

## 2021年度成果報告会

# 「海洋ケイ藻のオープン・クローズ型 ハイブリッド培養技術の開発」

バイオジェット燃料生産技術開発事業／微細藻類基盤技術開発



電源開発(株)

再委託先



(国)東京農工大学

(私)関西学院大学

(公)諏訪東京理科大学

問い合わせ先  
電源開発株式会社  
E-mail: kinhei\_konishi@jpower.co.jp  
TEL:093-741-0942

## 1. 期間

委託期間 : 2020年8月～2023年3月  
助成期間(予定) : 2023年4月～2025年2月

## 2. 委託期間（最終目標）

- (1) 本事業でのグリーンオイル生産量目標値である200L/回(例:藻体収量0.7g/L, オイル蓄積率40wt%)を見通す培養条件を設定し、600m<sup>3</sup>クラスのオープン型培養装置（以下、基本ユニット）とクローズ型培養装置を組合せた統合型培養システム(以下、ハイブリッド培養システム)による培養試験を開始する。
- (2) オイル生産性が最大となる培養プロセスの基本ユニット培養試験へ反映、改良株評価による改変技術の有効性を確認する。
- (3) 実現性の高いバイオジェット燃料製造事業シナリオを提案する。
- (4) 得られた成果からCO<sub>2</sub>削減効果、エネルギー収支を明らかにする。

## 3. 成果・進捗概要

- (1) 小規模既設オープン・クローズ型培養装置を用いた培養試験による藻油(以下、グリーンオイル)生産量向上に向けた屋外培養条件設定に取り組んでいる
- (2) グリーンオイル生産量向上に向け、ラボ試験によるデータ取得を開始した。ゲノム編集による改良株作出の効率化に向けた遺伝子導入方法、発現強化方法の検討を行い、分子育種基盤技術確立に向けた検討を行っている。
- (3) 海洋ケイ藻が産生する副生品についてリストアップし、市場調査を実施している。
- (4) 選定した構成機器のCO<sub>2</sub>発生量及びエネルギー消費量について機器仕様から試算を行っている

### 基本ユニット

クローズ型培養装置  
(10m<sup>3</sup>クラス)



オープン型培養装置(600m<sup>3</sup>クラス)



オープン・クローズ型培養ハイブリッド培養システムの完成

1. 屋外安定大量培養技術の必要性
2. 培養システム概要
3. 本事業の達成目標と参画者の関係性
4. オープン・クローズ型培養装置による培養試験状況
5. グリーオイル生産量向上（各大学の実施内容）
  - (1) 太陽光の利用性向上
  - (2) 光合成機能解析
  - (3) 海洋ケイ藻の改変技術開発
6. 設備設置状況
7. 成果まとめ
8. 事業の進捗状況

# 1. 屋外安定大量培養技術の必要性

微細藻類によるバイオジェット燃料生産では、下図の工程を経て生産される。

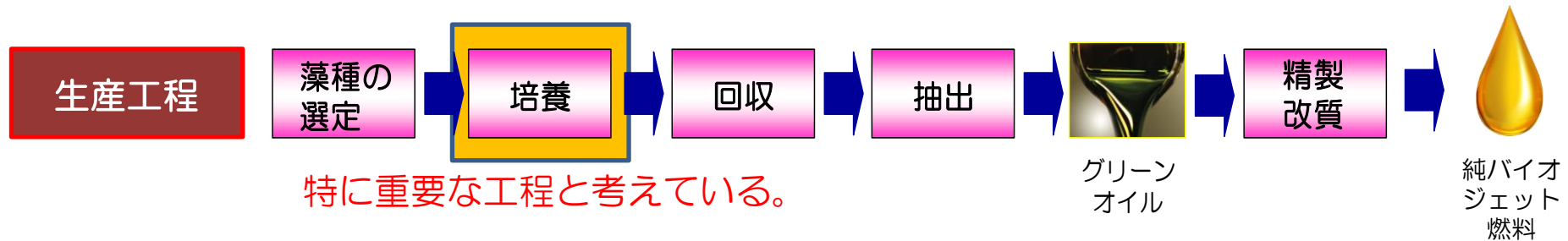
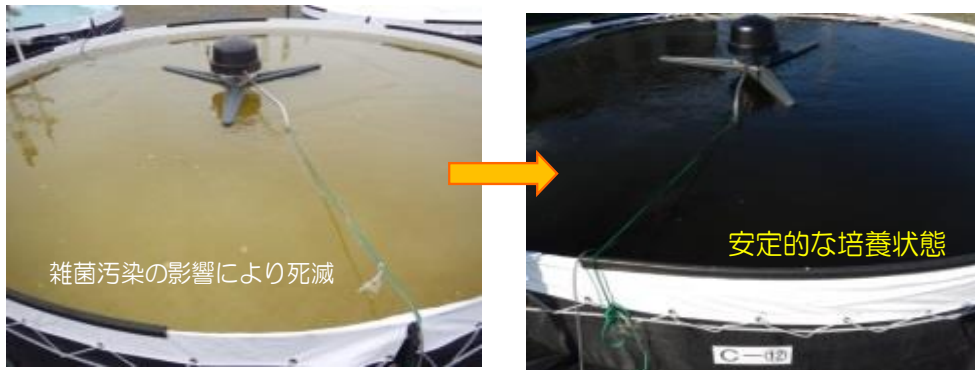


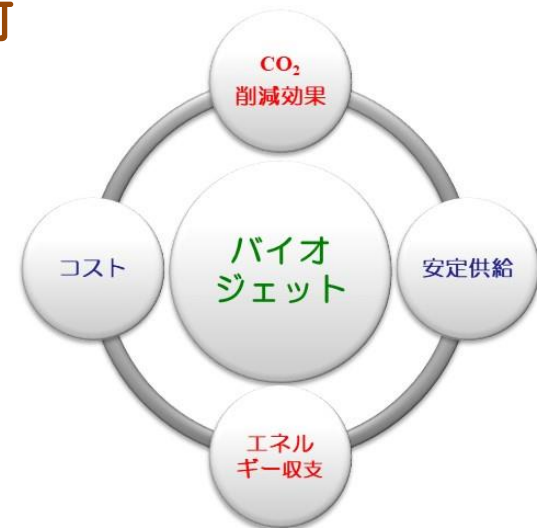
図 微細藻類によるバイオジェット燃料生産までの工程

## 求められる技術

- バイオジェット燃料生産には、微細藻類を屋外で大量に安定的に培養する培養技術が必要。



- また、大規模生産に向けて、規模拡大方法も視野に入れた培養技術であることも必要。



- バイオジェット燃料にはCO<sub>2</sub>削減効果が不可欠であり、低エネルギー型(低CO<sub>2</sub>排出)技術の生産プロセスが求められる。

# オープン・クローズ型ハイブリッド培養システムイメージ

## 円形ポンド、ガラスチューブ利用

- ・屋外におけるオープン培養期間短縮

オープン型培養装置



培養液移送

クローズ型培養装置



屋内培養室

- ・室内環境作業で清浄性を確保。

- ・クローズ型培養装置による高密度藻体の生産

- ・コンタミネーションリスクを低減できる。
- ・屋外培養期間を短縮により、環境変化影響を最小限にできる。

安定培養が行える培養方法として期待できる。

クローズ型培養装置は、培養実績が豊富なガラスチューブ型を採用。

## 2020年度の達成目標

- 1) 小規模既設オープン・クローズ型培養装置を用いた培養試験による藻油(以下、グリーンオイル)生産量向上に向けた屋外培養条件設定を行う。
- 2) グリーンオイル生産量向上に向け、ラボ試験によるデータ取得を開始する。ゲノム編集による改良株作出の効率化に向けた遺伝子導入方法、発現強化方法の検討を行い、分子育種基盤技術確立に向けた検討を開始する。
- 3) 海洋ケイ藻が産生する副生品についてリストアップし、市場調査を実施する。
- 4) 選定した構成機器のCO<sub>2</sub>発生量及びエネルギー消費量について機器仕様から試算する。



# 4. オープン・クローズ型培養装置による培養試験状況

## 既設培養装置を活用したハイブリット培養試験



小規模既設ガラスチューブ型培養装置(0.35m³)による増殖培養

(種株を作製する工程)

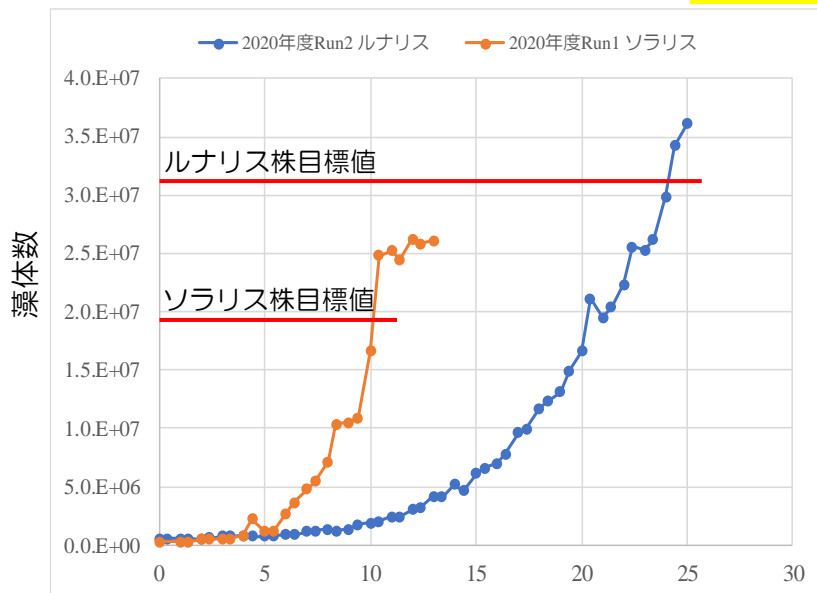


植菌

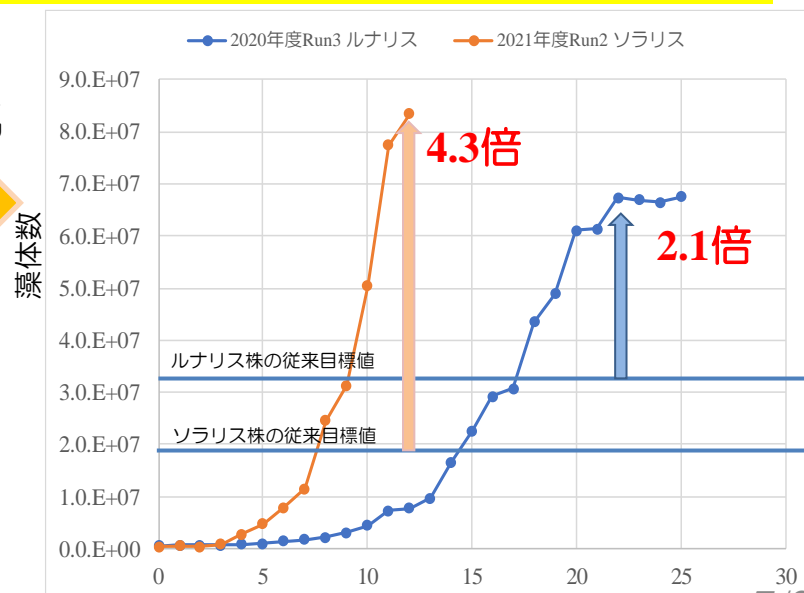
小規模既設円形ポンド型培養装置(10m³)による  
オイル蓄積培養

(オイルを貯めさせる工程)

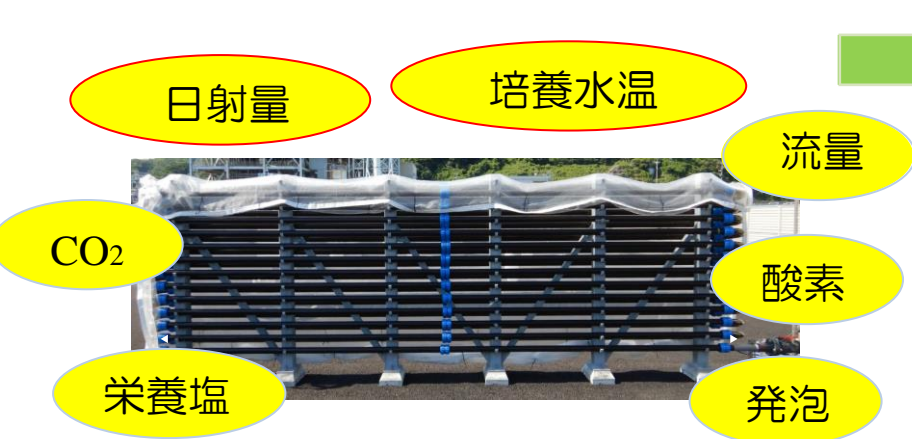
クローズ型培養：ソラリス株1,900万cells/ml以上、ルナリス株3,200万cells/ml以上となる  
培養条件設定 高密度化を達成する培養条件設定が行えた。



高密度化



# 4. オープン・クローズ型培養装置による培養試験状況



クローズ型培養の高濃度、安定培養では、外部環境要因のマネジメントが重要

表 日射量のマネジメント(ルナリス株)

藻体濃度	最大日射量 * (≒PPFD)	遮光率
50万cells/ml~	10,000lux (200 $\mu$ mol/m <sup>2</sup> /s)	90%
500万cells/ml~	25,000lux (500 $\mu$ mol/m <sup>2</sup> /s)	70%
1,000万cells/ml~	50,000lux (1,000 $\mu$ mol/m <sup>2</sup> /s)	50%
1,900万cells/ml~	75,000lux (1,500 $\mu$ mol/m <sup>2</sup> /s)	25%

\* 日射量については、太陽光の最大値を100,000lux (2,000 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s)とした場合の、遮光ネット透過後の値

ルナリス株では、日射量マネジメント(光阻害を回避)を行うことで、飛躍的に藻体数が上昇した。

表 日射量のマネジメント(ソラリス株)

藻体濃度	最大日射量* (≒PPFD)	遮光率
50万cells/ml~	10,000lux (200 $\mu$ mol/m <sup>2</sup> /s)	90%
500万cells/ml~	30,000lux (600 $\mu$ mol/m <sup>2</sup> /s)	70%
1,000cells/ml~	50,000lux (1,000 $\mu$ mol/m <sup>2</sup> /s)	50%
1,900万cells/ml~	75,000lux (1,500 $\mu$ mol/m <sup>2</sup> /s)	25%
3,000万cells/ml~	100,000lux (2,000 $\mu$ mol/m <sup>2</sup> /s)	-

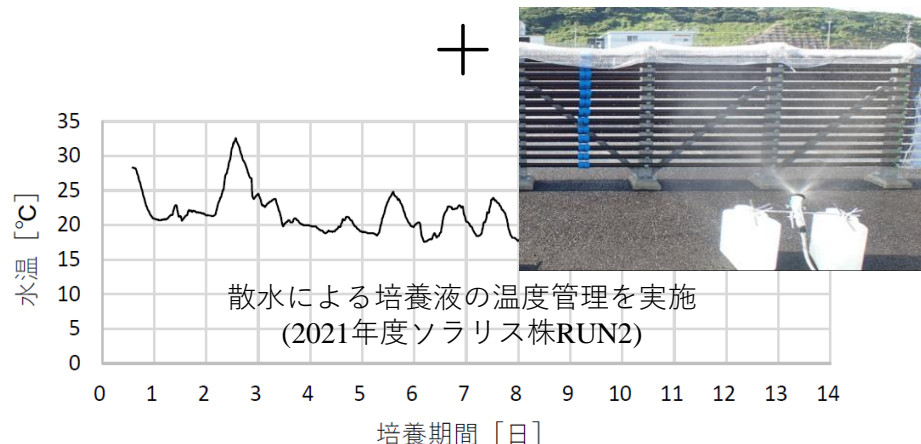
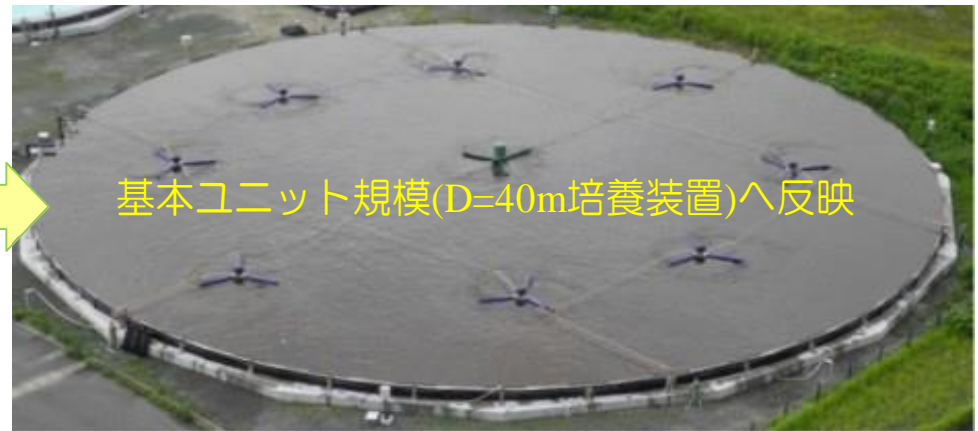


図 ソラリス株のクローズ型培養(RUN2)期間における水温変化



## 4. オープン・クローズ型培養装置による培養試験状況

オープン型培養：グリーンオイル200L/回(培養)に向けた培養条件の検討



基本ユニット  
直径:40m

水深:0.5m

オイル生産量200L/回

オイル生産量200L/回に向け、小規模既設オープン型培養装置による取り組み項目

- I. 栄養塩(成分検討、N源種類(硝酸体N、アンモニア体N濃度))について
- II. 培養開始の初期藻体濃度について
- III. 培養水深(50cm以下)について
- IV. 攪拌効果(攪拌装置の台数)について
- V. pH(無機炭素種、pHによる雑菌抑制)について
- VI. コンタミネーション(早期検出、抑制方法)について

## 4. オープン・クローズ型培養装置による培養試験状況

### 既設培養装置を活用したハイブリット培養



小規模既設ガラスチューブ型培養装置(350L)による増殖培養

(種株を作製する工程)



植菌

小規模既設円形pond型培養装置(10m³)による  
オイル蓄積培養

(オイルを貯めさせる工程)

オープン型培養：オイル生産性0.32ml/L-培養液 (オイル生産量200L/回)となる培養条件  
設定

目標値達成に向けた培養条件の絞り込みを進めている。

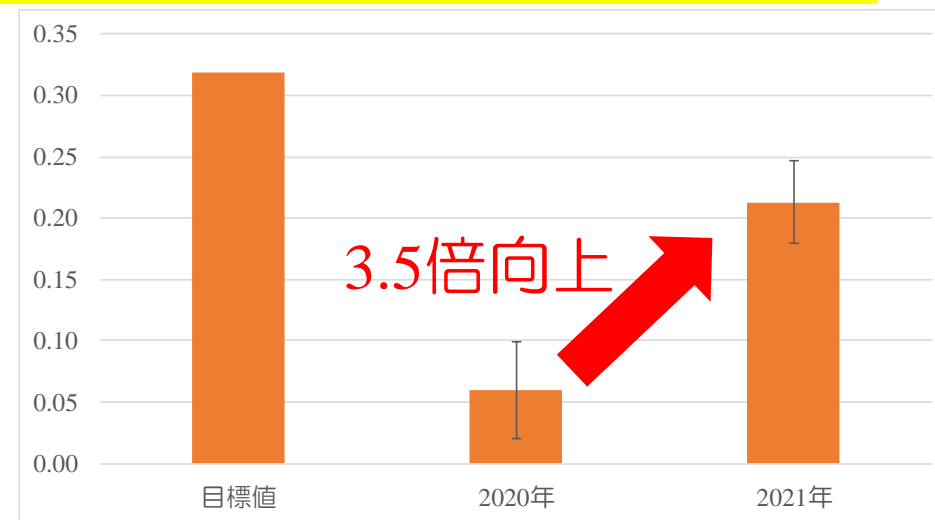
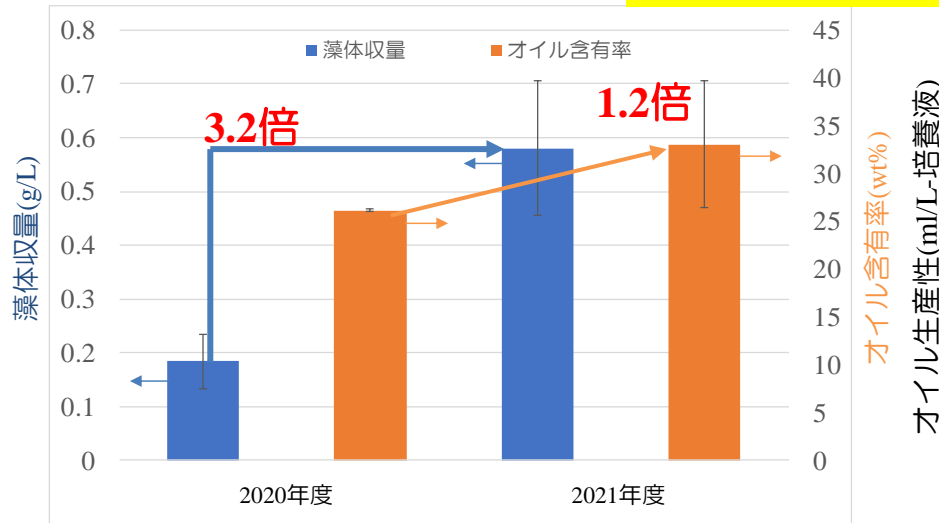


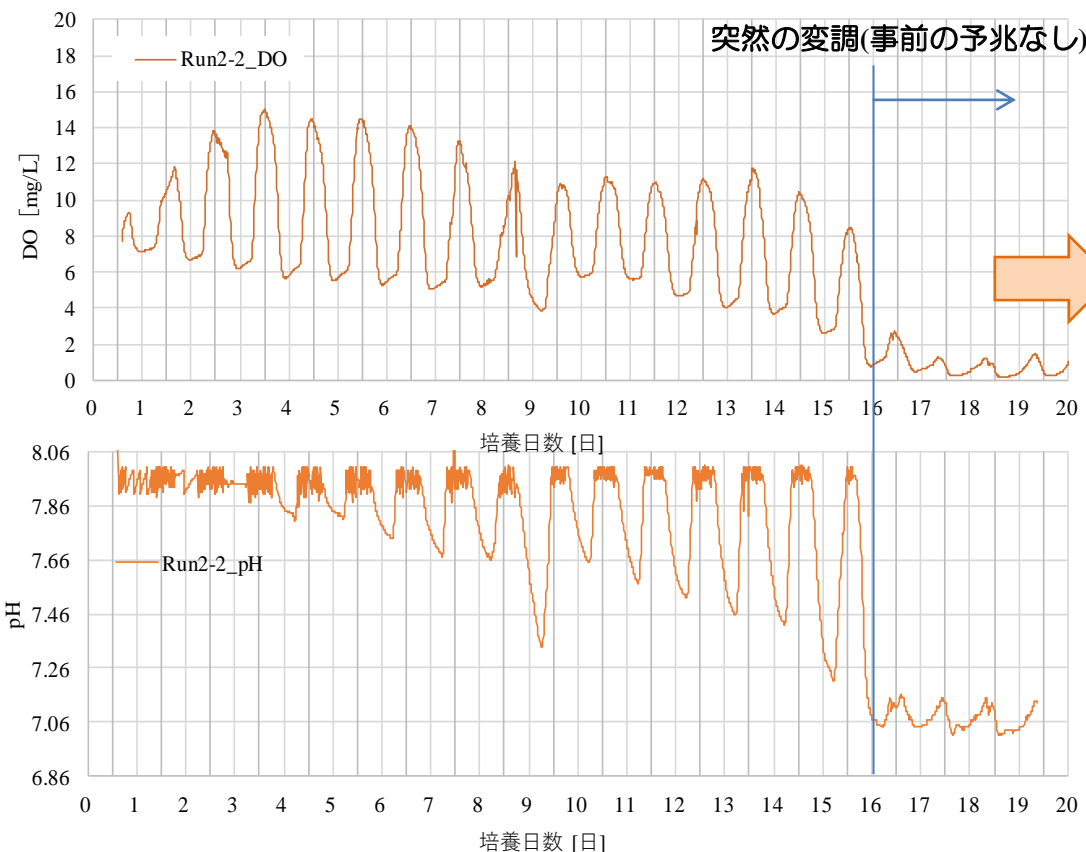
図 ソラリス株のオープン型培養による藻体収量、オイル含有率、オイル生産性の変化 (試験条件: 10m³)

## 4. オープン・クローズ型培養装置による培養試験状況

ハイブリッド培養技術へ期待するところは

- ・ 全てオープン型培養に比べて、コンタミリスクが低減できることが期待される。
- ・ 屋外環境下での培養期間が短縮され、環境変化から受ける影響が少ないことが期待される。

一方で、ハイブリッド培養技術でも最後のオイル蓄積培養はオープン型培養を行うことから、コンタミ微生物の混入、生育不良化のリスクは残る。



測定項目のモニタリングで変調が見られた時点で、既に手遅れの状態に陥る。  
(培養がクラッシュ)

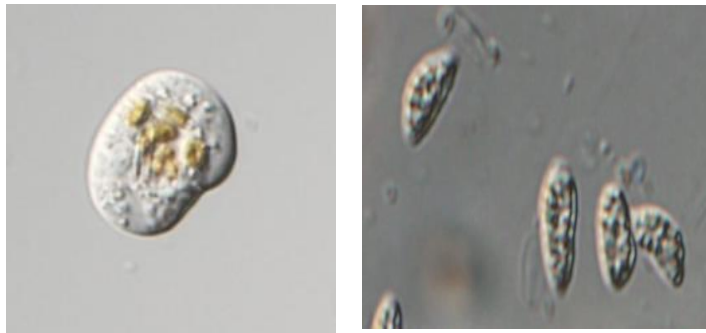
このため、ソラリス株/ルナリス株の迅速な培養状態の把握が必要となり、特に致命的なコンタミ微生物混入の早期検出とその対策が重要となる。

図 ソラリス株のオープン型培養(RUN2-2)におけるDO、pHの変調

# 4. オープン・クローズ型培養装置による培養試験状況

## 早期検出法の確立

### Real time PCRの活用



捕食性微生物

致命的な影響を及ぼす2つの  
捕食性微生物

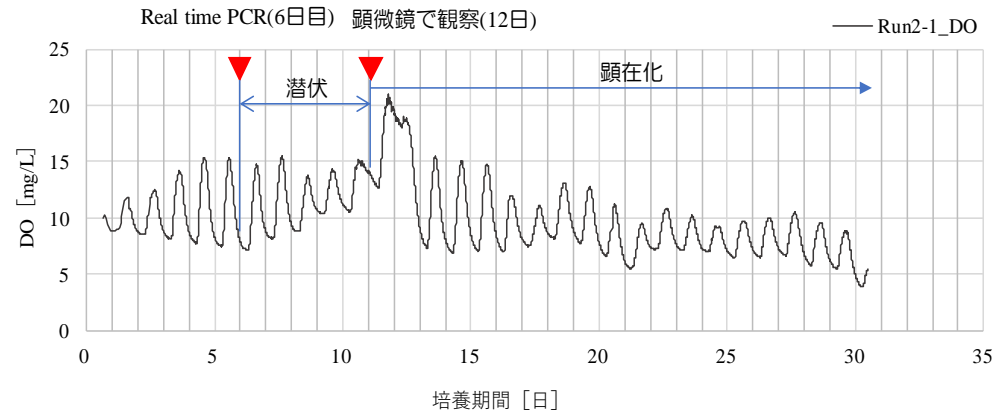


図 ルナリス株への混入と検出、DO変化

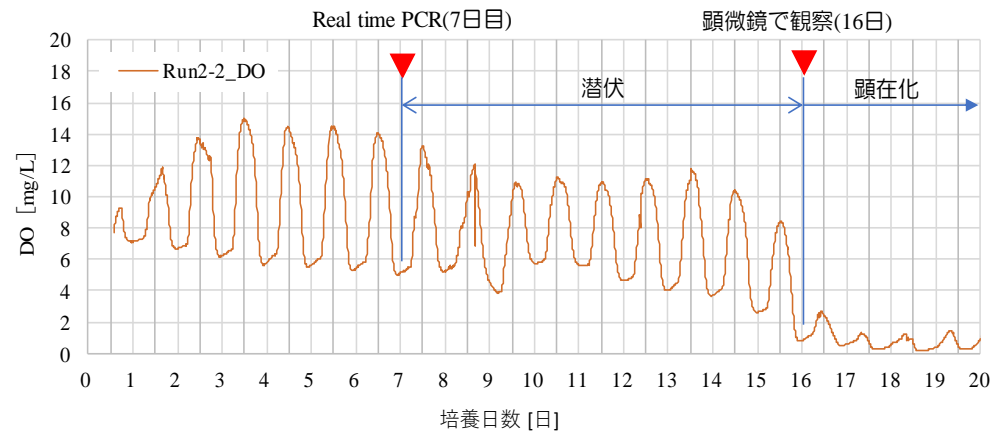


図 ソラリス株への混入と検出、DO変化

生育抑制装置の導入、pHなどの培養環境を変化させることによる抑制効果を確認しているものの、生育不良化への影響が残っているため、要素試験、有効な対策を検討中。

## 5. グリーンオイル生産性向上

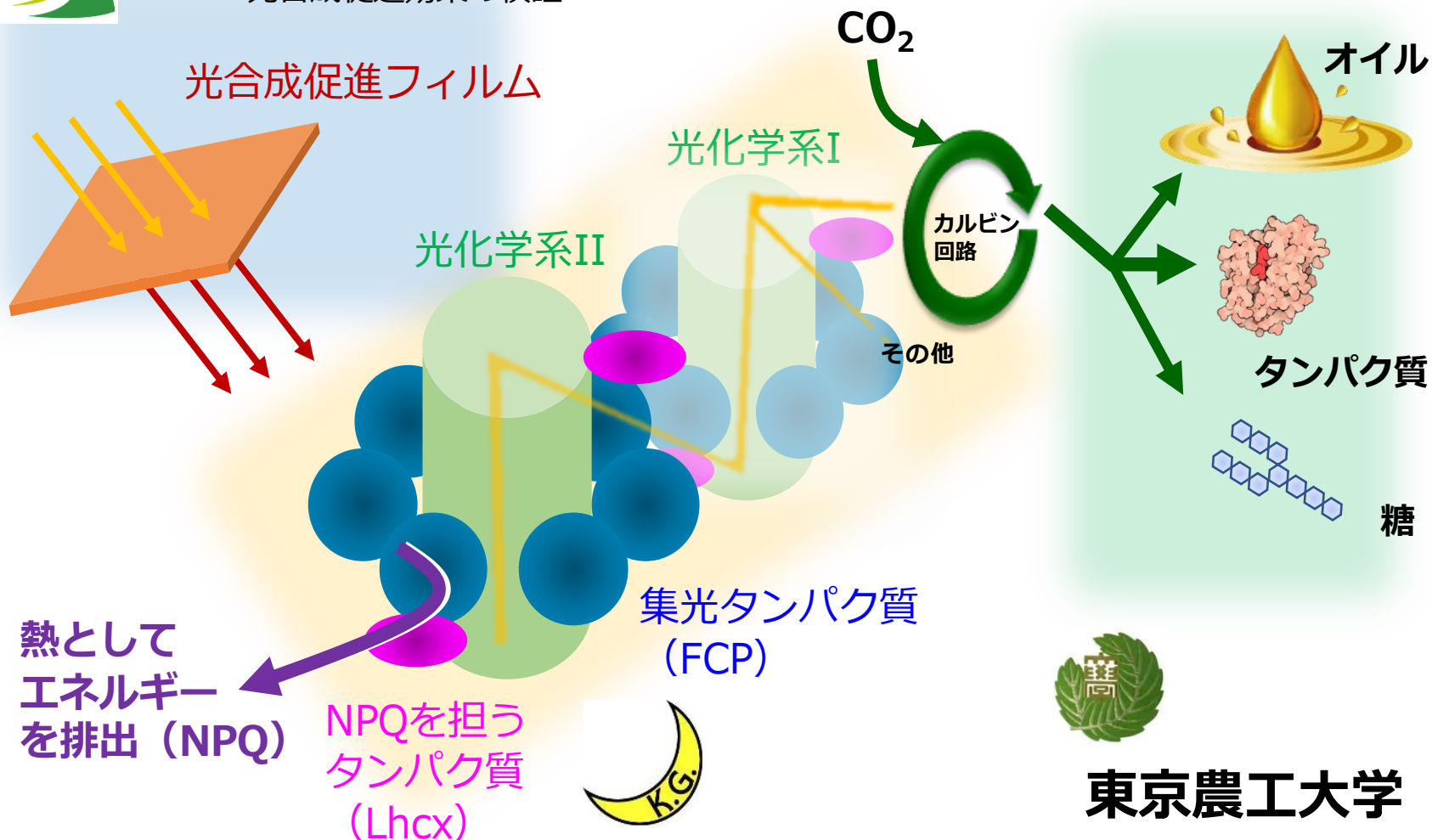


**諏訪東京理科大学**

光合成促進効果の検証

太陽光の有効活用

光合成促進フィルムによる生育向上



**東京農工大学**

トランスクリプトーム解析  
代謝改変  
改良株の作出

環境因子による光合成機能影響評価  
光合成活性-環境相関チャートの作成  
代謝ボトルネックの解明

**関西学院大学**

光合成機能の解析

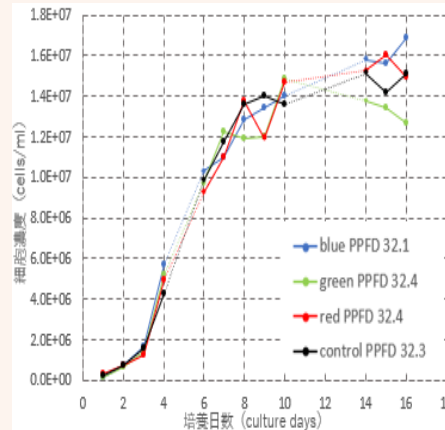


## 各波長(赤、青、緑)と光強度による生育比較

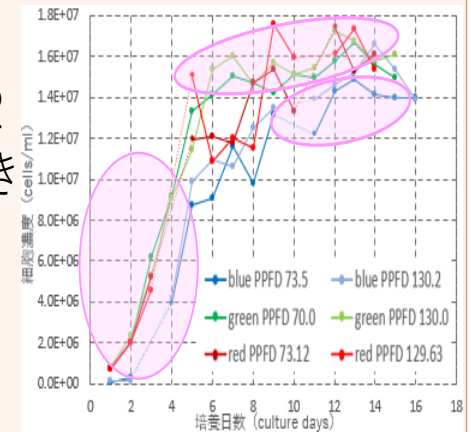
PPFD: 光合成量子束密度

### 課題① PPFDを一定にさせた培養試験

①. PPFD:  $32 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  での培養試験では、各波長ごとに対する大きな変化はない

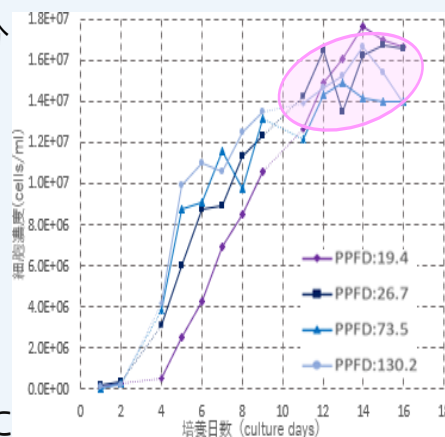


②. PPFDを高くすることで、赤、緑と青の2つに分けることができ主に、培養初期の増殖速度や細胞数の差に変化があった

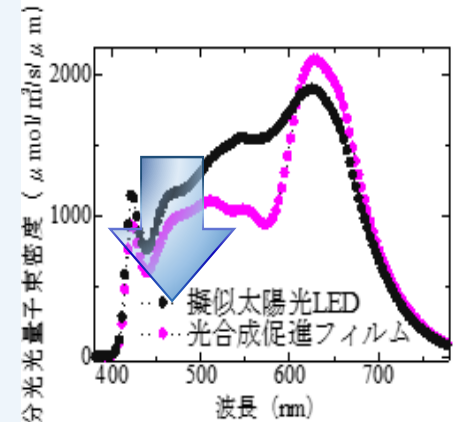


### 課題② 青の光波長の強度を変えた培養試験

③. 4つの光強度を振り分けて培養試験を行ったがPPFD:  $26.7 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  以上の培養でも、 $130 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  と同数の細胞数が確認できた

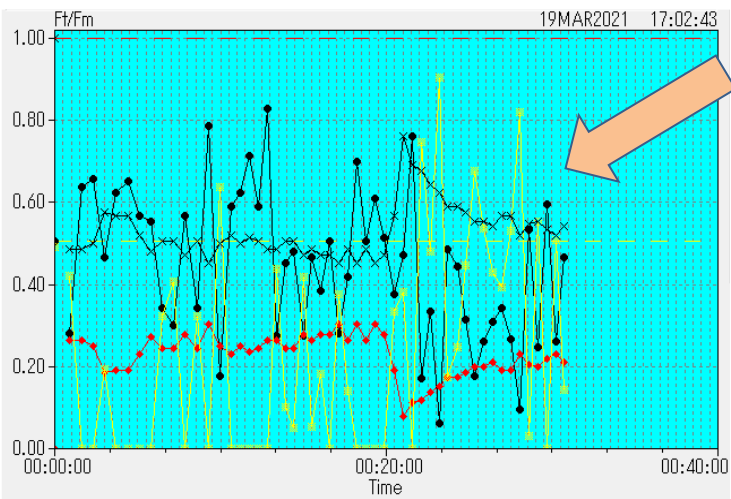


④. 光合成促進フィルムを用いた場合、青の光波長域が減少することによる細胞数の変化はないことが確認できた

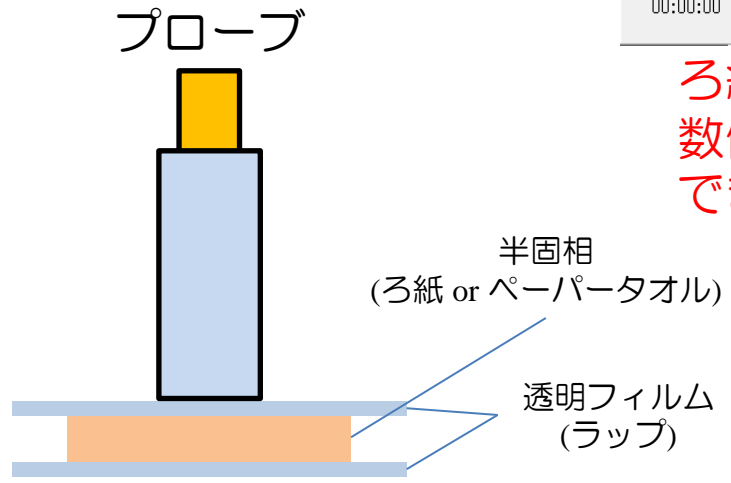
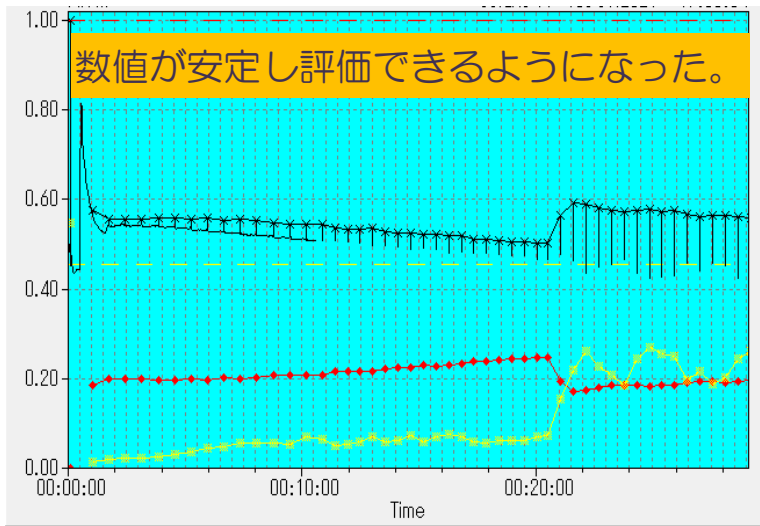




## 光合成の環境因子影響評価へ向けた測定条件の最適化



藻体懸濁液を用いた NPQ 評価では、凝集などから上手く測定できない。



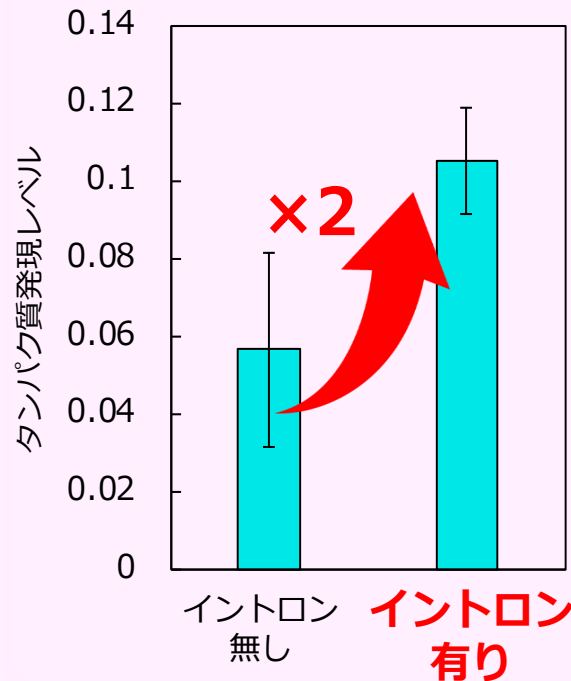
ろ紙に藻体を固定化することで数値が安定化する測定法を確立できた。

今後は、本方法を用いて各種環境因子による評価を行っていく予定。

## ゲノム編集による分子育種技術の確立

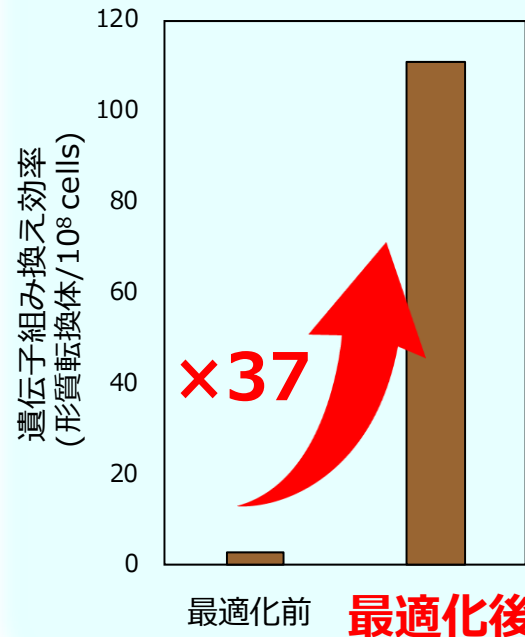
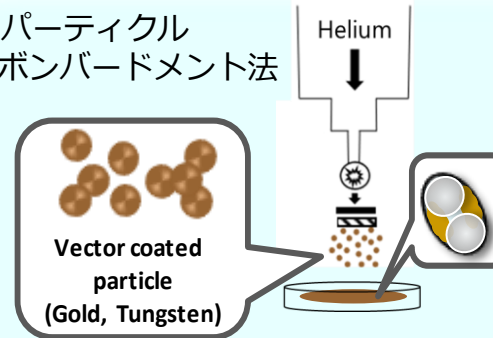
### 内在性イントロンによる 組み換えタンパク質発現強化法

遺伝子発現を増強する  
内在性イントロン

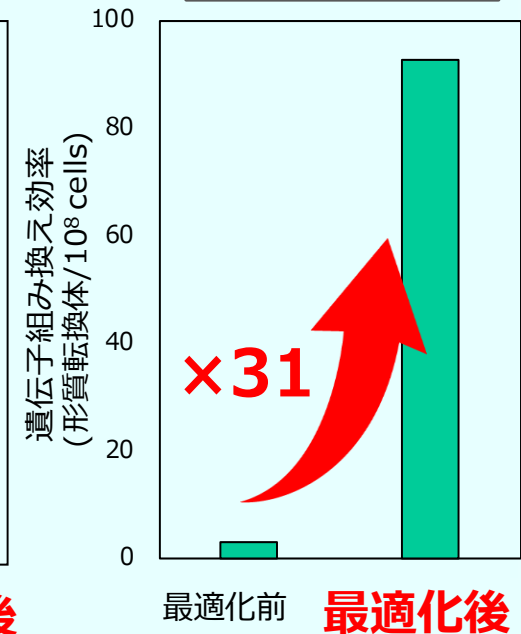
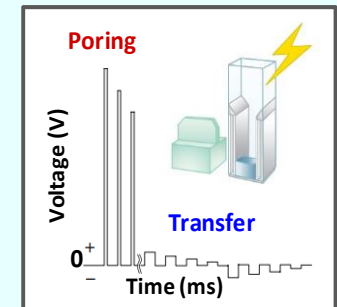


### 遺伝子導入方法の最適化

◆ パーティクル  
ボンバードメント法



◆ エレクトロポレーション法



### オープン/クローズ型ハイブリッド培養試験設備全体像



## (1) オープン・クローズ型ハイブリッド培養(ソラリス株/ルナリス株)

### クローズ型培養(ソラリス株/ルナリス株)

- ソラリス株(1,900万cells/ml)、ルナリス株(3,200万cells/ml)の藻体濃度を達成した。
- ソラリス株で8,300万cell/ml、ルナリス株で6,700万cells/mlの高濃度化に成功した。

### オープン型培養(ソラリス株/ルナリス株)

- ソラリス株において2020年度に比べ、オイル生産性を向上させる培養条件設定が行えた。
- ルナリス株については、ソラリス株の成果を反映しながら、今冬の培養試験を行う。
- 特定雑菌による生育不良化が顕在化しており、引き続き対策検討を継続する。

## (2) グリーンオイル生産性向上(各大学)

- 各波長(赤、緑、青)と光強度のケイ藻に対する生育特性評価を行った結果、青の波長で他の波長と異なる生育特性(生育遅延)が確認された。
- 今後、水温と波長による生育特性評価を行う。
- 光合成活性の安定的な測定方法を確立した。
- 各環境要因(栄養塩、pH、水温、光強度など)について評価を行い、チャート作製を進め、ボトルネックの解明を図って行く。

### (2) グリーンオイル生産性向上(各大学)

- 3種類の導入方の内、2種類導入方法を評価し、共に数十倍の導入効率向上が得られた。
- 残り導入技術評価、導入方法の選定を行うと共に、ターゲット遺伝子、導入遺伝子カセット、内在性イントロンの活用などの検討を行う。

### (3) 副生品利用

- 4種類の副生品の市場性調査を行い、それぞれの市場性があることを確認した。
- 安全性評価や興味を示した企業などへのサンプル提供を通じて具体的な取り組みを開始した。

### (4) エネルギー収支、CO<sub>2</sub>収支評価

- 基本ユニットの1/10処理量クラスの脱水・回収、乾燥設備を導入し、エネルギー収支、CO<sub>2</sub>収支について試験を開始する。



# 8. 事業計画の進捗状況(2021年度終了時点)

参考

項目	2020年度	2021年度	2022年度	2023年度	2024年度
<b>(1) 主な設備導入、既設設備の整備</b>		100%			
・クローズ型培養装置(基本ユニット用)					
・オープン型培養装置(基本ユニット用)					
・後段プロセス設備					
<b>(2) 試験項目</b>					
<b>① クローズ型培養装置の開発</b>		100%			100%
①-1 大規模クローズ型培養装置の仕様決定					
①-2 大規模クローズ型培養装置の設置と培養試験					
①-3 大規模オープン型培養へ藻体の供給開始					
①-4 大規模クローズ型培養の運転ノウハウの取得					
<b>② オープン型培養装置の開発</b>		60%	100%		
②-1 オープン型培養におけるグリーオイル生産条件の検討					
②-2 大規模オープン型培養装置の改良・試運転					
<b>③ オープン・クローズ型ハイブリッド培養装置の研究開発</b>		50%			100%
③-1 基本ユニットでの培養条件の検討					
③-2 基本ユニットの運用に向けた運用ノウハウの取得					
<b>④ 太陽光の利用性向上に向けた装置開発</b>		50%			100%
④-1 光合成促進フィルムによる生育促進効果					
④-2 光合成促進フィルムが光合成に与える影響					
④-3 太陽光下でのケイ藻の生育促進効果					
④-4 薄膜太陽光電池特性の把握					
<b>⑤ 海洋ケイ藻の光合成機能解析</b>		40%			100%
⑤-1 光合成活性と環境因子の関係性把握					
⑤-2 藻体収量向上に向けたボトルネックの把握					
<b>⑥ 光合成機能と生育、オイル蓄積率の関係性解明</b>		40%			100%
⑥-1 オイル生産性を最大化させる培養条件の設定					
⑥-2 グリーンオイル生産量の培養地域の検証					
<b>⑦ 海洋ケイ藻の改変技術開発</b>		30%			100%
⑦-1 ゲノム編集の効率化に向けた分子育種法の検討					
⑦-2 代謝改変のためのゲノム編集設計					
⑦-3 改良株の作出と評価					
<b>⑧ 副産品製造も含むバイオジェット燃料製造事業の採算性検討</b>		60%			100%
⑧-1 海洋ケイ藻が産生する副産品調査					
<b>⑨ CO<sub>2</sub>削減効果とエネルギー収支の試算と更なる効率化検討</b>		60%			100%
⑨-1 CO <sub>2</sub> 削減効果の試算					
⑨-2 エネルギー収支の試算					