

加熱前処理による
Botryococcus braunii からの
炭化水素抽出

平成 26 年 3 月

孫田 明忠

目次

第一章 序論.....	1
1.1 背景.....	1
1.2 微細藻類の利用.....	2
1.3 微細藻類のエネルギー利用.....	4
1.4 我が国における微細藻類バイオマスのエネルギー利用の動きとその意義.....	7
1.5 微細藻類 <i>B. braunii</i> の特徴.....	8
1.6 微細藻類のエネルギー利用における処理工程(乾燥工程).....	12
1.7 研究の目的.....	14
1.8 論文の構成.....	15
第二章 加熱前処理の異株に対する効果と処理温度の影響の検討.....	16
2.1 背景と目的.....	16
2.1.1 既往の研究.....	16
2.1.2 目的.....	17
2.2 試料および実験方法.....	17
2.2.1 藻体試料.....	17
2.2.2 加熱前処理.....	20
2.2.2.1 処理温度と炭化水素回収率の関係.....	21
2.2.2.2 保持時間と炭化水素回収率の関係.....	21
2.2.3 加熱前処理を行った試料からのヘキサンのによる炭化水素抽出.....	23
2.2.4 凍結乾燥試料からの炭化水素抽出と回収率の計算.....	25
2.2.5 光学顕微鏡による藻体コロニーの観察.....	26
2.2.5.1 明視野による光学顕微鏡観察.....	26
2.2.5.2 墨汁を用いた光学顕微鏡観察.....	27
2.3 結果と考察.....	27
2.3.1 処理温度と炭化水素回収率の関係.....	27
2.3.2 保持時間と炭化水素回収率の関係.....	30
2.3.3 光学顕微鏡を用いた藻体コロニーの観察.....	33
2.4 まとめ.....	44
第三章 加熱前処理により水相中へ分散した高分子物質の定量.....	45
3.1 目的.....	45

3.2	試料および実験方法.....	45
3.2.1	藻体試料.....	45
3.2.2	吸光光度法による水相中の多糖およびタンパクの定量.....	45
3.2.2.1	フェノール・硫酸法による還元糖の定量.....	46
3.2.2.2	BCA 法によるタンパクの定量.....	46
3.2.3	追加実験.....	47
3.2.3.1	追加実験 1: 粗分散物の乾燥重量測定.....	47
3.2.3.2	追加実験 2: 加熱ステージによる藻体コロニー表面の光学顕微鏡観察.....	48
3.3	結果および考察.....	49
3.3.1	吸光光度法による水相中の多糖およびタンパクの定量.....	49
3.3.2	追加実験 1: 粗分散物の乾燥重量測定.....	55
3.3.3	追加実験 2: 加熱ステージによる藻体コロニー表面の光学顕微鏡観察.....	57
3.4	まとめ.....	62
第四章 洗浄による細胞外高分子の除去と炭化水素回収率の関係.....		64
4.1	目的.....	64
4.2	試料および実験方法.....	64
4.2.1	藻体試料.....	64
4.2.2	加熱前処理および高分子物質の除去.....	64
4.2.3	洗浄操作後の藻体スラリーからの炭化水素抽出と回収率の計算.....	65
4.2.4	光学顕微鏡による藻体コロニーの観察.....	67
4.3	結果および考察.....	67
4.3.1	洗浄操作による藻体コロニー表面の変化.....	67
4.3.2	洗浄回数と炭化水素回収率の関係.....	74
4.4	まとめ.....	75
第五章 結論.....		76
5.1	まとめ.....	76
5.2	展望.....	77
謝辞.....		78
参考文献.....		80

第一章 序論

1.1 背景

近年、地球温暖化現象や一次エネルギー供給のおよそ 90 %をまかなう枯渇性エネルギーの様々な問題が具現化し始め、環境低負荷でカーボンニュートラルな再生可能エネルギーに注目が集まっている。経済発展の著しい中国、インド、東南アジアを始めとする新興国やアフリカ諸国の発展途上国における生活水準の向上による消費エネルギーの増大は免れられず、現状のままであればこれらの問題は深刻化し 2035 年における二酸化炭素排出量は 2012 年比でおよそ 1.5 倍になると考えられている[1][2]。IEA (International Energy Agency) は空気中の二酸化炭素濃度を長期的に 450 ppm に維持するとした 450 Scenario を掲げており、その中でも再生可能エネルギーの果たす役割は大きく、一次エネルギーに占める再生可能エネルギーの割合を 27 %に引き上げることで二酸化炭素排出量を現状に維持出来るとしている[3][4]。このシナリオにおける再生可能エネルギーの中でも大きな部分を占めているのが有機物を原料としてエネルギーを取り出すバイオマスである。風力や太陽光から生産される電力とは異なり、バイオマスエネルギーは固体や液体といった貯蔵可能な形態でエネルギーを生産でき、これまで人類が築き上げて来た石油をベースにしたインフラに投入できる特徴を持っている[5][6]。このバイオマスエネルギーの中でも特に最近注目を集め、現在、世界で盛んにその利用に関する研究開発がなされている資源が微細藻類である[7]。微細藻類が注目を集めている理由として、1. オイル分の生産能力が高いこと、2. 食糧生産と競合しないかたちで生産体系を築けること、3. 二酸化炭素を固定出来ること、4. 多様性が高く、有用な有機化合物を生産できること、5. 人類による利用の歴史が浅く、研究できる未知の部分が多くポテンシャルが大きいこと、等が挙げられる。微細藻類の中には細胞内や細胞外にトリグリセリドや炭化水素といったオイル分を蓄積する種類がある。それらのオイル分を抽出し、改質して輸送用燃料として使用することが微細藻類のエネルギー利用の体系として期待されている[8]。特にある種の微細藻類が生成するオイル分が酸素原子を含まない炭化水素であることや、比較的長い炭素鎖を持つ事からクラッキングや水素付加を行い、航空機燃料として JET-A, JET-B といったケロシンやワイドカット系燃料の代替燃料として用いることが目指されている[9][10]。航空業界においては国際線を運行する航空会社が加盟する IATA (International Air Transport Association) が 2020 年から航空機の二酸化炭素排出量に上限を設け、なおかつ 2050 年までに 2005 年比で 50 %の二酸化炭素排出量削減を努力目標として掲げている[11]。また、バイオマス由来の燃料を 50 %(v/v)混合した航空燃料を ASTM International では D7655 として、従来の航空機燃料の規格である D1655 と同等規格として承認している[12]。これらの動きを受けて、2008 年からアメリカのユナイテッド航空やコンティネンタル航空を始めとした航空会社が、微細藻類由来の燃料を従来の

燃料に混合してデモンストレーション飛行を行っている[13][14]。さらに 2010 年 6 月に開催されたベルリン国際航空宇宙ショーにおいてはエアバスの親会社である EADS (European Aeronautic Defence and Space Company) が 100 %微細藻類由来の燃料を使用したデモンストレーション飛行を行った[15]。さらにパリ-東京を 2 時間半で飛行する将来型超音速旅客機に微細藻類由来のオイルを用いるべく、2020 年の試験飛行に向けて研究開発を行っていることを発表した[16]。我が国においても平成 22 年から NEDO (独立行政法人新エネルギー産業技術総合開発機構)が「戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業」として、微細藻類からのバイオジェット燃料の実用化を目指し、有望株の選定、培養、オイル回収、精製プロセス、経済性など全体的なプロセスを対象に産学官連携事業として研究開発の推進を行っている[17][18]。民間においても 2009 年の日本航空によるバイオジェット燃料(50%混合(微細藻類由来はそのうち 1 %))を用いたデモンストレーション飛行や、2012 年に国内 10 社を主体として設立された微細藻燃料開発推進協議会など活発な動きが見られる[19][20]。このように、微細藻類をエネルギー利用する、とする動きはグローバルに起きており、そのソフトにおける法整備も着々と進められ、前述したように燃料の規格は既に策定されている。しかしながら、ハードそのものは多くの課題を抱え大量生産には至っていない[21]。

微細藻類を工業的に培養し有価物を回収する工程は既に確立されている技術であり、微細藻類に関連するサプリメントや餌料といった製品は既に市販され、商業化されている[22]。しかしながら、微細藻類をエネルギー利用するとなると、そもそもの目的である二酸化炭素削減効果や、現状のエネルギー単価の安さから、その商業化は未だ本当の意味では実現されていない。それは微細藻類の株の選抜、製造工程における培養方法や有価物の回収方法、精製方法、さらには残渣や廃液の利用方法など、既往の技術と比べて厳しい目標や制限が課せられているということ、また、微細藻類の多様性から、一つの株に対して十分な知見を得ていないという現状が背景に有る[23]。

油脂生産性微細藻類の多くが細胞内に油脂を蓄積するのに対し、本研究で用いた *Botryococcus braunii* (以下 *B. braunii*) は代謝の過程で細胞外に炭化水素を分泌し、細胞外マトリクスを構成する高分子物質中に蓄積する。このため、日本においては将来のエネルギー生産を担う有望種の一つとされている[24]。そこで、このような特徴を持つ *B. braunii* の有する化学的性質に関する知見を得ることは、この微細藻類を用いるエネルギー生産において最適化されたオプションを考案し、選択するために有効な課題であると考えられる。

1.2 微細藻類の利用

微細藻類と人間の関わりは近年に始まったことでは無く、その野生株は古くから世界において食糧として利用されてきた。アフリカのチャド湖で採取される *Spirulina* は古くから

先住民の重要な蛋白源として現地住民に食されてきた[25]。同じくメキシコ高原に存在したテスココ湖(今のニューメキシコ)でも14世紀から16世紀にかけてこの*Spirulina*が先住民の蛋白源として食されていた事が記録されている。中国では採取禁止措置が出る2000年まではシアノバクテリアの一種である髮菜(はっさい)の群体を縁起物として2千年も昔から食して来た。我が国においても髮菜と同じネンジュモに属するイシクラゲやアシツキ、さらにクロオコッカス属のスイゼンジノリを酢の物や味噌汁に入れて食す文化があり、野生株の食用に関して言えば微細藻類と人間との関わりは長い[26]。

しかし、微細藻類を人類が資源として目的をもって人為的に培養する歴史は1940年代になってから開始され、本格的な研究と利用開発の歴史はまだ浅い。世界で最初に微細藻類の本格的な培養実験を行ったのは第二次世界大戦中のドイツにおいてであり、石油の不足をきっかけに代替油としての植物油脂を生産するため、珪藻の培養を試みたのが始まりである[27][28]。戦後1940年代後半、アメリカではカリフォルニアのスタンフォードにあるカーネギー研究所、ドイツではエッセンにおいて*Chlorella*を対象に野外培養実験が試みられた。前者は世界人口の急激な増加による食糧不足を予測しての食糧・飼料のタンパク質源、後者はルール工業地帯から排出される工業排ガスを固定することに主眼に置いたものであった。アメリカにおけるこの*Chlorella*の研究ではその過程の中で微細藻類の大量培養技術や生理学に関する多くの知見と研究者が輩出され、その後、日本、イギリス、イスラエル、ドイツ、ベネズエラにおける微細藻類利用技術に大きな影響を与えた。ドイツにおいては微細緑藻*Scenedesmus*(和名:イカダモ)を用いた動物実験が食糧生産を目的に行われたが、研究所のあったドルトムントのような高緯度地域では年間を通じた培養は難しいという結果に至った。それゆえドイツでは1970年代から発展途上国での食糧生産を目的としてタイやインドにパイロットプラントを建設し、それがそれらの国の微細藻類研究の礎となった[29]。フランスにおいても、かつて植民地であったチャド湖周辺地域において*Spirulina*が食糧として摂取されていた事に着目し、国内のフランス国立石油研究所において*Spirulina*の栄養学的な研究がなされた。我が国においてはGHQの天然資源局長官のShenk博士を通して田宮博教授にこの研究成果が紹介され、1951年にアメリカ軍からの資金援助を受け、徳川生物化学研究所を始めとする研究組織が結成された[30]。その後その研究成果に目を付けた当時の科学技術庁が国立にクロレラ研究所を設立し、当時世界最大のパイロットプラントが建設された。この食糧生産を目的とした微細藻類の生産は、藻類を食するという食習慣が無い事や、穀物の品種改良により高収量種が次々に開発された、いわゆる「緑の革命」を期に需要が殆どなくなってしまった。しかし、1960年代半ばから微細藻類の栄養価の高さやそれらが作る生理活性物質が注目を浴びはじめた。例えばクロレラ(*Chlorella*)やスピルリナ(*Spirulina*)は日本が世界に先駆けて商業化した微細藻類であり、そのタンパク質や

脂肪酸、生理活性物質の含有バランスの良さからそれぞれ、1964年、1978年からタブレットやカプセルに封入して販売され、微細藻類の中では最も歴史のあるサプリメントである[31][32]。抗酸化作用による抗がん効果など、多くの生理活性効果で知られる β -カロテンは、*Dunaliella* が強光下において細胞内に大量に合成・蓄積されることがイスラエルで発見されてから大量生産され、精製物や乾燥藻体が世界で販売されている[33]。アメリカの Life's DHA 社(旧 Martek Bioscience 社)では血中コレステロールを抑え、動脈硬化を防ぐ不飽和脂肪酸として知られている DHA(ドコサヘキサエン酸)を微細藻類から抽出しており[34][35][36]、イスラエルの Seambiotic 社では EPA(エイコサペンタエン酸)を抽出し商業的に販売している[37][38]。また、緑藻の *Haematococcus pluvialis* からは生理活性として高い抗酸化作用を持つアスタキサンチンが抽出され販売されている[39][40]。また、その規模はまだ小さいものの、稚貝、稚魚、稚エビの栄養源として養殖用の飼料としての培養も行われている[41]。このように、現在商業的に成り立っている微細藻類の利用は化粧品や健康食品といった高付加価値の食品およびファインケミカル分野に限られている。

1.3 微細藻類のエネルギー利用

一方で、これら高付加価値の製品とは別に近年、二回のブームに分けてエネルギー分野に微細藻類を応用する気運がアメリカを始めとして高まった。最初に微細藻類を再生可能エネルギーとして用いる気運が高まったのは 1970 年代の第一次石油ショックからである[42]。微細藻類の中には細胞内または群体内に油脂を蓄積するものがあり、微細藻類の早い増殖速度と相まって高い生産能力を示し、将来石油を代替する燃料として高いポテンシャルをもっているといわれている。微細藻類からのバイオ燃料の理論的な生産量は、陸生植物で最もオイル生産量の高いパームやしに比べて 2~10 倍あるとされている[43][44]。一回目のブームに行われた代表的なプロジェクトに NREL (National Renewable Energy Laboratory、アメリカ国家再生可能エネルギー研究所)が 1978年から 1996年にかけて行った ASP(Aquatic Species Program)がある[45]。そこでの研究開発では微細藻類の選定、微細藻類の収集・スクリーニング、品種改良、野外大量培養法、経済性評価を中心に微細藻類からのバイオディーゼル燃料生産の可能性が検証された。NREL では 1000 m²規模のオープンポンドで検証実験を行い、微細藻類からのバイオディーゼル燃料生産には工学的・経済的課題は存在しないが、エネルギー生産において微細藻類を利用するには更なる基礎研究(育種、遺伝子改良)と応用研究(大量培養、ダウンストリームプロセス)が必要であると結論づけた[46]。当時の ASP は中東における紛争状態が安定したことから原油価格が安定し、石油代替燃料の社会的ニーズが減少しその時点で打ち切れ更なる基礎・応用研究を行うには至らなかったが、二度目のブームで用いられる重要な知見を残した。アメリカにおける現在の微細藻類プリ

ジェクトはこれらの知見を元に研究開発がなされている[47]。2000年に入って石油価格の高騰、または将来予測されるであろう価格上昇、地球温暖化と温室化効果ガスの関係が顕然化してきたこと、さらにはコンピューター技術の発展によるゲノム解析技術の高度化、遺伝子改良技術の発展等の背景から微細藻類をエネルギー利用する気運は現在まで続く二度目のブームを迎えた[48]。オバマ政権下でのグリーン・ニューディール政策によりアメリカ国防総省やエネルギー省、さらに農務省からの巨額の投資を背景に微細藻類から製造できるバイオ燃料や副産物の商業化を目指す民間企業があらわれ、民間、政府、大学や研究所など多くの組織が、より経済性に優れた燃料を生産するために共同で研究開発・実証試験を行っている[49]。表 1.3.2 にアメリカにおける微細藻類系ベンチャーの主要な動きを挙げる。

表 1.3.2 アメリカにおける微細藻類系ベンチャーの概要と最近の動き

研究主体	事業内容
Algaenol Biofuel社 [50][57]	<ul style="list-style-type: none"> ・メキシコのBiofuel社から8億5000万ドルの出資を受ける。 ・遺伝子組み換えを行った藍藻からのバイオエタノールをターゲットにしている。 ・1エーカーから年産9000ガロンのエタノールを理論上得られることを発表。 ・メキシコのソロラン砂漠で年産100万ガロンのエタノール生産事業を計画。
Cellana社[51][58]	<ul style="list-style-type: none"> ・Shell社とHR Biopetroleum社が共同出資して設立した会社(Shell社が撤退し、現在の名前に改名。) ・ハワイ島コナの州立自然エネルギー研究所に隣接した2.5 haのデモプラントを有する。 ・藻体収穫技術と養殖業向け飼料に関する研究でエネルギー省から900万ドルの投資を受ける。
Chevron社[52][57]	<ul style="list-style-type: none"> ・アメリカにおけるスーパーメジャー六社の内の一社。 ・NRELと共同で微細藻類由来のジェット燃料を研究。 ・ベンチャー子会社であるChevron Technology Venturesと共同でオイル改質技術に着手している。
Exxon Mobile社[53]	<ul style="list-style-type: none"> ・Synthetic Genomics社(株の開発)とMIT(LCA分析)と共同研究を行い、これまでに8億ドル以上を投資。 ・2013年5月、さらに契約を更新し、遺伝子組み換え技術による高成長株の開発に焦点。 ・ガソリンおよびディーゼル燃料と両立性を持つバイオ燃料の開発を目指す。
Sapphire Energy社[54]	<ul style="list-style-type: none"> ・エネルギー省および農務省から約1億ドルの投資を受ける。 ・ニューメキシコ州、コロムブスにおいて300エーカーのレースウェーブンドを有し、ジェット燃料とディーゼル燃料を生産予定。現在は100エーカーのポンドが稼働中。 ・2018年に38万 kL, 2025年に380万 kLの生産を目指す。
Solazyme社[55]	<ul style="list-style-type: none"> ・アメリカ国防総省やアメリカ海軍の後ろ盾のもと、ディーゼル燃料とジェット燃料を生産。 ・微細藻類由来の燃料550 kLを締結し、ジェット練習機、哨戒ヘリコプターおよび小型高速艇でのデモンストレーション運転を行った。 ・オイル改質に関してはChevron Technology Ventureと共同研究を実施。オイル精製を委託。 ・微細藻類バイオマスのカスケード利用を積極的に行い、ケミカル分野やコスメティック分野の会社と締結している。
Solix社[56]	<ul style="list-style-type: none"> ・これまでに国家プロジェクト等から6900万ドルの出資を受ける。 ・コロラド州立大学やNew Belgium Brewery(醸造所)と共同で研究を行い、工場からの排気ガスの固定を目的とした閉鎖系培養装置を開発。 ・培養装置の開発・販売が業務の中心であるが、自社のパイロットプラントにおいて複数の微細藻類を培養し、バイオ燃料の検証を行う。

アメリカのみならず、欧州やアジア・オセアニア地域においても微細藻類のエネルギー利用に関するコンソーシアム設立や推進事業が起きている。オーストラリアにおいては2009年に政府から280万ドルの資金投入を得てオーストラリア国立自然科学産業開発機関が中心となってAlgae Fuels Consortiumを組織し、微細藻類の安価な培養法確立とバイオデ

イーゼル燃料生産の可能性を模索している[59]。オランダでは 2010 年にワーヘニンゲン大学が政府の支援を得て微細藻類リサーチセンター(AlgaePARC)を設立し、主に閉鎖系における培養装置による高効率培養システムの検討を開始した[60]。これらの国に遅れるものの、中国においても国家重点基礎研究発展計画(973 計画)として資源および有害物質の濃縮を目的とした微細藻類の利用研究が委託された[61]。中国国内の航空会社でもボーイング社の協力を得て、微細藻類由来の燃料を用いたデモンストレーション飛行が行われた[62][63]。タイにおいても増殖速度が速い *Chlorella* である KKKU-S2 株が発見され、この藻類を用いたオイル生産が期待されている[64]。

1.4 我が国における微細藻類バイオマスのエネルギー利用の動きとその意義

我が国は前述のように微細藻類の利用という観点においてはどの国よりも早く商業化を行ったいわゆる微細藻類先進国であり、培養から加工までのプロセスに関するノウハウは十分に蓄積されており、微細藻類を利用する技術は整えられていると考えてよい。我が国においても 1990 年から 1999 年のニューサンシャイン計画において 133 億円を投じて $50\text{g} \cdot \text{CO}_2/\text{m}^2/\text{日}$ の吸収量を目標に微細藻類の資源利用が検討された[65][66]。このプロジェクトにおいては資源のカスケード利用を前提に、1. 高効率光合成細菌・微細藻類等の研究開発。2. フォトバイオリアクタによる二酸化炭素固定、有用物質の大量・高密度培養技術の研究開発。3. 研究支援調査、の 3 テーマからなっていた。しかし、これは本プロジェクトの最終報告書やアメリカの ASP 報告書から分かるように個々の開発成果に関しては高い評価を得たものの、それぞれが有機的に結びつかず、全体としての現実性、市場性、経済性の検討が十分に行われておらず、トータルシステムとしての説得力に欠けるものでであるとされた。2008 年のオバマ政権下のグリーン・ニューディール政策に後押しされる形で、2009 年に政府によって発表された二酸化炭素排出 25 %削減目標(後に 2005 年比で 6%削減に改訂)、2011 年の再生可能エネルギー電力の固定価格買取制度の成立、革新的エネルギー・環境戦略に向けたエネルギー基本計画のパブリックコメント開始、さらに 2012 年の第四次環境基本計画が公表され、再び我が国においても微細藻類のエネルギー利用が着目され今に至っている[67]~[69]。

航空機に用いられているジェットエンジンはそのエネルギー密度の高さから代替機関とその代替燃料が存在しないため、化石燃料の枯渇問題は航空産業にとって致命的な問題となりうる。国内における年間のジェット燃料消費量は 1300 万 kL (2010 年)である[70]。この内、20 %を微細藻類から生産するならば、必要となる培養池の稼働面積はおおよそ 900 km^2 、つまり広島市とほぼ同等の面積が必要になる[71]。現状ではまだまだ難しいかも知れないが、

国内の耕作放棄地の面積がおよそ 4000 km²、国内の農地面積が 45600 km²であることを考えれば、今後の培養技術の発達、創意工夫によって生産性を向上させることが出来れば不可能な値では無いと考える。

何よりも我が国は領土や領海内において油田や炭田などの化石資源に乏しく、戦後そのエネルギー供給の殆どを海外からの輸入に依存している。しかし、ここに来て化石燃料の枯渇問題や四方を海に囲まれるという地理上の理由から、海外への依存から脱却し、エネルギーを自給自足することはエネルギーセキュリティーの観点から成し遂げられなければならない課題であり、長年の夢であると言える。

1.5 微細藻類 *B. braunii* の特徴

B. braunii は緑藻に属する淡水性の単細胞性微細藻類で、個々の細胞が細胞間物質により繋ぎ止められ房状のコロニーを形成している。それゆえ中国においては *B. braunii* は葡萄藻と呼ばれている。微細藻類は種によって多くの異なる種類の脂質や炭化水素、複雑な油脂を生産する[72]。中でもこの *B. braunii* は、乾燥重量に対し 25-75%という、図 1.5.1 のように圧力を加えるとオイル分が染み出すほど高い炭化水素蓄積能を持ち、燃料生産資源として注目を集めてきた[73]。また、この藻類が注目されるようになった理由の一つに、炭素数 30-40 の炭化水素を生産するという特徴がある。生産される炭化水素は、炭素と水素だけからなる化合物である。実際にこの *B. braunii* はオルドビス紀のオイル・シェール（炭素、水素、窒素、硫黄などからなる高分子有機化合物を含む黒褐色の粘土状細粒からなる頁石）から化石として産出され、そこから石油が採取されている。このオイル・シェールは世界中に分布しており、推定埋蔵量は 3.3 兆バレルに達するとも言われている。このような炭化水素を生産する微細藻類は *B. braunii* と、海洋珪藻類である *Rhizosolenia* など、トリグリセリドを蓄える微細藻類に比べると非常に限られている[75][76]。この *B. braunii* から生産される炭化水素を利用することは既存の石油利用のインフラをそのまま利用することが出来るという大きな利点がある。*B. braunii* が生産する炭化水素はそのまま内燃機関の燃料として使用することは出来ず、触媒を用いたクラッキング(改質)が必要になるが、分子内に酸素を含む油脂と比べて改質する前の脱酸素が不要であるので大きな利点がある。生成する画分のそれぞれの割合は使用する触媒や反応温度により変化する。北里らは Co-Mo 触媒や Zeolites 触媒を用いてこれらの炭化水素の改質を行ったところ、ガソリン(60~70 %)、軽質油(10~15 %), 重質油(2~8 %), タール分(5~10 %)に変換されたことを報告している[77][78]。

B. braunii は、合成する炭化水素の種類からそれぞれが合成する炭化水素の頭文字を取って A race、B race、L race に分類されている。A race は炭素数が C₂₅ から C₃₁ までの奇数の直鎖状で分子中に二つまたは三つの二重結合を持つ n-アルカジエン、アルカトリエンの同族

体を生産するグループである。B race は C_nH_{2n-10} ($n=30 \sim 37$) で示され、ボツリオコッセンと呼ばれる分岐状のトリテルペン構造の炭化水素やスクアレンの同族体を生産するグループである[79]。また、L race はリコパジエンと呼ばれる C_{40} のテトラテルペンのみを生産するグループである。各品種が生産する代表的な炭化水素の化学構造式を図 1.5.2 に示す。*B. braunii* の各種における炭化水素含有率は、A race では株によって大きく異なり乾燥重量に対し 0.6~61%、B race では 30~40%、L race では 2~9%といわれており、A race や B race に対し低い。いくつかの報告では B race で乾燥藻体重量に対し実に 86%もの炭化水素を蓄積する株も報告されていれば、9%程度しか蓄積しない株も報告されていて、株や培養環境によって大きく異なる。これらの炭化水素の細胞内における合成経路も精力的に研究がなされている。例えば *B. braunii* におけるボツリオコッセンやスクアレンの合成経路は佐藤らや Okada らによると以下のように合成されることが分かっている。ピルビン酸とグリセルアルデヒド三リン酸から DOXP(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate) が合成され、MEP(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate) を経て FPP(ファルネシル二リン酸) が生成される。二分子の FPP は、*B. braunii* に特有のスクアレン合成酵素である SSL-1 および SSL-3 との共存下では PSPP(プレスクアレン二リン酸) を経てボツリオコッセンへ変換される。また、SSL-1 と SSL-2 の共存下では PSPP を経てスクアレンが合成されることが報告されている(図 1.5.3)[80][81][82]。

これらの炭化水素の殆ど(~97%)は *B. braunii* の細胞同士をつなぎ止め、コロニーを形成している細胞間マトリックスに蓄積される[83]。それゆえ、細胞を破壊せずとも、このマトリックス内から炭化水素を抽出することが出来るため、培養を行いながらオイルを回収するというミルクィングが行える可能性があるということも *B. braunii* が注目されている理由の一つである[84][85]。その他にも植物としての微細藻類が持つ二酸化炭素の固定や[86]、二次排水中の窒素やリンの固定といった特徴も有しており、研究が報告されている[87][88]。

ただし、バイオマス資源としての *B. braunii* は短所もあり、それは淡水性の微細藻類であるという事である。地球上にある水資源の殆どは海水であり、人類が使える淡水資源は全体の 1%もない。このような理由や、培養時のコンタミネーションを防ぐという観点から *B. braunii* を汽水および海水培養する研究も行われており今後の成果が期待される[89][90]。



図 1.5.1 *B. braunii* 藻体コロニーから炭化水素が染み出す様子
(プレパラート作成後、カバーガラスの上から加圧した直後に観察。)

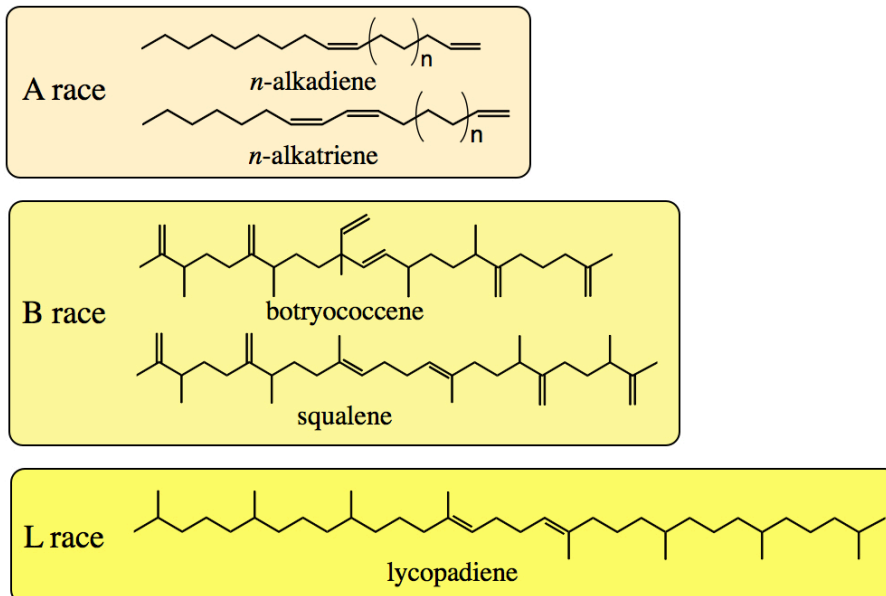


図 1.5.2 各種の *B. braunii* が生成する炭化水素

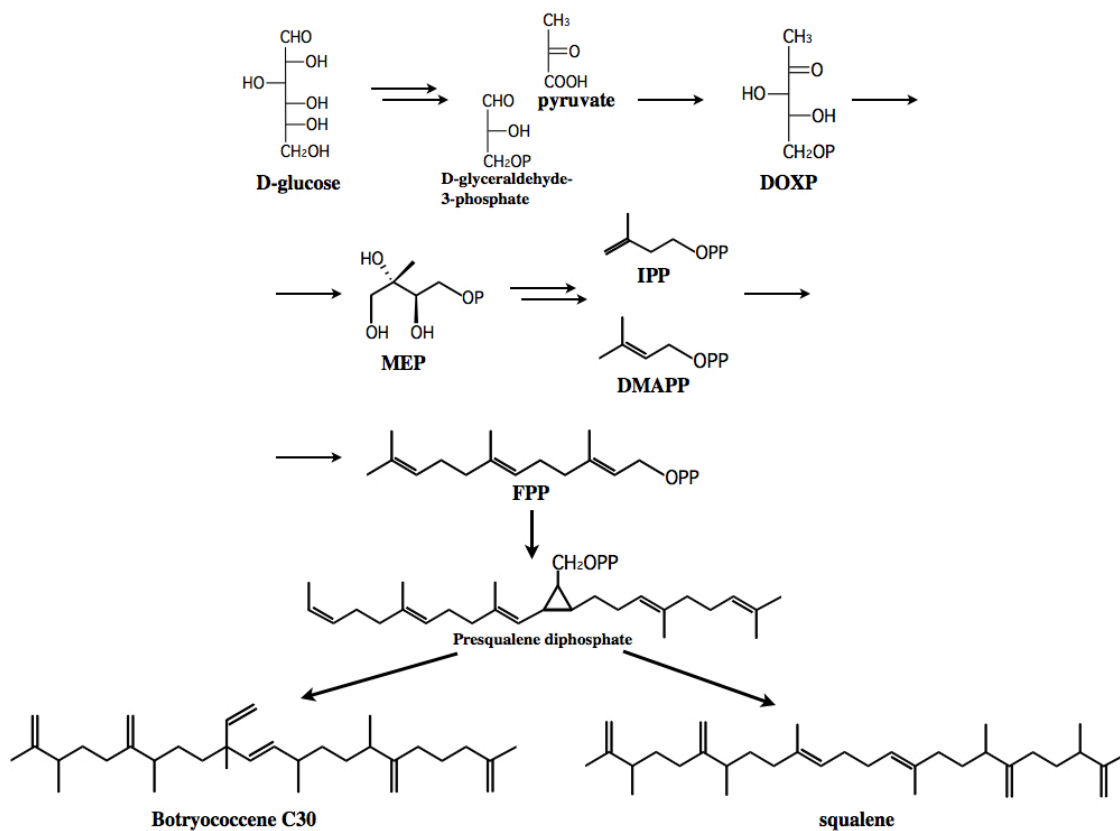


図 1.5.3 *B. braunii* における botryococcene および squalene の合成経路

1.6 微細藻類のエネルギー利用における処理工程(乾燥工程)

油脂を中心とする微細藻類のエネルギー利用プロセスは藻類の特性によって選択されるが、産業的に確立しているのは図 1.6.1 の様なプロセスである[91]。

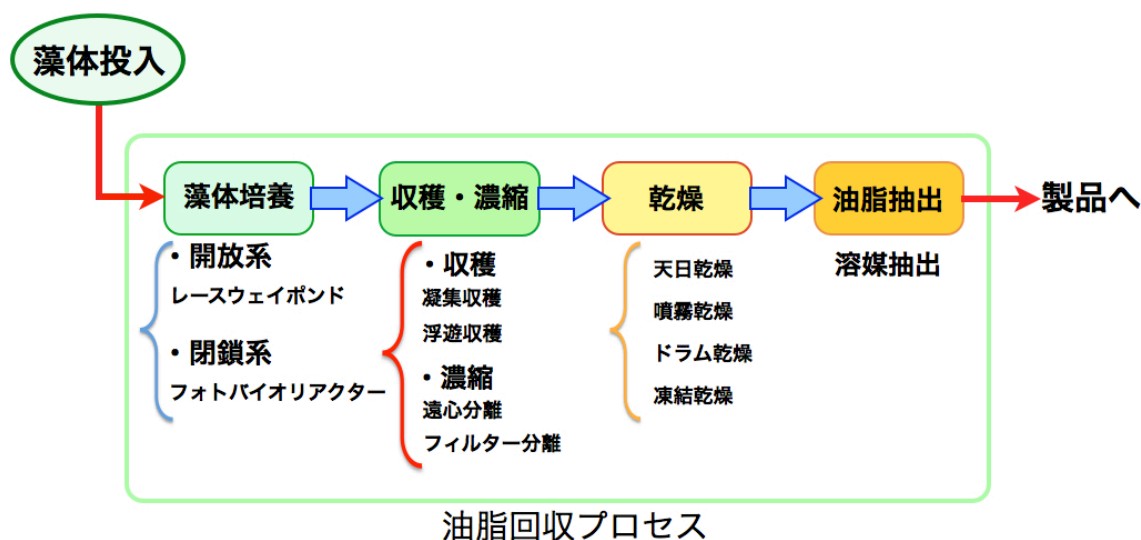


図 1.6.1 微細藻類からの有価物回収プロセス

エネルギーとして微細藻類のオイルを利用する場合、オイル回収過程で課題となる工程の一つに乾燥工程がある。培養中の微細藻類は藻体スラリーの状態であり、殆どが水分である。これを凝集剤による沈降や、浮遊によって収穫し、さらに濃縮によって最終的な含水率を 75~85 wt%にする事が出来る。オイル分の回収に用いる溶媒は有機溶媒であるため、藻体の持っている水分によってオイル分の回収が妨害され、細胞内のオイルを溶媒抽出できない。このため上記のプロセスの様に乾燥させて藻体の含水率を 10~30 %にまで低減する。乾燥方法としては天日乾燥、減圧乾燥[92]、噴霧乾燥[93]、ドラム乾燥、凍結乾燥[94]などが行われているが、エネルギー利用の場合は、乾燥工程におけるエネルギー消費とコストが問題になる。これに対する解決策として

1. 前処理(細胞の破壊)による湿藻体からの溶媒抽出
 2. 抽出媒体の最適化による湿藻体からの溶媒抽出
- が考えられ、研究されてきた。

前処理法に関しては細胞の破壊法としてホモジナイザー(超高速ミル)や超音波、ビーズミルなどによる機械的な方法や、水熱処理、凍結乾燥、マイクロ波、浸透圧法などの物理的な方法、さらに化学的な方法として塩酸や水酸化ナトリウム、アルカリによる細胞の分解が挙げられる[95]。これらの方法で前処理を行い、既存のヘキサン等による有機溶媒と接触させ、藻体中のオイル分を回収する。これらの前処理法についての *Chlorella*、*Scenedesmus*、

および本研究で対象とする *B. braunii* に関する報告を表 1.6.1 に示す。

表 1.6.1 各前処理法がオイル分の溶媒回収に与える効果

微細藻類	溶媒抽出(無処理)	ホモジナイザー	ビーズミル	超音波	水熱処理	マイクロ波	浸透圧法(NaCl)
<i>Botryococcus braunii</i> [98]	25%		90%	31%	38%	91%	38%
<i>Senedesmus</i>	21%(ソックスレー抽出)[96] 8 %[98]	85%[96]	70%[98] 20.5 %[97] 64 %[96]	71 %[98] 21 %[97] 60 %[96]	45 %[98] 38 %[96]	83%[98]	53%[98]
<i>Chlorella</i>	24%(ソックスレー抽出)[96] 26 %[98]	61%[96]	80%[98] 51 %[96]	46%[98] 32 %[96]	64%[98]	64%[98]	58%[98]

表からも分かるように、これらの前処理方法は微細藻類の性質によって効果が異なる。また、前処理法はそれぞれスケールアップへの適合性が異なり、例えばビーズミルは *Chlorella* や *B. braunii* に対して高いオイル回収率を示しているが、スケールアップが難しいとされている。反対に、超音波照射は比較的スケールアップが容易であるが、*Chlorella* や *B. braunii* に対して効果は小さい。現在のところ、様々な報告の中でもっとも汎用性が高く、スケールアップも比較的容易に行えるのはマイクロ波照射であると考えられている[96][98][99]。

抽出媒体の最適化には両親媒性の有機溶媒や Switchable 溶媒さらに超臨界法や亜臨界法などの新しい手法が研究されている。表 1.6.2 に報告されている超臨界 CO₂ や両親媒性溶媒、Switchable 溶媒等による溶媒抽出の効果を示す。これらの新しい溶媒回収法はヘキサン等による既往の溶媒抽出にはない長所を有する。例えば、超臨界 CO₂ による抽出では、ヘキサンのような色素が抽出されず、オイル分の精製が容易であり、常温において気体であるので分離も容易である。また、Switchable 溶媒は二酸化炭素や窒素の吹き込みにより、溶媒の水への溶解と分離を制御出来るため、藻体のミルク用溶媒としての可能性がある。しかし、これらの抽出法には共通して、回収率がそれほど高くない、分離後の溶媒のロスが多い、コストが高いなどの課題がある。ただし、これらは既往のヘキサン抽出と比べると研究・開発の歴史が浅いため、今後の成果に期待できる可能性がある。

表 1.6.2 各種抽出溶媒が微細藻類からのオイル抽出に与える効果

微細藻類	抽出媒体	抽出法	回収率 (%)	参考文献
<i>Nannochloropsis sp.</i>	CO ₂	超臨界法	25	[100]
<i>Spirulina platensis</i>	CO ₂	超臨界法	85	[101]
<i>Chlorococcum sp.</i>	CO ₂	超臨界法	61	[102]
<i>Botryococcus braunii sp.</i>	CO ₂	超臨界法	~80 mg/ 1 g dry-biomass	[103]
<i>Botryococcus braunii</i> UTEX572	N,N-dimethylcyclohexyl- amine	Switchable溶媒	17~50	[104]
<i>Botryococcus braunii</i> SAG 807-1	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene	Switchable溶媒	81	[105]
<i>Botryococcus braunii sp.</i>	1,2-dimethoxyethane	両親媒性溶媒	55~100	[106]
<i>Chlorella vulgaris</i>	MeSO ₄	イオン液体	<100	[107]
<i>Chlorella vulgaris</i>	CF ₃ SO ₃	イオン液体	<100	[107]

以上の様に、湿藻体からのオイル分回収は乾燥藻体からの溶媒抽出と比べると多くの課題がある。それは高付加価値利用からエネルギー利用という単価の安いものへ利用形態が変わったことにより、より厳しい制限を受けるからである。Lee らも、彼らの論文の最後に述べているが、これらの制限を克服する為には、微細藻類の性質を理解し、それらに適した回収方法を見いだす事が重要である[98]。本研究で用いる *B. braunii* は背景でも述べたように細胞間マトリクス中に生産する炭化水素の殆どを蓄積するという他の微細藻類には無い特徴を持っている。Kita らはこの微細藻に対して 85 ~90℃という比較的穏やかな加熱前処理が、その後の溶媒による炭化水素回収率を 90 %以上に向上させることを報告している[108]。この加熱前処理は、方法が簡便なだけでは無く、オイル分の溶媒抽出に必要とされる乾燥工程を一連のバイオ燃料生産工程から除くことが出来るという優位性を有する。実際に含水率 80 %の藻体スラリーを 85 °Cまで加熱するのに有する熱エネルギーは、加熱による蒸発で含水率を 30 %まで減少させるのに要する熱エネルギーのおよそ 9 分の 1 で済む。この Kita らの結果や Lee らの結果から考えると *B. braunii* はその形態上の特徴から、容易に炭化水素を回収できる可能性を秘めているものの、ただ単純に力を加えて細胞の破壊を試みればオイル分が回収出来るという訳ではない事が分かる。

1.7 研究の目的

Kita らによって *B. braunii* Berkeley 株ではコロニー内の炭化水素を回収するには 85°C 以上の加熱前処理が効果的であることを示された[108]。特に処理温度 80°C で藻体スラリーを加熱しても炭化水素は殆ど回収されないのに対し、5°C だけ高い 85°C に加熱すると炭化水素が 90 % 回収出来るということは *B. braunii* からの炭化水素回収において、回収率が処理温度に依存する可能性があることを示している。これから、何らかの化学反応が *B. braunii* からの炭化水素回収を可能にしているのではないかと考えられた。この仮定が正しいとすれば、本研究における加熱前処理はこれまでに試験され報告されてきた圧搾や超音波、ビーズミル、水熱処理と言った物理的な細胞壁の破壊による前処理とは異なる効果によって炭化水素を溶媒抽出している可能性がある。また、微細藻類からのオイル回収に関する多くの報告では“どの手法がどれくらい効果的であった”や“本手法は新しい前処理・回収法である”といった報告はあっても“何故この手法がこの藻に有効であるのか”という報告は殆ど無い。ゆえに加熱前処理における炭化水素回収の実験結果をベースとして、何故 *B. braunii* に対して加熱前処理が有効であるのか、85°C においてどのような変化が起きるのか、を明らかにすることは *B. braunii* の性質を理解するのみならず、消費エネルギーやコストの面で制限のあるエネルギー生産向けの前処理法を新たに開発する上で重要な知見になると考えられる。

1.8 論文の構成

本論文は全五章により構成される。第一章では、研究の背景および意義、本研究の目的を述べた。第二章では、加熱前処理が藻体スラリーからの炭化水素回収におよぼす効果を Berkeley 株以外の株に対しても検討し、さらにその効果は処理温度と保持時間のどちらの影響が強いのか、を検討した。そしてそれらの結果から、加熱前処理が藻体に与える変化を予測し、何故、加熱前処理を行うと藻体スラリーから炭化水素を回収出来るかの仮説を立てた。第三章では第二章において予測された藻体コロニーに対する変化を各処理温度において定量した。そしてそれを各処理温度と炭化水素回収率の関係と比較し、相関性と仮説の妥当性を検証した。さらに本章では加熱を行いながら藻体コロニーの顕微鏡観察を行い、藻体コロニーの変化を連続的に観察し、藻体コロニー表面の高分子物質の加熱に対する挙動に関して仮説を立てた。第四章では第三章で立てた仮説に基づき、藻体コロニー表面の高分子物質を洗浄し、藻体コロニー表面からの除去を試みた。それと同時に各洗浄回数において炭化水素の回収も行い、回収率を得ることで第三章において立てた仮説を再検証した。第五章は研究のまとめと展望である。

第二章 加熱前処理の異株に対する効果と処理温度の影響の検討

2.1 背景と目的

2.1.1 既往の研究

B. braunii もエネルギー利用において他の微細藻類と同様に、乾燥工程を用いない湿藻体からのオイル回収や、湿藻体の利用に関する研究が行われて来た。

土手らは *B. braunii* の湿藻体試料の利用法として水熱液化法による合成油の生成を行った。その研究においては 200-300°C、10 MPa の条件において、乾燥藻体に含まれる炭化水素の体積よりも多い合成油が回収されるという結果が報告されている[109][110]。しかし回収された合成油の中には高温高压処理によりセルロース・リグニン由来の重油相当のオイルが含まれ、硫黄、窒素等を含む流動性の低い低質なオイルとなってしまう問題が残った。

Lee らは微細藻類 *B. braunii* sp.、*Chlorella vulgaris* そして *Scenedesmus* sp の湿藻体試料(5 dry-g/L)に対してビーズミル、水熱処理、マイクロ波照射、超音波照射、浸透圧法といった5種の細胞破壊を前処理として行い、それぞれの方法がヘキサンによる炭化水素抽出に与える効果を比較、検討した[98]。彼らの結果では *Chlorella vulgaris* に対しては 125°C、1.5MPa、5 min の水熱処理が最も有効であり、*Scenedesmus* sp に対しては超音波による機械的破壊が最も有効であった。しかし *B. braunii* に対してはこれらの手法は不向きでありオイル回収率は低かった。*Chlorella vulgaris* や *Scenedesmus* sp. と比較すると、*B. braunii* ではこれらの細胞破壊法による前処理で炭化水素を回収することが難しく、新たな方法が必要であることが示唆された。

Kita らは収穫から抽出に至るプロセスエネルギーの低減を目指し、*B. braunii* B race Berkeley 株を対象に、溶媒抽出の前処理として 100°C未満の加熱前処理を行い、ヘキサンによる炭化水素抽出に与える効果を検討した。その結果 1.5 g/L という希薄藻体スラリーにおいて加熱温度 85°C、保持時間 10 分で炭化水素回収率が 86.7%となり、比較的穏やかな前処理によって炭化水素回収を劇的に改善する可能性を示した[108]。

Lee らによる前処理によっても *B. braunii* に対してマイクロ波照射は炭化水素抽出に有効であるが、120°C、1.5 MPa の水熱処理は有効で無かったことを踏まえると、*B. braunii* に対しては *Chlorella* や *Scenedesmus* のような細胞壁中に油脂を蓄積する微細藻類とは全く異なる条件で、むしろ、より穏やかな前処理法によって炭化水素を回収出来る可能性がある。これらのことから加熱前処理が *B. braunii* に与える変化を明らかにすることが出来れば、より低エネルギー、低コストで効率よく細胞間マトリクス中の炭化水素を回収する手法を見いだすための知見になり得ると考えられる。

2.1.2 目的

本章では Kita らが用いた B race Berkeley 株とは異なる品種の A race Yamanaka 株と、同じ品種に属し、異なる株である B race Kawaguchi-1 株を用いることで

1. 異なる株の *B. braunii* に対しても加熱前処理が炭化水素回収に有効であるかを検証する、
2. 加熱前処理の効果が加熱温度に依存するのか、処理時間に依存するのかを検証する、
- 3.1. および 2. から得た知見から、加熱前処理が *B. braunii* の藻体コロニーに与える変化を観察し、炭化水素回収のメカニズムを考察する、ことを目的とした。

2.2 試料および実験方法

2.2.1 藻体試料

本加熱前処理実験に供試した *B. braunii* 藻体試料は Kita らの報告で用いられた B race Berkeley 株に加え同品種であり異なる株である B race Kawaguchi-1 株、さらに異品種の *B. braunii* である A race Yamanaka 株とした。図 2.2.1.1 に本実験で用いた藻体試料の光学顕微鏡像を示す。前述のようにこれらの藻体は生成する炭化水素の種類によって分類されており、その詳細な分類については結論が得られていない。よって同種であっても遺伝子的には異種と同じくらいに異なることがあると報告されている[111][112]。同種である B race Berkeley 株と B race Kawaguchi-1 株の顕微鏡像を比べても分かるようにその形態は大きく異なる。

Berkeley 株は 1985 年に UC Berkeley の Nonomura らによって単離され、Showa 株とも呼ばれる。この株の大きな特徴には本株が細胞間物質中に蓄積する炭化水素中の botryococcene の割合が非常に高く、squalene の割合が少ない(1%未満)ことが挙げられる[113]。それゆえ、本株がバイオ燃料生産の有望種であると期待され、本株を用いた論文が多く発表されている。

Kawaguchi-1 株は 1993 年に山梨県の河口湖より分離され、炭化水素含有率は約 19%と報告されている。Okada らによると、Kawaguchi-1 株では C₃₄ の botryococcene の割合が低いという報告がある。この株の場合、メチル基を導入する能力が他の株と比べて低い可能性が考えられている。またこの株では、通常他の株では痕跡程度にしか検出されないテトラメチルスクアレンが 6.8%も存在することが発見され、特徴的とされている[114]。

A race Yamanaka 株は、1991 年に山梨県の山中湖より分離され、炭化水素含有率は約 16%であった。しかし、本藻種は同一の株でも生育条件の違いにより、コロニーや細胞の形状が変化するため、形態学的な手法による分類が非常に難しい[73]。

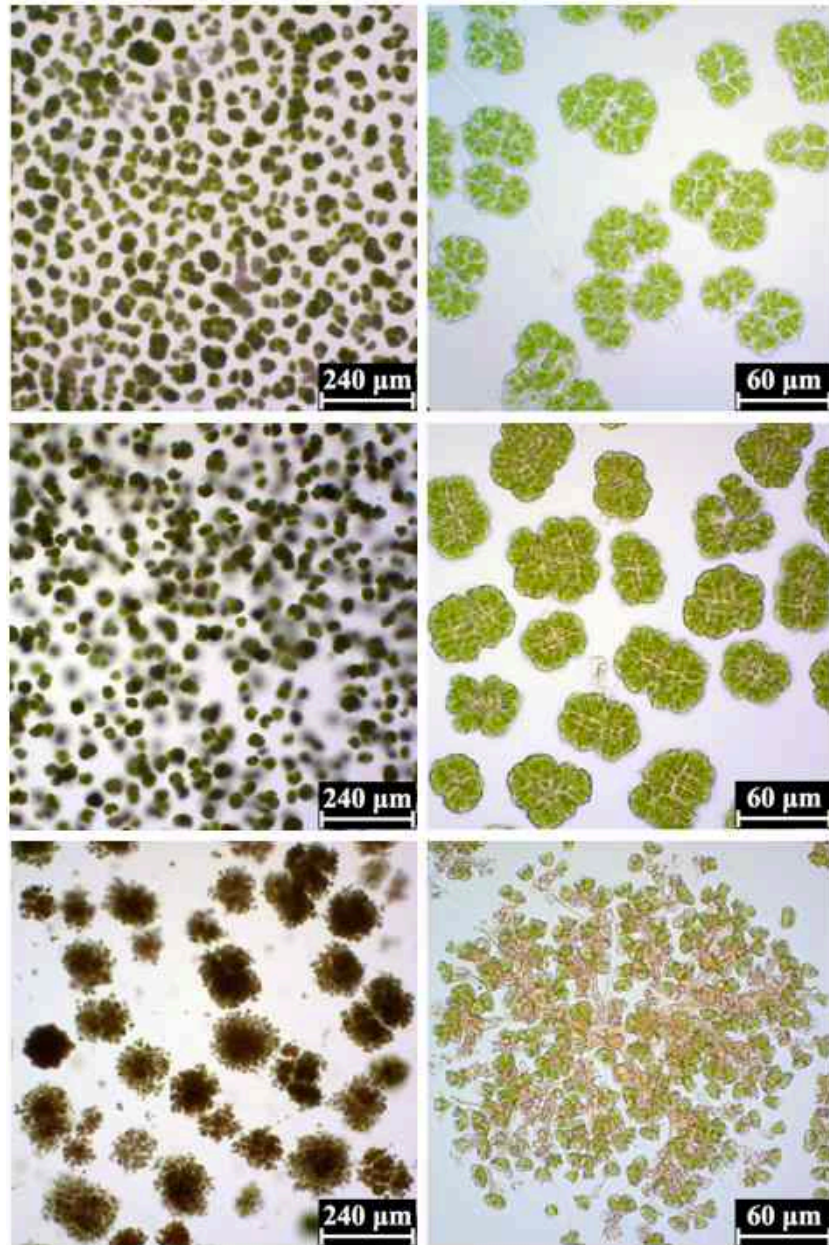


図 2.2.1.1 本研究に用いた *B. braunii* の藻体の生物顕微鏡による観察像
 (上段: A race Yamanaka 株 中段: B race Berkeley 株 下段: B race Kawaguchi-1 株)

実験で用いた藻体試料は培養液に Chu13 改変培地を用いてグロースチャンバー内で培養した[115]。Chu13 培地に含まれる栄養塩は KNO_3 (600 mg L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100 mg L^{-1}), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (52 mg L^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (54 mg L^{-1}), FeNaEDTA (10 mg L^{-1}) であり、さらに微量元素として H_3BO_3 (572 mg L^{-1}), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (308 mg L^{-1}), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (44 mg L^{-1}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (16 mg L^{-1}), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (12 mg L^{-1}), $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (18 mg L^{-1})を調製したものを 5 ml 加えた。培養液の pH は 7.2-7.5 の範囲になるよう希硫酸を用いて調製した。培養

に用いる器具および培養液は全て植え継ぎ操作を行う前にオートクレーブにより 121°C、40 min の滅菌操作を行った。培養温度は 25°C とし、1.5 vol% の二酸化炭素富化空気を培養瓶内に供給した。この二酸化炭素富化空気は、シリコンチューブによりヘパフィルターを通じて培養ビン内に底部から供給した。培養装置の構成を図 2.2.1.4 に示す。グロースチャンバー内の光量子束密度は培養ビンの表面近傍測定において B race Berkeley 株では 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、B race Kawaguchi-1 株および A race Yamanaka 株では 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ とした。これは A race Yamanaka 株と B race Kawaguchi-1 株が 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光量子束密度において培養が正常に行われず、死滅することが予備培養において分かったからである。明暗周期は 12h/12h とした。図 2.2.1.2 に培養に用いたグロースチャンバーを、図 2.2.1.3 にグロースチャンバー内における培養の様子を示す。また、藻体試料の培養に用いた培養装置の構成を図 2.2.1.4 に示す。実験に用いた藻体試料の収穫は培養開始から 25 日~30 日経過した後に行った。培養した藻体の収穫には間隙が 20 μm のナイロンメッシュとビフネルロートを用い、減圧吸引することにより脱水して藻体のみを濾取した。収穫した藻体は一定量のイオン交換水に懸濁させて藻体サンプルとし、冷蔵保存した。



図 2.2.1.2 藻体試料の培養に用いたグロースチャンバー



図 2.2.1.3 グロースチャンバー内の様子

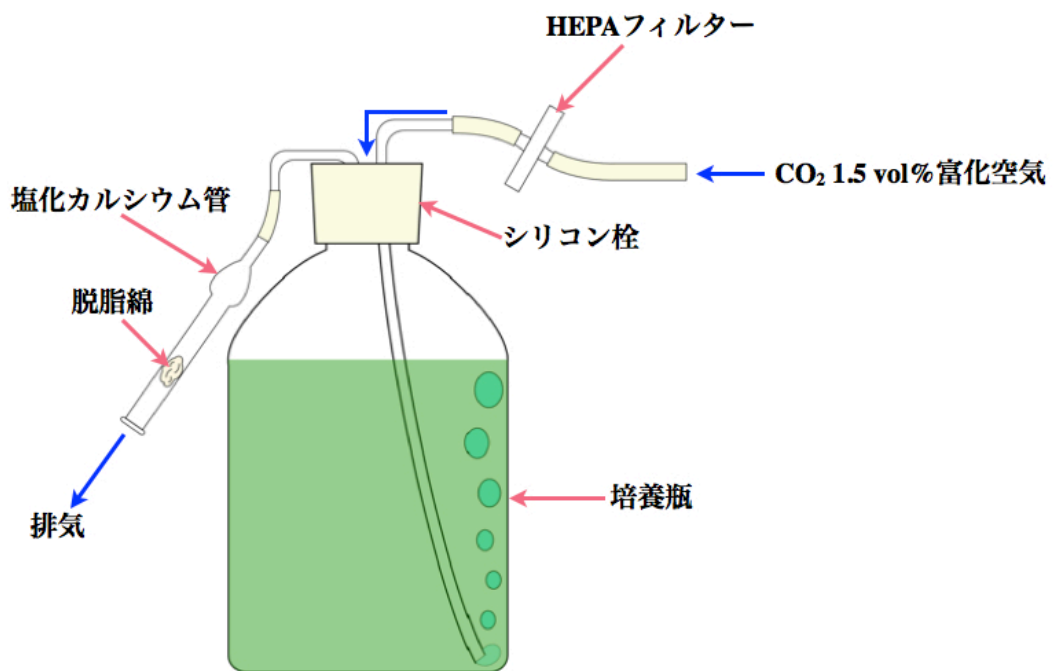


図 2.2.1.4 培養装置構成図

2.2.2 加熱前処理実験

加熱前処理に供試した藻体スラリーは次の手順で調製した。まず収穫した藻体サンプルの濃度を測定するため、収穫後に冷蔵庫内で保管した藻体サンプルを 30 mL、太口のメスピ

ペットで取り、100 mL のナス型フラスコに入れ、冷凍機にて冷凍させた。これを凍結乾燥機において減圧の下(9 Pa)で 24 h 凍結乾燥した。その試料の入った容器をデシケータ内で 1h 吸引・乾燥し、電子天秤で重量を秤量した。あらかじめ秤量しておいた乾燥容器のみの重量を差し引いて藻体サンプル 30 mL 中の乾燥藻体重量を求めた。これにより藻体サンプルの単位体積当たりの重量を測定した。この操作を 3 回行い、平均をとって藻体サンプルの藻体濃度とした。加熱前処理時にはこの藻体サンプルを 1.5 g/L の濃度に希釈して、これを加熱前処理における藻体スラリーとした。

2.2.2.1 処理温度と炭化水素回収率の関係

加熱前処理における処理温度と炭化水素回収率の関係を調べるために以下の手順により実験を行った。

- ① 調製した 1.5 g/L の藻体スラリーを専用の加熱処理容器に入れ、加熱前処理装置(図 2.2.2.2.1 および図 2.2.2.2.2)に固定した。
- ② 窒素ガスにより加熱処理容器中の空気を置換し、電気ヒータにより処理温度まで加熱した。
- ③ 加熱時は加熱容器内の攪拌羽によりスラリーを攪拌した。加熱処理容器内のスラリー温度は試料部に挿入した熱電対により測定した。加熱時の昇温グラフの例を図 2.2.2.2.3 に示す。本実験では加熱の保持時間を Kita らの実験と同様に 10 min とした。処理温度は Kita らによる実験と予備実験から三株に対して以下のように設定した。
B race Berkeley 株: 無処理(以下 NT), 60, 70, 80, 85°C の 5 条件
A race Yamanaka 株: NT, 50, 55, 60, 70, 80°C の 6 条件
B race Kawaguchi-1 株: NT, 50, 60, 70, 75, 80, 90°C の 7 条件
- ④ 各処理温度において 10 min 保持後、ただちに試料を冷水により室温まで冷却した。室温までの冷却は 8 min 以内に行い、冷却後は加熱前処理装置から取り外し、次の手順であるヘキサンによる炭化水素抽出を行った。

2.2.2.2 保持時間と炭化水素回収率の関係

加熱前処理における保持時間と炭化水素回収率の関係を調べるために、保持時間を変更して処理を行った。藻体スラリーの調製および加熱前処理の操作は第二章 2.2.2.1 における操作と同様である。異なる点は 2.2.2.1 における結果から、炭化水素回収率が 90%を超えた処理温度においては保持時間を短縮し、炭化水素回収率が 90%を超えなかった処理温度においては保持時間を延長して加熱前処理を行った点である。以下に各株における処理温度と保持時間の組み合わせを示す。

B race Berkeley 株: 80°Cにおいて保持時間 10, 20, 30 min
85°Cにおいて保持時間 0, 2.5, 5.0, 10 min
A race Yamanaka 株: 55°Cにおいて保持時間 10, 20, 30 min
60°Cにおいて保持時間 0, 2.5, 5.0, 10 min
B race Kawasguchi-1 株: 70°Cにおいて保持時間 10, 20, 30 min
75°Cにおいて保持時間を 0, 2.5, 5.0, 10 min

各処理温度において設定した保持時間が経過したのち、藻体スラリーの入った容器を冷水に浸して室温まで冷却した。室温までの冷却は 8 min 以内に行い、冷却後は加熱前処理装置から取り外し、次の手順であるヘキサンによる炭化水素抽出を行った。



図 2.2.2.1 加熱前処理装置

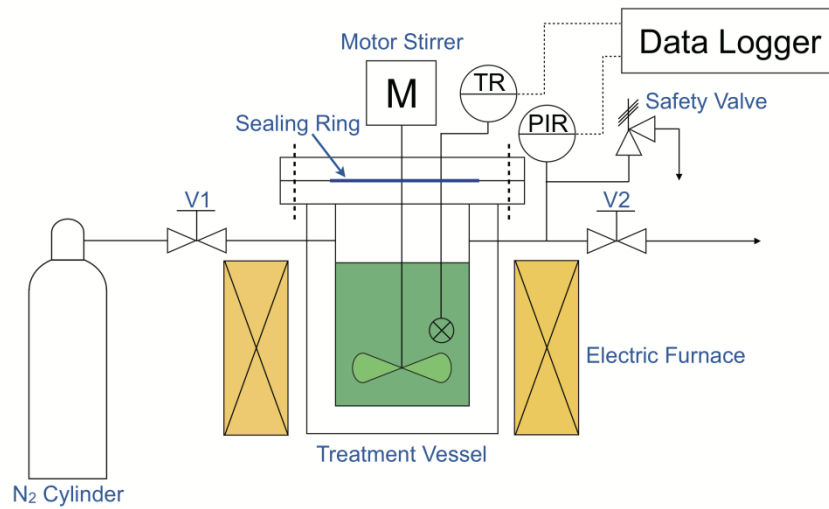
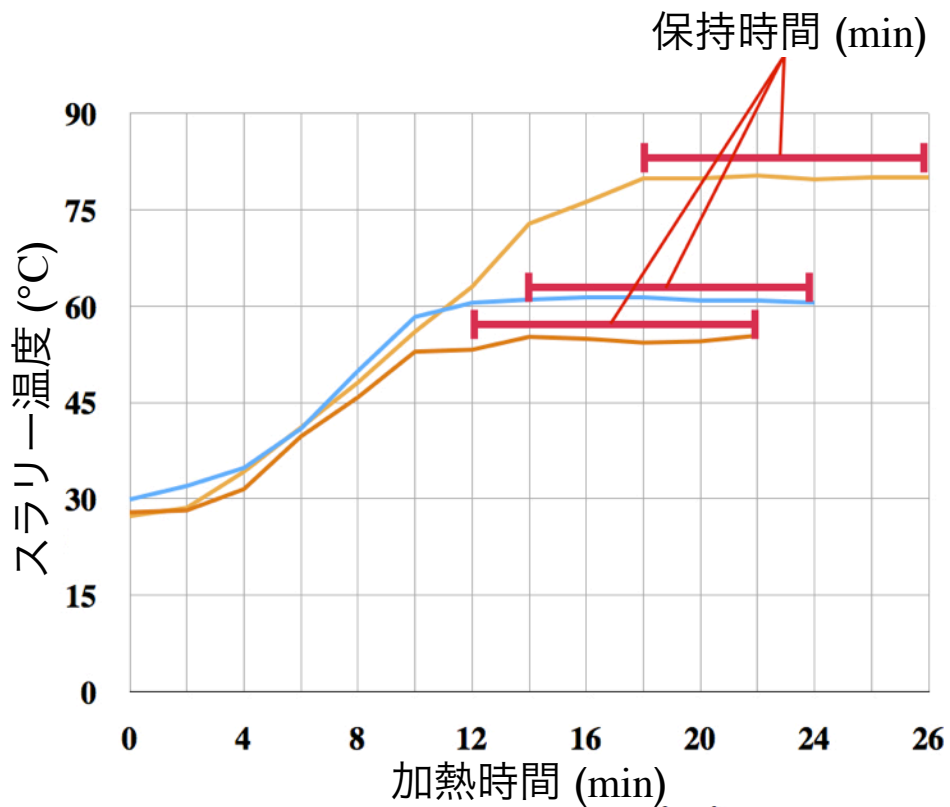


図 2.2.2.2.2 加熱前処理装置構成図



2.2.2.2.3 加熱前処理における昇温グラフと保持時間の定義

2.2.3 加熱前処理を行った試料からのヘキサンによる炭化水素抽出

加熱前処理を行った藻体スラリーからの炭化水素の抽出・分離は次の手順により行った。

- ① 分液ロートに加熱試料と同量(200 mL)の n-ヘキサンを加え、30 秒間振とうした後、下

相の水相を分離し、上相のヘキサン相を回収した。

- ② 下相の水相を分液ロートに戻し、1回目に対し、半分量のヘキサン(100 mL)を加えて一回目と同様に 30 秒間分液ロートを振とうし、2 回目の溶媒抽出操作を行った。
- ③ 1 回目および 2 回目で分離したヘキサン相をナス型フラスコへ移し、ロータリーエバポレーターにより減圧蒸留して、ヘキサンを除去し藻体からの抽出物を回収した。
- ④ この抽出物はカロテノイドなどの夾雑物を含むため、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（和光純薬工業製ワコーゲル、C-300）により夾雑物を除去して、炭化水素画分を溶出した。
- ⑤ シリカゲルカラムを通過した透明な溶媒相をロータリーエバポレーターを用いて減圧蒸留しヘキサンを除去した。
- ⑥ この無色透明の抽出物質を炭化水素として秤量し、炭化水素の回収率を計算した。図 2.2.3.1 に藻体試料のヘキサンによる炭化水素抽出操作の流れを、図 2.2.3.2 にワコーゲルを用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる炭化水素の精製の様子を示す。

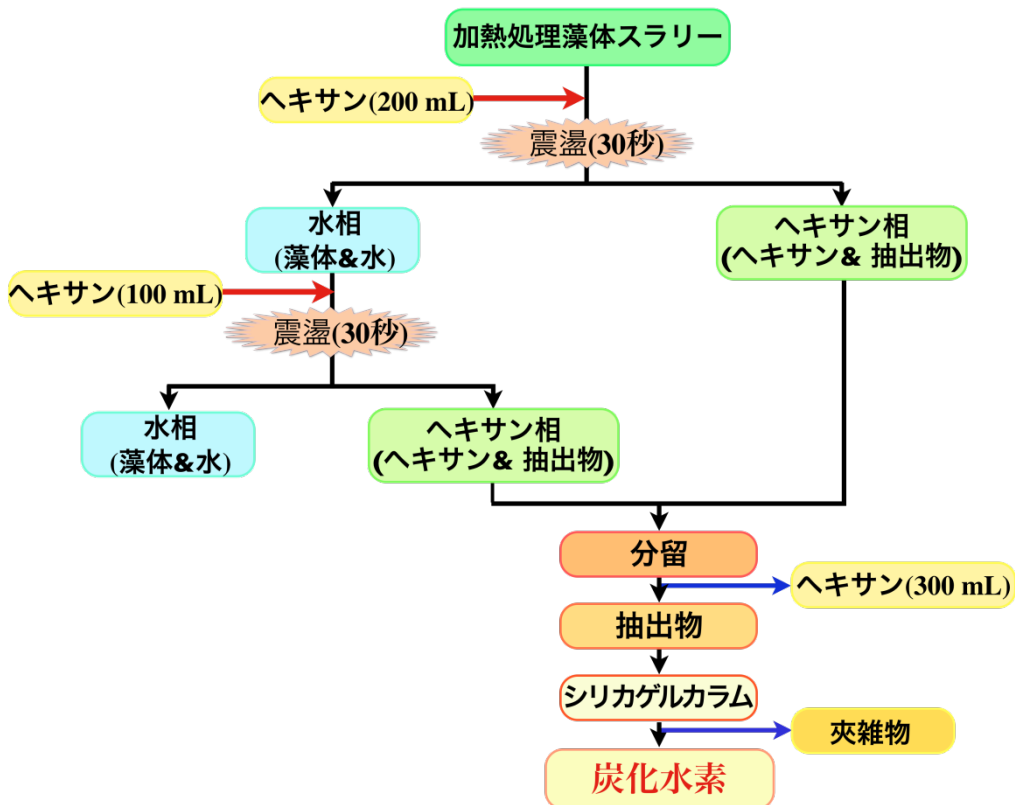


図 2.2.3.1 加熱前処理後のヘキサンによる炭化水素抽出の流れ



図 2.2.3.2 カラムクロマトグラフィーによるヘキサン抽出物からの夾雑物の分離
(カロテノイドはシリカゲルに保持され、炭化水素画分はシリカゲルを通過する。シリカゲルに保持されたカロテノイドの黄色部分が観察される。)

2.2.4 凍結乾燥試料からの炭化水素抽出と回収率の計算

2.2.3 によって回収した炭化水素の回収率を求めるためには藻体試料に含まれる炭化水素の全量を得る必要がある。*B. braunii* が生産する炭化水素は、藻体コロニーを形成する細胞間物質中に蓄積されており、ただ単に有機溶媒を加えて振とうするだけでは溶媒が藻体中の水分によって阻まれ、炭化水素を抽出出来ない。*B. braunii* からの炭化水素回収には、藻体試料を炉乾燥、減圧乾燥、あるいは凍結乾燥し、そこから溶媒抽出する方法が報告されている。予備実験による検討の結果、本研究での炭化水素含有率の測定には、同一サンプル内でもっとも測定結果のばらつきが少なく、また炭化水素を最も多く回収できた凍結乾燥を用いることにした。

乾燥藻体中に含まれる炭化水素含有率の測定は以下の手順により行った (図 2.2.4)。

- ① 2.2.2 において凍結乾燥させた 30 mL 分の凍結乾燥藻体に、試料が浸る程度にヘキサンを加えしばらく静置した。
- ② ヘキサン相が黄色に着色されたのちに、このヘキサン相を別のナス型フラスコに移し、藻体試料に再びヘキサンを加えて含浸させた。
- ③ この操作をヘキサン相が着色されなくなるまで繰り返した。
- ④ 回収したヘキサン相を、2.2.3 において加熱前処理を行った試料からの炭化水素回収と同様に分離・精製した。

⑤ 溶媒を除去した後の無色透明で粘性のあるオイル分を細胞外炭化水素として電子天秤で秤量し、乾燥藻体に含まれる炭化水素重量とした。

上記の方法から得られた乾燥藻体 0.30 g 中に含まれる炭化水素重量を分母、2.2.3 の方法で計測した加熱前処理藻体スラリーから得られた炭化水素重量を分子として炭化水素回収率を算出した。

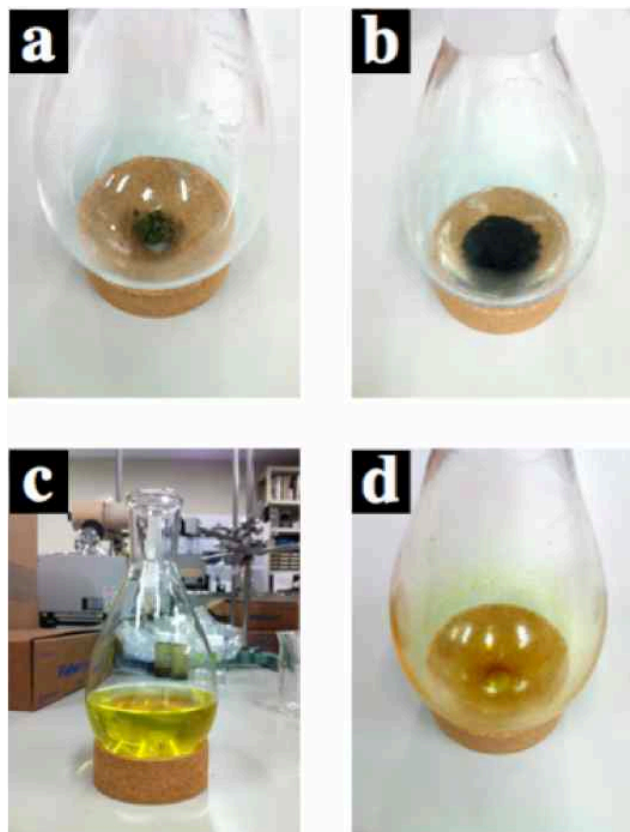


図 2.2.4 凍結乾燥藻体試料からの炭化水素回収の様子

a: 凍結乾燥藻体試料 b: ヘキサンに含浸した凍結乾燥藻体試料

c: 回収したヘキサン相 d:ヘキサン除去後のヘキサン抽出物

2.2.5 光学顕微鏡による藻体コロニーの観察

各処理温度において加熱前処理を行った藻体コロニーを、生物顕微鏡(Olympus CX-41)を用いて二種類の方法により観察した。

2.2.5.1 明視野による光学顕微鏡観察

加熱前処理前後における *B. braunii* の藻体コロニーについて B race Berkeley 株と、A race Yamanaka 株を明視野観察した。観察像の撮影は C マウントアダプタから一眼レフアダプタ

を紹介して一眼レフデジタルカメラ(Nikon Corporation, D7100 DSLR)にて撮影した(撮影条件: 露光時間: オート、絞り: 開放、WB: 蛍光灯、EV: +0.3)。

2.2.5.2 墨汁を用いた光学顕微鏡観察

藻体コロニー表面に存在する高分子物質を光学顕微鏡で可視化する目的で墨汁(開明株式会社 開明墨汁 粒径: 50 nm~200nm)を混合して観察を行った。藻体試料は明視野観察と同様、B race Berkeley 株、A race Yamanaka 株を用いた。墨汁に含まれる墨のコロイド粒子の粒径は、藻体コロニー表面の高分子物質の網目よりも大きいため、高分子物質の透明な層が確認出来る。無処理または加熱前処理を行った藻体試料を 50 μ L とり、同量の墨汁とともにマイクロチューブに入れ、よく振とうした。この混合液をそのままスライドガラスに垂らし、カバーガラスを被せ、すみやかに観察した。撮影は 2.2.5.1 と同じ方法で行った。

2.3 結果と考察

B race Berkeley 株、Kawaguchi-1 株、A race Yamanaka 株の三株について処理温度と炭化水素回収率の関係、そして保持時間と炭化水素回収率の関係を調べた。実験結果を各株について述べる。Berkeley 株については処理温度と炭化水素回収率の関係が既に Kita らによって報告されているが、ここでは再現性を確認するため再実験を行った。

各株の凍結乾燥試料からヘキサンによって炭化水素を抽出・精製し、乾燥藻体重量に対する炭化水素含有率を求めた結果、炭化水素含有率(wt%)は Berkeley 株が 35 ± 5.5 %、Yamanaka 株 26 ± 4.2 %、そして Kawaguchi-1 株が 27 ± 2.0 %であった。

2.3.1 処理温度と炭化水素回収率の関係

B race Berkeley 株における処理温度と炭化水素回収率の関係を図 2.3.1.1 に示す。また、各実験において回収された炭化水素重量を表 2.3.1.1 に示す。

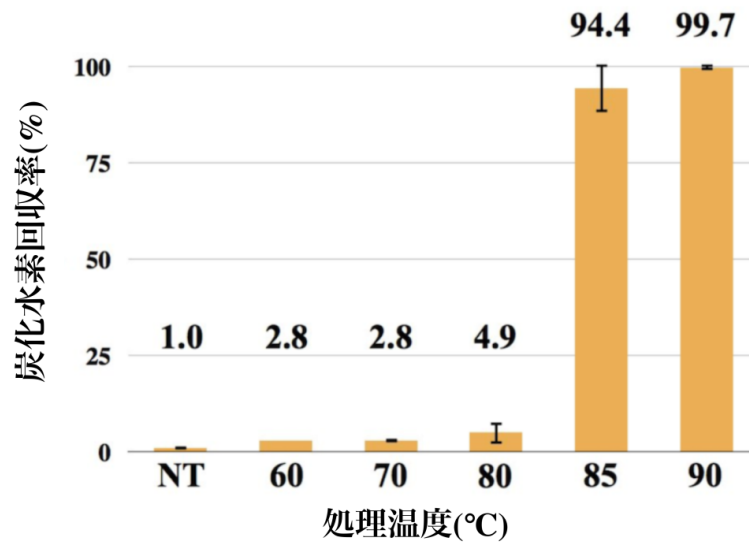


図 2.3.1.1 B race Berkeley 株における処理温度と炭化水素回収率の関係

表 2.3.1.1 B race Berkeley 株における処理温度と抽出された炭化水素重量の関係

加熱温度(°C)	NT	60	70	80	85	90
炭化水素重量 (mg/0.3g-dcw*)	1.1 ±0.7	3.0 ±1.3	2.8 ±0.9	5.0 ±1.7	99.6 ±19.0	104.7 ±14.2

*dcw: 乾燥藻体重量

B race Berkeley 株に関しては Kita らが報告した結果と同様に、炭化水素の回収率は 80°C から 85°C の間で急激に上昇し、90°C では細胞間マトリクスにある炭化水素がほぼ完全に回収されるという結果を得た。Kita らの用いた Berkeley 株を継代培養してから 10 代目以降の藻体サンプルであるが、結果が一致したことから Berkeley 株は加熱前処理を用いた炭化水素回収に関して再現性の高い藻体である事が分かる。

次に B race Kawaguchi-1 株における処理温度と炭化水素回収率の関係を図 2.3.1.2 に示す。また、各実験において回収された炭化水素重量を表 2.3.1.2 に示す。

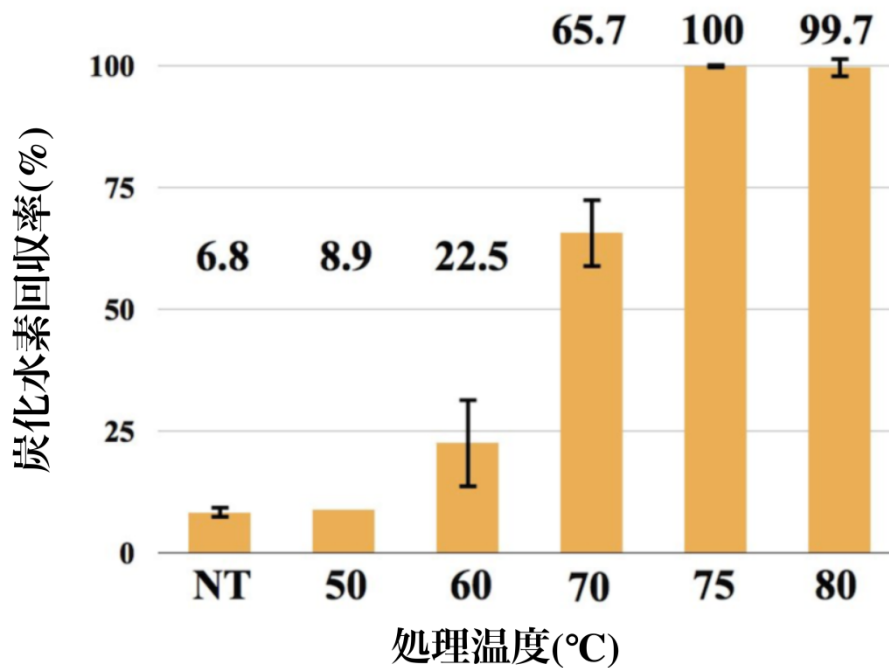


図 2.3.1.2 B race Kawaguchi-1 株における処理温度と炭化水素回収率の関係

表 2.3.1.2 B race Kawaguchi-1 株における処理温度と抽出された炭化水素重量の関係

加熱温度(°C)	NT	50	60	70	75	80
炭化水素重量 (mg/0.3g-dcw)	6.8 ±2.1	7.4 ±2.1	18.6 ±10.6	54.2 ±8.4	82.5 ±6.5	81.6 ±3.6

B race Kawaguchi-1 株でも Berkeley 株と同様に加熱前処理が炭化水素回収に有効であった。50°Cでは炭化水素回収率が 8.9 %であったのに対し、60°Cでは 22.5 %、70°Cで 65.7 %、そして 75°Cにおいて炭化水素回収率が 90 %を超えた。この実験結果により Berkeley 株とは異なり 60~75°Cという広い温度幅で炭化水素回収率が徐々に上昇することが分かった。

A race Yamanaka 株における処理温度と炭化水素回収率の関係を図 2.3.1.3 に示す。また、各実験において回収された炭化水素重量を表 2.3.1.3 に示す。

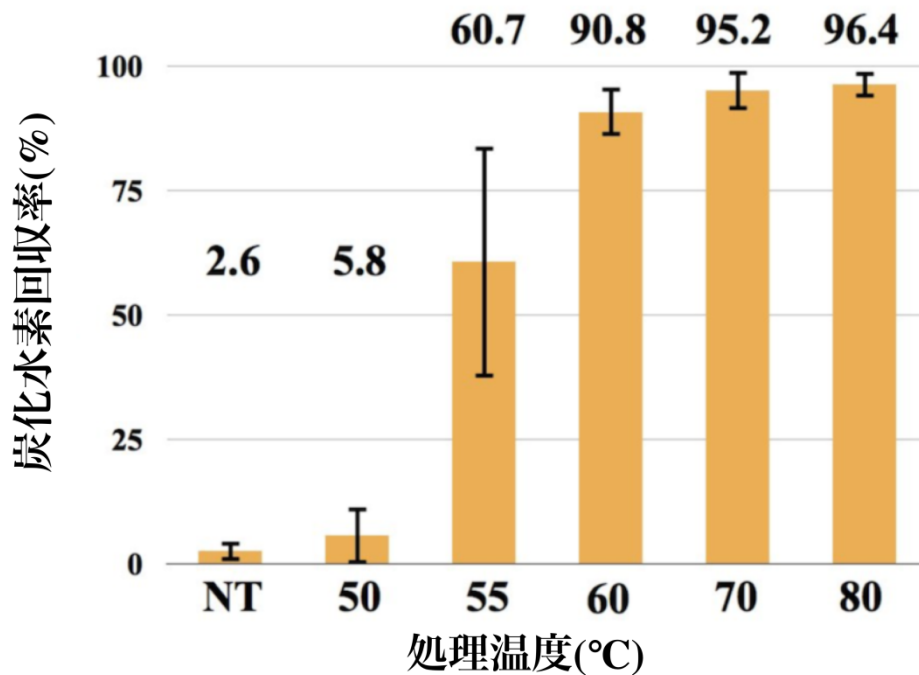


図 2.3.1.3 A race Yamanaka 株における処理温度と炭化水素回収率の関係

表 2.3.1.3 A race Yamanaka 株における処理温度と抽出された炭化水素重量の関係

加熱温度(°C)	NT	50 °C	55	60	70	90
炭化水素重量 (mg/0.3g-dcw)	2.1 ±2.9	4.6 ±6.4	47.6±25.5	71.9±7.6	74.7±7.1	76.0±6.7

A race Yamanaka 株では炭化水素の回収率は 60°C で 90 % を超えた。しかし、藻体サンプルによっては 55°C においても 68 %~82 % の炭化水素回収率を得た。これが図 2.3.1.3 の 55°C における標準偏差の大きさの理由である。このことから A race Yamanaka 株においては 55°C 付近が炭化水素回収率が上昇する温度と考えられる。これらの温度帯は Berkeley 株と比べると 30 °C 近く低い。しかし Berkeley 株と同様に比較的狭い温度幅で回収率が上昇することが分かった。藻類からオイル分を回収する目的で、このような温度で加熱する研究は、Kita ら、および著者らの報告以外に見当たらない[116]。その理由はこのような比較的穏やかな加熱温度では細胞を保護する細胞壁を破壊することは出来ず、細胞内のオイル分の回収が見込めないからである。それゆえ、マイクロ波を用いた加熱や、水熱処理のような高温高圧の処理が行われている。そのような中で 60°C という処理温度がオイルの回収に有効であるという結果は化学的に興味深い。

2.3.2 保持時間と炭化水素回収率の関係

Berkeley 株における保持時間と炭化水素回収率の関係を図 2.3.2.1 に示す。また回収された炭化水素重量を表 2.3.2.1 に示す。

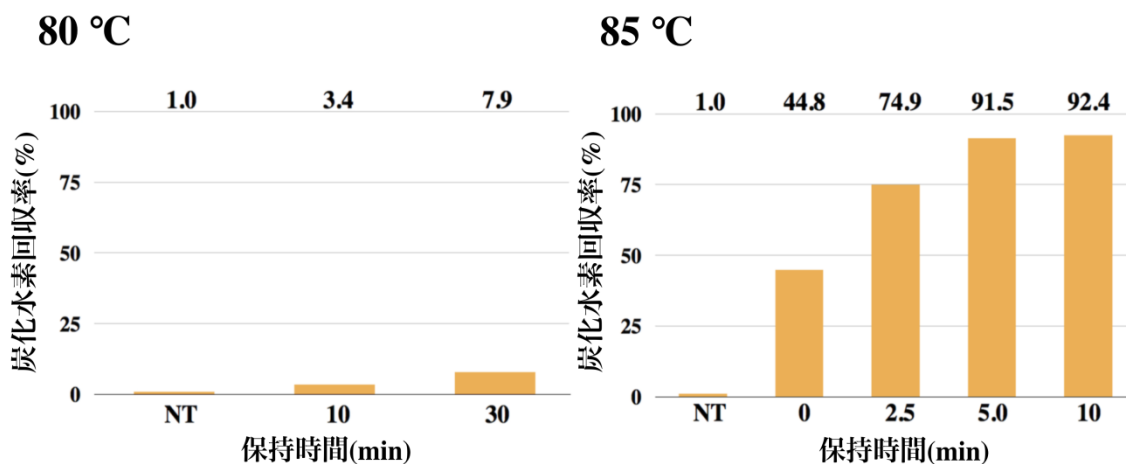


図 2.3.2.1 B race Berkeley 株における保持時間と炭化水素回収率の関係

表 2.3.2.1 B race Berkeley 株における保持時間と回収された炭化水素重量の関係

加熱温度(°C)	NT	80			85			
保持時間(min)	-	10	20	30	0	2.5	5	10
炭化水素重量 (mg/0.3g-dcw)	1.0	1.0	3.4	7.8	44.5	74.3	90.8	91.6

炭化水素回収率が90%を超えなかった最も高い処理温度である80°Cで最長30 min保持し、スラリーからの炭化水素回収を試みたが、回収率は低いままで、炭化水素回収率は10%未満であった。一方、炭化水素回収率が90%を超えた最も低い処理温度である85°Cでは、85°Cに達した瞬間に室温まで冷却する保持時間0 minの処理でも炭化水素回収率は44.8%であり、保持時間5.0 minで90%を超えた。このことから Berkeley 株に関して加熱前処理の効果は保持時間よりも処理温度の影響が強いことが分かった。

本実験において用いた加熱前処理装置では80°Cにおいて加熱を止めると1 min当たり約4°Cずつ藻体スラリー温度が低下する。ゆえに80°C、保持時間30 minの条件で投入された熱エネルギーは、85°C、0 minの条件で投入された熱エネルギーを明らかに超える。この事と85°C、0 minの実験結果から Berkeley 株の加熱前処理の効果は加熱操作で投入されたエネルギーよりも、加熱時の処理温度が炭化水素の回収率に強く影響することが考えられる。

次に Kawaguchi-1 株における保持時間と炭化水素回収率の関係を図 2.3.2.2 に示す。また、回収された炭化水素重量を表 2.3.2.2 に示す。

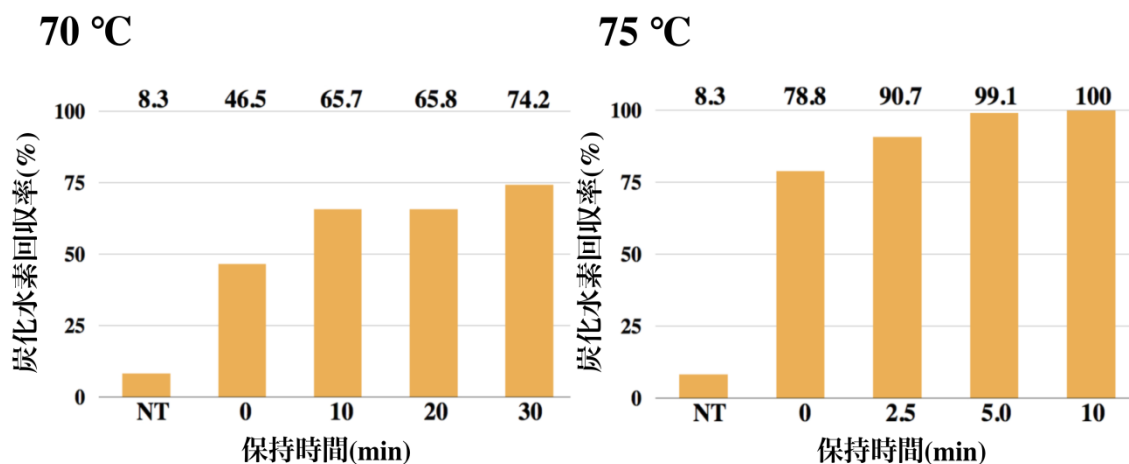


図 2.3.2.2 B race Kawaguchi-1 株における保持時間と炭化水素回収率の関係

表 2.3.2.2 B race Kawaguchi-1 株における保持時間と回収された炭化水素重量の関係

加熱温度(°C)	NT	70			75			
保持時間(min)	-	10	20	30	0	2.5	5	10
炭化水素重量 (mg/0.3g-dcw)	7.3	41.1	58.1	58.2	69.7	80.2	87.7	88.8

Kawaguchi-1 株においては処理温度と炭化水素回収率の関係が他の二株と異なったことから、本実験でも異なる傾向を示す可能性があるかと予想していた。しかし、結果は 70°C において保持時間を延長しても、やはりそれほど炭化水素回収率は上昇せず、一方で 75°C で保持時間を短縮したところ 2.5 min で炭化水素回収率が 90 % を超える結果となった。これは Berkeley 株と同様に、本株でも加熱前処理による炭化水素回収の効果は保持時間よりも処理温度の影響が強いことを示している。

Yamanaka 株における加熱保持時間と炭化水素回収率の関係を図 2.3.2.3 に示す。また、回収された炭化水素重量を表 2.3.2.3 に示す。

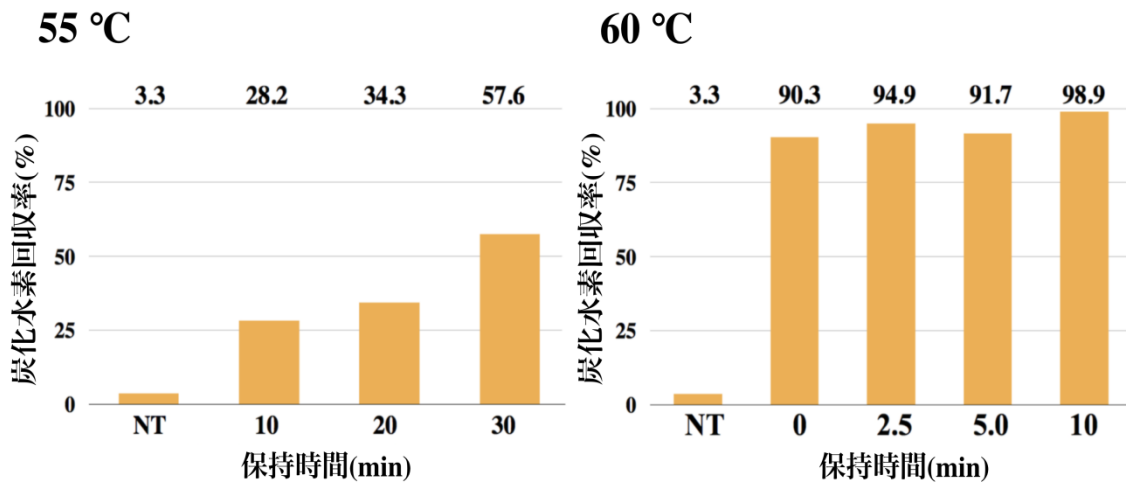


図 2.3.2.3 A race Yamanaka 株における保持時間と炭化水素回収率の関係

表 2.3.2.3 A race Yamanaka 株における保持時間と回収された炭化水素重量の関係

加熱温度(°C)	NT	55			60			
保持時間(min)	-	10	20	30	0	2.5	5	10
炭化水素重量 (mg/0.3g-dcw)	2.6	22.8	27.8	46.6	72.4	76.1	73.5	79.3

処理温度 55°C、保持時間 10 min において炭化水素回収率が 28.2 %であったサンプルに対し、保持時間を 20 min、30 min と延ばしても炭化水素回収率は 90 %を超えるほどの上昇は見られなかった。一方で 60°Cにおいて 60°Cに達したら、直ちに室温まで冷却する保持時間 0 min でも炭化水素回収率は 90 %を超えた。この事から Yamanaka 株においても加熱処理の効果は Berkeley 株や Kawaguchi-1 株と同様に処理温度の影響が大きいことが分かった。

以上の実験結果から以下が明らかになった。

- ① 加熱前処理は他の株に対しても細胞間マトリクス中に蓄積している炭化水素を回収するのに有効である。
- ② 加熱前処理による炭化水素の溶媒抽出においては保持時間よりも処理温度の影響が強い。

Ela らによる B race Berkeley 株によるビーズミルを用いた炭化水素の溶媒抽出や、Balasubramanian らによる *Scenedesmus* のマイクロ波による細胞破壊とオイル分抽出の結果を見ると、処理時間が長いほどオイル分の回収率が増加している[116][117]。つまりこれらの細胞破壊法によるオイル分の抽出は処理時間の影響が強いことが考えられる。一方で本

研究における加熱前処理による炭化水素回収率の改善効果は処理温度の影響が強い。これらのことから、加熱前処理による炭化水素回収率の改善は ”*B. braunii* が形作るコロニーを構成する物質に、温度依存の化学的な変化を及ぼすこと” に起因するのではないかと考察される。

2.3.3 光学顕微鏡を用いた藻体コロニーの観察

B race Berkeley 株の加熱前処理前後の藻体スラリーを光学顕微鏡を用いて明視野で観察した。処理前後の顕微鏡写真を図 2.3.3.1、図 2.3.3.2 にそれぞれ示す。また A race Yamanaka 株の観察像を図 2.3.3.3、図 2.3.3.4 に示す。

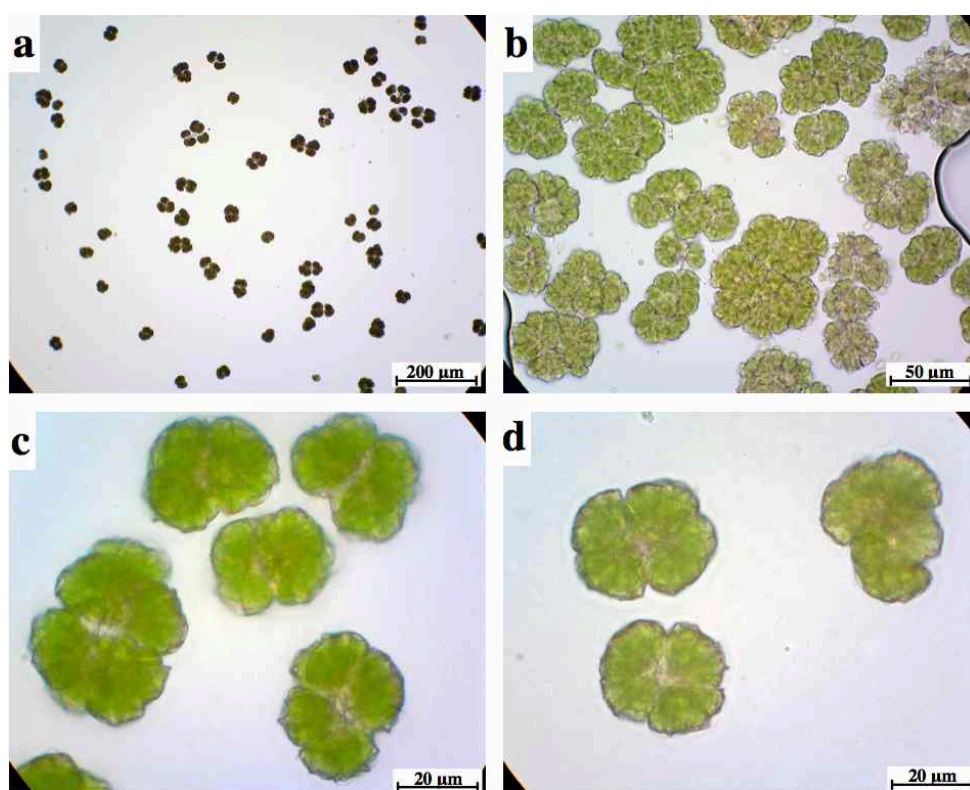


図 2.3.3.1 B race Berkeley 株の光学顕微鏡像(無処理)

(a: x100 b: x400 c, d: x1000)

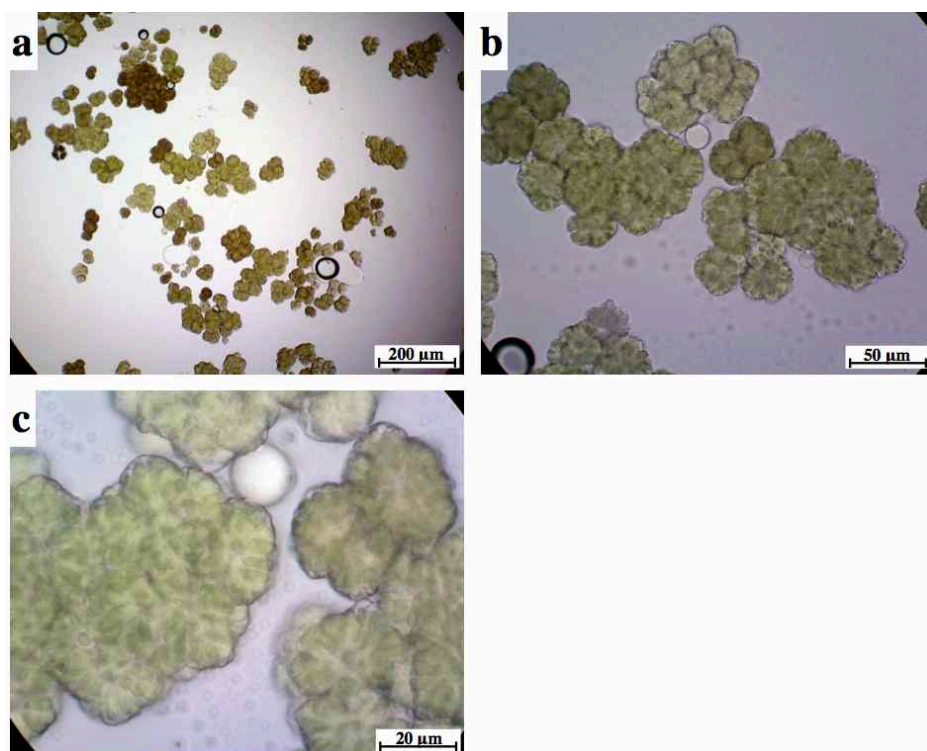


図 2.3.3.2 B race Berkeley 株の光学顕微鏡像(処理温度 85°Cにて加熱前処理)
(a: x100 b: x400 c: x1000)

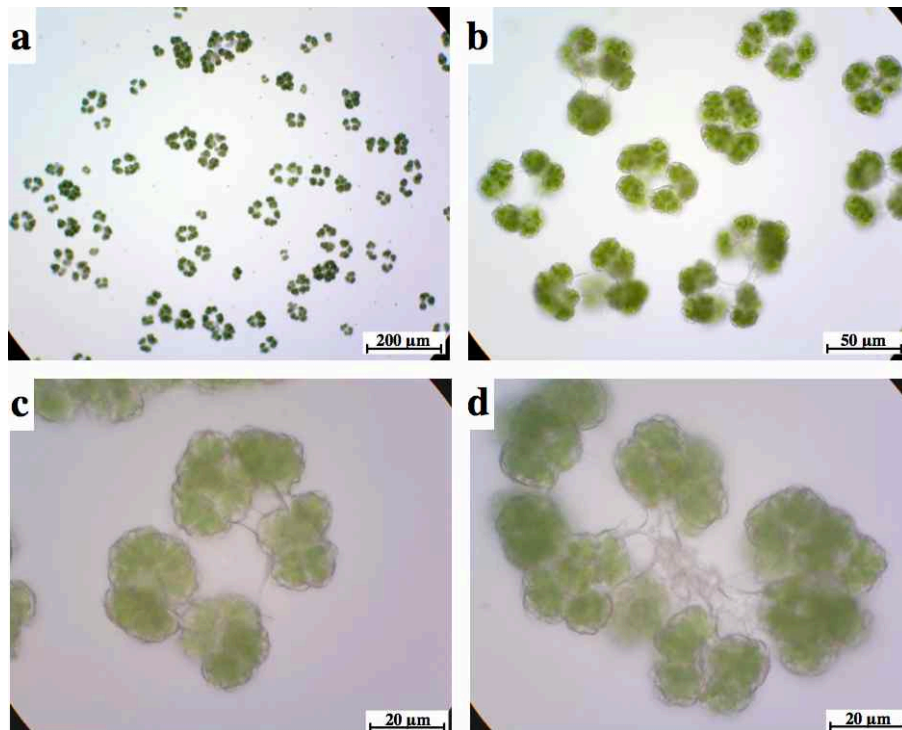


図 2.3.3.3 A race Yamanaka 株の光学顕微鏡像(無処理)
(a: x100 b: x400 c, d: x1000)

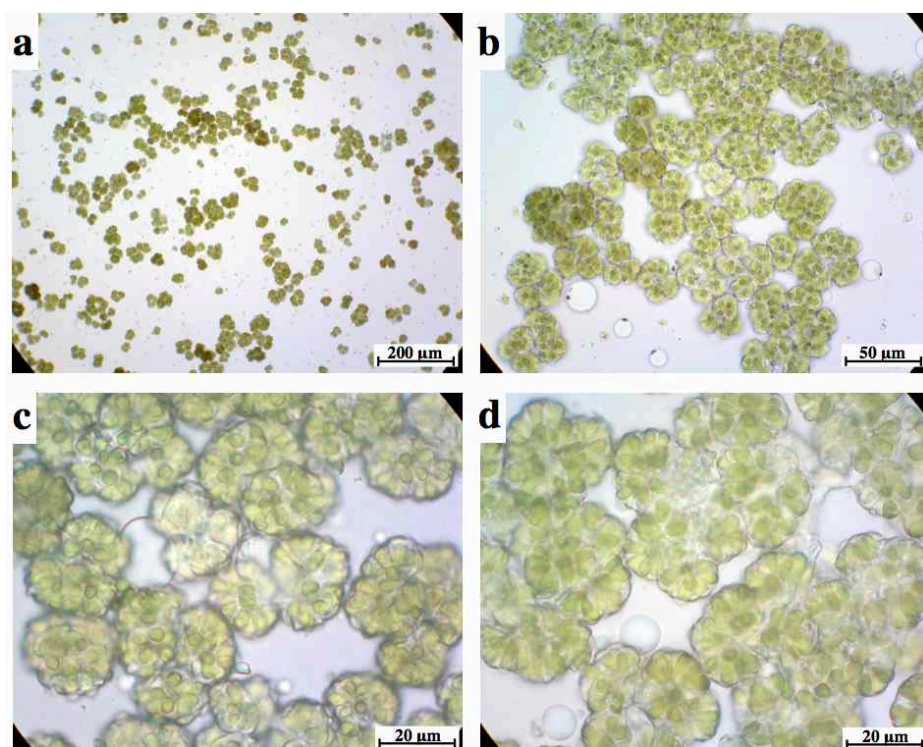


図 2.3.3.4 A race Yamanaka 株の光学顕微鏡像(処理温度 60℃にて加熱前処理)
(a: x100 b: x400 c, d: x1000)

B race Berkeley 株および A race Yamanaka 株の無処理の藻体コロニーを明視野において観察すると、コロニー中にある細胞の境界を識別することや、藻体表面の焦点位置を把握することが難しかった。しかし Berkeley 株においては 85℃、Yamanaka 株においては 60℃で加熱した後では、細胞間の境界や、コロニー表面の焦点位置を把握することが容易になった。図 2.3.3.1 では細胞同士が重なって見えるが、図 2.3.3.2 では細胞と思われる粒子が確認できる。図 2.3.3.3 では藻体コロニーの表面がぼけて写っている。これは焦点位置があっていないのではなく、これ以上焦点を合わせられないからである。しかし、これを 60℃で処理した図 2.3.3.4 ではコロニー最表面の細胞の輪郭が確認出来る。以上の観察結果から、ひとつの可能性として、藻体コロニーの表面にあった物質が加熱により除去されたことが考えられる。そこで、墨汁を用いて、藻体コロニー表面の高分子物質の層を可視化し、各加熱処理温度における藻体コロニーを観察した。B race Berkeley 株の無処理および 80℃と 85℃での観察像を図 2.3.3.5~2.3.3.7 に、またそれぞれの比較を図 2.3.3.8 に示す。A race Yamanaka 株の無処理および 55℃と 60℃での観察像を図 2.3.3.9~2.3.3.11 に、またそれぞれの比較を図 2.3.3.12 に示す。

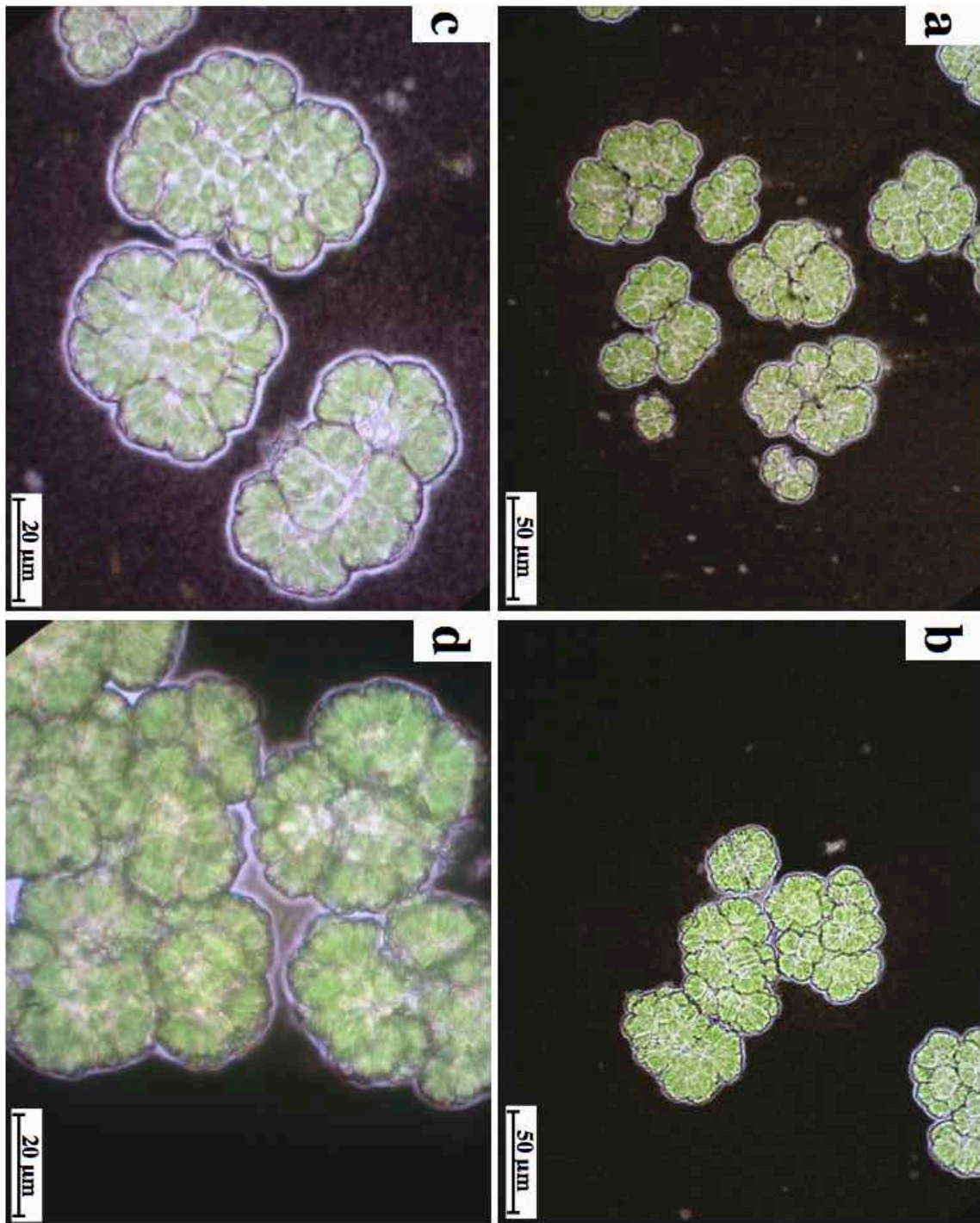


図 2.3.3.5 墨を用いた藻体コロニーの観察
(B race Berkeley 株 無処理 a, b: x400 c, d: x1000)

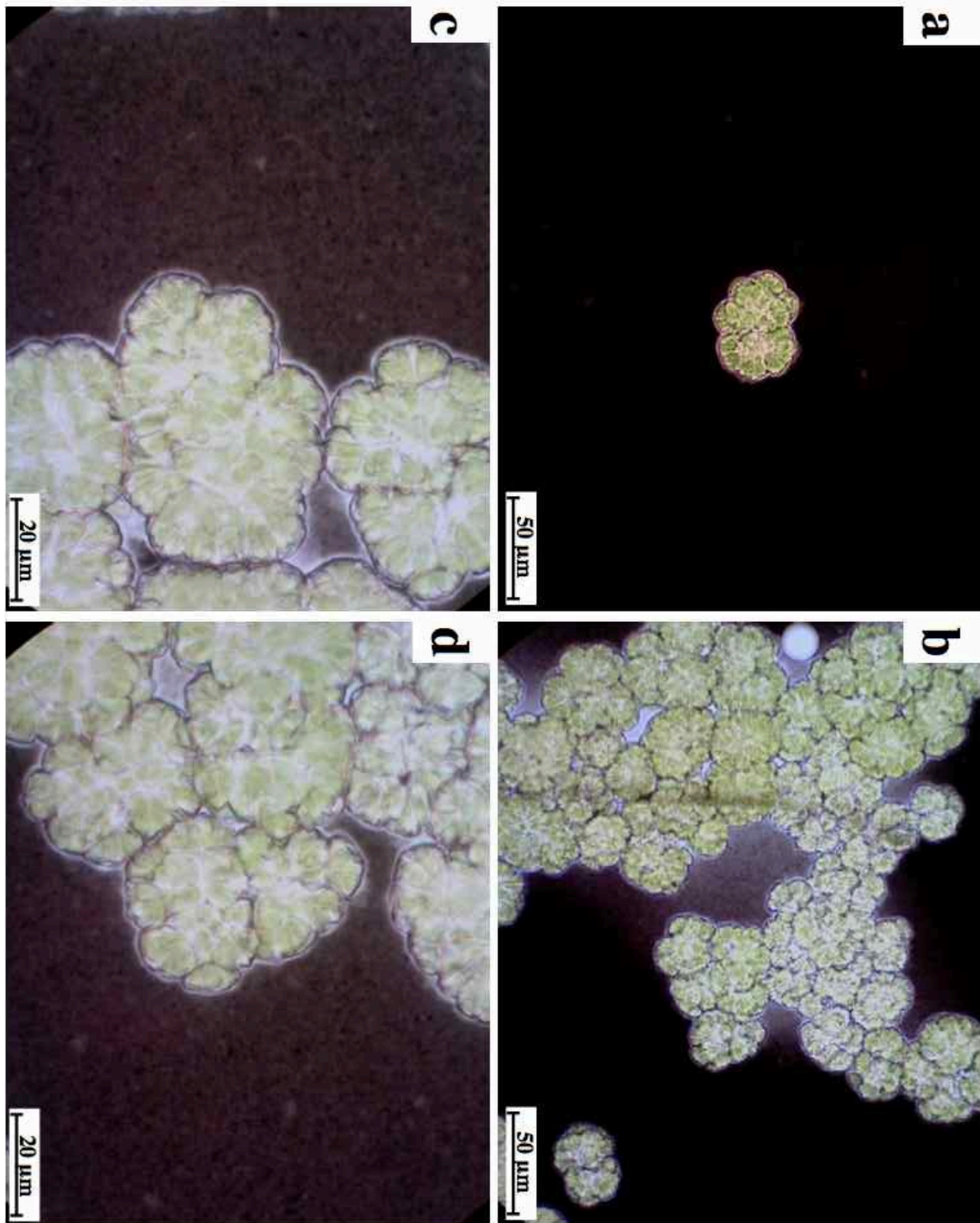


図 2.3.3.6 墨を用いた藻体コロニーの観察
(B race Berkeley 株 80°Cで加熱前処理 a, b: x400 c, d: x1000)

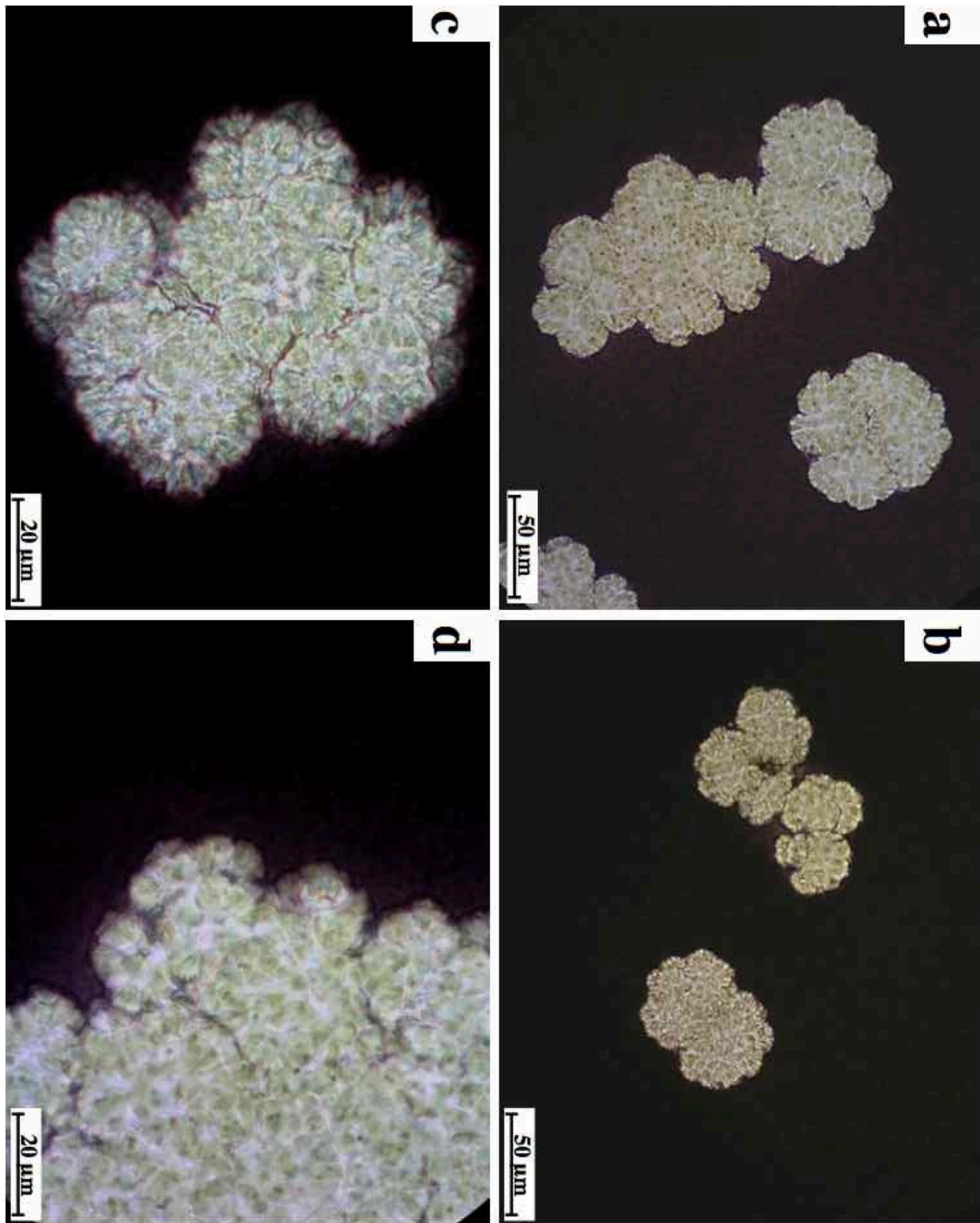


図 2.3.3.7 墨を用いた藻体コロニーの観察
(B race Berkeley 株 85°Cで加熱前処理 a, b: x400 c, d: x1000)

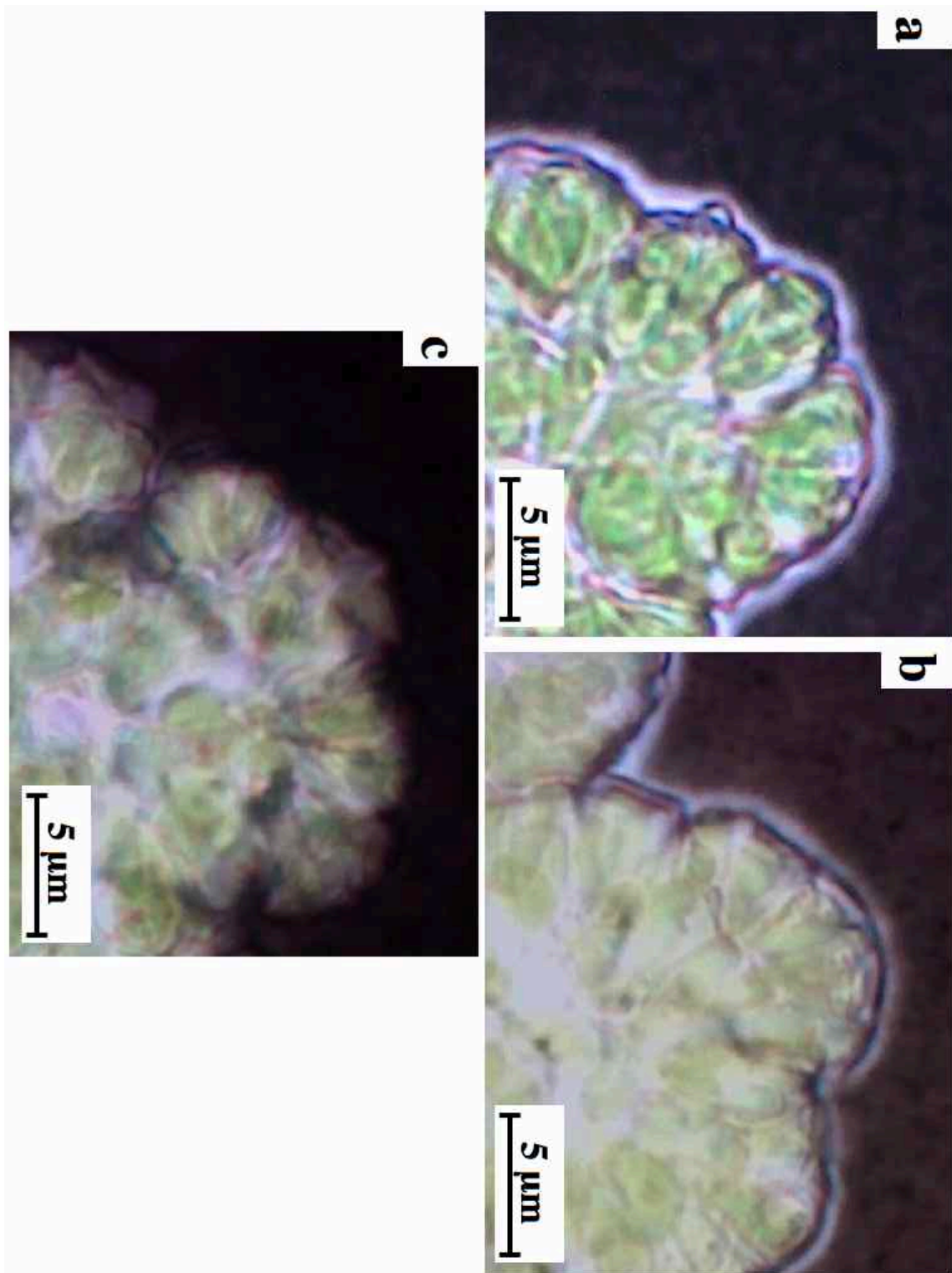


図 2.3.3.8 墨を用いた藻体コロニー表面の観察
(B race Berkeley 株 加熱前処理温度 a: 無処理 b: 80°C c: 85°C)

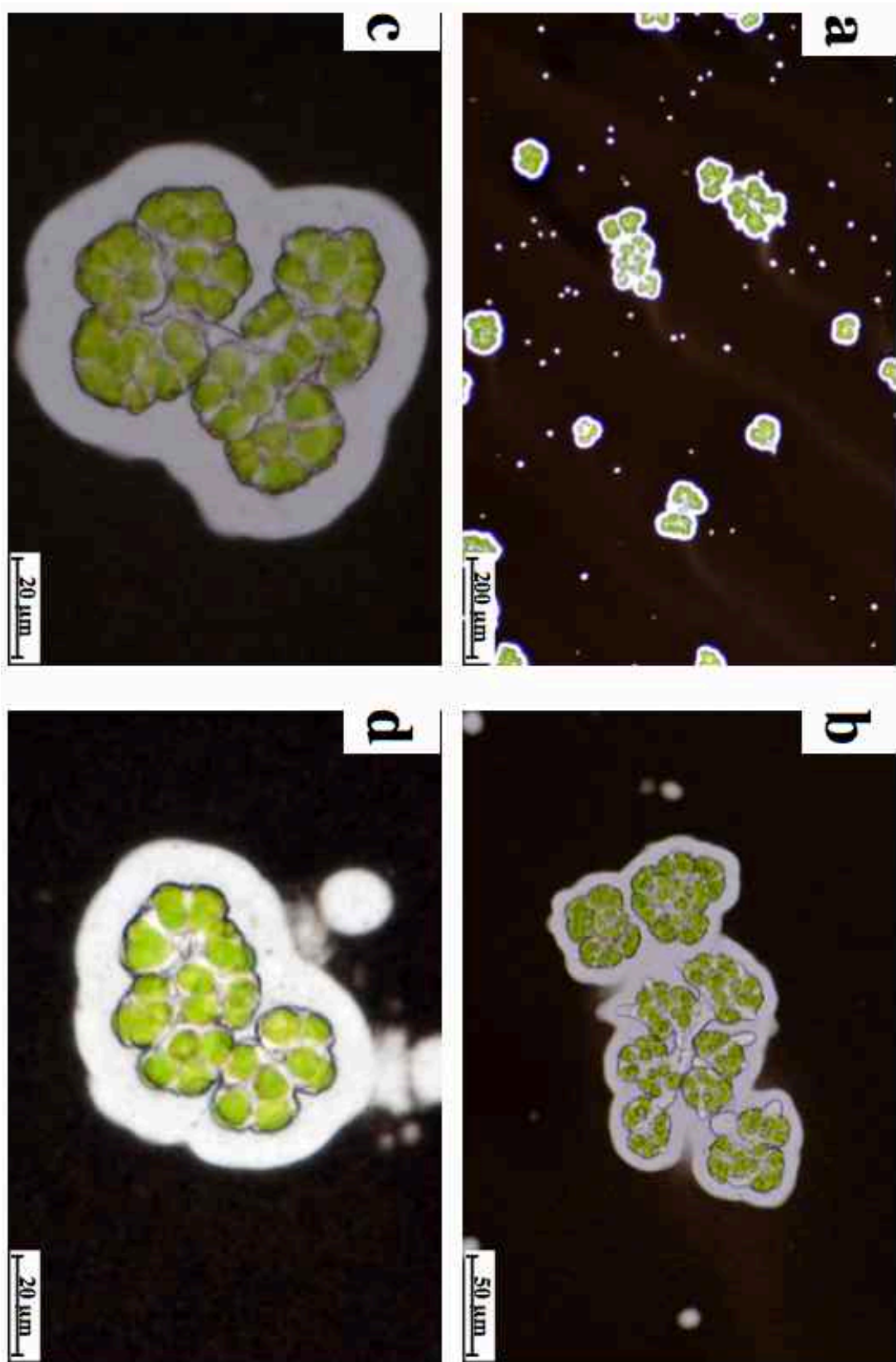


図 2.3.3.9 墨を用いた藻体コロニーの観察
 (A race Yamanaka 株 無処理 a: x100 b: x400 c, d: x1000)

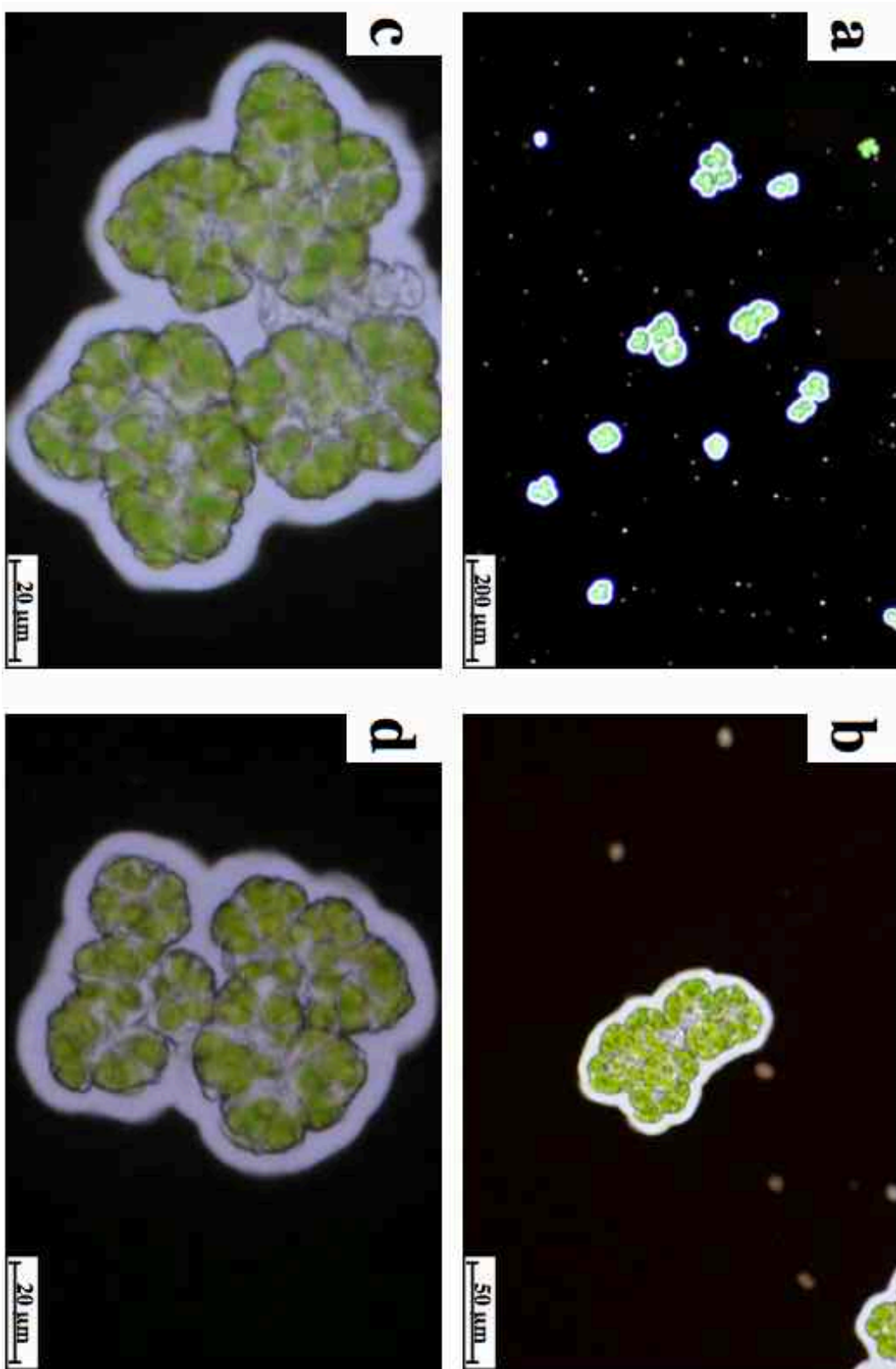


図 2.3.3.10 墨を用いた藻体コロニーの観察

(A race Yamanaka 株 55°Cで加熱前処理 a: x100 b: x400 c, d: x1000)

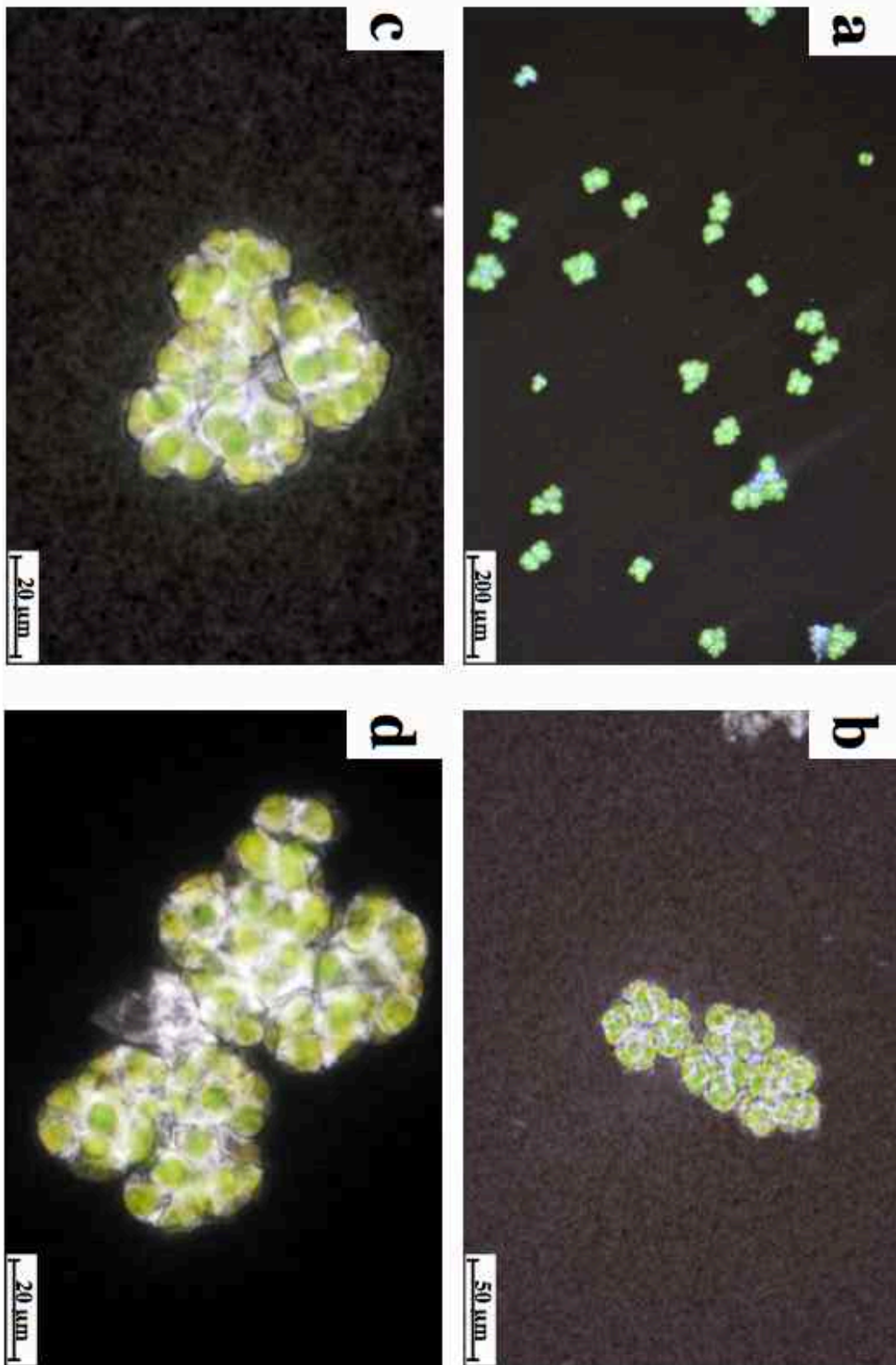


図 2.3.3.11 墨を用いた藻体コロニーの観察

(A race Yamanaka 株 60°Cで加熱前処理 a: x100 b: x400 c, d: x1000)

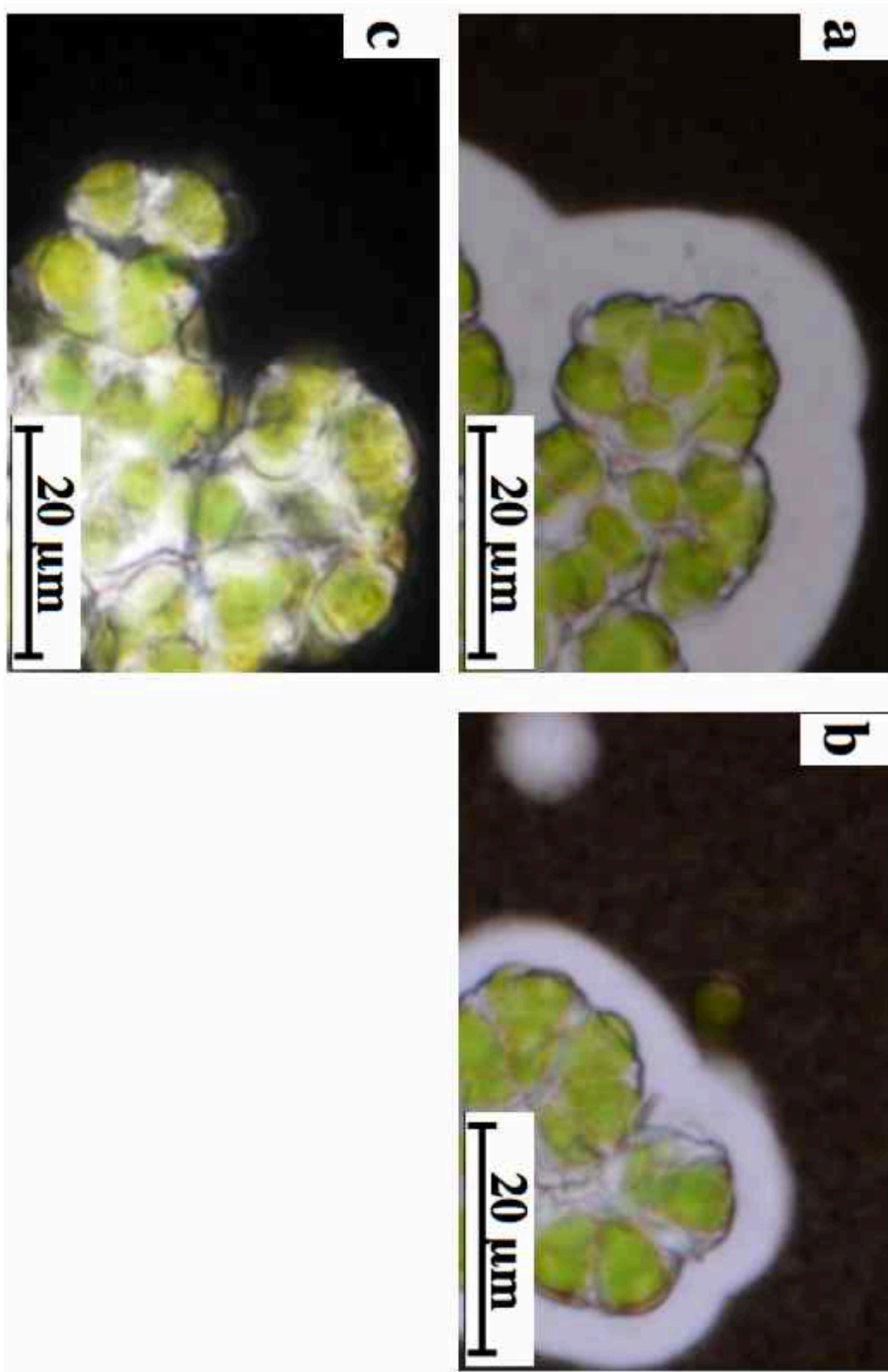


図 2.3.3.12 墨を用いた藻体コロニー表面の観察
(A race Yamanaka 株 加熱前処理温度 a: 無処理 b: 55°C c: 60°C)

B race Berkeley 株で、無処理、80°Cおよび85°Cで加熱前処理を行った藻体コロニーの観察像を比較すると、無処理および80°Cではコロニー表面に高分子物質の層ははっきりと観察出来るのに対し、85°Cでは藻体コロニー表面の層が観察されなかった。A race Yamanaka 株においても処理温度55°Cまでは藻体コロニー表面の高分子物質の層が明瞭に観察されるが、60°Cで加熱前処理を行うと、この層は観察されなくなった。B race Berkeley 株、A race Yamanaka 株ともに細胞間マトリクス中の炭化水素の殆どが回収される処理温度ではこれらの層が観察されなくなったことから、加熱前処理によって炭化水素が回収されるための条件は、これら高分子物質の藻体からの分散ではないかと考えられる。これらの高分子物質の成分については、最近の研究から多糖、もしくはタンパク質では無いかと考えられている[119]。特に多糖類においては工業的に、今回行ったような水の沸点以下の温度での熱水抽出やアルカリ抽出が行われていることから、加熱前処理によって *B. braunii* のコロニー表面の多糖が水中へ分散した可能性は十分にあると考えられる。

2.4 まとめ

B race Berkeley 株、Kawaguchi-1 株および A race Yamanaka 株に対して加熱前処理を行い、処理温度と保持時間に対する炭化水素回収率の関係を得た。その結果、全ての株において加熱前処理は藻体から炭化水素を回収するのに有効であり、処理温度の影響が強いことが分かった[116]。このことから、加熱前処理を用いた炭化水素の溶媒抽出においては、多糖等からなる藻体コロニー表面の高分子物質が変化を起しているのではないかと推定し、墨汁を用いて Berkeley 株と Yamanaka 株の観察を行った。その結果、藻体コロニー表面の高分子物質の様子は、炭化水素回収率が上昇する前後の温度で変化していることが観察された。このことから、加熱前処理が藻体コロニー表面の高分子物質を分散させることで、ヘキサンがコロニー内に浸入し、炭化水素が回収されるという仮説が得られる。このことを証明するには各処理温度におけるコロニー表面の高分子物質の分散を定量的に測定し、炭化水素回収率との相関を調べる必要がある。

第三章 加熱前処理により水相中へ分散した高分子物質の定量

3.1 目的

前章で細胞間マトリクスに蓄積されている炭化水素の回収には藻体コロニー表面の高分子物質がコロニーから水中へ分散することが必要であるという仮説を立てた。本章では加熱前処理によってコロニー表面から水相中に分散した高分子物質を、多糖およびタンパク質として、各処理温度において定量することにより、炭化水素回収率との相関を調べた。

3.2 試料および実験方法

3.2.1 藻体試料

本章における実験では、二章の加熱前処理実験に用いた *B. braunii* のなかでも処理温度に伴って炭化水素回収率が急激に変化する **B race Berkeley** 株を用いた。培養条件、収穫・保管法、藻体サンプルの単位体積あたりの乾燥藻体重量と炭化水素含有率の算出は第二章に準じた。

3.2.2 吸光光度法による水相中の多糖およびタンパクの定量

本実験では各定量法における検出範囲、感度、測定精度を考慮し、予備実験から加熱前処理における藻体スラリー濃度を 15 g/L とした。なお、この濃度においては処理温度と炭化水素回収率には第二章の結果と変わり無いことを予め確認している。

定量に供したサンプルは以下のように調製した。

- ① **B race Berkeley** 株の 15 g/L 藻体スラリー 25 mL を 50 mL の遠沈管に入れ、水浴により各処理温度にて加熱前処理を行った。このときのスラリー温度は温度計により測定した。
- ② 加熱前処理ののち、これを室温まで冷水で冷却し、ブフナトートを用いて間隙が 20 μ m のナイロンメッシュにより固液分離を行った。
- ③ ろ過により得たろ液は、均一になるように攪拌した後に回収し、この液体をそれぞれの定量法に供した。

図 3.2.2 に本実験で用いた器具とサンプル調製の概略を示す。本実験では多糖をフェノール・硫酸法によって還元糖量として、タンパクをビスシコニン酸法(BCA 法)によって定量した。

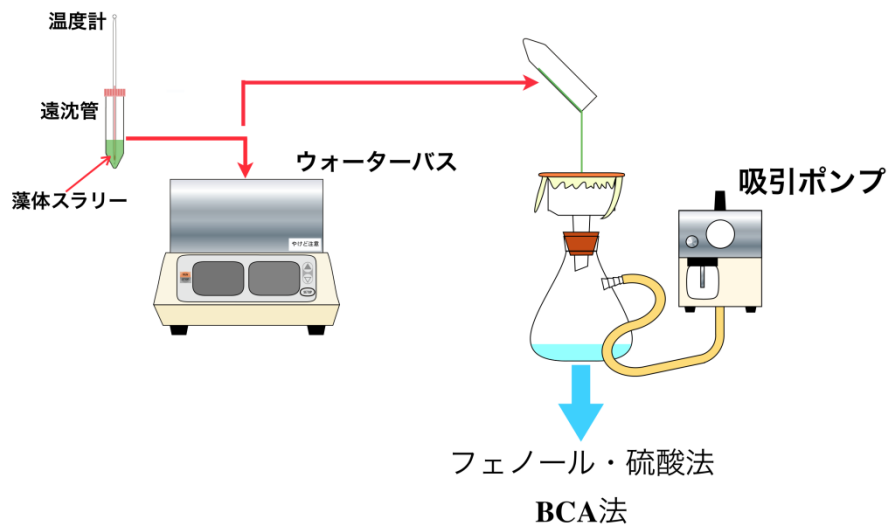


図 3.2.2 フェノール・硫酸法および BCA 法に用いたサンプルの調製

3.2.2.1 フェノール・硫酸法による還元糖の定量

多糖類は還元糖量としてフェノール・硫酸法により以下のように行った。

- ① 前述の方法で回収したサンプル 200 μ L を 5 mL チューブにとり、5 wt% フェノール水溶液を 200 μ L 加えた。
- ② これに濃硫酸 1 mL を液面に直接素早く加え、すぐに 30 s ボルテックスミキサーにより攪拌した。
- ③ これを 10 min 放置後、37°C で 30 min 水浴中で保温した。その後、室温にて 10 min 放置し、紫外・可視分光光度計(UV-1800)で 490 nm の吸光度を測定した。

標準糖の選択としては、これらの高分子物質の構成糖がガラクトースおよびアラビノースから構成されていると考えられる事[119][120]から、文献[121]よりモル吸光係数がこれらの平均値に近いスクロースを用いた。

3.2.2.2 BCA 法によるタンパクの定量

B. braunii の構成成分の中で炭水化物の次に質量が大きく、また藻体コロニー表面の高分子物質中にも含まれていると考えられているのがタンパク質である[89][115]。よって、タンパク質も定量を行った。定量には BCA 法を用いた。*B. braunii* 中の粗タンパクの定量では古くから Lowry 法や、最近の文献では Bradford 法が用いられている[89][119][120][122][123]。本研究において定量するのは高濃度の親水性多糖とタンパク質を同時に含むサンプルである。Lowry 法は妨害物質が多く、これら妨害物質の共存可能濃度が低いため不適切であると考えた。また、回収した水相とヘキサンを混合した際にエマルジョンを発生することが

確認され、これらの物質は界面活性剤のように挙動することが考えられる。よって疎水性相互作用により定量する Bradford 法は不適と考えられる。実際に藻体スラリーから回収したタンパク質濃度既知(BCA 法)のサンプルと標準物質である BSA(牛血清アルブミン)とを混合して定量したところ BSA のみの時と比べて、吸光度が期待値よりも著しく低かったことから、明らかに藻体コロニー表面から分散した物質の中には定量を阻害する物質が含まれていることが分かった。以上の問題を検討した結果、Lowry 法と定量原理が同じで、線形性や再現性、精度に優れ、さらに妨害物質が少ない BCA 法を用いた。定量には Pierce BCA Protein Assay Kit を用いた。手順は以下の通り。

- ① 各サンプル 100 μ L を、5 mL チューブにとり、2 mL の定量試薬を加え、よく振り混ぜた。
- ② これを 37°C で 30 min 水浴中で保温した後、室温にて 10 min 放置した。
- ③ 紫外可視分光光度計により 562 nm の吸光度を測定した。

3.2.3 追加実験

フェノール・硫酸法による還元糖量、および BCA 法によるタンパク質量の定量の結果は、仮説と異なった。そこで、その原因を突き止めるため、以下二種類の検証実験を行った。

3.2.3.1 追加実験 1: 粗分散物の乾燥重量測定

フェノール・硫酸法による還元糖の定量および BCA 法によるタンパク質の定量と同様に、回収した水相を凍結乾燥し、重量を測定した。実験手順は以下の通りである。

- ① 15 g/L に調製した B race Berkeley 株藻体スラリー 25 ml を 50 ml の遠沈管にいれ、ウォーターバスによりそれぞれの処理温度にて加熱前処理を行った。
- ② 加熱前処理の後、藻体スラリーを間隔が 20 μ m のナイロンメッシュでろ過した。メッシュ上に残った藻体を 100 ml のイオン交換水で洗浄し、洗浄液はろ液と共に回収した。
- ③ 洗浄した藻体を全量回収の為、適量のイオン交換水に分散させ、メスピペットで回収した。
- ④ 回収したろ液と藻体はそれぞれ別々に凍結乾燥し、水を除去した。
- ⑤ 凍結乾燥後、真空デシケータ内で 24 h 乾燥して重量を測定した。

また、回収したろ液中の固形物は 1.5 g/L の濃度になるようにイオン交換水を加え、60°C のウォーターバス内で再水和、分散させた。この水溶液をフェノール・硫酸法および BCA 法によって還元糖量とタンパク質量をそれぞれ定量した。本実験のフローを図 3.2.3.1 に示す。

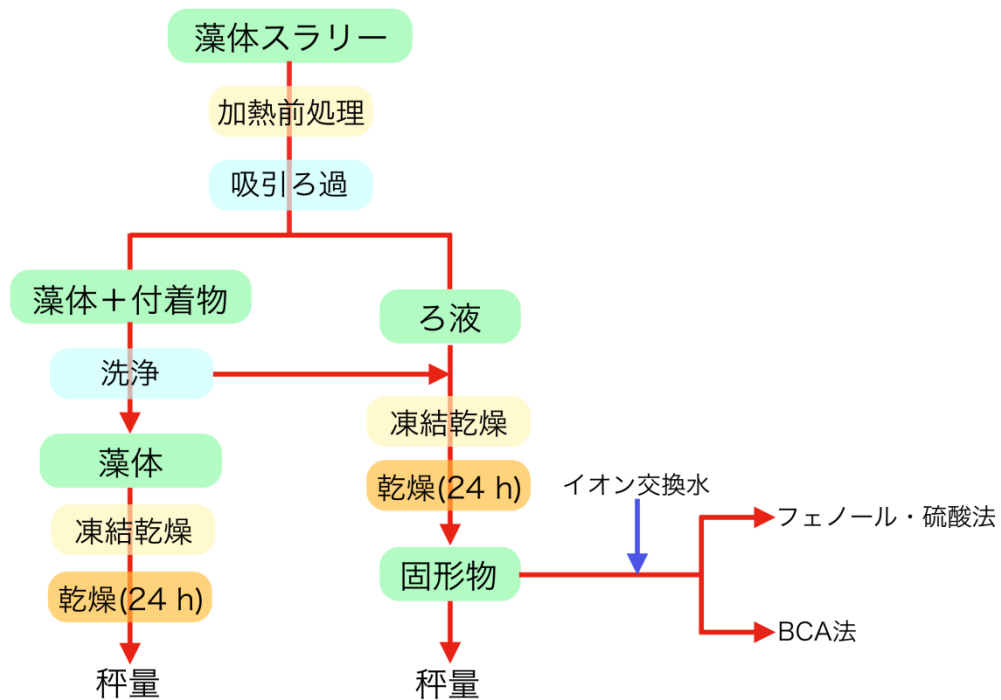


図 3.2.3.1 加熱前処理後の水相中の固形物重量測定フロー

3.2.3.2 追加実験 2： 加熱ステージによる藻体コロニー表面の光学顕微鏡観察

これまでの光学顕微鏡による観察は、所定の処理温度において加熱前処理を行ったあと、室温まで冷却した藻体スラリーに対して行った。この観察では処理温度 60℃において藻体から何が分散しているのか、さらにそれ以上の温度において藻体コロニーの表面ではどのような変化が起きているのかを観察する事が出来ない。そこで、追加実験 2 においては光学顕微鏡に装着した加熱ステージを用いて、藻体スラリーを加熱しながら表面の状態を各温度で観察した。これによりリアルタイムで藻体表面に起きている変化を、墨汁を用いて観察し、それぞれの処理温度における定量結果と照らし合わせて考察した。

顕微鏡用加熱ステージには Linkam 社製 LK-600 を用い、生物顕微鏡 Olympus 社製 BX-51 によって室温 25℃のもとで観察を行った。観察に用いたサンプルは以下のように調製した。

1. 藻体スラリーを、同量の墨汁(開明株式会社 開明墨汁 粒径: 50 nm~200nm)と混合した。
2. 墨を混合した藻体スラリーを、円形のカバーガラス(マツナミカバーガラス、直径 15 mm、厚み 0.12~0.17mm)の上に垂らした。
3. 更にその上からカバーガラスを被せ、キムワイプで余分な水分を取り除いた。

観察像の撮影は C マウントアダプタから一眼レフアダプタを介して一眼レフデジタルカメラ(Nikon Corporation, D7100 DSLR)にて撮影した(撮影条件: 露光時間: オート、絞り: 開放、WB: 蛍光灯、EV: +0.3)。なお、加熱ステージ温度とサンプル温度は一致しないため、ステ

ージ温度とは別にサンプル温度を測定した。サンプル温度は熱電対等で直接測定することが出来ないため、予めカバーガラスに塗布した示温インク(50℃, 55℃, 60℃, 70℃)の色が変化するまでの時間を測定し、サンプル温度の昇温グラフを作成した。サンプル温度の測定は各温度5回行った。以上のようにして作成した昇温グラフを図 3.2.4 に示す。図中のエラーバーは各温度に達するのに要した時間の絶対誤差を示す。

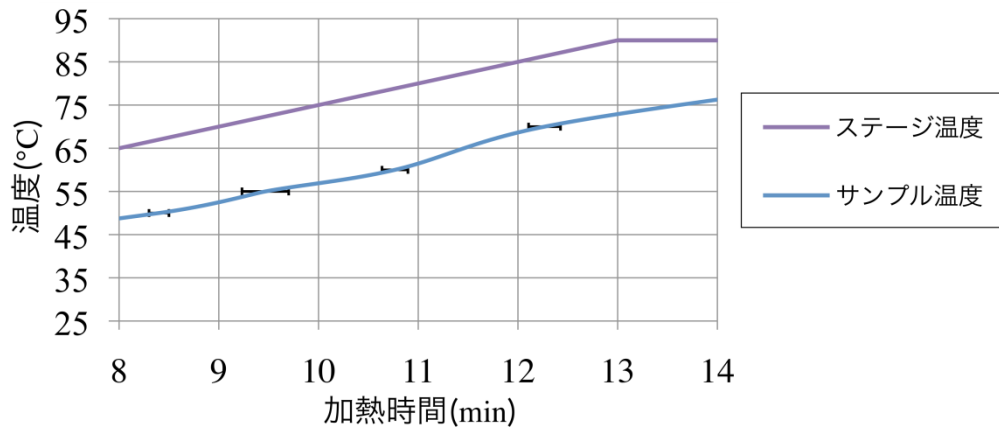


図 3.2.4 加熱ステージにおける昇温グラフ

3.3 結果および考察

3.3.1 吸光光度法による水相中の多糖およびタンパクの定量

B race Berkeley 株における処理温度と水相中に分散した物質中のフェノール・硫酸法で定量される還元糖量の関係を図 3.3.1.1 に、処理温度と水相中に分散した物質中の BCA 法で定量されるタンパク質量の関係を図 3.3.1.2 に示す。

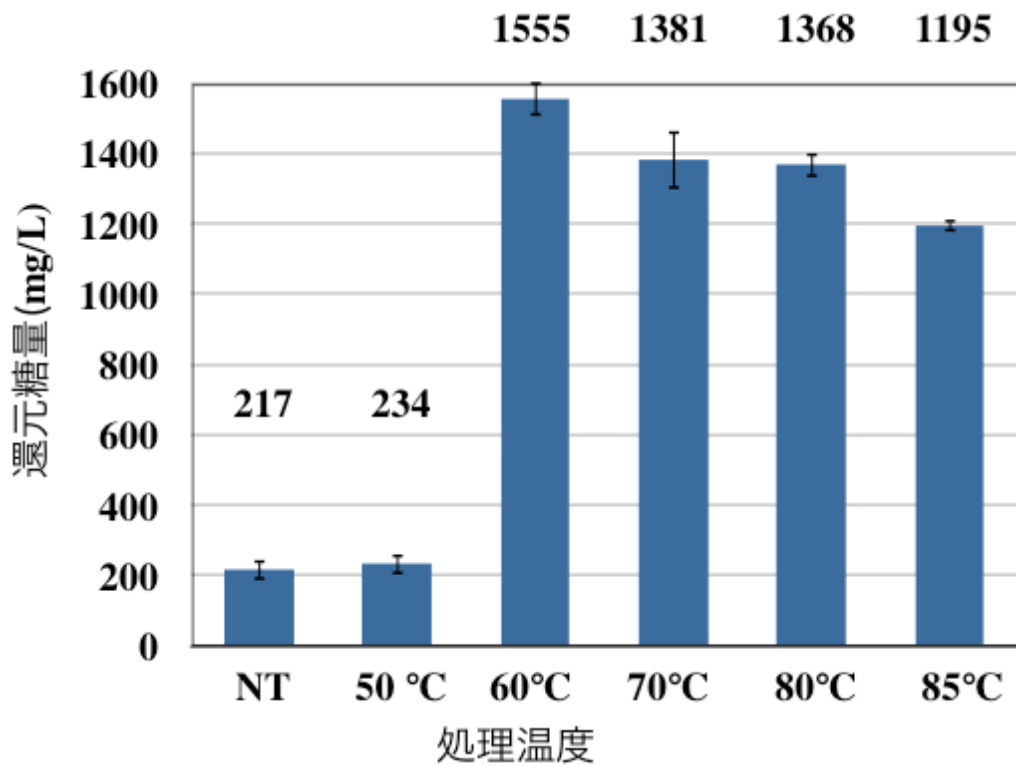


図 3.3.1.1 処理温度と水相中の還元糖量の関係

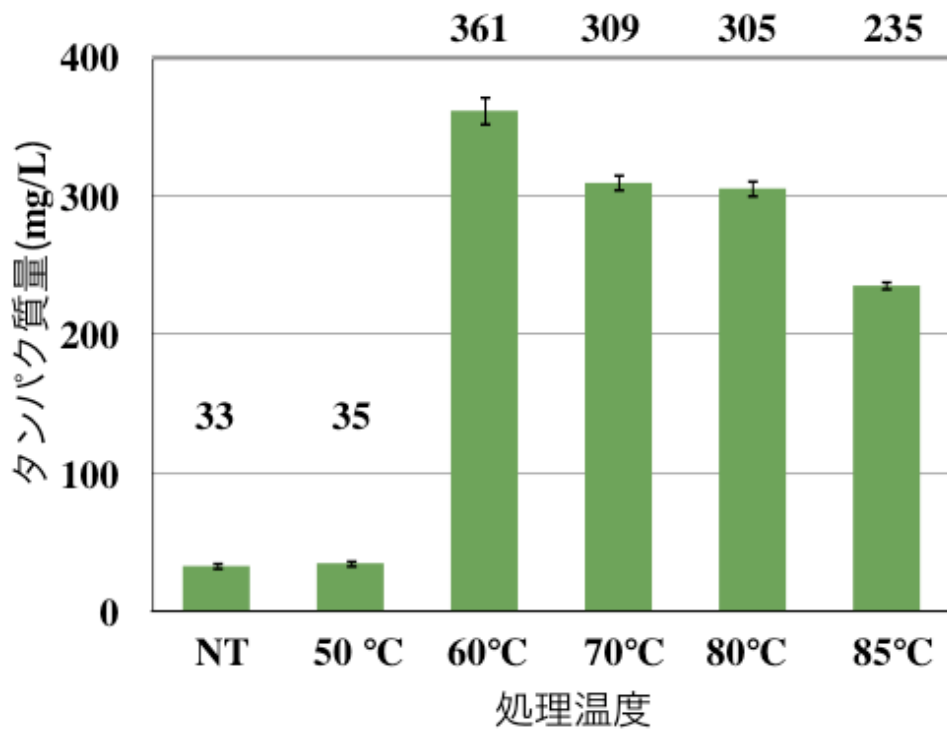


図 3.3.1.2 処理温度と水相中のタンパク質量の関係

本実験における加熱前処理後の水相中に含まれる還元糖量およびタンパク質量はともに50～60℃の間で急激に増加することが分かった。水中に分散する還元糖量およびタンパク質量の定量結果では、60℃が最も高く、70℃、80℃、85℃と処理温度が高くなるにつれて定量される値が減少する結果となった。この結果には二つの疑問点がある。

- 1.この結果は第二章で得られた Berkeley 株における処理温度と炭化水素回収率の関係と一致せず、60℃において高分子物質が分散し始めたことになる。本当にその現象が起きているのか。
- 2.本実験で用いたフェノール・硫酸法および BCA 法は水中に分散した高分子物質の量を正確に反映しているのか。

そこで、疑問1に対しては第二章では観察していなかった60℃および70℃で加熱前処理を行った B race Berkeley 株の藻体コロニーを、墨汁を用いて観察し、本当に60℃において、既にこれらの藻体表面の高分子物質が分散しているのかどうかを検討した。また、2つ目の疑問に関しては追加実験1において検証・考察を行った。

60℃における観察像を図3.3.1.3に、70℃における観察像を図3.3.1.4に示す。さらに各処理温度における藻体コロニー表面の比較を図3.3.1.5に示す。

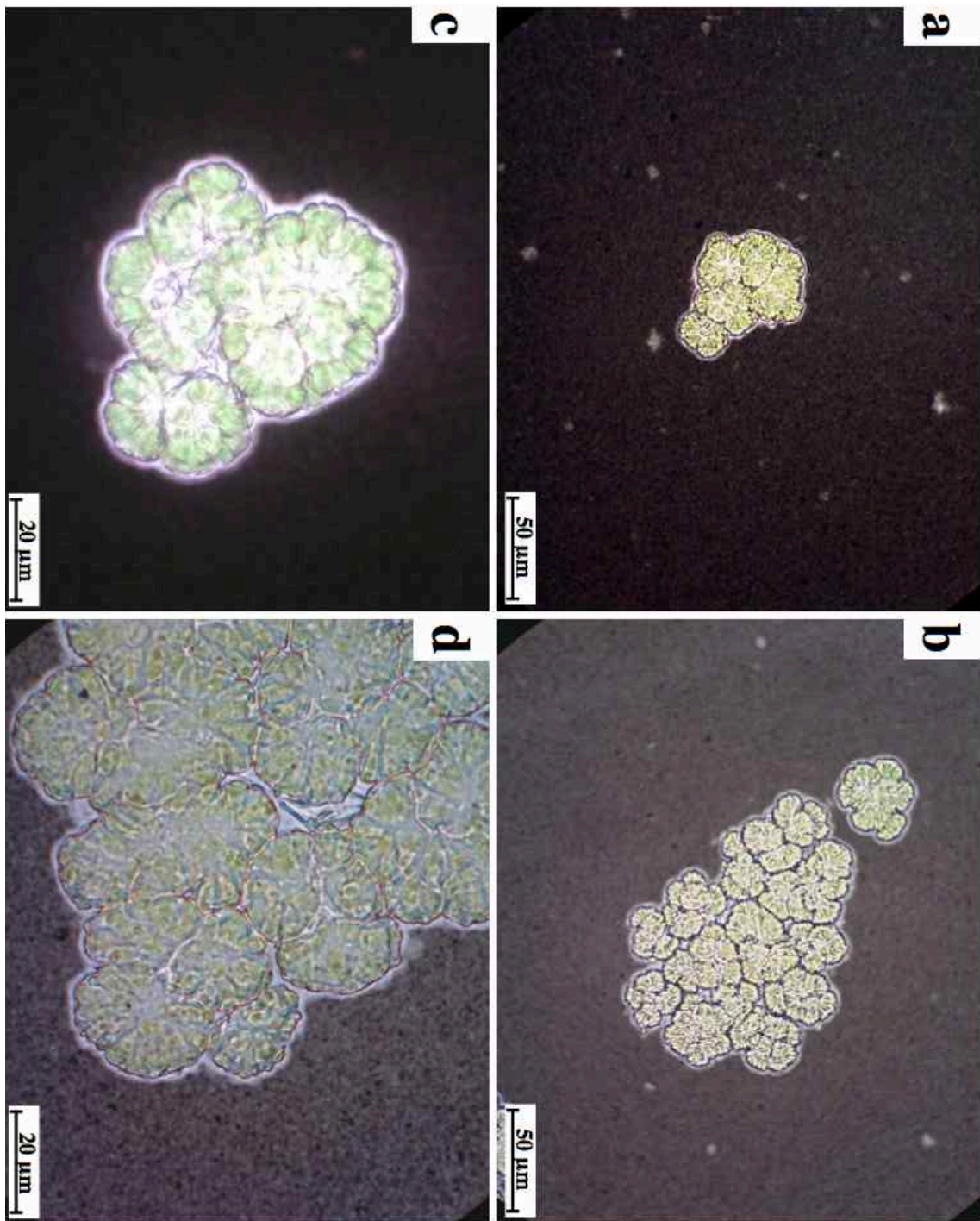


図 3.3.1.3 墨を用いた藻体コロニー表面の観察(60°C)

(a, b: x400 c, d: x1000)

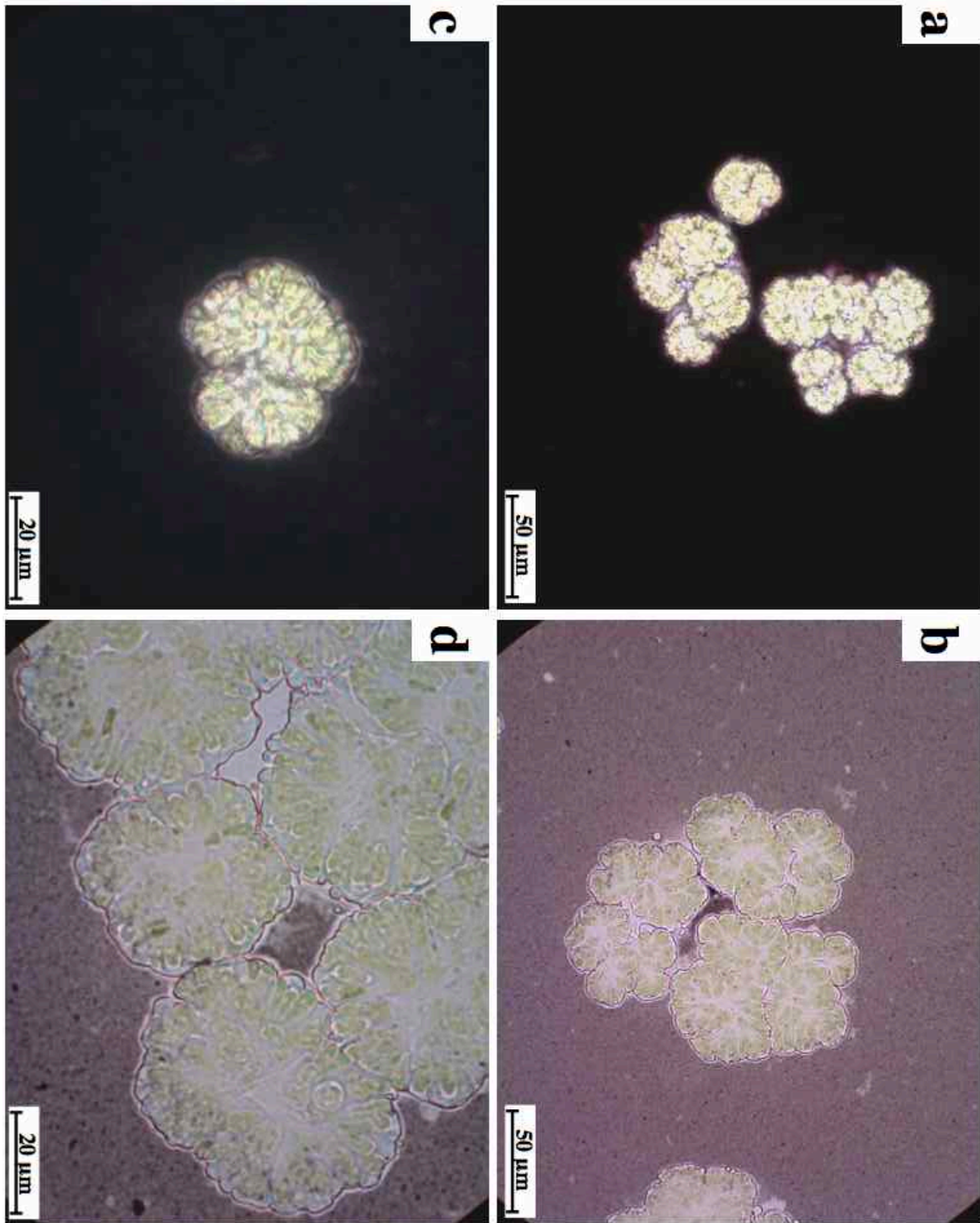


図 3.3.1.4 墨を用いた藻体コロニー表面の観察(70°C)

(a, b: x400 c, d: x1000)

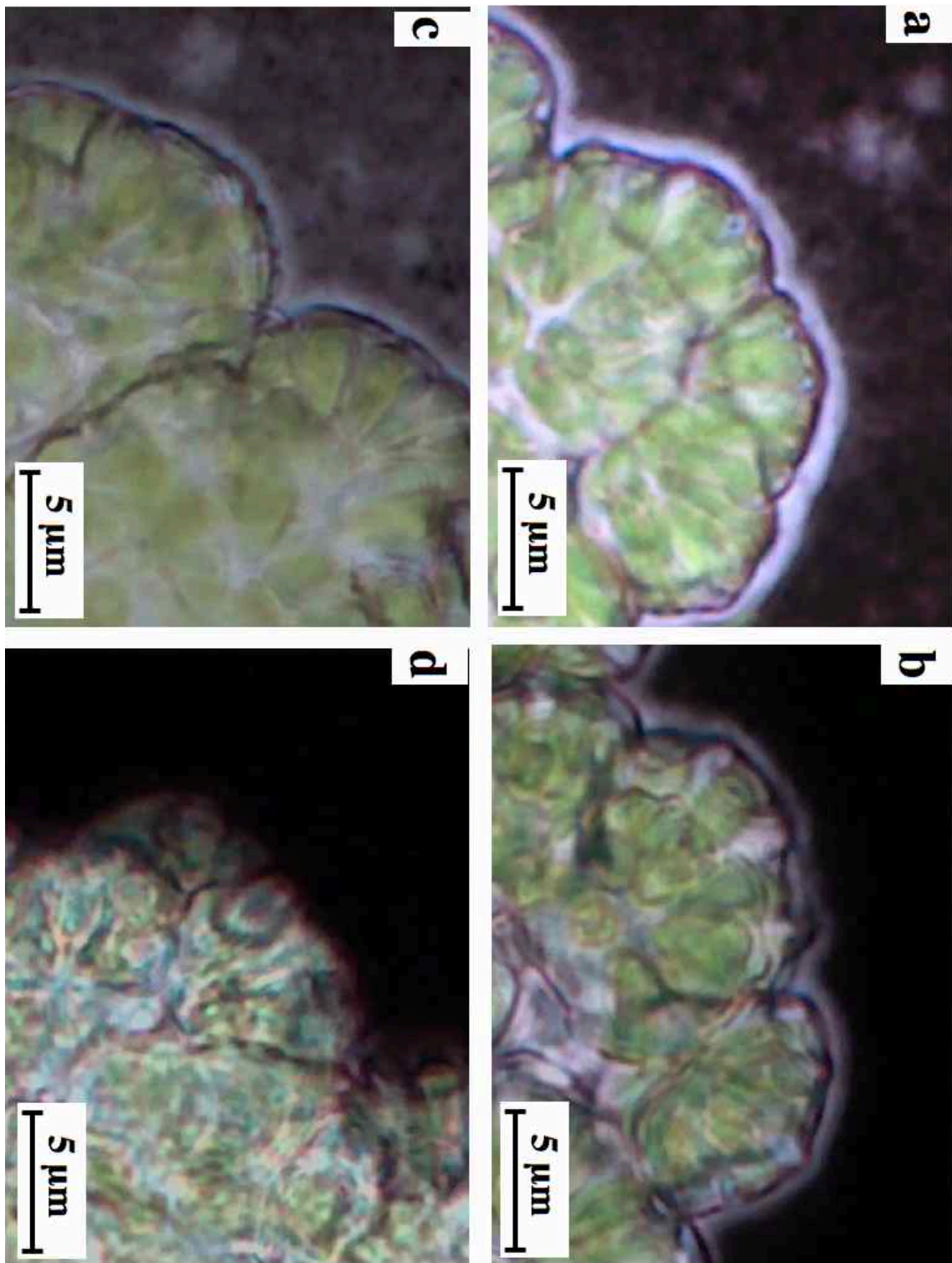


図 3.3.1.5 墨を用いた藻体コロニー表面の観察(a: 無処理 b: 60°C c: 80°C d: 85°C)

これらの観察から分かるように、処理温度 60°Cおよび 70°Cで加熱前処理を行っても藻体コロニー表面の高分子物質は水相中には分散しておらず、60°Cで加熱したものでは無処理

とほぼ同程度の、厚みのある層が観察された。これらのことから 60℃以上において定量された物質は藻体コロニー表面に観察されるの高分子物質そのものではない可能性がある。

3.3.2 追加実験 1: 粗分散物の乾燥重量測定

フェノール・硫酸法および BCA 法の吸光光度法による定量では 60℃以上の温度では、加熱温度が高ければ高い程、水相中に分散する物質が減少するという結果を得た。この結果の妥当性を検討するため、60 から 85℃の加熱前処理を行って水中に分散する固形物の重量を測定した。各処理温度で水相中に分散した物質の乾燥重量を図 3.3.2.1 に示す。

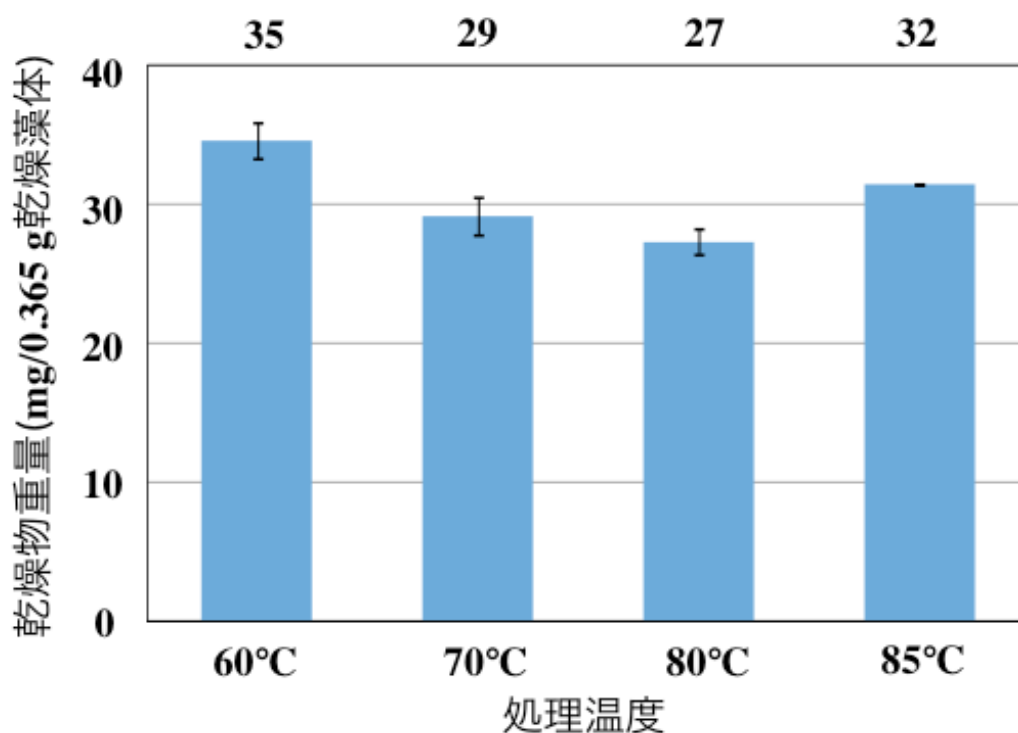


図 3.3.2.1 処理温度に対する水相中の固形物乾燥重量

図 3.3.2.1 より、水相中に分散した物質の乾燥重量は、処理温度 80℃までは先述した吸光光度法による定量法と同じように処理温度が高いほど乾燥重量は減少した。しかし、85℃においては吸光光度法とは異なり、減少傾向にあった値が、増加に転じた。この実験で回収した固形物をイオン交換水に最分散させてフェノール・硫酸法および BCA 法によって定量した結果を図 3.3.2.2 および図 3.3.2.3 に示す。

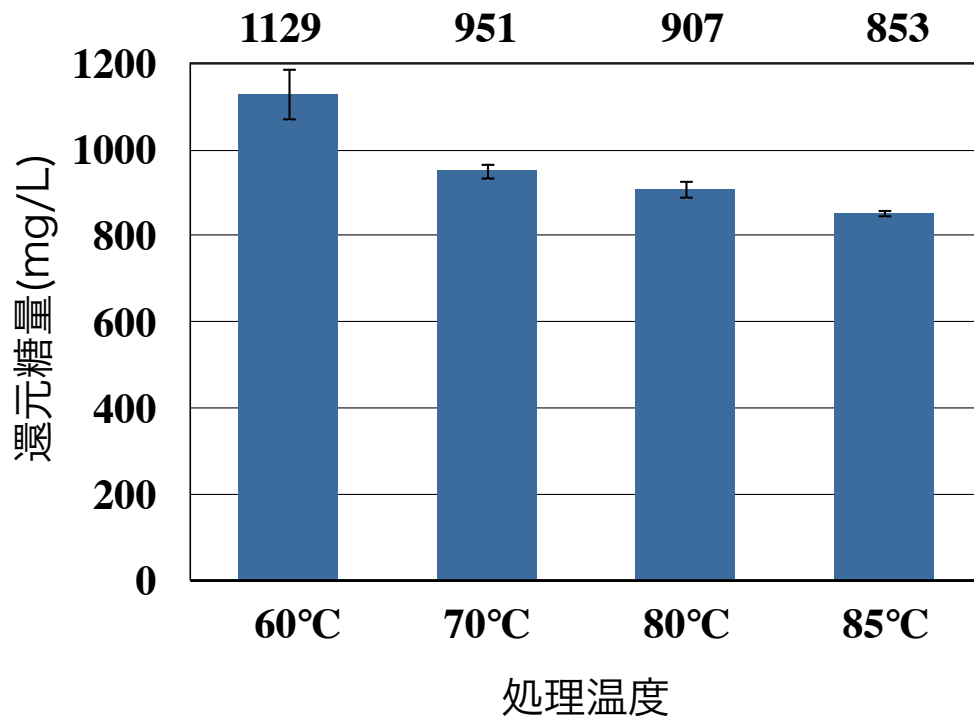


図 3.3.2.2 各処理温度において回収した乾燥物の再分散液(1.5 g/L)中に含まれる還元糖量

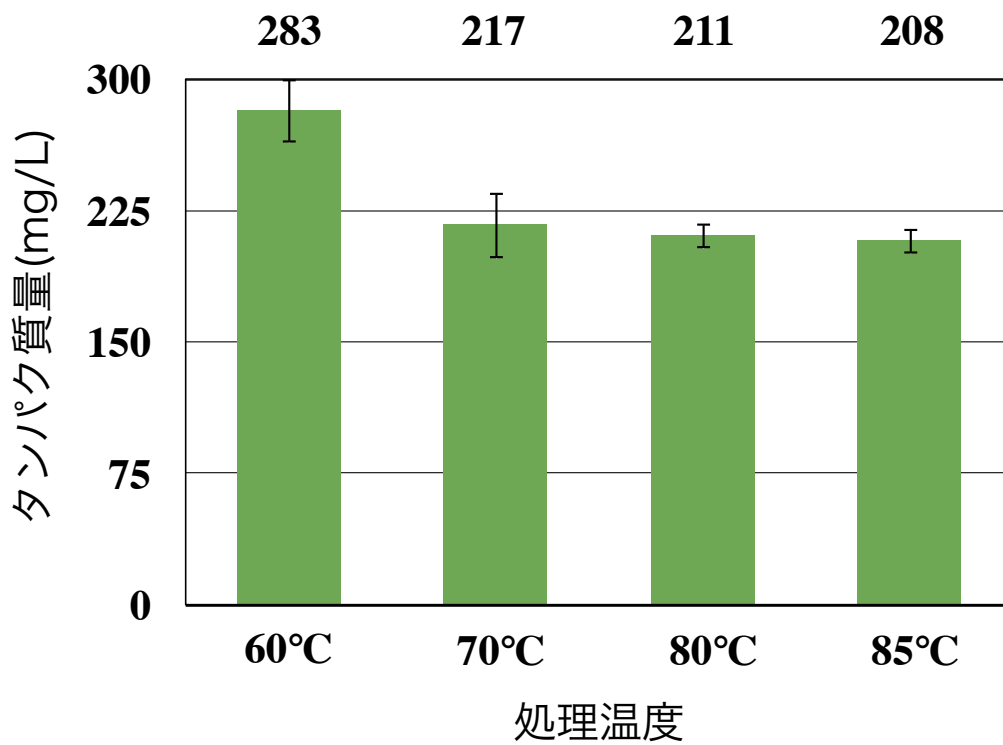


図 3.3.2.3 各処理温度において回収した乾燥物の再分散液(1.5 g/L)中に含まれるタンパク質量

両図のように乾燥固形物をイオン交換水に再分散させてフェノール・硫酸法、BCA 法によって定量した結果、図 3.3.1.1 および図 3.3.1.2 とほぼ同じ結果を示し、処理温度が高ければ高いほど定量される値は減少した。これらのことから

1. 処理温度 80℃までは加熱前処理によって藻体から水相中へ分散する固形物およびそれに含まれる還元糖とタンパク質は処理温度が高い程減少する。
2. 処理温度 85℃では、加熱前処理によって水相中に分散する固形物重量は処理温度 60℃よりは少ないが、処理温度 70℃および 80℃よりも増加する。しかし、この固形物中に含まれる還元糖量およびタンパク質量の割合が少ないため、処理温度 85℃における吸光光度法による定量では、処理温度 60、70、80℃における値よりも低い値となる。

ことが分かった。

加熱前処理においては藻体スラリーの温度は連続的に上昇しているため、追加実験 1 の結果から考察すると、60℃から 80℃の間では加熱温度の上昇に伴い、分散していた物質が再び藻体コロニーの方へ戻るといった現象が起きていることとなる。この考察の妥当性を検討するべく、追加実験 2 を行った。

3.3.3 追加実験 2: 加熱ステージによる藻体コロニー表面の光学顕微鏡観察

加熱ステージを用いて藻体サンプルを加熱しながらリアルタイムに藻体コロニーを連続観察した。観察を行った藻体サンプルは以下の通りである。

試料 1: 無処理藻体試料

試料 2: 処理温度 80℃において加熱前処理を行い、固液分離を行い、イオン交換水で洗浄した藻体試料。

試料 3: 処理温度 85℃において加熱前処理を行い、固液分離を行い、イオン交換水で洗浄した藻体試料。

各藻体試料の 30、50、55、60、65、70、75℃における観察像を図 3.3.3.1~図 3.3.3.3 に示し、特に試料 1 と試料 2 における 55、60、65、70℃の比較を図 3.3.3.4 に示す。

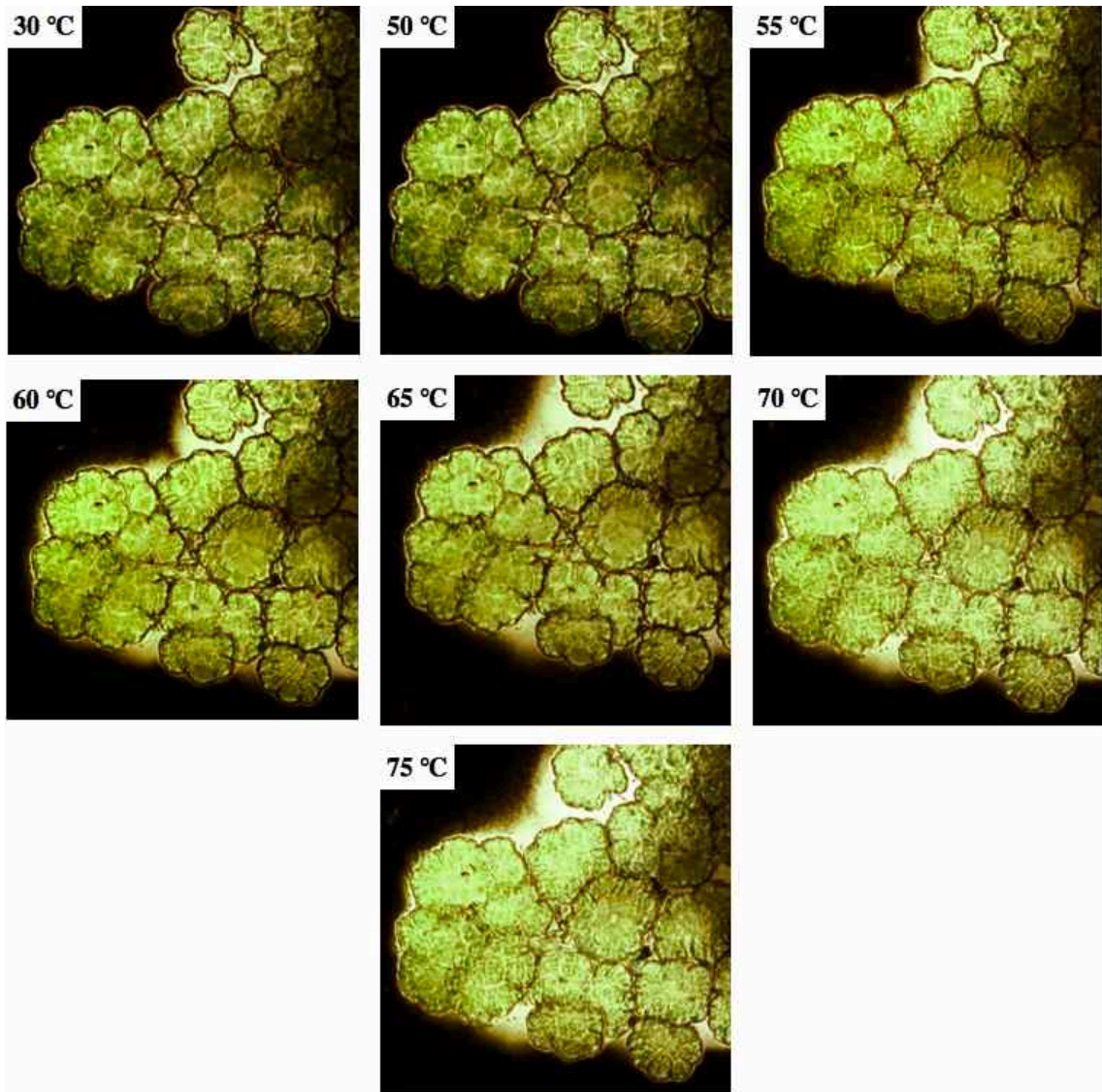


図 3.3.3.1 加熱ステージによる藻体コロニーの連続観察(無処理)

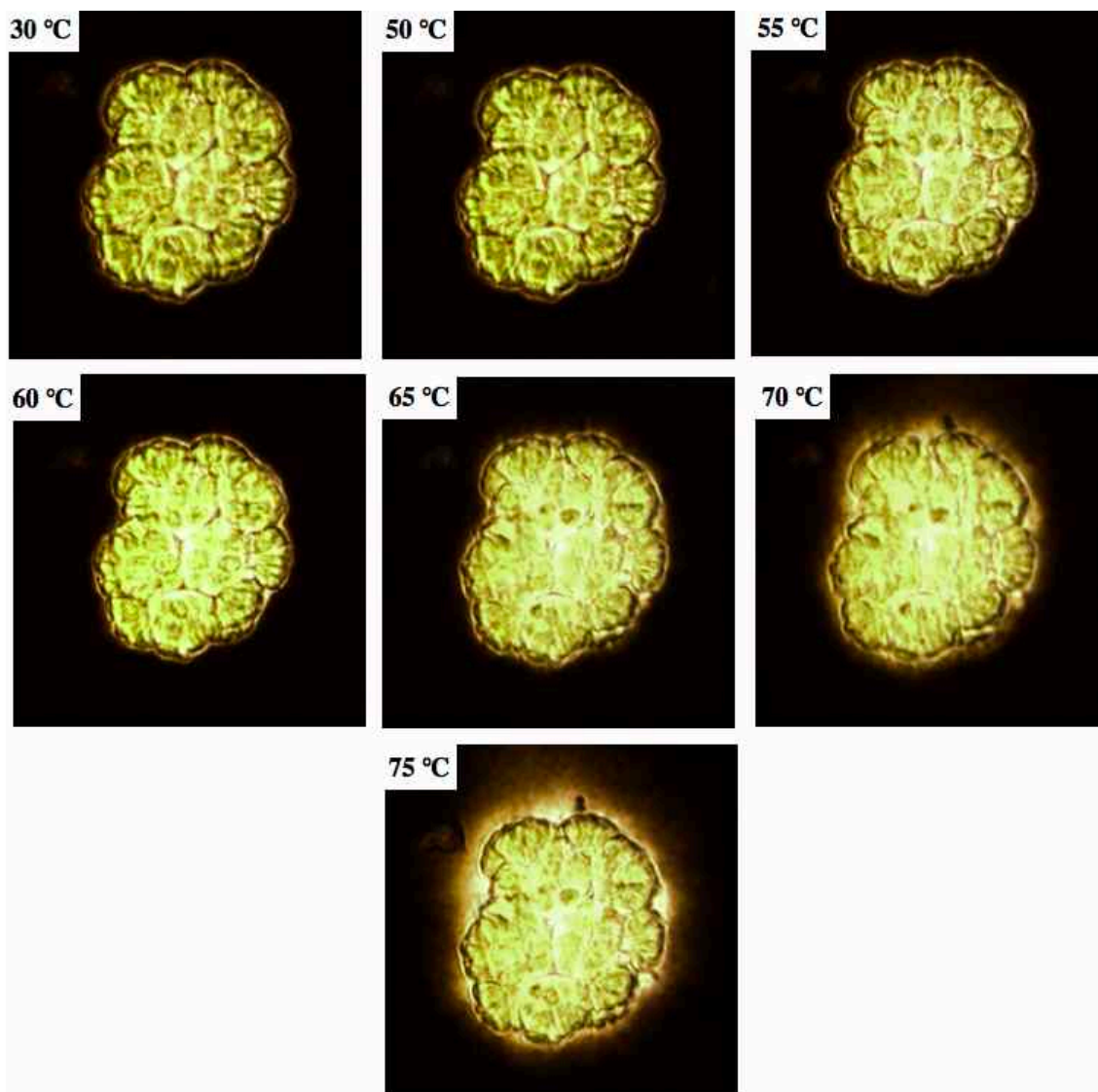


図 3.3.3.2 加熱ステージによる藻体コロニーの連続観察(80°Cで加熱前処理後、洗浄)

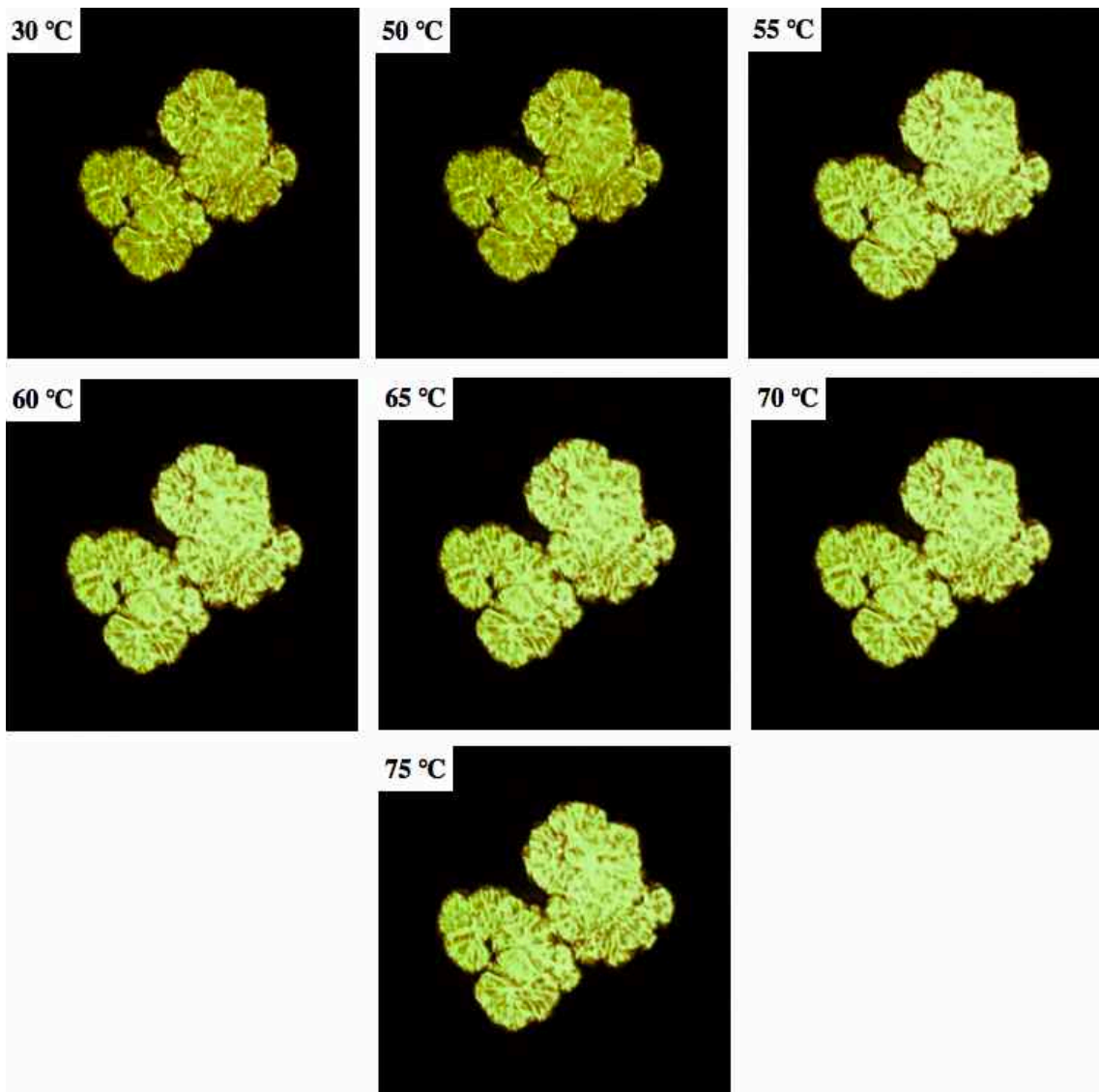


図 3.3.3.3 加熱ステージによる藻体コロニーの連続観察(85°Cで加熱前処理後、洗浄)

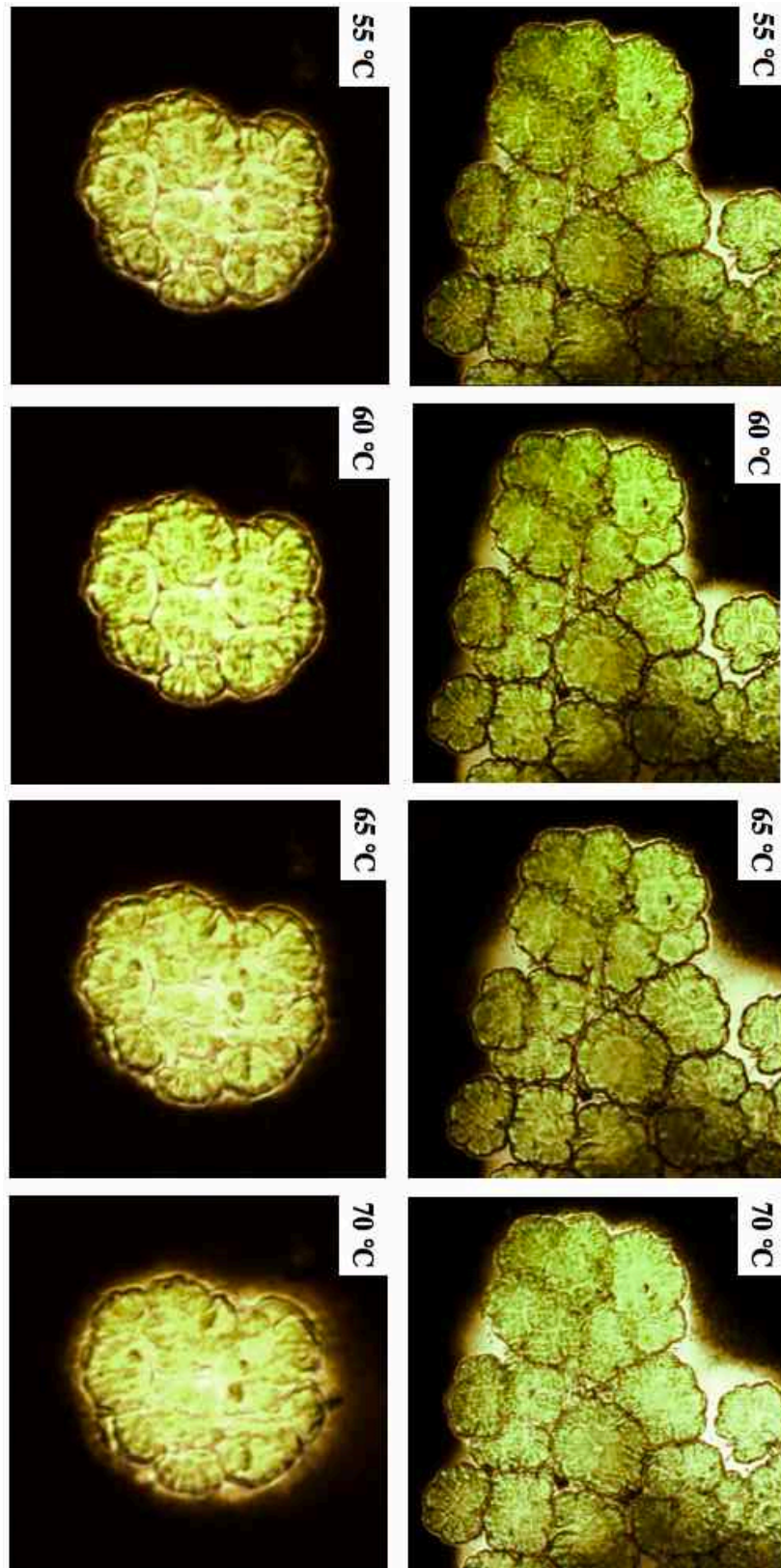


図 3.3.3.4 加熱ステージによる藻体コロニーの連続観察

無処理の藻体コロニーを加熱しながら観察すると、50~55 °Cにおいて藻体コロニーに変化が見られ始め、徐々に藻体コロニーから水相へ物質が分散し始めている(墨汁中の墨の粒子が藻体から分散する物質によって押しのけられ、コロニーの周りが顕微鏡のライトによって明るく映る)様子が観察された。また、70°Cおよび80°Cにおいて藻体コロニーへこれらの物質が戻るような様子は観察されなかったため、70°Cおよび80°Cにおいて定量された還元糖量、タンパク質量、さらに固形物重量が減少することを説明出来る現象は観察されなかった。

処理温度 80°Cで加熱前処理を行い固液分離した藻体試料を加熱しながら観察すると、無処理の藻体試料において観察された50~55°Cにおける物質の分散は見られなかった。しかし、温度が上昇し、65~70 °Cになると、藻体コロニーの周りが明るくなり始め、藻体コロニー表面の物質が分散している様子が観察された。80°Cで一度加熱前処理を行っているため、高分子物質は完全に分散していると考えていたが、再び藻体から物質が分散していることが観察された。これは、1. 一度分散した物質が藻体表面に再吸着している、あるいは、2. 藻体コロニー中にまだ分散する物質が残っているからであると考察される。

処理温度 85 °Cにおいて加熱前処理を行い、固液分離した藻体試料を加熱しながら観察すると、図 3.4.2.3 から分かるように、他の試料で観察された藻体コロニーからの物質の分散は観察されなかった。このことから上記の考察 2. 藻体コロニー中にまだ分散する物質が残っている、という予想は否定された。加熱ステージによる連続観察から、無処理の藻体からは 50~55°C前後においてコロニーを構成する物質の水相への分散が始まることが明らかになった。定量実験において60°Cで急激に増加したフェノール・硫酸法およびBCA法の定量値はこれらの物質に起因すると考えられる。また、80°Cで加熱前処理を行った藻体と85°Cで加熱前処理を行った藻体の観察から、80°Cまでの処理温度では加熱前処理を行い、冷却を行うと分散していた物質が再び藻体表面に吸着することが推察される。70°Cおよび80°Cにおける還元糖およびタンパク質の定量値、乾燥物重量の低下はこのことに起因すると考えられる。さらに85°Cまで加熱を行うと、これらの還元糖やタンパク質が反応を起こしフェノール・硫酸法およびBCA法で定量される値が減少する。また、この反応によってこれらの物質はスラリーを冷却しても再び藻体コロニーへ吸着せず、水相中に分散したままであるため、高分子物質の層が観察されなくなったと考えられる。

3.4 まとめ

本章では第二章で考察された水中に分散する高分子物質の定量を行った。その結果 50°C~60°Cにおいて藻体から物質が分散し、80°C~85°Cにおいては明確な違いは観察されなかった。しかし、水中に分散した物質の乾燥物重量の測定では、80°Cから85°Cにかけて重量が

増加した。墨汁を用いた光学顕微鏡による観察と照らし合わせて、この増加した重量が藻体コロニー表面の高分子物質に由来するのではないかと考える。また、加熱ステージを用いた連続観察から、藻体コロニーからは 50~55℃にかけて物質が分散し始め、これを 70℃から 80℃までに加熱し、冷却するとこれらの物質が再び藻体コロニーの表面に吸着することが分かった。さらに 85℃まで加熱するとこれらの物質は吸着する性質を失い、冷却しても藻体コロニーには吸着しないことが分かった。

さらに、加熱ステージによる観察から、65~70℃において分散し始める物質は加熱を続けている限り藻体コロニー表面から分散し続けていることから、加熱温度を維持すればこの物質を藻体コロニー表面から除去できると考えられる。そしてこの高分子物質を除去した藻体コロニーから炭化水素をヘキサンで抽出できれば、高分子物質の分散が藻体コロニーから炭化水素を回収できる条件であることを証明できる。

第四章 洗浄による細胞外高分子の除去と炭化水素回収率の関係

4.1 目的

第三章および第四章の結果から、加熱前処理によって藻体コロニー表面から高分子物質が分散することが炭化水素回収において重要であることが分かった。また、B race Berkeley 株の加熱ステージによる観察において 70°C前後で藻体コロニー表面の物質がなんらかの変化を起こし、藻体の周りに広がっていることが観察された。そこで本章では、それらの温度において表面物質の洗浄を行い、炭化水素回収を試みることにより、この藻体コロニー表面の物質の分散が炭化水素回収の条件である、とする仮説を検証した。

4.2 試料および実験方法

4.2.1 藻体試料

本章の実験ではこれまでの結果から B race Berkeley 株を用いた。培養条件や収穫・保管の条件は第二章に準ずる。藻体スラリーの単位体積当たりの乾燥藻体重量は凍結乾燥法により求めた。

4.2.2 加熱前処理および高分子物質の除去

本実験では藻体スラリーを各処理温度で加熱前処理後、同じ温度を維持して藻体スラリーを振とうし、藻体コロニー表面の高分子物質の洗浄・除去を試みた。以下に実験の手順を示す。15 g/L に調製した藻体スラリーを、ウォーターバスを用いて 60°C および 70°C において加熱前処理し、室温まで冷却した後、間隙 20 μ m のナイロンメッシュで固液分離した。ナイロンメッシュ上に残った藻体に対してこの時点から以下の洗浄操作を行った。

- ① イオン交換水に分散させ、ピペットにより回収し、全量が 25 mL となるようにイオン交換水を加えた。
- ② この藻体スラリーを一度目の処理温度と同じ温度まで加熱し、すぐにウォーターバスから取り出して 10 秒間振とうした。その後、再度同じ温度まで加熱し、振とうした。この 1 回あたり 10 秒の振とうを 3 セット行い、3 セットの振とう操作を 1 回の洗浄操作とした。
- ③ 洗浄を行った藻体スラリーを間隙が 20 μ m のナイロンメッシュで吸引ろ過し、固液分離を行い、ろ液を回収した。
- ④ ナイロンメッシュに残った藻体に①～③の操作を 9 回繰り返した。つまり、最初の加熱前処理と合わせて 10 回の加熱前処理および洗浄操作を行った。
- ⑤ 図 4.2.2 に本実験の概略を示す。

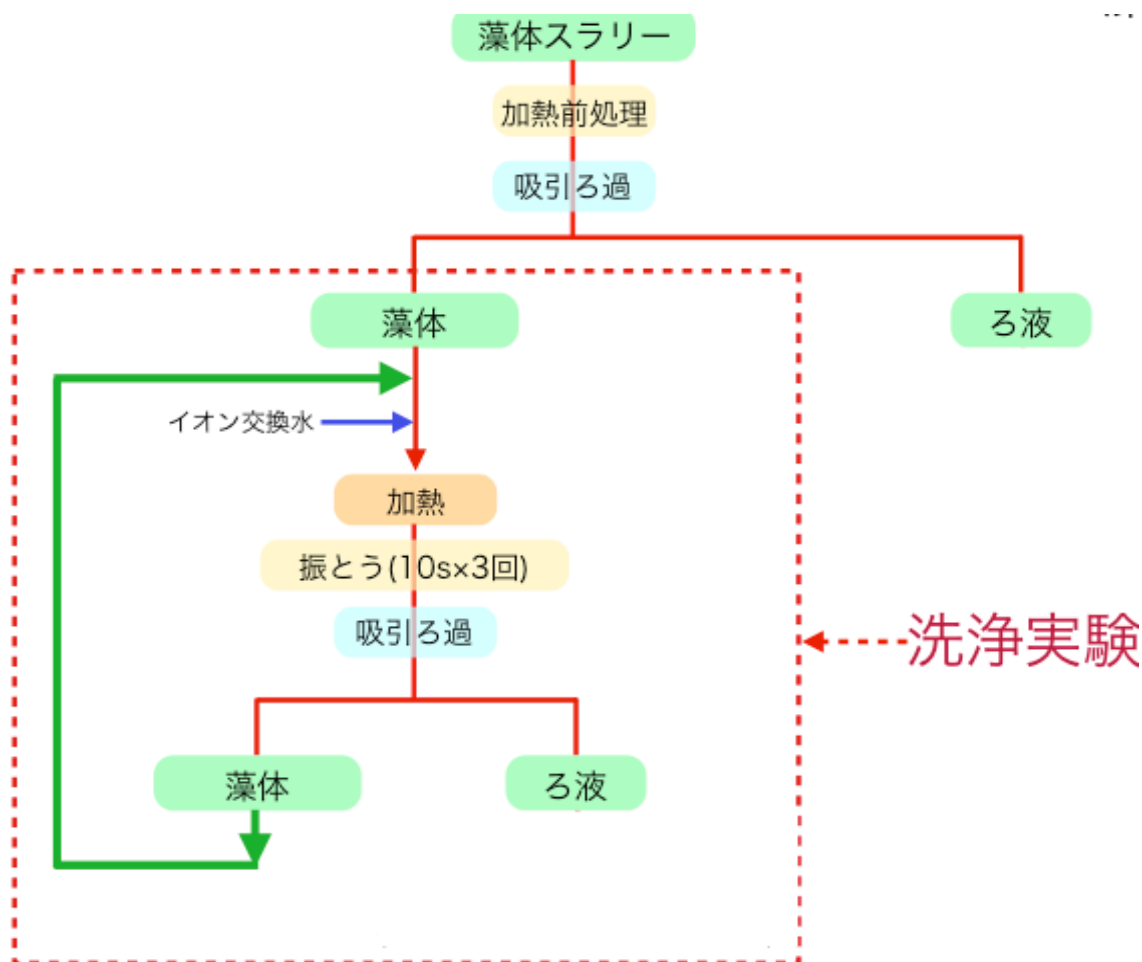


図 4.2.2 加熱前処理および前処理後の藻体スラリーの洗浄操作フロー

4.2.3 洗浄操作後の藻体スラリーからの炭化水素抽出と回収率の計算

本実験では一回目の加熱前処理、洗浄操作 1, 2, 4, 6, 8 回目の藻体スラリーを 1 mL ずつ 15 mL の遠沈管に分取し、この藻体スラリーを以下の通りヘキサンと振とうすることで藻体コロニー内の炭化水素を回収した。手順は以下の通りである。

- ① 回収した藻体スラリー 1 mL に同量のヘキサン 1 mL を加え、30 s 振とうした。
- ② 振とう後、二相分離したヘキサン相を回収した。残った水相に更に 1 mL のヘキサンを加え、30 s 振とうした。
- ③ 振とう後、二相分離したヘキサン相を回収し、一度目に回収したヘキサン相に加え、計 2 mL のヘキサン相を得た。このヘキサン相に対し、さらに適量のヘキサンを加えて薄め、メスフラスコに 5.0 mL とり、マイクロシリンジで 1 μ L を採取して、ガスクロマトグラフィーで定量した。

ガスクロマトグラフィーによる回収率の計算においては、85°C によって加熱前処理を行った藻体スラリーからヘキサンにより抽出し、ガスクロマトグラフィー(GC)によって得ら

れた保持時間 33.9 min から 35.7 min までに検出された全ピーク面積を炭化水素回収率 100 % の標準物質と定義した。ゆえに本方法にて得た炭化水素回収率は厳密な意味での回収率ではない。しかし、予備実験から炭化水素回収率が 90 % か 100 % であるかという差異よりも洗浄による効果の差異が大きいことと、ここでは厳密な回収率を求めることが目的ではないため本計算法は妥当であると考え。ガスクロマトグラフによる炭化水素の検出は以下の装置構成によって行った。

GC 装置: GC-2014(SHIMADZU)

検出装置: FID-2014(SHIMADZU)

カラム: Rtx-1(Restec) カラム長: 30 m、カラム内径: 0.53 mm、液相膜厚: 0.25 μm

オートサンプラー: AOC-20i(SHIMADZU)

キャリアーガス: ヘリウム(流量: 2.37 mL/min スプリット比: 1:39)

カラムオープンの昇温プログラムは Wolf ら[113]と Metzger ら[124]の報告から以下のように設定した。

50°C から 220°C へ 10°C/min で昇温後、3 min 保持。

220°C から 260°C へ 2°C/min で昇温後、3 min 保持。

検出器温度; 280°C

これらの条件によって得られたクロマトグラムの例を図 4.2.3 に示す。

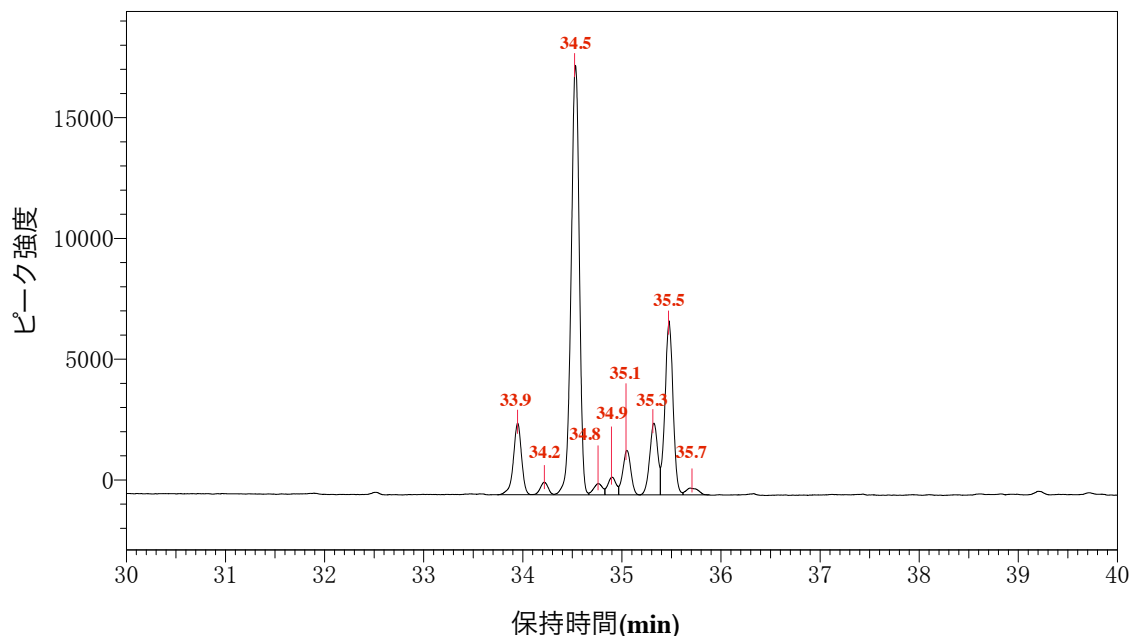


図 4.2.3 保持時間 30 min から 40 min における炭化水素のピーク

(処理温度 85°C で加熱前処理を行った藻体スラリーからヘキサンにより抽出)

本実験とほぼ同じ条件で GC による Berkeley 株の炭化水素を分析している Kanda らの結

果とほぼ同じ波形が得られた[125]。このことから、保持時間 34.2 min および 35.5 min のピークは C₃₂H₅₄ で示される botryococcene の同族体、保持時間 35.3 min は C₃₃H₅₆ で示される botryococcene、保持時間 33.9 min、34.5 min および 35.1 min のピークは C₃₄H₅₈ で示される botryococcene の同族体であると考えられる。

4.2.4 光学顕微鏡による藻体コロニーの観察

各処理温度において加熱前処理を行った藻体を生物顕微鏡(Olympus CX-41)を用いて観察した。ここでは第二章 2.2.5.2 で述べた手法と同様に *B. braunii* の藻体コロニー表面に存在する高分子物質を光学顕微鏡で可視化する目的で墨汁(開明株式会社 開明墨汁 粒径: 50 nm~200nm)を用いて観察を行った。加熱前処理を行った、もしくは洗浄を行った藻体スラリーを 50 μL とり、同量の墨汁とともにマイクロチューブに入れよく混ぜた。この混合液をそのままスライドガラスに垂らし、カバーガラスを被せ、速やかに観察した。観察像の撮影は C マウントアダプタから一眼レフアダプタを介して一眼レフデジタルカメラ(Nikon Corporation, D7100 DSLR)にて撮影した(撮影条件: 露光時間: オート、絞り: 開放、WB: 蛍光灯、EV: +0.3)。

4.3 結果および考察

4.3.1 洗浄操作による藻体コロニー表面の変化

各処理温度において洗浄操作を行った藻体スラリーから一部をサンプリングし、墨汁を加えて観察した結果を以下に示す。サンプルは

60°C洗浄: 加熱前処理+洗浄操作 9 回目

70°C洗浄: 加熱前処理後、加熱前処理+洗浄操作 5 回目、加熱前処理+洗浄操作 7 回目、
加熱前処理+洗浄操作 9 回目

である。

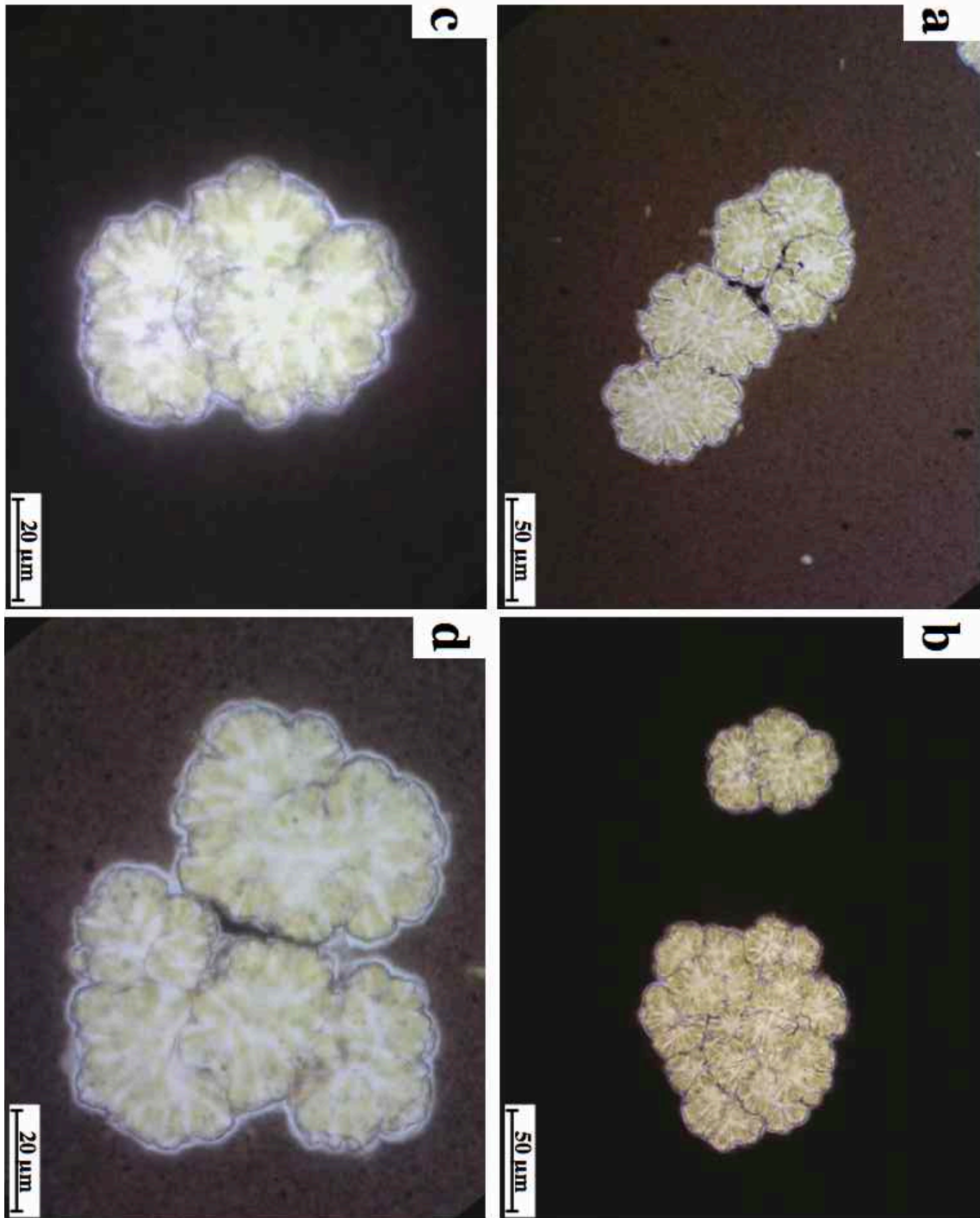


図 4.3.1.1 墨を用いた藻体コロニー表面の光学顕微鏡観察(60°C洗浄 9 回目)

(a, b: x400 c, d: x1000)

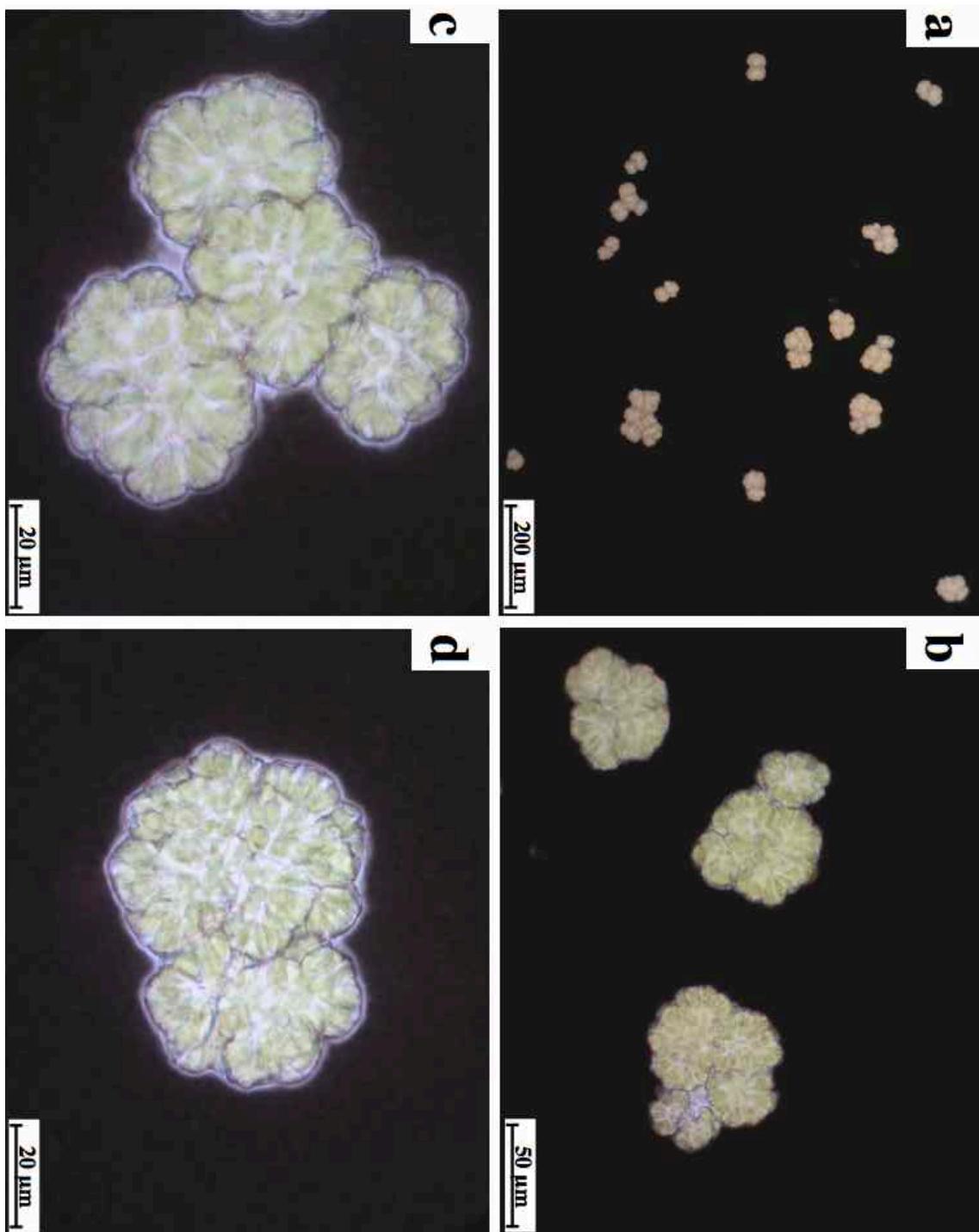


図 4.3.1.2 墨を用いた藻体コロニー表面の光学顕微鏡観察(70℃加熱前処理直後)

(a: 100 b: x400 c, d: x1000)

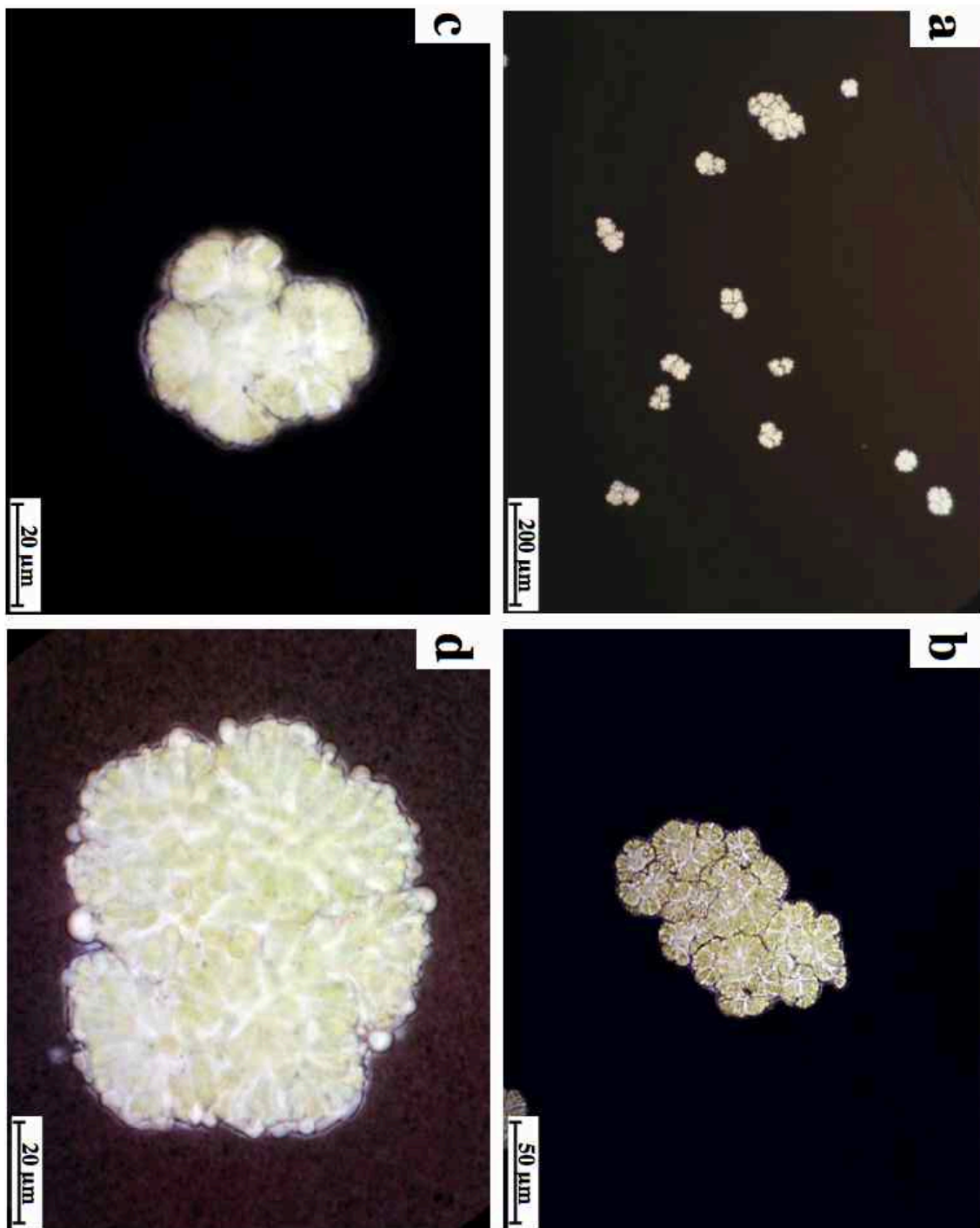


図 4.3.1.3 墨を用いた藻体コロニー表面の光学顕微鏡観察(70℃洗浄 5 回目直後)

(a: 100 b: x400 c, d: x1000)

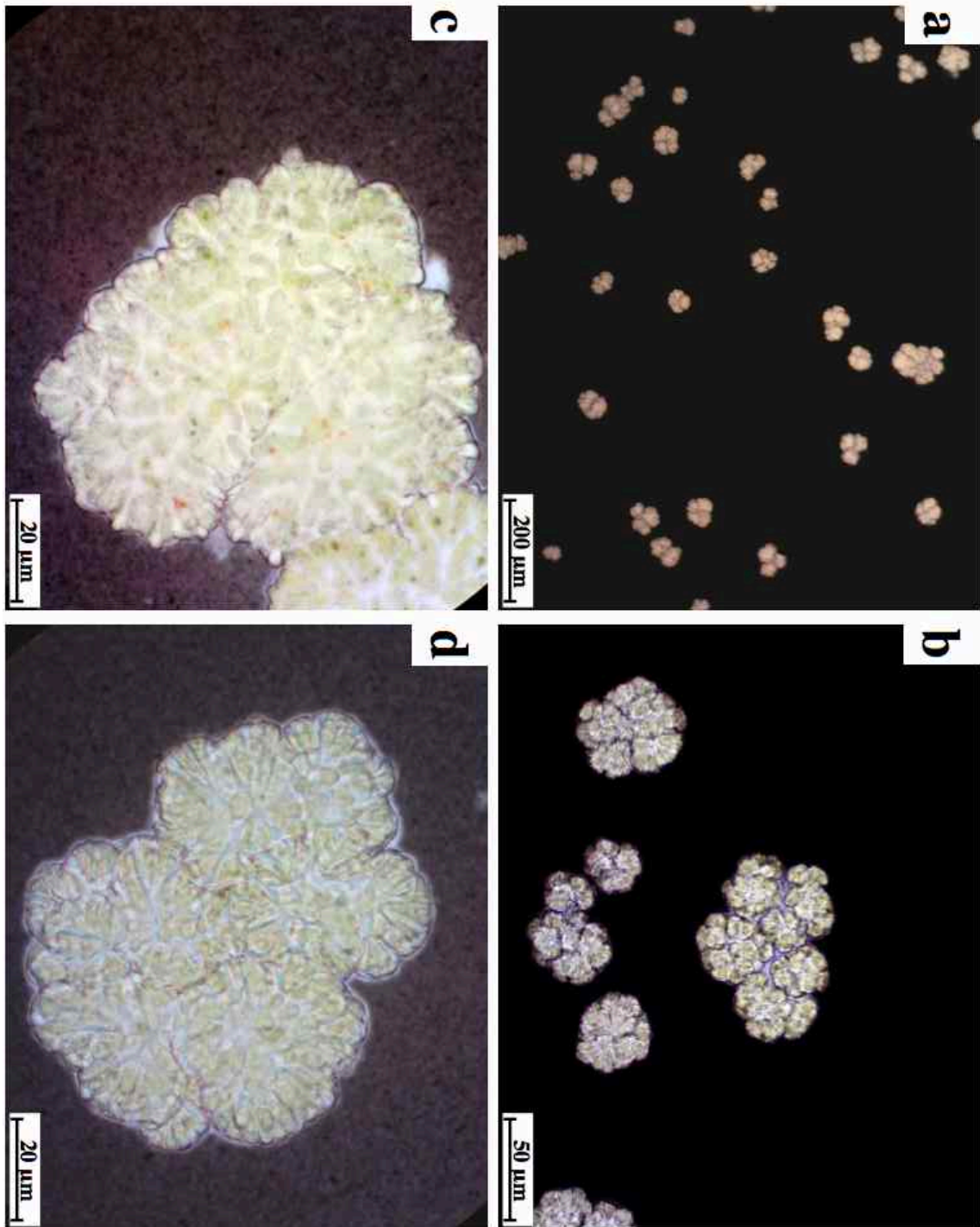


図 4.3.1.4 墨を用いた藻体コロニー表面の光学顕微鏡観察(70℃洗浄7回目直後)

(a: 100 b: x400 c, d: x1000)

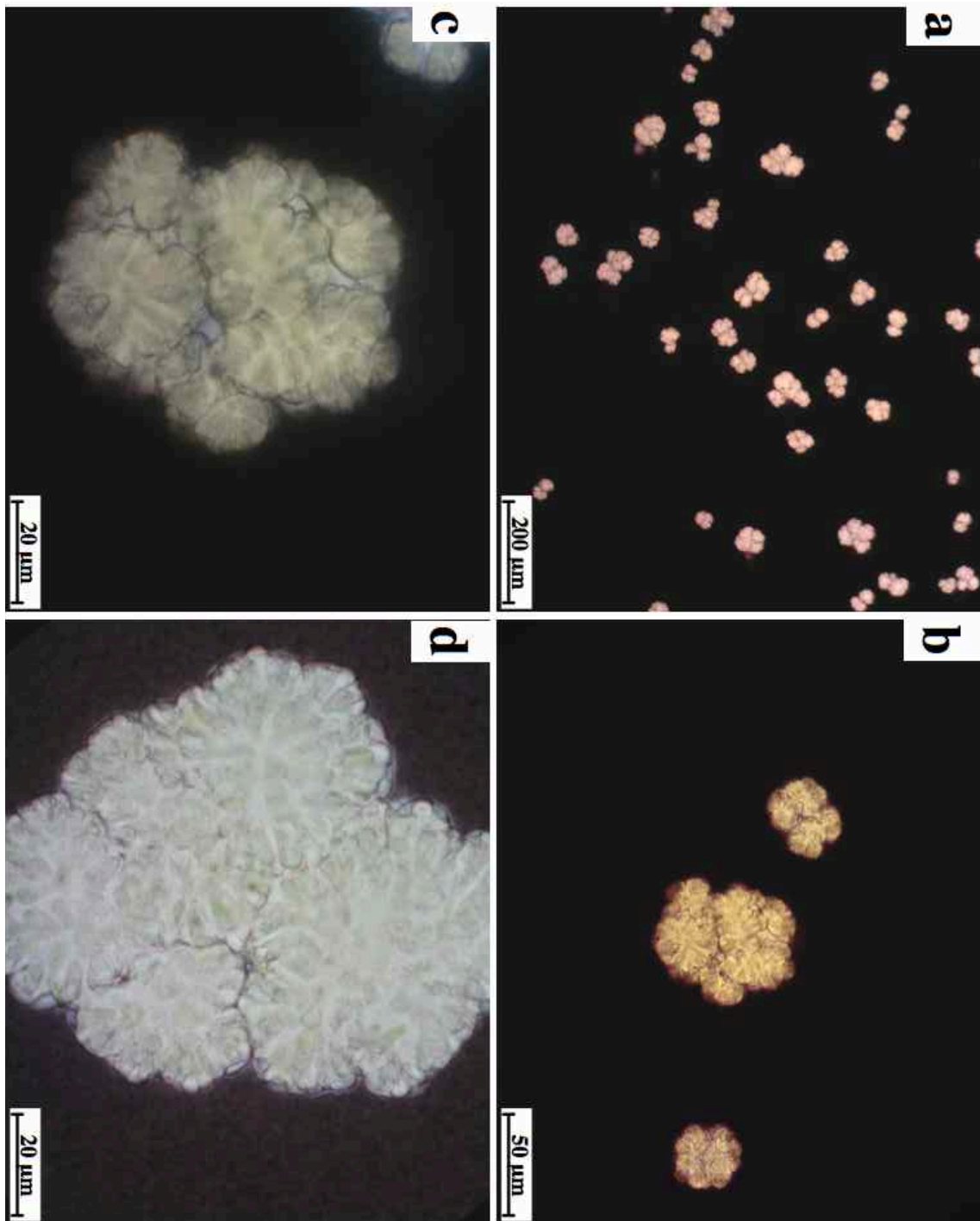


図 4.3.1.5 墨を用いた藻体コロニー表面の光学顕微鏡観察(70℃洗浄 9 回目直後)

(a: 100 b: x400 c, d: x1000)

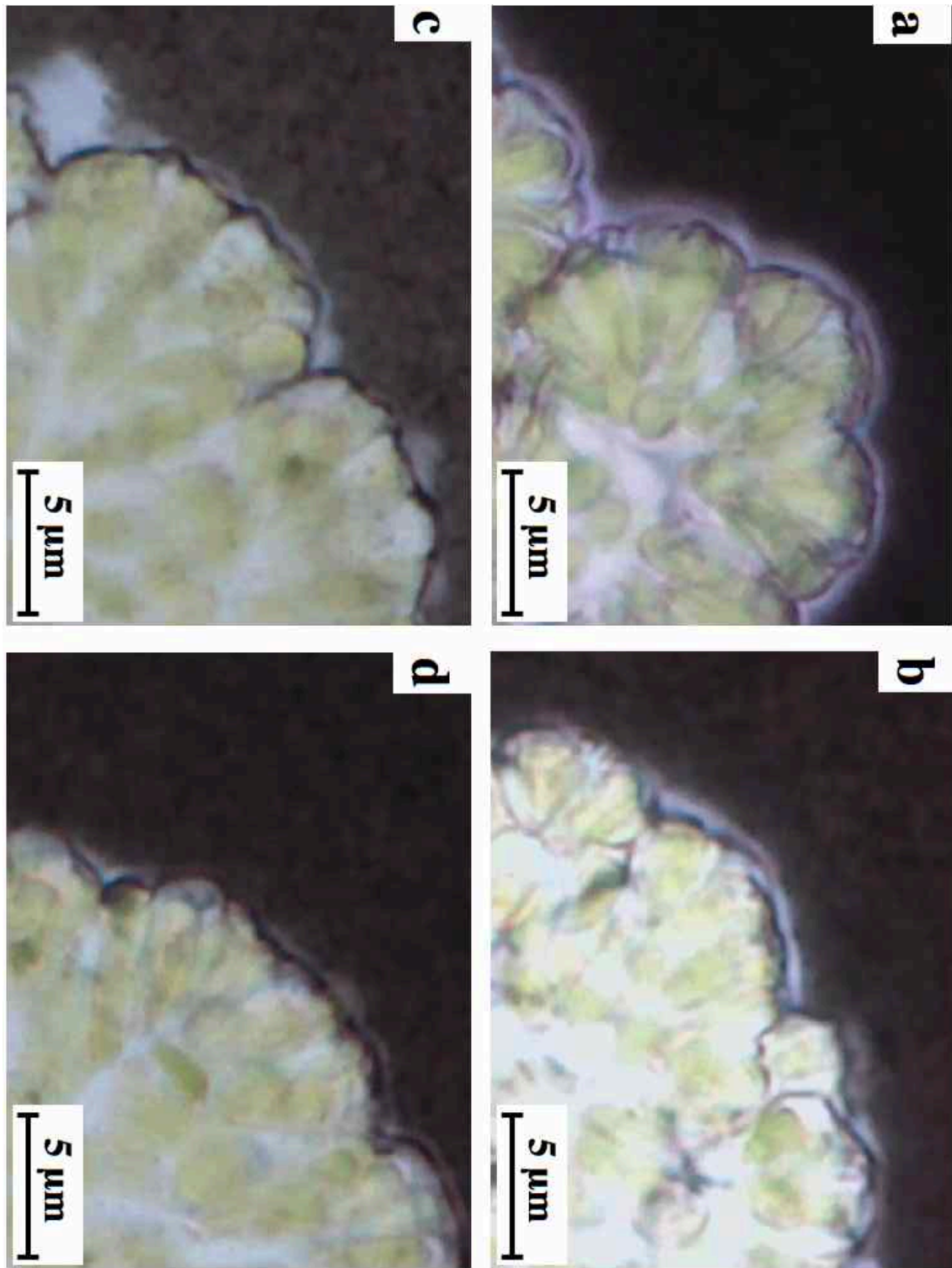


図 4.3.1.6 墨を用いた藻体コロニー表面の光学顕微鏡観察

(a: 60°C洗淨 9 回目 b: 70°C洗淨 5 回目 c: 70°C洗淨 7 回目 c: 70°C洗淨 9 回目)

写真から分かるように 60℃においては洗浄 9 回目を行った後でも、はっきりと藻体コロニー表面に高分子物質の層が確認された。処理温度 70℃で加熱前処理を行った直後の藻体コロニーでも同様にこの層が確認された。しかし、70℃で洗浄操作を 5 回以上行った場合には表面に高分子物質の層が確認される部分や確認されない部分を持つ藻体コロニーや、全体的に高分子物質の層が見られない藻体コロニーが観察された。7 回および 9 回の洗浄操作を行った場合はこの傾向がより強く現れ、高分子物質の層が殆ど観察されない藻体コロニーも確認された。洗浄 5 回目、洗浄 7 回目、洗浄 9 回目においては、全ての藻体コロニーで高分子物質が観察されなかったのではなく、コロニーの周りに高分子物質の層が確認されるものも多くあった。ただし、これらの層は 60℃洗浄の洗浄操作 9 回目のサンプルで観察される層と比べて非常に薄かった。これらの観察から、第四章で述べた“藻体コロニー表面の高分子物質は 70℃において変化を起こし、冷却せずに温度を 70℃で維持したままであれば除去できる”とする仮説は正しいと考えられる。

4.3.2 洗浄回数と炭化水素回収率の関係

60℃および 70℃において洗浄操作をおこなった藻体スラリーをヘキサンと振とうした時の洗浄回数と炭化水素回収率の関係を図 5.3.2 に示す。

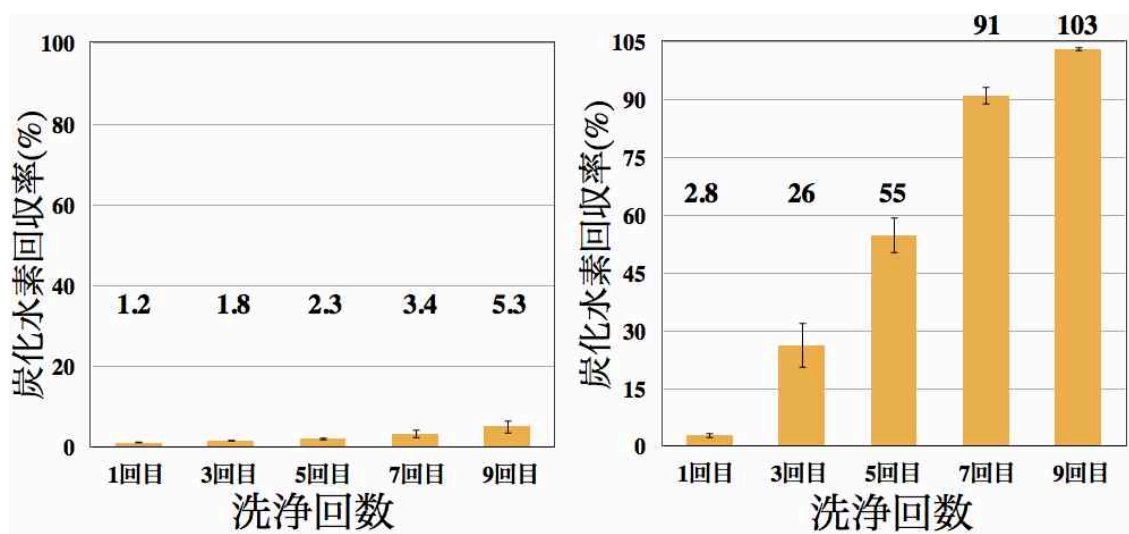


図 4.3.2 洗浄回数と炭化水素回収率の関係(左: 60℃, 右: 70℃)

60℃においては洗浄操作を 9 回行った後でも藻体スラリーからの炭化水素回収率は 10 % 未満であった。一方で 70℃においては洗浄操作が多いほど藻体スラリーからの炭化水素回収率が徐々に上昇し、洗浄操作 5 回目から 50 % を超え、9 回目において 85℃で加熱前処理を行った藻体スラリーとほぼ同じ結果となった。4.3.1 における光学顕微鏡による観察と照らし合わせて、藻体コロニー表面の高分子物質が減少するに従って炭化水素回収率が徐々

に上昇していくことが分かった。このことから藻体表面の高分子物質の分散と炭化水素回収率の間には強い相関関係があると考えられる。

4.4 まとめ

本実験により、前章で得られた“70℃に処理温度を維持した状態であれば藻体コロニー表面の高分子物質を除去できる”とする仮説は光学顕微鏡による観察から正しいことが分かった。また、60℃で9回洗浄した高分子物質が藻体コロニーに存在する試料からは炭化水素が回収されず、70℃で徐々に高分子物質を分散させ、除去した試料からは洗浄回数に伴って炭化水素の回収率が向上したことから、高分子物質の分散と炭化水素回収率には強い相関があることが分かった。

第五章 結論

5.1 まとめ

本研究により、以下のことが明らかとなった。

- ① B race Berkeley 株に加えて B race Kawaguchi-1 株および A race Yamanaka 株の藻体スラリーに対して、炭化水素を溶媒抽出するのに加熱前処理が有効であるかを検証した。加熱前処理は B race Kawaguchi-1 株および A race Yamanaka 株から炭化水素を回収するのに有効であることが分かった。また、これら三株において、加熱前処理の効果が処理温度に強く影響されるのか、それとも保持時間の影響が強いのかを検証した結果、全ての株において処理温度の影響が強いことが分かった。
- ② このことから炭化水素の回収率を向上させる加熱前処理の効果は、*B. braunii* が共通して有し、藻体コロニーの周りを取り囲む多糖類等からなる高分子物質であると推測した。そこで墨汁を用いて加熱前処理前後における藻体コロニー表面の様子を B race Berkeley 株を用いて、A race Yamanaka 株を用いて観察した。B race Berkeley 株では処理温度 80°Cまでは藻体コロニー表面に高分子物質と思われる層が観察されたが、処理温度 85°Cになると観察されなくなった。A race Yamanaka 株では 55°Cまでは藻体コロニー表面の高分子物質は観察されたが、60°Cでは観察されなくなった。双方の株で藻体コロニー表面の高分子物質が観察されなくなる処理温度が、炭化水素回収率の向上する処理温度に一致することから、加熱前処理によって、ヘキサンへの浸入を妨害するこれら高分子物質が藻体コロニーから水相に分散するために、コロニー内の炭化水素が回収されると推察した。
- ③ 分散したと思われる高分子物質の定量を、多糖についてはフェノール・硫酸法を、タンパク質については BCA 法によって行った。その結果、これらの物質は 60°Cから分散し始め、処理温度が高いほど値が減少することが分かった。
- ④ 60°Cおよび 70°Cにおける墨汁を用いた藻体コロニー表面の観察と、各処理温度における分散した物質の乾燥物重量から、1. 60°Cから 80°Cにかけては処理温度が高いほど分散する物質は減少する。2. 85°Cにおいては乾燥物重量は 70°Cおよび 80°Cよりも増加するが、構成する物質が 60°Cから 80°Cとは異なり還元糖量およびタンパク質の割合が減少するために定量結果としては 70°Cと 80°Cより低くなる。ことが分かった。
- ⑤ 加熱ステージによる観察より、50°C~55°Cにかけて藻体コロニーから物質が分散することが分かった。80°Cおよび 85°Cで加熱前処理を行い、固液分離をして藻体を洗浄したサンプルを再度加熱ステージで観察したところ、80°Cでは 65°C~70°Cにかけて物質が分散している様子が観察され、85°Cにおいては物質の分散は観察されなかった。これらのことか

ら、70℃および 80℃において観察された定量値の減少は分散した物質の再吸着に起因することが分かった。

- ⑥ 藻体スラリーの温度を 70℃に維持して洗浄操作を繰り返し、高分子物質の層を除去した。洗浄回数が増加するほど、高分子物質の層が減少することが分かった。さらに、それらの藻体スラリーをヘキサンと振とうして炭化水素の抽出操作を行うと、洗浄回収に伴って炭化水素の回収率が上昇した。一方で 60℃に維持して洗浄操作をくり返しても、藻体コロニー表面で観察された高分子物質の層が除去される様子は観察されず、ヘキサンと振とうしても炭化水素は殆ど回収されなかった。このことから、加熱前処理によって *B. braunii* から炭化水素を抽出する条件は藻体コロニー表面から高分子物質が分散することである事が分かった。

以上の結果から加熱前処理による *B. braunii* 湿藻体スラリーからの炭化水素抽出に関してそのメカニズムを以下のようにまとめた。

1. 50℃から 55℃にかけて藻体から物質が分散し始めるが、この温度帯で分散する物質は炭化水素の回収率を向上させない。
2. 65℃から 70℃にかけて藻体から高分子物質が分散する。これらの物質を藻体コロニーから取り除くことで炭化水素を回収出来るようになる。しかし、これらの物質は 80℃までは加熱、冷却を行うと可逆的に藻体コロニーに再吸着し、ヘキサンの藻体コロニーへの浸入を妨害する。
3. 85℃以上の処理温度では藻体コロニー表面の高分子物質が藻体へ再吸着できない物質となって完全に水中へ分散し、ヘキサンによる炭化水素抽出が可能となる。

5.2 展望

本研究によって *B. braunii* B race Berkeley 株および A race Yamanaka 株の加熱に対する挙動の一部が明らかになった。B race Berkeley 株では 80℃までは加熱と冷却により藻体表面に分散した物質が再吸着するが、85℃まで加熱すると再吸着しない物質になる。A race Yamanaka 株はこのような性質を有しておらず、一度 60℃で加熱すると分散した物質は最吸着しない。今後これらの物質の同定が必要である。その上で Berkeley 株では 85℃でどのような反応が起きて再吸着しなくなったのかを考察することが可能となる。それにより将来的には、高分子物質の構成と構造を元に炭化水素の抽出を目的とした前処理の手法を見いだせる可能性がある。また、炭化水素の抽出に必要な理論的化学エネルギーを計算することが出来る [126]。これによって前処理で消費するエネルギーを、理論的な最小エネルギーを基準にして評価することが可能となる。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、多くの方々に御指導、御教示を賜りました。

まず、本論文を取りまとめるに際しての御指導,並びに学位審査の際の主査として多大なるご苦勞を頂いた芋生憲司教授に感謝の意を表します。芋生憲司教授には修士からの五年間研究のみならず多くの場面でご助力頂き、また時にはご苦勞をおかけしました。私も教授の様に人を助けることが出来る懐の広い人間になれるように努力したいと思っております。佐賀清崇助教には、本論文をとりまとめる際に、多くの時間を割いて頂き、また多くの御助言をいただき、大変感謝しております。さらに、審査いただいた大下誠一教授、岡田茂准教授、海津裕准教授、牧野義雄准教授、に厚く御礼申し上げます。特に、岡田茂准教授には、修士課程から博士課程の5年間にわたり、研究に関して多くの御指導や御助言をいただき、大変感謝しております。

東京大学大学院農学生命科学研究科、生物材料科学専攻の木村聡助教、東京大学大学院農学生命科学研究科附属技術基盤センター、マイクロ観察系技術室、技術専門職員の石綱史子様、富田憲司様には電子顕微鏡による観察にあたって数多くの御指導・御支援頂きました。大変ありがとうございました。さらに奈良女子大学、理学部、生物科学科の野口哲子教授にはサンディエゴでの国際学会から懇意にして頂き、電子および光学顕微鏡による観察に関してのご助言や、*B. braunii*の不思議な生態に関する興味深いお話をして頂き研究を遂行する上でのモチベーションになりました。とても感謝しております。ありがとうございました。

生物機械工学研究室の先輩であり研究員である長谷川文生先輩には本研究室に入って以来、厳しくも的を射た多くのご助言を頂き、同じく研究員の跡部季子様と宮城尚子様には様々な場面で迷惑をかけたにも関わらず暖かく見守って頂き、感謝とともに今後社会人となる自分自身を顧みなければならないと思っております。生物機械工学研究室の研究員である昔農英夫様には研究を遂行する上でのご助言のみならず、共通の話題であるシンフォニーの話をする事によって日々のモチベーションを上げることが出来ました。誠にありがとうございました。生物機械工学研究室の院生・学生諸氏には修士・博士の五年間を通して研究においては多くの議論を交わし、また学生生活の多くの場面でアドバイスや一人暮らしをする上でのコツやティップスを教えて頂きました。ここに私が大学院で研究していた五年間の間に関わりのあった博士・修士および学部4年生の学生諸氏に感謝申し上げます。

本研究室の秘書である滝口聡子様には研究活動に必要な様々な手続きを行って頂き研究に専念することが出来ました。また共通の趣味であるミリタリーの話、特に航空母艦の赤

城がお好きだということで盛り上がったこと、忘れません。五年間を通して誠にありがとうございました。

生物機械工学研究室の博士後期課程の同期であり、東京瓦斯株式会社の大坂典子様、一般財団法人エネルギー総合工学研究所、プロジェクト試験研究部の松井徹様には研究のみならず人生の先輩としての夢実現のお話や、就職活動時のご助言を頂きました。皆様と過ごした日々は忘れません。誠にありがとうございました。

本研究はNEDO(新エネルギー・産業技術総合開発機構)の「戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業」およびJSPS(日本学術振興会)科研費00257433の助成により遂行されたものです。この場を持ちまして御礼申し上げます。

末筆となりましたが、以上に挙げた方々および両親を始めとして、研究を遂行するにあたり私の心の支えとなった数え切れないほどの方々のご協力、ご助言を得て、本論文を完成させることが出来ました。各位に心からの感謝の意を表します。

参考文献

- [1] BP. BP Statistical Review of the World Energy.2009.
- [2] 経済産業省, エネルギーに関する年次報告(平成 22 年度エネルギー白書) 平成 24 年 6 月
- [3] IEA(2012). World Energy Outlook 2012.
<http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/Japanese.pdf>
最終アクセス日: 2013/10/12
- [4] IEA(2012). Energy Technology Perspective 2012-how to secure a clean energy future.
<http://www.iea.org/Textbase/npsum/ETP2012SUM.pdf> 最終アクセス日: 2013/10/12
- [5] 井熊均, 「図解入門よくわかる最新バイオ燃料の基本と仕組み」, 株式会社秀和システム (2008)
- [6] 横山伸也, 「バイオマスエネルギー最前線」, 森北出版株式会社 (2001)
- [7] 井上勲, 「藻類 30 億年の自然史 藻類から見る生物進化・地球・環境 第 2 版」, 東海大学出版会(2007)
- [8] J. Ferrell et al., “National Algal Biofuels Technology Roadmap”, U. S. Department of Energy. (2010)
- [9] 鈴木真二ら, 「現代航空論 技術から産業・政策まで」, 東京大学出版会 (2012)
- [10] ATAG(2009). “Beginner’s Guide to Aviation Biofuels”
http://www.enviro.aero/content/upload/file/beginnersguide_biofuels_webres.pdf
最終アクセス日: 2013/9/21
- [11] IATA(2009). “Carbon-Neutral Growth by 2020” Press Release dated 8 June 2009.
- [12] ASRM HP <http://www.astm.org/Standards/D7566.html> 最終アクセス日: 2013/10/122013/9/21
- [13] ユナイテッド航空 HP
http://www.united.com/web/format/pdf/globalcitizenship/23413_Flyer_Environmental_Sustainability_Web_FINAL.PDF 最終アクセス日: 2013/9/21
- [14] ルフトハンザ航空 HP <http://www.lufthansagroup.com/en/themen/biofuel.html> 2013/9/21
- [15] EADS HP
<http://www.eads.com/eads/int/en/our-innovation/our-technologies/Eco-efficiency/Sustainable-biofuels.html> 最終アクセス日: 2013/10/12
- [16] EADA プレスリリース
http://www.diamondaircraft.com/media/uploads/files/IW_ILA_Biofuel_eng.pdf 最終アクセス日: 2013/10/122013/9/22

- [17] NEDO(新エネルギー・産業技術総合開発機構) HP
http://www.nedo.go.jp/koubo/h22_list_01_03.html 最終アクセス日: 2013/10/12
- [18] NEDO(新エネルギー・産業技術総合開発機構), 「NEDO 再生可能エネルギー技術白書」
平成 25 年 12 月 <http://www.nedo.go.jp/content/100544819.pdf> 最終アクセス日: 2013/12/20
- [19] 日本航空 HP <http://press.jal.co.jp/en/release/200812/001076> 最終アクセス日: 2013/10/12
- [20] JX 日鉱日石エネルギー HP
http://www.noe.jx-group.co.jp/newsrelease/2012/20120627_01_0960575.html 最終アクセス日: 2013/10/12
- [21] 竹山春子ら, 「微細藻類によるエネルギー生産と事業展望」, 株式会社シーエムシー出版 (2012)
- [22] 山口勝己, 「微細藻類の利用」, 恒星社厚生閣 (1992).
- [23] 倉橋みどりら, 「応用微細藻類学食料からエネルギーまで」, 成山堂 (2013)
- [24] 電力中央研究所, 「藻類からのバイオ燃料生産に関する調査報告」, V09025 平成 22 年 5 月
- [25] K. L. Kelly et al., “System design for the autotrophic production of microalgae”, *Enzyme and Microbial Technology*. **7**(1985) 474-487
- [26] T. Tsukihara et al., “Structure of the [2Fe-2S]ferredoxin I from the blue-green Alga *Aphanotheca sacrum* at 2.2 Å resolution”, *Journal of Molecular Biology*. **216**(1990) 399-410
- [27] F. Gummert et al., “Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant”, *Carnegie Institution of Washington*. **600**(1953) 166-176
- [28] C.U. Ugwu et al., “Photobioreactor for mass cultivation of algae”, *Bioresource Technology*. **99**(2008) 4021-4028
- [29] O. Tsukada et al., “Mass Culture of Chlorella in Asian Countries”, *Academic Press*. (1977)363-365.
- [30] K. Kawaguchi, “Microalgal production systems in Japan”, *Elsevier North Holland*. (1980) 25-34.
- [31] DIC ライフテック HP http://www.dic-global.com/ja/whats_dic/scene/spirulina/ 最終アクセス日: 2013/12/15
- [32] クロレラ工業株式会社 HP <http://www.chlorella.co.jp/research/knowledge/post/19/sort/1> 最終アクセス日: 2013/12/14
- [33] 株式会社日建総本社 HP http://www.chlostanin.co.jp/05kaisya/kaisya01_index.html 最終アクセス日: 2013/12/15
- [34] J. K. Volkman et al., “Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in

- mariculture”, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **128**(1989) 219-240
- [35] M. Olaizola, “Comercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace”, *Biomolecular Engineering*. **20**(2003) 459-466
- [36] Life’s DHA HP <http://www.lifesdha.com/clinical-research/maternal-health.aspx> 最終アクセス日: 2013/12/10
- [37] J. A. Gerde et al., “Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass”, *Algal Research*. **2**(2013) 145-153
- [38] スメーブジャパン HP <http://www.smabe.co.jp/food.html> 最終アクセス日: 2013/12/21
- [39] R. T. Lorenz, G. R. Cysewski. “Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin”, *Trends Biotechnology*. **18**(2000) 160-167
- [40] M. Olaizola. “Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors”, *Journal Applied Phycology*. **12**(2000) 499-506.
- [41] 山内一郎, 「水産用希少飼料キートセラス・カルシトランスの高濃度大培養」, *YAMAHA MOTOR TECHNICAL REVIEW* (2003)
- [42] 渡邊信, 「藻類バイオマス」, みみずく舎 (2010)
- [43] P. Spolaore et al., “Commercial applications of microalgae”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **101**(2006) 87–96.
- [44] Y. Chisti, “Biodiesel from microalgae”, *Biotechnology Advances*. **25**(2007) 294-306
- [45] J. Sheehan et al., “A look back at the U.S. Department of Energy’s aquatic species program: biodiesel from algae”, NREL: National Renewable Energy Laboratory(1998), TP-580-24190
- [46] E. E. Jarvis, “Aquatic Species Program(ASP) Lessons Learned”, National Renewable Energy Laboratory. (2008) <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/jarvis.pdf> 最終アクセス日: 2013/12/21
- [47] W, Barclay et al., “Microalgae Culture Collection”, U. S. Department of Energy. (1986)
- [48] Nature Publishing Group. “Algae bloom again”, *Nature*. **447**(2007) 520-521
- [49] [49]M. Torrey, “Algae in the tank.” *International News on Fats Oils and Related Materials*. **19**(2008) 432–437.
- [50] Algenol Biofuel HP
http://www.algenolbiofuels.com/sites/default/files/press_releases/AlgDOEgrantdec42009.pdf
最終アクセス日:2013/12/10
- [51] Cellana HP
<http://cellana.com/press-releases/cellana-leads-9-million-doe-funded-consortium-for-algae-based-fuels-and-feeds/> 最終アクセス日:2013/12/10
- [52] Chevron HP <http://www.chevron.com/deliveringenergy/biofuels/> 最終アクセス日:2013/12/10

- [53] Synthetic Genomics HP <http://www.syntheticgenomics.com/media/press/070910.html> 最終アクセス日:2013/12/21
- [54] Sapphire Energy HP
<http://www.sapphireenergy.com/news-article/62539-algae-to-fuel-venture-announces-funding>
最終アクセス日:2013/12/10
- [55] Solazyme HP <http://solazyme.com/media/2009-12-07> 最終アクセス日:2013/12/21
- [56] SOLIX HP
<http://solixbiofuels.nvi.co/solix-biofuels-completes-16-8-million-in-series-a-funding/> 最終アクセス日:2013/12/22
- [57] NEDO(新エネルギー・産業技術総合開発機構), NEDO 海外レポート, **1070**(2011)
- [58] NEDO(新エネルギー・産業技術総合開発機構), NEDO 海外レポート, **1066**(2010)
- [59] SARDI(South Australian Research and Development Institute) HP
http://www.sardi.sa.gov.au/aquaculture/aquaculture/algae_production_group 最終アクセス日:2013/10/9
- [60] ワーヘニンゲン大学 HP
<http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Facilities/AlgaePARC.html> 最終アクセス日:2013/10/9
- [61] 華東理工大学 HP http://news.ecust.edu.cn/index_news_view.php?id=19272 最終アクセス日:2013/10/11
- [62] 中国科学院 HP http://english.cas.cn/Ne/ICN/201005/t20100526_54579.shtml 最終アクセス日:2013/10/9
- [63] 中国石化 HP <http://www.sinopecgroup.com/english/Sinopecnews/Pages/201304251318.aspx>
最終アクセス日:2013/10/11
- [64] R, Leising et al., “Microalgal lipid production by microalgae *Chlorella* sp. KKKU-S2”, *World Academy of Science. Engineering Technology.* **76**(2011) 499–502
- [65] 産業技術審議会評価部会・二酸化炭素固定化等技術評価委員会, 「細菌・藻類等利用二酸化炭素固定化・有効 利用技術開発」, 最終評価報告書 (2000)
- [66] 工業開発研究所, 「石油植物による燃料油生産に関する調査(石油植物による燃料油大量生産システムの調査研究)」, (1983)
- [67] チャレンジ 25 HP <http://www.challenge25.go.jp/knowledge/future/index.html> 最終アクセス日:2013/12/22
- [68] 農林水産省 HP 第四次環境基本計画
http://www.env.go.jp/policy/kihon_keikaku/plan/plan_4/attach/pamph_ja-2.pdf 最終アクセス

日:2013/12/21

- [69] 経済産業省 資源エネルギー庁 HP <http://www.enecho.meti.go.jp/policy/fuel/080404/> 最終アクセス日:2013/12/21
- [70] 国土交通省 航空輸送統計年報 <http://www.mlit.go.jp/common/001005182.pdf> 最終アクセス日:2013/12/10
- [71] COCN(産業競争力会), 「微細藻類を利用した燃料の開発」, 産業競争力懇談会 2011年度最終報告 (2011)
- [72] D. G. Ugarte et al., “The economic impacts of bioenergy crop production in US agriculture”, *USDA Agricultural Economic Report*. **816**(2003) 41
- [73] 山口勝己, 水産生物化学, 東京大学出版会 (1995)
- [74] R. F. Cane, “Coorongite, balkashite and related substances—an annotated bibliography”, *Transactions of the Royal Society of South Australia*. **101**(1977) 153-154
- [75] J. K. Volkman et al., “C₂₅ and C₃₀ highly branched isoprenoid alkenes in laboratory cultures of two marine diatoms”, *Organic Geochemistry*. **21**(1994) 407-414
- [76] S. T. Belt et al., “Structural characterisation of C₃₀ highly branched isoprenoid alkenes (rhizenes) in the marine diatom *Rhizosolenia setigera*”, *Tetrahedron Letters*. **42**(2001) 5583-5585
- [77] W. Held et al., “Production of hydrocarbon from biomass”, *Energy Biomass*. (1985) 744-748
- [78] H. Kitazato et al., “Catalytic cracking of hydrocarbons from microalgae”, *Sekiyu Gakkaishi*. **32**(1989) 28-34.
- [79] P. Metzger et al., “Structure and chemistry of a new chemical race of *Botryococcus braunii* (chlorophyceae) that produces lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon”, *Journal of Phycology*. **26**(1990) 258-266
- [80] Y. Sato et al., “Boisynthesis of the triterpenoids, botryococcens and tetramethylsqualene in the B race of *Botryococcus braunii* via the non mevalonate pathway”, *Tetrahedron Letter*. **44**(2003) 7035-7037
- [81] S. Okada et al., “Molecular characterization of squalene synthase from the green microalga *Botryococcus braunii*, race B”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **373**(2000):307-317
- [82] T. D. Niehaus et al., “Identification of unique mechanisms for triterpene biosynthesis in *Botryococcus braunii*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**(2011) 12260-12265
- [83] C. Berkaloﬀ et al., “Variability of cell wall structure and hydrocarbon type in different strains of *Botryococcus braunii*”, *Journal of Phycology*. **20**(1984) 377-389

- [84] J. Frenz et al., “Hydrocarbon recovery by extraction with a biocompatible solvent from free and immobilized cultures of *Botryococcus braunii*”, *Enzyme and Microbial Technology*, **11**(1989) 717–724
- [85] F. Zhang et al., “Application of memberane dispersion for enhanced lipid milking from *Botryococcus braunii* FACHB 357”, *Journal of Biotechnology*. **165**(2013) 22-29
- [86] Y. Ge et al., “Growth characteristic of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration I photobioreactor”, *Bioresource Technology*. **102**(2010) 130-134
- [87] R. Orpez et al., “Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treate sewage”, *Desalination*. **246**(2009) 625-630
- [88] J. Y. An et al., “Hydrocarbon production from treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*”, *Journal of Applied Phycology*. **15**(2003) 185-191
- [89] R. Vazque-Duhalt., B. O. Arredondo-Vega, “Haloadaptation of the green alga *Botryococcus braunii* (race a)”, *Phytochemistry*, **30**(1991) 2919-2925
- [90] K. Furuhashi et al., “Seawater-Cultured *Botryococcus braunii* for Efficient Hydrocarbon Extraction”, *PLoS ONE*. **8**(2013) e66483
- [91] T. M. Mata et al., “Microalgae for biodiesel production and other application: A review”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.**14**(2010) 217-232
- [92] J. Prakash et al., “Microalgae drying by a simple solar device”, *International Journal of Solar Energy*.**18**(1997) 303–311
- [93] H. Desmorieux et al., “Convective drying of *spirulina* in thin layer”, *Journal of Food Engineering*. **66**(2006) 497–503
- [94] G. E. Molina et al., “Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass”, *Journal of the American Oil Chemists’ Society*. **71**(1994) 955–959
- [95] P. M. M. Mendes et al., “Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability“, *Journal of Applied Phycology*. **13**(2001) 19–24
- [96] Y. Shen et al., “Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield”, *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. **2**(2009) 51-57
- [97] P. Mercer, R. E. Armenta “Developments in oil extraction from microalgae”, *European Journal of Lipid Science and Technology*. **113**(2011) 539-547
- [98] J. Y. Lee et al., “Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae.” *Bioresource Technology*. **101**(2009) 75-77

- [99] G. Cravotto et al., “Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves”, *Ultrasonics Sonochemistry*. **15** (2008) 898–902
- [100] G. Andrich et al., “Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis* sp”, *European Journal of Lipid Science and Technology*. **107**(2005) 381–386
- [101] R. Mendes et al., “Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid (GLA) from the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina)maxima*: Experiments and modeling”, *Chemical Engineering Journal*. **105**(2005) 147– 151
- [102] M. Ota et al., “Carotenoid production from *Chlorococcum littorale* in photoautotrophic cultures with downstream supercritical fluid processing”, *Journal of Separation Science*. **32**(2009) 2327-2335
- [103] R. L. Mends et al., “Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae”, *Inorganica Chimica Acta*. **356**(2003) 328-334
- [104] A. R. Boyd et al., “Switchable hydrophilicity solvents for lipid extraction from microalgae for biofuel production”, *Bioresource Technology*. **118**(2012) 628-632
- [105] C. Samori et al., “Extraction of hydrocarbons from microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents”, *Bioresource Technology*. **101**(2010) 3274-3279
- [106] C. Z. Liu et al., “Algal oil extraction from wet biomass of *Botryococcus braunii* by 1,2-dimethoxyethane”, *Applied Energy*. **102**(2013) 971-974
- [107] Y. H. Kim et al., “Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass”, *Bioresource Technology*. **109**(2012) 312-315
- [108] K. Kita et al., “Thermal pre-treatment of wet microalgae harvest for efficient hydrocarbon recovery”, *Applied Energy*. **87**(2010) 2420-2423
- [109] Y. Dote et al., “Recovery of liquid fuel from hydrocarbon-rich microalgae by thermochemical liquefaction”, *Fuel*. **73**(1994) 1855-1857
- [110] S. Inoue et al., “Analysis of oil derived from liquefaction of *Botryococcus Braunii*”, *Biomass and Bioenergy*. **6**(1994) 269-274
- [111] T. L. Weiss et al., “Phylogenetic placement, genome size, and GC-content of the liquid hydrocarbon producing green microalga *Botryococcus braunii* var. Berkeley (Showa) (Chlorophyta)”, *Journal of Phycology*. **46**(2010) 534-540
- [112] T. L. Weiss et al., “Genome size and phylogenetic analysis of the A and L races of *Botryococcus braunii*”, *Journal of Applied Phycology*. **23**(2011) 833-839
- [113] F. R. Wolf et al., “Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii*(Chorophyta)”, *Journal of Phycology*. **21**(1985) 388-396

- [114] S. Okada et al., “Botryoxanthin B and α -botryoxanthin A from the green microalga *Botryococcus braunii* Kawaguchi-1”, *Phytochemistry*. **47**(1998) 1111-1115
- [115] S. P. Chu, “The Influence of the Mineral Composition of the Medium on the Growth of Planktonic Algae: Part I. Methods and Culture Media”, *The journal of Ecology*. **30**(1942) 284-325
- [116] A. Magota et al., Effect of thermal pretreatments on hydrocarbon recovery from “*Botryococcus braunii*”, *Bioresource Technology*. **123**(2012) 195-198
- [117] E. Eroglu, A. Melis “Extracellular terpenoid hydrocarbon extraction and quantitation from the green microalgae *Botryococcus braunii* var. Showa”, *Bioresource Technology*. **101**(2010) 2359-2366
- [118] S. Balasubramanian et al., “Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system – design, optimization, and quality characterization”, *Bioresource Technology*. **102**(2011) 3396-3403
- [119] T. L. Weiss et al., “Colony Organization in the Green Alga *Botryococcus braunii* (Race B) Is Specified by a Complex Extracellular Matrix”, *Eukaryotic Cell*. **11**(2012) 1424-1440
- [120] B. Allard, E Casadecall “Carbohydrate composition and characterization of sugars from the green microalga *Botryococcus Braunii*”, *Phytochemistry*. **29**(1990) 1875-1878
- [121] M. Dubois et al., “Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances”, *Analytical Chemistry*. **28**(1956) 350-356
- [122] V. D. Rafael, G. Hubert “Growth and production of cell constituents in batch cultures of *Botryococcus sudeticus*”, *Phytochemistry*. **26**(1987) 885-889
- [123] J. Talukdar et al., “Characterization of the biofuel potential of a newly isolated strain of the microalga *Botryococcus braunii* Kützing from Assam, India”, *Bioresource Technology*. **149**(2013) 268-275
- [124] P. Metzger et al., “Alkadiene-and botryococcene-producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*”, *Phytochemistry*. **24**(1985) 2305-2312
- [125] H. Kanda et al., “Wet extraction of hydrocarbons from *Botryococcus braunii* by dimethyl ether as compared with dry extraction by hexane”, *Fuel*. **105**(2013) 535-539
- [126] A. K. Lee et al., “Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements”, *Biomass and Bioenergy*. **46**(2012) 89-101