

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「藻類・水圏微生物の機能解明と制御による  
バイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」  
研究課題「海洋微生物発酵制御を基盤とした大型  
藻類の完全資源化基盤技術の開発」

## 研究終了報告書

研究期間 平成24年10月～平成30年3月

研究代表者：中島田 豊  
(広島大学大学院  
先端物質科学研究科 教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

本研究プロジェクトでは、海洋微生物群が持つ耐塩性および海藻糖質代謝機能に着目し、1)耐塩無加水高効率メタン発酵によるエネルギー回収を中心として、2)海洋藻類を基質とした高付加価値物質生産、3)メタン発酵残渣処理及び貴重金属・エネルギーの回収、そして 4)発酵原料に適した前処理に関する要素基盤技術の統合的な開発を進め、エネルギー生産収支および経済収支をとともにプラスとする利用プロセスの研究開発を行った。

海洋藻類からのメタン発酵におけるエネルギー回収率を改善するためには、投入エネルギーを少なくすること、そして藻体有機物からのメタン収率の向上が重要である。投入エネルギーを最小化するためには、生藻体を乾燥せずそのまま発酵する必要がある。しかし、生藻体には海水と同程度の約 2-3%の塩分が含まれており、従来の淡水系メタン発酵では塩阻害によりメタン発酵することは困難であった。そこで我々は、特殊環境ではなく大量に入手可能な海洋底泥に着目し、褐藻類であるマコンブ粉砕物からの海水塩条件下でのメタン発酵性能を検討した。その結果、日本国内の複数の海洋底泥微生物群が、マコンブを容易に分解し、天然ガス代替再生可能エネルギーであるメタンを海水塩濃度条件下でも高効率に生成できることを発見した。さらに、この大型褐藻類を容易にメタン化する微生物菌群の集積法を開発するとともに、未希釈・高塩条件下での海洋大型藻類からの長期・安定メタン発酵、さらにはメタン発酵法の律速となる有機酸からのメタン発酵工程を超高速度化する固定床型発酵槽の開発し、藻体の有機酸生成-メタン発酵槽から構成される 2 槽式高速メタン発酵プロセスの開発にも成功した。取得した微生物群は 5%塩存在下でもメタン発酵性能を有しており、海洋藻類はもとより従来メタン発酵困難であった水産廃棄物などの高塩排水などエネルギー化資源の拡大に道を拓くものである。

また、大型藻類は植物体構造を有し、そのままでは微生物による発酵が行えない。これを解決するために本研究においては、コンブを高温の圧縮水で処理し可溶化する水熱前処理法を検討した。その結果、130°C程度での比較的低温で 80%程度の可溶化効率が得られた。水熱処理物はメタン発酵を阻害しなかったことから、メタン発酵のもう一つの律速段階となる固体有機物の加水分解工程を高速化できることが示唆された。また、固相生成物についても液相生成物についても、水熱処理性能は塩の添加による影響はほとんど見られなかった。このことは、実用的には、コンブの水熱前処理にあたって脱塩の処理を行う必要がないことを意味する重要な知見である。

大型藻類からのエネルギー生産における経済性を確保するためには、水熱処理により可溶化した糖類からの高付加価値物質の同時生産が必要である。そこで、海洋微生物ラビリンチュラ類 *Aurantiocytrium* 属を用い、海藻糖質からのドコサヘキサエン酸やアスタキサンチン、スクアレンなど高付加価値油脂の高生産プロセス開発を行った。*Aurantiocytrium* 属は、海藻を構成する特殊な糖質(アルギン酸、マンニトールなど)に対して資化性を持たなかったが、*Aurantiocytrium* 属が資化可能な有機酸やフルクトースにそれぞれ変換する微生物を見だし、*Aurantiocytrium* 属との複合培養による褐藻糖質からの油脂発酵技術を確立した。本技術を活用することにより、褐藻類の主要糖質を原料として遺伝子組換えを使わない食品分野に提供可能な高付加価値油脂の発酵生産プロセスの開発が期待できる。

藻体有機物からのエネルギー・高付加価値物質生産後の残渣には、有機物が残存するとともに貴重金属類、レアアース、有害金属類など様々な金属が含まれており、その処理または再資源化が必要である。廃液中有機酸を油脂に変換する *Nitratireductor* sp. OM-1 株を単離し、メタン発酵の中間産物である酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸を完全資化し、油脂を菌体重量当たり 90%まで蓄積することに成功した。さらに、銅、コバルト、カドミウムなどの重金属や、テルルなどのレアアース、イットリウムなどのレアアースを除去・回収可能な株を取得に成功し、廃液浄化・リサイクルが可能であることが示された。さらにメタン発酵固体残渣については、高極性イオン液体である  $[P_{4,4,4,4}][OH]$  が高い有機物溶解能を示すことを見いだした。このイオン液体を電解質として用い、独自のキャスト法により作製した金属ナノ粒子修飾電極をアノードとする発電用プロトタイプセルを作製し、固体発酵有機物残渣からのエネルギー回収可能な発電・処理システムを開発した。

上記要素技術開発で得られた成果に基づき、全体のプロセス設計および、エネルギー・経済収

支の検討を行うためのプラットフォームを整備し、10t/日の処理規模においてその両方をプラスとするプロセス・操作条件があることを見いだした。

本研究は、将来、我が国が持つ領海を活用した海洋バイオガス田の実現、さらには、新しい海洋バイオガス製造産業の創製はもとより、大型藻類養殖場を藻場として魚介類などの水産養殖施設として複合活用することで、経済性のさらなる改善および水産業振興による経済的インパクトも期待される。

## (2) 顕著な成果

### < 優れた基礎研究としての成果 >

#### 1. 耐塩無加水メタン発酵完全微生物源としての海洋底泥の発見

概要: 高塩条件下でのメタン発酵は従来微生物では塩耐性が低く実用化されていない。我々は、実用化を想定して、特殊環境ではなく大量に入手可能な海洋底泥に着目し、褐藻類であるマコンブ粉砕物からの海水塩条件下でのメタン発酵性能を検討した。その結果、日本国内の複数の海洋底泥微生物群が、マコンブを容易に分解し、天然ガス代替再生可能エネルギーであるメタンを海水塩濃度条件下でも高効率に生成できることを世界で初めて発見した (T. Miura et al., *Bioresource Technology*, **169**: 362–36, 2014)。

これは、海洋微生物群を用いた耐塩メタン発酵法の可能性を切り開く基礎研究成果であり、海洋水圏微生物を用いた、無加水耐塩メタン発酵プロセスの実現可能性を一気に切り開いたという意味において、課題目標の達成に大いに寄与するものであった。

#### 2. 遺伝子組換えによらない高付加価値油脂生産技術の開発

概要: オーランチオキトリウム属はドコサヘキサエン酸、アスタキサンチンなど高付加価値油脂を大量生産する。しかし、海藻特有糖質のアルギン酸やマンニトールを資化できない。我々は、酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* がマンニトールをオーランチオキトリウム属が資化できるフルクトースに変換することを発見、二段階共生培養により海洋藻類基質からの遺伝子組換えに拠らない新規油脂生産技術を開発した (特願 2014-066844, K.H.V. Arafiles et al., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**: 9207-16, 2014)。さらに、アルギン酸を利用可能とする二段階培養系も開発した。

これらの結果は、高コストな設備を必要とする遺伝子組換えによらない高付加価値油脂生産基盤技術として、経済性を重視する本プロジェクトの目標を達成する上で高い価値を持つと考えている。

#### 3. 廃液中有機酸を油脂に変換する *Nitratireductor* sp. OM-1 株の発見

概要: 藻体有機物からのエネルギー・高付加価値植物質生産後の残渣には、有機物が残存するとともに貴重金属類、レアアース、有害金属類など様々な金属が含まれており、その処理または再資源化が必要である。このような廃液中有機酸を油脂に変換する *Nitratireductor* sp. OM-1 株を単離することに成功した (Y. Okamura et al., *Bioresource Technology*, **201**, 215-221, 2016, 特願 2016-007620)。本菌は、メタン発酵の中間産物である酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸を完全資化し、油脂を菌体重量当たり 90% まで蓄積した。

従来、メタン発酵残渣処理は活性汚泥法などのエネルギー消費型プロセスが必要とされていた。しかし、本成果は、海洋水圏微生物を活用することで発酵残渣からもエネルギーを回収しつつ排水処理を行う省エネルギー型プロセス開発の可能性を示したものとして、課題目標の達成に大いに貢献する。

### < 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

#### 1. DNA のノーコンタミネーション増幅技術

概要: 細菌の 99% 以上は培養困難であり、有用微生物を発見しても研究・解析が出来ない。難培養性細菌のゲノム利用のため、夾雑微生物中から標的特異的に全ゲノムを増幅する方法を確立した (特願 2012-261404)。興研株式会社の協力でオープンクリーンシステム KOACH の P

ッシュフードを、バイオ用のベンチトップ型クリーンシステムに改良し、ノーコンタミネーションで微量ゲノム増幅を達成した(H. Takahashi et al., *Bio Techniques*, **61**, 42-46, 2016)。

改良されたベンチトップクリーン COACH は、現在、実用化され、一般に販売されており、一分子 DNA 増幅技術の高精度化に大きく寄与している。

## 2. 耐塩無加水メタン発酵プロセスの長期連続運転

概要: 大型褐藻類を容易にメタン化する微生物菌群の集積法を開発し(T. Miura et al., *Bioresource Technology*, **187**, 275-281, 2015)、未希釈・高塩条件下での海洋大型藻類からの長期・安定メタン発酵(T. Miura, et al., *Bioresource Technology*, **200**, 616-623, 2016)、および有機酸からの高速耐塩メタン発酵法(A. Kita et al., *Journal of the Japan Petroleum Institute*, **59**, 9-15, 2016.)を開発した。取得した微生物群は5%塩存在下でもメタン発酵性能を有していた。本成果は、海洋藻類はもとより従来メタン発酵困難であった水産廃棄物などの高塩排水などエネルギー資源の拡大に道を拓くものである。

本成果は、耐塩メタン発酵プロセスの実用化可能性を示すものであり、これまで困難とされてきた海水利用による大型藻類を原料とした海洋バイオガスプラントの実現が期待されるなど、課題目標の達成に大きく寄与するものであった。

## 3. 油脂生産 *Aurantiochytrium* 属の有機酸資化性の発見

概要: 従来、油脂生産 *Aurantiochytrium* 属は発酵基質としてグルコースやフルクトースなどの非常に限定された発酵基質しか用いることができないと考えられてきた。しかし、本プロジェクトにより、本菌株がコハク酸、乳酸、酢酸などの有機酸資化能力を有することが明らかとなった。さらに、有機酸資化性は株ごとに異なり、カロテノイド高生産性の *Aurantiochytrium* 属 RH-7A-7 株の酢酸に対する資化性が特徴的に高いことを発見した。

酢酸はメタン発酵における主要中間代謝物であり、メタン生成の直接の基質であることから、酢酸生成菌との複合培養系が成立すれば、あらゆるバイオマスから有機酸を経由して液体燃料生産が可能となるばかりでなく、合成ガス(H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>)資化性のホモ酢酸菌を用いると二酸化炭素固定も視野に入ることから、バイオマスからの新規再生可能液体燃料生産技術として有望である(特願 2017-250129)。

## § 2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ① 中島田研究グループ

##### 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
中島田豊	広島大学大学院先端物質科学研究科	教授	H24.10～
田島誉久	広島大学大学院先端物質科学研究科	助教	H24.10～
三浦豊和	広島大学大学院先端物質科学研究科	研究員	H25.1～
喜多晃久	広島大学大学院先端物質科学研究科	研究員	H25.4～
宮本翔太	広島大学大学院先端物質科学研究科	M1～	H27.4～
糸永誠	広島大学大学院先端物質科学研究科	M1～	H29.4～
北川恵美	広島大学大学院先端物質科学研究科	研究補助員	H26.4～H.28.3
福本直樹	広島大学大学院先端物質科学研究科	M1～M2	H25.4～H27.3
山口健志	広島大学大学院先端物質科学研究科	M2	H24.10～H25.3
池田勝哉	広島大学大学院先端物質科学研究科	M2	H24.10～H25.2
矢野友寛	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～M2	H26.4～H29.3
岩崎祐樹	広島大学大学院先端物質科学研究科	D1～D4	H25.4～H28.9

##### 研究項目

- ・ 耐塩性藻体資化・メタン発酵微生物・遺伝子群の探索
- ・ 耐塩性メタン発酵菌叢の構築
- ・ 耐塩性藻体資化・メタン発酵微生物・遺伝子群の機能解析
- ・ 耐塩性メタン発酵菌叢を活用した無加水耐塩メタン発酵最適法の開発

#### ②秋研究グループ

##### 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
秋 庸裕	広島大学大学院先端物質科学研究科	教授	H24.10～
渡邊研志	広島大学大学院先端物質科学研究科	特任助教	H24.10～
Kim Arafles	広島大学大学院先端物質科学研究科	M1～	H24.10～
青井真人	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～	H27.4～
野村夏矢	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～	H27.4～
上原莉世	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～	H28.4～
畑浩介	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～	H28.4～
北堀智希	広島大学工学部	B4～	H29.4～
廣谷 蘭	広島大学工学部	B4～	H29.4～
織田愛海	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～M2	H26.4～H29.3
東 莉沙	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～M2	H26.4～H29.3
恵良本祐里	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～M2	H25.4～H28.3
長野亜希子	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～M2	H25.4～H28.3
岩坂宏明	広島大学大学院先端物質科学研究科	研究員	H24.10～H27.3
大野 洵	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～M2	H24.10～H27.3
佐藤亮介	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～M2	H24.10～H27.3

##### 研究項目

- ・ 大型藻類を資化するラビリンチュラ株の分子育種

- ・ 脂質生合成系を強化したラビリンチュラ株の分子育種
- ・ 藻類多糖を原料とした機能性油脂生産システムの構築
- ・ 発酵油脂の高効率回収・精製技術の確立

### ③岡村研究グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
岡村好子	広島大学大学院先端物質科学研究科	准教授	H24.10～
高橋宏和	広島大学大学院先端物質科学研究科	博士研究員	H25.4～
清水 稜	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～	H27.4～
中井昇太	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～	H27.4～
登 祐介	広島大学工学部	B4～	H29.4～
堀尾京平	広島大学工学部	B4～	H29.4～
野村崇博	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～M2	H25.4～H28.3
松尾忠明	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～M2	H24.4～H27.3
古場和平	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4	H26.7～H27.3
鈴木祥吾	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～M2	H26.4～H29.3
大川内雅彦	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～M2	H27.4～H29.3
木村博美	広島大学大学院先端物質科学研究科	B4, M1～M2	H27.4～H29.3

研究項目

- ・ 各種大型藻類に吸着した金属のプロファイリング
- ・ 金属耐性・細胞内金属蓄積能を有する光合成細菌の探索
- ・ 残渣中の主要金属を吸着する生体分子の開発
- ・ レアメタルやレアアースを吸着する生体分子の開発
- ・ 廃液中の残存有機酸を資化する光合成細菌の探索
- ・ 光合成細菌による発酵残渣浄処理効率の検討・最適化

### ④松村研究グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
松村 幸彦	広島大学大学院工学研究院	教授	H24.10～
伊藤大志	広島大学大学院工学研究科	B4, M1～	H27.4～
Pattasuda Duangkaew	広島大学大学院工学研究科	教育研究補助職員	H26.4～H29.12
松本龍之介	広島大学大学院工学研究科	M1～M2	H25.4～H27.3
Rozyanti binti Mohamad	広島大学大学院工学研究科	D1～D3	H25.10～H28.9

研究項目

- ・ 水熱前処理における塩分の影響の確認とその機構の解明
- ・ 水熱前処理による糖と栄養成分の挙動確認
- ・ 解明された水熱前処理機構に基づく最適プロセスの開発

### ⑤中村研究グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
中村暢文	東京農工大学大学院工学研究院	教授	H27.9～

作田 陸	東京農工大学大学院工学研究科	D3	H29.4～
八巻絵里	東京農工大学大学院工学研究科	B4, M1～M2	H27.9～
岡 耕佑	東京農工大学大学院工学研究科	B4, M1～	H28.4～
柴田大貴	東京農工大学大学院工学研究科	B4, M1～	H28.4～
島倉雅子	東京農工大学大学院工学研究科	技能補佐員	H28.4～H29.10
西村直美	東京農工大学大学院工学研究科	技能補佐員	H29.10～
阿部隼人	東京農工大学工学部	B4～	H29.4～
佐藤梨沙	東京農工大学工学部	B4～	H29.4～
藤田恭子	東京農工大学大学院工学研究科	講師	H27.9～H28.3
池田一磨	東京農工大学大学院工学研究科	M2	H27.9～H29.3

#### 研究項目

- ・ メタン発酵残渣溶解用イオン液体の探索
- ・ メタン発酵残渣溶解用イオン液体の最適化
- ・ イオン液体に溶解した残渣成分からの電気エネルギーの抽出
- ・ 大型藻類の前処理のためのイオン液体の作製

#### (2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

現在までに、国際及び国内学会、シンポジウム、ワークショップでの研究成果の迅速な発表、紹介を通じた国内外の研究者、産業界への情報発信を中心としたネットワーク形成につとめてきた。

その中で、例えば、オーランチオキトリウム属の分子育種に必須のゲノム解析について、沖縄科学技術大学院大学と、テルル蓄積微生物が形成するテルル粒子の特性について、(独)物質材料研究機構との共同研究を開始するなど、国内研究機関研究者との研究連携が進んでいる。さらに、広島大学バイオマスイノベーションセミナーを中心として、適時国内、国際シンポジウムを開催、広くバイオマス利活用技術に関する先端国内外研究者を招聘し、産業界研究者も含めて幅広い議論を行うことで、ネットワーク形成を推進している。

このような活動のなかで、複数の民間会社が当プロジェクトの研究開発内容に興味をもち接触してきている。その中で、耐塩性微生物菌叢の作成技術を活用した高効率メタン発酵プロセスについて磐田化学工業株式会社との共同研究を開始し、油脂高生産株の育種や複合培養系による油脂発酵プロセスの事業化研究についても長瀬産業株式会社と共同研究契約を締結し、研究開発を進めるなど産業界との連携は進んでいる。

国際連携、ネットワーク形成についても強力に推し進めており、その詳細を以下に記述する。

- ・ 当プロジェクトでは、International Symposium on Marine Biomass Utilization/ Japan-Hawaii Joint Workshop "Marine Biomass Utilization"を、広島大学およびハワイ大学で開催してきた。広島大学へは、ハワイ大学側のカウンターパートである S. Masutani 教授、B. Yoza 博士の他、P. Takahashi 教授(ハワイ大学)、P. Antal 教授(ハワイ大学)、鈴木敦教授(静岡大学)らを招聘して、大型藻類の利用可能性について議論を続けている。さらに、平成 25 年度に喜多博士研究員を S. Masutani 教授、B. Yoza 博士の研究室に短期派遣し、ハワイにおける大型藻類の賦存量、および現地海洋菌叢の大型藻類のメタン発酵特性について共同調査を行うなど、研究連携に向けた準備を進めている。さらに、2017 年 5 月に Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2017 において、Algal Workshop を開催し、アジア、ヨーロッパ、アメリカ合衆国から大型藻類研究を先導する研究者を招き、各地域での大型藻類のエネルギー・マテリアル利用に関する講演を頂くとともに、今後のコラボレーションに関わる議論を行っている。
- ・ 2015 年 9 月に、当プロジェクトの中島田、松村、岡村がデンマークでのバイオマスエネルギー利用に関するワークショップに参加した。ここで、当プロジェクトの研究概要を紹介するとともに、大型藻類を含むバイオマス利用技術について、日本およびデンマークの先端研究者と議論を進めた。デンマークでは 2050 年までに、国内消費エネルギーの 100%を再生可能エネルギー

とすることを目標として、そのうち 40%をメタン発酵によるバイオガスで賄うことを想定しており、メタン発酵技術開発に政府資金が多く投資されている。このような状況下で、このワークショップにおいて I. Angleaki 教授(デンマーク工科大学)、J. L. Nielsen 教授(オールボー(Aalborg)大学)、S. Hafner 准教授(南デンマーク大学)らと、大型藻類を含むメタン発酵の今後の研究課題について議論し、メタゲノム解析による菌叢構造と代謝構造の高精度な解析に基づくメタン発酵菌叢のモニタリング、最適化による安定化・高性能化が重要であるとの共通認識を得た。さらに、2015年9月(広島大学)、2017年3月(デンマーク工科大学)第2回ワークショップを開催し、デンマーク研究者らと今後の研究連携について議論を深めた。その一貫として、本プロジェクトで発見した、有機酸から油脂エステルを細胞内で合成することができる *Nitratireductor* sp. OM-1 株を用いた、メタン発酵廃液の油脂生産-廃液処理システムの共同研究をデンマーク工科大学 Prof. Irini Angelidaki 教授と開始している。

- Asean 諸国との国際連携も進めている。平成 26 年度、岡村 G が有する海洋性微生物単離・解析技術による有用物質生産菌開発について、インドネシア技術評価応用庁(Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, BPPT)との共同研究を開始、昨年度 BPPT より 3 名の研究者が来日し、単離・解析技術の共有および実際の研究開発を行った。さらに、本年度 3 月に、中島田が BPPT を訪問し、上記共同研究に関する打ち合わせを行うとともに、本プロジェクトをセミナーにて紹介し、当プロジェクトとの研究連携についての議論を行った。また、これまでに、中島田研究 G では、ベトナムでのメタン発酵技術の普及を目的として、ベトナム科学技術アカデミー(Vietnam Academy of Science and Technology)、バイオテクノロジー研究所から、メタン発酵研究者を受け入れており、基本的なメタン発酵技術の供与、共有を行ってきた。

さらに、海洋微生物による有用油脂生産技術の共同開発研究を端緒に、2015年10月に広島大学大学院先端物質科学研究科とフィリピン・サントマス大学大学院とで部局間交流協定を締結した。秋 G ではすでにサントマス大学から大学院生 1 名を国費留学生として受け入れており、本プロジェクトで成果を挙げ、論文・学会発表を通じて受賞もしている。今後も引き続き、研究者や学生の交流を活発にしていく予定である。

このように、当プロジェクトの開発技術に対する需要は Asean 地域全体として大きく、現在、広島大学を中心として日本国内の他大学も巻き込み、当プロジェクト開発技術の高度化・汎用化を含む日本-Asean 共同研究拠点の設置を目指している。

## § 3 研究実施内容及び成果

### 3.1 大型藻類の耐塩無加水メタン発酵技術の開発(広島大学 中島田G)

#### 1-1) 耐塩性藻体資化・メタン発酵微生物・遺伝子群の探索

大型藻類は湿重量の3%程度が塩分であり、その塩分濃度はメタン発酵に影響を及ぼす。塩分濃度を水で希釈することによりメタン発酵は可能であるが、水の使用はメタン発酵にかかるコストに影響を及ぼし得るため、塩分濃度無希釈でメタン発酵を行う必要がある。本研究項目では、海洋大型藻類を塩分濃度無希釈でメタン発酵を行うため、海水に順応した海洋底泥を微生物源として探索し、海洋底泥中微生物がもつ大型藻類からの海水塩濃度下でのメタン発酵能力を評価した。

##### (1) 海洋底泥の種々の基質代謝能

海洋藻類のメタン発酵高速化を目的とした海洋メタン発酵微生物群の網羅的な解析は行われていないことから、海洋底泥を高塩微生物リソースとして採取し、3%塩化ナトリウムを含む培地で海洋藻類、および含有糖類を炭素源として嫌気培養した。その結果、海洋底泥はセルロースを除く試験した全ての藻類およびその構成糖を代謝し、メタン発酵の基質となる可溶性有機酸を生成した。このことから、海洋底泥が海洋大型藻類からのメタン生産の耐塩微生物源として有望と考え、さらに詳細な解析を行うこととした。

##### (2) 様々な海洋底泥のメタン生成活性評価

海洋底泥を微生物源、コンブを基質として海水塩濃度下でのメタン発酵能力を評価した。ここで、各メタン発酵過程の種々の基質を使用して、微生物源として種々の海洋底泥または淡水系メタン発酵菌叢を接種し、3%塩化ナトリウム含む培地中で、37°Cで嫌気培養した。

本検討により、海洋底泥が3%塩化ナトリウム存在下でも、コンブを基質として旺盛なメタン生産能を有することが明らかとなった。一方、淡水系微生物源については3%塩化ナトリウム存在下でメタン生成が阻害されたことから、海洋底泥が耐塩無加水メタン発酵実現のための新規微生物源として有望であることが強く示唆された。また、メタン生成の各過程の活性を調べた結果、加水分解・脂肪酸生成過程および水素資化メタン生成過程においては、海洋底泥は淡水系微生物源と比較して同等かそれ以上の活性を有し、その他の過程においては、海洋底泥は淡水系微生物源より高い活性を有することが分かった。以上の成果を、原著論文2として公表した。

#### 1-2) 耐塩性メタン発酵菌叢の構築(広島大学 中島田G)

先に見いだした海洋底泥由来耐塩メタン生成菌叢は、微生物存在量が低く、そのままでは水分含量90%の未希釈藻体のメタン発酵菌叢として活用できない。そこで本研究項目では、海洋底泥由来耐塩メタン生成菌叢を、未希釈藻体の連続処理を可能とする耐塩メタン発酵菌叢にまで集積するための乾燥コンブの逐次添加法を検討した。さらに、得られた発酵菌叢を用いた無希釈コンブの連続メタン発酵性能を検討・評価し、実用的に使用可能な耐塩性メタン発酵菌叢を構築した。

##### (1) 流加培養による褐藻の耐塩メタン発酵菌叢の調製

まず、乾燥コンブを微生物源である海洋底泥に逐次添加する流加培養法により、コンブ由来塩分蓄積条件下でのメタン生産能の強化を行った。ここでは、濃縮海洋底泥に3% NaCl含有培地を添加したスラリーに、乾燥コンブを1回の添加当たり培地水分量に対して1 wt% TS分添加して静置嫌気培養した。メタン生産がほぼ停止した後、再度基質を添加することを繰り返すことで、関連微生物を集積した。さらに、乾燥コンブと嫌気水を生コンブ相当の10 wt%となるように半連続的に添加した。

流加培養において、コンブ総添加量が生コンブの固形分含有量である10 wt%となる10回目の添加時も、メタン生成速度は上昇したままであり、メタン生成速度は8倍に増加し、塩濃度は5% NaCl相当に達した。このことから、海洋底泥由来の海洋メタン発酵菌叢は高い海水濃度以上の耐塩性を有しており、大型藻類の耐塩性メタン発酵実現の可能性がさらに高くなった(公表文献8)。

##### (2) 無希釈褐藻を基質として連続メタン発酵による微生物菌叢の安定性評価

大型褐藻類を高効率にメタン発酵するためには、無加水で連続的に処理できる必要がある。そこで、得られたコンブ馴養海洋底泥由来培養液のコンブからの半連続メタン発酵性能を評価した。

塩濃度約 4% NaCl 相当であったコンブ馴養海洋底泥由来培養液を使用し、生コンブに相当する 10 wt%コンブスラリーを基質として、2.0 g VS (volatile solid, 揮発性有機物)/L/day で培養を開始した。安定したメタン生産を確認後、2.9 g VS/L/day に基質負荷を上昇させて培養した。しかし、しばらくの培養操作後、有機酸が蓄積してメタン収量が減少し始めた。そこで、1.7 g VS/L/day に有機物負荷を低下させて培養したところ安定してメタンを生産することができた。従って、完全混合培養系では、コンブ無希釈条件で、1.7 ~ 2.0 kg VS/L/day での耐塩メタン発酵が可能であると考えられた。ここで、有機物負荷 1.7 g VS/L/day における、メタン収率は 346 mL/g VS substrate となり、有機物利用率は 82%に達しており、既報と比較して、高効率にコンブからの半連続メタン発酵が可能であることが示された((表 1-1、原著論文 12)。これらのことから、無加水コンブから高効率に連続メタン生産可能である耐塩メタン発酵菌叢を構築できることが示された。

表 1-1 藻類の連続メタン発酵性能の比較

Substrate	OLR (g-VS/L/d)	メタン収率 (mL/g VS)	メタン生成速度 (mL/L/day) <sup>b</sup>	Ref.
加水条件				
<i>Laminaria hyperborea</i>	1.65	280	462	Hanssen et al., 1987
<i>Laminaria saccharina</i>	1.65	230	380	Hanssen et al., 1987
<i>Ascophyllum nodosum</i>	1.75	110	193	Hanssen et al., 1987
<i>Laminaria hyperborea</i>	1.00	230	230	Hinks et al., 2013
無加水条件				
<i>Saccharina latissima</i>	1.73	238	412	Jard et al., 2012
<i>Saccharina japonica</i>	2.00	358	695	This study
	2.87	335	961	This study
	1.74	346	602	This study

### (3) 褐藻からの耐塩半連続メタン生産における過負荷の影響

#### 【基質濃度上昇による過負荷の影響】

OLR を上昇させるには、HRT を短縮することにより達成されるが、通常の完全混合メタン生産の場合、HRT の短縮化は微生物の流出によるメタン生産不安定化につながる。大型藻類のような水分含有基質の場合、濃縮して固形物含有量を上昇させることによっても、OLR を上昇させることができる。そこで、濃縮コンブを使用した基質濃度上昇による過負荷の、コンブ耐塩半連続メタン生産への影響を調べた。

(2-1)の無加水コンブ(10 wt% TS)からの半連続培養液を種培養液として使用し、HRT = 68 day に固定し、条件 1: 15 wt% TS コンブ使用、OLR = 1.7 g VS/kg culture/day から、条件 2: 20 wt% TS コンブ使用、OLR = 2.3 g VS/kg culture/day、そして条件 3: 15 wt% TS コンブ使用、1.7 g VS/kg culture/day に変化させて、700 mL バイアル内で 37 °C で 3 重に半連続培養を行った。

条件 2 の 20% TS 基質を使用した高負荷により、試験した 3 本の培養液の中で、1 本目の培養液が著しく不安定化した。その不安定化は、プロピオン酸の蓄積に始まったことから、プロピオン酸蓄積が不安定化の兆候となるようであった。真正細菌については、条件 2 の高負荷時、変化していったが、不安定化した 1 本は、他の 2 本と比較して大きく変化した。一方、古細菌については、条件 2 の高負荷時、いずれの培養液についても変化したものの、元に戻る傾向があった。よって、不安定化は、真正細菌の変化による、酸生成過程とメタン生成過程のバランスの不均衡化により起こった可能性が考えられた。微生物菌叢と運転パラメータとの関係を調べた結果、真正細菌については、ある分類群が、不安定化につながったプロピオン酸および酢酸の蓄積と正に関係した。よって、真正細菌のある分類群の割合の増加が、メタン生産不安定化に関与した可能性が考えられた。

#### 【HRT 短縮による過負荷の影響】

コンブ耐塩無加水半連続メタン生産を改善するには、HRT を短縮することが一般的である。そこで、HRT 短縮による過負荷の、コンブ耐塩半連続メタン生産への影響を調べた。

(3-2-1)の濃縮コンブ(15 wt% TS)からの半連続培養液 2 本を種培養液として使用し、15 wt% TS の濃縮コンブを使用し、条件 1: HRT = 58 day、OLR = 2.0 g VS/kg culture/day、条件 2: HRT = 49

day、OLR = 2.3 g VS/kg culture/day、条件 3: HRT = 58 day、OLR = 1.9 g VS/kg culture/day に変化させて、700 mL バイアル内で 2 重のままで半連続培養を行った。その結果、条件 2 の高負荷により、不安定化の兆候であるプロピオン酸が蓄積した。条件 3 の低負荷においても、その不安定化は回復せず、メタン生産量が減少し続け、さらに不安定化が進行した。よって、HRT 短縮による不安定化の、HRT 延長による回復は困難であることが考えられた。

### 1-3) 耐塩性藻体資化・メタン発酵微生物・遺伝子群の機能解析

メタン発酵は、固形物加水分解、脂肪酸酸化、メタン生成段階からなる微生物エコシステムである。これを高速化するためには各段階で関与する微生物機能を掌握することが重要である。そこで、藻体メタン発酵に関与する微生物群の詳細な構造・機能解析を行った。

#### (1) 耐塩メタン発酵における共生プロピオン酸酸化菌の解析

プロピオン酸は、メタン発酵における中間代謝産物であり、上記連続培養において有機物過負荷時に酢酸とともに蓄積することから、プロピオン酸分解菌の推定、および流加培養液のプロピオン酸分解における塩耐性を評価した。

流加培養は、2.5 g/L のプロピオン酸ナトリウム含む培地 100 mL と海洋底泥 140 mL を、700 mL バイアル内で 37 °C で 3 重に静置嫌気培養し、基質消費後、培養液上清の一部を終濃度が同じとなるように濃縮基質溶液と入れ替え、合計 10 回培養することにより行った。

プロピオン酸分解速度が 8 倍に増加した流加培養液は、既知のプロピオン酸分解菌が検出限界以下であったが、増加していた *Kosmotoga* など 4 群がプロピオン酸分解に関与していることが考えられた。さらに、プロピオン酸流加培養液は、淡水系のメタン発酵培養液をプロピオン酸で集積した他の例よりも、プロピオン酸分解における塩耐性が高いことが分かった。これらのことから、海洋底泥由来のプロピオン酸分解菌叢は、プロピオン酸分解において塩耐性を有していることが示された(原著論文 11)。

#### (2) 海洋性酢酸資化メタン生成菌の同定および耐塩性解析

上記連続培養において、有機物過負荷時に酢酸が蓄積することから、酢酸資化性メタン生成菌がメタン発酵を律速する一要因になっている。そこで、発酵高速化の糸口を見いだすために、酢酸を炭素源として無限希釈法による海洋底泥からの耐塩性酢酸資化性メタン生成菌の単離を試みた。結果としては完全に純化することはできなかったが、16srRNA 遺伝子比率として 99%以上の純度で、耐塩性 *Methanosaeta* 属細菌 (strain H<sub>A</sub>) を集積することに成功した。本菌は 0%~12% NaCl 濃度化で増殖し得る高い耐塩性を有しており、NaCl 濃度 0%および 9%での strain H<sub>A</sub> の増殖率はそれぞれ 0.037h<sup>-1</sup> および 0.027h<sup>-1</sup> であった(図 1-1)。また、セラミック担体を用いた固定床リアクター連続培養により酢酸から 70mmol/L/d でのメタン生産に成功した(原著論文 15)。

#### (3) 褐藻類構成糖質以外の基質からの耐塩メタン生産

塩分含有排水処理は産業や都市において必要である。連続処理を開始するには、微生物の活性化が必要であり、流加培養により達成することができる。そこで、糖、タンパク質、脂質の各種基質を使用して塩条件下で微生物源である海洋底泥の流加培養を行い、流加培養によるメタン生産の改善が様々な塩分含有排水に対して応用可能であるか調べた。

基質として寒天、デンプン、牛血清アルブミン(BSA)、トリオレイン酸グリセリルを、微生物源として海洋底泥を使用し、嫌気条件下で、37 °C、200 rpm で回転振とう培養した。

BSA を除く全ての基質から、理論収量に近い量のメタンが生産された。BSA からのメタン収量は、流加培養により改善され、最大メタン生成ポテンシャルは理論収量となった。いずれの基質の場合においても、メタン生成速度は改善されたことから、海洋底泥を使用した本流加培養法は、様々な塩分含有排水の連続処理に応用可能であることが考えられる(原著論文 30)。

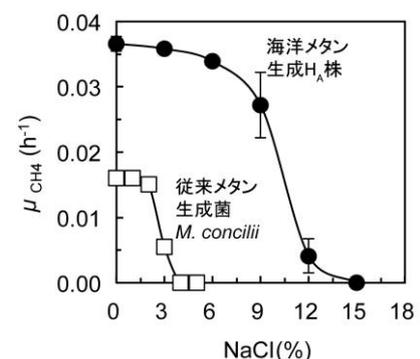


図 1-1 酢酸資化メタン生成菌の比増殖速度に及ぼす塩濃度の影響

#### (4) 微生物共生系によるアルギン酸分解機構の解明

海洋で最も賦存量が多い褐藻類の主要成分であるアルギン酸は難分解性糖質であり、有機酸-メタン発酵の障害となる。我々は、広島湾内の海砂サンプルからアルギン酸を長期に渡り安定的に嫌気分解する複合微生物群を発見した。次世代シーケンシングを活用した 16S rRNA 遺伝子解析とメタゲノム解析により、菌叢構造および菌叢におけるアルギン酸嫌気代謝経路を明らかにした(原著論文 16)。

さらに、アルギン酸分解に関与する微生物の単離を試み、本菌叢を構成する 2 種の優占種 HUA-1 (*Clostridium* 属) および HUA-2 (*Dysgonomonas* 属)、そして付随種である HUA-3 (*Citrobacter* 属) の単離に成功した。HUA-2 に関しては、16S rRNA 遺伝子配列、基質特異性、発酵生産物、主要脂肪酸組成、生理・生化学的特徴から *Dysgonomonas alginatilytica* として命名し、新種として提案することができた(原著論文 9)。

単離菌 HUA-1 や HUA-3 は単独でアルギン酸を分解することができなかった。HUA-2 は単独でアルギン酸を分解することができたが、その分解能力は菌叢時と比較して顕著に低かった。しかしながら、単離菌の混合培養と継代培養、そして T-RFLP による各世代の菌叢構造の解析により、混合培養系では 10 世代継代培養後も HUA-2 だけでなく HUA-1 および HUA-3 の存在が確認された。これらの結果から、HUA-1 および HUA-3 は単独でアルギン酸を資化することができないが、HUA-2 との何らかの共生システムによって、アルギン酸培地中で増殖することが可能となること分かった。さらに興味深いことに HUA-2 も HUA-1 または HUA-3 との混合培養によって、単独培養時よりも増殖およびアルギン酸資化機能が強化されることが明らかとなった。

さらに、HUA-2 培養上清中からの未知増殖基質の精製と培養試験により、本菌叢の共生メカニズムの一端が明らかとなっていった。現在までの結果から予想される分解機構として、HUA-2 は単独でアルギン酸ポリマーを分解することができるが、アルギン酸分解物(オリゴマー)が蓄積してしまうことによって増殖が阻害されてしまう。一方、HUA-1 はアルギン酸ポリマーを分解することができないが、オリゴマーを分解資化することができる。そのため、菌叢中では HUA-1 がアルギン酸分解により生じたオリゴマーを速やかに資化することによって、HUA-2 の増殖阻害が解除されることが予想された(図 1-2)。これらの予測は、アルギン酸オリゴマーを用いた培養(阻害)試験や、単離菌のゲノム解析(東京農工大学、モリ テツシ先生)によるアルギン酸リアーゼ遺伝子の同定結果により裏付けされた。一方、HUA-2 と HUA-3 の共生メカニズムはまだ解明できていない。しかしながら本研究では、環境中には単独で難分解糖質を分解することができない(または機能が弱い)にもかかわらず、いとも簡単に分解してしまう共生メカニズムが存在することを実験的に示し、そのメカニズムの一端を明らかにすることができた。

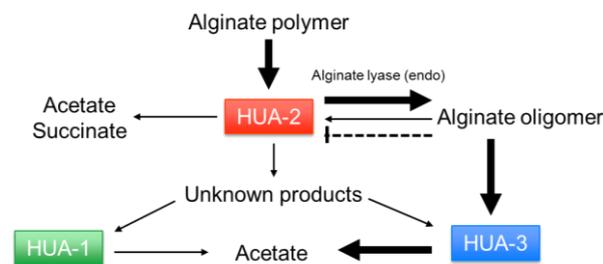


図 1-2 予想される共生系アルギン酸分解機構

#### 海洋性菌叢によるアルギン酸からの VFAs 生産

アルギン酸は、褐藻類由来の有望な炭素源であり(S. Kawai, *et al.*, (2014) *J. Biosci. Bioeng.* 117, 269-274)、近年ではエタノールやピルビン酸、Volatile Fatty Acids (VFAs) 生産の基質としても利用されているが、その報告例はまだ少ない。VFAs は 6 個以下の炭素原子からなる短鎖脂肪酸であり、バイオプラスチックやエネルギー(バイオガス、バイオディーゼル)生産などへ広く応用できる。そこで、本研究では海洋底泥から海洋性アルギン酸分解菌叢の取得とその解析および VFAs 生産への応用を目的とした。

有明海の底泥から、3%NaCl 存在下でアルギン酸を効率的に分解することができる海洋性菌叢 A302 を取得することに成功した。本菌叢は HRT=2d の半連続培養においても安定してアルギン酸を分解し、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、コハク酸を生産した。また、本菌叢の優占種は *Photobacterium*、*Mangrovibacterium*、*Petrimonas* 属細菌の近縁種で構成されており、その存在比はそれぞれ 62.4、18.8、18.8%であることが明らかとなった。本菌叢の構成菌の単離を試みたところ、

優占種である *Photobacterium* 属細菌と付随種である *Shewanella* 属細菌を単離することができた。一方、その他の優占種である *Mangrovibacterium* および *Petrimonas* 属細菌は単離できなかった。また、*Photobacterium* 属細菌は単独でアルギン酸を分解することができたが、*Shewanella* 属細菌はアルギン酸を分解することができなかった。さらに、興味深いことにアルギン酸分解能を持つ *Photobacterium* 属細菌 (A1 株) と分解能を持たない *Shewanella* 属細菌 (L1 株) を混合培養すると、A1 株単独培養時よりもアルギン酸分解能が向上することが分かった。

そこで、50g/l のアルギン酸を単独炭素源とした培地で菌叢 A302 および合成菌叢 (A1 株+L1 株) を培養したところ、A302 培養系において培養 36 時間で約 15.6g/l の total VFAs を生産した (図 1-3)。主な生産物は酢酸 (約 11.1g/l) およびプロピオン酸 (約 2.6g/l) であった (図 1-4)。一方、合成菌叢では、培養 42 時間で約 17.9g/l の total VFAs を生産し、主な生産物は酢酸 (約 8.5g/l) とギ酸 (約 5.8g/l) であった (図 1-3,1-4)。total VFAs の生産速度は A302 で  $26.2 \pm 1.51$  g/l/d、合成菌叢で  $18.5 \pm 0.97$  g/l/d であった (表 1-2)。その生産速度は、これまで報告されている *Sphingomonas* sp. strain A1 によるアルギン酸ナトリウムからのピルビン酸生産の速度 ( $2.28$ g/l/d) と比較して約 12 倍 (A302) および 8 倍 (合成菌叢) と非常に高い値を示した。この結果から、本研究で取得した海洋性アルギン酸分解菌叢 A302 および単離菌 A1 株と L1 株で構成される合成菌叢によるアルギン酸からの VFAs 生産システムは、これまでに報告されているシステムと比較して、より高速であることが示された。また、A302 および合成菌叢は 3%NaCl 条件下での培養が可能であるため、培養に海水を使用することもできる。したがって、高塩濃度の食品残渣の処理にも利用でき、淡水の利用も削減することができる。

A302 は合成菌叢と比較して VFAs の生産速度が約 1.4 倍高く、炭素収率も 1.2 倍高かった。しかしながら、半連続培養や継代培養の過程で、菌叢構造や生産物に変化してしまい、安定性に欠ける可能性が考えられる。一方で、単離菌 A1 株と L1 株で構成された合成菌叢は、その構造がより単純化されており、それぞれの菌を単独で培養および保存が可能である。そのため、培養中のトラブルで構成菌が死滅したり、コンタミネーションにより菌叢構造が変化してしまった場合でも、容易に再構築することができるため、A302 と比較して安定性に優れている。

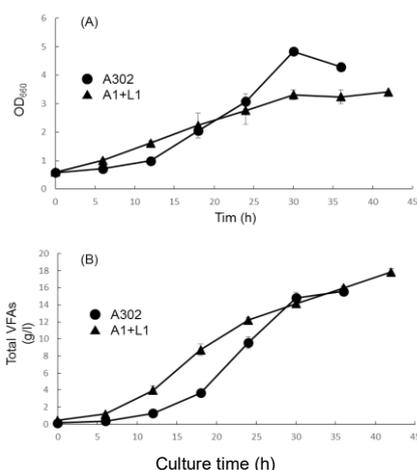


図 1-3 海洋性菌叢 A302 および合成菌叢によるアルギン酸からの VFAs 生産

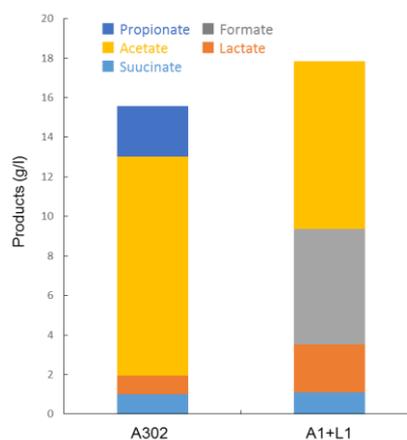


図 1-4 A302 および合成菌叢により生産された VFAs の組成

表 1-2 アルギン酸および大型藻類を基質とした物質生産

Inoculum	Substrate	Products	Total VFAs (g/l)	Production rate (g/l/d)	Ref.
AD sludge <sup>a</sup>	<i>Laminaria japonica</i>	Ace, Pro, But	9.80	2.45	Xu et al. (2015)
AD sludge <sup>a</sup>	<i>Laminaria japonica</i>	Ace, Pro, But	15.2	5.1	Pham et al. (2012)
<i>Sphingomonas</i> sp. A1	Sodium alginate	Pyr	4.56	2.28	Kawai et al. (2014)
Marin bacterial consortium A302	Sodium alginate	Ace, Suc, Lac, Pro	15.6±0.55	26.2±1.51	This study
Synthetic bacterial consortium A1 + L1	Sodium alginate	Ace, For, Suc, Lac	17.8±0.39	18.5±0.97	This study

## (5) 海洋性菌叢によるキチンの微生物変換

本研究で我々は、有明海の底泥から37°C、3%NaCl存在下でキチン粉末を効率的に分解し、メタンを生成する菌叢を馴養することに成功した。本菌叢は継代培養を繰り返しても安定してメタンを生産し、5g/lのキチン粉末から、21日間で352ml/g-VSのメタンを生産することができた。

### 1-4) 耐塩性メタン発酵菌叢を活用した無加水耐塩メタン発酵最適法の開発

#### (1) メタン生産に及ぼす褐藻前処理物の効果

メタン発酵原料を前処理することにより、メタン生産が改善される可能性がある。そこで、各前処理のメタン生産に及ぼす影響を調べた。

##### 【湿式微粉碎処理の影響】

メタン発酵原料の微粉碎処理により、メタン発酵へ影響がもたらされるかもしれない。そこで、原料として生コンブ粗粉碎物(切片)を使用し、グラインダーによる湿式微粉碎処理物のメタン生産を調べたところ、生コンブ湿式微粉碎処理物と生コンブ未処理物と比較して同程度のメタン生産となった。これは、エネルギーを必要とする粉碎工程を省くことができることを意味しており、エネルギー生産基質としての藻類の有用性を多いに示すものである。

##### 【水熱処理の影響】

水熱処理により、メタン発酵原料であるコンブを可溶化することにより、メタン発酵の律速段階の一つであるメタン発酵過程初期の固形物可溶化過程を高速化できる。しかし、水熱処理は、フルフルールなどの増殖阻害物質を生成する可能性も有する。そこで、コンブ水熱処理物のメタン生産能を調べた。3% NaCl溶液にコンブを0.2%添加し、170°Cで2.5min連続水熱処理したものとしてメタン発酵を行った。その結果、水熱処理物は、未処理物と比較して、メタン生成速度およびメタン収量とも変わらず、水熱処理によるメタン発酵への大きな阻害効果は認められなかった。本知見から、メタン発酵の律速段階となる固形物の可溶化を高速化する水熱可溶化前処理を導入した2段階式高速メタン発酵プロセスを開発することとした。

#### (2) 褐藻の耐塩2段階式メタン生産

##### 【有機酸からの固定化メタン発酵槽の開発】

2段階式メタン生産プロセスは、1段目で揮発性脂肪酸を生成させ、2段目の微生物を保持するリアクターでメタンを高速に生産する。有機酸発酵過程とメタン発酵過程を分離することで、それぞれの発酵条件を最適化でき処理を高速化できる。特に、後段のメタン発酵過程は酢酸資化性メタン生成菌の増殖が非常に遅く、メタン生成菌をリアクター内に高密度に保持することがメタン発酵高速化の大きな鍵となる。

そこで、本研究では、海洋底泥を馴養することでシルトに固定化された酢酸資化メタン生成菌を用いて、3%塩濃度下で酢酸からの高速メタン発酵を試みた。人工海水を用いて37°Cで6か月間、回分培養後、馴養したシルトを含む底泥を固定床とするメタン発酵槽を構築、酢酸を単一基質、3%塩濃度下、初期希釈率2.0d<sup>-1</sup>の速度で連続培養を始めた。希釈率を20d<sup>-1</sup>まで段階的に上昇させたところ、16.2d<sup>-1</sup>の希釈率で750mmol/L/dの最大メタン生産速度が得られた。その際の酢酸除去率は77%であった(原著論文13)。塩濃度が低い条件では、thermophilic down-flow packed-bedリアクターを用いた連続培養で598mmol/L/dのメタン生産効率と65%の酢酸除去率

が報告されている(M. Tatara, *et al.*, (2008) *Bioresour. Technol.* 99, 4786-4795)が、これと比較しても今回の研究で、高塩という悪条件において酢酸からの顕著に高いメタン生産効率が得られたと言える。

さらに、1-2) (2)において、連続発酵の過負荷条件で酢酸とともにプロピオン酸の蓄積が見られたことから、2段目を酢酸とプロピオン酸を基質とした塩条件下で上記と同様の固定床メタン発酵槽を構築した。コンブで流加培養することにより活性化した海洋底泥を充填し、塩濃度 3%NaCl 相当の 200 mM 酢酸および 90 mM プロピオン酸を含む基質を投入し、希釈率を上げていったところ、有機物負荷速度 25 g COD/L/day、HRT = 0.77 day で、メタン収量が減少することなく、メタンを生産することができた。以上のことから、海洋シルトを固定化担体とする固定床型有機酸の耐塩高速メタン発酵法の有効性が明らかとなった。

そこで、2 段階プロセスの実現可能性を検証するために、完全混合型の連続有機酸発酵槽を構築し、有機物負荷速度 21 g VS/L/day で処理したコンブの有機酸発酵物の上清画分を上述の固定床メタン発酵槽に投入した。有機物負荷 21 g VS/L/day でコンブの有機酸発酵処理物の上清画分をメタン発酵槽に同速度で投入する2段階プロセスを稼働したところ、有機酸をほぼ全て消費し 3.1 L/L/day の速度でメタンを生産することができた。この 5wt%コンブからの分割 2 段階メタン生産に加えて、10 wt%コンブの 120 °C 水熱処理物からの同時 2 段階メタン生産を試みた。120 °C 水熱処理において遊離フェノール濃度が上昇しない 6 h 処理物の遠心分離後上清の 100 μm メッシュ濾過物に、2% NaHCO<sub>3</sub> を添加したものを投入原料として使用した。OLR を 27.5 g COD/L/day (未処理コンブを使用した場合の OLR = 21.1 g VS/L/day に相当)まで上昇させたが、メタン生成速度は 1.7 L/L/day にとどまった。培養期間中、メタン発酵槽内の微生物が固定化されたシルト槽の流出が見られたことから、メタン生成菌群の流出によりメタン生成速度は制限された可能性が高い。従って、シルト成分の流出を抑えるようにメタン発酵槽の設計を変更することにより、高速2段階メタン発酵が可能となると考えられる。

### 3. 2 高付加価値油脂生産技術の開発(広島大学 秋グループ)

海藻バイオマスを用いたメタン発酵プロセスで低価格エネルギーを提供するシステムにおいては、高付加価値物質の同時生産によってコストバランスを安定化する技術開発が必要となる。本研究では、ドコサヘキサエン酸、アスタキサンチン、スクアレンなど高付加価値油脂の生産能を有する従属栄養型海洋真核微生物ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* (オーランチオキトリウム) 属を用いて、海藻特有の糖質を利用する新規技術とゲノム情報を駆使した分子育種を組み合わせ、海藻からの効率的油脂生産の実用化に向けた基盤技術の確立をめざした。

#### 2-1) 海藻糖質資化系および脂質生合成系を標的とした分子育種

##### (1) 海藻糖質資化系を標的とした分子育種

海藻糖質を用いた油脂発酵を単一微生物で実現するために、マンニトールをフルクトースに変換するマンニトール-2-脱水素酵素の遺伝子を *Gluconobacter* 属から単離して *Aurantiochytrium* 属で発現させたところ、マンニトール培地における増殖性にわずかながら向上が認められた。しかし、酵素の発現量あるいは活性が低く、異種遺伝子発現レベルのさらなる強化が必要と考えられたため、プロモーターの選定など改善に向けて鋭意検討しているところである。しかし、後述する通り、複合培養による非遺伝子組換えプロセスを開発することができたため、プロジェクト遂行の上での大きな問題とはならなかった。

##### (2) カロテノイド生合成経路におけるトランスクリプトーム解析

*Aurantiochytrium* 属において糖質代謝系からカロテノイド生合成系にわたる各種反応に関わる酵素をゲノム情報から推定し、各酵素の遺伝子発現レベルを RNA-seq 解析で比較した。その結果、解糖系やメバロン酸経路に沿ってスクアレンに至る生合成系が対数増殖期に高発現する一方で、C20 テルペンからアスタキサンチンに至る経路 (CrtE~CrtZ) では定常期から飢餓期にかけて高発現していた(図 2-1)。また、カロテノイド合成酵素 CrtIBY の遺伝子をカロテノイド低生産性の

*Aurantiochytrium* 属株で発現させたところ、 $\beta$ -カロテンとともにその代謝物であるアスタキサンチンなどのキサントフィルも顕著に蓄積した。これは *Crt1BY* が本生合成系の律速酵素であることを示しており、キサントフィル高生産株の創成に向けた分子育種ターゲットとして選定した。

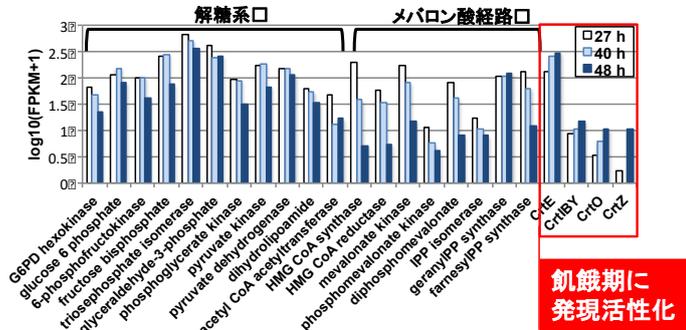


図 2-1 *Aurantiochytrium* 株におけるアスタキサンチン生合成に関わる酵素の遺伝子発現解析

27, 40, 48 時間の培養液から得た細胞について、RNA-seq 解析により各酵素遺伝子の発現量(log 表示)を測定したところ、カロテノイド生合成酵素(Crt)は培養後期に高発現していた。

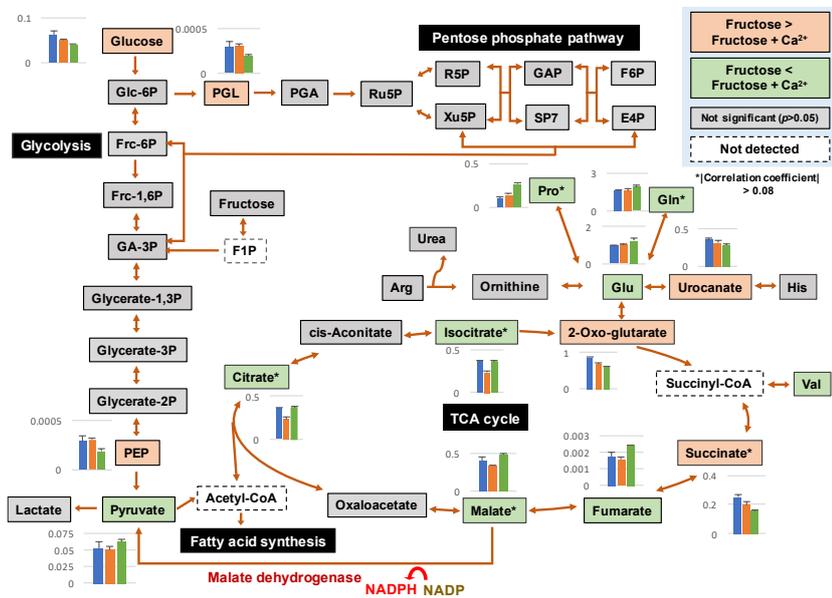


図 2-2 フルクトースを主要炭素源とした *Aurantiochytrium* 属株におけるメタボローム解析とカルシウム添加の効果

グラフバー: 青、グルコース培地; 橙、フルクトース培地; 緑、フルクトース培地+Ca<sup>2+</sup>イオン

#### (4) 褐藻由来糖質の代謝におけるメタボローム解析

海藻由来糖質を基質とした発酵生産系においては特有の代謝変動が予想された。フルクトースを炭素源としたときの *Aurantiochytrium* 属株の細胞内代謝物を GC-MS 及び LC-MS で調べたところ、グルコースの場合と比較して、TCA 回路関連物質の減少が見られた。そこで、TCA 回路を活性化する Ca<sup>2+</sup>イオンを添加したところ、その効果が代謝物の増減に反映され(図 2-2)、脂質・脂肪酸生産量がグルコースと同等のレベルになった。また、新たに単離したカロテノイド高生産株のメタボローム解析で酸化ストレスマーカーの亢進が見られたので、酸化ストレスを誘起する鉄イオンを添加したところ、アスタキサンチンの生産性としてこれまでで最高の 75.6 mg/L を得た(図 2-3)。なお、3%フルクトース培地の場合は 49.1 mg/L が最大であった。

褐藻に含まれる主要カロテノイド色素であるフコキサンチンはアスタキサンチンに匹敵する高い生理活性を示すことから、新規な機能性食品素材として注目されている。一方、*Aurantiochytrium* 属の複合培養系においては、褐藻から *Aurantiochytrium* 属へのフコキサンチン様色素の移行が認められている。そこで、フコキサンチンによる脂質代謝系への影響を調べたところ、不飽和脂肪酸代謝系酵素の発現を負に制御する活性が認められた(原著論文 4)。フコキサンチンにはドコサヘキ

サエン酸を顕著に蓄積させる効果が認められていることから、上記の観察は代謝酵素の発現制御とは異なるメカニズムが作動していることを示唆しており、*Aurantiochytrium* 属の育種ターゲットを設定する上で考慮に値する。

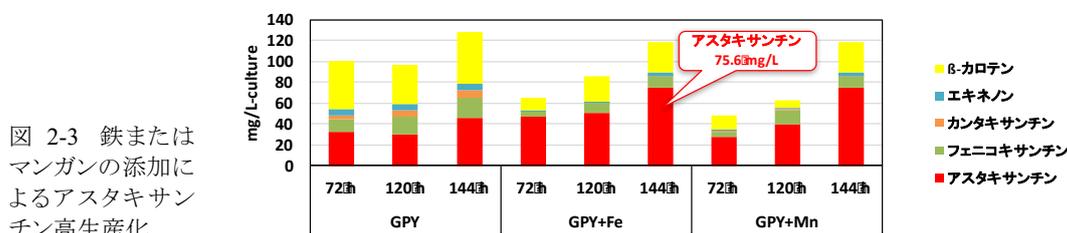
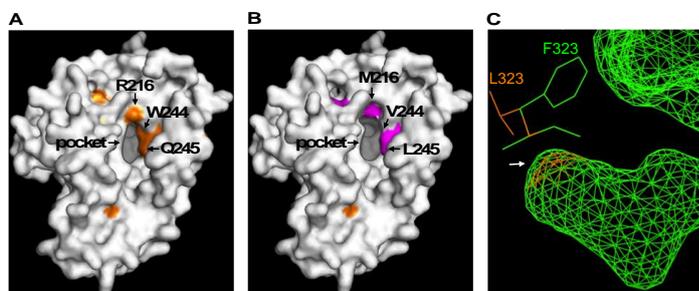


図 2-3 鉄またはマンガン添加によるアスタキサンチン高生産化

### (5) 脂肪酸不飽和化酵素及びグリセリド合成系の解析

ドコサヘキサエン酸を始めとする高度不飽和脂肪酸は、基質特異性を異にする各種脂肪酸不飽和化酵素の段階的作用によって生合成される。*Aurantiochytrium* 属では比較的低発現であるが、その活性制御は脂質膜不飽和度の調節に重要となる。パラログの関係が示唆される  $\Delta 6$  及び  $\Delta 5$  不飽和化酵素の基質特異性を規定するアミノ酸残基を、アミノ酸配列の比較と変異株作出を通じて検索した結果、各酵素活性を置換する複数の残基と、二機能性を与える残基をそれぞれ特定することができた。最近明らかになった  $\Delta 9$  不飽和化酵素の結晶構造をもとにしたホモロジーモデリングはその結果を支持し、任意構造の不飽和脂肪酸のデザインを可能とする基盤的知見を与えた (図 2-4、原著論文 18)。また、そのような構造機能相関を厳密に解析することを目的として、基質及び生成アシル CoA をブチルアミド誘導体として選択的に検出する迅速活性定量法を開発した (原著論文 19)。これらの成果は、*Aurantiochytrium* 属における脂質合成系の分子育種にも資することが期待される。

図 2-4  $\Delta 6$  不飽和化酵素 (A) 及びその変異体 (B) の基質特異性を規定するアミノ酸残基 (C) 基質結合ポケットの底部における L323F 変異は単独で二機能性を与える。



ドコサヘキサエン酸などの高度不飽和脂肪酸を食品として用いる場合、腸管吸収の特性上、トリグリセリドの *sn*-2 位に分配されることが望ましいとされている。そこで、トリグリセリドの構造を酵素的に解析する手法を新たに開発し、*Aurantiochytrium* 属脂質を分析したところ、高度不飽和脂肪酸の約 40% が *sn*-1,3 位に配置されていることが分かった (表 2-1、原著論文 5)。この脂肪酸分布に関わるアシル転位酵素がゲノム上に推定できたため、グリセリド構造の改変に向けた育種標的の一つとして追究していく。

表 2-1 *Aurantiochytrium* 株が生産するトリグリセリドの脂肪酸分布

Position	Fatty acid (%)							
	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	22:5	22:6	others
total	2.7	3.1	45.8	1.0	1.2	8.4	35.2	2.6
<i>sn</i> -2	2.8	1.7	15.2	0.4	0.4	15.7	61.2	2.6
<i>sn</i> -1(3), calculated	2.7	3.9	63.4	1.4	1.7	4.1	20.2	2.6
FAEE fraction	3.1	4.1	64.5	1.5	1.8	4.0	18.2	2.8

海藻バイオマスを用いたメタン発酵プロセスを高付加価値物質の同時生産によってコストバランスを安定化させる技術開発として、本研究では特にアスタキサンチンを著量生産するラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属を海藻特有の糖質によって培養する新規要素技術を開発した。さらにゲノム情報を駆使した分子育種による効率的油脂生産の実用化に向けて、幾つかの興味深い知見を得ることができた。中でも有機酸資化性を活用した新たな研究展開により、海洋から陸上に及ぶ幅広いバイオマスを原料とした画期的な油脂生産技術の確立も現実味を帯びてきており、今後の研究開発が期待される。

## 2-2) 藻類多糖を原料とした機能性油脂生産システムの構築

### (1) 複合培養系による糖転換-油脂発酵プロセスの開発

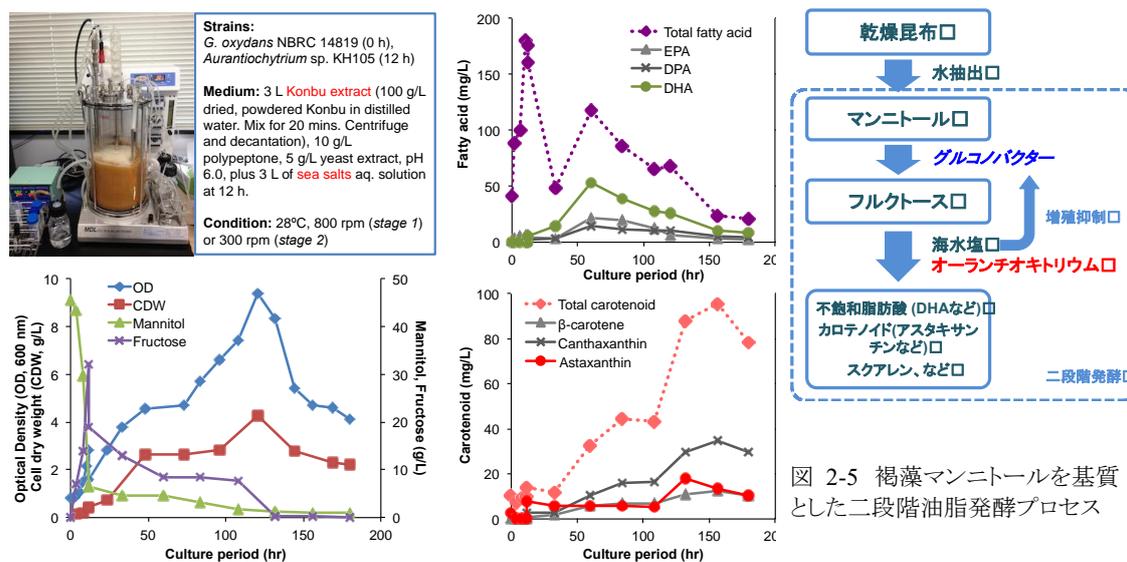


図 2-5 褐藻マンニトールを基質とした二段階油脂発酵プロセス

### 【マンニトールの利用】

海藻を原料とした高付加価値油脂発酵プロセスの開発に向けては、海藻構成糖質を、それに対して資化性を持たない *Aurantiochytrium* 属が資化しうる物質に効率的に変換する技術が必要となる。そこで、海藻糖質に対する資化性を指標に近海から単離した微生物や同様の資化性が報告あるいは予想された系統保存株、合計 168 株を一次ライブラリーとして、それらの培養上清を加えた培地で *Aurantiochytrium* 属が増殖しうるか検討した。その結果、褐藻等の主要糖質であるマンニトールを *Aurantiochytrium* 属が資化可能なフルクトースに変換して細胞外に放出する酢酸菌 *Gluconobacter* 属を有望株として選抜した。これにより、低塩濃度に適性の *Gluconobacter* 属による「糖質変換ステージ」と好塩性の *Aurantiochytrium* 属による「油脂生産ステージ」を培地への塩添加によって切り替える、海藻からの二段階油脂発酵プロセスを世界で初めて確立した(図 2-5、原著論文 3; 特願 2014-066844)。

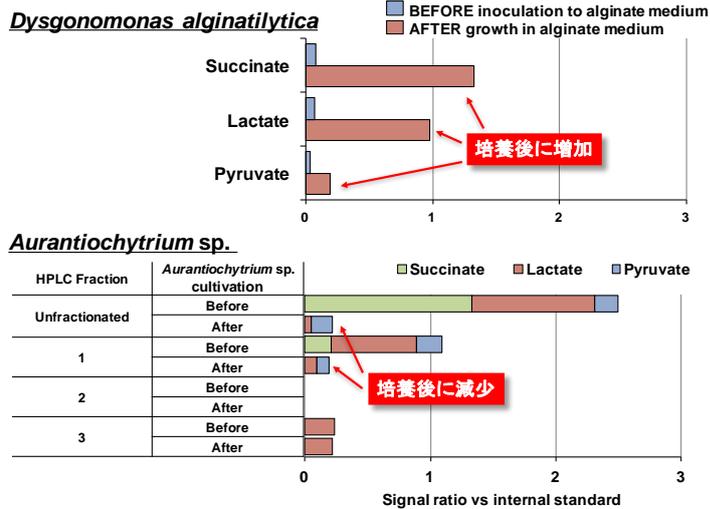


図 2-6 *D. alginatilytica* によるアルギン酸からの有機酸生成と *Aurantiochytrium* sp. CB15-5 による有機酸資化

### 【ラミナランの利用】

褐藻(コンブ)からの水抽出物にはマンニトールの他に多糖類も全糖質の数%程度(藻体の属種、採集時期、部位によって異なる)含まれており、前項の糖質変換ステージの後、この多糖が消失していた。そこで、*Gluconobacter* 属の各種多糖に対する分解活性を検討して、ラミナランがその本体であると推察した。さらに、同属はラミナランを少糖にまで分解するものの、単糖は生成あるいは蓄積せず、その培養上清を含む培地で *Aurantiochytrium* 属が増殖可能であった。したがって、ラミナラン由来オリゴ糖に対する資化性が新たに示唆され、ラミナランも発酵原料として利用可能であることが分かった。

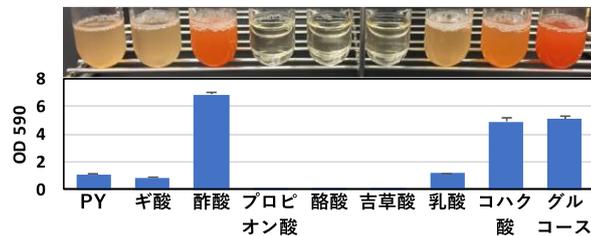


図 2-7 *Aurantiochytrium* 属 RH-7A-7 株の有機酸資化性

PY (0.6% polypeptone, 0.2% yeast extract, 2% sea salt) + 各炭素源 1% (pH6.5) で 28℃、65 時間培養後、濁度測定。

### 【アルギン酸の利用】

アルギン酸は褐藻に含まれる主要糖質であり、油脂生産の基質として無視できない。当初、アルギン酸資化性の海藻付着微生物や系統保存株を *Aurantiochytrium* 属と組み合わせた共培養の系を検討していたが、十分な油脂生産性を達成するには至らなかった。一方、中島田グループによってアルギン酸の資化に関与する *Dysgonomonas alginatilytica* HUA-2 株が汚泥から単離されたため、その培養上清を含む培地で *Aurantiochytrium* 属が生育可能か検討したところ、顕著な増殖が認められた。そこで、イオン交換クロマト等で分析したところ、有機酸類が重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、*D. alginatilytica* をアルギン酸含有培地で培養して得た上清を LC-MS や GC-MS を用いたメタボローム解析に供し、培養前の成分との量的比較で候補物質を特定したところ、コハク酸や乳酸などが増加していることが分かった(図 2-6)。さらに、それら有機酸を含む培地で *Aurantiochytrium* 属 CB15-5 株を培養したところ、各成分は減少し、炭素源として利用されたことが示唆された。この培養上清の HPLC 画分 (fraction 1) でも同様の結果となった。したがって、*D. alginatilytica* が生成したこれらの有機酸が *Aurantiochytrium* 属株の増殖に資すると結論された。

有機酸資化性は株ごとに異なる可能性があるため、新たに単離したカロテノイド高生産性の *Aurantiochytrium* 属 RH-7A-7 株について調べたところ、酢酸に対する資化性が特徴的に高いことが分かった(図 2-7)。酢酸はメタン発酵系の主要中間代謝物であり、酢酸生成菌との複合培養系

が成立すれば、あらゆるバイオマスの利用が可能となるばかりでなく、合成ガス(H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>)資化性のホモ酢酸菌を用いると二酸化炭素固定も視野に入る。そこで、酢酸資化性が高く、かつトリグリセリド生産性が高い同属 SR21 株について、酢酸とグルコースをそれぞれ主要炭素源とした培地で培養したときの脂肪酸生産性を比較した。その結果、30 g/L グルコースのときに脂肪酸生産率の最大値が 6.5 g/L/24-h であったのに対して、30 g/L 酢酸の場合は 4.5 g/L/30-h であり、十分に高い油脂生産性が認められた(図 2-8)。

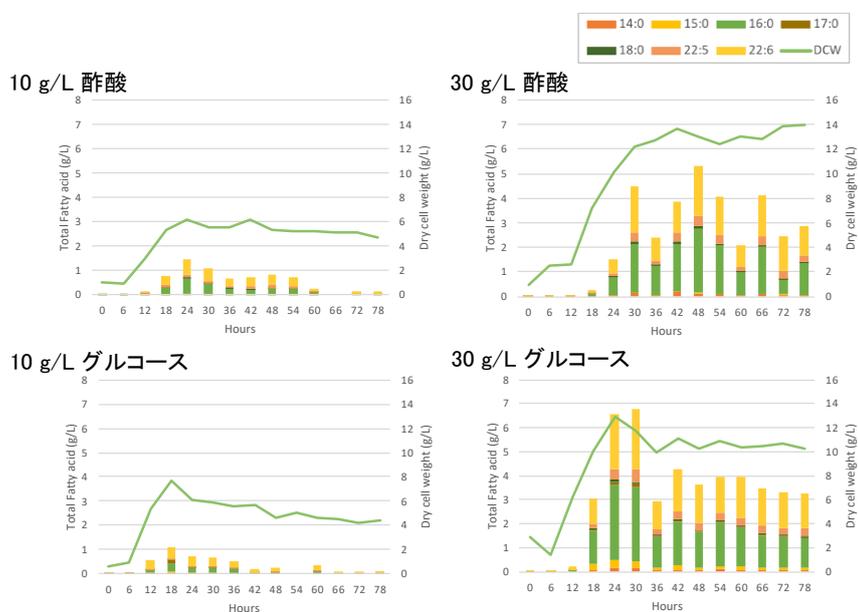


図 2-8  
*Aurantiocytrium* 属  
 SR21 株の酢酸培  
 地での油脂生産  
 PY (6 g/L  
 polypeptone, 2 g/L  
 yeast extract, 20 g/L  
 sea salts)+各炭素源  
 (pH6.5)で 28℃、  
 150 rpm にて培養。

以上のように、褐藻の寡占的構成糖質であるマンニトール、ラミナラン及びアルギン酸を基質とした遺伝子組換えによらない高付加価値油脂発酵技術の実用化に向けて、核心となる要素技術を開発することができた。今後は各技術の課題を解決しつつ、それらを統合した海藻全利用技術の構築をめざす。

### 【シンプル酵素反応による藻類由来の効率的物質変換】

海藻由来のバイオマスの主成分としてアルギン酸とマンニトールが挙げられる。有用物質に変換するにはこれらを基質として利用できること、効率的な変換には細胞代謝に利用せずに効率的に物質変換できることがもとめられる。シンプル酵素触媒は低温菌に中高温菌の耐熱酵素を発現させて中温で熱処理させることで宿主である低温菌の代謝を熱失活させて高収率な物質変換を実現できる触媒である。この技術を用いて、大型藻類の主成分であるマンニトールをフルクトースに効率的に変換する触媒を創製し、マンニトールを資化できないラビリンチュラ類に糖基質を供給するプロセスを構築することとした。

触媒の基礎技術開発として、副産物を生成する代謝酵素の活性が熱処理により抑制されることを検討した。モデル反応系として低温菌の代謝系と競合するフマル酸からアスパラギン酸を生成するアスパルターゼを選択し、低温菌に発現させた。これを 50℃で熱処理することにより競合するフマラーゼの活性を抑制し、副産物を生成することなくアスパラギン酸を高収率で変換することができた。また、これをアルギン酸で固定化することにより 95%以上の高収率で 9 回まで繰り返して変換することに成功した(原著論文 10)。

マンニトールをフルクトースに変換するマンニトールデヒドロゲナーゼ (Mdh) とこの酸化反応に必要な補酵素 NAD<sup>+</sup>を再生する NADH オキシダーゼ (Nox-Prx) をともに低温菌で発現させ、変換反応を検討した。ロイコノストック属細菌由来の Mdh とアンフィバチルス属由来の Nox-Prx を異種発現させた低温菌を構築し、40℃で熱処理して触媒を調整した。これにマンニトール(50 mM)と補酵素再生系の基質である酸素を添加して反応させた。酸素をヘッドスペースに充填したバイア

ルで振盪させて反応させたところ、フルクトース生成に必要とされる補酵素  $\text{NAD}^+$  を添加することなく高収率でフルクトース(47 mM)に変換することに成功し、本触媒は補酵素再生系と共役する変換に応用できることを示した。また、マコンブ粉末から溶出させたマンニトール(75 mM)を基質としてもマンニトール消費量 45mM に対してフルクトースを 45mM 生成されたことから副産物を生じる異なる高効率で変換する触媒といえる。また、昆布より抽出したマンニトールの変換では試薬マンニトールでは蓄積していた過酸化水素がほとんど見られないことが示された。これは補酵素再生系の中間産物である過酸化水素が昆布に含まれるカロテノイド類により消去されたためと考えている。本触媒にて変換されたフルクトースを高度不飽和脂肪酸生産株である *Aurantiochytrium* sp. CB15-5 株の培養に供したところ、マンニトールや昆布抽出液(Konbu extract)では増殖がみられないが、シンプル酵素触媒で変換した昆布抽出液(Konbu extract converted by PSCat)では糖(グルコース、フルクトース)と同様に増殖可能であった(図 2-9)。したがって、本シンプル酵素触媒は、糖質コンバーターとして利用できることが示された(原著論文 31)。

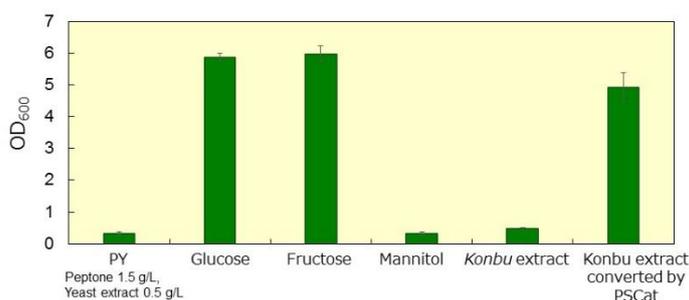


図 2-9 コンブ抽出物シンプル酵素反応物を用いた *Aurantiochytrium* sp. CB15-5 の増殖

### 3.3 無機資源回収基盤技術の開発(広島大学 岡村グループ)

#### 3-1) 各種大型藻類に吸着した金属のプロファイリング

国内で廃棄量が最も多い藻類を褐藻から1種類、緑藻から1種類えらび、これを研究の主軸とするチーム方針が決定されたため、この2種類に集中して解析を行った。コンブおよびアオサを松村グループの超臨界水処理で溶解し、可溶化した金属イオンを ICP発光分光装置(平成24年度購入)で測定した。

定性分析では、コンブおよびアオサ中にそれぞれ 11 種、15 種のレアメタル、および 1 種、2 種のレアアースが検出された。そのうちわけは、レアメタルが、Li, B, Al, Ti, V, Cr, Mn, Ni, Sr, Zr, Se, Cs, Ba, Re, Tl であり、レアアースは Sc, Y であった。また、海洋中の溶存金属濃度を基準にするとレアアースであるイットリウム(Y)は 85 万倍、レアメタルも数万倍に濃縮されていることが分かり、これらの資源を回収する技術が重要であることが示唆された。

#### 3-2) 金属耐性・細胞内金属蓄積能を有する光合成細菌の探索

海洋性光合成細菌の収集のために、広島県・沖縄県・愛知県・鳥取県・島根県の沿岸の砂礫を海水と共に採取し、集積培養を行った。光合成細菌の増殖が顕著になったところで、高濃度の重金属添加による集積培養を行い、まずは10種の重金属イオン(1mM)に対する耐性カクテル(複合菌群)を得た。コンブ中に濃縮された重金属(Cu, Co, Cd)は健康被害を起こす濃度ではないが、敢えて過剰量の条件を設定してその除去率を検討した。また、レアメタル・レアアースを蓄積する細菌の探索には、コンブが含んでいる元素(上述3金属は除く)を混合したモデル金属廃液を使用した。

コンブ中に濃縮された濃度よりも敢えて過剰量の条件を設定してその除去率を検討した結果、Cu 10 $\mu\text{M}$ 、Cd 20 $\mu\text{M}$ の各単独添加、でそれぞれ 89%、98%の除去率を示した。Co10 $\mu\text{M}$ は 56%であるが、コンブ溶解液中の濃度が 3.6 $\mu\text{M}$ であるので、100%除去可能であると計算される。また、Cu、Cdについてはそれぞれ 80%、90%の回収が期待された。

一方、Cu, Co, Cd 各イオンは低濃度でもシナジー効果で、菌体の生育を阻害することが、明ら

かになったため、複合添加条件、3種の重金属を同時回収できる株を探索し、3株取得することが出来た。なお、この除去率は、コンブ溶解液中の濃度相当の重金属を全て除去可能であることを示している。

また、コンブに吸着・蓄積したイオン種ではないが、レアメタル蓄積菌としてテルルを高度に集積する光合成細菌 *Marichromatium* sp. MT-1 株を獲得した。

### 3-3) 残渣中の主要金属、レアアース・レアメタルを吸着する生体分子の開発

#### (1) レアアース特異的吸着細菌

上述のコンブに高度に蓄積されたイットリウムをほぼ完全に回収する *Marichromatium* sp. NT-1 を分離・命名した。細胞外マトリックスにレアアースを特異的に吸着する分子が存在する。そこで、細胞外マトリックスを回収し、HPLC で分画してイットリウムと親和性をもつ分子を分離した。ネガティブコントロールとして同じくグラム陰性菌である大腸菌を用い、精製物の吸着活性を比較検討しながら、分画した。まず、大腸菌 DH5 $\alpha$  株にイットリウム吸着活性がないことを確認後、NT-1 株、DH5 $\alpha$  株、両株をリゾチーム処理し、遊離した細胞外成分を回収した。薄層クロマトグラフィーで展開し、得られたスポットのシリカゲルを回収して、イットリウム吸着活性を測定した。その結果、NT-1 由来のスポットのみイットリウム吸着活性が見られた。またリン酸緩衝液による洗浄で、シリカゲルからイットリウムが脱離することも確認され、活性本体を分画できたことが分かった。さらに HPLC 精製を重ね、標的画分を得た。染色特性から、糖あるいは糖ペプチドであることが示唆された。

#### (2) レアメタル特異的吸着細菌

テルルを高度に集積する光合成細菌 *Marichromatium* sp. MT-1 株を獲得し、この集積分子の正体と集積メカニズムの解明を目指した。その結果、粒子は単体テルルの自己集積による結晶成長であるが、粒子表面の炭素膜が粒子サイズを 30nm に制御していることが示唆された。また、亜テルル酸還元は、呼吸鎖から分岐する電子によって行われ、そして亜テルル酸還元に伴い、ATP 合成が共役する亜テルル酸還元呼吸であることが示唆された。

#### (3) メタゲノムを利用

メタゲノムは未知未培養微生物の遺伝子を含むため、unknown sequence をそのまま鵜呑みにしていいものかどうか、という極めてシンプルな疑問から、従来から問題視されていた DNA 増幅試薬・増幅環境のコンタミネーションの制圧に取り組んだ。ベンチトップ型スーパークリーンベンチを改良・性能評価した結果、 $\phi$  29 DNA ポリメラーゼによる全ゲノム合成において浮遊 DNA のコンタミネーションを完全に防ぐことができることを証明した。また、浮遊 DNA の招待はヒト由来であることを明らかとなり、実験作業員によって持ち込まれる避けがたい DNA を排除するために、興研株式会社の協力を得て半導体レベルのスーパークリーンゾーン生成装置 COACH のバイオモデルを作った。これにより、安心な実験環境が確保されることを証明した。以上の結果を論文発表した(原著論文 21)。これを用いて、海洋の砂、泥、礫等をサンプルとした金属集積培養からメタゲノムを回収しライブラリーを構築して亜テルル酸イオン還元活性を示す遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、還元されたテルルの黒色を示す形質転換体を取得し、大腸菌の亜テルル酸耐性が 400 倍上昇したことを確認した。分離された遺伝子は既知の遺伝子と相同性を示すが、機能は全く別であり、MT-1 株で予想された硫酸還元酵素とは大きくかけ離れていた。

150株の金属イオンに対する親和性は株毎に異なり、複合回収の様式も特定の傾向が見られず、菌の好みによって変わるという結果であった。よって「主要金属を吸着する生体分子」はユニバーサルなキレート能をもつ分子を探索する方針にしたほうがよいことが示唆された。一方、生体分子としてではなく、個体として主要金属を除去する能力に優れたものは、約30株得ている。これらは培養可能な細菌であるので、細菌自体を金属吸着に使用することが可能であり、複合培養による除去に適していると考えられる。

一方、金属除去能を示すカクテルから得られるコロニーは金属除去能が低下することから、目的の細菌は分離培養困難な細菌であることが予想された。従って、ユニバーサルなキレート能をもつ分子はメタゲノムライブラリーで探索する方針をとっている。

スーパークリーンゾーン生成装置 COACH を得たことで、multiple displacement amplification (MDA)をコンタミネーションフリーで行える様になったため、メタゲノムとして標的をスクリーニングす

るのではなく、標的遺伝子発現細胞をマイクロバイームから1細胞単位で標識することを着想した。この手法は FACS による選別を可能とするため、環境中から集積培養を経ることなく、1細胞分取が可能であり、かつ、1秒間に5万件のハイスループットスクリーニングを実現する。現在、全 RNA 中から特異的 mRNA を検出することに成功している。この検出方法は、mRNA の任意の内部配列をプロービングするという点で新規性が高いため、特許出願した(原著論文 33)。

### 3-4) 廃液中の残存有機酸を資化する光合成細菌の探索

一般に発酵残渣に残存する有機酸は、資化性の低いプロピオン酸であり、廃液浄化・放流のためには、プロピオン酸を主とする低級有機酸の除去も必要と考え、本研究を追加した。低級有機酸を除去することで、余剰汚泥を生産することは回避しなければならず、油脂に変換する能力のある菌をターゲットとし、酢酸-プロピオン酸を主な炭素源とする培地で光合成細菌を集積した。その中から、油脂生産能をもつ株を分離した。

単菌化分離した結果、光合成細菌とコンソーシアムを組んでいた細菌が真の油脂生産者であったことが判明した。プロピオン酸資化性のスクアレン生産菌 *Bacillus* sp. A-C 株の3株および、トリアシルグリセロール生産菌の *Nitratireductor* sp.OM-1 株の分離に成功した。どちらも、各種 VFA を唯一の炭素源としても生育可能であり、プロピオン酸をスクアレンに変換することが初めての報告であるので、それぞれの株について、2件出願した(特許出願)。*Nitratireductor* sp. OM-1 株は、窒素枯渇条件では、トリアシルグリセロールではなく、可燃性の軽油 2-butenoic acid およびそのエステルを生成した。この条件では乾燥菌体当たり油脂含量は 70%であった(原著論文 14)。

*Nitratireductor* sp. OM-1 株は体内で短鎖脂肪酸エステルを合成する酵素をもち、廃グリセロールを生じること無くディーゼル燃料生産することができることから、このエステル化酵素遺伝子を分離するため、ゲノム解読および発現解析を行っている。

一方、OM-1 株の最大油脂合成培養条件を探索したところ、現在のところ、90%の油脂含量、1g/L を達成した。さらにこの条件の乾燥菌体の燃焼による発熱量は、23.7 MJ/kg であり、石炭(亜炭)より上、メタノールと同程度であることが示された。

### 3-5) 光合成細菌による発酵残渣浄処理効率の検討・最適化

中島田Gから供給されたメタン発酵廃液を未滅菌のまま使用して、*Nitratireductor* sp.OM-1 株を培養し、残存有機酸、残存窒素の消長を追跡し、汚泥量と油脂合成量を測定した。その結果、メタン発酵菌叢と協働して、有意に COD を減少させ、廃液中の低級有機酸を完全消費した。OM-1 株とメタン発酵菌叢と協働した方が最終汚泥量を削減することができ、余剰汚泥削減に有効であることが示されたが、油脂はほとんど生産されていなかった。処理廃液中の成分分析から、アンモニウムイオンが 200 ppm ほど残存していることが分かり、窒素枯渇条件ではないため油脂生産が阻害されたと考えられた。実際、アンモニウムイオンを成分から抜いた合成廃液培地中での油脂生産量を調べた結果、油脂含量が25%まで上昇した。この知見は、アンモニウムイオン濃度を制御できれば、発酵廃液から油脂を生産することが可能である可能性を示唆している(Water Research 投稿中)。さらに、定量範囲内の金属イオンは K, Mg, Ca, Na, P, Fe, I, Sr であり、重要金属は除去されていた。

## 3. 4 大型藻類前処理技術の開発(広島大学 松村グループ)

### 4-1) 水熱前処理における塩分の影響の確認とその機構の解明

本研究では、海洋大型藻類であるコンブを、生物化学的変換を用いて有効に利用することを目的としている。エネルギーとマテリアルの両方を得ることが求められており、前者についてはメタン発酵を、後者については付加価値油の生産を、それぞれ行うものである。しかしながら、コンブは大型藻類としての植物体構造を有し、このために単純に微生物による発酵が行える状況にはない。水熱前処理は、コンブを 120~250 °C 程度の圧縮水で処理し、水溶性成分を溶解、細胞壁を破壊して、その流動性を高めると共に細胞内容物の放出を実現する。しかも、このときに利用するのは

水のみであり、処理そのものは危険な化学薬品や高価な酵素などを用いることなく、環境に優しい形で実現することができる。このため、コンブを水熱前処理してから微生物による生物化学的変換を行うこととした。

対象は海洋性バイオマスであるコンブであり、その周辺の水ならびに体内にも塩分が含まれている。塩分の存在は、水熱条件におけるイオンの挙動に影響を与え、得られる水熱処理物内の生成物の種類やその分布に影響を与える可能性がある。このため、塩が存在する条件で処理することによってどのような影響があるかを確認することが重要である。本研究項目では塩分を加えた場合と加えない場合について水熱前処理を行い、その生成物を比較、塩分の影響を確認することを目的として検討を行った。

実際にコンブの水熱処理を行うことによってその成分の挙動を確認した。水熱前処理にはバッチ式のオートクレーブを用いた。オートクレーブは内径 90 mm、深さ 125 mm での内容積は 800 cm<sup>3</sup> であった。オートクレーブを密閉後、電気炉の中に設置して外部から加熱を行い、所定温度まで昇温した。原料はコンブとし、乾燥重量で 2.0 g を投入、水は 50 g を追加した。塩を加える場合には 3 % の塩化ナトリウムを加えた。目標温度は 150–190 °C で変化させた。コンブは 105 °C で 1 d 乾燥したものを扱い、使用前に < 63 μm に粉碎した。これと合わせて乾燥していないコンブについても同様の実験を行った。

#### 【水熱処理性能に及ぼす温度及び塩の添加効果】

実塩を添加しない場合と 3 % 添加した場合について、150–190 °C での固体成分収率、液相 TOC を比較した。固体成分収率は、塩の添加の有無に関わらず、ほとんど変わらなかった。この固体生成物について元素分析を行った結果を表 4-1 に示す。得られた固形物の組成は原料のコンブから灰分が大きく減少し、その分だけ有機物含有率が増加している。しかしながら、これらの組成は温度を変えても塩分を添加しても変化しておらず、塩分の添加による固形物への影響はほとんどないことが確認された。このことは、塩が主として液相に存在しており、影響を及ぼすとしても液相の反応においてであると考えれば理解できる結果である。

表 4-1 マコンブ水熱処理前後の固形成分の元素組成分析

Temp. (°C)		C	H	N	S	O	Ash
150	Raw kelp	30.7	4.9	1.5	2.3	27.9	32.7
	w/o salt	49.7	7.6	1.7	1.1	31.6	8.4
	+salt	48.5	7.3	1.9	1.1	35.2	6.0
160	w/o salt	48.1	7.2	1.6	1.0	34.1	8.0
	+salt	48.2	7.3	1.9	1.1	31.6	10.0
170	w/o salt	46.9	6.6	1.6	1.0	33.3	10.5
	+salt	46.3	7.2	1.4	1.0	32.3	8.8
180	w/o salt	48.9	6.6	1.2	1.0	27.5	14.7
	+salt	49.1	6.9	1.2	1.1	29.8	12.0
190	w/o salt	46.7	6.3	1.1	0.9	27.0	17.9
	+salt	45.7	6.3	1.2	1.0	24.3	21.5

液相 TOC 収率については、85 % を越える炭素分が液相に移動していることが確認された。このことは、水熱前処理によって微生物がコンブ中の有機物を処理しやすくなることを如実に示す物である。TOC 収率についても塩分添加の影響はほとんど確認されなかった。

図 4-1 にコンブの主要成分であるマンニトールの回収率を示す。温度を変えてもほとんど変化はなく、0.7~0.9 g のマンニトールが回収されている。ここでも塩の添加の効果はほとんど確認されていない。温度と共に多少収率が減少しているのは熱分解が進行したためと考えられる。

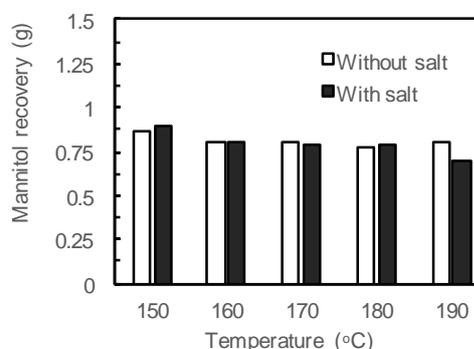


図 4-1 水熱処理によるマンニトール回収率

以上、固相生成物についても液相生成物についても塩の添加による影響はほとんど見られないという結果が得られた。このことは、実用的には、コンブの水熱前処理にあたって脱塩の処理を行う必要がないことを意味する。また、今回のプロセス全体を考えれば脱塩をすることなく水熱前処理を行うので、微生物に供給する水熱前処理物は塩を含んだ形で供給されることになる。よって、後段のメタン発酵ならびに付加価値油生産を行う微生物には耐塩性が求められることにもなる。これらの知見については原著論文 1 で発表した。

このほかに乾燥保存処理したコンブを用いた場合とコンブを乾燥せずにそのまま用いた場合にも結果に大きな差は確認されないという結果を得ている。また、次の研究項目で述べる連続装置を用いた水熱前処理でも、用いる反応器の種類によって結果に大きな影響はなかった。これらのことは、乾燥昆布を用いた研究結果をそのまま利用することができるとともに、コンブを乾燥保存してもその反応性に大きな影響がないことを示す。さらに、バッチ式の反応器で得られた結果は実用に供する連続式の反応器においても適用可能であることを示す、実用的に重要な知見である。特にコンブの乾燥保存は、長期間、均一なサンプルを安定して用いることができることを意味するので、実用化の際には乾燥エネルギーの確保が課題であるが、今後の研究を進めるにあたってきわめて有効である(原著論文 7)。

#### 4-2) 水熱前処理による糖と栄養成分の挙動確認

前研究項目で述べた通り、海洋大型藻類であるコンブを有効に利用する上では、その成分を微生物が有効利用しやすくする水熱前処理が有効である。幸い、塩分の存在や乾燥前処理によって、その反応特性は影響を受けないことも確認された。しかし、高温高圧の水は、処理条件が厳しすぎると水熱前処理の間に有効成分が熱分解されてしまったり、分解によって微生物の活動を阻害する物質が生成したりする。このために、これらの物質の挙動を確認し、最適な処理条件を確認する必要がある。さらに、主成分のひとつであるアルギン酸の加水分解生成物であるウロン酸を熱化学的に得て、これを他のグループに提供することも求められた。

そこで本研究項目では、コンブの主成分であるマンニトールの水熱分解挙動を明らかとし、さらにアルギン酸の加水分解法を確立、生成するウロン酸の提供を行った。また、水熱分解挙動を詳細に分析する新規手法としてオンライン質量分析法を確立した。

##### (1) ウロン酸生成法

実験に用いたウロン酸については、アルギン酸の加水分解を行うことによって得た。加水分解には、既往の研究を踏まえて検討を行ったが、従来の手法は濃硫酸の利用や煩雑な処理が必要であり、本当にウロン酸の単量体が得られているかの確認も不十分で、本研究で用いるための大量のウロン酸を生産するには不適當であった。そこで、図 4-2 に示す方法を開発した。まず、1 w/v % のアルギン酸を 3 wt% の塩酸に入れて 90°C で 30 min 処理し、真空濾過で固液分離を行った。不純物は液相に移動するので固相のみを回収し、さらに 0.3 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸で 2 時間処理した。こうして不純物を除き、加水分解を行った固相を回収、1 mol/dm<sup>3</sup> 水酸化ナトリウム水溶液に溶解させた。結果として、目的の2種類のウロン酸を含む均一溶液を得た。続いて、この溶液の pH を 1 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸を用いて 2.85 に調節すると、GA が固体として析出、回収された。液相に残存する MA はエタノールを添加することによって溶解度を低下させて析出、回収した。この時、pH を変えて析出させると純度の高い生成物が得られず、また、回収した固体を 90°C で乾燥すると熱分解が進行して純度が低下することも合わせて確認している。これを避けるために、エタノールによる析出と常温での乾燥剤を用いた乾燥を行った。

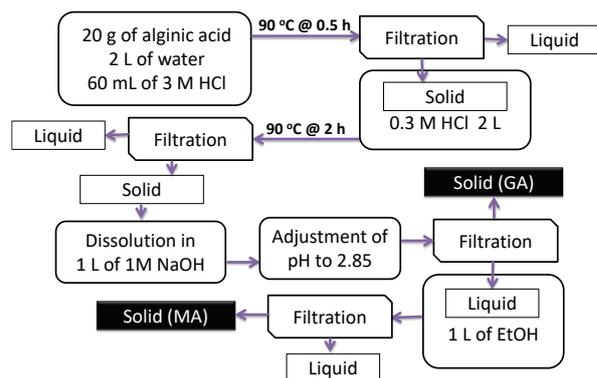


図 4-2 開発したアルギン酸からのウロン酸 (GA および MA) 回収法

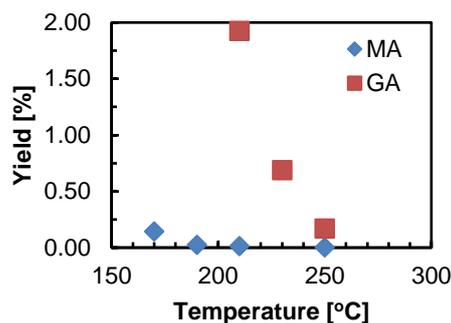


図 4-3 ウロン酸収率 (MA=mannuronic acid, GA=guluronic acid)

## (2) 糖挙動に及ぼす水熱処理条件の影響

水熱前処理中における熱分解特性の確認には、コンブの主成分であるマンニトールと、上記操作で精製したウロン酸について確認を行った。実験には内径 1 mm のステンレス製反応器を有する連続式水熱処理装置を用いて行った。反応温度は 170~250°C の範囲で変化させ、反応圧力は 25 MPa 一定、反応時間は熱分特性に応じて調節した。

検討の結果、マンニトールおよびウロン酸の収率は高温ほど下がり、熱分解が進行していることがわかった (原著論文 6, 20)。特にウロン酸の収率はきわめて低く、他の糖と比較して、水熱分解が迅速であることがわかった (原著論文 22, 23) (図 4-3)。ここで、分解反応は 1 次反応速度式で表すことが可能である。そこで、得られた反応速度に Arrhenius 式を適用し反応速度パラメータを得た (表 4-2)。グルコースと比較して水熱分解の反応速度定数は大きく、特にウロン酸が分解しやすいことが明確に見て取れる。

表 4-2 水熱分解反応速度パラメータ

	Pre-exponential factor [ $s^{-1}$ ]	Activation energy [ $kJ mol^{-1}$ ]
Mannitol	3.23	26.5
MA	1.63	11.7
GA	20.61	25.1

## (3) 直接測定法による糖挙動の観察

マンニトールやウロン酸の水熱分解特性を確認する上で、分解生成物の分析は重要であるが、水熱場において生成する物質の分析を、一度冷却して行うことによって実際に存在する物質とは違う物質が観察される恐れがあったため、水熱反応場から直接質量分析を行う装置を開発した (図 4-4)。これはコンブの連続水熱前処理を行う連続装置から 0.1 mm 径のノズルを用いて少量を質量分析装置に供給、分析を行うものである。質量分析装置には、ULVAC 製の四重極質量分析装置を用い、原料としてはモデル化合物として水熱反応機構について多くの知見が得られているグルコースを用いた。最初に中間体として生成することが知られている各種有機物を水溶液としてこの装置に供給し、熱分解をしないで質量分析をしてこれらの標準質量スペクトルを決定した。その後、グルコース水溶液を用いてオンラインサンプリングを行って質量分析を行った場合と、一度冷却してから同じ装置で加熱をせずに質量分析を行った場合の比較をした。

実際にグルコースを 230°C の水熱条件で分析した結果について、直接分析と一度冷却したものを分析した結果の比較を図 4-5 に示す。一度冷却するとフルフラール類が確認されず、直接分析の重要性が確認された (原著論文 24-26, 32)。

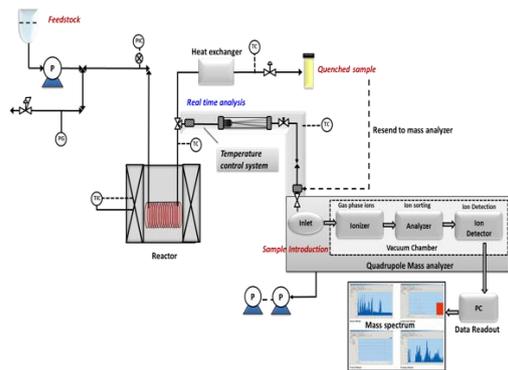


図 4-4 水熱処理装置からの直接 MS 分析装置

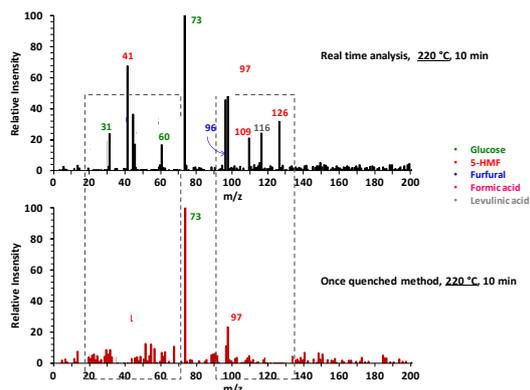


図 4-5 グルコース水熱処理物の直接 MS 分析と冷却後 MA 分析結果の比較

本研究項目では、水熱前処理による糖と栄養成分の挙動確認を行い所定の成果を得ることができた。また、研究実施期間中に当初計画の枠内ではあるが、アルギン酸を比較的容易な方法で、その構成糖であるマンヌロン酸とグルロン酸というウロン酸に加水分解、高い純度で分離回収する方法を提出した。現在、海洋バイオマスの利用は世界的に注目されているが、これらのウロン酸は市販されておらず、その研究が進んでいない。今回のウロン酸回収法は、この分野の研究を加速するべきものと考えている。また、水熱反応生成物を高温高压の反応器から直接質量分析することによって反応のその場観察する手法を開発した。一度冷却してから分析すると見られないフルフラール類などが確認され、より精度の高い分析結果を得るのに有効であった。

#### 4-3) 解明された水熱前処理機構に基づく最適プロセスの開発

各プロジェクトで解明されたプロセスの基本特性を組み合わせることでプロセス設計を行うことによって、今回の研究テーマのアプローチの有効性を確認する。即ち、高付加価値物質として付加価値油を生産、エネルギーとしてメタン発酵ガスを生産し、これに前処理並びに後処理を行うプロセスを大型藻類に適用することによって、ネットでのエネルギー生産と経済的な成立を両立させることができるプロセスができることを確認する。

そこでまずプロセスフローを描き、それぞれの要素に対する物質収支とエネルギー収支を取った。このことによって矛盾のない大型藻類変換プロセスを構築することができる。このときに、生成物の収率などはそれぞれの担当テーマで実験的に得られた結果に基づいた値を用いた。プロセス全体として、投入した原料、運転に必要なエネルギー、得られたエネルギーからエネルギーに関する評価関数を得た。さらに、主要な要素プロセスの反応器について建設コストを評価、さらに原料コスト、人件費、メンテナンス、ユーティリティなどの費用を考慮し運転コストを出し、これらを生成物の価格と比較、経済性の評価を行った。本プロセスの特長は、原料コンブをメタン発酵と付加価値油生産に回す割合を調整することによってエネルギー生産量と経済性のバランスを取ることが可能となることである。この比率を変えた計算を行い、エネルギー生産と経済性に及ぼす影響を確認した。

得られたプロセスフローを図 4-6 に示す。原料のコンブは水熱前処理を行って流動性と反応性を高めた後に、付加価値油生産サブプロセスとメタン発酵サブプロセスに分離供給する。付加価値油生産プロセスの残渣・排水もメタン発酵に供給される。メタン発酵の排水は低級脂肪酸を含んでいるので、これを原料として低級油生産サブプロセスを運転する。

実験結果に基づいた値を用い、1t/d の処理における物質収支とエネルギー収支を取ることによって決定した、プロセスパラメータの例を表 4-3 に示す。エネルギー収支は1より大きい時に正味でエネルギーが生産され、経済性は 0 円以上が求められる。処理規模およびメタン発酵と付加価値油への原料振り分け割合を変化させてプロセス計算を繰り返した結果、100 円/t で原料コンブを購入することができても、1t/d では経済性がプラスになる領域はなく、少なくとも 10t/d 程度の処理規模が必要であった。ここで得られたエネルギー収支と経済性を図 4-7 に示す。メタン発酵に回す割合が 40 %以上で正味のエネルギー生産が可能となるが、80 %以上を回してしまうと付加価値油の生



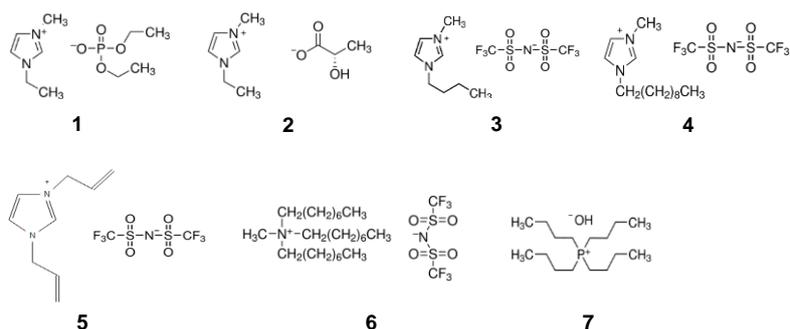


図 5-1 合成したイオン液体

表 5-1 各種イオン液体の残渣溶解率と有機成分抽出率

Cation	[C <sub>2</sub> mim]			[C <sub>20H</sub> mim]	[P <sub>4,4,4,4</sub> ]
Anione	[MeOHPO <sub>2</sub> ]	[CH <sub>3</sub> COO]	[N(CN) <sub>2</sub> ]	[MeO(H)PO <sub>2</sub> ]	[OH]
溶解率(%)	32	15	8	26	59
有機成分抽出率(%)	30	13	4	25	72

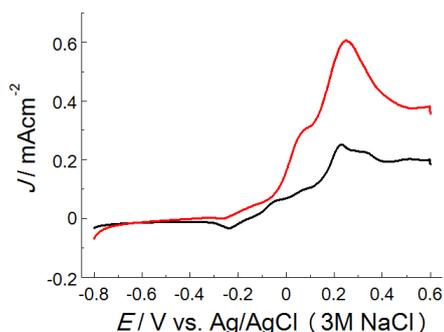


図 5-2 金ナノ粒子電極による[P<sub>4,4,4,4</sub>][OH]に溶解したメタン発酵残渣の酸化。メタン発酵残渣あり(赤)、ブランク(黒)

### 5-2) イオン液体に溶解した残渣成分からの電気エネルギーの抽出

大型藻類のメタン発酵残渣にはまだ有機成分が含まれており、これらの有機成分についてもエネルギー変換可能であれば、藻類のさらなる有効利用につながる。高付加価値の有機成分であれば回収して利用するのが望ましいが、回収に値する成分でなければ、有効にエネルギー変換する方が良い。

メタン発酵残渣中の有機成分を効率的に溶解できる[P<sub>4,4,4,4</sub>][OH]を電解液とする系で金属ナノ粒子修飾電極が使用可能であれば、電気エネルギーへの直接変換が期待できる。平成 28 年度には、金ナノ粒子修飾電極と白金ナノ粒子修飾電極を我々の考案したキャスト法により作製し、これらの電極によりイオン液体中に溶解した残渣中の有機成分の酸化が可能であるかの検討を行った。まずは、キャスト法で作製した電極の有効性を調べるため、5wt%メタノール/1M NaOH 水溶液の酸化反応を検討したところ、通常 of 白金電極に比較して110倍の酸化電流値が検出できた。金ナノ粒子修飾電極も同様であり、これらの電極の有用性を示せた。金ナノ粒子修飾電極を用いて、[P<sub>4,4,4,4</sub>][OH]に溶解したメタン発酵残渣についても電気化学的酸化反応を調べたところ、電流値の増大が観測された(図 5-2)。平成29年度には、この電極をアノードとし、酸素の還元を行うカソードと組み合わせ、耐強塩基性のセルのプロトタイプを作製した。このセルを用い、金ナノ粒子修飾電極をアノードとし、酸素の還元を行うカソードと組み合わせ、メタン発酵残渣の有機成分から得られる電気エネルギーをアノードの触媒電流から見積もったところ、約10 μWcm<sup>-2</sup> となった。

### 5-3) 大型藻類の前処理のためのイオン液体の作製

大型藻類そのものを溶解できれば、基本的には発酵残渣中の藻類由来の成分は溶解可能と考えられるため、予定を前倒して平成 27 年度から検討することとした。メタン発酵残渣の溶解試験で用いたイオン液体と同じ種類のイオン液体(図 5-1 1-7)を用い、マコンブ粉末の溶解性の検討を行った。7([P<sub>4</sub> 4.4.4] [OH]) がマコンブ粉末を完全溶解することを見出した。また、疎水性の 3 や 4 が、マコンブ粉末を完全溶解はしないものの部分的に溶解し、かつマコンブ粉末をほぐすような効果があることも見出した。マコンブそのものの溶解では、水と相分離するような低極性のイオン液体にもある種の成分は溶解することから、目的化合物に応じたイオン液体を用いることにより、特定の成分を抽出することも可能であることが示唆された。また、マコンブ中のアルギン酸を構成する糖を原料として電気エネルギーと有用物質を同時生産するためのフローセルタイプの発電装置に用いることの可能な酵素を発見し、論文として報告した(原著論文 28-29)。

## § 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 37件)

1. R. Matsumoto, T. Aki, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Nakashimada, Y. Matsumura: Behavior of organics in kelp during hydrothermal pretreatment: Fundamental characteristics and effect of salt. *Journal of the Japan Institute of Energy*, **93(5)**: 531-535, 2014 (DOI: 10.3775/jie.93.531)
2. T. Miura, A. Kita, Y. Okamura, T. Aki, Y. Matsumura, T. Tajima, J. Kato, Y. Nakashimada: Evaluation of marine sediments as microbial sources for methane production from brown algae under high salinity. *Bioresource Technology*, **169**: 362-366, 2014 (DOI: 10.1016/j.biortech.2014.07.013.)
3. K.H.V. Arafles, H. Iwasaka, Y. Eramoto, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Matsumura, Y. Nakashimada, T. Aki: Value-added lipid production from brown seaweed biomass by two-stage fermentation using acetic acid bacterium and thraustochytrid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**: 9207-16, 2014. (DOI:10.1007/s00253-014-5980-4)
4. T. Aki, M. Yamamoto, T. Takahashi, K. Tomita, R. Toyoura, K. Iwashita, S. Kawamoto, M. Hosokawa, K. Miyashita, K. Ono: Regulation of polyunsaturated fatty acid biosynthesis by seaweed fucoxanthin and its metabolite in cultured hepatocytes. *Lipids*, **49**: 133-141, 2014. (DOI 10.1007/s11745-013-3856-5)
5. Y. Watanabe, S. Sato, S. Sera, C. Sato, K. Yoshinaga, T. Nagai, R. Sato, H. Iwasaka, T. Aki: Enzymatic analysis of positional distribution of fatty acids in solid fat by 1,3-selective transesterification with *Candida antarctica* lipase B. *Journal of American Oil Chemists Society*, **91**, 1323-1330, 2014. (DOI: 10.1007/s11746-014-2481-7)
6. R. Matsumoto, T. Aki, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Nakashimada, Y. Matsumura: Determination of mannitol decomposition rate under hydrothermal pretreatment condition. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, **58** (4), 252-255, 2015 (DOI 10.1627/jpi.58.252)
7. Y. Uemura, R. Matsumoto, S. Saadon, Y. Matsumura: A study on torrefaction of *Laminaria japonica*. *Fuel Processing Technology*, **138**, 133-138, 2015. (DOI: 10.1016/j.fuproc.2015.05.016)
8. T. Miura, A. Kita, Y. Okamura, T. Aki, Y. Matsumura, T. Tajima, J. Kato, Y. Nakashimada: Improved methane production from brown algae under high salinity by fed-batch acclimation, *Bioresource Technology*, **187**, 275-281, 2015. (DOI: 10.1016/j.biortech.2015.03.142)
9. A. Kita, T. Miura, S. Kawata, K. Yamaguchi, Y. Okamura, T. Aki, Y. Matsumura, T. Tajima, J. Kato, Y. Nakashimada: *Dysgonomonas alginatilytica* sp. nov., an alginate-degrading bacterium isolated from a microbial consortium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **65**, 3570-3575, 2015. (DOI: 10.1099/ijsem.0.000459)
10. T. Tajima, M. Hamada, Y. Nakashimada, J. Kato: Efficient aspartic acid production by a psychrophile-based simple biocatalyst. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **42**, 1319-1324, 2015. (DOI: 10.1007/s10295-015-1669-7)
11. T. Miura, T. A. Kita, Y. Okamura, T. Aki, Y. Matsumura, T. Tajima, J. Kato, Y. Nakashimada: Effect of salinity on methanogenic propionate degradation by acclimated marine sediment-derived culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **177**, 1541-1552, 2015. (DOI: 10.1007/s12010-015-1834-5)
12. T. Miura, A. Kita, Y. Okamura, T. Aki, Y. Matsumura, T. Tajima, J. Kato, Y. Nakashimada: Semi-continuous methane production from undiluted brown algae using a halophilic marine microbial community. *Bioresource Technology*, **200**, 616-623, 2016. (DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.090)
13. A. Kita, K. Kobayashi, T. Miura, Y. Okamura, T. Aki, Y. Matsumura, T. Tajima, N. Nishio, Y. Nakashimada: High-rate fermentation of acetate to methane under high salinity by acetoclastic methanogens immobilized in marine sediment. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, **59** (1), 9-15, 2016. (DOI: 10.1627/jpi.59.9)
14. Y. Okamura, S. Nakai, M. Ohkawachi, M. Suemitsu, H. Takahashi, T. Aki, Y. Matsumura, T. Tajima, Y. Nakashimada, M. Matsumoto: Isolation and characterization of bacterium

- producing lipid from short-chain fatty acids. *Bioresource Technology*, **201**, 215-221, 2016. (DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.040)
15. A. Kita, K. Suehira, T. Miura, Y. Okamura, T. Aki, Y. Matsumura, T. Tajima, N. Nishio, Y. Nakashimada: Characterization of a halotolerant acetoclastic methanogen highly enriched from marine sediment and its application in removal of acetate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **121**(2), 196-202, 2016. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.05.018)
  16. A. Kita, T. Miura, S. Kawata, K. Yamaguchi, Y. Okamura, T. Aki, Y. Matsumura, T. Tajima, J. Kato, Y. Nakashimada: Bacterial community structure and predicted alginate metabolic pathway in an alginate-degrading bacterial consortium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **121**(3), 286-292, 2016. (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.06.014)
  17. T. Mori, K. Iwamoto, S. Wakaoji, H. Araie, Y. Kohara, Y. Okamura, Y. Shiraiwa, H. Takeyama: Characterization of a novel gene involved in cadmium accumulation screened from sponge-associated bacterial metagenome. *Gene*, **576**, 618-625, 2016. (DOI: 10.1016/j.gene.2015.10.018)
  18. K. Watanabe, M. Ohno, M. Taguchi, S. Kawamoto, K. Ono, T. Aki: Identification of amino acid residues that determine the substrate specificity of mammalian membrane-bound front-end fatty acid desaturases. *Journal of Lipid Research*, **57**, 89-99, 2016. (DOI: 10.1194/jlr.M064121)
  19. K. Watanabe, M. Ohno, T. Aki: Detection of acyl-CoA derivatized with butylamide for *in vitro* fatty acid desaturase assay. *Journal of Oleo Science*, **65**, 161-167, 2016. (DOI: 10.5650/jos.ess15257)
  20. R. Mohamad, T. Aki, Y. Nakashimada, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Matsumura: Decomposition kinetics of mannose, its sugar alcohol, and its uronic acid under hydrothermal condition. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **49**, 663-667, 2016. (DOI: 10.1252/jcej.15we164)
  21. H. Takahashi, T. Satoh, H. Kanahara, Y. Kubota, T. Hirose, H. Yamazaki, K. Yamamoto, Y. Okamura, T. Suzuki, T. Kobori: Development of a bench-top extra-cleanroom for DNA amplification. *Bio Techniques*, **61**, 42-46, 2016. (DOI: 10.2144/000114433)
  22. R. Mohamad, T. Aki, Y. Nakashimada, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Matsumura: Kinetics of sorbitol decomposition under hydrothermal condition. *Journal of Japan Petroleum Institute*, **59**, 149-154, 2016. (DOI: 10.1627/jpi.59.149)
  23. R. Mohamad, T. Aki, Y. Nakashimada, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Matsumura: Decomposition kinetics of uronic acids obtained from kelp under hydrothermal condition. *Journal of the Energy Institute*, **90**(2), 185-190, 2017. (DOI: 10.1016/j.joei.2016.02.005)
  24. P. Duangkaew, S. Inoue, T. Aki, Y. Nakashimada, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Matsumura: In-situ mass spectroscopic analysis of glucose decomposition under hydrothermal condition-Quantitative analysis for reaction kinetics, *Journal of the Japan Petroleum Institute*, **60**(2), 101-109, 2017. (DOI: doi.org/10.1627/jpi.60.101)
  25. P. Duangkaew, S. Inoue, T. Aki, Y. Nakashimada, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Matsumura: In situ mass spectrometry of glucose decomposition under hydrothermal reactions, *Korean Journal of Chemical Engineering*, **34**(5), 1524-1530, 2017. (DOI: 10.1007/s11814-017-0030-4)
  26. P. Duangkaew, S. Inoue, T. Aki, Y. Nakashimada, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Matsumura: Real-time Mass Spectrometric Analysis of Hydrothermal Reaction Products, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *In press*. (DOI: 10.1021/acs.iecr.7b02663)
  27. Y. Iwasaki, A. Kita, K. Yoshida, T. Tajima, S. Yano, T. Shou, M. Saito, J. Kato, K. Murakami, Y. Nakashimada: Homolactic acid fermentation by the genetically engineered thermophilic homoacetogen *Moorella thermoacetica* ATCC 39073. *Applied and Environmental Microbiology*, **83**(11), e00247-17, 2017. (DOI: 10.1128/AEM.00247-17)
  28. R. Sakuta, K. Takeda, K. Igarashi, H. Ohno, N. Nakamura: Pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase anode: Coproduction of galactaric acid and electricity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **133**, s76-s79, 2016. (DOI: 10.1016/j.molcatb.2016.11.021)
  29. R. Sakuta, K. Takeda, K. Igarashi, H. Ohno, N. Nakamura: Enzymes suitable for biorefinery to coproduce hexaric acids and electricity from hexuronic acids derived from biomass, *Energy Technology*, **6**(2), 273-279 (2018). (DOI: 10.1002/ente.201700404)

30. T. Miura, A. Kita, Y. Okamura, T. Aki, Y. Matsumura, T. Tajima, J. Kato, Y. Nakashimada: Improved methanization and microbial diversity during batch mode cultivation with repetition of substrate addition using defined organic matter and marine sediment inoculum at seawater salinity, *Bioresource Technology*, **245**, 833-840 (2017). (DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.009)
  31. T. Tajima, K. Tomita, H. Miyahara, K. Watanabe, T. Aki, Y. Okamura, Y. Matsumura, Y. Nakashimada, J. Kato: Efficient conversion of mannitol derived from brown seaweed to fructose for fermentation with a thraustochytrid, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **125**(2), 180-184 (2018). (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.09.002)
  32. P. Duangkaew, S. Inoue, T. Aki, Y. Nakashimada, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Matsumura: Quantitative in situ MS analysis of mannitol decomposition products under hydrothermal conditions, *Energy Fuels*, **31**, 10866-10873 (2017). (DOI: 10.1021/acs.energyfuels.7b01558).
  33. H. Takahashi, M. Ohkawachi, K. Horio, T. Kobori, T. Aki, Y. Matsumura, Y. Nakashimada, Y. Okamura: RNase H-assisted RNA-primed rolling circle amplification for targeted RNA sequence detection, *Scientific Reports*, **8**, Article number: 7770 (2018). (doi:10.1038/s41598-018-26132-x)
  34. K. Watanabe, K.H.V. Arafiles, R. Higashi, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Matsumura, Y. Nakashimada, T. Aki: Isolation of *Aurantiochytrium* sp. mutants highly producing carotenoids and improvement of astaxanthin productivity using metabolic information. *Journal of Oleo Science*, *In press*.
  35. N. Satoh, H. Iwasaka, R. Koyanagi, R. Satoh, A. Nagano, K. Watanabe, T. Aki: A possible trifunctional  $\beta$ -carotene synthase gene identified in the draft genome of *Aurantiochytrium* sp. strain KH105. *Genes*, *Accepted*.
- 【査読審査の入る proceedings 等】
36. H. Kimura, T. Arima, Y. Okamura, T. Oku, T. Sakaguchi, Selenium recovery and conversion by a Filamentous Fungus, *Aspergillus oryzae* Strain RIB40. *Asia Pacific Journal of Sustainable Agriculture Food and Energy*, **2** (2), 5-8. 2014.
  37. M. P. Munar, T. Matsuo, H. Kimura, H. Takahashi, Y. Okamura: Biomineralization of metallic tellurium by bacteria isolated from marine sediment off Niigata Japan. *Proceedings of BIOMIN XIV*, *Accepted*.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. T. Bruce, A. D. Ferrao-Gonzales, Y. Nakashimada, Y. Matsumura, F. Thompson, T. Sawabe: Biofuel innovation by microbial diversity, *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, (Kim, Se-Kwon ed.), Springer, pp. 1163-1180, 2015.
2. 岡村好子: 細菌によるレアメタルの回収, *バイオベース資源確保戦略—都市鉱山・海底鉱山に眠る貴金属・レアメタル等の分離回収技術—*, 小西康裕監修, シーエムシー, pp.144-149, 2015.
3. 高橋宏和, 岡村好子, 小堀俊郎: 1 細胞ゲノミクスの為の試薬と環境, *DNA-free phi29 DNA ポリメラーゼの開発*, *ケミカルタイムズ*, vol. 238, No. 4, pp.22-27, 2015.
4. 渡邊研志: 脂肪酸の多様な生理活性～細身の体に秘める力～, *生物工学会誌*, vol. 93, pp. 216, 2015.
5. 中島田豊, 喜多晃久, 三浦豊和, 田島誉, 秋庸裕, 岡村好子, 松村幸彦: 海洋大型藻類からのエネルギー・マテリアル回収, *環境バイオテクノロジー学会誌*, vol. 16, No. 1, pp. 3-9, 2016
6. 秋 庸裕: 海藻バイオマスの利用とラビリンチュラによる油脂生産, *海洋と生物*, vol. 38, No. 1, pp. 36-40, 2016.
7. 秋 庸裕, 細川雅史: 海藻カロテノイドと不飽和脂肪酸代謝, *化学と生物*, vol. 54, No. 5, pp. 308-309, 2016.
8. 冷牟田修一, 秋 庸裕: 藻類の分子育種とその応用, *バイオマスエネルギーの技術と市場*, シーエムシー出版, pp. 22-32, 2016.
9. Y. Nakashimada, N. Nishio: Energy recovery from organic wastes, *Applied Bioengineering vol. 5 -Innovations and Future Directions* (T. Yoshida ed.), pp. 545-572, 2016, Wiley,

Weinheim, Germany.

10. 松村幸彦: バイオマス利用技術の現状, 環境バイオテクノロジー学会誌, **16(1)**, 41-44, 2016.
11. H. Takahashi, Y. Okamura, T. Kobori, Use of DNA CircLigase for direct isothermal detection of microbial mRNAs by RNA-primed rolling circle amplification and preparation of  $\phi$ 29 DNA polymerase not contaminated by amplifiable DNA. *Rolling Circle Amplification (RCA): Toward New Clinical Diagnostics and Therapeutics (Vadim Demidov ed.)* pp.37-46, 2016, Springer, Heidelberg, Germany.

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 39 件、国際会議 29 件)

1. Y. Watanabe, Improvement in enzymatic regiospecific analysis of TAG. 8th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, California, USA, 2012/10/28.
2. 秋 庸裕, ラビリンチュラにおける機能性脂質の生合成機構. 第 3 回学際的脂質創生研究部会講演会、京都大学、2013/1/25
3. T. Aki, Production of high value-added lipids by marine thraustochytrids. 2nd International Symposium on Marine Biomass Utilization, Hiroshima University, 2013/4/11.
4. 中島田豊, メタン発酵高速化を基盤とした海洋藻類のエネルギー・資源化に向けて、第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会シンポジウム「マリンゲノミクス その新たな躍動」、沖縄県市町村自治会館、2013/6/1.
5. 岩坂宏明, 有用微細藻類のゲノム解読とその応用、第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会シンポジウム「マリンゲノミクス その新たな躍動」、沖縄県市町村自治会館、2013/6/1.
6. 岩坂宏明, ラビリンチュラ類の分子育種による機能開発、第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会シンポジウム「ラビリンチュラ類を用いたバイオテクノロジーの展望」、沖縄県市町村自治会館、2013/6/2.
7. 三浦豊和, 海洋大型藻類のメタン発酵, 第11回広島大学バイオマスイブニングセミナー、広島大学、2013/7/17.
8. 中島田豊, 大型藻類の完全活用によるエネルギー・資源化プロセスの開発に向けて、日本生物工学会大会シンポジウム「水圏バイオマスリファイナリー研究の最新動向」、広島国際会議場、2013/9/20.
9. Y. Okamura, Screening of a Bioactive Compounds and Their Genes from a Metagenomic Library of Sponge-Associated Bacteria. BIT's 3rd Annual World Congress of Marine Biotechnology, Hangzhou, China, 2013/9/23.
10. T. Aki, Bioconversion of seaweed saccharides to value-added lipids. 9th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Piestany, Slovak Republic, 2013/10/15.
11. Y. Nakashimada, Anaerobic fermentation of unconventional substrates for recovery of energy and useful materials. Asia BioHydrogen & BioEnergy 2013, Osaka City University, 2013/11/24.
12. Y. Nakashimada, Anaerobic fermentation of unconventional substrates for recovery of energy and useful materials. Asia BioHydrogen & BioEnergy 2013, Osaka City University, 2013/11/24.
13. 秋 庸裕: 海洋微生物を用いた高付加価値油脂の生産、「知的クラスター形成に向けた研究拠点構築事業」シンポジウム、沖縄産業支援センター、2013/12/19.
14. 秋 庸裕, 海洋生物資源を活用した高付加価値油脂の生産. 2014 油脂産業技術部会・オレオライフサイエンス部会共催セミナー「有用油脂の創生と高度利用」、東京海洋大学、2014/6/19.

15. K. Arafles, Utilization of seaweed biomass for functional lipid production. 105th American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo, San Antonio, TX, USA, 2014/5/6
16. T. Aki, Production of functional lipids using marine resources. 1st Asian Conference on Oleo Science, Sapporo, 2014/9/9.
17. Y. Okamura, Metal resources in marine biomass, Danish-Japanese Workshop on Bioenergy, Odense, Denmark, 2014/9/12.
18. Y. Nakashimada, Biogas production from ocean biomass by marine microbial ecosystem, Danish-Japanese Workshop on Bioenergy 2014, Odense, Denmark, 2014/9/12.
19. 中島田豊, 非従来型バイオマスの高効率メタン発酵法の開発(Anaerobic digestion of unconventional biomass feedstock), M319, 化学工学会第46回秋季大会, 福岡, 2014/9/18.
20. 中島田豊, メタン発酵によるバイオマス利活用, 環境科学会・シンポジウム「生物工学を基盤とした環境動態解析と化学物質処理」、つくば, 2014/9/28.
21. K. Arafles, Lipid production from seaweed biomass by two-stage fermentation. 10th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Kaohsiung, Taiwan, 2014/10/30.
22. 秋 庸裕, 海洋生物資源を利用した有用油脂の生産. バイオインダストリー協会・研究会合同シンポジウム「藻類に託されるグリーンビジネス成長戦略のゆくえ」、東京大学, 2014/12/12.
23. 中島田 豊, 海洋バイオマスの全体利用 —CREST プロジェクトの紹介—, 日本エネルギー学会 [リサイクル・バイオマス・ガス化] 三部会 (RGB) シンポジウム—廃棄物、バイオマス、石炭等利用技術の最新動向—, 東京, 2015/5/22.
24. 秋 庸裕, 海洋バイオマスの利用とラビリンチュラによる油脂生産, ラビリンチュラ・シンポジウム～オーランチオキトリウムとその仲間たちの生物学と産業応用, 東京, 2015/7/4.
25. T. Aki, Bioconversion of marine biomass for production of valuable lipids, 11th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Banff, Canada, 2015/9/14.
26. Y. Nakashimada, Process development of anaerobic digestion for energy and material production from land and marine biomass, International symposium "Recent advances in biorefinery research in Asian countries", in 67th The Society for Biotechnology, Japan Annual Meeting, Kagoshima, Japan, 2015/10/27.
27. 岡村好子, 海藻バイオマス廃液処理における有価物生産, グリーン科学事業「未利用バイオマスの CO<sub>2</sub> 削減/エネルギー・資源利用による低炭素循環型社会連携—分離融合型の新学際組織の構築—」 気候変動適用グリーン社会創製へのバイオマスの新たな戦略, 静岡大学, 静岡キャンパス, 2015/11/12.
28. 岡村好子, 未知・未培養微生物の遺伝子資源の利用, 文部科学省科学技術人材育成費補助事業 女性研究者研究活動支援事業(拠点型) 第2回女性研究者研究交流会, 広島大学, 東広島キャンパス, 2015/11/27.
29. Y. Matsumura, Marine biomass utilization for biorefinery, International Symposium on EcoTopia Science '15 (ISETS2015), Nagoya, Japan, 2015/11/28.
30. 中島田豊, 海藻バイオマスの徹底利用, 日本農芸化学会, サッポロコンベンションセンター, 2016/3/28.
31. 伊藤 大志, コンブの水熱前処理におけるウロン酸の挙動, 第41回広島大学バイオマスイブニングセミナー, 広島大学, 2016/4/14.
32. 岡村好子, 培養できない微生物の遺伝子, グリーン科学研究所講演会, 静岡大学, 2016/4/22.
33. T. Aki, Production of biomethane and functional lipids from marine macroalgae, 107th American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo, Salt Lake City, UT, USA, 2016/5/4.

34. 岡村好子, ノーコンタミネーションのゲノム増幅・稀少未知微生物の遺伝子探索に向けて, 第 13 回アカデミックフォーラム, 東京ビッグサイト, 2016/5/11.
35. P. Duangkaew, Hydrothermal pretreatment of macroalgae for sugar production; Investigation of products of mannitol decomposition during hydrothermal process via real time mass spectrometry, 第42回広島大学バイオマスイブニングセミナー, 広島大学, 2016/5/12.
36. 中島田豊, バイオガス化の重要性及び水素社会実現への貢献, 「中部浄化センター 汚泥バイオガス化計画」に関する勉強会, アクトシティ浜松 研修交流センター, 2016/6/3
37. 松村幸彦, バイオマス利用技術の現状, 環境バイオテクノロジー学会 2016 年度大会, サテライトキャンパスひろしま, 2016/6/13
38. 秋 庸裕, 海藻バイオマスの利用とラビリンチュラによる脂質生産, 第3回ラビリンチュラ・シンポジウム, 甲南大学 平生記念セミナーハウス, 2016/7/9
39. 田島 誉久, 低温菌を活用したシンプル酵素変換触媒, ライフサイエンス技術部会・反応分科会講演会:「人工代謝経路の構築による化学品の生産技術」, 新化学技術推進協会, 2016/7/12.
40. T. Aki, Bioconversion of marine and industrial biomass for production of value-added lipids and terpenoids, 45th Philippine Society for Microbiology Annual Convention and Scientific Meeting and 7th Asia Pacific Biotechnology Congress, Vigan, Philippines, 2016/7/22.
41. 松村幸彦, バイオマス研究・バイオマス利用の現状と展望, 第 25 回日本エネルギー学会大会, 工学院大学, 2016/8/9.
42. R. Mohamad, Hydrothermal pretreatment of macroalgae: Detailed reaction kinetics and mechanisms, 第 45 回広島大学バイオマスイブニングセミナー, 広島大学, 2016/9/26
43. N. Nakamura, Construction of an enzymatic biofuel cell which produces electric energy and a platform chemical simultaneously, PRiME 2016, Honolulu, Hawaii, USA, 2016/10/3.
44. 松村幸彦, バイオマス利用の現状と展望, 地球環境技術推進懇談会平成 28 年度第 2 回講演会, 大阪科学技術センター, 2016/10/5.
45. T. Aki, Bioconversion of marine biomass into value-added lipids by marine thraustochytrids, 12th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Hong Kong, China, 2016/10/17.
46. Y. Nakashimada, Fermentation technology to recover energy and high-value added products from seaweed, 4th International Conference on Bioprocess and Bio Therapeutics, Crowne Plaza Houston River Oaks, Huston, USA, 2016/10/21.
47. 岡村好子, 低級有機酸資化性細菌によるコンブ発酵廃液処理と軽油生産の可能性, 第 47 回広島大学バイオマスイブニングセミナー・第 3 回広大 ACE セミナー, 広島大学, 2016/11/10.
48. 秋 庸裕, 海のバイオマス藻ラビリンチュラ類からの油、ジェット燃料、健康食品生産, 蔵前バイオエネルギー講演会, 東工大キャンパスイノベーションセンター, 2016/11/24.
49. T. Aki, Effective utilization of marine biological resources for production of value-added lipids, 3rd International Symposium on Molecular Science, Manila, Philippines, 2016/12/1.
50. Y. Okamura, Metal utilization by marine bacteria, 3rd International Symposium on Molecular Science, Manila, Philippines, 2016/12/1.
51. 秋 庸裕, 海洋生物資源を活用する油脂バイオテクノロジー, 第 48 回広島大学バイオマスイブニングセミナー・第 4 回広大 ACE セミナー, 広島大学, 2016/12/20.
52. 松村幸彦, バイオマス利用技術の現状, 第24回静岡フォーラム・第49回研究交流セミナー「持続可能社会に向けたバイオマス利用の推進」, アクトシティ浜松, 2016/12/20.

53. 田島誉久, 低温菌シンプル酵素触媒を用いた海洋バイオマスの物質変換, 第 48 回広島大学バイオマスイブニングセミナー・第 4 回広大 ACE セミナー, 広島大学, 2016/12/20.
54. 中島田豊, 様々なバイオマスからの水素、メタン発酵プロセスの開発, 「バイオマスイノベーション研究会」第38回研究会, 大阪科学技術センター, 2017/2/10.
55. 中島田豊, 海洋性微生物を活用した耐塩性メタン発酵プロセスの開発, 第 46 回広島大学バイオマスイブニングセミナー, 広島大学, 2017/2/10.
56. D. Pattasuda, In-situ quantitative mass spectrometry of decomposition products and development for hydrothermal treatment of glucose, 第51回広島大学バイオマスイブニングセミナー, 広島大学, 2017/3/1.
57. K Watanabe (Hiroshima University), Regulation of carotenoid biosynthesis in marine thraustochytrid, *Aurantiochytrium* sp., 2017 American Oil Chemists' Society Annual Meeting, Florida, USA, 2017/5/2.
58. 三浦豊和, 褐藻からのバイオメタン生産, 第53回広島大学バイオマスイブニングセミナー・第13回広大 ACE セミナー, 広島大学, 2017/5/18.
59. Y. Nakashimada, Integrated process development for biorefinery of seaweed, 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC2017), Honolulu, USA, 2017/5/23.
60. 岡村好子: 細菌のミネラル化, 第19回マリンバイオテクノロジー学会シンポジウム「バイオミネラル化における有機-無機相互作用の分子メカニズムを利用した応用研究の最前線」東北大学, 2017/6/4.
61. N. Nakamura, Co-production of electric energy and platform chemicals, Frontiers in Materials Processing Applications, Research and Technology (FiMPART) 2017, Bordeaux, France, 2017/07/10.
62. T. Aki, Bioprocess for valuable oil production by thraustochytrids, 13th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Taichung, Taiwan, 2017/10/19.
63. Y. Nakashimada, Future perspective of biomass toward sustainable society-Biogas production from various unconventional feedstock, International Workshop on Biomass for Biofuels 2017, Puspiptek Serpong, Indonesia, 2017/10/19.
64. 岡村好子, 海藻バイオマス発酵廃液処理と金属資源・バイオオイル回収, 第 58 回広島大学バイオマスイブニングセミナー・第 23 回広大 ACE セミナー, 広島大学, 2017/11/8.
65. 中島田豊, 大型藻類を徹底的に利用する, 第 17 回バイオマス関連部会・研究会合同交流会, 全国家電会館, 東京, 2017/12/5.
66. 秋 庸裕: 海洋微生物を活用する油脂バイオリファイナリー, 第 59 回広島大学バイオマスイブニングセミナー・第 24 回広大 ACE セミナー, 広島大学, 2017/12/6.
67. Y. Nakashimada, Seaweed biorefinery: integrated process development, iBio-S 2017, Singapore, 2017/12/19.
68. 岡村好子, 標的 RNA の新規な高精度識別方法, 第 15 回アカデミックフォーラム, 東京ビッグサイト, 2018/6/28. 発表決定

② 口頭発表 (国内会議 29 件、国際会議 44 件)

1. 岡村好子, 特異的プライマーを用いた環状 DNA の増幅, 第7回日本ゲノム微生物学会年会, 長浜バイオ大学, 滋賀県, 2013/3/8 - 10.
2. 阪口利文・田邊伸康・有馬寿英・宮下英明・石川可奈子・岡村好子, 琵琶湖深湖底由来菌類によるセレンオキシアニオン還元とナノ微粒子への変換, 日本農芸化学会 2013 年大会, 東北大学, 宮城県, 2013/3/24 - 28.
3. Y. Nakashimada, Ethanol production from brown algae with alginate-degrading microbial consortia, 19<sup>th</sup> Regional Symposium on Chemical Engineering, Surabaya, Bali, Indonesia, 2012/11/7.

4. 岡村好子、高橋宏和、非リボソーム合成酵素遺伝子を有する細菌特異的なゲノム増幅法の開発、第15回マリンバイオテクノロジー学会、沖縄県市町村自治会館、2013/6/1
5. R. Matsumoto, The behavior of sugar in hydrothermal pretreatment of laminaria, 2DV.2.3, 21st European Biomass Conference & Exhibition: Setting the course for a biobased economy, Copenhagen, Denmark, 2013/6/3-7.
6. Y. Nakashimada, Fundamental study for methane fermentation of marine algal biomass under saline condition, The 9th Asia Pacific Conference on Sustainable Energy & Environmental Technologies (APCSEET 2013), Narita, Japan, 2013/7/5-8.
7. R. Matsumoto, Fundamental investigation of hydrothermal pretreatment of marine macroalgae for sugar recovery, B12, The 9th Asia Pacific Conference on Sustainable Energy & Environmental Technologies (APCSEET 2013), Narita, Japan, 2013/7/5-8.
8. A. Kita, Symbiotic alginate degradation by anaerobic microbial consortium: The 2nd Joint Conference on "Renewable Energy and Nanotechnology": Hiroshima: 2013/11/25.
9. R. Matsumoto, Behavior of mineral component in kelp during hydrothermal pretreatment, C51, 2nd Joint Conference in Renewable Energy and Nanotechnology (JCREN2013), Higashi-Hiroshima, Japan, 2013/11/25-26.
10. T. Miura, Availability of microorganisms in marine sludges for methane production from brown algae, The 2<sup>nd</sup> Joint Conference on "Renewable Energy and Nanotechnology", Faculty Club, Hiroshima University, 2013/11/25.
11. A. Kita, Metagenomic analysis of anaerobic microbial consortium that can degrade alginate by symbiosis, The 3rd International Symposium on Marine Biomass Utilization (The 1st Japan-Hawaii Joint Workshop "Marine Biomass Utilization"), Honolulu, USA, 2013/11/12.
12. T. Miura, Availability of marine sediments for methane production from brown algae under high salinity, The 3rd International Symposium on Marine Biomass Utilization (The 1st Japan-Hawaii Joint Workshop "Marine Biomass Utilization"), Honolulu, USA, 2013/11/12.
13. Y. Okamura, Marine biomass waste is the resources for metals, The 3rd International Symposium on Marine Biomass Utilization (The 1st Japan-Hawaii Joint Workshop "Marine Biomass Utilization"), Honolulu, USA, 2013/11/12.
14. Y. Matsumura, Hydrothermal pretreatment of kelp, The 3rd International Symposium on Marine Biomass Utilization (The 1st Japan-Hawaii Joint Workshop "Marine Biomass Utilization"), Honolulu, USA, 2013/11/12.
15. K. Arafles, Production of high value-added lipids by marine thraustochytrids, The 3rd International Symposium on Marine Biomass Utilization (The 1st Japan-Hawaii Joint Workshop "Marine Biomass Utilization"), Hawaii Natural Energy Institute, University of Hawaii, 2013/11/22.
16. T. Miura, Detailed evaluation of marine sediments as microbial sources for methane production from brown algae at seawater salinity, International Bioenergy Conference 2014, Manchester Central Conventional Complex, Manchester, UK, 2014/3/11.
17. Y. Okamura, Heavy metal removal from the algal biomass by marine photosynthetic bacteria, 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Taipei, Taiwan, (<http://www.apmbc2014.com>), 2014/5/6.
18. 岡村好子、コンブバイオマスに蓄積された金属資源の光合成細菌による回収、第16回マリンバイオテクノロジー学会 三重県 三重大学、2014/6/1.
19. H. Kimura, Yoshiko Okamura, Selenium recovery and conversion by a filamentous fungus, *Aspergillus oryzae* strain RIB40、International Conference Sustainable Agriculture, Food and Energy、SAFE2014, Indonesia, 2014/9/18.
20. Rozyanti Mohamad, Fundamental study on uronic acids utilization from alginic acid, B14, 化学工学会中国四国支部大学院生発表会、広島、2014/12/5.
21. 松本龍之介、水熱前処理におけるコンブ中の糖の挙動、C16, 化学工学会中国四国支部大学院生発表会、広島、2014/12/5.

22. R. Mohamad, Isolation of gluconic and mannuronic acids from kelp, RE-11, the 3rd Joint Conference on Renewable Energy and Nanotechnology (JCREN2014), Kanchanaburi, Thailand, 2014/12/22.
23. R. Matsumoto, Effect of salt on production of furfurals during decomposition of kelp, RE-18, the 3rd Joint Conference on Renewable Energy and Nanotechnology (JCREN2014), Kanchanaburi, Thailand, 2014/12/22.
24. 松本龍之介, 乾燥しないコンブの水熱前処理, O-52, 第10回バイオマス科学会議, つくば, 2015/1/14-15.
25. 長野亜希子, *Aurantiochytrium* 属における新規カロテノイド生合成酵素の機能解析, 第5回学際的脂質創生研究部会講演会, 京都, 2015/1/23.
26. Y. Nakashimada, The effect of drying and salt on behavior of kelp components in hydrothermal pretreatment, 23rd European Biomass Conference and Exhibition (EUBCE2015), Vienna, Austria, 2015/6/2.
27. P. Duangkaewa, Development of direct mass analysis of hydrothermal reactions, 第24回日本エネルギー学会大会, 札幌, 2015/8/3.
28. R. Mohamad, Decomposition kinetics of mannose, mannitol and mannuronic acid under hydrothermal condition, 化学工学会第47回秋季大会, 札幌, 2015/9/11.
29. P. Duangkaew, Investigation of products from glucose decomposition under hydrothermal reaction by real time analysis of quantitative mass spectrometry, The 4th Joint Conference on Renewable Energy and Nanotechnology (JCREN2015), Matsuyama, Japan, 2015/12/6.
30. Y. Matsumura, Behavior of alginic acid during hydrothermal pretreatment of kelp, The 4th Joint Conference on Renewable Energy and Nanotechnology (JCREN2015), Matsuyama, Japan, 2015/12/6.
31. R. Mohamad, Study on characteristics of mannitol and sorbitol under hydrothermal condition, The 4th Joint Conference on Renewable Energy and Nanotechnology (JCREN2016), Matsuyama, Japan, 2015/12/6.
32. T. Yano, Effect of salt concentration on anaerobic digestion of macroalgae: a kinetic study, The 4th Joint Conference on Renewable Energy and Nanotechnology (JCREN2015), Matsuyama, Japan, 2015/12/6.
33. 中島田 豊, 耐塩性メタン発酵による海洋高塩バイオマス処理技術, 広島大学新技術説明会 2015 in 広島, 広島, 2015/12/7.
34. Y. Okamura, Valuable substances production using marine biomass wastewater, PACIFICHEM 2015, Honolulu, Hawaii, U.S, 2015/12/19.
35. A. Kita, Reconstruction of a stable anaerobic bacterial consortium capable of degrading alginate, 3rd Asian Conference on Biomass Science, TOKI MESSE, Japan, 16/1/19.
36. 三浦豊和, 大型藻類からのバイオメタン生産, 第14回広島大学バイオマスプロジェクトセンターシンポジウム・第9回中国地域バイオマス利用研究会講演会「実用化に迫る中国地域のバイオマス研究」, 広島大学東千田キャンパス, 2016/3/10.
37. R. Sakuta, Galactaric acid production catalyzed by PQQ-dependent glucose dehydrogenase, 1st Green and Sustainable Chemistry Conference, Berlin Germany, 2016/4/4.
38. 中島田豊, 海洋性微生物資源を活用した大型藻類からのエネルギー・物質生産, 環境バイオテクノロジー学会 2016年度大会, サテライトキャンパスひろしま, 2016/6/13.
39. Y. Nakashimada, Green production of biofuels, valuable chemicals and metals from macroalgae by marine microorganisms, International Marine Biotechnology Conference 2016, The Hyatt Regency Hotel, Baltimore, USA, 2016/8/30.
40. Y. Nakashimada, Toward complete utilization of seaweed, The 5th International Symposium on Marine Biomass Utilization, University of Hawaii. Honolulu, USA, 2016/10/31.
41. Y. Matsumura, System analysis for kelp refinery, The 5th International Symposium

- on Marine Biomass Utilization, University of Hawaii. Honolulu, USA, 2016/10/31.
42. Y. Okamura, Light oil production in algal wastewater by Nitratireductor sp. OM-1, The 5th International Symposium on Marine Biomass Utilization, University of Hawaii. Honolulu, USA, 2016/10/31.
  43. K. Watanabe, Bioconversion of marine biomass into value-added lipids by thraustochytrids, The 5th International Symposium on Marine Biomass Utilization, University of Hawaii. Honolulu, USA, 2016/10/31.
  44. T. Tajima, Psychrophile-based simple bioCatalyst (PSCat) for efficient bioconversion of marine biomass, The 5th International Symposium on Marine Biomass Utilization, University of Hawaii. Honolulu, USA, 2016/10/31.
  45. A. Kita, Elucidation of the symbiotic alginate degradation mechanism; toward engineering of a synthetic microbial consortium, The 5th International Symposium on Marine Biomass Utilization, University of Hawaii. Honolulu, USA, 2016/10/31.
  46. T. Miura, Process development for biomethane production from undiluted brown algae, The 5th International Symposium on Marine Biomass Utilization, University of Hawaii. Honolulu, USA, 2016/10/31.
  47. Y. Matsumura, Determination of alginic acid decomposition rate under hydrothermal pretreatment condition of kelp, The 4th Joint Conference on Renewable Energy and Nanotechnology, Universiti Teknologi Petronas, Kuala Lumpur, Malaysia, 2016/12/8.
  48. T. Yano, Effect of salt concentration on anaerobic digestion of macroalgae: a kinetic study, The 4th Joint Conference on Renewable Energy and Nanotechnology, Universiti Teknologi Petronas, Kuala Lumpur, Malaysia, 2016/12/8.
  49. 東 莉沙, キサントフィル高生産性 *Aurantiocytrium* 属変異株の作出と特性解析, 日本生物工学会・第 7 回学際的脂質創生研究部会講演会, 九州大学西新プラザ, 2017/1/27.
  50. 中島田豊, もっとコンブから天然ガスをつくる, 第 16 回広島大学バイオマスプロジェクト研究センターシンポジウム, 広島大学千田キャンパス, 広島, 2017/3/13.
  51. 松村幸彦, もっと水中のコンブに熱と圧力をかける, 第 16 回広島大学バイオマスプロジェクト研究センターシンポジウム, 広島大学千田キャンパス, 広島, 2017/3/13.
  52. 秋庸裕, もっとコンブの糖質から有用な油をつくる, 第 16 回広島大学バイオマスプロジェクト研究センターシンポジウム, 広島大学千田キャンパス, 広島, 2017/3/13.
  53. 田島誉久, シンプル酵素でコンブを効率的に変換する, 第 16 回広島大学バイオマスプロジェクト研究センターシンポジウム, 広島大学千田キャンパス, 広島, 2017/3/13.
  54. 岡村好子, もっと海からレアメタル・レアアースを集める, 第 16 回広島大学バイオマスプロジェクト研究センターシンポジウム, 広島大学千田キャンパス, 広島, 2017/3/13.
  55. 中村暢文, コンブから電気エネルギーをつくる, 第 16 回広島大学バイオマスプロジェクト研究センターシンポジウム, 広島大学千田キャンパス, 広島, 2017/3/13.
  56. 岡安耕祐, 大型藻類のメタン発酵後残渣に含まれる有機物のイオン液体を用いた回収, 日本化学会第 97 春季年会, 慶應義塾大学 日吉キャンパス, 2017/3/18.
  57. 渡邊研志, ラビリンチュラ類 *Aurantiocytrium* 属のメタボローム解析による育種標的の探索と脂質生産量の向上, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都女子大, 2017/3/19.
  58. P. Duangkaew, In situ mass spectroscopy of hydrothermal reaction products, 2113, The 6th International Symposium on Micro and Nano Technology (ISMNT-6), Fukuoka, Japan, 2017/3/19-22.
  59. N. Nakamura, Dissolution of the methane fermentation residue of macroalgae in ionic liquids, The 11<sup>th</sup> Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC) 2017, Honolulu, Hawaii, USA, 2017/05/23.
  60. P. Duangkaew, Continuous mass spectrometry analysis for hydrothermal decomposition of glucose, 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference

- (APMBC2017), Honolulu, USA, 2017/5/22-24.
61. Y. Okamura, Oil production from organic acids derived from marine algal biomass by *Nitratireductor* sp. OM-1, 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC2017), Honolulu, USA, 2017/5/22-24.
  62. T. Miura, Continuous methane production from volatile fatty acids for the second stage of two-stage methanization of undiluted brown algae, 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC2017), Honolulu, USA, 2017/5/22-24.
  63. A. Kita, Production of volatile fatty acids from alginate by bacterial consortium derived from marine sediment, 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC2017), Honolulu, USA, 2017/5/22-24.
  64. Y. Matsumura, Process evaluation of macroalgae utilization system, 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC2017), Honolulu, USA, 2017/5/22-24.
  65. Tajima, Efficient conversion of carbohydrate derived from brown seaweed by psychrophile-based simple biocatalyst, Asia Pacific Marine Biotechnology Conference 2017, Hawaii University, 2017/5/24.
  66. 上原莉世, *Aurantiochytrium* 属におけるカロテノイド高生産変異株の単離とその生産特性の解析、第4回ラビリンチュラシンポジウム、九州大学、2017/7/8.
  67. 作田陸(東京農工大学)、酵素バイオ燃料電池を用いたヘキサロン酸からのヘキサール酸と電気エネルギーの同時生産、電気化学会秋季大会、長崎大学、2017/09/04.
  68. K. Watanabe, Improvement of docosahexaenoic acid and astaxanthin productivity of *Aurantiochytrium* sp. through metabolome analysis, 2nd Asian Conference on Oleo Science, Tokyo University of Science, Japan, 2017/9/11.
  69. 青井真人、油糧微生物オーランチオキトリウム属への CRISPR-Cas9 システムの導入、第8回学際的脂質創生研究部会、東広島芸術文化ホールくらら、2018/1/26.
  70. 上原莉世、オーランチオキトリウム属キサントフィル高生産性株の単離とその生産性の改良、日本農芸化学会中四国支部第50回記念講演会、広島大学、2018/1/27.
  71. 畑 浩介、オーランチオキトリウム属への CRISPR-Cas9 システムの適用、日本農芸化学会中四国支部第50回記念講演会、広島大学、2018/1/27.
  72. 喜多晃久、海洋性菌叢によるキチン含有廃棄物からの有用物質生産、日本農芸化学会2018年度大会、名城大学、2018/3/16.
  73. 渡邊研志、オーランチオキトリウム属キサントフィル高生産変異株の作出とメタボローム情報による生産性向上、日本農芸化学会2018年度大会、名城大学、2018/3/17.
- ③ ポスター発表 (国内会議 62 件、国際会議 45 件)
1. 中島田豊, 大型藻類の完全資源化基盤技術の開発、第8回バイオマス科学会議、東広島、2013/1/9-10.
  2. 松本龍之介, 海洋大型藻類有効利用のための水熱前処理の基礎検討、第8回バイオマス科学会議、東広島、2013/1/9-10
  3. 喜多 晃久, 嫌氣的アルギン酸分解菌叢の解析:第65回日本生物工学会:広島:2013/9/18-20.
  4. 三浦 豊和, 海洋由来微生物菌叢による褐藻のメタン発酵特性、第65回日本生物工学会、広島国際会議場、2013/9/18.
  5. 渡邊 研志, 膜結合型脂肪酸不飽和化酵素の基質選択機構の解明、第65回日本生物工学会大会、広島国際会議場、2013/9/19.
  6. 大野 洵, Δ5 脂肪酸不飽和化酵素の発現と精製、第65回日本生物工学会大会、広島国際会議場、2013/9/19.
  7. 松尾忠明, 重金属耐性光合成細菌を用いた金属除去能の研究、第15回マリンバイオテクノロジー学会、沖縄県市町村自治会館、2013/6/2.
  8. 末光全紘, 環境中から取得した光合成細菌による炭化水素生産の研究、第65回生物工学会大会、広島国際会議場、広島市、2013/9/20.
  9. R. Matsumoto, Determination of pyrolysis product of kelp, P04, 1st Asian Conference

- on Biomass Science (ACBS2014), Kochi, Japan, 2014/1/14.
10. 松本龍之介, コンブの熱分解特性の解明, P-52, 第9回バイオマス科学会議, 高知, 2014/1/15-16.
  11. 松本龍之介, 水熱前処理における海洋系バイオマス中金属の挙動, P-53, 第9回バイオマス科学会議, 高知, 2014/1/15-16.
  12. T. Miura, Detailed evaluation of marine sediments as microbial sources for methane production from brown algae at seawater salinity, International Bioenergy Conference 2014, Manchester Central Conventional Complex, Manchester, UK, 2014/3/11.
  13. A. Kita, Isolation and Characterization of Novel Aceticlastic Halotolerant Methanogen from Marine Sludge: International Biomass Conference & Expo: Orlando, Florida: 2014/3/24~26.
  14. Y. Okamura, Heavy Metal Removal from the Algal Biomass by Marine Photosynthetic Bacteria, 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2014, Taipei, Taiwan, 2014/5/6.
  15. Y. Matsumura, The behavior of kelp components in hydrothermal pretreatment, 3BV.3.19, 22nd European Biomass Conference and Exhibition (EUC&E2014), Hamburg, Germany, 2014/6/23-26.
  16. A. Kita, The first demonstration of symbiotic alginate degradation by anaerobic microbial consortium, 22nd European Biomass Conference and Exhibition, Hamburg, Germany, 2014/6/23-26.
  17. Y. Okamura, Isolation and Characterization of Marine Photosynthetic bacteria for Metal Removal from the Marine Biomass Residues, APCSEET2013, Narita Airport, Japan, 2013/7/5.
  18. R. binti Mohamad, Heat and mass balance for kelp utilization process, P-Bm-1-7, Grand Renewable Energy 2014 International Conference and Exhibition (GRE2014), Tokyo, Japan, 2014/7/27-8/1.
  19. Y. Okamura, Screening of Heavy Metal-Resistant Bacteria Toward Metal Removal from Marine Biomass Residues, Grand Renewable Energy 2014 International Conference and Exhibition, Tokyo, Japan, 2014/7/27-8/1.
  20. K. H. V. Arafiles, Production of high-value added lipids from brown seaweed by two-stage fermentation, 1st Asian Conference on Oleo Science, Sapporo, 2014/9/8.
  21. R. Sato, Identification of a novel multi-functional carotenoid synthase in thraustochytrid, 1st Asian Conference on Oleo Science, Sapporo, 2014/9/8.
  22. 三浦豊和, 大型藻類の無加水耐塩メタン発酵菌叢の構築, 第66回日本生物工学会、札幌コンベンションセンター、2014/9/9.
  23. 木村博美, 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いた亜セレン酸還元と元素体セレンの回収, 第66回日本生物工学会大会 (2014)、札幌コンベンションセンター、北海道、2014/9/9.
  24. 野村崇博, コンブバイオマスに蓄積されたレアアースを回収可能な海洋性光合成細菌の探索, 第66回日本生物工学会大会 (2014)、札幌コンベンションセンター、北海道、2014/9/10.
  25. H. Kimura, Selenium Recovery and Conversion by a Filamentous Fungus, *Aspergillus oryzae* Strain RIB40, International Conference Sustainable Agriculture, Food And Energy, SAFE2014, Indonesia, 2014/9/18.
  26. R. Matsumoto, Behavior of kelp in continuous hydrothermal pretreatment, P24, 2nd Asian Conference on Biomass Science (ACBS2015), Tsukuba, Japan, 2015/1/13.
  27. R. Mohamad, Utilization of mannuronic acid in kelp, P09, 2nd Asian Conference on Biomass Science (ACBS2015), Tsukuba, Japan, 2015/1/13.
  28. ロジヤンティ・ムハンマド, Study on decomposition characteristics of guluronic acid, P-46, 第10回バイオマス科学会議、つくば、2015/1/14-15.
  29. T. Miura, Acclimation of microbes for improved methane production from brown algae without dilution, The Energy & Material Research Conference - EMR2015, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, 2015.2/27.

30. K. H. V. Arafles, A novel two-stage fermentation system to produce polyunsaturated fatty acids and xanthophylls from brown seaweed extracts. Annual Conference 2015 of the Association for General and Applied Microbiology, Marburg, Germany, 2015/3/1.
31. 鈴木祥吾ほか, プロピオン酸資化性スクアレン生産菌の分離, 第 17 回マリンバイオテクノロジー学会, 東京, 2015/5/30.
32. 大川内雅彦ほか, プロピオン酸資化性トリアシルグリセロール生産菌のスクリーニング, 第 17 回マリンバイオテクノロジー学会, 東京, 2015/5/30.
33. K. H.V. Arafles ほか, Fermentation of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls by *Aurantiochytrium* sp. using brown seaweed biomass, ラビリンチュラ・シンポジウム～オーランチオキトリウムとその仲間たちの生物学と産業応用, 東京, 2015/7/4.
34. 恵良本祐里ほか, 海洋微生物ラビリンチュラによる油脂生産のための海藻糖質利用技術の開発, ラビリンチュラ・シンポジウム～オーランチオキトリウムとその仲間たちの生物学と産業応用, 東京, 2015/7/4.
35. 長野亜希子ほか, *Aurantiochytrium* 属における新規カロテノイド合成酵素の機能解析, ラビリンチュラ・シンポジウム～オーランチオキトリウムとその仲間たちの生物学と産業応用, 東京, 2015/7/4.
36. 矢野 友寛ほか, 大型藻類のメタン発酵を阻害する塩の影響についての動力的解析, 第 67 回日本生物工学会大会, 鹿児島, 2015/10/26.
37. 織田愛海ほか, 新規多機能性カロテノイド合成酵素 CrtIBY の発現解析, ラビリンチュラ・シンポジウム～オーランチオキトリウムとその仲間たちの生物学と産業応用, 東京, 2015/7/4.
38. 長野亜希子ほか, *Aurantiochytrium* 属カロテノイド合成酵素 CrtIBY の発現調節機構解析, 第 67 回日本生物工学会大会, 鹿児島, 2015/10/26.
39. 渡邊 研志ほか, 膜結合型脂肪酸不飽和化酵素の基質識別に関与するアミノ酸残基の特定, 第 67 回日本生物工学会大会, 鹿児島, 2015/10/26.
40. 織田 愛海ほか, 多機能性カロテノイド合成酵素 CrtIBY の発現解析, 第 67 回日本生物工学会大会, 鹿児島, 2015/10/26.
41. 宮原 裕之ほか, 低温菌シンプル酵素変換触媒によるマンニトールの効率的変換, 第 67 回日本生物工学会, 鹿児島, 2015/10/27.
42. 鈴木祥吾ほか, プロピオン酸資化性菌によるスクアレン生産のキャラクタリゼーション, 第67回日本生物工学会大会, 鹿児島, 2015/10/27.
43. 大川内雅彦ほか, 低級有機酸をバイオディーゼルに変換する細菌の培養特性, 第 67 回日本生物工学会大会, 鹿児島, 2015/10/27.
44. 喜多 晃久ほか, 共生系によるアルギン酸の嫌氣的分解機構の解析, 第 67 回日本生物工学会大会, 鹿児島, 2015/10/27.
45. 三浦豊和ほか, 大型藻類の耐塩無加水半連続メタン発酵, 第 67 回日本生物工学会大会, 鹿児島, 2015/10/28.
46. S. Suzuki, Squalene production by marine bacterium in wastewater derived from algal biomass. PACIFICHEM 2015, Honolulu, Hawaii, U.S, 2015/12/19.
47. T. Sakaguchi, Aerobic reduction of selenite by a filamentous fungus, *Aspergillus oryzae* for selenium recovery and recycling. PACIFICHEM 2015, Honolulu, Hawaii, U.S, 2015/12/19.
48. M. Okawachi, Screening of triacylglycerol producing bacteria for reducing propionic acid, PACIFICHEM 2015, Honolulu, Hawaii, U.S, 2015/12/19.
49. H. Takahashi, Development of a bench-top extra-cleanroom for single cell genomics, PACIFICHEM 2015, Honolulu, Hawaii, U.S, 2015/12/19.
50. A. Kita, Analysis of anaerobic alginate degradation mechanism in bacterial consortium, PACIFICHEM 2015, PACIFICHEM 2015, 2015/12/19.
51. T. Miura, Effect of salinity on methanogenic propionate degradation by acclimated marine sediment-derived culture, PACIFICHEM 2015, Honolulu, Hawaii, U.S.,

- 2015/12/19.
52. P. Duangkaew, Direct analysis via mass spectrometry of products from hydrothermal pretreatments of glucose, PACIFICHEM 2015, Honolulu, USA, 12/19/15.
  53. R. Mohamad, Decomposition reaction of D-(+)-mannose under hydrothermal condition, PACIFICHEM 2015, Honolulu, USA, 2015/12/19.
  54. P. Duangkaew, Investigation of products of mannitol decomposition during hydrothermal process via real time mass spectrometry], 3rd Asian Conference on Biomass Science (ACBS2016), Niigata, Japan, 2016/1/19.
  55. R. Mohamad, Decomposition behavior of sugar, sugar alcohol and uronic acid under hydrothermal condition, 3rd Asian Conference on Biomass Science (ACBS2016), Niigata, Japan, 2016/1/19.
  56. 三浦豊和, 大型藻類の耐塩無加水半連続メタン発酵の改善, 第 11 回バイオマス科学会議, 新潟, 2016/1/20/.
  57. P. Duangkaew, Real time mass analysis for hydrothermal decomposition of mannuronic acid, 第 11 回バイオマス科学会議, 新潟, 2016/1/20.
  58. 伊藤大志, コンブの水熱前処理におけるウロン酸の挙動, 第 11 回バイオマス科学会議, 新潟, 2016/1/20.
  59. R. Sakuta, A pectin biorefinery: Galactaric acid production from D-galacturonic acid with an enzymatic bioanode, 20th Annual Green Chemistry & Engineering Conference, Hilton Portland and Executive Tower, Oregon, USA, 2016/6/15.
  60. 渡邊研志, ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属のカロテノイド生合成機構の解析, 第3回ラビリンチュラ・シンポジウム, 甲南大学 平生記念セミナーハウス, 2016/7/9.
  61. K. H.V. Arafiles, Growth of *Aurantiochytrium* sp. on alginate degradation products of a marine bacterial consortium member: insights on its role in macroalgae degradation, 第3回ラビリンチュラ・シンポジウム, 甲南大学 平生記念セミナーハウス, 2016/7/9.
  62. 喜多晃久, 海洋底泥中における共生系アルギン酸分解メカニズムの解明と揮発性脂肪酸生産への応用, 第 68 回日本生物工学会大会, 富山国際会議場, 2016/9/30.
  63. 三浦豊和, 褐藻の耐塩半連続メタン生産における固形分添加量増加による過負荷の影響, 第 68 回日本生物工学会大会, 富山国際会議場, 2016/9/30.
  64. 渡邊 研志, ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属のメタボローム解析による育種標的の探索, 第 68 回日本生物工学会大会, 富山国際会議場, 2016/9/30.
  65. 矢野 友寛, 海洋性メタン発酵モデルの構築, 第 68 回日本生物工学会大会, 富山国際会議場, 2016/9/30.
  66. K. H.V. Arafiles, Alginate degradation product of anaerobic bacterium supports growth of oleaginous thraustochytrid, *Aurantiochytrium* sp., 第 69 回日本生物工学会大会, 富山国際会議場, 2016/9/30.
  67. 清水 稜, II-VI 族化合物半導体結晶を合成する光合成細菌のスクリーニング, 第 68 回日本生物工学会, 富山国際会議場, 2016/9/30.
  68. 中井昇太, 有機酸資化性細菌を用いたメタン発酵廃液中の有機酸除去, 第 68 回日本生物工学会, 富山国際会議場, 2016/9/30.
  69. R. Sakuta, Simultaneous production of electricity and galactaric acid from pectin with an enzymatic biofuel cell , PRiME 2016, Honolulu, Hawaii, USA, 2016/10/4.
  70. E. Yamaki, Oxidation of woody biomass dissolved in ionic liquids by a platina-loaded titanium dioxide electrode, PRiME 2016, Honolulu, Hawaii, USA, 2016/10/4.
  71. 八巻絵里, 381. 有機オニウム水酸化物水溶液中でのアルコール類・糖類の電気化学的酸化の検討, 第 7 回イオン液体討論会, 金沢市文化ホール 石川県, 2016/10/24.
  72. 池田一磨, LCST 型相挙動を示すイオン液体/緩衝液二相系におけるシトクロム c の分配挙動を支配する因子の解明 , 第 7 回イオン液体討論会, 金沢市文化ホール 石川県, 2016/10/25.
  73. K. Ikeda, Distribution behavior of cytochrome C in the ionic liquid/buffer biphasic system showing temperature-sensitive phase change, 8th Asian Biological Inorganic

- Chemistry Conference, Aucland, New Zealand., 2016/12/5.
74. H. Ito, Ddecomposition rate of alginic acid under hydrothermal condition, The 5th International Symposium on Marine Biomass Utilization, University of Hawaii. Honolulu, USA, 2016/12/8.
  75. S. Nakai, Removal of organic acids from methane fermentation wastewater using Nitratireductor sp. OM-1, The 5th International Symposium on Marine Biomass Utilization, University of Hawaii. Honolulu, USA, 2016/12/8.
  76. A. Oda, Analysis of structure and function of multifunctional carotenoid synthase, CrtI<sub>BY</sub>, The 5th International Symposium on Marine Biomass Utilization, University of Hawaii. Honolulu, USA, 2016/12/8.
  77. D. Pattasuda, In situ analysis of mannitol decomposition under hydrothermal condition by mass spectrometry, The 5th International Symposium on Marine Biomass Utilization, University of Hawaii. Honolulu, USA, 2016/12/8.
  78. R. Shimizu, Screening of photosynthetic bacteria synthesizing crystal of group-II-VI compound semiconductor, The 5th International Symposium on Marine Biomass Utilization, University of Hawaii. Honolulu, USA, 2016/12/8.
  79. H. Takahashi, Improvement of whole genome amplification procedure for single cell genomics, The 5th International Symposium on Marine Biomass Utilization, University of Hawaii. Honolulu, USA, 2016/12/8.
  80. R. Mohamad, Process evaluation for effective utilization of kelp as renewable energy resources, PA2, 4th Asian Conference on Biomass Science (ACBS2016b), Penang, Malaysia. 2016/12/13.
  81. S. Hirota, Torrefaction of algae, PD1, 4th Asian Conference on Biomass Science (ACBS2016b), Penang, Malaysia. 2016/12/13.
  82. S. Nakai, Wastewater treatment of methane fermentation residue by Nitratireductor sp. OM-1, アジアバイオマス科学会議, Penag, Malasia, 2016/12/13.
  83. P. Duangkaew, In-situ quantitative mass spectrometry of decomposition products and reaction kinetics development for hydrothermal treatment of glucose, 第12回バイオマス科学会議, 東京, 2017/1/18.
  84. 三浦豊和, 海洋微生物を活用した大型藻類の耐塩性メタン発酵プロセスの開発, 第12回バイオマス科学会議, 東京, 2017/1/18.
  85. E. Yamaki, Electrochemical oxidation of cellulose without a harsh condition, 日本化学会第97春季年会, 慶應義塾大学 日吉キャンパス, 2017/3/16.
  86. Y. Okamura, Development of high throughput screening of oil-producing bacteria toward bio-oil fermentation. International Symposium on Fuels and Engines 2017, Hiroshina, Japan. 2017/7/11.
  87. T. Miura, A. Kita, Y. Okamura, T. Aki, Y. Matsumura, T. Tajima, J. Kato, Y. Nakashimada, Continuous methane production from volatile fatty acids for two-stage methanization of undiluted brown algae, The 1st International Symposium on Fuels and Energy, Hiroshima, 2017/7/11.
  88. S. Nakai., Oil production from marine biomass by esterified light oil producer *Nitratireductor* sp. OM-1. International Symposium on Fuels and Engines 2017, Hiroshina, Japan. 2017/7/11.
  89. Takahisa Tajima, Kousuke Tomita, Kenshi Watanabe, Aki Tsunehiro, Yoshiko Okamura, Yukihiko Matsumura, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato: Efficient conversion of mannitol by the psychrophile-based simple biocatalyst, P04, The 1st International Symposium on Fuels and Energy (ISFE2017), Hiroshima, Japan, 2017/7/10-12.
  90. Hiroshi Ito, Tsunehiro Aki, Yutaka Nakashimada, Yoshiko Okamura, Takahisa Tajima, Yukihiko Matsumura: Behavior of kelp cell under hydrothermal pretreatment, P21, The 1st International Symposium on Fuels and Energy (ISFE2017), Hiroshima, Japan, 2017/7/10-12.
  91. Mutsumi Kuroki, Pattasuda Duangkaew, Shuhei Inoue, Tsunehiro Aki, Yutaka Nakashimada, Yoshiko Okamura, Takahisa Tajima, Yukihiko Matsumura: In situ mass

- spectrometry of glucose decomposition under hydrothermal reactions using capillary, P29, The 1st International Symposium on Fuels and Energy (ISFE2017), Hiroshima, Japan, 2017/7/10-12.
92. Akihisa Kita, Toyokazu Miura, Yoshiko Okamura, Tsunehiro Aki, Yukihiko Matsumura, Takahisa Tajima, Junichi Kato, Yutaka Nakashimada: Production of volatile fatty acids from alginate by marine bacterial consortium, P30, The 1st International Symposium on Fuels and Energy (ISFE2017), Hiroshima, Japan, 2017/7/10-12.
  93. 富田晃佑, 低温菌を活用したシンプル酵素触媒によるマンニトールの効率的変換、生物学若手研究者の集い夏のセミナー2017、ツネイシしまなみビレッジ、2016/7/22.
  94. 富田晃佑, 低温菌を活用したシンプル酵素触媒によるマンニトールの効率的変換、第 69 回日本生物工学会、早稲田大学、2017/9/12.
  95. K. H. V. Arafiles, Polyunsaturated fatty acid and terpenoid production of *Aurantiochytrium* sp. using alginate-derived organic acids, 2nd Asian Conference on Oleo Science, Tokyo University of Science, Japan, 2017/9/12.
  96. N. Nomura, Regulation of carotenoid biosynthesis in *Aurantiochytrium* sp., Tokyo University of Science, Japan, 2017/9/12.
  97. 渡邊研志, メタボローム解析によるオーランチオキトリウム属のドコサヘキサエン酸及びアスタキサンチン生産性の改善, 第 69 回日本生物工学会大会, 早稲田大学, 2017/9/14.
  98. K. H. V. Arafiles, Astaxanthin production using alginate derived from brown algae by *Aurantiochytrium* sp., 第 69 回日本生物工学会大会, 早稲田大学, 2017/9/14.
  99. 野村夏矢, オーランチオキトリウム属由来  $\beta$ -カロテン合成酵素 CrtIBY の発現制御機構の解析, 第 69 回日本生物工学会大会, 早稲田大学, 2017/9/14.
  100. 三浦豊和, 「各種基質と海洋由来微生物源を使用した海水条件下での流加培養におけるメタン生産の改善と微生物の多様性」, 第 69 回日本生物工学会大会, 早稲田大学, 2017/9/14.
  101. Yukihiko Matsumura, Mutsumi Kuroki, Pattasuda Duangkaew, Shuhei Inoue, Tsunehiro Aki, Yutaka Nakasimada, Yoshiko Okamura, Takahisa Tajima: In situ mass spectrometry of hydrothermal glucose decomposition using capillary, REPO-5, The 6th Joint Conference on Renewable Energy and Nanotechnology (JCREN2017), Bangkok, Thailand, 2017/10/12-14.
  102. 岡安耕佑, イオン液体を用いた大型藻類メタン発酵後残渣中に含まれる有機成分の抽出, 第 8 回イオン液体討論会, 東京農工大学, 2017/11/24.
  103. 八巻絵里, Tetra-n-butylphosphonium hydroxide を用いたワンポットセルロース燃料電池システムの構築, 第 8 回イオン液体討論会, 東京農工大学, 2017/11/24.
  104. Yukihiko Matsumura\*, Hiroshi Ito, Tsunehiro Aki, Yutaka Nakashimada, Yoshiko Okamura, Takahisa Tajima: Behavior of Organic Compounds and Kelp Cell during Hydrothermal Pretreatment, PA5, 5th Asian Conference on Biomass Science (ACBS2018), Sendai, Japan, 2018/1/16.
  105. Yukihiko Matsumura\*, Mutsumi Kuroki, Pattasuda Duangkaew, Shuhei Inoue: Determination of Hydrothermal Glucose Decomposition Products Using Mass Spectrometry, PC7, 5th Asian Conference on Biomass Science (ACBS2018), Sendai, Japan, 2018/1/16.
  106. 黒木睦美, 井上修平, 秋庸裕, 岡村好子, 中島田豊, 田島誉久, 松村幸彦\*: キャピラリー管を用いた水熱条件下からの直接サンプリングの検討, P-49, 第 13 回バイオマス科学会議, 仙台, 2017/1/17-19.
  107. 阿部隼人, ガラクタル酸と電気エネルギーを同時生産するバイオ燃料電池, 電気化学会第 85 大会, 東京理科大学, 2018/03/09.

#### (4)知財出願

##### ①国内出願 (8件)

1. 標的DNAの特異的増幅法、岡村好子、国立大学法人広島大学、11/29/12、特願2012-261404
2. 高付加価値脂質の生産方法、秋 庸裕、中島田豊、岡村好子、松村幸彦、国立大学法人広島大学、14/3/27、特願2014-066844
3. 微生物、炭化水素の生産方法、廃液の処理方法及び微生物のスクリーニング方法、岡村好子、中島田豊、秋庸裕、松村幸彦、鈴木祥吾、松本光史、国立大学法人広島大学・電源開発株式会社、2015/5/28、特願2015-108321
4. 成分分析方法、松村幸彦・井上修平・秋庸裕・岡村好子・田島誉久・中島田豊・デュアンケウ・パッタスタ、国立大学法人広島大学、15/8/15、特願2015-199952
5. 微生物、脂質の生産方法及び廃水処理方法、岡村好子・中島田豊・秋庸裕・松村幸彦・大川内雅彦・松本光史、国立大学法人広島大学・電源開発株式会社、2016/1/19、特願2016-007620
6. カロテノイド組成物、カロテノイド組成物の製造方法、カロテノイド組成物を生産する微生物、秋 庸裕・渡邊研志・東莉沙・上原莉世・松山恵介、国立大学法人広島大学・長瀬産業株式会社、2017/1/24、特願2017-010607
7. RNA検出方法、高橋宏和、岡村好子、中島田豊、秋庸裕、松村幸彦、大川内雅彦、国立大学法人広島大学、2017/4/24、特願2017-085299
8. 脂質の生産方法、秋 庸裕、渡邊研志、中島田豊、松村幸彦、岡村好子、田島誉久、廣谷 蘭、国立大学法人広島大学、2017/12/26、特願2017-250129

#### (5)受賞・報道等

##### ① 受賞

1. Excellent Paper Award: R. Matsumoto, Y. Matsumura, Y. Uemura, Determination of pyrolysis product of kelp, 1st Asian Conference on Biomass Science ACBS2014, Kochi, Japan, 2014/1/14.
2. 2014 ACOS Student Poster Award (1st Place): Kim Hazel V. Arafles et al., 2014/9/10.
3. Best Oral Presentation Award: R. Matsumoto, T. Aki, Y. Nakashimada, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Matsumura, Effect of salt on production of furfurals during decomposition of kelp, the 3rd Joint Conference on Renewable Energy and Nanotechnology (JCREN2014), Kanchanaburi, Thailand, 2014/12/22-23.
4. Best Oral Presentation Award: R. Mohamad, T. Aki, Y. Nakashimada, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Matsumura, Isolation of gluronic and mannuronic acids from kelp, the 3rd Joint Conference on Renewable Energy and Nanotechnology (JCREN2014), Kanchanaburi, Thailand, 2014/12/22-23.
5. 三浦賞: 松本龍之介(松村グループ)、日本機械学会、2015/3/23.
6. 日本生物工学会西日本支部学生賞: 渡邊研志(秋グループ)、日本生物工学会西日本支部、2015/12/10.

##### ② マスコミ(新聞・TV等)報道

1. プレスリリース JST「外来DNAの混入を防ぎ、信頼性の高いDNA解析を可能にする卓上型クリーンルームを開発」(<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20160713-2/index.html>) 2016/7/13. DNAの混入をほぼ完全に防止できる、DNA増幅用の卓上型クリーンルームを開発した。
2. 日刊工業新聞, 外来DNA混入防止 広島大など, 2016/7/13.
3. 科学新聞 4面 学技術総合, 外来DNAの混入防止, 2016/7/22.

##### ③ その他

1. 岡村好子 「複合菌体の中から標的細菌ゲノムのみを特異的に増幅する方法」、広島大学 新技術説明会 ライフサイエンス、主催:国立大学法人広島大学、独立行政

法人科学技術振興機構、共催：大阪商工会議所、2013年9月10日、大阪府、大阪商工会議所

2. 海藻は宝の山-コンブからエネルギーと有用物質をつくる、<http://www.mirai-kougaku.jp/explore/pages/150303.php>、国立大学 54 工学系学部ホームページに掲載、2015. 3. 3.
3. 中島田豊 「海藻をエネルギーに変換する水産バイオマス実現への道のり-“廃棄物”となる海藻をエネルギーに変える方法」、EMIRA 特集「今始まる、海洋発電時代」第三回、<http://emira-t.jp/special/3124/>、2017/10/2.

#### (6)成果展開事例

##### ①実用化に向けての展開

- ・ 開発した耐塩メタン発酵プロセスについて、廃棄大型藻類(主に緑藻類)、海洋微細藻類、及び高塩食品廃棄物処理・エネルギー生産プロセスとして磐田化学工業と共同研究中であり、JST-OPERA (研究総括, 山本卓, 広島大学)に参画し、海洋微細藻類のゲノム編集技術の開発およびその有用物質、エネルギー源としての利用を図るために研究実施中
- ・ 開発したラビリンチュラ類による油脂発酵技術について、油脂素材化合物の発酵プロセス開発に向けた微細藻類のゲノム育種、二段階発酵法を基盤技術とした油脂生産システムを開発中(長瀬産業株式会社との共同研究、JST-OPERA (研究総括, 山本卓, 広島大学)に参画)

##### ②社会還元的な展開活動

- ・ 卓上型クリーンルーム「クリーンコーチ」は興研株式会社から販売されている。

## § 5 研究期間中の活動

### 5.1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2013/1/28	1st International Symposium on Marine Biomass Utilization	広島大学	20 人	本プロジェクト関連の情報を紹介した他、関係研究者の研究発表もいただき、意見交換を行った。
2013/4/10	2nd International Symposium on Marine Biomass Utilization	広島大学	25 人	本プロジェクト関連の情報を紹介した他、関係研究者の研究発表もいただき、意見交換を行った。
2013/5/22	第 9 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15 人	研究進捗の一般公開
2013/7/17	第 11 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15 人	研究進捗の一般公開
2013/9/20	第 65 回日本生物工学会大会シンポジウム「水圏バイオマスリファイナリー研究の最新動向」	広島国際会議場	250 人	水圏バイオマスリファイナリー研究の最新動向に関するシンポジウム
2013/11/12	3rd International Symposium on Marine Biomass Utilization (The 1st Japan-Hawaii Joint Workshop “Marine Biomass Utilization”)	ハワイ大学	15 人	本プロジェクト研究発表、及びハワイ大学関連研究発表及び意見交換を行った。
2013/11/20	第 14 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15 人	研究進捗の一般公開
2013/12/12	第 15 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15 人	研究進捗の一般公開
2014/1/22	第 16 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15 人	研究進捗の一般公開
2014/2/7	第 17 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15 人	研究進捗の一般公開
2014/6/17	第 21 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	20 人	研究進捗の一般公開

2014/10/22	第 24 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	20 人	研究進捗の一般公開
2014/11/6	4th International Symposium on Utilization of Marine environment for Development of Sustainable Society/2nd Japan-Hawaii Joint Workshop "Marine Biomass Utilization"	広島大学	50 人	本プロジェクト研究発表、ハワイ大学および静岡大学研究者による研究発表ののち意見交換を行った。
2014/11/17	第 21 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	20 人	先端関連研究者との交流
2014/12/17	第 26 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15 人	研究進捗の一般公開
2015/1/21	第 27 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15 人	研究進捗の一般公開
2015/2/18	第 28 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	20 人	先端関連研究者との交流
2015/3/25	シンポジウム「海洋バイオマス研究の新展開」	広島大学	20 人	研究進捗の一般公開
2015/4/20	第 30 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	20 人	研究進捗の一般公開
2015/5/18	第 31 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15 人	研究進捗の一般公開
2015/6/19	第 32 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15 人	先端関連研究者との交流
2015/8/1	広島大学平成27年度公開講座	広島市鯉城会館	200 人	市民に微生物や海を利用したエネルギー生産などのバイオテクノロジーを紹介した
2015/8/22	広島大学高大連携公開講座「工学部のバイオ、役立つバイオー何ができるか、何をやっているかー」	呉市大和ミュージアム	70 人	高校生にバイオテクノロジー研究を分かりやすく説明し、理系進学者増進に努めた
2015/9/14	第 34 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15 人	先端関連研究者との交流および 研究進捗の一般公開

2015/11/2	第36回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15人	研究進捗の一般公開
2015/12/9	第37回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15人	研究進捗の一般公開
2016/3/10	シンポジウム「実用化にせまる中国地域のバイオマス研究」	広島大学	30人	研究進捗の一般公開、および先端関連研究者との交流
2016/4/14	第41回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15人	成果発表
2016/5/12	第42回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15人	成果発表
2016/7/7	第44回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15人	成果発表
2016/9/13	広島大学新技術説明会	JST 東京オフィス	50人	特許紹介
2016/9/26	第45回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	10人	成果発表
2016/10/17	第46回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15人	成果発表
2016/10/31	The 5th International Symposium on Marine Biomass Utilization	University of Hawaii	20人	成果発表、学術交流
2016/11/10	第47回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	20人	成果発表
2016/12/19	第48回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	15人	成果発表
2017/3/13	第16回広島大学バイオマスプロジェクト研究センターシンポジウム	広島大学	25人	成果発表
2017/5/18	第53回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	18人	成果発表
2017/5/24	Algal Workshop in APMBC2017	ハワイ大学、米国	50人	学術交流、ヨーロッパ、アジア、アメリカ本土研究者との研究交流・展開

2017/6/8	第 54 回広島大学バイオマスイブニングセミナー	広島大学	21 人	成果発表
----------	--------------------------	------	------	------

## § 6 最後に

本研究プロジェクトでは、海洋微生物群が持つ耐塩性および海藻糖質代謝機能に着目し、1)耐塩無加水高効率メタン発酵によるエネルギー回収を中心として、2)海洋藻類を基質とした高付加価値物質生産、3)メタン発酵残渣処理及び貴重金属・エネルギーの回収、そして 4)発酵原料に適した前処理に関する要素基盤技術の統合的な開発を進め、エネルギー生産収支および経済収支をともにプラスとする利用プロセスの研究開発を行った。

海洋藻類からのメタン発酵におけるエネルギー回収率を改善するためには、投入エネルギーを少なくすること、そして藻体有機物からのメタン収率の向上が重要であった。我々は、本研究において特殊環境ではなく大量に入手可能な海洋底泥に着目し、褐藻類であるマコンブ粉砕物からの海水塩条件下でのメタン発酵に成功した。取得した耐塩微生物群は 5%塩存在下でもメタン発酵性能を有していた。さらに、この大型褐藻類を容易にメタン化する微生物菌群の集積法を開発するとともに、未希釈・高塩条件下での海洋大型藻類からの長期・安定メタン発酵試験、さらにはメタン発酵法の律速となる有機酸からのメタン発酵工程を超高速化する固定床型発酵槽の開発し、藻体の有機酸生成-メタン発酵槽から構成される 2 槽式高速メタン発酵プロセスの開発にも成功するなど、耐塩無加水メタン発酵によるエネルギー回収の高効率化の目標を十分に果たすものであった。

また、大型藻類は植物体構造を有し、そのままでは微生物による発酵が行える状況にはないことから、コンブ藻体を高温処理し、水溶性成分を溶解、細胞壁を破壊して可溶化する水熱前処理法を検討した。その結果、130℃程度での比較的低温で 80%程度の可溶化効率が得られた。水熱処理性能に塩は影響しないこと、水熱処理物はメタン発酵を阻害しなかったことから、メタン発酵のもう一つの律速段階となる固体有機物の加水分解工程を高速化した、高効率な水熱処理-耐塩メタン発酵プロセスが実現可能であることを示す重要な知見であった。

大型藻類からのエネルギー生産において、経済性を確保する海洋微生物ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属による海藻糖質を用いたアスタキサンチンなどの高付加価値油脂の高生産プロセス開発においては、海藻を構成する特殊な糖質(アルギン酸、マンニトールなど)に対して資化性を持たないことが大きな問題であった。しかし本プロジェクトにおいて、*Aurantiochytrium* 属が資化可能な有機酸やフルクトースにそれぞれ変換する微生物を見だし、*Aurantiochytrium* 属との複合培養による褐藻糖質からの油脂発酵技術を確立した。本技術の確立により、高コストな遺伝子組み換え菌を用いず発酵生産が可能となったことは、アスタキサンチン高生産変異株の育種に成功したことから合わせて、本プロジェクトの目標である経済性の高い全体プロセス構築に大きく寄与するものである。

上記発酵残渣処理-エネルギー・マテリアル回収要素技術として、海洋環境から、メタン発酵の発酵排液中に残存する酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸を完全資化し、油脂を菌体重量当たり 90%まで蓄積する *Nitratireductor* sp. OM-1 株の単離に成功するとともに、銅、コバルト、カドミウムなどの重金属や、テルルなどのレアアース、イットリウムなどのレアアースを除去・回収可能な株を取得に成功した。さらに、残渣中の固体成分についても、高極性イオン液体[P<sub>4,4,4,4</sub>][OH]を用いた有機成分溶解技術とともに、溶解した残渣成分からの発電装置開発に関わる要素技術を開発するなど、本プロジェクトにおける大きな目標である、廃棄物ゼロを実現する発酵残渣中の有機物および金属類の完全浄化・リサイクルを行うための要素技術を開発することができたと考えている。

最後に、上記要素技術開発で得られた成果に基づくことで、実現可能な大型藻類からのエネルギー・マテリアル生産の全体プロセスを設計することができた。これにより、エネルギー・経済収支の検討を行うためのプラットフォームを整備することができ、様々な処理規模でのエネルギー収支、経済収支の試算が可能となった。その一つの例として、コンブ 10t/日を水熱処理したのち、耐塩メタン発酵、アスタキサンチン生産をおこない、エネルギー油発酵により可溶性残渣処理を行うシステム

において、エネルギー収支、および経済収支をともにプラスとするプロセス・操作条件があることを見いだすことができた。これにより、本プロジェクトの最大の目標をクリアすることができたと自負している。

従来のアルギン酸などの付加価値物質を回収して、その残渣をエネルギー生産に利用するカスケードプロセスは、高付加価値製品の製造工程で、残渣から回収される以上のエネルギーを投入するエネルギー消費型プロセスである。しかし今回、我々は、経済性の低いエネルギー生産と、経済性が高い高付加価値製品生産プロセスを平行して運用するパラレル発酵プロセスを実現する要素技術を開発した。その開発成果に基づき、10t/日の処理規模において¥100/t 以下で原料を確保できた場合に、原料の最適利用割合を設定することでエネルギー収支プラス、コストバランスプラスのプロセスが実現可能であることを明らかにした。しかし社会実装のための今後の問題としては、1) スケールアップした規模での試験データの検証と、これを用いた FS の実施、2) FS において藻類の買価を¥100/kg-乾物は日本国内では通常調達が困難、3) エネルギー生産事業者の確保などが考えられる。

それぞれの課題を今後、克服してゆく必要があるが、1)については、実証規模のパイロットスケール設備を用いたプロセス運転によるエネルギー収支・経済性検討を進めてゆきたい。2)については、処理を必要とする廃海藻、および高塩食品廃棄物処理とエネルギー・マテリアル生産とを組み合わせ合わせた逆有償ビジネスモデル、および海外での安価な海藻栽培と本プロジェクトの開発要素技術を組み合わせ合わせた生産プロセスの実証研究を行いたい。3)については FIT などの再生可能エネルギー生産に関わるインセンティブの整備が必要と考えられるが、2)において事業性が認められれば今後、他の企業体の参画が期待できる。

上記展開をはかり、提案設計手法によるプロセスが実用化されれば、将来、我が国が持つ領海、および世界中の海洋水圏を活用した海洋バイオガス田の実現、さらには、新しい海洋バイオガス製造産業の創製はもとより、大型藻類養殖場を藻場として魚介類などの水産養殖施設として複合活用することで、経済性のさらなる改善および水産業振興による経済的インパクトも期待できる。

最後に、本研究プロジェクトは、広島大学の研究者を中心としてチームを編成し研究を遂行した。これにより、広島大学バイオマスイノベーションセミナーを中心とする研究成果の発表を継続して行うことができた。さらに、研究上の議論を日常的に行うことができ、共同研究に関わる問題点の確認、意見のすり合わせなどを非常に円滑に進めることができ、得られた成果およびプロジェクト目標に対する意識の共有をうまく図ることができた。また、当プロジェクトにおいて研究費は、初年度、二年度において実験遂行上重要な研究機器を購入し、継続的に使用したが、人件費、とくに研究員雇用に関与することを各グループに推奨した。これは、5年間の長期研究において、プロジェクト目標を達成するために教育的配慮を必要とされる学生に大きな負担をかけることなく、円滑かつ継続的な研究環境を確保するために重要視した。その結果として、今回、おおきくぶれることなく当初目標をほぼ達成する成果が得られたと考えている。