を通して、微細藻類由来の脂質は酸素発生と炭素同化の両者に内因的に関与する Calvin 回路の経由に問題があると想定しており、本研究では無機炭素源と有機炭素源を併用するハイブリッド型生産システムの構築を考案している。ここで有機炭素源は、従来は可食バイオマス由来のシュガーが中心であったが、微細藻類が光独立栄養条件で生産する糖類は非食原料であるため望ましいと考えている。一方、糖類の中には、細胞壁や貯蔵多糖として細胞内に固定化されるものも存在し、一部の藻類では多糖を細胞外に分泌生産する。その代表的な例として紅藻類ポルフィリジウムがある。通常、この細胞外分泌多糖 (Exopolysaccharide, EPS) はスルホン酸基やカルボキシル基を含む水溶性の多糖であり、その分子量は例えば *Porphyridium purpureum* において $2\sim 7 \times 10^6$ Da とされている。草本木質系などの在来型バイオマスでは細胞壁中に存在するリグニンとの強固な結合により活用する上で反応・改質は容易ではないが、微細藻類はリグニン含有率が極めて低いためこの多糖の応用を視野に入れることができる。

2. 研究の目的

本研究で想定する細胞外分泌多糖の応用利用の概念は、培養生産を中心とするアップストリームと分離・改質・精製を中心とするダウンストリームに分類される。この細胞外分泌多糖の応用プロセスの開発には、培養生産の制御に加えて分離生産、後段の反応・改質、精製行程などの単位操作を最適化した後、条件の精査を行う必要がある。本研究では、まずアップストリームにおいて基本的な培養条件の影響を明らかにする一方、ダウンストリームでは超臨界抽出を用いたトリグリセリド (TG) のカロテノイド (CA) からの分離生産の可能性を検証した。

3. 研究の方法

培養実験

本研究で使用した *Porphyridium purpureum* (1380-1a) は、ドイツ・ゲッティンゲン大学で単離されたものを使用した。実験は以下の手順で行った。人工海水培地 (ASW 培地) または N 源 KNO_3 の濃度を 1/5 倍に設定した ASW 培地 240 ml を 500 ml フラスコに導入した後、蒸気滅菌後、所定細胞濃度の前培養液 10 ml を加えた。次に、フラスコを空気恒温

槽内に設置し、下部から LED 照射を行うことで振とう培養を開始した。培養条件は、温度 25°C 、光強度 $12\sim 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、 CO_2 濃度および O_2 濃度は大気中濃度、振とう速度 100 rpm とした。細胞濃度 X は、培養液の濁度 D (@750 nm) と乾燥重量の相関関係 ($X = 0.35 D$) より決定した。

P. purpureum が細胞外に分泌生産する EPS の濃度は、Alucian-blue 染色法を用いて決定した。この染色法は、多糖中の遊離酸性基が Alucian-blue と結合することで染色液中濃度が薄く変化することを原理とし、Alucian-blue の特定吸収波長 (610 nm) において海水培地の吸光度 ($\text{Abs}_{610, \text{ASW}}$) からの変化量と、全有機炭素計より得られた EPS 濃度の実測値との相関関係より評価した。ここで、 $\text{Abs}_{610, \text{ASW}}$ は 1.746 とした。

超臨界抽出実験

微細藻類からの超臨界流体抽出実験は以下の手順で行った。抽出には半回分式高压抽出装置を用いた。約 3 g の凍結乾燥細胞を抽出器 (内容積 10 cm^3) に仕込み、Air bath 内で 0°C に保持した後、 CO_2 単独の抽出では CO_2 をパージ後 30 MPa まで圧入し、所定流量にて抽出実験を開始した。助溶媒として Ar を 50 mol% 添加した実験では、まず 15 MPa まで Ar を圧入した後、 CO_2 を全圧 30 MPa まで昇圧し、Ar と CO_2 を所定流量に調整して抽出実験を開始した。出口流量を $450 \text{ cm}^3/\text{min}$ (STP)、全抽出時間を 60 min と固定し、抽出物は冷却したトラップにて回収した。回収した CA は HPLC-DAD より、TG は n-カプリル酸コレステロールを内部標準として TLC-FID よりそれぞれ定量評価した。CA および TG の抽出率は、それぞれ各時間において得られた重量を仕込み重量で除した値として定義した。選択率は、CA に対する TG の抽出率比とした。

4. 研究成果

培養実験

まず、本助成により新たに導入した白色 LED 式振盪培養システムは、従来の白色蛍光灯式培養システムとほぼ同等の培養結果が得られることが確認された。続いて、ハイブリッド培養における有機炭素供与藻類として *P. purpureum* の生産性の向上を目的として検討を行った。Fig. 1 に温度 25°C 、振とう速度 100 rpm における *P. purpureum* の細胞増殖曲線を示す。通常 ASW 培地では、細胞増殖速度は光強度の増加に伴い増加した。これは光エネルギー量の増加に伴う光合成速度の増加に伴うものと考えられる。一方、N 源の濃度を 1/5 倍に調整した ASW 培地では、同条件より低い光強度に設定した $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件でも増殖速度は低下した。これは、*P. purpureum* の光合成色素がタンパク質

複合体として存在するため N 源の濃度の低下とともにタンパク質生産速度が低下したことを示しているものとする。

Fig. 2 に Fig. 1 と同条件における *P. purpureum* の EPS 濃度の経時変化を示す。図より、EPS の生産速度は EPS 濃度 0.25 g dm^{-3} までは光強度によらずほぼ一定だったが、それ以上の濃度では光強度の増加とともに急激に増加する傾向が観察された。これは N 源などの栄養源の枯渇により細胞増殖が抑制されたためと考える。

次にこの影響を詳しく考察するため、Fig. 1 と Fig. 2 より細胞濃度と EPS 濃度の関係を定量評価した。その結果を Fig. 3 に示す。図の点線は、細胞濃度と EPS 濃度が 1:1 を示すときの関係である。図より、いずれの光強度に

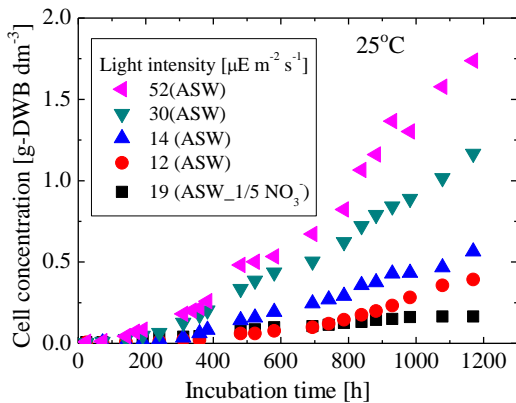


Fig. 1 Growth curve of *Porphyridium purpureum*

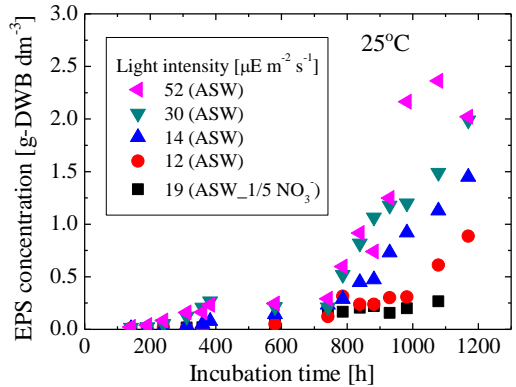


Fig. 2 EPS production from *P. purpureum*

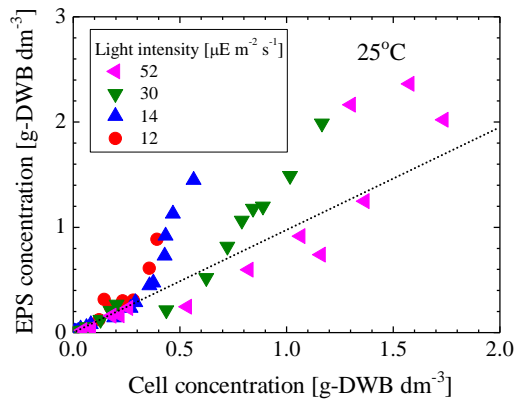


Fig. 3 EPS conc. vs. Cell conc.

においても低細胞濃度での傾きと高細胞濃度での傾きが異なることが判明した。また、この低細胞濃度での傾きが続く長さは高光強度ほど大きくなる傾向があった。これは、細胞増殖が盛んであれば盛んであるほど EPS が生産されにくいことを示している。すなわち、細胞増殖の抑制により EPS 生産が促進されることが今回の判明した。

超臨界抽出実験

Fig. 4 に 0°C , 30 MPa における抽出結果を示す。CO₂ 単独の抽出 (Fig. 4a) では、CA に起因する黄色が確認されたが、CO₂+Ar 抽出 (Fig. 4b) では抽出時間 10 min にて淡黄色が認められたものの 30 min 以降では透明であった。これら抽出物について HPLC より定量分析した結果、CO₂ 抽出では CA の主成分として α および β カロテン、ルテインが得られたが、CO₂+Ar 抽出では分子内にヒドロキシル基を 1 つ有する高極性のルテインは検出されなかった。TLC-FID 分析からはいずれの抽出法においても TG が検出された。Fig. 5 に 0°C , 30 MPa における TG と CA の抽出結果を示す。

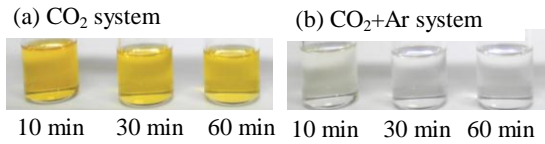


Fig. 4 Extracts as ethanol solution (0°C , 30 MPa)

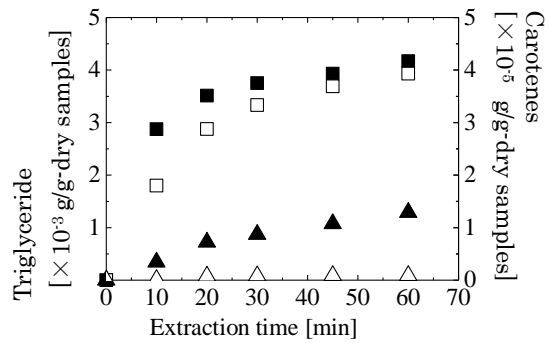


Fig. 5 Extraction curves for CO₂ (squares) and CO₂+Ar (triangles) systems (0°C , 30 MPa)

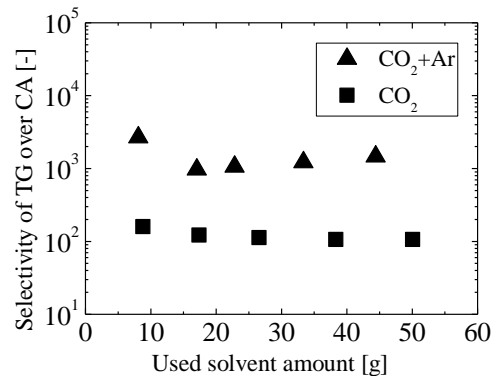


Fig. 6 Selectivity of TG over CA (0°C , 30 MPa)

いずれにおいても抽出率は時間とともに増加した。抽出速度はCO₂+Ar抽出よりもCO₂抽出のほうが高かった。各抽出時間の抽出率よりCAに対するTGの選択率を計算した結果はFig. 6に示すように、選択率はCO₂抽出に比べてCO₂+Ar抽出のほうが10倍程度高かった。以上より、CO₂+Ar抽出は抽出速度が若干劣るもののTG選択率において大きなメリットがあることがわかった。さらに、カロテノイドの分析からは、希ガスの添加によりキサントフィル類が効率的に除去されることが確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1) M. Ota, Y. Kato, H. Watanabe, M. Watanabe, Y. Sato, R. Rosello, P. Clemens, H. Inomata, Effects of nitrate and oxygen on photoautotrophic lipid production from *Chlorococcum littorale*, *Bioresource Technology*, **102**, 3286-3292 (2011).査読有

2) 大田昌樹, 入内島齋, 野村幸一郎, 佐藤善之, 猪股宏, 抽出実験に基づく超臨界二酸化炭素に対する稀少天然物の溶解度推定, *日本食品科学工学会誌*, **57**, 464-471 (2010).査読有

3) 佐藤恵, 武田圭右, 大田昌樹, 佐藤善之, 猪股宏, 超臨界CO₂中溶解度測定による溶質SP値の実験的推定, *化学工学論文集*, **36**, 466-471 (2010).査読有

[学会発表] (計4件)

1) M. Ota, M. Takanaka, Y. Sato, H. Inomata, Effect of bubbling gas composition on photoautotrophic lipid production from a green alga *Chlorococcum littorale*, *International Symposium on Algal Biofuels*, **P18**, Tokyo, Nov. 17, 2011.

2) M. Takenaka, M. Ota, M. Watanabe, Y. Sato, H. Inomata, Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Chlorococcum littorale* grown in photoautotrophic cultures, *International Symposium on Algal Biofuels*, **P19**, Tokyo, Nov. 17, 2011.

3) 大田昌樹, 微細藻類のバイオマス資源としての可能性, (東北大学公開講座・招待講演) 第1回宮城県藻類産業フォーラム, 仙台, 2011年9月3日.

4) 大田昌樹, (招待講演) II-4 藻類バイオマスの高効率分離・回収技術 ~カスケード利用のための超臨界流体技術~, 東京メガ

セミナー, 東京, 2011年3月1日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称: 画像による藻類濃度決定方法
発明者: 山田巧, 小野陽子, 猪股宏, 大田昌樹
権利者: 東北大学・日本電信電話株式会社
種類: G03C 5/02
番号: NTTH236127
出願年月日: 2012年3月30日
国内外の別: 国際

名称: 微細藻類成分量測定方法および装置ならびにプログラム
発明者: 山田巧, 小野陽子, 猪股宏, 大田昌樹
権利者: 東北大学・日本電信電話株式会社
種類: G03C 5/02
番号: NTTH236513
出願年月日: 2012年3月30日
国内外の別: 国際

名称: 二酸化炭素有効利用装置
発明者: 小野陽子, 津田昌幸, 中村二郎, 丸尾容子, 猪股宏, 大田昌樹
権利者: 東北大学・日本電信電話株式会社
種類: C12S 13/00
番号: NTTH226676
出願年月日: 2011年3月30日
国内外の別: 国際

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://blog2012mohta.japanprize.jp/> (公益財団法人国際科学技術財団研究ブログ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大田 昌樹 (OTA MASAKI)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 50455804

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし