

## 環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

研究区分 : 環境問題対応型研究（カーボンニュートラル枠）

研究実施期間 : 2022（令和4）年度～2024（令和6）年度

課題番号 : 3CN-2205

体系的番号 : JPMEERF20223C05

研究課題名 : 微細藻類からの油脂抽出におけるポリマー系凝集剤の影響の解明

Project Title : Elucidating the Effects of Polymer-Based Flocculants on Lipid Extraction from Microalgae

研究代表者 : 山本 徹也

研究代表機関 : 名古屋大学

研究分担機関 : 京都大学

キーワード : カーボンニュートラル、カーボンネガティブ、微細藻類、溶媒抽出、凝集剤

注：研究機関等は研究実施期間中のものです。また、各機関の名称は本報告書作成時点のものです。

令和7（2025）年11月



## 目次

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書.....	1
研究課題情報.....	3
<基本情報> .....	3
<研究体制> .....	3
<研究経費> .....	4
<研究の全体概要図> .....	5
<b>1. 研究成果.....</b>	<b>6</b>
1. 1. 研究背景 .....	6
1. 2. 研究目的 .....	6
1. 3. 研究目標 .....	6
1. 4. 研究内容・研究結果 .....	7
1. 4. 1. 研究内容 .....	7
1. 4. 1. 1. サブテーマ1の研究内容 .....	8
1. 4. 1. 2. サブテーマ2の研究内容 .....	9
1. 4. 2. 研究結果及び考察 .....	10
1. 4. 2. 1. サブテーマ1の研究結果及び考察 .....	10
1. 4. 2. 1. 1. ポリマー系凝集剤のDME溶解実験とその理論検討(成果7,11~14,17,19) .....	11
1. 4. 2. 1. 2. 緑藻クロレラに対するDME抽出(成果8,10,11,16,18,20,23,24,38~40) .....	14
1. 4. 2. 1. 3. 緑藻クロレラからの抽出物や抽出残渣の分析結果と考察(成果8,10,11,16,18,20,23,24,38~40) .....	18
1. 4. 2. 1. 4. 珪藻キートセロスに対する検討(成果6,15,22,25,29~31,40) .....	22
1. 4. 2. 1. 5. 円石藻プレウロクリシスに対する検討(成果9) .....	26
1. 4. 2. 1. 6. 緑藻ドナリエラに対する検討(成果5,21,26) .....	29
1. 4. 2. 1. 7. ユーグレナに対する検討 .....	30
1. 4. 2. 2. サブテーマ2の研究結果及び考察 .....	31
1. 4. 2. 2. 1. ポリマー系凝集剤の安全性に関する文献調査(研究成果36,41) .....	31
1. 4. 2. 2. 2. 微細藻類とポリマー系凝集剤の特性評価(成果1~4,28,32~35,37,41) .....	32
1. 4. 2. 2. 3. 複数種のポリマー凝集剤を用いた遠心分離実験(成果1,2,27,28,41) .....	34
1. 4. 2. 2. 4. 最適なポリマー系凝集剤の種類と凝集条件(成果1,3,4,27,33~35,37) .....	36
1. 4. 2. 2. 5. 凝集メカニズムの解明(成果1~4,27,28,32~35,37) .....	39
1. 4. 2. 2. 6. 自重濃縮と遠心脱水試験(研究成果4,35) .....	43
1. 4. 2. 2. 7. ライフサイクルエネルギー・温室効果ガス排出量の評価(研究成果36,42) .....	45
1. 4. 2. 2. 8. 天然由来凝集剤を用いた微細藻類の凝集効果の検討(研究成果36,42) .....	48
1. 4. 2. 2. 9. 二液薬注によるエネルギー消費量低減の検討(研究成果36,42) .....	48
1. 4. 2. 2. 10. 生細胞の微細藻類での凝集効果の検討 .....	51
1. 4. 3 研究全体のまとめ .....	52
1. 5. 研究成果及び自己評価 .....	52
1. 5. 1. 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献 .....	52
1. 5. 2. 研究成果に基づく研究目標の達成状況及び自己評価 .....	54
1. 6. 研究成果発表状況の概要 .....	56
1. 6. 1. 研究成果発表の件数 .....	56
1. 6. 2. 主要な研究成果発表 .....	57
1. 6. 3. 主要な研究成果普及活動 .....	57
1. 7. 国際共同研究等の状況 .....	57
1. 8. 研究者略歴 .....	58
<b>2. 研究成果発表の一覧 .....</b>	<b>59</b>
(1) 研究成果発表の件数 .....	59
(2) 産業財産権 .....	59
(3) 論文 .....	60
(4) 著書 .....	60
(5) 口頭発表・ポスター発表 .....	62
(6) 研究成果による受賞 .....	63

## 研究課題情報

&lt;基本情報&gt;

研究区分 :	環境問題対応型研究（カーボンニュートラル枠）
研究実施期間 :	2022（令和4）年度～2024（令和6）年度
研究領域 :	資源循環領域
重点課題 :	【重点課題10】地域循環共生圏に資する廃棄物処理システムの構築に関する研究・技術開発
行政ニーズ :	非該当
課題番号 :	3CN-2205
体系的番号 :	JPMERF20223C05
研究課題名 :	微細藻類からの油脂抽出におけるポリマー系凝集剤の影響の解明
研究代表者 :	山本 徹也
研究代表機関 :	名古屋大学
研究分担機関 :	京都大学
研究協力機関 :	スラバヤ工科大学

注：研究協力機関は公開の了承があった機関名のみ記載されます。

## &lt;研究体制&gt;

サブテーマ1 「微細藻類凝集体へのDME 抽出技術の適用」

&lt;サブテーマリーダー（STL）、研究分担者、及び研究協力者&gt;

役割	機関名	部署名	役職名	氏名	一時参画期間
サブテーマリーダー	名古屋大学	大学院工学研究科化学システム工学専攻	准教授	山本徹也	2024年11月～2025年3月
サブテーマリーダー	名古屋大学	大学院工学研究科化学システム工学専攻	助教	神田英輝	2022年4月～2024年11月
研究分担者	名古屋大学	大学院工学研究科化学システム工学専攻	特任助教	王涛	2022年4月～2024年12月
研究分担者	名古屋大学	大学院工学研究科物質プロセス工学専攻	特任助教	朱力	2022年10月～2024年9月
研究協力者	名古屋大学	大学院工学研究科物質プロセス工学専攻	学生	楠美海斗	2022年4月～2025年3月

研究協力者	名古屋大学	大学院工学研究科化学システム工学専攻	研究補佐員	徐波	2022年4月～ 2023年12月
研究協力者	名古屋大学	大学院工学研究科化学システム工学専攻	研究補佐員	黄美宣	2022年12月～ 2025年3月

## サブテーマ2 「溶媒調和型凝集剤の探索」

&lt;サブテーマリーダー（STL）、研究分担者、及び研究協力者&gt;

役割	機関名	部署名	役職名	氏名	一時参画期間
サブテーマリーダー	京都大学	工学研究科 都市環境工学 専攻	准教授	大下和徹	2022年4月～ 2025年3月
研究分担者	京都大学	工学研究科 都市環境工学 専攻	特定研究員	本間亮介	2022年9月～ 2025年3月
研究協力者	京都大学	工学研究科 都市環境工学 専攻	学生	米澤璃穂	2022年4月～ 2025年3月

## &lt;研究経費の実績&gt;

年度	直接経費（円）	間接経費（円）	経費合計（円）	備考（自己充当等）
2022	15,380,000	4,614,000	19,994,000	
2023	15,380,000	4,614,000	19,994,000	
2024	15,380,000	4,614,000	19,994,000	
全期間合計	46,140,000	13,842,000	59,982,000	

注： 環境研究総合推進費の規定する研究経費の支援規模を超えた額は自己充当等によるものです。

&lt;研究の全体概要図&gt;

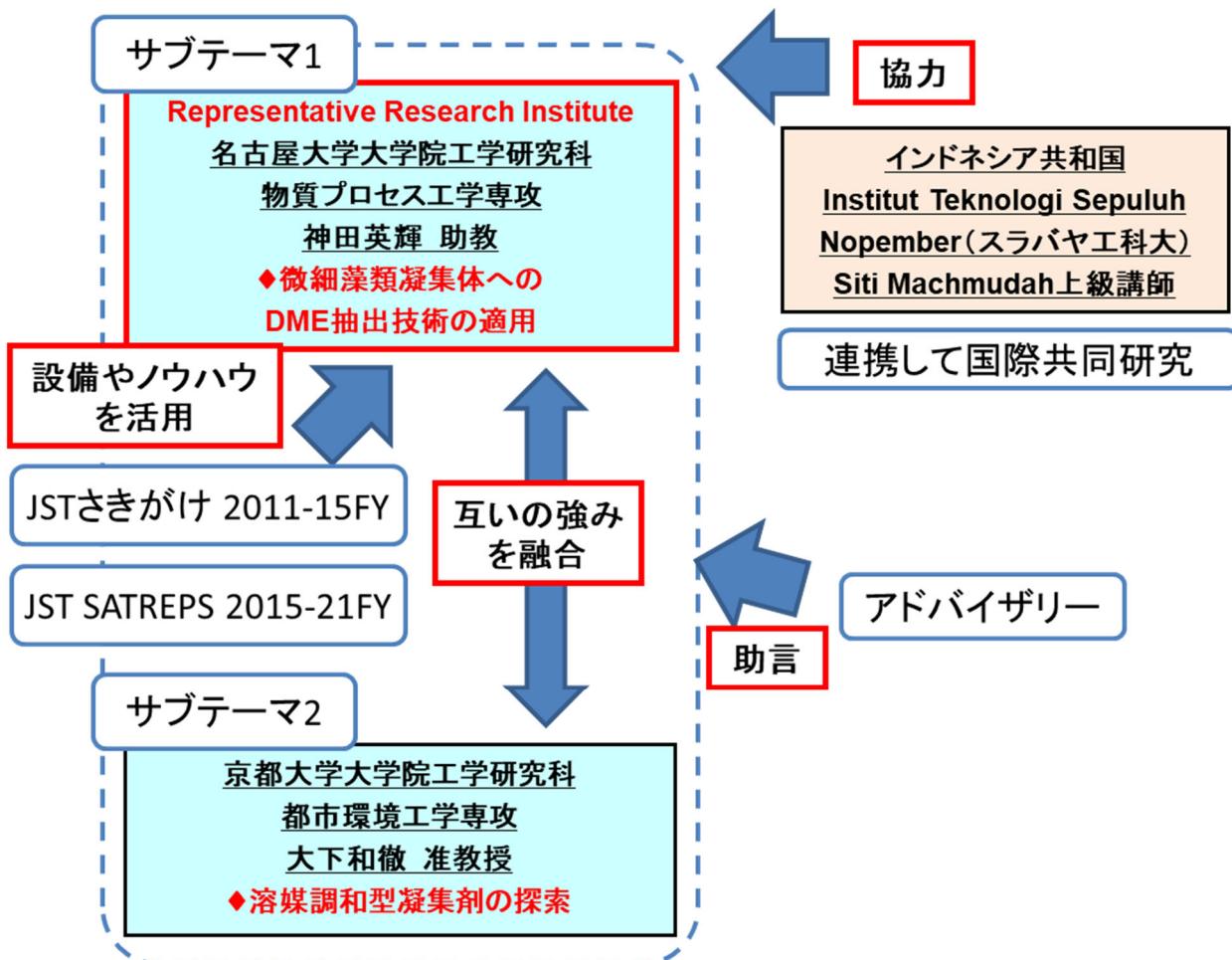
## 微細藻類からの油脂抽出におけるポリマー系凝集剤の影響の解明 代表機関: 国立大学法人東海国立大学機構(名古屋大学)

### 目的

日本の石油消費の20%は化成品原料であり、これを光合成能力に優れる微細藻類由来にするため、油脂抽出能力に優れるDME溶媒に、回収に優れるポリマー系凝集剤を併用した際の、油脂へのポリマー系凝集剤の混入の抑制や、機能性成分の抽出挙動を解明する。

### 全体目標

- ・微細藻類の加熱による乾燥前処理を経ることが無い、油脂や機能性成分の抽出手法の確立
- ・微細藻類に添加するポリマー系凝集剤の、抽出溶媒であるDMEの影響を把握
- ・抽出油脂への混入量が少ないポリマー系凝集剤の探索
- ・抽出物に含まれる機能性物質の解明(定性・定量)
- ・遠心分離で回収された微細藻類に含まれる水分量80%以下と回収率98%以上



## 1. 研究成果

### 1. 1. 研究背景

2021年に国際連合の気候変動に関する政府間パネル（IPCC）は20年以内に世界の平均気温が産業革命以前から1.5°C以上上昇するとの予測を発表し、日本政府はパリ協定を念頭に置き、2050年のカーボンニュートラルを目指している。しかし、太陽光発電や風力発電が普及しても日本の石油消費の20%は化成品原料であり、これを再生可能にする必要がある。加えて、大気中のCO<sub>2</sub>を減らすカーボンネガティブには、単位時間面積当たりの光合成能力が高い微細藻類の活用が重要である。既に微細藻類の培養では、下水二次処理水を肥料にした窒素やリンの回収や屋外大量培養は行われ、例えばユーグレナ等が食品産業で商業化されるなど一定の社会実装が進んでいる。微細藻類は油脂等の化成品原料も含有し、これを抽出した後の残渣は高タンパクなので食料や農業肥料として利用できる。化成品原料として利用するには微細藻類から抽出する必要があるが、微細藻類は水生植物であるので遠心分離で回収された状態は水分90%の泥状であり、抽出の前に乾燥が必要である。しかし乾燥には微細藻類の保有熱量を超えるエネルギーが必要なので、エネルギー収支がマイナスとなる。仮にグリーン電力を投入しても、それは極めて低効率なグリーン電力の化成品原料への変換となるので意義に乏しい。この問題は世界的に全く解決されていないが、今回提案する技術は、ジメチルエーテル（DME：欧米で食品加工に許可されている）を用いて、温水や未利用廃熱を水や油脂を抽出するエネルギーに変換する手法であり、乾燥を経ることなく微細藻類から油脂や有用成分を抽出できるので、先述の問題を解決できる。ただし今までの研究で二つの課題が判明している。本技術は水分90%の泥状の微細藻類から抽出できる代わりに、装置に充填される微細藻類の90vol%が水なので装置が大型化した。そこで前処理として遠心分離などの濃縮操作が必要となるが、この際に効率化のために利用されるポリマー系凝集剤の添加が、後段のDME抽出に与える影響は未研究である。次に、バイオ燃料の原料である中性脂質は抽出できたが、それ以外の機能性物質については抽出の知見が乏しい。本研究ではこれら未解明の点を明らかにし、微細藻類からの抽出物の環境産業への実装を目指す。

### 1. 2. 研究目的

本研究の目的は、微細藻類を再生可能な化成品原料として活用するための技術開発を行い、環境産業への実装を促進することである。具体的には、微細藻類からの油脂や有用成分の効率的な抽出方法を確立し、装置の効率化やポリマー系凝集剤の影響評価、その他の機能性物質の抽出に関する知見を得ることを目指す。

詳細には、以下の課題を解決することを目的とする。

- ① 微細藻類からの油脂や機能性物質の抽出方法の開発：微細藻類は水分90%の泥状で回収されるため、乾燥が必要でありエネルギー収支がマイナスになる問題がある。本研究では、ジメチルエーテル（DME）を用いて微細藻類から油脂や機能性物質を抽出する際の挙動を解明し、乾燥を回避することでエネルギー効率を向上させる抽出手法を開発する。
- ② 微細藻類の含水率の低減：通常の遠心分離で培養液から微細藻類を回収すると、微細藻類の90vol%が水であるので、装置に充填すると装置が大型化してコストが増大する課題がある。本研究では、前処理としてポリマー凝集剤を用いた濃縮操作を組み合わせることで微細藻類の水分を低減し、装置の大型化の課題を解決する。
- ③ ポリマー系凝集剤の影響評価：濃縮操作において利用されるポリマー系凝集剤の添加が、後段のDME抽出に与える影響を明らかにする。効率的かつ環境に配慮した凝集剤の選定や最適な操作条件の確立を目指す。
- ④ 微細藻類の抽出残渣の活用：微細藻類の抽出残渣を肥料や飼料、食品分野や化学品の代替原料として活用する可能性を明らかにし、さまざまな価値創造の可能性を探求する。

研究目的を上記のように設定することで、微細藻類の持つ潜在的な価値を最大限に引き出し、化成品原料である石油の代替有機物としての微細藻類の利用を実現することを目指す。

### 1. 3. 研究目標

<全体の研究目標>

研究課題名	微細藻類からの油脂抽出におけるポリマー系凝集剤の影響の解明
全体目標	微細藻類の加熱による乾燥前処理を使用しない、油脂や機能性成分の抽出手法において、微細藻類に含まれるポリマー系凝集剤への抽出溶媒であるDMEの影響を把握する。これにより微細藻類からDMEで抽出された油脂へのポリマー系凝集剤の混入の防止（検出下限未満）、抽出物に含まれる機能性物質の解明

	(定性・定量)、遠心分離で回収された微細藻類に含まれる水分量の下水汚泥並み(80%以下)への低減と微細藻類の回収率も98%以上を目標とする。これにより微細藻類の化成品原料への転換における、回収エネルギーの低減、抽出装置のコスト抑制、残渣の肥料や食料への転換に向けた技術開発を進める。
--	---

## &lt;サブテーマ1の研究目標&gt;

サブテーマ1名	微細藻類凝集体へのDME 抽出技術の適用
サブテーマ1実施機関	名古屋大学
サブテーマ1目標	研究全体を統括するとともに、凝集剤で回収された微細藻類（緑藻・珪藻・円石藻から各1種類）に含まれるポリマー系凝集剤への抽出溶媒であるDMEの影響を解明する。これにより微細藻類からDMEで抽出された油脂へのポリマー系凝集剤の混入の防止（検出下限未満）、抽出物に含まれる機能性物質の解明（定性・定量）を行う。分析にはMALDI-TOF-MS（低分子量分布）、ゲル浸透クロマト（高分子量分布）、HPLC（UN-Vis）、GC-MS（脂肪酸組成）を駆使する。

## &lt;サブテーマ2の研究目標&gt;

サブテーマ2名	溶媒調和型凝集剤の探索
サブテーマ2実施機関	京都大学
サブテーマ2目標	細胞壁の構成物質が著しく異なる3種類の微細藻類（緑藻・珪藻・円石藻）に対する、ポリマー系凝集剤による凝集効果を明らかにする。ポリマー系凝集剤の探索に際しては、DMEに不溶といった溶媒調和性や、農業肥料や食品としても利用される抽出残渣への残留を念頭にして環境調和性も考慮する。凝集剤の水分の低減効果としては、遠心分離後の微細藻類への含水率が下水汚泥並みの水分80%未満を目指すとともに、微細藻類の回収率も98%以上を目指す。凝集剤の遠心分離の消費エネルギーの低減効果に関しては、実機を想定した遠心条件（加速度）における分離試験を小型遠心分離器で行い、その分離時間から実機の処理速度を逆算し、そこから消費エネルギーを推算する。

## 1. 4. 研究内容・研究結果

## 1. 4. 1. 研究内容

この研究課題では、微細藻類の加熱乾燥処理を使用しない、油脂や機能性成分の抽出手法において、微細藻類に含まれるポリマー系凝集剤に対する抽出溶媒としての液化ジメチルエーテル(DME)の影響を把握することを目的とした。具体的には、微細藻類からDMEで抽出された油脂へのポリマー系凝集剤の混入の防止、抽出物に含まれる機能性物質の解明（サブテーマ1）を取り組むとともに、凝集・遠心分離で回収された微細藻類に含まれる水分量の下水汚泥脱水ケーキ並み(80%以下)への低減と微細藻類の回収率も98%以上を目標とした検討を行った（サブテーマ2）。

#### 1. 4. 1. 1. サブテーマ1の研究内容

サブテーマ1では、微細藻類からの油脂や有用成分を高効率かつ低エネルギーで抽出する技術の確立を目的とし、液化DMEを用いた抽出法に適したポリマー系凝集剤の探索および、抽出挙動の評価を実施した。そのスケジュールを表Iに示す。なお、微細藻類の凝集体やポリマー系凝集剤は、サブテーマ2との連携において提供されたものを用いた。

表I サブテーマ1のスケジュール

検討項目	令和4年度				令和5年度				令和6年度			
	4-6月	7-9月	10-12月	1-3月	4-6月	7-9月	10-12月	1-3月	4-6月	7-9月	10-12月	1-3月
凝集剤可溶性の理論検討					溶解度パラメータに基づくDMEへの溶解挙動の判断				論文投稿 受理			
凝集剤のDME溶解実験		DMEへの溶解挙動から利用可能な凝集剤候補を選定			論文作成				論文投稿 受理			
緑藻クロレラ					凝集剤なしDMEによる脂質抽出挙動を解明				論文投稿・受理			
					適切に選定された凝集剤を添加すれば脂質抽出に悪影響しないことが判明							
珪藻キートセラス					凝集剤なしの脂質と機能性物質の抽出(追加分)				論文投稿 受理			
					早期に最適なポリマー凝集剤の種類と添加量の決定				適切に選定された凝集剤によるDMEの脂質抽出挙動を解明			
円石藻					凝集剤なしの脂質抽出挙動を解明				適切に選定された凝集剤の添加によるDMEの脂質抽出挙動を解明			
					早期に最適なポリマー凝集剤の種類と添加量の決定					論文投稿・受理		
緑藻ドナリエラ(追加分)					凝集剤なしの脂質と機能性物質の抽出(追加分)				論文投稿・受理			
					適切に選定された凝集剤の添加によるDMEの脂質抽出挙動を解明(追加分)							
ユーグレナ(追加分)					凝集剤なしの脂質抽出挙動を解明(追加分)				適切に選定された凝集剤の添加によるDMEの脂質抽出挙動を解明(追加分)			
インドネシア産クロレラ					凝集剤なしの脂質抽出挙動を解明				日本産クロレラに最適な凝集剤の添加によるDMEの脂質抽出挙動を検討			
当初計画	→	→	→	→	実績	→	→	→	→	→	→	→

まず、提供されたポリマー系凝集剤候補のDMEへの溶解性について、Hansen溶解度パラメーター (HSP) を文献データおよび実測結果から推算し、DMEとの相溶性を理論的に予測したうえで、実験的にもDMEに対して不溶であることを確認した。これにより、ポリマー系凝集剤が抽出操作に影響を及ぼさないことを立証した。さらに、緑藻クロレラの凝集体に対してDME抽出を行い、抽出物中の油脂およびポリマー系凝集剤成分を定量分析した。従来法（クロロホルム／メタノール混液）と同等の油脂抽出性能が得られ、ポリマー系凝集剤成分の混入も確認されなかった。分析には、GPC（ゲル浸透クロマトグラフィー）、HPLC-UV-Vis（液体クロマトグラフィー、紫外可視吸光度検出器）、GC-MS（ガスクロマトグラフィー質量分析計）、FT-IR（フーリエ変換赤外分光光度計）、CHNSO元素分析、SEM（走査型電子顕微鏡）、DLS（動的光散乱法）、XPS（X線光電子分光法）など多様な手法を用い、信頼性の高い結果が得られた。

続けて、緑藻クロレラ（日本産、インドネシア産）、円石藻プレウロクリシス、珪藻キートセロスに加えて、当初の研究計画に無かったユーグレナ、緑藻ドナリエラを対象にDME抽出を実施し、これら6種の藻類において抽出データを取得し、最適なポリマー系凝集剤の種類と添加量を同定した。ポリマー系凝集剤の評価を、単に凝集効率だけでなく、抽出後の脂質収量や品質への影響も含めて行った結果、例えば緑藻クロレラでは、脂質抽出への影響がない有効なポリマー系凝集剤や抽出を阻害するポリマー系凝集剤があることが明らかとなった。キートセロスや、プレウロクリシスでも最適なポリマー系凝集剤を同定した。これらの結果から、ポリマー系凝集剤の選定に際しては、凝集体の含水率も含め、抽出工程への影響を考慮する必要があることが確認された。また、インドネシア・スラバヤ工科大学と連携して得られたインドネシア産緑藻クロレラと日本産クロレラとの比較を行った結果、同一の凝集剤および抽出条件が異なる産地の藻類にも適用可能である可能性を示唆する結果が得られた。

加えて、クロロホルム／メタノール法による抽出では、一部の凝集剤が脂質抽出量を減少させることが確認されたのに対し、DME抽出ではその影響が見られなかった。さらに、FT-IR分析によって、抽出脂質にポリマー系凝集剤由来のピークが検出されず、脂肪酸組成や元素比率においてもポリマー系凝集剤の影響がないことが示された。これにより、抽出後の油脂へのポリマー系凝集剤混入を防止するための重要な知見が得られ、DME抽出の選択性、安全性、精製性の高さが裏付けられた。

また、サブテーマ1では当初の研究計画に含まれていなかった以下の3点の副次的成果が得られた。

- ① 42種類のポリマーに対する溶解性評価からDMEのHSP値を新たに推定し、DMEが、ポリマー系凝集剤自身の未反応モノマーを抽出できその精製にも有効であることを明らかにした。
- ② 珪藻キートセロス等に加え、当初予定していなかった緑藻ドナリエラ、ユーグレナの3種についてもDME抽出を実施し、機能性成分と脂質の同時抽出が可能であることを確認した。
- ③ 抽出物および抽出残渣が、食品、肥料、飼料等への応用や、石油由来化成品原料の代替となる有用なバイオマス資源であることを明らかにした。

#### 1. 4. 1. 2. サブテーマ2の研究内容

サブテーマ2では、複数の微細藻類（緑藻・珪藻・円石藻など）に対する、ポリマー系凝集剤による凝集効果を明らかにした。ポリマー系凝集剤の探索に際しては、DMEに不溶といった溶媒調和性や、農業肥料や食品としても利用される抽出残渣への残留を念頭にして環境調和性も考慮した。ポリマー系凝集剤の効果としては、遠心分離後の微細藻類の含水率が下水汚泥脱水ケーキ並みの含水率80%未満を目指すとともに、微細藻類の回収率も98%以上を目指す検討を行うとともに、全体プロセスの消費エネルギー、温室効果ガス排出量も試算した。これらのスケジュールを表IIに示す。

表II サブテーマ2のスケジュール

検討項目	令和4年度				令和5年度				令和6年度			
	4-6月	7-9月	10-12月	1-3月	4-6月	7-9月	10-12月	1-3月	4-6月	7-9月	10-12月	1-3月
3種類の微細藻類の特性評価			緑藻1種・珪藻1種・円石藻1種									
	<b>緑藻1種・珪藻1種・円石藻1種・ユーグレナ藻1種</b>											
ポリマー凝集剤の特性評価			カチオン度・分子量測定、主成分・粘度の調査									
	<b>カチオン度・分子量測定、主成分・粘度の調査、ポリマーの安全性に関する調査(追加)</b>											
複数種のポリマー凝集剤を用いた遠心分離実験			実験装置・分析手法の確立、実験条件の調査、遠心試験(藻類3種)、性状分析									
	<b>実験装置・分析手法の確立、実験条件の調査、遠心試験(藻類6種)、性状分析</b>											
最適なポリマー凝集剤の種類と添加量の最適化			種類と添加量の最適化(緑藻、珪藻、円石藻)									
	<b>種類と添加量の最適化&amp;性状分析(緑藻)</b>		(珪藻)		(円石藻)							
凝集メカニズムの解明に関する検討			凝集試験[攪拌条件、pH、水温](緑藻、珪藻、円石藻)									
	<b>凝集試験[攪拌条件、pH、水温](緑藻)</b>		(珪藻)		(円石藻)							
重回帰分析による支配因子の究明			重回帰分析[凝集剤種類、添加率、カチオン度、分子量、攪拌条件](緑藻、珪藻、円石藻)									
	<b>重回帰分析[凝集剤種類、添加率、カチオン度、分子量、攪拌条件](緑藻)</b>		(珪藻)		(円石藻)							
全体エネルギー試算			エネルギー評価[凝集・自重式濃縮・遠心脱水-DME抽出](緑藻、珪藻、円石藻)									
	<b>エネルギー評価[凝集・自重式濃縮・遠心脱水-DME抽出](緑藻)</b>		(珪藻)		(円石藻)							
エネルギー消費量低減 or ポリマー凝集剤の添加量低減等の対策試験			エネルギー消費量の検討(緑藻、珪藻、円石藻)									
	<b>エネルギー消費量の検討(緑藻、珪藻、円石藻)</b>		添加量低減試験(緑藻、珪藻、円石藻)									
備考			学会	査読無2件	学会2件	学会2件	投稿論文	学会				
	<b>学会</b>		<b>査読無2件</b>		<b>学会2件</b>		<b>投稿論文</b>		<b>学会</b>			
	<b>国民との対話</b>											
	<b>天然由来凝集剤での検討</b>											
	<b>2液薬注での検討</b>											
	<b>画像解析</b>											
当初計画	<b>実施期間</b>											

まず、ポリマー系凝集剤の抽出残渣への残留を考慮し、抽出残渣の利用先について、環境調和性を目指すべく、ポリマー系凝集剤による哺乳類、水産生物、植物への生体蓄積性（ポリマーの安全性）を文献調査した。その結果、家畜飼料・農業肥料の利用において、ヒトへの健康被害を及ぼさないポリマー系凝集剤も把握し、本研究に向けて選定した。

次に、3種類の微細藻類（緑藻クロレラ（日本産）、珪藻キートセラス、円石藻プレウロクリシス）の基本特性を評価した。追加で、当初研究計画になかった3種類の微細藻類（緑藻クロレラ（インドネシア産）、緑藻ドナリエラ、ユーグレナ）の基本特性の調査も行った。続けて、凝集効果の因果関係を把握するために、「ポリマー系凝集剤25種（カチオン性：14種、両性：3種、アニオン性：3種、ノニオン性：5種）の基本特性」を明らかにした。さらに、「複数種のポリマー系凝集剤の遠心分離実験」では、25種類の凝集剤と3種の微細藻類の凝集効果を把握でき、各微細藻類について少なくとも1種類の最適ポリマー系凝集剤を選定できた。追加で、3種類の微細藻類（緑藻クロレラ、緑藻ドナリエラ、ユーグレナ）に対する遠心分離実験を実施し、そ

それぞれの最適ポリマー系凝集剤を選定できた。また、「最適なポリマー系凝集剤の種類と添加量の最適化」に向けて、サブグループ1の結果（DME抽出の際に、ポリマー系凝集剤が溶解しなかったこと）に基づいて、クロレラ（日本産）に対する凝集実験（25種類のポリマー系凝集剤、添加率1～10%）を実施した。

次に「凝集メカニズムを解明」するために、凝集実験の操作因子である、ポリマー系凝集剤のカチオン度、分子量、凝集剤添加率、攪拌条件の異なる実験（600検討）を行い、クロレラ（日本産）の凝集機構を考察した。また、操作因子のみならず、水質因子の影響を把握するために、pH、水温によるクロレラの凝集率への影響も調査した。続けて、クロレラの凝集率に対して、前述した4つの操作因子を用いて、「重回帰分析による支配因子の究明」を実施した。これらの結果に基づき、ポリマー系凝集剤を用いたクロレラの回収に適切なポリマー系凝集剤および、その凝集条件の指針をまとめた。珪藻キートセラスおよび円石藻プレウロクリシスに対しても、同様に検討し、重回帰分析することで支配因子を明らかにした。

次に、「全エネルギー試算」の一環で、緑藻クロレラ、珪藻キートセラス、円石藻プレウロクリシスの凝集体の自重濃縮および遠心脱水試験を検討した。その際に、サブテーマ2の目標である、下水汚泥脱水ケーキ並みの含水率80%未満を全ての微細藻類で達成できた。また、培養、ポリマー系凝集剤製造、凝集、自重濃縮、遠心脱水、DME抽出にかかるエネルギーを本実験データと文献値を用いて、全体のエネルギー試算を算出した。

また当初計画になかった追加検討として、残渣の利用用途を開拓するために、複数の天然由来凝集剤での凝集効果を評価した。その結果、キトサンが最も効率良く微細藻類を凝集できることが明らかになった。また、「エネルギー消費量orポリマー系凝集剤の添加量低減等の対策試験」では、既に緑藻・珪藻・円石藻で98%以上の回収率を達成できていたが、凝集剤の添加率を更に減量化することを目指し、クロレラを対象に、キトサンとポリアクリル酸ナトリウムによる2液薬注の検討を実施した。その結果、キトサンの添加量を大幅削減できる添加条件および攪拌条件が明らかになった。さらに、追加で、生細胞での凝集効果の検証を実施し、乾燥試料よりも生細胞の方が凝集しやすいことが明らかになった。

#### 1. 4. 2. 研究結果及び考察

本項では、当研究課題の研究成果及び考察をサブテーマごとに以下に示す。

##### 1. 4. 2. 1. サブテーマ1の研究結果及び考察

本研究に利用した微細藻類は採取された後に凍結乾燥されており、以下の通りに入手した。クロレラ（日本産）はクロレラ工業株式会社（東京）から購入した。クロレラ（インドネシア産）はインドネシアのスラバヤ工科大学 Siti Machmudah上級講師から提供された。珪藻キートセラスは Alnur Co.（東京）から購入しており、原株は英国スコットランド海洋研究所の Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) 1085/3 に由来している。円石藻プレウロクリシスはマイクロアルジェコーポレーション株式会社（岐阜）から購入した。いずれも精製せずに実験に利用した。本研究に利用したDMEは株式会社タミヤ（Air Can 420D；静岡）から購入し、精製せずに使用した。また高速液体クロマトグラフィー(HPLC)グレードのクロロホルムとメタノールは富士フィルム和光純薬（大阪）から購入し、精製せずに使用した。ポリマー系凝集剤の候補として、次の Table 1.1 に示す11種を選定した。KP7000, KP1202BH, C502, KP209H, KA305BH, C510はいずれも三菱化学株式会社（東京）より提供された。これらは主に水処理に用いられるポリマー系凝集剤であり、下水汚泥の脱水助剤としても実績があり、脱水汚泥の農業利用も実施されている。ただし可食性は未確認であり、これらのポリマー系凝集剤が混入した残渣は飼料や食品として利用することはできない。これらの高分子はTable 1.1に示す主成分のポリマーに加えて、分子にカチオン性官能基を付与するためにジメチルアミノエチルアクリレート塩化メチル4級塩などのモノマーが共重合されているが、その共重合の組成は明らかではない。キトサン、PAA, PVA, PVP はシグマアルドリッヂ社（セントルイス, USA）より購入した。キトサンはカニやエビなどの甲殻類の殻に含まれる多糖類であり、PAA, PVA, PVP はそれぞれ主に整形外科材料、代替血漿、洗濯のりとして利用される環境調和性に優れた高分子である。いずれもポリマー系凝集剤としての利用可能性が研究されている。PGA-Naは味丹企業（台中, 台湾）から購入した。PGA-Naは納豆に含まれる成分であり、可食性のポリマーであると同時に、凝集剤としての利用可能性が報告されている。すなわち水処理用のポリマー系凝集剤6種を含んだ残渣は肥料として、残り5種のポリマー系凝集剤を含んだ残渣は肥料または飼料、食品としての利用を想定することができる。

Table 1.1 選定されたポリマー系凝集剤とその特徴

高分子凝集剤	主成分	平均分子量	カチオン度 (meq/g)	イオン性
KP7000	ポリビニルアミジン	3,000,000	5.00	カチオン
KP1202BH	ポリアクリルアミド	7,000,000	3.27	カチオン
C502	ポリアクリルアミド	7,000,000	2.82	カチオン
KP209H	ポリアクリル酸エステル	140,000,000	1.49	カチオン
KA305BH	ポリアクリルアミド	7,000,000	1.05	両性
C510	ポリアクリルアミド	7,000,000	0.77	カチオン
キトサン	—	145,000	0.06	カチオン
ポリ-γ-グルタミン酸Na (PGA-Na)	—	1,000,000	0.04	アニオン
ポリアクリルアミド (PAA)	—	6,000,000	0.02	アニオン
ポリビニルアルコール (PVA)	—	130,000	0.02	ノニオン
ポリビニルピロリドン (PVP)	—	1,300,000	0.00	ノニオン

## 1. 4. 2. 1. 1. ポリマー系凝集剤のDME溶解実験とその理論検討(成果7, 11~14, 17, 19)

まず、液化DMEで微細藻類から脂質を抽出する際に、凝集剤が液化DMEに溶解して脂質に混入しないことを確認するため、後述の脂質抽出の際と同様の温度、圧力、およびDMEの流速での凝集剤の溶解度を測定した。ポリマー系凝集剤の液化DMEに対する溶解度測定の装置をFig. 1.1に示す。ポリマー系凝集剤をそれぞれ10mLカラム (HPG-10-5: タイツウテクノ, 容量10mL, 内径 11.6 mm × 長さ190mm) に充填した。カラムの上下には孔径 0.20 μm のセルロースフィルター (アドバンテック東洋株式会社, 東京) を設置し、ポリマー系凝集剤の流出を防いだ。DMEをスプレー缶からDME供給タンク (金属タンク TSV-1: タイツウテクノ, 埼玉) へと移し、DME供給タンクをウォーターバスで37°Cに保持しDMEを液化させ、液化DMEを流速10mL/minで25°Cに保ったカラムへと供給した。装置内部は液化DMEで満たされており、内圧は37°CでのDMEの飽和蒸気圧である約0.8MPaであった。DME供給タンク、カラム、回収器 (HPG96-3: タイツウテクノ, 容量96mL) は直列に接続されており、ポリマー系凝集剤が液化DMEに溶解した場合、液化DMEと共に回収器にて回収される。液化DMEを50mL供給した後、回収器を交換し、再度液化DMEを50mL供給する操作を繰り返すことで、累計200mLの液化DMEを供給した。液化DMEを流し終わった後、回収器のバルブを開き減圧することでDMEを蒸発させた。DMEが十分蒸発した後、回収器を60°Cで12時間乾燥させ、回収器に残留する水を除去した。回収器の重さの変化から各ポリマー系凝集剤の液化DMEに対する溶解度を算出した。なおポリマー系凝集剤の液化DMEに対する溶解度は、ポリマー系凝集剤の乾燥重量(g)当たりの液化DMEに抽出された成分の乾燥重量(g)と定義した。

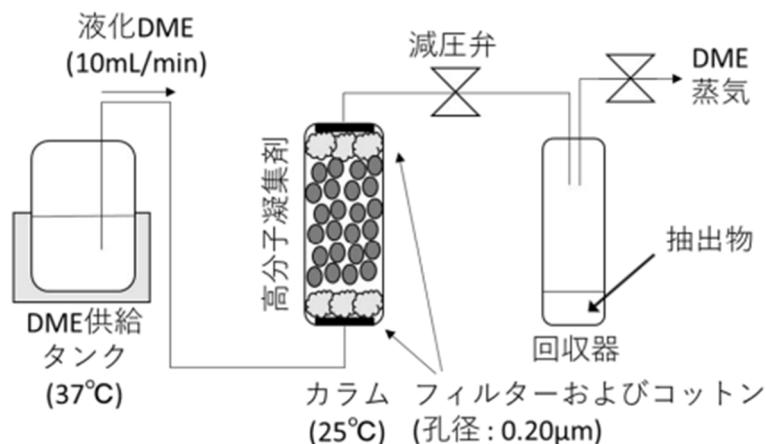


Fig. 1.1 ポリマー系凝集剤の液化DMEに対する溶解度測定装置

本実験の結果、液化DMEに対するポリマー系凝集剤の溶解度は次のTable 1.2のようになった。一般に「難溶または不溶」とされる溶解度の閾値は0.1 g/Lであり、いずれのポリマー系凝集剤もこの溶解度を下回ったことから液化DMEに対して難溶であると判断した。この結果は、液化DMEが分子量の大きい樹脂や天然高分子などに溶解性を示さないという報告に合致している。

Table 1.2 候補のポリマー系凝集剤の液化DMEに対する溶解度

高分子凝集剤	主成分	液化DMEへの溶解度( $10^{-2}$ g/L)
KP7000	ポリビニルアミジン	5.2
KP1202BH	ポリアクリルアミド	4.3
C502	ポリアクリルアミド	8.4
KP209H	ポリアクリル酸エステル	4.1
KA305BH	ポリアクリルアミド	5.4
C510	ポリアクリルアミド	9.1
キトサン	—	0.3
PGA-Na	—	0.3
PAA	—	0.0
PVA	—	0.5
PVP	—	0.6

本実験においては抽出実験の対象としたポリマー系凝集剤の液化 DMEへの溶解性を理論的に検討するため Hansen 溶解度パラメータ（以下、HSP）を利用した。HSP とは物質の溶解性の検討に用いられる値で、van der Waals 力など分散力についての項  $\delta_d$ 、分子間相互作用についての項  $\delta_p$ 、水素結合およびその他の影響力についての項  $\delta_h$  の 3 つのパラメータ（単位はいずれも  $MPa^{0.5}$ ）で構成される。ポリマー系凝集剤の液化DMEへの溶解性を検討するに当たっては、初めに HSP 間の距離  $R_a$  を式 1.1 のとおり定義した。

$$R_a = \sqrt{4(\delta_{d1} - \delta_{d2})^2 + (\delta_{p1} - \delta_{p2})^2 + (\delta_{h1} - \delta_{h2})^2} \quad (1.1)$$

このとき、 $\delta_{d1}, \delta_{p1}, \delta_{h1}$  をポリマー系凝集剤の HSP とし、 $\delta_{d2}, \delta_{p2}, \delta_{h2}$  を液化DME の HSP とする。これら 3 つのパラメータを 3 次元空間における座標とみなした場合、 $R_a$  はポリマー系凝集剤を表す点と液化DME を表す点の間の距離を表すこととなる。一般にこの距離  $R_a$  が小さいほど 2 物質間の親和性が高く、互いに溶解しやすいことが分かる。既往の研究により液化DMEへの溶解性が判明しているポリマーを上述の 3 次元空間にプロットした。液化DME に溶けるポリマーと溶けないポリマーの境界面に、液化DME の HSP を中心座標とする球（以下、Hansen 溶解球）を描画した。この Hansen 溶解球の半径を相互作用半径  $R_0$  と呼び、相対エネルギー差 RED の値を式 1.2 のように定義した。

$$RED = \frac{R_a}{R_0} \quad (1.2)$$

$RED < 1$  すなわちポリマー系凝集剤を示す点が Hansen 溶解球の内側にあるならば、ポリマー系凝集剤は液化DME に可溶と判断し、 $RED > 1$  すなわちポリマー系凝集剤を示す点が Hansen 溶解球の外側にあるならば、ポリマー系凝集剤は液化DME に不溶と判断した。以上の Hansen 溶解度パラメータにかかる計算は HSP iP というソフトウェアを用いて行った。

次に HSP を用いて、液化DME とそれぞれのポリマー系凝集剤の溶解性を理論的手法で評価した。一般に DME の HSP は  $\delta_D = 14.0 [MPa^{0.5}]$ 、 $\delta_P = 0.08 [MPa^{0.5}]$ 、 $\delta_H = 16.1 [MPa^{0.5}]$  と報告されている。しかし、このパラメータを用いてポリマー系凝集剤の溶解性を検討したところ、溶解度測定の結果を説明することができなかった。この原因として既報 DME の HSP が、液化DME が抽出溶媒として用いられる場合の温度・圧力条件とは異なる条件で算出されたことが考えられる。実際、既報の DME の HSP は超臨界二酸化炭素のパラメータに酷似しているが、この 2 物質が溶解性を示す物質は大きく異なる。また HSP は温度 や圧力に依存して変動することが知られており、その換算式も提案されている。ところが抽出溶媒として用いられる液化DME は亜臨界流体であり、臨界点近傍では僅かな温度・圧力の変化に伴って、物質の性状が大きく変動することから、換算式が有効に作用しなかったと予想される。

そこで本研究では、ポリマー系凝集剤の液化DMEに対する溶解性を検討する前に、液化DME 自身の HSP を算出した。Table 1.3 に示す 30 種のゴムや樹脂などは、既往の研究によって液化DMEへの溶解性が明らかな物質である。これらの物質の溶解性を説明するに足る Hansen 溶解球の相互作用半径  $R_0$  および、球の中心（すなわち DME の HSP）を算出した。液化DME を中心とする Hansen 溶解球を Fig. 1.2 に示す。

Table 1.3 液化DMEのHSP算出に用いた物質とそのHSP

物質名	Hansen溶解度パラメータ			液化DMEへの 溶解性
	$\delta_d$ (MPa <sup>0.5</sup> )	$\delta_p$ (MPa <sup>0.5</sup> )	$\delta_s$ (MPa <sup>0.5</sup> )	
天然ゴム	17.1	0.5	1.3	可溶
スチレンブタジエンゴム	18.2	0.9	2.3	可溶
エチレンプロピレンゴム	17.2	0.3	0.8	可溶
クロロプロレンゴム	17.9	1.9	0.6	不溶
ブチルゴム	16.1	0.2	1.0	不溶
ニトリルゴム	17.6	7.9	4.1	可溶
水素化ニトリルゴム	16.9	1.7	4.1	可溶
ビニルメチレンシリコーンゴム	12.6	0.3	0.2	可溶
フッ素ゴム	12.5	0.3	0.2	可溶
ポリテトラフルオロエチレン樹脂	12.5	0.5	0.2	不溶
ペルフルオロアルコキシフッ素樹脂	12.3	1.7	0.6	不溶
高密度ポリエチレン	16.2	2.1	2.4	不溶
低密度ポリエチレン	16.8	3.8	3.8	不溶
ポリアミド11	12.5	0.3	0.0	不溶
ポリエチレンテレフタート	18.7	6.3	6.7	不溶
ポリプロピレン	17.7	9.9	16.5	不溶
ナイロン6	17.2	9.9	16.5	不溶
ポリ塩化ビニル	16.8	8.9	6.1	不溶
レスベラトロール	20.9	6.7	13.1	可溶
ビセイド	19.6	8.3	16.2	可溶
フェナントレン	20.5	1.5	4.9	可溶
ビレン	20.8	4.1	5.1	可溶
テトラフェン	20.7	1.1	3.9	可溶
ベンゾ[a]ピレン	22.3	4.5	5.0	可溶
ベンゾピレンビリレン	23.0	6.1	6.1	可溶
グリシン	18.3	9.3	19.6	不溶
レシチン	16.1	6.4	9.1	可溶
ケンブフェロール	20.3	9.3	17.2	可溶
フェラル酸	19.3	8.4	15.8	可溶
リグスティラド	17.7	9.4	6.6	可溶

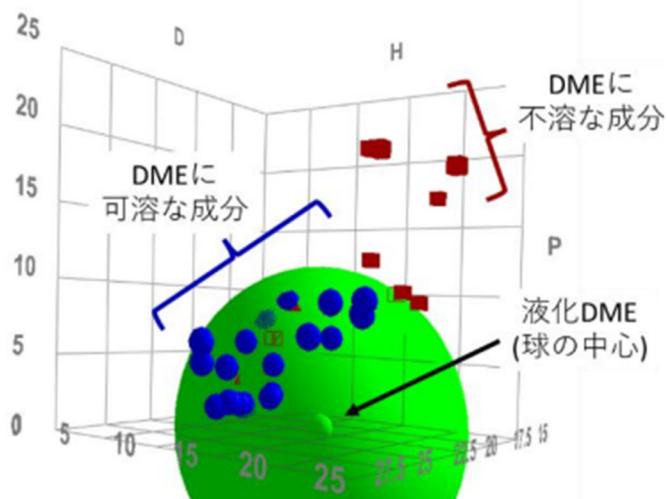


Fig 1.2 液化DMEを中心とする Hansen 溶解球

検討の結果、新たに算出された液化DMEのHSPは $\delta d=19.2[\text{MPa}^{0.5}]$ ,  $\delta p=0.10[\text{MPa}^{0.5}]$ ,  $\delta h=12.0[\text{MPa}^{0.5}]$ となつた。これは既報のDMEのHSPと比較して $\delta$ の値が $5.2\text{MPa}^{0.5}$ だけ減少し、 $\delta h$ の値が $4.1\text{MPa}^{0.5}$ だけ増加しており、従来は極性項として計算されていたパラメータが水素結合項として数えられたことが分かる。またこのとき、液化DMEの相互作用半径 $R_0$ は $R_0 = 11.5[\text{MPa}]$ であった。

従って次に、新たに算出したDMEのHSPを用いて、ポリマー系凝集剤の液化DMEに対する溶解性を検討した。それぞれのポリマー系凝集剤のHSPと液化DMEへの溶解性を以下のTable 1.4に示す。なお水処理用のポリマー系凝集剤6種については主成分のHSPを用いて計算を行った。またHSPiP ver. 4.1.04に記述されていない成分HSPについては、同ソフトを用いて、分子構造からHSPの推算を行った。

Table 1.4 ポリマー系凝集剤のHSPおよび液化DMEへの溶解性の予測

物質名	Hansen溶解度パラメータ			$R_e(\text{MPa})$	RED (-)
	$\delta_d(\text{MPa}^{0.5})$	$\delta_p(\text{MPa}^{0.5})$	$\delta_h(\text{MPa}^{0.5})$		
ポリビニルアミジン※1	17.5	8.8	5.0	11.7	1.02
ポリアクリルアミド※2	19.5	19.7	16.4	20.1	1.75
ポリアクリル酸エステル※3	15.5	4.6	4.5	11.5	1.00
キトサン	22.8	17.1	26.6	23.5	2.05
PGA-Na	19.3	12.1	16.5	12.8	1.11
PVA	15.0	17.2	17.8	19.9	1.73
PVP	18.1	10.0	18.0	11.8	1.02

※1. ポリアクリルアミジンを主成分とするKP7000のHSP

※2. ポリアクリルアミドを主成分とするKP1202BH, C502, KA305BH, C510およびPAAのHSP

※3. ポリアクリル酸エステルを主成分とするKP209HのHSP

Table 1.4に示す結果はいずれのポリマー系凝集剤の場合にも $\text{RED} \geq 1$ となり、これらのポリマー系凝集剤が液化DMEに対して難溶であることを示している。この結果は液化DMEに対する溶解度測定の結果と一致し、以上のことから候補としたポリマー系凝集剤はいずれも液化DMEに難溶であると結論づけた。すなわち液化DMEを用いた微細藻類からの脂質抽出において、候補のポリマー系凝集剤が脂質と共に液化DMEに溶解して脂質に混入する可能性は低く、候補のポリマー系凝集剤が研究目的に合致することが確認された。

#### 1. 4. 2. 1. 2. 緑藻クロレラに対するDME抽出(成果8, 10, 11, 16, 18, 20, 23, 24, 38~40)

ポリマー系凝集剤により回収された微細藻類の凝集体と凝集剤未添加の微細藻類から液化DMEを用いて脂質と水分を抽出した。微細藻類のカラムへの充填方法は後述する。実験装置はFig. 1.2と同様であるが、フィルターの孔径が異なる。液化DMEは流速 $10 \text{ mL/min}$ で供給し、一定量供給されるごとに回収器を交換しながら、回収される液体が十分無色になるまで液化DMEの供給を続けた。抽出後は回収器のバルブを開いて減圧し、液化DMEを蒸発・除去した。その後抽出物から水分を除くため $60^\circ\text{C}$ で12 時間乾燥させた後、抽出率を計算した。なお水分除去の条件は脂質以外にカロテノイド等の熱分解されやすい成分が抽出される可能性があるため、中程度の温度で乾燥を行う本条件を採用した。また脂質および水の抽出率(wt.%)はそれぞれ、微細藻類の乾燥重量(g)当たりの抽出物の乾燥重量(g), 抽出前の微細藻類の含水量(g)当たりの抽出された水分量(g)と定義した。

次に、微細藻類をカラムへ充填する方法を説明する。ポリマー系凝集剤を添加した場合、はじめに前述した実験によって明らかにされた最適な凝集条件に従い、各々の微細藻類を回収した。回収した微細藻類の凝集体に、カラムの閉塞防止のためのビスコパール(AH-2050L, 2 mm diameter, Rengo, 大阪)と呼ばれる、多孔質のセルロースボールを混合した。このとき緑藻クロレラ(日本産)と緑藻クロレラ(インドネシア産)の場合は、微細藻類凝集体5.00 gに対し、ビスコパール0.75 gを混合し、混合物10mL をカラムに充填した。キートセロスおよびプレウロクリシスの場合は、微細藻類凝集体2.00 gに対し、ビスコパール0.30 gを混合し、混合物6mLをカラムに充填した。なおカラムの空隙部分にはコットンを充填した。次に凝集剤を添加しない場合、各々の微細藻類の乾燥粉末をBG11の 2wt.%水溶液に1:9(w/w)で混合・分散させた後、3000 rpmで10 分間遠心脱水(CN-1040, Hsiangtai, Taipei, Taiwan)した。遠心脱水後の沈殿を採取し、各々の微細藻類に対してビスコパールと混合し、カラムへ充填した。

また、液化DMEによる脂質抽出量を従来の抽出方法と比較するために、クロロホルム・メタノール(=2:1vol%)を用いたバッチ抽出を実施した。各々の微細藻類を適当なポリマー系凝集剤で回収した後、 $60^\circ\text{C}$

で12時間乾燥させ、フードミル(IFM-800DG, Iwatani Corporation, 日本)で5分間粉碎して実験に用いた。ポリマー系凝集剤の添加の有無で脂質抽出量を比較するため、凝集剤未添加の微細藻類乾燥粉末をフードミルで5分間粉碎して同様に実験に用いた。バッヂ抽出実験では、微細藻類3.00 gに有機溶媒300 mLを添加し、微細藻類が分散した後にハンドホモジネイザー(Dremel 300 Series, Robert Bosch Tool, Mount Prospect, IL, USA; 10 mm for outside diameter)を用いて試料を5000 rpmで5分間粉碎した。その後2.5時間攪拌し、孔径0.1 μmのフィルター(H010A047A, Advantec 東洋, 東京)で溶媒を吸引ろ過し、エバボレーター(SB-1200, Eyela Co., Ltd., 東京)で溶媒を除去した。得られた抽出物を60°Cで12時間乾燥させ、液化DME抽出の場合と同様に脂質抽出率を算出した。

以下に結果および考察を説明する。緑藻クロレラについては産地によらずKA305BH, KP1202BHの2つのポリマー系凝集剤が回収に有効であると予備検討から判明した。そこで、それぞれの凝集剤を5wt.%添加して回収されたクロレラ(日本産)から、脂質および水を累計1260 mLの液化DMEで抽出した。以下のFig. 1.3に抽出前後の微細藻類、脂質、残渣の写真を示し、Fig. 1.4に脂質と水の抽出挙動をそれぞれ示す。

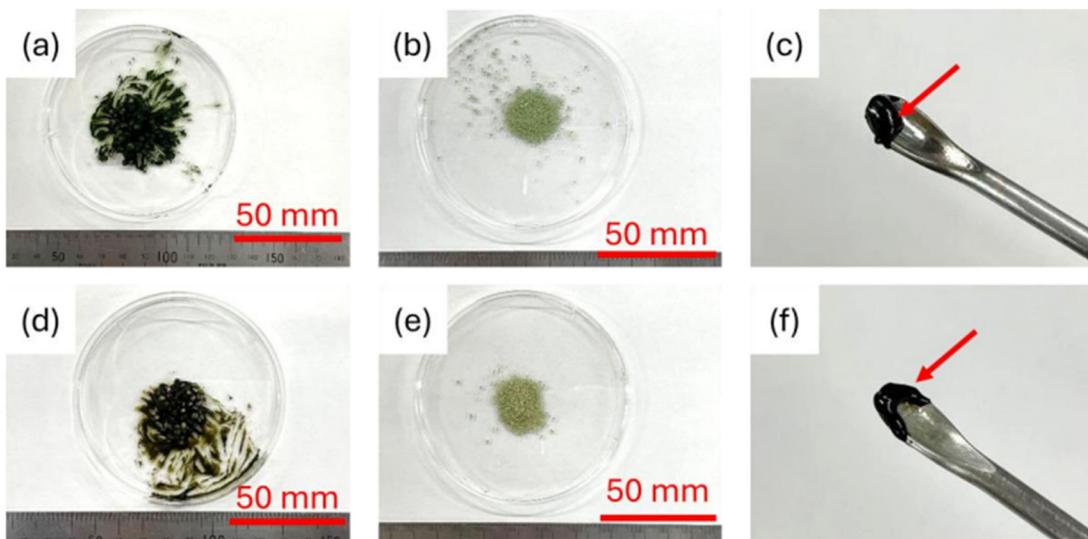


Fig. 1.3 クロレラ(日本産)の液化DME抽出前後の写真凝集剤未添加の場合：  
(a)カラム充填物, (b)残渣, (c)抽出物, KA305BH 添加の場合：(d)カラム充填物, (e)残渣, (f)抽出物

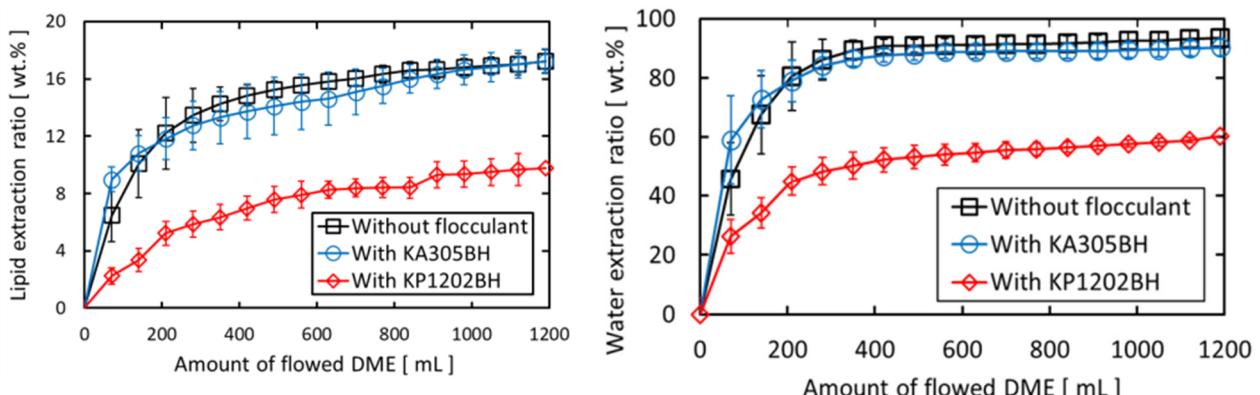


Fig. 1.4 液化DMEによるクロレラ(日本産)からの脂質(左)と水分(右)抽出量の変化  
なお、Lipid Extraction ratioは、微細藻類の乾燥重量(g)当たりの抽出物の乾燥重量(g)の百分率

Fig. 1.4に示す脂質抽出に着目すると、KA305BHを添加した場合には凝集剤未添加の場合と同様の抽出挙動を描き、一方でKP1202BHを添加した場合には、凝集剤未添加の場合と比べて脂質の抽出率が低下してしまうことが分かった。以下にこの脂質抽出量の減少について考察する。凝集剤未添加の場合、液化DMEはクロレラ表面のセルロース被殻に点在する微小な孔から内部の細胞質へと浸透し、そこに蓄えられた脂質を溶解して、再び孔を通過して外部へと流出することで脂質の抽出が行われる。しかし、このとき高カチオン度(3.27 meq/g)のKP1202BHを添加すると、KP1202BHはクロレラの表面のセルロース被殻と電気的に強く結合し、液化DMEが浸透するはずの隙間を塞いでしまったことで、液化DMEの細胞質への浸透を阻害し、脂質抽出率の低下を招いたと考えられる。他方で低カチオン度(1.05 meq/g)の両性凝集剤KA305BHを添加した場合には、KA305BHはクロレラの表面に付着したものの、カチオン度の低さゆえに静電引力が弱く、表面の孔を塞がなかったために脂質の抽出率を低下させなかつたと考えられる。さらにKP1202BHで回収されたクロレラ(日本産)からの

脂質抽出に際しては、以下のFig. 1.5に示すようなカラム内部の様子が観察された。凝集剤未添加の場合やKA305BHを用いた場合、脂質抽出後のカラム内部はFig. 1.3に示す残渣と同様の淡緑色を示していたが、KP1202BHを添加した場合にはFig. 1.5のように部分的に濃緑色が観察され、この濃緑色の部分は液化DMEが通過していないと予測される。これは凝集剤未添加の場合やKA305BHを添加した場合にはクロレラ(日本産)の水分率がそれぞれ $78.4 \pm 1.2\text{wt.\%}$ ,  $75.4 \pm 2.4\text{wt.\%}$ であったのに対して、KP1202BHによって回収されたクロレラ(日本産)の水分率は $66.7 \pm 1.7\text{wt.\%}$ と著しく低く、それゆえに粘度が上昇したことで、カラム内での液化DMEの流動を阻害したことが原因と考えられる。すなわちKP1202BHで回収されたクロレラ(日本産)において脂質抽出率が低下した原因は、クロレラ表面のKP1202BHが液化DMEの細胞質への浸透を阻害したことと、含水率の低下によるクロレラ(日本産)の粘度の増加によって液化DMEが流入できない部分がカラム内に形成されたことの2つと言える。



Fig. 1.5 液化DMEによるクロレラ(日本産)からの脂質抽出後のカラム：  
(a)凝集剤未添加の場合, (b)KP1202BH添加の場合

Fig. 1.4に示す水分抽出に着目しても、KA305BHを用いた場合には、凝集剤未添加の場合と抽出挙動が一致し、それぞれの最終的な水分抽出率は $90.9 \pm 3.0\text{wt.\%}$ ,  $93.7 \pm 3.4\text{wt.\%}$ であった。一方でKP1202BHを用いた場合には最終的な水分抽出率が $62.4 \pm 2.5\text{wt.\%}$ に留まり、脂質抽出の場合と同様に、KP1202BHは水分の抽出も阻害してしまうことが分かった。抽出率低下の原因も脂質抽出の場合と同様であると考えられる。ただし、抽出される水分の大半はクロレラ(日本産)の凝集体の外部に存在しており、クロレラ(日本産)の細胞質内に存在する水分はごくわずかであることから、カラム内に液化DMEが流入できない部分が形成された影響がより大きいと言える。以上のことから、液化DMEによるクロレラ(日本産)からの脂質抽出においては、適切なカチオン度を持つ両性のポリマー系凝集剤KA305BHが併用可能であると判明した。以下のクロレラに対する実験では、KP1202BHに対する検討は行わず、凝集剤未添加の場合とKA305BHを添加した場合の比較を行った。

液化DME抽出の挙動を従来法と比較するため、クロロホルム・メタノールを用いてクロレラ(日本産)のKA305BH凝集体および凝集剤未添加のクロレラ(日本産)から脂質を抽出した。以下のTable 1.5に溶媒種および凝集剤KA305BHの有無による脂質の抽出率の比較をそれぞれ示す。

Table 1.5 クロレラ(日本産)からの脂質抽出率の比較

No.	抽出溶媒	KA305BHの有無	脂質抽出率 (wt.%)
1	液化DME	あり	$17.5 \pm 0.9$
2	液化DME	なし	$17.1 \pm 0.5$
3	クロロホルム/メタノール	あり	$15.9 \pm 0.4$
4	クロロホルム/メタノール	なし	$15.6 \pm 0.5$

凝集剤KA305BHの有無に着目すると、液化DME抽出とクロロホルム・メタノール抽出のいずれの場合にも、脂質抽出率に大きな違いは無かった。後述する他の微細藻類において、いずれのカチオン性ポリマー系凝集剤もクロロホルム・メタノールによる脂質抽出量を低下させたが、KA305BHは両性凝集剤であるため、クロレラ表面との静電引力が弱く、浸透力の劣るクロロホルム・メタノールとも併用できたと考えられる。次に溶

媒種の違いに着目すると、凝集剤の有無によらず液化DMEは、一般に微細藻類の脂質の全量を抽出できると考えられているクロロホルム・メタノールよりも、約1.5wt.%だけ多くの脂質を抽出したことが分かる。このことからクロレラ(日本産)に対しては、これまで脂質抽出に適当とされてきたクロロホルム・メタノールよりも液化DMEの方が脂質抽出に適していることが明らかになった。

次に、クロレラ(インドネシア産)に対しては、クロレラ(日本産)からの脂質抽出を阻害しなかったKA305BHのみを用いて凝集体を作成し、前節に述べたものと同様の実験を行い、日本産との場合と比較した。Fig. 1.6に脂質と水の液化DME抽出の挙動をそれぞれ示す。

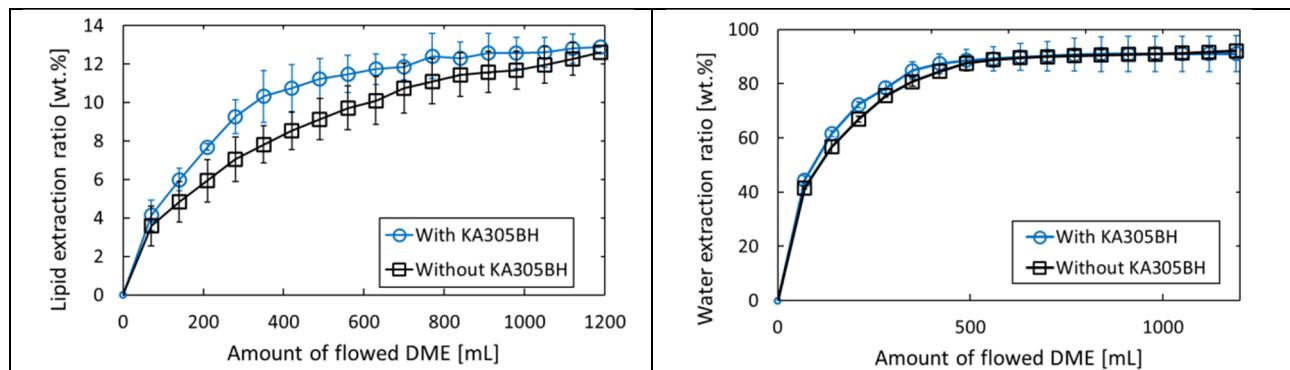


Fig. 1.6 液化DMEによるクロレラ(インドネシア産)からの脂質抽出量(左)と水分抽出量(右)の変化  
なお、Lipid Extraction ratioは、微細藻類の乾燥重量(g)当たりの抽出物の乾燥重量(g)の百分率

脂質および水の抽出挙動を KA305BH 添加の有無で比較したところ、KA305BHが与える影響は僅かであり、クロレラ(日本産)の場合と同様にKA305BHが脂質や水の抽出を阻害しないことが明らかとなった。クロレラ(インドネシア産)の水分率は、凝集剤未添加の場合やKA305BH添加の場合でそれぞれ $78.4 \pm 1.2\text{wt.\%}$ ,  $75.4 \pm 2.4\text{wt.\%}$ であり、約80wt.%という高い数値で一致していた。従ってカラム内に充填された微細藻類に極端に粘度が大きい部分は無く、液化DMEはカラム内のクロレラ(インドネシア産)に満遍なく接触することができたと考えられる。次に脂質の抽出率を产地で比較すると、日本産の場合17.1wt.%の脂質が抽出できたのに対し、インドネシア産の場合は13.0wt.%の脂質が抽出され、脂質抽出率に約4.1wt.%の差があると分かった。これは抽出前の時点で、Fig. 1.7に示すように、クロレラ(日本産)がクロレラ(インドネシア産)より多くの脂質を含有していたためであると考えられる。クロレラ(日本産)の場合、培養工程において栄養塩を与えて成長を促す期間を経た後、貧栄養期間を設けており、そのためサイズは $4.3 \pm 0.8 \mu\text{m}$ と比較的小さい。一方でクロレラ(インドネシア産)の場合、貧栄養期間を設けずに栄養塩を供給し続けたためにサイズは $8.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$ と比較的大きいが、脂質の代謝が十分に行われておらず、脂質含有量が少ない可能性がある。

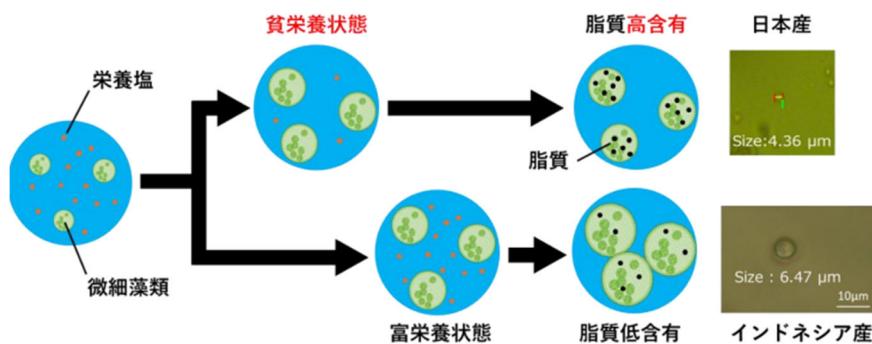


Fig. 1.7 日本産およびインドネシア産のクロレラの培養方法の違い

クロロホルム・メタノールで脂質を抽出し、結果を液化DME抽出と比較した。以下のTable 1.6に溶媒種および凝集剤KA305BHの有無による脂質の抽出率の比較をそれぞれ示す。

Table 1.6 クロレラ(インドネシア産)からの脂質抽出率の比較

No.	抽出溶媒	KA305BHの有無	脂質抽出率 (wt.%)
1	液化DME	あり	12.9 ± 0.7
2	液化DME	なし	13.0 ± 0.8
3	クロロホルム/メタノール	あり	10.8 ± 0.9
4	クロロホルム/メタノール	なし	10.5 ± 1.0

Table 1.6に示す通り、いずれの溶媒種の場合にもKA305BHの有無による脂質抽出率の差は小さく、KA305BHが脂質抽出を阻害しないことが分かる。また溶媒種を比較すると液化DMEがクロロホルム・メタノールよりも約2.5wt.%多くの脂質を抽出すると分かり、クロレラ(日本産)の場合と同様に液化DMEが脂質抽出により適した溶媒であると分かった。

以上のクロレラ(インドネシア産)に対して凝集剤が与える影響の傾向は、上述のクロレラ(日本産)の場合と酷似している。従ってクロレラからの脂質抽出において凝集剤KA305BHは、クロレラ種の間で存在するわずかな差異を無視して、回収に有効かつ脂質抽出を阻害しないことが明らかとなった。微細藻類のオープンボンド培養においては、培養池への亜種の混入は回避し難いため、亜種同士のわずかな差に影響されずに利用できるポリマー系凝集剤が必要とされる。KA305BHがこの条件を満たすという結果は、この一連のプロセスの実用化に向けて重要な発見と言える。

#### 1. 4. 2. 1. 3. 緑藻クロレラからの抽出物や抽出残渣の分析結果と考察(成果)

8, 10, 11, 16, 18, 20, 23, 24, 38~40)

緑藻クロレラ(日本産)およびクロレラ(インドネシア産)とその脂質および残渣の表面官能基をFT-IRを用いて分析した。FT-IRスペクトルをそれぞれ日本産についてFig. 1.8(a)に、インドネシア産についてFig. 1.8(b)に示し、検出されたピークをTable 1.7に示す。

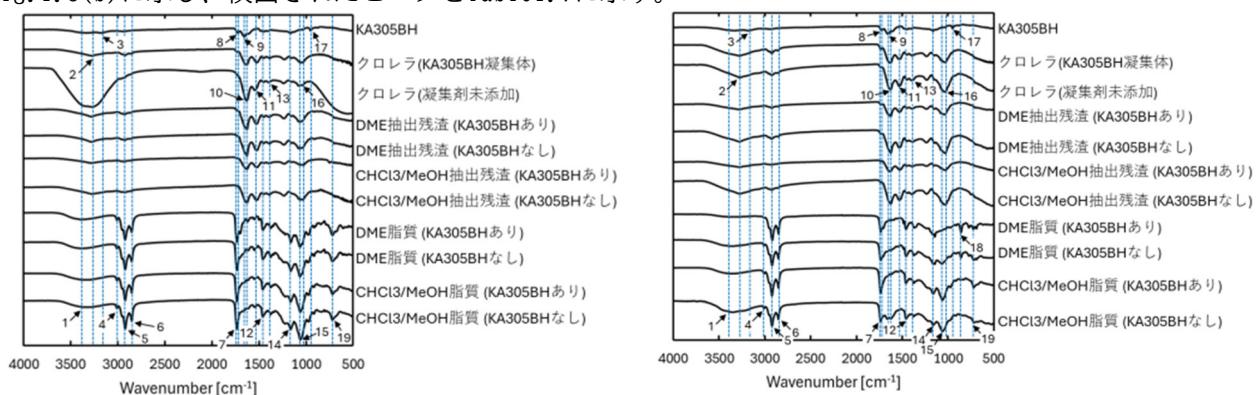


Fig. 1.8 (a)クロレラ(日本産), (b)クロレラ(インドネシア産)とその脂質および残渣のFT-IRスペクトル

Table 1.7 クロレラとその脂質および残渣のFT-IRスペクトルから検出されたピーク

ピーク No.	波数 (cm <sup>-1</sup> )		官能基	由来する成分	ピークが検出 された試料
	日本産	インドネシア産			
1	3389	3342	CH=CH stretching	脂質	脂質
2	3271	3277	O-H stretching	水	クロレラ
3	3171	3171	Alkenes C-H stretching	凝集剤	KA305BH
4	3010	2998	=C-H stretching	脂質	脂質
5	2924	2923	CH=CH asymmetric stretching	脂質	クロレラ, 脂質, 残渣
6	2853	2854	CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> symmetry stretching	脂質	クロレラ, 脂質
7	1735	1738	C=O stretching	脂質	クロレラ, 脂質
8	1722	1722	Carboxylic acids C=O stretching	凝集剤	KA305BH
9	1655	1655	Amide C=O stretching (Derived from acrylamide)	凝集剤	KA305BH
10	1627	1624	Amide C=O stretching	タンパク質	クロレラ, 残渣
11	1545	1532	Amide II C-N stretching N-H angular vibration	タンパク質	クロレラ, 残渣
			CH <sub>2</sub> symmetry in-plane variation, CH <sub>3</sub> inverse symmetry variable angle		
12	1460	1455		脂質	クロレラ, 脂質, 残渣
13	1376	1376	Methyl carboxylic acids C-O stretching	タンパク質 脂質	クロレラ, 脂質, 残渣
14	1163	1163	Ester C-O stretching	脂質 凝集剤	脂質, KA305BH
15	1061	1059	C-O stretching	脂質	クロレラ, 脂質, 残渣
16	1052	1027	Ethers C-O-C symmetry stretching	セルロース	クロレラ, 残渣
17	951	947	N <sup>+(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>} stretching vibration</sup>	凝集剤	KA305BH
					インドネシア産の クロレラから液化DME で抽出された脂質
18	未検出	680	Symmetry C-O-S vibration	脂質	クロレラから液化DME で抽出された脂質
19	720	719	C-H out-of-plane bending vibrations	脂質	脂質

クロレラとその脂質および残渣について、Table 1.7に示す通り、産地によるスペクトルの違いはほとんどなかった。唯一の違いであるピーク18は、クロレラ(インドネシア産)から液化DMEで抽出された脂質にのみ検出され、クロレラ(日本産)から液化DMEで抽出された脂質からは検出されなかった。ピーク18は糖脂質中に含まれるC-O-S基の伸縮振動に起因しており、培養条件の違いからクロレラ(インドネシア産)でのみSを含んだ糖脂質が生産され、極性物質と親和性の高い液化DMEでのみこれが抽出されたと考えられる。以下は産地に依らず双方のクロレラで一致したスペクトルについて述べる。はじめにクロレラより抽出された脂質に着目する。各々の溶媒で抽出された全ての脂質でピーク1・4・5・6・7・12・14・15・19が検出され、これらはトリグリセリドを構成するCH=CH基の伸縮振動・=C-H基の対称伸縮振動・CH=CH基の非対称伸縮振動・CH<sub>3</sub>やCH<sub>2</sub>基の対称伸縮振動・C=O基の伸縮振動・CH<sub>2</sub>の面内対称振動やCH<sub>3</sub>基の逆対称変角振動・エステル基のC-Oの伸縮振動・C-O基の伸縮振動・C-Hの面外変角振動に各々対応している。この内、ピーク5・6・7・12は脂質以外に抽出前のクロレラや残渣からも検出されたが、脂質サンプルではピークが大きい一方で、抽出前のクロレラや残渣では小さなピークとして検出された。このことはクロレラに含まれる脂質のほとんどが溶媒によって抽出されたことを示している。次に残渣のスペクトルに着目すると、各々の溶媒で抽出された全ての残渣でピーク10・11・16が検出され、これらはタンパク質に含まれるアミド結合中のC=O基の伸縮振動・アミド結合中のC-Nの伸縮振動やN-Hの変角振動・セルロースに含まれるC-O-Cの対称伸縮振動に各々対応している。このことは、タンパク質やセルロースが溶媒に溶けていないことを示し、後述する残渣の元素分析において窒素が残渣中で濃縮されたことと整合性が取れる。なお残渣のスペクトルではピーク15とピーク16が同程度の大きさで検出されているが、脂質においてはピーク16が隣のピーク15に隠れて検出の判定ができない。最後に凝集剤KA305BHに特徴的なピーク3・8・9・17は、各々C-H基の伸縮振動・カルボン酸のC=O基の伸縮振動・アクリルアミドとその誘導体のC=O基の伸縮振動・N<sup>+(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>}の伸縮振動に対応している。これらのピークはKA305BHのスペクトルのみから検出され、脂質や残渣のスペクトルからは検出されなかった。以上の結果を総合すると、抽出された脂質はトリグリセリドの成分と矛盾が無く、残渣は主にクロレラを構成するタンパク質や細胞壁の主成分であるセルロースである。またKA305BHは脂質に混入していない可能性が高いと結論づけられる。なおピーク13は脂質と残渣の双方で検出されているが、タンパク質や脂肪酸エステルのC-O結合に由来しており、脂質と残渣の分離の可否の判定に不適である。またピーク14は脂質とKA305BHの双方で検出されているが、双方に含まれる脂肪酸エステルのC-O結合に由来するピークであるから、脂質に凝集剤が混入したかの判定には利用できない。</sup>

次にクロレラ(日本産)およびクロレラ(インドネシア産)から抽出された脂質よりFAMEを合成し、脂質に含まれる脂肪酸の組成をGC-MSで分析した。GCスペクトルと脂肪酸組成をそれぞれ、日本産についてFig. 1.9とTable 1.8に、インドネシア産についてFig. 1.10とTable 1.9に示す。

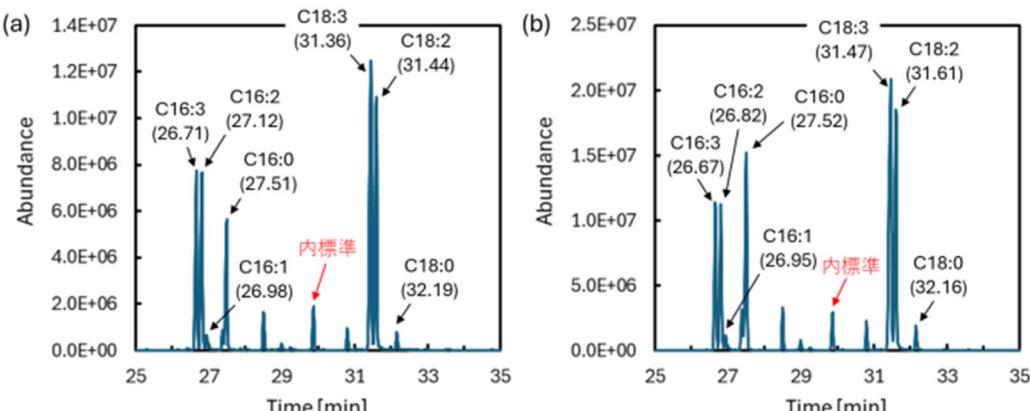


Fig. 1.9 凝集剤未添加のクロレラ(日本産)から抽出された脂質より合成したFAMEのGCスペクトル：  
(a) 液化DME抽出, (b) クロロホルム・メタノール抽出

Table 1.8 クロレラ(日本産)から抽出された脂質に含まれる脂肪酸の組成

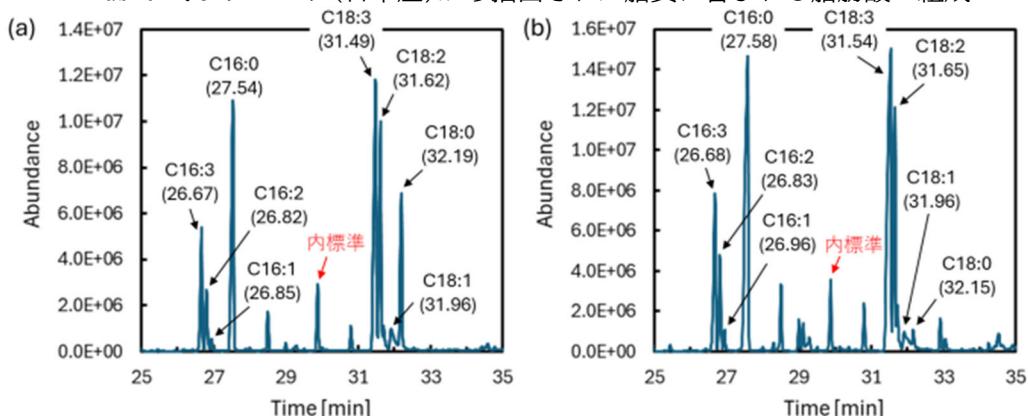


Fig. 1.10 凝集剤未添加のクロレラ(インドネシア産)から抽出された脂質より合成した  
FAMEのGCスペクトル：(a) 液化DME抽出, (b) クロロホルム・メタノール抽出

Table 1.9 クロレラ(インドネシア産)から抽出された脂質に含まれる脂肪酸の組成

略称 (正式名称)	液化DME (wt.%)		クロロホルム・メタノール (wt.%)	
	KA305BHあり	KA305BHなし	KA305BHあり	KA305BHなし
C16:0 (Palmitic acid)	22.9 ± 0.3	20.4 ± 2.2	25.7 ± 1.9	27.4 ± 0.9
C16:1(9), n-7 (Palmitoleic acid)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.0
C16:2(9,12), n-4 (9,12-Hexadecadienoic acid)	8.6 ± 0.1	10.4 ± 0.4	10.1 ± 0.2	11.5 ± 0.2
C16:3(6,9,12), n-4 (6,9,12-Hexadecatrienoic acid)	4.6 ± 0.1	8.2 ± 1.1	5.6 ± 0.3	5.0 ± 0.2
C18:0 (Octadecanoic acid)	9.7 ± 0.3	3.9 ± 0.3	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1
C18:1 (cis-9-Octadecanoic acid)	2.6 ± 0.0	2.2 ± 0.3	2.8 ± 0.4	2.9 ± 0.3
C18:2(9,12), n-6 (Linoleaidic acid)	29.1 ± 0.2	33.8 ± 1.3	33.2 ± 0.3	35.6 ± 0.4
C18:3 (6,9,12), n-6 ( $\gamma$ -Linolenic acid)	21.6 ± 0.0	20.1 ± 0.7	20.3 ± 1.0	15.6 ± 0.2

クロレラ(日本産)から抽出された脂質にはC18:2やC18:3等の脂肪酸が主に含まれ、次いでC16:2やC16:3およびC16:0が含まれていた。凝集剤KA305BH添加の有無で脂肪酸組成を比較する。液化DME抽出においては、KA305BHを添加するとC16:0, C16:2, C16:3の割合が小さくなり、C18:2, C18:3の割合が大きくなることが分かった。一方、クロロホルム・メタノール抽出においては、KA305BH 添加の有無が脂肪酸組成に影響を与えていないことが分かる。抽出溶媒ごとに脂肪酸組成を比較すると、液化DMEで抽出された脂質にはクロロホルム・メタノールで抽出された脂質と比較して、不飽和脂肪酸の割合が大きいことが分かる。これはクロロホルム・メタノール抽出の場合、抽出前の微細藻類の乾燥や抽出後の溶媒除去工程において、不饱和脂肪酸が酸化されたことが原因であると考えられる。このことは後述する元素分析において、クロロホルム・メタノールによって抽出された脂質では酸素の割合が大きかったことと整合性が取れる。一般に不饱和脂肪酸は融点が低く、不饱和脂肪酸の割合が大きい脂質は室温で液体となる。一方で飽和脂肪酸は融

点が高く、飽和脂肪酸を多く含む脂質は室温で固体となる。また不飽和脂肪酸は酸化によって劣化されやすいが、飽和脂肪酸は酸化安定性が高い。これらの性質はバイオ燃料化された後にも受け継がれるため、高品質なバイオ燃料製造のためには飽和・不飽和脂肪酸の組成の適切なバランスが必要となる。特にSAFとしての利用を想定すると相応に低い融点が求められるため、液化DMEによってクロレラ(日本産)から抽出された不飽和脂肪酸の割合の大きい脂質はSAFへの利用に適していると言える。また食用油への利用の観点から評価すると、不飽和脂肪酸は抗酸化作用を持つため摂取が好ましいと言われている。特にC18:2(9,12), n-6で表されるリノール酸やC18:3 (6,9,12), n-6で表されるアリノレン酸はいずれも $\omega$ -6脂肪酸であり、これは体内で合成できない必須脂肪酸である。従って食用油として利用する場合にも、従来法より液化DME抽出の方が適している。

クロレラ(インドネシア産)から抽出された脂質にはC18:2やC18:3に加えてC16:0が多量に含まれていた。またクロレラ(日本産)の場合には抽出されなかったC18:1が新たに検出された。KA305BH 添加の有無で比較すると、どちらの溶媒で抽出した場合にもKA305BHは抽出される脂肪酸の組成に影響を与えていないことが分かる。また溶媒種で比較すると液化DMEはC18:0を抽出したのに対して、クロロホルム・メタノールの場合にはC18:0がほとんど抽出されていないことが分かった。さらに飽和および不飽和脂肪酸の割合を比較すると、液化DMEのみが飽和脂肪酸C18:0を抽出したため、液化DMEで抽出された脂質の方が不飽和脂肪酸の割合が多いことが分かる。

以上のことから、凝集剤KA305BHの添加は液化DMEで抽出される脂肪酸の組成に影響を与える可能性があるが、その影響はごく僅かであったと言える。また緑藻クロレラは産地によらず多くの不飽和脂肪酸を生産し、特に脂質を食品利用する場合には液化 DME が優れた抽出溶媒であった。バイオ燃料として用いる場合、不飽和脂肪酸は融点の低下や酸化安定性の向上に寄与する重要な成分であると言える。

次にクロレラ(日本産)およびクロレラ(インドネシア産)とその脂質および残渣の元素組成を分析した。日本産についての結果を Table 1.10に、インドネシア産についての結果を Table 1.11に示す。

Table 1.10 クロレラ(日本産)およびその脂質と残渣の元素組成

wt. %	KA305BH	試料	C	H	N	O	S	C/N (-)
クロレラ (日本産)	–		48.5 ± 0.1	6.7 ± 0.1	10.4 ± 0.0	33.9 ± 0.2	0.5 ± 0.0	4.7 ± 0.0
KA305BH	–		44.6 ± 0.3	8.7 ± 0.4	10.3 ± 0.1	36.4 ± 0.0	0.0 ± 0.5	4.3 ± 0.0
液化 DME	あり	残渣	47.4 ± 0.5	6.9 ± 0.1	9.9 ± 0.8	35.4 ± 1.2	0.5 ± 0.1	4.8 ± 0.3
		脂質	71.4 ± 0.1	10.1 ± 0.2	2.1 ± 0.0	16.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	33.5 ± 0.1
	なし	残渣	48.0 ± 0.1	7.1 ± 0.3	12.2 ± 0.0	32.1 ± 0.4	0.6 ± 0.0	3.9 ± 0.0
		脂質	69.4 ± 0.4	10.2 ± 0.3	2.1 ± 0.2	18.3 ± 0.3	0.1 ± 0.0	33.9 ± 3.8
クロロホルム ・メタノール	あり	残渣	51.0 ± 0.1	7.3 ± 0.3	11.0 ± 0.0	30.3 ± 0.4	0.5 ± 0.1	3.8 ± 0.0
		脂質	66.0 ± 1.1	9.7 ± 0.2	2.3 ± 0.0	21.7 ± 1.3	0.2 ± 0.1	28.7 ± 0.2
	なし	残渣	43.6 ± 0.3	6.5 ± 0.1	10.6 ± 0.1	38.9 ± 0.3	0.5 ± 0.0	4.1 ± 0.0
		脂質	67.8 ± 0.1	9.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1	21.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	37.3 ± 1.0

Table 1.11 クロレラ(インドネシア産)およびその脂質と残渣の元素組成

wt. %	KA305BH	試料	C	H	N	O	S	C/N (-)
クロレラ (インドネシア産)	–		47.3 ± 0.1	6.8 ± 0.4	9.2 ± 0.0	36.1 ± 0.5	0.6 ± 0.1	5.2 ± 0.0
KA305BH	–		44.6 ± 0.3	8.7 ± 0.4	10.3 ± 0.1	36.4 ± 0.0	0.0 ± 0.5	4.3 ± 0.0
液化 DME	あり	残渣	50.0 ± 0.2	7.5 ± 0.1	9.3 ± 0.1	32.7 ± 0.4	0.5 ± 0.1	5.4 ± 0.0
		脂質	71.1 ± 1.0	9.9 ± 0.7	1.4 ± 0.3	16.4 ± 1.0	1.3 ± 0.3	52.9 ± 9.4
	なし	残渣	45.3 ± 0.9	7.0 ± 0.2	8.3 ± 0.1	39.0 ± 1.2	0.5 ± 0.3	5.5 ± 0.1
		脂質	69.4 ± 0.1	9.4 ± 0.2	2.1 ± 0.1	18.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2	33.8 ± 1.3
クロロホルム ・メタノール	あり	残渣	45.2 ± 0.1	6.9 ± 0.1	9.5 ± 0.2	37.9 ± 0.1	0.6 ± 0.0	4.7 ± 0.1
		脂質	67.6 ± 0.2	9.8 ± 0.1	1.8 ± 0.0	20.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	37.7 ± 0.8
	なし	残渣	44.2 ± 0.0	6.8 ± 0.0	9.3 ± 0.1	39.1 ± 0.1	0.6 ± 0.2	4.7 ± 0.0
		脂質	60.9 ± 0.2	9.7 ± 0.1	3.5 ± 0.0	25.8 ± 0.3	0.1 ± 0.1	17.2 ± 0.1

まず日本産のクロレラについて説明する。日本産のクロレラでは脂質抽出を経て、脂質にCとHが、残渣にNとOが濃縮されたことが分かる。これをFT-IRでの分析結果と併せて判断すると、脂質は主にトリグリセリドによって、残渣はタンパク質やセルロースによって構成されていると言える。KA305BHの有無で比較すると、いずれの溶媒種の場合にも脂質や残渣の元素組成に違いはなく、KA305BHの添加が脂質抽出に影響を与えていないことが分かった。ただしKA305BHの構成元素はクロレラの構成元素に酷似しており、元素組成の視点からKA305BHが抽出工程後に脂質に混入しているかは判断できなかった。また溶媒種で比較すると、クロロホルム・メタノールで抽出された脂質は液化DMEで抽出された脂質より、0の割合が約5wt.%程大きいことが分かる。これは脂肪酸組成の分析結果について上述した通り、クロロホルム・メタノール抽出の前後処理にて不飽和脂肪酸の一部が酸化されたためと考えられる。最後にC/N比に着目すると、液化DMEで抽出された脂質はKA305BHの有無に依らずC/N比が30以上であることが分かる。C/N比はバイオマス変換技術を選択する上で重要な指標であり、一般に30より大きい場合にはメチルエステル化、燃料化等の熱化学変換プロセスに適し、30より小さい場合には発酵等の生化学的プロセスに適しているとされる。従って液化DMEによって抽出された脂質はバイオ燃料としての利用が適した脂質であると言える。

次にクロレラ(インドネシア産)の場合もクロレラ(日本産)とほぼ同様で、脂質はCとHが濃縮されておりトリグリセリドが主成分でクロレラ(インドネシア産)およびその脂質と残渣の元素組成38あるのに対し、残渣はNとOが濃縮されておりタンパク質やセルロースが主成分であった。KA305BHの有無での元素組成の違いはないが、溶媒種が異なると、クロロホルム・メタノール抽出物の0の割合がより大きく、抽出の前後処理で脂質が酸化されたためと考えられる。C/N比に注目すると、液化 DME 抽出の場合にはKA305BHの有無に依らず30を上回り、バイオ燃料に適した脂質が抽出されたと言える。

#### 1. 4. 2. 1. 4. 珪藻キートセロスに対する検討（成果6, 15, 22, 25, 29~31, 40）

珪藻キートセロスの回収に有効なポリマー系凝集剤KP7000, KP1202BH, KP209Hをそれぞれ用いてキートセロス凝集体を作成し、累計500mLの液化DMEで水および脂質を抽出した。以下のFig. 1.11に抽出前の微細藻類、脂質、残渣の写真を示し、Fig. 1.12に脂質と水の抽出挙動を示す。

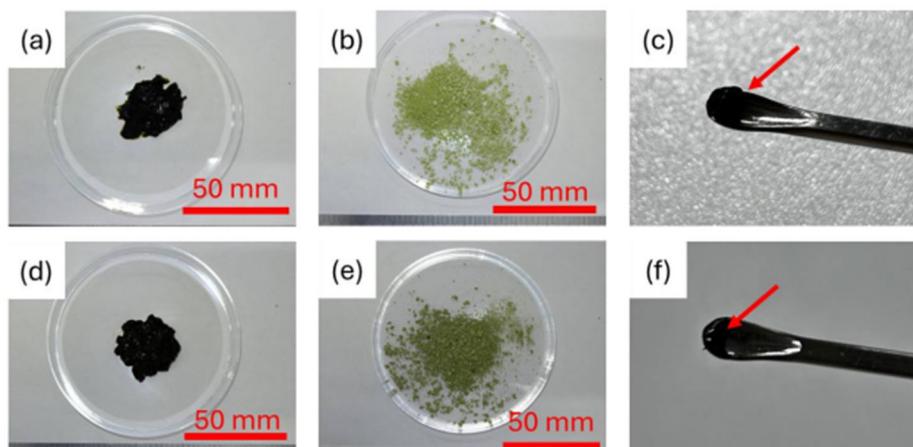


Fig. 1.11 キートセロスの液化DME抽出前後の写真  
凝集剤未添加の場合：(a)抽出前サンプル, (b)残渣, (c)抽出物,  
KP209H 添加の場合：(d)抽出前サンプル, (e)残渣, (f)抽出物

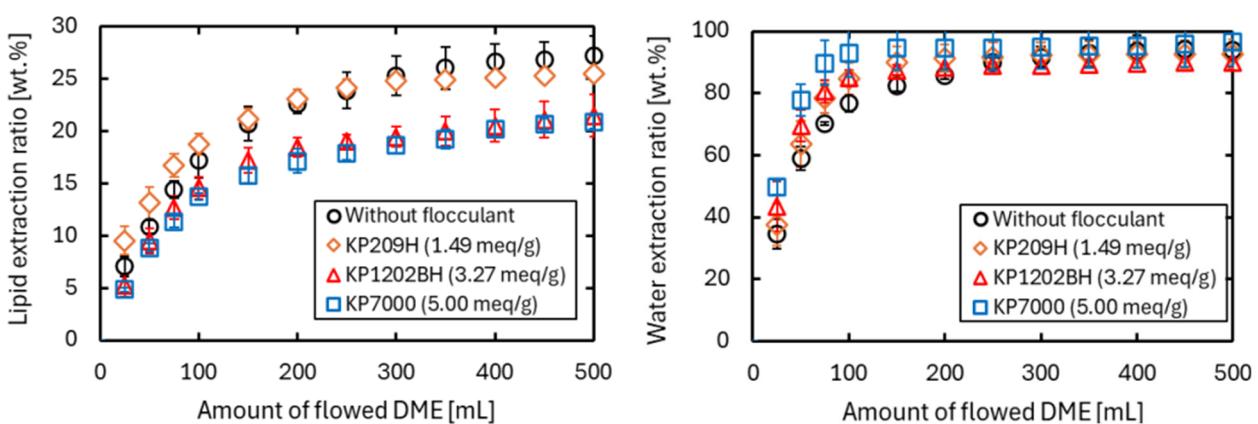


Fig. 1.12 液化DMEによるキートセロスからの脂質（左）と水分（右）の抽出量変化

なお、Lipid Extraction ratioは、微細藻類の乾燥重量(g)当たりの抽出物の乾燥重量(g)の百分率

Fig. 1.12に示す脂質の抽出挙動を比較すると、凝集剤未添加の場合には脂質抽出率は $27.2 \pm 1.9\text{wt.}\%$ であり、KP209Hを添加した場合にはこれとほぼ等しい脂質抽出率 $25.4 \pm 0.6\text{wt.}\%$ であった。一方でKP1202BHやKP7000を添加した場合にはそれぞれ脂質抽出率 $21.5 \pm 2.0\text{wt.}\%$ ,  $20.8 \pm 0.6\text{wt.}\%$ となり、いずれも凝集剤未添加の場合より約6wt.%質抽出率が低下した。以下にこの原因について考察する。凝集剤未添加の場合、Fig. 1.13(a)に示すように、液化DMEはキートセロス表面のシリカ被殻に点在する約10nmの隙間を通過して、細胞質へと浸透することで、脂質が抽出される。ここでKP209Hを添加すると、KP209Hは静電引力によってキートセロス表面を覆う。しかしKP209Hはカチオン度が1.49 meq/gと低いため、キートセロスが水に覆われた抽出の初期段階ではFig. 1.13(b)のように、直鎖上のKP209Hがキートセロス表面の隙間を僅かに狭める程度の小さな影響を与えるにとどまり、浸透性に優れた液化DMEはこの小さな隙間を浸透することで、凝集剤未添加の場合と同量の脂質が抽出された。一方で KP1202BHやKP7000を添加すると、そのカチオン度がそれぞれ3.27 meq/g, 5.00 meq/gと高いため、Fig. 1.13(c)のようにキートセロス表面との強い静電引力で表面を覆ったポリマー系凝集剤が液化DMEの浸透を妨げたことで、脂質抽出率は低下した。脂質抽出の中終盤以降では、KP209Hをその貪溶媒である液化DMEが覆うため、KP209Hは直鎖上から球状へと変化する。そのためキートセロス表面を覆ったKP209Hによる脂質の抽出阻害の影響は小さくなる。ところが脂質の大半が抽出されたことで、液化DMEに対する脂質の濃度勾配が小さくなり、それに伴い脂質の物質移動抵抗が大きくなつたため、脂質の抽出率が再度増加することは無かった。液化DMEが局地的に通過しない部分は見受けられなかった。これはいずれのキートセロスも水分率が $82.0 \pm 4.0\text{wt.}\%$ の範囲にあり、ポリマー系凝集剤を添加しても、著しい水分率の低下とそれに伴う粘度の増加が無かつたためと考えられる。Fig. 1.12における、液化DMEによるキートセロスからの水分抽出量変化より、凝集剤の有無や種類に依らず水分の最終的な抽出率は等しく平均 $93.4 \pm 2.3\text{wt.}\%$ であり、抽出前のキートセロスに含まれる水分のほぼすべてを抽出できたことが分かる。

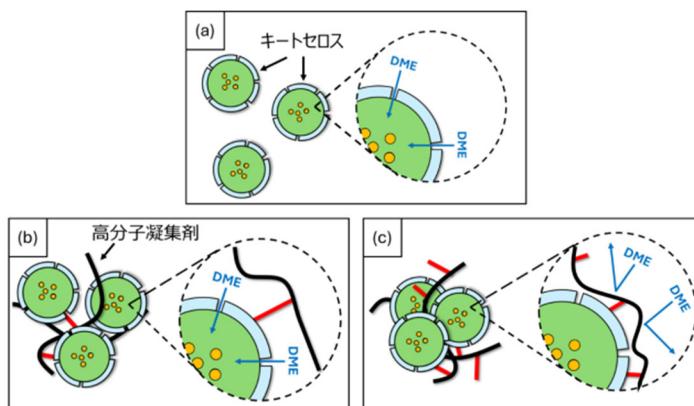


Fig. 1.13 抽出初期段階における液化DMEによるキートセロスからの脂質抽出のメカニズム  
(a) 凝集剤未添加の場合, (b) 低カチオン度凝集剤添加の場合, (c) 高カチオン度凝集剤添加の場合

液化DME抽出の挙動を従来法と比較するため、クロロホルム・メタノールを用いてキートセロスから脂質を抽出した。以下のTable 1.12に溶媒種および凝集剤の有無や種類による脂質の抽出率の比較を示す。液化DME抽出の場合、KP1202BHやKP7000を添加すると脂質抽出率が低下し、KP209Hを添加しても脂質抽出率は凝集剤未添加の場合と同程度であった。一方でクロロホルム・メタノール抽出の場合、いずれのポリマー系凝集剤を添加しても脂質抽出率が $4.0\text{wt.}\%$ から $10.0\text{wt.}\%$ ほど減少した。ここで液化DME抽出において脂質抽出を阻害しなかつたKP209Hが、クロロホルム・メタノール抽出においては脂質抽出を阻害した原因を考察する。液化DMEはクロロホルムやメタノールと比較して粘度、表面張力がそれぞれ約1/4倍, 1/3倍、自己拡散係数が約5倍の浸透性に優れた溶媒である。従って液化DME抽出の場合には、仮にポリマー系凝集剤がキートセロス表面のシリカ被殻の隙間の一部を覆った程度では、その隙間から細胞質へと浸透可能であるために脂質抽出率はほとんど減少しなかつた。しかし浸透性の劣るクロロホルム・メタノールの場合、低カチオン度のポリマー系凝集剤がわずかにシリカ被殻の隙間を狭めただけで細胞質へと浸透できなくなり、脂質抽出率の低下を招いたと考えられる。またポリマー系凝集剤未添加の場合においても、脂質の全量抽出が可能と考えられてきたクロロホルム・メタノールよりも、液化DMEが多くの脂質を抽出しており、キートセロスが生産する脂質を抽出するにあたっては、液化DMEがより優れた抽出溶媒であると言える。クロロホルム・メタノールによって抽出される脂質の量を増やすためには、より細かく細胞を破壊することが有効である。しかし過度な細胞破壊は、それ自体に多くのエネルギーを消費することに加えて、摩擦熱によって脂質の劣化や機能性成分の分解が引き起こされる可能性がある。また過度な細胞破壊に伴って、タンパク質や被殻由来のシリカが脂質へ

混入する懸念が強くなる。たとえごく僅かなSiがバイオ燃料中に混入しただけでも、エンジン内に灰が蓄積してエンジンの劣化を招くことに加えて、大気汚染を増加させる。

Table 1.12 キートセロスからの脂質抽出率の比較

No.	抽出溶媒	高分子凝集剤	脂質抽出率 (wt.%)
1	液化DME	なし	27.2 ± 1.9
2	液化DME	KP209H	25.4 ± 0.6
3	液化DME	KP1202BH	21.5 ± 2.0
4	液化DME	KP7000	20.8 ± 0.6
5	クロロホルム/メタノール	なし	26.0 ± 0.7
6	クロロホルム/メタノール	KP209H	20.0 ± 1.3
7	クロロホルム/メタノール	KP1202BH	22.0 ± 0.7
8	クロロホルム/メタノール	KP7000	16.2 ± 0.8

次にFT-IRを用いてKP209H、抽出前の微細藻類、残渣および脂質の表面官能基を分析したところ、それぞれスペクトルのピークが示す官能基はTable 1.13の通りであった。

Table 1.13 キートセロスとその脂質および残渣のFT-IRスペクトルから検出されたピーク

ピーク No.	波数 (cm <sup>-1</sup> )	官能基	由来する成分	ピークが検出された試料
1	3356	CH=CH stretching	凝集剤	KP209H
2	3273	O-H stretching	水	キートセロス、残渣
3	3000	=C-H stretching	脂質	脂質
4	2974	-C-H stretching	凝集剤 脂質	KP209H, キートセロス、脂質
5	2923	CH=CH asymmetric stretching	脂質	脂質
6	1722	Carboxylic acids C=O stretching	凝集剤	KP209H
7	1713	C=O stretching	フコキサンチン	脂質
8	1657	Amide C=O stretching (Derived from acrylamide)	凝集剤	KP209H
9	1625	Amide C=O stretching	タンパク質	キートセロス、残渣
10	1522	Amide II C-N stretching N-H angular vibration	タンパク質	キートセロス、残渣
11	1486	C-H <sub>2</sub> in-plane variation	凝集剤	KP209H
12	1451	CH <sub>2</sub> symmetry in-plane variation, CH <sub>3</sub> inverse symmetry variable angle	凝集剤 脂質	KP209H, 脂質
13	1154	Ester C-O stretching	凝集剤	KP209H
14	1053	Si-O-Si asymmetric stretching	シリカ	キートセロス、残渣、脂質 ※ DME脂質(KP209H)を除く
15	947	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> stretching vibration	凝集剤	KP209H
16	770	Si-O-Si inter tetrahedral bridging bonds in SiO <sub>2</sub>	シリカ	キートセロス、残渣
17	697	C-H out-of-plane bending vibration	脂質	脂質

各々の溶媒で抽出されたすべての脂質でピーク3・4・5・7・12・17が検出され、これらは=C-H基の伸縮振動・-C-H基の伸縮振動・CH=CH基の非対称伸縮振動・フコキサンチン(カロテノイド)由来のC=O基の伸縮振動・CH<sub>2</sub>の面内対称振動やCH<sub>3</sub>基の逆対称変角振動・C-Hの面外変角振動に各々対応している。この内ピーク4は、抽出前のキートセロスからも検出されたが、抽出前のキートセロスと比較して脂質のピーク4は明らかに大きい。このことは、キートセロスに含まれる大半の脂質が各々の溶媒によって抽出できたことを示している。またピーク4・12はKP209Hからも検出されたが、これらのピークは炭化水素の存在を示す一般的なピークであり、凝集剤の混入の判断には利用できない。また抽出前のキートセロスと各々の溶媒で抽出されたすべての残渣からは、ピーク9・10・14・16が検出され、これらはタンパク質に含まれるアミド結合中のC=O基の伸縮振動・

アミド結合中のC-N 基の伸縮振動やN-H基の変角振動・シリカの被殻に含まれるSi-O-Si非対称伸縮振動・Si-O-Si 四面体間架橋結合に各々対応している。このことはキートセロスを構成するタンパク質や被殻のシリカが溶媒に溶けにくいことを示している。ただしピーク14はKP209Hを添加したキートセロスから液化DMEで抽出された脂質を除く3通りの脂質からも検出されており、脂質抽出の過程でシリカが脂質に混入したことを示している。特にクロロホルム・メタノール抽出においては、抽出前に細胞破壊プロセスを伴うためにシリカが脂質へと混入する可能性が高く、脂質の品質低下が懸念されてきた。この分析結果は、事前の細胞破壊プロセスを必要としない液化DME抽出と適切な凝集剤を併用することで、副次的にシリカの混入を避けられることを示唆しており、凝集剤の添加が脂質の品質低下を防ぐ可能性がある。最後に、KP7000に特徴的なピーク1・6・8・11・13・15は、各々CH=CH基の伸縮振動・-C-H基の伸縮振動・カルボン酸由来のC=O伸縮振動・アクリルアミド由来の C=O 伸縮振動・エステル結合由来のC-O 基の伸縮振動・N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>の伸縮振動に対応しており、これらのピークは藻類サンプルのいずれからも検出されなかった。以上の結果を総合すると、抽出された脂質はトリグリセリドの成分と矛盾が無く、残渣は主にキートセロスを構成するタンパク質や被殻に由来するシリカである。またKP209Hは脂質に混入していない可能性が高いと結論づけられる。

キートセロスから抽出された脂質よりFAMEを合成し、脂質に含まれる脂肪酸の組成をGC-MSで分析した。脂肪酸組成をTable 1.14に示す。キートセロスから抽出された脂質には、C16:1が脂肪酸全体の3分の1程度含まれ、次いでC14:0, C16:0, C16:3およびC20:5が多く含まれていた。はじめに凝集剤KP209H添加の有無で脂肪酸の組成を比較する。液化DME抽出においては、KP209Hを添加するとC16:3の割合が小さくなり、C16:0の割合が大きくなかった。またクロロホルム・メタノール抽出においては、KP209H添加の有無が脂肪酸組成に影響を与えていないことが分かる。さらに抽出溶媒ごとに脂肪酸組成を比較すると、大きな違いはないことが分かる。すなわち液化DMEは、従来のクロロホルム・メタノール抽出によって得られる脂質と同様の脂肪酸組成を持つ脂質を抽出したと言える。加えて飽和・不飽和脂肪酸の割合においても、Table 2.20に示す通り、凝集剤の有無や溶媒種による差はほとんどなく、クロロホルム・メタノール抽出前後の処理で不飽和脂肪酸が酸化されていないことが分かる。いずれの抽出方法においても抽出された脂肪酸全体の約70%が不飽和脂肪酸であり、クロレラから抽出された脂質の場合と同様にSAFへの利用が適した脂質であることが分かる。食用油への利用の観点から評価すると、C20:5(5,8,11,14,17), n-3で表されるエイコサペンタエン酸(EPA)というω3脂肪酸が含まれていることが分かる。ω-3脂肪酸は脳や心臓の健康維持に有効である可能性が示されており、ω-6脂肪酸の場合と同様に摂取が望ましい成分である。

Table 1.14 キートセロスから抽出された脂質に含まれる脂肪酸の組成

略称 (正式名称)	液化DME (wt.%)		クロロホルム・メタノール (wt.%)	
	KP209Hあり	KP209Hなし	KP209Hあり	KP209Hなし
C14:0 (Myristic acid)	16.3 ± 0.3	15.4 ± 1.2	17.0 ± 0.1	17.3 ± 0.4
C16:0 (Palmitic acid)	15.0 ± 0.2	10.2 ± 0.6	12.9 ± 0.1	10.5 ± 0.0
C16:1(9), n-7 (Palmitoleic acid)	32.3 ± 3.2	29.8 ± 2.5	37.7 ± 3.1	25.8 ± 0.1
C16:2(9,12), n-4 (9,12-Hexadecadienoic acid)	4.2 ± 3.0	2.5 ± 0.2	2.3 ± 3.2	8.2 ± 0.0
C16:3(6,9,12), n-4 (6,9,12- Hexadecatrienoic acid)	11.9 ± 0.1	19.4 ± 0.3	12.8 ± 0.1	18.2 ± 0.2
C18:2(9,12), n-6 (Linoleaidic acid)	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.0
C20:4 (5,8,11,14), n-6 (Arachidonic acid)	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.0	2.1 ± 0.1	1.3 ± 0.0
C20:5 (5,8,11,14,17), n-3 (5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid)	16.1 ± 0.5	18.7 ± 0.3	14.1 ± 0.1	18.1 ± 0.1

KP209H、抽出前のキートセロス、残渣および脂質の元素組成を分析したところ、以下のTable 1.15の通りとなった。

Table 1.15 キートセロスおよびその脂質と残渣の元素組成

Wt. %	KP209H	試料	C	H	N	O	S	C/N (-)
キートセロス	—	—	36.6 ± 0.3	5.6 ± 0.0	7.0 ± 0.0	50.1 ± 0.4	0.8 ± 0.1	5.2 ± 0.0
KP209H	—	—	43.9 ± 1.9	7.7 ± 0.2	16.1 ± 0.2	31.4 ± 1.0	0.9 ± 1.2	2.7 ± 0.1
液化 DME	あり	残渣	28.0 ± 0.1	4.8 ± 0.1	7.0 ± 0.0	59.8 ± 0.1	0.5 ± 0.0	4.0 ± 0.0
		脂質	73.9 ± 0.0	11.1 ± 0.4	1.2 ± 0.0	13.2 ± 0.3	0.7 ± 0.1	62.1 ± 1.5
なし	あり	残渣	27.1 ± 0.1	4.1 ± 0.2	7.2 ± 0.0	60.9 ± 0.2	0.7 ± 0.0	3.7 ± 0.0
		脂質	70.1 ± 0.3	9.5 ± 0.3	1.6 ± 0.0	18.6 ± 0.1	0.2 ± 0.0	43.9 ± 0.1
クロロホルム ・メタノール	なし	残渣	26.2 ± 0.1	4.5 ± 0.1	7.2 ± 0.0	61.6 ± 0.2	0.5 ± 0.0	3.6 ± 0.0
		脂質	65.5 ± 0.1	10.2 ± 0.1	2.4 ± 0.1	21.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0	27.0 ± 1.0
なし	なし	残渣	27.2 ± 0.4	5.0 ± 0.3	7.4 ± 0.1	59.8 ± 0.8	0.7 ± 0.0	3.7 ± 0.0
		脂質	56.7 ± 0.1	7.6 ± 0.2	3.4 ± 0.3	31.8 ± 0.5	0.5 ± 0.1	16.7 ± 1.2

キートセロスにおいても、クロレラの場合と同様に、脂質抽出を経て脂質にはトリグリセリドに由来するCとHが、残渣にはタンパク質に由来するNとOが濃縮されたことが分かる。はじめにKP209Hの有無で比較すると、いずれの溶媒種の場合にも脂質や残渣の元素組成に違いはなく、KP209Hの添加が抽出に影響を与えていないことが分かった。また溶媒種で比較すると、クロロホルム・メタノールで抽出された脂質は液化DMEで抽出された脂質より、Oの割合が7から11wt.%程大きく、Nの割合が1から2wt.%程大きいことが分かる。これはクロロホルム・メタノール抽出の選択性が低いために、トリグリセリドのみでなく、Oを含んだ糖脂質やNを含んだリン脂質を抽出したことが原因であると考えられる。従って、OやNの脂質への混入が少ない液化DME抽出は、従来よりも選択性が高い抽出方法であると言える。最後にC/N比に着目すると、液化DMEで抽出された脂質はKP209Hの有無に依らずC/N比が40以上であることが分かり、バイオ燃料に代表される熱化学変換プロセスでの利用が適した脂質であると言える。一方でクロロホルム・メタノールによって抽出された脂質は、Nが混入しているためにC/N比は小さくなり、バイオ燃料としての利用適正は液化DMEで抽出された脂質に劣ることが分かった。

#### 1. 4. 2. 1. 5. 円石藻プレウロクリシスに対する検討(成果9)

プレウロクリシスの回収に有効なポリマー系凝集剤KP1202BH, C502, C510をそれぞれ用いてプレウロクリシス凝集体を作成し、累計500 mLの液化DMEで水および脂質を抽出した。以下のFig. 1.14に脂質と水の抽出挙動を示す。

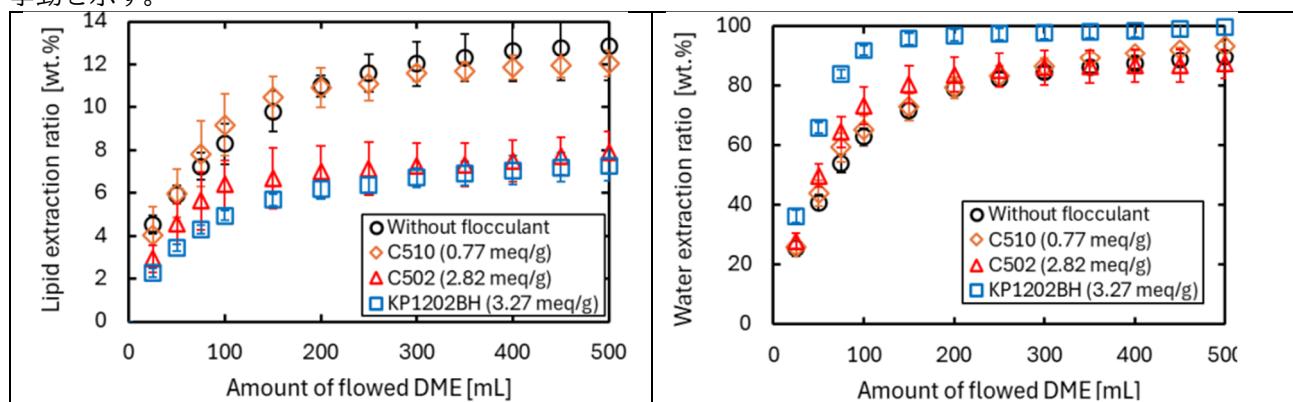


Fig. 1.14 液化DMEによるプレウロクリシスからの脂質(左)と水分(右)の抽出量変化  
なお、Lipid Extraction ratioは、微細藻類の乾燥重量(g)当たりの抽出物の乾燥重量(g)の百分率

Fig. 1.14に示す脂質の抽出挙動を比較すると、凝集剤未添加の場合には脂質抽出率は $11.7 \pm 1.1\text{wt. \%}$ であり、カチオン度0.77 meq/gの低カチオン度凝集剤C510を添加した場合には、これとほぼ等しい脂質抽出率 $12.0 \pm 0.6\text{wt. \%}$ であった。一方でカチオン度がそれぞれ2.82 meq/g, 3.27 meq/gの高カチオン度凝集剤C502やKP1202BHを添加した場合には、脂質抽出率は $7.9 \pm 1.0\text{wt. \%}$ ,  $7.3 \pm 0.7\text{wt. \%}$ となり、いずれも液化DMEによる脂質抽出量を低下させることとなった。またFig. 1.14に示す水分の抽出挙動においては、凝集剤の有無や種類による水分抽出率の違いはほとんどなく、最終的な水分の抽出率は $92.5 \pm 4.8\text{wt. \%}$ であった。すなわち液化DMEは抽出前のプレウロクリシスに含まれるほぼ全ての水分を抽出することができたと言える。これらの結果は

前章で述べた珪藻キートセロスからの液化DMEによる脂質抽出にポリマー系凝集剤が及ぼす影響と傾向が酷似している。従って高カチオン度凝集剤が脂質抽出を阻害した原因は、凝集剤がプレウロクリシス表面を覆い、液化DMEの浸透を妨げたためと考えられる。

液化DME抽出の挙動を従来法と比較するため、クロロホルム・メタノールを用いてプレウロクリシスから脂質を抽出した。以下のTable 1.16に溶媒種および凝集剤の有無や種類による脂質の抽出率の比較を示す。液化DME抽出の場合、C502やKP1202BHを添加すると脂質抽出率が低下し、C510を添加しても脂質抽出率は凝集剤未添加の場合と同程度であった。一方でクロロホルム・メタノール抽出の場合、いずれのポリマー系凝集剤を添加しても脂質抽出率が少なくとも5wt.%減少した。すなわちこの結果は、前項のキートセロスの場合と同様に、液化DMEによる脂質抽出を阻害しなかったC510でも、クロロホルム・メタノール抽出においては脂質抽出を阻害したことを意味する。この原因是、液化DMEが浸透性に優れた溶媒であるためにポリマー系凝集剤が微細藻類表面の孔の一部を覆った程度では、その隙間から細胞質へと浸透可能であったのに対し、浸透性に劣るクロロホルム・メタノールは浸透できなくなったためと考えられる。また凝集剤未添加の場合において溶媒種を比較すると、クロロホルム・メタノールよりも液化DMEが多くの脂質を抽出しており、プレウロクリシスが生産する脂質を得るには液化 DME 抽出が、従来は脂質の全量を抽出すると考えられてきたクロロホルム・メタノール抽出よりも適した方法であることが分かる。

Table 1.16 プレウロクリシスからの脂質抽出率の比較

No.	抽出溶媒	高分子凝集剤	脂質抽出率 (wt.%)
1	液化DME	なし	11.7 ± 1.1
2	液化DME	C510	12.0 ± 0.6
3	液化DME	C502	7.9 ± 1.0
4	液化DME	KP1202BH	7.3 ± 0.7
5	クロロホルム/メタノール	なし	10.3 ± 0.4
6	クロロホルム/メタノール	C510	3.7 ± 0.2
7	クロロホルム/メタノール	C502	5.0 ± 0.5
8	クロロホルム/メタノール	KP1202BH	4.5 ± 0.0

FT-IRを用いて、C510、抽出前の微細藻類、残渣および脂質の表面官能基を分析したところ、それぞれのスペクトルの有するピークが示す官能基はTable 1.17の通りであった。

Table 1.17 プレウロクリシスとその脂質および残渣のFT-IRスペクトルから検出されたピーク

ピーク No.	波数 (cm <sup>-1</sup> )	官能基	由来する成分	ピークが検出された試料
1	3260	O-H stretching	水	プレウロクリシス、脂質、残渣
2	3127	Alkenes C-H stretching	凝集剤	C510
3	2959	=C-H stretching	脂質	脂質
4	2883	CH=CH asymmetric stretching	脂質	プレウロクリシス、脂質
5	2847	CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> symmetry stretching	脂質	脂質
6	1704	C=O stretching	脂質	脂質
7	1621	Amide I C=O stretching	凝集剤 タンパク質	C510, プレウロクリシス、残渣
8	1455	CH <sub>2</sub> symmetry in-plane variation, CH <sub>3</sub> inverse symmetry variable angle	脂質	脂質
9	1450	CH <sub>2</sub> in-plane variation	凝集剤	C510
10	1396	Out-of plane and in plane vibration of CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ions for solid catalysts	炭酸カルシウム	プレウロクリシス、残渣
11	1073	C-C-CN stretching	凝集剤	C510
12	1039	C-O-C stretching	タンパク質	プレウロクリシス、残渣, CHCl <sub>3</sub> /MeOH 脂質
13	876	Out-of plane and in plane vibration of CO <sub>2</sub> <sup>3-</sup> ions for solid catalysts	炭酸カルシウム	プレウロクリシス、残渣,
14	799	C-Cl <sub>3</sub> stretching	残留溶媒	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 脂質 (C510あり)
15	712	Out-of plane and in plane vibration of CO <sub>2</sub> <sup>3-</sup> ions for solid catalysts	炭酸カルシウム	プレウロクリシス、残渣

各々の溶媒で抽出されたすべての脂質でピーク3・4・5・6・8が検出され、これらは=CH基の伸縮振動・CH=CH基の非対称伸縮振動・CH<sub>2</sub>基やCH<sub>3</sub>基の伸縮振動・C=O基の伸縮振動・CH<sub>2</sub>の面内対称振動やCH<sub>3</sub>基の逆対称変角

振動に各々対応している。この内ピーク4は、抽出前のプレウロクリシスや残渣からも検出されたが、抽出前のプレウロクリシスや残渣と比較して脂質のピーク4は明らかに大きい。このことは、プレウロクリシスに含まれる大半の脂質が各々の溶媒によって抽出できたことを示している。またピーク14はC510を添加したプレウロクリシスからクロロホルム・メタノールによって抽出された脂質のみから検出された、ピーク14は抽出溶媒のクロロホルムに起因するC=C基の伸縮振動に対応しており、液化DMEと比較して沸点が高いクロロホルムが脂質に残留していると考えられる。次に抽出前のプレウロクリシスと各々の溶媒で抽出されたすべての残渣からは、ピーク7・10・12・13・15が検出された。ピーク7と12はそれぞれタンパク質に含まれるアミド結合中のC=O基の伸縮振動・アミド結合中のC-N基の伸縮振動やNH基の変角振動に対応しており、ピーク10・13・15はいずれも被殻の炭酸カルシウムに起因するCO<sub>3</sub><sup>2-</sup>の面内および面外振動に対応している。この内ピーク12はC510の有無に依らずクロロホルム・メタノールによって抽出された脂質からも検出された。これはクロロホルム・メタノール抽出の前処理の粉碎工程において過度に粉碎された一部のタンパク質が脂質へと混入したためと考えられる。最後にC510のスペクトルからはピーク2・7・9・11が検出され、これらは炭化水素由来のC-H伸縮振動・C=O基の伸縮振動・CH<sub>2</sub>基の面内振動・C-C-CN基の伸縮振動に各々対応している。この内ピーク7は抽出前のプレウロクリシスや残渣のタンパク質由来のピークと位置が重なっており、C510の混入の判定には利用できない。これを除くピーク2・9・11はいずれの脂質からも検出されなかった。以上の結果を総合すると、抽出された脂質はトリグリセリドの成分と矛盾が無く、残渣は主にプレウロクリシスを構成するタンパク質や被殻に由来する炭酸カルシウムである。また液化DMEで抽出された脂質には抽出溶媒の残留やタンパク質の混入が無く、クロロホルム・メタノールと比較して高い品質の脂質が得られたと考えられる。さらにC510に特徴的なピーク2・9・11はいずれの脂質からも検出されず、C510は脂質に混入していないと結論づけられる。

プレウロクリシスから抽出された脂質よりFAMEを合成し、脂質に含まれる脂肪酸の組成をGC-MSで分析した。脂肪酸組成をTable 1.18に示す。

Table 1.18 プレウロクリシスから抽出された脂質に含まれる脂肪酸の組成

略称 (正式名称)	液化DME (wt.%)		クロロホルム・メタノール (wt.%)	
	C510あり	C510なし	C510あり	C510なし
C12:0 (Lauric acid)	2.1 ± 0.4	1.3 ± 0.8	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
C14:0 (Myristic acid)	1.2 ± 0.4	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.0
C16:0 (Palmitic acid)	56.5 ± 4.8	66.9 ± 0.9	59.1 ± 3.9	74.9 ± 0.7
C16:1(9), n-7 (Palmitoleic acid)	1.4 ± 1.1	0.1 ± 0.1	4.1 ± 0.4	0.9 ± 0.1
C18:0 (Octadecanoic acid)	12.1 ± 3.0	7.3 ± 1.2	8.0 ± 0.5	1.5 ± 0.1
C18:1 (cis-9-Octadecanoic acid)	25.9 ± 8.5	22.8 ± 2.3	28.0 ± 2.7	22.3 ± 0.4
C18:2(9,12), n-6 (Linoleaidic acid)	0.8 ± 0.7	1.0 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.2 ± 0.0

プレウロクリシスから抽出された脂肪酸の約半分はC16:0であり、次いでC18:1、C18:0が多く含まれていた。はじめに凝集剤C510添加の有無で脂肪酸の組成を比較する。液化DME抽出においては、C510を添加するとC16:0の占める割合が小さくなり、代わりにC18:0やC18:1の割合が大きくなっている。クロロホルム・メタノール抽出においても液化DME抽出の場合と同様の傾向を示しており、これは脂質抽出の過程でC16:0を凝集剤C510が吸着した可能性を示唆している。また抽出溶媒ごとに脂肪酸組成を比較すると、液化DMEのみが比較的炭素数の少ないC12:0やC14:0を抽出したことが分かり、液化DMEは幅広い中性脂質に対し溶解性を持つことが分かる。さらに飽和・不飽和脂肪酸の割合においては、C16:0を凝集剤C510が吸着した影響で、C510を添加した場合、不飽和脂肪酸の割合が5wt.%程大きくなる。またプレウロクリシスから抽出された脂質は、クロレラやキートセロスとは異なり飽和脂肪酸の割合が大きいため、食用油よりSAF等の燃料への利用が望ましいと言える。

C510、抽出前のプレウロクリシス、残渣および脂質の元素組成を分析したところ、以下のTable 1.19の通りとなった。

Table 1.19 プレウロクリシスおよびその脂質と残渣の元素組成

Wt. %	KP209H	試料	C	H	N	O	S	C/N (-)
プレウロクリシス	-		27.5 ± 0.1	3.6 ± 0.0	2.5 ± 0.0	65.6 ± 0.2	0.8 ± 0.2	10.8 ± 0.1
C510	-		46.2 ± 0.2	7.7 ± 0.0	15.3 ± 0.0	30.8 ± 0.1	0.1 ± 0.1	3.0 ± 0.0
液化	あり	残渣	28.7 ± 0.1	3.3 ± 0.0	3.3 ± 0.0	64.1 ± 0.0	0.5 ± 0.0	8.7 ± 0.1
		脂質	62.1 ± 0.7	9.4 ± 0.3	1.1 ± 0.1	26.5 ± 1.0	0.9 ± 0.1	58.9 ± 4.6
DME	なし	残渣	30.5 ± 0.1	3.8 ± 0.0	4.1 ± 0.0	61.2 ± 0.1	0.4 ± 0.0	7.4 ± 0.1
		脂質	68.9 ± 0.7	10.6 ± 0.7	0.7 ± 0.1	18.9 ± 1.3	0.9 ± 0.1	96.7 ± 10.7
クロロホルム ・メタノール	あり	残渣	24.6 ± 0.1	3.1 ± 0.0	2.6 ± 0.0	69.0 ± 0.2	0.7 ± 0.2	9.4 ± 0.0
		脂質	40.6 ± 0.0	7.4 ± 0.2	1.9 ± 0.0	49.2 ± 0.2	0.9 ± 0.0	21.0 ± 0.1
	なし	残渣	29.4 ± 0.1	3.4 ± 0.0	3.9 ± 0.0	63.0 ± 0.1	0.2 ± 0.0	7.5 ± 0.0
		脂質	64.0 ± 0.7	9.4 ± 0.3	1.1 ± 0.1	24.1 ± 0.6	0.4 ± 0.0	44.7 ± 5.1

プレウロクリシスにおいても、上述の微細藻類の場合と同様に、脂質抽出を経て脂質にはトリグリセリドに由来するCとHが、残渣にはタンパク質に由来するNとOが濃縮されたことが分かる。ただしC510を添加したプレウロクリシスからクロロホルム・メタノールによって抽出された脂質は、他の脂質と濃縮の程度が著しく異なるため、CおよびOの割合が大きく異なっている。はじめにC510の有無で比較すると、いずれの溶媒の場合にもC510を添加した場合には、残渣に占めるNの割合が約1wt.%程増加している。これはNを15wt.%含んだC510が残渣中に残留したためと考えられる。一方で脂質の元素組成にはC510の添加に伴うNの割合の変化は見られず、C510が脂質に混入していないと考察される。溶媒種ごとの元素組成の違いも小さく、これはプレウロクリシスの生産する脂質に占める糖脂質やリン脂質の割合が少ないために、溶媒ごとの選択性の差が現れなかつたためと考えられる。最後にC/N比に着目すると、液化DMEで抽出された脂質はC510の有無に依らずC/N比が56以上であることが分かり、クロロホルム・メタノールで抽出された脂質以上に、バイオ燃料に代表される熱化学変換プロセスでの利用が適した脂質であると言える。

#### 1. 4. 2. 1. 6. 緑藻ドナリエラに対する検討(成果5, 21, 26)

Fig. 1.15には凝集剤未添加と凝集剤KP206BHを添加したドナリエラからの脂質および水分の抽出率を示した。ここで選定した凝集剤KP206BHは、これまでの結果から凝集効果が高いと想定して用いた。脂質の抽出挙動を比較すると、凝集剤を添加しない場合の脂質抽出率は28.4 ± 1.3 wt.%であり、KP206BHを添加した場合の抽出率は28.8 ± 1.6 wt.%であった。水分に関しては、未添加条件下での抽出率は93.5 ± 6.0 wt.%、KP206BH添加時は91.3 ± 5.0 wt.%であり、いずれも同程度の抽出率が得られた。これらの結果より、液化DMEによる抽出において、KP206BHの添加が脂質および水分の抽出を阻害しないことが明らかとなった。この理由として、KP206BHの主成分が分子量700万のポリアクリレートであり、カチオン度が2.15 meq/gと比較的低いため、ドナリエラとの静電的相互作用が弱いことが挙げられる。さらに、KP206BHの凝集剤としての性能は高く、ドナリエラの回収率は98%に達した。

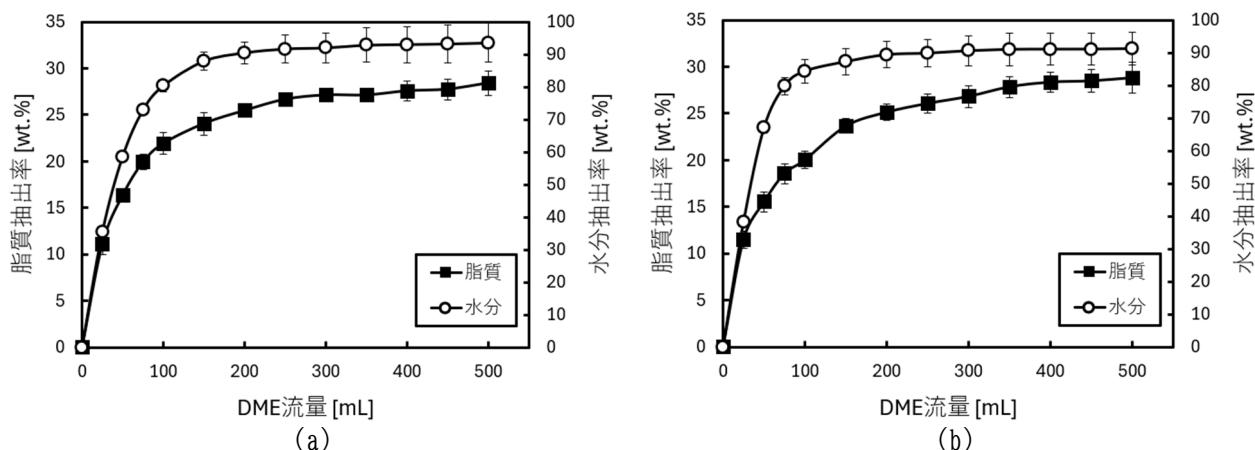


Fig. 1.15 液化DMEによる(a)緑藻ドナリエラおよび(b)緑藻ドナリエラのKP206BH凝集体からの

脂質と水分抽出量変化、なお、脂質抽出率は、微細藻類の乾燥重量(g)当たりの抽出物の乾燥重量(g)の百分率

Fig. 1.16に示すように、従来法であるクロロホルム・メタノール抽出による脂質の抽出率は、凝集剤未添加のドナリエラでは $28.7 \pm 1.6$  wt.%、KP206BH添加時では $15.3 \pm 1.7$  wt.%であり、凝集剤の添加により抽出率が有意に低下した。一方、液化DMEは従来法よりも高い脂質抽出率を示し、KP206BHポリマー系凝集剤の添加下でも抽出効率の低下は認められなかった。このことから、液化DMEはポリマー系凝集剤と併用可能な脂質抽出溶媒であることが示唆された。

また、 $\beta$ -カロテンの抽出についても同図に比較結果を示す。液化DMEによる抽出では、凝集剤未添加および添加の両条件下で、それぞれ $7.0 \pm 0.7$  mg/gおよび $6.0 \pm 0.6$  mg/gの抽出率が得られた。これに対し、クロロホルム・メタノール抽出では、同様の条件下で $1.8 \pm 0.2$  mg/gおよび $0.4 \pm 0.0$  mg/gと、顕著な抽出率の低下が認められた。特に湿式および熱風乾燥処理を施した試料では $\beta$ -カロテンの収率が著しく低下し、凍結乾燥処理でもわずかに収率が減少することが明らかとなった。一方、液化DMEは湿潤状態の試料から直接抽出可能な有効な溶媒であることが確認された。以上の結果に基づき、以後のクロロホルム・メタノール抽出による分析は凍結乾燥試料を用いて実施し、最も良好な抽出性能が得られた。また、脂質および $\beta$ -カロテンのいずれの成分においても、凝集剤KP206BHの添加が抽出挙動に対して阻害的に作用しないことが確認された。

#### 1. 4. 2. 1. 7. ヨーグレナに対する検討

Fig. 1.17には、凝集剤未添加と、KP7000を添加したヨーグレナからの脂質および水分の抽出率を示した。ここで選定した凝集剤KP7000は、これまでの結果から凝集効果が高いと想定し、緑藻ドナリエラとは異なるものを用いた。脂質の抽出挙動を比較すると、凝集剤未添加時における脂質抽出率は $40.7 \pm 1.0$  wt.%であり、KP7000添加時では $42.5 \pm 1.6$  wt.%と、いずれも高い抽出率が得られた。水分の抽出率に関しても、未添加条件では $91.2 \pm 3.4$  wt.%、KP7000添加条件では $93.1 \pm 3.3$  wt.%であり、脂質同様、ほぼ同程度の抽出率を示した。これらの結果から、液化DMEを用いた抽出において、ポリマー系凝集剤KP7000の添加は脂質および水分の抽出挙動に対して阻害的に作用しないことが明らかとなった。加えて、KP206BHは高い凝集性能を有しており、ヨーグレナに対する回収率は98%に達した。これにより、ポリマー系凝集剤を併用することで、藻体の効率的な回収とその後の抽出工程の効率化が両立可能であることが示された。

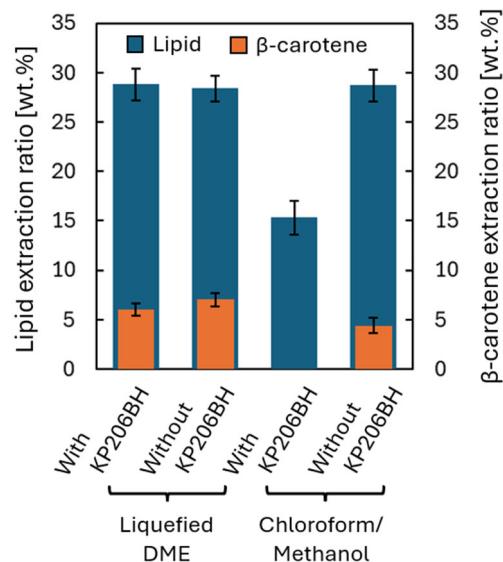
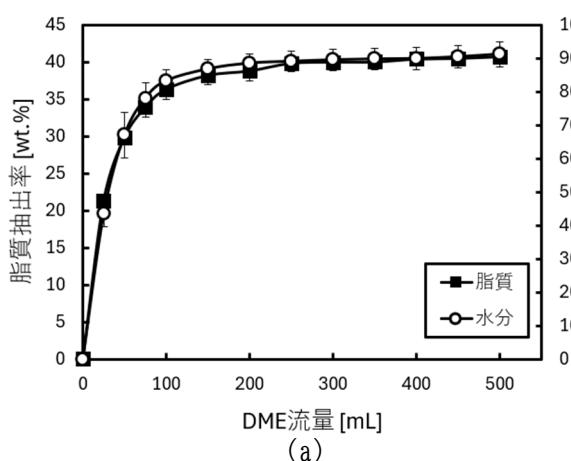
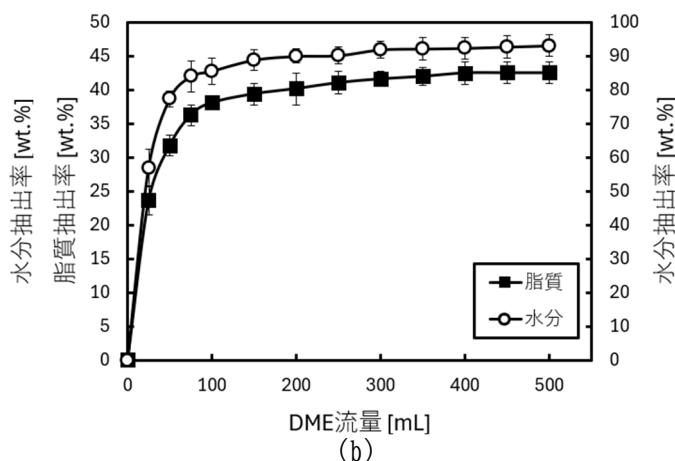


Fig. 1.16 液化DMEおよびクロロホルム・メタノール抽出による緑藻ドナリエラ、およびKP206BH凝集体からの脂質抽出量の比較、なお、Lipid Extraction ratioは、微細藻類の乾燥重量(g)当たりの抽出物の乾燥重量(g)の百分率



(a)



(b)

Fig. 1.17 液化DMEによる(a)ヨーグレナおよび(b)ヨーグレナKP206BH凝集体からの脂質と水分抽出量変化  
なお、脂質抽出率は、微細藻類の乾燥重量(g)当たりの抽出物の乾燥重量(g)の百分率

一方、Fig. 1.18に示すように、従来法であるクロロホルム・メタノール系溶媒による脂質抽出では、凝集剤未添加時における抽出率は $40.0 \pm 0.5$  wt.%であったのに対し、KP7000添加時では $35.8 \pm 0.3$  wt.%と有意に低下した。この結果は、ポリマー系凝集剤の存在がクロロホルム・メタノール系溶媒の浸透性や脂質溶解性に影響を与え、抽出効率を抑制する可能性を示唆している。これらの比較から、液化DMEは従来の有機溶媒系抽出法に比べて脂質抽出効率が高く、かつポリマー系凝集剤との併用が可能であることが示された。

本研究では、ユーグレナからの脂質抽出においても高い脂質含有量が得られた。ユーグレナは、光合成と従属栄養の両方が可能なミックス栄養性を有する微細藻類であり、その代謝特性により、培養条件に応じた柔軟な炭素代謝が可能である。特に、窒素源が制限された条件下では、細胞内における余剰炭素が脂質合成に振り向けられることが報告されており、本研究においても類似の傾向が観察された。また、ユーグレナは細胞壁を持たず、代わりにペリクルと呼ばれる柔軟なタンパク質構造により細胞外被が構成されている。この構造的特徴により、溶媒の細胞内浸透が促進され、脂質抽出効率が他の細胞壁を有する藻類と比較して高くなる傾向がある。加えて、ユーグレナはワックスエステルや不飽和脂肪酸を豊富に含むことが知られており、これらのエネルギー密度の高い脂質成分が、抽出された脂質含有量の増加に寄与したと考えられる。

さらに、培養時にグルコースや有機酸を炭素源として供給したことで、ユーグレナはエネルギー貯蔵物質であるパラミロンや脂質を効率的に蓄積したと推察される。このような培養条件と抽出条件の最適化も、高脂質含有量の獲得に寄与した要因と考えられる。

#### 1. 4. 2. 2. サブテーマ2の研究結果及び考察

サブテーマ2では、複数の微細藻類（緑藻・珪藻・円石藻など）に対する、ポリマー系凝集剤による凝集効果を明らかにした。ポリマー系凝集剤の探索に際しては、DMEに不溶といった溶媒調和性や、農業肥料や食品としても利用される抽出残渣への残留を念頭にして環境調和性も考慮した。ポリマー系凝集剤の効果としては、遠心分離後の微細藻類の含水率が下水汚泥脱水ケーキ並みの含水率80%未満を目指すとともに、微細藻類の回収率も98%以上を目指す検討を行うとともに、全体プロセスの消費エネルギー、温室効果ガス排出量も試算した。以下にこれらの研究結果及び考察を示す。

##### 1. 4. 2. 2. 1. ポリマー系凝集剤の安全性に関する文献調査(研究成果36, 41)

サブテーマ1の成果から適切にポリマー系凝集剤を選定すればDME抽出液にポリマーが含まれないと判明したので、残渣にポリマーが残留することから、残渣の有効利用を想定して各ポリマーによる家畜・水産資源・農作物への毒性や成長阻害についての文献調査を行った<sup>1), 2)</sup>。

本調査で対象とした凝集剤は、天然由来の凝集剤であるキトサン、ポリグルタミン酸ナトリウムを除く23種とした。家畜飼料（哺乳類）への経口毒性は、どの凝集剤も生体内にほとんど吸収されず、生体器官への生体濃縮は確認されなかった。皮膚刺激性および粉塵の吸入による毒性も認められないことが確認された。点眼刺激性（眼に対する刺激）は、カチオン性で比較的強く、アニオン・ノニオン性では弱いことが確認された。これらのことから、牛や豚などの家畜飼料への利用では、凝集剤自身の毒性はないことが示唆された。しかし一方で、鶏への家畜飼料については、十分な知見が確認されておらず、更なる調査が必要であると考えられる。水産飼料（魚類）への経口毒性は、魚の鰓から生成されるポリアニオニン性の粘質物がカチオン性ポリマーと反応し、窒息死するケースがあった。一方で、アニオン性とノニオン性ポリマーは水処理工程の現実的な残留濃度の範囲(<0.3 mg/L程度)では、毒性は極めて低いことが確認された。なお、生体濃縮については、どの凝集剤も確認されてなかった。これらのことから、水産資源の魚類飼料への利用は、カチオン性ポリマーを使用した際に、魚毒性が発現するため、不適切であると判断した。

農業肥料としての毒性は、発芽毒性、根の身張に対する毒性、生育に対する毒性、作物への濃縮性、農地への環境蓄積性について調査したところ、顕著な毒性は認められなかった。

以上のことから、文献調査の範囲において、家畜飼料(牛・豚)と農業肥料の利用では、現実的な残渣の有効利用であれば、ヒトへの健康被害を及ぼすものはないことが確認された。一方で、水産資源への残渣の利

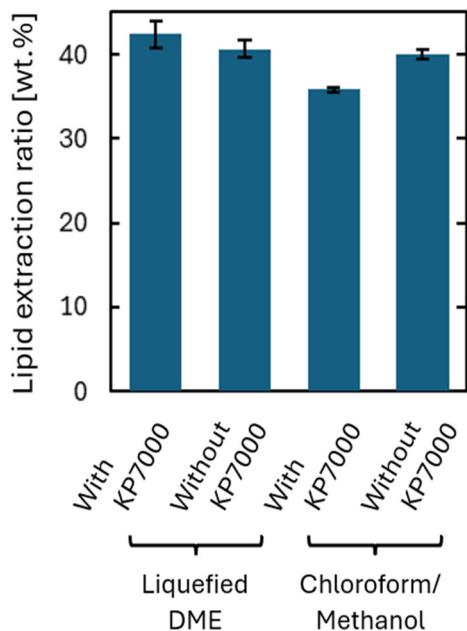


Fig. 1.18 液化DMEおよびクロロホルム・メタノール抽出によるユーグレナおよびKP7000凝集体からの脂質抽出量の比較 なお、Lipid Extraction ratioは、微細藻類の乾燥重量(g)当たりの抽出物の乾燥重

用では、魚毒性の観点から、カチオン性ポリマーを用いた場合は利用できないと考えられる。

- 1) 高分子凝集剤環境協会技術委員会, 高分子凝集剤の案税について<改訂版>(カチオン編). 高分子凝集剤環境協会, 2016
- 2) 高分子凝集剤環境協会技術委員会, 高分子凝集剤の案税について<改訂版>(アニオン/ノニオン編). 高分子凝集剤環境協会, 2016

#### 1. 4. 2. 2. 2. 微細藻類とポリマー系凝集剤の特性評価(成果1~4, 28, 32~35, 37, 41)

まず、微細藻類とポリマー系凝集剤の基本特性評価を実施した。

6種類の微細藻類は、pH、固体物濃度、粒径分布、ゼータ電位、油分含有量、元素組成をそれぞれ分析した(Table 2.1)。各微細藻類のpHは、6~7の範囲を示し、中性付近であった。固体物濃度は、0.1%であった。粒径分布は、数~数十 $\mu\text{m}$ の範囲であった。それらの平均粒子径は、全て既報値に近い値であった。ゼータ電位の結果から、全ての微細藻類の表面が、負に帯電していることが確かめられた。油分含有量はC12~24が主成分として検出された。従って、微細藻類の種類によって脂肪酸の組成が異なることから、目的に応じた脂肪酸を回収可能であることが示唆された。微細藻類の種類によって、水分、総発熱量、元素比は異なることが明らかになった。生産地の異なるクロレラの比較では、概ね同じ結果を示したことから、同じ系統分類の微細藻類を用いれば、同程度の脂質および機能性成分等が得られるものと示唆された。

本研究では、主に、微細藻類の乾燥粉末をサンプルとして使用したが、乾燥粉末の製造過程で加えられる操作により、生細胞と比較して粒径が異なる可能性がある。凝集において、懸濁物質の粒径は結果に影響を及ぼす因子の一つであるため、両者の違いを確認する必要がある。したがって、調製した微細藻類スラリーと、生細胞から調製したスラリーを対象に、その粒径分布を測定した。ただし、円石藻(プレウロクリシス)は生細胞が入手できなかったため、乾燥粉末から調製したスラリーの測定のみを行った、Figure 2.1 に結果を示す。横軸は粒径(常用対数表示)、縦軸は相対粒子量の積算値を%表示で示した。以下では、微細藻類の種類ごとに考察する。

クロレラ乾燥粉末を用いて調整したスラリーに含まれる粒子は、概ね2~10  $\mu\text{m}$  の大きさで、特に2~5  $\mu\text{m}$  のサイズの粒子が多く、全体の約80%を占めた。一方、生細胞から調製したスラリーは、2~5  $\mu\text{m}$  の粒子が全体の90%以上を占め、6  $\mu\text{m}$  以上の粒子は測定されなかった。一般的なクロレラの細胞の直径は2~10  $\mu\text{m}$  であり<sup>3)</sup>、双方の粒径分布と一致している。乾燥粉末から調製したスラリーでは、粉末と培地を攪拌により混合する段階で、一部の細胞が完全には分離せず集合し、6~10  $\mu\text{m}$  程度の比較的大きい粒子を形成していると考えられる。また、乾燥粉末の製造工程において、一部の細胞が破壊されることで、2  $\mu\text{m}$  以下の粒子も存在していると考えられる。粒径分布の幅に差はあるものの、存在割合が大きい粒子径は概ね一致しており、

本研究の実験原水として乾燥粉末から調製したスラリーを使用することに大きな問題はないと判断できる。

キートセラス乾燥粉末を用いて調整したスラリーに含まれる粒子は、2~50  $\mu\text{m}$ の大きさであり、5  $\mu\text{m}$ 以下の粒子は全体の約15%、10  $\mu\text{m}$ 以下の粒子は約40%であった。一方、生細胞から調製したスラリーは、5  $\mu\text{m}$

Table 2.1 各微細藻類の分類・サイズ・ゼータ電位・工業分析の結果

	クロレラ (日本)	クロレラ (インドネシア)	ドナリエラ	キートセラス	プレウロクリシス	ユーグレナ
分類	緑藻植物門 (緑藻)	緑藻植物門 (緑藻)	緑藻植物門 (緑藻)	不等毛植物門 (浮遊珪藻)	ハフト植物門 (円石藻)	ユーグレナ門 (ユーグレナ藻)
サイズ ( $\mu\text{m}$ )	4.3	8.3	5.8	6.0	3.7	42.8
ゼータ電位 (mV)	-33.5	-20.8	-22.5	-26.7	-25.2	-9.0
水分 (wt%)	5.68	5.7	6.21	0.77	6.15	4.78
灰分 (wt%)	7.64	5.32	5.09	32.42	36.46	3.68
揮発分 (wt%)	79.54	80.8	80.1	55.1	53.78	85.9
固定炭素 (wt%)	12.82	13.88	14.8	12.48	9.76	10.42
総発熱量 (kcal/kg)	5,460	5,320	5,600	3,890	2,510	6,680
総発熱量 (kJ/kg)	22,860	22,270	23,440	16,270	10,510	27,960
真発熱量 (kcal/kg)	5,070	4,940	5,270	3,600	2,320	6,240
真発熱量 (kJ/kg)	21,230	20,660	22,070	15,060	9,720	26,100
炭素 (wt%)	49.2	48.9		34.5	27.5	59
水素 (wt%)	7.21	7.11		5.36	3.49	8.21
窒素 (wt%)	10.6	9.22		6.62	2.61	8.9
全硫黄 (wt%)	0.6	0.68		0.53	0.17	0.59
酸素 (wt%)	25.4	29.4		21.1	29.9	20.2

以下の粒子は全体の約25%、10  $\mu\text{m}$ 以下の粒子は約35%、50  $\mu\text{m}$ 以下の粒子は約80%を占めた。110  $\mu\text{m}$ 程度の粒子も検出されており、乾燥粉末のスラリーと比較して粒径分布の幅が大きかった。一般的なキートセラスの細胞の直径は3~9  $\mu\text{m}$ であるとされており<sup>4)</sup>、双方のスラリーで粒形の幅が実際の細胞の大きさよりも大幅に広くなっている。乾燥粉末のスラリーに関しては、クロレラスラリーと同様に、調製時に完全には分散しなかった細胞が粒径の大きい粒子を形成しているため、粒子径の幅が大きくなっていると考えられる。生細胞のスラリーに関しては、粒径が大きくなる原因として、自己凝集が挙げられる。微細藻類は、pHや栄養面のストレス、金属イオンの存在などが原因となって自己凝集する場合がある<sup>5)</sup>。本研究で使用したキートセラスの生細胞のスラリーは、細胞以外の物質(栄養塩など)を多量に含んでおり、その物質が原因で自己凝集することで粒形の大きい粒子が形成されていると考えられる。一般的なキートセラスの細胞の直径である3~9  $\mu\text{m}$ の範囲においては、その範囲に存在する粒子の割合はほぼ変わらないが、生細胞のスラリーの方がより小さい粒径の割合が大きい。ただし、9  $\mu\text{m}$ 以上では、乾燥粉末のスラリーの方が小さい粒子が多い。したがって、この粒径分布の結果のみでは、実験原水として乾燥粉末から調製したスラリーを使用する妥当性が判断できなかった。したがって、後述する生細胞を用いた凝集実験ではこの観点からの比較に関する考察も行った。

プレウロクリシス乾燥粉末を用いて調整したスラリーに含まれる粒子は、 $1\sim100\ \mu\text{m}$ であり、 $10\ \mu\text{m}$ 以下の粒子が約30%、 $50\ \mu\text{m}$ 以下の粒子が約90%を占めた。一般的なプレウロクリシスの細胞の直径は約 $10\ \mu\text{m}$ であるため<sup>6)</sup>、乾燥粉末のスラリーは、それに比較して、粒径の幅が非常に広くなっていることが分かる。Figure 2.1に示すようにプレウロクリシス乾燥粉末は培地と混合するだけでは粒子が分散しづらかったため、超音波を用いて調製した。その過程で、細胞が破壊され粒径が実際の細胞よりも小さくなる粒子と、強固に固まり超音波をあてても分散しない粒子の両方が存在することで、Figure 2.1のような粒径分布となつたと考えられる。また、乾燥粉末の製造時に加えられた力により、細胞が破壊、もしくは複数の細胞が強固に繋がった可能性も考えられる。

次に、ポリマー系凝集剤25種類の主成分、分子量、粘性は、各メーカーの記載情報を参照し、各凝集剤のカチオン度は、下水道試験法にて、それぞれ測定を行った。凝集剤の主成分は、一般的に使用されるアクリレート系とメタクリレート系を主骨格としたカチオン性と両性ポリマーを対象とし、アニオン性とノニオン性ポリマーも広く知られている凝集剤を対象とした。カチオン性と両性ポリマーのカチオン度は、約 $1\sim5\ \text{meq/g}$ の範囲であることを確認した。

- 3) Vander Wiel, J. B.; Mikulicz, J. D.; Boysen, M. R.; Hashemi, N.; Kalgren, P.; Nauman, L. M.; Baetzold, S. J.; Powell, G. G.; He, Q.; Hashemi, N. N. Characterization of Chlorella vulgaris and Chlorella protothecoides using multi-pixel photon counters in a 3D focusing optofluidic system. *Rsc Advances* 2017, 7 (8), 4402-4408. DOI: 10.1039/c6ra25837a.
- 4) OLENINA, I. Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea. 2006. <https://epic.awi.de/id/eprint/30141/1/bsep106.pdf>.
- 5) Li, S. X.; Hu, T. Y.; Xu, Y. Z.; Wang, J. Y.; Chu, R. Y.; Yin, Z. H.; Mo, F.; Zhu, L. D. A review on flocculation as an efficient method to harvest energy microalgae: Mechanisms, performances, influencing factors and perspectives. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 2020, 131. DOI: 10.1016/j.rser.2020.110005.
- 6) Walker, J.; Marzec, B.; Ozaki, N.; Clare, D.; Nudelman, F. Morphological development of *Pleurochrysis carterae* coccoliths examined by cryo-electron tomography. *JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY* 2020, 210 (1). DOI: 10.1016/j.jsb.2020.107476

#### 1. 4. 2. 2. 3. 複数種のポリマー凝集剤を用いた遠心分離実験(成果1, 2, 27, 28, 41)

複数種のポリマー凝集剤を用いた遠心分離実験により最適ポリマー系凝集剤群の選定のため、スクリーニング試験にて、その凝集効果および遠心分離（脱水）効果の有無を調査した。具体的には、25種類の高分子凝集剤を用いて、6種の微細藻類に対する回収効果（凝集率）をスクリーニング評価した。その結果、凝集剤の電荷特性（カチオン性、両性、アニオン性、ノニオン性）、カチオン度（ $\text{meq/g}$ ）、分子量などの物理化学的性質が、微細藻類の種類ごとに回収率へ大きな影響を与えることが明らかとなった。回収率50%以上の凝集効果を示したポリマーの数は、クロレラ（日本産）で15種、クロレラ（インドネシア産）で16種、ドナリエラで25種、キートセラスで17種、プレウロクリシスで15種、ユーグレナで22種にのぼった（Table 2.2）。特に、ドナリエラやユーグレナでは、全体の約9割にあたる凝集剤で高い回収率が認められた。これらの結果から、緑藻・珪藻・円石藻・ユーグレナといった表面構造の異なる藻類に対しても、カチオン度が $1\ \text{meq/g}$ 以上のカチオン性または両性ポリマーであれば、一定の凝集・脱水効果が得られることが確認された。

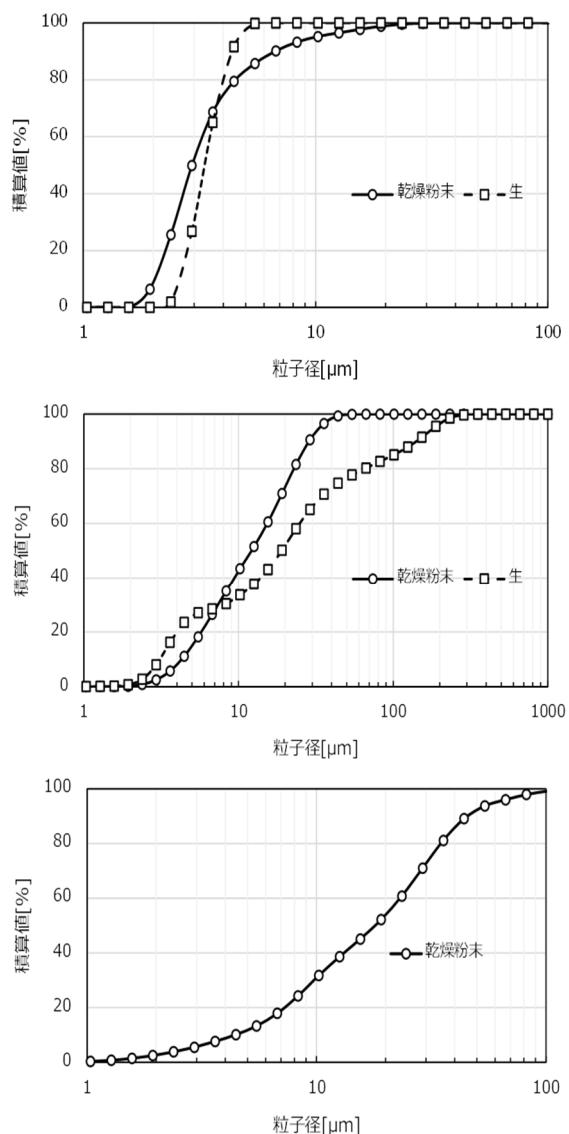


Figure 2.1 各微細藻類(上：クロレラ、中：キートセラス、下：プレウロクリシス)の粒径分布の分析結果

Table 2.2 ポリマー系凝集剤25種による各微細藻類への凝集効果のスクリーニング試験の結果

25種類の高分子凝集剤	極性	カチオン度(-)	分子量(万)	クロレラ(日本産)回収率(%)		(インドネシア産)回収率(%)		ドナリエラ回収率(%)		キートセラス回収率(%)		プレウロクリシス回収率(%)		ユーブレナ藻回収率(%)	
				緑藻		緑藻		珪藻		珪藻		円石藻		円石藻	
KP7000	カチオン	5.00	300	15	60	93	97	93	88	97	80	93	88	93	80
KP1205E	カチオン	4.09	300	84	64	94	95	94	75	95	47	94	75	95	47
KP201J	カチオン	3.86	100	49	54	94	95	94	57	95	45	94	57	95	45
KP201G	カチオン	3.81	300	88	70	94	95	94	73	95	50	94	73	95	50
C825L	カチオン	3.65	450	91	65	94	95	94	81	95	55	94	74	95	55
KP120BH	カチオン	3.27	700	93	84	95	95	95	84	95	59	95	64	95	59
C809	カチオン	3.19	900	92	81	97	97	97	91	91	74	97	84	91	74
KP1201BH	カチオン	2.95	500	89	71	97	92	97	92	92	59	97	44	92	59
C808LL	カチオン	2.93	200	94	75	96	91	96	83	91	50	96	45	91	50
KP204B	カチオン	2.68	500	92	91	97	97	97	85	91	55	97	71	91	55
KP206BH	カチオン	2.15	1000	92	95	98	98	98	82	92	57	98	83	92	57
KA003	両性	2.12	400	88	82	94	94	94	83	93	60	94	77	93	60
KP206B	カチオン	1.69	500	90	82	96	96	96	84	96	56	96	63	96	56
KP209H	カチオン	1.49	1400	94	33	94	94	94	88	94	50	94	51	94	50
C553	カチオン	1.36	450	93	85	97	97	97	90	90	67	97	68	97	67
KA305BH	両性	1.05	500	89	92	97	97	97	50	95	65	97	83	95	65
KA205	両性	0.97	500	75	69	96	96	96	72	96	65	96	74	96	65
キトサン低(pH調整なし)	アニオン	0.06	5-19	0	0	93	93	93	0	0	52	93	0	93	52
ポリYクルタミン酸ナトリウム	アニオン	0.04	100	0	0	90	90	90	0	0	50	91	0	91	50
キトサン高(pH調整なし)	アニオン	0.03	31-37.5	2	0	94	94	94	0	0	54	94	12	94	54
PVA13000	ノニオン	0.02	1.3-2.3	11	0	90	91	91	16	90	51	93	35	93	51
ポリアクリルアミド高	ノニオン	0.02	600	3	0	93	93	93	27	93	55	93	14	93	55
ポリアクリルアミド低	ノニオン	0.01	~5.5	4	0	93	93	93	0	0	61	94	22	94	61
ポリビニルビロドン高	ノニオン	0.00	~130	15	1	93	93	93	0	0	55	94	0	94	55

同じ緑藻系統であるクロレラ（日本産・インドネシア産）の比較では、約6割のポリマーで共通して75%以上の高い凝集率を示し、基本的に類似した凝集特性を持つことが示された。しかし一部の凝集剤においては、異なる凝集挙動が観察され、これは株ごとの細胞サイズや表面電位（ゼータ電位）の違いが影響していると考えられる。実際に、クロレラ（日本産）は比較的安定した回収性能を示す一方で、インドネシア産クロレラは凝集剤によって回収率のばらつきが大きく、個体差や培養条件の影響が伺える。ドナリエラはすべての凝集剤で高い回収率を示し、特に95%以上の値を示すものも多かった。この藻類は細胞壁を持たないため凝集剤との相互作用が起きやすく、さらに自身が沈降しやすい性質も相乗効果として作用したと考えられる。逆に、珪藻キートセラスはカチオン度の高いポリマーで強い凝集性を示す一方で、両性ポリマーでの回収率は低く、静電相互作用が回収の支配要因であることを示唆した。円石藻プレウロクリシスでは、一部のカチオン性ポリマーおよび両性ポリマーで高い凝集効果が見られたが、全体的には回収率が50%未満にとどまるケースも多く、他の藻類と比較してやや凝集しにくい傾向があった。これは、細胞壁表面に存在する炭酸カルシウムの外殻が凝集剤との相互作用を妨げている可能性がある。ユーグレナに関しては、22種の凝集剤で50%以上の回収が確認され、最も対応範囲が広い藻類であった。特筆すべきは、アニオン性やノニオン性ポリマーでも一定の回収効果が見られた点であり、これは他の藻類とは異なる挙動である。一般に、アニオン性・ノニオン性ポリマーは藻類表面との静電反発や疎水性の不足により凝集に不利とされるが、ユーグレナではKP1205E、KP201J、ポリイグルタミン酸ナトリウムを除くすべてのタイプのポリマーで凝集効果が認められた。この理由として、ユーグレナは他の藻類に比べて細胞サイズが大きく（10倍程度）、さらにζ電位の絶対値が小さい、つまり表面電荷が少ないことが挙げられる。これにより、ポリマーとの静電相互作用だけでなく、ユーグレナ自身の沈降速度や物理的な架橋効果による凝集が起きやすいと考えられる。

総じて、今回の試験結果は、微細藻類の種類によって最適な凝集剤が異なる一方で、高分子量かつカチオン度の高いカチオン性凝集剤が全般的に有効であることを示した。また、同一分類群内においても、微細藻類の表面組成の違いにより凝集挙動には顕著な差が見られた。これは、細胞表層の官能基の分布や電荷状態、細胞外多糖などの存在が凝集剤との相互作用に直接影響を及ぼすためである。したがって、凝集剤の選定にあたっては、株の由来や培養条件よりも、むしろ各微細藻類の系統に着目することが重要であると言える。なお、本検討は、あくまでも各種ポリマーの基礎的な凝集特性のスクリーニング評価を目的としており、個別藻類に対する最適化を行ったものではない。そのため、得られた結果は凝集剤の有効性を比較する上での指標として捉えるべきであり、緑藻・珪藻・円石藻に最適な凝集条件の検討は、後述する。

#### 1. 4. 2. 2. 4. 最適なポリマー系凝集剤の種類と凝集条件(成果1, 3, 4, 27, 33~35, 37)

25種類のポリマー系凝集剤を対象に、凝集剤添加率1~10%における緑藻クロレラへの凝集効果を評価した。既往文献を参考にし、急速攪拌と緩速攪拌の時間・強度の異なる条件 (A) 350 rpm 5分+80 rpm 10分+30分静置、(B) 80 rpm 10分+30分静置、(C) 350 rpm 5分+30分静置、(D) 123 rpm 5分+32 rpm 10分+30分静置にて実験を行った。実験原水は、固形物濃度0.1%、pH6で実施した。なお、条件Aは、微細藻類を対象とした既往研究<sup>7)</sup>に近い条件である。条件BとCは、条件Aの結果と比較し、急速攪拌や緩速攪拌の必要性を検討した。条件Dは、下水処理場における前凝集プロセスで一般的な条件値<sup>8)</sup>であり、攪拌にかかるエネルギーが削減可能かを検討した。これらの結果をTable 2.3に示す。

その結果、条件Aにおいて、25種類中17種類のポリマー系凝集剤で90%以上の凝集率が得られた。高い凝集率を示す共通点は、凝集剤添加率が2%以上であり、その添加率が多くなると、より高い回収率を比較的示す傾向にあった。これは、他の攪拌条件でも同様であった。

条件B~Dとの比較により、攪拌条件が凝集性能に与える影響を調査した。特に、条件B (80 rpm 10分) のみの緩速攪拌では、全体的に凝集率が低下し、凝集剤によっては凝集が不十分となる傾向が見られた。これは、凝集剤がクロレラ細胞表面に十分に接するためには、凝集剤を溶液全体に行き渡っていなかった為であると考えられる。一方で、条件C (350 rpm 5分) の急速攪拌のみでは、多くの凝集剤で比較的高い凝集率が得られた。加えて、条件Cでは、90%以上の凝集率を示す凝集剤が多数確認されており、十分な攪拌速度によって短時間で凝集が進行する点が評価できる。装置の簡素化や省エネルギー化を考慮した場合、条件Cは実用面でも十分に有効な運転条件であると考えられる。条件D (123 rpm 5分+31 rpm 10分) は、条件Aに比べて全体的に凝集率が若干低下した。十分な拡散や架橋効果が促進されていなかったことが示唆される。また、KP1202BHやKP206Bなど一部の凝集剤では、どの攪拌条件でも安定して高い凝集率が得られており、これらの凝集剤は分子柔軟性や粒子親和性が高く、広範な条件下で機能しうることが分かった。

総じて、凝集剤の特性に応じた攪拌条件の選定が重要であるが、実用性やエネルギー効率の観点からは、条件Cがシンプルかつ高い凝集効果を発揮できる有効な選択肢であると考えられる。

次に、本実験値を用いて統計解析を行い、各要因の影響度を評価した。目的変数をクロレラの回収率とし、吸光度法より算出した。説明変数として、ポリマー系凝集剤のカチオン度、分子量、添加率、攪拌条件の4つの指標を用いて数量化1類を行った。解析には統計解析ソフトウェアJMP®Pro16.2.0を使用した。解析結果として得られた予測式の各パラメーターと相關を示す（Table 2.4, Figure 2.2）。カチオン度、分子量、添加

率は、推定値が正で、いずれもp値が0.0001未満であったことから、凝集効果の主要因子であることが確認された。従って、それぞれ値が高いほど回収率が高くなると示唆された。つまり、カチオンによる荷電中和効果や高分子鎖による架橋効果が重要であることが示唆された。

Table 2.3 クロレラの凝集率が90%以上との値を示したポリマー系凝集剤

25種類の高分子凝集剤	350rpm 5min, 80rpm 10min					80rpm 10min					350rpm 5min					1230rpm 5min, 310rpm 10min								
	1%	2%	3%	4%	5%	10%	1%	2%	3%	4%	5%	10%	1%	2%	3%	4%	5%	10%	1%	2%	3%	4%	5%	10%
KP7000	40	32	41	93	96	90	38	38	42	95	96	77	30	31	30	62	82	89	26	34	42	95	98	79
KP1205E	65	82	93	95	96	97	49	57	75	81	87	90	71	82	93	96	97	98	61	74	84	87	89	92
KP201J	52	49	68	76	88	94	40	60	67	74	80	87	52	58	81	89	90	94	49	59	73	79	87	90
KP201G	52	62	78	87	92	94	54	62	70	78	81	92	70	82	91	96	98	98	62	78	85	89	91	96
C825L	75	89	97	97	97	97	70	95	94	93	92	94	74	88	96	97	97	97	75	93	95	94	94	95
KP1202BH	69	87	96	98	99	98	96	98	98	99	97	95	71	92	94	95	98	96	99	99	99	98	99	95
C809	47	65	80	90	98	97	70	89	98	99	100	100	40	64	78	90	98	97	58	80	91	97	99	99
KP1201BH	73	86	94	96	95	98	68	81	89	89	89	89	77	92	97	97	97	97	73	87	94	92	92	91
C808LL	68	91	96	96	97	98	69	86	91	90	92	92	75	92	95	96	98	97	71	89	94	93	93	93
KP204B	72	83	93	96	97	99	73	92	87	86	91	93	73	93	94	97	97	98	68	86	94	92	93	96
KP206BH	80	89	96	97	97	98	69	85	94	96	97	99	68	83	91	97	98	98	68	85	95	96	97	99
KA003	45	61	77	87	95	98	59	75	85	89	90	88	54	63	79	89	94	98	61	77	85	91	92	91
KP206B	79	92	95	95	96	97	76	93	91	90	90	89	79	97	97	98	98	97	71	96	93	93	96	96
KP209H	65	90	95	89	80	63	70	86	88	89	90	94	77	78	74	74	69	58	65	85	93	94	92	95
C553	59	68	81	93	99	98	64	81	86	97	98	99	65	72	82	93	97	97	40	65	84	94	98	98
KA305BH	80	92	93	96	99	95	65	79	86	89	93	96	62	71	83	90	96	98	59	70	79	87	89	95
KA205	52	65	74	80	87	99	50	66	75	80	86	97	55	65	73	81	87	99	54	62	70	77	80	97
キトサン低(pH調整なし)	47	47	46	44	45	48	50	48	54	56	39	38	49	44	44	51	51	51	50	51	53	40	42	46
ポリグリタミン酸ナトリウム	48	48	39	35	39	38	39	34	33	39	43	42	40	48	47	33	45	45	43	43	35	37	39	39
キトサン高(pH調整なし)	40	32	42	38	39	45	46	43	46	53	50	40	52	41	37	44	47	35	43	40	45	53	45	39
PVA13000	58	47	57	53	50	44	24	28	39	31	32	33	42	43	47	41	45	44	43	40	40	53	47	46
ポリアクリルアミド高	39	42	41	40	43	44	42	38	43	34	44	52	47	37	43	41	54	45	42	42	44	45	52	52
ポリビニルビロドン低	32	34	37	64	64	68	34	36	43	26	29	39	50	53	45	53	40	40	31	43	50	53	40	54
ポリアクリルアミド低	13	22	13	42	59	47	44	34	39	37	48	46	45	49	57	54	47	53	53	26	23	37	44	44
ポリビニルビロドン高	47	40	43	51	53	43	48	54	46	51	47	50	50	46	46	50	50	53	49	52	49	53	44	44

Table 2.4 予測式のパラメータ一値

	推定値	標準誤差	t値	p値	R <sup>2</sup> 値	p値
切片	38.66	1.452	26.62	<0.0001		
カチオン度	6.88	0.421	16.33	<0.0001		
分子量	0.0282	0.002	14.34	<0.0001		
攪拌[350-80]	0.2335	1.101	0.21	0.8322	0.54	<0.0001
攪拌[350]	0.876	1.101	0.8	0.4267		
攪拌[80]	-1.432	1.101	-1.3	0.194		
攪拌[123-31]	0.323	1.101	0.29	0.7697		
凝集剤添加率	2.02	0.218	9.27	<0.0001		

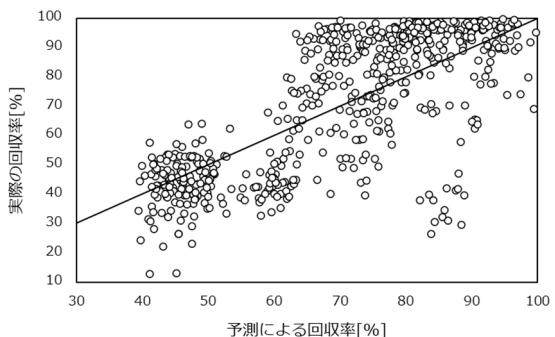


Figure 2.2 重回帰分析の結果

次に、4種類の攪拌条件ごとにデータを分割し、ポリマー系凝集剤のカチオン度、分子量、添加率の3つの指標を説明変数とし、重回帰分析を行った。4条件(A~D)における回収率の予測式と、回収率の予測値と実測値の相関を示す(Figure 2.3)。また、4つの予測式における各説明変数の対数値を示す(Table 2.5)。

条件A~Dの結果により、各説明変数が凝集率に与える影響の大きさが異なることが明らかになった。今回用いた説明変数の中で、最も攪拌条件の違いによる影響を受けたのは分子量であった。分子量の回収率への寄与は、B>D>A>Cの順に大きく、条件BとCでは約1.8倍異なった。また、カチオン度の係数は、C>A>D>Bの順に大きかったが、その差は分子量ほど大きくなかった。カチオン度と分子量の対数値(Table 2.5)を比較すると、条件A、C、Dはカチオン度の方が大きく、条件Bのみ分子量の方が大きかった。また、カチオン度と分子量の値の差は、C>A>Dの順番に大きかった。従って、分子量は攪拌速度が遅いほど回収率に影響する一方で、カチオン度は攪拌条件に比較的左右されないが、攪拌速度が速いと影響が大きくなること明らかになった。以上より、効率的な凝集には、使用する凝集剤の特性に応じた攪拌条件を設定する必要があると示唆される。

いずれの条件における予測式でも、決定係数R<sup>2</sup>は低い値にとどまるため、本研究で評価した凝集剤のカチオン度、分子量、添加率、攪拌条件以外に、クロレラの凝集効率の評価に必要な要素が存在することが示唆された。そのような要素として、原水のpH、水温等の影響が考えられる。

Table 2.5 各説明変数の対数値

	A) 350-80	B)80	C)350	D)123-31
カチオン度	11.98	13.49	12.51	13.83
分子量	8.84	16.89	5.41	12.81
凝集剤添加率	5.86	4.99	4.35	5.34

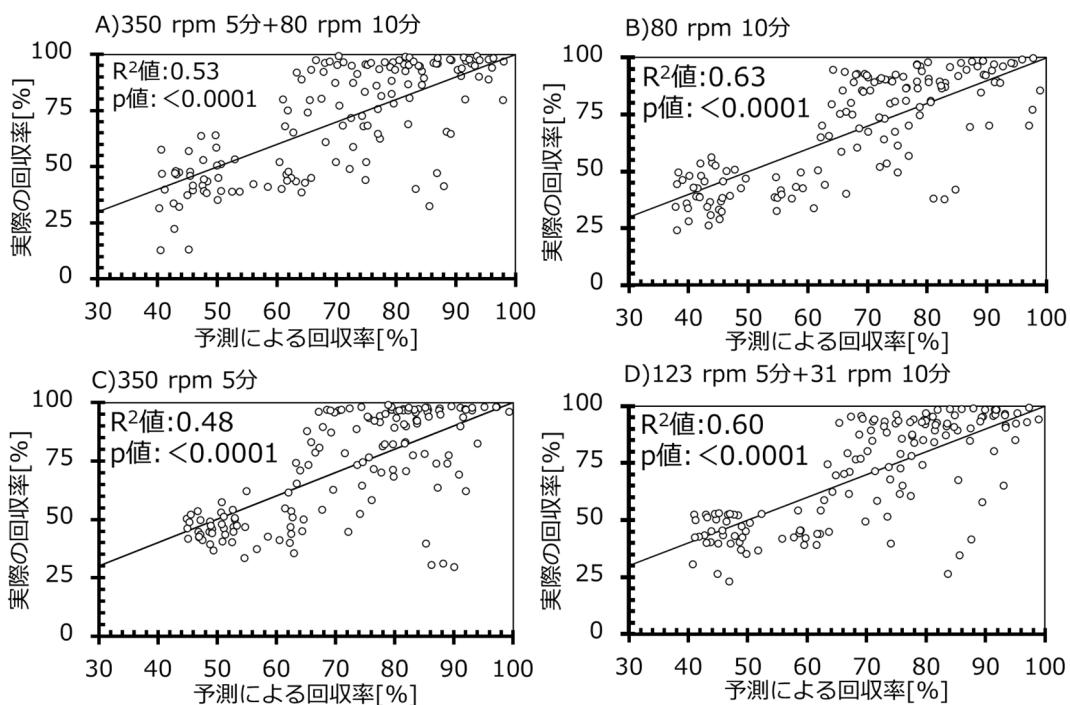


Figure 2.3 各攪拌条件における回収率の予測値と実測値の相関

- 7) Noh, W.; Kim, J.; Lee, S. J.; Ryu, B. G.; Kang, C. M. Harvesting and contamination control of microalgae Chlorella ellipsoidea using the biopolymeric flocculant alpha poly L lysine. *Bioresource Technology* 2018, 249, 206–211. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.157.
- 8) 高岡昌輝; 松本暁洋; 大下和徹; 武田信生; 永原茂. 前凝集プロセスが下水汚泥処理に与える影響. 環境工学研究論文集 1998, 35, 171–180. DOI: 10.11532/proes1992.35.171.

#### 1. 4. 2. 2. 5. 凝集メカニズムの解明(成果1~4, 27, 28, 32~35, 37)

本項で使用した5種類の凝集剤 (KP1202BH、KP206B、KP206BH、C510、C502) は、カチオン度（弱カチオン、中カチオン、強カチオン）や分子量（500万、700万、1000万Da）が凝集効果に及ぼす影響を評価できるように選定した。凝集実験では、凝集剤の種類、凝集剤添加率、攪拌速度、攪拌時間を変数とした。各実験の結果を以下に示す。

##### (1) 攪拌速度

Figure 2.4に攪拌速度を変化させた凝集実験の結果を示す。以下では、まず3種の微細藻類に共通する傾向について考察し、次に各微細藻類における傾向を個別に論じる。そして最後に、高分子凝集剤による微細藻類の凝集における主要な作用である架橋効果と荷電中和効果について、それぞれに注目して考察を行う。

##### (i) 共通する傾向

一般に、凝集剤の添加量が過剰な場合、粒子表面の負電荷が中和されたうえで、逆に正に帯電することで、粒子間の反発力が強まり、その結果、回収率が低下する現象が生じることが報告されている<sup>9), 10)</sup>。しかし、本研究では凝集剤添加率の上昇に伴う明らかな回収率の低下は、いずれの藻類でも確認されなかった。Fabio Roselet et al. がクロレラを対象にアクリルアミド系の複数の合成ポリマー系凝集剤を用いて実施した実験では、最適な凝集剤添加率が0.64%~5%であり、添加率が17.3%に達すると過剰投与による回収率の低下がみられたと報告されている<sup>9)</sup>。したがって、本研究の添加率の範囲内で、高い添加率でも回収率の低下がみられなかつたことは妥当であると考えられる。

##### (ii) 各微細藻類の傾向

緑藻クロレラは、添加率が3%以上、攪拌速度が80 rpm以上の条件で、回収率は概ね90%以上を示した。一方、40 rpmの攪拌では、全ての凝集剤で回収率が低下した。この現象については(iii)で詳しく考察する。添加率が2%以下の条件では、回収率は他の微細藻類と比較して低く、1%では80%を下回る結果が多かったが、攪拌速度による変動は小さかった。クロレラスラリーは3種の微細藻類の中で最も粒径が小さいため、比較的凝集しにくいと考えられる。

キートセラスは凝集剤添加率が3%以上の条件では、攪拌速度によらず、回収率は多くの場合で90%以上を示した。添加率が3%以上の範囲で、凝集剤と添加率が同じ条件における結果を比較すると、攪拌速度による回収率の変動幅は最大で13.2% (C502、添加率3%、350 rpmと160 rpm) であった。一方、この条件以外では、概ね回収率5%以内の変動であった。凝集剤の添加量が多いため、微細藻類細胞と凝集剤の接触頻度が変化しても十分凝集できる量の凝集剤が存在していること、また、攪拌速度が大きな条件でも破壊されない強固なフロックが形成されていることが原因であると考えられる。一方、凝集剤添加率が小さい条件では、他の微細藻類と比較して攪拌速度による回収率の差が顕著であった。特に、添加率1%の場合、350 rpmでの回収率が低く、C502 では40 rpmでの結果と比較して回収率が26.4%低下していた。この原因として、前述の通り、添加率が低い条件では凝集剤の存在量が少なくフロック強度が比較的弱いため、速い攪拌ではフロックが破壊され、回収率が低下したと考えられる。

プレウロクリシスは、添加率1%の場合、キートセラスと同様に攪拌速度による回収率の変動が大きく、最大で14.7%の差があった(KP1202BH、160 rpmと40 rpm)。ただし、添加率が5%の条件においても、攪拌速度による回収率の違いが顕著に現れた。KP206Bを用いた場合、350 rpmでは回収率は97.7%であったが、40 rpmでは77.4%であり、20.3%低下していた。凝集剤添加によるスラリーの粘性増加や、必要量以上のカチオンが存在することによる電荷バランスの変化などが影響している可能性があるが、本研究のデータのみでは、明確な因果関係を判断することは困難であった。

##### (iii) 2つの凝集作用

まず、架橋効果に着目して考察する。本節で使用した凝集剤の中で、最も分子量が大きいKP206BH(分子量: 1000万Da)は、クロレラおよびキートセラスに対して、添加率が3%以下の場合、攪拌速度が80 rpmまたは160 rpmで高い回収率を示す傾向が見られた。一方、分子量が最も小さいKP206B(分子量: 500万Da)は、350 rpmの攪拌速度で高い回収率を示す傾向が確認された。ただし、これらの傾向はプレウロクリシスにおいては確認されなかった。Wei Ma et al. の研究<sup>11)</sup>では、無機系凝集剤を使用した場合、攪拌速度が300 rpmで最大の回収率が得られた。しかし、それ以上の攪拌速度では、強い剪断力によってフロックが破壊され、凝集した細胞が再分散するため、回収率が低下することが報告されている。有機系ポリマー系凝集剤による凝集では、荷電中和効果に加え、高分子鎖が微細藻類の細胞間を架橋することで凝集を促進する効果がある。一般的に、

この効果は凝集剤の分子量が高いほど顕著になるとされる<sup>12)</sup>。しかし、過度の攪拌が加わると、ポリマーの脱離が生じやすく、細胞間の架橋が困難になるため、凝集した細胞が再分散するとされている<sup>13)</sup>。したがって、分子量が大きいKP206BHは小さいKP206Bと比較して架橋効果の寄与が大きいと考えられ、攪拌速度が大きすぎると架橋効果が小さくなるため、80 rpmまたは160 rpmの比較的遅い攪拌速度で高い回収率が得られていると考えられる。

次に、荷電中和効果に着目して考察するクロレラとプレウロクリシスは、すべての凝集剤において40 rpmで回収率が低かった。特に、クロレラは、カチオン度が最も高いKP1202BHを用いた場合に低かった。攪拌が不十分な場合、凝集剤が均一に分散せず、一部にカチオンが偏ることで、負電荷が十分に中和されない微細藻類細胞が多く存在することが原因であると考えられる<sup>11)</sup>。また、今回使用した凝集剤の中で最もカチオン度が高いKP1202BHは、荷電中和効果の寄与が大きく、凝集剤と微細藻類細胞が接触する回数が多いほど凝集が促進されやすいことも要因として考えられる。

これらの結果の差異から、キートセラスはクロレラやプレウロクリシスと比較して、凝集に対する架橋効果の寄与が大きい可能性が示唆される。しかしながら、その原因を特定するには本実験では不十分であり、

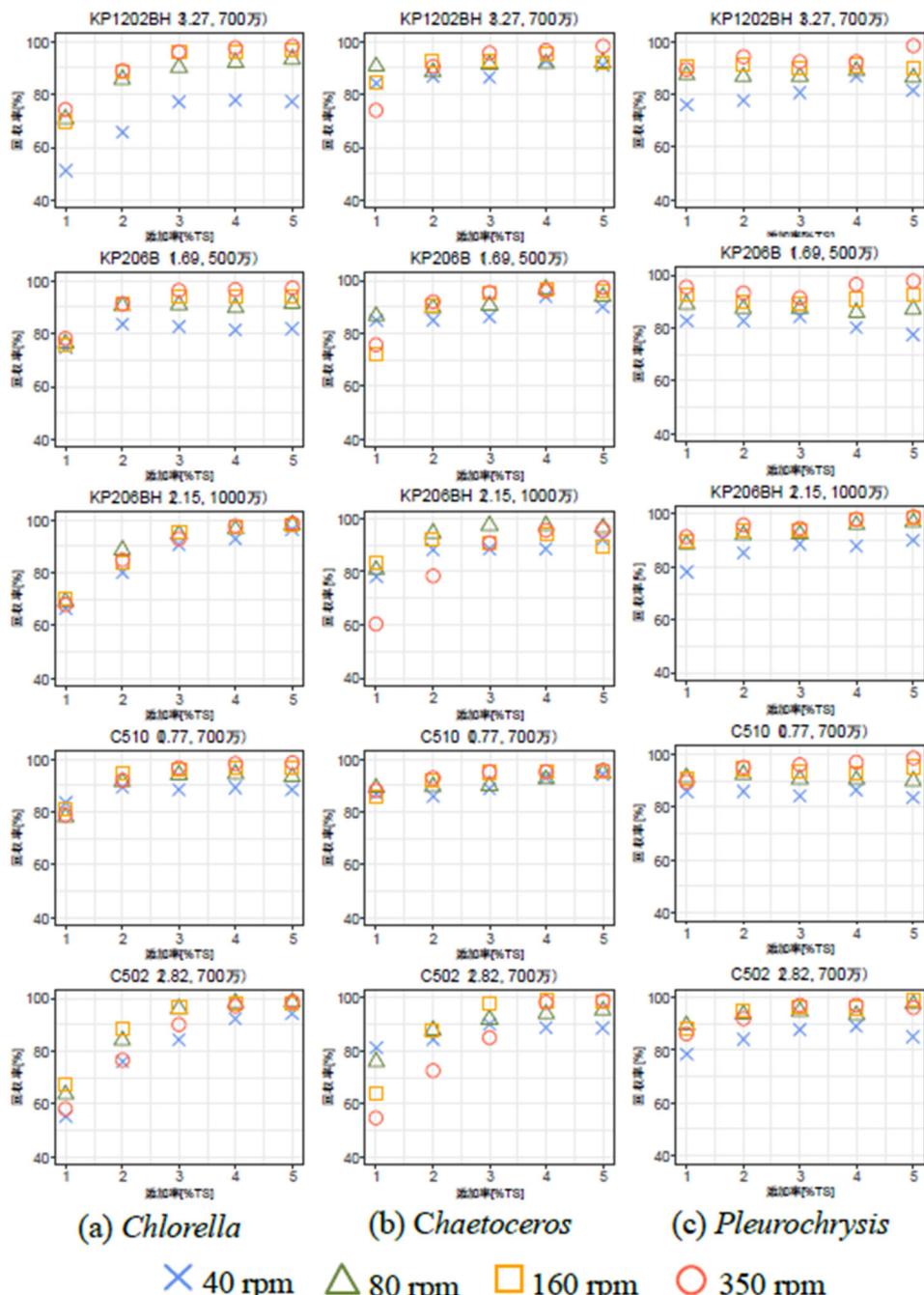


Figure 2.4 凝集実験結果（攪拌速度）

グラフ上部：凝集剤型番(カチオン度[meq/g], 分子量[Da])

カチオン度を一定に保ちながら分子量が異なる複数の凝集剤を用いた凝集実験等、架橋効果と荷電中和効果の影響を独立して評価できる検討が必要である。

## (2) 搅拌時間

Figure 2.5に搅拌時間を変化させた凝集実験の結果を示す。

クロレラとプレウロクリシスは、搅拌時間の違いによる回収率の変動はあまり見られなかった。凝集剤と添加率が同じ条件で最大でも、クロレラは6.4%(KP206B, 350 rpm, 0.5 minと5 min, 添加率1%)プレウロクリシスは5.7%(KP206B, 350 rpm, 0.5 minと5 min, 添加率1%)であった。搅拌時間が長いほど比較的高い回収率が得られる傾向があり、多くの場合、搅拌時間が5分で最大の回収率が得られた。搅拌時間が短い場合は、凝集剤と微細藻類細胞の接触機会が少なく、十分なフロックが形成されないため凝集効率が低くなると考えられる<sup>11), 14)</sup>。

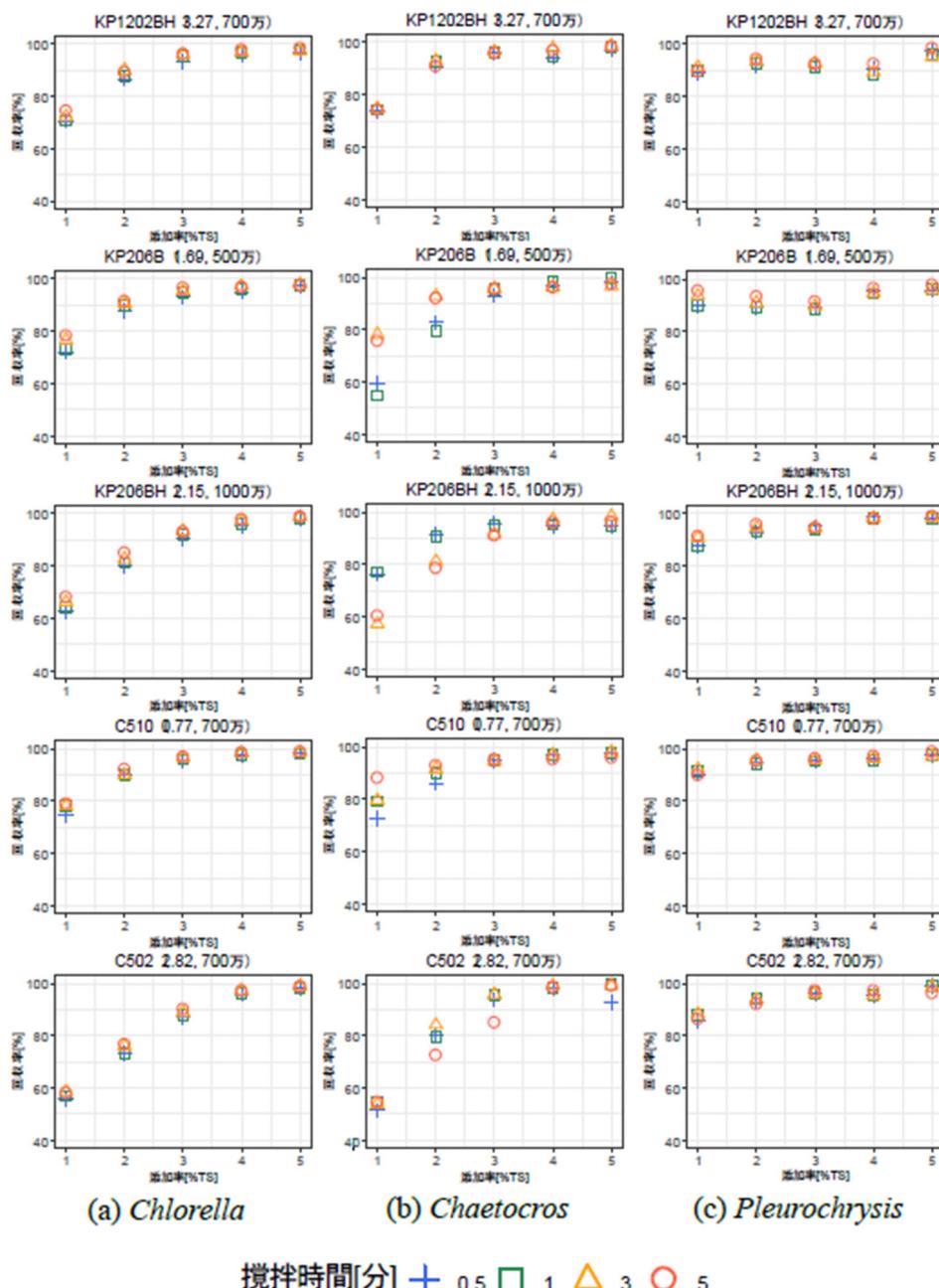


Figure 2.5 凝集実験結果（攪拌時間）  
グラフ上部：凝集剤型番(カチオン度[meq/g], 分子量[Da])

キートセラスは、凝集剤と添加率が同じ条件で、最大23.1% (KP206B, 350 rpm, 1 minと3 min, 添加率1%) の変動があった。2%以下の添加率で攪拌時間による回収率の変動がみられ、高い添加率の場合はその変動は小さかった。Mu et al. がクロレラを対象に実施した研究でも、凝集剤の添加率が高いと攪拌時間による回収率への影響が小さくなることが確認されている<sup>10)</sup>。攪拌時間が3 min以下の比較的短い条件で高い回収率を示す場合が多く、特に凝集剤 KP206BHではその傾向が顕著であった。KP206BHは、本研究で使用した凝集剤の中で最も分子量が大きく、架橋効果が最も強く働くと推測される。(2)の結果では、速い攪拌速度で回収率が低下しており、攪拌の強度が強すぎると架橋効果は弱くなると考えられる。クロレラやプレウロクリシスを対象にした場合は、KP206BHを用いても同様の傾向は得られなかった。このことから、(2)でも述べたように、キートセラスはクロレラやプレウロクリシスよりも凝集に対する架橋効果の寄与が大きいと推察される。

以上の結果をまとめると、クロレラ・キートセラス・プレウロクリシスの凝集効果は、凝集剤添加率1%の場合でも、攪拌速度や攪拌時間、凝集剤の違いによって、それぞれ39~81、52~91、63~93%の範囲を示した (Figure 2.6)。このことから、凝集剤添加率が少ない条件でも、高い凝集効果を得ることが出来ることが明らかになった。さらに、それぞれの微細藻類への凝集剤添加率を増加させると、どの微細藻類にもその凝集効果は大きくなつた。なお、どの微細藻類においても、数値目標であった微細藻類の98%以上の回収率を示すことができた。

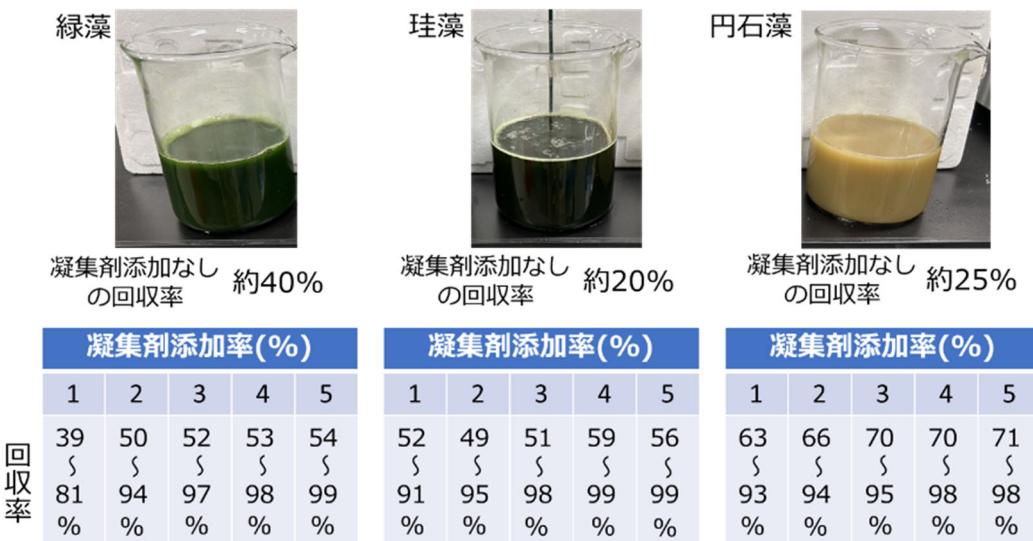


Figure 2.6 各微細藻類の凝集実験結果（まとめ）

次に、各微細藻類への凝集の主要因子を調べるために、統計解析を実施した。本データでは、各微細藻類:175データを対象とし、現場でも使用されるようなカチオン度および分子量の凝集剤5種を対象とした。その結果をFigure 2.7に示す。緑藻の主要因子は、凝集剤添加率、カチオン度、攪拌速度、攪拌時間、分子量の順で凝集効果への影響が大きかった。珪藻の主要因子は、凝集剤添加率、分子量、カチオン度、攪拌時間、攪拌速度の順で凝集効果への影響が大きかった。円石藻の主要因子は、攪拌速度、凝集剤添加率、分子量、攪拌時間、カチオン度の順で凝集効果への影響が大きかった。このことから、微細藻類ごとに、凝集因子の重要度が異なることが明らかになり、微細藻類の表面組成や沈降性の違いによる影響が示唆された。

続けて、本技術を現場に適応させた際に、凝集剤添加率の減量化に対する要望があることを想定し、どの微細藻類門に対して、どのような凝集剤を選定すべきか調査を行つた。なお、本対象の微細藻類は、細胞壁を持っており、FT-IRにて、緑藻クロレラはセルロース、珪藻キートセラスはケイ酸、円石藻プレウロクリシスは炭酸カルシウムのピークが強く検出され、それぞれの藻類門の代表的な化学組成を含むことを確認した。

緑藻、珪藻、円石藻に対する凝集剤の凝集性能を比較した結果、それぞれの藻類において高い回収率を示す凝集剤

要因	対数値	P値	順位
凝集剤添加率	39.016	<0.00000	1
カチオン度	4.094	0.00008	2
分子量	0.084	0.8246	5
攪拌速度	3.706	0.0002	3
攪拌時間	1.659	0.02191	4

要因	対数値	P値	順位
凝集剤添加率	27.615	<0.00000	1
カチオン度	0.929	0.11782	3
分子量	1.061	0.08695	2
攪拌速度	0.115	0.76746	5
攪拌時間	0.239	0.57651	4

要因	対数値	P値	順位
凝集剤添加率	12.448	<0.00000	2
カチオン度	2.365	0.00431	5
分子量	4.948	0.00001	3
攪拌速度	20.871	<0.00000	1
攪拌時間	2.279	0.00166	4

Figure 2.7 統計解析により得られた、各微細藻類の凝集の重要因子（まとめ）

には共通した特性が認められた (Figure 2.8)。具体的には、緑藻に対しては弱～中程度のカチオン性を有し、分子量が700万～1000万Daの凝集剤が有効であった。珪藻においては中～高カチオン性かつ同様の分子量範囲の凝集剤が高い回収率を示し、円石藻では中程度のカチオン性および700万～1000万Daの分子量を有する凝集剤が効果的であった。このような傾向は、各藻類の細胞表面構造および化学組成の違いに起因しており、それが表面のゼータ電位に影響を与え、カチオン性ポリマーによる荷電中和を促進したと考えられる。特に、緑藻クロレラの細胞壁に多く含まれるセルロースや、珪藻キートセラスの構造成分であるケイ酸は、水中で負に帯電しやすい性質を持つ。このため、適度なカチオン性および適切な分子量を持つ凝集剤と反応しやすく、荷電中和による凝集が促進されたと推察される。一方、円石藻プレウロクリシスにおいては、細胞表面に存在する炭酸カルシウムが凝集特性に大きく影響する。炭酸カルシウムは結晶構造によって表面の電荷特性が異なるため、荷電中和の効果が他の藻類と比べて一定ではない可能性がある。このため、今後は異なる種の円石藻を対象とした詳細な検討が必要であると考えられる。

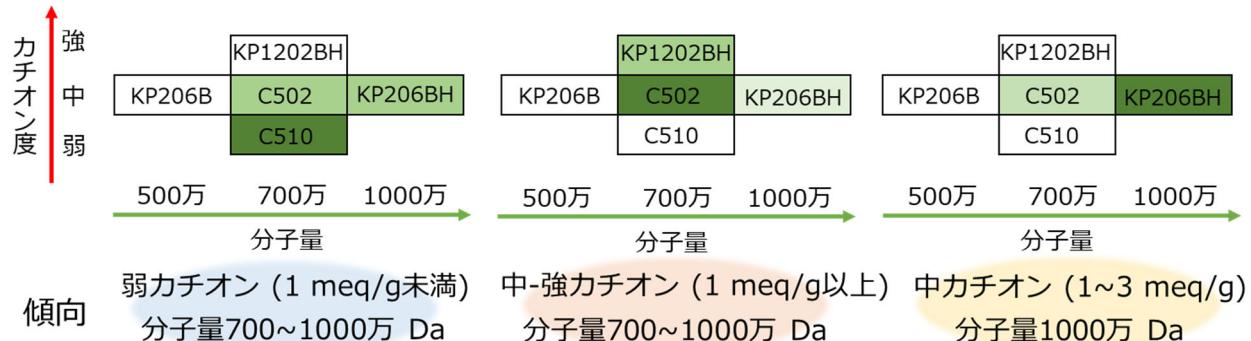


Figure 2.8 各微細藻類の回収に適切な凝集剤の条件（まとめ）

- 9) Roselet, F.; Vandamme, D.; Roselet, M.; Muylaert, K.; Abreu, P. C. Screening of commercial natural and synthetic cationic polymers for flocculation of freshwater and marine microalgae and effects of molecular weight and charge density. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 2015, 10, 183- 188. DOI: 10.1016/j.algal.2015.05.008.
- 10) Mu, R. M.; Zhao, Y. L.; Bu, Q. W.; Wang, M. X.; Liu, D. The effects of three different flocculants on the harvest of microalgae Chlorella vulgaris. In 4th International Conference on Water Resource and Environment (WRE) , I Shou Univ, Kaohsiung, TAIWAN, Jul 17-21, 2018; 2018; Vol.191. DOI: 10.1088/1755-1315/191/1/012042.
- 11) Ma, W.; Feng, C. C.; Guan, F. C.; Ma, D. R.; Cai, J. L. Effective Chlorella vulgaris Biomass Harvesting through Sulfate and Chloride Flocculants. *Journal of Marine Science and Engineering* 2023, 11 (1). DOI: 10.3390/jmse11010047.
- 12) Grima, E. M.; Belarbi, E. H.; Fernandez, F. G. A.; Medina, A. R.; Chisti, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* 2003, 20 (7-8), 491-515.
- 13) 大佐々邦久; 三分一政男; 中倉英雄. 高分子凝集剤を用いた凝集操作における最適攪拌条件. 化学工学論文集 1985, 11 (5). DOI: <https://doi.org/10.1252/kakoronbunshu.11.589>.
- 14) Singh, G.; Patidar, S. K. Water quality restoration by harvesting mixed culture microalgae using Moringa oleifera. *Water Environment Research* 2020, 92 (9), 1268-1282. DOI: 10.1002/wer.1322.

#### 1. 4. 2. 2. 6. 自重濃縮と遠心脱水試験(研究成果4, 35)

凝集した微細藻類スラリーから凝集体を回収するために、KUBOTA製BPテスターを用い、自重式濃縮を実施した。次に、自重濃縮試験により回収された凝集体を、遠心分離機（コクサン製：卓上遠心機H-36）で遠心脱水した。凝集剤添加率を5%、攪拌条件を350 rpm 5 minに統一し、凝集体を作成及び回収した。得られた凝集体をポリエステル製のマイクロメッシュ（通過粒径10 μm）に包み、脱水セルに設置後、3分間の遠心分離を行い、遠心強度100～2,100 Gの4段階に変化させた。含水率の変化をFigure 2.9に示す。また、自重濃縮後と遠心脱水後の凝集体をFigure 2.10に示す。

クロレラは、重力濃縮後の含水率は82%、遠心分離後の含水率は、100、700、1400、2100 Gで3分間の条件下において、それぞれ72、66、65、63%の値を示した。プレウロクリシスは、重力濃縮後の含水率は83%、遠心分離後の含水率は、100、700、1400、2100 Gの条件下において、74、67、63、60%であった。クロレラと同様の傾向を示している。キートセラスは、重力濃縮後の含水率は92%、遠心分離後の含水率は、100、700、1400、2100 Gの条件下において、85、79、76、72%の値を示した。これらの結果から、100Gおよび700Gの条件下では、遠心強度の上昇に伴い含水率は減少するが、1400 Gより強い遠心強度では、含水率の減少幅が小さくなり、効率的な脱水は望めないことが明らかになった。Yousef et al.<sup>15)</sup>によると、遠心分離を用いた微細藻類の脱水に関する先行研究では、最終的なスラリーの濃度は0.4～25%程度であり、本研究における遠心脱水後の含水率は比較的良好な結果であるといえる。

クロレラの細胞壁は主にセルロースで構成されているため<sup>16), 17)</sup>、クロレラスラリーと同様に、セルロースを含む有機物粒子と水の混合物である、汚泥の水分の存在形態について述べる。汚泥中の水分は、自由水、間隙水、表面付着水、内部水の4つの形態で存在している<sup>18)</sup>。自由水は、粒子に付着せず、重力沈降等により分離可能である。間隙水は汚泥粒子が接触した内部に閉じ込められた水分であり、機械的な力で除去できる。表面水は、汚泥粒子表面に吸着もしくは吸着している水分である。内部水は微生物細胞膜内水分であり、除去には細胞膜の破壊や分解が必要であり、機械的な脱水はできないと考えられている。例えば、含水率が95%の汚

泥を例とすると、自由水を除いた残りは、間隙水が70%、表面付着水が22%、内部水が8%となる。各処理操作で除去した後の含水率の限界は、沈降濃縮で85%、機械脱水で60%、加熱で2%とされている<sup>19)</sup>。従って、汚泥とクロレラスラリーにおける水の存在形態が類似していると仮定すると、本実験における重力濃縮後の含水率82%や、遠心分離での限界が含水率63%程度である結果と一致する。つまり、凝集体の構造上、自重濃縮や遠心分離などの機械的脱水操作による含水率の低減には限界があり、本研究の条件では、遠心力700 Gを超えて設定しても結果はほぼ変化しないと考えられる。

キートセラスは、他の藻類と比較して、全ての遠心強度で含水率が約10%高い。キートセラスの外殻は、アモルファスシリカと少量の金属元素(Al, Mg, Fe, Tiなど)から構成されており、多孔質構造を取るため表面積が極めて大きい<sup>17), 20)</sup>。そのため、細胞表面上に多数のシラノール基(Si-OH)が存在し、水素結合により水分子を吸着しやすいことが、凝集及び遠心脱水後の含水率が高くなっている原因と考えられる<sup>21)</sup>。加えて、アモルファスシリカは不規則な分子配列を取るため、結晶構造中に物理的に水分子を取り込む空隙が存在する点も含水率の高さに寄与していると考えられる。

続いて、凝集・濃縮・脱水の一連のプロセスにおける体積変化について考察する。濃縮までで、凝集前と比較して、クロレラは約180分の1、キートセラスは約77分の1、プレウロクリシスは約170分の1まで体積が減少した。また、700 G以上の遠心脱水により、クロレラとプレウロクリシスはさらに約2分の1、キートセラスはさらに約3分の1に減容した。

- 15) Najjar, Y.; Abu-Shamleh, A. Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: A review. *ALGAL RESEARCH-BIOMASS BIOFUELS AND BIOPRODUCTS* 2020, 51. DOI: 10.1016/j.algal.2020.102046.
- 16) Domozych, D. S.; Ciancia, M.; Fangel, J. U.; Mikkelsen, M. D.; Ulvskov, P.; Willats, W. G. T. The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity. *Frontiers in Plant Science* 2012, 3. DOI: 10.3389/fpls.2012.00082.
- 17) Huo, S. H.; Wang, Z. M.; Zhu, S. N.; Cui, F. J.; Zou, B.; Wang, F.; Yuan, Z. H.; Dong, R. J.; Zhao, P. X. Process Analysis of Alkaline Flocculation Harvesting for *Chaetoceros muelleri* and *Scenedesmus quadricauda*. *Bioenergy Research* 2016, 9 (2), 682-690. DOI: 10.1007/s12155-015-9712-0.
- 18) Chen, G. H.; Yue, P. L.; Mujumdar, A. S. Sludge dewatering and drying. *Drying Technology* 2002, 20 (4-5), 883-916. DOI: 10.1081/drt-120003768.
- 19) 神村正樹. 汚泥の濃縮・脱水における凝集剤の効果. *環境技術* 1973, 2 (12), 919-927. DOI: 10.5956/jriet.2.919.
- 20) Mazumder, N.; Gogoi, A.; Kalita, R. D.; Ahmed, G. A.; Buragohain, A. K.; Choudhury, A. Luminescence studies of fresh water diatom frustules. *Indian Journal of Physics* 2010, 84 (6), 665-669. DOI: 10.1007/s12648-010-0068-1.
- 21) Zhuravlev, L. T. SURFACE CHARACTERIZATION OF AMORPHOUS SILICA - A REVIEW OF WORK FROM THE FORMER USSR. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 1993, 74 (1), 71-90. DOI: 10.1016/0927-7757(93)80399-y.

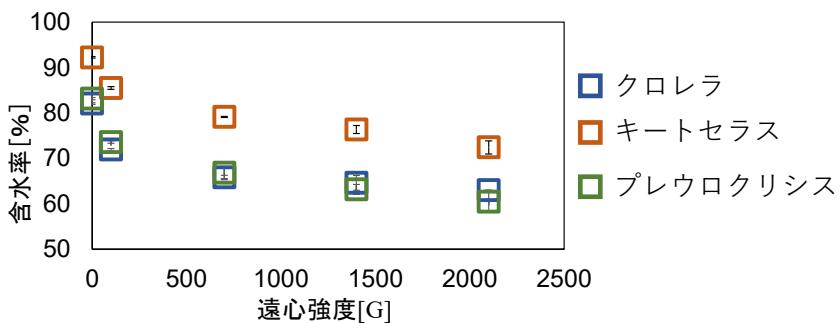


Figure 2.9 自重濃縮と遠心脱水による含水率推移

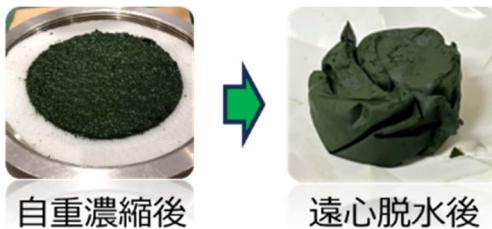


Figure 2.10 自重濃縮と遠心脱水後の凝集体

#### 1. 4. 2. 2. 7. ライフサイクルエネルギー・温室効果ガス排出量の評価(研究成果36, 42)

凝集剤メーカーへのヒアリング調査の結果、高分子凝集剤を用いた残渣の有効利用において、堆肥利用は有効であるものの、飼料や食糧利用は、安全対策や衛生法に対するコストから現実的な運用は難しいことが指摘された。そこで本研究では、得られた物質収支のデータ（凝集剤添加5%）をもとに、実機でクロレラスラリーのDME抽出を行った際のエネルギー消費量とGHG排出量を、Case0：培養→遠心脱水→DME処理→残渣の飼料化、Case 1：培養→濃縮→DME処理→残渣の堆肥化、Case 2：培養→濃縮→遠心脱水→DME処理→残渣の堆肥化として、3つのケースに分けて計算した。

Figure 2.11に3つのケースの概要、Figure 2.12に緑藻クロレラを例とした培養からDME抽出までの物質収支を示した。残渣の堆肥化については、化学肥料の窒素分を代替するとして、文献を参考に代替量を計算した<sup>22), 23)</sup>。残渣の飼料化については、抽出残渣中のたんぱく質含有量を含水率や抽出率等の実験値と文献を利用して求め、それと同等の大豆を代替すると仮定して計算した<sup>24)~26)</sup>。規模は、既往研究<sup>27)</sup>を参考に、Open Raceway Pondにて培養された微細藻類スラリーを1日で120 t処理することを想定した。結果をFigure 2.13に示す。

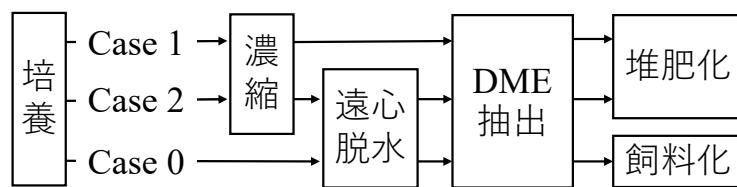


Figure 2.11 シナリオの概要

エネルギー収支は、全ての微細藻類において、Case1が最も良い収支を示した。GHG排出量に関しては、Case2で最も正味の排出量が少なくなった。一方で、GHG排出量に関しては、クロレラはCase2、キートセラスとプレウロクリシスはCase1で最も正味の排出量が少なくなった。

Case0では、遠心分離による消費エネルギー及びGHG排出量が大部分を占めており、微細藻類の凝集・濃縮・脱水を含めた、より省エネルギーな微細藻類の回収・脱水方法の必要性が改めて確認された。残渣を堆肥化したCase1や2と比較して、飼料化したCase0では、得られる残渣エネルギーとGHG削減量が大きいことが分かる。また、堆肥化に比べて飼料化ではGHG排出量が少なく、代替効果による削減も大きい。ただし、プレウロクリシスはタンパク質含有率が低いため、残渣の飼料利用による効果は小さかった。Case1と2では、凝集と自重濃縮により遠心分離機に投入する体積が約100分の1から約200分の1まで減少するため、遠心分離によるエネルギー及びGHG排出量が大幅に削減されていることが分かる。一方で、培養工程は約850 MJと全体の半分以上を占めている。本研究で想定したORPはフォトバイオリアクター等と比較すると消費エネルギーが低い培養手段であるが、添加する栄養塩の製造で消費されるエネルギーが大きいと考えられる。クロレラの凝集濃縮・湿式抽出を対象としたLardon et al. の研究<sup>28)</sup>においても、1 MJのバイオ燃料の製造で消費するエネルギー(3.99 MJ)のうち、約25%の1.06 MJが栄養塩由来であり、培養設備由来の消費量(0.52 MJ)と合算すると、消費エネルギー全体の約40%を占める(Figure 2.14)。つまり、培養工程が消費エネルギーに占める割合が大きい点は本研究の計算と一致し、中でも栄養塩由来の消費が多いことが分かる。

Case2はCase1と比較すると油脂や残渣の利用により得られるエネルギー、および削減したGHGが少ない。これは、凝集後に遠心脱水を行った凝集体では油脂抽出率が低いことや、微細藻類によっては遠心分離の工程で固体物の損失が発生していることが起因していると考えられる。

今回のシナリオでは、すべての条件において消費エネルギーが獲得量を上回った。最もエネルギー消費の超過が少なかったキートセラスのCase1では、エネルギーの消費量が1386 MJ、獲得量が611 MJであり、合計で消費エネルギーが775 MJ超過していた。Lardon et al. の結果<sup>28)</sup>では、1 MJのバイオ燃料を製造する場合、消費量が3.99 MJ、獲得量が3.84 MJであり、合計で消費エネルギーが0.15 MJ超過していた。これらの結果を比較すると、本研究の結果はLardon et al. の結果よりも、消費量の超過割合が大きいことが分かる。Lardon et al. は、抽出残渣によるエネルギーを残渣の組成(たんぱく質、炭水化物、油脂)と各成分の発熱量から計算しているが、具体的な残渣の利用用途については言及されていなかった。一方で、本研究では利用用途を堆肥もしくは飼料と想定し、化学肥料を代替することで削減されるエネルギーを抽出残渣から獲得するエネルギーとして計算している。つまりエネルギー収支計算の差は残渣評価手法の違いに起因すると考えられる。

今回の計算結果から、凝集により消費エネルギー及びGHG排出量を大幅に削減できること、残渣の飼料利用により獲得エネルギーおよびGHG削減量が向上することが明らかになった。以上より、エネルギーおよびGHGの両観点から、凝集と残渣の飼料利用を組み合わせることでさらなる収支改善が見込まれるため、安全性の高い凝集剤を使用して残渣の高付加価値化を図る必要がある。加えて、培養工程の栄養塩削減、油脂抽出率の向上といった追加的工夫も必要であると考えられる。

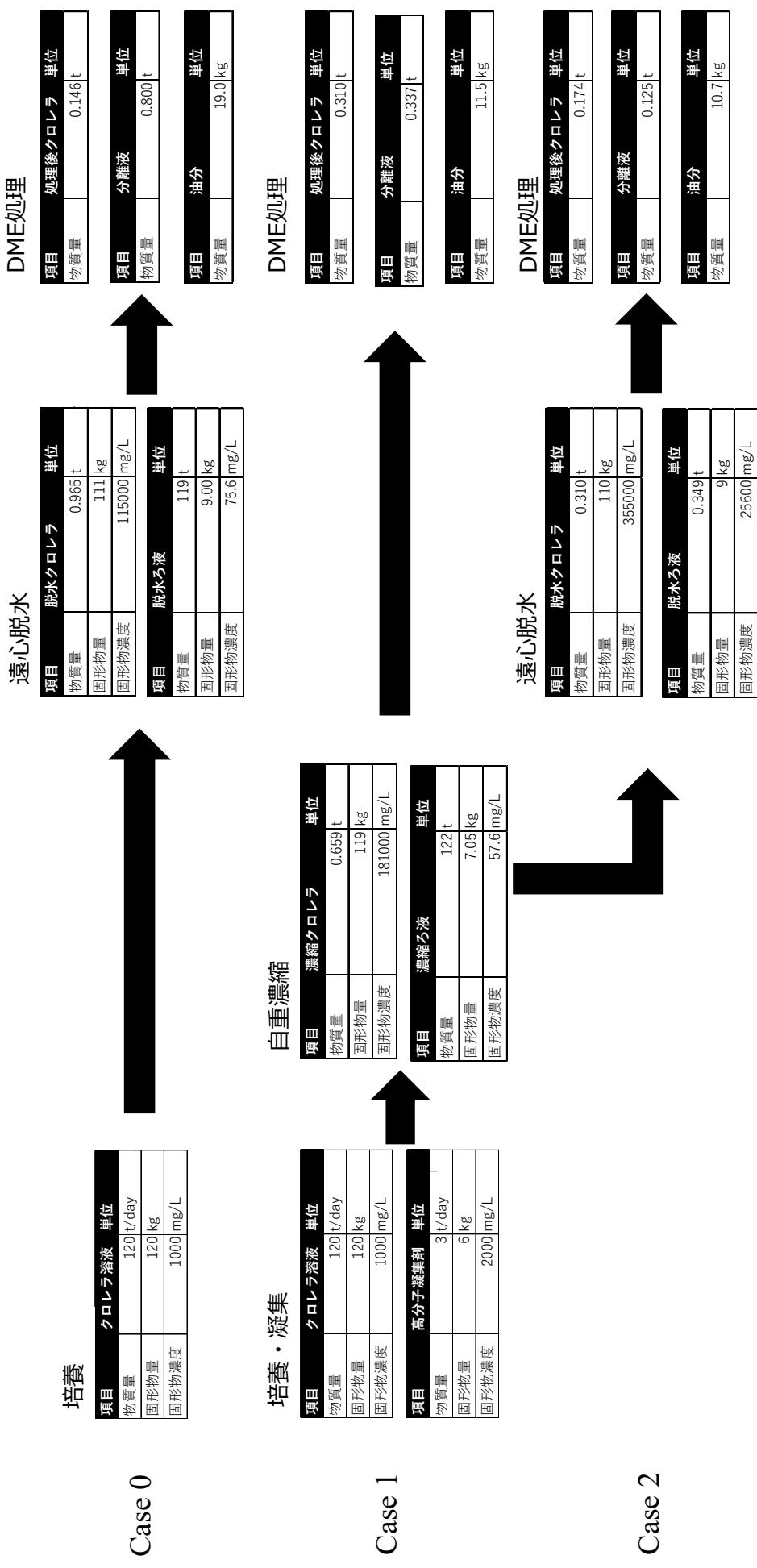


Figure 2.12 3ケースの計算に用いた前処理の物質収支(クロレラ)

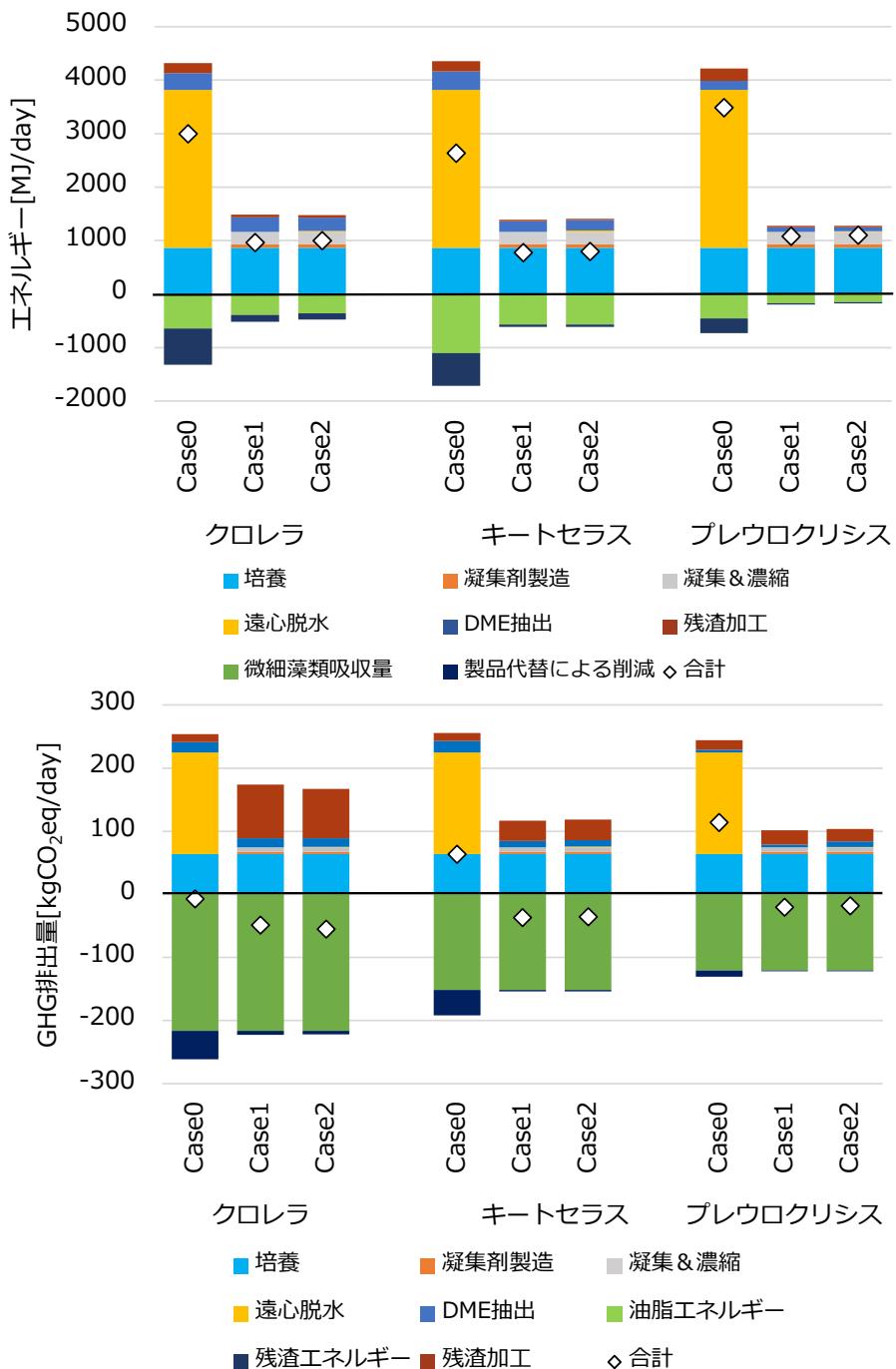


Figure 2.13 エネルギー収支・GHG収支計算結果

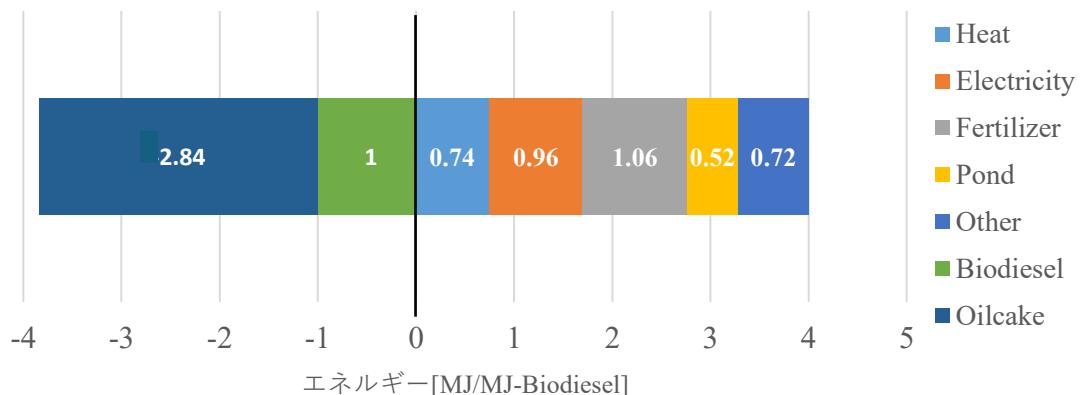


Figure 2.14 Lardon et al.のエネルギー収支計算結果(想定されたプロセス：クロレラをORPで培養後、凝集により濃縮し、湿式油脂抽出を行う)

- 22) 柚山義人, 生村隆司, 小原章彦, 小林久, 中村真人. バイオマス再資源化技術の性能・コスト評価. 農業工学研究所技報 2006, 204, 61-103. DOI: 10.24514/0002001088.
- 23) 渡辺卓弘. 山口県で生産される堆肥の肥料成分的特徴およびその代替量の推定方法. 山口県農業試験場研究報告 2007, (56), 100-108.
- 24) 中村龍樹, 吉竹恒, 森衣里子, 伊藤瑛子. プロテインクリシスがもたらす食品業界の地殻変動. 知的資産創造 2021, 29 (11), 88-101.
- 25) Banerjee, S.; Hew, W.; Khatoon, H.; Shariff, M.; Yusoff, F. Growth and proximate composition of tropical marine Chaetoceros calcitrans and Nannochloropsis oculata cultured outdoors and under laboratory conditions. AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY 2011, 10 (8), 1375-1383.
- 26) Andreeva, A.; Budenkova, E.; Babich, O.; Sukhikh, S.; Ulrikh, E.; Ivanova, S.; Prosekov, A.; Dolganyuk, V. Production, Purification, and Study of the Amino Acid Composition of Microalgae Proteins. MOLECULES 2021, 26 (9). DOI: 10.3390/molecules26092767.
- 27) 神田英輝. 國際科学技術共同研究推進事業, 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS) 平成30年度実施報告書. 2018
- 28) Lardon, L.; Helias, A.; Sialve, B.; Steyer, J. P.; Bernard, O. Life -Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. Environmental Science & Technology 2009, 43 (17), 6475-6481. DOI: 10.1021/es900705j.

#### 1. 4. 2. 2. 8. 天然由来凝集剤を用いた微細藻類の凝集効果の検討(研究成果36, 42)

天然由来凝集剤の候補として、代表的な天然由来凝集剤、食品添加物またはゲル化剤(植物由来成分)の観点から、キトサン(低分子)、キトサン(高分子)、アルギン酸ナトリウム(粘度80~120cp)、アルギン酸ナトリウム(粘度500~600cp)、タンニン酸AL(食品添加物グレード)、ペクチン、ムチン酸、グーガムを対象に、凝集剤添加率3%、水温25°C、微細藻類(円石藻 1g/L, pH6)に対する凝集実験を行った。キトサンを凝集剤として使用する際には、HClで溶解させる必要があるため、本検討では、対象の8つの凝集剤に加えて、HClで溶解させた凝集剤も準備した。凝集条件は、350 rpm 5 min+静置30 minとした。

その結果、HClで溶解させたキトサンを用いた場合では、円石藻プレウロクリシスの凝集が確認された(Figure 2.15)。特に、添加率3~4%であれば、98%以上の回収が可能であることが明らかになった。しかし、キトサンを除く、他の天然由来凝集剤では、プレウロクリシスへの凝集効果は確認されなかった。このことから、天然由来凝集剤を用いた微細藻類の凝集において、キトサンは有力な候補となり、残渣の有効利用としての可能性が拡大できることが明らかになった。しかしながら、キトサンは通常の高分子凝集剤と比較して高価であることから、より凝集剤添加率の減量化が求められると考えられる。なお、キトサンは $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ などの無機凝集剤と比較して50-100倍程度高価であるため、添加率が極めて小さい条件で高回収率が得られなければ、回収コストが高いことが指摘されている<sup>29)</sup>。

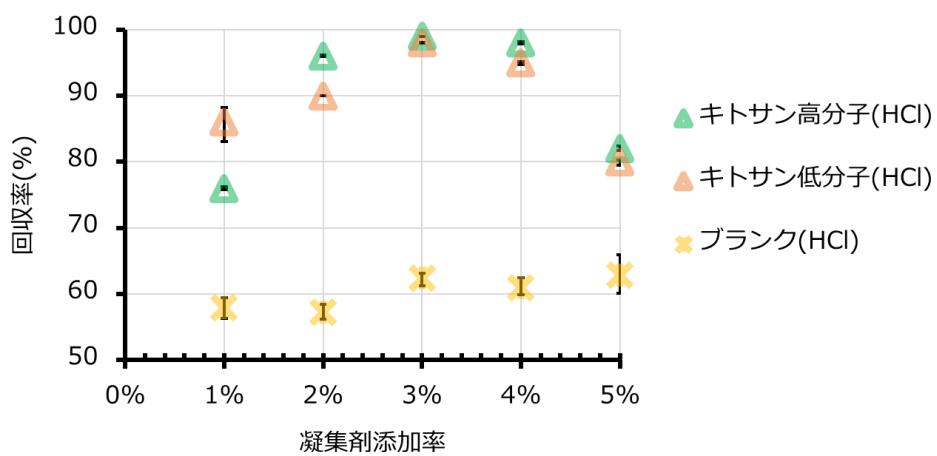


Figure 2.15 天然由来凝集剤:キトサンによる円石藻プレウロクリシスでの凝集実験結果

- 29) Li, S. X.; Hu, T. Y.; Xu, Y. Z.; Wang, J. Y.; Chu, R. Y.; Yin, Z. H.; Mo, F.; Zhu, L. D. A review on flocculation as an efficient method to harvest energy microalgae: Mechanisms, performances, influencing factors and perspectives. Renewable & Sustainable Energy Reviews 2020, 131. DOI: 10.1016/j.rser.2020.110005.

#### 1. 4. 2. 2. 9. 二液薬注によるエネルギー消費量低減の検討(研究成果36, 42)

本項では、天然由来凝集剤:キトサンを用いた二液薬注の凝集におけるエネルギー消費量低減を検討した。具体的には、食品添加物として使われるアニオン性ポリマーであるポリアクリル酸ナトリウム(日本触媒製アクリック®)をキトサンと併用することで、キトサンの添加量低減を目指した。実験では凝集剤添加率、攪

拌速度、攪拌時間を変化させた。次に、得られた最適な攪拌速度を用いて、攪拌時間を変化させた実験を行った。これらの検討をもとに決定された攪拌条件（速度と時間）のもとで、キトサンとアクアリックの添加率を変化させた際のゼータ電位およびフロック粒径の変化を評価した。最後に、エネルギー・GHGの収支計算を行った。

250 rpm 3 min + 120 rpm 10 min の攪拌条件でキトサンとポリアクリル酸ナトリウムを5段階に変化させた凝集実験を行った。結果をFigure 2.16に示す。二液凝集では、各凝集剤の添加率が小さくなるほど標準偏差が大きくなり、両凝集剤の添加率が0.1%の条件では、回収率14.4%であった。一方で、添加率が大きい条件では誤差は小さく、キトサンが添加率1.5%の場合は、ポリアクリル酸ナトリウムの添加率に関わらず、回収率1.0%以内であった。キトサンのみを添加した場合、回収率の標準偏差は最大でも8.9%であった。ポリアクリル酸ナトリウムを添加した場合、キトサンの添加率が同じ条件であっても、ポリアクリル酸ナトリウムの添加に伴い明らかに回収率が向上していることがわかる。例えば、キトサンのみを添加率0.5%で添加すると回収率は33.6%であったが、ポリアクリル酸ナトリウムを0.1%添加すると、回収率は38.8%向上して72.4%となった。カチオン性物質とアニオン性物質の併用が懸濁物質の除去に相乗効果をもたらした点に関しては、Sang et al. やAl-Dawery et al.の研究結果<sup>30), 31)</sup>と一致する。これは、負に帯電している微細藻類細胞表面にキトサンが吸着して正に帯電した箇所を形成し、その箇所に、アニオン性でより分子量が大きいポリアクリル酸ナトリウムが吸着し、架橋効果でフロックが形成されていることによると考えられる<sup>31)</sup>。90%程度の回収率を得るために必要なキトサン添加量は、キトサン単体では添加率1.5%であるが、ポリアクリル酸ナトリウムを併用する条件では、キトサン添加率が0.3%、ポリアクリル酸ナトリウム添加率が1.0%であった。つまり、製造コストが合成高分子凝集剤よりも高いキトサンの添加量を、1/5に減らすことが可能であり、アニオン性高分子凝集剤の併用は、キトサンによる微細藻類の回収の実現性を向上させる可能性が示唆された。ポリアクリル酸ナトリウムは安全性の高い化合物で、食品添加物としても指定されている<sup>45)</sup>。キトサンおよびポリアクリル酸ナトリウムにより凝集処理を行った場合、残渣の安全性からその有効利用用途の選択肢拡大も期待される。

		ポリアクリル酸ナトリウム 添加率[%TS]							ポリアクリル酸ナトリウム 添加率[%TS]				
		0.0	0.1	0.3	0.5	1.0			0.0	0.1	0.3	0.5	1.0
[%TS] 添加率 合計 ノルマ ナ	1.5	88.3	97.6	98.2	98.6	99.3	[%TS] 添加率 合計 ノルマ ナ	1.5	1.0	0.6	0.4	0.3	0.2
	1.0	37.3	77.3	95.9	96.5	98.5		1.0	8.9	7.1	0.5	0.7	0.5
	0.5	33.6	72.4	90.8	91.7	93.6		0.5	8.1	7.9	6.3	3.7	1.2
	0.3	30.2	50.5	85.3	86.5	94.3		0.3	8.0	13.2	5.7	2.3	5.3
	0.1	26.3	47.2	71.8	79.5	82.9		0.1	6.1	14.4	9.9	8.8	1.4

Figure 2.16 天然由来凝集剤凝集実験結果（左：回収率[%] (n=3), 右：標準偏差）

Figure 2.17 にフロック粒径の測定結果を示す。キトサンとポリアクリル酸ナトリウムの添加率を各5段階で変化させた計25条件で測定を行い、10 μm以下の粒子が含まれる条件では顕微鏡観察も実施した。キトサンのみを添加した場合、添加率の上昇に伴いフロック径が大きくなつた。例えば、添加率0.1%では10 μm以下の粒子が約35%の割合、30 μm以上が約10%の割合だったが、添加率1.5%では30 μm以上が約37%の割合に増加した。一方、キトサンに加えてポリアクリル酸ナトリウムを添加すると、0.1%の少量添加でもフロック径は顕著に増大した。キトサン0.3%添加に対し、ポリアクリル酸ナトリウムを0.1%添加すると、30 μm以上の粒子の割合は約5%から約27%に増加した。さらに添加率が上がると粒径も大きくなつた。この増大は、キトサンの正電荷部にアニオン性ポリマーが架橋しフロックを成長させることや、ポリアクリル酸ナトリウムと微細藻類表面の負電荷の反発でフロック構造が拡張するためと考えられる<sup>48)</sup>。Lama et al.の研究では、キトサン約9.5%添加で平均粒径172±80 μmであったが、本研究ではキトサン0.3%、ポリアクリル酸ナトリウム1.0%の条件で200 μm以上の粒子が約60%を占めた<sup>32)</sup>。のことから、両凝集剤の併用により、高い回収率を維持しつつ添加量の大幅な削減が可能であると示唆された。

最後に、エネルギー・GHG収支計算を、1.4.2.2.7と同様に、ORP (Open Raceway Pond)にて培養された微細藻類スラリーを1日で120 t処理することを想定した。天然由来凝集剤による凝集は、クロレラのみを対象としたため、本節でもクロレラのみを対象とする。本研究では、天然由来凝集剤を用いた凝集体に対する自重濃縮、遠心分離、DME抽出の検討は行っていない。したがって、凝集後そのまま沈降させ、沈降した凝集体のみを抜き取り、遠心分離で1.4.2.2.7のCase2と同様の含水率(63%)まで低下させ、DME抽出を行うプロセスにお

けるエネルギー及びGHG収支を計算する。また、抽出残渣は堆肥化と飼料化の2つのケースを想定した。コスト、エネルギー消費量、GHG排出量全てにおいて、キトサンの係数が10倍以上大きいため、キトサンの添加率を可能な限り抑えることが重要であると考えられる。キトサンの添加率に関わらず、ポリアクリル酸ナトリウムを添加するほど回収率が向上したため、ポリアクリル酸ナトリウムの添加率は1.0%とする。その中で、回収率が90%を超えた最も低いキトサンの添加率は0.3%であった。したがって、本項の計算では、キトサン添加率：0.3%、ポリアクリル酸ナトリウム添加率：1.0%の条件と、比較のため、キトサン添加率：0.1%、ポリアクリル酸ナトリウム添加率：1.0%の条件の2条件のエネルギー及びGHG排出量収支の計算を行った。計算結果をFigure 2.18に示す。

Figure 2.13と比較すると、凝集剤製造にかかるエネルギー消費量及びGHG排出量が増加していることが分かる。

1.4.2.2.7の計算では、凝集剤添加率は5%である一方、本節の計算ではポリアクリル酸ナトリウムが添加率1.0%、キトサンが多い条件で添加率0.3%であり、使用量としては3分の1以下である。しかし、キトサンのエネルギー消費やGHG排出の係数が大きいため、凝集剤製造が全体に占める割合は約6.7%と、1.4.2.2.7のCase2における約1-4%と比較して大きい。つまり、天然由来凝集剤を使用する場合、合成高分子凝集剤を用いた場合と比較して、凝集剤添加率を低く抑える必要性が高いといえる。エネルギー収支の合計値は、キトサン添加率が0.3%、残渣を飼料利用したケースにおいて、消費エネルギーが279 MJ超過した。

キトサン添加率が0.1%の条件においては、消費エネルギーの超過分が増加し、348 MJであった。凝集剤の使用量削減によるエネルギー消費量やGHG排出量の低減よりも、回収率の低下による油脂や残渣の減少による生産エネルギーの減少が顕著であったことが分かる。1.4.2.2.7で計算した合成ポリマー系凝集剤を用いたシナリオでは、クロレラが対象の場合、最適プロセスでも消費エネルギーの超過は968 MJであった。GHG排出量に関しては、キトサン添加率が0.3%、残渣を堆肥利用する場合のみ、排出量が吸収量を上回ったが、そのほかの条件では正味の排出量がマイナスとなり、キトサン0.3%、残渣を飼料利用するシナリオでは、GHGの正味吸収量が134 kg-CO<sub>2</sub>eqであった。1.4.2.2.7のクロレラに合成ポリマー系凝集剤を用いたシナリオでは、正味吸収量は最大でも55 kg-CO<sub>2</sub>eqであった。これらの結果から、今回想定したシナリオでは消費エネルギーを超えるエネルギーの生産は難しいことが示唆された。一方で、GHG収支では、残渣の飼料利用を行うシナリオ

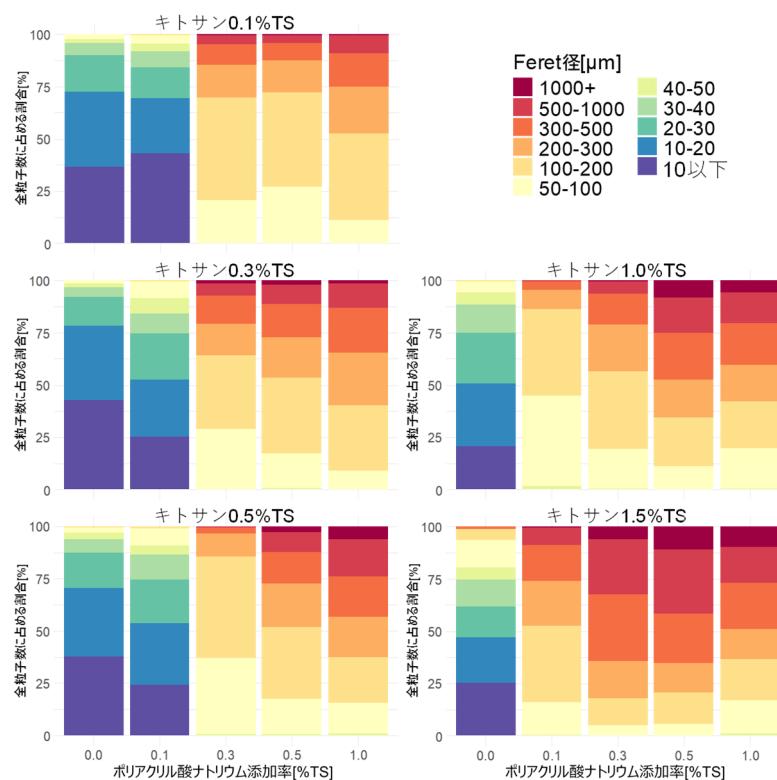


Figure 2.17 フロック粒径

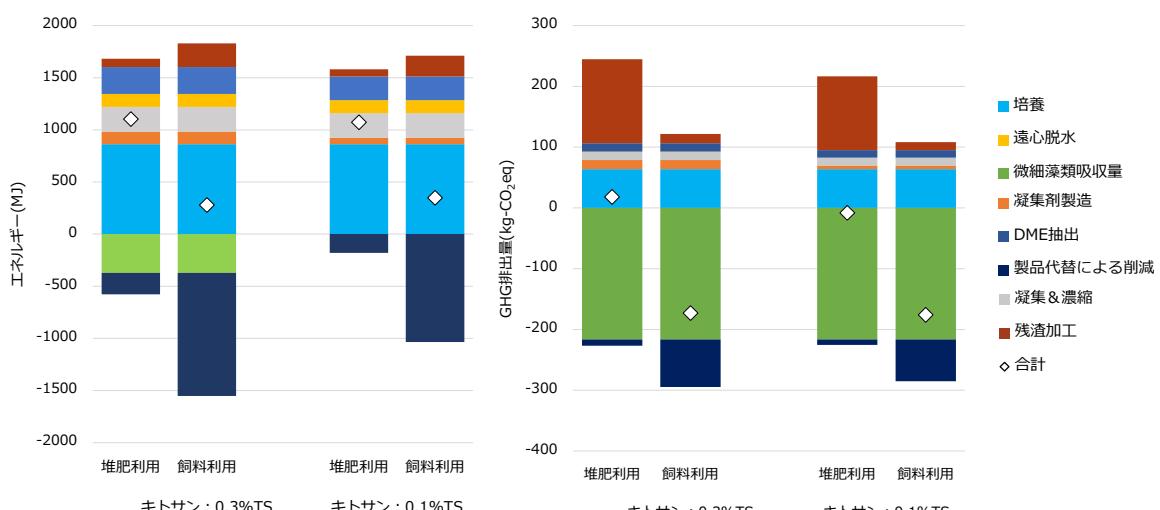


Figure 2.18 エネルギー収支(左)とGHG排出量収支(右)(ポリアクリル酸ナトリウム添加率：1.0%TS)

では正味の吸収量がプラスとなった。エネルギーおよびGHG双方の観点で、合成ポリマー系凝集剤を使用したシナリオよりも天然由来凝集剤を使用したシナリオで収支が向上しており、天然由来凝集剤により凝集操作と残渣の飼料利用の組み合わせることで、収支が改善されることが確認された。

- 30) Sang, Y.; Xiao, H. Clay flocculation improved by cationic poly(vinyl alcohol)/anionic polymer dual-component system. JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE 2008, 326 (2), 420-425. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.06.058.
- 31) Al-Dawery, S. Degree of Flocculation and Interparticles Charges of Conditioned Municipal Activated Sludge using Mixed Polymers. JOURNAL OF MACROMOLECULAR SCIENCE PART B-PHYSICS 2017, 56 (8), 578-594. DOI: 10.1080/00222348.2017.1356131.
- 32) Lama, S.; Muylaert, K.; Karki, T.; Fouber, I.; Henderson, R.; Vandamme, D. Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. BIORESOURCE TECHNOLOGY 2016, 220, 464-470. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.08.080.

#### 1. 4. 2. 2. 10. 生細胞の微細藻類での凝集効果の検討

凝集実験では、常に均一な試料を使用するために、微細藻類の乾燥粉末を用いて調製したスラリーを実験対象とした。そこで、乾燥粉末を用いた場合と生きた細胞を用いた場合の結果の差を確認するため、クロレラとキートセラスは、生細胞から調製したスラリーを原水として使用した凝集実験を行った。なお、ブレウロクリシスは、単体で生きた状態の商品が販売されていなかったため、実施しなかった。生細胞スラリーは、微細藻類由來の固形分と培地成分由來の固形分を区別できない。本研究で通常使用している凝集剤添加率は、スラリー中の微細藻類固形分に対する凝集剤固形分の割合として計算するため、生細胞スラリーを用いた凝集実験では凝集剤添加率を求められない。そこで、乾燥粉末から調製したスラリーと生細胞スラリーのVTSを比較し、それらの比から添加率を換算した。

クロレラの結果をTable 2.5に、キートセラスの結果をTable 2.6に示す。クロレラは、VTSベースで換算した添加率0.80%で、回収率99.9%であった。キートセラスは、VTSベースで換算した添加率0.28%で回収率99.9%を得られた。乾燥粉末から調製したスラリーを対象に行った凝集実験では、98%以上の回収率を得るために、クロレラもキートセラスも4%以上の添加率が必要であった。つまり、生細胞スラリーの凝集では乾燥粉末から調製したスラリーと比較して、高い回収率を得るために必要な凝集剤添加量が少ない結果となった。微細藻類の生細胞は、EPSを細胞表面に分泌する。微細藻類によっては、EPSが高分子鎖で微細藻類細胞を架橋してフロックを形成することで、細胞が自己凝集する現象がみられる<sup>33)</sup>。本研究においても、使用した生細胞がEPSを分泌することで、凝集剤を添加する以前に微小なフロックが形成され、乾燥粉末から調製したスラリーよりも高い回収率が得られた可能性がある。本研究で乾燥粉末から調製したスラリーに対して得られた結果と同等以上の成果が、実際に培養されたスラリーにおいても期待できると考えられる。

ただし、使用した生細胞のサンプルは、培養後に濃縮されて販売されているものであるため、培地成分が濃い等、通常の培養後のスラリーと比較して性質に多少の差異は存在すると考えられる。そのため、培養された直後のスラリーを凝集させた場合にも、本節と全く同じ結果が得られるとは限らない。

Table 2.5 生細胞スラリーの凝集実験結果(クロレラ)

クロレラ						
VTSベース換算添加率[%]	0. 268	0. 535	0. 803	1. 07	1. 34	2. 68
回収率[%]	32. 7	85. 4	>99. 9	>99. 9	99. 8	99. 6

Table 2.6 生細胞スラリーの凝集実験結果(キートセラス)

キートセラス						
VTSベース換算添加率[%]	0. 0275	0. 0413	0. 0550	0. 275	0. 550	1. 10
回収率[%]	90. 3	94. 8	95. 0	>99. 9	99. 4	98. 8

33) Shen, Y.; Fan, Z.; Chen, C.; Xu, X. An auto-flocculation strategy for Chlorella vulgaris. BIOTECHNOLOGY LETTERS 2015, 37 (1), 75-80. DOI: 10.1007/s10529-014-1655-6.

### 1. 4. 3 研究全体のまとめ

本研究で実施した複数の微細藻類に対する、結果のまとめを以下Table 3.1に示す。

Table 3.1 本研究のまとめ

		緑藻			珪藻	円石藻	ユーグレナ藻
		クロレラ (日本産)	クロレラ (インドネシア産)	ドナリエラ	キートセラス	ブレウロクリシス	ユーグレナ
最適な凝集剤 (高分子凝集剤)	極性	カチオン性 or 開性	カチオン性 or 開性	カチオン性 or 開性	カチオン性	カチオン性 or 開性	カチオン性 or 開性
	カチオン度	弱力カチオン			中～強カチオン	中力カチオン	
	分子量	700～1000万 Da			700～1000万 Da	1000万 Da	
凝集条件 (重要因子)		①凝集添加率 ②カチオン度 ③攪拌速度			①凝集添加率 ②分子量 ③カチオン度	①攪拌速度 ②凝集剤添加率 ③分子量	
回収率 (各微細藻類の凝集実験結果*)		39～99%	33～95% (最適化未実施)	90～98% (最適化未実施)	52～99%	63～99%	45～80% (最適化未実施)
含水率		凝集後:82% 遠心脱水後:63～72%			凝集後:92% 遠心脱水後:72～85%	凝集後:83% 遠心脱水後:60～74%	
液化DME抽出条件		液化DME 500mL, 10mL/min, 25°C					
油脂抽出効率 (wt.%)		17.5±0.9	12.9±0.7	28.8±1.6	25.4±0.6	12.0±0.6	42.5±1.6
残渣の用途		堆肥	堆肥	堆肥	堆肥	堆肥	堆肥

脂質の抽出効率(wt.%)は、微細藻類の乾燥重量(g)当たりの抽出物の乾燥重量(g)と定義

<以下、追加検証>

生体細胞での検証		凝集効果 ◎ 粉末試料よりも 高い回収率			凝集効果 ◎ 粉末試料よりも 高い回収率		
2液葉注 自然由来凝集剤 キトサン + アクリル酸ナトリウム	凝集条件 急速 + 緩速	添加順&攪拌速度 重要 添加率の減量可					
	回収率	26～99%					
	含水率						
	回収物の用途						
	残渣の用途	堆肥 or 飼料					

\*凝集実験の検討内容：凝集剤の種類、凝集剤添加率1～5%、攪拌速度、攪拌時間、水温、pH

### 1. 5. 研究成果及び自己評価

#### 1. 5. 1. 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献

<得られた研究成果の学術的意義>

##### サブテーマ1

- ✓ ポリマー系凝集剤の候補を選び、それらが液化DME難溶であり、抽出時には油脂等に移行せず、油脂の脂肪酸組成や、元素比率には影響しないことを明らかにした。
- ✓ 凝集、脱水を経た凝集体に用いられたポリマー系凝集剤やその含水率によっては、脂質抽出が阻害される場合があり、単に凝集による回収率が高いだけではなく、抽出工程に与える影響を考慮した凝集剤の選定が重要であることを明らかにした。
- ✓ ポリマー系凝集剤が特定の微細藻類の亜種と言える程度の軽微な差異を無視し、凝集から脂質抽出までを水平展開することができる
- ✓ 微細藻類の培養液からの凝集などをポリマー系凝集剤に頼る場合には、浸透性に優れた液化DMEを抽出溶媒とすることが妥当である。

##### サブテーマ2

- ✓ 既往研究では、微細藻類全量を遠心分離にて固液分離し、エネルギー収支が課題となっていた。本研究では、凝集、濃縮のプロセスを加えてこれを改善するとともに、スケール縮小への貢献も期待できる。
- ✓ 既往研究では微細藻類の有効利用においてエネルギー収支が十分にとれないことが、指摘されていたが、本研究を通じて、その課題の数値化ができ、何をどのように改善すべきか、その展望を可視化できるようになった。
- ✓ 文献調査により、高分子凝集剤を微細藻類の凝集に用いた知見は極めて少なく、本研究では、25種

類の高分子凝集剤を対象とし、どのような凝集剤であれば適応可能かを明らかにすることことができた。

- ✓ 凝集メカニズムは、多くの因子が複雑に絡んでおり、既往研究では、独自で合成した凝集剤や、固定化された攪拌条件での検討が実施されていた。本課題では、多種多様な高分子凝集剤からカチオニ度や分子量などの理論的に影響するパラメータを対象に、攪拌速度や攪拌条件による凝集効果への影響を調査し、現場を想定したpH変動や水温影響についても調査し、微細藻類への凝集に関する網羅的な実験データから基礎的な傾向を把握できている。
- ✓ 一般的に含水率の低減は重要であるが、サブテーマ1と連携により、凝集させた微細藻類の含水率は70~80%を目指すべきであり、遠心脱水機を必要としないケースを提案することができた。これは、基礎的検討を積み重ねたことによる成果である。
- ✓ 近年、他分野(下水処理分野)で注目されている技法に着目し、天然由来凝集剤を用いた二液薬注による手法の検討を実施した。その結果、凝集剤添加率を大幅に低減でき、残渣の有効利用の選択肢を拡大させることができた。さらに、ゼータ電位の測定や画像解析にも取組んだことから、水環境学会2025ではクリタ賞を受賞しており、学術的にも社会的にも高い評価を得ている。

#### <環境政策等へ既に貢献した研究成果>

特に記載する事項はない。

#### <環境政策等へ貢献することが見込まれる研究成果>

- ✓ 貢献の見通しについては、本研究で実施した液化DMEを用いた抽出技術に関する上記に示した学術的意義により、単なる有機溶媒代替ではなく、微細藻類資源のエネルギー的・物質的な完全活用を実現する中核的技術として位置付けられることが期待できる。その導入は、環境負荷の低減、安全性の向上、資源の循環利用、温室効果ガスの削減、さらには国際的な環境規制への適合という複数の課題を同時に解決しうるものであり、今後の環境政策および環境産業の展開において極めて重要な役割を果たすことが期待される。
- ✓ 微細藻類の乾燥重量の20~40%が脂質であり、残りの60~80%は残渣であることが一般的である。残渣を利用しなければ、微細藻類が光合成で獲得したエネルギーの大半が無駄になる。微細藻類の抽出残渣には約10%の窒素分が含まれており、これは人間の活動により消費された窒素肥料（アンモニアが原料）に由来している。したがって、微細藻類の抽出残渣は肥料の代替品として有効に活用できる。しかし、抽出残渣に残留する有機溶媒を完全に除去するため困難であるので、従来溶媒では多くのエネルギーを消費する必要がある。環境調和性に優れ、水よりも沸点が非常に低い溶媒だけを使用するようにできれば、その結果、残渣に残留する溶媒を少量に抑え、毒性の低い状態で食料、飼料、肥料などに活用できるようになる。それに伴い、残渣の活用を義務化すべきである。また、この提案には副次的な効果もある。例えば、窒素肥料の原料用途のアンモニア消費量を削減して、火力発電燃料に転用できる。ここで、微細藻類の脂質含有量を33.3%、抽出残渣を66.6%と仮定すると、日本の化成品原料用途の石油消費量は77万バレル/日であるので、これを微細藻類の脂質で賄った場合に生じる抽出残渣は158万トン/日となる。抽出残渣の窒素含有量を10%と仮定すると、抽出残渣に含まれる窒素量は15.8万トン/日となり、これは18.2万トン/日のアンモニアに由来することになる。アンモニアと石油の燃焼熱が、それぞれ22.5 kJ/gと41.9 kJ/gであることを考慮すると、抽出残渣を肥料として活用することで生じた余剰のアンモニアを発電用燃料に回した場合には、9.8万トン/日(71.7万バレル/日)の石油に相当するエネルギーが得られる。つまり、微細藻類の残渣を有効活用すれば、1億1万トン/年のCO<sub>2</sub>排出量の削減が可能になる。
- ✓ 実スケールでの微細藻類の回収・濃縮法では、一般に遠心分離が多く導入されている。しかし微細藻類は水生生物であるので、培養状態では固形分濃度が0.1%程度の非常に希薄な懸濁液であり、エネルギー消費量が大きいことが課題として挙げられる。実機レベルを想定し、凝集剤を用いた本技術を既往技術(遠心分離法)と比較した結果、既往技術は明らかに遠心脱水での消費エネルギーが多く、エネルギー収支に見合わなかった。一方で、凝集剤を併用した本技術は、エネルギー収支に合う技術であることを見出した。従って、遠心分離を制限し、凝集剤の添加を推奨することが必要である。
- ✓ 本研究で使用したポリマー系凝集剤については、文献調査の結果、家畜飼料（牛・豚）および農業肥料への活用を想定した場合、微細藻類の抽出残渣中に残存しても、ヒトの健康に対する影響は極めて低いと考えられることが示唆された。しかしながら、実際の社会実装を見据えた場合には、凝集剤メーカーとのヒアリングを通じて、安全性対策やリスク評価の重要性が明らかとなった。このため、残渣の堆肥利用以外の用途を検討する際には、より一層の安全性を確保する観点から、使用する凝集剤の選定に慎重を期す必要があるとわかった。本研究成果では、微細藻類に対して高い凝集効果を示す

天然由来の凝集剤を探索し、さらにコストおよびエネルギー削減を実現する2液薬注方式の有効性を見出すことに成功した。これらの成果は、今後、微細藻類資源の高度利用における天然由来凝集剤の適用指針として、大きな意義を持つものと期待される。

- ✓ 本プロセスの残渣の有効利用において、残渣加工までを考慮した場合に、すべてのシナリオにおいて生産エネルギーが消費エネルギーを上回ることはなかったものの、天然由来凝集剤を用いることで正味GHG排出量をマイナスに転じさせる効果が確認された。特に、キトサン0.3%TSおよびポリアクリル酸ナトリウム1.0%TSの添加条件下で残渣を飼料利用した場合、正味消費エネルギーは279 MJとなり、合成高分子凝集剤を用いた場合と比較してエネルギー収支が大幅に改善された。なお、凝集剤製造由来のエネルギー消費とGHG排出量がプロセス全体に占める割合が大きいため、天然由来凝集剤の添加率を低く抑えることの重要性も示唆された。これらの知見は、微細藻類バイオマスのエネルギー利用において、プロセス全体の環境負荷低減に資する指針を提示するものとして役立つと考えられる。

### 1. 5. 2. 研究成果に基づく研究目標の達成状況及び自己評価

<全体達成状況の自己評価> · · · ·

#### 1. 目標を大きく上回る成果をあげた

「微細藻類からの油脂抽出におけるポリマー系凝集剤の影響の解明」（名古屋大学、山本徹也）

全体目標	全体達成状況
微細藻類の加熱による乾燥前処理を使用しない、油脂や機能性成分の抽出手法において、微細藻類に含まれるポリマー系凝集剤への抽出溶媒であるDMEの影響を把握する。これにより微細藻類からDMEで抽出された油脂へのポリマー系凝集剤の混入の防止（検出下限未満）、抽出物に含まれる機能性物質の解明（定性・定量）、遠心分離で回収された微細藻類に含まれる水分量の下水汚泥並み（80%以下）への低減と微細藻類の回収率も98%以上を目指とする。これにより微細藻類の化成品原料への転換における、回収エネルギーの低減、抽出装置のコスト抑制、残渣の肥料や食料への転換に向けた技術開発を進める。	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ポリマー系凝集剤のDMEに対する溶解性について、Hansen溶解度パラメーターを理論・実験の両面から評価し、凝集剤がDME抽出操作において抽出物に混入しないこと（「難溶または不溶」とされる溶解度の閾値は0.1 g/Lであり、それ以下）を明確に立証した。（Table 1.2、Fig. 1.2）</li> <li>2. 各種微細藻類に対するDME抽出実験において、従来法と同等以上の油脂抽出性能（Table 1.5、1.6、1.12、1.16）が得られ、かつ油脂へのポリマー成分の混入がないことを多手法解析（GPC、HPLC、GC-MS、FT-IR、CHNSO元素分析、SEM、DLS）によって裏付けた（Table 1.7、1.13、1.17）。</li> <li>3. 各種微細藻類からの抽出物に含まれる機能性物質として、脂質に含まれる脂肪酸の種類やそのレベルを明らかにした。緑藻ドナリエラの場合は、β カロテンの抽出挙動も明らかにした。（Table 1.8、1.9、1.14、1.18、Fig. 1.16、）</li> <li>4. 凝集後の遠心分離において、全ての微細藻類で含水率80%未満を達成し、回収率も各種試験で98%以上を確保した。（Table 2.3、Figure 2.9）</li> </ol> <p>これ以外に各サブテーマにて、目標を上回りかつ副次的な効果が得られたことを含め、自己評価結果の根拠とする。</p>

<サブテーマ1 達成状況の自己評価> · · · ·

#### 1. 目標を大きく上回る成果をあげた

「微細藻類凝集体へのDME 抽出技術の適用」（名古屋大学、山本徹也）

サブテーマ1 目標	サブテーマ1 達成状況
研究全体を統括するとともに、凝集剤で回収された微細藻類（緑藻・珪藻・円石藻から各1種類）に含まれるポリマー系凝集剤への抽出溶媒であるDMEの	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ポリマー系凝集剤のDMEに対する溶解性について、Hansen溶解度パラメーターを理論・実験の両面から評価し、凝集剤がDME抽出操作において抽出物に混入しないこと（「難溶または不溶」とされる溶解度の閾値は0.1 g/Lであり、それ以下）を明確に立証した。（Table 1.2、Fig. 1.2）</li> </ol>

影響を解明する。これにより微細藻類からDMEで抽出された油脂へのポリマー系凝集剤の混入の防止（検出下限未満）、抽出物に含まれる機能性物質の解明（定性・定量）を行う。分析にはMALDI-TOF-MS（低分子量分布）、ゲル浸透クロマト（高分子量分布）、HPLC（UN-Vis）、GC-MS（脂肪酸組成）を駆使する。

- いて抽出物に混入しないこと（「難溶または不溶」とされる溶解度の閾値は0.1 g/Lであり、それ以下）を明確に立証した。（Table 1.2、Fig.1.2）
2. 各種微細藻類に対するDME抽出実験において、従来法と同等以上の油脂抽出性能（Table 1.5、1.6、1.12、1.16）が得られ、かつ油脂へのポリマー成分の混入がないことを多手法解析（GPC、HPLC、GC-MS、FT-IR、CHNSO元素分析、SEM、DLS）によって裏付けた（Table 1.7、1.13、1.17）。
  3. 各種微細藻類からの抽出物に含まれる機能性物質として、脂質に含まれる脂肪酸の種類やそのレベルを明らかにした。緑藻ドナリエラの場合は、 $\beta$ カロテンの抽出挙動も明らかにした。（Table 1.8、1.9、1.14、1.18、Fig.1.16、）
  4. さらに、当初の計画を超える以下の副次的成果も得られた。
    - (1) 42種類のポリマーの溶解性評価を通じてDMEのHSP値を新たに推定し、DMEがポリマー系凝集剤中に含まれる未反応モノマーを抽出でき、凝集剤を精製できる溶媒としての有用性を明らかにした（成果12）。
    - (2) 抽出残渣の元素組成やその有用性を評価し、食品・肥料・飼料等への応用可能性、さらには石油由来化成品の代替資源としてのポテンシャルを示した。（Table 1.10、1.11、1.15、1.19）
    - (3) インドネシア・スラバヤ工科大学との共同研究により、インドネシア産クロレラと日本産クロレラの比較実験を実施し、同一条件での抽出適用性を検証した。（Fig.1.4、1.6、1.7）

<サブテーマ2達成状況の自己評価> · · · · ·

### 1. 目標を大きく上回る成果をあげた

「溶媒調和型凝集剤の探索」（京都大学、大下和徹）

サブテーマ2目標	サブテーマ2達成状況
<p>細胞壁の構成物質が著しく異なる3種類の微細藻類（緑藻・珪藻・円石藻）に対する、ポリマー系凝集剤による凝集効果を明らかにする。ポリマー系凝集剤の探索に際しては、DMEに不溶といった溶媒調和性や、農業肥料や食品としても利用される抽出残渣への残留を念頭にして環境調和性も考慮する。凝集剤の水分の低減効果としては、遠心分離後の微細藻類への含水率が下水汚泥並みの水分80%未満を目指すとともに、微細藻類の回収率も98%以上を目指す。凝集剤の遠心分離の消費エネルギーの低減効果に関しては、実機を想定した遠心条件（加速度）における分離試験を小型遠心分離器で行い、その分離時間から実機の処理速度を逆算し、そこから消費エネルギーを推算する。</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 緑藻（クロレラ）、珪藻（キートセラス）、円石藻（プレウロクリシス）の各種微細藻類に対して、25種類のポリマー系凝集剤を用いた網羅的な凝集試験を実施した（Table 2.2）。</li> <li>2. 凝集性能を規定する因子（凝集剤の分子量、カチオン度、主鎖骨格等）と藻類特性（ゼータ電位、細胞サイズ、含水率）との関係を重回帰分析により解析し、支配因子を特定した。特に、ゼータ電位の中和効果と、架橋効果が凝集効率に大きく寄与することが明らかとなった。（Figure 2.7）</li> <li>3. 凝集後の遠心分離において、全ての微細藻類で含水率80%未満を達成し、回収率も各種試験で98%以上を確保した。（Table 2.3, Figure 2.9）</li> <li>4. キトサンベースの天然由来凝集剤についても、同等以上の脱水・回収性能を示し、環境調和性</li> </ol>

	<p>と機能性の両立が可能であることを実証した。 (Figure 2.15)</p> <p>5. 二液薬注による凝集剤添加量の最適化による使用量削減（約30%削減）も達成し、コスト低減とエネルギー負荷低減の両立に成功した (Figure 2.16、Figure 2.18)。</p> <p>6. 遠心分離エネルギー推算においては、小型遠心分離機を用いた分離試験から、遠心加速度、処理時間、脱水効率に基づくエネルギー消費量を推定した。その結果、従来法（大容量の遠心分離）に比べ、凝集工程を介在させることで30～35%のエネルギー削減効果が得られることを確認した（表8；非公開部分、Figure 2.13、2.18）。</p> <p>7. LCC02分析でも微細藻類由来バイオ燃料・バイオ素材のCO<sub>2</sub>排出削減に寄与できる見通しが得られた(Figure 2.13、2.18)。</p> <p><b>自己評価の理由</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 主要目標である凝集効果解明、数値目標であった含水率・回収率の達成、エネルギー消費低減をすべて達成したため。</li> <li>✓ 凝集剤メーカーへのヒアリングを通じて、凝集剤の環境調和性を高めた新規提案（天然由来凝集剤）という副次的成果も得られたため。</li> <li>✓ 3種の微細藻類に加え、他種の微細藻類に対しても凝集試験を行い、多様な微細藻類群に対する本技術の適応性を検証した。あわせて、生細胞を対象とした実証試験も実施し、実用性の高い成果を得るに至った。</li> <li>✓ 2液薬注方式による凝集剤添加量の低減策は、従来から指摘されていたキトサンの高コストという課題にも配慮したものであり、エネルギー消費の削減に加え、コスト低減にも資する有効な手法を見出すことに成功した。</li> </ul>
--	---

## 1. 6. 研究成果発表状況の概要

## 1. 6. 1. 研究成果発表の件数

成果発表の種別	件数
産業財産権	0
査読付き論文	6
査読無し論文	4
著書	0

「国民との科学・技術対話」の実施	4
口頭発表・ポスター発表	27
マスコミ等への公表・報道等	0
成果による受賞	1
その他の成果発表	0

### 1. 6. 2. 主要な研究成果発表

成果番号	主要な研究成果発表 (「研究成果発表の一覧」から10件まで抜粋)
4	米澤璃穂, 本間亮介, 高岡昌輝, 神田英輝, 大下和徹; <i>Chlorella sorokiniana</i> および <i>Chaetoceros simplex var. calcitrans</i> を対象とした高分子凝集剤による凝集・濃縮・脱水, 土木学会論文集, 2024, 80, 25. 24-25007. <a href="https://doi.org/10.2208/jscejj.24-25007">https://doi.org/10.2208/jscejj.24-25007</a>
5	Hideki Kanda, Kaito Kusumi, Li Zhu, Tao Wang, Direct Extraction of Lipids, $\beta$ -Carotene, and Polyphenolic Compounds from Wet Microalga Dunaliella salina by Liquefied Dimethyl Ether, <i>Marine Drugs</i> 2024, 22(10), 438; <a href="https://doi.org/10.3390/md22100438">https://doi.org/10.3390/md22100438</a>
6	Hideki Kanda, Li Zhu, Bo Xu, Kaito Kusumi, Tao Wang, Extraction of fucoxanthin, antioxidants and lipid from wet diatom <i>Chaetoceros simplex</i> var. <i>calcitrans</i> by liquefied dimethyl ether, <i>Arabian Journal of Chemistry</i> , Vol.17, Issue 2, 2024, 105538. <a href="https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105538">https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105538</a>
7	Tao Wang, Li Zhu, Li Mei and Hideki Kanda, Extraction and Separation of Natural Products from Microalgae and Other Natural Sources Using Liquefied Dimethyl Ether, a Green Solvent: A Review, <i>Foods</i> 2024, 13(2), 352; <a href="https://doi.org/10.3390/foods13020352">https://doi.org/10.3390/foods13020352</a>
9	楠美海斗, 王涛, 真部愛也, 米澤璃穂, 本間亮介, 山本徹也, 高岡昌輝, 大下和徹, 神田英輝, 高分子凝集剤が液化ジメチルエーテルによる円石藻からの脂質抽出に与える影響, 化学工学論文集, 2025, 51, 4, 89-95.
10	Tao Wang, Li Zhu, Kaito Kusumi, Tetsuya Yamamoto, Akiho Yonezawa, Ryosuke Homma, Kenji Shioota, Masaki Takaoka, Kazuyuki Oshita, Hideki Kanda, Lipid extraction from wet polymer-flocculated <i>Chlorella sorokiniana</i> using liquefied dimethyl ether without centrifugation and drying pretreatment, <i>ACS Omega</i> , Vol.10, Issue 35, 2025, 39482-39493. <a href="https://doi.org/10.1021/acsomega.4c11491">https://doi.org/10.1021/acsomega.4c11491</a>

注：この欄の成果番号は「研究成果発表の一覧」と共通です。

### 1. 6. 3. 主要な研究成果普及活動

本研究課題での成果普及活動は、合計で4件行った。そのうち、3件は各大学が主催する研究成果普及イベントであり、成果番号3-8のオンライン開催イベントではアーカイブの視聴回数が1年弱で2,000回を超える、その影響は大きいと思われる。また特に重要なものとしては、成果番号4-10の参加者の多数が小学生の出前授業であり、将来的にもその波及効果が期待できる。

### 1. 7. 国際共同研究等の状況

#### <国際共同研究の概要>

インドネシア共和国のスラバヤ工科大学(Siti Machmudah上級講師)と、名古屋大学との共同研究において、インドネシア産クロレラを提供してもらい、日本産クロレラとの比較を行うことができた。

&lt;相手機関・国・地域名&gt;

機関名（正式名称）	(本部所在地等の) 国・地域名
スラバヤ工科大学 (Sepuluh Nopember Institute of Technology)	インドネシア共和国・ スラバヤ、東ジャワ州

注：国・地域名は公的な表記に準じます。

## 1. 8. 研究者略歴

&lt;研究者（研究代表者及びサブテーマリーダー）略歴&gt;

研究者氏名	略歴（学歴、学位、経歴、現職、研究テーマ等）
山本徹也	研究代表者及びサブテーマ1リーダー 京都大学工学研究科博士後期課程修了 博士（工学） 広島大学助手・助教を経て、 現在、名古屋大学准教授 専門は化学工学、研究テーマは高分子ナノコロイド
神田英輝	研究代表者及びサブテーマ1リーダー 京都大学工学研究科博士後期課程修了 博士（工学） 電力中央研究所博士研究員を経て、 現在、名古屋大学助教 専門は化学工学、研究テーマは超臨界プロセス、吸着、バイオ燃料
大下和徹	サブテーマ2リーダー 京都大学工学研究科修士課程修了 博士（工学） 日本ガイシ株式会社勤務、京都大学助手・助教を経て、 現在、京都大学准教授 専門は環境工学、研究テーマは、廃棄物処理、バイオマスのエネルギー利用

## 2. 研究成果発表の一覧

### (1) 産業財産権

成果番号	出願年月日	発明者	出願者	名称	出願以降の番号
	特に記載する事項はない。				

### (2) 論文

#### <論文>

成果番号	発表年度	成果情報	主たるサブテーマ	査読の有無
1	2023	本間亮介, 米澤璃穂, 王涛, 朱力, 楠美海斗, 山本徹也, 塩田憲司, 高岡昌輝, 神田英輝, 大下和徹; 微細藻類 <i>C. sorokiniana</i> の回収を目的としたカチオン系高分子凝集剤の分子量・添加率・攪拌速度の検討, 環境衛生工学研究, 2023, 37, 3, 119–121	2	無
2	2023	本間亮介, 米澤璃穂, 王涛, 朱力, 楠美海斗, 山本徹也, 塩田憲司, 高岡昌輝, 神田英輝, 大下和徹; 高分子凝集剤による微細藻類 <i>C. Sorokiniana</i> の凝集特性-凝集剤の主成分、pH、水温による凝集効果-, 環境工学総合シンポジウム講演論文集, 2023, 23, 14, J414	2	無
3	2024	本間亮介, 米澤璃穂, 王涛, 山本徹也, 高岡昌輝, 神田英輝, 大下和徹; カチオン性ポリマーを用いた珪藻：キートセラスの回収, 環境衛生工学研究, 2024, 38, 3, 138–140	2	無
4	2024	米澤璃穂, 本間亮介, 高岡昌輝, 神田英輝, 大下和徹; <i>Chlorella sorokiniana</i> および <i>Chaetoceros simplex var. calcitrans</i> を対象とした高分子凝集剤による凝集・濃縮・脱水, 土木学会論文集, 2024, 80, 25	2	有
5	2024	Hideki Kanda, Kaito Kusumi, Li Zhu, Tao Wang, Direct Extraction of Lipids, $\beta$ -Carotene, and Polyphenolic Compounds from Wet Microalga <i>Dunaliella salina</i> by Liquefied Dimethyl Ether, Marine Drugs 2024, 22(10), 438; <a href="https://doi.org/10.3390/md22100438">https://doi.org/10.3390/md22100438</a>	1	有
6	2024	Hideki Kanda, Li Zhu, Bo Xu, Kaito Kusumi, Tao Wang, Extraction of fucoxanthin, antioxidants and lipid from wet diatom <i>Chaetoceros simplex var. calcitrans</i> by liquefied dimethyl ether, Arabian Journal of Chemistry Volume 17, Issue 2, 2024, 105538. <a href="https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105538">https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105538</a>	1	有
7	2024	Tao Wang, Li Zhu, Li Mei and Hideki Kanda, Extraction and Separation of Natural Products from Microalgae and Other Natural Sources Using Liquefied Dimethyl Ether, a Green Solvent: A Review, Foods 2024, 13(2), 352; <a href="https://doi.org/10.3390/foods13020352">https://doi.org/10.3390/foods13020352</a>	1	有
8	2024	楠美海斗 王涛 朱力 徐波 et al., 液化ジメチルエーテルによるクロレラからの脂質抽出に対する高分子凝集剤の影響, 環境衛生工学研究 37(3) 128–130 2023年7月	1	無
9	2025	楠美海斗, 王涛, 真部愛也, 米澤璃穂, 本間亮介, 山本徹也, 高岡昌輝, 大下和徹, 神田英輝, 高分子凝集剤が液化ジメチルエーテルによる円石藻からの脂質抽出に与える影響, 化学工学論文集, 2025, 51, 4, 89–95.	1	有

10	2025	Tao Wang, Li Zhu, Kaito Kusumi, Tetsuya Yamamoto, Akiho Yonezawa, Ryosuke Homma, Kenji Shiota, Masaki Takaoka, Kazuyuki Oshita, Hideki Kanda, Lipid extraction from wet polymer-flocculated Chlorella sorokiniana using liquefied dimethyl ether without centrifugation and drying pretreatment, <i>ACS Omega</i> , Vol.10, Issue 35, 2025, 39482-39493. <a href="https://doi.org/10.1021/acsomega.4c11491">https://doi.org/10.1021/acsomega.4c11491</a>	1	有
----	------	--	---	---

## (3) 著書

&lt;著書&gt;

成果番号	発表年度	成果情報	主たるサブテーマ
	特に記載する事項はない。		

## (4) 口頭発表・ポスター発表

&lt;口頭発表・ポスター発表&gt;

成果番号	発表年度	成果情報	主たるサブテーマ	査読の有無
11	2022	神田英輝：化学工学会産学官連携センター・グローバルテクノロジー委員会（2022）微細藻類の化成品やバイオ燃料への転換における課題と研究開発（依頼講演）	1	無
12	2022	楠美海斗、朱力、王涛、神田英輝：第53回中部化学関係学協会支部連合秋季大会（2022）ポリマー系凝集剤の液化ジメチルエーテルへの溶解性の検討	1	無
13	2022	楠美海斗、朱力、王涛、神田英輝：分離技術会年会（2022）ポリマー系凝集剤の液化ジメチルエーテルによる抽出挙動の検討	1	無
14	2022	王涛、朱力、朱ワンイン、神田英輝：分離技術会年会（2022）液化ジメチルエーテル(DME)を用いたウコンからのクルクミンと抗酸化物質の抽出	1	無
15	2022	王涛、朱力、楠美海斗、神田英輝：化学工学会第88年会（2023）液化ジメチルエーテルによる高含水珪藻からのフコキサンチンと脂質の直接抽出	1	無
16	2023	楠美海斗、王涛、朱力、米澤璃穂、本間亮介、山本徹也、塩田憲司、高岡昌輝、大下和徹、神田英輝：化学工学会第88年会（2023）クロレラの高分子凝集体からの液化ジメチルエーテルを用いた油脂抽出挙動の解明	1	無
17	2023	朱力、王涛、朱ワンイン、神田英輝：化学工学会第88年会（2023）液化ジメチルエーテルによる高含水ウコンからのクルクミンと抗酸化物質の抽出	1	無
18	2023	楠美海斗、王涛、朱力、徐波、米澤璃穂、本間亮介、山本徹也、塩田憲司、高岡昌輝、大下和徹、神田英輝：第45回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム（2023）液化ジメチルエーテルによるクロレラからの脂質抽出に対する高分子凝集剤の影響	1	無
19	2023	王涛、楠美海斗、朱力、徐波、米澤璃穂、本間亮介、山本徹也、塩田憲司、高岡昌輝、大下和徹、神田英輝：化学工学会第54回秋季大会（2023）液化ジメチルエーテルを用いた高分子凝集剤の抽出挙動の検討	1	無

20	2023	楠美海斗、王涛、朱力、徐波、米澤璃穂、本間亮介、山本徹也、塙田憲司、高岡昌輝、大下和徹、神田英輝：化学工学会第54回秋季大会（2023）微細藻類の高分子による凝集が液化ジメチルエーテルによる脂質抽出に及ぼす影響	1	無
21	2023	朱力、王涛、楠美海斗、徐波、神田英輝：化学工学会第54回秋季大会（2023）液化ジメチルエーテルを用いた高含水藻類ドナリエラからの脂質と機能性成分の直接抽出	1	無
22	2023	T. Wang, L. Zhu, K. Kusumi, X. Bo, H. Kanda : The 20th The Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering, Makati, Philippine(2023) Direct extraction of fucoxanthin and lipids from highly hydrous diatoms by liquefied dimethyl ether	1	無
23	2023	H. Kanda : THERS Gifu Joint Degree Program India/Malaysia/Japan Symposium, 岐阜大学/Zoom併用開催(2023)Lipid Extraction from Microalgae for Biofuel Production without Drying Pretreatment	1	無
24	2023	Kaito KUSUMI, Tao WANG, Li ZHU, Xu BO, Akiho YONEZAWA, Ryosuke HOMMA, Tetsuya YAMAMOTO, Kenji SHIOTA, Masaki TAKAOKA, Kazuyuki OSHITA, Hideki KANDA, The 12th International Conference on Separation Science and Technology (ICSST23, Okinawa), Impacts of polymer flocculants on lipid extraction from Chlorella sorokiniana with liquefied dimethyl ether	1	無
25	2023	Tao Wang, Kaito Kusumi, Bo Xu, Li Zhu, Hideki Kanda, The 12th International Conference on Separation Science and Technology (ICSST23, Okinawa), Drying-free co-extraction of fucoxanthin, antioxidants and lipids from the hydrous diatom <i>Chaetoceros simplex</i> var. <i>calcitrans</i> with liquefied dimethyl ether	1	無
26	2023	Li ZHU, Kaito KUSUMI, Bo XU, Tao WANG, Hideki KANDA, The 12th International Conference on Separation Science and Technology (ICSST23, Okinawa), Liquefied dimethyl ether used for direct extraction of lipids, $\beta$ -carotene, and antioxidants from highly wet alga <i>Dunaliella salina</i> without prior drying treatment	1	無
27	2023	本間亮介、米澤璃穂、王涛、朱力、楠美海斗、山本徹也、塙田憲司、高岡昌輝、神田英輝、大下和徹；微細藻類C. sorokinianaの回収を目的としたカチオン系高分子凝集剤の分子量、添加率、攪拌速度の検討、第45回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム、2023、37、3、119-121	2	無
28	2023	本間亮介、米澤璃穂、王涛、朱力、楠美海斗、山本徹也、塙田憲司、高岡昌輝、神田英輝、大下和徹；高分子凝集剤による微細藻類C. Sorokinianaの凝集特性 -凝集剤の主成分、pH、水温による凝集効果-、第33回環境工学総合シンポジウム2023、2023、23、14、J414	2	無

29	2024	楠美海斗、王涛、朱力、徐波、米澤璃穂、本間亮介、山本徹也、塙田憲司、高岡昌輝、大下和徹、神田英輝：化学工学会第55回秋季大会（2024）液化ジメチルエーテルを用いた珪藻からの脂質抽出における高分子凝集剤の影響	1	無
30	2024	楠美海斗、王涛、朱力、米澤璃穂、本間亮介、山本徹也、塙田憲司、高岡昌輝、大下和徹、神田英輝：化学工学会第89年会（2024）珪藻の高分子による凝集が液化ジメチルエーテルによる脂質抽出に及ぼす影響	1	無
31	2024	楠美海斗、王涛、朱力、米澤璃穂、本間亮介、山本徹也、塙田憲司、高岡昌輝、大下和徹、神田英輝：分離技術会年会（2024）珪藻からの脂質の液化ジメチルエーテル抽出における高分子凝集剤の影響	1	無
32	2024	本間亮介、米澤璃穂、王涛、山本徹也、高岡昌輝、神田英輝、大下和徹；油脂抽出に向けた高分子凝集剤による珪藻：キートセラスの凝集特性、日本水環境学会第58回年会，2024, 516	2	無
33	2024	米澤璃穂、本間亮介、王涛、山本徹也、高岡昌輝、神田英輝、大下和徹；高分子凝集剤を用いた複数の微細藻類の回収法に関する基礎検討、日本水環境学会第58回年会，2024, 71	2	無
34	2024	本間亮介、米澤璃穂、王涛、山本徹也、高岡昌輝、神田英輝、大下和徹；カチオン性ポリマーを用いた珪藻：キートセラスの回収、第46回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム、2024, 38, 3, 138-140	2	無
35	2024	米澤璃穂、本間亮介、高岡昌輝、神田英輝、大下和徹； <i>Chlorella sorokiniana</i> および <i>Chaetoceros simplex var. calcitrans</i> を対象とした高分子凝集剤による凝集・濃縮・脱水、第61回環境工学研究フォーラム、2024, 80, 25	2	有
36	2025	米澤璃穂、本間亮介、高岡昌輝、大下和徹、王涛、山本徹也、神田英輝；残渣利用拡大に向けた <i>Chlorella sorokiniana</i> の二液薬注による凝集効率の向上、日本水環境学会第59回年会、2025, 348	2	無
37	2025	本間亮介、米澤璃穂、高岡昌輝、神田英輝、大下和徹；カチオン度と分子量が異なる5種類の凝集剤が円石藻プレウロクリシスの凝集特性に及ぼす影響、日本水環境学会第59回年会、2025, 635	2	無

## (5) 「国民との科学・技術対話」の実施

成果番号	発表年度	成果情報	主たるサブテーマ
38	2023	名大研究フロントライン「乾燥不要！バイオ燃料生産のエネルギー収支問題を解決」（主催：名古屋大学、2022年9月22日、オンライン開催、2023年7月25日時点での通算視聴回数2090回）	1
39	2022	あいちサイエンスフェスティバル「微細藻類がカーボンニュートラルな食べ物や燃料になるための課題とは」（主催：名古屋大学、2022年10月31日、オンライン開催、リアルタイム聴講者約50名）	1
40	2023	名古屋大学出前授業「小さな植物が地球の温暖化を防ぐかもしれない」（主催：とよはしプラネタリウム、2023年11月25日、とよはしプラネタリウム、聴講者40名）	1
41	2023	京都大学附属桂インテックセンター研究成果報告会「微細藻類( <i>Chlorella Sorokiniana</i> )を対象とした効率的な油脂抽出のための	2

		凝集・濃縮・脱水条件の検討」（主催：京都大学、2023年1月24日、京都大学桂図書館2階、聴講者約50名）	
--	--	---	--

## (6) 研究成果による受賞

成果番号	発表年度	成果情報	主たるサブテーマ
42	2025	米澤璃穂, 残渣利用拡大に向けたChlorella sorokinianaの二液藻注による凝集効率の向上, 日本水環境学会第59回年会, 年会優秀発表賞(クリタ賞)	2

**Abstract****[Project Information]**

Project Title : Elucidating the Effects of Polymer-Based Flocculants on Lipid Extraction from Microalgae

Project Number : JPMEERF20223C05

Project Period (FY) : 2022-2024

Principal Investigator : Tetsuya Yamamoto

(PI ORCID) : ORCID 0000-0001-8179-900X

Principal Institution : Nagoya University  
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8601, JAPAN  
Tel: +81 52-789-3378  
E-mail: yamamoto.tetsuya@material.nagoya-u.ac.jp

Cooperated by : Kyoto University

Keywords : Carbon neutral, Carbon negative, Microalgae, Solvent extraction, Coagulant

**[Abstract]**

This study aims to investigate the effect of liquefied dimethyl ether (DME) as an extraction solvent on polymer-based flocculants (polymers) contained in microalgae, using a method for extracting oils and functional components without heat drying. Specifically, the study focuses on preventing the contamination of oils extracted from microalgae with DME by polymers, identifying the functional substances contained in the extract (Subtheme 1), and reducing the moisture content of microalgae aggregates recovered by flocculation and centrifugation to 80% or less while maintaining a microalgae recovery ratio of 98% or higher (Subtheme 2).

In Subtheme 1, we first estimated the Hansen solubility parameters for the polymer based on literature values and measured values, confirmed its insolubility in DME both theoretically and experimentally, and demonstrated that the polymer has minimal adverse effects on the extraction process.

Next, DME extraction experiments were conducted using chlorella aggregates, confirming that lipid extraction efficiency equivalent to the conventional chloroform/methanol method could be achieved. Additionally, the absence of polymer components in the extract was clarified through comprehensive instrumental analysis. Furthermore, it was demonstrated that simultaneous extraction of lipids and functional components is possible using DME for other algae as well. Furthermore, it was confirmed that when selecting polymers for these algae, it is necessary to consider the influence of the aggregate's moisture content and its impact on the extraction process.

In Subtheme 2, we first evaluated the basic characteristics of 25 polymers and six types of microalgae, and through flocculation experiments, identified at least one optimal polymer for each algae. Factors influencing flocculation effects were analyzed in detail, including the polymer

backbone, addition amount, stirring conditions, solution pH, and water temperature. Through multiple regression analysis, the primary factors influencing flocculation were identified, and conditions achieving a microalgae recovery ratio of 98% or higher were determined. Furthermore, for the effective utilization of extraction residues, the effectiveness of a two-liquid method using chitosan and sodium polyacrylate was demonstrated. Flocculation experiments using live microalgae were also conducted, confirming the high practicality of the process. Subsequently, the gravity concentration performance was evaluated for reducing energy consumption in the centrifugal dewatering process, achieving a moisture content of less than 80% for all algae.

Finally, based on energy calculations for the entire process considered in this study, which were derived from actual equipment conditions and experimental results, we demonstrated that this method is a promising bio-resource recovery technique with high energy efficiency.

### [References]

Kanda, H. et al. (2024) 'Direct Extraction of Lipids,  $\beta$ -Carotene, and Polyphenolic Compounds from Wet Microalga *Dunaliella salina* by Liquefied Dimethyl Ether', Marine Drugs, 22(10),438.  
DOI: 10.3390/md22100438

This research was performed by the Environment Research and Technology Development Fund (JPMEERF20223C05) of the Environmental Restoration and Conservation Agency provided by Ministry of the Environment of Japan.