

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292132

研究課題名(和文) 微細緑藻ボツリオコッカスの海水培養による炭化水素生産システムの開発

研究課題名(英文) Development of hydrocarbon production system from micro green alga *Botryococcus braunii* cultured in seawater medium

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・教授

研究者番号：40184832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炭化水素を生産する微細藻*Botryococcus braunii* (*B. braunii*)を海水添加培地で培養することにより、効率的な炭化水素生産プロセスを開発することを目的とした。海水を添加した培地で培養した*B. braunii*は炭化水素回収性が向上し、コロニーが大型化した。その結果、これまで検討されてきた炭化水素生産プロセスと比較して、藻体の収穫・濃縮工程、藻体からの炭化水素回収工程での消費エネルギーが削減され、エネルギー収支が向上することが確認された。

研究成果の概要(英文)：Hydrocarbon production process from *Botryococcus braunii* (*B. braunii*) cultured in seawater medium was developed in this study. Seawater culture improved hydrocarbon extractability of *B. braunii* slurry by non-polar solvent, such as hexane, and increase the size of the colony. These effects could save the energy consumption in collection and concentration of *B. braunii* and hydrocarbon extraction from the concentrated slurry, and could improve total energy balance of hydrocarbon production from *B. braunii*.

研究分野：農業工学

キーワード：再生可能エネルギー 微細藻類 バイオ燃料

1. 研究開始当初の背景

微細藻類はリグノセルロース系バイオマスとともに次世代バイオ燃料資源として期待されている。中でも *Botryococcus braunii* (以下、*B. braunii*) は乾燥藻体重量の 30~50% の炭化水素を生産する。また、多くの脂質生産微細藻類が細胞内に脂質を蓄積するのに対して、*B. braunii* は炭化水素を細胞外に分泌して、コロニーを形成する細胞間マトリックスに蓄積させる。*B. braunii* は細胞破碎の必要がないことから、脂質の回収が容易であり、バイオ燃料の原料の一つとして有望視されている。しかし、圧搾等の物理的方法では炭化水素を回収することはできない。これは炭化水素蓄積の場である細胞間マトリックスが、親油性のバイオポリマーから構築されており、炭化水素との親和性が高いことと同時に、バイオポリマー自体が非常に弾性に富み、圧搾時に緩衝作用を有しているためである。*B. braunii* から炭化水素を回収する方法としては、まず藻体を乾燥させた後、ヘキサン等の低極性有機溶媒で抽出する方法が知られている。この方法によって細胞間マトリックスに蓄積されているほとんどの炭化水素を回収することができる。しかし乾燥プロセスには非常に多くのエネルギーが必要であり、乾燥プロセスの省略はバイオ燃料生産の実用化をはかる上で解決しなければならない大きな課題である。

これまでに筆者らは *B. braunii* の藻体スラリーを 100 以下で加熱前処理し、ヘキサンで溶媒抽出することで、乾燥工程を経ることなく効率的に炭化水素を回収できることを見出した。これにより *B. braunii* からの炭化水素回収に必要なエネルギーを大幅に削減することが可能であることを明らかにした。また、筆者らは海水を添加し浸透圧を高めた培地 (以下、希釈海水培地) を用いて *B. braunii* B 品種 Showa 株を培養することで乾燥や加熱などの前処理を経ることなく、藻体にヘキサンを直接混合するだけで効率的に炭化水素を回収できることを発見した。しかし、炭化水素回収性が向上する一方、希釈海水培地で培養することで増殖速度が低下する課題も明らかとなった。

2. 研究の目的

前述したように希釈海水培地での培養では、炭化水素回収性は向上するが、増殖速度が低下するという課題が明らかになった。また、希釈海水培地での培養により、*B. braunii* 藻体コロニーの大型化や浮上性の向上が確認された。そのため、これまで検討されてきた藻体の回収方法と比較して、より簡便な手法での藻体回収が可能となると考えられる。そこで本研究では、以下の3点を目的とした。(1) 海水濃度が *B. braunii* の増殖速度・炭化水素回収性に与える影響の解明

(2) 放射線突然変異法による耐塩性 *B. braunii* の育種

(3) 海水培養藻体に適した炭化水素生産プロセスの検討

(4) 水温の日変化が *B. braunii* 増殖に与える影響の評価

3. 研究の方法

(1) 海水濃度が *B. braunii* の増殖・炭化水素回収性に与える影響の解明

人工海水を、塩濃度 0.7%、0.5%、0.3% となるよう純水で希釈し、藻体増殖に必要な成分の内、人工海水に含まれていない栄養塩類、微量元素に関しては、*B. braunii* の培養に用いられること多い改変 Chu13 培地と同濃度となるように添加した培地 (以下、希釈海水培地) を作成した。これらの培地を用い *B. braunii* B 品種 Showa 株の培養を行い、炭化水素回収率・藻体濃度を測定する。

さらに海水培養による炭化水素回収性の向上が Showa 株だけでなく他の *B. braunii* の品種や株にも適用可能か明らかにするために、他品種や他株に対しての培養試験も行った。

(2) 放射線突然変異法による耐塩性 *B. braunii* の育種

農研機構・次世代作物開発研究センター・放射線育種場の ルームで 線の照射を行い、1.8% 塩濃度 (海水の半分の濃度) の希釈海水培地で培養し、高耐塩性の藻体の選抜を行った。

(3) 海水培養藻体に適した炭化水素生産プロセスの検討

藻体の回収法として、重力式濾過法を検討した。また、濃度の異なる藻体スラリーからの炭化水素抽出性を検証した。

これらの結果をもとに、培養・収穫・輸送・脱水、炭化水素抽出回収から構成される *B. braunii* の海水培養による炭化水素生産システムのエネルギー収支を算出し、従来システムと比較した。

(4) 水温の日変化が *B. braunii* 増殖に与える影響の評価

屋外培養の結果、日射の豊富な昼間では水温が 35 を越えることがあることが確認された。本研究で主として用いている Showa 株は水温 35 では増殖が止まることが知られている。一方、屋外の培養では夜間の水温の低下も期待できる。そこで、昼夜の水温の日変化を考慮し、明期と暗期の温度を変化させ培養を行い、昼間の高温の *B. braunii* 増殖に与える影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 海水濃度が *B. braunii* の増殖・炭化水素回収性に与える影響の解明

改変 Chu13 培地（一般的に *B. braunii* の培養に使用される淡水培地）および、海水塩濃度を調整することにより浸透圧を変えた 3 種の塩濃度（0.3%、0.5%、0.7%）の希釈海水培地（以下 0.3%SM、0.5%SM、0.7%SM と表す）で *B. braunii* B 品種 Showa 株を培養し、藻体増殖速度、炭化水素含有率および炭化水素回収率を評価した。藻体濃度（乾燥重量）の経時変化を図 1 に、炭化水素回収率の経時変化を図 2 に示す。炭化水素含有率は、改変 Chu13 培地、0.3%SM、0.5%SM、0.7%SM でそれぞれ、35.4%、37.5%、37.9%、39.3% であった。海水塩濃度が上がる（浸透圧が大きくなる）につれて、藻体の増殖速度は下がり、炭化水素含有率、炭化水素回収率が上がることが確認された。また、改変 Chu13 培地と同等の増殖速度であった 0.3%SM で培養した藻体では、濃縮しない状態での 1 分間の抽出では炭化水素回収率は最大でも 25%程度であったが、水分 60%の状態まで濃縮することにより 2 時間の抽出で 90%以上の炭化水素を回収可能であることを確認した。

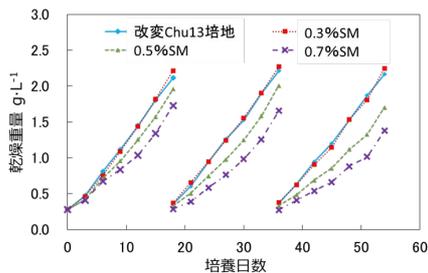


図 1 異なる海水濃度で培養した *B. braunii* 藻体濃度（乾燥重量）の経時変化

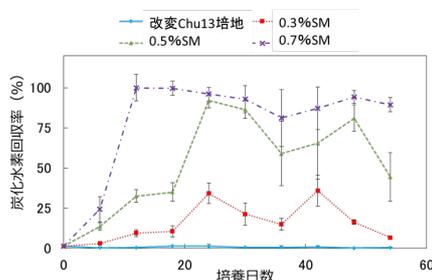


図 2 異なる海水濃度で培養した *B. braunii* 藻体の炭化水素回収率

前述した 4 種の培地（改変 Chu13 培地、0.3% SM、0.5% SM、0.7% SM）で培養した *B. braunii* のコロニー径を表 5 に示す。海水塩濃度が上がる（浸透圧が高くなる）と、コ

ロニーサイズが大きくなることが確認された。また、コロニー径は培養期間に比例して増大することも確認された。

表 1 異なる海水塩濃度で培養した *B. braunii* 藻体のコロニー径

	コロニー径 (μm)		
	d10%	d50%	d90%
Chu13 培地	46.8	63.3	92.9
0.3%SM	122.4	210.6	304.2
0.5%SM	213.7	279.7	383.0
0.7%SM	209.9	277.7	377.6

改変 Chu13 培地、0.7%SM で培養した *B. braunii* 藻体を電子顕微鏡で観察した。0.7%SM で培養した藻体ではコロニーを覆うように存在する繊維層が観察されなかった。また、加熱処理によりヘキサンの炭化水素の回収が可能となった藻体でも同様にこの繊維層は確認されなかった。これらの結果から、この繊維層の存在がヘキサンによる炭化水素回収を妨げているものと考えられた。そして、希釈海水培地での培養では、ヘキサン等の無極性溶剤のコロニー内部への侵入を妨害する繊維層の形成が抑制され、加熱乾燥との処理を経ることなく無極性溶剤で炭化水素の抽出が可能となったと解される。

希釈海水培養の炭化水素回収率向上やコロニー大型化の効果は、A 品種 Yamanaka 株、B 品種 Sanshiro5 株でも確認された。Yamanaka 株は Showa 株に比べて低い海水塩濃度で炭化水素回収率の向上やコロニーの大型化が見られたが、海水塩濃度が 0.3%を越えると著しく増殖速度が低下した。一方、Sanshiro5 株では希釈培養によるコロニーの大型化が Showa 株に比べ強く表れた。

(2) 放射線突然変異法による耐塩性 *B. braunii* の育種

藻体濃度 1g/L 程度の *B. braunii* B 品種 Showa 株培養液をガラス製の培養瓶に入れ、エアレーションした状態で、線を照射した後、海水塩濃度 1.8%となるように培養液を調製し、耐塩性株の取得を目指した。しかし、耐塩性のない藻体が死滅し、培養液を白濁させ耐塩性の変異株の取得には至らなかった。死滅した藻体による白濁により耐塩性株の増殖にも影響が及んだ可能性があるため、より選抜を確実にする方法として、寒天培地に播種した *B. braunii* 単細胞に線を照射する手法を構築した。しかし、研究期間内に目的とする形質を持つ変異株を取得することはできなかった。

線を照射した試料から、コロニーが大型化した変異株 1 種を取得した。この変異株は野生株 (*B. braunii* B 品種 Showa 株) と比べ、コロニー径が 2 倍程度まで大型化していた。この結果から、線照射による優良変異株の取得の可能性が確認された。

(3) 海水培養藻体に適した炭化水素生産プロセスの検討

改変 Chu13 培地と 0.3%SM で培養した *B.braunii* 藻体で、図 3 に示す金属製ワイヤースクリーンを用いた重力式ろ過装置による回収試験を行った。改変 Chu13 培地で培養した藻体は、重力式ろ過装置では効率的に回収することができなかった。0.3%SM で培養した藻体は表 1 に示したようにコロニー径が大きくなるため、ろ過装置のスクリーンのスリット間隔 100 μm で、藻体回収率 90% 以上で回収可能であった。また、この時の回収藻体の含水率は 83% であり、高効率で回収できていることが確認された。

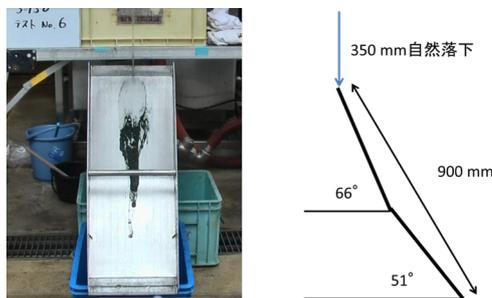


図 3 金属製ワイヤースクリーンを用いた重力式ろ過装置（左）と *B.braunii* 藻体回収試験の概要（右）

B.braunii を利用した炭化水素生産は、培養、収穫・輸送・脱水、炭化水素抽出（加熱・乾燥等の抽出前処理、抽出溶媒分離を含む）で構成される。本研究では、炭化水素抽出前処理として 90 程度の加熱処理を行う加熱プロセス、炭化水素抽出前に乾燥させる乾燥プロセス、希釈海水培地で培養し炭化水素抽出前処理を行わない希釈海水培養プロセスの 3 つの炭化水素生産プロセスのエネルギー収支を比較した。結果を図 4 に示す。希釈海水培養技術の導入により、炭化水素生産のエネルギー収支が向上することが確認された。特に、収穫・輸送・脱水工程では 80% のエネルギー削減となった。

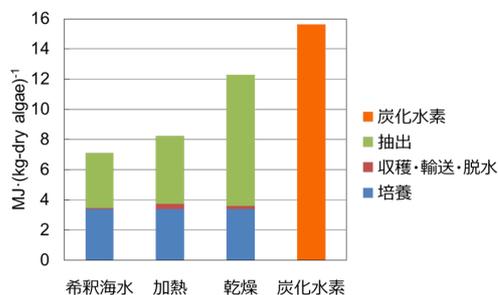


図 4 炭化水素生産プロセスのエネルギー収支

(4) 水温の日変化が *B.braunii* 増殖に与える影響の評価

28 一定、明期 35 暗期 28、明期 28 暗期 35、35 一定の 4 条件で培養試験を行った。35 一定の温度条件では藻体の白化が観察され、増殖しなかった。自然環境における昼夜の温度変化を考慮した明期 35 暗期 28 の温度環境では *B.braunii* B 品種 Showa 株が増殖することを確認した。さらに、明期 28 暗期 35 でも問題なく増殖した。これらの結果は、35 では *B.braunii* の生育に必要な物質の一部が生産されないが、水温低下時にそれらの物質が生産されれば、35 での生育に大きな影響はないことを示唆している。

< 引用文献 >

Kita, K., Okada, S., Sekino, H., Imou, K., Yokoyama, S., Amano: Thermal Pre-treatment of Wet Microalgae Harvest for Efficient Hydrocarbon Recovery, *Applied Energy*, 87(7), 2010, 2420-2423

Furuhashi, K., Saga, K., Okada, S., Imou, K.: Seawater-cultured *Botryococcus braunii* for efficient hydrocarbon extraction, *PLoS ONE* 8(6), 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Furuhashi, K., Hasegawa, F., Saga, K., Kudou, S., Okada, S., Kaizu, Y., Imou, K., “Effects of culture medium salinity on the hydrocarbon extractability, growth and morphology of *Botryococcus braunii*”, 査読有、*Biomass and Bioenergy*, 91, 2016, 83-90

DOI:10.1016/j.biombioe.2016.05.007

Furuhashi, K., Noguchi, T., Okada, S., Hasegawa, F., Kaizu, Y., Imou, K., “The surface structure of *Botryococcus braunii* colony prevents the entry of extraction solvents into the colony interior”, 査読有、*Algal Research*, 16, 2016, 160-166

DOI:10.1016/j.algal.2016.02.021

Atobe, S., Saga, K., Hasegawa, F., Furuhashi, K., Tashiro, Y., Suzuki, Y., Okada, S., Imou, K., “Effect of amphiphilic polysaccharides released from *Botryococcus braunii* Showa strain on hydrocarbon recovery”, 査読有、*Algal Research*, 10, 2015, 172-176

DOI:10.1016/j.algal.2015.05.007

Atobe, S., Saga, K., Hasegawa, F., Magota, A., Furuhashi, K., Okada, S., Imou,

K., "The effect of the water-soluble polymer from *Botryococcus braunii* Showa strain on solvent extraction of hydrocarbons", 査読有, Journal of Applied Phycology, 27, 2015, 755-761
DOI 10.1007/s 10811-014-0363-x

Saga, K., Hasegawa, F., Miyagi, S., Atobe, S., Okada, S., Imou, K., Osaka, N., Yamagishi, T., "Comparative Evaluation of Wet and Dry Processes for Recovering Hydrocarbon from *Botryococcus braunii*", 査読有, Applied Energy, 141, 2015, 90-95
DOI 10.1016/j.apenergy.2014.12.018

〔学会発表〕(計5件)

山本悠策、古橋賢一、長谷川文生、海津裕、芋生憲司、「温度の日変化が *Botryococcus braunii* の増殖に与える影響」、農業食料工学会第75回年次大会、2016年5月27日~5月30日、京都大学(京都府京都市)

古橋賢一、長谷川文生、岡田茂、海津裕、芋生憲司、「微細藻からのオイル生産プロセスの評価」、農業環境工学関連5学会2015年合同大会、2015年9月15日~17日、岩手大学(岩手県盛岡市)

Furuhashi, K., Hasegawa, F., Saga, K., Okada, S., Kaizu, Y., Imou, K., "Changes of hydrocarbon extractability and extracellular polysaccharides covering *Botryococcus braunii* cultured in salinity medium," 23rd European Biomass Conference & Exhibition, 2015年6月1日~6月4日、Vienna, Austria

Furuhashi, K., Hasegawa, F., Saga, K., Okada, S., Kaizu, Y., Imou, K., "Effect of salinity in culture media on matrix composition of *Botryococcus braunii*," 2nd Asian Conference on Biomass science, 2015年1月13日、Tsukuba, Japan

Furuhashi, K., Saga, K., Okada, S., Hasegawa, F., Kaizu, Y., Imou, K., "Hydrocarbon extraction from concentrated slurry of green microalga *Botryococcus braunii* cultured in diluted seawater," Renewable Energy 2014, 2014年7月27日~8月1日、Yokohama, Japan

〔図書〕(計1件)

芋生憲司、微細緑藻ボツリオコッカスブラウニからの炭化水素抽出、日本エネルギー学会機関誌 96(1)、2017、29-33

〔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

6. 研究組織

(1) 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・
教授
研究者番号：40184832

(2) 研究分担者

海津 裕 (Kaizu, Yutaka)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授
研究者番号：70313070

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()