

論文の内容の要旨

生物・環境工学専攻

平成 18 年度博士課程進学

鈴木 健吾

指導教官：大政謙次教授

論文題目：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

【1. 本研究の背景】

微細藻類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、関連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。

そこで本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、パラミロンの生物素材としての利用可能性を探ることとする。

【2. 新奇ユーグレナ種のパラミロン生産への利用の試み】

<目的>

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（ $\sim 30^{\circ}\text{C}$ ）で良好な増殖を示し、 $\text{pH}2.5 - 3.5$ の低い pH で増殖可能であることが大きく寄与する。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。特に、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* 以外の種でも大量培養が成功すればパラミロン生産に利用できる種が存在すると思われる。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った。

<結果と考察>

E. gracilis 以外のユーグレナ種として、*E. anabaena* var. *minor* Mainz、*E. clara*、*E. deses*、*E. granulate*、*E. schmitzii*、*E. stellata*、*E. agilis* の 7 種の検討を行っ

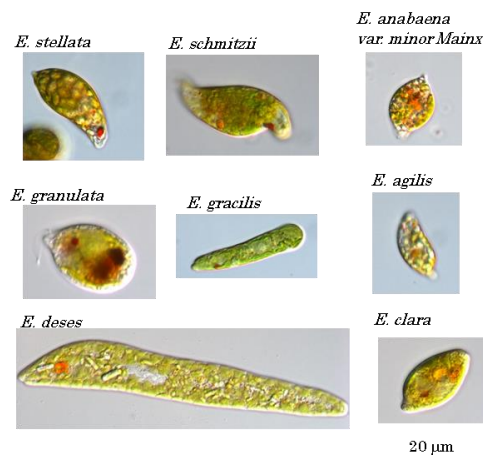


Fig. 1. 本研究で扱った各種ユーグレナの顕微鏡像。

た (Fig. 1)。各種ユーグレナを藻類培養において汎用的な培地を含め古来より *E. gracilis* の培養に用いられてきた基本的な培地 (AF6、BG-11、C、TAP、mAC、CM、KH) を用いて増殖試験を実施した。結果として、*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。一方で、*E. gracilis* 以外の種はそれぞれ C 培地で良好な増殖を示した。そこで、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で比較した (Fig. 2)。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. anabaena* の増殖が比較的速いことが分かった。

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。そこで、*E. anabaena* の培養特性をより詳細に調査するために、*E. anabaena* の培養至適温度条件を検討した (Fig. 3)。その結果、23°C、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増殖が抑制され、大部分が死滅、もしくはシスト化した。

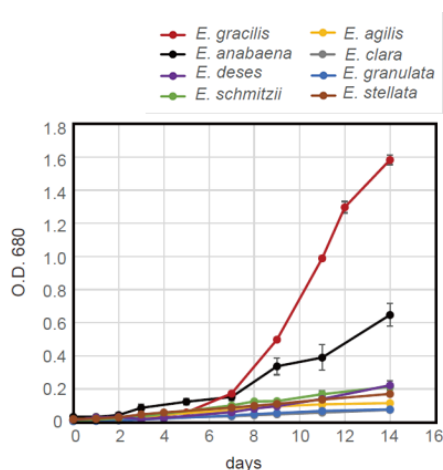


Fig. 2. 各種ユーグレナの増殖速度比較。各種ユーグレナの C 培地での増殖曲線と *E. gracilis* の CM 培地 (pH 3.5) での増殖曲線。

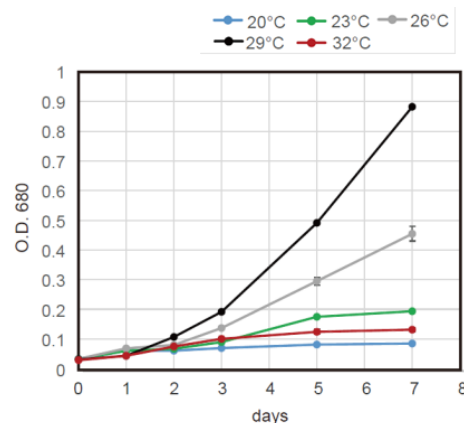


Fig. 3. 培養温度による *E. anabaena* の増殖曲線の変化。20°C、23°C、26°C、29°C、32°C での増殖曲線。エラーバーは SEM を示す。

このように、*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。

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* 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、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。そこで、*E. anabaena* パラミロン含量を定量した。*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。*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。

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 つの可能性が挙げられる。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培養を実施する必要があるが、*E. anabaena* をパラミロン生産に用いる場合にはその窒素制限のプロセスが省略可能となり、そのまま収穫可能であるため効率が良い可能性がある。

【3. 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】

<目的>

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。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、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。

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。

<結果と考察>

母材としての PP 樹脂 100 部、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（ユーメックス 1010）5 部を、密閉式混練機を用いて、220 $^{\circ}\text{C}$ 、120 rpm で 5 分間混練し、混合体を得た。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 $^{\circ}\text{C}$ 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を用いて、真空度 -760 mmHg において、220 $^{\circ}\text{C}$ 、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。

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 (Fig. 4)。その結果、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。これは市販の有機化雲母の 5mas %

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。また、混合体の最大曲げ応力点でのひずみ変化はパラミロン 10 部添加の場合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(Fig. 5)。さらに、混合体の最大曲げ応力は、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(Fig. 6)。これらの結果から、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、最大曲げひずみは減少する。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。以上のように、本研究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。

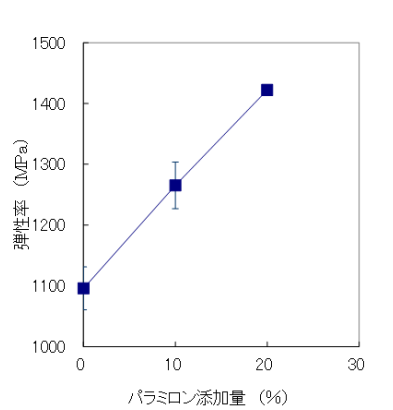


Fig. 4. パラミロンの添加量と弾性率の関係。

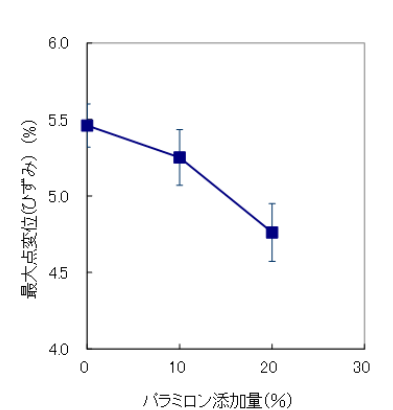


Fig. 5. パラミロンの添加量と最大点変位の関係性。

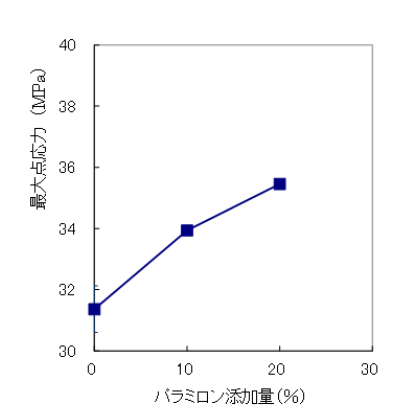


Fig. 6. パラミロンの添加量と最大点応力の関係。

【4. 総合考察】

2 章では *E. anabaena* が既存の *E. gracilis* と比較して増殖の性能とともにパラミロン産生の能力について検証を行った。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、パラミロンを利用した化学素材分野での事業化に向けた実際的な応用例を示すことができた。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。