# 製鉄副産物を活用した微細藻類バイオマス生産の 開発に向けた基礎検討

# Basic Study on Development of Microalgal Biomass Production Utilizing By-products of Steel Industry

吉 村	航*	小 杉 知 佳	加	藤	敏	朗
Ko YOSHIMU	JRA	<i>Chika KOSUGI</i>	Tosh	iaki	KAT	0
三 木 Osamu MIKI	理	宮 下 英 明 Hideaki MIYASHITA				

抄 録

近年, CO<sub>2</sub> 削減技術としての微細藻類バイオマス生産に注目が集まっている。そこで, 我々は製鉄所 の副生資源を利用した微細藻類培養技術の開発を目指し研究を開始した。製鉄所の排水処理設備から分 離した単細胞緑藻 (NS001C 株) は高増殖性とアンモニア耐性を有していた。NS001C 株を小規模の固 相表面培養に適用したところ, 1%CO<sub>2</sub> の供給により最大で 15.4g/m<sup>2</sup>/d のバイオマス生産性が得られ, 太陽光を効率的に利用した場合, 20-30g/m<sup>2</sup>/dと既存技術の5倍程度の生産性が実現できる可能性が ある。このことから固相表面培養は大規模培養において, 高バイオマス生産性を実現するうえで有望な技 術であると考え, 今後は大規模培養装置の開発などに取り組んでいく。

#### Abstract

Microalgal biomass production has attracted attention as a technology for CO<sub>2</sub> emission reduction for recent years. We started the research on development of the microalgal culture system utilizing by-products generated in steel works. A unicellular microalga (NS001C strain) isolated from the wastewater treatment equipment in steel works showed high growth rate with high ammonia tolerance. In the experiments in which NS001C strain was applied to the small-scale substrate surface culture, the maximum biomass productivity was 15.4 g/m<sup>2</sup>/d. By the effective utilization of the sunlight into the system, the biomass productivities can be realized to be 20–30 g/m<sup>2</sup>/d which was more than 5 times higher than that of current pond system theoretically. We concluded the substrate surface culture is a hopeful technique to achieve high biomass production in large-scale culture of microalgae and will work on the development of a large-scale bioreactor.

# 1. 緒 言

近年,地球温暖化による気候変動の影響が異常気象などの目に見えるかたちで現れつつあり,温室効果ガス排出量の削減は喫緊の課題となっている。様々な省エネルギー技術の開発は依然として重要な課題ではあるものの,削減できる CO<sub>2</sub>の量には自ずと限界がある。CO<sub>2</sub>排出の主たる原因である化石燃料への依存度を減らし,太陽光や風力などの再生可能エネルギーの利用を推進していくことが世界的な潮流になっている。そうした中で,バイオマスのエネルギー利用にも注目が集まっている。バイオマスは元来,生態学において生物の物質量を表す言葉であるが,近年では

生物由来の資源を指す言葉として用いられている。バイオ マスに含まれる炭素は、植物や藻類の光合成によって固定 された大気中の CO<sub>2</sub>に由来する。バイオマスの生成から消 費までの過程を全体で考えると、大気中の CO<sub>2</sub> 濃度が変化 しないことから、カーボンニュートラルなエネルギー源で あるとされている<sup>1)</sup>。しかしながら、廃棄物系のバイオマス などの、自然環境に悪影響を与えずに利用できるバイオマ スの現存量には限りがある。そこで、バイオマスを再生可 能エネルギーとして持続的に利用していくためには、その 生産の過程から人為的に行う必要がある。そうした観点か ら近年注目されているのが、微細藻類を利用したバイオマ ス生産である。

微細藻類は、陸上植物以外の酸素発生型光合成を行う生 物のうち、顕微鏡サイズのものを指す。微細藻類は陸上植 物と比較して、バイオマス生産に適した多くの特質があ る2)。そのひとつが、増殖性の高さである。微細藻類の増 殖速度は種や株により大きく異なるが、速いものでは数時 間たらずで、2倍のバイオマス量に増殖できる。この微細 藻類の増殖性の高さをうまく引き出すことができれば、陸 上植物よりもはるかに効率が良いバイオマス生産が可能に なる。また、培養に土壌を必要としないことから、既存の 農業との用地をめぐる競合が少ない点も利点として挙げら れる。さらに、様々な環境に適応した藻類が存在するため、 多様な培養条件に適用できることも利点である。一般的に 陸上植物は海水では育たないが、微細藻類には海産性の 様々な種が存在する。適用できる培養条件が広いことは, 排水などの未利用資源の利用にもつながる。排水処理過程 に微細藻類を利用し、排水処理とバイオマス生産を両立す るという研究例もある3。さらに、油脂含量が高い点も利点 として挙げられる。微細藻類には、バイオマス重量の50% を超える脂質を蓄積することができる種や株も存在する2)。 この値は、パーム椰子などの油脂生産作物よりもはるかに 高い。このことから、微細藻類バイオマスは特に次世代の バイオ燃料の原料として期待されている。このようにバイ オマス生産に適した多くの特性を有することが、微細藻類 バイオマス生産が世界的に注目されている理由である。

日本製鉄(株)では CO, 排出量を削減するための様々な技 術開発を進めている。その中のひとつが微細藻類によるバ イオマス生産研究である。我々が微細藻類バイオマスに着 目したのは、先述した理由に加え、製鉄の過程で発生する 副産物の有効利用につながると考えたためである。特に製 鉄排水は、微細藻類を培養する培地としての利用が期待で きる。製鉄排水のほとんどは製鉄所内で循環利用されてい るが、再利用が困難な排水であるコークス炉排水にはコー クス由来のアンモニアが高濃度で含まれている。微細藻類 にとって窒素は必要量の多い栄養素であり、窒素源として アンモニアを利用することができれば. 副産物の有効利用 のみならず、従来のバイオマス生産コストの削減、排水の 環境負荷の低減にもつながる。また製鉄所から排出される CO,を多く含むガスも、微細藻類の増殖を促進するために は好都合である。さらに、製鉄所には未利用の低温排熱が 多く存在し、これらを微細藻類の培養温度を維持するため の冬場の熱源として活用できる可能性がある。また、製鉄 の副産物である製鋼スラグ中には微細藻類の必須栄養素で あるリンが多量に含まれており、肥料としての利用が見込 まれる。こうした製鉄所内の未利用資源を有効活用するこ とで、省コスト、省エネルギーのバイオマス生産システム を構築することができるのではないかと考えた。

微細藻類の大規模培養は、クロレラ、ユーグレナ、スピ ルリナなどの数種の微細藻類で実用化しているが、それら の目的は、健康食品や色素などの有用成分など、高付加価 値品の原料に限られてきた。バイオ燃料などのエネルギー 生産を目的とした大規模培養技術は、特に 2000 年代以降、 世界中で多くの研究機関や企業が研究開発を行っているも のの,依然として実用化には至っていない。微細藻類バイ オマス生産の実用化は極めて難しい課題であるが、生産に 利用可能なインフラが多く整っている製鉄所において実現 すれば有効な CO, 削減技術となりうる可能性を秘めてい る。そこで我々は、製鉄所に導入可能な微細藻類の大規模 培養技術の開発を目指して研究を行っている。これまでの 研究では、まず培養対象となる藻類株の採取と単離から始 め、得られた候補藻の特性評価を行った。そして候補藻の 増殖性を最大限に生かすため、従来の液体培養法とは異な る固相表面培養法の検討を行った。固相表面培養はガス交 換と太陽光の利用効率に優れる培養法であり、微細藻類の 生産性を大きく高める技術として期待できる。本稿では, それらの研究について紹介する。

# 2. 本 論

## 2.1 培養株の単離と特性評価

## 2.1.1 背景

微細藻類を用いたバイオマス生産系を構築するにあた り、培養株の選定は最も重要な課題である。微細藻類の特 性は種や株により大きく異なるため、目的に適した特性を 有する株を選択することが求められる。バイオマス生産に は、培養環境への適用性、培養し易さ、高増殖性、脂質や 炭水化物の高蓄積などの特性を備えていることが望まし い。我々の培養系では、安水の利用を前提にしているため、 まず安水中で生育可能な株を選定することとした。

安水に含まれるアンモニアは、藻類の栄養素であると同 時に、高濃度では毒性を示すことが知られている<sup>4</sup>。また、 安水はその処理の過程で、海水を用いて希釈されているた め、培養株には少なくともアンモニア耐性と耐塩性が必要 である。候補株を選定する主な方法としては、大学や微生 物株保存機関(カルチャーコレクション)が保有する藻類 株の中から選別する方法と、環境中から独自に新しい株を 採取する方法の二つが考えられる。高濃度のアンモニアを 含む海水からの藻類の分離例がないことから、既知の藻類 株で安水に適用できる株は少ないと考えられた。そこで、 まず実際の安水処理設備から上記条件で生育可能な藻類を 採取し、その中から増殖の速い株を選別するほうが効率的 であると考え、製鉄所の安水処理設備から、培養株の候補 となる藻類の単離を行った。

前項で単離した株を培養株として培養系を構築するにあ たり、まず株の特性を把握するための実験を行った。特に バイオマス生産能力に直結する特性として重要な増殖速度 を明らかにすることとした。また、安水に適用するにあたり、 必要となるアンモニア耐性を評価するため、アンモニア濃 度と生育速度の関係を検討した。

## 2.1.2 材料と方法

製鉄所の安水処理設備に付着したバイオフィルムのうち、目視で緑色がかった箇所をこすり落とし、少量の廃水とともに回収して、これを藻類試料とした。試料を寒天平板培地(ろ過天然海水にダイゴIMK 培地(富士フイルム和光純薬(株))を終濃度250 mg/Lとなるよう添加、寒天1.5%)に塗布し、人工気象器((株)日本医科器械製作所、LPH-411PFD-SP)で静置培養(温度:25℃、明暗周期:(14L:10D)、光量子束密度:約100µmol/m²/s)した。寒天平板上に出現した緑色コロニーをマイクロループで釣菌し、新たな寒天平板培地に植え継ぐことを繰り返した。このとき、コロニー出現までの日数が短く、コロニーの拡大速度が大きいものを数株選別し、植え継ぎを繰り返すことで無菌化を行った。そのうちの一株をNS001C株と命名し、光学顕微鏡((株)ニコン、DS-Fi2)で観察を行った。また種の同定のため18S rRNA 遺伝子配列解析(外注)に供した。

強化海水培地 (天然海水 1L に PES 培地<sup>5</sup>を 20ml 添加 したもの)で前培養した NS001C 株を波長 730nm における 濁度が 0.01 となるよう, 30ml の海水培地に植え継ぎ, シ リコ栓で蓋をした 100ml 容バッフル付き三角フラスコに入 れ,人工気象器内で 120rpm の振盪培養 (温度:25℃,明 暗周期:(14L:10D),光合成光量子束密度:約 150µmol/ m<sup>2</sup>/s)を行った。約 2 時間ごとに 1ml の培養液を分取し, 波長 730nm における濁度を分光光度計((株)日立ハイテク サイエンス,U-2910)で測定することで対数増殖期におけ る増殖曲線を作成した。

窒素を含まない PES 培地 (PES 培地から硝酸ナトリウム を除いたもの,以下 N-PES 培地)を調製し,N-強化海水 培地 (天然海水 1L に N-PES 培地を 20ml 添加したもの) を調製した。また,塩化アンモニウム溶液(20000mg/L as N) を調製した。100ml 容バッフル付き三角フラスコに,塩化 アンモニウム溶液を適量加え,N-強化海水培地で 30ml に 調製し,アンモニア態窒素濃度が異なる (0,20,40,80,150, 300,1000mg/L as N)7種類の培地を作製した。先述と同様 に前培養した NS001C 株を,それぞれの培地に濁度が 0.1 となるよう植え継ぎ,先述と同様の条件で培養 0,1,2,3日 目に,1mlの培養液を分取し,濁度を測定することで増殖 曲線を作成した。

# 2.1.3 結果と考察

NS001C株の光学顕微鏡観察の結果を図1に示した。 NS001C株は緑色の楕円球形の単細胞藻で、細胞の直径は約3-8µmであった。内生胞子形成による増殖が確認された。18SrRNA遺伝子配列解析の結果、トレボウクシア藻 綱 Chlorella 属または Parachlorella 属に近縁であり、新属 新種株である可能性が示唆された。 NS001C 株の他にも数株の単細胞藻類株の単離に成功したが、寒天平板上における簡易的な増殖性の比較実験において、NS001C 株が最も優れていたこと (データは示していない), Chrorella に近縁な藻類には増殖性に優れた株がこれまでに見出されていることからの、NS001C 株を暫定的な培養株として選定し、以降の研究を行うこととした。

図2にNS001C株の対数増殖期における増殖曲線を示した。濁度は指数的な増加を示した。縦軸を対数変換(底数2) し、近似直線の傾きから算出した濁度の倍化時間は4.54h であり、比増殖速度に直すと0.15h<sup>-1</sup>であった。実験条件 が異なるため直接的な比較は難しいが、先行研究では増殖 性に優れる *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230の比増殖速度 が0.12h<sup>-1</sup>と報告されており<sup>7</sup>, NS001C株が極めて高い増 殖性を示すことが明らかになった。

図3に各アンモニア濃度における増殖曲線を示した。増 殖性はアンモニア態窒素濃度が20mg/Lのとき最も良く, アンモニア濃度が上がるにつれ徐々に低下したが,1000 mg/Lにおいても直線的な増殖がみられた。非常に高濃度 のアンモニアでも増殖が認められたことから,NS001C株 は安水に適用するのに十分な,アンモニア耐性を有してい ることが明らかになった。

以上から, NS001C株は既存株と比較しても高い増殖性



# 図1 NS001C株の光学顕微鏡写真

Microphotographs of NS001C strain Cells of NS001C strain cultured with 14L/10D light-dark cycles were observed at three different time points in a light period. Left: autospores. Middle: vegetative cells. Right: an autosporangium.



図2 NS001C株の対数増殖期における増殖曲線 Growth curve of NS001C strain in log phase Optical density at 730 nm of culture solutions were measured by a UV-Vis spectrometer. The symbols indicate the mean value of three cultures. The error bars indicate the standard deviations.



図3 種々のアンモニア濃度における NS001C 株の増殖曲線 Growth curves of NS001C strain under various ammonia concentrations

Optical density at 730 nm of culture solutions were measured by a UV-Vis spectrometer.  $\diamond$ : NH<sub>4</sub>-N 0mg/L,  $\square$ : NH<sub>4</sub>-N 20mg/L,  $\triangle$ : NH<sub>4</sub>-N 40mg/L,  $\times$ : NH<sub>4</sub>-N 80mg/L, +: NH<sub>4</sub>-N 150mg/L,  $\blacklozenge$ : NH<sub>4</sub>-N 300mg/L,  $\blacksquare$ : NH<sub>4</sub>-N 1000mg/L.

を有しており、またアンモニアに高い耐性があることが明 らかになった。この他にも淡水から海水で増殖可能な塩分 耐性を有することも明らかになった(データは示していな い)。これらのことから、NS001C株は製鉄排水を利用した 藻類培養システムにおける培養株として適切であると考 え、以降この株を用いて研究を行うこととした。なお、上 記の特性を踏まえ、NS001C株は独立行政法人製品評価技 術基盤機構の特許生物寄託センターへ特許微生物(受領番 号:FERM AP-22328)として寄託した<sup>8</sup>。

## 2.2 固相表面培養法の検討

## 2.2.1 背景

候補株 NS001C 株を用いた高効率のバイオマス生産/ CO<sub>2</sub> 回収系の構築を目指した小規模の実験を従来の液体培 養法によって何度か実施したが,当初期待した高いバイオ マス生産性は得られなかった。液体培養法では NS001C 株 の高増殖性が,細胞密度が極めて低いときにしか発揮され ず,培養により密度が高まると,増殖性は顕著に低下した。 この原因が,光合成に必要な光と CO<sub>2</sub> が不足するためであ ると考え,これを解決するためには,培養法を見直すこと が必要であると考えた。

従来, 微細藻類の培養には, 液体培地中に藻を懸濁し, 攪拌しながら培養する液体培養法が一般的である。大規模 培養においても、オープンポンドやフォトバイオリアクター による液体培養が用いられている。液体培養法はほとんど の藻類に適用できる優れた培養方法であるが,二つの大き な問題があると考える。ひとつは、ガス交換が難しいこと である。藻は光合成により培地中の CO<sub>2</sub> を消費し, O<sub>2</sub> を放 出する。光合成が活発になると,培地中の CO<sub>2</sub> 濃度が低下, O<sub>2</sub> 濃度が上昇することで,光合成速度が低下する。この 問題は、培地に CO,を含むガスを通気することで改善でき るが、CO<sub>2</sub>の水中への溶解速度は遅く、藻に十分な CO<sub>2</sub>を 供給することは容易ではない。もうひとつは光の利用効率 が低いことである。藻の細胞自体が光を遮蔽するため、藻 が高密度になると培養液の内部には光はほとんど届かな い。一方、太陽光の利用を考えると別の問題もある。光合 成は太陽光のような強い光を利用することができないため、 培養液の表層においても光を効率よく利用することができ ない。このことから、液体培養における光の利用効率はそ れほど高くない。

そこで、微細藻類の高い増殖性を引き出し、バイオマス 生産性の向上につなげるため、藻を担体の表面に担持して 培養する固相培養、表面培養などと呼ばれる培養法の、中 でも、藻を気相中で培養する方法(以下、固相表面培養法 とする)に着目した<sup>9,10</sup>。この方法では、藻は担体上に少量 の水分を含むペーストのような状態で担持されており、気 相と固相(担体)の両方に接している(図4)。担体をスポ ンジのような多孔質体にし、そこに液体培地を含ませるこ とで、藻は水分と栄養を担体から得ることができる。

この固相表面培養法には大きく三つの利点があると考え る。ひとつは、液体培養法に比べてガス交換の速度に優れ る点である。藻は気相に接しているため、気相から CO<sub>2</sub>を 取り込み、また O<sub>2</sub>を放出することが可能である。二つ目は、 光の利用効率を向上できる点である。藻類バイオマス生産 では、太陽光の利用が前提となるが、光合成によって太陽 光をすべて利用することは難しい。太陽光の地上付近にお ける光合成光量子束密度 (Photosynthetic Photon Flux Density, 以下 PPFD) は、最高で 2000 µmol/m<sup>2</sup>/s を超える。一方で、 光合成速度はある PPFD 以上で一定になることが知られて おり、光飽和点と呼ばれている。その値は、種によって異 なるが、概ね 50-500 µmol/m<sup>2</sup>/s 程度であることが報告され ている<sup>11</sup>。藻に強い太陽光が当たったとき、光飽和点を超



#### 図4 固相表面培養の概念図

Conceptual drawing of substrate surface culture Algae are cultured on porous substrates in a gaseous phase. Light is supplied to algae through the gaseous phase, while water and nutrients are supplied from the substrates filled with a culture medium. Algae can take CO<sub>2</sub> up from the gaseous phase and discharge O<sub>2</sub> into it. える光は光合成に有効に利用されず,バイオマス生産に寄 与しない。この問題を解決する方法として,受光面積を増 やすことで,太陽光の強さを低減して利用する方法が考え られる。固相表面培養法では藻を担持した担体の設置の仕 方には自由度があるため,太陽光に対して,担体の設置角 度を変えることで,担体表面での藻にあたる光の強さを変 えることが可能である(図5)。また,このようにすることで, 設置面積当たりの担体表面積,つまり培養に利用する面積 を増やすことができる。結果として,より広い面積で太陽 光を効率よく利用し,バイオマス生産性を向上させること が可能である。藻が液体中に無秩序に懸濁されている液体 培養法においては,このような工夫は困難である。

三つ目は、密度の高いバイオマスが回収できる点である。 固相表面培養法では藻が少量の水分を含むペースト状であ り、バイオフィルムの水分含量が低い。このため、バイオ マスを回収した後、脱水処理にかかるコストを大幅に低減 することが期待できる。微細藻類バイオマス生産において はバイオマス回収後の脱水、乾燥の過程にかかるエネル ギーコストが大きいことが指摘されており<sup>12)</sup>、水分含量の 低いバイオマスが得られることは、エネルギー収支を改善 するうえで大きな利点となりうる。

以上のことから,固相表面培養法は微細藻類の大規模培 養における生産性の課題を解決する技術となると考えた。 一方で,液体培養法に比べて研究例が乏しく,培養手法も 確立されているとは言い難い。また,海水性の微細藻類を 固相表面培養法に適用した例は少なく,NS001C株が固相 表面培養法に適用できるかは未知数であった。そこで,我々 はまず小規模の固相表面培養系を採用し,NS001C株の固

The sunlight (PPFD 2,000 μmol/m²/s) PPFD 2,000 μmol/m²/s PPFD 2,000 μmol/m²/s

図 5 固相表面培養による太陽光の有効利用の概念図 Conceptual drawings of effective utilization of sunlight by substrate surface culture

When substrates are arranged vertically to the direction of the sunlight, algae can not utilize the sunlight efficiently because PPFD on the substrates exceeds their light saturation point (left). When the substrates are arranged diagonally in order to decrease PPFD on the surfaces of substrates to the saturation point or lower, algae can utilize the sunlight more efficiently with the wider area of substrate surface than in the left situation (right). 相表面培養法への適用性を検証するとともに,そのバイオ マス生産性を定量的に測定する実験を行った。

# 2.2.2 材料と方法

藻を担持したガラスフィルターを,液体培地を含ませた スポンジ上に設置し、培養を行う固相表面培養の実験系を 用いた (図 6)。液体培養 (ろ過滅菌海水+ダイゴ IMK (富 士フイルム和光純薬))で前培養したNS001C株の培養液を, 予め風袋重量を測定した 47mm 径のガラスフィルター (GE Health Care, GF/F) でろ過し、バイオマス密度が 1 mg/cm<sup>2</sup> 程度となるようにフィルター上に藻を担持した。培地には, 人工海水(富田製薬(株),マリンアート SF-1)に強化培地(富 士フイルム和光純薬,ダイゴ IMK 培地)を栄養塩の枯渇を 防ぐため規定量の2倍濃度で添加した海水培地を用いた。 縦 148mm, 横 84mm, 深さ 32mm の透明なポリスチレン 製プラスチック容器に容器底面積よりやや小さな面積の厚 さ 10mm の PVA スポンジ (アイオン(株), ベルイーター D) を入れ、海水培地 120ml を添加して、スポンジに培地を含 ませた。各容器のスポンジ上に NS001C 株を担持したフィ ルターを3枚ずつ並べ、容器の蓋を開けたまま透明なチャッ ク付きビニール袋に入れて密封した。これを、温度25℃の 培養室内で明期14時間, 暗期10時間に設定したLED照 明の下に設置し、袋に空気または空気とCO,を100:1で 混合したガス(以下1%CO,)を洗気瓶中の滅菌蒸留水に通 気したものを、シリコンチューブでそれぞれ導入した(一 容器当たりの流量:約 150 ml/min)。LED 照明とフィルター との距離を調整することで、フィルター表面における光の 強さを変え PPFD を光量子計(日本医科器械製作所,LA-105) で測定した。2日間培養後に、培地を全量交換した。 3日間培養後にフィルターを回収し、吸引ろ過装置の上に 載せ、真空ポンプで吸引しながらフィルターおよび、フィ



#### 図6 固相表面培養の写真

A photograph of substrate surface cultures Algae are cultured on glass filters placed on sponges filled with a culture medium in plastic cases. Upper: three-day cultures supplied with air. Lower: three-day cultures supplied with  $1\%CO_2$ . ルター上の NS001C 株を 5 ml の蒸留水で洗浄した。これを 乾熱器に入れ、110℃で一晩乾燥した後、乾燥後の重量を 測定した。フィルターの培養後の重量と、風袋重量との差 から、担持面積当たりの NS001C 株の増加量を算出し、そ こからバイオマス生産性を求めた。

# 2.2.3 結果と考察

実際の固相表面培養の実験の様子を図6に示した。CO2 濃度と光条件を変えて実施した3回の実験の結果をまとめ て図7に示した。横軸に培養時のPPFDを、縦軸にバイオ マス生産性をとった。いずれの条件でも、フィルター上の 藻の増加が目視と重量変化で確認され,NS001C株は海水 培地を用いた固相表面培養で培養可能であることが確認さ れた。空気を供給した条件では、PPFD が 131 μmol/m<sup>2</sup>/s ま では、生産性が増加する傾向がみられたが、それ以上の PPFD では生産性は 2.9-3.8g/m<sup>2</sup>/dの間でほぼ一定となっ た。一方, 1%CO, を供給した条件では, PPFD が約 264 µmol/m<sup>2</sup>/s までは生産性が増加したが、それ以上の PPFD では、約12.4-15.4g/m<sup>2</sup>/dで一定となる傾向がみられた (PPFD 1357 µmol/m<sup>2</sup>/s における値は極めて誤差が大きく, ここでは外れ値と考えた)。以上の結果から、空気の代わ りに1%CO、を供給することで、バイオマス生産性の最大 値が約4-5倍に向上し、またバイオマス生産性が頭打ちに なる PPFD が約2倍に上昇することが示された。

この結果は, PPFDと光合成速度の関係から解釈できる。 先述した通り,光合成速度は PPFD が低いうちは光量子束 密度に対して直線的に増大するが,光飽和点以上では光合 成速度は一定になることが知られている<sup>13)</sup>。また,空気中



図7 種々の PPFD における NS001C 株のバイオマス生産性 Biomass productivities of NS001C strain cultured with lights of various PPFDs

 $\diamond$ : supplied with air,  $\Box$ : supplied with 1%CO<sub>2</sub>. The results of three independent experiments are shown in this graph. The symbols indicate mean values of three cultures. Error bars indicate the standard deviations.

の CO<sub>2</sub> 濃度 (約 400 ppm) では、CO<sub>2</sub> が光合成の律速要因 となっており、CO<sub>2</sub> 濃度の上昇は、光合成速度と光飽和点 の上昇につながることが知られている。藻の増殖が活発な 条件では、バイオマス生産性は光合成速度に概ね比例する と考えることができ、そのために上記の結果が得られたと 考える。

空気の代わりに CO, を供給することで、大幅な生産性の 向上がみられた。今回得られたバイオマス生産性の最大値 は 15.4g/m<sup>2</sup>/d (外れ値を除く) だが、太陽光の利用を考慮に 入れれば、生産性はより向上する可能性がある。先述した ように固相表面培養法では,担体の設置の仕方を工夫する ことで、太陽光を効率よく利用できる可能性がある。太陽 光に対して、担体を斜めに設置し、担体表面における太陽 光の PPFD を光飽和点以下にしつつ,培養装置の設置面積 当たりの担体表面積を増やせば、これまで利用できていな かった一部の太陽光を含め太陽光のほとんどを光合成に利 用することが可能である。実際には太陽の高度や方角は季 節や時間によって変化し、また培養装置自身による光の遮 蔽もあるため、話はそれほど単純ではない。しかし、ここ ではそうした制約を無視し、1%CO,を供給した条件におけ る実験値から、太陽光下における理論的なバイオマス生産 性を以下の式(1)より求めた。

$$\mathbf{P}_{\mathrm{t}} = \mathbf{P}_{\mathrm{m}} / \mathbf{L}_{\mathrm{e}} \times \mathbf{L}_{\mathrm{s}} \tag{1}$$

 $P_t$ : 理論的なバイオマス生産性  $[g/m^2/d]$ 

P<sub>m</sub>:実験で求めたバイオマス生産性 [g/m<sup>2</sup>/d]

L<sub>e</sub>: 実験で用いた日積算光量 [mol/m<sup>2</sup>/d]

L<sub>:</sub>:太陽光下での日積算光量[mol/m<sup>2</sup>/d]

ここで, 日積算光量 (Daily Light Integral, DLI) は, PPFD を一日当たりの積算量に変換した値であり、単位は mol/m<sup>2</sup>/d である。実験で用いた日積算光量(L\_)は、実験で用いた光 条件の PPFD を明期の長さ (14h) で積算することで算出し た。また、太陽光下における日積算光量(L)は、先行研究 を参考に 25 mol/m²/d とした。これは日本における日積算光 量として年間の平均的な値に近いと考える14%。各実験値か ら算出した理論的なバイオマス生産性を表1に示した。理 論的には約 20-30g/m<sup>2</sup>/d の生産性が実現可能であることが 示唆された。先行研究では、太陽光下での理想的なバイオ マス生産性は33-42g/m²/dと試算されている15)。あくまで 試算値ではあるが、今回これに近い値が得られたことは、 NS001C株を用いた固相表面培養の高バイオマス生産性を 示す結果であると考える。また, CO, 濃度や培地, 担体な どの培養条件を最適化することで、生産性は更なる向上が 期待できる。一方で、試算値を実現するためには、図5に 概念的に示したような太陽光の効率的な利用を実現する培 養装置が必要である。先行研究ではそうした培養装置がい くつか提案されており、比較的規模の大きな実験も行われ ているが?)、まだ技術的に確立しているとは言い難い。そ のため、大規模化が可能な培養装置の開発は今後の課題で

表1 実験値から算出した理論的バイオマス生産性 Theoretical biomass productivities calculated from measured values

Theoretical biomass productivities were calculated from the measured values obtained in the experiments of substrate surface culture with  $1\%CO_2$  supply (data are shown in Fig. 7).

Experimental DDED*1	Measured biomass	Theoretical biomass	
Experimetal PPFD	productivity*2	productivity*3	
[µIII01/III /S]	$[g/m^2/d]$	$[g/m^2/d]$	
80	4.1	25.6	
104	5.3	25.5	
131	8.1	30.6	
132	6.7	25.1	
227	10.5	22.9	
264	12.6	23.8	
328	15.0	22.8	
362	12.4	17.0	
812	15.4	9.4	
1357	18.1	6.6	

<sup>\*1</sup> PPFD used in the experiments.

\*2 Measured values of biomass productivities obtained from the experiments.

\*3 Theoretical biomass productivities at 25 mol/m<sup>2</sup>/d of daily light integral calculated from the measured values.

ある。

# 3. 結 言

CO, 削減に寄与する新たな技術を開発するため、我々は 製鉄所に導入可能な微細藻類大量培養システムの開発を目 指し研究を行っている。本稿では製鉄所からの藻類の単離, 培養株の特性評価、固相表面培養への適用性の検討という 一連の研究について紹介した。製鉄所の排水処理設備から 単離した単細胞緑藻 NS001C 株は,高い増殖性とアンモニ ア耐性を有していた。また、この株は海水培地を用いた固 相表面培養に適用可能であり、1%CO,供給条件において 12.4-15.4g/m<sup>2</sup>/dという高いバイオマス生産性を実現した。 理論的には、太陽光を利用した固相表面培養において 20-30g/m²/d 程度の生産性が達成できる可能性があること が示された。これらの結果から、固相表面培養は高バイオ マス生産性を実現するうえで有効な手段であることが明ら かになったが、試算値を実現するためには、太陽光の効率 的な利用を可能にする培養装置が不可欠である。そのよう な培養装置の開発が、今後の大きな研究課題のひとつであ ると考えている。

地球温暖化への懸念の高まりから世界中で多くの研究グ ループが微細藻類バイオマス生産に関する研究に取り組ん でいるが、実用化にはいまだ多くの課題が残されている。 しかし、地球温暖化問題を解決するためには革新的な CO2 固定技術の開発が不可欠であり、培養に利用できる様々な インフラが整っている製鉄所内での微細藻類の大規模培養 システムはそのひとつになりうると考えている。今後も製 鉄所に導入可能な微細藻類大量培養システムの実用化に向 けて研究を進めていく。

# 参照文献

- Saidur, R., Abdelaziz, E.A., Demirbas, A., Hossain, M.S., Mekhilef, S.: A review on biomass as a fuel for boilers. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 15, 2262-2289 (2011)
- Chisti, Y.: Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 25 (3), 294-306 (2007)
- Park, J.B.K., Craggs, R.J., Shilton, A.N.: Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. Bioresource Technology. 102 (1), 35-42 (2011)
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J.: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity in higher plants: a critical review. Journal of Plant Physiology. 159, 567-584 (2002)
- 5) Provasoli, L.: Growing marine seaweeds. Proceedings of the International Seaweed Symposium (edited by DeVirville, D., Feldmann, J.). Oxford, Pergamon Press, 4, p. 9-17
- 6) Li, T., Zheng, Y., Yu, L., Chen, S.: High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. Bioresource Technology. 131, 60-67 (2013)
- Lizzul, A.M., Lekuona-Amundarain, A., Purton, S., Campos. L.C.: Characerization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. Biology. 7 (2), 25 (2018)
- 8) 日本製鉄(株),特開 2018-157817,微細藻類の培養法及び微 細藻類
- Gross, M., Jarboe, D., Wen, Z.: Biofilm-based algal cultivation systems. Applied Microbiology and Biotechnology. 99, 5781-5789 (2015)
- Podola, B., Li, T., Melkonian, M.: Porous substrate bioreactors: a paradigm shift in microalgal biotechnology? Trends in Biotechnology. 35 (2), 121-132 (2007)
- Singh, S.P., Singh, P.: Effects of temperature and light on the growth of algae species: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 50, 431-444 (2015)
- Show, K.Y., Lee, D.J., Chang, J.S.: Algal biomass dehydration. Bioresouce Technology. 135, 720-729 (2013)
- Sorokin, C., Krauss, R.W.: The effects of light intensity on the growth rates of green algae. Plant Physiology. 33 (2), 109-113 (1958)
- 14) 古賀秀昭:光量子と日照時間・全天日射量及び珪藻類増殖との関連. 佐賀県有明水産試験場研究報告. 12, 67-74 (1990)
- Wayer, K.M., Bush, D.R., Darzins, A., Willson, B.D.: Theoretical maximum algal oil production. BioEnergy Research. 3, 204-213 (2010)



吉村 航 Ko YOSHIMURA
先端技術研究所 環境基盤研究部
主任研究員 博士(農学)
千葉県富津市新富20-1 〒293-8511



小杉知佳 Chika KOSUGI 先端技術研究所 環境基盤研究部 主幹研究員 博士(水産科学)



加藤敏朗 Toshiaki KATO 日鉄環境(株) 技術本部 技術企画部長 博士(学術) (前 新日鉄住金(株) 先端技術研究所 環境基盤研究部 上席主幹研究員)



三木 理 Osamu MIKI金沢大学 教授 博士(工学)



宮下英明 Hideaki MIYASHITA 京都大学大学院 教授 博士(理学)