

「二酸化炭素排出抑制に資する革新的技術の創出」  
平成 20 年度採択研究代表者

渡邊 信

筑波大学大学院生命環境科学研究科・教授

オイル産生緑藻類 *Botryococcus* (ボトリオコッカス)  
高アルカリ株の高度利用技術

## 1. 研究実施の概要

平成 20 年度は、21 年度からの本研究の本格的な推進に必要な基礎資料の探索・収集、研究基盤の構築、計測やモデリングの予備的検討を行い、以下の主要な成果を得た。

1)ボトリオコッカスを含めてオイル産生機能をもつ多くの野生株を収集、分離し、オイル産生藻類培養株の多様性を高めた。2)研究基盤となる培養センターを確立し、1ヶ月で1トンの培養試料を生産することを可能とした。3)増殖・オイル生産最適条件サーベイシステムの設計・試作を行い、ボトリオコッカス培養株の増殖に及ぼす水温、照度、光質及び pH の影響を明らかにした。4)オイル産生生物の特性情報について、21 のデータ項目を設定して、情報の登録作業を進めた。5)品種改良に不可欠な遺伝情報を得るために、BOT-22 および別の培養株 BOT-88-2 から RNA を抽出し、発現している遺伝子の網羅的塩基配列の解析を行い、BOT-22 について 14,664 個、BOT-88-2 について 14,220 個の独立な cDNA 配列を得た。6)増殖速度および炭化水素含有量が多く有望株として4培養株が選抜され、それらの主要炭化水素の構造と含有量を明らかにした。7)重力を利用したネットろ過による脱水と風乾および油圧プレスによるオイルの搾り出しが最もエネルギー投入量の少ない方法であることを明らかにした。8)屋外培養システムのプロトタイプである試験プラントを筑波大学構内に設置した。本試験プラントでボトリオコッカスは順調に増殖した。

以上のように生物、化学および工学的研究のいずれにおいても当初の計画通りに研究が進捗しており、それぞれ基盤となる技術、知見ならびにインフラストラクチャーが構築できたことから、次年度からの本格的な研究が順調に進むために不可欠な研究基盤が確立できた。

## 2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

### 1. 最適増殖・オイル生産に導く培養基盤技術と高度品種改良技術の開発

#### (1)有用機能をもつボトリオコッカス等新規野生株の分離培養及び特性評価

茨城県、香川県、福岡県、沖縄県のダムや湖沼で採取した試料について、高濃度の塩や重

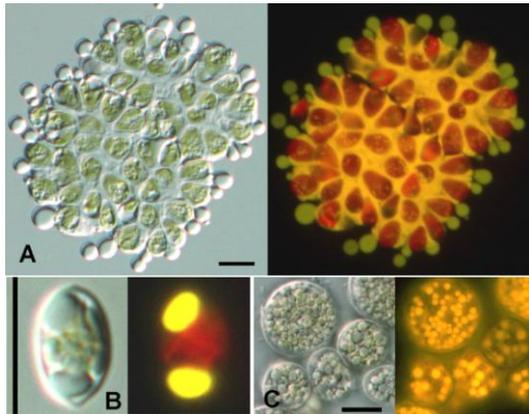


図 1. 選択培養試料から培養株として確立されたオイル生産微細藻株。A. 20mM  $\text{NaHCO}_3$  条件で選抜されたボトリオコッカス培養株、B. 0.35%海水条件で選抜された単細胞性緑藻株、C. 20mM  $\text{NaHCO}_3$  条件で選抜されたクロロコッカム様緑藻株。

炭酸を含む培地、温、強光などの特殊な培養条件において選択培養と分離培養を行った。分離培養後約2週間以降に培養藻株について、オイルの有無、生産量をナイルレッドによる染色後蛍光顕微鏡による観察を行い、オイルの生産が確認された細胞をマイクロピペット法により単細胞分離することで、これまでに12株の単藻培養株を確立した(図1)。また、比較的濃い栄養物添加培地(GPY培地)を用い、沖縄県のマングローブ域の海水、泥、マングローブの落ち葉などから、釣り餌法により高度不飽和脂肪酸を産生する従属栄養原生生物を60株分離培養した。

## (2) 研究基盤となる培養センターの確立と管理

筑波大学の産学リエゾン共同研究センターに7.5m<sup>2</sup>の培養庫を構築し、10L培養槽54個(540L)が設置可能な光照射培養棚を完成させた。温度は25°Cで一定であるが、照度を600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ まで、CO<sub>2</sub>濃度を任意に設定できるシステムとなっており、1ヶ月に1トンの培養試料を提供することが可能となった。

## (3) 増殖・オイル生産の最適培養条件の明確化

照度及び光質を変化でき、温度を制御できる最適条件サーベイシステムを設計・試作した。温度は任意に制御でき、蛍光灯とLED赤色光を任意の照度で設定することができた。この試作システムでボトリオコッカス BOT-144 株の増殖に対する種々の環境要因に対する影響を解析し、至適条件の検討を行った結果、1)至適温度は30°Cで、2)至適pHは5-9の広い範囲にあり、pH 10においても80%程度の増殖速度を維持し、オイル生産も維持した。この性質は生活排水・廃液などを利用する際に利点となる可能性を示すものである。さらに、3)塩濃度に対しては0.3%まで生育阻害が見られず、0.5%においても1/3の増殖速度を維持する。これは培地として1/10濃度の海水を使用しても問題ないことを示すものである。また、4)光強度については160  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ で飽和する、ことを明らかにした。

## (4) オイル産生藻類・従属栄養性原生生物に関する特性情報のデータベース化

オイル産生生物の有効利用と情報の共有化を目的として、地理情報を含むサンプル情報、株情報、増殖やオイル生産に関わる特性情報について、21のデータ項目を設定して、これまでに収集したサンプルと培養株に関する情報の登録作業を進めている。登録データはGoogle Document BETAを利用することで、web上でのデータの入力と共有化を図っている。

## (5) 野生株の品種改良

ボトリオコッカス培養株 BOT-22 を用いて紫外線照射による突然変異誘発の処理条件の検討を行った。その結果、半数致死線量は150J/m<sup>2</sup>であることが明らかとなった。塩耐性株を選抜するため、生育に影響を与える塩濃度を調べた結果、0.75% NaClまでは生育できるが1.5%では生育できないことが明らかとなった。また、対数増殖期にある BOT-22 および別の培養株 BOT88-2 からRNAを抽出し、発現している遺伝子の網羅的塩基配列の解析を行った。その結

果、BOT22 について 14,664 個、BOT88-2 について 14,220 個の独立な cDNA 配列を得た。

## 2. オイル等産生物の高度利用技術の開発(化学グループ)

### (1)炭化水素の化学構造・産生量・産生速度を元に解析する培養株の特定

現在収集したボトリオコッカスの国内株の中から、増殖速度の速い株を中心に炭化水素の構造を GC/MS および<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C-NMR を用いて構造解析した。株番号 BOT-22、BOT-88-2、BOT-70 および BOT-144 が増殖速度および炭化水素含有量が多く有望株として選抜された。それらの主要炭化水素の構造は BOT-22:C35H58(トリテルペン、純度74%)、BOT-88-2:C27H50(直鎖3二重結合、45%)、C27H52(直鎖2二重結合、55%)、BOT-70:C34H58(トリテルペン、純度95%)、BOT-144:C34H58(トリテルペン、純度96%)であり、炭化水素含量はいずれの株も乾燥藻体当たり35-50%の範囲にあった。

### (2)培養液から炭化水素分離の基本となる方法の選抜、

培養液から炭化水素の分離法にはいくつかの方法があるが、エネルギー投入量の少ない方法の選抜が必要である。重力を利用したネットろ過による脱水と風乾(または火力発電所や焼却場の 70℃前後の廃熱による乾燥)、および油圧プレスによるオイルの搾り出しが最もエネルギー投入量の少ない方法であった。

### (3)炭化水素精製の基本となる方法の検討

炭化水素を高分子材料として用いるには純度の高い材料とする必要がある。予備試験として、乾燥藻体から n-ヘキサン抽出とシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて高純度化の結果を得たが、より安価な方法に検討が必要であると考えられた。

## 3. 試験プラント・デモプラントによる工業化技術開発

### (1)試験プラントの建設

実験場整備については、屋外培養システムのプロトタイプを筑波大学構内に、筑波大学と共同して設置し、これらの制御、監視のためのビニールハウス、コンテナなどを培養施設近傍に設営した。図2右にあるように、本試験プラントでボトリオコッカスは順調に増殖しており、将来この培養を、数m<sup>3</sup>規模にまで、約数百倍にスケールアップすることが可能な、実験システムの概念設計を生物グループと共同で行った。

(2)各種モニターパラメータの確定と計測モニター系概念設計では、試験プラント(図2)において将来のプラント運転のモニターとして、pH、酸化還元電位、溶存酸素、二酸化炭素量、日照などの同時測定、通年測定を行えるシステムの検討を行った。

(3)外部高アルカリ池の建設  
外部環境での高アルカリ試験地の候補となる休沈殿池プラントの使用について、保有者の内諾をえることができ、21年度からの開始にむけての共同研究計



図2 屋外培養器用ビニールハウス(左)大量培養テスト運転(右)

画を検討した。

#### (4) 多種生態系のモデリングと解析

多種生態系の主要な影響因子として光源（エネルギー、フルエンス、パルス幅）、培養液（PH、成分、温度、攪拌率）、ガス供給条件（CO<sub>2</sub>およびO<sub>2</sub>の供給率）、および競合微生物を抽出するとともに、基本的なモデリングの検討を行った。また、マイクロ秒の短パルスで駆動される深紫外フラッシュ光源を試作し、分光スペクトル、出力、変換効率などを明らかにした。さらには、試作した高ラックス深紫外フラッシュ光源を用いてボトリオコッカスの遺伝子改質を目的とした照射試験を実施した。

### 3. 研究実施体制

#### 1) 生物学グループ1

①研究分担グループ長：渡邊 信（筑波大学、教授）

##### ②研究項目

- ・有用機能をもつボトリオコッカス等新規野生株の分離培養及び特性評価
- ・研究基盤となる培養センターの確立と管理
- ・増殖・オイル生産の最適培養条件の明確化
- ・野生株の品種改良

#### 2) 生物学グループ2

①研究分担グループ長：中嶋 信美（国立環境研究所、室長）

##### ②研究項目

- ・有用機能をもつボトリオコッカス等新規野生株の分離培養及び特性評価
- ・ボトリオコッカス等オイル産生藻類・従属栄養性原生生物に関する特性情報のデータベース化
- ・野生株の品種改良

#### 3) 化学グループ

①研究分担グループ長：彼谷 邦光（東北大学、教授）

##### ②研究項目

- ・オイル抽出・精製法の開発

#### 4) 工学グループ1

①研究分担グループ長：藤岡 知夫（応用光学研究所、理事長）

##### ②研究項目

- ・試験プラントの建設
- ・各種モニターパラメータの確定と計測
- ・外部アルカリ池の建設

5) 工学グループ 2

①研究分担グループ長：堀岡 一彦（東京工業大学、教授）

②研究項目

・多種生態系のモデリングと解析