

メタン・藻類バイオ燃料を製造できる排水処理プロセスの開発

燃料物質である遊離脂肪酸を細胞外に生産できる微細藻類の開発

山本 哲史^{*1}・門脇 太郎^{*2}・西山 佳孝^{*2}・高谷 信之^{*3}・愛知 真木子^{*3}・池田 和貴^{*4}・
小俣 達男^{*3}

Keywords : renewable energy, microalgae, free fatty acids, sustainable aviation fuel, biodiesel fuel, genetic manipulation

再生可能エネルギー，微細藻類，遊離脂肪酸，持続可能な航空燃料，バイオディーゼル燃料，遺伝子改変

1. はじめに

脱炭素化と持続的経済成長を両立するには、これまでの廃棄物や排水の概念を見直し、資源利用するゼロエミッションの考えが必要である。特に排水は、産業活動だけでなく生活からも定常的に発生するものであり、その資源化が進めば、徹底的な物質循環を行いながら市場価値の高い物質資源を生産するサーキュラーエコノミー（循環経済）の実現¹⁾にも貢献できる。排水の中でも有機系排水は、熱量を持つ多種多様な有機物が含まれるが、従来はエネルギーを掛けて有機物を分解する考えが排水処理の基本であった。本研究では、排水に含まれるこれらの有機物をエネルギー源と捉え、積極的にメタンガス及びバイオディーゼル燃料（BDF : Biodiesel fuel）などのバイオ燃料に転換する新たな排水処理プロセスの開発を進めている（図-1）。本

報では、開発プロセスの概要とプロセスを構成する要素技術について紹介する。

2. 開発する排水処理プロセスの概要

2.1 メタン製造システム

従来、下水や産業排水の処理には、活性汚泥に代表される好気処理が採用されてきた。これらの好気処理は、排水に含まれる有機物を好気性微生物の作用により分解・除去する方法であるが、酸素供給のための曝気が必要であることから、処理に係る投与エネルギー量が過大である。また、好気性微生物の増殖速度が速いため、処理に伴い大量の余剰汚泥が発生し、これらの処分費の削減も共通の課題であった。このような状況から現在では、排水処理施設の高効率機器への更新や汚泥の資源化の取り組みが行われている。一方で、

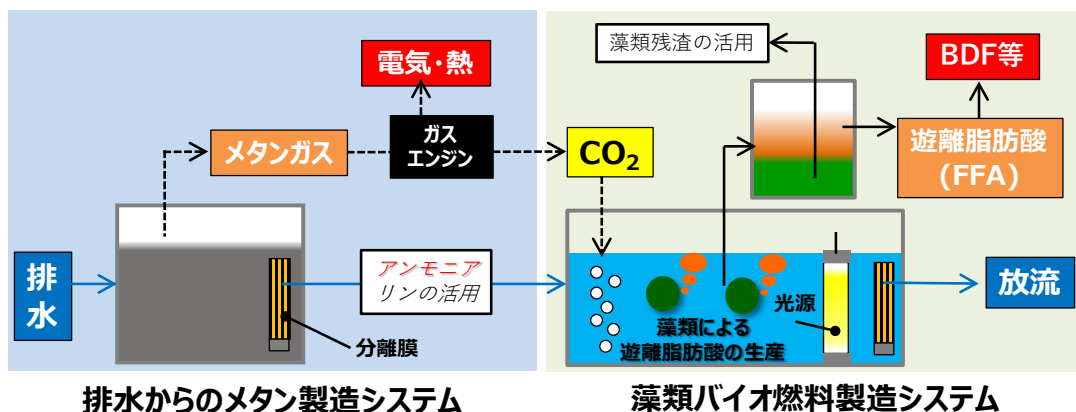


図-1 メタン及びバイオ燃料を製造できる新排水処理プロセス
Fig.1 New wastewater treatment process capable of producing methane and biofuel

* 1 技術センター 先進技術開発部 新領域技術開発室
* 2 埼玉大学
* 3 中部大学

* 4 かずさDNA研究所

好気処理よりも省エネルギー化が期待できる処理方法として、メタン発酵が挙げられる。メタン発酵は、高濃度有機物の処理に適した方法であり、主に生ごみや家畜糞尿等の処理に適用されている。メタン発酵では、有機物を嫌気性微生物群のリレーションによって、最終的にメタンと二酸化炭素まで分解する方法であり、得られたメタンガスを電力や熱源として利用することも進められている。このように、メタン発酵は、省エネルギー性だけでなく、資源生産性の観点からも大いに注目されているが、排水処理への適用は実現されていないのが実状である。これは、メタン発酵に關与する微生物の増殖速度が極めて遅いことが原因であり、処理水槽内にこれらの微生物を高濃度に保持するのが困難であったためである。

近年では、膜分離技術とメタン発酵を組み合わせた嫌気 MBR (Membrane Bio-Reactor) プロセスが開発され、メタン発酵に關与する微生物を系内に高濃度に保持することが可能となった。筆者らは、嫌気 MBR による排水処理性能について、実下水を対象とした実証試験を実施した(写真-1)。その結果、処理水の水質項目の一つである BOD (生物学的酸素供給量) は、自治体の上乗せ排水基準値 (20 mg/L) 未満まで低減でき、活性汚泥法と同等の処理性能が得られることを確認した。現在は技術展開として、産業排水への適用性や装置のスケールアップ検討を進めている。

2.2 藻類バイオ燃料製造システム

前節では、排水を対象としたメタン製造システムについて紹介した。排水には有機物の他に窒素やリンも含まれているが、一般的にメタン発酵では、排水中の窒素やリンの除去が期待できない。窒素及びリンは、富栄養化の原因物質であるが、資源循環の観点から考えると貴重な資源であるため、これらを活用した物質生産を行うことが望ましい。そこで、メタンのガス発電で生じた二酸化炭素と、メタン製造システムの処理水に含まれる窒素・リンを活用した藻類バイオ燃料の製造システムに関する研究も進めている。次章では、微細藻類を用いた燃料生産の課題について述べる。

3. 微細藻類を用いた燃料生産とその課題

自然界に生息する一部の微細藻類は、細胞内にトリアシルグリセロール (TAG) 等の脂質を蓄積することが明らかとなっている。細胞内に蓄積した脂質を改質することにより、持続可能な航空燃料 (SAF : Sustainable Aviation Fuel) や軽油代替燃料 (BDF) を製

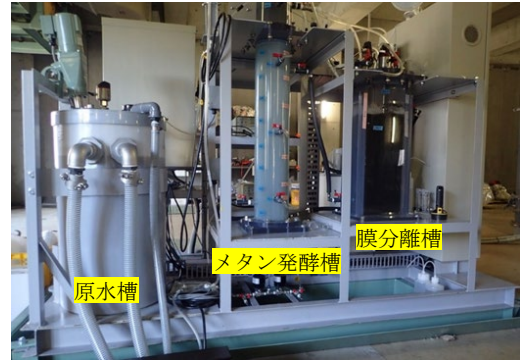


写真-1 嫌気性 MBR を用いたメタン発酵実証試験
Photo.1 Demonstration experiment of methane fermentation using anaerobic MBR

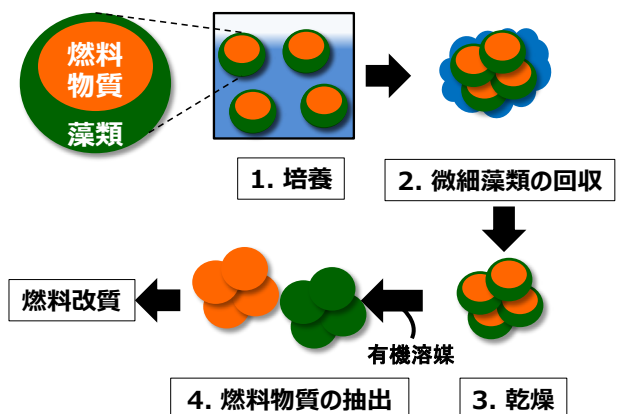


図-2 細胞内に脂質を蓄積する微細藻類を用いた燃料物質生産のフロー

Fig.2 Manufacturing process of biofuel using microalgae that accumulate lipid in cell.

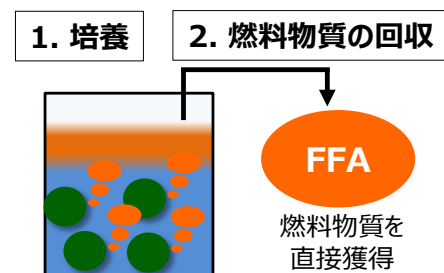


図-3 細胞外に燃料物質を生産する微細藻類を用いた生産のフロー

Fig.3 Manufacturing process of biofuel using microalgae that produce extracellular free fatty acids.

造できるため、微細藻類を用いたバイオ燃料生産に関する研究が精力的に行われている²⁾。しかしながら、これらの藻類が生産する燃料物質は細胞内に蓄積されるため、培養後に藻類菌体を回収・乾燥し、燃料物質を有機溶媒等で抽出する必要がある(図-2)。特に、藻類菌体の回収・乾燥及び有機溶媒による抽出工程では、燃料物質の生産に係る投与エネルギーの 50%以上を占めているため³⁾、実用化を阻む要因となっている。

著者らは、微細藻類を活用した燃料生産の省力化の一つとして、微細藻類の遺伝子を改変して燃料物質である遊離脂肪酸（FFA：Free fatty acids）を細胞外に生産する「細胞外生産法」の検討を進めている（図-3）。本方法は、遺伝子改変した微細藻類を培養することにより、液中に分泌された燃料物質を回収でき、さらには藻体自体を死滅させることなく燃料生産に再利用することができる。この結果、製造工程の大幅な簡略化と省エネルギー化が達成できる。次章では、遺伝子改変技術を用いて作製した細胞外 FFA 生産微細藻類について紹介する。

4. 細胞外に燃料物質を生産する微細藻類

遺伝子改変技術を用いて細胞外に燃料物質を生産する微細藻類は 2011 年に初めて報告された⁴⁾。ここでは、シアノバクテリア（ラン藻）の脂肪酸合成経路に係る遺伝子を改変することで細胞外に FFA を生産することを実現している。以下、細胞外に FFA を生産可能な藻類について紹介する。

4.1 外来生物の遺伝子を活用した FFA 生産

シアノバクテリアは、光合成によって CO_2 からアシル ACP を合成して膜脂質を生合成する（図-4）。膜脂質からリパーゼの働きにより FFA が切り出されるが、FFA はアシル ACP 合成酵素（Aas）によりアシル ACP へと変換されて膜脂質の生合成に再利用されるため、通常は細胞外に FFA はほとんど放出されない。しかし、アシル ACP 合成酵素をコードするアシル ACP シンターゼ遺伝子（*aas*）を破壊すると、細胞内に FFA が蓄積し過剰量の FFA は細胞外へと放出される。さらに、大腸菌のチオエステラーゼ遺伝子（*tesA*）を導入することにより、直接、アシル ACP から FFA を切り出すことが可能となり、FFA 生産量が大きく増大することが報告されている^{4),5)}。しかしながら、作製した藻類は外来の遺伝子を挿入した生物であり、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（カルタヘナ法）に規定される遺伝子組換え生物に該当する。遺伝子組換え微生物の工業利用では、該当生物の環境漏洩対策を講じる必要があり、その管理など運用面での課題が残されている。そこで、本研究では、外来生物の遺伝子を用いずに FFA を細胞外に生産できる藻類の開発を進めている。

4.2 内在性遺伝子の発現抑制・強化による FFA 生産

シアノバクテリアが生来備えている内在性遺伝子の

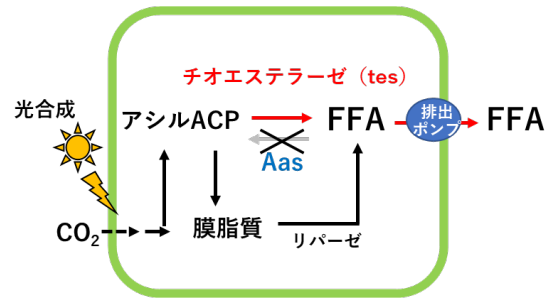


図-4 細胞外に FFA を生産可能な遺伝子組換え藻類
Fig.4 Genetically manipulated microalgae that produce extracellular free fatty acids.

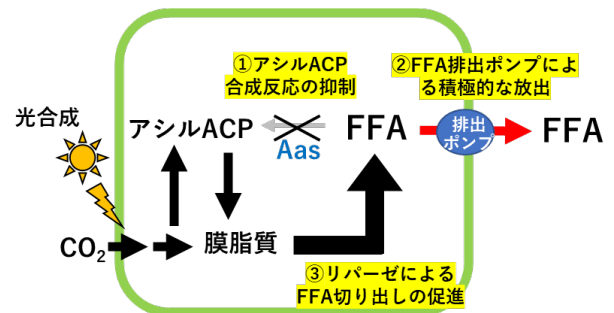


図-5 セルフクローニング技術による FFA の細胞外生産
Fig.5 Production of extracellular free fatty acids by using self-cloning techniques.

発現を抑制・強化すること（セルフクローニング技術）で FFA を細胞外に生産できる藻類を作製できる可能性がある（図-5）。その実現には、①FFA からアシル ACP への合成反応を抑制し、②FFA を細胞外に放出する機能（FFA 排出ポンプ）⁵⁾と③膜脂質から FFA を生産するリパーゼの強化を行う必要がある。そこで、次章ではシアノバクテリアを用いて①～③に関する遺伝子改変を施した株（セルフクローニング株）を作製し、FFA 生産性能を評価した結果を報告する。

5. セルフクローニング株における FFA 生産性能の評価

5.1 実験方法

シアノバクテリアである *Synechococcus elongatus* を用いて株の作製を行った。遺伝子改変としては、①*aas* 遺伝子の破壊、②FFA 排出ポンプ機能を持つ RND 型輸送体の遺伝子 *rndAB* の高発現化及び③リパーゼ遺伝子の高発現化の 3 つの遺伝子操作を施した 3 種類の株を作製し（写真-2）、FFA 生産試験を実施した。FFA 生産試験では、事前に培養した各種セルフクローニング株を濁度（OD730）が 0.05 となるように栄養塩類を含む培

地に植菌し、2%のCO₂を給気しながら、電球色のLEDライトを用いて 200 μ E/m²/s の連続光照射下で 32℃、10 日間培養した。培地中の FFA を回収するためにミリスチン酸イソプロピル (IM) を重層して、IMに含まれる FFA を Free Fatty Acid Quantification Kit (Biovision) により測定し、培地当たりの FFA 濃度を算出した。

5.2 実験結果

図-6 に①～③の遺伝子改変を実施した株の FFA 生産速度を示した。FFA からアシル ACP への合成反応を抑制した株（遺伝子改変株①）の FFA 生産速度は 5 mg-FFA/日/g-dry cell を示し、*aas* 遺伝子を破壊することにより FFA が細胞外生産できることを示した。さらに、FFA の排出ポンプ機能を強化した株（遺伝子改変株②）、これにリパーゼ活性を強化した株（遺伝子改変株①②③）の FFA 生産速度は、それぞれ 8 mg-FFA/日/g-dry cell, 31 mg-FFA/日/g-dry cell を示した。以上の結果から、*S. elongatus* が元来有する遺伝子を抑制・強化することにより、燃料物質である FFA を細胞外に生産できることが明らかとなった。

6. まとめ

本報では、排水に含まれる有機物等をエネルギー源と捉え、積極的にメタンガス及び BDF などのバイオ燃料に転換する新たな排水処理プロセスについて紹介した。排水からのメタン発酵については、排水に含まれる有機物をメタンガスに変換しながら水処理を実行できることから、スケールアップ等への応用研究を実施する予定である。また、藻類バイオ燃料の製造システムでは、外来生物の遺伝子を用いずに FFA を細胞外に生産できる藻類の作製を試みた。その結果、3 種の遺伝子改変を施すことで細胞外に FFA を生産できる藻類の作製に成功した。但し、今回作製した株の FFA 生産能力は、最大で 31 mg-FFA/日/g-dry cell であり、細胞内に燃料物質を蓄積する微細藻類（10～120 mg-FFA/日/g-dry cell）と比べて中程度である。そのため、今後は FFA の生産能の強化を図る予定である。

謝辞

本研究の一部は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）から助成を受けて実施したものである。



写真-2 セルフクローニング技術を用いて作製した FFA 生産藻類

Photo. 2 Free fatty acids producing microalgae generated by using self-cloning techniques

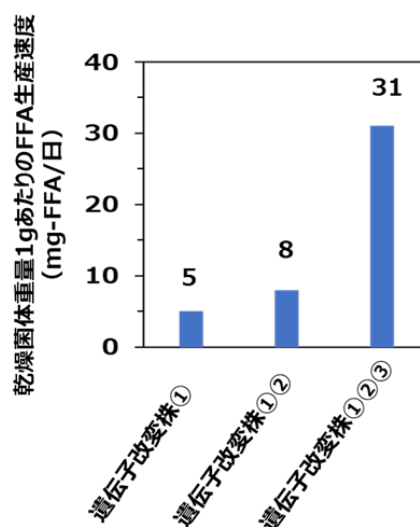


図-6 各遺伝子改変株の FFA 生産能力

Fig.6 FFA production performance of genetically manipulated strains

参考文献

- 1) 国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構：技術戦略研究センターレポート TSC Foresight 持続可能な社会の実現に向けた技術開発総合指針 2020, 2020.
- 2) 産業競争力懇談会（COCN）：微細藻類を利用した燃料の開発，産業競争力懇談会 2011 年度プロジェクト最終報告, 2012.
- 3) Hou, J., Yang, J. and Zhang, P.: Life cycle analysis on fossil energy ratio of algal biodiesel: effects of nitrogen deficiency and oil extraction technology, Sci. World J., Vol.2015, pp.1-9, 2014.
- 4) Liu *et al.*: Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria, Proc Natl Acad Sci USA, Vol.108, pp.6899-6904, 2011.
- 5) Kato *et al.*: Identification of a cyanobacterial RND-type efflux system involved in export of free fatty acids, Plant Cell Physiol, Vol. 56, pp.2467-2477, 2015.