Original Paper

Special Articles: Biomass

特集：バイオマス

Application of Cold-tolerant Marine diatom, *Mayamaea* sp. JPCC CTDA0820 to Low-Energy Cultivation Process for Stable Biodiesel Production

Mitsufumi MATSUMOTO^{*1}, Daisuke NOJIMA^{*2}, Kiichi IKEDA^{*2},
Tomoko YOSHINO^{*2}, and Tsuyoshi TANAKA^{*2}

(Received February 13, 2015)

通年バイオディーゼル燃料生産に向けた低温耐性海洋珪藻 *Mayamaea* 属 JPCC CTDA08020 株の 低エネルギー化プロセスへの適応

松本光史^{*1}, 野島大佑^{*2}, 池田貴一^{*2}, 吉野知子^{*2}, 田中 剛^{*2}

A marine cold tolerant diatom *Mayamaea* sp. JPCC CTDA0820 which showed high lipid content of 47 % at 10 °C was isolated from the coastal area of Kitakyushu city, Japan as a candidate for biodiesel production in winter in Japan. This strain can be cultured at a wide range of temperature from 5 °C to 28 °C. The biomass productivity and the oil productivity were 31 g/m²/day and 9.8 g/m²/day at the optimized culture conditions at 10 °C, respectively. The results highly suggested that the strain JPCC CTDA0820 was appropriate for the biodiesel production in cool climates. *Mayamaea* sp. JPCC CTDA0820 were succeeded in outdoor mass cultivation in winter (Nov. 25- Dec. 5). With the combination of our previously reported promising biodiesel producing diatom *Fistulifera solaris* JPCC DA0580, the stable biodiesel production through the year can be achieved.

Key Words

Biodiesel production, Cold tolerant microalgae, *Mayamaea* sp. JPCC CTDA0820

冬季におけるバイオディーゼル燃料生産の候補株として北九州沿岸から単離された耐冷性海洋珪藻 *Mayamaea* 属 JPCC CTDA0820 株は 10℃において高いオイル含有量(47%)を示した。本株は 5-28℃までの広い温度域において培養可能であり、最適化した培養条件において、バイオマス及びオイルの生産性は 31 g/m²/day, 9.8 g/m²/day であった。更に当該株の屋外大量培養に成功した。これらの結果から *Mayamaea* 属 JPCC CTDA0820 株は、低温環境下においてバイオディーゼル燃料生産を可能とし、これまでにバイオディーゼル燃料生産に用いてきた海洋珪藻 *Fistulifera solaris* JPCC DA0580 株と組み合わせることで、年間を通じた安定生産が可能になる。

キーワード

バイオディーゼル生産, 耐冷性微細藻類, *Mayamaea* 属 JPCC CTDA0820 株

※1 Biotechnology Laboratory, Wakamatsu Research Institute, Technology Development Center, Electric Power Development Co., Ltd. 1 Yanagasaki-machi, Wakamatsu-ku, Kitakyusyu-shi, Fukuoka, 808-0111 Japan

※2 Division of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology 2-24-16, Naka-cho, Koganei-shi, Tokyo, 184-8588 Japan

※1 電源開発株式会社 技術開発部 若松研究所 バイオ研究室 〒808-0111 福岡県北九州市若松区柳崎町 1

※2 東京農工大学大学院工学研究院 生命機能科学部門 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16

1. 緒 言

近年、石油や石炭といった化石燃料の枯渇や地球温暖化などの問題から、二酸化炭素削減効果のあるバイオ燃料が注目を集めている。バイオ燃料はその原料となるバイオマスの種類により、第1世代～第3世代までに分類されている。第1世代のバイオ燃料とは、食物であるナタネや大豆、またはサトウキビなどを原料としている。これらの原料は主に食料や飼料として用いられているため、第1世代のバイオ燃料は食物や飼料利用との競合、食料価格の高騰や耕作地の競合、更には生産工程におけるエネルギー収支が悪いなどの問題が生じた。燃料の生産プロセスはエネルギー収支比 (EPR; energy profit ratio) で評価され、(生産したエネルギー/生産に消費したエネルギー) で示される。つまり $EPR \geq 1$ でなければ、エネルギー生産プロセスとしては成立しない。第2世代のバイオ燃料は第1世代で生じた問題点を解消するために、食料と競合しない木質バイオマスやバイオ燃料生産にのみ利用するヤトロファやキャッサバなどを利用し生産を行っている¹⁾。これにより食料との競合などの問題は解決されたが、依然として、耕作地との競合の問題やEPRの改善は不十分であった。そこでEPRの改善を目指し、現在では第3世代のバイオ燃料生産が多く行われている。第3世代のバイオ燃料はバイオマスとして、微細藻類を利用している。第1世代や第2世代のバイオマスは陸生植物であり、アメリカの運搬用燃料の50%を賄うためにはアメリカの耕地面積の24%が必要であると試算されている²⁾。そこで現在では限られた陸地で生産するのではなく、広大な海域に着目し、15～300倍の生産性の向上が見込まれている海洋性微細藻類がバイオ燃料生産の候補バイオマスとして注目されている²⁾。しかしながら微細藻類を用いたバイオ燃料生産においても、EPRの問題は解決されておらず各プロセスの最適化などが行われているが、高く見積もった場合においても1程度であるという現状である。

一方でエネルギー生産の実用化においてはEPR以外にも考慮すべき点がいくつか存在する。それは二酸化炭素削減効果、コスト、そして供給安定性である。これらにEPRを加えた4つの要素をバランスよく満たすことがバイオ燃料生産の実用化には非常に重要になってくる。微細藻類を用いた場合、その増殖速度の速さから陸生植物を用いた場合と比較して二酸化炭素削減効果は高い³⁾。またコストに関しては培養に用いる水のリサイクルや排水等を用いることでリンや窒素源を再利用することや β カロテンなどの高付加価値の副産物を生産させるなどにより全体のコストダウンが行われている。このようにEPR、二酸化炭素削減効果やコストといった要因に関してはこれまで数多くの議論や対応策が行われているが、安定供給に関してはあまり考慮されていない現状であった。バイオ燃料生産に用いられている株の多くは至適培養温度が20～30℃付近の中温性微細藻類である。それはバイオ燃料生産を行う場所や地域が温暖な地域でのみの生産を前提としているためである。一方で、日本のような四季に気候の変動が激しい場所や高緯度地域においては、海域

の温度変化は10～25℃付近と変動が大きく中温性微細藻類を用いた場合だと著しく生産性が低下するという試算がなされている⁴⁾。気温の影響の少ない屋内での培養や温度コントロールの導入を考えた場合、装置の大型化や設置場所の確保、更に投入エネルギーの増加の面から望ましくない。これらを考慮すると屋外での開放系、かつ粗放型の培養が最適であるが、このような屋外培養においては他の細菌類の混入や水温の変化など外環境の変化が大きい。そのため、低温環境下でかつ屋外という過酷な環境に適した株を選抜することが通年のバイオ燃料生産を行うためには必須である。

近年、通年バイオ燃料生産に向けて、低温環境下で生育可能な好冷性・耐冷性の微細藻類がいくつか報告されている^{5)～7)}。これらの報告では培養温度域を低温～中温域まで幅広く持つ微細藻類を獲得し、年間を通じた培養を行うことを目的としている。しかしながら、これらの株はオイル含有量が低いこと、難培養性であることなどの問題があり屋外での培養評価まで至っていない。

我々はこれまでにオイル高蓄積海洋珪藻 *Fistulifera solaris* (*F. solaris*) JPCC DA0580 株を獲得し、屋外大量培養試験を実施している⁸⁾。当該株はオイル含有量が60-65%と非常に高く、また生産する脂肪酸はバイオディーゼル燃料に非常に適した組成を有していることが確認されている⁹⁾。そこで我々は同じ培養特性を持つ2種類の微細藻類を冬季～春季、夏季～秋季と使い分けることで、生産プロセスをほとんど変えることなく年間生産が可能になると考え、耐冷性を有する新規オイル高蓄積海洋珪藻株のスクリーニングを行い、培養特性の評価及び屋外培養への適応を行った。

2. 実験方法

2.1 候補株のスクリーニング

日本各地の海水をサンプリングした。回収した各サンプルを、珪藻類の培養に一般的に用いられる f/2 培地¹⁰⁾へ植え継ぎ、低温環境下(10℃)で培養を行い、耐冷性珪藻類のスクリーニングを行った。更にオイルを高蓄積している株をスクリーニングするため、培養10日目の細胞に対し、BODIPY505/515 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を添加し、オイルボディの蛍光染色を行った。蛍光顕微鏡を用いて細胞内オイルボディを観察し、低温環境下で培養可能、かつオイル高蓄積株のスクリーニングを行った。

2.2 低温下での培養特性の評価

候補株の低温下での培養特性の評価として培養条件(光量、温度、CO₂濃度、栄養塩濃度)の検討、低温でのバイオマス生産性及びオイル含有量の評価、及びガスクロマトグラフィー質量(GC-MS)分析装置による脂肪酸組成解析を行った。バイオマス及びオイル含有量は以下の手法により測定した。藻体の培養には、f/2培地の各成分を20倍(シリカのみ80倍)に富栄養化した培地を用い、500 ml 容扁平フラスコを用いて、エアレーション0.8 l/min(2% CO₂)、温度10℃、光量140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で培養を行った。各培養条件の検討

Fig. 1 Open pond reactor (Area: 20 m², Volume: 10,000 l, Depth: 0.5 m)

は、上記の条件を基本培養とし、条件検討の際には対応するパラメータのみを変更した (CO₂ 濃度: 0-8%, 温度: 5-30℃, 光量: 70-260 μmol/m²/s)。藻体を遠心回収 (6,500 g, 10 分間) し、ペレットを蒸留水で2回洗浄した後、凍結乾燥した。得られた乾燥藻体を秤量し、バイオマス量を測定した。乾燥藻体を乳鉢、乳棒を用いて5分間破碎した後、*n*-ヘキサン 5 ml を加え、遠心分離 (1,000 g, 5 分間) した後、上清を分取した。ペレットに対し再度ヘキサン 4 ml を添加し、同様に遠心し、回収した上清をアルゴンガス雰囲気下で 80℃ に加熱し、ヘキサンを揮発させた。抽出物を秤量し、乾燥藻体重量あたりのオイル含有量を算出した。GC の条件として、カラム FAME WAX (30 m, 0.25 mm (I.D.)), 0.25 μm film, RESTEK, Bellefonte, PA, USA) を用いて昇温法により分析した。昇温条件は、140℃ で5分間保持した後、4℃ / 分間で昇温し、240℃ で10分間保持した。MS のイオン化法として電子衝撃法を用いた。脂肪酸の標品として 37 component FAME standard (Sigma Aldrich, MO, U.S.) を用い、同様に GC-MS により分析を行った。

2.3 屋外における実証試験

電源開発 (株) の若松研究所 (福岡県北九州市) において、当該株を用いた屋外培養を以下の培養条件で行った。Open pond 型培養槽 (底面積: 20 m², 水面の高さ: 50 cm, 容積: 10,000 l) (Fig. 1), f/2 培地のシリカ濃度を4倍にした改変 f/2 培地, 初期藻体濃度 0.05 g/l, 通気処理無し, 浮遊型の攪拌装置を用いて 2014/11/25 ~ 2014/12/5 の10日間培養を行った。

3. 結果及び考察

3.1 候補株のスクリーニング

海水サンプルを1週間培養した結果、70 コロニーを獲得した。これらの候補株を培養し、蛍光顕微鏡を用いてオイル含有量の高い株をスクリーニングした結果、北九州市沿岸の海水から JPCC CTDA0820 株が選抜された (Fig. 2)。当該株は細胞内に2つのオイル蓄積オルガネラであるオイルボディを持ち、これまでに獲得している *F. solaris* JPCC

Fig. 2 Microscopic images of *F. solaris* JPCC DA0580 and JPCC CTDA0820 stained with BODIPY 505/515. Arrows indicate oil body (A),(C): Differential interference contrast (DIC) images (B),(D): Fluorescent images. Scale bars = 10 μm

DA0580 株と非常に似た形態を持つことが確認できた。また 18S rDNA 配列から分子系統解析を行った結果、当該株は羽状目珪藻 *Mayamaea* 属と相溶性 99% を示し、*Mayamaea* 属であることが示唆された。

3.2 低温下での培養特性の評価

3.2.1 至適培養条件 (屋内環境) の検討

培養条件として至適光量, 培養温度, CO₂ 濃度, 栄養塩濃度の検討を行った結果をまとめた (Table 1)。*F. solaris* JPCC DA0580 株と比較するとシリカと CO₂ の要求性が高いことが確認された。つまりシリカ濃度以外に培養特性に大差がないことが確認された。低温下 (10℃) と至適培養温度 (25℃) でのバイオマス生産性及びオイル含有量の測定を行った結果、10℃ 及び 25℃ においてそれぞれ 270 mg/l 及び 307 mg/l, オイル含有量はそれぞれ 47% 及び 60% であった。このことから至適条件よりは低下するものの、十分なバイオマス生産性及びオイル含有量を有していることが確認できた。またこれまで用いている *F. solaris* JPCC DA0580 株よりも低光量でも生育が可能であるという特徴を有しており、これにより培養槽を深くすることが可能であり単位面積当たりの生産性向上に寄与できると考えられた。

更に低温での脂肪酸組成を解析した結果、主な脂肪酸組成はパルミチン酸 (C16:0), パルミトレイン酸 (C16:1), ステアリン酸 (C18:0), オレイン酸 (C18:1) であり、全脂肪酸の 70% を占めることが示された (Table 2)。またバイオディーゼル燃料の品質低下に繋がる不飽和結合数の増加や炭素鎖長の変化など、温度変化による大きな変化は見られなかった。よって当該株は低温下においてもバイオ燃料生産に適した脂肪酸を合成可能な株であることが示された。

Table 1 Comparison of selected traits of *F. solaris* JPCC DA0580 and JPCC CTDA0820

Growth characteristics	JPCC CTDA0820	<i>F. solaris</i> JPCC DA0580
Optimum temperature (°C)	25	25
Growth at 10 °C	+	-
Optimum light intensity ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)*	140	500
Optimum CO ₂ (%)**	4	2
Maximum oil content (%)	60 (25 °C) ; 47 (10 °C)	65 (25 °C)
N:P:Si (mol)	24:1:12	24:1:3
Biomass productivity ($\text{g}/\text{m}^2/\text{day}$)* ²	31	64
Oil productivity ($\text{g}/\text{m}^2/\text{day}$)* ²	9.8	23.9

* Medium: modified 10f medium.

** *Mayamaea* sp. cultivated at 10 °C, *F. solaris* JPCC DA0580 cultivated at 25 °C. Both diatoms cultivated in modified f medium at 140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Table 2 Fatty acids composition of *Mayamaea* sp. JPCC CTDA0820 under the cold temperature

Fatty acids	Cultivation temperature	
	10 °C	25 °C
C12:0	1.6 ± 2.6	1.8 ± 3.1
C14:0	7.0 ± 1.4	8.6 ± 2.5
C15:0	2.5 ± 1.7	3.8 ± 1.6
C16:0	16.3 ± 4.6	15.8 ± 2.3
C16:1	40.8 ± 18.9	34.7 ± 6.2
C17:0	1.0 ± 1.5	0.8 ± 1.4
C17:1	1.0 ± 1.4	1.8 ± 1.6
C18:0	1.6 ± 2.5	6.1 ± 2.7
C18:1c	8.2 ± 6.3	6.6 ± 5.9
C18:1t	4.3 ± 3.4	6.9 ± 3.1
C18:2c	2.7 ± 1.5	0.8 ± 1.4
C18:2t	2.0 ± 1.5	0.7 ± 1.2
C18:3	2.4 ± 1.2	3.3 ± 1.4
C20:0	1.5 ± 2.5	-
C20:2	1.2 ± 2.0	-
C20:3	2.1 ± 1.8	3.6 ± 1.5
C20:5	4.2 ± 0.4	4.7 ± 1.1

3.3 屋外での実証試験

本培養装置はEPRの向上を目指し、投入するエネルギーを削減している。攪拌には浮遊式攪拌装置を用いることで、培養容積に対する投入エネルギーの大幅な削減が可能であり、現状用いている *F. solaris* JPCC DA0580 株においては $\text{EPR} > 1.5$ が見込まれている。また CO₂ 供給は培地の pH を制御する目的でわずかに供給しているが、温度制御、装置及び培地の滅菌操作、光照射などは行っていない。本培養期間 (2014/11/25 ~ 2014/12/5) において、平均水温は 11.6 °C (4.3 ~ 18.7 °C) であった。前培養した藻体を初期濃度 0.05 g/l で植え継ぎし、培養 10 日間でバイオマス量は 0.15 g/l に到達することが確認された。また、当該株は、11 月 ~ 3 月の冬季の屋外培養試験を実施し、培地等の滅菌処理など行わず他の細菌の混入などの影響を受けても、屋外で優先的に増殖し、大量培養が可能であることが示された。しかしながら、*F. solaris* JPCC DA0580 株と比較するとバイオマス及びオイル生産性の低下が見られた。これは低温下での培

養であることが大きな原因の 1 つであることに加え、その他に、JPCC CTDA0820 株が CO₂ の要求量が *F. solaris* 株よりも高いことに由来することも考えられた。今後は EPR を考慮しながら、CO₂ の添加を行うなどして生産性と EPR のバランスの取れるシステムに改良する必要がある。

4. 結 言

本研究ではバイオディーゼル燃料の安定供給を目指し好・耐冷性オイル高蓄積珪藻のスクリーニングを行った。その結果、5-28 °C まで培養可能な *Mayamaea* 属 JPCC CTDA0820 株を選抜した。JPCC CTDA0820 株は低温環境下においても、十分なバイオマス生産性及びオイル含有量を有していることが確認できた。更に 11 月 ~ 3 月で屋外培養試験を実施し、屋外培養可能であることを明らかにした。さらに、低温下での培養特性を評価した結果、シリカの要求性が *F. solaris* JPCC DA0580 株よりも高く、組み合わせた生産プロセスを構築するためには、僅かに培地を改変する必要性がある一方で、*F. solaris* JPCC DA0580 株よりも至適光量が低いため、高層化培養が可能であるといった特徴を有していることが確認された。

本研究ではこれまであまり評価されていない安定供給という面に着目し、耐冷性を有するオイル高蓄積珪藻をスクリーニングした。低エネルギー化した屋外培養システムへ応用し、屋外での大量培養への適応の可能性を示した。本結果よりこれまで用いている *F. solaris* JPCC DA0580 株と組み合わせたバイオディーゼル燃料の年間生産プロセスの基盤技術が構築できた。

謝 辞

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 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 (次世代技術研究開発) の助成を受けたものである。

文 献: References

- 1) Inderwildi, O. R.; King, D. A., *Energy Environ. Sci.*, **2**, 343-346 (2009)
- 2) Yusuf, C., *Biotechnol. Adv.*, **25**, 294-306 (2007)

- 3) Batan, L.; Quinn, J.; Willson, B.; Bradley, T., *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 7975-7980 (2010)
 - 4) Slegers, P. M.; Lösing, M. B.; Wijffels, R. H.; van Straten, G.; van Boxtel, A. J. B., *Algal Res.*, **2**, 358-368 (2013)
 - 5) Ahn, J.-W.; Hwangbo, K.; Lee, S. Y.; Choi, H.-G.; Park, Y.-I.; Liu, J. R.; Jeong, W.-J., *Bioresour. Technol.*, **125**, 340-343 (2012)
 - 6) Nelson, D. R.; Mengistu, S.; Ranum, P.; Celio, G.; Mashek, M.; Mashek, D.; Lefebvre, P. A., *Biotechnol. Prog.*, **29**, 853-861(2013)
 - 7) Jin, X.; Hu, H., *Bioresour. Technol.*, **144**, 637-643 (2013)
 - 8) Sato, R.; Maeda, Y.; Yoshino, T.; Tanaka, T.; Matsumoto, M., *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 720-724 (2014)
 - 9) Liang, Y.; Maeda, Y.; Yoshino, T.; Matsumoto, M.; Tanaka, T., *Mar. Drugs.*, **12**, 3218-3230 (2014)
 - 10) Guillard, R. R. L., *Cult. Mar. Invertebr. Anim.*, **29**-60 (1975)
-