

博士論文

希釈海水培地による *Botryococcus braunii* の

培養と効率的炭化水素回収プロセス

古橋 賢一

目次

第1章	序論	1
1.1	研究背景	1
1.1.1	バイオマスエネルギーへの注目	1
1.1.2	輸送燃料代替を目指した微細藻類バイオマスの研究	2
1.1.3	商業的に利用されている微細藻類	5
1.1.4	緑藻 <i>Botryococcus braunii</i>	6
1.1.5	<i>B. braunii</i> からの脂質回収法	9
1.2	研究目的	10
1.3	論文構成	12
第2章	希釈海水培養による <i>B. braunii</i> からの炭化水素回収性の向上	13
2.1	研究目的	13
2.2	研究方法	13
2.2.1	試料および培養方法	13
2.2.2	培地	14
2.2.3	増殖速度の算出	17
2.2.4	炭化水素回収性の評価	17
2.3	結果および考察	18
2.3.1	高塩濃度下での培養による藻体の死滅	18
2.3.2	希釈海水培養が炭化水素回収性に与える影響	19
2.3.3	希釈海水培養が細胞外マトリクスの弾性および培養液中の糖類に与える影響	22
2.3.4	希釈海水培養が増殖速度と炭化水素含有率に与える影響	24
2.3.5	まとめ	27
第3章	培地海水塩濃度が <i>B. braunii</i> の増殖速度・炭化水素回収性およびその形態に与える影響	29
3.1	研究目的	29
3.2	研究方法	29
3.2.1	試料および培養方法	29
3.2.2	培地	30
3.2.3	増殖速度の算出	30
3.2.4	炭化水素回収性の評価	31
3.2.5	コロニーサイズの測定	31
3.2.6	培養液の光透過率の測定	32
3.3	結果および考察	32

3.3.1	培地海水塩濃度が増殖に及ぼす影響	32
3.3.2	培地海水塩濃度が炭化水素回収性に及ぼす影響	34
3.3.3	<i>B. braunii</i> の増殖段階が炭化水素回収性に及ぼす影響	38
3.3.4	培地海水塩濃度が <i>B. braunii</i> コロニーの形態に及ぼす影響	41
3.4	まとめ	46
第4章	希釈海水培養による <i>B. braunii</i> からの炭化水素回収性向上のメカニズム	48
4.1	研究背景および目的	48
4.1.1	<i>B. braunii</i> コロニーの表面構造	48
4.1.2	研究目的	49
4.2	研究方法	50
4.2.1	試料および培養方法	50
4.2.2	培地	50
4.2.3	培地中に放出された糖量の測定	51
4.2.4	熱水による糖抽出および組成分析	51
4.2.5	藻体に含まれる二糖代謝物の測定	52
4.2.6	蛍光顕微鏡および電子顕微鏡による観察	53
4.2.7	炭化水素回収性の評価	53
4.3	結果および考察	54
4.3.1	希釈海水培養が <i>B. braunii</i> のコロニー表面物質に及ぼす影響	54
4.3.2	二糖代謝物の変化	57
4.3.3	蛍光顕微鏡, 電子顕微鏡によるコロニー全体の観察	60
4.3.4	炭化水素回収性が向上したコロニーの表面変化	62
4.3.5	まとめ	73
第5章	希釈海水培養を用いた炭化水素生産システムの評価	74
5.1	研究目的	74
5.2	研究方法	74
5.2.1	培養プロセスにおける投入エネルギーの算出	74
5.2.2	収穫・輸送・脱水プロセスにおける投入エネルギーの算出	79
5.2.3	抽出プロセスにおける投入エネルギーの算出	85
5.3	結果および考察	88
5.3.1	培養プロセスにおける投入エネルギー	88
5.3.1	収穫・輸送・脱水プロセスにおける投入エネルギー	90
5.3.2	溶媒抽出プロセスにおける投入エネルギー	98
5.3.3	炭化水素生産システムのエネルギー収支	102
5.3.4	まとめ	109

第6章	結論.....	111
6.1	研究のまとめ.....	111
6.2	今後の課題.....	112
	謝辞.....	114
	参考文献.....	115

第1章 序論

1.1 研究背景

1.1.1 バイオマスエネルギーへの注目

世界の一次エネルギー消費の約8割を占める化石燃料は有限な資源であり、将来的には必ず再生可能資源で代替しなければならない。さらに、日本のような一次エネルギー供給量の約9割を輸入した化石燃料に頼っている国においては、エネルギー保障という観点からも、化石燃料への依存度を減らし、自国におけるエネルギー生産を積極的に進めていく必要がある [1]。

しかし、環境問題を考えた場合、国内に膨大な賦存量があると推定されているメタンハイドレートのような化石燃料を自国で産出することが、必ずしもエネルギー生産の最善策であるとは限らない。化石燃料を燃焼すると二酸化炭素を含む温室効果ガス（Greenhouse gas, 以後 GHG）が多量に排出される。GHG は地表から宇宙空間への放熱を抑える効果を有していることが知られている。地球はこの効果によって、恒温性を維持してきた。ところが近年の急激な化石燃料の消費量増加とともに、大気中の二酸化炭素濃度が増加し、世界の年平均気温は上昇している [2]。その結果、地球温暖化に起因すると考えられている海面上昇等の深刻な環境問題が露呈してきている。

このような背景から、二酸化炭素排出削減効果がある再生可能エネルギーの導入は、化石燃料の輸入量削減だけでなく、地球温暖化対策にもつながることから注目が集まっている。特に再生可能エネルギーの中でもバイオマスは唯一有機物という形で蓄積され、エネルギー資源として利用できる特徴がある。そのため、バイオマスは単に燃焼させ熱、電気に変換して利用するだけでなく、動植物由来の各バイオマスの特徴を活かして、固体・液体・気体燃料さらには石油由来の化成品代替といった既存のシステムに適応させた多様な形でのアウトプットも可能であることから、その応用に注目が集まっている。

1.1.2 輸送燃料代替を目指した微細藻類バイオマスの研究

微細藻類とは、酸素発生型光合成を行う生物の中からコケ植物、シダ植物、種子植物を除いた残りの全てと分類されている藻類の中で、顕微鏡サイズ藻類の総称である [3]. その微細藻類が輸送燃料代替として期待されている理由として、増殖速度が大きいことによる単位面積当たりの生産性の高さ、食料と競合しない土地利用、脂質を生産して蓄積する種の存在等が挙げられる. その中でも特に注目されるのが、陸上植物と比較して著しく高い単位面積当たりの脂質生産性である. それを示すために、年間 1 ha 当たりの脂質生産量が、陸上植物最大のパーム 5.95 kL に対して、微細藻類ではオイル含有率 30% の場合 58.7 kL, 70% の場合 136.9 kL という Chisti の推定値 [4] がよく引用される. Weyer et al. は地表面における太陽光エネルギーに光合成効率を乗じて、脂質含有率 50% と仮定した場合における年平均の日増殖速度、1 ha 当たりのオイル収量の最大値はそれぞれ $42 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, 53.2 kL であると見積もっているが、この値は光飽和等を考慮していないエネルギー変換から考えた光合成の理想的最大値である [5]. 一方で、最大日増殖速度では $50 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ に到達する夏日もあるが年平均では $15\text{--}30 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ に落ちるといふ報告もあり [6, 7], また屋外開放培養において年間収量が発表されているものの大部分は、年平均の日増殖速度が $10\text{--}30 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ であるといふ報告もある [8]. 最近では LCA やコスト、エネルギー収支のモデルを構築する際に年平均の日増殖速度を $10\text{--}30 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ と評価したのも散見されるようになってきている [9, 10]. 年平均の日増殖速度 $10 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, 30% の脂質含有率であっても、年間で 1 ha 当たり約 12 kL の脂質が生産可能であり、陸上植物と比較して脂質生産が優れているといふことは間違いない.

微細藻類由来のバイオ燃料生産は、アメリカでは 1970 年代、日本ではオイルショック後の 1980 年代から本格的に研究されてきたが、原油価格の変動とともに研究開発は止まった. そして 2007 年頃から再びアメリカで、エネルギー省だけでなく多くの会社が多額の投資を行い、実用化へ向け研究開発が進められている. それを示すように、2007

年より、外国出願人からの燃料と記載がある国内藻類特許出願が急激に増加した [11]. 一方、日本では遅れること 2 年、2009 年より日本国出願人からの同特許出願が急激に増加した. そして 2010 年度から NEDO（国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構）による「戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業」の中で藻類バイオマス利用技術に関する研究開発が採択され、藻種の選定から、屋外大量培養、収穫濃縮技術、抽出技術、燃料精製技術に至る燃料生産の各技術ハードル全てを実用化に向けクリアすべく、種々の藻種を対象としたバイオ燃料生産プロセスの研究開発が行われている（表 1-1）.

表 1-1. 国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）による「戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業」の中で採択された藻類バイオマス利用技術に関する研究開発で対象とされた藻種と課題概要.

対象とした藻種	課題概要
<i>Rhizosolenia</i>	炭化水素生産能力を備える海産微細藻類の創製
<i>Botryococcus</i> <i>Euglena</i>	細菌との共生や有機排水の資化の検討
<i>Botryococcus</i>	乾燥工程を経ない炭化水素回収プロセスの開発
<i>Euglena</i>	生産性と油脂含有率を向上させる培養プロセスの開発
<i>Pseudochoricystis</i>	有用形質の原因遺伝子特定と遺伝子組み換え技術の開発
<i>Botryococcus</i> <i>Aurantiochytrium</i>	バイオクルードから従来の石油系燃料への変換技術の開発
多種	燃料生産に適した微細藻の探索や評価方法の確立
<i>Chlamydomonas</i>	高油脂生産株の創製および培養プロセスの開発
<i>Botryococcus</i>	育種改良した株を用いた培養・藻体濃縮プロセスの開発
<i>Aurantiochytrium</i>	C5糖を資化する株の選抜と高濃度培養プロセスの開発
<i>Mayamaea</i> <i>Fistulifera</i>	中温株，耐冷性株を用いたオイル生産全体プロセスの開発
<i>Pseudococcomyxa</i>	対象藻種を用いたオイル生産全体プロセスの開発

1.1.3 商業的に利用されている微細藻類

前節では、バイオ燃料の実用化に向けて行われている微細藻類の研究について述べたが、バイオ燃料を実用化するためには、経済性、エネルギー収支が成り立ち、GHG 排出量の削減効果がなければならないため、商業的に成功しているものはない。その一方でバイオ燃料以外であれば商業的に利用されている微細藻類が存在する。その主なものを表 1-2 に示す。その利用法は、高付加価値をもつ健康食品や機能性色素としてのものがほとんどである。また光合成を行わないので厳密には藻類に分類されないが、海産微生物である *Schizochtrium* からは DHA が生産されている [12]。

バイオ燃料実用化に向けて、屋外大量培養下でのコンタミネーション（他生物の混入・汚染）対策は常に問題となっているが、表 1-2 に示した藻種はコンタミネーションを防ぎ、大量培養に成功した種である。高付加価値性を活かして屋外培養でなく、比較的高価とされる閉鎖系のフォトバイオリクターを導入しコンタミネーションを防いでいるものもあるが、高塩濃度耐性、高アルカリ耐性、従属栄養性といった各藻種の利点を活かして、屋外培養でもコンタミネーションを防いでいると考えられる [13]。

表 1-2. 商業的に利用されている主な微細藻種および用途 [14–17].

藻種	用途
<i>Arthrospira</i>	健康食品, フィコビルリン (色素)
<i>Chlorella</i>	健康食品, 水産飼料
<i>Dunaliella</i>	健康食品, β カロテン (色素)
<i>Haematococcus</i>	アスタキサンチン (色素), 水産飼料
<i>Euglena</i>	健康食品
<i>Nannochloropsis</i>	水産飼料
<i>Aphanizomenon</i>	健康食品

1.1.4 緑藻 *Botryococcus braunii*

種々の藻種を対象としてバイオ燃料の実用化に向けた研究が進められている。群体性緑藻 *Botryococcus braunii* (以後, *B. braunii*) (図 1-1) はバイオ燃料の原料として有望視されている種の一つである。*B. braunii* が注目されている理由として, (1) 生産する脂質が炭化水素, (2) 生産した炭化水素を細胞外に蓄積, (3) 増殖中における炭化水素生産といった本藻種がもつ独特の特徴が挙げられる。

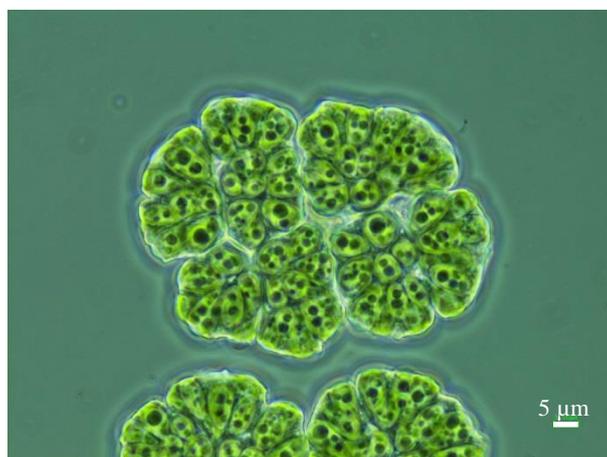


図 1-1. *B. braunii* (B race, Showa 株) コロニーの光学顕微鏡写真.

(1) 生産する脂質が炭化水素

一般的な脂質生産性微細藻類が生産する脂質は油脂 (トリアシルグリセロール) や脂肪酸である [18]. 一方で, *B. braunii* が生産する脂質は炭化水素である. *B. braunii* は生産する炭化水素の種類によって A, B, L race に分類される [19]. A race は脂肪酸由来の炭素数 23–31 の直鎖炭化水素アルカジエンおよびアルカトリエンを生産する [20]. B

race はスクアレン合成の基となるファルネシルニリン酸由来の炭素数 30–37 のトリテルペン系の炭化水素を生産する [20–23]. その代表的なものが C₃₄ botryococcene である (図 1-2). L race はリコパジエンと呼ばれるテトラテルペンを生産する [24]. B race に属する *B. braunii* はバイオ燃料生産の原料として最も有望視されている. 一般的な B race で炭化水素含有率は 30–40% と高く, 図 1-2 で示した C₃₄ botryococcene のように多価不飽和・分岐鎖であるために, オクタン価が高いガソリン代替燃料に容易に精製される [25–27].

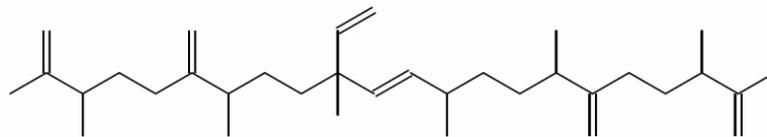


図 1-2. B race に属する *B. braunii* が生産する炭化水素 C₃₄ botryococcene の構造式.

(2) 生産した炭化水素を細胞外に蓄積

一般的な脂質生産性微細藻類は脂質を細胞内に蓄積する. そのため一般的な溶媒抽出を行うと, 抽出前に乾燥・細胞破碎のプロセスを経る必要があるために, 抽出エネルギーおよび抽出前処理用の装置コストが増加する [28]. 一方, *B. braunii* は細胞内で生産した炭化水素の大部分 (95%以上) を細胞外に分泌し, 細胞と細胞を繋いでいる細胞外マトリクスに蓄積する [29]. カバーガラスでコロニーを潰すと細胞外マトリクスに保持されていた炭化水素が染み出してくるのが観察される (図 1-3). A race の細胞外マトリクス構造は, 長鎖エポキシドや長鎖アルデヒドが重合したものと推定されている

[19, 30]. B race からは, botryococcene と同じくファルネシルニリン酸から合成された後にメチル化されたテトラメチルスクアレンが酸化されたエポキシ化合物や長鎖の脂肪酸化合物が発見されており, そのマトリクス構造はそれらが重合したものではないかと考えられている [19, 30]. そのような親油性ポリマーに炭化水素が内包されているため, *B. braunii* からの炭化水素回収は他の藻体と比べ, 比較的容易であると考えられている.

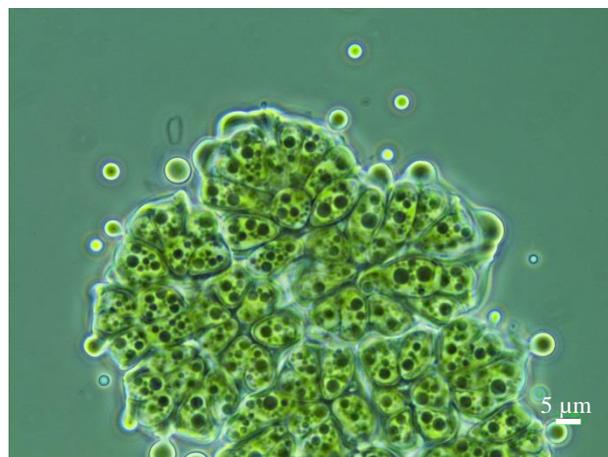


図 1-3. *B. braunii* コロニーとその細胞外マトリクスに存在している炭化水素油滴.

(3) 増殖中における炭化水素生産

一般的な脂質生産性微細藻類の細胞内への脂質蓄積は, 栄養枯渇条件や細胞増殖が顕著に低下するストレス環境条件下において始まる [31]. そのため, 単純な増殖速度から脂質生産速度を求めることができず, 細胞増殖行程と脂質蓄積行程が別となるため脂質生産のための培養管理も難しくなる. 一方で, *B. braunii* は細胞増殖しながら炭化水素を生産・蓄積する [22]. A race においては分裂前期から蓄積し始め, 分裂後に炭化水

素をマトリクスに分泌する [32]. **B race** は分裂前期だけでなく、間期の藻体も炭化水素を生産することが観察されており、そのことが **B race** の炭化水素含有率の高さに繋がっている可能性があると考えられている [33].

このような生物学的特徴から緑藻 *B. braunii* は、脂質の蓄積、回収、精製工程で他の脂質生産性微細藻類と比較して、消費エネルギーおよび生産コストの低減が期待されている。

1.1.5 *B. braunii* からの脂質回収法

一般的な微細藻類から脂質を溶媒抽出するためには、まず抽出前に乾燥し、続いて細胞破碎することで、細胞内の脂質と溶媒の接触性を上げる必要がある [34]. しかし細胞破碎に必要とされるエネルギーは大きく、また乾燥にも多大な熱エネルギーを必要とするため、含水率が高い藻体スラリーから直接、脂質を回収する方法が検討されてきた [28, 35]. メタノール/クロロホルム抽出のように水および脂質にそれぞれ溶解しやすい二相溶媒を用いる方法、さらに二相溶媒の難溶媒回収性という欠点を補うために、25°C 大気圧下では気体であるが 0.6 MPa 以上の圧力下では液体となり水にも脂質にも溶解するジメチルエーテルを用いて抽出する方法などが研究開発されている [36, 37]. 一方で、環境負荷が大きい有機溶媒を用いない方法として、超臨界状態の二酸化炭素を用いて抽出する方法や [38], 藻体スラリーを 250–350°C 程度の亜臨界水下で反応させることで重油状の液状物質が得られる直接液化法が検討されている [39]. これらの技術は *B. braunii* にも応用されており、これらの方法による脂質の回収率は顕著に高かったことが報告されている [40–43].

しかし、前節で述べたように *B. braunii* は細胞外に炭化水素を保持しているので細胞破碎の必要はなく、既存の大豆油や菜種油抽出で用いられている水に不溶なノルマルヘ

キサン抽出をそのまま適用できる。そのため湿藻体を直接ノルマルヘキサンと混合する抽出実験が行われたが、回収率は芳しくなかった [44]。藻体スラリーにビーズミルで物理的衝撃を与えホモジナイズすることで回収率が向上することも報告されているが、プラントレベルでの大型化は難しい [45]。これに対し、現実的なノルマルヘキサン抽出の前処理として、スラリーを 90°C 程度に加熱することで、乾燥後抽出よりも低投入エネルギーで効率的に炭化水素を回収できることが報告されている [46–48]。

1.2 研究目的

B. braunii は元来淡水域に存在する緑藻である。淡水資源は地域偏在性・時間的変動が大きく、常に安定した量を地球各地で得られるわけではない。そのため将来的なバイオ燃料生産のための商業的規模の培養では、*B. braunii* への海水利用の可能性も模索する必要があると考えた。

そこで、まず予備実験として、市販されている人工海水を 1/1 海水、1/2 海水、1/4 海水濃度となるようにそれぞれ添加することで塩濃度を調整し、それぞれの培地で *B. braunii* B race (Showa 株) を培養した。1/1 海水および 1/2 海水濃度で培養した藻体は、35 日目までに死滅した。しかし 1/4 海水濃度の培地では、藻体の増殖が確認された。さらに、その培地で増殖した藻体では、淡水培地で培養した藻体と比較して、ノルマルヘキサン抽出を行うと炭化水素を容易に回収できることが確認された。以後、*B. braunii* から炭化水素を容易に回収するために、増殖可能な希釈した海水培地中で藻体を培養することを、「希釈海水培養法」と呼称する。

既往の研究で、高塩濃度下で *B. braunii* を培養した事例はあるが、それらは増殖への影響や代謝物の変化に関して調べた研究である [49–52]。また、*B. braunii* を培養して炭化水素生産を目指した既往の研究は全て、炭化水素含有率や増殖速度を上げる培養の研

究, または工学的プロセスにより炭化水素の回収性を上げる回収技術の研究であり, 両者を繋ぎ合わせた培養方法によって炭化水素を回収しやすい藻体へと変えるような研究は報告されていない.

本研究では, まず *B. braunii* による炭化水素生産システムの投入エネルギー低減を目指し, 乾燥, 加熱, 物理的破碎等の前処理を行わなくても, ノルマルヘキサン等の非極性溶媒により炭化水素を高収率で回収できる藻体に変えることが可能な, 希釈海水培養法を開発する. そして, 希釈海水培養法を用いた炭化水素生産システムと, 淡水培養した藻体を溶媒抽出する前に加熱もしくは乾燥する既存の炭化水素生産システムを比較し (図 1-4), 希釈海水培養法が炭化水素生産システムのエネルギー収支向上に与える影響を評価することを目的とした.

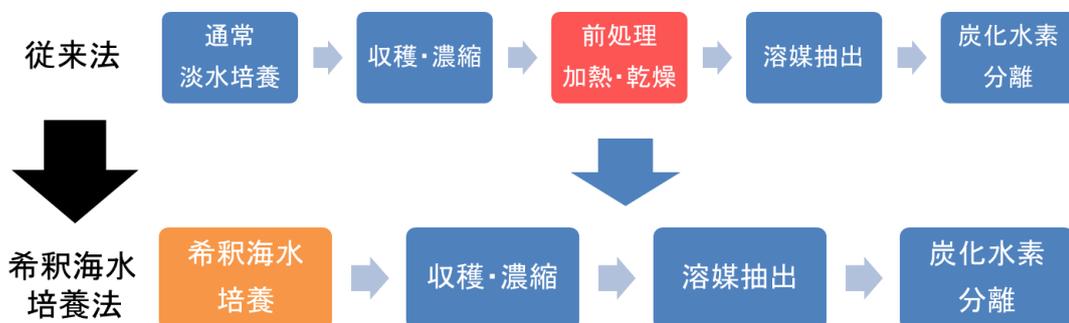


図 1-4. 本研究で提案する希釈海水培養法を用いた *B. braunii* からの炭化水素生産システム.

1.3 論文構成

本論文は 6 章によって構成される。第 1 章では、本研究の背景および目的を述べた。第 2 章では、希釈海水培養が *B. braunii* からの炭化水素回収性に及ぼす影響について述べる。炭化水素の回収率は各実験の抽出条件によって変化するため、異なる章間では比較できない。そのため溶媒抽出による藻体からの炭化水素回収の容易さを包括的に表す言葉として「炭化水素回収性」という言葉を用いる。第 2 章で炭化水素回収性を向上させた 0.9% 塩濃度の希釈海水培養は増殖速度を大幅に低下させることが判明した。そのため第 3 章では、希釈海水培地の塩濃度が増殖速度、炭化水素回収性および藻体の形態変化に及ぼす影響について調べた結果を述べる。第 4 章では、希釈海水培養が炭化水素回収性を向上させる原因・メカニズムについて述べる。第 5 章では、第 3 章の実験結果より明らかとなった増殖速度を低下させずに炭化水素回収性を向上させる塩濃度下での希釈海水培養法を用いた炭化水素生産システムと、淡水培養した藻体を溶媒抽出する前に加熱もしくは乾燥する既存の炭化水素生産システムを比較して、希釈海水培養法が炭化水素生産システムのエネルギー収支に与える影響を評価した。第 6 章では研究のまとめおよび展望と課題を述べる。

第2章 希釈海水培養による *B. braunii* からの炭化水素回収性の向上

2.1 研究目的

淡水性の緑藻 *B. braunii* を海水等の高塩濃度下で培養し、増殖、代謝物に与える影響を調べた論文は複数報告されており、高塩濃度下では増殖速度が低下することが確認されている [49–52]。しかし、高塩濃度下での培養が溶媒抽出による炭化水素回収性に影響を与えることに焦点を当てたものはない。本章では、希釈海水培養が炭化水素回収性に与える影響を調べた。また希釈海水培養により炭化水素回収性が向上する現象を、人工海水培地を希釈することで作製した培地で培養した藻体だけでなく、天然海水や塩化ナトリウムで塩濃度を調整し作製した培地で培養した藻体でも調べた。天然海水をもとに作製した培地で培養した藻体からの炭化水素回収性が向上すれば、この現象は人工海水培地中の微量金属の存在に起因すると考えられる。一方で、淡水培地に塩化ナトリウムを添加することで作製した培地で培養した藻体からの炭化水素回収性が向上すれば、この現象は塩化ナトリウムの存在もしくは塩による浸透圧に起因すると考えられる。

2.2 研究方法

2.2.1 試料および培養方法

B race に属し、 C_{34} botryococcene を主成分とするトリテルペン系の炭化水素を生産する *B. braunii* (Showa strain) を用いた。藻体培養はインキュベータ内で 1.5 L のガラス製培養瓶 (ルー瓶) を用いて行った。培養温度は 25°C に調整し、1.3% の二酸化炭素富化空気を、塵や微生物の混入を防ぐため HEPA フィルターを通した後、藻体攪拌及び二酸化炭素供給のため培養瓶底部より培養瓶内に供給した。光合成光量子束密度 (Photosynthetic photon flux density, 以後 PPF) は培養瓶の表面近傍測定で約 $50 \mu\text{mol}$

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となるように調整し、明暗周期を12時間とした。各継代期培養後に藻体を含む培地400 mlを新しい培地1000 ml内に入れて繰り返し培養した。各継代期の期間を約35日とした。

2.2.2 培地

本実験では4種類の培地、A) Chu13 改変培地、B) 改変希釈人工海水培地、C) 改変希釈天然海水培地、D) 塩化ナトリウム添加培地を作製した。

A. Chu13 改変培地 (Freshwater medium, 以後 FM)

B. braunii は、種々の適用培地が検討されているが [53]、本研究では淡水培地として Chu13 改変培地を用いた。

B. 改変希釈人工海水培地 (Artificial seawater medium, 以後 ASM)

人工海水培地は市販されている人工海水 (ダイゴ人工海水 SP, 和光純薬工業) を 1/1 海水 (全塩濃度 3.6%, 3.6%ASM), 1/2 海水 (同 1.8%, 1.8%ASM), 1/4 海水 (同 0.9%, 0.9%ASM) となるよう、それぞれ純水で希釈して作製した。藻体増殖に必要なものの、人工海水に含まれていない栄養塩類と微量元素 (KNO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, FeNaEDTA , H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) については、Chu13 改変培地と同濃度となるように添加した。

C. 改変希釈天然海水培地 (Natural seawater medium, 以後 NSM)

希釈海水培養により藻体からの炭化水素回収性が向上する現象が、人工海水培地中の微量元素の存在による可能性を確かめるため、伊豆諸島周辺で採取された天然海水を、1/4 海水濃度となるよう純水で希釈して培地を作製した。栄養塩類と微量元素も同様に添加した。

D. 塩化ナトリウム添加培地 (Sodium chloride medium, 以下 SCM)

改変希釈天然海水培地と同様に、現象が塩化ナトリウムもしくは塩による浸透圧による可能性を確かめるため、0.9%ASM と同等の浸透圧となるように Chu13 改変培地に規定量の塩化ナトリウムを添加して培地を作製した。

これら FM, 0.9%ASM, NSM, SCM の培地組成を表 2-1 に示す。

表 2-1. 淡水培地 (FM), 0.9%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.9%ASM), 改変希釈天然海水培地 (NSM) および塩化ナトリウム添加培地 (SCM) の組成.

組成 (mg L ⁻¹)	FM	0.9%ASM	NSM	SCM
KNO ₃	600	600 ^a	600	600
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100			100
CaCl ₂ ·2H ₂ O	54	332		54
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	52	52 ^a	52	52
FeNaEDTA	10	10 ^a	10	10
H ₃ BO ₃	2.36	2.36 ^a	2.36	2.36
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.54	1.54 ^a	1.54	1.54
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22	0.22 ^a	0.22	0.22
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.09	0.09 ^a	0.09	0.09
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08	0.08 ^a	0.08	0.08
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.06	0.06 ^a	0.06	0.06
NaCl		5190		8800
MgCl ₂ ·6H ₂ O		2370		
Na ₂ SO ₄		876		
KCl		149		
NaHCO ₃		42.8		
KBr		21		
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O		8.5		
SrCl ₂		3.0		
NaF		0.8		
LiCl		0.3		
KI		0.02		
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·3H ₂ O		0.005		
AlCl ₃ ·6H ₂ O		0.002		
FeCl ₃ ·6H ₂ O		0.001		
MnCl ₂ ·4H ₂ O		0.0002		
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O		0.00005		
天然海水			250 mL ^b	
純水	1000 mL	1000 mL	750 mL	1000 mL

^a Chu13 改変培地と比較して不足しているために加えた元素

^b 外海から直接採取した天然海水 250mL

2.2.3 増殖速度の算出

藻体の増殖速度は、比増殖速度を求める次式で算出した。ここで M_{t1} , M_{t2} はそれぞれの時間 t_1 , t_2 (d) における藻体乾燥重量 (g L^{-1}) を表す。

$$\mu = \frac{\text{Ln}(M_{t2} / M_{t1})}{t_2 - t_1}$$

乾燥重量は次のように測定した。藻体を含む培養液を、あらかじめ恒量を求めたガラス繊維濾紙 (GF/A 110-mm diameter, Whatman) で濾過し、濾紙上に残っている藻体を、純水で洗浄した。洗浄後、1 分間隔での水分率の測定値の変化が 0.05% 以下となるまで 105°C で乾燥し、乾燥重量を測定した。

2.2.4 炭化水素回収性の評価

炭化水素回収性の評価方法として、同抽出条件により測定した炭化水素回収率を用いた。炭化水素回収率は一定量の藻体を乾燥し溶媒抽出・カラム精製により得られる藻体の炭化水素含有量に対する、同量の藻体を含む培養液に直接ノルマルヘキサンを添加し混合することで抽出される炭化水素量の比として定義した。

藻体の炭化水素含有量は以下のように求めた。藻体を含む培養液 200 ml を冷凍後、凍結乾燥した。乾燥藻体にノルマルヘキサンを加えて攪拌した。ノルマルヘキサンは細胞外マトリクスに炭化水素と共存する色素により黄色に着色する。これをナス型フラスコに移し回収した。この操作をノルマルヘキサンの着色がなくなるまで繰り返し行い、色素および炭化水素を含む全てのノルマルヘキサン層を集めた。回収したノルマルヘキサンをロータリーエバポレーターで減圧蒸留した後、残存物をノルマルヘキサンを展開溶媒としてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ワコーゲル C-300, 和光純薬工業) に付し、炭化水素画分のみを溶出させた。シリカゲルカラムを通過した炭化水素を含む

ノルマルヘキサンを再度減圧蒸留し、残存した無色透明で粘性のある炭化水素を、細胞外マトリクスに存在する藻体炭化水素含有量として重量測定した [29].

藻体を含む培養液に直接ノルマルヘキサンを混合して炭化水素を回収する方法は、次の手順で行った。藻体を含む培地 200 mL と同量のノルマルヘキサンを分液漏斗に入れ 30 秒間攪拌した後、二層に分離するまで静置し、上層のノルマルヘキサンを回収した。リンスするため下層の藻体を含む水相を再び分液漏斗内に戻し、100 mL のノルマルヘキサンを加えて、同様に 30 秒間攪拌し静置した。上層のノルマルヘキサンと 1 回目のノルマルヘキサン層を合一し、凍結乾燥試料からの炭化水素抽出と同様に、減圧蒸留後シリカゲルカラムに通し、炭化水素の重量を測定した。

2.3 結果および考察

2.3.1 高塩濃度下での培養による藻体の死滅

3.6%ASM および 1.8%ASM で培養した藻体は、培養途中に黄変した後、培養 35 日目までに培養液が白濁し死滅した (図 2-1)。そのため炭化水素回収は行わなかった。次節以降は全て 0.9%ASM で培養した藻体を用いた実験結果である。

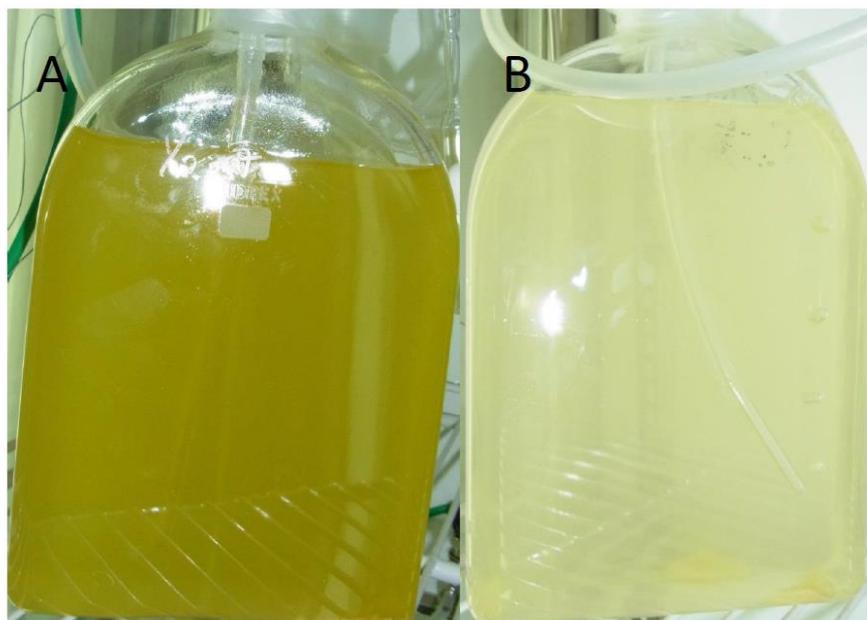


図 2-1. 1.8%海水塩濃度改変希釈人工海水培地（1.8%ASM）で培養した *B. braunii*.
A) 藻体の黄変. B) 培養液が白濁し藻体が死滅.

2.3.2 希釈海水培養が炭化水素回収性に与える影響

FM で 35 日間培養した藻体を 0.9%ASM に継代し、その後 0.9%ASM で継代培養を繰り返した。継代元となる FM および 0.9%ASM で継代培養した藻体からの炭化水素回収率を図 2-2 に示す。FM で培養した藻体では、2.6%の炭化水素回収率しか得られなかった。一方で、0.9%ASM に継代培養すると、継代 1 期のみの培養期間で、最も炭化水素回収率が少なかったロットにおいても 20%の炭化水素回収率が得られた。2 期培養後では最も回収率が少なかったロットにおいても 80%が得られ、3 期培養後では全てのロットにおいて 90%以上の炭化水素回収率を得た。このように 0.9%ASM 培地で継代培養の回数が増え 0.9%ASM で培養した時間が長くなるほど、炭化水素回収性が向上すること

が確認された。しかし、培養期間1期だけの藻体でも、一つのロットでは炭化水素回収率が90%を超えた。1期におけるロット間の炭化水素回収率の違いについて、理由は明確ではないが、植え継ぎ時の藻体の生理状況の違い、もしくは各ロット間の増殖速度の違いが影響していると考えられる。

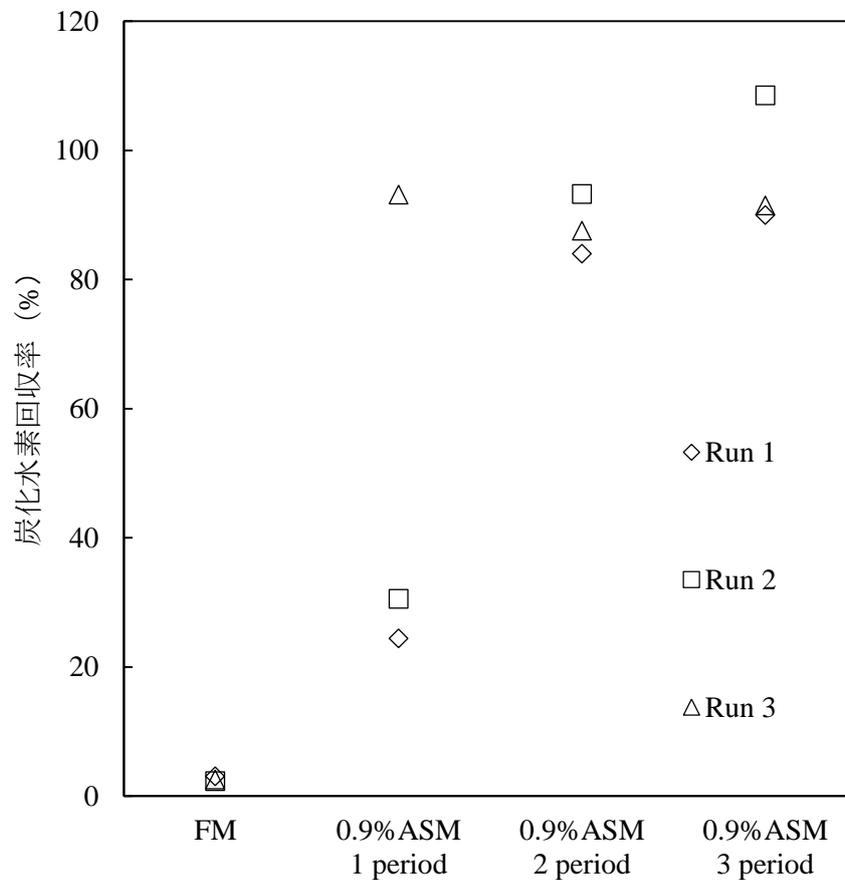


図 2-2. 継代元の淡水培地 (FM) と継代した 0.9%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.9%ASM) で培養した *B. braunii* からの炭化水素回収率. period, 継代培養の継代期.

0.9% ASM 培養した藻体からの炭化水素回収率は FM 培養した藻体と比較して高かった。そこで、その現象が人工海水培地中の微量金属等あるいは塩化ナトリウムの存在のいずれかに起因する可能性を検討した。継代元となる FM と、NSM もしくは SCM で繰り返し継代培養した藻体からの炭化水素回収率を図 2-3 に示す。

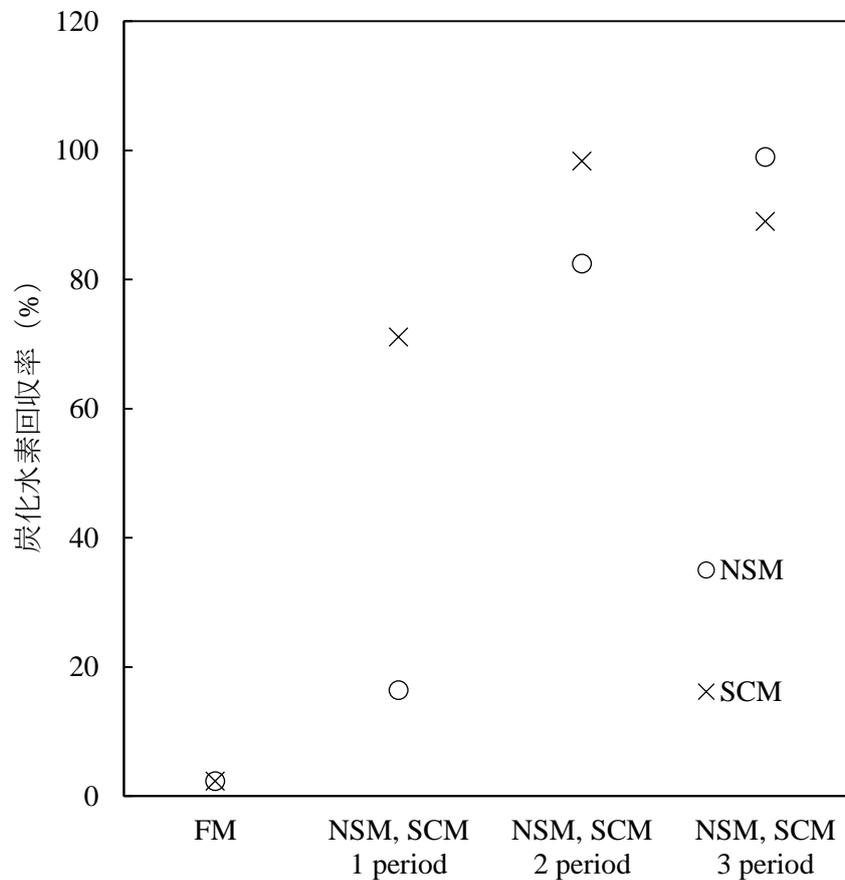


図 2-3. 継代元の淡水培地 (FM) と継代した改変希釈天然海水培地 (NSM) もしくは塩化ナトリウム添加培地 (SCM) で培養した *B. braunii* からの炭化水素回収率.

period, 継代培養の継代期.

NSM および SCM の両培地において、1 期培養後に炭化水素回収率の上昇傾向が確認され、2 期培養後では両培地において 80% を超え、人工海水培地を用いて塩濃度を調整した 0.9%ASM と同様の現象が確認された。よって培地により炭化水素回収性が向上する現象は塩による浸透圧上昇もしくは塩化ナトリウムの濃度上昇に起因すると考えられる。

この現象により、ノルマルヘキサン抽出において加熱や乾燥の前処理工程を省くことが可能になるため、投入エネルギーの低減だけでなく、前処理による *B. braunii* の細胞死滅を回避して炭化水素を抽出することが可能となる。つまり藻体を殺さずに有価物を抽出し、再び培養して有価物を再生産させるミルクキングというプロセスを実現できる可能性がある [54]。ミルクキングの研究結果はいくつか報告されているが、藻体に比較的危害を与えないノルマルヘキサンやノルマルヘプタンで炭化水素を回収しても、長時間溶媒と接触させると藻体の生理活性が下がる [55]。逆に接触時間が短いと炭化水素の回収率が低く、また数回の抽出プロセス後に藻体活性が下がることが報告されている [56]。一方で圧搾では炭化水素がほとんど回収されないと報告されており [57]、圧搾においても藻体の活性が下がる [58]。本研究では溶媒との短い接触時間で、炭化水素の多くを回収することが可能となったため、新たなミルクキングプロセスを創出できる可能性がある。

2.3.3 希釈海水培養が細胞外マトリクスの弾性および培養液中の糖類に与える影響

図 2-4 はスライドガラスに FM および 0.9%ASM で培養した藻体を乗せ、カバーガラスの上から圧力をかけて藻体を圧迫し、炭化水素を放出させた様子である。FM で培養した藻体は、圧力をかけた直後では細胞外マトリクスがクッションとなってコロニー外に炭化水素が放出されない。一旦圧力をかけ圧力を除いて静置 5 分後、徐々にコロニー

外に炭化水素が放出された。一方、0.9%ASM で培養した藻体は圧力をかけた直後に炭化水素が放出された。0.9%ASM では細胞外マトリクスの弾性が弱まったと考えられる。

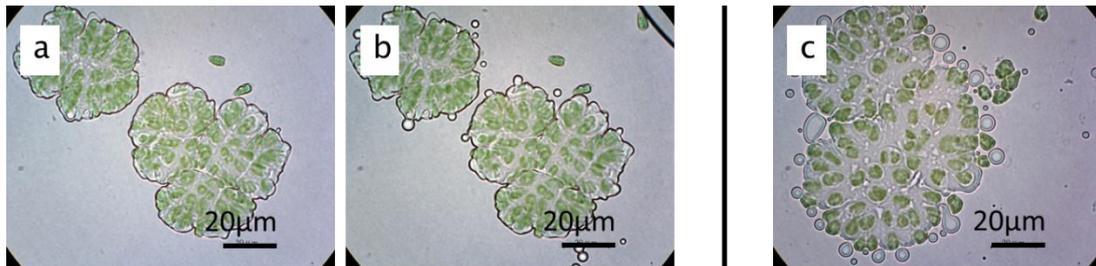


図 2-4. 圧迫による *B. braunii* コロニーからの炭化水素油滴の放出。

a) 圧迫直後の淡水培地 (FM) 培養藻体. b) 一旦圧迫後に圧力を除いて静置 5 分後の FM 培養藻体. c) 圧迫直後の 0.9%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.9%ASM) 培養藻体.

また、培地を凍結乾燥したものにも 0.9%ASM で培養した藻体と FM で培養した藻体との間に相異が観察された (図 2-5). *B. braunii* は培養液中に糖類を最大 1 g L^{-1} 分泌し、培養液の粘度を高めることが知られている [59]. その構成単糖は品種、株によって異なるが、ガラクトースが最も多くを占める単糖であることは共通している [59]. 培養後の藻体を含む FM 培地を凍結乾燥させると、図中の白矢印で示されるような糖類と想定される綿状物が確認された。一方で、培養後の藻体を含む 0.9%ASM を凍結乾燥してもそのような綿状物は確認されなかった。ナス型フラスコに付着している白い固形物および底部の固形物のほとんどは、藻体濃度に対して 4 倍以上を占める海水由来の塩と考えられる。図 2-5 の A では、緑の藻体は白い綿状物の中に混合している状態で確認され、一方で B ではナス型フラスコに付着している状態もしくは底部の白い塩の中に混

合している状態で確認された。溶媒抽出時の炭化水素回収性の向上および圧迫時の弾性の変化はマトリクスに存在する糖類の変化に由来していることが示唆された。

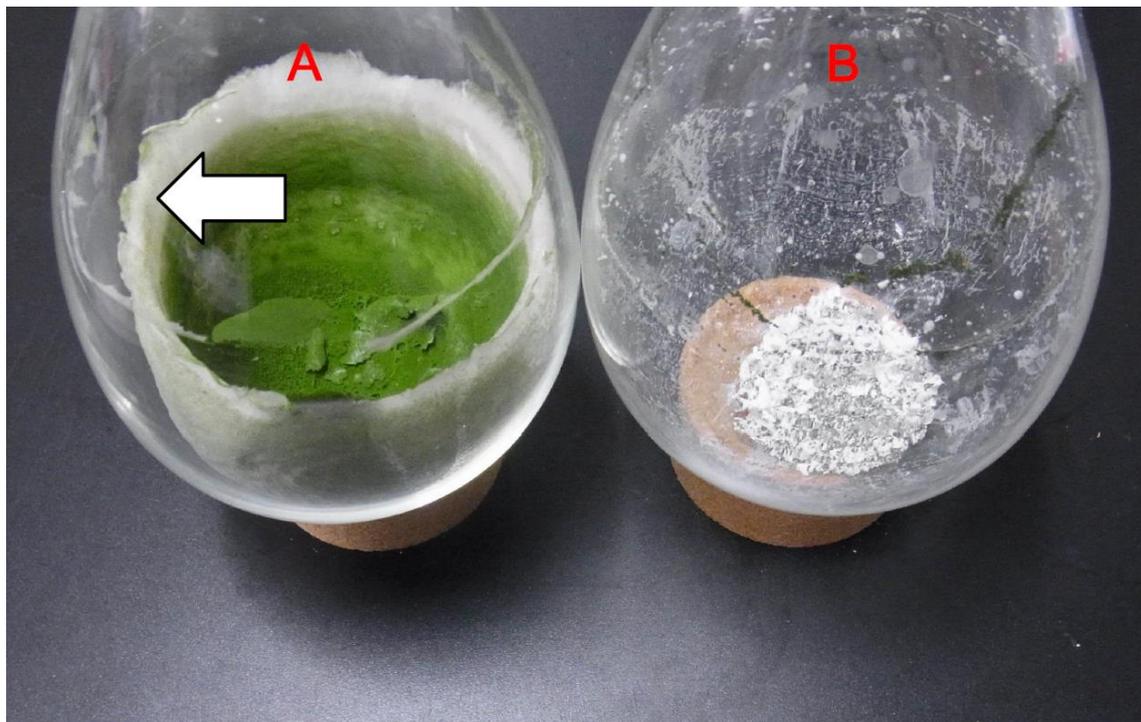


図 2-5. A) 淡水培地 (FM) と B) 0.9%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.9%ASM) で培養した *B. braunii* を含む培養液の凍結乾燥物の違い。白矢印, 白い綿状物。

2.3.4 希釈海水培養が増殖速度と炭化水素含有率に与える影響

本節では、炭化水素回収性を大幅に向上させた 0.9%ASM が、増殖および炭化水素含有率に与える影響を評価する。0.9%ASM で培養した藻体と FM で培養した藻体の比増殖速度を図 2-6 に示す。*B. braunii* は元来淡水性の緑藻のため、3 期培養後の 0.9%ASM では、培地塩濃度が高くなったことにより比増殖速度が FM の半分に低下した。他の研

究でも、塩を加えた培地では淡水培地と比較して増殖速度が落ちることが報告されている [49–52]. *B. braunii* は増殖とともに炭化水素を生産・蓄積することが知られている. その合成酵素も増殖時に大きく働くことが確認されている [22]. また電子顕微鏡観察の結果、細胞分裂周期の各段階と炭化水素の蓄積・分泌の行程は密接な関係性があることが報告されている [33]. そのため増殖速度の低下すなわち細胞分裂周期の速度低下が炭化水素代謝に影響を与えることが懸念された. しかしながら乾燥藻体量に対する炭化水素含有率の低下は確認されず、炭化水素代謝に関しては FM と同様に働いていることが確認された. 0.9%ASM による培養では、炭化水素生産の代謝は働いているため炭化水素含有率の低下を引き起こさないが、増殖が高塩濃度下で抑制されるため増殖速度は半減し、炭化水素の生産量は減少した.

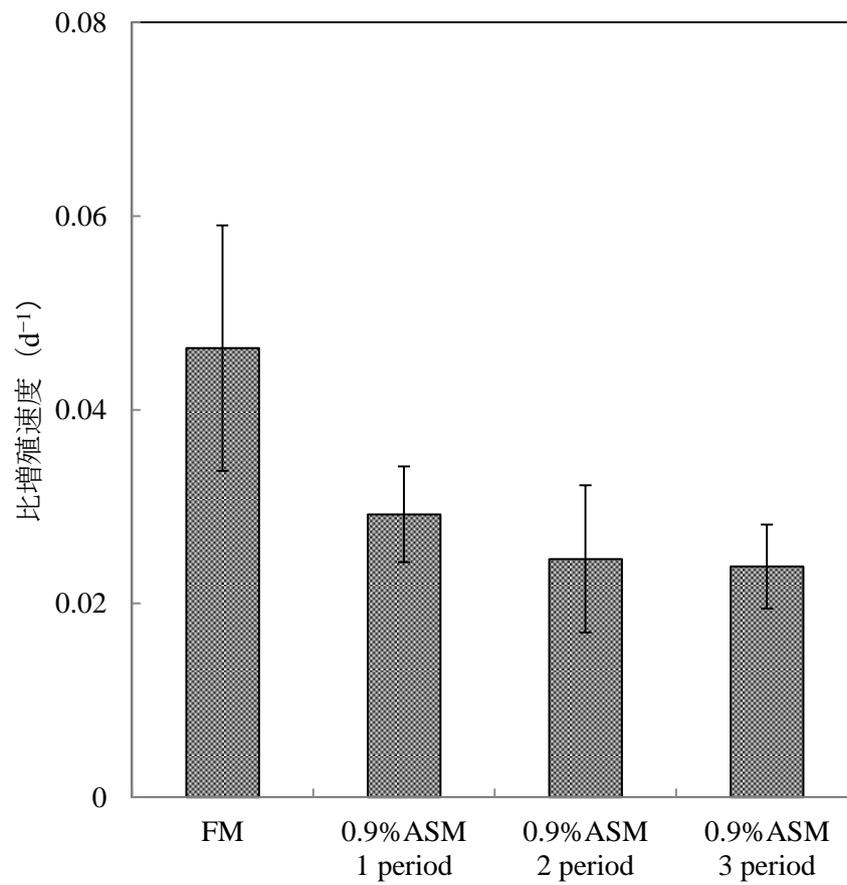


図 2-6. 継代元の淡水培地 (FM) と継代した 0.9%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.9%ASM) で培養した *B. braunii* の比増殖速度. period, 継代培養の継代期. (n = 3, mean ± SD)

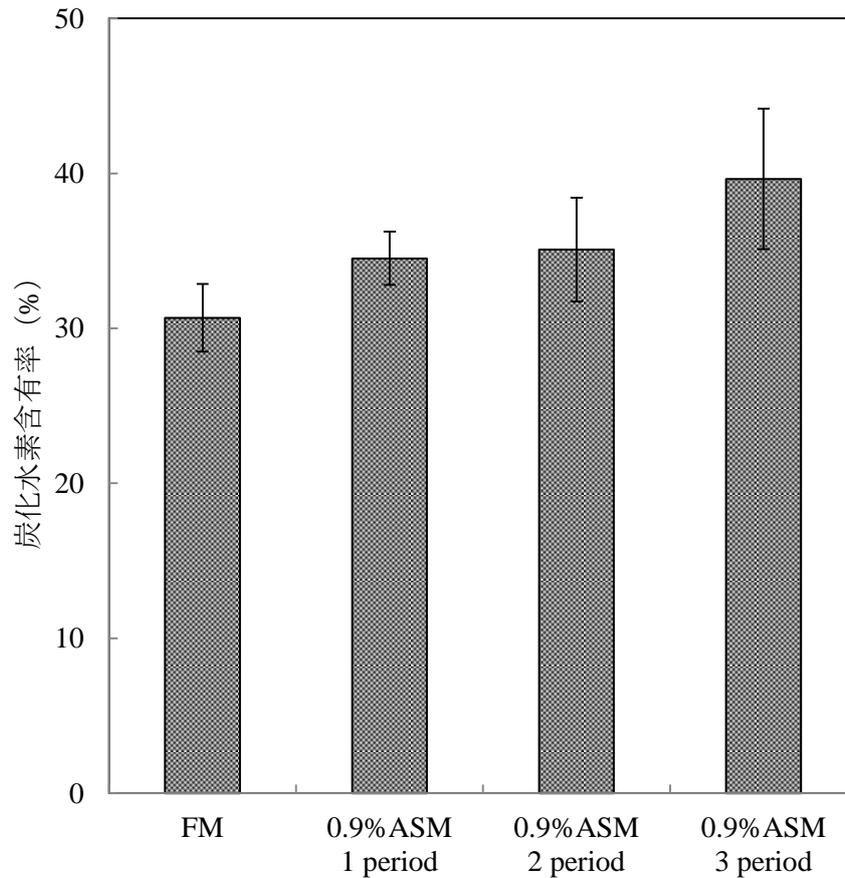


図 2-7. 継代元の淡水培地 (FM) と継代した 0.9%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.9%ASM) で継代培養した *B. braunii* の炭化水素含有率. period, 継代培養の継代期. (n = 3, mean ± SD)

2.3.5 まとめ

本章では、淡水性微細緑藻 *B. braunii* の高塩濃度培地における培養が、溶媒抽出による炭化水素の回収性に与える影響を調べた。B race に属する Showa 株は、人工海水培地を用いて 1.8%, 3.6%の海水塩濃度に調整した培地では、藻体は増殖することなく、黄変したのちに培養液が白濁し死滅した。しかし、0.9%海水塩濃度に調整した培地では比

増殖速度が、淡水培地と比較して半減した。一方で、0.9%海水塩濃度に調整した培地で培養した藻体からの炭化水素回収率は90%以上を超え、3%以下であった淡水培地と比較して大幅に向上した。また、炭化水素含有率の低下はみられなかった。希釈海水培養において継代培養の回数が増加するほど炭化水素回収性が向上する現象は、人工海水のみでなく、天然海水により作成された培地や塩化ナトリウムを添加した高塩濃度培地においても確認され、塩化ナトリウムの存在もしくは塩による浸透圧が本現象の原因となっていることが考えられた。バイオ燃料生産を目的とした大量培養を考える際に、海岸地域であれば精製せずに直接投入できる天然海水を利用できることは大きなメリットであると考えられる。しかし、天然海水の微量成分は採取時期や場所等で変わるため、以後の章の実験では、希釈海水培養には天然海水ではなく人工海水を用いた。

また、藻体を含む培養液をそのまま凍結乾燥したものを観察すると、希釈海水培地では培地中に放出される糖類による綿状物が消失しており、糖代謝が変わっていることが考えられた。細胞外マトリックスに存在する糖類の代謝変化が炭化水素回収性の向上に影響を及ぼしていることが示唆された。

第3章 培地海水塩濃度が *B. braunii* の増殖速度・炭化水素回収性およびその形態に与える影響

3.1 研究目的

前章で、人工海水培地を用いて 0.9%海水塩濃度に調整した培地での *B. braunii* の培養は、藻体からの炭化水素回収性を大幅に向上させたが、藻体の増殖速度を大幅に低下させることが判明した。群体性緑藻 *B. braunii* はコロニーを作る特徴を持ち、一方向からの光が全細胞に照射されない。そして疎水的な細胞外マトリックスおよび炭化水素という高エネルギー物質を細胞増殖とともに生産するためか、*B. braunii* の増殖速度は他の藻体と比較して遅いことが知られており、静置培養では倍加時間が一週間程度である [60, 61]。屋外培養を想定した場合、更なる増殖速度の低下は他の微細藻類や微生物のコンタミネーションを招く結果につながるため、避けることが望ましい。そのため本章では、0.9%海水塩濃度より塩濃度が薄い培地において、炭化水素回収性を向上させ、かつ増殖速度を維持することが可能な海水塩濃度が存在する可能性を検証し、同時に希釈海水培養がコロニーサイズに与える影響を定量的に測定した。

3.2 研究方法

3.2.1 試料および培養方法

前章と同様に、B race に属し C₃₄ botryococcene を主成分とするトリテルペン系の炭化水素を生産する *B. braunii* (Showa strain) を用いた。藻体培養はインキュベータ内で 1.5 L のガラス製培養瓶 (ルー瓶) を用いて行った。培養温度は 25°C に調整し、1.3% の二酸化炭素富化空気を、塵や微生物の混入を防ぐため HEPA フィルターを通した後、藻体攪拌及び二酸化炭素供給のため培養瓶底部より培養瓶内に供給した。PPFD は培養瓶の

表面近傍測定で $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となるように調整し、明暗周期を 12 時間とした。各継代期培養後に藻体を含む培地 200 ml を新しい培地 1000 ml 内に入れて繰り返し培養した。各継代期の培養期間を 18 日とし、合計 54 日間培養を行った。

3.2.2 培地

前章と同様に淡水培地として Chu13 改変培地 (Freshwater medium, 以後 FM) を用いた。改変希釈人工海水培地 (Artificial seawater medium, 以後 ASM) として、市販されている人工海水 (ダイゴ人工海水 SP, 和光純薬工業) を全海水塩濃度 0.7% : 0.7% ASM, 同 0.5% : 0.5% ASM, 同 0.3% : 0.3% ASM となるよう、それぞれ純水で希釈して培地を作製した。藻体増殖に必要であるものの、人工海水に含まれていない栄養塩類と微量金属 (KNO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, FeNaEDTA , H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) については、Chu13 改変培地と同濃度となるように添加した。

3.2.3 増殖速度の算出

増殖速度は、比増殖速度を求める次式で算出した。ここで M_{t_1} , M_{t_2} はそれぞれの時間 t_1 , t_2 (d) における藻体乾燥重量 (g L^{-1}) を表す。

$$\mu = \frac{\text{Ln}(M_{t_2} / M_{t_1})}{t_2 - t_1}$$

乾燥重量は次のように測定した。藻体を含む培養液をあらかじめ恒量を求めたガラス繊維濾紙 (GF/A 110-mm diameter, Whatman) で濾過し、濾紙上に残っている藻体を純水で洗浄した。洗浄後、 105°C で 1 時間乾燥し、乾重量を測定した。

3.2.4 炭化水素回収性の評価

炭化水素回収性の評価方法として、同抽出条件により測定した炭化水素回収率を用いた。炭化水素回収率は2章と同様に、一定量の藻体を乾燥し溶媒抽出・カラム精製により得られる藻体の炭化水素含有量に対する、同量の藻体を含む培養液に直接ノルマルヘプタンを添加し混合することで抽出される炭化水素量の比として定義した。

藻体の炭化水素含有量は以下のように求めた。藻体を含む培養液 1 ml を 16 ml のガラス製試験管の中で冷凍後、凍結乾燥した。乾燥藻体にノルマルヘプタンを加え 5 分間攪拌した。ノルマルヘプタン中の炭化水素量は、紫外可視分光光度計 (UV-1800, 島津製作所) で 200 nm の吸光度を計測することにより同定した [62, 63]。検量線は、凍結乾燥抽出物をシリカゲルカラムトグラフィー (ワコーゲル C-300, 和光純薬工業) に付し、炭化水素画分のみをノルマルヘプタンで溶出させたものを標準物質として作成した。この測定値を細胞外マトリクスに存在する炭化水素量とした。

藻体を含む培養液に直接ノルマルヘプタンを混合して炭化水素を回収する方法は、次の手順で行った。藻体を含む培地 1 mL と 10 ml のノルマルヘプタンを 16 ml のガラス製の試験管に混ぜ、60 秒間攪拌を行った。攪拌後、二層に分離するまで静置し、上層のノルマルヘプタン層に存在する炭化水素量を、同様に紫外可視分光光度計を用いて 200 nm の吸光度を計測することにより測定した。

3.2.5 コロニーサイズの測定

藻体を含む培養液をヘキサメタリン酸ナトリウム溶液中に入れ、ホモジナイザで 60 秒間分散した後に、レーザー回折・散乱式粒度分析計 (MT-3300EX II, 日機装) を用いてレーザー光線を照射し、その回折 (散乱光) を測定して粒度を求めた。

3.2.6 培養液の光透過率の測定

培地に含まれる汚れや不純物の影響を除き、藻体コロニーのみの光透過率の影響を見るために、20 μm のナイロン製プランクトンネットを濾布として吸引濾過し、培地と藻体コロニーの固液分離を行った。プランクトンネット上で純水を用いてリンス後、乾燥藻体濃度が 0.5 g L^{-1} 、 1 g L^{-1} 、 2 g L^{-1} となるように純水中に再分散させた。分光放射照度計 (MS-720, 英弘精機) の受光部上にシャーレを置き、濃度調整した藻体スラリーを深さ 1 cm となるように注いだ。そして受光部上から蛍光灯で照射し、藻体スラリー 1 cm 当たりの光合成有効放射波長域の光透過度を測定した。

3.3 結果および考察

3.3.1 培地海水塩濃度が増殖に及ぼす影響

各海水塩濃度の ASM および FM で培養された培養期間中の *B. braunii* の増殖曲線を図 3-1 に示す。また、継代培養を繰り返した培養 36–54 日での各培地培養藻体の最大比増殖速度を表 3-1 に示す。54 日間の培養期間中、FM と 0.3%ASM 間では増殖曲線に差は見られなかった。0.5%ASM では、FM および 0.3%ASM の区画より増殖速度が低下した。0.7%ASM では更に増殖が抑制された。初期植え継ぎ時の接種濃度は全ての培地区画で同一であり、54 日間合計の藻体合計増殖量は、FM : 5.5 g L^{-1} 、0.3%ASM : 5.7 g L^{-1} 、0.5%ASM : 4.7 g L^{-1} 、0.7%ASM : 3.9 g L^{-1} であり、増殖曲線から読み取れる速度と同一の傾向を示した。表 3-1 に示す培養 36–54 日の最大比増殖速度も、FM と 0.3%ASM の間に差はみられず、0.3%ASM では FM と比較して増殖が低下しないことが確認された。

次に、継代培養を繰り返した培養 36–54 日の炭化水素含有率を表 3-1 に示す。炭化水素含有率は塩濃度とともに増加傾向にあったものの、有意差はなかった。0.9%ASM で

培養した前章の結果とともに、低海水塩濃度下でも高海水塩濃度下でも ASM は炭化水素生産の代謝に影響を及ぼさないことが確認された。よって 0.3%ASM は増殖速度および炭化水素含有率においても FM と比較して低下しなかったため、増殖量と炭化水素含有率の積から求められる炭化水素生産速度も低下しないことが確認された。

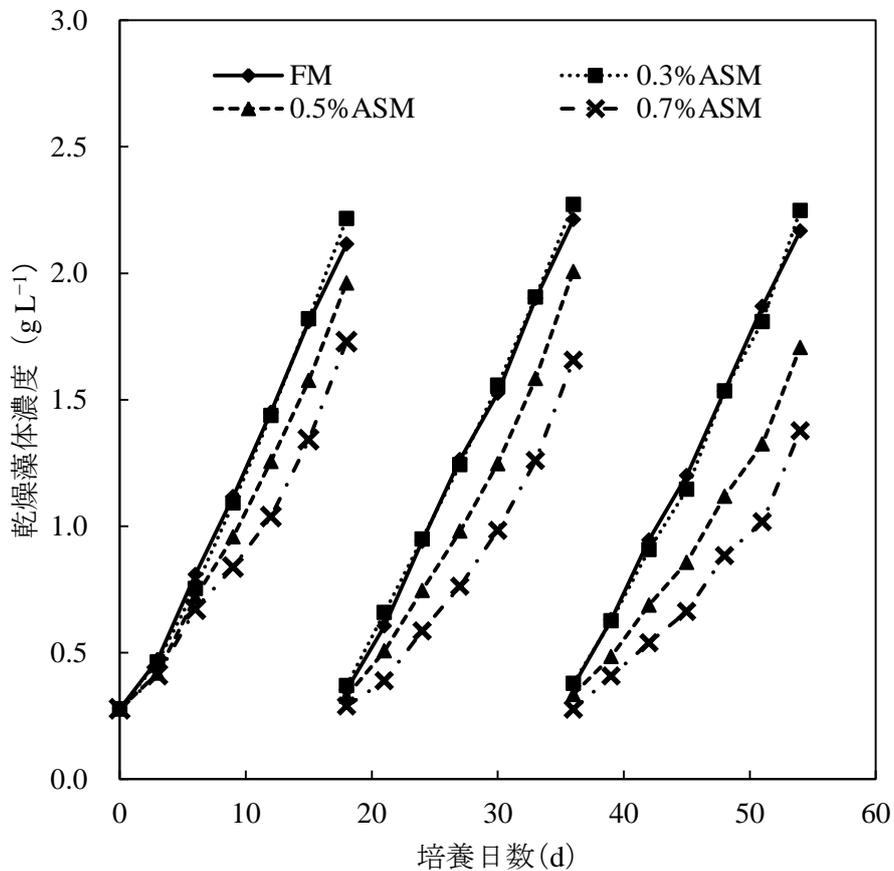


図 3-1. 18, 36 日目に継代培養した異なる海水塩濃度培地で培養した *B. braunii* の増殖曲線.

FM, 淡水培地 ; ASM, 改変希釈人工海水培地. (n = 3)

表 3-1. 培養 36–54 日の異なる海水塩濃度培地で培養した *B. braunii* の最大比増殖速度および炭化水素含有率.

FM, 淡水培地 ; ASM, 改変希釈人工海水培地. (n = 3, mean ± SD)

培地	最大比増殖速度 (day ⁻¹)	炭化水素含有率 (%)
FM	0.17 ± 0.01	35.4 ± 1.3
0.3%ASM	0.17 ± 0.01	37.5 ± 0.6
0.5%ASM	0.13 ± 0.01	37.9 ± 0.5
0.7%ASM	0.13 ± 0.01	39.3 ± 0.3

3.3.2 培地海水塩濃度が炭化水素回収性に及ぼす影響

次に培地海水塩濃度が炭化水素回収性に与える影響について述べる. 図 3-2 に各海水塩濃度培地での, 56 日間の培養期間中における炭化水素回収率の変化を示す. 全ての塩濃度培地において, 培養 6 日目から炭化水素回収率が上昇した. 0.7%ASM では, 培養 12 日目において炭化水素回収率は 90%を超えた. 全体の傾向として, 海水塩濃度が上昇するほど, 炭化水素回収性が向上することが確認された.

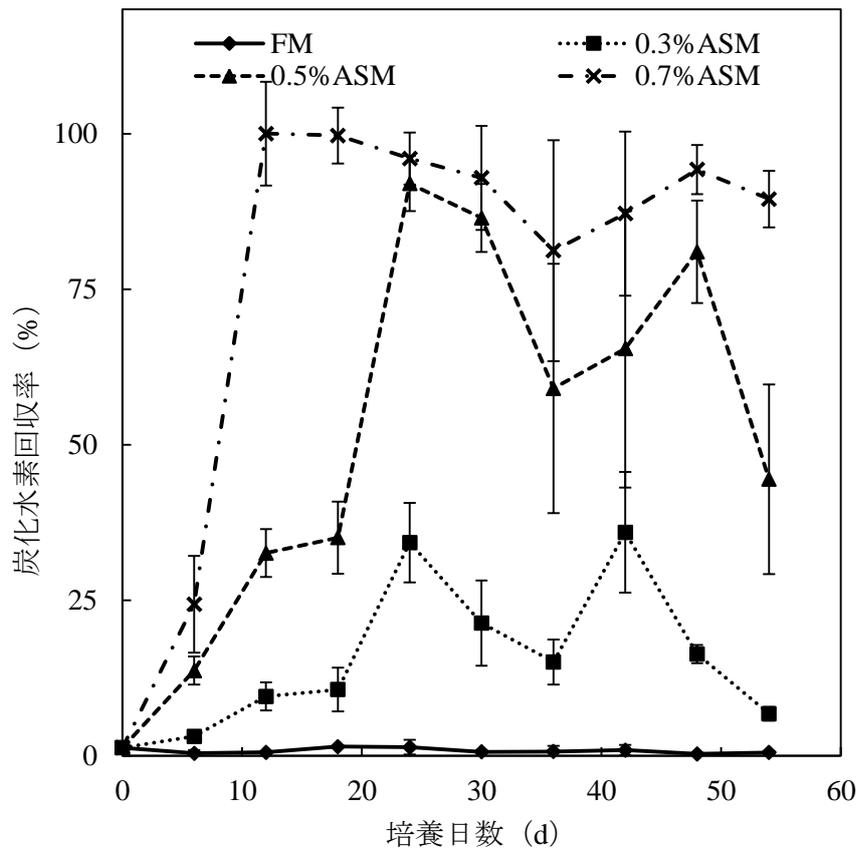


図 3-2. 異なる海水塩濃度培地で培養した *B. braunii* からの炭化水素回収率の経日変化. FM, 淡水培地; ASM, 改変希釈人工海水培地. (n = 3, mean ± SD)

また, FM で 54 日培養した藻体, 0.3%ASM で 54 日培養した藻体, FM で 54 日培養した藻体に 0.3%ASM と同量となるように海水塩を攪拌前に添加したサンプルで, 攪拌時間を延長し炭化水素回収率を測定し比較した (図 3-3). この実験で, 0.3%ASM の炭化水素回収性向上の確認および改変希釈人工海水培地に含まれる塩が抽出時に有機溶媒の溶媒相と海水塩を含む水相間に, 極性の変化や分配係数の変化等の化学的作用をもたらすことにより, 炭化水素回収性が向上する現象が引き起こされている可能性を検証

した。

図 3-2 に示すように、0.5%ASM および 0.7%ASM においては 1 分間の攪拌時間でも炭化水素回収率は FM と比較して大幅に向上することが確認されたが、0.3%ASM では炭化水素回収率の顕著な向上は確認されなかった。そのため攪拌時間を 3 時間に延ばし、FM と炭化水素回収率を比較した。FM 培養藻体は攪拌時間を延長しても、炭化水素回収率はほとんど変化せず、3 時間の攪拌でも 1%以下の回収率であった。一方で 0.3%ASM 培養藻体では、3 時間の攪拌時間で 90%を超える回収率が得られた。0.3%ASM においても FM と比較して炭化水素回収性が顕著に向上していることが確認された。前節の結果と合わせると、0.3%ASM は、炭化水素生産速度が維持されており、炭化水素回収性も大幅に向上する結果が得られたため、当初の目的であった希釈海水培養法を用いた炭化水素生産システムにおいて適切な海水塩濃度培地であるといえる。本実験で炭化水素回収実験を行った藻体サンプルの濃度は培養液の状態であるため極めて低く、含水率が 99.7–99.9 wt% という条件である。藻体スラリーの含水率を減らすと炭化水素回収性が向上することが報告されており [44]、バイオ燃料生産を考えた溶媒抽出プロセスでも、ハンドリングやエネルギー収支の観点から濃縮藻体スラリーから炭化水素の回収が行われている [48]。バイオ燃料生産を目的とし、0.3%ASM 培養藻体からの炭化水素回収を考える場合、濃縮藻体からの炭化水素回収性を評価する必要がある。

また、FM で 54 日培養した藻体に 0.3%ASM と同量となるように海水塩を攪拌前に添加したサンプル (FM + salt) の炭化水素回収率は、3 時間の攪拌時間においてもほとんど変化せず、FM と同様の傾向を示した。海水培地に含まれる塩が、抽出時に有機溶媒の溶媒相と海水塩を含む水相間に、極性の変化や分配係数の変化等の化学的作用をもたらすことにより、炭化水素回収性が向上するのであれば、FM + salt サンプルの回収率は 0.3%ASM と同様の傾向を示すと考えられる。しかし、FM + salt での回収率の傾向は FM と同様であったため、炭化水素回収性の向上は希釈海水培養による藻体の生物学的

変化に由来するものと考えられる。特に *B. braunii* は炭化水素を細胞外マトリクス内部に蓄える特徴をもつことから、そのマトリクスが溶媒と炭化水素の接触を妨げているのであれば、マトリクスの構造や化学特性が変化している可能性がある。

前章の 0.9%ASM における炭化水素回収性を評価する実験で、藻体に対する有機溶媒の量が本章の実験よりも少ない方法で、炭化水素回収率が 90%を超えているので、0.9%ASM は 0.7%ASM と同等もしくはそれ以上に、炭化水素回収性を向上させる効果があると考えられる。これは培地の海水塩濃度が炭化水素回収性に影響を及ぼすという本実験結果と同様であった。しかし、0.9%ASM の実験では 35 日間の培養では炭化水素回収率は最大とならず、植え継ぎ時より 70 日培養した藻体において炭化水素回収率が最大となり、本実験の結果よりも炭化水素回収性の向上効果が完全に現れるまでに長い培養時間を必要とした。炭化水素回収性向上の現象が生物学的変化に由来すると考えられ、0.9%ASM では著しく増殖が遅くなっていることを鑑みると、増殖とともに、細胞外マトリクスの構造や化学特性が変化している可能性がある。

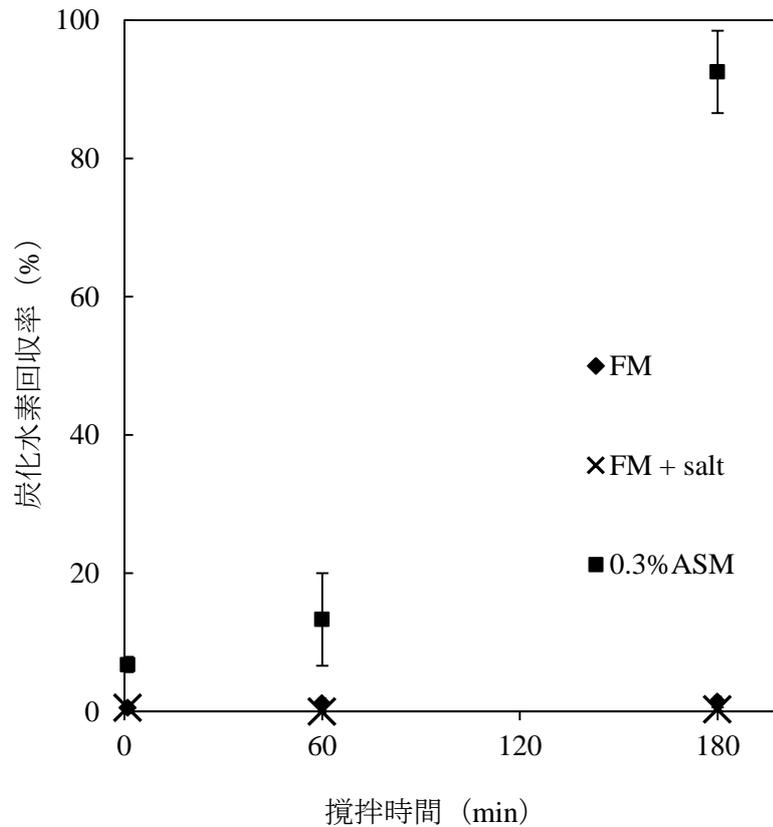


図 3-3. 溶媒抽出の攪拌時間が *B. braunii* からの炭化水素回収率に及ぼす影響。
 FM, 淡水培地 (FM) で 54 日培養した藻体 ; FM + salt, FM で 54 日培養した藻体に 0.3%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.3%ASM) と同量の海水塩を攪拌試験前に培養液に添加した藻体 ; 0.3%ASM, 0.3%ASM で 54 日培養した藻体. (n = 3, mean ± SD)

3.3.3 *B. braunii* の増殖段階が炭化水素回収性に及ぼす影響

B. braunii の増殖曲線 (図 3-1) と藻体からの炭化水素回収率 (図 3-2) のグラフを同時に比較すると次のことがわかる。培養の継代は 18 日と 36 日に行ったので、24 日および 42 日はまだ増殖初期である。一方、36 日および 54 日は増殖後期であり、増殖は

定常期に近づいていると考えられる。0.3%ASM および 0.5%ASM において後期 (36 日, 54 日) における炭化水素回収率が初期 (24 日, 42 日) の回収率よりも低い値を示している。増殖段階で炭化水素回収性が変化する現象が, 藻体の増殖による溶媒と藻体量の比の変化, もしくは藻体の生理状態のいずれかによることを確認するため追加実験を行った。

0.3%ASM で 42 日培養した藻体の濃度は 0.9 g L^{-1} であり, 54 日では 2.2 g L^{-1} であった。ここで 54 日培養した藻体を 0.3%ASM で 2 倍に希釈して藻体濃度を 1.1 g L^{-1} とし, 炭化水素回収性を評価した。もし, 増殖段階で炭化水素回収性が変化する現象が溶媒と藻体量の比の変化によるものであれば, 炭化水素回収率は上昇し 42 日培養した藻体に近い炭化水素回収率が得られるはずである。実験の結果を表 3-2 に示す。42 日培養した藻体 (藻体濃度: 0.9 g L^{-1}) の炭化水素回収率は 35.9%, 54 日培養した藻体 (藻体濃度: 2.2 g L^{-1}) では 6.8% であった。54 日培養し培地で藻体濃度を 2 倍に希釈した場合の炭化水素回収率は 9.8% であり, 希釈による炭化水素回収率の変化は小さかった。よって, 増殖段階で炭化水素回収性が変化する現象は, 増殖に伴う藻体藻体の生理状態の変化によるものであると考えられる。増殖に伴う藻体の生理状態の変化に伴って, 脂質の抽出性が変化することは他の藻体においても知られており, *Chlamydomonas* では脂質を蓄積し始める窒素欠乏状態 (増殖後期) において, 細胞壁が厚くなる [64]。 *B. braunii* においても, 培養液中に分泌し粘度を増大させる細胞外糖類が, 窒素欠乏が起こる増殖後期により多く分泌されることが確認されている [65]。前章では希釈海水培養による糖類の代謝変化が炭化水素回収性の向上に影響を及ぼしていることが示唆されており, 増殖段階における炭化水素回収性の変化も細胞外糖類の生産性の変化に由来する可能性が高いことが示唆された。一方で, 増殖段階で炭化水素回収性が変化する現象は, 細胞外マトリクスを構成する炭化水素の生産が少ないことに由来する可能性も考えられる。 *B. braunii* は, フェルネシルニリン酸からスクアレンおよび C_{30} botryococcene を生産する。

C₃₀ botryococcene はメチル化され油滴 (botryococcene 類) として細胞外マトリクス内に蓄積される。しかしながらスクアレン由来の物質が油滴として細胞外マトリクス内に存在する量は微量であり、スクアレンはエポキシ化されることで、膜ステロールや細胞外マトリクスのバイオポリマーとなる [66]。スクアレン合成酵素の活性が培養後期で高いこととは対照的に、C₃₀ botryococcene 合成酵素の活性は培養初期に高いと報告されている [22]。そのため培養初期ではバイオポリマーとなるスクアレンの合成に比べて、C₃₀ botryococcene の合成が活発になり、バイオポリマーの量に対して油滴として存在する炭化水素 (botryococcene 類) の量の割合が大きくなることも考えられる。その結果として、抽出溶媒と炭化水素の接触が容易になり、培養初期の藻体からの炭化水素回収率が培養後期の藻体と比較して、高くなった可能性が考えられる。

表 3-2. *B. braunii* の増殖段階が藻体からの炭化水素回収率に与える影響。

A) 0.3%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.3%ASM) で 54 日培養した藻体 (藻体濃度は 2.2 g L⁻¹)。 B) 0.3%ASM で 54 日培養し藻体濃度を培地で 2 倍に希釈した藻体 (藻体濃度は 1.1 g L⁻¹)。 C) 0.3%ASM で 42 日培養した藻体 (藻体濃度は 0.9 g L⁻¹)。

サンプル	炭化水素回収率 (%)
A	6.8%
B	9.8%
C	35.9%

3.3.4 培地海水塩濃度が *B. braunii* コロニーの形態に及ぼす影響

0.3–0.7%ASM の希釈海水培養で炭化水素回収性が向上したが、同時に藻体の形態にも変化が認められた。各海水塩濃度の ASM 培地で 54 日培養した藻体のコロニー粒度分布を表 3-3 に示す。0.3%ASM における平均中央粒径 (d50%) は 210.6 μm であり、FM での平均中央粒径 63.2 μm と比較して 3 倍以上増大した。また FM の平均 d90% (92.9 μm) が、0.3%ASM の平均 d10% (122.5 μm) より小さいことから、一部のコロニーの粒径が大きくなったことによる中央粒径の増大でなく、粒度が全体的に増大していることが分かる。塩濃度が高い 0.5%ASM と 0.7%ASM の間では差はみられないが、これらを FM および 0.3%ASM と比較すると、更にコロニー粒径が増大している。コロニー粒径が増大した 0.3%ASM 培養藻体と FM 培養藻体の光学顕微鏡写真を図 3-4 に示す。FM で培養した藻体コロニーより、0.3%ASM で培養した藻体コロニーの方が明らかに大きい。粒度分布の結果が、光学測定による見かけ上の粒度増大ではなく、実際にコロニーサイズが増大していることが確認された。

本研究で用いた人工海水の成分 (36 g L^{-1}) の 57.6wt% が塩化ナトリウムであり、0.3%ASM と 0.7%ASM にはそれぞれ 30 mM, 70 mM の塩化ナトリウムが含まれている。40 mM のグルコースが含まれている培地で *B. braunii* B race に分類される株を培養したところ、暗期完全従属培養と光照射下での混合培養の両方で、コロニーが増大したという報告がある [67]。コロニーが増大した培地中のグルコースの浸透圧は、本実験で用いた人工海水の食塩のみの浸透圧と比較しても低い値である。そのためコロニー増大には淡水培地の浸透圧よりも高い培地浸透圧が有効である可能性が考えられる。

表 3-3. 異なる海水塩濃度培地で 54 日培養した *B. braunii* コロニーの粒度分布.

FM, 淡水培地 ; ASM, 改変希釈人工海水培地. (n = 3)

培地	粒度分布 (μm)		
	d10%	d50%	d90%
FM	46.5	63.8	94.8
	47.2	63.3	92.4
	46.9	62.7	91.3
0.3%ASM	135.4	219.9	319.4
	127.0	217.5	315.2
	105.0	194.4	278.1
0.5%ASM	217.0	284.4	392.5
	224.1	293.1	405.0
	200.0	261.5	351.5
0.7%ASM	210.4	279.2	377.7
	223.0	293.0	409.6
	196.4	261.0	348.4

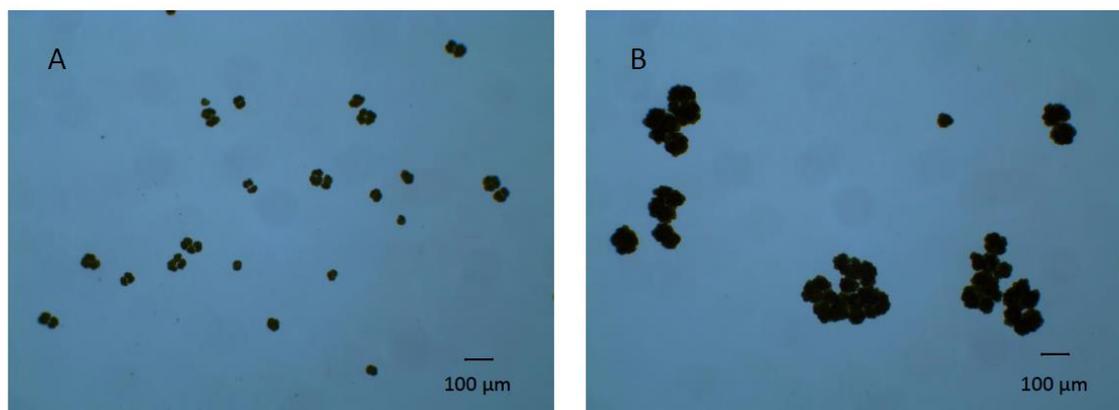


図 3-4. A) 淡水培地 (FM) 培養藻体と B) 0.3%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.3%ASM) で培養した *B. braunii* の光学顕微鏡によるコロニーサイズの比較.

コロニーサイズの増大は、バイオ燃料生産を目的とし商業的に *B. braunii* を大量培養した際に、培養池からの収穫時における固液分離を容易にする。バイオ燃料生産システムにおける投入エネルギーと設備、作業コストについて、収穫工程の占める割合が多いことは知られており、凝集剤を添加せずにコロニーサイズを増大させることは非常に重要な要素である [68, 69]。コロニーサイズの増大が固液分離を容易にすることを確かめるため、重力濾過であるウェッジワイヤースクリーン素子を用いた傾斜型固液分離試験を行ったところ、0.3%ASM で培養した藻体コロニーは含水率約 78%の粘性スラリーが網上に回収された。一方で、FM で培養した藻体はスリット間隔を狭くしないと重力濾過ではほとんど固液分離できず、得られた網上回収物も全て濃度が薄いスラリーであった。この重力濾過実験の詳細については 5 章で述べる。

更にコロニーの浮上により濾過エネルギーを低減できる可能性がある。各培地で培養した藻体の浮上性を図 3-5 に示す。全ての海水塩濃度 ASM において、10 分間の静置後、分散したコロニーの大部分が浮上した。一方で、FM で培養したコロニーも、10 分経過

後に若干のコロニーが浮上したが、大部分がまだ分散していた。浮上性の向上は、海水添加による培地比重の増加による可能性、もしくは有意差は得られなかったものの炭化水素含有率が増加傾向にあったため藻体比重の低下による可能性が考えられる。いずれにしても、浮上性の向上により、濃縮された上層のみを回収することができれば、原液の濃度が上昇し、収穫時の処理量が減るため、濾過に要するエネルギーと設備、作業コストが削減される。

図 3-5 の左写真におけるサンプル 1) FM 培養藻体と、サンプル 2) 0.3%ASM 培養藻体では藻体濃度はほぼ等しいにもかかわらず (図 3-1)、光透過率が異なるように見える。そこで FM 培養藻体と 0.3%ASM 培養藻体の、光合成有効放射波長域の光透過率を測定した (表 3-4)。0.3%ASM の方が、同濃度の FM と比較して透過率が大きいことが確認された。例えば地表面における真夏の昼の PPFD を $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と仮定すると、0.3%ASM で培養した藻体濃度 1 g L^{-1} のスラリーは深さ 11 cm 以下であれば $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上が得られ、20cm 以内の深さであれば $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ が得られる。一方で、FM で培養した藻体濃度 1 g L^{-1} のスラリーは、 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上が得られるのは、わずか 6cm 以内であり、 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ が得られるのは深さ 11 cm 以内となり、同程度の光が届く距離は 0.3%ASM と比較して半分程度になる。そのため、培養池の水深をより深くすることが可能となり、日中や夜間の温度変化を少なくすることができると考えられる。

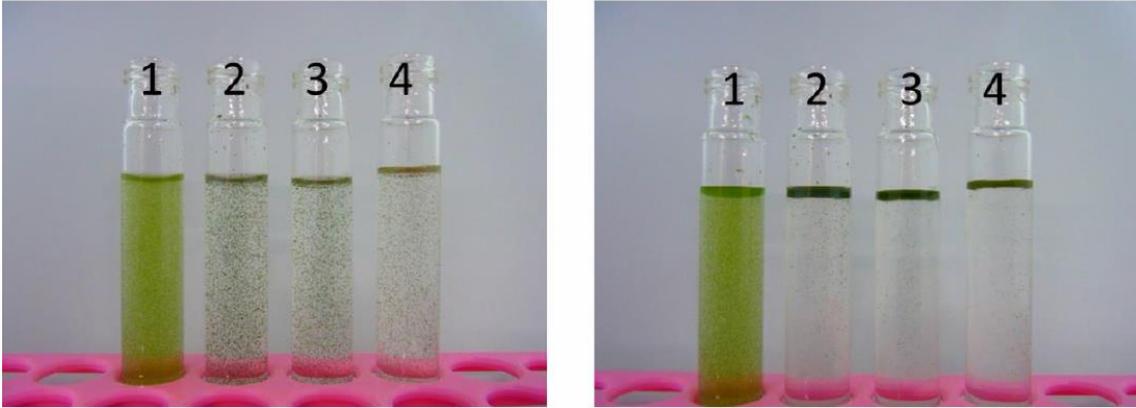


図 3-5. 異なる海水塩濃度培地で培養した *B. braunii* のコロニーサイズおよび浮上性の比較.

1) 淡水培地 (FM) 培養藻体. 2) 0.3%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.3%ASM) 培養藻体. 3) 0.5%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.5%ASM) 培養藻体. 4) 0.7%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.7%ASM) 培養藻体.

左の写真は攪拌後すぐに撮影. 右の写真は攪拌 (左の写真) 後 10 分間静置し撮影.

表 3-4. 希釈海水培養によりコロニーサイズが変化した *B. braunii* スラリー1 cm の光合成有効放射波長域の光透過率.

スラリーの藻体濃度は透過率測定時に 0.5 g L^{-1} , 1.0 g L^{-1} , 2.0 g L^{-1} となるように調整. FM, 淡水培地; 0.3%ASM, 0.3%海水塩濃度希釈人工海水培地.

培地	藻体濃度 (g L^{-1})	光透過率 (%) (%)
FM	0.5	82.6
	1.0	63.8
	2.0	37.1
0.3%ASM	0.5	90.5
	1.0	77.1
	2.0	53.8

3.4 まとめ

B. brauni の増殖速度を維持しつつ、溶媒抽出による炭化水素回収性を向上させることが可能な培地海水塩濃度が存在する可能性を検証した。0.3%海水塩濃度の希釈海水培地では、増殖速度と炭化水素含有率に低下はみられなかったが、0.5%以上の海水塩濃度の希釈海水培地では増殖が抑制された。一方で、増殖が抑制されない 0.3%海水塩濃度の希釈海水培地を含めた全ての塩濃度培地において、培養 6 日目から淡水培地と比較して炭化水素回収率が上昇した。0.7%海水塩濃度の希釈海水培地では、培養 12 日目において炭化水素回収率は 90%を超えた。全体の傾向として、海水塩濃度が上昇するほど、炭化水素回収性が向上することが確認された。また希釈海水培養は、浸透圧に起因すると考えられるコロニーサイズの大幅な増大をもたらし、その平均粒径は淡水培養と比較して 3 倍以上に増大した。また希釈海水培養により、コロニーの浮上性も向上した。コロ

ニーサイズの増大および浮上性の向上は濾過工程に要するエネルギーと設備，作業コストを削減する．そのため，希釈海水培養は，溶媒抽出プロセスにおける投入エネルギーと設備，作業コストを削減するだけでなく，培養池からの収穫プロセス，溶媒抽出前の脱水プロセスにおいてもプロセス投入エネルギーと設備，作業コストを削減すると期待される．さらにコロニーサイズの増大により培養時の藻体スラリーの光透過率が向上したため，培養池の水深をより深くすることが可能となり，日中や夜間の温度変化を少なくし，安定的に培養することができると考えられる．

第4章 希釈海水培養による *B. braunii* からの炭化水素回収性向上のメカニズム

4.1 研究背景および目的

4.1.1 *B. braunii* コロニーの表面構造

B. braunii は生産した炭化水素の大部分を細胞外に分泌し、親油性ポリマーと考えられている細胞外マトリクスに蓄積する [29]. しかし、湿藻体をノルマルヘキサンのような抽出溶媒と単純に接触させるだけでは、炭化水素は容易に抽出されない [44]. 細胞外マトリクス内部は、細胞分裂時に生産される、炭化水素を含む 3-6 層の”thin layer (以後, TL)”と呼ばれる構造によって構成されており、それらが細胞間を繋いでいる [33]. コロニー表面は”retaining wall (以後, RW)”と呼ばれる構造物に覆われ、さらに繊維状物質で構成される”colony sheath (以後, CS)”がコロニー最外周を覆っている [70, 71]. 1980 年に、CS の一部である繊維状物質が電子顕微鏡で細胞先端部に存在することが発見され、ルテニウムレッド染色でコロニーの一部外周が染色されたことから、繊維状物質は細胞間で連続していると考えられた [29]. その後、RW および CS が細胞先端部のみでなくコロニー全体を覆っていることが示された [71]. さらに、急速凍結および凍結置換法を用いた電子顕微鏡観察により、細胞分裂後、細胞頭頂部の RW および CS と、細胞外マトリクス上の RW および CS は異なる動きをすることが判明した [70]. 細胞分裂後、細胞頭頂部の RW および CS はコロニーから外れ新しいものと置き換わるが、細胞外マトリクス上の RW および CS は分裂後でも維持されることが確認されている. *B. braunii* のコロニー表面構造の概略を図 4-1 に示す.

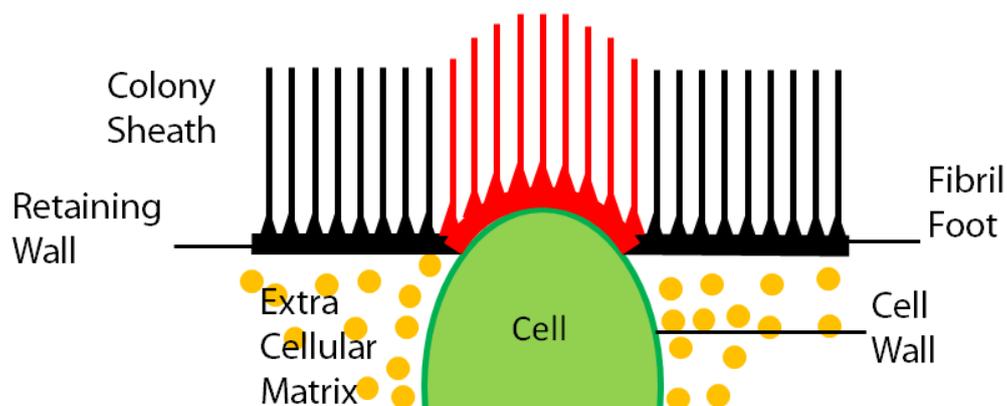


図 4-1. *B. braunii* コロニーの表面構造の概略図.

赤色部，細胞分裂時に更新される Retaining wall および Colony sheath；円形黄色部，細胞外マトリクス内に存在する炭化水素の油滴.

4.1.2 研究目的

前章において，希釈海水培養が *B. braunii* からの炭化水素回収性を向上させる原因として，細胞分裂および糖類が関わっていることが示唆された．培養中にコロニーから外れ培地中に放出される RW および CS を集め（図 1-1 の赤色部），その組成を解析したところ 97%以上が糖であることが確認されている [71]．また，PAS 染色の一種である銀へキサミン反応を用いた顕微鏡観察で，RW は陽性反応を示さなかったが，CS の繊維状物質が陽性を示したため，CS は糖類であると推定されている [70]．そのため抽出溶媒と単純に接触させるだけでは，炭化水素が容易に抽出されないという *B. braunii* の特徴は，この糖類からなる層が親水的な層として働き，結果的に抽出溶媒がコロニー内部に入り込むのを妨げているためと推測される．その仮定が正しければ，希釈海水培養

で炭化水素回収性が向上する理由として、海水塩の影響により繊維層が剥がれやすくなる、もしくは繊維層の生産が落ちることで、炭化水素を含む細胞外マトリクスが露出していることが考えられる。そこで本研究では、希釈海水培養時のコロニー表面の変化を調べ、希釈海水培養が *B. braunii* からの炭化水素回収性を向上させるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

4.2 研究方法

4.2.1 試料および培養方法

2, 3 章と同様に **B race** に属し、 C_{34} botryococcene を主成分とするトリテルペン系の炭化水素を生産する *B. braunii* (Showa strain) を用いた。藻体培養はインキュベータ内で 1.5 L のガラス製培養瓶 (ルー瓶) を用いて行った。培養温度は 25°C に調整し、1.0% の二酸化炭素富化空気を、塵や微生物の混入を防ぐため HEPA フィルターを通した後、藻体攪拌及び二酸化炭素供給のため培養瓶底部より培養瓶内に供給した。PPFD は培養瓶の表面近傍測定で約 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となるように調整し、明暗周期を 12 時間とした。各継代期を 18 日とし、培養後に藻体を含む培地 200 ml を新しい培地 1000 ml 内に入れて繰り返し培養した。

4.2.2 培地

2, 3 章と同様に淡水培地として Chu13 改変培地 (Freshwater medium, 以後 FM) を用いた。改変希釈人工海水培地 (Artificial seawater medium, 以後 ASM) として市販されている人工海水 (ダイゴ人工海水 SP, 和光純薬工業) を全海水塩濃度 0.9% : 0.9% ASM, 同 0.7% : 0.7% ASM, 同 0.5% : 0.5% ASM, 同 0.3% : 0.3% ASM となるよう、それぞれ

純水で希釈して培地を作製した。藻体増殖に必要であるものの、人工海水に含まれていない栄養塩類と微量金属 (KNO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, FeNaEDTA , H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) については、Chu13 改変培地と同濃度となるように添加した。

4.2.3 培地中に放出された糖量の測定

培養後の藻体を含む培養液をフィルターユニットに通した後、濾液を回収した。濾液内に放出された糖量は、D-グルコースを標準物質としてフェノール硫酸法を用いて測定した [72]。10 ml のガラス試験管に、400 μl の濾液と 400 μl の 5% フェノール水溶液を入れた。その混合液中に 2 mL の 98% 濃硫酸を直接液面に滴下するよう急速に加え、攪拌後 30°C のウォーターバス中で 60 分間安定化させた後、485 nm の波長で吸光度を測定した。

4.2.4 熱水による糖抽出および組成分析

藻体を含む培養液を 20 μm のナイロン製プランクトンネットを濾布にして吸引濾過し、培地と藻体コロニーの固液分離を行った。藻体をプランクトンネット上で純水を用いてリンス後、含水率 95 wt% の藻体スラリーとなるように純水で調整した。含水率は含水率計 (MX-50, A&D) を用いて測定した。藻体スラリーを 50 mL のプラスチック製遠沈管に 12 g ずつ分注し、85°C で 20 分間加熱した。加熱サンプルを遠心分離し (2320 g, 10 分間) , 下層の液体 5 g をマイクロシリンジで引き抜いた。同量の純水を加えた後、再び下層を引き抜き、この操作を計 3 回繰り返し行った。抽出物は凍結乾燥し、4% の希硫酸下で加水分解を行った [73]。中性糖であるグルコース、ガラクトース、アラ

ビノース, マンノースの構成は, 高速液体クロマトグラフ (LC-20, 島津製作所), SP0810 カラム (Shodex), 示差屈折検出器 (RID-10A, 島津製作所) を用いて測定した.

4.2.5 藻体に含まれる二糖代謝物の測定

藻体を含む培養液を 20 μm のナイロン製プランクトンネットを濾布にして吸引濾過し, 培地と藻体コロニーの固液分離を行った. プランクトンネット上で純水を用いてリンス後, 酵素を不活性化させるために, 液体窒素を用いて急速冷凍した. 冷凍サンプルを乳鉢で磨り潰した, サンプル (100 mg) を 300 μl のメタノールに加えた. ジルコニアビーズを 1 粒加え, 25 Hz で 2 分間ホモジナイズし (TissuLyser, QIAGEN), 1 時間後, 同条件で再びホモジナイズした. 4°C の低温条件下で 10 分間遠心分離した後, 上清に 75% メタノールを加え 6 倍に希釈し, 脂質を除去した水溶性代謝物の抽出サンプルとした.

スピンカラム (MonoSpin C18, GL Sciences) のコンディショニングは以下の手順で行った. 1) 100 μl のメタノールを加えて遠心分離 (5000 g, 2 分間, 4°C). 2) 100 μl の水を加え遠心分離 (5000 g, 2 分間, 4°C). 3) 200 μl の 75% メタノールを加え遠心分離 (5000 g, 2 分間, 4°C). 4) 200 μl を除去. コンディショニングを終えたスピンカラムに抽出液を加え, 遠心分離 (5000 g, 2 分間, 4°C) した後, 0.2 μm PTFE フィルターを通した濾液を LC-Orbitrap-MS で測定した. LC-Orbitrap-MS は LTQ OTBITRAP XL (Thermo fisher scientific), Aglient 1200 system (Aglient Technology), TSK-GEL カラム (TOSOH, ODS-100V, 5 μm , 3.0 mm I.D. \times 50 mm) で構成した.

4.2.6 蛍光顕微鏡および電子顕微鏡による観察

蛍光顕微鏡による藻体コロニーの観察のため、藻体スラリーに対して、1 mM のナイルレッドを溶解させたジメチルスルホキシドを 0.5 vol% となるように加え、10 分間浸漬した。観察には蛍光顕微鏡 BX51, FITC フィルター（オリンパス）を用いた。

電子顕微鏡観察は以下の手順で行った。藻体スラリーを付けたフォルムバル膜を直径 8 mm のワイヤーループに乗せ、液体プロパンで急速冷凍した。凍結試料を 3% の酸化オスミウム (VIII) および 0.2% の酢酸ウラニルを含むアセトンに -85°C 下で 72 時間浸漬した。凍結試料の温度を 4°C に上昇後、室温で 3% の酸化オスミウム (VIII) および 0.2% の酢酸ウラニルを含む新しいアセトンに 1 時間浸漬した。サンプルをアセトンで洗浄した後、徐々に樹脂置換し、 60°C で重合化させた。クエン酸鉛で 10 分染色後、切片を透過型電子顕微鏡 (JEM-1230, JEOL) にて観察した。

4.2.7 炭化水素回収性の評価

炭化水素回収性の評価方法として、同抽出条件により測定した炭化水素回収率を用いた。炭化水素回収率は 2, 3 章と同様に、一定量の藻体を乾燥し溶媒抽出・カラム精製により得られる藻体の炭化水素含有量に対する、同量の藻体を含む培養液に直接ノルマルヘプタンを添加し混合することで抽出される炭化水素量の比として定義した。

藻体の炭化水素含有量は以下のように求めた。藻体スラリーを凍結乾燥した後、超音波中でノルマルヘキサンに浸漬した。ノルマルヘキサンは細胞外マトリクスに炭化水素と共存する色素により黄色に着色する。これをナス型フラスコに移し回収した。この操作をノルマルヘキサンの着色がなくなるまで繰り返し行い、色素および炭化水素を含む全てのノルマルヘキサン層を集めた。回収したノルマルヘキサン層をロータリーエバポレーターで減圧蒸留した後、残存物をノルマルヘキサンを展開溶媒としてシリカゲルカ

ラムクロマトグラフィー（ワコーゲル C-300，和光純薬工業）に付し，炭化水素画分のみを溶出させた．シリカゲルカラムを通過した炭化水素を含むノルマルヘキサンを再度減圧蒸留し，24 時間減圧したデシケーターの中で乾燥した後，残存した無色透明で粘性のある炭化水素を，細胞外マトリクスに存在する藻体炭化水素含有量として重量測定した．

湿藻体にノルマルヘプタンを直接混合して抽出された炭化水素量は以下の手順で測定した．藻体を含む培養液を 20 μm のナイロン製プランクトンネットを濾布にして吸引濾過し，培地と藻体コロニーの固液分離を行った．抽出するための藻体スラリーは，プランクトンネット上で純水を用いてリンス後，純水を加えて乾燥藻体濃度が 4.1 g L^{-1} となるよう調整した．16 ml のガラスチューブに 5 ml のノルマルヘプタンと藻体スラリーを入れ，300 rpm，傾き 70° の条件下で攪拌機（MMV-1000W，東京理化機械）を用いて 1 分間攪拌した．二層分離するまで静置し，上層のノルマルヘプタン中に含まれる炭化水素量を GC-FID（GC-2014，島津製作所），Rtx-1 キャピラリーカラム（島津製作所）を用いて測定した．溶媒中の炭化水素量は，凍結乾燥物から抽出された精製後の炭化水素のピークと比較して，炭化水素のピークとして検出されたピークの面積を合計して求めた．カラムの昇温条件は以下のように設定した．1) 50°C，1 分間保温．2) 50–220°C，10°C 分^{-1} 昇温．3) 220°C，3 分間保温．4) 220–260°C，2°C 分^{-1} 昇温．4) 260°C，3 分間保温．

4.3 結果および考察

4.3.1 希釈海水培養が *B. braunii* のコロニー表面物質に及ぼす影響

培養 18 日で一度継代し，18–36 日の間に培地に放出した糖量の測定結果を図 4-2 に示す．希釈海水培養が *B. braunii* からの炭化水素回収性を向上させる原因が，CS や RW

からなるコロニー表面層が剥がれやすくなったためである, すなわち主に糖類から成る繊維層 (CS) が剥がれやすい状態に変化していたためであるとする, 培地中に放出された糖量は, 培地海水塩濃度の増加とともに上昇する, もしくは変化しない傾向を示すはずである. しかし, 培地中に放出された糖量は海水塩濃度上昇とともに減少した (Kruskal-Wallis, $P < 0.01$). この結果から, CS 層は生産されているにも関わらず剥がれにくい状態になっているか, 生産量が減少していると推定される.

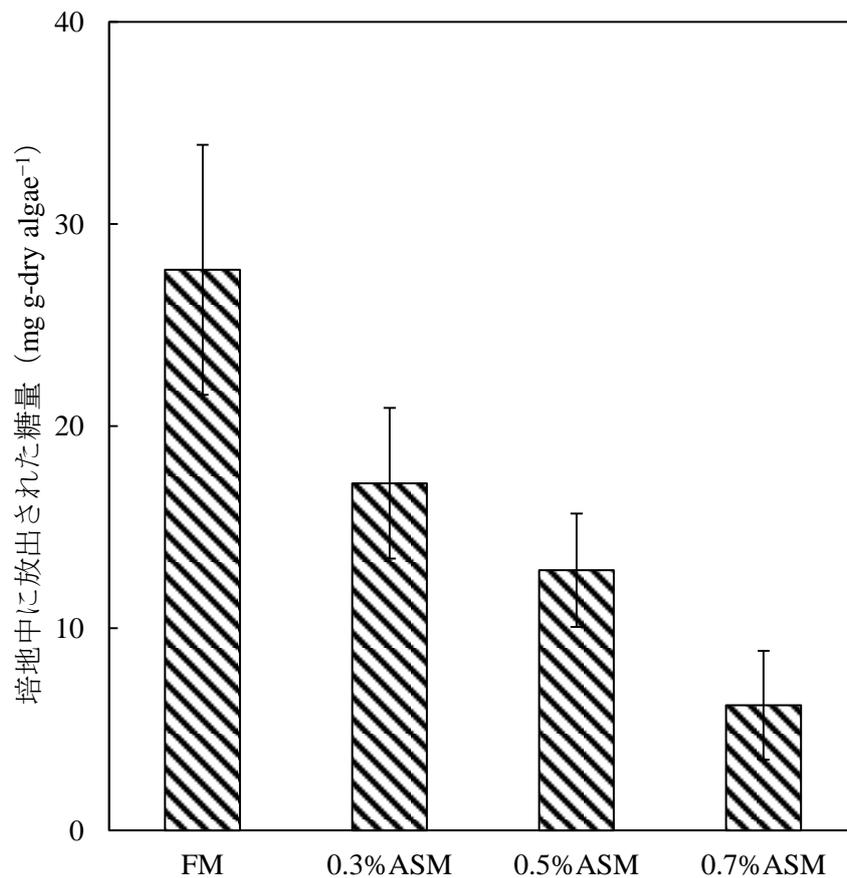


図 4-2. 異なる海水塩濃度培地で *B. braunii* を培養し 18-36 日の培養期間中に培地中に放出された糖量.

FM, 淡水培地; ASM, 改変希釈人工海水培地. ($n = 3$, mean \pm SD)

そこで糖類の生産量と組成を調べるために、同様に 18 日で一度継代し 36 日まで培養した藻体コロニーを加熱することで、糖類を熱水抽出し、熱水抽出物の単糖構成を調べた。その結果を図 4-3 に示す。抽出糖を構成する単糖成分の中で、グルコースは海水塩濃度の上昇とともに上昇傾向を示したが、一方でガラクトース、アラビノースは減少した。ガラクトース、アラビノースは培養中に藻体コロニーから分離する RW および CS (図 4-1 の赤色部) の 81% を占める主成分であり [71]、ASM 培養で CS を構成している繊維状物質の生産が減少した可能性が高いと考えられる。また FM で培養した藻体からの糖類を含む熱水抽出物は、両親媒性をもち、炭化水素抽出時に、ヘキサンをエマルジョン化して抽出を妨げる [48, 74]。これらのことから、希釈海水培養が *B. braunii* からの炭化水素回収性を向上させる原因が CS 生産の減少であることが示唆された。

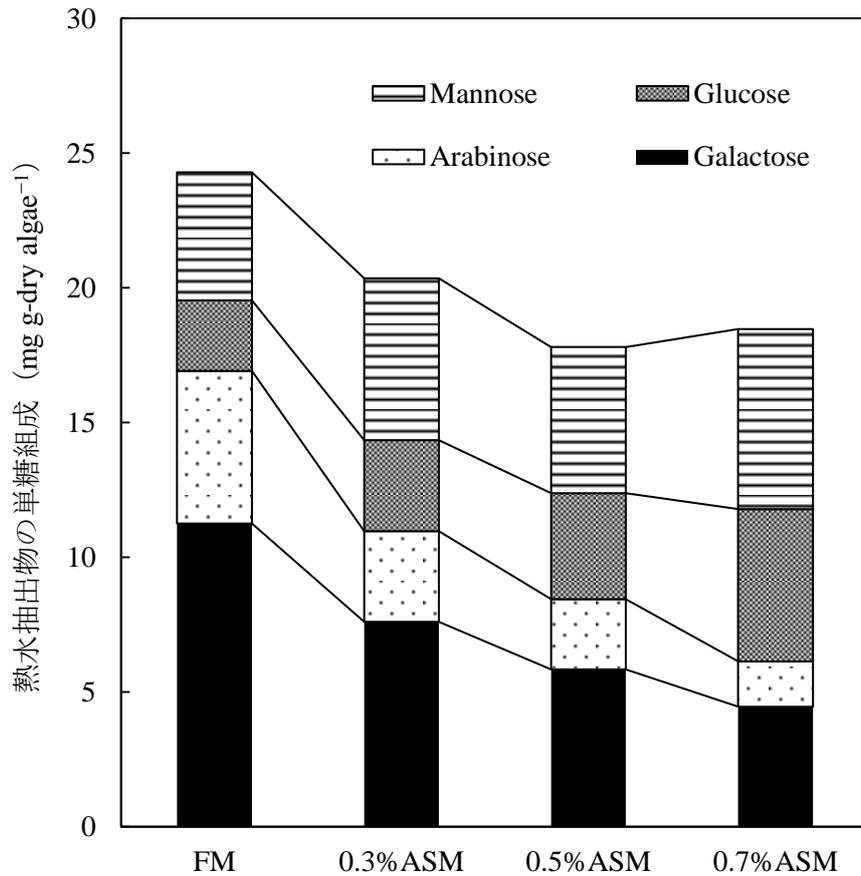


図 4-3. 異なる海水塩濃度培地で培養した *B. braunii* から熱水抽出したものの単糖組成. FM, 淡水培地 ; ASM, 改変希釈人工海水培地.

4.3.2 二糖代謝物の変化

A race に分類される *B. braunii* において、培地の塩濃度の増加とともに、グルコース二分子が β 1-3 結合した α -ラミナリボースが比例的に増加し、この二糖類が浸透圧調整物質として働いていると報告されている [75]. そこで全水溶性代謝物中の二糖類の代謝変化を液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) によって測定した. 分子量 342.1163 である二糖類として検出されたピークは三箇所あり、そのピーク強度を FM および

0.9%ASM 下で 15 日培養した藻体間で比較した (図 4-4). FM 培養藻体から抽出した 3 種類の二糖類ピークの内, Peak 2 は 2 測定で測定限界値以下のため検出されなかった. Peak 1, 3 に関しては, 両者とも ASM では FM と比較して有意に上昇していた ($P < 0.05$). この結果から, B race においても同様に二糖類で浸透圧調整を行っていると考えられる. 熱水抽出物の糖組成については, 培地海水塩濃度の上昇とともに, CS 由来と考えられるアラビノース, ガラクトースが減少するがグルコースは増加傾向にあった (図 4-3). この B race におけるグルコースの増加は, A race で浸透圧調整物質として生産される物質がグルコースの二量体であることから [75], 浸透圧調整物質由来である可能性が考えられる. *B. braunii* は FM 培養であれば CS を構成しているアラビノース, ガラクトースを主に生産するが, ASM 培養ではグルコースを主体とした浸透圧調整物質を生産する必要があると考えられた.

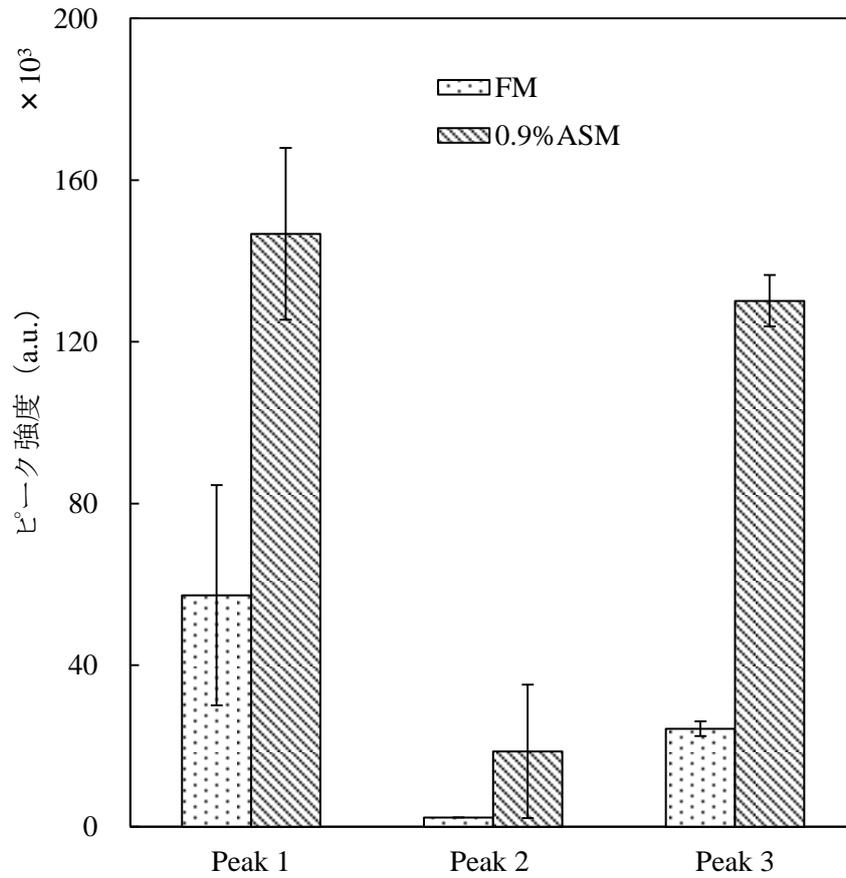


図 4-4. 淡水培地 (FM) および 0.9%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.9%ASM) で培養した *B. braunii* が生産した二糖代謝物を液体クロマトグラフィーで測定したピーク強度。
二糖類として検出されたピークは3種類。FMのPeak 2は4測定中2測定で検出限界以下。(n = 4, mean ± SD)

4.3.3 蛍光顕微鏡，電子顕微鏡によるコロニー全体の観察

ASM 培養では FM と比較して，アラビノース，ガラクトースの生産量が減少しており，コロニー表面における CS の生産量が減少したと示唆された．そこで蛍光顕微鏡および電子顕微鏡を用いて，コロニー表面部位に存在する CS や RW の相異を観察した．供試した試料は 3 種類である．1) FM で 18 日間培養した藻体 (No treatment, 以下 NT)，2) 0.7%ASM で 18 日間培養した藻体 (Culture in artificial seawater medium, 以下 CASM)，3) NT を熱水抽出実験と同様に加熱した藻体 (Pre-heating, 以下 PH) である．FM で培養した藻体を 85°C以上の温度で加熱することで，炭化水素回収性が向上することが報告されており [46, 47]，PH のコロニー表面の変化を CASM と比較した．

脂質を特異的に染色する蛍光色素であるナイルレッドで染色した後，3 サンプルのコロニー全体の様子を蛍光顕微鏡で観察した．ナイルレッド染色により，全サンプルで細胞と細胞をつないでいる細胞外マトリックス中に，脂質を保持していることが確認された (図 4-5, A1, B1, C1)．CASM のコロニーは，NT および PH と比較して，細胞内に比較的大きい油体が存在していた．また CASM では前章でみられたコロニーサイズの増大が本実験でも観察された．

電子顕微鏡で撮影したコロニー全体の様子を図 4-5, A2, B2, C2 に示す．NT では両頭矢印によって示される 5 μm 以下の CS の繊維層が，コロニー全体を覆っている様子が観察された．しかし，CASM および PH では，CS の繊維層がほとんど観察されず，減少していた．

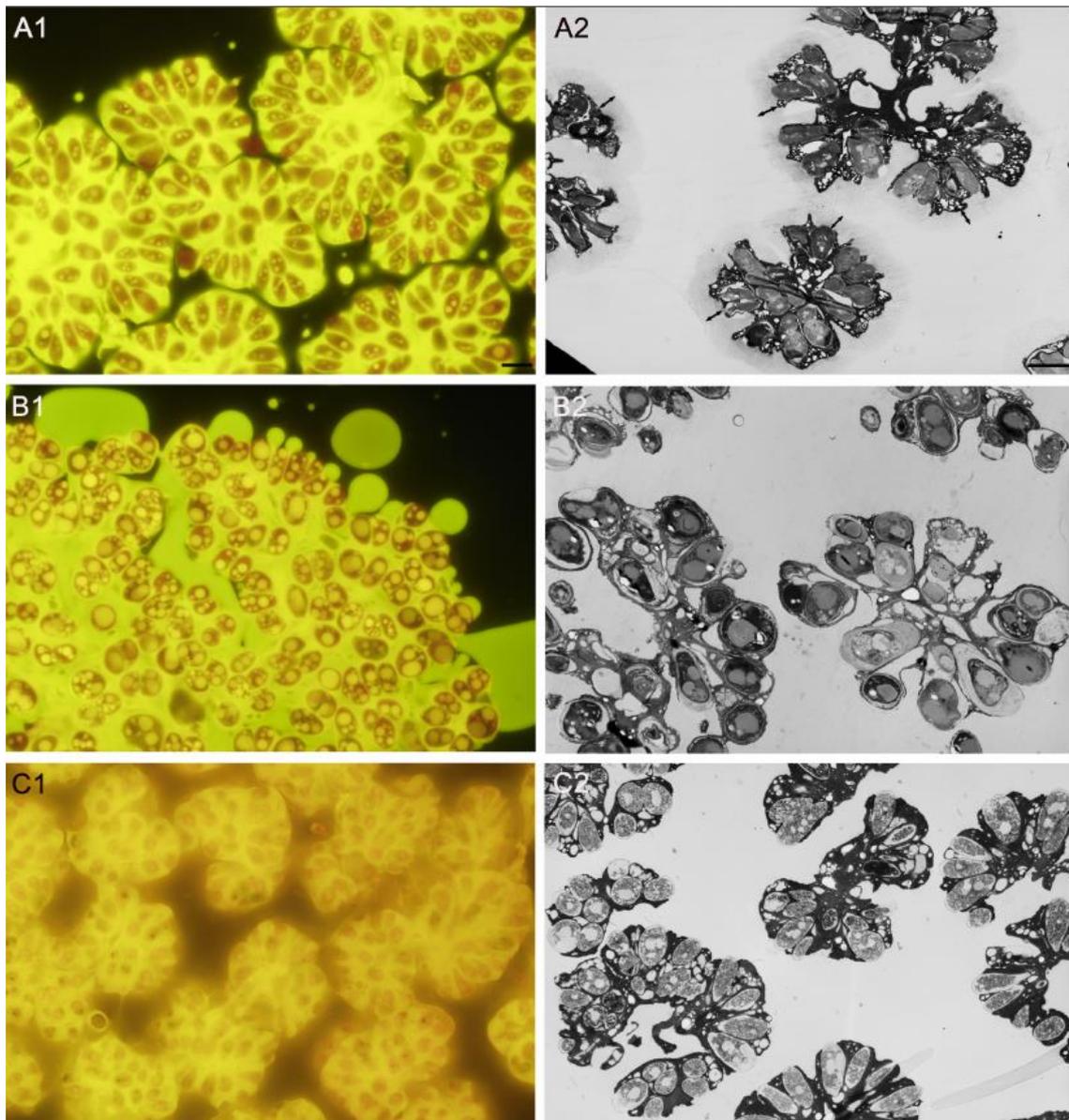


図 4-5. 蛍光顕微鏡および電子顕微鏡による *B. braunii* コロニーの観察像.

A) 淡水培養藻体 (NT). B) 希釈海水培養藻体 (CASM). C) 加熱処理藻体 (PH). 1) ナイルレッド染色により細胞質は赤色に蛍光し, 細胞質および細胞外マトリクス内の油体は黄色に蛍光した蛍光顕微鏡画像. 2) 透過型電子顕微鏡画像. NT では両頭矢印で示される Colony sheath (CS) が観察. CASM および PH は CS 観察なし. B-2 では細胞全体の様子を見せるために小サイズのコロニーを選択. (Size bars, 1, 10 μm ; 2, 5 μm . B, C の倍率は A と同一.)

4.3.4 炭化水素回収性が向上したコロニーの表面変化

CASM と PH において、コロニー表面の超微細構造をより詳細に観察するため、高倍率でコロニー断面を撮影した。まず NT のコロニー断面を図 4-6 に示す。図 4-6, A1 は CS をコロニー表面からコロニーの中心部へ切断した垂直切片である。分岐状の繊維が、細胞壁上の RW (c-RW) だけでなく、細胞外に分泌した炭化水素が重合化した TL からなる細胞外マトリクス上の RW (h-RW) からも伸びていることが観察された。この繊維物質はコロニー表面全体を覆っており (図 4-5, A2), さらに CS の最外周には高電子密度の薄い層が観察された (図 4-6, A1, 矢印で示す部分)。また c-RW 上には繊維と RW を繋いでいる高電子密度の”Fibril foot, 以後 FF”が観察された。FF は RW と同様に銀ヘキサミン反応で陽性を示さないことから、糖類を含まない別組成物質であることが分かっている [70]。 *B. braunii* の特徴的なコロニー表面構造は RW, FF, CS から成り立っている。CS を介して、2 個のコロニーが接触している様子を図 4-6, B2 に示す。CS の最外周に存在する層が、重なり合うことで、電子密度が非常に高くなっていた。図 4-6, C1 はコロニー表面に沿って CS を切断した平行切片の写真である。繊維は極めて微細な網目構造を構成しており、そのメッシュサイズは 50 nm から 500 nm 程度である。また図 4-6, C2 に見られるように、高電子密度の物質が繊維構造の隙間に詰まっていることが確認された。CS の最外周に存在する層や CS 繊維構造の隙間に詰まっている物質が、抽出溶媒とコロニー内部の炭化水素の接触を妨げている可能性も考えられる。

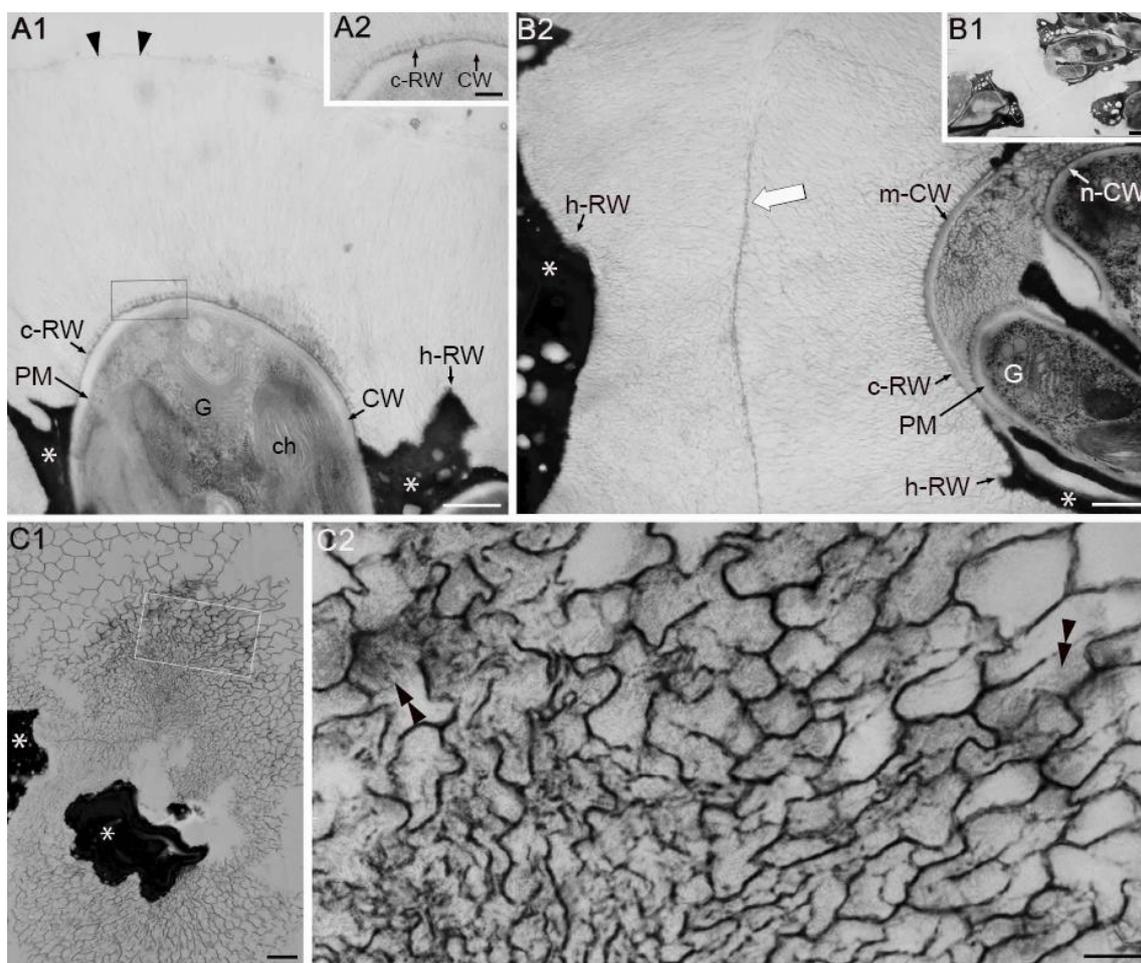


図 4-6. 淡水培養した *B. braunii* (NT) のコロニー表面の電子顕微鏡写真.

A) Colony sheath (CS) からコロニー中心方向へ切断した垂直切片. B) CS を介したコロニーの接触. C) コロニー表面に沿って CS を切断した平行切片.

2) 1 内の箱の拡大写真. 矢印, CS 外周の表面層; 二頭矢印, 繊維ネットワーク内に含まれる高電子密度物質; ch, 葉緑体; c-RW, 細胞壁上の Retaining wall (RW); h-RW, 細胞外マトリクス上の RW; G, ゴルジ体; m-CW, 母細胞の細胞壁; n-CW, 新しい娘細胞の細胞壁; PM, 細胞膜; *, 炭化水素を含む細胞外マトリクス. (Size bars, B1, 2 μm ; A1, B2, C1, 0.5 μm ; A2, C2, 2 μm)

図 4-7 は CASM のコロニー断面写真である。NT では明確に繊維物質の微細構造が確認されたが、CASM では異なる繊維構造が観察された。CASM の繊維は NT と同様に分岐した構造をとっていたが、その繊維密度が明らかに低下していた。NT で観察された CS 最外周に存在する高電子密度の薄い層は観察されず (図 4-6, A1), 繊維構造内部の隙間に詰まっていた高電子密度の物質も観察されなかった。図 4-7, B は、コロニー表面の構造をより詳細に観察した高倍率像である。CS の繊維物質は ASM によって変化した。繊維層下では NT と同じくコロニー全体の表面を覆っている高電子密度の層である c-RW および h-RW が、ASM の影響を受けずに残存していた。図 4-8 に NT と CASM のコロニー表面構造の相異を概略図で示す。

CASM のコロニーの状態は図 4-9 に示すように 4 種類であった。A はコロニーの一部で完全な CS が残存しているが、他部では繊維が短くなり、その密度が低下していた。B は CS の最外周層が観察されず、繊維が短くなり密度が低下していた。C, D ではコロニー表面の網目をもった繊維構造はほとんど観察されない。本実験では C の状態が最も多く観察された。

B. braunii のコロニーは、通常は花束のように細胞頭頂部がコロニー表面外周に向かって (図 4-5, A)。またその表面面積は、娘細胞の頭頂部や新しく生産された細胞外マトリクスによって細胞分裂後に増加する。表面面積の増加とともに、新たな RW が生産され、RW から新たな繊維が延びる [70]。細胞分裂とともに、c-RW および c-RW 上の繊維は新しいものに置き換わり、h-RW および h-RW 上の繊維は分裂による面積増加とともに新しく生産される。CASM において、もし RW から新しく繊維を生産する能力が抑制されているのであれば、連続的な細胞分裂とともに、h-RW と c-RW 上の繊維は両者共に短くなり、やがて図 4-9 の C, D の状態のように消失していくと考えられる。A の状態は、急激な塩濃度の変化によりコロニーを構成する一部の細胞の増殖が停止したか、もしくは増殖速度が著しく低下したことで、CS の繊維層がコロニーの一部で残

存したと考えられる。また真核藻類は、培地中の塩に完全に適応するまで、ある程度の時間を要することが知られている [76]。液胞等による選択的なイオン輸送は要するエネルギーが低く素早く反応するが、浸透圧調整物質の生産・蓄積や分解には多くのエネルギーを必要とし、完全な塩への順化にはある程度の時間を要する。B でみられた繊維が短くなり、繊維密度が低下した状態は、完全に培地中の塩に適応しておらず、CS 生産の抑制も完全でなかった可能性が考えられる。ASM で培養したコロニーの状態が 4 種類であったことから、CS の繊維層の減少および消失は、培地中の塩による物理・化学的反応によるものではなく、RW からの繊維物質の生産が抑制されたためであることが示唆される。連続的な細胞分裂の結果、A-D の順番で CS の繊維物質が消失したと考えられる。

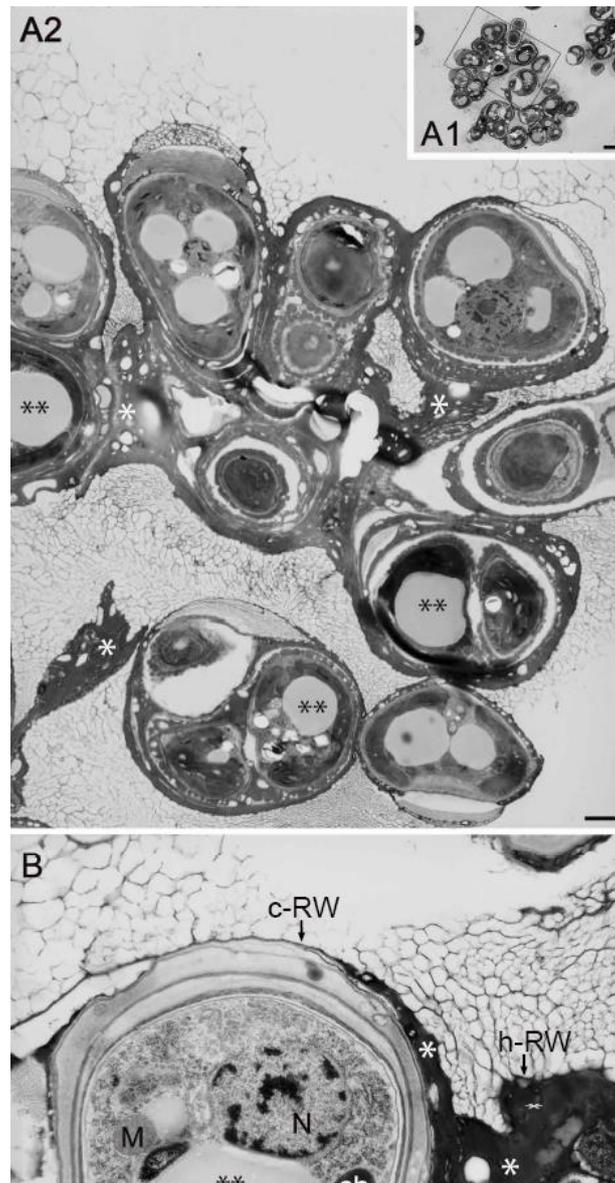


図 4-7. 希釈海水培養した *B. braunii* (CASM) のコロニー表面の電子顕微鏡写真.

A) Colony sheath (CS) からコロニー中心方向へ切断した垂直切片. 2) 1 内の箱の拡大写真. B) CS の繊維構造の拡大写真. ch, 葉緑体; M, ミトコンドリア; N, 核; c-RW, 細胞壁上の Retaining wall (RW); h-RW, 細胞外マトリクス上の RW; *, 炭化水素を含む細胞外マトリクス; **, 油体. (Size bars, A1, 5 μm ; A2, 1 μm ; B, 0.5 μm)

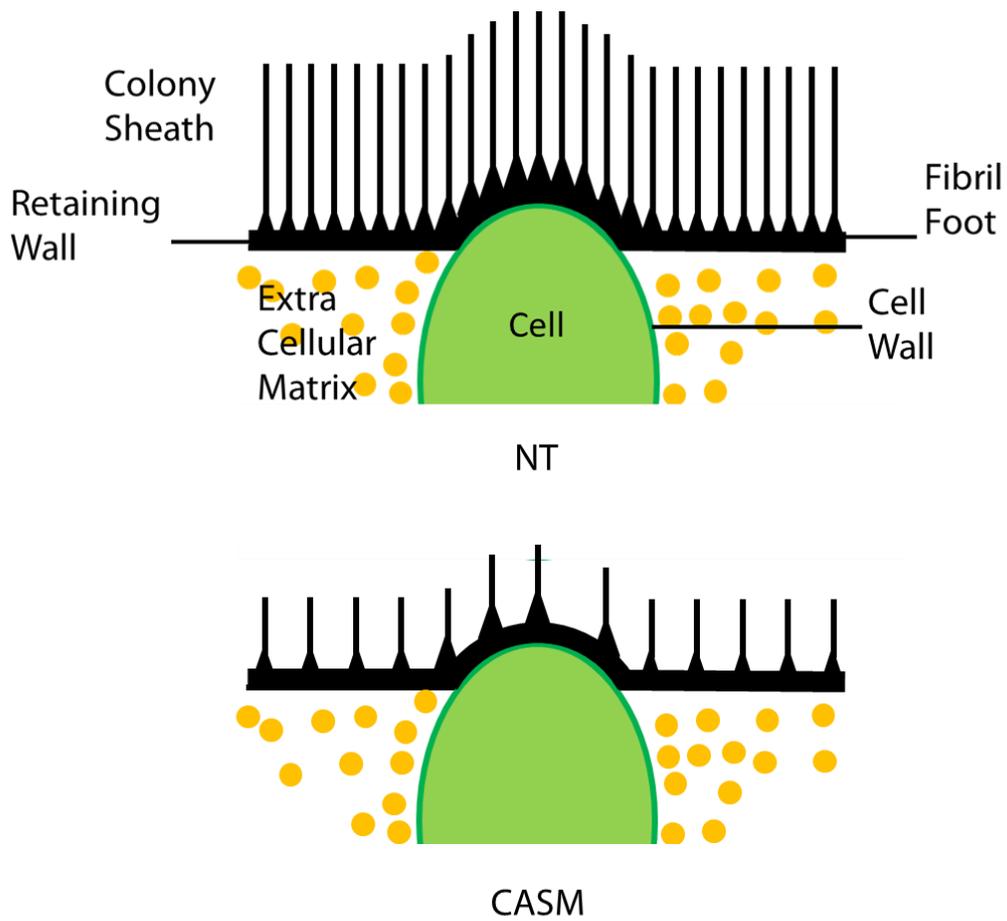


図 4-8. 淡水培養した *B. braunii* (NT) および希釈海水培養した *B. braunii* (CASM) のコロニー表面構造の概略図.

CASM の Colony sheath (CS) は長さが短くなり繊維密度が低下. 円形黄色部, 細胞外マトリクス内に存在する炭化水素の油滴.

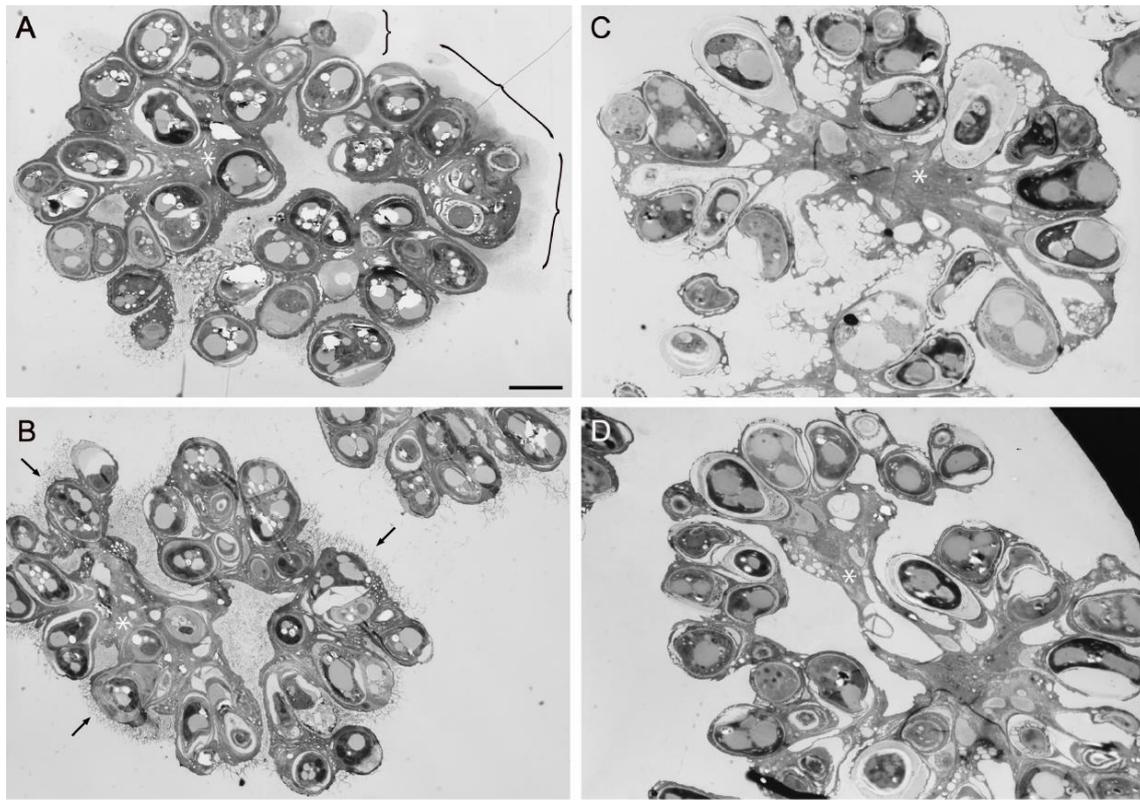


図 4-9. A-D の順で消失した希釈海水培養した *B. braunii* (CASM) の Colony sheath (CS).
 A) コロニーの一部分で完全な CS が残存. B) CS の最外周層がなく繊維が短くなり繊維密度が低下 (矢印部). C, D) コロニー表面の網目をもった繊維構造なし. (Size bars, 0.5 μm . B, C, D の倍率は A と等しい.)

PH のコロニー表面部を図 4-10 に示す. c-RW 上および h-RW 上の繊維が完全に消失している. 4.3.1 で述べたように, 熱水中に CS 繊維の主成分であるガラクトース, アラビノースが多量に放出されたことから, 繊維物質は加熱時に熱水中に溶解したと考えられる. しかし, CASM と同様に, c-RW と h-RW は消失せずコロニー表面に残存していた. 図 4-11 に NT と PH のコロニー表面構造の相異を概略図で示す. また, PH では c-RW 上には繊維と RW を繋いでいる高電子密度の FF が観察されなかったが, c-RW 内部に存在している高電子密度の粒 "Granules" が観察された (図 4-10, B 矢印部).

これらの観察に用いたサンプルで炭化水素回収性を比較した。NT および CASM の炭化水素含有率は、それぞれ 34.3% および 35.5% であった。希釈海水培養が炭化水素の含有率に影響を及ぼさないことは、2, 3 章の結果と同様であった。各サンプルの藻体濃度を 4.1 g L^{-1} に調整し、直接ノルマルヘプタンと混合することで得られた炭化水素の回収率を表 4-1 に示す。1 分間の攪拌で、CASM および PH からは 90% 以上の炭化水素が回収されたが、NT からは炭化水素がほとんど回収されなかった。CASM および PH で炭化水素回収性は大幅に向上していた。

CASM および PH で、CS の減少もしくは喪失が、炭化水素回収性の向上に影響を及ぼしていることが示唆された。培養中に藻体コロニーから分離する RW および CS (図 4-1, 赤色部) を集め、構成割合を調べると、81% を占めるのがガラクトースとアラビノースであることが報告されている [71]。また熱水抽出物の主成分はガラクトースとアラビノースであり、その熱水抽出物は両親媒的作用をもちヘキサンをエマルジョン化することが報告されている [74]。また PH の電子顕微鏡画像で CS が消失していたことから、熱水に CS が溶解したと考えられる。希釈海水培養や加熱処理が炭化水素回収性を向上させる理由は、この両親媒的特徴をもつと考えられる糖類を含む CS の繊維層が減少もしくは消失し、抽出溶媒がコロニー内部へ侵入する障害がなくなったためと考えられる。一方で、RW は銀ヘキサミン反応で陽性を示さない物質であり、高電子密度であることから、細胞外マトリクスと同様に重合化した細胞外炭化水素から構成されていると考えられている [70]。そのため CASM および PH では、RW が残存しているにも関わらず、炭化水素回収性が向上したと考えられる。

一方で、RW と同様に銀ヘキサミン反応で陽性を示さない FF は、加熱時に CS とともに消失した。しかし、PH では FF の代わりに、Granules が観察された。Granules は、FF が加熱処理によって変性し、高電子密度になったものと考えられる。本実験結果では銀ヘキサミン反応で陽性を示さない物質の内、FF のみが熱水に溶出し、RW は残存した。

つまり **FF** は糖類を含んでいないが **CS** の繊維物質に近い挙動を示したため、**RW** とはまた違う構造をとっていると考えられる。そのため、**FF** は合成中の糖類および **CS** の繊維を合成する酵素から構成されていて、*B. braunii* の独特な特徴である **CS** の繊維層を生産すると考えられる。

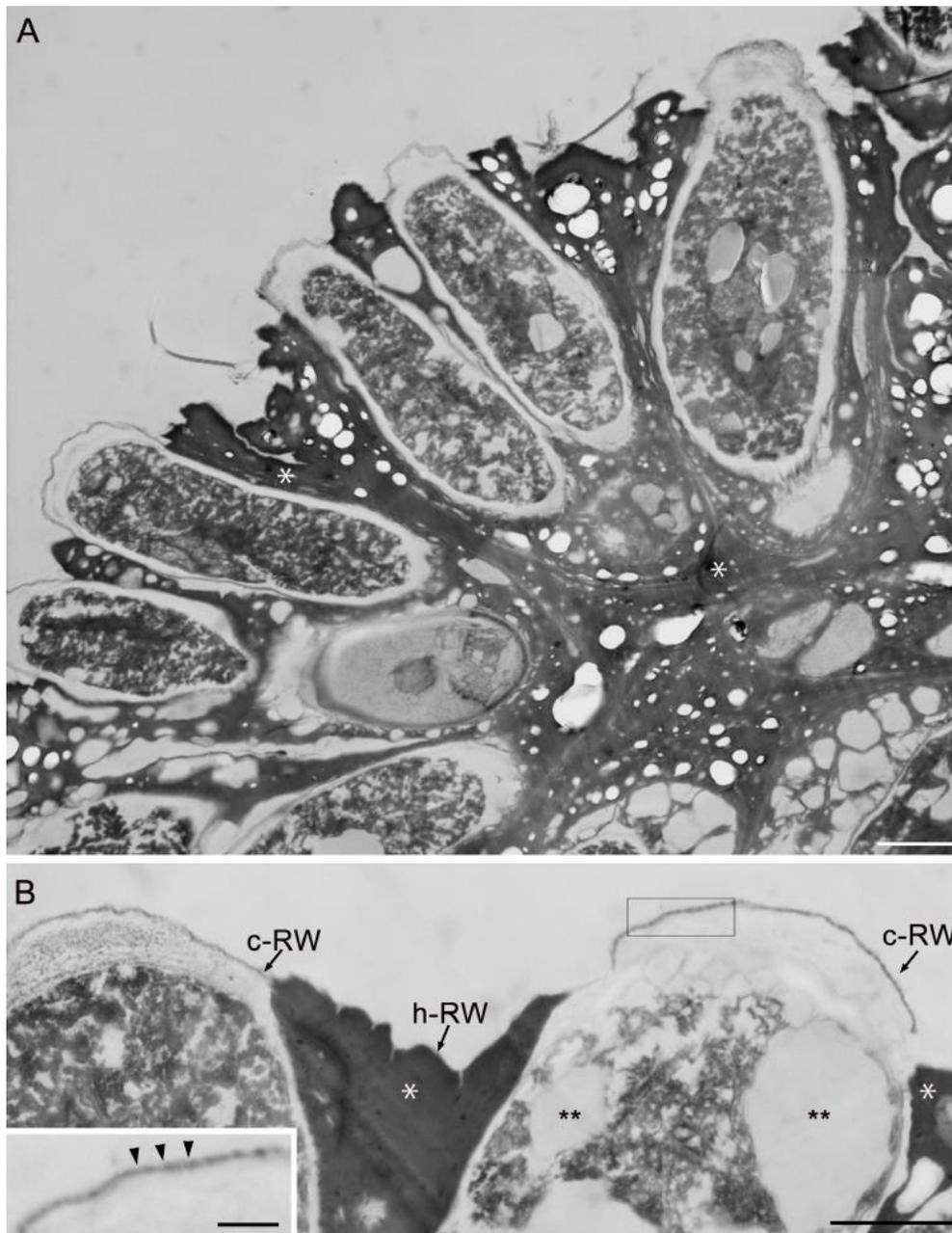


図 4-10. 加熱処理した *B. braunii* (PH) のコロニー表面の電子顕微鏡写真.

A) コロニー表面から中心方向へ切断した垂直切片. B) コロニー表面の拡大写真. 挿入図は B 内の箱の拡大図. 矢印, c-RW 内にみられる Granules; c-RW, 細胞壁上の Retaining wall (RW); h-RW, 細胞外マトリクス上の RW; *, 細胞外マトリクス; **, 油体. (Size bars, A, B, 1 μm ; B 中の挿入図, 0.25 μm)

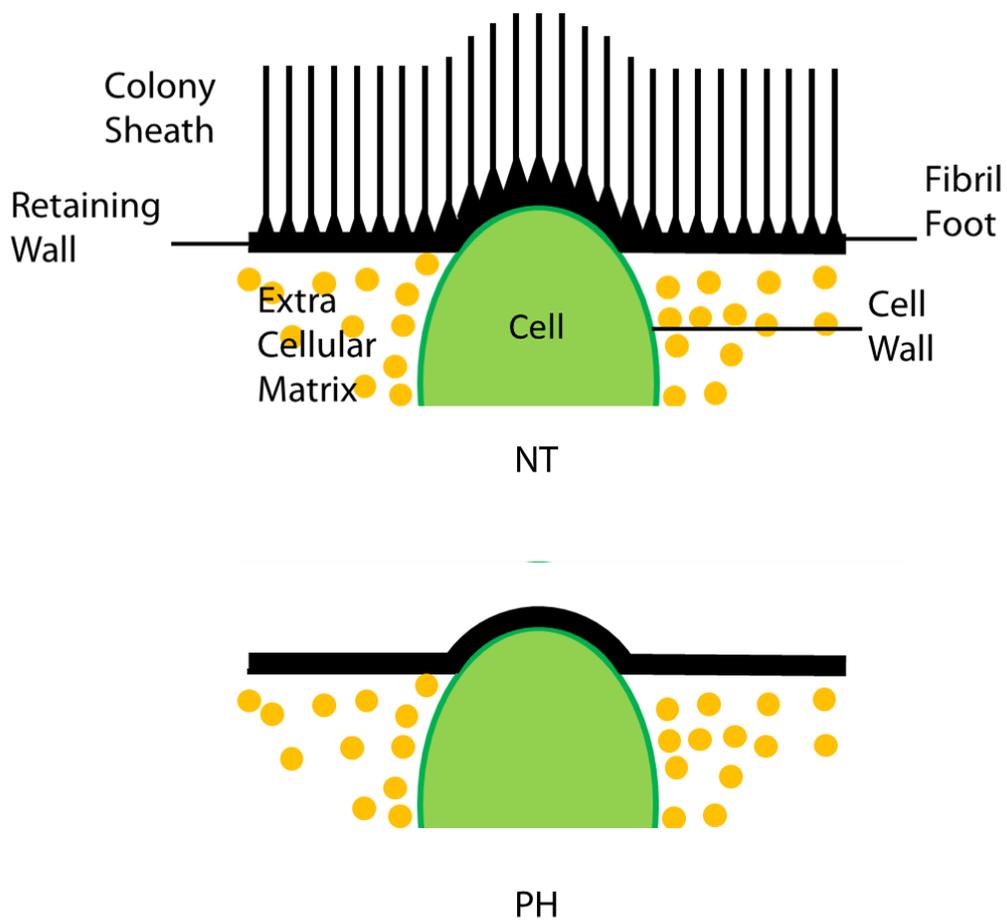


図 4-11. 淡水培養した *B. braunii* (NT) および加熱処理した *B. braunii* (PH) のコロニー表面構造の概略図.

PH では Colony sheath (CS) および Fibril foot (FF) は消失. 円形黄色部, 細胞外マトリクス内に存在する炭化水素の油滴.

表 4-1. 淡水培養藻体 (NT), 希釈海水培養藻体 (CASM) および加熱処理藻体 (PH) の炭化水素含有率および炭化水素回収率の比較.

Sample	炭化水素含有率 (%)	炭化水素回収率 (%)
NT	34.3	<0.1
CASM	35.5	93.8
PH	42.9	95.3

4.3.5 まとめ

B. braunii が炭化水素を細胞内ではなく細胞外マトリクスに蓄積するにも関わらず, 容易に有機溶媒抽出できない理由は, コロニー全体を覆っている主に糖類からなる Colony sheath と呼ばれている繊維層が親水的な層として働き, コロニー内部への有機溶媒の侵入を妨げているためであることが考えられる. 電子顕微鏡観察の結果, 希釈海水培養藻体の Colony sheath は繊維長が短くかつ繊維密度が低くなっており, また大部分の希釈海水培養藻体の Colony sheath は消失していることが確認された. 一方で, 加熱処理藻体の Colony sheath は熱水中に溶出したと考えられ, 同様に消失していた. このように希釈海水培養, 加熱処理では Colony sheath が消失しており, その結果コロニー内部へ容易に有機溶媒が入ることができるようになり, 炭化水素回収性が向上したと考えられる.

一方で, 細胞分裂の完了とともに, 細胞頭頂部の Colony sheath とともに培地中に放出される Retaining wall は, 希釈海水培養と加熱処理の両方でコロニー表面に残存していた. しかしながら, Retaining wall は炭化水素の重合体から構成されていると考えられているため, コロニー内部への有機溶媒の侵入を妨げないと考えられる.

第5章 希釈海水培養を用いた炭化水素生産システムの評価

5.1 研究目的

第3章において、*B. braunii* を0.3%海水塩濃度で培養した場合、淡水培地培養と比較しても増殖速度、炭化水素含有率は低下せず、炭化水素回収性は向上することが明らかとなった。また同時にコロニーサイズが増大することが明らかとなり、図1-4で示した抽出プロセスだけでなく収穫プロセスにおいても省エネルギー化が図れることが示された。そこで本章では、希釈海水培養を用いた炭化水素生産システム（以後、希釈海水培養システム）のエネルギー収支を算出し、既存の淡水培地で培養した藻体を溶媒抽出前に加熱（以後、加熱システム）もしくは乾燥前処理（以後、乾燥システム）した炭化水素生産システム [77]のエネルギー収支と比較した。

5.2 研究方法

5.2.1 培養プロセスにおける投入エネルギーの算出

閉鎖型のフォトバイオリアクター（Photobioreactor, 以後 PBR）を用いると、レースウェイポンドによる屋外開放培養と比較して、培養時の投入エネルギーおよび生産コストが過大になるため、バイオ燃料生産を目的とした場合、PBRの導入は難しいといわれている [78]。そのため本研究ではレースウェイポンドを用いた屋外大量培養を想定した。*B. braunii* の日増殖速度として、NEDO（国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構）による「戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業／微細藻類の改良による高速培養と藻体濃縮の一体化方法の研究開発」のなかで、*B. braunii* の増殖速度目標であり達成したとされている値に基づき、 $8 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ と設定した [79]。またパネルリアクタであるが屋外培養で *B. braunii* を培養した報告もあり、そのデータか

ら算出すると増殖速度は約 $5.5 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ であった [80]. バイオ燃料生産を目的とした微細藻類の低生産時を想定したモデルでは, 年平均の日増殖速度を $10 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ と評価しているものもあり [9, 78], 他の藻類と比較して増殖速度が遅い *B. braunii* であれば $8 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ は妥当な値であると考えられる. また *B. braunii* の炭化水素含有率はこれまでの実験で得られた値に基づき, 35.0 wt% と設定した.

次に培養面積を設定した. 400 ha の培養面積からコスト面におけるスケールメリットが出始めるという報告がある [81]. そのため日増殖速度 $8 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, 含有率 35.0wt% から計算するとプラント当たりの生産量が約 1 万 kL となる 1000 ha と設定した. 2012 年度の統計で, アメリカ国内のトウモロコシから生産する第一世代エタノールの工場生産能力を, 稼働している工場数で除すると, 1 プラント当たりの年生産量が約 24 万 kL となるため [82], バイオ燃料生産という観点からみると年間生産量約 1 万 kL, 培養面積 1000 ha はデモプラント規模であると想定される.

培養プロセスにおける投入エネルギーの算出に用いた設定を以下表 5-1 に示す.

培養プロセスにおける攪拌動力は以下のようにして求めた. 培養には長方形の 2 列の水路がわん曲水路により繋がっている 1 基あたり 4 ha のレースウェイポンドを用いることを想定した. 水路を攪拌するためのパドル攪拌による曲面損失水頭 h_b (m), 摩擦水頭 h_c (m) は以下の Manning の式より算出した.

$$h_b = \frac{Kv^2}{2g} \quad h_c = v^2 n^2 \frac{L}{R^{4/3}}$$

ここで,

h_b : 曲面損失水頭 (m)

K : 曲面損失係数 (-)

v : 流速 (m s^{-1})

g : 重力加速度 (m s^{-2})

h_c : 摩擦水頭 (m)

n : 粗度係数 (-)

L : ポンド直線部の距離 (m)

R : 潤辺 (m)

パドル攪拌動力 E (W) は、以下の式より算出した。

$$E = \frac{Q\rho gh}{e}$$

ここで、

Q : 管内流速 ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)

ρ : 流体密度 (kg m^{-3})

h : 損失水頭 (m), 曲面損失水頭および摩擦水頭の和

e : パドル効率 (-)

栄養塩の施肥条件については、藻体増殖に必要な窒素量を、元素分析組成より算出した。また *B. braunii* の淡水培地として用いた Chu13 改変培地は窒素成分と比較して、リン成分、微量金属類が占める割合は少ないため、施肥条件は硝酸カリウムのみを考慮した。

CO₂ の供給条件については、藻体に必要な炭素量を、元素分析組成より算出し、藻体が固定する炭素割合を吹き込んだ全 CO₂-C の 20% とした。元素分析の方法は後述する。供給ガスは火力発電所等から出る燃焼排ガスを吹き込むことを想定し、その体積当たりの CO₂ 混合率を 20% とした。溶解量を上げるために供給水深を培養深度より深い 1 m と設定し、供給圧力を 19.6 kPa と設定した。CO₂ 供給に必要とするポンプ動力 E (W)

は以下の式を用いることで算出した.

$$E = \frac{P_c V_c}{\varphi}$$

ここで,

P_c : 供給圧 (Pa)

V_c : 吹き込みガスの流量 ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)

φ : ポンプ効率 (-)

また, ポンドからの蒸発水を補填する必要がある. 栄養塩を含有する二次排水を用いて培養することも考えられているが [87], 本研究ではコンタミネーションのリスクを考え, 工業用水を用いて蒸発水を補うことを想定した. ポンドより蒸発する年平均蒸発フラックスを 2 mm d^{-1} とし, 蒸発した水を補うために必要な工業用水量に, その製造エネルギー原単位を掛けることで, 所要エネルギーを算出した.

表 5-1. *B. braunii* からの炭化水素生産システムの培養プロセスにおける投入エネルギー算出のための設定値.

攪拌 [83, 84]		
培養面積		1000 ha
レースウェイポンドのサイズ		4 ha
サイズ：縦, 横, 列		690 m, 30 m, 2 列
培養深度		0.2 m
流速： v		0.25 m s^{-1}
曲面損失係数： K		2
粗度係数： n		0.018
パドル効率： e		0.4
攪拌時間		12 h
施肥（栄養塩）		
藻体 N 含有率		1.21%
KNO_3 -N 製造エネルギー [85]		98.6 MJ kg^{-1}
CO ₂ 供給		
藻体 C 含有率		71.4%
供給水深 [84]		1 m
供給圧： P_c (Pa)		19.6 kPa
CO ₂ 固定割合 [86]		0.2
ポンプ効率： φ		0.7
CO ₂ 混合率		0.2 (20%)
工業用水製造		
蒸発フラックス		2 mm d^{-1}
工業用水製造エネルギー		0.9 kJ kg^{-1} [88]

5.2.2 収穫・輸送・脱水プロセスにおける投入エネルギーの算出

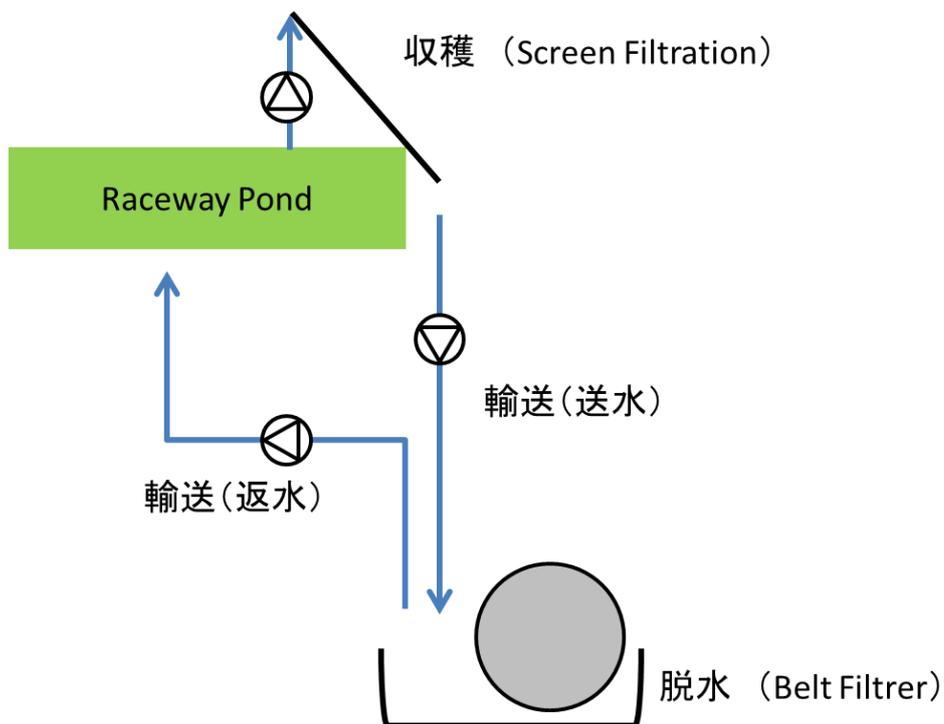


図 5-1. *B. braunii* からの炭化水素生産システムの収穫・輸送・脱水プロセスのフロー。収穫プロセスはウェッジワイヤースクリーン素子を用いた重力濾過，輸送プロセスは送液ポンプ，脱水プロセスはベルトフィルタを用いることを想定。青矢印，送液ポンプによる水の移動方向。

収穫・輸送・脱水プロセスのフローを図 5-1 に示す。投入エネルギーの算出に用いた設定を表 5-2 に示す。

収穫プロセスにはコロニーを作る *B. braunii* の特徴を活かし，ウェッジワイヤースクリーン素子を用いた重力型の傾斜式固液分離装置（東洋スクリーン工業）を用いることを想定した。*B. braunii* における傾斜式固液分離装置の分離性能を測定するために，以下のような実験を行った。

スクリーン濾過装置に送る原液として、表 3-4 のデータより、 1.0 g L^{-1} で連続培養することを想定した。そのため $1.0\text{-}1.5 \text{ g L}^{-1}$ の藻体濃度に増殖した **B race** に属する *Botryococcus braunii* (Showa strain) を用いた。藻体培養はインキュベータ内で 10 L の培養バッグを用いて行った。培養条件は 4.2.1 と同様である。淡水培地として Chu13 改変培地 (以後, FM) を用いた。改変希釈人工海水培地 (以後, ASM) として、市販されている人工海水 (ダイゴ人工海水 SP, 和光純薬工業) を全海水塩濃度 0.3% (0.3%ASM) となるよう、純水で希釈して作製した。作成方法は 4.2.1 と同様である。継代元に用いた *B. braunii* は各培地で 1 年以上培養したものをを用いた。

スクリーン濾過の実験では、図 5-2 に示すように、藻体を含む原液を蛇口付タンクから約 3 L min^{-1} となるように供給し、350 mm の高さから重力落下させた。傾斜角 66° に設置された第 1 スクリーン、 51° に設置された第 2 スクリーンを通過したものを網上回収液として回収した。ウェッジワイヤースクリーン素子の断面を図 5-3 に示す。スリット間隔は藻体コロニーの粒度分布に基づいて決定し、FM では 10, 20, 30, 50, 75 μm , 0.3%ASM では、50, 100, 150, 200, 300 μm とした。網上回収物が液体の場合、回収液をあらかじめ恒量を求めたガラス繊維濾紙 (GF/A 110-mm diameter, Whatman) で濾過し、濾紙上に残っている藻体を、純水で洗浄した。洗浄後、 105°C で重量が一定となるまで乾燥し、乾重量を測定し、藻体濃度を算出した。そして原液に対する回収液の藻体濃度の濃縮率を算出した。網上回収液が粘度の高いスラリーである場合は、藻体濃度ではなく含水率を、含水率計 (MX-50, A&D) を用いて測定した。捕捉率は、送液に含まれる全固体量に対する、網上回収物の固体量である。実験の様子を図 5-4 に示す。

スクリーン濾過装置に送るまで、レースウェイポンドから培養液をポンプアップする必要がある。ポンプアップする揚程は 2 m と設定した。ポンプ動力 E (W) は以下の式を用いることで算出した。また、輸送プロセスに要する送液ポンプ動力 E (W) も同様の式で算出した。

$$E = \frac{MgH}{\varphi}$$

ここで,

M : 流量 (kg s^{-1})

H : 揚程 (m)

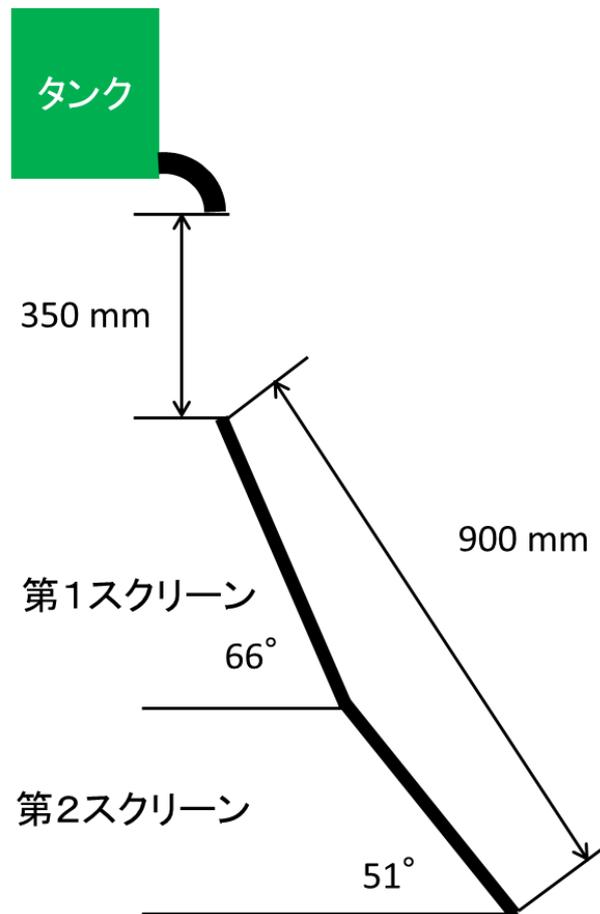


図 5-2. ウェッジワイヤースクリーン素子を用いた重力による傾斜型固液分離装置の側面図.

350 mm の高さからタンクより原液を第 1 スクリーンに自由落下. 第 1, 2 スクリーンの角度はそれぞれ 66° , 51° .



図 5-3. 断面が 3 角形のウェッジワイヤーにより構成されたスクリーン素子の断面拡大図.



図 5-4. ウェッジワイヤースクリーン素子を用いた重力による傾斜型固液分離装置を用いた収穫実験の様子.

脱水プロセスには、大型ベルトフィルターを用いることを想定した。ベルトフィルターの設定条件は大規模条件を想定して表 5-2 とし、浸漬率および設定回転数から濾過時間は 20 秒とした。ベルトフィルターの単位時間当たりの処理量を求めるために、脱水濾過試験機（リーフテスター、宮本製作所）を用いて、*B. braunii* の真空濾過試験を行った。濾布には 20 μm のナイロン製プランクトンネットを用いた。濾過時の差圧は一般的な連続式真空濾過機で用いられる 40 kPa とし、単位時間当たりに濾布を通過した水量を測定することで、20 秒間で処理できる藻体量を求めた。

ベルトフィルターで必要とする真空ポンプ動力 E (W) は次式で求めた。

$$E = \frac{P_f V}{\phi}$$

P_f : 差圧 (Pa)

V : 濾液量 ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)

表 5-2. *B. braunii* からの炭化水素生産システムの収穫・輸送・脱水プロセスにおける投入エネルギー算出のための設定値.

収穫プロセス		
揚程： H		2 m
ポンプ効率： φ		0.7
輸送プロセス		
揚程： H		20 m
ポンプ効率： φ		0.7
脱水プロセス		
ベルトフィルターサイズ		
ドラム径		4.2 m
長さ		7.6 m
回転数		1 rpm
浸漬率		1/3
ドラムのモーター動力		10 kW
差圧： P_f (Pa)		40 kPa
ポンプ効率： φ		0.7

5.2.3 抽出プロセスにおける投入エネルギーの算出

炭化水素抽出プロセスとして、脱水後の濃縮スラリーからのノルマルヘキサンによる有機溶媒抽出を想定した。希釈海水培養した藻体からは加熱・乾燥等の前処理をせずにノルマルヘキサン抽出するとし、既往の研究で報告されている加熱・乾燥を経たノルマルヘキサンによる抽出プロセスと炭化水素の回収率および投入エネルギーを比較した [77, 89]。投入エネルギーの算出に用いた設定を表 5-3 に示す。

希釈海水培養した藻体の脱水後濃縮スラリーからの炭化水素回収率を評価するため、炭化水素回収率を以下のようにして測定した。炭化水素回収率は、一定量の藻体を乾燥し溶媒抽出・カラム精製により得られる藻体の炭化水素含有量に対する、同量の藻体ス

ラリーに直接ノルマルヘプタンを添加し混合することで抽出される炭化水素量の比として定義した。炭化水素含有量の測定は、4.2.7 と同様に行った。一方で、藻体スラリーにノルマルヘプタンを直接混合して抽出した炭化水素量は以下のようにして測定した。250 ml のテフロン性遠沈瓶のなかに、含水率を調整した藻体スラリー10 g とスラリーに含まれる乾燥藻体量の 6 倍量となるようにノルマルヘプタンを混合した。800 rpm で攪拌を行い、設定した攪拌時間でノルマルヘプタンに溶解する炭化水素量を測定した。炭化水素量を測定するために GC-FID (GC-2014, 島津製作所), Rtx-1 キャピラリーカラム (島津製作所) を用いた。測定方法は、4.2.7 と同様である。

加熱処理に必要なエネルギーを算出する際に、熱交換することを想定し、加熱ピンチ温度を 20°C とした。藻体の比熱は示差走査発熱計 (DSC Q100, TA instruments) で測定した。高位発熱量 Q (MJ kg^{-1}) は、以下の Dulong の式より算出した [43]。

$$Q = 0.3383C + 1.442 \left(H - \frac{O}{8} \right)$$

N, C, H の元素分析は NCH-22F (住化分析センター) を用いて酸素循環燃焼・TCD 検出方式により、O は EMGA-920 (堀場製作所) を用いて不活性ガス中のインパルス加熱・融解—NDIR 検出方式により行った。その元素組成の分析結果を表 5-4 に示す。

プロセスのエネルギー収支を判断する指標として、次式で示されるエネルギー収支比 (Energy profit ratio, 以後 EPR) を用いた。電力は、一次エネルギー換算をせずに用いた。

$$\text{EPR} = (\text{回収された炭化水素の高位発熱量}) / (\text{プロセス投入エネルギー})$$

表 5-3. *B. braunii* からの炭化水素生産システムの溶媒抽出プロセスにおける炭化水素投入エネルギー算出のための設定値.

加熱処理 [77, 89]		
加熱ピンチ温度		20°C
加熱温度		95°C
加熱時含水率		92.0%
藻体比熱 [90]		1.9 J g ⁻¹ K ⁻¹
水比熱 [90]		4.18 J g ⁻¹ K ⁻¹
乾燥処理		
水蒸発潜熱 [77]		2.25 MJ kg ⁻¹
抽出および溶媒分離		
攪拌動力 [89]		15 W kg-dry algae ⁻¹
ヘキサン蒸発潜熱 [77]		0.34 MJ kg ⁻¹
炭化水素回収率		95%
溶媒回収率 [89]		99.5%
高位発熱量一覧		
藻体		36.6 MJ kg ⁻¹
炭化水素		47.0 MJ kg ⁻¹

表 5-4. *B. braunii* の藻体および炭化水素の元素組成

	元素組成 (%)			
	C	H	N	O
藻体	71.4	10.3	1.21	13.6
炭化水素	87.4	12.1	<0.01	

5.3 結果および考察

5.3.1 培養プロセスにおける投入エネルギー

培養プロセスに要するエネルギーおよび抽出後に得られる炭化水素の高位発熱量を図 5-5 に示す。培養プロセスの EPR は 4.6 であった。本研究の設定で計算した攪拌動力（電力）は 91 MJ ha^{-1} であった。他の研究においても、レースウェイポンドでの攪拌時間を日中のみの 12 h とすると、その攪拌投入エネルギー（電力）は $60.4\text{--}108 \text{ MJ ha}^{-1}$ と報告されている [7, 83, 84, 91]。しかしながら、攪拌投入エネルギー（電力）を 484 MJ ha^{-1} と評価した報告もある [92]。攪拌動力を算出する際には、種々の変数が関わってくるが、パドル攪拌効率が最も決定することが困難な変数であり、低いものでは 0.17 としている報告もある [83]。パドル攪拌効率が半減すれば、攪拌に必要な動力が 2 倍になる。そのため攪拌動力は、ある程度の幅をもって評価する必要があると考える。なお攪拌動力は培養面積で決まる値であるため、単位面積当たりの炭化水素収率が上昇すれば、単位収量当たりの攪拌動力は低下する。

二酸化炭素供給および施肥も、それぞれが攪拌動力と同程度のエネルギーを必要とする。二酸化炭素供給をして微細藻類を培養すると、二酸化炭素の占めるコストの割合が高くなるといわれている [78]。そのため本研究では、発電所等より排出された二酸化炭素混合率 20% の排ガスをポンドに吹き込むことを想定した。溶解度を考慮すると、二酸化炭素割合がより高い空気を送ることや、吹き込み圧力がより必要となるが小気泡サイズで吹き込むことも検討する必要があると考える。施肥の窒素源として、本研究では硝酸カリウムを選択した。*B. braunii* は栄養塩としてアンモニア態の窒素をほとんど使うことができないためである。本研究で設定した硝酸カリウムの施肥には単位窒素重量当たり 98.6 MJ kg^{-1} の投入エネルギーを必要とするが、硝酸アンモニウムとしてアンモニア態窒素を半分吸収することが可能となれば、その投入エネルギーは、約 64% の 63.0

MJ kg⁻¹まで低減する [85]. クラミドモナスなど, アンモニア態窒素を吸収することができる微細緑藻は存在する [93]. 品種改良等により, アンモニア態窒素を利用できる *B. braunii* を開発できれば, 投入エネルギーを大幅に低減できる. 蒸発する水を補うための工業用水の製造に必要なエネルギーは, 攪拌, 二酸化炭素供給, 施肥が占める割合と比較すると小さかった. そのため蒸発量がある程度変化したとしても, 全エネルギー収支に与える影響は小さい.

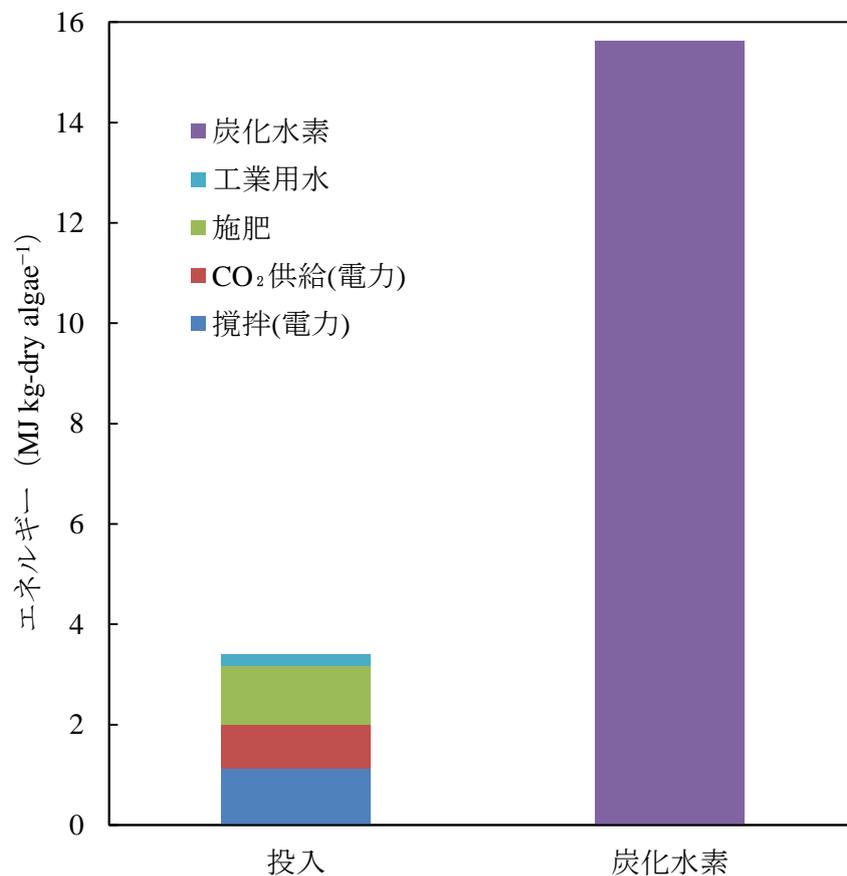


図 5-5. *B. braunii* からの炭化水素生産システムの培養プロセスにおける投入エネルギーおよび回収した炭化水素の高位発熱量.

5.3.1 収穫・輸送・脱水プロセスにおける投入エネルギー

FM および 0.3%ASM で培養したコロニーサイズの異なる藻体を、ウェッジワイヤースクリーン素子を用いて固液分離した結果を表 5-5 に示す。また濾過実験を行った藻体のコロニーサイズを表 5-6 に示す。FM で培養した藻体では、コロニーサイズが小さいため、スリット間隔を狭くしないと重力濾過ではほとんど固液分離できず、得られた網上回収物も全て濃度が薄かった。スリットサイズ 75 μm で、網上に若干の粘性スラリーが存在していたが、回収できたスラリーの量が非常に少なく、含水率を測定することが不可能であった。一方で、0.3%ASM 区画では 100 μm 以上で、網上回収物は全て粘性スラリーであり、150 μm 以上では含水率約 78%の粘性スラリーが網上に回収された。これ以上スリットサイズを大きくしても、回収される粘性スラリーの含水率は低下しなかったため、重力固液分離で得られる本藻体の限界含水率が約 78%程度であると考えられる。この結果から、網捕捉率が約 90%となるように、FM でスリットサイズ 30 μm 、0.3%ASM でスリットサイズ 150 μm を選択し、輸送プロセスにおける藻体スラリーの含水率を決定した。輸送および脱水プロセスの流れを図 5-6 に示す。加熱システムにおいては、藻体から水相中に放出される糖類がヘキサン抽出を妨げるため、取り除く必要がある [48, 74]。そのため加熱システムでは糖類をリンスするため加熱後の加水・脱水を 2 回行うことを想定した [89]。希釈海水培養においては、スクリーン濾過で含水率 78–79%の藻体スラリーを得られるが、そのような高粘性物質をパイプで長距離送液することは現実的ではない。そのため、粘性スラリーにスクリーン濾過後の網下濾液を加水して、一般的にポンプ負荷がかからないとされる含水率 95%の状態を送液することを想定した。

表 5-5. ワイヤースクリーンのスリットサイズが淡水培地 (FM) と 0.3%海水塩濃度希釈海水培地 (0.3%ASM) でそれぞれ培養した *B. braunii* コロニーの重力濾過に与える影響.

培地	スリット (μm)	捕捉率 (%)	回収物	濃縮率 (液体) (%)	含水率 (粘性スラリー) (%)
FM					
	10	96.3	液体	1.33	
	20	93.0	液体	2.93	
	30	91.3	液体	6.21	
	50	51.3	液体	9.04	
	75	2.7	粘性スラリー		n.d.
0.3%ASM					
	50	96.0	液体	22.9	
	100	92.6	粘性スラリー		83.0
	150	86.7	粘性スラリー		78.9
	200	77.8	粘性スラリー		77.4
	300	66.2	粘性スラリー		78.8

表 5-6. ワイヤースクリーン濾過実験に供試した *B. braunii* のコロニーサイズ.

培地	粒度分布 (μm)		
	d10%	d50%	d90%
FM	33.4	46.2	67.2
0.3%ASM	147	332	513

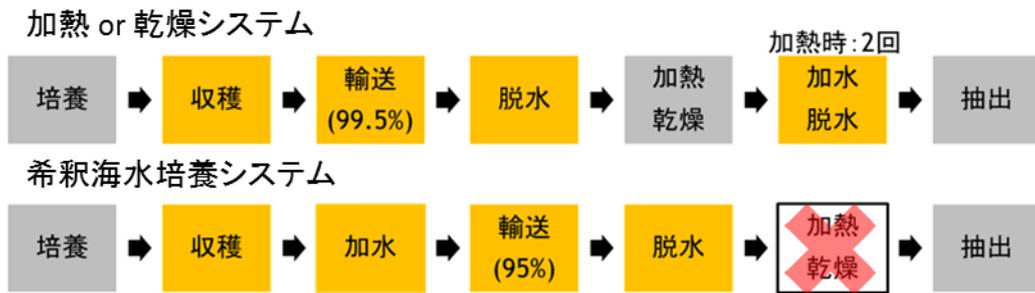


図 5-6. 淡水培養し溶媒抽出前に加熱もしくは乾燥する炭化水素生産システム（加熱もしくは乾燥システム）と希釈海水培養を用いた炭化水素生産システム（希釈海水培養システム）における収穫・輸送・脱水プロセスの比較.

乾燥システムでは乾燥後の加水・脱水は必要なし. 括弧内, 輸送時に想定した藻体スラリーの含水率.

濾布に 20 μm のナイロン製プランクトンネットを用いることを想定し, 差圧 40 kPa で単位時間当たりに濾布を通過した水量を測定することで, 20 秒間の脱水プロセス (ベルトフィルター) で処理できる藻体量を求めた (表 5-7). これらの結果から, 収穫・輸送・脱水プロセスに必要なエネルギーを求めた. その結果を図 5-7 に示す. 仮に FM 培養 (加熱システム) でスクリーンワイヤーを使わずに, 濃縮せず原液のまま送液したと仮定した場合の投入エネルギーを算出した. その場合, スクリーンを使用した場合と比較して, 投入エネルギーが約 3 倍となり, 収穫 (濃縮) プロセスの重要性が明らかとなった. 希釈海水培養システムでは, 投入エネルギーが加熱システム (図 5-7, B) の 19% 程度であった. しかし, 培養時の投入エネルギー (攪拌, 二酸化炭素供給, 施肥) (図 5-5) と比較すると, 収穫・輸送・脱水プロセスに必要なエネルギーは小さく, 削減効果は小さいものであった.

表 5-7. 淡水培地 (FM) と 0.3%海水塩濃度改変希釈人工海水培地でそれぞれ培養した *B. braunii* を脱水プロセス (ベルトフィルター) で 20 秒間に処理できる量.

培地	処理藻体量 (kg 20s ⁻¹ 台 ⁻¹)
FM	4.7
0.3%ASM	11.7

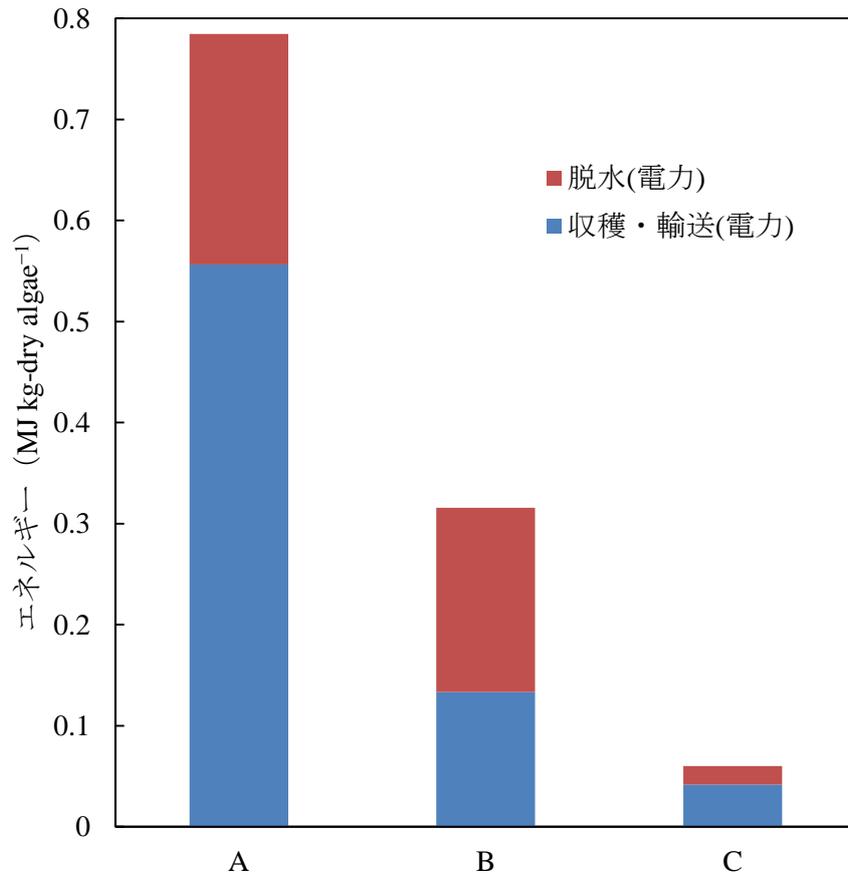


図 5-7. *B. braunii* からの炭化水素生産システムの収穫・輸送・脱水プロセスにおける投入エネルギー。

A) 淡水培養し溶媒抽出前に加熱処理する炭化水素生産システム（加熱システム）でワイヤースクリーン収穫なし。B) 加熱システムでワイヤースクリーン収穫あり。C) 希釈海水培養を用いた炭化水素生産システム（希釈海水培養システム）。

希釈海水培養システムでは含水率 78%の粘性スラリーが重力による傾斜型固液分離で得られることが確認された。その特性を利用して、レースウェイポンドで収穫した藻体スラリーを送液ポンプではなく、車輸送することを考えた。想定した 4 ha のレース

ウェイポンドを正方形になるように 1000 ha 並べ、その中央に抽出プラントを設置することを想定した (図 5-8)。輸送経路として、中央プラントを出発し、各レースウェイポンドで藻体スラリーを回収し、最大積載量になると中央プラントに戻ることを繰り返すを想定した。輸送車には最大積載量 24 t のトレーラー、5.4 t の吸上車 (バキュームカー)、4.0 t のトラックを想定した。各トラックの燃費を表 5-8 に示す [94]。吸上車の燃費は最大積載量が近いトラックの燃費を参考にして設定した。また収穫後、ポンドの前で天日干しすることにより、輸送前のある程度含水率を下げることも可能と考えられる。表 1-2 で示した *Arthrospira* も重力濾過が可能なサイズであり、実際にポンドの傍で濾過後の天日干しが行われている [8]。藻体スラリーを車輸送した際の、総走行距離および投入エネルギーを表 5-9 に示す。含水率 60%、30% の流動性がない状態では吸上車による吸引は不可能であると判断し、30%、60% における輸送は大型トレーラーとトラックを想定した。軽油の発熱量は 38.04 MJ L^{-1} として計算した。運送方法に関わらず、単位乾燥藻体当たりに必要な投入エネルギーは $15 \text{ kJ kg-dry algae}^{-1}$ 以下であった。輸送車別にみると、積載量の上昇とともに総走行距離は低下する。それは投入エネルギーにおいても同様の傾向であった。希釈海水培養システムにおいてポンプで送液し、脱水した場合に必要なエネルギーは $60 \text{ kJ kg-dry algae}^{-1}$ であり、コスト面でみると搬入および搬出に人件費等が発生するが、車輸送は低投入エネルギー型の輸送プロセスである。

このように車輸送は、低投入エネルギー型の輸送であることが確認された。日本のように、平地が少なく大型培養ポンドを敷設しにくい地形や、脱水・抽出プラントと培養ポンド間の距離や地形の問題でパイプラインを敷設することが難しい場所もある。コロニーサイズの上昇は、ポンプおよびスクリーンのみを使った簡易的な現地収穫を可能とし、そのような場所では自動車ですべて抽出プラントまで輸送することが有利であることが示唆された。

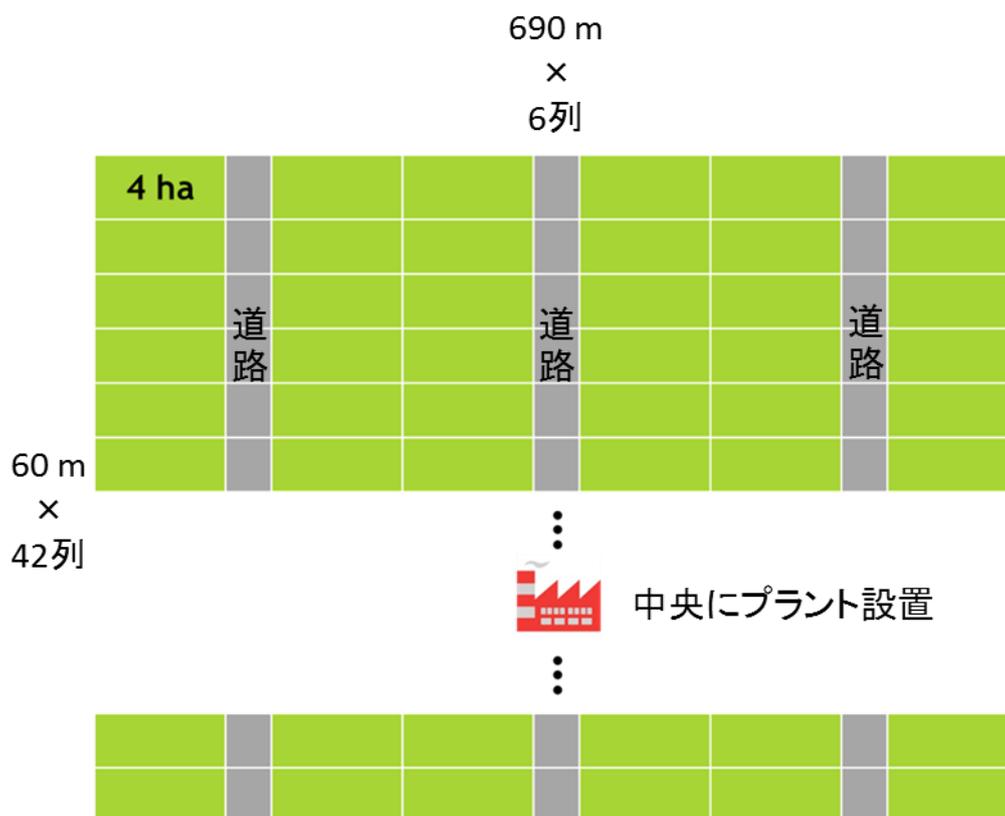


図 5-8. 濃縮藻体スラリーを車輸送するプロセスで想定した総培養面積 1000 ha のレイ
スウェイポンド、道路および中央に設置した抽出プラントの配置イメージ。

表 5-8. 濃縮藻体スラリーを運ぶ輸送車の最大積載量および燃費 [94]

輸送車	最大積載量 (t)	燃費 (km L ⁻¹)
トレーラー	24.0	4.0
吸上車	5.4	6.2
トラック	4.0	7.0

表 5-9. 濃縮藻体スラリーを車輸送するために必要な輸送車の走行距離および投入エネルギー.

輸送車	スラリー含水率 (%)	走行距離 (km)	投入エネルギー (kJ kg-dry algae ⁻¹)
トレーラー	78.9	50.7	6.1
	60	28.5	3.4
	30	24.4	2.9
吸上車	78.9	166.2	12.8
トラック	78.9	217.4	14.8
	60	119.5	8.1
	30	74.9	5.1

5.3.2 溶媒抽出プロセスにおける投入エネルギー

希釈海水培養した濃縮藻体スラリーからの溶媒抽出による炭化水素回収率を図 5-9 に示す。0.3%ASM で希釈海水培養した含水率 70%の藻体スラリーからは 4 h で 95%以上の炭化水素が回収された。一方で,FM 下で培養した同含水率の藻体スラリーからは,抽出時間を 12 h にしても炭化水素回収率は 50%以下であり, グラフから 95%以上の炭化水素を回収するには 16 h 以上かかると予想される。これは濃度が非常に希薄である培養液に直接有機溶媒を混合して炭化水素回収を行った実験 (図 3-3) と同様の傾向であり, 炭化水素回収性に与える希釈海水培養の有効性が, 濃縮藻体スラリーにおいても確認された。希釈海水培養システムでは濃縮藻体スラリーの含水率の低下とともに炭化水素回収性が向上し, 含水率 60%のスラリーでは約 3 h 程度で 95%以上の炭化水素回収率が得られると予想される。一方で, 加熱処理においては, 同じ溶媒比において, 液状のスラリーから溶媒抽出する液液抽出であれば 2 h, 含水率 60%のほぼ固体のペースト状からの固液抽出であれば 30 min で 95%以上の炭化水素が回収可能であると報告されている [89]。0.3%ASM の希釈海水培養では, 加熱前処理程の炭化水素回収性向上効果は得られなかった。これらの結果から脱水後に得られる含水率 70%の藻体スラリーから溶媒抽出することを想定し, 加熱システムでは抽出時間を 2 h, 希釈海水培養システムでは 4 h と設定した。乾燥システムに関しては, 加熱処理の固液抽出と同条件であると仮定し, 抽出時間を 30 min とした。

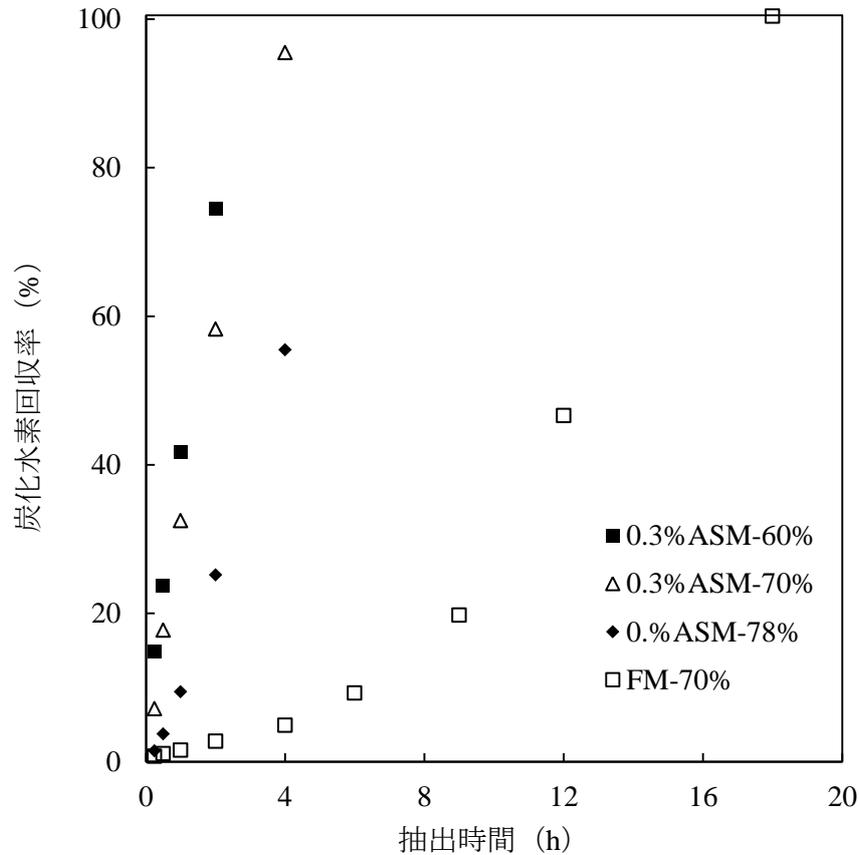


図 5-9. 0.3%海水塩濃度改変希釈人工海水培地 (0.3%ASM) および淡水培地 (FM) で培養した濃縮藻体スラリーからの炭化水素回収率.

凡例中の百分率は濃縮藻体スラリーの含水率.

溶媒抽出プロセスに要するエネルギーおよび抽出後に得られる炭化水素の高位発熱量を図 5-10 に示す. 希釈海水培養システムでは, 投入エネルギーが加熱システムの 80% 程度であった. 投入エネルギーに占める割合として, 前処理としての加熱, 乾燥が大きな割合を占めている. 希釈海水培養システムでは, 加熱, 乾燥処理が不要である. しかし, 全てのシステムにおいて, ノルマルヘキサンを蒸発させて回収するための熱エネルギー (ヘキサン潜熱に相当) と, 抽出残渣中に残ってしまい回収しきれないノルマルヘ

キサン（ヘキサンロス）の発熱量が全投入エネルギー中で大きな割合を占める。後者を低減するのは非常に難しく、残渣に残るノルマルヘキサンを減らそうとすると、残渣中の水分も蒸発させ、投入エネルギーが増加することが報告されている [77]。前者については、実機でのハンドリングおよび抽出時間を考慮して、投入する溶媒の量を低減していく必要があると考えられる。攪拌動力については、攪拌時間が長くなっても、エネルギー収支に与える影響は小さい。

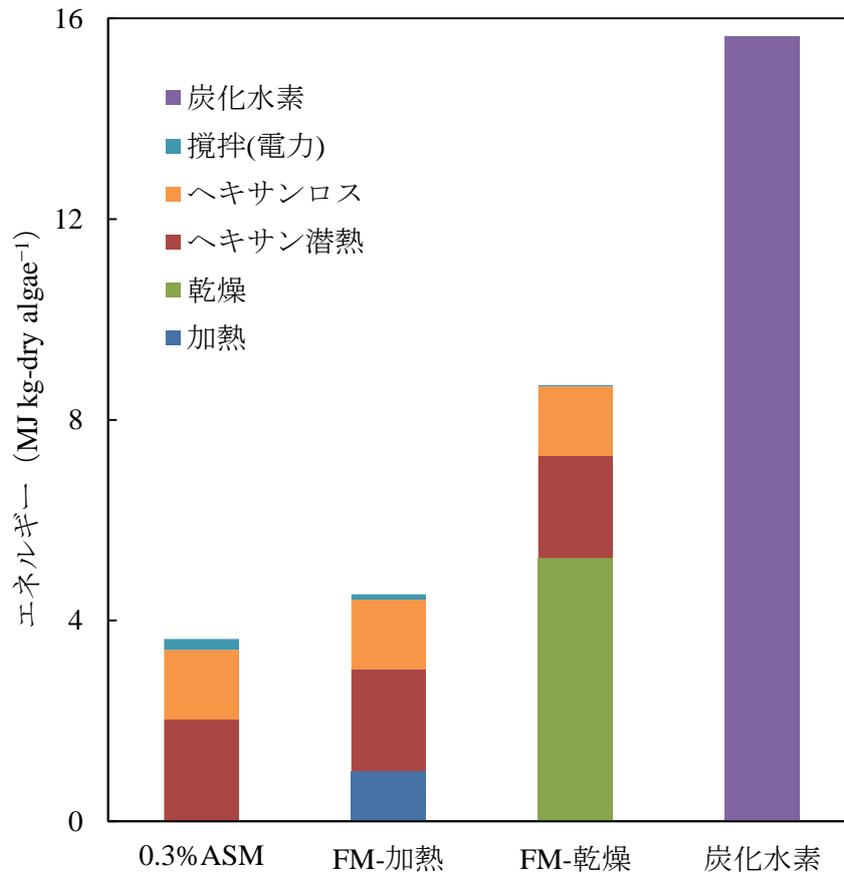


図 5-10. *B. braunii* からの炭化水素生産システムの溶媒抽出プロセスにおける投入エネルギーと回収した炭化水素の発熱量.

0.3%ASM, 希釈海水培養を用いた炭化水素生産システム (希釈海水培養システム); FM-加熱, 淡水培養し溶媒抽出前に加熱処理する炭化水素生産システム (加熱プロセス); FM-乾燥, 淡水培養し溶媒抽出前に乾燥処理する炭化水素生産システム (乾燥プロセス); 炭化水素, 回収した炭化水素の高位発熱量.

5.3.3 炭化水素生産システムのエネルギー収支

培養，収穫・輸送・脱水，溶媒抽出プロセスに分けて，各プロセスに要するエネルギーを述べた．これらをまとめて，図 5-11 に炭化水素生産システムのエネルギー収支を示す．収穫・輸送・脱水プロセスのエネルギー割合は少なく，加熱システムでは収穫・輸送・脱水プロセスの投入エネルギーが占める割合は全プロセス投入エネルギーの僅か4%程度であった．そのため希釈海水培養によりコロニーサイズを増大させることで，収穫・輸送・脱水プロセスに必要な投入エネルギーを削減しても，全エネルギー収支への影響は小さい．しかし，コロニーサイズを大きくしてワイヤースクリーンにより容易に濃縮スラリー化すれば，天日干しによる現地乾燥が可能になる．現地乾燥すると，脱水プロセスを取り入れずかつパイプライン敷設に要するコストを削減することが可能となるため，輸送にかかる人件費を考慮する必要があるが，コスト削減効果も考えられる．導入には，設置場所やプラントレベルを想定した経済的分析が必要になると考えられる．

一方で，培養および溶媒抽出プロセスに必要なエネルギーは大きい．そのため培養プロセスおよび抽出プロセスの個別の分析で議論した課題（施肥，二酸化炭素供給，ロスヘキサン，抽出溶媒量）が，エネルギー収支に大きな割合を占めることになる．図 5-11 で得られたエネルギー収支より算出した EPR を表 5-10 に示す．希釈海水培養システムでは $EPR = 2.2$ ，加熱システムでは $EPR = 1.9$ ，乾燥システムでは $EPR = 1.3$ であり，希釈海水培養システムのエネルギー収支改善効果が確認された．

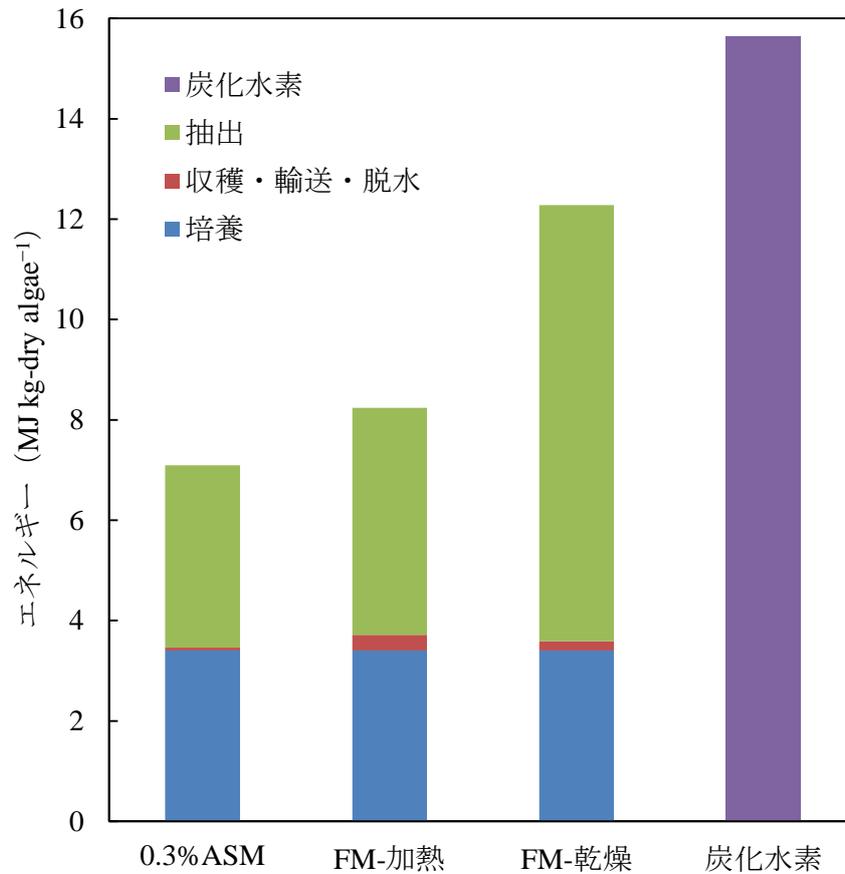


図 5-11. *B. braunii* からの炭化水素生産システムに要するエネルギー収支.

0.3% ASM, 希釈海水培養を用いた炭化水素生産システム (希釈海水培養システム); FM-加熱, 淡水培養し溶媒抽出前に加熱処理する炭化水素生産システム (加熱プロセス); FM-乾燥, 淡水培養し溶媒抽出前に乾燥処理する炭化水素生産システム (乾燥プロセス); 炭化水素, 回収した炭化水素の高位発熱量.

表 5-10. *B. braunii* からの炭化水素生産システムのエネルギー収支比の比較.

希釈海水培養システム, 希釈海水培養を用いた炭化水素生産システム; 加熱システム, 淡水培養し溶媒抽出前に加熱処理する炭化水素生産システム; 乾燥システム, 淡水培養し溶媒抽出前に乾燥処理する炭化水素生産システム.

炭化水素生産システム	EPR
希釈海水培養システム	2.2
加熱システム	1.9
乾燥システム	1.3

図 5-11 のエネルギー収支は, 藻体から抽出した炭化水素のみを対象にしたものである. 他に, 副産物として抽出残渣が得られる. *B. braunii* の抽出残渣は, 細胞, および細胞外マトリクスから炭化水素を除いたもので構成される. 細胞外マトリクスは生産された炭化水素が重合化したものであると考えられており, 残渣から付加価値物質を得ることができる可能性がある. 市場規模がある程度大きく, バイオ燃料との同時生産が可能な付加価値物質が開発できれば, 製造コストが課題の一つとなっている微細藻類からのバイオ燃料生産をコスト面で補填することが可能となる.

他方で, 残渣のエネルギー利用も考えられる. 上述のように *B. braunii* の抽出残渣は, 炭化水素が重合化した細胞外マトリクスから構成されており, そのエネルギー密度は高い. 元素分析結果から算出したその高位発熱量は 33.8 MJ kg^{-1} と高い値であった. 残渣の持つエネルギーは藻体全体の 55.0% を占め, 残渣のエネルギー利用も有望である.

Chlorella や *Spirulina* など, 脂質をほとんど蓄えない微細藻類の高位発熱量はそれぞれ 24.3 MJ kg^{-1} , 24.9 MJ kg^{-1} であり [95], 細胞内脂質を蓄える他の脂質生産性微細藻類の抽出残渣の発熱量も同程度であると考えられる. それらの藻体と比較すると *B. braunii* の抽出残渣の発熱量は高い. 高エネルギーをもつ抽出残渣からエネルギーを回収する方

法として、メタン発酵や水熱液化、熱分解などが試されているが [89, 96], 課題もある。

メタン発酵では残渣中に残存するヘキサンが発酵を阻害する [89]。水熱反応では得られるオイルに酸素原子が多く含まれており、改質を必要とする [97, 98]。

溶媒抽出残渣の熱利用を想定したエネルギー収支を図 5-12 に示す。投入エネルギーは各プロセスを統合した上で、電力、熱エネルギーおよび投入資材の間接エネルギーに分けた。抽出残渣には、回収しきれなかった炭化水素、残存するヘキサン、加熱抽出時に溶出する熱水抽出物が含まれる。熱水抽出物は糖類が主成分であるため、その発熱量は 15.20 MJ kg^{-1} と低く、残渣のエネルギーに占める割合も 6.8% と低いため、加熱システムの評価において残渣の熱エネルギーが減少する影響は無視した。最も多く熱を利用する乾燥システムの場合でも、必要とする熱エネルギーは、残渣の高位発熱量の 33% 程度であった。そのため残渣を熱利用することにより、希釈海水培養システム、加熱システムおよび乾燥システムの全てにおいて、システム全体に必要な熱エネルギーを賄うことが可能である。一方で、抽出残渣を直接燃焼して発電を行い熱電併給した場合、排ガスの熱によって、燃焼のための抽出残渣の事前乾燥、および全プロセスの熱エネルギーはほぼ賄えると考えられる。図 5-12 から熱エネルギーを引いたものが、図 5-13 である。電力と資材のエネルギーのみを対象にすると、各システム間に大きな違いはない。残渣による発電効率を 10% と仮定すると、その電力量は本研究で算出したシステム投入電力量の、希釈海水培養システムでは 98%、加熱システムでは 94% とほぼ全てを賄うことができる。抽出残渣を直接燃焼して発電を行い熱電併給した場合の算出した EPR をに示す。希釈海水培養システムでは、 $\text{EPR} = 5.5$ 、加熱システムでは $\text{EPR} = 5.2$ であった。抽出残渣によってガス化発電を行えば更に効率が高くなる。残渣による熱電併給で電力と熱を賄う場合、EPR に影響するものは、施肥およびロスヘキサンの損失であり、それらを低減させる技術開発が重要となる。施肥については、培養プロセスにおける投入エネルギーで述べたようにアンモニア態窒素の吸収が可能となれば大幅な投入エネ

ルギーの減少が見込まれる。溶媒回収にともなうヘキサン損失の低減は難しいと上述したが、残渣を熱利用するのであれば、水分蒸発にともなう熱エネルギーは残渣の熱で賄える。そのため、液液抽出と比較して溶媒回収率がよいと報告されている固液抽出を採用した方が有利となり [79]、現地ポンドでの収穫後の天日干し、および車輸送によって投入エネルギーを低下できると考えられる。

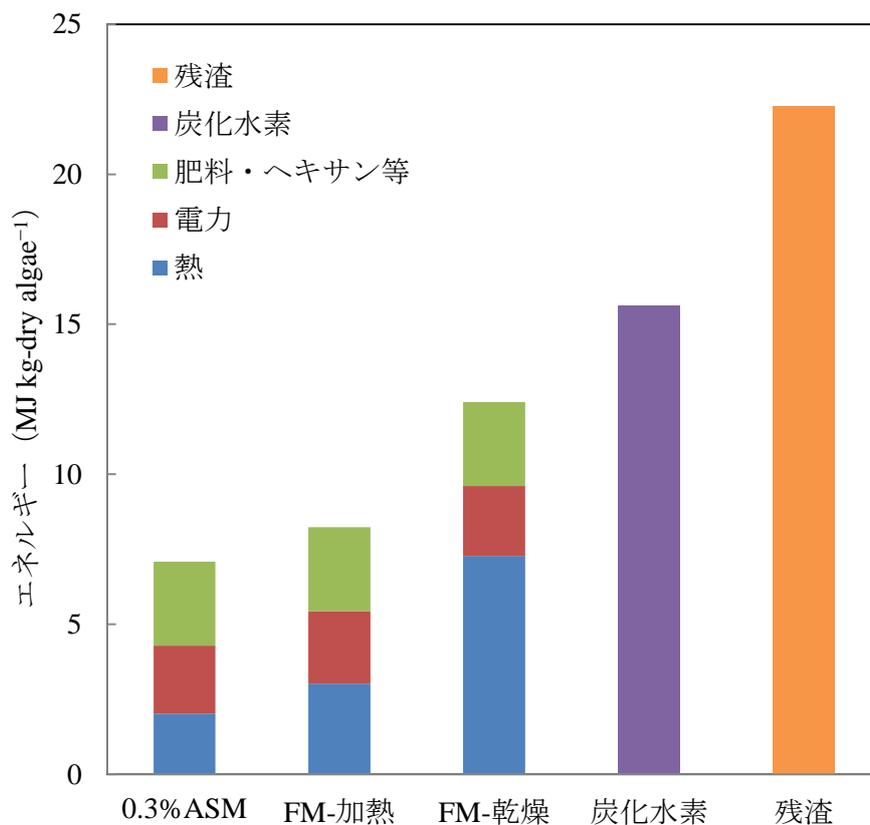


図 5-12. 熱，電力，間接エネルギーに分類した *B. braunii* からの炭化水素生産システムの投入エネルギーと炭化水素および残渣の高位発熱量.

0.3%ASM, 希釈海水培養を用いた炭化水素生産システム (希釈海水培養システム); FM-加熱, 淡水培養し溶媒抽出前に加熱処理する炭化水素生産システム (加熱プロセス); FM-乾燥, 淡水培養し溶媒抽出前に乾燥処理する炭化水素生産システム (乾燥プロセス); 炭化水素, 回収した炭化水素の高位発熱量; 残渣, 溶媒抽出残渣の高位発熱量.

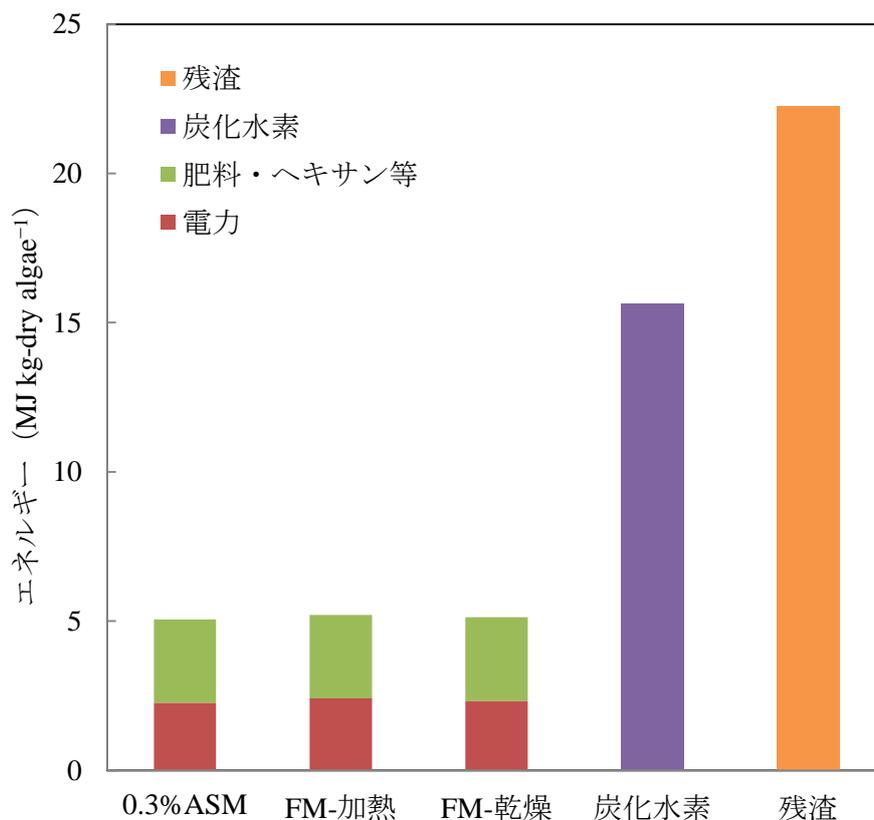


図 5-13. 熱エネルギーを除いた *B. braunii* からの炭化水素生産システムの投入エネルギーと炭化水素および残渣の高位発熱量.

0.3%ASM, 希釈海水培養を用いた炭化水素生産システム (希釈海水培養システム); FM-加熱, 淡水培養し溶媒抽出前に加熱処理する炭化水素生産システム (加熱プロセス); FM-乾燥, 淡水培養し溶媒抽出前に乾燥処理する炭化水素生産システム (乾燥プロセス); 炭化水素, 回収した炭化水素の高位発熱量; 残渣, 溶媒抽出残渣の高位発熱量.

表 5-11. 溶媒抽出残渣を直接燃焼して発電を行い熱電併給した場合における *B. braunii* からの炭化水素生産システムのエネルギー収支比の比較。
 希釈海水培養システム，希釈海水培養を用いた炭化水素生産システム；加熱システム，淡水培養し溶媒抽出前に加熱処理する炭化水素生産システム。

炭化水素生産システム	EPR
希釈海水培養システム	5.5
加熱システム	5.2

5.3.4 まとめ

溶媒抽出前に加熱・乾燥処理する既存の *B. braunii* からの炭化水素生産システムの EPR を算出した結果，それぞれ 1.9，1.3 であった。一方で希釈海水培養を用いた炭化水素生産システムの場合，算出された EPR は 2.2 となり，希釈海水培養により *B. braunii* からの炭化水素生産システムのエネルギー収支は向上することが確認された。希釈海水培養システムを用いると加熱システムと比較して，収穫・輸送・脱水プロセスでは投入エネルギーを 80%程度削減，溶媒抽出プロセスでは 20%程度削減することが可能となった，コロニーサイズの増大により収穫・輸送・脱水プロセスにおいても投入エネルギーが削減される。しかし，加熱システムで収穫・輸送・脱水プロセスの投入エネルギーが占める割合は全プロセス投入エネルギーの 4%程度と小さいため，その削減効果は僅かである。ただ，希釈海水培養システムでは，ウェッジワイヤースクリーンを用いた傾斜型固液分離により重力濾過のみで培養ポンドで現地収穫が可能となるので，パイプラインによる液輸送を使わず，パイプラインによる液輸送に必要な投入エネルギーの 25%以下という低エネルギーで車輸送することが可能となる。パイプラインを引くことが難しい場所や，培養ポンドが飛び地である場合には，メリットになると考えられる。実際の導入には，パイプラインの敷設等と車輸送に関わる人件費等を比較したコスト試算が必要となる。

他方で、*B. braunii* の溶媒抽出残渣を直接燃焼して発電を行い熱電併給した場合、投入熱エネルギーおよび投入電力のほとんどを残渣から賄うことが可能である。そのため、希釈海水培養、加熱、乾燥システムの投入エネルギーはほぼ変わらない。そのため、希釈海水培養システムでも溶媒抽出前に、加熱もしくは乾燥の前処理を行うことで抽出時間をより短くすることが可能となる。前処理（加熱・乾燥）の導入判断にはコスト試算をする必要がある。加熱もしくは乾燥処理にかかる装置コストと、希釈海水培養システムの抽出時間延長に伴う抽出装置コストの増大を比較し、前処理の導入を検討する必要がある。しかし、希釈海水培養した藻体スラリーは含水率の低下とともに、その炭化水素回収性が向上したことから、残渣の熱電併給を考えた場合、溶媒抽出前にある程度藻体の含水率を下げるため、排熱による事前乾燥や現地収穫による天日干しを行うのが有効であると考えられる。含水率が 60%より低下した藻体から溶媒抽出を行えば 95%以上の炭化水素回収率を得る時間は 3 h よりさらに短くなり、加熱処理や乾燥処理と同等の抽出時間で炭化水素を回収できる可能性がある。投入電力の算出は、培養プロセスにおける攪拌動力算出に直結するパドル攪拌効率選定の不確定要素があるため、ある程度幅をもった評価が必要であるが、残渣の熱電併給により投入電力のほとんどを残渣から賄うことが可能である。その場合、最終的にエネルギー収支に影響するものは施肥および回収しきれずに抽出残渣に残存してしまう溶媒（ヘキサン）の損失である。それらを低減させるため、*B. braunii* に硝酸態窒素ではなくアンモニア態窒素を利用させる技術および固液抽出するために抽出前に含水率を更に下げる技術開発が重要である。

第6章 結論

6.1 研究のまとめ

淡水性微細緑藻 *Botryococcus braunii* を希釈海水培地で培養することで、溶媒抽出による炭化水素の回収性が向上することが確認された。B race の Showa 株を用いた実験で 1.8%以上の海水塩濃度培地で培養すると、藻体は死滅し、培養することができなかった。0.9%海水塩濃度の希釈海水培地では増殖速度が大幅に低下したが、炭化水素の回収性は飛躍的に向上した。さらに塩濃度を下げた 0.3%海水塩濃度の希釈海水培地では、増殖速度、炭化水素含有率に低下はみられず、炭化水素回収性が向上した。また、希釈海水培地は炭化水素回収性の改善効果をもたらすだけでなく、濾過プロセスに有効であると考えられる浸透圧由来と考えられるコロニーサイズの大幅な増大およびコロニー浮上性の向上をもたらした。

希釈海水培養が炭化水素回収性を向上させるメカニズムについても検討した。*B. braunii* が炭化水素を細胞内ではなく細胞外マトリクスに蓄積するにも関わらず、容易に溶媒抽出できない理由は、コロニー全体を覆っている主に糖類からなる Colony sheath と呼ばれている繊維層が、コロニー内部への有機溶媒の侵入を妨げているためと考えられる。希釈海水培養では Colony sheath の繊維長が短くなりかつ繊維密度が低下し、徐々に繊維層が消失していくために、また加熱処理では繊維層の溶出のために、コロニー内部への有機溶媒の侵入が容易になったため藻体からの炭化水素回収性が向上したと考えられる。一方で、細胞分裂が完了した際に、細胞頭頂部の Colony sheath とともに培地中に放出される Retainig wall は、希釈海水培養と加熱処理の両方でコロニー表面に残存していた。Retaining wall が存在するにも関わらず、藻体からの炭化水素回収性が向上していた理由は、Retaining wall は炭化水素の重合物であると考えられており、コロニー内部への有機溶媒の侵入を妨げないためと考えられる。

溶媒抽出前に加熱・乾燥処理する既存の *B. braunii* からの炭化水素生産システムの EPR を算出した結果、それぞれ 1.9, 1.3 であった。一方で希釈海水培養を用いた炭化水素生産システムの場合、算出された EPR は 2.2 となり、希釈海水培養により *B. braunii* からの炭化水素生産システムのエネルギー収支は向上することが確認された。希釈海水培養システムを用いると加熱システムと比較して、収穫・輸送・脱水プロセスでは投入エネルギーを 80%程度削減、溶媒抽出プロセスでは 20%程度削減することが可能となった、しかし、収穫・輸送・脱水プロセスの投入エネルギーが占める割合は全プロセス投入エネルギーの 4%程度と小さいため、その削減効果は僅かである。ただ、希釈海水培養では、ウェッジワイヤースクリーンを用いた傾斜型固液分離により、重力濾過のみで培養ポンドで現地収穫が可能となるので、パイプラインによる液輸送を使わず、低投入エネルギーで車輸送することが可能である。パイプラインを引くことが難しい場所や、培養ポンドが飛び地である場合には、大きなメリットになると考えられる。一方で、残渣を直接燃焼して熱電併給を考えた場合、炭化水素生産システムに必要な熱エネルギーおよび投入電力のほとんどを残渣から賄うことが可能である。

6.2 今後の課題

今後、希釈海水培養を用いて *Botryococcus braunii* からのバイオ燃料を製造していくにあたり、一番の課題は安定的な大量培養である。海岸沿い地域では容易に海水を利用できるが、内陸部では難しい。またコロニーサイズ増大による現地ポンドでの収穫プロセスを導入する場合、排水や輸送設備を建設せず、既存の入水設備のみで賄えるため耕作放棄地を利用できる可能性もある。そのような場合には、海水を使用せず、コロニーサイズおよび Colony sheath の繊維層を消失させる育種技術が求められる。

残渣をエネルギー利用し熱電併給を考えた場合、施肥および抽出溶媒に用いたノルマ

ルヘキサン損失が投入エネルギーのほとんどを占める。それらを低減させるため、*B. braunii* に硝酸態窒素ではなくアンモニア態窒素を吸収させる技術および固液抽出するため抽出前に含水率を70%よりも更に下げる技術を開発する必要がある。また実際に導入プロセスを決定するには、エネルギー収支だけでなく、コスト試算が必要となるため、実プラント規模（バイオエタノール生産プラントの規模から想定すると10万kL以上）を想定した精細なコスト計算をする必要がある。

最後に、微細藻類からバイオ燃料を生産する研究は、世界中でさかんに行われているが、実用化するためには経済性、エネルギー収支が成り立ち、GHG排出量の削減効果が必要不可欠である。そのため微細藻類からのバイオ燃料生産の実用化まではまだ長い年月がかかると考えられる。実際に、商用化している微細藻類からの生産物質は、全て健康食品、色素等の高付加価値物質である。そのため、現在の技術で高コストな脂質を生産し、商業的に採算が合わないバイオ燃料生産のみを目的とすることは、研究の存続性を失わせ、実証プラント規模の研究開発は止まる可能性がある。よって、バイオ燃料生産に優れている微細藻類、特に*B. braunii* から高付加価値物質を見つけることができれば、将来的に生産コストを下げるための大量培養技術、濃縮技術そして抽出技術をモジュールスケールのプラントで継続的に発展させることが可能となり、微細藻類からのバイオ燃料生産を実用化できると考える。

謝辞

本論文は、著者が東京大学大学院農学生命科学研究科在学中に行った研究の成果をまとめたものであり、多くの方々に御指導を賜った。まず指導教員として、また学位審査の主査として、御苦勞頂いた芋生憲司教授に厚く感謝の意を表す。また、副査として御審査頂いた、大下誠一教授、富士原和宏教授、岡田茂准教授、海津裕准教授、そして研究の発展のために御指導いただいた元東京大学助教の佐賀清崇氏、特任研究員の長谷川文生氏に、感謝の意を表す。

また実験にご協力いただいた野口哲子教授、東洋スクリーン工業株式会社に厚く御礼申し上げます。

以上の方々、並びにここに挙げるができなかった方々の御協力、御助言により、本論文は完成した。また本研究は、主に JSPS 特別研究員奨励費 02507091 の助成を受けて実施した。関係者各位に心より深く感謝申し上げます。

参考文献

1. 経済産業省, 資源エネルギー庁. 2015. 平成 26 年度エネルギーに関する年次報告 (エネルギー白書 2015).
2. 環境省. 2014. 気候変動に関する政府間パネル (IPCC) 第 5 次評価報告書 (AR5).
3. Sahoo, D. et al. 2015. *The Algae World*. Springer Netherlands.
4. Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25(3): 294-306.
5. Weyer, K.M. et al. 2010. Theoretical maximum algal oil production. *Bioenergy Research*. 3(2): 204-213.
6. Darzins, A. et al. 2010. Current status and potential for algal biofuels production. NREL Report T39-T2.
7. Weissman, J.C. et al. 1989. Design and operation of an outdoor microalgae test facility. SERI Final Subcontract Report.
8. Becker, E.W. 1994. *Microalgae*. Cambridge University Press.
9. Quinn, J.C. et al. Current large-scale US biofuel potential from microalgae cultivated in photobioreactors. *Bioenergy Research*. 30(5): 49-60.
10. Moody, J.W. et al. 2014. Global evaluation of biofuel potential from microalgae. *PNAS*. 111(23): 8691-8696.
11. 稲井史生ら. 2014. バイオ分野におけるグリーンエネルギー関連技術に関する特許面からの調査, 研究及び提言. *パテント*. 67(13): 51-58.
12. Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*. 86(11): 807-815.
13. Benemann, J. 2013. Microalgae for biofuels and animal feeds. *Energies*. 6(11): 5869-5886.
14. Spolaore, P. et al. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101(2): 87-96.
15. Krienitz, L. et al. 2006. The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. *Limnologia*. 36(3): 204-210.
16. Pulz, O. et al. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65(6): 635-648.
17. Suzuki, K. et al. 2015. Selection and characterization of *Euglena anabaena* var. minor as a new candidate *Euglena* species for industrial application. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 79(10): 1730-1736.
18. Hu, Q. et al. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*. 54(4): 621-639.

19. Metzger, P. et al. 2005. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 66(5): 486-496.
20. Metzger, P. et al. 1985. Alkadiene- and botryococcene-producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*. 24(10): 2305-2312.
21. Huang, Z. et al. 1989. Tetramethylsqualene, a triterpene from *Botryococcus braunii* var. *Showa*. *Phytochemistry*. 28(5): 1467-1470.
22. Okada, S. et al. 2004. Characterization of botryococcene synthase enzyme activity, a squalene synthase-like activity from the green microalga *Botryococcus braunii* Race B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 422(1): 110-118.
23. Niehaus, T.D. et al. 2011. Identification of unique mechanism for triterpene biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *PNAS*. 108(30): 12260-12265.
24. Metzger, P. et al. 1987. Lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon from new strains of the green alga *Botryococcus braunii*. *Tetrahedron Letters*. 28(34): 3931-3934.
25. 北里元ら. 1989. 藻類により生産される炭化水素油の接触分解. *石油学会誌*. 32(1): 28-34.
26. Hillen, L.W. et al. 1980. Hydrocracking of the oils of *Botryococcus braunii* to transport fuels. *Biotechnology and Bioengineering*. 24(1): 1043-1051.
27. 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構. 2013. 炭化水素計オイル産生微細藻類からの”Drop-in fuel”製造技術に関する研究開発, 平成 23-24 年度成果報告書.
28. Lee, A.K. et al. 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy* 46: 89-101.
29. Largeau, C. et al. 1980. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*. 19(6): 1043-1051.
30. Cohen, Z. 1999. *Chemicals from Microalgae*. CRC Press.
31. Sharma, K.K. et al. 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*. 5(5): 1532-1553.
32. Hirose, M. et al. 2013. Active hydrocarbon biosynthesis and accumulation in a green alga, *Botryococcus braunii* (Race A), *Eukaryotic Cell*. 12(8): 1132-1141.
33. Suzuki, R. et al. 2013. Transformation of lipid bodies related to hydrocarbon accumulation in a green alga, *Botryococcus braunii* (Race B). *PLoS One*. 8(12): e81626.
34. Rakesh, S. et al. 2015. Cell disruption methods for improving lipid extraction efficiency in unicellular microalgae. *Engineering in Life Sciences*. 15(4): 443-447.
35. Slade, R. et al. 2013. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and Bioenergy*. 53: 29-38.

36. Bligh, E.G. et al. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(8): 911-917.
37. Kanda, H. et al. 2012. Lipids extracted from several species of natural blue-green microalgae by dimethyl ether: extraction yield and properties. *Fuel*. 95(1): 88-92.
38. Aresta, M. et al. 2005. Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO₂ extraction and thermochemical liquefaction. *Environmental Chemistry Letters*. 3(3): 136-139.
39. Tian, C. et al. 2014. Hydrothermal liquefaction for algal biorefinery: a critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 38: 933-950.
40. Kanda, H. et al. 2013. Wet extraction of hydrocarbons from *Botryococcus braunii* by dimethyl ether as compared with dry extraction by hexane. *Fuel*. 105: 535-539.
41. Mendes, R.L. et al. 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*. 356: 328-334.
42. Dote, Y. et al. 1994. Recovery of liquid fuel from hydrocarbon-rich microalgae by thermochemical liquefaction. *Fuel*. 73(12): 1855-1857.
43. Inoue, S. et al. 1994. Analysis of oil derived from liquefaction of *Botryococcus braunii*. *Biomass and Bioenergy*. 6(4): 269-274.
44. Frenz, J. et al. 1989. Hydrocarbon recovery and biocompatibility of solvents for extraction from cultures of *Botryococcus braunii*. *Biotechnology and Bioengineering*. 34(6): 755-762.
45. Lee, J.Y. et al. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*. 101(1): 575-577.
46. Kita, K. et al. 2010. Thermal pre-treatment of wet microalgae harvest for efficient hydrocarbon recovery. *Applied Energy*. 87(7): 2420-2423.
47. Magota, A. et al. 2012. Effect of thermal pretreatments on hydrocarbon recovery from *Botryococcus braunii*. *Bioresource Technology*. 123: 195-198.
48. Saga, K. et al. 2013. Hydrocarbon recovery from concentrated algae slurry via thermal pretreatment. *Journal of the Japan Institute of Energy*. 92: 1212-1217.
49. Ranga Rao, A. et al. 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*. 98(3): 560-564.
50. Ruangsomboon, S. 2012. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. *Bioresource Technology*. 109: 261-265.
51. Natalia, O. et al. 2011. Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *Journal of Applied Phycology*. 23(1): 47-52.

52. Yoshimura, T. et al. 2013. Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain showa: optimal CO₂, salinity, temperature, and irradiance conditions. *Bioresource Technology*. 133: 232-239.
53. Dayananda, C. et al. 2007. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass and Bioenergy*. 31(1): 87-93.
54. Amin Hejazi, M. et al. 2004. Milking of microalgae. *Trends in Biotechnology*. 22(4): 189-194.
55. Moheimani, N.R. et al. 2013. Non-destructive oil extraction from *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*. 25(6): 1653-1661.
56. Frenz, J. et al. 1989. Hydrocarbon recovery by extraction with a biocompatible solvent from free and immobilized cultures of *Botryococcus braunii*. *Enzyme and Microbial Technology*. 11(11): 717-724.
57. 財団法人バイオインダストリー協会ら. 1987. 微細藻類による燃料油生産システムに関する調査研究 (バイオテクノロジー利用による新燃料油生産, 利用技術に関するフィージビリティ調査).
58. Moheimani, N.R. et al. 2014. Non-destructive hydrocarbon extraction from *Botryococcus braunii* BOT-22 (race B). *Journal of Applied Phycology*. 26(3): 1453-1463.
59. Allard, B. et al. 1990. Carbohydrate composition and characterization of sugars from the green microalga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*. 29(6): 1875-1878.
60. Zhang, H. et al. 2011. Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*. *Biomass and Bioenergy*. 35(5): 1710-1715.
61. Wolf, F.R. et al. 1985. Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*. 21(3): 388-396.
62. Eloglu, E. et al. 2010. Extracellular terpenoid hydrocarbon extraction and quantitation from the green microalgae *Botryococcus braunii* var. Showa. *Bioresource Technology*. 101(7) 2359-2366.
63. Eloglu, E. et al. 2011. Hydrocarbon productivities in different *Botryococcus* strains: comparative methods in product quantification. *Journal of Applied Phycology*. 23(4): 763-775.
64. Van Donk, E. et al. 1997. Altered cell wall morphology in nutrient-deficient phytoplankton and its impact on grazers. *Limnology and Oceanography*. 42(2): 357-364.
65. Casadevall, E. et al. 1985. Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure and phosphate nutrition. *Biotechnology and Bioengineering*. 27(3): 286-295.

66. Uchida, H. et al. 2012. Isolation and characterization of two squalene epoxidase genes from *Botryococcus braunii*, Race B. PLoS One. 1(10): e0122649.
67. Tanoi, T. et al. 2013. Iron and glucose effects on the morphology of *Botryococcus braunii* with assumption on the colony formation variability. Journal of Applied Phycology. 26(1): 1-8.
68. Sawayama, S. et al. 1999. Possibility of renewable energy production and CO₂ mitigation by thermochemical liquefaction of microalgae. Biomass and Bioenergy. 17(1): 33-39.
69. Milledge, J.J. et al. 2013. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 12(2): 165-178.
70. Uno, Y. et al. 2015. Colony sheath formation is accompanied by shell formation and release in the green alga *Botryococcus braunii* (race B). Algal Research. 8: 214-223.
71. Weiss, T.L. et al. 2012. Colony organization in the green alga *Botryococcus braunii* (Race B) is specified by a complex extracellular matrix. Eukaryotic Cell. 11(12): 1424-1440.
72. Dubois, M. et al. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28(3): 350-356.
73. Sluiter, A. et al. 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. NREL Laboratory Analytical Procedure.
74. Atobe, S. et al. 2015. Effect of amphiphilic polysaccharides released from *Botryococcus braunii* Showa on hydrocarbon recovery. Algal Research. 10: 172-176
75. Vazquez-Duhalt, R. et al. 1991. Haloadaptation of the green alga *Botryococcus braunii* (Race A). Phytochemistry. 30(9): 2919-2925.
76. Kirst, G.O. et al. 1990. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 41: 21-53.
77. Saga, K. et al. 2015. Comparative evaluation of wet and dry processes for recovering hydrocarbon from *Botryococcus braunii*. 141(1): 90-95.
78. Slade, T. et al. 2013. Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. Biomass and Bioenergy. 53: 29-38.
79. 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構. 2015. バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）／微細藻類の改良による高速培養と藻体濃縮の一体化方法の研究開発, 平成 26 年度分中間年報.
80. Bazaes, J. et al. 2012. Outdoor pilot-scale production of *Botryococcus braunii* in panel reactors. Journal of Applied Phycology. 24(6): 1353-1360.
81. Eman Mohammed, A. et al. 2012. Modeling cost structure for assessment production cost of algal – Biofuel. International Scholarly and Scientific Research & Innovation. 6(3): 650-657.

82. 日本貿易振興機構. 2013. 調査レポート 2012 年度米国食料及びバイオ燃料生産の現状と課題.
https://www.jetro.go.jp/ext_images/jfile/report/07001324/2012_us_bio.pdf
83. Chiamonti, D. et al. 2013. Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: Re-thinking a traditional system is possible. *Applied Energy*. 102: 101-111.
84. Lundquist, T.J. et al. 2010. A realistic technology and engineering assessment of algae biofuel production. Energy Biosciences Institute.
85. Nemecek, T. et al. 2007. Life cycle inventories of agricultural production systems. data v2.0. Ecoinvent Report No.15.
86. Sasongko, N.A. et al. 2015. Introduction of integrated energy plantation model for microalgae-using palm oil mill effluent (POME). *Journal of the Japan Institute of Energy*. 94(6): 561-570.
87. Sawayama, S. et al. 1994. Continuous culture of hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41(6): 729-731.
88. LCA 日本フォーラム. LCA データベース, JLCA-LCA database 2004Fy 2nd edition, 工業用水の製造.
89. 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構. 2014. バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）／微細藻類による高効率炭化水素生産プロセスの研究開発, 平成 22-25 年度成果報告書.
90. Isa, A. et al. 2011. Estimation of energy for hydrocarbon extraction in biofuel production from microalgae. *Journal of the Japan Petroleum Institute*. 54(6): 395-399.
91. Kadam, K.L. et al. 2002. Environmental implications of power generation via coal-microalgae cofiring. *Energy*. 27(10): 905-922.
92. Jorquera, O. et al. 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*. 101(4): 1406-1413.
93. Florencio, F.J. et al. 1983. Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. 158(4): 288-293.
94. 国土交通省. 2012. 自動車燃費一覧, トラック等・トラクタ.
95. Jazrawi, C. et al. 2013. Pilot plant testing of continuous hydrothermal liquefaction of microalgae. *Algal Research*. 2(3): 268-277.
96. Murata, K. et al. 2015. Production of bio-oil from a *Botryococcus braunii* residue. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 114: 187-196.

97. Zhu, Y. et al. 2013. Development of hydrothermal liquefaction and upgrading technologies for lipid-extracted algae conversion to liquid fuels. *Algal Research*. 2(4): 455-464.
98. Biller, P. et al. 2015. Hydroprocessing of bio-crude from continuous hydrothermal liquefaction of microalgae. *Fuel*. 159(1): 197-205.