2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

学　校　名	**大　阪　工　業　大　学**	研究所名等	環境バイオリソース研究センター
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		

〇研究代表者

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	研究総括と微細藻類の実験

〇研究分担者

氏　名	所　属	職　名	役割分担
古崎　康哲	大阪工業大学　工学部	教授	メタン発酵実験
粟田　貴宣	大阪工業大学　工学部	准教授	アナモックスの実験

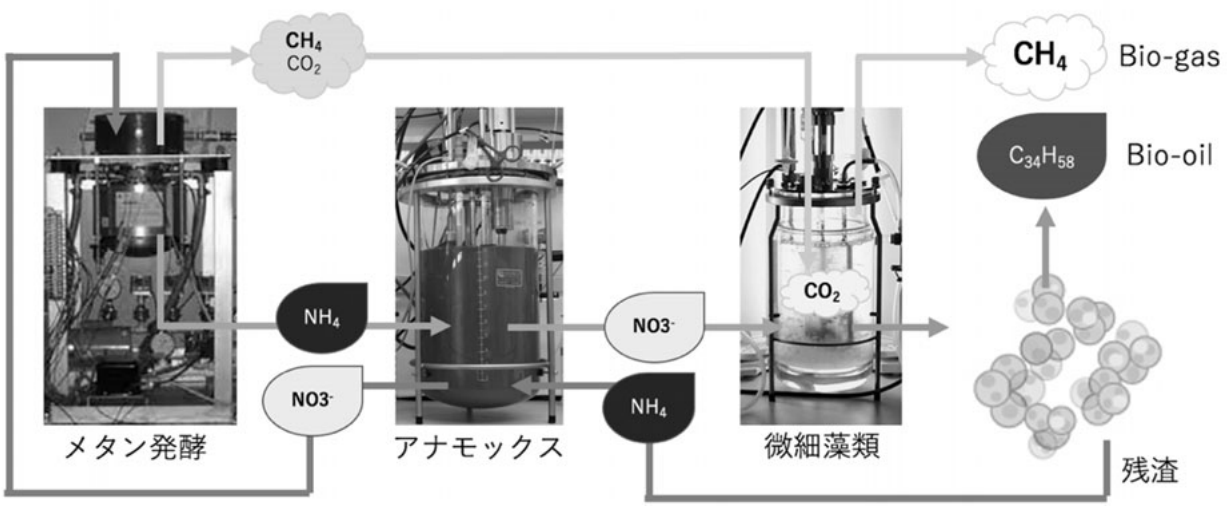
排 CO_2 ゼロのバイオエネルギー生産システムの構築

1. 研究の目的

日本の岸田総理は COP26 で 2050 年 CO2 排出実質ゼロを目指す「チャレンジ・ゼロ」を国際公約として発表し、これを受けて経産省はグリーン成長戦略を策定した。ポストコロナの世界において CO_2 削減技術の重要性が増す中、本研究は「藻類バイオ燃料」「メタン発酵」「アナモックス」の 3 つの環境バイオ技術を統合し、CO_2 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。

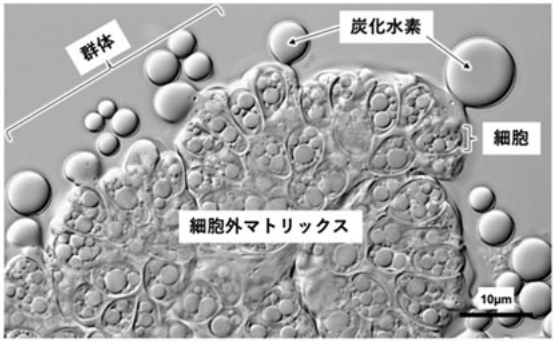
藻類バイオ燃料は光合成で CO_2 を液体燃料に変換する技術で、航空燃料（SAF）として期待されるが、化石燃料の 5〜10 倍という高い生産コストが課題である。一方、実用化が進むメタン発酵はバイオガス中の約 40%を CO_2 が占めており、燃料精製におけるエネルギーコストの増大や設備の大型化が課題となっている。

そこで本研究は、メタン発酵のバイオガスを藻類培養槽に通気して CO_2 除去とオイル生産を同時に行う。さらにオイル抽出後の藻類残渣を発酵槽へ返送するループ構造により、全バイオマスのエネルギー変換を図る。ここにアンモニアを無毒化する「アナモックス」プロセスを連結プラグとして組み込み、全体システムの安定した物質循環構造を構築することを目指す。



2. 研究の計画

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（$C_{34}H_{58}$）を高蓄積する緑藻 *Botryococcus braunii* に着目した。*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、（３）対数増殖期に炭化水素の生産速度が最大化する。このような他に類をみない特質から、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つである。研究代表者（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、野生株の濃縮単離法を開発、これまで 1000 株に及ぶ野生株を国内外の自然湖沼から単離、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）。本研究はこの野生株コレクションと高増殖株を使い、以下の方法で研究を行う。



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

① 野生株のスクリーニング（2023-2024 年度）：メタン発酵ガスを模した高濃度 CO_2（40%）条件下でスクリーニングを行った結果、高増殖株 OIT-678 株を含む熱帯株から高耐性株が見つかった。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%CO_2 曝気条件で起こる培地酸性化に耐性があった。

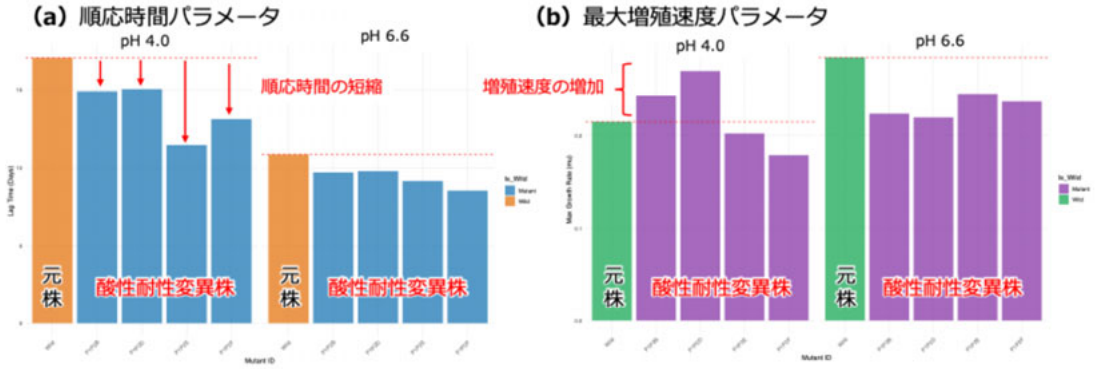
② 突然変異育種（2024-2025 年度）：高増殖株 OIT-678 株とその他の耐性野生株に重イオンビームを照射し変異を誘導（若狭湾エネルギー研究センター）、その後、2023 年度に購入した蛍光プレートリーダーを使い、ストレス耐性株、低クロロフィル含量、群体形成異常など、メタン発酵との結合や高密度化に適した有用変異株を単離し、その性能評価を行う。

③ ゲノム解析（2025 年度）：得られた有用変異株や野生株について、その機能を実現している遺伝子機構を調べるため、ゲノム解析を実施する。

さらに、2023-2024 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。主に「バイオメタネーションの高効率化」および「高圧メタン発酵プロセスの安定性向上」について研究する。技術的ボトルネックである水素溶解効率の改善に向けた工学技術の開発を行う。

3. 研究の成果

メタン発酵との連結を想定し、*B. braunii* の酸性耐性株と塩性耐性株の作出を試みた。具体的な方法は以下のとおりである。変異誘導を行ったのち、寒天培地で再生させ、液体培養へ移行して十分に増殖した後に、塩（NaCl 0.5%）、もしくは、酸性（pH4.0）によるストレス条件下に移行し、数ヶ月間培養を行って大半が死滅した段階で耐性変異株を単離した。単離後にストレス条件下でも生残、増殖した耐性株について、元株とストレス耐性を比較する実験を行った。その結果、塩性耐性の選抜では、NaCl 0.5%添加条件下において、元株よりも 3 倍程度増殖速度が高い変異株が得られた。ただし、耐性を獲得した可能性のある変異株はこの 1 株のみであり、他の単離株は NaCl 添加条件では十分に増殖できないものがほとんどであった。耐性を獲得した可能性のある変異株については引き続き、培養スケールを上げて、元株との比較実験を行い、結果を検証する。NaCl の添加は藻類に浸透圧などのストレスを与えるため、これに対処できるような能力を獲得するためには、複合的な突然変異の蓄積が必要と考えられる。そのため、一定の耐性を獲得した変異株を元株とし、さらなる突然変異育種を行うことが実用性のある品種開発には必要であろう。一方、酸性（pH4）耐性株の育種では、複数の耐性株が得られた。これらの耐性株でも、NaCl 添加時のように、酸性ストレスに対し、一定のラグタイム（順応期間）を経たのちに増殖するパターンを示した。そこで、より詳細な変異株の性状評価を行うため、順応期間を明示的にパラメータとして含む Baranyi モデルを増殖パターンに適用し、順応時間と増殖速度のパラメータを算出する方法で、変異株のストレス耐性を定量的に評価した。その結果、耐性株は酸性条件への順応期間を短縮していること、さらに、一部の変異株では増殖速度の増加も併発していることが示唆された（下図）。



酸性耐性変異株の性状評価.

pH=4.0（酸性ストレス条件）もしくはpH=6.6（ノーマル条件）にて培養を行い、増殖速度を光学密度（OD660）で測定、Baranyiモデル をあてはめ、**(a)**順応時間（Lag Time, Days）と **(b)** 最大増殖速度（Max Growth Rate μ）を求め、元株（Wild）と比較した。pH6.6条件に比べ、pH4.0では5日程度長い順応期間があり、変異株ではこの期間が短縮していた。さらに、一部の変異株（P1P2E）ではストレス条件下での増殖速度の増加も認められた。

微細藻類のバイオマス生産性はメタン発酵の処理速度より数倍遅い。そのため藻類のバイオマス生産性を向上させることが全体システムの律速である。そのための育種として、低クロロフィル含有変異体の作出を試みた。細胞あたりのクロロフィル含量が低下した「低クロロフィル変異体」を作出すれば、細胞集団の光利用効率が高まるため、高密度培養が可能となり、バイオマスの生産性（単位培養液容積あたりのバイオマス生産速度）が向上すると期待される。イオンビーム照射によって変異誘導した細胞塊を寒天培地に低密度で塗布し、発生したコロニー群から目視で緑色が薄いものをピックアップする方法で、低クロロフィル含有変異体の候補を単離した。その後、プレートリーダーにて藻液の吸光スペクトルを測定、低クロロフィル変異体の候補株を選抜し、候補株と元株を 100mL 培養瓶で液体培養、藻体を凍結破砕してクロロフィル色素を抽出し含有量を定量した。その結果、低クロロフィル変異体の候補 6 株を特定した。これらの株では、クロロフィル a とクロロフィル b の含量が元株に比べて有意に低下しており、a/b 比は変化がないことから、クロロフィル a の合成経路に変異が入った変異体であると推察された。今後は、これらの低クロロフィル変異体と元株を使った 1L スケールの瓶培養を行い、藻密度とバイオマス生産性の違いを評価する計画である。

さらに、メタン発酵システムに関し、排 CO_2 ゼロのバイオエネルギー生産システムの構築に向け 、主に「バイオメタネーションの高効率化」および「高圧メタン発酵プロセスの安定性向上」について多角的なアプローチから研究を推進した。技術的ボトルネックである水素溶解効率の改善において、新規提案の「泡沫充填型リアクタ」が従来のトリクルベッド型を大きく上回る負荷追従性（58L/L/d）と高いメタン精製能力（90%以上）を持つことを実証した 。さらに、加圧条件下での反応速度論的・動力学的解析を通じて、比水素消費速度を圧力変化から精度高く算出するモデルを確立し 、連続運転時における培地緩衝能や pH 低下といった実用上の課題と対策を明確にした 。また、外部エネルギーを必要としない「自己加圧型メタン発酵」の長期安定性を証明するなど、システム統合に向けた極めて有益な基盤的知見を構築し、国内外の学会等で計 7 件の成果発表を行った。

4. 研究の反省・考察

本年度は、「排 CO_2 ゼロのバイオエネルギー生産システム」の構築に向け、微細藻類の育種（農学）とメタン発酵・メタネーションの高効率化（工学）の両面から多角的なアプローチを行い、当初の計画を概ね達成するとともに、システム統合に向けた重要な知見と課題を抽出した。藻類育種においては、メタン発酵ガス通気時の培地酸性化を克服する「酸性耐性株」や、光利用効率を高め高密度培養を可能にする「低クロロフィル変異体（候補 6 株）」の作出に成功した。酸性耐性株の増殖挙動を Baranyi モデルで定量評価した結果、環境への順応期間（ラグタイム）が有意に短縮されていることが示された。一方で、塩性耐性株の選抜では顕著な耐性を示す株が 1 株に留まり、浸透圧等の複合ストレスへの適応には単一の変異では不十分であることが判明した。今後は、今回得られた酸性耐性株や低クロロフィル株を親株として、さらなる突然変異育種を累積的に重ねる「段階的品種開発」が必要である。

工学システム側では、技術的ボトルネックであった水素溶解効率の改善において、新規提案の「泡沫充填型リアクタ」がトリクルベッド型を大きく凌駕する水素負荷（58 L/L/d）とメタン精製能力（90%以上）を持つことを連続運転にて実証した。しかし、より高負荷な連続運転試験においては、反応生成水による液相の希釈、緩衝力の低下、およびホモ酢酸生成の促進に伴う pH 低下といった、微生物活性を阻害する実用上の新たな課題が明確となった。速度論的解析により、栄養塩や緩衝能が豊富な培地系が上澄系の約 10 倍の比水素消費速度を示すことが確認されたため、今後はリアクタの押し出し流れ化等の工学的対策に加え、オイル抽出後の藻類残渣を発酵槽へ返送する「ループ構造」による栄養塩・緩衝能の相互補完作用を定量的に検証していく必要がある。

以上の通り、各コンポーネントにおける課題と対策は明確化されており、今後は現在進行中のゲノム解析データをベースに育種機構を解明するとともに、異質な培養槽（メタン発酵／藻類培養）を機能的に連結する「アナモックス」プロセスの導入を進め、システム全体の物質循環構造の最適化へと研究を展開する。

5. 研究発表

査読付論文

1) 丁含含,古崎康哲：汚泥を泡沫状態で保持するバイオメタネーションリアクタの運転特性,土木学会論文集,Vol.81,No.25,25-25024(2025.12.3)

その他雑誌投稿

1) 古崎康哲：下水道カーボンニュートラル～バイオメタネーション技術～,下水道協会誌,Vol.62,No.756,pp.34-38(2025.10)
2) 河村耕史,栗田貴宣,古崎康哲：トピックス　環境バイオリソース研究センター（RCEB）の紹介,環境技術,Vol.54,No.5,pp.34-38(2025.9)

口頭発表等

1) 西村由稀,古崎康哲：バイオメタネーション反応の動力学パラメータを算出する手法の提案,化学工学会第91年会,PD336(2026.3.19)
2) 丁含含,古崎康哲：嫌気性汚泥を泡沫状に保持するリアクタを用いたバイオメタネーションの高負荷運転,化学工学会第91年会,PE376(2026.3.19)
3) 福冨純也,古崎康哲：バイオガス生成による自己加圧型高圧メタン発酵の運転特性, 第60回日本水環境学会年会講演集,p.479(2026.3.10)
4) 川村祐介,古崎康哲,松林未理,野宮高由,高橋惇太,森田智之：加圧バイオメタネーションの培地に関する反応速度論的検討, 第60回日本水環境学会年会講演集,p.478(2026.3.10)
5) 丁含含,古崎康哲：嫌気性消化汚泥を泡沫として充填するリアクタの高負荷バイオメタネーション運転, 第60回日本水環境学会年会講演集,p.480(2026.3.10)
6) 西村由稀,古崎康哲：生物脱リンのリン放出促進を目的とした水素供給によるORP制御の検討, 第60回日本水環境学会年会講演集,p.459(2026.3.9)
7) 福冨純也,古崎康哲,立木悦二,孫晋：においセンサを用いたメタン発酵槽の状態評価に関する研究,第25回環境技術学会年次大会研究発表会予稿集,pp.106-107(2025.10.20)
8) 丁含含,古崎康哲：バイオメタネーションにおける泡沫型とトリクルベッド型の性能比較,第25回環境技術学会年次大会研究発表会予稿集,pp.40-41(2025.10.20)
9) 西村由稀,古崎康哲,森田智之,高橋惇太：加圧メタネーションによるメタン生成菌の動力学的パラメータ算出,第25回環境技術学会年次大会研究発表会予稿集,pp.38-39(2025.10.20)
10) 川村祐介,古崎康哲,森田智之,高橋惇太：加圧型バイオメタネーションの連続運転特性の研究,第25回環境技術学会年次大会研究発表会予稿集,pp.12-13(2025.10.20)
11) 吉川雅登・畑下昌範・河村耕史.群体性緑藻 *Botryococcus braunii* の単細胞由来の突然変異株ライブラリー作成法.環境バイオテクノロジー学会 2025 年度大会. 2025.7.10. 札幌クラーク会館. P-46
12) 西中日菜子・河村耕史.オイル産生藻類 *Botryococcus braunii* の炭化水素含量の株による違いを Nile Red 蛍光で推定する方法. 環境バイオテクノロジー学会 2025 年度大会.札幌クラーク会館. P-43 (2025.7.10)
13) 越智裕斗・松﨑美宙・河村耕史.炭化水素生産藻 *Botryococcus braunii* の細胞外多糖類(EPS)高生産株の選抜.環境バイオテクノロジー学会 2025 年度大会.札幌クラーク会館. P-30 (2025.7.10)
14) 河村耕史. 石油を作る微細藻類 *Botryococcus*.日本農業気象学会 近畿支部大会2025.大阪工業大学. 口頭（招待講演）(2025.11.29)
15) 越智裕斗・畑下昌範・河村耕史. *Botryococcus braunii* の酸性耐性野生株のスクリーニングと変異株の作出.第50回日本藻類学会.筑波大学. P14 (2026.3.21)