

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25630227

研究課題名（和文）窒素回収とグリーン燃料原料としてのアオコと人間との共存技術への挑戦

研究課題名（英文）Challenge for coexistence of blue-green microalgae as nitrogen recovery and green fuel resource and human

研究代表者

神田 英輝（Kanda, Hideki）

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：90371624

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）：従来、活用されていなかったアオコのような微細藻類から油脂を抽出した後の残渣の利活用について、亜臨界水処理によるアミノ酸やタンパク質への分解を検討した。例えば、微細藻類の *Nannochloropsis oceanica* の油脂抽出において、液化ジメチルエーテル（DME）を用いて油脂抽出を行った後に、この抽出残渣を亜臨界水処理した。抽出残渣を亜臨界水処理すると、最大で抽出残渣の21.5%が、水溶性タンパク質として分解され、水相に移行することが明らかになった。次の藻類の培養サイクルへの、藻類の栄養源となるタンパク質水溶液として、窒素栄養源としての再利用に利用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Decomposition of microalgae residue obtained after lipid was extracted microalgae was examined. Microalgae residue was decomposed by subcritical water and it was converted to amino acids and/or protein. In this study, *Nannochloropsis oceanica* was employed as microalgae, and lipid was extracted liquefied dimethyl ether. By decomposition by subcritical water, maximum value of residue decomposed to protein was 21.5% of the residue. This result was implies that decomposition of microalgae residue has a potential to use the residue as nutrition resources to cultivate microalgae.

研究分野：プロセス工学

キーワード：微細藻類 亜臨界水 ジメチルエーテル 蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

アオコは人為的な発生制御が難しいので、回収時には腐敗した状態になることが多い。また、アオコの主要藻類であるミクロキストスは、その多くが有毒種であるので、廃棄物として焼却処分される。その上に、アオコの殆どが水なので、焼却処分の際には多量の水の蒸発潜熱が必要になる。この熱エネルギー源として化石燃料を用いるので CO<sub>2</sub> を排出する。

しかし、本来、アオコの大量発生は、富栄養化した水質を浄化する自然界のメカニズムの一つであり、人間活動と共存できないだけである。更に、アオコに代表される微細藻類の増殖能力 (CO<sub>2</sub> 固定能力)・水中の富栄養物質の固定能力は、高等植物の能力と比べて突出して高い。

研究代表者 (神田英輝) は、液化ジメチルエーテル (DME) を抽剤に用いて、高品質の油脂や重油を光合成する微細藻ミドリムシ・ボツリオコッカス・ナンクロロプシスを、水分 70% 以上のペースト状態のまま、細胞膜や細胞壁を破壊せずに、従来の Hexane Soxhlet 抽出法や、Bligh-Dyer 抽出法と同じ収率・品質で、油脂や重油を抽出することに成功した。

アオコにはラン藻・ミドリムシ・ボツリオコッカス・ナンクロロプシスなど、様々な微細藻類が多く含まれている。

研究分担者 (後藤元信) は、亜臨界水を用いた草木質バイオマスの分解研究を重ねる中で、草木質バイオマスに含まれる油脂 (低窒素含有) は『何らかの方法で』事前に除去してグリーン燃料化して、亜臨界水で残渣 (高窒素含有) を殺菌すると同時に、アミノ酸に分解するのが望ましいと考えた。この二人の異分野の研究成果を融合させることで、本研究を着想するに至った。

### 2. 研究の目的

中国等の新興国の湖や海、国内の霞ヶ浦では、湖水や海水の富栄養化が進み、アオコの大量発生が問題になっている。アオコの多くが有毒種であり、水圏生態系を破壊するうえに、腐敗して悪臭源にもなる。このため、アオコは焼却処分されている。しかし、本来、アオコの大量発生は自然界の浄化メカニズムの一つであり、人間の生活や経済活動と共存できないだけである。

一方で、アオコは高等植物に比べて光合成能力に優れ、細胞内に CO<sub>2</sub> を油脂として固定でき、窒素含有量が多い特徴がある。つまり、アオコを最適に処理することが可能になれば、水中の富栄養物質の除去、アンモニア合成に代わる窒素回収、グリーン燃料の生産を、一挙に達成でき、人間との共存が可能になる。

### 3. 研究の方法

まず、第 1 工程として、従来の Hexane

Soxhlet 抽出法や Bligh-Dyer 抽出法ではなく、DME 抽出法を採用して、湖水も含む水分大過剰のアオコから油脂を直接抽出する。様々な微細藻類を内容積 10cm<sup>3</sup> の耐圧硝子管に 5cm<sup>3</sup> 充填して抽出カラムとして用いる。生じた残渣の元素比率 (C・H・O・N) や保有熱量を分析して明らかにする。抽出カラムに、液化 DME を 20 ± 0.51MPa で 10cm<sup>3</sup>/min の速度で供給し、抽出カラムの内部にて微細藻類から油脂を抽出した。抽出に用いた液化 DME を大気圧に減圧すると、DME が蒸発して、液体の水と油脂が得られる。抽出カラムには、油脂が抽出除去された残渣が残り、これを第 2 工程で用いた。

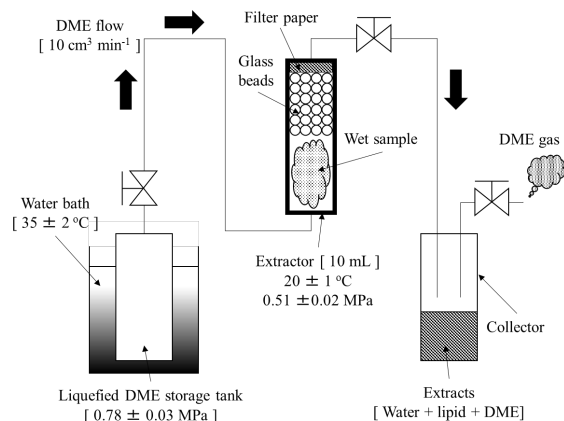


Fig. 1 液化 DME 抽出装置

第 2 工程として、DME で油脂を抽出した後の微細藻類の残渣を、微細藻類の培養工程でアミノ酸やタンパク質などの窒素化合物として再利用するため、抽出残渣を亜臨界水で処理した。DME を用いた油脂の抽出工程において、十分に油脂を抽出した微細藻類の残渣を用いた。その残渣 0.3 g と水 5 ml を、内径 1cm、容量 10ml のパッチ式反応器 (AKIKO 振盪式リアクター加熱攪拌装置) に挿入し、高温高圧状態で 30 分間振盪攪拌を行った。攪拌中、内部の水は臨界点に近づき亜臨界状態になる。温度条件は 150、175、200、225 にて亜臨界水処理を行った。

実験終了後、反応器が常温程度に冷えた後に、内容物を回収し、遠心分離機 (TYPE THM 100VAC 50/60Hz SAKUMA SEISAKUSHO LTD.) を用いて、回転数 900 rpm にて 20 分ほど遠心分離を行った。遠心分離後、回収物は上澄み液と分解後の沈殿物に分けられた (Fig. 2)。アミノ酸やタンパク質は上澄み液に含まれており、上澄み液をに含まれるアミノ酸及びタンパク質分析を行った。

DME で抽出後の微細藻類の残渣から、亜臨界水処理によって上澄み液へ移行した物質の成分を推測するために、底に堆積した沈殿物と亜臨界水処理前の抽出残渣を CHN コーダーにて元素組成比を分析し、比較した。

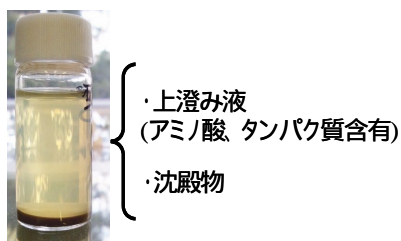


Fig. 2 抽出残渣を亜臨界水で処理した後に遠心分離した溶液

微細藻類の抽出残渣を 30 分間亜臨界水処理した後、遠心分離にて得た上澄み液に含まれるアミノ酸、タンパク質を分析した。

アミノ酸の分析は、分析するアミノ酸の種類によって手法が変わる。今回は 18 種類のアミノ酸を定量分析するため 3 つの分析を行った。15 種類のアミノ酸(アルギニン、リジン、ヒスチジン、フェニルアラニン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、グリシン、プロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニン、アスパラギン酸)の分析と、シスチン及びメチオニンの分析、トリプトファンの分析の 3 方法のアミノ酸分析を行った。

15 種類のアミノ酸については、試料 1 g に、0.04%2-メルカプトエタノール含有 20%塩酸 20ml を加えた後に、脱気・封管したのち、50ml の溶液を分取して、減圧濃縮乾固して、クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH2.2) 5ml を加えて乾固物を溶解した。この溶液をアミノ酸自動分析計に供した。アミノ酸自動分析計としては JIC-500/V (日本電子株式会社) を用い、カラムに LCR-6, 4mm × 120mm(日本電子株式会社)、移動相にクエン酸ナトリウム緩衝液(H-01 ~ H-04) (日本電子株式会社)、反応液に日本電子用ニンヒドリン発色溶液キット (和光純薬工業株式会社)、流量は移動相 0.42 ml/min、反応液 0.22 ml/min、測定波長は、570 nm (プロリンを除く 14 種) と 440 nm (プロリン) とした。

シスチン及びメチオニンの分析については、試料 1g に過ギ酸溶液を 25ml 加えた後に、過ギ酸酸化処理を冷倉庫内で 16 時間行った。これを減圧濃縮乾固して、50ml を分取し、減圧濃縮乾固して、クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH2.2) 5ml を加えて乾固物を溶解した。この溶液をアミノ酸自動分析計に供した。アミノ酸自動分析計としては JIC-500/V (日本電子株式会社) を用い、カラムに LCR-6, 4mm × 120mm(日本電子株式会社)、移動相にクエン酸リチウム緩衝液(P-11、P-12 (日本電子株式会社)、反応液に日本電子用ニンヒドリン発色溶液キット (和光純薬工業株式会社)、流量は移動相 0.40 ml/min、反応液 0.30 ml/min、測定波長は、570 nm とした。

トリプトファンの分析については、試料 1.5g に水酸化バリウム水和物 7.8g と水 4.5ml と 60%チオジエチレングリコール 0.5ml を加えた後に、加熱・溶解と脱気・封管して、

205 塩酸 50ml を加えた後に 2mol/l の水酸化ナトリウム水溶液で中和・微アルカリに調整するとともに、50ml を分取して、この溶液をアミノ酸自動分析計に供した。アミノ酸自動分析計としては LC-20SD (株式会社 島津製作所) を用い、検出器には蛍光分光光度計 RF-20Axs (株式会社 島津製作所)、カラムには CAPCELL, PAK C18 AQ, 4.6mm × 250mm (株式会社 資正党)、移動相に 20 mmol/l 過塩素酸及びメタノールの混液(80:20)、流量は 0.7 ml/min、蛍光励起波長は 285 nm、蛍光測定波長は 348nm とした。カラム温度は 40 とした。

タンパク質の分析方法は、いずれも、脱気・封管の後に、110、24 時間の加水分解反応の工程が加わっただけで、アミノ酸の分析方法と殆ど同じである。また、アミノ酸の分析と同様に、タンパク質から分解されたアミノ酸も、3 つの分析を行った。

すなわち、もともと単独で上澄み液中に溶解しているアミノ酸を分析するのと、上澄み液中に溶解しているタンパク質を加水分解してできたアミノ酸を分析した。

#### 4. 研究成果

DME にて、油脂抽出後の微細藻類の抽出残渣を亜臨界水処理した。その亜臨界水処理溶液を回収し遠心分離すると、上澄み液と沈殿物が得られた。残渣の亜臨界水処理によって分解されたアミノ酸とタンパク質は、上澄み液に移行したと考えられる。上澄み液と分解後の沈殿物を各々分析した。Table 1 に、微細藻類として、*Nannochloropsis oceanica* を用い、亜臨界水処理によって底に堆積した固形物の重量と、亜臨界水分解前の残渣の重量割合を示す。

Table 1 亜臨界水処理前後の残渣重量割合  
温度 ( ) (分解後の沈殿物)  
/(分解前の抽出残渣) (g/g)

温度 ( )	(分解後の沈殿物) / (分解前の抽出残渣) (g/g)
150	0.67
175	0.28
200	0.32
225	0.36

150 ~ 175 にかけて、急激に亜臨界水処理によって残った重量が減少した。175 以上の温度では、分解前後の重量割合に大きな変化は見られない。この 150 ~ 175 の範囲内のある温度から、抽出残渣が急激に分解されると考えられる。

DME で抽出後の *N. oceanica* 残渣ならびに、亜臨界水処理後に得られた底部の沈殿物を CHN コーダーにて分析し、元素組成比を比較した (Table 2)。亜臨界水分解後の沈殿物に含まれる、窒素元素と酸素元素の割合が減少していることが明らかになった。これは、上澄み液に窒素原子と酸素原子の割合が高い物質が移行し、その物質がアミノ酸やタンパ

ク質であると考えた。

Table 2 亜臨界水処理による残渣構成元素割合の変化

亜臨界水温度( )	C(%)	H(%)	N(%)	O(%)
処理前	48.8	7.8	10.2	33.2
150	52.5	7.9	10.0	29.6
175	52.8	7.7	9.4	30.1
200	55.7	7.8	8.7	27.9
225	60.9	8.3	7.5	23.3

抽出残渣が十分に分解された200 で30分間亜臨界水処理して、遠心分離によって得られた上澄み液に含まれるアミノ酸、タンパク質の量を分析した。まず、アミノ酸を分析したが、上澄み液からは検出されなかった。一方で、上澄み液に加水分解を行ったところ、タンパク質に由来するアミノ酸が検出された。Table 3 は、上澄み液に含まれるタンパク質を加水分解して検出されたアミノ酸の重量を示す。上澄み液 100 g あたりの各アミノ酸重量を示している。

Table 3 亜臨界水処理によって得られた水溶性タンパク質を構成するアミノ酸

アミノ酸	水溶液の含有量(mg/100g)
リジン	49.0
ヒスチジン	-
ロイシン	80.5
イソロイシン	38.0
メチオニン	27.0
バリン	63.5
スレオニン	42.0
トリプトファン	-
フェニルアラニン	47.5
アルギニン	51.0
チロシン	36.0
アラニン	81.5
グリシン	73.5
プロリン	64.0
グルタミン酸	164.5
セリン	41.5
アスパラギン酸	63.0
シスチン	-

上澄み液 100 g あたりから検出されたアミノ酸は、必須アミノ酸が 347.5mg、その他のアミノ酸が 575.0 mg、合計で 922.5 mg のアミノ酸が含有していた。このアミノ酸水溶液は約 0.92%の濃度であり、抽出残渣 0.31 g から分解された総タンパク質量は、加水分解後のアミノ酸換算で 45.3mg となり、抽出残渣 1g につき 0.146 g となった。また、Table. 14 より、200 にて抽出残渣の亜臨界水処理を行った際、亜臨界水処理前後で抽出残渣 1 g につき、0.68 g 減少している。抽出残渣重量の減少分の 21.5%がタンパク質へ分解されたことが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計13件)

1. Hideki Kanda, Peng Li, Motonobu Goto, Hisao Makino  
“DME assists microalgae fuel production in reaching positive energy balance”  
The 9th World Congress of Chemical Engineering, Seoul, South Korea  
(2013/8/18-23)

2. 加茂佑一・小川真輝・栗田裕子・Siti Machmudah・Wahyudiono・神田 英輝・後藤元信

「亜臨界 DME による微細藻類ナンノクロロプシスからの油脂抽出挙動の解明」

第 44 回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会、静岡大学

(2013/11/3)

3. 小川真輝・加茂佑一・栗田裕子・Siti Machmudah・Wahyudiono・神田 英輝・後藤元信

「亜臨界 DME による藻類油脂の抽出と水の助溶媒効果」

第 44 回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会、静岡大学

(2013/11/3)

4. “Lipids Extracted from High-moisture Microalgae by Subcritical Dimethyl Ether ”

International Symposium on EcoTopia Science 2013, Nagoya, Japan

(2013/12/13-15)

5. Yuichi Kamo, Shuhei Shintani, Siti Machmudah, Wahyudiono, Hideki Kanda, Motonobu Goto

“Direct Extraction of Carotenoids from High-Moisture Macroalgae by Using Subcritical Dimethyl Ether ”

International Symposium on EcoTopia Science 2013, Nagoya, Japan

(2013/12/13-15)

など

〔図書〕(計2件)

1. 藻類の培養とその事業化・高収益化に向けた最新技術 バイオ燃料など各種活用先と大量生産のための課題

榎本 平、松本 光史、鷲見 芳彦、宮下 修、小俣 達男、佐々木 俊弥、中原 剣、竹中 裕行、山口 裕司、前川 孝昭、吉田 行友、石川 卓、仲宗根 宏政、西尾 幸郎、中野 和弘、大橋 慎太郎、石井 孝定、神田 英輝、榎 節子、鈴木 健吾、増田 篤稔、竹中 優弥、福澤 秀哉「B5判、全220頁」

分担箇所：第3部培養藻類の活用分野別利用技術 1節3項「微細藻類由来バイオ燃料の高効率抽出技術の開発」p.166-173

出版社：情報機構，ISBN:

978-4-86502-025-0 (2013)

2. 藻類オイル開発研究の最前線 微細藻類

由来バイオ燃料の生産技術研究

岡田 茂、河野 重行、神田 英輝、石川 孝博、  
田茂井 政宏、鈴木 健吾、重岡 成、中嶋 信  
美、増田 篤稔、蘆田 弘樹、広瀬 侑、池内 昌  
彦、関口 弘志

「B5判、全228頁」

分担箇所：第3部未利用廃熱を利用する微細  
藻類バイオオイルの省エネルギー抽出技術

p.83-92

出版社：エヌ・ティー・エス， ISBN:

978-4-86469-085-0 (2013)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 英輝 (KANDA, Hideki)

名古屋大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90371624

(2) 研究分担者

後藤 元信 (GOTO, Motonobu)

名古屋大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80170471