

藻類学最前線



吉田昌樹：藻類リファイナリーの現状と展望

原油供給の不安定性や世界的な原油価格の高止まり、地球環境への配慮等を背景として、生物由来のエネルギー源を模索する試みが盛んである。特に日本では東日本大震災に伴う脱原発志向、あるいは被災地における産業創成の要請から、藻類を用いた燃料生産（リファイナリー）に注目が集まっている。

藻類リファイナリーに関しては既に多くの企業や調査機関、果ては米国 DOE のような政府機関までもが報告書をまとめ、有償無償で公開している。しかし、エネルギー産業や化学工業の分野から藻類の可能性を注視する報告は数多いものの、学術目的で藻類を扱う立場から下流工程が俯瞰されることは、比較的少ないように思われる。本稿では数多くのオイル産生藻類のうち有望株と目されるものに焦点を当てながら、藻類リファイナリーの近年の動向と今後の可能性について述べる。

オイル産生藻類

良く言われるように、微細藻類を用いたオイルの生産には、高等植物を利用したそれと比較して生産性が高い、食料生産と競合しにくい、など様々な利点がある。産業的に価値のある「オイル」、すなわち炭化水素や脂肪酸、およびそれらのエステルを高い乾燥重量比で産生する藻類には様々なものが知られている（表 1）。これらオイル産生藻類は広範な分類群に散在しており、一口にオイルといえどもその組成や蓄積様式は多様である。多くの藻類は脂肪酸のエステルであるトリアシルグリセロール（TAG）を油滴として細胞内に包含する。食用油として広く利用されている TAG であるが、粘度や引火点、燃焼温度といった物性の違いから、単純に軽油や重油、ガソリン等を代替することはできない（バイオディーゼル混合燃料（B5）の安全な利用に係るマニュアル）。もちろんエステル交換反応等の処理を行ってオイルを改質し、各国の燃料油やバイオディーゼルの品質基準に合致させることは可能である。このような TAG の燃料油化プロセスはバイオディーゼルにおける一大分野であり、また著者の知識の範疇を超える内容であるので、詳細は専門書に譲る。

藻類学の視点から藻類リファイナリーを考えるならば、下流における改質プロセスの増大とそれに伴うコスト増やエネルギーロスを抑えるためには、最初から燃料油としての品質を満足するオイルを蓄積する藻類を探せば良い、ということになる。具体的には、産生されるオイルは炭化水素であることが望ましい。現在知られているオイル産生藻類の中で大量の炭化水素を蓄積するものは、緑藻ボトリオコッカスとラビリンチュラ類のオーランチオキトリウムである。他

にも温泉性緑藻の *Pseudochoricystis ellipsoidea* nom. nud. が、TAG と共に軽油相当の炭化水素（炭素数 17-20）を蓄積することが報告されている（藏野ら 2005）。しかし *P. ellipsoidea* は生物種自体を特許で保護するという戦略の下に置かれており、当面は第三者が明細書以上の情報を得ることは難しい。従って本稿ではボトリオコッカスとオーランチオキトリウムについて、最新の知見を交えつつ述べる。

ボトリオコッカス

オイル産生藻類として比較的長い研究の歴史を持つものが、緑藻ボトリオコッカス (*Botryococcus*) 特に *B. braunii* である。培養条件次第では乾燥重量の 7 割を超えるオイルを蓄積し、しかも細胞外に分泌する。産生されるオイルは重油相当の炭化水素であるが、後述する Race と呼ばれる内部分類により、その炭素数は 23-40 と幅広い。ボトリオコッカスは化石燃料に近い構造の炭化水素を生産するが、そもそも一部のオイルシェールの中にはボトリオコッカスの化石が認められており、過去に化石燃料の産生と蓄積を担った生物であることが示唆されている（Stasiuk 1999）。

ボトリオコッカスは淡水性の緑藻であり、世界中の湖沼から単離されている（Komárek & Marvan 1992）。AF-6 を始めとする様々な淡水藻類用の培地で生育し、温度や光条件についてもごく一般的な環境条件の下で培養が可能である。産業廃水を含む培地で良好に生育することも報告されており（Yonezawa *et al.* 2011）、水質に対する適応性は比較的高い。

表 1 主なオイル産生藻類のオイル含有量。Chisti (2007) より引用。

藻類名	オイル含有率 (乾燥重量%)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Dunaliella primolecata</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

天然では時にブルームをも形成するボトリオコッカスであるが、倍加には一週間から数週間を要し、その成長速度は非常に小さい。

ボトリオコッカスの細胞は幅 5-15 μm 、長さ 10-20 μm ほどの歪な楕円形である (図 1)。細胞は房状のコロニーを形成し、個々の細胞はおおよそ放射状にコロニーの外側を向いて、ソケットに嵌った電球のように配列する。コロニーのサイズは直径数十から数百 μm 、時に肉眼的な大きさに達する。細胞外に分泌されたオイルはコロニーの細胞間の細胞外マトリックスに蓄積される。このオイルは Nile Red 染色で確認できるほか、コロニーをスライドガラスで押しつぶして滲出させることでも観察可能である。オイルの蓄積場所を提供するコロニーであるが、遺伝的改変や無菌化を行う際には障害となり得る。加えてボトリオコッカスは強固な細胞壁を持つ上、大量の粘性多糖を細胞外に分泌しており (Allard & Casadevall 1990)、コロニー形成と相まって細胞を扱いづらいものになっている。今までに次亜塩素酸やグリセロールで処理することで単細胞のボトリオコッカスが得られることが知られており、無菌化やクローン化に利用されている。

Botryococcus 属の分類学的整理は進んでいるとは言い難く、*B. braunii* 以外の種は明確でない。*B. braunii* は産生する炭化水素の炭素数や構造、またそこに至る生合成経路の違いなどから、Race-A, B, L の 3 群に大別される。Race-A の炭化水素は炭素数 27 前後の奇数個の炭素からなる骨格を持つ、ジエン類やトリエン類である。Race-B はボトリオコッセンやスクアレノといったテルペノイド、およびその誘導体を主に産生する。Race-L は炭素数 40 のリコパジエンを主要な産生物としている (Metzger & Largeau 2005)。他にも、Race-B に属しながら炭化水素を凌駕して大量のエキネノン蓄積する株も報告されている (Matsuura *et al.* 2011)。これらはいずれも利用価値の高い代謝産物であるが、Race は 18S rDNA 配列に基づく分子系統や採集地等との関係が定かでない。つまり特定の Race や炭化水素を狙って採集することはほぼ不可能である。従って生産性の高い、利用目的に合致した株を得るためには、地道な採集とオイル組成の評価を

積み重ねなければならない。現在は国立環境研究所のグループを中心に、ボトリオコッカス培養株の確立と株情報のデータベース化が進められている。

オイル産生藻類として注目されているボトリオコッカスであるが、開放系での大規模培養は未だ成功例がない。これは偏にボトリオコッカスの増殖の遅さに起因する。細胞の増殖速度は工業利用を検討する上で大きな要因であり、ボトリオコッカスによるリファイナリーの実用化へ向けて避けて通れない課題である。増殖速度は当然生産性に直結するパラメータであるが、さらに重要なことは、低すぎる増殖速度ではコンタミネーションとして侵入してくる他者の増殖を振り切ることができないという点である。増殖速度の大きい藻類ならば、継代の時期を最適化することで実用上問題が無いレベルの純度を保つことができるが、ボトリオコッカスではそのような手段は使えない。グルコースなどの有機炭素源をボトリオコッカスの培養に添加すると、成長速度やオイルの生産性が著しく向上することが報告されている (Tanoi *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2011)。しかしグルコースの使用は無菌株であることが絶対条件であり、また有機炭素源を投入することでカーボンニュートラルや食料資源との競合回避という独立栄養生物によるリファイナリーの優位性が失われてしまう。開放系での大量培養を最終目的とした場合、生産性の向上のために有機炭素源を使うというアプローチは難しいと考えられる。しかし他方、無菌の閉鎖系を前提として廃棄物から有機炭素を得るという思想に基づくならば、従属栄養性の藻類によるリファイナリーも十分に実現可能である。そのためには、閉鎖系の維持コストと引き合うだけの高増殖率の生物が必要となってくる。そのような運用の可能性を見せてくれる生物がオーランチオキトリウムである。

オーランチオキトリウム

オーランチオキトリウム (*Aurantiochytrium*) は 2007 年に設立された属である (Yokoyama & Honda 2007)。従属栄養性の無色ストラメノパイル生物であり、葉緑体を持たず光合成を行わないラビリンチュラ類の一属である。前述の通り、オーランチオキトリウムという名称自体は比較的新しいものであるが、属の独立前は *Schizochytrium* 属に含まれ、「シゾキトリウム」の呼称で扱われてきた生物群である。広義のシゾキトリウムは、主にドコサヘキサエン酸 (DHA) に代表される高度不飽和脂肪酸の食用利用を目的として研究されてきた経緯があり (Yokochi *et al.* 1998)、過去にはかなりユニークな利用法まで考案されている (小磯・中辻 1995)。

Aurantiochytrium 属が *Schizochytrium* 属から分離された根拠は Yokoyama & Honda (2007) に詳述されているが、中でも特筆すべきは含有カロテノイドの組成の違いである。狭義のシゾキトリウムが β カロテン以外のカロテノイドを持たないのに対し、オーランチオキトリウムは β カロテンに加えてアスタキサンチンやフェニコキサンチン、カンタキ

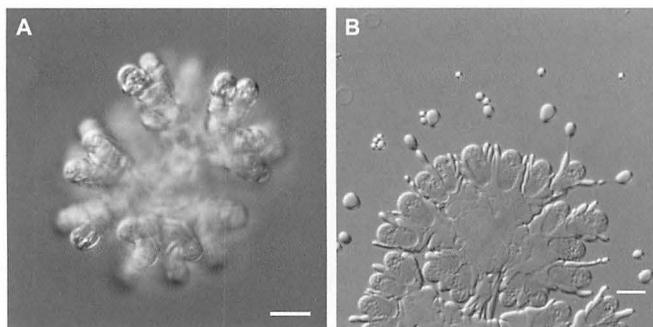


図 1 *Botryococcus braunii* bot22 株の微分干渉像。A. 炭化水素を蓄積したコロニー。B. コロニーを押し潰し、細胞間の炭化水素を滲出させた状態。スケールバーはいずれも 10 μm 。

サンチン、エキネノンといった多様なカロテノイドを例外無く含む。これは本属のテルペノイド合成の多様性を示すものであり、同じテルペノイドであるスクアレンの産生能とも無関係でないと思われる。

オーランチオキトリウムの栄養細胞は直径数〜数十 μm の球形ないしは亜球形である (図2)。オイルを蓄積するのは主にこの栄養細胞である。栄養細胞の他にヘテロコント型の遊走細胞やそれを内包する遊走子嚢、不定形のアメーバ型細胞などを生じるが、これらの有無や生活環、細胞形態の細部などは種によって異なる。

オーランチオキトリウムを含む広義のシゾキトリウム類は、マツ花粉やキチン質を釣り餌として選択的に釣菌できることが知られている。オーランチオキトリウムとして記載されている種は本稿の執筆時点で *A. limacinum* と *A. mangrovei* の2種のみであるが、各地で多くの培養株や未同定種が採取・スクリーニングされ、炭化水素の産生能に関する研究が行われている。最近注目されている炭化水素高生産株は、筑波大学を中心とするグループによって確立された18W-13a株である (Nakazawa *et al.* 2011) (図2)。18W-13a株は2% グルコース濃度の一般的な GPY 培地・25°C の培養において4日で定常期に達する。この時の細胞乾燥重量は 6 g L^{-1} を超え、その約20%がスクアレンである。これら培養期間やスクアレンの含有量は、培地や培養条件を最適化することでさらに短縮・向上させることが可能である。従来 *A. limacinum* IFO32693株や同 mh0186株が6-12% グルコース濃度条件下において良好な高度不飽和脂肪酸の生産性を示す報告がなされてきたものの (Yaguchi *et al.* 1997, Nagano *et al.* 2009)、炭化水素であるスクアレンを高い乾燥重量比で産生する生物は、ラビリンチュラ類はもとより他の微細藻類や真菌類においても例がない。ボトリオコッカス同様、細胞から直接炭化水素が得られることは、オイル収穫以降の下流工程の単純化や既存の石油関連施設の互換的利用を考える上で大きなアドバンテージである。18W-13a株は従属栄養生物を利用したバイオリファイナリーの鍵となる生物である。

高い炭化水素生産性の反面、エネルギー生産に従属栄養生物を利用する上で課題となるのが炭素源の資化性である。*A. limacinum* は様々な炭素源を利用できるが (Honda *et al.* 1998)、オーランチオキトリウムの資化性は株や種によってかなり異なる。このことは培養コストや廃棄物利用までを考慮に入れた培養の最適解の探索空間を広げ、ライフサイクルアセスメントを困難にする。炭素源を独立栄養性の藻類に求めることも可能であるが、ボトリオコッカスやクロレラといった主要なオイル・多糖産生緑藻が淡水性であることを考えると単純な話ではない。ラビリンチュラ類が海洋生態系における分解者としての地位を確立している一方 (Naganuma *et al.* 2007)、淡水域におけるラビリンチュラ類の多様性は、汽水域や海水域におけるそれと比較して極端に貧弱だからである。18W-13a株の培養の最適化は研究途上であり、コス

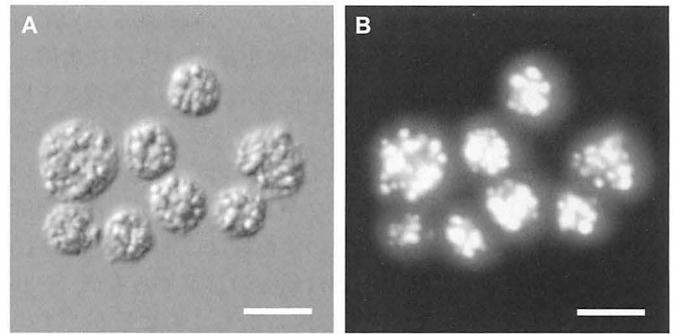


図2 *Aurantiochytrium* 18W-13a株の栄養細胞の光学顕微鏡像。A. 微分干渉像。細胞内に見られる高コントラストの顆粒は油滴。B. 脂質を染色する Nile Red で処理した細胞の落射蛍光像。油滴が黄色の蛍光を放つ。スケールバーはいずれも $10 \mu\text{m}$ 。

トと生産性を両立した培養系の確立が期待される。同時に、18W-13a株を超える炭化水素の生産能や幅広い資化性を持つ株、また淡水や極高/低 pH 環境など多様な環境条件に対応する新規系統の発見も待たれるところである。

まとめ

藻類を利用したエネルギー生産の試みは近年の隆盛が最初ではない。1980年代後半から2000年頃にかけて、米国を始めとする世界中で藻類を利用した二酸化炭素吸収とオイル生産に係る研究が盛んに展開された。日本でも、1993年に発足した「ニューサンシャイン計画」の一環として藻類を利用した研究プロジェクトが遂行されたもの、最終評価の中で目標と実体との乖離が指摘されるなど、必ずしも成功とは言えない結果に終わった (ニューサンシャイン計画「細菌・藻類等利用二酸化炭素固定化・有効利用技術研究開発」最終評価報告書)。それが今再び2011年の「サンライズ計画」構想や、東日本大震災後の脱原発の潮流を纏って復活しつつある。世界的に見れば、2007年のNature誌に掲載された「Algae bloom again」が一つの契機であろう (Haag 2007)。各国とも藻類リファイナリーに注力する事情は違えども、このような流れの根底には冒頭に挙げた原油依存型社会への根強い不安がある。

日本における藻類学の基礎研究は非常に盛んである。これは伝統的に水産業が発達してきた経緯があり、直接的にも間接的にも藻類に関する知見が蓄積されてきたことが大きいと思われる。日本において藻類リファイナリーの概念は未だ広く定着したとは言えず、産官学の連携も途上である。また大規模培養の展開状況や藻類オイル市場の構築、流通の確立という点では、諸外国に遅れをとる部分があることを認識せざるを得ない。しかし過去の蓄積や最新の基礎研究を基盤に据えれば、世界の先陣を切って実用化への道を拓くことも十分可能である。水産分野から関連する知見の一つ挙げると、2008年に開発された「好適環境水」という養殖魚用の人工海水がある。これは工夫されたイオン組成の人工海水で、淡

水魚と海水魚とを共存させることができる画期的なものである(山本 2008, 2009)。好適環境水を藻類の培養に適用するならば、淡水藻と海産藻との垣根を取り払って培養系を構築することが可能となる。一方、オーランチオキトリウム等の従属栄養性藻類によるリファイナリーとなれば、閉鎖系の制御には発酵工学に近いノウハウが必要となってくる。発酵工学における日本の技術・文化の優位性はここで触れるまでもない。藻類リファイナリーとは新参の言葉であるが、これを推進するための知識や技術は既にあちこちに散在している。その中であって運良く藻類学に身を置く者としては、今までの専ら学術的な視点に加えて、社会の要請に目を向ける姿勢も必要なのだと省みる次第である。

引用文献

- Allard, B. & Casadevall, E. 1990. Carbohydrate composition and characterization of sugars from the green microalga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*. 29: 1875-1878.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306.
- Haag, A. L. 2007. Algae bloom again. *Nature* 447: 520-521.
- Honda, D., Yokochi, T., Nakahara, T., Erata, M. & Higashihara, T. 1998. *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from mangrove area in the west Pacific Ocean. *Mycol. Res.* 102: 439-448.
- 小磯博昭・中辻康城 1995. 藻入り麺. 特願平 7-324835. 特開平 9-154513.
- Komárek, J. & Marvan, P. 1992. Morphological differences in natural populations of the genus *Botryococcus* (Chlorophyceae). *Arch. Protistenk.* 141: 65-100.
- 藏野憲秀・関口弘志・佐藤朗・松田諭・足立恭子・熱海美香 2005. 新規微細藻類及び炭化水素の生産方法. WO2006/109588. 特願 2007-512903 (優先権基礎出願 特願 2005-114404.)
- Matsuura, H., Watanabe, M. M. & Kaya, K. 2011. Echinone production of a dark red-coloured strain of *Botryococcus braunii*. *J. Appl. Phycol.* (in press).
- Metzger, P. & Largeau, C. 2005. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotech.* 66: 486-496.
- Nagano, N., Taoka, Y., Honda, D. & Hayashi, M. 2009. Optimization of culture conditions for growth and docosahexaenoic acid production by a marine thraustochytrid, *Aurantiochytrium limacinum* mh0186. *J. Oleo. Sci.* 58: 623-628.
- Naganuma, T., Kimura, H., Karimoto, R. & Pimenov N. V. 2007. Abundances of planktonic thraustochytrids and bacteria and of particulate ATP in the Greenland and Norwegian Seas. *Polar Biosci.* 20: 37-45.
- Nakazawa, A., Matsuura, H., Kose, R., Kato, S., Honda D., Inouye, I., Kaya K. & Watanabe, M. M. 2011. Optimization of culture conditions of the thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain 18W-13a for squalene production. *Biores. Tech.* in press.
- Stasiuk, L. D. 1999. Confocal laser scanning fluorescence microscopy of *Botryococcus* alginite from boghead oil shale, Boltysk, Ukraine: selective preservation of various micro-algal components. *Org. Geochem.* 30: 1021-1026.
- Tanoi, T., Kawachi, M. & Watanabe, M. M. 2011. Effects of carbon source on growth and morphology of *Botryococcus braunii*. *J. Appl. Phycol.* 23: 25-33.
- Yaguchi, T., Tanaka, S., Yokochi, T., Nakahara, T. & Higashihara, T. 1997. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 1431-1434.
- 山本俊政 2008. 人工飼育水及び人工飼育水生成物質. 特願 2008-159762. 特開 2010-000009.
- 山本俊政 2009. 観賞魚用飼育水, トリートメント水, および, 観賞魚用 トリートメント水, 観賞魚用トリートメント水生成物質. 特願 2009-178426. 特開 2011-30474.
- Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T. & Nakahara, T. 1998. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl. Microbiol. Biotech.* 49: 72-76.
- Yokoyama, R. & Honda, D. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium sensu lato* based on morphology, chemotaxonomical characteristics and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48:199-211.
- Yonezawa, N., Matsuura, H., Shiho, H., Kaya, K. & Watanabe, M. M. 2011. Effects of soybean curd wastewater on the growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* strain BOT-22. *Biores. Tech.* (in press).
- Zhang, H., Wang, W., Li, Y., Yang, W. & Shen, G. 2011. Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*. *Biomass Bioen.* 35: 1710-1715.
- 株式会社三菱総合研究所(資源エネルギー庁委託) 2009. バイオディーゼル混合燃料(B5)の安全な利用に係るマニュアル. 株式会社三菱総合研究所. 東京.
- 工業技術院技術評価課. 2000. ニューサンシャイン計画「細菌・藻類等利用二酸化炭素固定化・有効利用技術研究開発」最終評価報告書. 工業技術院. 東京.

(筑波大学)