

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：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14272

研究課題名(和文) 藻類バイオマス由来油脂類生産を活性化させる新規ユニットオペレーションの開発

研究課題名(英文) Development of new unit operation for microalgal lipid production

研究代表者

大田 昌樹 (Masaki, Ota)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：50455804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：藻類は、その高いオイル生産速度から次世代型バイオマスとして期待されている。その中でも緑藻*Botryococcus braunii*は、炭化水素系オイルを細胞外に分泌生産し、コロニー内にそのオイルを貯蓄する株として知られている。本研究では、この培養液をスラリーポンプにて送液し、キャピラリーノズルを通すことでコロニーを破砕しながらオイルを湿式で連続抽出する方法論について検討した。具体的には、コロニー破砕によるオイルの抽出率を操作条件に対応した無次元数を用いて整理できた。この結果を受けて、牛の搾乳のように、分泌生産されたオイルを湿式連続抽出生産し、生細胞は再培養するミルクング培養法の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：*Botryococcus braunii*, BOT-22 can be a producer of hydrocarbon which is secreted naturally from the body. It can be useful that the only hydrocarbon can be recovered by some extraction methods with no damage to the living cell, leading to a hydrocarbon production with continuous cultivation. We assessed the "milking" method for a non-destructive hydrocarbon extraction according to literature. The content of hydrocarbon of the strain was from 30 to 50 wt% -dry cells depending on the cultivation phase. In the experiments, colony-destruction treatment was conducted by flowing culture media through capillary nozzle. A heptane extraction solvent was used and rapidly contacted to culture media. Then, this system was used for extracting the oil. The extracts recovered by heptane was analysed by GC-FID. The results showed that the mixing and extraction time are very important for "the milking" and the developed method can be applied for milking cultures.

研究分野：化学工学

キーワード：藻類 オイル 油脂 脂質 二酸化炭素 バイオマス コロニー 炭化水素

1. 研究開始当初の背景

申請者らのグループでは、微細藻類の中でも重油相当の炭化水素をオイル主成分として産生する緑藻 *Botryococcus braunii* (*B. braunii*) を対象として、効率的オイル生産に向けたオイル抽出法の検討を行っている。*B. braunii* は細胞集合体コロニー内の細胞外マトリックスに炭化水素を蓄積し、細胞内にオイルを蓄積する一般的な微細藻類とは大きく異なる特徴を有している。この性質を利用して、細胞が生存する条件でコロニーを解砕し、オイルをコロニー外へ滲出させた後に湿式抽出するプロセスが提案されている。本プロセスでは、培養液中の藻体の乾燥および脱水工程を省略できる上、抽出後の培養液を再培養して藻体を再利用（ミルクィング）することが可能である。既往の研究では、回分式ビーズミル+回分式湿式抽出によるコロニー解砕、オイル抽出およびミルクィングに成功しているが、連続プロセスやスケールアップに課題が残っている。

2. 研究の目的

本研究では、これら課題の克服のため、ミルクィングに向けたコロニー解砕・湿式抽出工程の連続化を検討した。

3. 研究の方法

試料は筑波大学より分譲された *B. braunii* BOT-22 株（細胞濃度 0.680 g-dry algae/L, オイル含有率 0.189 g/g-dry algae, 粘度 1.63 mPa s, 密度 999 kg/m³）を用いた。コロニー径は一般的に 50 μm 程度であることから、内径 175 μm, 長さ 3 cm のキャピラリーチューブに培養液を 5 ~ 120 mL/min で流通させた際の剪断応力を利用してコロニーを解砕した。尚、コロニー解砕の評価はフロー式粒子像分析装置（測定範囲 0.5 ~ 200 μm）によってコロニー解砕前後の藻体 10000 個体の円相当径を測定するほか、培養液に対して *n*-ヘプタンを体積基準で 5 倍量添加し、20 min, 300 rpm にて回分抽出した後に GC-FID 分析によりオイルを定量することで行った。その際、オイル成分は *B. braunii* BOT-22 株の代表的な産生物である炭化水素 C₃₄H₅₈ とし、式(1)で定義されるオイル回収率を用いてコロニー外に滲出したオイルの抽出を評価した。また、式(1)中の Content [g/g-dry algae] は予め凍結乾燥を行った試料から全量抽出したオイル量を用いて算出した。

$$\text{Oil yield [\%]} = \frac{\text{Extract [g/g-dry algae]}}{\text{Content [g/g-dry algae]}} \times 100 \quad (1)$$

また、オイル抽出挙動を追跡するため、十分量のオイルがコロニー外に滲出される条件（キャピラリーチューブに 120 mL/min で流通）で予めコロニー解砕処理した培養液と *n*-ヘプタンを 1:5 ~ 5:1 [v/v]

（総流量 60 mL/min）で送液・合流させた（Fig. 3, 合流部の内径 0.8 mm, 長さ 1 m, 滞在時間 0.5 s）。その後、*n*-ヘプタン層を回収し、GC-FID 分析によってオイルを定量した。

4. 研究成果

Fig. 1 に用いた実験装置図を、Fig. 2 にキャピラリーチューブ内の Reynolds 数と平均円相当径比およびオイル回収率の関係を示す。高 Reynolds 数領域では藻体の平均円相当径が減少し、未処理試料と比較してオイル回収率が著しく向上した。これは藻体に作用する剪断応力が増大し、コロニーが解砕されることでコロニーに内包されていたオイルが滲出される現象を支持するものである。以上より、本法が連続式コロニー解砕法として有用であることが示された。

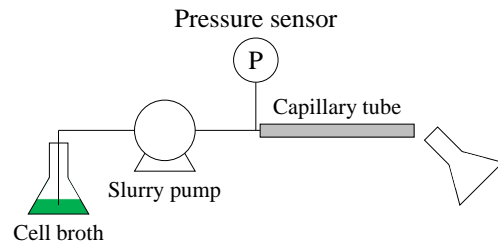


Fig. 1 連続式コロニー解砕装置

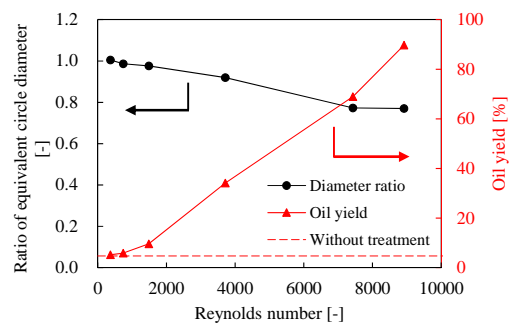


Fig. 2 Reynolds 数と平均円相当径比（処理後/処理前）およびオイル回収率の関係（処理前試料の平均円相当径 13.5 μm, Content : 0.189 g/g-dry algae）

続いて Fig. 3 に示す連続式湿式抽出実験では、*n*-ヘプタン使用量の低減に伴い、溶媒比 1:1 [v/v] 以上では *n*-ヘプタン層と培養液層の二層の他に中間フラッフ層が形成された。Fig. 4 に溶媒比とオイル回収率および *n*-ヘプタン層中オイル濃度の関係を示す。*n*-ヘプタンの使用量低減に伴い、オイル回収率は減少した。また、オイルが *n*-ヘプタンに対して相溶であり、全溶媒比においてオイル回収率が溶媒比 1:5 [v/v] の値である 82 % で一定だと仮定して計算したオイル濃度と比較して、オイル濃度の実験値は溶媒比 1:1 [v/v] から約半分の値を示した。ここで *B. braunii* が産生した細胞外多

糖は、高濃度条件下でオイルを内包したエマルションを形成すると報告されている。本実験において溶媒比 1:1 [v/v]以上でフラッフ層が生じたことから、コロニー解砕によりコロニー外に滲出したオイルが *n*-ヘプタン層とフラッフ層に分配したことでオイル回収率は減少し、オイルは *n*-ヘプタンの使用量低減によって濃縮されながらもオイル濃度は予測値より下回ったと考えられる。ミルキング時には上層と下層を分液することから、フラッフ層が生じず、かつオイルがより濃縮されている溶媒比 1:2 [v/v]が至適条件と考える。

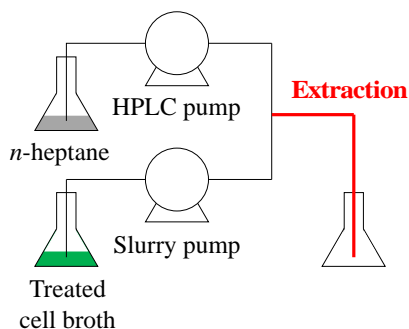


Fig. 3 連続式湿式抽出装置

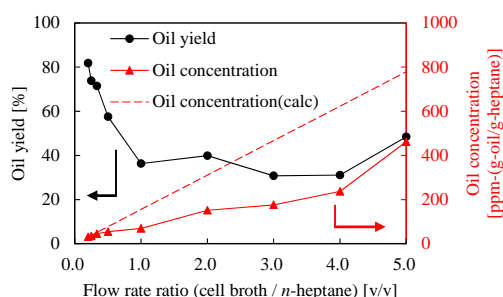


Fig. 4 溶媒比とオイル回収率および *n*-ヘプタン層中オイル濃度の関係 (Content : 0.189 g/g-dry algae, オイル濃度計算値はフラッフ層にオイルが分配せず、回収率 82% で一定として算出)

次に、コロニー解砕・湿式抽出の各々が細胞増殖に及ぼす影響を評価するため、コロニー解砕単独処理、コロニー解砕+湿式抽出後に再培養した。Fig. 5 にコロニー解砕単独処理、Fig. 6 にコロニー解砕+湿式抽出後の再培養結果を示す。コロニー解砕処理は細胞増殖に殆ど影響を及ぼさない一方、 $Re > 4000$ (流量 100 mL/min 以上) のコロニー解砕後の湿式抽出は細胞増殖に影響を及ぼした。以上より、ミルキングを志向したコロニー解砕処理条件は $Re < 4000$ (流量 50 mL/min 以下) が望ましいことが判明した。

以上の結果より、本法で提案した湿式抽出法の妥当性が示唆されるとともに、将来的な観点でのミルキング培養法の可能性が示唆された。

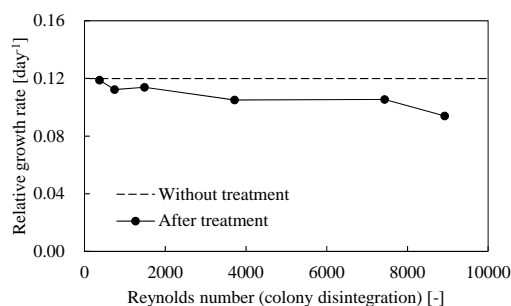


Fig. 5 コロニー解砕処理後の再培養

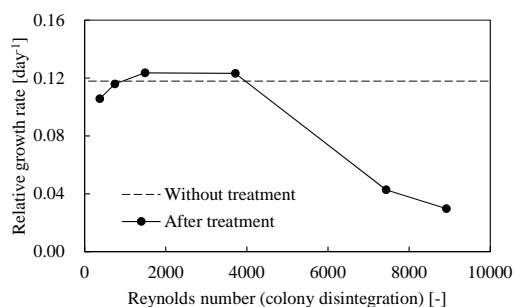


Fig. 6 コロニー解砕+湿式抽出後の再培養

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 1 件)

[1] 菅原啓, 大田昌樹, 佐藤善之, 猪股宏, 藻類由来バイオ燃料の精製に向けた減圧蒸留の検討, 化学工学論文集, 42(2), 42-47 (2016). [査読有]

〔学会発表〕(計 3 件)

[1] 大田昌樹, [招待講演] 今後の取り組みについて, 第 4 回仙台市民フォーラム, 東北大学(仙台), 2017 年 3 月 23 日.

[2] 濱野裕一郎, 平賀佑也, 大田昌樹, 佐藤善之, 猪股宏, 微細藻類 *Botryococcus braunii* が産生する炭化水素の連続抽出に関する検討, 化学工学会第 82 年会 P141, 芝浦工業大学(東京), 2017 年 3 月 6 日

[3] 濱野裕一郎, 平賀佑也, 大田昌樹, 佐藤善之, 猪股宏, *Botryococcus braunii* の藻体循環利用プロセスに向けたコロニー連続解砕法の検討, 第 8 回藻類バイオマスプロセス開発研究発表会 A7, 筑波大学(つくば), 2016 年 8 月 8 日. (優秀発表賞受賞)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ()