

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25709085

研究課題名(和文)藻類バイオマス自然エネルギー化に向けた株情報の数値集積化と必須単位操作の課題克服

研究課題名(英文)Development of unit operation with data accumulation of algal strains for future algal industries

研究代表者

大田 昌樹(OTA, MASAKI)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50455804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：藻類バイオマスが自然エネルギー産業として自立するためにはLife Cycle Assessment解析にて指摘される2つの技術課題(培養・抽出)の克服は不可欠である。特に重要度が高いのは、対象株に応じた合目的な培養技術や抽出法の開発にある。本研究では、緑藻*Chlorococcum littorale*などの藻類を対象として培養時の脂質生産の制御因子を追究するとともに、噴霧などを利用した簡便な抽出技術の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Photoautotrophic fatty acid production of a highly CO₂-tolerant green alga *Chlorococcum littorale* in the presence of inorganic carbon at 295 K and light intensity of 170 mmolphoton m⁻² s⁻¹ was investigated. CO₂ concentration in the bubbling gas was adjusted by mixing pure gas components of CO₂ and N₂ to avoid photorespiration and β-oxidation of fatty acids under O₂ surrounding conditions. Maximum content of total fatty acid showed pH dependence after nitrate depletion of the culture media and increased with the corresponding inorganic carbon ratio. Namely, [HCO₃²⁻]/([CO₂]_{in}[CO₂]₂₃) ratio in the culture media was found to be a controlling factor for photoautotrophic fatty acid production after the nitrate limitation. At a CO₂ concentration of 5% (vol/vol) and a pH of 6.7, the fatty acid content was 47.8 wt % (dry basis) at its maximum that is comparable with land plant seed oils. On the other hand, simple extraction methods were also developed in this work.

研究分野：化学工学

キーワード：藻類 バイオマス 抽出 超臨界流体 分離 光合成 油脂

1. 研究開始当初の背景

藻類バイオマスが自然エネルギー産業として自立するためには Life Cycle Assessment 解析にて指摘される2つの技術課題(培養・抽出)の克服は不可欠である。特に重要度が高いのは、対象株に応じた合目的な閉鎖系培養技術や抽出法の開発にある。今後を見据えた上では国産株を中心とした株情報の数値集積化も欠かせない。

このような背景のもと申請者らは、微細藻類の中でも優れた CO₂ 固定能を有する緑藻 *Chlorococcum littorale* (*C. littorale*) をモデルとして、二酸化炭素の脂質への高効率変換に関する検討を行ってきた。これまでの結果から、培地成分中 N 源充足下では良好な細胞増殖が見られ、N 欠乏下では増殖速度の低下と脂質の蓄積が確認されている。一方、通気 CO₂ 濃度の影響に関する検討では、低 CO₂ 濃度条件で増殖速度および脂質含有率の向上が観察された。ここで、CO₂ 濃度変化が誘引する培地 pH 変化が溶存 CO₂ の解離平衡を支配していることに着目し、CO₂ 解離種である HCO₃⁻ の CO₂ に対する存在比 (S_{CO_2}) を定義したところ、これら N 欠乏前後の現象を整理可能でありことが示唆され、さらに HCO₃⁻ が脂質生産の基質として作用している可能性も報告されている。しかしながら、 S_{CO_2} 値の制御は通気 CO₂ 濃度変化によるため間接的で、かつ検討範囲も限定的である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、CO₂ 解離平衡を培地 pH の調整により直接制御し、より広範囲での S_{CO_2} における増殖速度、脂質含有率の挙動を定量化し、脂質生産機構の全容解明を目指すことにした。これにより、培養過程での脂質生産における制御因子を明らかにするとともに、モデルを開発することで生産予測の可能性を検討した。なお、紙面の都合上、藻類からの抽出についての研究は投稿論文に纏めていることもあり、ここでは割愛する。

3. 研究の方法

培養実験には白色 LED 通気振とう恒温槽を用いた。人工海水培地 200 cm³ を導入した 300 cm³ フラスコに前培養サンプルを接種し、初期細胞濃度を 1.5 mg-dry weight/dm³ として、所定温度に制御した恒温槽内に設置した。実験条件は、温度 8~28℃、光強度 10~170 μmol m⁻² s⁻¹、振とう速度 120 rpm とし、通気ガスは流量 100 cm³/min (STP)、組成 CO₂:N₂=5:95 v/v とした。培地 pH の調整には NaOH を用い、pH 範囲は NaOH 無添加の pH6.0 から HCO₃⁻ の存在比が極大値を持つ pH7.5 とした。細胞濃度 X は分光光度計による濁度測定 (@750 nm) より決定し、増殖速度の指標として比増殖速度 $\mu = 1/X(dX/dt)$ を算出した。脂肪酸は、凍結乾燥した試料に 5wt.% HCl-EtOH 溶液を加えてエステル前処理し、GC 分析より定量した。脂肪酸含有率は、得ら

れた脂肪酸の総量を乾燥藻体重量で除した値と定義した。

4. 研究成果

実験条件は、温度 22℃、光強度 170 μmol m⁻² s⁻¹ とした。各 pH での細胞濃度の経時変化を Fig. 1 に示す。なお、pH は培養開始から終了まで、ほぼ変動がなかったため (±0.1)、培養開始時の値とした。得られた増殖曲線より N 充足下の μ を定量化し、増殖速度の S_{CO_2} 依存性を検討した。実験値と文献値 1 を Fig. 2 に示す。図中の破線は Monod 型の (1) 式による相関結果であり、フィッティングパラメータ K_S は 0.30、 μ_m は 0.120 h⁻¹ となった。実験値は (2) 式で定義される AAD = 9.0% 以内で相関可能であった。

続いて、培養終了時の試料の脂肪酸含有率を測定し、これを最大脂肪酸含有率 η_m と仮定して S_{CO_2} 依存性を検討した。結果を Fig. 3 に示す。図より、 S_{CO_2} の増加に伴う η_m の大幅な増加が確認され、特に $S_{CO_2}=12.8$ (pH 6.7) では、47.8 wt.% の脂肪酸を蓄積した。この現象については、 S_{CO_2} の増加が HCO₃⁻ を要求するアセチル CoA からマロニル CoA への合成反応の促進による可能性が考えられる。

一方で、 η_m は $S_{CO_2}=10$ 近傍で極大を示した後、減少した。何らかの要因で脂肪酸生産が阻害されたものと考え、基質の阻害作用を表現可能な Andrews 式 3 に S_{CO_2} を導入した脂肪酸生産モデル (3) 式を構築した。フィッティングパラメータは η_m, CO_2, K_S, K_i として相関を行った。結果を Fig. 3 の破線で示す。本モデルは実験値の傾向を AAD = 4.5% 以内で良好に再現した。以上、 S_{CO_2} により μ, η_m が整理でき、脂肪酸の効率的生産条件の推定が可能となった。

$$\mu = \mu_m \frac{S_{CO_2}}{K_S + S_{CO_2}} \quad (1) \text{式}$$

$$AAD = \frac{1}{N} \sum_i \left| \frac{x_{i,exp.} - x_{i,calc.}}{x_{i,exp.}} \right| \times 100 \quad (2) \text{式}$$

$$\eta_m = \eta_{m,CO_2} \frac{S_{CO_2}}{K_S + S_{CO_2} + \frac{S_{CO_2}^2}{K_i}} \quad (3) \text{式}$$

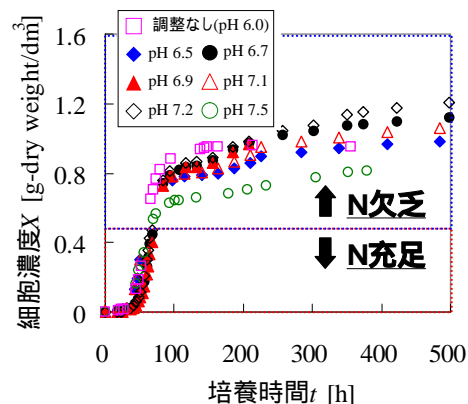


Fig.1 各 pH における細胞増殖曲線

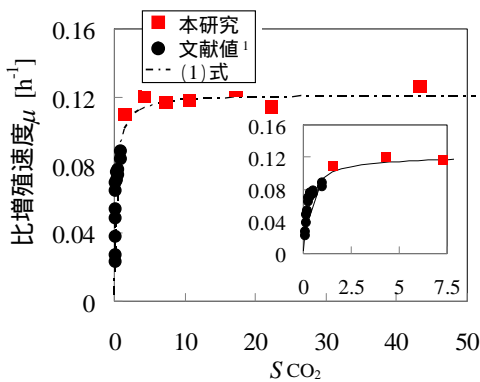


Fig.2 μ の S_{CO_2} 依存性とその拡大図

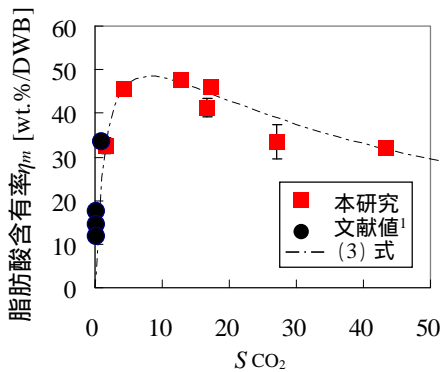


Fig.3 脂肪酸含有率の S_{CO_2} 依存性

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 5 件)

[1] M. Ota, M. Takenaka, Y. Sato, R. L. Smith, Jr., H. Inomata, Effects of light intensity and temperature on photoautotrophic growth of a green microalga, *Chlorococcum littorale*, *Biotechnology Reports*, 7, 24-29 (2015). 査読有

[2] M. Ota, M. Takenaka, Y. Sato, R. L. Smith, Jr., H. Inomata, Variation of photoautotrophic fatty acid production from a highly CO₂ tolerant alga, *Chlorococcum littorale*, with inorganic carbon over narrow ranges of pH, *Biotechnology Progress*, 31, 1053-1057 (2015). 査読有

[3] Y. Maeta, M. Ota, Y. Sato, H. Inomata, Measurements of vapor-liquid equilibrium in both binary carbon dioxide-ethanol and ternary carbon dioxide-ethanol-water systems with a newly developed flow-type apparatus, *Fluid Phase Equilibria*, 405, 96-100 (2015). 査読有

[4] 大田昌樹, 藻類由来バイオ燃料生産研究の最近の情勢, 公益社団法人化学工学学会化学工学, 79(9), 714 (2015). 招待

[5] 大田昌樹, 藻類バイオマスの利活用に向けての超臨界流体技術, 化学工学/特集企

画「超臨界流体研究開発の最前線」, 77(4), 248-251 (2013). 招待

[学会発表](計 10 件)

[1] T. M. Aida, T. Nonaka, S. Fukuda, M. Ota, I. Suzuki, M. M. Watanabe, H. Inomata, Hydrothermal treatment of municipal sludge for microalgae cultivation, The 5th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, San Diego, USA, June 7-10 (2015).

[2] T. M. Aida, R. Maruta, Y. Tanabe, Y. Kumagai, T. Nonaka, I. Suzuki, M. M. Watanabe, M. Ota, H. Inomata, R. L. Smith, Jr., Liquefaction of oil extracted microalgae using high temperature water, The 5th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, San Diego, USA, June 7-10 (2015).

[3] F. Hishinuma, M. Ota, I. Ushiki, Y. Sato, H. Inomata, Continuous hydrocarbon production from *Botryococcus braunii*, The 5th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, San Diego, USA, June 7-10 (2015).

[4] 菅原啓, 大田昌樹, 佐藤善之, 猪股宏, 天然物抽出エキス分離精製に向けた超臨界流体抽出法の適用性, 化学工学学会新潟大会 2014, 新潟大学, 2014 年 11 月 22 日

[5] 菱沼藤丸, 野中利之, 大田昌樹, 佐藤善之, 猪股宏, Extraction and analysis of lipid in *Botryococcus braunii*, 平成 25 年度化学系学協会東北大会及び日本化学会東北支部 70 周年記念国際会議, 国際センター(仙台), 2013 年 9 月 28 ~ 30 日

[6] 前田雄也, 大田昌樹, 佐藤善之, 瀧戸次郎, 大泉康, 猪股宏, Vapor-liquid equilibrium measurements for modeling of supercritical fluid rectification of natural components, 平成 25 年度化学系学協会東北大会及び日本化学会東北支部 70 周年記念国際会議, 国際センター(仙台), 2013 年 9 月 28 ~ 30 日

[7] 前田雄也, 大田昌樹, 佐藤善之, 瀧戸次郎, 大泉康, 猪股宏, 天然物含有機能性成分の超臨界流体精留の最適化に向けた気液平衡比測定, 第 13 回宮城懇話会先端研究発表会, 東北大学(仙台), 2013 年 9 月 6 日

[8] 濱邊友理, 大田昌樹, 佐藤善之, 猪股宏, 微細藻類の分離法としての超音波霧化に関する検討, 第 2 回藻類バイオマスプロセス開発研究会, 東北大学(仙台), 2013 年 8 月 2 日

[9] 菱沼藤丸, 野中利之, 大田昌樹, 佐藤善之, 猪股宏, 緑藻 *Botryococcus braunii* からのオイル生産に向けた抽出法の検討, 化学工学学会盛岡大会 2013 (3 支部合同大会), 岩手大学(盛岡), 2013 年 8 月 8 ~ 10 日

[10] 菱沼藤丸, 野中利之, 大田昌樹, 佐藤善之, 猪股宏, 緑藻 *Botryococcus braunii*

からの脂質生産に向けた抽出法に関する基礎的研究, 第2回藻類バイオマスプロセス開発研究会, 東北大学(仙台), 2013年8月2日

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 4 件)

取得状況欄に記述

取得状況(計 4 件)

名称: 微細藻類の培養方法および培養装置
発明者: 山田巧, 丸尾容子, 猪股宏, **大田昌樹**

権利者: 東北大学および日本電信電話株式会社

種類: 特開
番号: 2014-223024
取得年月日: 2013年
国内外の別: 国内

名称: バイオマス発電システム
発明者: 丸尾容子, 山田巧, 猪股宏, **大田昌樹**

権利者: 東北大学および日本電信電話株式会社

種類: 特開
番号: 2014-224616
取得年月日: 2013年
国内外の別: 国内

名称: 微細藻類濃度決定方法および装置
発明者: 山田巧, 小野陽子, 猪股宏, **大田昌樹**

権利者: 東北大学および日本電信電話株式会社

種類: 特開
番号: 2013-188157
取得年月日: 2013年
国内外の別: 国内

名称: 微細藻類成分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: 東北大学および日本電信電話株式会社

種類: 特開
番号: 2013-213783
取得年月日: 2013年
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

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 なし

(3) 連携研究者 なし