

中東におけるレースウェイ型培養施設を用いたクロレラの屋外大規模培養試験

加藤 雄大 中野 孝司 Mark Sueyoshi 田崎 雅晴 黒岩 洋一
(技術研究所) (フロンティア開発室) (国際支店) (技術研究所) (技術研究所)

Large-Scale Outdoor Test of Chlorella Culturing in Raceway System in the Middle East

Takahiro Kato, Koji Nakano, Mark Sueyoshi, Masaharu Tasaki and Yoichi Kuroiwa

微細藻類は機能性食品への利用のみならず、単位面積当たりの収量が高く食料生産と競合しないバイオマス資源として注目されている。我々は効率的な培養技術開発のために、概して温暖で降雨量が少ない中東での屋外培養試験を試みた。培養には高温条件下で生育可能なクロレラ、*Chlorella sorokiniana* NIES2169株を用い、徐々にスケールアップしながら培養し、最終的に400 m²のレースウェイ型培養施設での大規模培養に成功した。また、培養環境把握のために、小規模の培養施設を用いた各種データ取得と検討を行った。その結果、培養方法に応じた気温と水温の関係や、その際のCO₂供給量など、商業規模での培養に必要な知見を得た。

Microalgae gain attention not only for their use in functional foods, but also as a biomass resources with a high yield per unit area that does not compete for land with food production. As a part of development work on an efficient technology, we conducted a field culture demonstration in the Middle East, which is generally warm and has low rainfall and high illuminance. *Chlorella sorokiniana* NIES2169 which is high temperature adaptive species was used for culture test. We succeeded in large-scale culture outdoor culture using a 400 m² raceway facility. In order to determine the most effective culture environment for algal culture in advance of demonstration, facility of small- and medium-scale were used for data gathering tests and examinations.

The demonstration yielded knowledge that is crucial to developing a commercial-scale culture facility, such as how air temperature and culture liquid temperature fluctuate according to the condition of the culture, the required amount of CO₂, and other factors.

1. はじめに

微細藻類は機能性物質の生産能やバイオフィューエル原料としての利用可能性から長く研究されてきたが、近年の健康ブームと地球温暖化問題への関心の高まりから、研究開発に拍車がかかってきている。また、水中で生育する微細藻類は、陸上の耕作地での食料バイオマスの生産と競合せず、さらに微細藻類によるバイオフィューエル生産は、陸上植物によるバイオフィューエル生産と比較して単位面積当たりの理論収率が非常に高い。そのため、一刻も早い生産技術の具現化が期待されている^{1)~3)}。

しかし、現時点では微細藻類の生産コストが課題となっており、培養スケールを拡大することによりスケールメリットを得ることが肝要である。

大規模な培養の場合、屋外でのオープンポンドによる培養が選択されることが多いが、日本国内では日射量、降雨、用地確保などの問題から、屋外での大規模培養が可能な地域は限られている。そのため、大規模培養の主なターゲットは海外となっている^{4),5)}。

そこで我々は微細藻類の効率的な培養技術の開発のため、温暖かつ降水量が少なく、安定的に高い日射量が得られる中東での屋外大規模培養試験を実施した。これまでの中東での環境事業の経験を活かし、オマーン国立スルタンカブース大学(Sultan Qaboos University; SQU)の協力を得て、同大学敷地内に試験サイトを整備した。継代培養及び分析を行うためのラボスペース、CO₂供給機能を有した最大400 m²規模のレースウェイ型培養施設(以下、レースウェイと表記)を複数

基、回収・乾燥のための遠心分離機やスプレードライヤ、廃水処理設備等、一連の生産試験施設を設置した。この施設を用いて、現地屋外での生産環境を把握するための各種試験を実施した。

2. 試験方法

2.1 培養環境の測定

SQU 内の試験サイト(北緯 23° 35' 54"、東経 58° 09' 47")において 2017 年 1 月から 12 月までの気象データ(気温・照度)を TR-74Ui(照度センサ: ISA-3151)(T&D)により取得した。また、微細藻類の培養は 2017 年 10 月から 11 月、12 月から 2018 年 1 月の期間に実施し、培養中の水温を TR-71nw(温度センサ: TR-0406)(T&D)により測定した。

試験サイトの日射量を日本国内と比較するために、気象庁 HP に公開されている石垣島の全天日射量データ⁶⁾を用いて、参考文献⁷⁾より一日当たりの累積放射照度に換算した。

2.2 培養方法

現地での培養試験は、国立環境研究所 微生物系統保存施設(NIES collection)より入手した *Chlorella sorokiniana* NIES-2169 株(以下 NIES 株と表記)を用いて試験した。NIES 株は増殖速度が速く⁸⁾、至適生育温度が 35~40℃で、最高で 42℃まで増殖可能であることが確認されている⁹⁾。

試験サイトの概観を図-1 に示す。現地に設置したラボにて、少量の培養株を 50 mL のフラスコで

無菌的に継代培養して維持した。そこから約 18.9 L のプラスチック製ボトル、0.8 m² レースウェイ、40 m² レースウェイに順次スケールアップしていき、最終的に 400 m² レースウェイでの大規模培養を実施した。強光下において、微細藻類の濃度(密度)が低い場合には光が過剰に透過、供給されることで光合成能力が低下する強光阻害が起こり、増殖が阻害される場合がある¹⁰⁾。これまでの経験から、NIES 株では濁度が 20 FTU 以上で屋外培養に支障がないことを確認しているため、植種後の濁度が 20 FTU を超えるまでは遮光ネットにより日射量を 50%程度遮った状態で培養を実施した。

0.8 m² レースウェイの概要図を図-2 に示す。培養試験は 2017 年 10 月 22 日から 11 月 1 日にかけて実施した。水位は気温と日射を考慮して 200 mm に設定し、水面からの入射光面積による生産性評価のために側面はアルミ箔で遮光した。

CO₂ 及び空気は二通りの方法で供給した。A 系は、空気と混合して 1%、3%に希釈した CO₂ を日中(6:00~18:00)に 0.02 vvm(volume per volume per minute)で連続的に供給し、B 系は pH が 8.3 以上になると 100%の CO₂ を供給するように設定した。なお、A 系において培養開始時は 1% CO₂ を連続的に供給していたが、培養 2 日目の日中に pH が 8.5 を大きく超過したため同日 15 時から供給濃度を 3%に変更した。この時の CO₂ の使用量は A 系では流量計によって積算流量を測定し、B 系では供給時間の合計と設定流量の積から算出した。

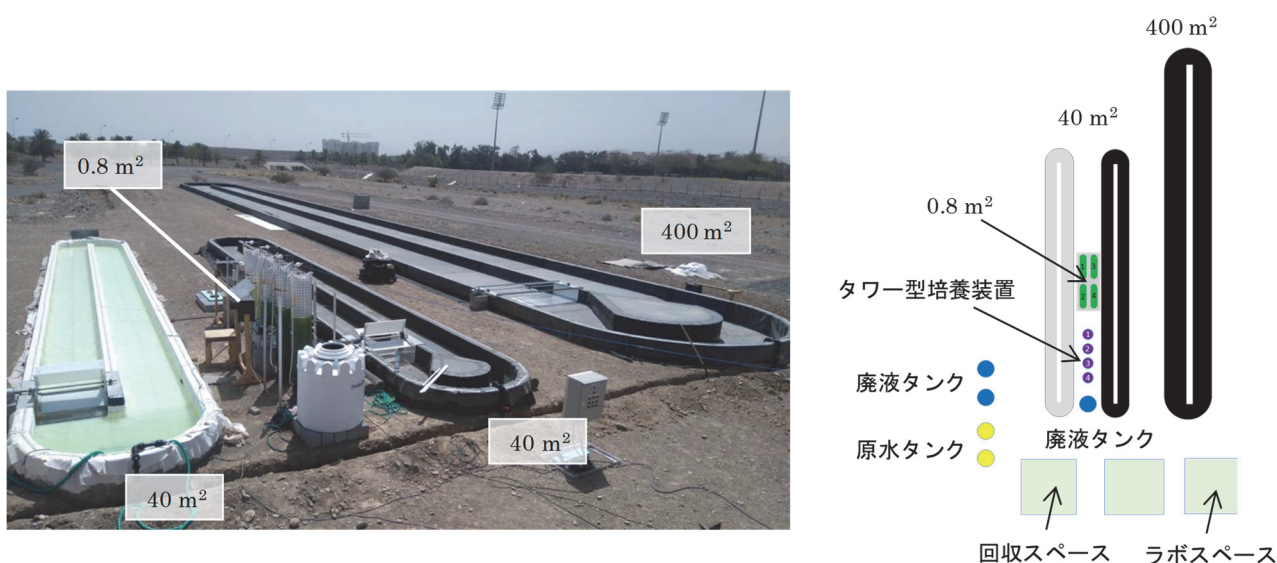


図-1 試験サイトの概観(左)と配置図(右)

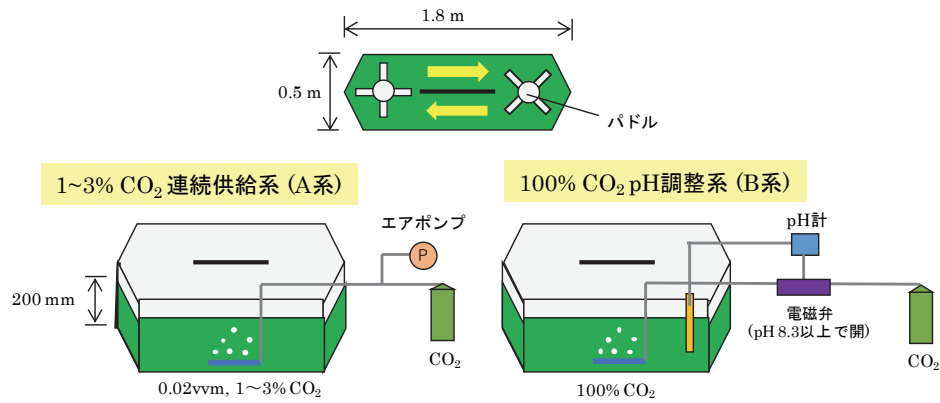


図-2 0.8m² レースウェイの概要図

微細藻類の培養環境をモニタリングするために水温 (TR-71nw (温度センサ: TR-0406), T&D)、濁度 (HI93703、HANNA)、pH (D-74、HORIBA)を測定した。濁度は培養開始時のみ 16 時、以降は 13 時に測定した。事前に藻体の乾燥重量と濁度の相関関係を求め、濁度 T (FTU) の値から以下の式(1)に基づいて乾燥重量 Dw (g-dry algae·L⁻¹)を算出した。

$$Dw = 0.0017 \times T \quad (1)$$

40 m² レースウェイ、400 m² レースウェイでの培養試験は 2017 年 12 月 3 日から 2018 年 1 月 4 日にかけて実施した。冬期の日射量の減少を考慮してどちらも水位を 100 mm とした。CO₂ 供給方法は B 系と同様のシステムとした。

3. 結果と考察

3.1 培養環境の測定

試験サイトにおける 2017 年の気温を図-3 に示す。なお、図-3 の網掛け部はデータを取得出来なかった期間を示す。試験サイトは 5 月から 9 月にかけて日最低気温が 25°C を上回る温暖な気候であった。また、試験サイトにおける 2017 年の 1 日あたりの日射量を沖縄県石垣島の 2017 年のデータを比較したグラフを図-4 に示す。石垣島と比較すると、1 日の日射量が高い値で安定していた。日射量は微細藻類の増殖速度に大きく影響し、光環境が安定していることは生産量の計画に大きく寄与する。

2017 年 10 月 22 日から 11 月 1 日にかけて 0.8 m² レースウェイでの培養試験を実施した期間の気象データを図-5 に示す。10、11 月は 5、6 月と比較して気温や日射量は低くなっているものの依然と

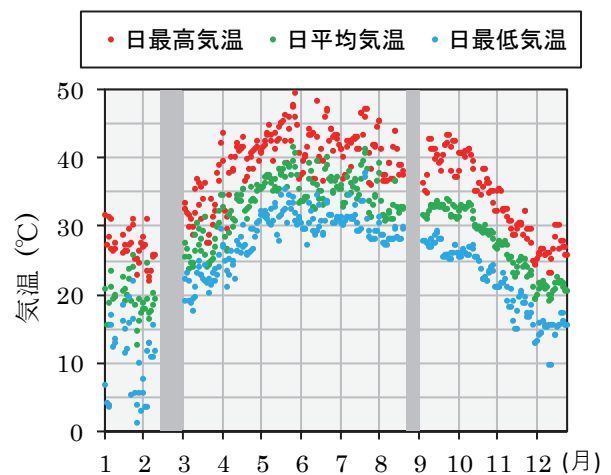


図-3 試験サイトの気温 (2017 年)

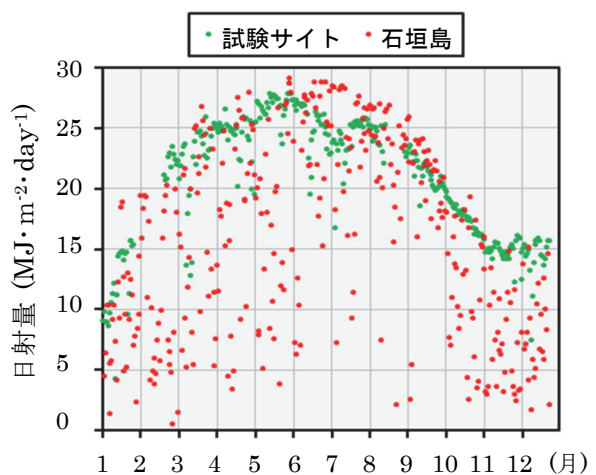


図-4 試験サイトの日射量 (2017 年)

して高く、10 月 23 日、10 月 27-31 日の最高気温は 35°C を超えていた。1 日の最大光量子束密度は約 1,800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ で安定していた。この値は石垣島の 2017 年における毎時の最大値 (2017 年 8 月 19 日 12 時~13 時、約 1,549 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$) よりも大きな値である。オマーンでは日射量が 5、6 月

の3分の2程度になる10月であっても、7月の石垣島よりも強い日射量を安定して確保できることが分かった。

藻類種によって光束密度に対する耐性は異なるが、Carvalho らによると、一般に $200\sim 400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ 程度で光化学系IIの損傷による強光阻害が発生するとされている¹¹⁾。屋外培養における光条件は非常に重要であり、培養種を選択においても重要な要素である。今回試験に用いた NIES 株は至適温度下において約 $1,200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ でクロロフィル量あたりの酸素発生量が最大となり、以降約 $3,000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ までは強光阻害が確認できていない¹⁰⁾。しかし、微細藻類の中には強光に対する耐性が培養温度や日変化により弱まるケースが確認されている¹¹⁾。植え継ぎ藻体密度が小さい状態や、早朝の日射量が急激に増加する時間帯は、日中の最大日射量における強光阻害とは別に考慮すべきポイントと考えられる。

3.2 通気方法による違い

0.8 m^2 レースウェイで培養した際の、各系培養液の水温と外気温を図-6に示す。どちらの系においても気温と比較して水温が $1\sim 5^\circ\text{C}$ 低くなっており、A系はB系と比較して最高水温が 2°C 程度低い値を示した。A系では希釈 CO_2 の連続供給により常時水面に気泡が生じており、そのことにより水面からの蒸発が促進され、蒸発熱によって最高水温が低下したためと考えられる。

また、この時の NIES 株の増殖を各系で比較した結果を図-7に示す。培養6-9日目はA系の方がより良好な増殖を示したが、最終的にはどちらの系においても10日間の培養で $16 \text{ g-dry algae}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{day}^{-1}$ という増殖速度を得ることが出来た。この値は他の *Chlorocella* sp. の屋外培養試験の結果⁴⁾と比較して遜色ないものであった。

この培養試験において、培養開始から10日間の各系における CO_2 の総供給量はA系で 505 L 、B系で 185 L であった。NIES 株に含まれる炭素量で換算すると、A系では供給した CO_2 に含まれる炭素の約 27% が藻体に転換され、B系では 62% が藻体に転換された。

二つの系の差異について考察する。増殖については6-9日目はA系の方がB系と比べてわずかに良好だったが、これは常に空気を供給していることによる垂直方向の物理的な攪拌促進効果や、溶存気体の状態改善が考えられる。溶存気体の状態改善とは、主に培養液低層での酸素不足もしくは表層から

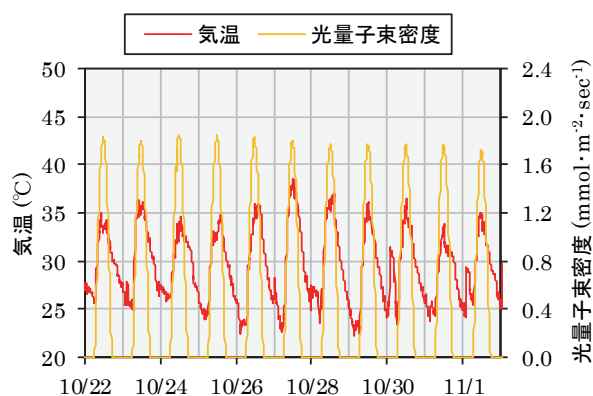


図-5 試験期間中の気温、光量子束密度

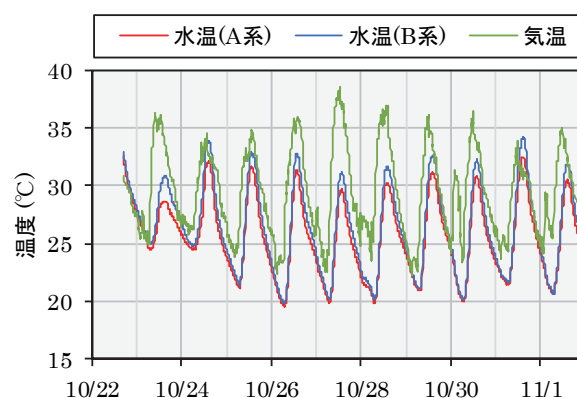


図-6 各系の水温と気温の比較

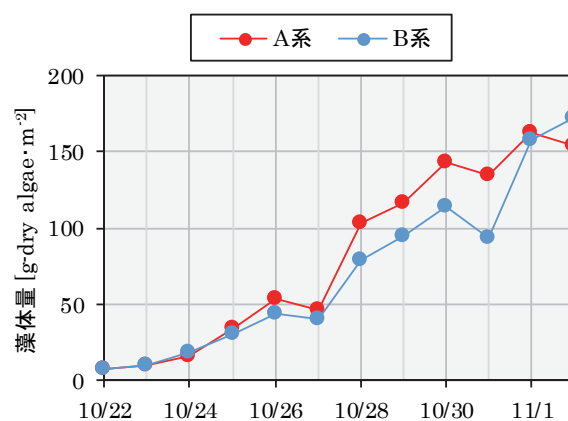


図-7 各系における NIES 株の増殖

中層での過剰な光合成による酸素の過飽和を解消することを示す¹²⁾。

10日間の CO_2 の供給量はA系が 505 L 、B系が 185 L であり、A系の供給量はB系の約 2.7 倍となった。これは、A系では日射量によらず常に一定の CO_2 が供給されるため、朝や夕方などの日射量が少ない時間帯は過剰量の CO_2 が培養液に供給されたためと考えられる。空気で希釈することによっても CO_2 の培養液への溶解効率は低下する。そのため pH を下げ、 CO_2 を効率よく培養液に溶解させ

るためにはB系が適当で、パドル等による上下方向の攪拌が不十分な場合にはCO₂とは分けて空気を導入すると良いと考えられる。

3.3 培養スケールによる水温変化の違い

0.8 m² レースウェイの試験期間中に 40 m² レースウェイにも水深 200 mm で水を張り、水温を測定した。0.8m² レースウェイと比較した結果を図-8に示す。40 m² レースウェイは水のみを循環させ、CO₂や空気の導入は実施しなかった。しかしながら、連続的に希釈CO₂を導入した系(A系)と同程度の最高水温となり、最低水温は0.8m² レースウェイ(A系、B系)よりも3°C程度高くなった。この結果から、40 m² レースウェイでは0.8 m² レースウェイよりもさらに水温の変化が小さいことが確認できた。

培養温度を安定させることは微細藻類の増殖速度を安定させると共に、脂質の蓄積等の有用物質生産において品質と生産量を安定させるため、非常に重要な要素である¹³⁾。培養スケール拡大が培養温度管

理に与えるメリットとして、その地点の日中の最高気温と比較して至適培養温度が同等か少し低い株を安定的に培養できることと、一日の寒暖差が大きい地域においてその影響を軽減できるというメリットが挙げられる。今回の試験では、温暖で日射量も多いオマーンにおいて、その二つのメリットを観測結果から確認することができた。

3.4 大規模レースウェイでの培養試験

400m² レースウェイでの大規模培養試験は 2017年12月から2018年1月にかけて実施した。その際の培養の様子を写真-1に、NIES株の増殖を図-9に示す。40 m² レースウェイでは培養開始時から10日後までの平均で約5 g-dry algae·m⁻²·day⁻¹、400 m² レースウェイでは培養開始時から12日後までの平均で約6 g-dry algae·m⁻²·day⁻¹の増殖速度を確認した。12月でも平均気温は20°C付近であり、中東では冬期であっても加温をせずに屋外にてNIES株の維持・生産が可能であることを確認できた。

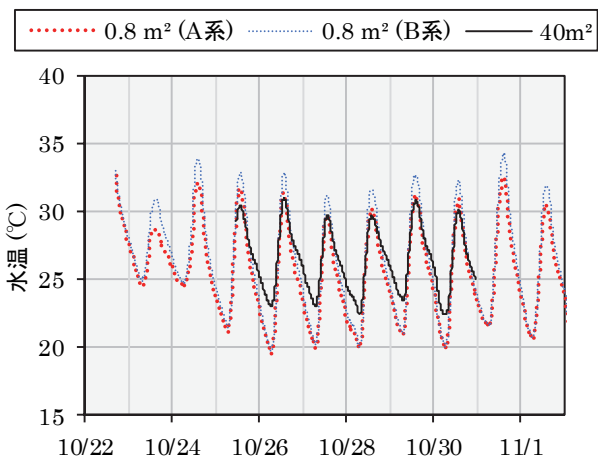


図-8 培養規模ごとの水温の比較

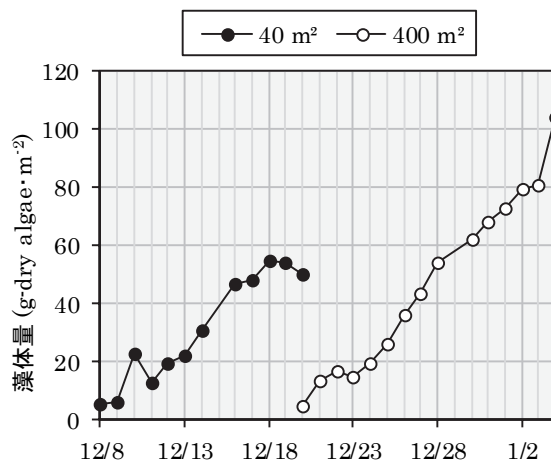


図-9 大規模レースウェイでのNIES株の増殖



写真-1 400 m² レースウェイでの培養の様子

大規模レースウェイにおける培養システム面での増殖速度の向上方法としては、まず垂直方向の攪拌の促進が挙げられる¹²⁾。培養液表層と底層での光合成効率の均一化は、強光阻害や酸素欠乏の抑制に繋がり、ひいては培養効率の向上に寄与すると推察される。具体的対策として攪拌頻度を高めることや、空気等の導入が考えられる。

その他の増殖速度の向上方法としては、水深が浅く面積の広い培養液へのCO₂の溶解促進、光環境の計測・管理による適切な光合成速度の維持などが考えられる。

4. まとめ

中東オマーンにおいて NIES 株と 0.8 m² レースウェイを用いて屋外培養試験を実施し、培養環境の測定および改善方法の検討を実施した。最終的に、大規模な 400 m² レースウェイでの増殖を確認した。その結果、中東地域における微細藻類培養のための有意義な知見を得ることが出来た。

現地の気象データと培養時の水温を比較することで、培養液の水温が気温よりも 1~5℃程度小さくなることを確認した。また、CO₂ や空気の導入方法によって水温に違いが生じることを確認した。

40 m² レースウェイの場合は、気温の変化よりも水温の変化が小さくなることを確認した。このように気温と比較して水温変化が小さいことは気温が高い夏期における培養可能株の選択肢を広げること繋がり、今回の試験ではその程度を示した。

冬期に 400 m² レースウェイで屋外培養した結果、NIES 株の順調な増殖速度を確認できた。また、冬期であってもオマーンのような温暖な地域では、外部動力による加温の必要がなく、屋外で NIES 株を維持・生産できる可能性を示した。

これらの結果は、中東のように温暖で乾燥した地域における屋外での藻類大量生産の可能性を示唆する大きな成果と言える。

謝辞

本研究の当時の担当者である平山彰彦様、太田雄樹様(元自然共生事業推進室)および試験サイトの提供と試験の円滑な実施に協力頂いたオマーン国立スルタンカブース大学の Rashid S. Al-maamari 教授に対し、この場を借りて謝意を表します。

<参考文献>

- 1) US Department of Energy: National Algal Biofuels Technology Roadmap, 2010.
- 2) Liam Brennan and Philip Owende: Biofuels from microalgae -A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, vol.14, pp.557-577, 2010.
- 3) 林雅弘: 藻類を活用する食品素材開発, 生物工学会誌, vol.91, No.11, pp.621-624, 2013.
- 4) Teresa Muta, et. al.: Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, vol.14, pp.217-232, 2010
- 5) 宮下修: 福島藻類プロジェクトから見えてきた燃料生産シナリオ, 生物工学会誌, vol.95, No.4, pp.177-180, 2017.
経済産業省サイト: 2020年東京オリンピック・パラリンピック競技大会に向けたバイオジェット燃料利用に関する検討について <https://www.meti.go.jp/>
- 6) 気象庁サイト: 過去の気象データ・ダウンロード <https://www.jma.go.jp/jma/index.html>
- 7) Thimijan Richard: Photometric, Radiometric, and Quantum Light Units of Measure: A Review of Procedures for Interconversion, *HORTSCIENCE*, vol.18(6), pp.818-822, 1983.
- 8) Vincenza Vona, et. al.: Temperature responses of growth, photosynthesis, respiration and NADH: nitrate reductase in cryophilic and mesophilic algae, *New Phytologist*, vol.163, pp.325-331, 2004
- 9) Julian Rosenberg, et. al.: Comparative analyses of three chlorella species in response to light and sugar reveal distinctive lipid accumulation patterns in the microalga *C. sorokiniana*, *PLOS ONE*, vol.9, issue 4, e92460, 2014.
- 10) Ana Carvalho, et. al.: an overview of biophotonic aspects, *Appl. Biotechnol.*, vol.89, pp.1275-1288, 2011.
- 11) Stefano Cazzaniga, et. al.: Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor, *Biotechnology for Biofuels*, vol.7, No.157, 2014.
- 12) Robert Andersen: ALGAL CULTURING TECHNOLOGY, phycological society of America, 2005.
- 13) 野坂裕一ら: 淡水産微細藻群集の増殖と脂質生産に及ぼす温度の影響, 石巻専修大学 研究紀要, 第28巻, pp.129-139, 2017.