

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19163

研究課題名（和文）自己生産炭化水素を抽出溶媒とする微細藻ミルクングによる革新的バイオオイル生産

研究課題名（英文）Continuous hydrocarbon extraction from microalgae by non-toxic solvent

研究代表者

芋生 憲司（Imou, Kenji）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：40184832

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：一般的なオイル生産性微細藻は、細胞内に油脂や脂肪酸といったオイルを蓄積するが、緑藻*Botryococcus braunii*は、他と異なり細胞同士をつなぐ細胞間高次構造に重油相当の炭化水素を蓄積する。そのため、細胞を非破壊のままオイルを抽出し、再培養するミルクングという手法が検討されているが、一般的な有機溶媒では毒性があり、細胞活性が低下する。本研究では、抽出効率を上昇させるため、溶媒の細胞間構造への侵入を阻害するコロニー外周の繊維構造の生産を低減させる手法を既存品種以外にも適用可能なことを明らかにした。また、これまでとは異なる非毒性有機溶媒を用いて光合成活性を低下させずに、炭化水素を抽出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微細藻類は陸上植物よりもオイル生産性が高いため、航空燃料やトラクタ等のバイオ燃料代替の資源として期待されている。しかし、その培養～回収～オイル抽出の工程で、多くのエネルギーや資源が投入されるため、生産プロセスでのGHG排出量削減が求められている。本研究の手法は、微細藻を殺さずに再培養してオイルを再生産させる新たな手法について行ったものであり、培養工程での生産性向上ならびに投入エネルギー削減に大きく貢献が期待されるものである。

研究成果の概要（英文）：While general oil-producing microalgae accumulate oils such as fats and fatty acids in their cells, *Botryococcus braunii* differs from others in that it accumulates hydrocarbons equivalent to heavy oil in extra-cellular matrix. A method called "milking," in which the oil is extracted without killing the cells and then re-cultured, has been considered, but it is toxic in common organic solvents and reduces cellular activity. In this study, we found that the method of reducing the production of fiber structures around the colony periphery, which inhibit solvent entry into the extracellular structures, can be applied to other than existing varieties in order to increase extraction efficiency. In addition, hydrocarbons were extracted without reducing photosynthetic activity using a different non-toxic organic solvent.

研究分野：バイオマスエネルギー工学

キーワード：微細藻類 炭化水素 抽出 オイル バイオ燃料

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオ燃料生産のための生物資源として期待されている群体性微細緑藻 *Botryococcus braunii* (以下、*B. braunii*) は、細胞分裂過程で生産した炭化水素を、乾燥藻体重量の 30-50% の割合で細胞間構造体に蓄積する。しかし、ノルマルヘキサン等の抽出溶媒分離のための蒸留操作に要する投入エネルギーが大きいこと及び増殖が他藻種と比較して遅いことが課題となっている。

これまで、研究代表者らは、*B. braunii* からの炭化水素生産の研究開発を行う中で、他藻種と比較して本藻種は、収穫(濃縮)が容易、細胞破碎を経ずに溶媒抽出可能、バイオ燃料化のためのクラッキング(低分子化)が容易というメリットをもつことがわかった。一方で、プロセス評価を行い、増殖速度及び抽出溶媒分離時の蒸留操作の改善がプロセスの投入エネルギー低減に大きな影響を与えることを明らかにした。

その中で、効率的に炭化水素を回収できる前述の塩添加培養を開発し、溶媒接触時間の低減が可能となった。また、botryococcene の流動パラフィン代替可能性を検討した際に、酸化防止および安定化のために水素添加を行い、水素添加油 (botryococcane) は粘度が低下することが明らかとなった。これらの研究活動を通じて、この塩添加培養法および本藻種が生産する炭化水素の水素添加油を抽出溶媒として用いれば、細胞を死滅させることなく細胞外に蓄積された炭化水素のみを回収して再培養させるミルクキングと呼ばれるプロセスにおいて、生存率が格段と向上すると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、上記課題を解決するために、まず *B. braunii* への塩添加培地や低温水処理等での非破壊炭化水素抽出率向上効果を解明する。また、自身が生産した炭化水素の水素添加油に近い溶媒を超低毒性の抽出溶媒として利用することで、細胞を死滅させることなく細胞外に蓄積された炭化水素のみを回収して再培養させるミルクキングプロセスを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

A 品種における塩添加培養効果

B. braunii の A 品種 (Yamanaka 株) を、一般的に用いられる淡水性 Chu13 培地に異なる量の塩を加えた塩添加培地で 40 日間 (20 日で継代) 培養した。藻体濃度に関しては、吸引ろ過で GF/A 上に残存した藻体を 105 °C 24h 法で、炭化水素量は、凍結乾燥させた藻体から n-hexane にて完全抽出したものを GC-FID にて測定した。

低温水処理での炭化水素抽出

B. braunii の B 品種 (Showa 株) を 70 °C、60 分の温水で、温度を保ったままナイロンメッシュでろ過し、温水中への溶解物を除去した藻体から n-hexane にて炭化水素抽出を行い、溶媒への炭化水素移行率 (炭化水素抽出率) を同様に GC-FID で測定した。

4. 研究成果

これまで、*B. braunii* の B 品種で一般的に用いられる淡水性 Chu13 培地に微量の塩を加えた塩添加培地 (SM) が、コロニー外周部のガラクトースおよびアラビノースを主構成糖とする多糖類繊維構造の生産を抑制することが明らかとなっていた。一方で、B 品種と全く異なる生合成メカニズムで炭化水素を生産する A race においても、この繊維構造が観察されると共に、同様に塩添加培地で、繊維構造の生産が低減されることが明らかになる (図 1) と共に、細胞間高次構造中に含まれる炭化水素と有機溶媒の接触が改善され、抽出効率が大きく向上されることが明らかとなった。増殖が低減されない塩濃度でも明確な抽出率向上ならびに繊維構造の生産低減が確認された。

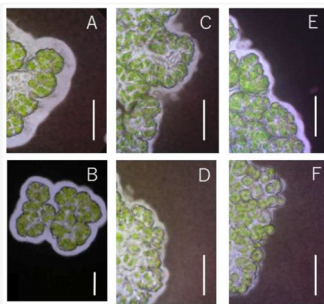


図 2. Yamanaka 株の光学顕微鏡像。(A, B)は Chu13、(C)は 4 日目の 0.4%SM、(D)は 20 日目の 0.4%SM、(E)は 4 日目の 0.6%SM、(F)は 20 日目の 0.6%SM。スケールバーは 20 μ m を表す。

これまで、B 品種 Showa 株では、85 以上の加熱処理によって、繊維構造を構成する多糖類が水相に溶出され、抽出効率が上がるということが明らかとなっている。この繊維構造を構成する多糖類はゲル・ゾル転移することが知られている。85 は不可逆相転移点と考え、より低温でも温水洗浄することで繊維構造を洗い流せるのではないかと考えた。70、60 の温水で温水洗浄を繰り返した結果、60 では、9 回の洗浄においても炭化水素抽出率は 10%を超えなかったが、70 では 90%以上の抽出効率が得られた。温水洗浄を行うことで、これまで知られていた加熱温度（不可逆相転移点）よりも低温で効率的に炭化水素抽出可能であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 1件）

1. 著者名 Furuhashi Kenichi, Magota Akinari, Liu Yifan, Hasegawa Fumio, Okada Shigeru, Kaizu Yutaka, Imou Kenji	4. 巻 2
2. 論文標題 Thinning of <i>Botryococcus braunii</i> Colony Sheath by Pretreatment Enhances Solvent-Based Hydrocarbon Recovery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phycology	6. 最初と最後の頁 363 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/phycolgy2040020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 FURUHASHI Kenichi, HASEGAWA Fumio, TANAKA Akihiro, KURODA Kazutaka, FUKUJU Naoki, KAIZU Yutaka, IMOU Kenji	4. 巻 101
2. 論文標題 Production and Application of High-nitrogen Compost Extract as Liquid Fertilizer for Leafy Vegetable and Microalgae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Japan Institute of Energy	6. 最初と最後の頁 218 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3775/jie.101.218	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 Miura Ryoji, Furuhashi Kenichi, Hasegawa Fumio, Kaizu Yutaka, Imou Kenji	4. 巻 34
2. 論文標題 Calcium carbonate prevents <i>Botryococcus braunii</i> growth inhibition caused by medium acidification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Phycology	6. 最初と最後の頁 177 ~ 183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10811-021-02622-w	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮崎貴也, 古橋賢一, 海津裕, 芋生憲司
2. 発表標題 微細藻類 <i>Botryococcus braunii</i> における細胞非破壊炭化水素抽出の可能性
3. 学会等名 農業環境工学関連学会 2023 年合同大会
4. 発表年 2023年 ~ 2024年

1. 発表者名 本山夏子, 古橋賢一, 長谷川文生, 海津裕, 芋生憲司
2. 発表標題 微細藻による堆肥由来アンモニアの回収および資化
3. 学会等名 第 80 回農業食料工学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenichi Furuhashi, Fumio Hasegawa, Yutaka Kaizu, Kenji Imou
2. 発表標題 Effects of pretreatments on the surface structure and energy balance in hydrocarbon extraction from the green microalga Botryococcus braunii
3. 学会等名 The XX CIGR World Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片岡直也, 古橋賢一, 長谷川文生, 海津裕, 芋生憲司
2. 発表標題 コロナサイズが微細藻同士の相互遮蔽に与える影響の評価
3. 学会等名 日本エネルギー学会 第18回 バイオマス科学会議
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	古橋 賢一 (Furuhashi Kenichi) (10779739)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教 (12601)	

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
---------	---------