

東北藻類プロジェクトの現状と課題

鈴木 石根

光合成生物のバイオマスなかでも液体燃料に変換可能な油脂の生産は、その消費がカーボンニュートラルにつながることで、また工業原料としての石油消費の代替となりうることから、再生可能資源として近年大いに注目を集めている。光合成生物のうち微細藻類の多くは、窒素あるいは硫黄などの栄養塩成分の欠乏条件下で、乾燥重量の30-70%の油脂を蓄積する能力を有し、陸上植物の油脂生産性と比べてきわめて高い能力を有している。陸上植物は、油脂をシンク器官の種子にしか蓄積しないが、微細藻類は光合成を行う、いわゆるソース器官である個々の細胞に油脂を蓄積できるからである。本プロジェクトでは、2011年3月の震災により、自前のエネルギー供給源の必要性を認識した仙台市と藻類バイオマス生産のシーズ技術を持つ筑波大学、藻類の回収・抽出・バイオマスの改質技術などを研究する東北大学の3者が協力し、仙台市の約7割の下水を処理する南蒲生浄化センターをベースに、下水を利用し微細藻類の培養・オイル生産から燃料への改質までを行うプロジェクト（図1）として、2012年から5年計画でスタートした。

下水を用いる理由

微細藻類の培養には、陸上植物の生育と同様に、二酸化炭素の他に、窒素・リン・硫黄・無機金属イオン（ K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} など）の栄養分の供給が必要である。窒素はアミノ酸に含まれタンパク質合成のもっとも主要

な因子であり、その獲得はバイオマス生産を規定する主要の要因の一つである。窒素は空気中の大半を占める気体であるが、地球上のほとんどの生物は窒素ガスを直接利用できず、アンモニアや硝酸塩、アミノ酸などの有機態窒素に固定された窒素源の供給が必要である。窒素肥料は、Haber-Bosch法により、気体状の窒素と水素からアンモニアとして固定され利用されるが、これには多量のエネルギーが必要で、こうして固定されたアンモニアを微細藻類の培養に用いると、藻類が固定するエネルギーの大半がこのステップで相殺されてしまう懸念がある。また、生物が利用可能なリン源であるリン酸はリン鉱石から得られるが、日本はその全量を中国など海外からの輸入に頼っており、近い将来その採掘可能なリン鉱石資源が枯渇する可能性が指摘され、価格の上昇が避けられない状況にある。

このような状況から、安価で安定した窒素・リン酸などの無機栄養源の確保は、安定した藻類バイオマス生産に不可欠な要素であり、本プロジェクトでは、一般的な都市下水をその供給源とすることを目的とした。

本プロジェクトで対象とした藻類

本プロジェクトでは、炭化水素系のオイルを生産蓄積する微細藻類を対象とした。多くの微細藻類は、脂肪酸系のトリアシルグリセリドを蓄積する。トリアシルグリセリドは、グリセリンと脂肪酸3分子のエステルで、加水分解とメチル化により脂肪酸メチルエステルを得て、いわゆるバイオディーゼル燃料として利用が可能である。一般に光合成生物の生産するトリアシルグリセリドは、共役する二重結合を持つ多価不飽和脂肪酸を含み、それから作られるバイオディーゼル燃料は、低融点で液体燃料として利用できるが、大気中の酸素により容易に酸化され劣化するため、長期間の保存に不向きである。本プロジェクトで着目した微細藻類の炭化水素系の油脂は、現状の石油精製プラントに導入可能で、直接的に燃料や工業原料として利用価値が高い。

本プロジェクトでは、主に2種類の微細藻類に着目した。一つは光合成により炭化水素を生産する緑藻 *Botryococcus braunii* で、もう一つは従属栄養性のラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* である（図2）。

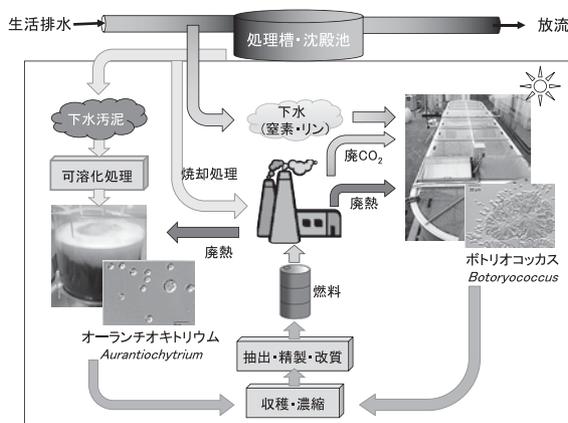
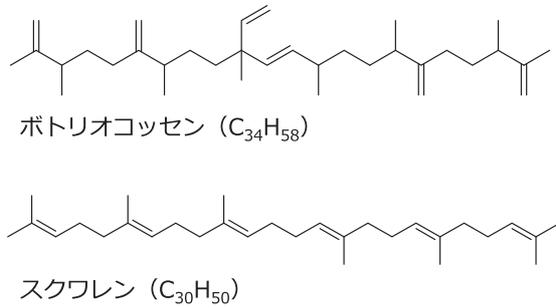
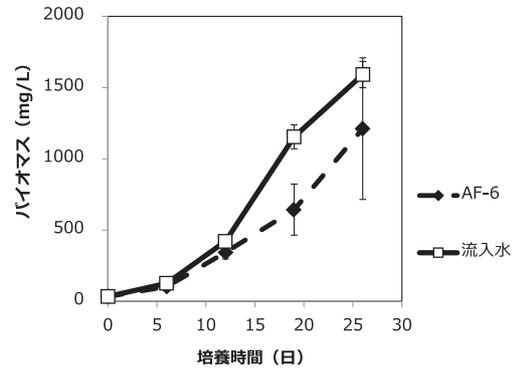


図1. プロジェクト概要図

図2. *Botryococcus* と *Aurantiochytrium* が生産する炭化水素

*B. braunii*には、4つの種類 (race A, B, L, S) があり、それぞれ異なるタイプの炭化水素を蓄積する。本プロジェクトでは、ボトリオコッセンと呼ばれるトリテルペン型の炭化水素を合成する race B に分類される株を用いた。*B. braunii* は、コロニーを形成し、炭化水素を細胞間に分泌し、一部は縮合し細胞をつなぐマトリクスとして機能する。細胞外に炭化水素が分泌されることから、理想的には細胞を破壊せず炭化水素を回収し、細胞は再度培養に戻すことができる (ミルクング)。この手法を確立することが、生育速度の遅い本藻を用いた物質生産においては大変重要な点である。

Aurantiochytrium は、ラビリンチュラ類 (Labyrinthulea) やプレツボカビ目 (Thraustochytriales) に属する生物で、海洋の沿岸域から汽水域に生育する。この仲間の生物は、海藻や海草、陸上植物などの枯死体表面で消化吸収を行い、細胞内に油滴を蓄積する性質がある。油滴は主に、トリアシルグリセリドで、ドコサヘキサエン酸やドコサペンタエン酸などの必須脂肪酸を生産することから注目を集めていたが、筑波大学の渡邊教授らのグループにより、乾燥重量の20%に相当するスクワレン (C₃₀H₅₈) を蓄積する株 (*Aurantiochytrium* sp. 18W-13a株) が見いだされたことにより、炭化水素系オイル生産のための生物種としても着目された¹⁾。スクワレンは、トリテルペンの一種でステロール合成の中間体である。保湿剤として化粧品などの製造の用いられる他、抗炎症薬・ワクチン基材などさまざまな産業的用途があるが、現在は深海ザメの肝臓から主に抽出され、深海ザメ個体数の減少により代替資源の開発が求められている。本プロジェクトでは、下水中の有機物をいかに *Aurantiochytrium* の培養に利用するか、また、下水に塩を添加することなく海洋性の本生物をどう培養するかの点が、重要なポイントであった。



培養液中の溶存有機炭素・全窒素・全リン除去率

	TOC (mg/l)	TN (mg/l)	TP (mg/l)
AF-6	↑38.2 (1.3倍増)	↓34.9 (67%減)	↓9.5 (99%減)
流入水	↑55.4 (5.8倍増)	↓13.3 (94%減)	↓0.9 (93%減)

図3. 下水による *Botryococcus* の培養と、その間の全有機気体窒素 (TOC)、全窒素 (TN)、全リン (TP) の変化

下水を用いた *Botryococcus* の培養

通常実験室内で *Botryococcus* を培養している培地は AF-6 という培地であり、主な窒素源は硝酸イオンで、アンモニウムイオンと合わせて、0.62 mM の無機窒素が含まれている。下水流入水は、硝酸・亜硝酸イオンはほとんど含まれず、アンモニアが主な窒素源であり、時期によって変動はあるが、同程度の無機窒素濃度が存在する。この下水流入水を用いて、*Botryococcus* を培養すると、通常の培地と同様に生育でき、その間、下水中の全窒素・全リンのほとんどを除去し、十分なオイルを生産できることがわかった (図3)。

さらに、定期的に培養液を回収し新たな培養液を追加することで、*Botryococcus* の連続培養系を確立し、数か月におよぶ長期間にわたって安定した培養系を維持することに成功した。この連続培養系を、2015年度に南蒲生浄化センター敷地内に設置した屋外パイロット培養施設の2.5 t レースウェイにおいて実施した。この際、下水一次流入水をセラミックフィルターでろ過するだけの簡易な除菌処理で、実験室内とほぼ同様に連続培養系を維持できた点は特筆すべきである。培養2か月目を過ぎる頃には、徐々に生育の早い他の緑藻のコンタミが増加し、*Botryococcus* による炭化水素生産量は減少した。当初は、下水に含まれる細菌やカビなどの微生物の混入を心配していたが、それらの影響はそれほど大きくはなく、むしろ光合成をする他の微細藻類のコンタミの方が影響は大きかった。

下水を用いた *Aurantiochytrium* の培養

もともと *Aurantiochytrium* は、海洋から汽水域で生育する従属栄養性生物であるため、下水由来の有機物(活性汚泥)を利用できる低分子に分解することと、培地への塩分の添加が課題であった。

下水由来の活性汚泥は、下水中の有機物とそれらを摂食分解する原生生物・細菌類・真菌類などの集合体であるが、南蒲生の活性汚泥にはセルロースが多量に含まれ、その分解により *Aurantiochytrium* が利用可能な単糖類が回収できると考えられた。当初計画では、亜臨界水処理による糖分の分解回収を試みたが、十分な量の糖を回収することは困難であった。混在するタンパク質などから生じるアミノ酸とセルロースからのグルコースによる、アミノカルボニル反応(メイラード反応)が起こるためだと考えられた。そこで、糖の回収には酸分解を用い、窒素・リン酸の回収には亜臨界水処理を用いることが検討され、実際に培養が行えることが示された。

Aurantiochytrium の生育に必要な塩分の添加は下水処理の反応に負荷を掛けるため、塩分を含まない条件で生育可能な *Aurantiochytrium* 株の取得を試みた。もともとの *Aurantiochytrium* 株は25-50%の海水濃度条件でもっとも効率よくスクワレンを生産し、海水をまったく含まない条件では生育が著しく阻害された。そこで、培地の塩濃度を段階的に低下させ、5日おきに新たな培地に植え継ぐことを13か月以上繰り返し、最終的に0.016%の海水濃度で生育可能な低塩濃度適応株(LSA-1株)を入手することに成功した(図4)。このLSA-1株の解析から、*Aurantiochytrium* は海水の主な塩分のNaClのうち、塩化物(Cl⁻)イオンの培地中への添加が必要なこと、特に低Cl⁻イオン濃度条件で、アンモニアの代謝に影響がみられることが明らかとなった²⁾。

従来、従属栄養性の *Aurantiochytrium* は、温度・通気条件を自動で制御できる完全密閉型のジャーフェメンターを用いて、大型の培養が行われていたが、それで

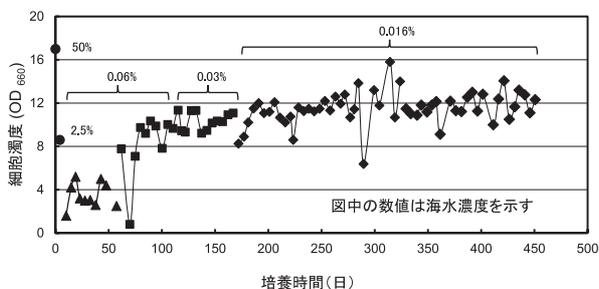


図4. *Aurantiochytrium* の低塩濃度条件への適応

は投入エネルギーが膨大であったため、培養のさらなる低コスト化を目指した研究が必要であり、現在取り組んでいる。

Botryococcus からのオイルの抽出

B. braunii はコロニーを形成し、そのコロニー内にオイルが蓄積されているため、従来その抽出には回収した藻体を乾燥し、有機溶媒で抽出する工程が必要で、この処理では細胞が死滅すること、乾燥の工程にエネルギーの投入が必要であることが問題であった。

小型のビーズミル機処理と細胞への影響の少ないヘプタンを抽出溶媒としてミルキングを行う系を確立し、1月間に7回の炭化水素抽出と培養を繰り返せることを示した。ビーズミル機ではスルーットの向上が困難なため、連続的なコロニーの解砕処理条件を検討し、キャピラリーを高圧で通して常圧条件に戻すことでコロニーの解砕が連続的にできることを見いだした。今後はこのハイスルーットな手法をミルキングへ応用したい。

また、湿潤状態の藻体からの炭化水素抽出を制限しているものが、コロニー表面を覆う多糖層であることが示された。高圧ホモジナイザー、ビーズミル、ジェットペースターを用いた機械的破碎により、湿潤状態の藻体からの抽出効率を向上できること、消費電力との関係からジェットペースターがもっとも効率が良いことが明らかとなった。さらに、セラミック中空糸膜による細胞の濃縮過程で表層多糖が除去できることが示され、この手法による細胞の濃縮回収と抽出効率化の検討が期待されている。

オイル抽出残渣の可溶化による *Aurantiochytrium* の培養

微細藻類が多く油脂を蓄積すると言っても、その含量はせいぜい数十%であり、残りのバイオマスの利用効率の改善が全体の収支の向上には不可欠である。本プロジェクトでは、抽出残渣を熱水で可溶化し、従属栄養性の *Aurantiochytrium* の培養に利用することを試みた。下水の有機物濃度は *Aurantiochytrium* の培養に十分とは言えないため、培養残渣の利用はそれを補完する意味からも不可欠であった。

Aurantiochytrium の抽出残渣の亜臨界水処理により、全窒素の約6割がアンモニア・アミノ酸・ペプチドとして、全リンのうち6-8割がリン酸として回収できることがわかった。それらは *Aurantiochytrium* の培養に窒素・リン酸源として利用可能であったが、コントロールに比べて十分高いとは言えなかった。そこにごく微量の酵母エキスを添加することにより、通常の培地と同程度の増

殖性を回復できることが明らかとなった³⁾。酵母エキスは何らかのビタミンの供給に関わっていると想像され、現在その成分の同定を試みている。

*B. braunii*の抽出残渣からも亜臨界水処理による有機成分の回収と *Aurantiochytrium*の培養を試みたが、期待したような培養は認められなかった。その原因は亜臨界水処理過程でギ酸が生じたためと推定された。ギ酸の生成を抑制するには酸性条件での分解が必要だったため、酸性条件での分解を試みたところ、その分解産物により *Aurantiochytrium*の培養が可能であることがわかった。

藻類炭化水素の改質

*B. braunii*と *Aurantiochytrium*由来の炭化水素はトリテルペノイド (C₃₀)を基本骨格としており(図2)、ディーゼル燃料として軽油に混合して燃料として利用できるが、そのままでは揮発性に乏しいため、ガソリンやジェット燃料としては利用できない。スクワレンを飽和化した炭化水素のスクワランを一般的な接触分解触媒を用いて分解すると、分解と同時に著しい異性化反応が生じ、安定的な産物回収が不可能であった。

そこで、新規触媒の開発に取り組み、二酸化セリウム (CeO₂)を担体とするルテニウム (Ru) 触媒 (Ru/CeO₂)を用い、スクワランの分岐の少ない位置のC-C結合が選択的に切断できることを明らかとした³⁾。反応時間により、ジェット燃料からガソリン成分、さらに低分子のガス状分子まで分解できた。さらに分子構造が複雑なボトリオコッセンについても、Ru/CeO₂触媒である程度分解可能であったが、同定できない化合物が精製しているようで、収率は60%程度に留まった。

ライフサイクルアセスメントの考え方と課題

一般的な下水処理施設では、活性汚泥法により流入水への曝気による有機物の除去と生じた汚泥の脱水・焼却にエネルギーが消費されている。本プロジェクトでは、下水流入水と下水汚泥を活用してオイル産性藻類を培養し、液体燃料の生産を試みる(図1)。藻類の培養により、下水中の有機物・窒素・リン酸などが吸収され、通常の

下水処理プロセスが不要となれば、その分処理コストが低減できるものとする。また、生産された燃料分は単純にエネルギーのプラスと計算する。藻類の培養・収穫・抽出・蒸留・改質の各ステップで消費されるエネルギーをマイナスとして計算すると、全工程でエネルギー収支はマイナスであった。*B. braunii*の培養に関しては、培養サイズを拡大することによるスケールメリットの効果が期待できるため、さらに規模拡大により改善できると期待される。一方、*Aurantiochytrium*の培養は、消費エネルギーをプロジェクト発足時と比較して、10-20%まで削減する必要がある。また、抽出に用いる有機溶媒の回収率が現状90%程度であるが、それを95%まで改善し、その蒸留にかかる電力を約半分に抑制することが望まれる。有機溶媒によらない回収方法が開発されることができれば、なお望ましい。

復興への貢献と今後の取り組み

本プロジェクトの実施サイトの仙台・南蒲生 藻類バイオマス技術開発実験室および屋外パイロットプラントには、これまでのプロジェクト期間中に国内外から700名を超える視察者があった。2015年3月に仙台市で開催された第3回国連防災世界会議では、前国連事務総長の潘基文氏をはじめ多数の会議出席者が、2016年5月のG7財務大臣・中央銀行総裁会議でも大臣・総裁が見学され、情報発信を行う機会を得た。また、毎年仙台市民向けに市民フォーラムを開催し、市民向けに情報提供を行った。

引き続き、3者の共同研究を進め、さらに民間企業からの協力を得て、下水を利用した藻類の培養とエネルギー生産を仙台市で行い、最終的には国内外の浄化施設への展開を図りたい。

文 献

- 1) Nakazawa, A. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **109**, 287 (2012).
- 2) Aida, T. M. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **228**, 186 (2017).
- 3) Oya, S. *et al.*: *Chem. Sus. Chem.*, **8**, 2472 (2015).