

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	大 阪 工 業 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	排CO2ゼロのバイオエネルギー生産システムの構築		研 究 分 野 環 境 科 学
キ ー ワ ー ド	①バイオ燃料、②微生物、③低炭素技術、④リサイクル、⑤微細藻類、⑥メタン発酵		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
河 村 耕 史	大阪工業大学 工学部	准 教 授	研究総括・微細藻類の実験

○研究分担者

[illegible]

排 CO2 ゼロのバイオエネルギー生産システムの構築

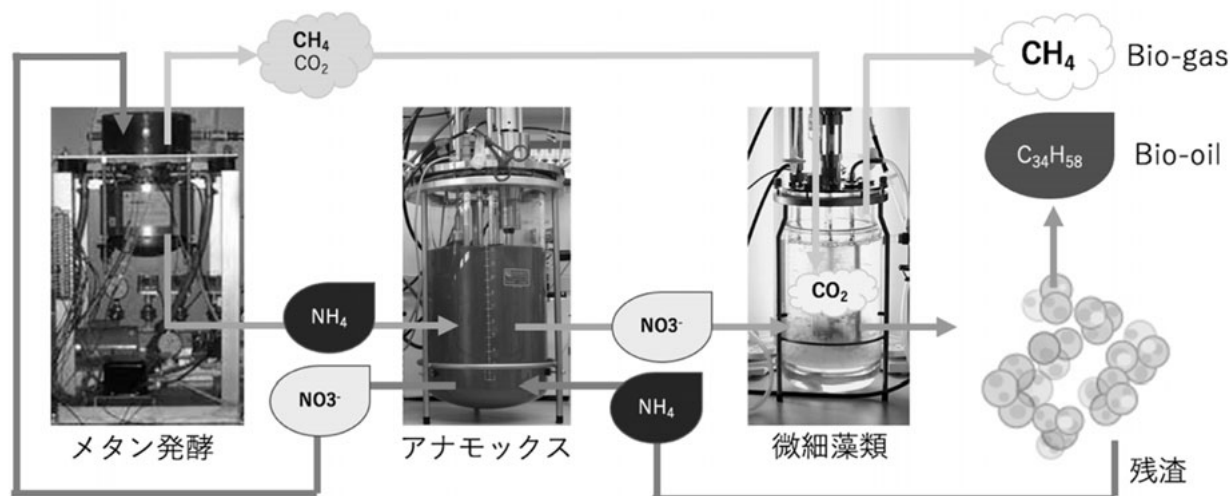
1. 研究の目的

日本の岸田総理は、2021 年 11 月にグラスゴーで開催された COP26（国連気候変動枠組条約第 26 回締約国会合）において、これから 2030 年までの期間を「勝負の 10 年」と位置づけ、全ての国に野心的な気候変動対策を呼びかけた。2050 年までに CO2 排出量を実質ゼロとする「チャレンジ・ゼロ」構想を国際公約として発表、2030 年までの数値目標として、CO2 排出量を 2013 年度比で 46%削減するとした。コロナ禍が収束した後の世界経済において、CO2 の排出削減技術はこれまで以上に大きな期待と役割を担うことが予測される。

本研究は、「藻類バイオ燃料」、「メタン発酵」、「アナモックス」という 3 つの環境バイオ技術を統合し、CO2 排出量ゼロのバイオエネルギー生産システムの構築を目指す。「藻類バイオ燃料」とは、微細藻類の光合成を利用し、CO2 を Bio-oil（油脂や炭化水素など）に変換する技術である。電気や水素に比べ、エネルギー密度が高く、輸送・貯蔵性に優れた液体燃料を創りだす点で優れている。しかしながら、藻類バイオ燃料の単位土地面積あたりのオイル生産性は、陸上植物に比べれば一桁高いものの、化石燃料の代替資源として利用するためには、さらに 5-10 倍程度の生産性向上が必要とされている（Energies 2019, 12: 1920）。

一方、「メタン発酵」技術はすでに実用化された技術であり、廃棄物からのエネルギー回収や減容化ができる技術として、社会的なニーズも年々高まっている（環境バイオテクノロジー学会誌 2022, 22: 53-59）。しかしながら、メタン発酵によって生じる Bio-gas には、約 60% を占めるメタンの他に約 40% の CO2 が含まれる。Bio-gas を天然ガスの代替燃料として利用するためには、メタン濃度を 90-95% まで精製する必要がある。薬品を利用した化学吸収法やアルカリ性水溶液による湿式吸着法が導入されているが、高温高压が必要であることや、大量の水が必要であることから、エネルギーコストの増大、設備の大型化が避けられない（J. Renew. Energy Smart Grid Tech. 2022, 17: 29-38.）。

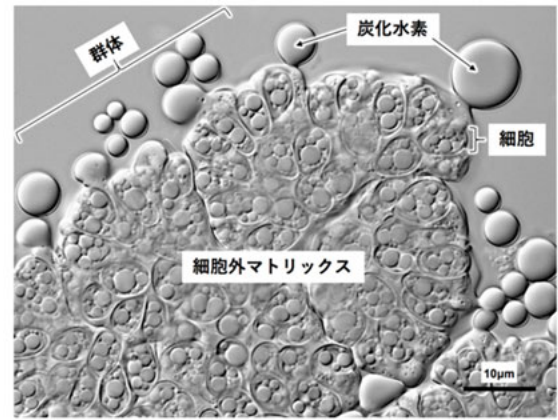
本研究は、「メタン発酵」によって生じる Bio-gas を「藻類バイオ燃料」を生産する培養槽に通気する方法で、CO2 を除去すると同時に Bio-oil に変換するシステムの構築を目標とした研究を行う。このシステムでは、Bio-oil 抽出後の残渣をメタン発酵槽に返送するループ構造を作る。これにより、理論的には全てのバイオマスをもしくは Bio-oil に変換できる。さらに、実施設の運営コスト削減と廃棄物の減容化を念頭に、メタン消化液で微細藻類を培養する技術の開発を並行して行う。このとき、有害なアンモニア態窒素を、無毒な硝酸態窒素に変換する「変換プラグ」として「アナモックス（嫌気性アンモニア酸化）」プロセスを利用する。これにより、異質な培養槽（メタン発酵＋藻類培養）を機能的に連結し、全体システムの物質循環構造を構築することを目指す。



2. 研究の計画

(1) 微細藻類株の選抜と育種、集積培養化

メタン発酵ガスと消化液の処理に適した微細藻類株の選抜と育種、集積培養化を行う。微細藻類は重油相当の炭化水素（C₃₄H₅₈）を高蓄積する緑藻 *Botryococcus braunii* を使う。*B. braunii* は他のオイル産生藻類には見られないユニークな特質を持つ微細藻類である：（１）炭化水素は、発熱量が高く、既存の石油精製施設を使って燃料化できる、（２）群体を形成し、細胞内ではなく細胞外に炭化水素を蓄積する（右図）、（３）対数増殖期に炭化水素の生産速度が最大化する（河村 2021 アグリバイオ 5: 49-52）。



B. braunii 顕微鏡画像. 群体をカバーガラスで押しつぶすと、細胞外マトリックスに蓄積していた炭化水素がしみだす様子

特質（２）は、牛からミルクを絞るように、微生物を生かしたままオイルだけ回収する「milking」を可能にしている（J. Appl. Phycol. 2021, 33: 785）。このような特質から、バイオ燃料の生産者として、*B. braunii* は最も有望な生物種の１つであり他に類をみない特質を持つ微生物といえる。しかしながら、自然環境中では生息数が少なく発見が難しい。これに対し、研究代表者である河村は、*B. braunii* を特異的に検出する環境 DNA 分析によって生息地を解明（Hirano, Kawamura et al. 2019. Sci. Rep. 9: 16974）、オイル蓄積によって浮上する性質を利用した野生株の簡易濃縮単離法を開発（Kawamura et al. 2020. J. Ecosyst. Ecogra. 10: 274）、それを用いて、これまで 800 株以上の野生株を国内外の自然湖沼から単離収集してきた。そして、前例のない規模で野生株のスクリーニングを行い、これまでの増殖速度の世界最速記録を更新する株（OIT-678 株）を発見した（Kawamura et al. 2021；業績欄）。本研究はこの野生株の大規模コレクションと高増殖株 OIT-678 株を使い、以下の方法で研究を行う。

①野生株のスクリーニングと集積培養

メタン発酵ガスを模した高濃度 CO₂（40%）条件下でスクリーニングを行い、適応した野生株を選抜、高濃度 CO₂ 条件下で集積培養を行い、高密度化させる（乾燥藻重 10g/L 以上）。その後、実際にメタン発酵槽から出るガスを通気しながら培養を行い、CO₂ の吸収速度、藻バイオマス生産速度、オイル生産速度を測定し、有用性を評価する。同様に、メタン消化液によるスクリーニング、選抜、集積培養、性能評価を行う。

②突然変異育種

高増殖株 OIT-678 株を使った突然変異育種を行い、メタン発酵ガスや消化液に適応した変異株の作出を行う。変異誘導法として、若狭湾エネルギー研究センターにおいて、重イオンビームを照射する方法を使う。重イオンビームを OIT-678 株に照射した後に、高濃度 CO₂ もしくはメタン消化液を使って耐性変異株を選抜する。選抜の際に、大量の変異細胞塊から有用変異細胞をスクリーニングするため、多検体の蛍光測定が可能なマルチプレートリーダーを予算計上した。

(2) メタン発酵

藻類バイオの抽出残渣をメタン発酵槽で高速に処理するため、発酵槽の小型化と高濃度メタン化を可能にする気相部構成を検討した。具体的には、泡沫充填による気相部混合特性をシミュレーションで検討しながら滞留時間確保と押し出し流れを両立できる装置構成を検討する。

(3) アナモックス

藻類バイオ残渣やメタン発酵消化液のアンモニア態窒素を硝酸態窒素に変換するためのアナモックスリアクターの高効率化を目的に、微量金属の添加効果を調べる。

3. 研究の成果

(1) 微細藻類株の選抜と育種、集積培養化

①野生株のスクリーニングと集積培養：メタン発酵ガスを模した高濃度 CO₂ (40%) 条件下でスクリーニングを行った結果、高増殖株 OIT-678 株を含む熱帯産株から高い耐性を持つ株が見つかった。これらの株は、未分解性有機物によって pH4 前後になるインドネシア熱帯泥炭湿地に由来する株であり、40%CO₂ 曝気条件で起こる培地酸性化に耐性があった。集積培養を試みた結果、1L 以上スケールでは世界で初めて 10g/L を超える高密度化に成功し、0.5g/L/day のバイオマス生産速度を達成した（業績 2-⑤）。さらに、京都の高層湿原から単離した株 OIT-1001 は、高密度化に必要な強光/高水温 38℃条件に耐性があることも発見した（業績 2-②）。

②突然変異育種：高増殖株 OIT-678 株と耐性株 OIT-1001 株を使った突然変異育種を行った。イオンビーム（従来の化学薬品や放射線に比べ、生体へのダメージが少なく、DNA に局所的に大きな変異を引き起こすため、有用な変異体を得られやすい）を照射し、変異を誘導した（若狭湾エネルギー研究センター）。その後、高濃度 CO₂ 条件、メタン消化液等のストレス条件下にて耐性変異株の選抜と集積化を進めている。さらに、2023 年度に購入した蛍光プレートリーダーを使い、低クロロフィル含量、巨大群体形成などの有用変異株を 200 株以上単離した。また、群体を単細胞化したうえで変異細胞を選抜するため、培地に糖類を高濃度に添加し浸透圧で単細胞を遊離させる手法を開発した（業績 2-④）。高頻度に転移する内在性トランスポゾン进行を特定し、生物学的変異誘導法としての有用性を示した（業績 2-①）。

(2) メタン発酵

気相部を泡沫で充填する新奇リアクタを設計、性能を評価した。泡沫を安定保持してガス循環を減らすことで、リアクタを押出し流れとし、出口メタン濃度の向上を実現した（業績 3-①②）。今後は、シミュレーションにより運転条件の最適化をはかりつつ、水素吸着ナノ材料の探索・検証を行う。また、最新の CO₂ 削減技術に関する国内外の知見をレビューした著書を複数執筆、本研究プロジェクトの新規性や社会実装の可能性についての知見を深めた（業績 1-①②③）。

(3) アナモックス

異なるカリウム濃度において連続運転を行い、窒素除去速度などのリアクター性能を評価した結果、カリウムの添加によって菌体が増加し、窒素除去速度が高まることが示された（業績 3-④）。

4. 研究の反省・考察

2023 年度の成果から、10g/L の高密度状態で、これまで微細藻類で報告された中でもトップクラスの高いオイル生産性 (250mg/L/day) を実現できることがわかった。2024 年度は高密度状態を維持しながら連続培養するためのリアクタ（送液ポンプ、外部水循環装置、pH モニター等から構成）を製作し、培養槽の安定化とさらなる性能向上を目指す。そして、メタン発酵槽からのバイオガス供給速度と、藻類培養槽による CO₂ の除去速度とのバランスを定量的に評価する。また、高密度状態では光が増殖を制限する要因になっているため、2023 年度に作出した低クロロフィル変異株や巨大群体形成変異株がさらなる高密度化に有用であるとの仮説を検証する。

今後は、2023 年度に集積培養した *B. braunii* を使い、オイル抽出後の残渣をメタン発酵させてバイオガスを創る方法を検討する。このとき、研究分担者である古崎が開発した「エタノール化前処理」による高負荷運転を実施し、それを実現する生物学的なメカニズムの解明を行う。さらに、藻類バイオマス残渣のメタン発酵と、メタン消化液による藻類培養において、それぞれ高濃度の NH₄⁺がメタン発酵あるいは藻類培養を阻害する可能性が指摘されている (Water Sci. Technol., 2020, 82: 1070)。高濃度 NH₄⁺は培地のアルカリ化を引き起こし、微生物反応を阻害するためである。そこで、この NH₄⁺を NO₃⁻に変換して無毒化するための「変換プラグ」として、アナモックスプロセスを利用する研究を進める必要がある。

5. 研究発表

(1) 出版物

- ① 新井博之, 古崎康哲, 他 30 名 : 独立栄養微生物による CO₂ 資源化技術, シーエムシー出版, pp. 109-123 (2023. 12. 13) ISBN978-4-7813-1756-4
- ② 関根泰, 古崎康哲, 他 39 名 : メタネーションとグリーン水素の最新動向, シーエムシー出版, pp. 105-117 (2023. 10. 31) ISBN978-4-7813-1754-0
- ③ 橋崎克雄, 古崎康哲, 他 83 名 : CO₂ の有効利用技術の開発, 技術情報協会, pp. 366-375 (2023. 7) ISBN978-4-86104-972-9

(2) 国際学会発表

- ① Koji Kawamura, Naoya Komatsubara, Shigeru Okada. BoTIPseq: Transposon-insertion polymorphism sequencing technique for *Botryococcus braunii*. International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts 2023. 6. 12 Waikoloa Beach, Hawaii, USA 01A. 02
- ② Shotaro Omae, Shogo Imai, Ryota Sueyoshi, Koji Kawamura. Bioprospecting of the oil-producing microalga *Botryococcus braunii*: Isolation of high temperature stress tolerant strains. International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts 2023. 6. 12 Waikoloa Beach, Hawaii, USA P1. 039
- ③ Ryusei Miyako, Koji Kawamura. Antibiotics and their optimal concentrations for axenic culture of freshwater microalga *Botryococcus braunii*. International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts 2023. 6. 12 Waikoloa Beach, Hawaii, USA P1. 060
- ④ Sho Matsubara, Keito Yasuda, Koji Kawamura. Survivorship and regrowth potential of single cells released from a colony of *Botryococcus braunii*. International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts 2023. 6. 12 Waikoloa Beach, Hawaii, USA P1. 040
- ⑤ Masaya Hashimoto, Sho Matsubara, Haruki Fujisaki, Koji Kawamura. High-density continuous culture of *Botryococcus braunii* under strong light conditions. International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts 2023. 6. 13 Waikoloa Beach, Hawaii, USA P2. 045

(3) 国内学会発表

- ① 丁含含、古崎康哲 : 泡沫充填型リアクタを用いた高負荷バイオメタネーションの連続運転, 第 58 回日本水環境学会年会講演プログラム, p. 240 (2024. 3. 7)
- ② 丁含含、古崎康哲 : 泡沫充填型リアクタを用いたバイオメタネーション, 2023 年度関西土木工学交流発表会, 口頭発表 (2023. 11. 2)
- ③ 守岡歩、笠原伸介、栗田貴宣 : 窒素固定菌の活性に及ぼす pH の影響. 第 58 回日本水環境学会 P-E-03 (2024. 3. 7)
- ④ 飯田陽、栗田貴宣、笠原伸介、金田一智規 : 海洋性アナモックス細菌の連続培養における微量元素制限の影響第 58 回日本水環境学会 2-E-10-1 (2024. 3. 7)

(4)

学会誌など

なし