

博士論文

微細藻類ユーグレナによるパラミロンの
生産と利用可能性の検討

鈴木 健吾

目次

1 章 序章	p3
1.1. 研究の背景	p4
1.2. 既往の研究	p9
1.3. 研究の目的と構成	p13
2 章 新奇ユーグレナ種のパラミロン生産への利用の試み	p14
2.1. 各種ユーグレナの増殖速度の評価	p15
2.2. <i>E. anabaena</i> 株の培養特性の評価	p40
2.3. <i>E. anabaena</i> 株の産業利用価値	p46
2.4. <i>E. anabaena</i> 株の産業利用価値	p53
3 章 ユーグレナに含有されるパラミロンの有機フィラーとしての利用可能性 について	p61
3.1. 序	p62
3.2. 実験方法	p64
3.3. 結果と考察	p69

3.4. 総括	p84
4 章 総合考察	p86
参考文献	p89
謝辞	p100

1 章

序論

1 章 序論

1.1 研究の背景

第二次世界大戦後、将来起こりうる食糧問題への対策として微生物タンパク質の食飼料利用の研究が世界的に盛んになった。特に敗戦国であり資源小国でもあるわが国では、石油酵母や醸造用酵母の利用に多くの労力と資金が注ぎ込まれてきた（園田ら, 1973）。世界的にはタンパク源として微細藻類を利用する検討が行われており（Becker, 2004）、東京大学の応用微生物研究所のグループは同じ発想で光合成真核生物であるクロレラ、原核生物であるラン藻類に注目し、低栄養下で培養可能であり、必須アミノ酸、ビタミン類を豊富に含むことから有効な食糧資源となる可能性を論じた（田宮, 1955, 1957）。この一連の研究がわが国における微生物の食糧資源化への始まりとなった。

微細藻の食用自体は *Nostoc*、*Arthrospira*、*Aphanizomenon* などの種において数千年にわたって行われてきたと報告されるが（Jensen, 2001）、人類が微細藻の商業生産を実際に始めたのは 1960 年代のニホンクロレラによる台湾における *Chlorella* の培養からであり、その後 1970 年代にはスピルリナの培養施設がメキシコに完成した（Borowitzka, 1999）。また、1980 年代にはアジアだけで 46 カ所もの微細藻培養施設が稼働し、3 番目の商用微細藻類として、オーストラリアでは beta-カロテン（βカロテン）を含む *Dunaliella salina* の培養も行われるようになった（Spolaore, 2006）。

オイルショック後の 1970 年代以降、日本においては、数ある微細藻類の中でも細胞

内に特殊な代謝機構を有し、動物性タンパク質や多種のビタミンを生産するユーグレナに対して、新しい食資源としての注目が集まってきた（北岡ら，1977，河野ら，1987）。数多く存在するユーグレナ属の中でも、特に *Euglena gracilis*（以下、*E. gracilis*）は、1950年代から Calvin によって光合成の研究に用いられてきたため培養方法などの知見が豊富に蓄積されてきた（Lynch, 1953, Cramer, 1952）。また、溶存二酸化炭素濃度が高く低 pH の環境条件に対して適応可能であることから他生物の混入を防ぎつつ培養することが可能であり、増殖も速い。さらに、細胞内に β -1, 3-グルカンを合成しパラミロンと呼ばれる顆粒として蓄えることや、特殊な条件下でワックスエステルを合成するなど特徴的な代謝経路を有しており（E. Korn, 1964）、産業上それらが活用できる可能性が高いと考えられてきた。ユーグレナは、和名はミドリムシという名前で親しまれ、小中学校の理科の授業の際にはミジンコなどと共に顕微鏡で観察される代表的な微生物教材の一種である（図 1-1）。ユーグレナは、植物の特徴的な性質である光合成を行いながら、その一方で細胞形態を柔軟に変化させ、鞭毛を使って自由に動き回ることから、動物的側面も併せ持ち、同時に多様な栄養素を持つ理由となる。ユーグレナ属及び近縁の属種は 120 余りとされ、その多くは水田、沼及び湖といった流れの少ない淡水域もしくは汽水域に生息する。多くのユーグレナは紡錘型をしており、眼点付近にある光受容体で光の情報を得て、鞭毛を回転させながら各種波長、強度の光に対して、状況に応じた正負それぞれの走性を示す（大岡ら）。ユーグレナの細胞は、ペリクルと呼ばれるタンパク質を主成分とする膜複合体で覆われ、らせん状に溝が刻まれており、細胞周辺で鞭毛を回転させて推進力を生むのに寄与する（北岡，1989）。



図 1-1 *E. gracilis* の顕微鏡写真.

20 世紀後半から二酸化炭素やメタンなどの温室効果ガスによる地球温暖化が広く認識されるようになり、特に化石燃料の使用から発生する二酸化炭素の排出量の削減の必要性が議論されている。二酸化炭素排出量の削減策の一環として、二酸化炭素が水によく溶ける性質と微細藻類がその二酸化炭素を光合成の炭素源として利用できる点に注目し、二酸化炭素の排出源の傍に微細藻類の培養槽を設置して、二酸化炭素の排出を削減しつつ有用物質を生産することが検討されてきた。中でも、ユーグレナを用いた二酸化炭素固定と食料生産を同時に達成することを目指した研究は古くから国内で行われてきた。代表的な例として、1990 年代には近藤次郎らによる「K プロジェクト」というユーグレナの大量培養を目指した研究が挙げられる。これは、発光ダイオード (LED) を用いることで効率的に光を利用し、ユーグレナの光合成による二酸化炭素固定を促進させることで食料を生産することで、食糧問題と温暖化問題を解決することを目指したプロジェクトであった(近藤, 1996)。

ユーグレナの食品としての利用は、2005 年に実現された大量培養を契機に徐々に広まった。水中で培養されたユーグレナは遠心分離機などを用いて濃縮、乾燥させて粉末状にされることで、これを食品として加工している。ユーグレナは食品としては、幅広い栄養素を有しており、消化・吸収を妨げる細胞壁がないことから消化率も高い。またユーグレナ特有の成分であるパラミロンは食物繊維様の働き(河野ら, 1987)や抗腫瘍活性(中野, 1994)および免疫機能の向上(Koizumi, 1993)など様々な機能性を有することが明らかになっており、食品としての市場性が確認されている。

嵐田らは 2009 年に沖縄電力株式会社の金武火力発電所に 500 リットルの培養槽を設置し、発電所の煙突に向かう直前の煙道に配管をつなぐことにより排気ガスを培養槽に

引き込み通気する実証試験装置を構築した。この装置を用いてユーグレナの試験培養を実施することによって、一週間程度の培養により培養液が薄黄緑から濃い緑色に変化し、排気ガスを炭素源として利用してユーグレナの培養が可能であることを実証した。(嵐田, 2010, 鈴木ら, 2012) これまで、二酸化炭素を高濃度で含有する空気と混合したガスを利用してユーグレナの培養は実施されてきたが、上記の火力発電所の排気ガスを利用したユーグレナの培養の成功は、二酸化炭素の排出源の近傍でユーグレナの培養を行うという、Kプロジェクトの実現可能性を裏付ける結果である。

1.2 既往の研究

【1.2.1】 ユーグレナが産生するパラミロンに関する研究

パラミロンはユーグレナが特異的にその細胞内に蓄積する β -1,3-グルカンの結晶体である(図 1-2)。パラミロンは単糖のグルコースのみから構成され、そのすべてが β -1,3-結合で連なっている。また、高度に結晶化されている点が他の β グルカンと異なる特徴である。その平均重合度は750程度と報告がある(Miyatake, 1983)。

生物の作り出す多糖の粒子としては、一般的に、植物などではデンプン、動物ではグリコーゲンが知られている。植物ではまず、最初葉の光合成で生成したグルコースの α -1,4-結合を主体とした重合体としてデンプン顆粒が産生する。ユーグレナにおいては栄養条件などの環境変化によりパラミロンがエネルギー源として合成・貯蔵、または分解・消費の調節がなされる。パラミロンの蓄積される細胞部位によりその大きさは最大数十ミクロンに及ぶまで様々なサイズであり、ユーグレナの種分類の指標の一つともなる(表 1-1)。パラミロンという名称は、アミロースの異性体という意味で、Par(等しい)と amylo(澱粉)から paramylon と命名されたとされる(宮武ら, 1995)。

パラミロンはユーグレナが本格的に市場に流通する以前は食として供された歴史はないが、同様にキノコ等に含まれる β -1,3-グルカンには一般的に免疫賦活効果などがあるとされている。そのため、パラミロンも類似の機能性を示す可能性があり、その検討に期待が集まっている(A. Sugiyama et al., 2009; A. Sugiyama et al., 2010)。

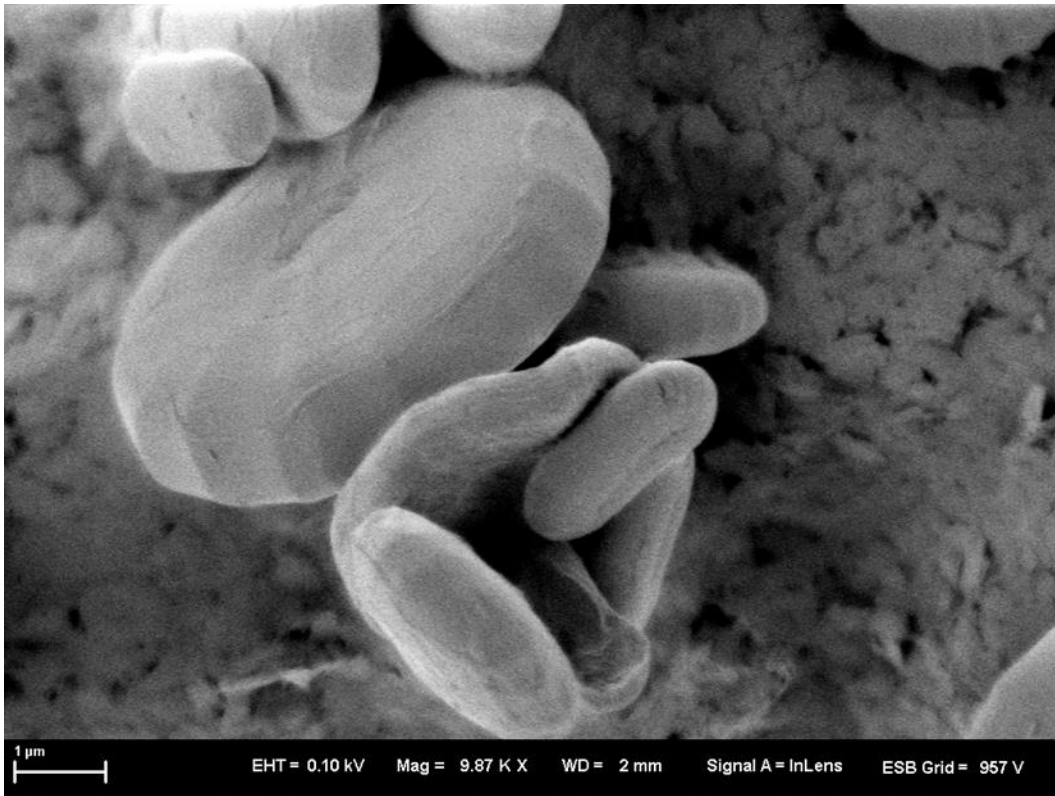


図 1-2 パラミロンの電子顕微鏡写真
(撮影： 青山学院大学 福岡教授)

表 1-1 ユーグレナの種類と細胞の中に含まれるパラミロンの特徴 (宮武ら, 1995)

ユーグレナの 種類	細胞の大きさ (μm)	パラミロンの 特徴 細胞内での存 在状態と数	形状	大きさ (μm)
葉緑体を持た ないユーグレ ナ <i>Astasia klebsii</i>	50~65×12~ 18 (長紡錘形・円 筒形)	散在、多数 (不 定数)	水楕円形	1×2
葉緑体を持つ ユーグレナ <i>Euglena deses</i>	75~170×8~ 22 (長円筒形)	核の前後に2個 短棒状の小粒 でも存在	大型棒状	2×10
<i>Euglena gracilis</i>	55~89×13~ 18 (長紡錘形)	散在、多数 (不 定数)	小楕円形	1×4
<i>Euglena acus</i>	85~137×7~ 12 (長紡錘形)	数個	長棒状 (板状・輪状)	1×10~50
<i>Euglena intermedia</i>	85~137×6~ 12 (長円筒形)	数個 短棒状の小粒 でも存在	大型棒状	2×10
<i>Euglena spirogyra</i>	78~130×8~ 15 (円筒形)	核の前後に2個	大型棒状 輪状	2×10
<i>Euglena viridis</i>	35~58×9~14 (紡錘形)	散在、多数 (不 定数)	小楕円形	1×4

【1.2.2】パラミロンの化学製品としての利用についての研究

宮崎大学の林らは、バイオプラスチックとしてパラミロンに、同じくユーグレナ由来の油脂成分（ワックスエステル）から得られる長鎖脂肪酸またはカシューナッツ殻由来の油脂成分で柔軟性をもつ長い鎖状部位と剛直な六角形状部位を併せもつカルダノールを付加して合成をした物質を開発した。この物質は熱可塑性と耐熱性に優れ、植物成分率が約70%と高いことが特徴とされる。

1.3 研究の目的と構成

研究の目的としては、ユーグレナに効率よくパラミロンを産生させるための種と条件を選抜し、ポリプロピレンに一部パラミロンを配合することによって物性の変化を確かめることで、パラミロンの生物資源としての利用可能性を探ることとする。

具体的な構成としては、本章において研究の背景と構成について確認をして、2章にて新奇ユーグレナ種を調査して、従来知られている種と比較してパラミロンを特異的に生産させることができる種があるかの考察を行い、3章においてユーグレナに含有されるパラミロンの有機フィラーとしての利用可能性について検証し、4章にて総合考察を行う。

2章

新奇ユーグレナ種のパラミロン生産への利用の試み

2章 新奇ユーグレナ種のパラミロン生産への利用の試み

2015年現在、産業利用が達成されているユーグレナ種は *E. gracilis* だけである。これは *E. gracilis* が比較的高温（～30℃）で良好な増殖を示し、pH2.5 - 3.5の低いpHで増殖可能であることが大きく寄与する。それに加え、古くからモデル生物として利用されてきたことによる部分も大きく、先人たちの長年にわたる培養条件の最適化と知識の蓄積が基礎となっている（M. Gojdics, 1953、S.H. Hunter et al., 1955、J.J. Wolken, 1961、G.F. Leedale, 1967、F.E. Round, 1965、E.I. Rabinowitch, 1956、D.E. Buetow, 1968, 1982, 1989）。*E. gracilis* が上記のように幅広い環境変化に適応できる能力があり、増殖が速いなどの産業利用に適した特性を持つ一方、他の各種ユーグレナもそれぞれ固有の特徴を持っており産業への適性を持つ可能性が期待できる。例えば、*E. sanguinea* は特殊な培養条件で細胞全体に高価値なカルテノイドであるアスタキサンチンを蓄積することが知られ（M. Grung et al., 1993）、*E. mutabilis* は *E. gracilis* よりさらに低いpHへの耐性を有し（D. Halter et al., 2014）、*E. viridis* は汽水域で生存可能であることから高塩濃度への耐性を有することが予想される（E. G. Pringsheim, 1956）。前章 Table1-1 で示したように各種ユーグレナは顕微鏡観察から高付加価値を持つパラミロンを粒子として細胞内に蓄積することが確認されており、*E. gracilis* 以外も、大量培養が成功すればパラミロン生産にも利用できると考えられる。

E. gracilis 以外はこれまで大量培養が検討された例がないため、各種ユーグレナの増殖速度と、効率的に培養するための条件が明らかとなっていない。本章では *E. gracilis* 以外のユーグレナ種の産業利用に向けて、増殖が速い種の選定、培養条件の検討、パラミロン生産での利点について検討を行う。

2.1 各種ユーグレナの増殖速度の評価

【2.1.1】 序

E. gracilis 以外のユーグレナ種として、國學院大学の加藤季夫先生から *E. anabaena* var. *minor* Mainx (以下便宜上 *E. anabaena* と記す)、*E. clara*、*E. deses*、*E. granulate*、*E. schmitzii*、*E. stellata* の 6 種に分譲を受けた。これらの株と、独自に単離した *E. agilis* を含めた 7 種においてユーグレナ種の培養条件の検討を行った。それぞれの種は細胞内にパラミロン粒子を保持することが観察され、うまく大量培養することができればパラミロン生産に寄与できると考えた。大量培養の前提条件として、ある程度の増殖速度が必要となる。このため、最初に各種ユーグレナの増殖速度の検討を行い、増殖が速い種を選抜した。それぞれの株は微細藻類用汎用培地である AF6 培地 (S. Kato, 1982) を利用して維持継代されていたが、*E. gracilis* の培養で用いられる CM 培地 (pH3.5) (M. Cramer et al., 1952) や KH 培地 (pH3.5) (L. E. Koren et al., 1967) では生存できなかった。これは各種が低 pH に対して耐性がなかったためと考えられ、実際、CM 培地と KH 培地を pH5.5 で調製した場合には、増殖は悪いが死滅はしなかった。それぞれの種としての増殖能を比較するため、AF6 以外に、いくつかの藻類用培地 BG-11 (J. B. Waterbury et al., 1981), C(T. Ichimura, 1971), mAC (H. Nozaki et al., 1995), TAP (D. S. Gorman and R. P. Levine, 1965) と pH5.5 に調整した *E. gracilis* 用の培地 CM5.5, KH5.5 培地を利用して増殖速度を比較した。ユーグレナ属の生存にはビタミン B1 とビタミン B12 が必須とされるが (S. H. Hutner, 1949)、TAP 培地はこれを含まないため本実験では AF6 培地と同じ分量で添加した。

【2.1.2】 方法

各種ユーグレナ株は日本国内の池や川から採取し単離された株である。それぞれ形態観察、粘液の染色パターン、もしくは 16s, 18s rDNA の配列解析により種を同定済みであり、これを実験に用いた。それぞれの顕微鏡写真を図 2-1-1 で示す。

各種培地の作製方法と成分は表 2-1 及び、表 2-2 にまとめた。

培養は 24 穴プレート (TPP 社) で 1 ml の培地を使用して 3 回ずつ行った。培養は 23°C のインキュベーター内で静置して行い、50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ の光量で明期 14 時間、暗期 10 時間の明暗周期で培養を行った。培養の様子を図 2-1-2、図 2-1-3 に示す。各経過日数での藻体量は、680 nm での吸光度 (OD680) をプレートリーダー (SH1200 コロナ電気) により測定し評価した。

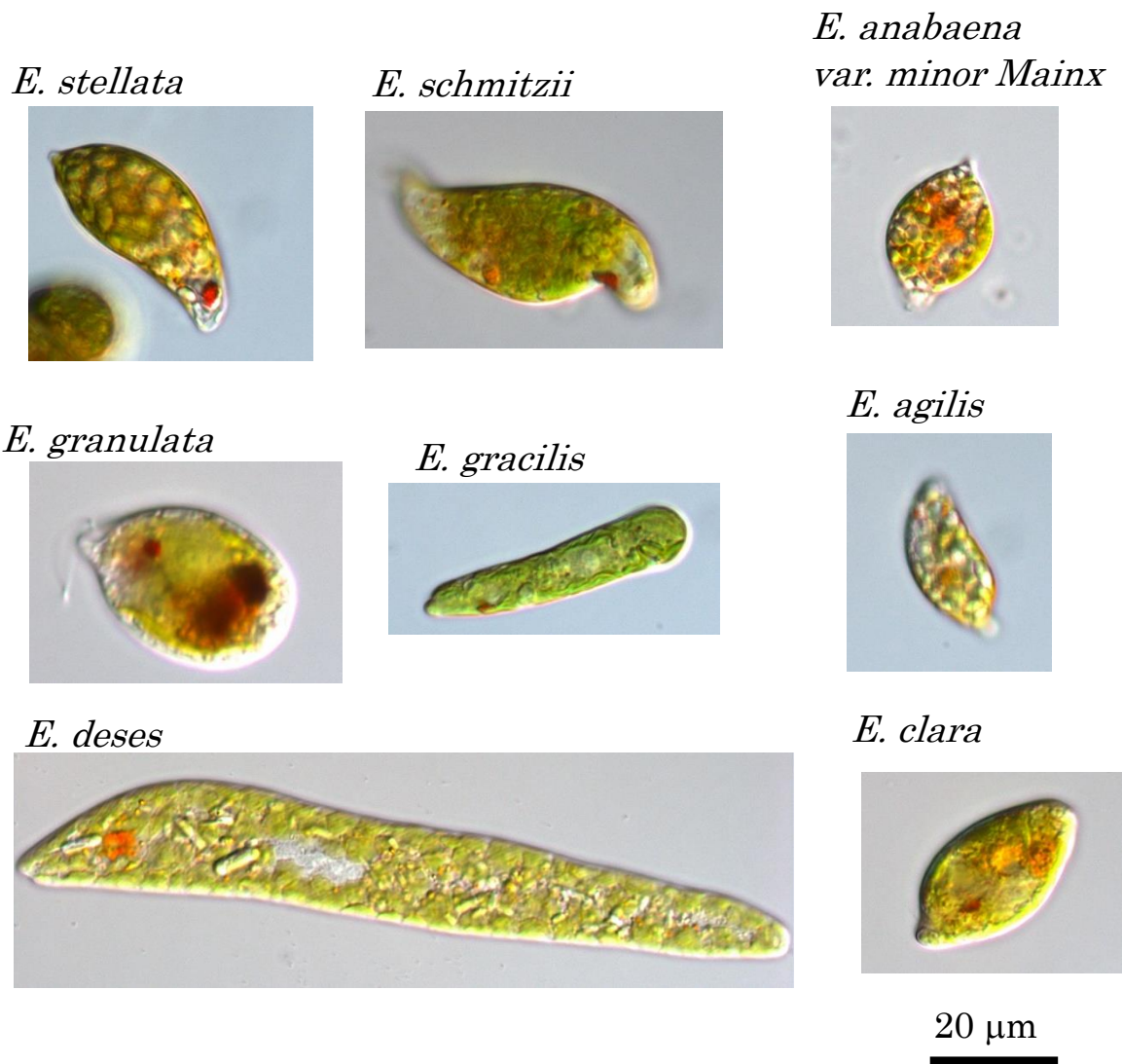


図 2-1-1 本章で扱った各種ユーグレナの顕微鏡像

40 倍の対物レンズを使用し LeicaDM2500 にて観察撮影した。スケールバーは 20 μm を示す。

表 2-2-1 各種培地の作製方法

Af6		C	
mg/L		mg/L	
NaNO ₃	14	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	150
NH ₄ NO ₃	22	KNO ₃	100
MgSO ₄ · 7H ₂ O	30	β -Na ₂ glycerophosphate · 5H ₂ O	50
KH ₂ PO ₄	10	MgSO ₄ · 7H ₂ O	40
K ₂ HPO ₄	5	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	500
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10	Biotin	0.0001
Fe-citrate	2	Vitamin B1(Thiamin)	0.01
Citric acid	2	Vitamin B12	0.0001
Biotin	0.002		
Vitamin B1(Thiamin)	0.01	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	3
Vitamin B6	0.001	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.588
Vitamin B12	0.001	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.108
MES	400	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.066
		CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.012
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	5	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.0075
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.98		
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.18		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.11		
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.02		
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.0125		

pH 6.6

pH 7.5

表 2-2-2 各種培地の作製方法

CM	mg/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1000
KH ₂ PO ₄	1000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200
CaCl	20
Vitamin B1(Thiamin)	0.1
Vitamin B12	0.0005
Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·7H ₂ O	3
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.8
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.4
CoSO ₄ ·7H ₂ O	1.5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.02

pH3.5 or pH5.5

KH	mg/L
Arginine HCl	500
Aspartic acid	300
Glucose	12000
Glutamic acid	4000
Glycine	300
histidine HCl·H ₂ O	50
Malic acid	6500
Na ₃ citrarte·H ₂ O	500
Na ₂ Succinate·H ₂ O	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	500
NH ₄ HCO ₃	250
KH ₂ PO ₄	250
MgCO ₃	600
CaCO ₃	120
Vitamin B1(Thiamin)	2.5
Vitamin B12	0.005
EDTA-Na ₂	50
FeSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	50
MnSO ₄ ·H ₂ O	18
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	25
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	4
CuSO ₄	1.2
NH ₄ VO ₃	0.5
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
H ₃ BO ₃	0.6
NiSO ₄ ·6H ₂ O	0.5

pH3.5 or pH5.5

表 2-2-3 各種培地の作製方法

BG-11

	mg/L
NaNO ₃	1500
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	40
MgSO ₄ · 7H ₂ O	75
CaCl ₂ · 2H ₂ O	36
Citric acid	6
Ferric ammonium citrate	6
Na ₂ EDTA - Mg	1
Na ₂ CO ₃	20
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.39
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.049

pH 7.4

TAP

	mg/L
NH ₄ Cl	400
CaCl ₂ · 2H ₂ O	51
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100
K ₂ HPO ₄	119
KH ₂ PO ₄	60.3
Acetic acid	1055
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	2420
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	50
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22
H ₃ BO ₃	11.4
MnCl ₂ · 4H ₂ O	5.06
FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.99
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.61
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	1.1
KOH	15

pH7

表 2-2-4 各種培地の作製方法

mAC

mg/L

NaNO ₃	14
NH ₄ NO ₃	22
MgSO ₄ · 7H ₂ O	30
KH ₂ PO ₄	10
K ₂ HPO ₄	5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10
CaCO ₃	10
Fe-citrate	2
Citric acid	2
Biotin	0.002
Thiamine HCl	0.01
Vitamin B6	0.001
Vitamin B12	0.001
MES	400
Glucose	400
Yeast extract	400
Tryptone	400
Sodium acetate	400
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	5
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.98
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.18
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.11
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.02
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.0125

pH 6.6

表 2-2-5 各種培地の成分

μmol/L	Na	Mg	K	Ca	Fe	Mn	Zn	Co	Mo	Cu	Ni	VO3
KH	6813	7117	1837	1199	12753	10650	8697	1.78	0.00	7.52	1.90	4.27
CM	2	812	7348	180	11.41	9.10	1.39	5.34	0.83	0.08	0.00	0.00
AF-6	192	122	131	68	11.76	0.91	0.38	0.08	0.05	0.00	0.00	0.00
mAG	5070	122	131	68	11.76	0.91	0.38	0.08	0.05	0.00	0.00	0.00
TAP	267	406	2344	347	17.95	25.58	76.54	6.77	0.00	6.29	0.00	0.00
BG-11	18035	307	459	245	22.82	9.15	0.77	0.17	1.61	0.32	0.00	0.00
C	343	182	989	635	2.18	0.55	0.23	0.05	0.03	0.00	0.00	0.00

μmol/L	NH4	NO3	SO4	PO4	Cl	CO3	BO3	MES	EDTA	Tris
KH	10985	0	4243	1837	2612	11478	10	0.0000	134	0
CM	15142	0	838	14819	189	0	0	0.0000	13	0
AF-6	275	440	122	102	148	0	0	0.0019	1.3	0
mAG	275	440	122	102	148	0	0	0.0019	1.34	0
TAP	7478	0	507	126	8204	0	184	0.0000	3	19977
BG-11	23	17649	305	230	499	189	48	0.0000	8	4127
C	0	2260	163	0	7	0	0	0.0000	8	0

μmol/L	citrate	glycerophosphate	acetate	glucose	arginine	aspartic acid	glutamic acid	glycine	histidine	malic acid	succinic acid	biotin	Thiamine	VitaminB6	VitaminB12
KH	1812	0	0	66867	2374	2254	27187	3996	239	48475	556	0.00000	0.00000	14.77716	0.00368
CM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00000	0.00000	0.00037	
AF-6	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00019	0.00591	0.00074	
mAG	8	0	0	4878	0	0	0	0	0	0	0	0.00019	0.00591	0.00074	
TAP	0	0	0	17583	0	0	0	0	0	0	0	0.00000	0.00000	0.00000	
BG-11	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00000	0.00000	0.00000	
C	0	0	0	163	0	0	0	0	0	0	0	0.00041	0.002965	0.00007	

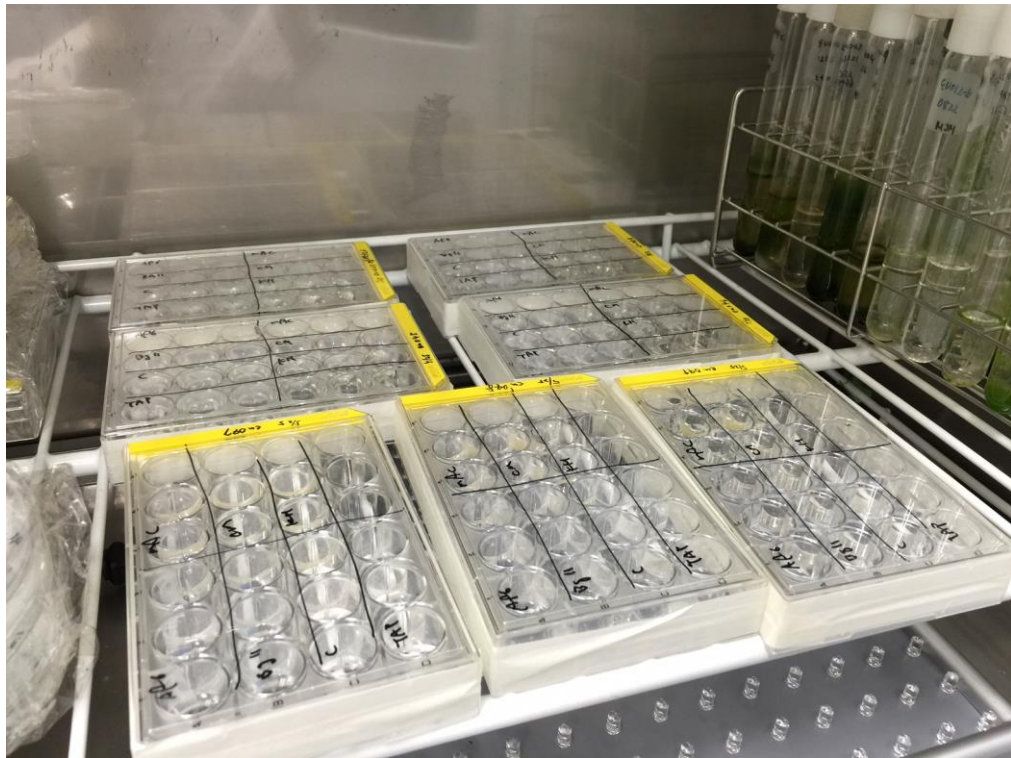


図 2-1-2 暗期条件時のインキュベーター内部の画像

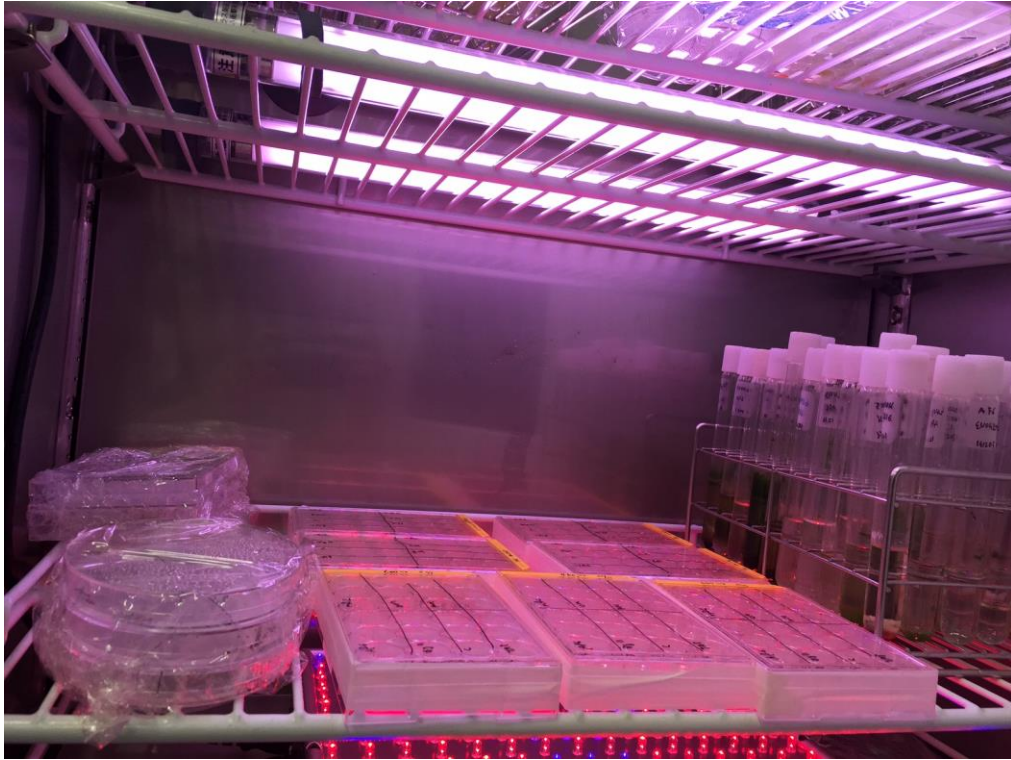


図 2-1-3 明期条件時のインキュベーター内部の画像

【2.1.3】 結果

*E. gracilis*がCM培地、KH培地で速い増殖を示したのに対し、他の種はこれらの培地ではほとんど育たなかった（図2-2-A-H）。*E. schmitzii*は例外であり、KH培地で順調に増殖した（図2-2-G）。*E. anabaena*、*E. deses*、*E. stellata*はTAP培地で、*E. agilis*と*E. granulata*はC培地で、*E. clara*はmAC培地でそれぞれ最も増殖が良かった（図2-2-B-H）。興味深いことに、*E. anabaena*と*E. deses*はC培地とTAP培地で特殊な表現型を示した。それぞれC培地では素早く泳ぎ回り、TAP培地では形態が太く、明視野観察下で黒緑色に見える表現型を示した（図2-4）。同様に、*E. agilis*は対数増殖期にはシスト形態（動かない球形の形態）で増殖したが、C培地では多くの個体が遊泳可能な状態で存在した。

*E. gracilis*以外の種は、それぞれC培地で良好な増殖を示した。各種の増殖の速さを直接比較するため、CM培地で培養した*E. gracilis*とC培地で培養したその他の種を対数増殖期にあたる7日目から11日目における細胞の比増殖速度で比較した（図2-3）。その結果、*E. gracilis*の増殖が圧倒的に速かったが、それ以外の種では*E. anabena*の増殖が比較的速いことが分かった。

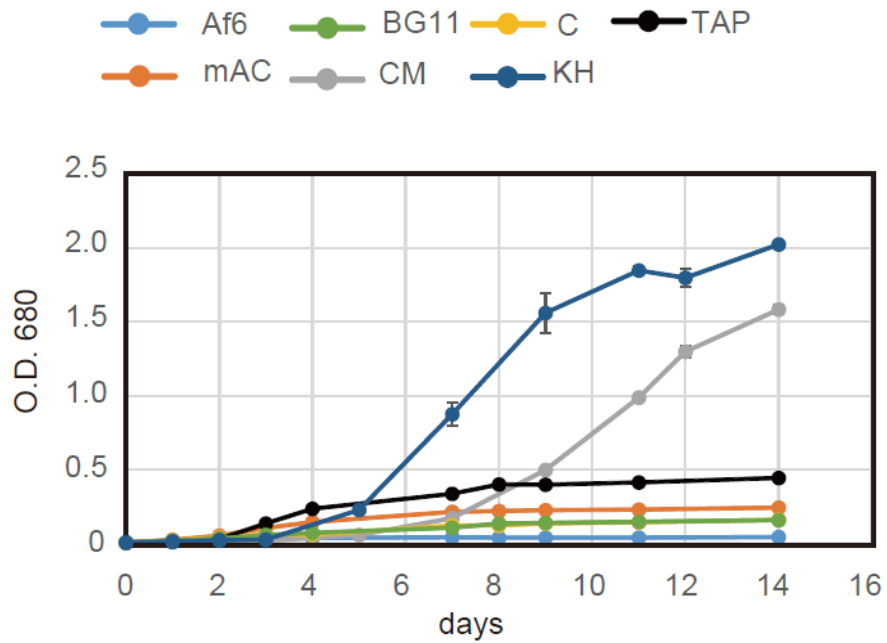


図 2-2-A. *E. gracilis* の基本的培地での増殖.

E. gracilis を各種培地 (AF6、BG-11、C、TAP、mAC、CM、KH) を用いて 23°C で静置培養した。初期濃度は約 0.01 (OD680) で合わせ、3 ウェルずつ使用した。エラーバーは 3 ウェルの結果の SEM を示す。

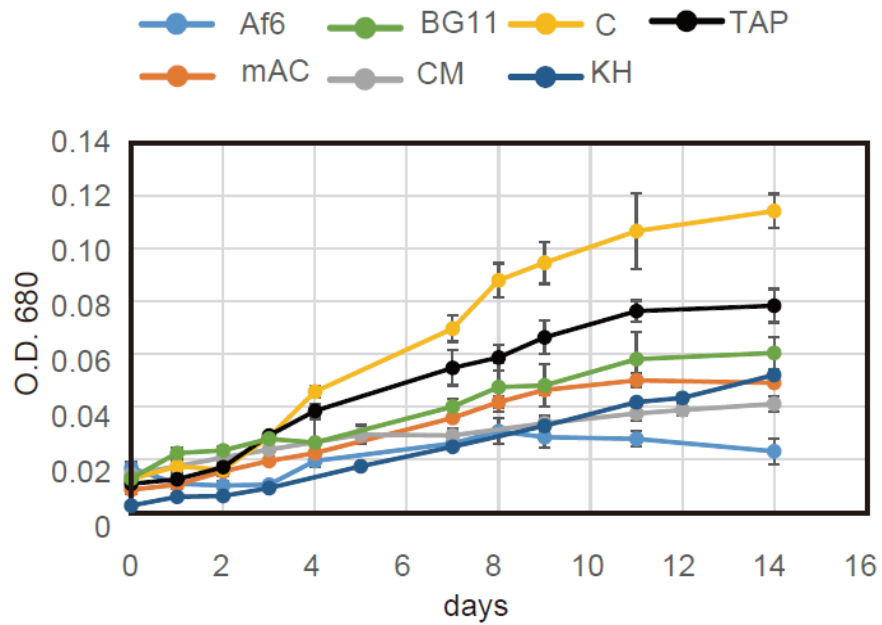


図 2-2-B. *E. agilis* の基本的培地での増殖.

E. agilis を各種培地 (AF6、BG-11、C、TAP、mAC、CM、KH) を用いて 23°C で静置培養した。初期濃度は約 0.01 (OD680) で合わせ、3 ウェルずつ使用した。エラーバーは 3 ウェルの結果の SEM を示す。

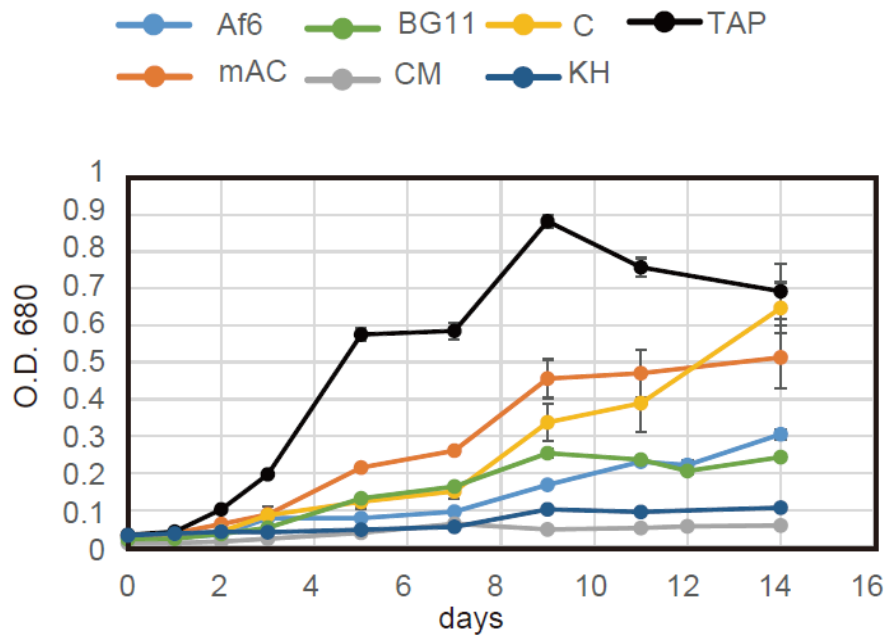


図 2-2-C. *E. anabaena var. minor Mainx* の基本的培地での増殖。

E. anabaena var. minor Mainx を各種培地 (AF6、BG-11、C、TAP、mAC、CM、KH) を用いて 23°C で静置培養した。初期濃度は約 0.01 (OD680) で合わせ、3 ウェルずつ使用した。エラーバーは 3 ウェルの結果の SEM を示す。

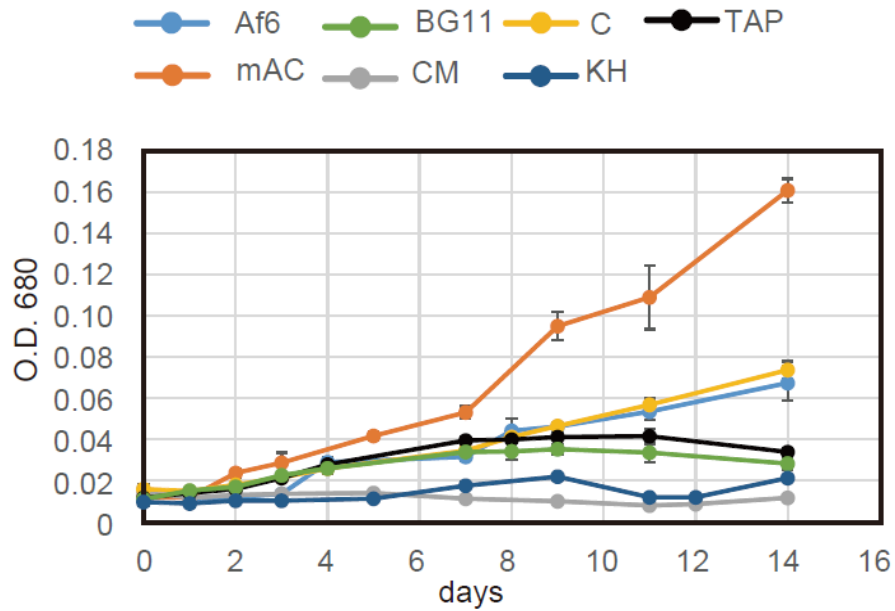


図 2-2-D. *E. clara* の基本的培地での増殖.

E. clara を各種培地 (AF6、BG-11、C、TAP、mAC、CM、KH) を用いて 23°C で静置培養した。初期濃度は約 0.01 (OD680) で合わせ、3 ウェルずつ使用した。エラーバーは 3 ウェルの結果の SEM を示す。

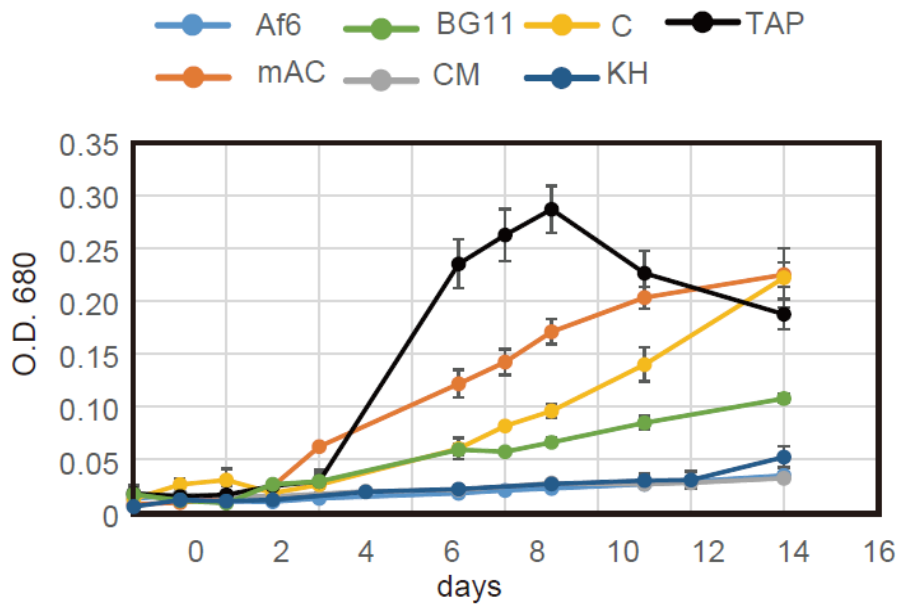


図 2-2-E. *E. deses* の基本的培地での増殖。

E. deses を各種培地 (AF6、BG-11、C、TAP、mAC、CM、KH) を用いて 23°C で静置培養した。初期濃度は約 0.01 (OD680) で合わせ、3 ウェルずつ使用した。エラーバーは 3 ウェルの結果の SEM を示す。

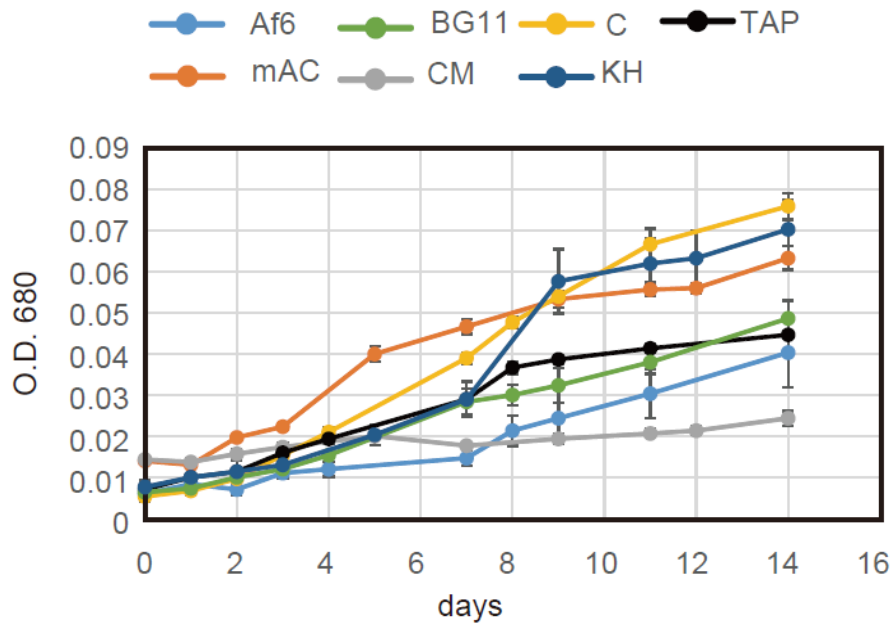


図 2-2-F. *E. granulata* の基本的培地での増殖.

E. granulata を各種培地 (AF6、BG-11、C、TAP、mAC、CM、KH) を用いて 23°C で静置培養した。初期濃度は約 0.01 (OD680) で合わせ、3 ウェルずつ使用した。エラーバーは 3 ウェルの結果の SEM を示す。

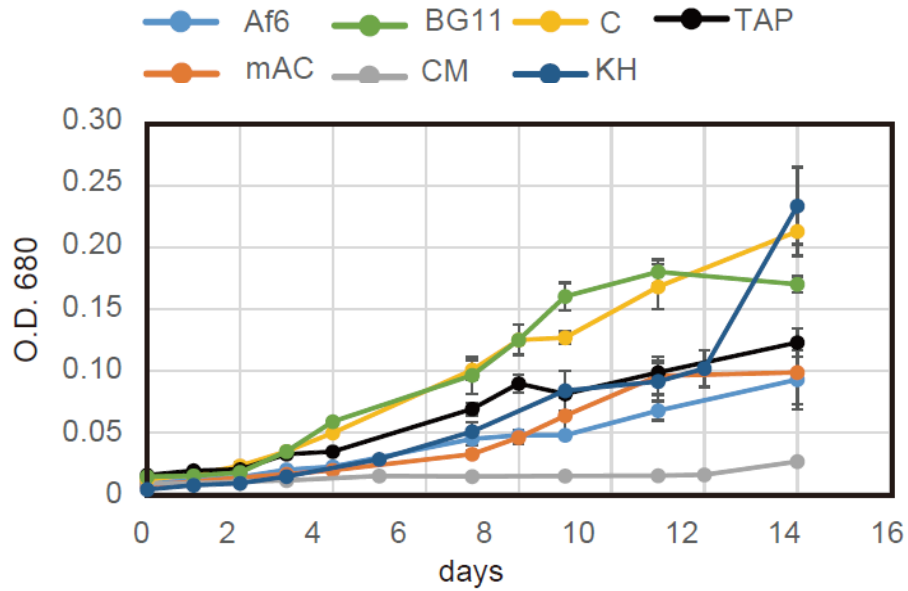


図 2-2-G. *E. schmitzii* の基本的培地での増殖.

E. schmitzii を各種培地 (AF6、BG-11、C、TAP、mAC、CM、KH) を用いて 23°C で静置培養した。初期濃度は約 0.01 (OD680) で合わせ、3 ウェルずつ使用した。エラーバーは 3 ウェルの結果の SEM を示す。

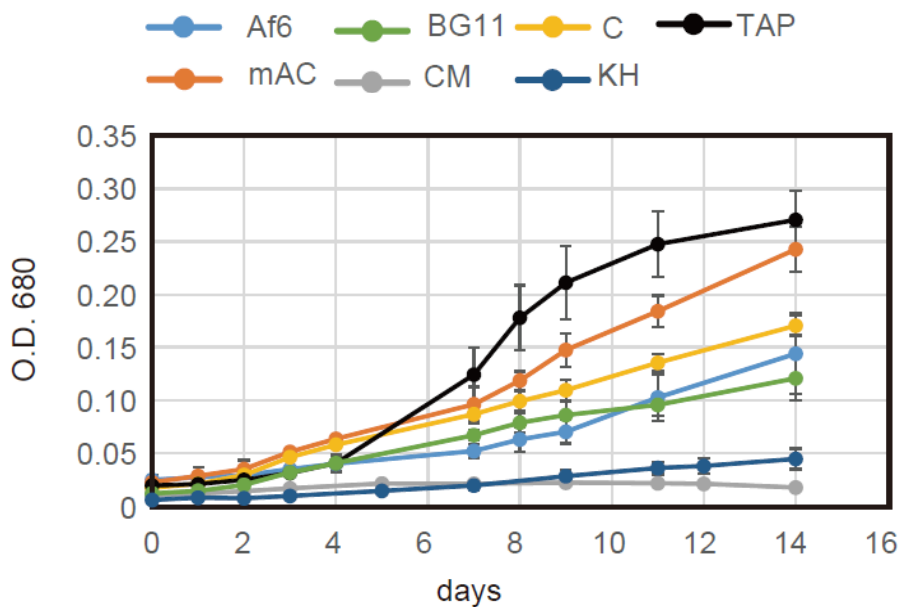


図 2-2-H. *E. stellata* の基本的培地での増殖.

E. stellata を各種培地 (AF6、BG-11、C、TAP、mAC、CM、KH) を用いて 23°C で静置培養した。初期濃度は約 0.01 (OD680) で合わせ、3 ウェルずつ使用した。エラーバーは 3 ウェルの結果の SEM を示す。

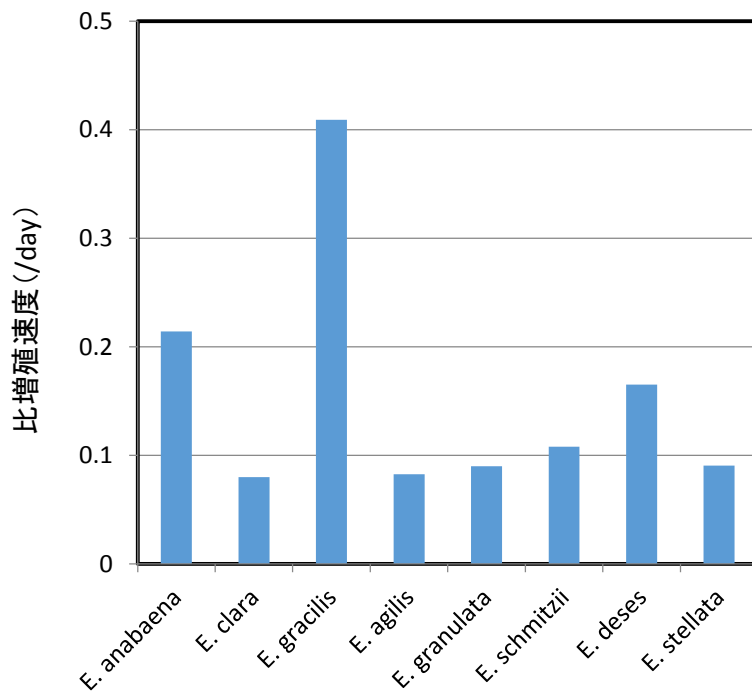


図 2-3. 各種ユーグレナの増殖速度比較

対数増殖期にあたる 7 日目と 11 日目の間の *E. agilis*、*E. anabaena*、*E. clara*、*E. deses*、*E. granulata*、*E. schmitzii*、*E. stellata* それぞれの C 培地での比増殖速度と *E. gracilis* の CM 培地(pH 3.5)での比増殖速度。

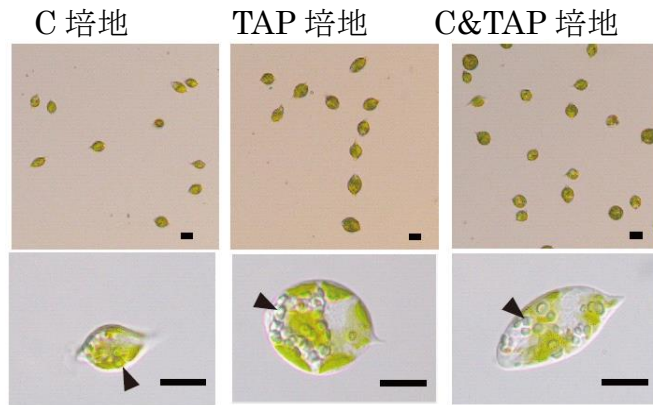


図 2-4. TAP 培地で培養した *E. anabaena* の表現型

C 培地、TAP 培地、C&TAP 培地を用い、*E. anabaena* を 23°C で 1 週間静置培養した。それぞれの細胞を 40 倍の対物レンズを使用し LeicaDM2500 にて観察撮影した。スケールバーは 10 μm を示す。

【2.1.4】 考察

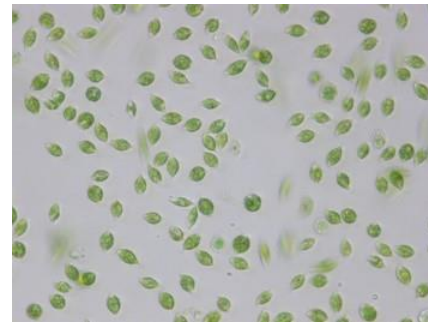
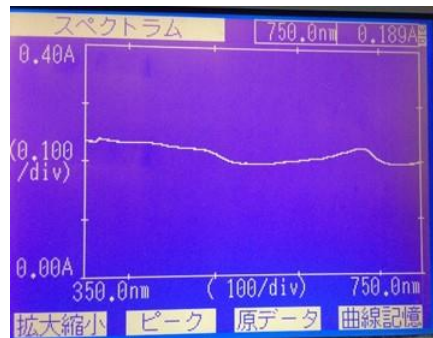
CM 培地、KH 培地は *E. gracilis* 特異的に増殖を強く促進し、他の種はあまり増殖しなかった。これは CM 培地と KH 培地が *E. gracilis* のために開発された経緯から予想される結果ではあったが、*E. gracilis* とそれ以外のユーグレナ種では培地に要求する条件が大きく異なることが示唆された。そのことを支持する事実として、*E. gracilis* 以外のユーグレナ種はアンモニア態窒素を含まない C 培地で増殖することも挙げられる。これは *E. gracilis* が硝酸還元酵素を持たず、硝酸態窒素をほとんど資化できないことと対照的である (M. Cramer et al., 1952)。*E. gracilis* 以外の各種ユーグレナが C 培地で増殖することから、種が分かれる以前のユーグレナの祖先が硝酸還元酵素を持っていたが、*E. gracilis* は主として分岐した後にこの酵素をコードする遺伝子を失ったことが示唆される。

E. anabaena は TAP 培地で最もよい増殖を示したが、同時に太くなり、明視野観察下で黒緑色に見える表現型も示した。これは TAP 培地のみに含まれない、もしくは TAP 培地のみに含まれる成分に由来することが予想された。培地に含まれる成分を比較すると TAP 培地のみに含まれない、もしくは含まれる成分は存在しなかった (表 2-2)。TAP 培地を大きく特徴づける成分としては酢酸 (0.1 %) が挙げられ、mAC 培地が同様に酢酸ナトリウム由来の酢酸を含むが、その量は TAP 培地の方が多し。そのため、これらの表現型は酢酸に由来する可能性が予想されたが、C 培地に酢酸 (0.1 %) のみを加えた場合には *E. anabaena* は致死であった。TAP 培地を作製する際、酢酸を加えた後にオートクレーブ滅菌するため、揮発により TAP 培地中に含まれる酢酸濃度は 0.1% より少なくなっている可能性が考えられる。一方で、さらに少量の酢酸を C 培地に加えることも試し

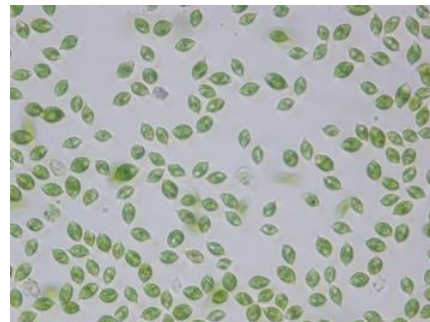
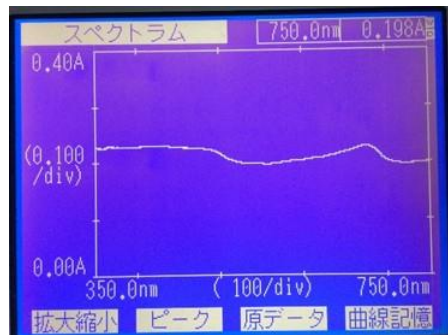
たが、生存可能な酢酸濃度(～0.01%)では効果は現れなかった。以上のことから、TAP 培地に含まれる酢酸が形態と色調の変化の原因であるとしても、それ以外の成分のバランス等も影響していると考えられる。例えば、ホウ酸も TAP 培地には他の培地より多く含まれているので、これも要因の一つとなっている可能性が考えられる。

E. anabaena を TAP 培地で培養した際に、他の培地で培養した場合と比較して、明視野観察下でより暗い色に見えるのは、透過光がより吸収されるためと予想された。しかしながら、AF6 培地, C 培地, TAP 培地のそれぞれについて培養した細胞を等量利用し、吸光スペクトルを測定したところ、スペクトルパターンに大きな違いはみられなかった。このことから、TAP 培地で培養した際に、特定の波長を吸収する成分が産生されているわけではないことがわかった。一方で、TAP 培地で培養した細胞は各波長での吸光が著しく大きく、細胞が大きくなり、厚みを増していることを反映している可能性が考えられる。また、以降の実験で示すように、TAP 培地で培養した場合にはパラミロンの蓄積量が増えるため、パラミロンにより照明光が乱反射し、透過光が減じて暗い色調になっている可能性も併せて示唆される。

AF6



C



TAP

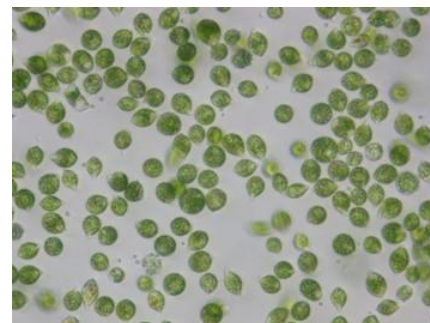
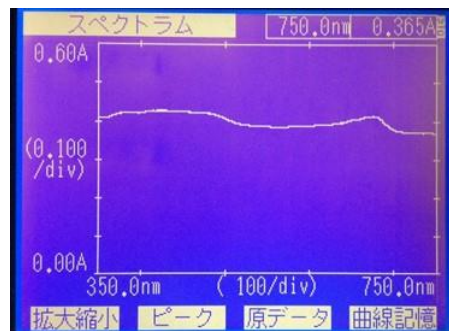


図 2-5. TAP 培地で培養した *E. anabaena* の吸光スペクトル

AF6 培地、C 培地、TAP 培地を用い、*E. anabaena* を 26°C で 1 週間振盪培養した。それぞれの細胞を 4×10^5 個を使用し吸光光度計（島津、UVmini-1240）で吸光スペクトルを調べた。

オリンパス CKX41 にて観察撮影した。

2.2 *E. anabaena* 株の培養特性の評価

【2.2.1】 序

前項において調べた各種ユーグレナ種のうち、*E. gracilis* 以外では *E. anabaena* の増殖が格段に速かった。その際に培養は、1 ml の容量で比較的低温 (23°C)、低光量 (50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) で行った。経験上、培養の規模は増殖の良し悪しに影響を与えることが多いため、通常の試験管培養試験で用いる 40 ml ほどの容量で同様に増殖可能であるかを検討した。また、より高温で培養することによって増殖が速くなる可能性が考えられたため、*E. anabaena* の培養に適した温度条件を検討した。さらに至適温度、最適培地で培養した際に *E. gracilis* との増殖の速さの比較を行った。

【2.2.2】 方法

培養の至適温度の検討では、100 ml 試験管を用い、40 ml の AF6 培地で実験を行った。実験開始時の藻体量は、OD680 = 0.03 程度に合わせ、試験管を 3 本ずつ用い、通気化で 20°C、23°C、26°C、29°C、32°C の 5 種類の温度に設定した水槽中でそれぞれ実験を行った。実験の際の光照射は 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ の恒常光で行い、5% CO₂ を含む空気を 40 ml/min. 通気して培養した。藻体濃度は吸光光度計（島津、UVmini-1240）にて OD680 を各日測定し評価した。

至適培養条件での *E. gracilis* との増殖比較は、至適温度の検討の実験と同様の方法で行った。ただし、温度は 29°C とし、培地は TAP 培地 (+vitamine)、C 培地、C 培地と TAP 培地の等量混合培地 (C&TAP) を用いた。対照実験での *E. gracilis* の培養は同様の条件で行い、培地は CM 培地 (pH3.5) を用いた。

【2.2.3】 結果

AF6 培地を用いた 40 ml 容量での培養でも、*E. anabaena* の増殖を確認することができた（図 2-6）。24 穴プレートでの培養実験で設定していた温度、23°Cでの増殖と比較して、26°C、29°Cと温度が高くなるほど増殖が速くなった。一方で、32°Cまで温度を上げるとほとんど増殖しなくなり、大部分が死滅、もしくはシスト化した。

TAP 培地、C 培地、C&TAP 培地を用い、同様に 40 ml の容量、29°Cで増殖を調べた結果、TAP 培地と C&TAP で増殖が速く、6 日目までに 6~7 倍に増加した（図 2-7）。これは同様の条件で CM 培地 (pH3.5) を使い培養した *E. gracilis* の半分程度の増殖の速さであった。

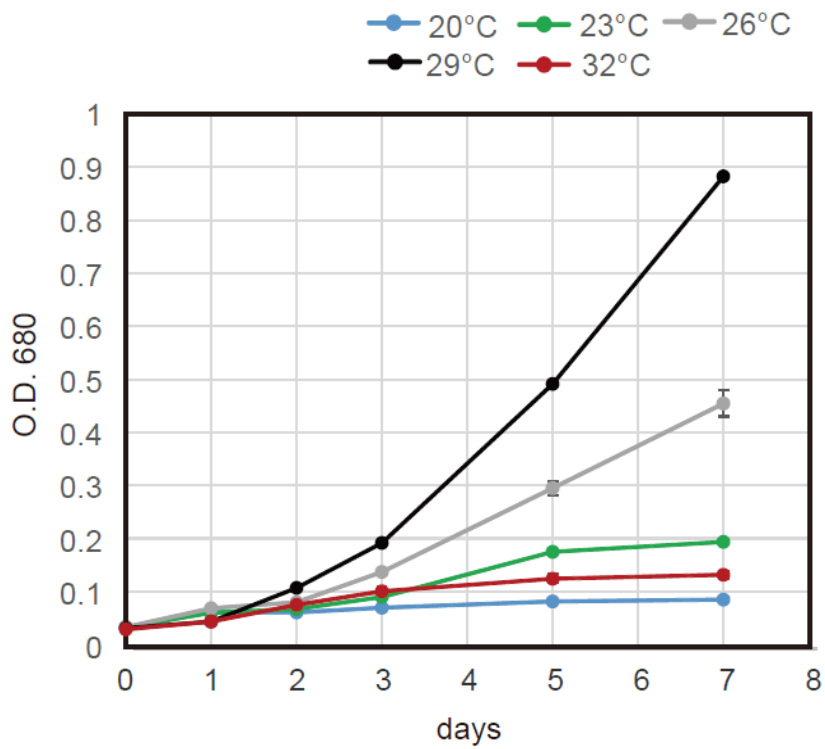


図 2-6. 培養温度による *E. anabaena* の増殖曲線の変化

20°C、23°C、26°C、29°C、32°C での増殖曲線。試験管 3 本ごとの結果で、エラーバーは SEM を示す。

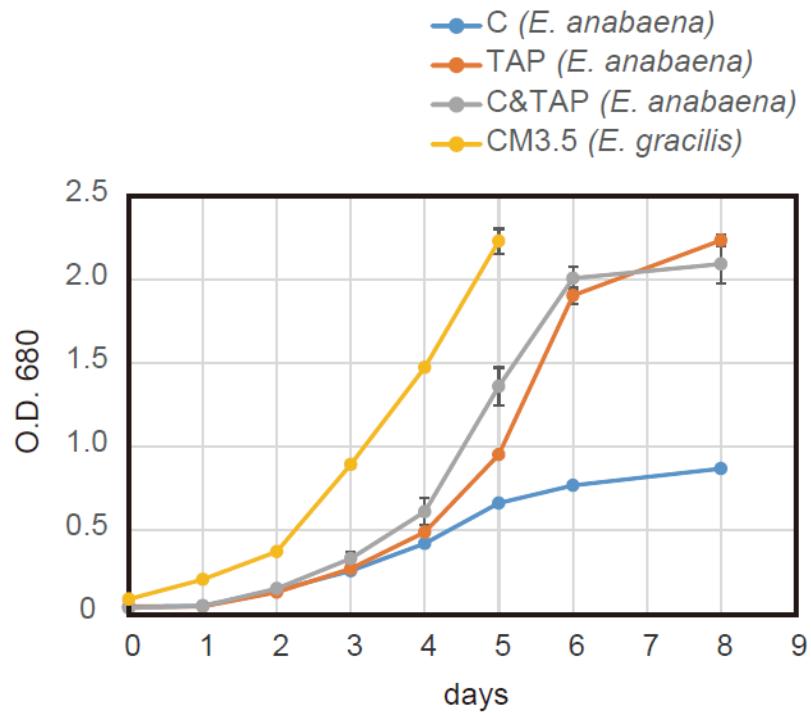


図 2-7. *E. anabaena* の最適化された培養条件での増殖

それぞれ 100 mL の試験管内で 40 mL の培地を使用し、29°Cで培養を行った。*E. anabaena* には C 培地、TAP 培地、C&TAP 培地のそれぞれで培養し、*E. gracilis* は CM 培地(pH3.5)で培養を行った。初期細胞濃度は OD680 = 0.03 とし、それぞれ 3 回の試行数で行った。エラーバーは SEM を示す。

【2.2.4】 考察

前項の実験では、各種ユーグレナ種を 23°C で培養比較した。これは *E. clara* など、一部のユーグレナ種がそれより高い温度でほとんど増加しないことが経験的に明らかになっていたため、比較のために 23°C での培養で統一した。一方で、*E. anabaena* の増殖は *E. gracilis* と同様に 29°C が一番よく、より速い増殖を得るために必要な温度条件が明らかになったのと同時に、ある程度の高温に対する耐性を持っていることが示された。

TAP 培地、及び C&TAP 混合培地を用いた培養では、それぞれで *E. gracilis* を CM 培地 (pH3.5) で培養した際の半分程度の増殖速度を示した。TAP 培地はクラミドモナスなどの培養で広く使われる培地であるが、この培地を基としてさらなるミネラルの調整や窒素源の選択などを行うことによって *E. anabaena* の増殖により適した培地を作製できる余地は存在すると考えられる。なお、TAP 培地と C&TAP 混合培地では同じぐらいの増殖の速さを示したが、C&TAP 混合培地中での細胞形態は TAP 培地で培養した場合と同様に、太く、明視野観察下で黒緑色に見えた。このことは、前項で考察した形態の表現型を引き起こす TAP 培地の成分について、TAP 培地に少ない成分ではなく、TAP 培地に多く含まれる成分（おそらく 0.1%酢酸）が影響していることを再度示唆する結果である。

2.3. *E. anabaena* 株の小規模培養試験

【2.3.1】 序

ユーグレナ類を産業利用する際の目的産物の一つに、ユーグレナが特異的に産生する β -1, 3 グルカンであるパラミロンが挙げられる。各種ユーグレナを維持培養する過程で *E. anabaena* と *E. deses* の二種は藻体が試験管の底にすぐに沈降してしまう様子が観察されていた。パラミロンは比重が高い（約 1.5）物質であるため (R. H. Marchessault et al., 1979)、よく沈降する性質はパラミロンを多く蓄積していることを示唆すると考えられる。*E. anabaena* は 40 mL の容量でも一定の増殖を示し、炭水化物含量を測定するのに十分な量の藻体を集めることができたため、その含量を定量した。

【2.3.2】 方法

E. gracilis は CM 培地 (pH3.5)、*E. anabaena* は TAP 培地 (+vitamin) でそれぞれ 1 週間培養し、培養液を 100 ml 試験管内に OD680 = 0.38 となるように希釈調整し静置した。一定時間おきに写真を撮影し、沈降具合を観察、記録した。細胞内のパラミロン粒子確認のための細胞は、各種培地で培養した後に顕微鏡 (LeicaDM2500) で観察し、40 倍対物レンズを利用し写真を撮影した。パラミロン粒子の詳細な観察のため、一部の細胞はカバーガラスを載せた後に一定時間 (~5 分程度) 放置し、その重みにより潰して観察した。

細胞の含有炭水化物量は、藻体を凍結乾燥機 (FDV-1200, EYLA) により乾燥させた後、10 mg 程度を利用し定量した。乾燥操体に 10 ml のアセトンを加え、超音波破碎機 (UD-201, TOMY) により細胞を破碎し、遠心により回収した沈殿を SDS 水溶液 (10%, 1%) と水を利用して 3 回洗浄した。その後、得られたパラミロンを含む沈殿をフェノール硫酸法により定量し、元の乾燥藻体との重量比を計算した。

【2.3.3】 結果

培養液の藻体濃度を揃え静置すると、*E. anabaena* では一時間後にはその大部分が沈殿し、*E. gracilis* の細胞はあまり沈殿しない様子が観察された(図 2-8)。*E. anabaena* を各種培地で育てた細胞を観察すると予想通りたくさんのパラミロン粒子が観察された(図 2-4: C 培地で 6 個、TAP 培地で 28 個ほど)。さらにカバーガラスの重みでつぶれた細胞を観察すると、多いものは一細胞あたり 80 個ものパラミロン粒子が含まれることが確認できた(図 2-9: 図上の細胞)。

E. anabaena の藻体に含まれるパラミロンを定量すると、最大で乾燥重量の 45%程度含むことが明らかとなった(図 2-10)。*E. gracilis* も窒素制限などのストレスにより 40%程度のパラミロンを蓄積したが、CM 培地で独立培養した状態ではほとんどパラミロンの蓄積は確認できなかった。

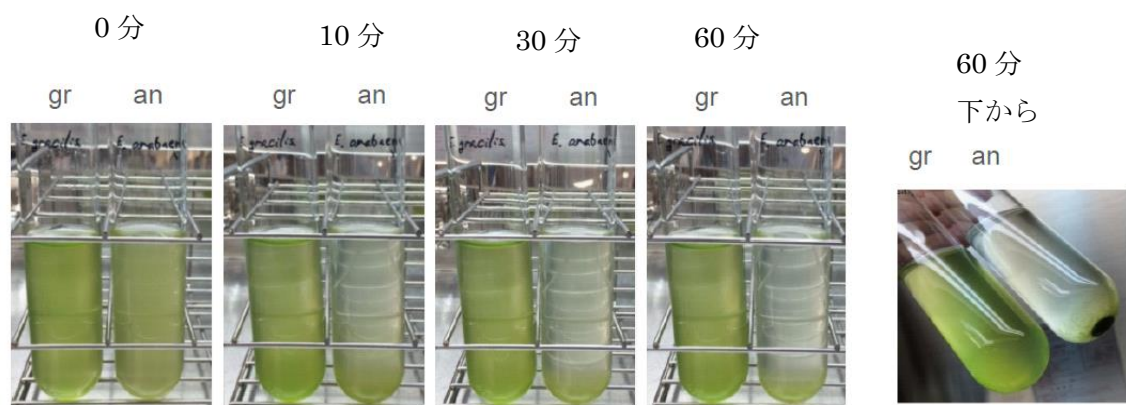


図 2-8. *E. gracilis* および *E. anabaena* 細胞の沈降性の比較

E. gracilis と *E. anabaena* の培養液を静置した際に 10 分後、30 分後、60 分後の沈降の経時変化を撮影記録した。60 分後には沈降の具合を良く確認するために底面の様子の写真も撮影した。gr と an はそれぞれ *E. gracilis* と *E. anabaena* を示す。



図 2-9. *E. anabaena* 細胞の沈降

E. anabaena を TAP 培地で培養後に顕微鏡観察を行った。カバーガラスを載せて、5 分程度放置して重みで潰れた細胞の写真を撮影した。各細胞には 40-70 個のパラミロン粒子が確認できた。スケールバーは 10 μm を示す。

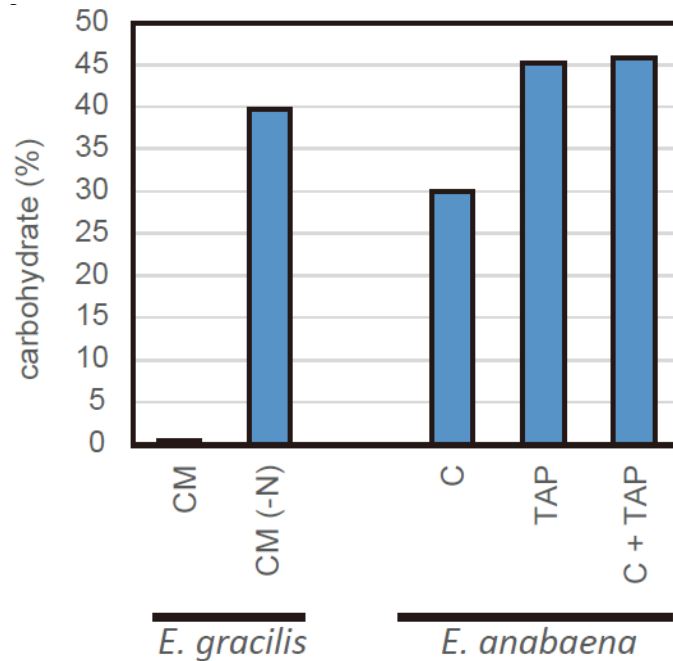


図 2-10 *E. gracilis* および *E. anabaena* の炭水化物含量の比較

100 mL 試験管を用い 1 週間培養した *E. anabaena* と *E. gracilis* の炭水化物含量を測定した。*E. gracilis* は CM 培地、もしくは窒素源を抜いた CM 培地(CM(-N))を用いて培養した。*E. anabaena* は C 培地、TAP 培地、C&TAP 混合培地のそれぞれを用いて培養した。炭水化物量はフェノール硫酸法で定量した後に、元の藻体の乾燥重量と比較して含有率を計算した。

【2.3.4】 考察

E. anabaena は TAP 培地で培養することにより、増殖期であっても乾燥重量の 45% 程度のパラミロンを蓄積し、*E. gracilis* に匹敵する割合の量のパラミロンを蓄積することが明らかになった。この点に加え、*E. gracilis* と比較して *E. anabaena* を産業利用する利点は以下の 3 つが挙げられる。第一に、細胞のサイズが *E. gracilis* が 50 μm 程度であるのに対し、*E. anabaena* が 20 μm 程度と小さい。*E. gracilis* は培養液の攪拌により生じるせん断力に弱いという弱点があるが、*E. anabaena* は比較的小さいため、せん断力の影響を受けにくいと期待できる。第二に、培養液中で沈みやすいため、攪拌と通気を止めることにより容易に藻体の回収ができることが予想される。そして最後に、*E. gracilis* を利用してパラミロンを作らせる場合には窒素制限するなどの培養を実施するといった形で、培地交換などひと手間多くかける必要がある。その一方、*E. anabaena* をパラミロン生産に用いる場合にはそのプロセスが省略可能となり、単一の培養槽での培養で増殖させた後に、そのまま収穫可能であるため効率が良い。

以上で考察したように *E. gracilis* につぐユーグレナ種として、*E. anabaena* を産業利用できる可能性を示した。微生物の培養のための培地の作製、改良は、膨大な量の試行錯誤の産物となるが、それにより増殖が大きく改善される余地もあると考えられる。*E. anabaena* の培養のために培地改良する価値が確認できた。

2.4. *E. anabaena* 株の培養のスケールアップに関する考察

【2.4.1】 序

試験管レベルで培養を行うことができることを確認した藻類については、スケールアップした培養の可否を確認して産業上利用可能かどうかを検討する必要がある。そのための評価の一つとして、*E. anabaena* を用いて、2Lスケールでの開放系培養試験を行った。底面 10 cm x 10 cm の直方体型の培養槽の側面をアルミホイルで遮光し、TAP 培地+ vitamine(ビタミン B1 : 10 µg/L, ビタミン B12 : 1 µg/L)2L (水深 20 cm) を用いて培養を行った。本試験例における 20cm 水深の角形培養槽は、屋外の 20 cm 水深のプールの一部を切り取った状態を模している。

【2.4.2】 方法

E. anabaena は、TAP 培地を用いて前培養したものを用い、培養開始時の濃度を 5×10^5 細胞/mL、 90 g/m^2 、 $\text{OD}_{680} = 0.45$ とした。培養中において、培養槽の上面は蓋をせず開放し、メタルハライドランプを使用して、光量を $800 \text{ } \mu\text{mol photons/m}^2 \text{ s}$ ，明暗周期を L（明期）14 h:D（暗期）10 h とした。培養温度 29°C 、 CO_2 が 10 ml/min を含むよう、 200 ml/min で曝気し、培養液を底面からスターラーにより 100 rpm で攪拌した。コントロールとして CM 培地を用いて前培養した *E. gracilis* を、開始濃度 $\text{OD}_{680} = 0.45$ で合わせ CM 培地で培養した。培養を行う際に、藻体重量、 OD_{680} 、細胞数の変化についてそれぞれの項目で経時的に測定を行った。また、*E. anabaena* の 1 週間後の藻体に含まれる炭水化物量を測定した。

【2.4.3】 結果

本試験例の培養開始から 140 時間後までの藻体重量、藻体重量増加量、細胞数の変化を示すグラフを、図 2-11～図 2-13 に示す。培養を 1 週間（144 時間）行った結果、乾燥藻体重量は、200 g/m²程度増加した。

1 週間培養後の *E. anabaena* の藻体を顕微鏡で 40 倍対物レンズを用いて撮影した写真を、図 2-14 に示す。図中で矢印で示すように、*E. anabaena* が順調に増殖するとともに、*E. anabaena* よりも小粒の雑菌が観察された。*E. gracilis* の培養においては、雑菌は見られなかった。また、*E. anabaena* の 1 週間後の藻体に含まれる炭水化物量は、乾燥藻体重量の 14%程度で、*E. gracilis* は 0.43%であった。

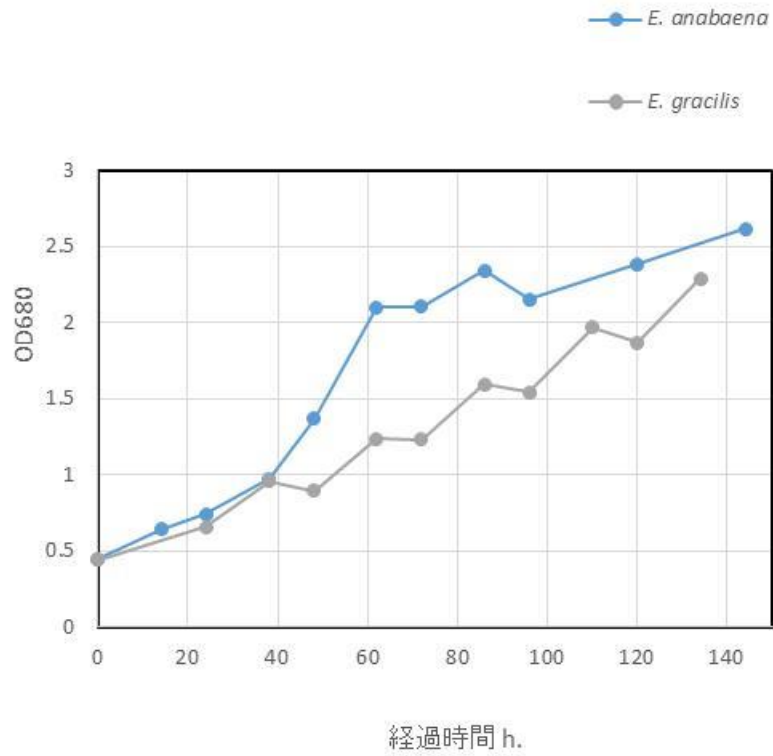


図 2-11 *E. anabaena* および *E. gracilis* の 2 L 培養槽における増殖
E. anabaena および *E. gracilis* の増殖の経時的な変化を OD で比較した。

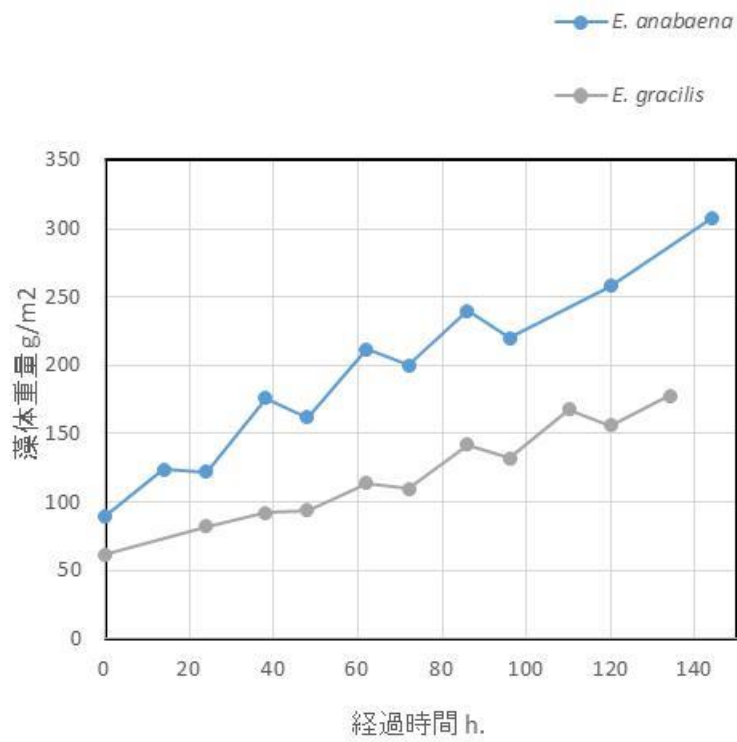


図 2-12 *E. anabaena* および *E. gracilis* の 2 L 培養槽における増殖
E. anabaena および *E. gracilis* の増殖の経時的な変化を藻体重量で比較した。

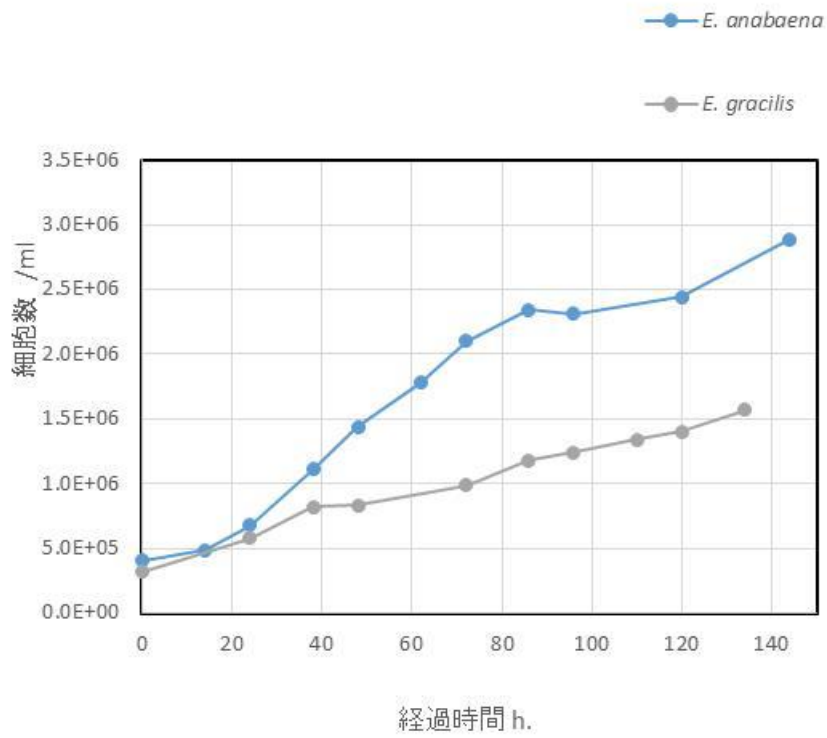
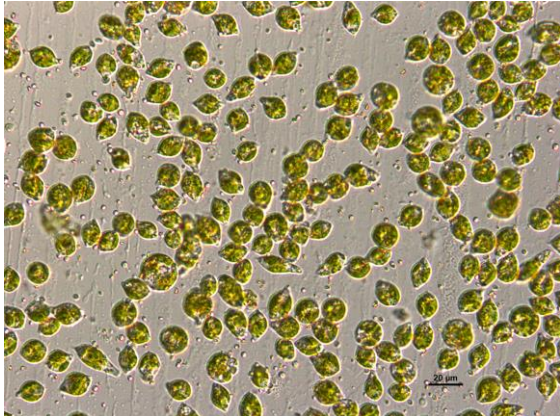


図 2-13 *E. anabaena* および *E. gracilis* の 2 L 培養槽における増殖
E. anabaena および *E. gracilis* 増殖の経時的な変化を細胞数で比較した。

(A)



(B)

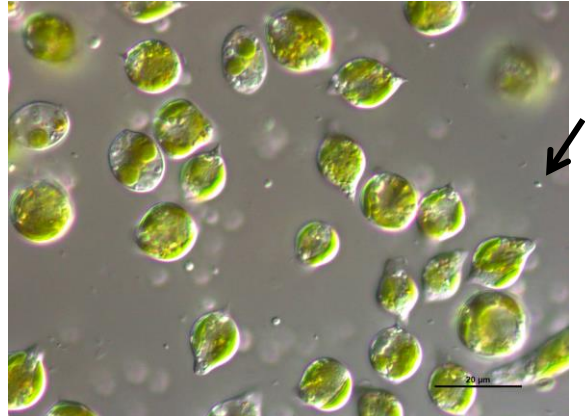


図 2-14 *E. anabaena* の培養後の顕微鏡画像

(A) 培養後の藻体の画像と (B) 拡大画像で、矢印の先に雑菌とみられるものの増殖が認められる。スケールバーはそれぞれ 20 μm 。

【2.4.4】 考察

今回の試験例より、少なくとも屋内で培養する限りにおいては、上面に蓋をせず開放した状態で *E. anabaena* を *E. gracilis* と同様に培養することができることを確認した。しかし、*E. anabaena* の培養において雑菌の増殖が一部みられた。その理由として、TAP 培地に炭素源としての酢酸が含まれていることが影響していると考えられる。

また、計測された炭水化物の量は 14% と、培養スケールが変化することによる物理的な条件が変化したことによる影響からか、前述の試験管レベルでの試験結果と比較してより少ない値であった。ただ、*E. gracilis* が増殖期でほとんどパラミロンを蓄積しないのと比較して、*E. anabaena* では依然としてパラミロンの蓄積は多かった。

培養液の設計に酢酸を用いることについては、コスト面や品質面において課題があるものの、食品産業などで発生される副産物の液体などを活用し、かつ雑菌などのコンタミネーションの抑制方法を確立すれば、パラミロンの生産を効率的に行うことができるという可能性の一部が示唆された。

3 章

ユーグレナ含有成分パラミロンのフィラーとしての機能性

3章 ユーグレナ含有成分パラミロンのフィラーとしての機能性

【3.1.】 序

パラミロン (paramylon) は、約 700 個のグルコースが β -1, 3-結合により重合した高分子 (β -1, 3-グルカン) であり、微細藻類ユーグレナが含有する貯蔵多糖である (R. Marchessault et al., 1979)。パラミロン粒子は、扁平な回転楕円体粒子であり、 β -1, 3-グルカン鎖がらせん状に絡まった結晶構造を形成している。さらに、パラミロン粒子は多孔質であり、吸油性および吸水性を示すことから親水性材料および親油性材料のいずれに対しても親和性を有するバイオベースマテリアルと考えられる。

これまでパラミロンは、その高次構造や物性に起因する生理活性に注目が集まり、機能性食品等に利用されてきた。その一方で、フィルム、化粧品粉体として用途なども期待されてきた(宮武ら, 1995)。しかしながら、樹脂やゴムの特性を向上させるフィラーとしての研究に関しては、実用化に資する研究はなかった。

フィラーは、物性改善や機能性付与のために添加される充填剤の総称である。現在、樹脂およびゴム等の特性 (例えば、寸法安定性、耐衝撃性、機械的強度) を改善するために様々な種類のフィラーが用いられている。地球環境の保全および資源の枯渇防止といった環境問題への対策が重要視されるに伴って、生物由来のフィラーを用いる試みがなされている。例えば、木材または綿花から得られる天然セルロースを原料として製造されるセルロース粒子またはセルロース繊維がフィラーとして用いられている (E. Fernandes, 2004)。

このように市場においては、環境負荷が少なく、製造効率が高く、かつ優れた物質特

性改善効果を有するフィラーが求められている。そこで本研究では、ユーグレナが含有する特異成分であるパラミロンに着目し、フィラー素材として汎用樹脂であるポリプロピレンの機械物性（強度、曲げ弾性率）の機能向上の可能性について検証した。

【3.2】 実験方法

<3.2.1> 試料

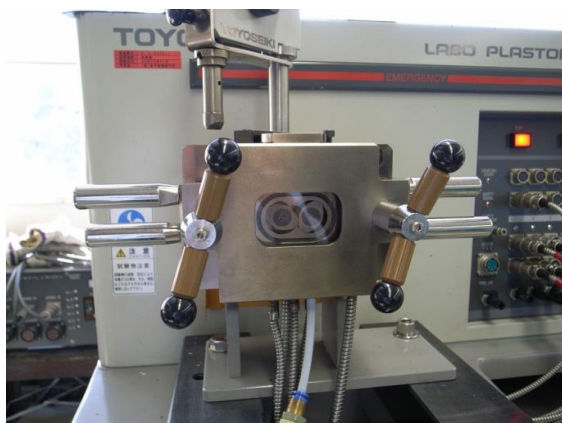
試料として用いるパラミロン粒子は、一般的な *E. gracilis* の乾燥物であるユーグレナグラシリス粉末（(株) ユーグレナ社製）から抽出した。ユーグレナ粉末を水に懸濁し、超音波（トミー精工社製、UD201）で細胞破碎処理を 10 分間行った後、1 mass % の SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）溶液、95 °C の条件になるように調製して 1 時間攪拌しながら処理をした。その後、遠心分離（3000 g, 15 分）を行い、沈殿物を蒸留水で水洗し、アセトンで脱脂を行った後に乾燥し、グラインダーにかけ、パラミロン粒子を得た。対照フィラー素材としてセルロース粒子（日本製紙ケミカルズ製セルロースパウダーKC・フロック 100G）を用いた。

<3.2.2> ポリプロピレン (PP) との混合体の作製

母材としての PP 樹脂（日本プロピレン社製、ノバテック P P）100 部（部は重量比を示す単位で、以後注記なしで使用）、上記パラミロン粒子 10 部または 20 部あるいはセルロース粒子 10 部、および相溶化剤としてのマレイン酸変性低分子量 PP 樹脂（三洋化成社製、ユーメックス 1010、酸価 52）5 部を、密閉式混練機（東洋精機社製、ラボプラストミル）を用いて、220 °C、120 rpm で 5 分間混練し、混合体を得た。用いた密閉式混練機を図 3-1 に示す。なお、PP 樹脂、パラミロン粒子およびセルロース粒子はいずれも、110 °C で 20 時間減圧乾燥した後、実験に用いた。

この混合体を真空ホットプレス（テスター産業製、SA-401-A）を用いて、真空度 760 mmHg において、220 °C、プレス圧 500 MPa、1 分間加圧し、その後鉄板上に移して急冷し、シート状成形体を得た。物性評価に際しては、これを所定のサイズに切断して用いた。

(a)



(b)



図 3-1. 密閉式混練機の写真

- (a) 東洋精機製作所製ラボプラストミル (4M150) の全体写真
- (b) ミキサー内部の小型セグメントミキサ (KF15V)

<3.2.3> 混合体の物性評価

得られた混合体の曲げ試験を微細 3 点曲げ試験機 EZGraph-10kN（島津製作所）にて行った。試験の様子を図 3-2 に示す。曲げ強度試験片のサイズ=10 mm×10 mm、曲げ支点間距離=4 mm、圧子押し込みの試験速度=0.5 mm/分に設定し、膜厚はマイクロメータにて試験片ごとに測定した。試験片の膜厚は 0.2 ± 0.02 mm であった。測定環境は 25 °C、52%RH であった。

(a)



(b)

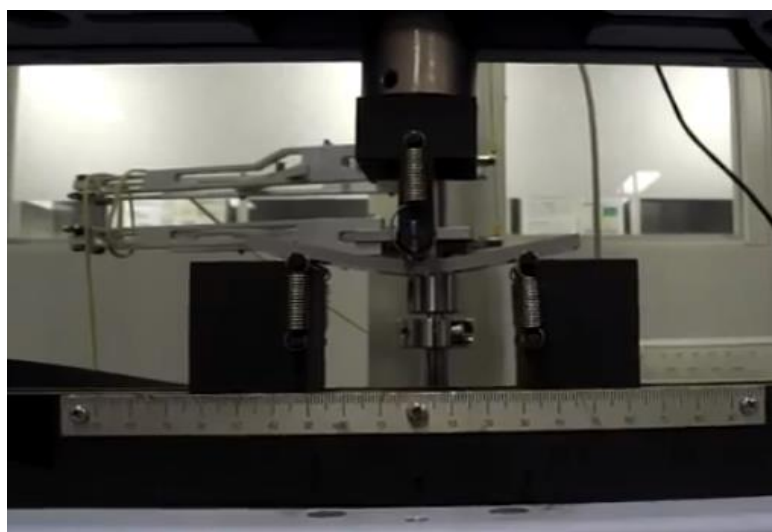


図 3-2 微細 3 点曲げ試験機 EZGraph-10kN の運転の様子
(a) 運転時の様子
(b) 一般的なサンプル片が大きいケースの試験イメージ

【3.3】 結果と考察

<3.3.1> フィラーとしての適性評価

図 3-3 に得られたパラミロン粒子の走査電子顕微鏡写真を示す。パラミロン粒子の長径は 1~6 μm 、アスペクト比は 2~4 と見積もられ、既報(宮武ら, 1995)の値と大差はなかった。

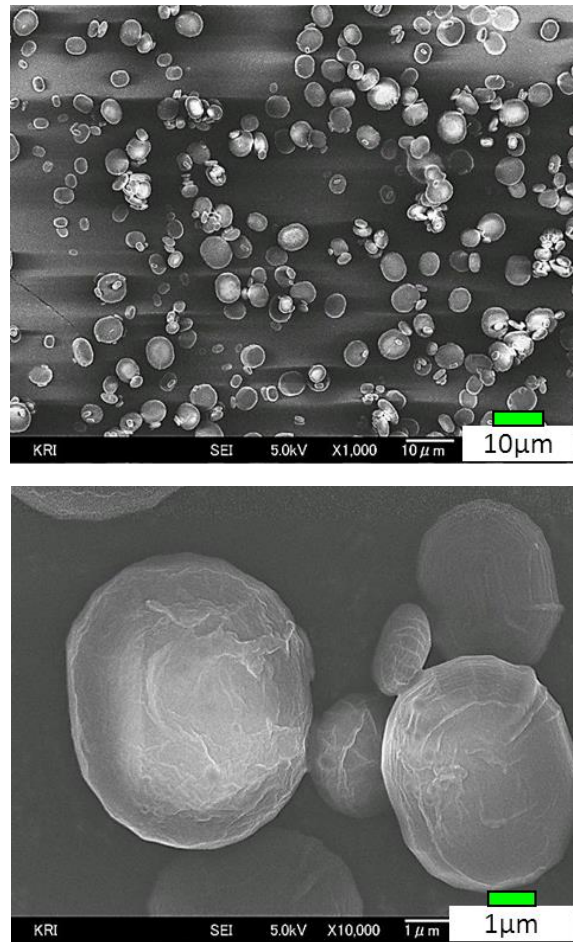


図 3-3 電子顕微鏡 SEM で撮影されたパラミロンの写真

粉末状の PP 及びパラミロンを用いて、熔融混練法で PP/パラミロン混合体を調製し、シート状に成形して観察を行った。その結果、相溶化剤の存在下では、母材の PP 量を 100 部としてパラミロン添加量を 10~20 部としても、凝集物がほとんど存在しないことが確認された。また、パラミロン 20 部を添加した場合、相溶化剤を添加しなかった場合においてもほとんど凝集物はないことが観察された。図 3-4 にそのシートの外観の写真を示す。凝集物が見られる場合は不均質な凝集物の局在が目視で認められるが、今回のサンプルにおいては凝集物が見られず均一分散していた(図上部黒色背景参照)。また、大きな着色もなかった(図下部白色背景参照)。一般的に、PP にはタルク等の無機化合物がフィラーとして添加される。これら極性無機化合物は表面吸水性が高く凝集しやすいため非極性樹脂への均一分散が困難である。そのため、表面修飾を施す必要があり、シランカップリング剤や脂肪酸などで処理された極性無機化合物が使用される。水酸基による極性表面を有するパラミロン粒子が上記のような表面処理することなく PP 中に均一分散したことは、パラミロン特有の多孔質構造と親水性・親油性を併せ持つ特性が影響していると考えられる。実際に、3.0 g のパラミロンは 1.6 ml のアマニ油を吸収することができる(宮武ら, 1995)。この吸油性を示す親油的特性が PP との親和性に関連し、PP 中での均一分散に繋がっていると推定される。一方、図 3-5 に示すように、セルロース粒子を用いて混合体シートの形成を試みたものの、セルロースは母材に対して目視でも明らかに凝集物が見られ均質な混合体を得ることができなかった。ここで用いたセルロース粒子は不定形の形態で数十 μm の大きさを持ち、パラミロン粒子よりもやや大きい。分散性は形態の差異とは考えにくい。なぜなら、PP が疎水性であるのに対してセルロースは親水性であるため PP 中ではセルロースが凝集しやすく、

高分散化が非常に難しいからである(W, Qiu et al., 2005)。その理由として、セルロースは分子中に親水部位と疎水部位が局在しているが、親水部位だけが表面を形成した場合、その表面張力は有機高分子の中で最も親水性の高い 42m N/m であり(磯貝, 2003)、PP 中ではセルロース粉末が凝集体を形成し易いことが考えられる。従って、これらのことより多糖の中でもパラミロンは、非極性樹脂の PP に良好に分散する特徴的な性質を有することが示された。

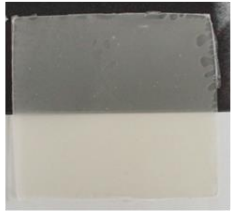
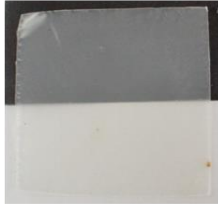
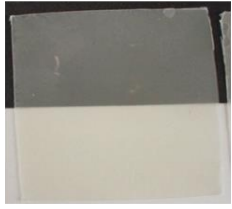
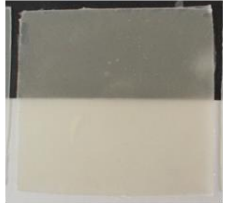
パラミロン 相溶化剤	なし	10部	20部
なし			
ユーメックス 1010 5部			

図 3-4 パラミロンを配合したポリプロピレン複合体の写真

黒字の背景で白い濁りは見えず、白い背景では色のついた濁りが認められず、均一に分散していることが確認できる

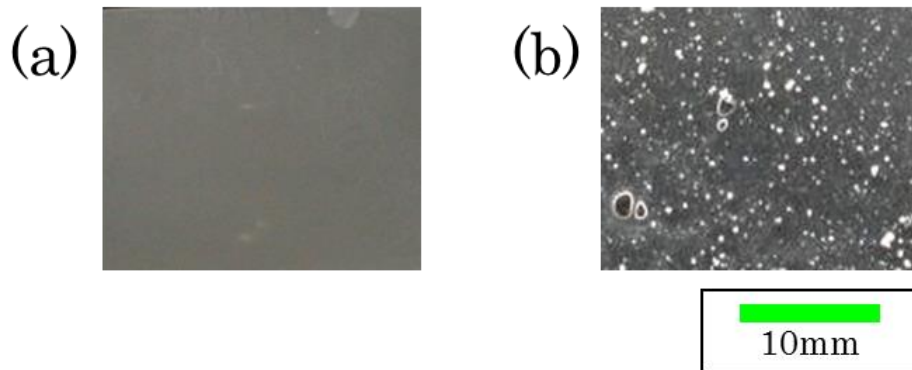


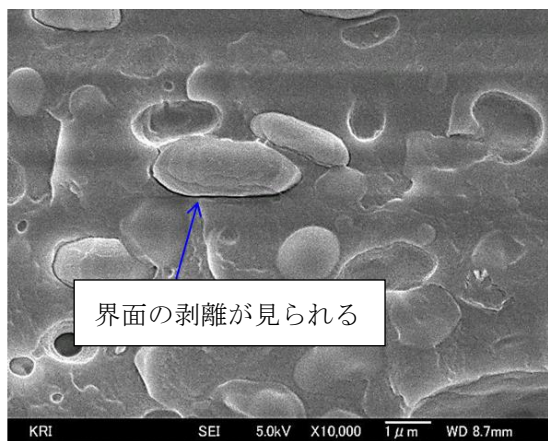
図 3-5 複合体シートの写真

- (a) パラミロンを 10 部添加したポリプロピレン複合体
- (b) セルロースを 10 部添加したポリプロピレン複合体

図 3-6 に、PP/パラミロン混合体の破断面の走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真を示す。パラミロンと PP だけで混練した場合 (図 3-6-A)、両者の界面に剥離が観察された。このことは、両素材間で密着性が不十分であることを示している。パラミロン 20 部添加の条件下では外観としては十分な分散性を示すものの、微細スケールで素材間の密着性を高めるためには相溶化剤の添加が必要であることがわかった。相溶化剤としてマレイン酸変性低分子量 PP 樹脂を少量添加して同様に混練した場合 (図 3-6-B)、界面の剥離が観察されず、密着性が良好であった。この密着性の向上は、相溶化剤樹脂中のカルボン酸とパラミロンの水酸基の強い相互作用によるものと推測される。

高分子マトリックスへのパラミロン粒子の分散性について確認するために、母材として、ポリ乳酸 (帝人社製、レイシア 100) を用い同様に混合体の作製を行ったところ、凝集物が確認されず、パラミロン粒子が均一に分散した混合体を成形することができた。このことは、極性樹脂から非極性樹脂まで広範囲の樹脂に対してパラミロン粒子が良好な分散性を示す可能性を示唆している。

(A)



(B)



図 3-6 電子顕微鏡 SEM で撮影されたパラミロン 20 部を加えたポリプロミレン複合体の写真

(A) 相溶加材なしのサンプル

(B) 相溶加材を添加したサンプル

<3.3.2> フィラーとしての機能性の評価

混合体のフィラーとしての適性を評価するため、PP/パラミロン混合体の曲げ強度試験を行った。一例として、パラミロン 10 部を添加した混合体の曲げ応力-曲げひずみ曲線を図 3-7 に示す。混合体は塑性変形を示した。この曲げ応力-曲げひずみ曲線の曲げ応力 5-10 Mpa における傾き（図中の直線）から曲げ弾性率（図 3-8）、降伏点におけるひずみ（図 3-9）および降伏点における応力（図 3-10）を求めた。なお、曲げによる亀裂は降伏点以降に発生していることを目視により確認した。

図 3-8 に示すように、パラミロンを 10 部添加した際は無添加の場合に比べて混合体の曲げ弾性率が 1.15 倍に、20 部添加した場合は 1.30 倍に増加した（相溶化剤を添加しない場合は、1.15 倍）。これは市販の有機化雲母の 5mass % 添加の場合において曲げ弾性率が 1.3 倍程度なので、同等程度の特性と見える(W, Lertwimolnun et al., 2005; 植村ら, 2008)。パラミロン粒子は同じ添加量では曲げ弾性率向上効果は有機化雲母に劣る。しかし、パラミロンにはフィラーとして表面処理することなしに大量添加できるという利点がある。

図 3-9 に示すように、混合体の降伏点におけるひずみはパラミロン 10 部添加の場合には無添加の場合に比べて 0.96 倍に、20 部添加の場合は 0.88 倍に減少した。図 3-10 に示すように、混合体の降伏点における応力は、パラミロン 10 部を添加した際は無添加の場合に比べて 1.08 倍に、20 部添加の際は 1.13 倍に増加した。図 3-8 から図 3-10 の結果から、パラミロン添加量の増加とともに混合体の曲げ強度が向上していることが確認され、パラミロンがフィラーとして機能していることが示唆された。一般的にフィラーを添加すると曲げ弾性率は向上し、降伏点におけるひずみは減少する(A. Sanadi et al., 1995)。パラミロン粒子添加においても同様の挙動を示し、10 から 20 部添加して

も混合体は脆くなる傾向をあまり示さず、曲げ弾性率の向上により曲げ強度が改善された。

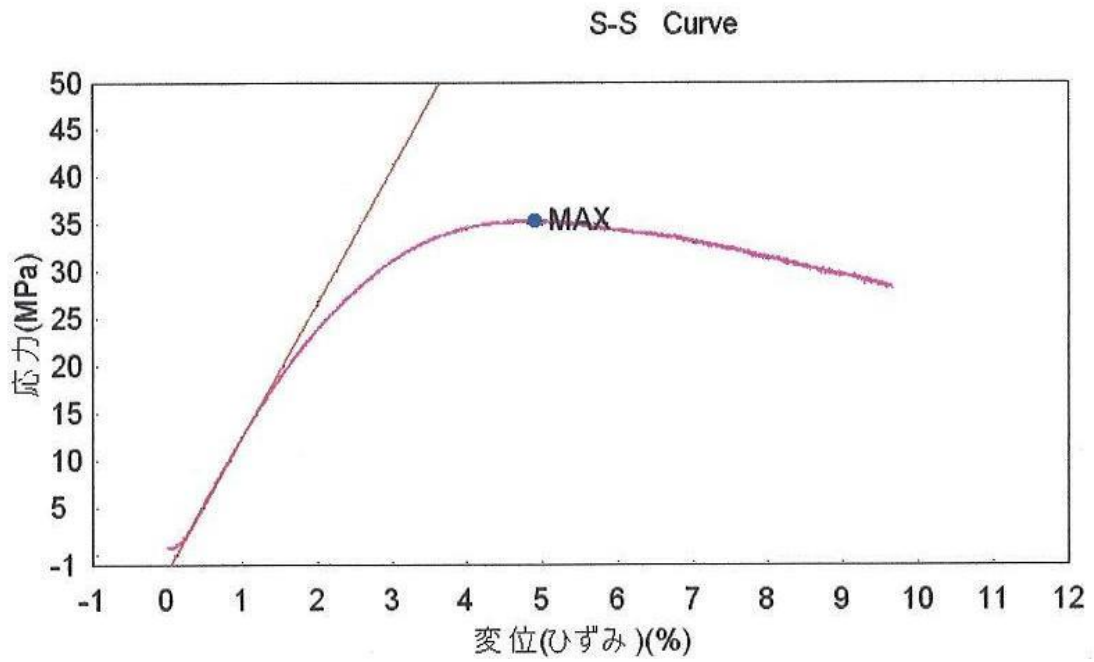


図 3-7 パラミロン 20 部、ユーメックス 5 部添加したパラミロン複合体における応力-ひずみ線図

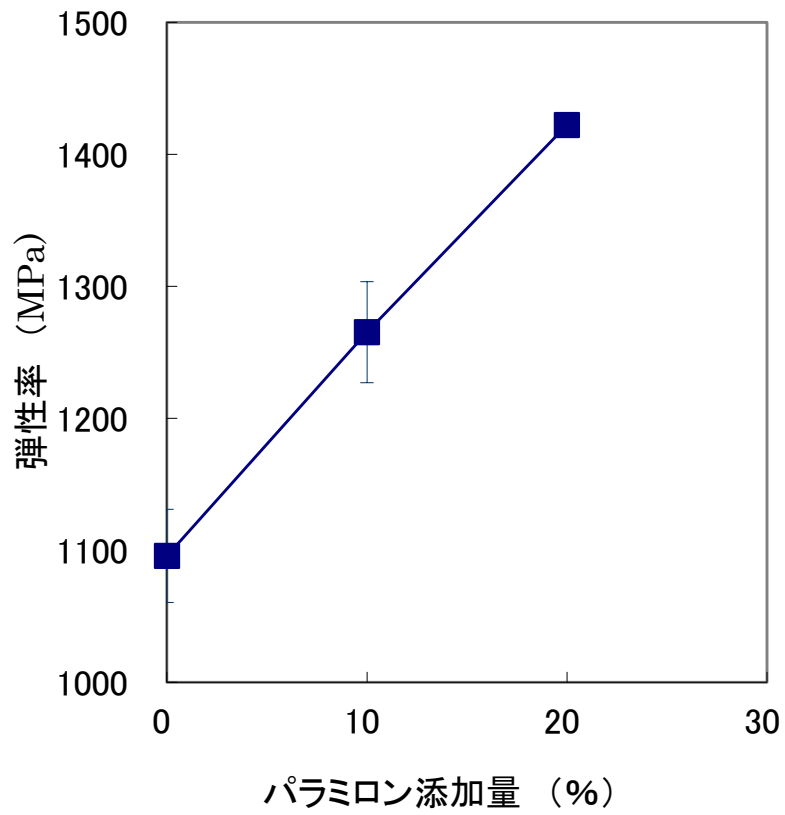


図 3-8 パラミロンの添加量と弾性率の関係

パラミロンの添加量ごとにそれぞれ計測を 3 回試行して平均値をプロットし、SEM をスケールバーで示す。

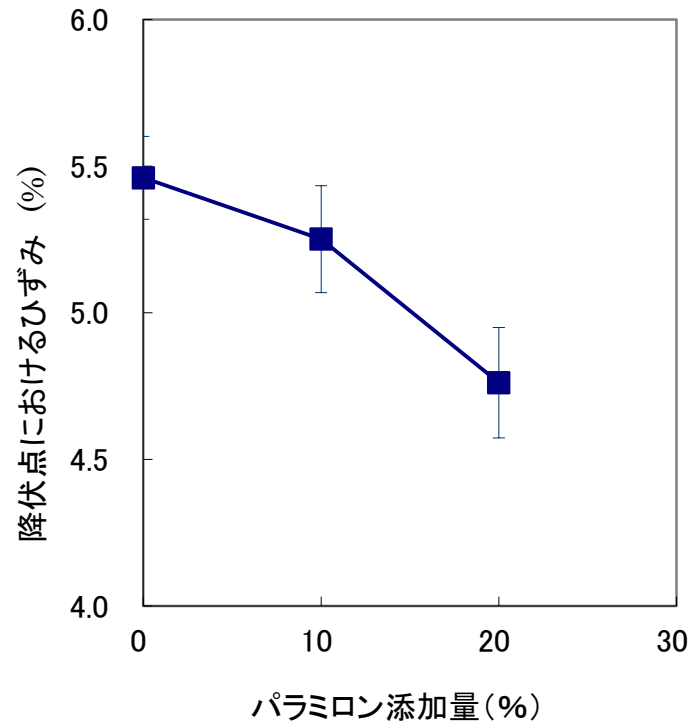


図 3-9 パラミロンの添加量と降伏点におけるひずみの関係性

パラミロンの添加量ごとにそれぞれ計測を 3 回試行して平均値をプロットし、SEM をスケールバーで示す。

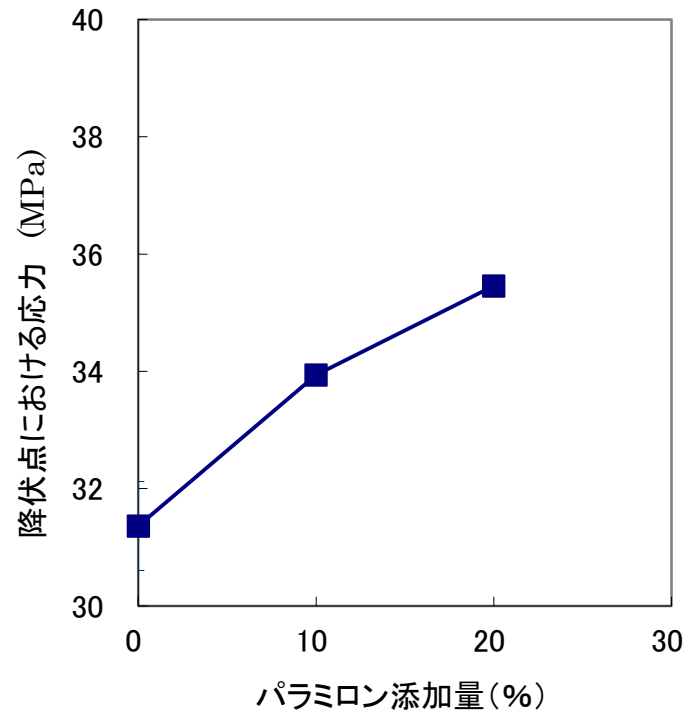


図 3-10 パラミロンの添加量と降伏点における応力の関係性

パラミロンの添加量ごとにそれぞれ計測を 3 回試行して平均値をプロットし、SEM をスケールバーで示す。

強度向上効果は、従来の無機フィラーと比較して同等レベルではあるが、合成樹脂の特性を改善すると同時に天然由来有機材料を大量に添加できることは注目に値する。近年、環境問題から合成樹脂に天然由来のバイオプラスチックを混合する試みが盛んに行われ、バイオプラスチック比率を上げるために特別な工夫がなされている。パラミロン粒子は、ベースとなる樹脂の特性を低下させずに、また特別な表面処理をすることなしに大量混合できる可能性があることが本研究から示された。

【3.4】 総括

従来の無機フィラーよりも環境負荷の少ない有機フィラーとして天然資源由来のフィラーが望まれている。その一例としてセルロースがあるものの、母材によっては分散性が悪く、混合体を形成することすら困難である。天然物由来の多糖でありながら固有の物性を有するパラミロンに着目し、フィラーとしての物性を検証した。その結果、パラミロンの添加率の上昇に伴い、曲げ弾性率が向上する一方、降伏点におけるひずみは減少し、降伏点における応力が向上することを明らかにした。これらの結果は、パラミロンのフィラー素材としての新たな可能性を示唆するものである。

4 章

総合考察

4章 総合考察

ユーグレナの生産とその利用に関しては多様な可能性があり、地球上の物質循環の担い手となることで持続型社会に寄与することが期待されているものの、コスト面や生産方法などを中心に、いまだ議論・検証の余地がある。その中で、生産物としてのユーグレナに高い付加価値を見出して市場を開拓しつつ、事業を持続可能な形で進めることは、ユーグレナ関連の生産技術の確立と習熟を行うと同時に、将来のエネルギー・環境技術としての市場へ展開する際の基盤を形成することにつながる。

ユーグレナに由来する生産物の産業利用についての方向性は、「バイオマスの5F」に則り段階的に検討することで、持続可能な形で事業化の実現が可能である(図4-1)。「バイオマスの5F」とは、重量単価(例:1kgあたりの値段)が高い順からFood(食料)、Fiber(繊維)、Feed(飼料)、Fertilizer(肥料)、Fuel(燃料)の各分野へ展開することを指しており、現在は、一番価格が高いFood(食料)を主として食品の事業化が達成されている。本研究で着目したパラミロンは、その素材の持つ特殊性から様々な工業製品への利用可能性が考えられる。そのため、パラミロンの効率生産、および産業利用が明確にイメージできるパラミロン応用例を示したことは、事業化戦略を次の階層へ進めるためのマイルストーン的な成果であると考えられる。

2章では *E. anabaena* が既存の *E. gracilis* に比べてパラミロン生産プロセスがより簡素化できる可能性を示した。今後の検討項目として屋外での培養実証試験、パラミロン抽出・精製プロセスの効率化など産業化を目指した課題が挙げられる一方で、なぜ *E. anabaena* が他のユーグレナと違って対数増殖期にパラミロンを高蓄積することが

可能なのか、遺伝子発現プロファイルを種ごとに比較してみるなど、学術的な興味も尽きないところである。本成果をもとにして、今後も産業応用、基礎研究両面において更なる発展が期待される場所である。

3章ではパラミロンのフィラーとしての物性を検証し、従来の無機フィラーよりもポリプロピレンの機械物性を向上させることを明らかにした。本成果によって、「バイオマスの5F」における2番目のF、Fiber（繊維）の事業化に向けた実際的な応用例を示すことができた。本研究第2章の発展研究によって *E. anabaena* の培養方法、パラミロン抽出・精製プロセスの効率化が達成されることで、環境負荷が少なく、かつ優れた特性改善効果を有するバイオマテリアルとしてパラミロンを市場に対し安定供給することが可能になると期待される。

本論文では、ユーグレナのパラミロンの利活用の可能性を中心に触れたが、生物としての特徴については未だ学術的にも明らかにされていない部分が多く、代謝系を中心に解明していく余地が存在する。一部、ユーグレナのパラミロン分解酵素についての研究が進捗していることや(Takeda et al., 2015)、脂質代謝に関するトランスクリプトーム解析なども進んでいることなどから(O'Neill et al., 2015)、産業に資する研究の基礎的な知見のプラットフォームが整備されつつある。

今後、生物としてのユーグレナがそもそも有するポテンシャルが環境技術へ応用できる可能性が世の中に認知されるとともに、パラミロンが有用性の確認された環境に配慮した素材の一つという認識で世の中に普及することが期待される。

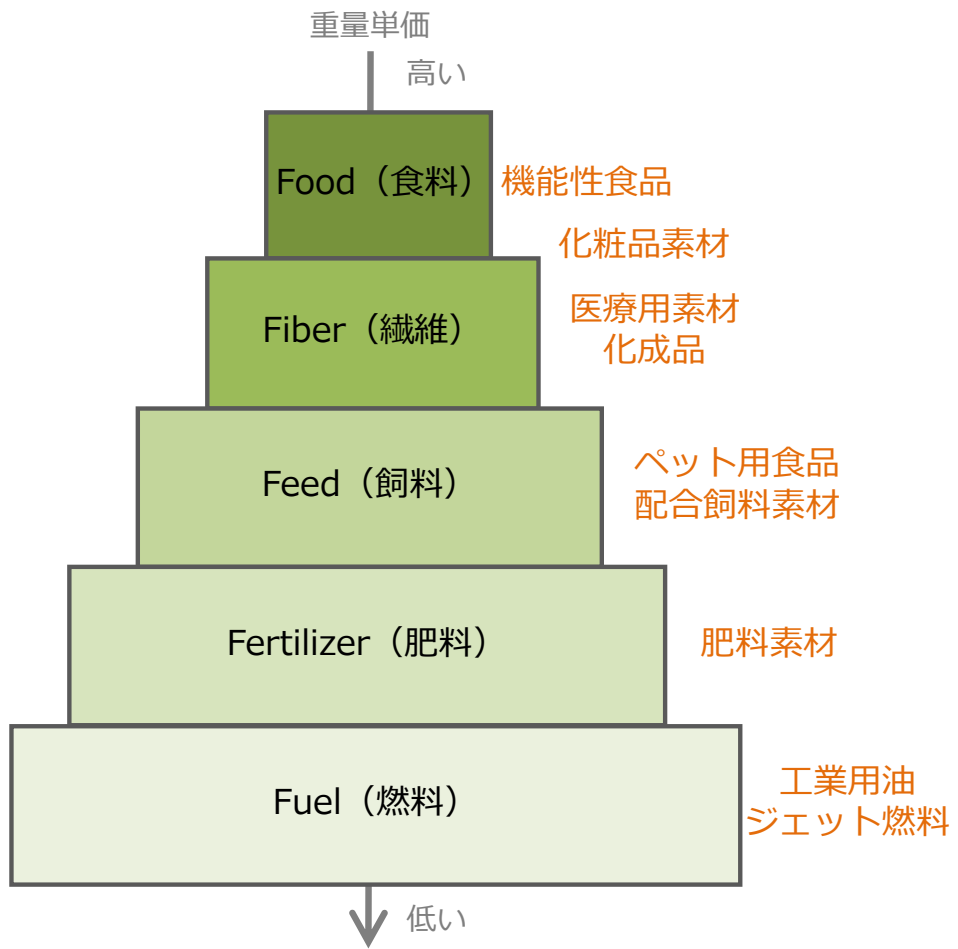


図 4-1 バイオマスの 5 F についての概念図

参考文献

第1章

- A. Sugiyama, K. Suzuki, S Mitra, R. Arashida, E. Yoshida, R. Nakano, Y. Yabuta and T. Takeuchi, “Hepatoprotective Effects of Paramylon, a β -1, 3-D-Glucan Isolated from *Euglena gracilis* Z, on Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Rats”, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 71(7), p885-890, (2009)
- A. Sugiyama, S. Hata, K. Suzuki, E. Yoshida, R. Nakano, S. Mitra, R. Arashida, Y. Asayama, Y. Yabuta and T. Takeuchi, “Oral Administration of Paramylon, a β -1,3-D-Glucan Isolated from *Euglena gracilis* Z Inhibits Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice” *The Journal of Veterinary Medical Science*, 72(6), p755-763, (2010)
- E. Korn, “The fatty acid of *euglena gracilis*”, *Journal of Lipid Research*, 5, p352-362, (1964).
- G. S. Jensen, D. I. Ginsberg, and M. S. Drapeau, “Bluegreen algae as an immunoenhancer and biomodulator” *J. Am. Nutraceutical Assoc.*, 3, p24–30 (2001).

- K. Miyatake and S. Kitaoka, “Comparison of the Methods for Determining Degree of Polymerization of Water-Insoluble β -1, 3-Glucans”, *Bulletin of the University of Osaka Prefecture. Ser. B, Agriculture and Biology* 35, p55-58, (1983).

- M. A. Borowitzka, “Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters”, *J. Biotechnol.*, 70, p313–321, (1999).

- M. Cramer and J. Myers, “Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*” *Archiv fur Milrobiologie*, 17, S.383-402, (1952).

- N. Koizumi, H. Sakagami, A. Utsumi, S. Fujinaga, M. Takeda, K. Asano, I. Sugawara, S. Ichikawa, H. Kondo, S. Mori, K. Miyatake, Y. Nakano, H. Nakashima, T. Murakami, N. Miyane and N. Yamamoto, “Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of sulfated paramylon”, *Antiviral Research*, 21(1), p1-14, (1993).

- P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert, “Commercial applications of microalgae”, *J. Biosci. Bioeng.* 101(2), p87-96, (2006).

- V. H. Lynch and M. Calvin, “CO₂ fixation by *Euglena*”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 56(5), p890-900, (1953).

- W. Becker, “Microalgae in human and animal nutrition”, In Richmond, A. (ed.), *Handbook of microalgal culture*. Blackwell, Oxford, p. 312–351, (2004).
- 嵐田亮, 「微細藻類ユーグレナの特徴と食品・環境分野への応用」, *南方資源利用技術研究会誌*, 26(1), p19~22, (2010).
- 北岡正三郎, 「ユーグレナ—生理と生化学」, (1989)
- 北岡正三郎、細谷圭助, 「*Euglena gracilis* タンパク質の栄養価決定のための培養条件の検討と細胞の一般成分およびアミノ酸組成」, *日本農芸化学会誌*, 51(8), p477-482, (1977).
- 河野裕一、中野長久、北岡正三郎、加藤清、重岡成、大西俊夫, 「ラットにおける[14C] コレステロールの吸収、体内移行に及ぼすユーグレナ (*Euglena gracilis* z) の影響」, *日本栄養・食糧学会誌* *日本栄養・食糧学会誌*, 40(3), p193-198, (1987).
- 近藤 次郎, 「K プロジェクト:CO₂ の生物固定による食糧生産」, *環境科学会誌*, 9(3), p417-426, (1996).
- 鈴木健吾、中野良平、足立秀行, 「微細藻類ユーグレナの特徴と用途」, *Japan energy & technology intelligence*, 60(7), p30-32, (2012).

- ・ 園田頼和、清古義雄、風袋則夫、村上利雄、「石油酵母培養廃水の活性スラッジ処理およびスラッジ抽出液の利用：炭化水素からの菌体生産(第3報)」, *醗酵工学雑誌*, 51(7), p484-488, (1973).

- ・ 田宮博、「クロレラの発育生理(同調培養による研究)」, *生化学*, 27, p1, (1955)

- ・ 田宮博、「緑色細胞の発育生理(同調培養による研究)」, *細胞化学シンポジウム*, 6, 1, (1957)

- ・ 中野長久, 「ユーグレナ細胞の多機能性とその応用」, *FOODS & FOOD INGREDIENTS JOURNAL OF JAPAN*, 159, p72, (1994).

- ・ 宮武 和孝、竹中 重雄、山地 亮一、中野 長久, 「原生動物の作り出すバイオ粒子, パラミロンの性質と利用」, *粉体工学会誌*, 32(8), p566-572, (1995).

第2章

- D. E. Buetow, “The Biology of Euglena”, Vols. I & II, *Academic Press*, New York, (1968).

- D. E. Buetow, “The Biology of Euglena”, Vol. III, *Academic Press*, New York, (1982).

- D. E. Buetow, “The Biology of Euglena”, Vols. IV, *Academic Press*, New York, (1989).

- D. S. Gorman and R. P. Levine, “Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 54(6), p1665–9, (1965).

- D. Halter, J. Andres, F. Plewniak, J. Poulain, C. Da Silva, F. Arsène-Ploetze, and P. N. Bertin, “Arsenic hypertolerance in the protist *Euglena mutabilis* is mediated by specific transporters and functional integrity maintenance mechanisms”, *Environ. Microbiol.*, 33, (2014)

- E. G. Pringsheim, “Contributions towards a monograph of the genus *Euglena*”, (1956).

- E.I. Rabinowitch, “Photosynthesis and Related Processes”, *Interscience*, New York,

(1956).

- F.E. Round, “The Biology of Algae”, *Edward Arnold*, London, (1965).
- G.F. Leedale, “The Euglenoid Flagellates”, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, (1967).
- H. Nozaki, M. M. Watanabe, and K. Aizawa, “Morphology and paedogamous sexual reproduction in *Chlorogonium capillatum* sp.”, *J. Phycol.*, 31(4), p655–663, (1995).
- J. B. Waterbury and R. Y. Sranier, “Isolation and growth of cyanobacteria from marine and hypersaline environments”, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p221–223, (1981).
- J.J. Wolken, “Euglena”, *Rutgers Univ. Press*, New Brunswick, New Jersey, (1961).
- L. E. Koren and S. H. Hutner, “High-yield media for photosynthesizing *Euglena gracilis* Z,” *J. Protozool.*, (1967).
- M. Gojdics, “The Genus *Euglena*”, *Univ. of Wisconsin Press*, Madison, Wisconsin, (1953).

- M. Grung and S. Liaaen-Jensen, “Algal carotenoids 52; secondary carotenoids of algae 3; carotenoids in a natural bloom of *Euglena sanguinea*”, *Biochem. Syst. Ecol.*, 21(8), p757–763, (1993).

- M. Cramer and J. Myers, “Growth and photosynthetic characteristics of *euglena gracilis*.”, *Archiv für Mikrobiologie.*, 17(1–4), p384–402, (1952).

- R. H. Marchessault and Y. Deslandes, “Fine structure of (1→3)- β -d-glucans: curdlan and paramylon”, *Carbohydr. Res.*, 75, p231-242, (1979)

- S.H. Hunter and A. Lwoff, “Biochemistry and Physiology of Protozoa”, Vol. II, *Adademic Press*, New York, (1955).

- S. H. Hutner, L. Provasoli, E. L. R. Stokstad, C. E. Hoffmann, M. Belt, A. L. Franklin, and T. H. Jukes, “Assay of Anti-Pernicious Anemia Factor with *Euglena*.”, *Exp. Biol. Med.*, 70(1), p118–120, (1949).

- S. Kato, “Laboratory culture and morphology of *Colacium vesiculosum* Ehrb. (Euglenophyceae)”, *Jpn J Phycol*, 30, p63–67, (1982).

- T. Ichimura, “Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction

of *Closterium strigosum*", *Proc. Seventh Int. Seaweed Symp.*, p208–214, (1971).

第3章

- A. Sanadi, D. Caulfield, R. Jacobson and R. Rowell, “Renewable Agricultural Fibers as Reinforcing Fillers in Plastics: Mechanical Properties of Kenaf Fiber–Polypropylene Composites”, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 34, p1889-1896, (1995).

- E. Fernandes, M. Pietrini and E. Chiellini, “Bio-based polymeric composites comprising wood flour as filler”, *Biomacromolecules*, 5, p1200–1205, (2004).

- R. Marchessault and Y. Deslandes, “Fine structure of (1,3)-b-D-glucans: Curdlan and paramylon.” *Carbohydrate Research.*, 75, p231-242, (1993).

- W. Lertwimolnun, B. Vergnes, “Influence of compatibilizer and processing conditions on the dispersion of nanoclay in a polypropylene matrix”, *Polymer*, 46, p3462–3471, (2005).

- W Qiu, F Zhang, T Endo and T Hirotsu, “Isocyanate as a compatibilizing agent on the properties of highly crystalline cellulose/polypropylene composites”, *Journal of Materials Science.*, 40, p3607– 3614, (2005).

- 磯貝 明, 「セルロースの科学」, p162, (2003).

- ・ 植村 哲、安田 則彦、木村豊恒、足立茂寛、「ナノフィラーによるポリオレフィン系樹脂の耐熱・高強度化(第1報)」, *奈良県工業技術センター 研究報告* 34, p1-4, (2008).
- ・ 宮武 和孝、竹中 重雄、山地 亮一、中野 長久、「原生動物の作り出すバイオ粒子 パラミロンの性質と利用」, *粉体工学会誌*, 32(8), p566-572, (1995).

第4章

- T. Takeda, Y. Nakano, M. Takahashi, N. Konno, Y. Sakamoto, R. Arashida, Y. Marukawa, E. Yoshida, T. Ishikawa, K. Suzuki, “Identification and enzymatic characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Euglena gracilis*” *Phytochemistry*, 116, p21-27, (2015).
- E. C. O'Neill, M. Trick, L. Hill, M. Rejzek, R.G. Dusi, C. J. Hamilton, P. V. Zimba, B. Henrissat, R. A. Field, “The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry”, *Mol Biosyst.*, 11(10), p2808-20, (2015).

謝辞

本論文の構成についての相談からご審査までいただき、多くの助言を与えていただきました東京大学の太政謙次先生に深く感謝いたします。また、本論文の審査に携わっていただいた石川孝博先生、芋生憲司先生、大下誠一先生、渡部終五先生に感謝を申し上げます。

本研究の遂行におきましては、ユーグレナ研究会の会長を務められた経験のある大阪府立大学の中野長久先生、会長の重岡成先生には有益な助言をいただき、ここに感謝申し上げます。他にも本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたって、多くの先生方と企業の方からのご支援とご指導を賜りました。学術的な考察を適切に行うことの試行を行うことができたことは、私の今後の努力の糧になるものであります。

これまで自分の考えを一つの形にすることに対して、温かく見守りそして辛抱強く支援して下さったことに対して深い感謝の意を表して謝辞と致します。