

微細藻類 *Euglena gracilis* 3 株のバイオマス生産性 およびパラミロン含有率

出村 幹英*

(生物資源科学科 生命機能科学コース)

2020年1月16日 受理

Biomass productivity and paramylon content of 3 strains of *Euglena gracilis*

Mikihide DEMURA

(Applied Biochemistry and Food Science Course, Department of Bioresource Sciences)

Accepted January 16, 2020

Summary

Euglena gracilis (Euglenophyceae) produces paramylon, which has recently been demonstrated to have various medicinal effects. In this study, biomass productivity and paramylon content of 3 strains (NIES-47, NIES-48, NIES-49) of *E. gracilis* were investigated in autotrophic conditions. In addition, the cost of 1L-scale cultivation was calculated. The maximum biomass productivity of 0.103 ± 0.011 g/L/day was recorded for NIES-48. The maximum paramylon content of $6.68 \pm 1.09\%$ was also produced by the same strain. The estimated cost for 10 days of cultivation was 1123.8 yen/L. The optimal culture method should be determined from the relationship between biomass productivity, paramylon content, and total cost.

Key words: *Euglena*, paramylon, biomass productivity, cost

緒 言

ユーグレナ植物門ユーグレナ藻綱 *Euglena gracilis* は、主に淡水の湖沼や小さな水溜りに生息する単細胞性植物プランクトンである。細胞長は約 $50\mu\text{m}$ 程度でラグビーボールのような形態をしている。光合成を行う「植物」プランクトンであるが、1本の鞭毛運動による遊泳を行う。遊泳運動には、鞭毛基部に存在する光受容体の眼点に関連していると考えられる。また、細胞表面に「ペリクル」と呼ばれるタンパク質でできた板が規則正しく並び^{1),2)}、これらが互いに滑ることによって細胞形態が変形する「ユーグレナ運動」も行う³⁾。

ユーグレナ藻綱の微細藻類の特徴として、細胞内に「パラミロン」と呼ばれる特殊な貯蔵物質を産生することがあげられる。パラミロンは、1,000個程度のグルコースが β -1,3結合した直鎖状の β -1,3-グルカンである。細胞内では直鎖状のパラミロンが3重螺旋構造をとった上で、さらに複雑な立体構造を形成し、パラミロン顆粒となっていることが知られている⁴⁾。近年、パラミロンに、免疫機能活性化作用^{5),6)}、花粉症抑制作用⁷⁾、血糖値上昇抑制効果と血中コ

レステロール低下作用⁸⁾など様々な医学的効能があることが証明されている。また、各種毒性試験では全く毒性を示さないことも判明している^{8),9)}。パラミロンは、細胞が嫌気状態におかれると、ワックスエステルへ変換される¹⁰⁾。このワックスエステルは近年バイオ燃料として注目され、研究が進展している¹¹⁾。

ユーグレナ藻綱の微細藻類は、混合栄養性 (Mixotrophy) を示す種類が多い。つまり、光合成を行い二酸化炭素を炭素源とする「独立栄養性 (Autotrophy)」と同時に、有機化合物も利用できる「従属栄養性 (Heterotrophy)」を兼ね備えている。光環境や水中の利用可能な有機物の量に応じて両方の栄養性の比率を変化させているものと思われる。パラミロンは、いずれの栄養性増殖の場合にも生成されるが、*E. gracilis* NIES-48株を用いた培養実験では、従属栄養性培養の方がより多くのパラミロンを産生すると報告されている^{12),13),14)}。そのため *E. gracilis* の培養に関する研究では、従属栄養性培養が中心に行われてきた。パラミロン生産量の観点では、従属栄養性で培養を行う方がよいと考えられるが、従属栄養性の培養を行う際には、グルコースやフルクトースなどを炭素源として用いているため、炭素源を確保するコスト増大、無菌的な培養装置の設置に大きなコストがかかるというマイナス面もある。そこで、本研究では、これまでに研究例の少ない、独立栄養性条件において培養実験を行い、バイオマス生産性、パラミロン含有率について検証した。

本研究では、国立環境研究所で入手可能なすべての *E. gracilis* で評価するため、多くの先行研究に用いられてきた *E. gracilis* NIES-48株だけでなく、同種の NIES-47株、NIES-49株についても、バイオマス生産性とパラミロン含有率を測定した。そして、その際にかかるコストを簡易的に求め、*E. gracilis* 3株のバイオマスならびにパラミロン生産とコストとの関係についても考察した。

材料及び方法

培養実験に使用した *Euglena gracilis* は国立環境研究所、微生物系統保存施設 (<https://mcc.nies.go.jp/index.html>) で系統保存されている NIES-47, NIES-48, NIES-49株を用いた (図1)。

初期バイオマスが乾燥重量で約0.5g/Lとなるように調整し、培養を開始した。スピナーフラスコ (セルスター, WHEATON) を使用し、500mL の CM 培地¹⁵⁾ を使用した。また、二酸化炭素10%に混合された空気を50mL/min で通気した。スピナーフラスコは底面よりスターラー (OCUTOPUS CB-1, アズワン) を用いて培養液を常時攪拌させた。フラスコ3本に対して、側面側1方向から3波長昼白色蛍光灯の光を24時間照射した。光源側のフラスコ表面の

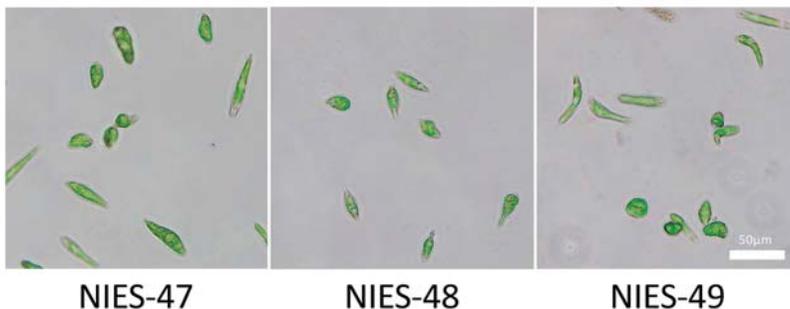


図1: *Euglena gracilis* 培養株3株の光学顕微鏡写真

光量子束密度を $100\mu\text{ mol/m}^2/\text{s}$ となるようにし、10日間培養した。培養期間を10日に設定したのは、これまでの予備的培養試験において、ほぼ10日でバイオマス増殖が飽和に達していたためである。培養開始時と終了時に乾燥バイオマス密度 (g/L) を測定した。培養終了後、3000 g、5分で遠心 (マイクロ冷却遠心機3740, KUBOTA)、上清を除去、純水添加で懸濁、再度遠心を繰り返すことで洗浄し、凍結真空乾燥を行なった (凍結真空乾燥機 FDU-1200, EYELA)。バイオマス生産性 (g/L/day) は、10日目のバイオマス密度から開始時のバイオマス密度を引き、培養日数10で除し算出した。有意性の検定 ($P < 0.05$) は、解析ソフト HAD16.0を用い、Bonferroni法による多重比較を行った¹⁶⁾。

凍結真空乾燥処理を行なった *E. gracilis* バイオマスについて、日本食品分析センター (<https://www.jfrlor.jp/>) に依頼し、定量 NMR によりパラミロン含有率 (パラミロン量/乾燥バイオマス量 $\times 100$) を測定した。

コスト計算は、培養に使用した試薬 (主に500g ボトルで購入) の価格、使用機器 (攪拌、培養装置、光照射光源) の電力から、1Lサイズの1試験を行うコストについて算出した。電力は、30円/kWhとして算出した。通気を使用した二酸化炭素のコストは、40L液体二酸化炭素ボンベの購入金額から気体1Lあたりの値段を算出し、培養期間中の消費量で計算した。

結果と考察

E. gracilis 培養株3株のバイオマス生産に関する結果を表1に示す。表1を元に算出したバイオマス生産性は、平均で NIES-47株が $0.091 \pm 0.008\text{ g/L/day}$ 、NIES-48株が $0.103 \pm 0.011\text{ g/L/day}$ 、NIES-49株が $0.014 \pm 0.004\text{ g/L/day}$ となった (図2)。同種内でも違いがあることが判明した。この3株は形態的には全く識別できず (図1)、真核生物の分子系統解析や集団遺伝学的解析に使用される18S リボソーム RNA 遺伝子約2,000塩基対の比較でも3箇所しか違いが見られない (出村未発表データ)。しかし、バイオマス生産やこの後述べるパラミロン含有率に有意差が見られたことは、*E. gracilis* がもつ種内の多様性が大きいことを示すものと思われる。

表1. 独立栄養性条件における *Euglena gracilis* 3株の培養実験結果

培養株名	フラスコ No.	培養開始時 バイオマス密度 (g/L)	培養10日目 バイオマス密度 (g/L)
NIES-47	1	0.40	1.30
	2	0.38	1.40
	3	0.38	1.20
	平均	0.39	1.30
NIES-48	1	0.44	1.48
	2	0.44	1.60
	3	0.44	1.34
	平均	0.44	1.47
NIES-49	1	0.32	0.42
	2	0.32	0.52
	3	0.30	0.42
	平均	0.31	0.45

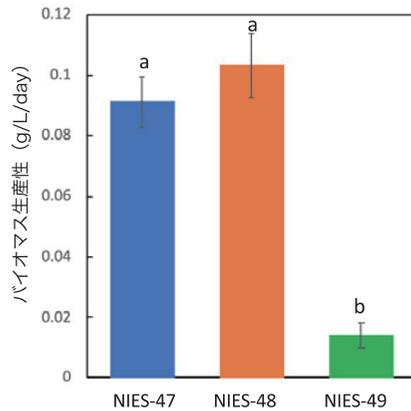


図2 : *Euglena gracilis* 培養株 3 株のバイオマス生産性. 記号 a と b の間には $P < 0.05$ で有意な差があることを示す.

NIES-48は、「Z株」としても多くの研究に用いられている培養株である. NIES-48株の独立栄養性培養における最大バイオマス密度として Ogawa et al. (2015) は $0.32 \pm 0.12 \text{g/L}^{17}$, Grimm et al. (2015) は10日間で $3.2 \pm 0.15 \text{g/L}^{13}$ を報告している. どちらも初期バイオマス密度の情報が不明なためバイオマス生産性は算出できないが, 本研究における NIES-48の最大バイオマス密度 $1.47 \pm 0.11 \text{g/L}$ と大きな違いがあった. 同じ培養株で同じ栄養性培養実験であっても, 培養液組成や光環境などの培養条件の違いによってバイオマス生産量が大きく変動することが推察された. ちなみに Grimm et al. (2015) では従属栄養性培養における最大バイオマス密度も報告しており, 10日間で $12.3 \pm 0.14 \text{g/L}$ であった¹³. 炭素源としてグルコースを利用することでバイオマス生産量も大きく向上することが分かる.

E. gracilis 培養株 3 株のパラミロン含有率の結果を図3に示す. 平均で NIES-47が $4.62 \pm 0.16\%$, NIES-48が $6.78 \pm 1.09\%$, NIES-49が $1.60 \pm 0.60\%$ となった. NIES-47と NIES-48はバイオマス生産性では有意差はなかったが, パラミロン含有率では有意差があった. また, 3株のバイオマス生産量とパラミロン含有率は正の相関をすることが分かった (図4, 相関係数

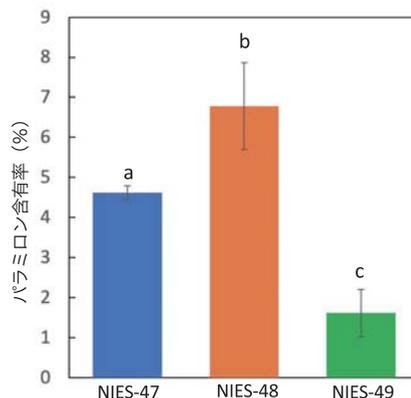


図3 : *Euglena gracilis* 培養株 3 株のパラミロン含有率. 記号 a と b と c の間には $P < 0.05$ で有意な差があることを示す.

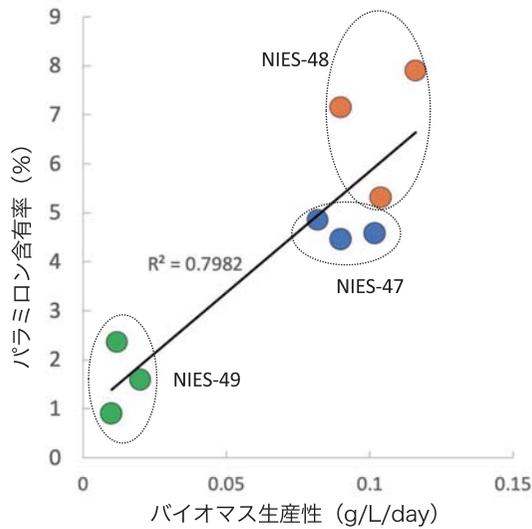


図4：*Euglena gracilis* 培養株3株のバイオマス生産性とパラミロン含有率の関係。R²=0.7982は、近似直線の相関係数を示す。

R²=0.7982)。この結果は、バイオマス生産性を増加させれば、パラミロン含有率も増加することを示唆している。バイオマス増加とパラミロン含有率増加の因果関係は現時点では不明であるが、パラミロン生産量のみを目的とする場合には、先行研究で指摘されたように従属栄養性培養が適していると思われる。実際に、Ivusic & Santek (2015) では、NIES-48株の従属栄養性培養によるパラミロン含有率48.3-53.9%を報告している¹⁴⁾。

本研究の培養に関するコスト計算の結果を表2に示す。本研究で行なったフラスコサイズで10日間培養するためには、1Lあたり約1,120円が必要であることが判明した。しかし、実際には、人件費、設備費は入っていないため、本結果は低く見積もられており、より多くのコストが必要である。バイオマス生産量1gあたりに関するコストを算出すると、最もバイオマス生産量が多かったNIES-48株で1,091円/g、最もバイオマス生産量が低かったNIES-49では、8,027円/gという結果となった。バイオマス生産を増加させることで、バイオマス生産コストを大幅に削減できると言える。また、本研究では、合計金額のうち、約82%が光照射に関する費用であることが分かった。仮に人工光ではなく、自然光を利用した場合、コストは1Lあたり約200円程度に削減できる。さらに、培養スケールを上げることで、さらなるコスト削減効果があると思われる。しかし、屋外で自然光を利用する培養では天候・気温の変化、様々な生物のコンタミネーションのリスクがある。これらは生産性を減少させるだけでなく、パラミ

表2. 本実験の培養に関するコスト (1Lあたり10日間)

	価格 (円)
培地	28
光照射	922
通気	165.6
培地攪拌	8.2
合計	1123.8

ロンやその他の有用物質の含有量も不安定になり、実際に生産する場合には品質が安定しない可能性もある。バイオマス生産とコスト削減の関係については、数多くの研究がなされているものの¹⁸⁾、非常に課題が多い。

先にも述べたが、パラミロン生産のみを目的とした場合には、従属栄養性培養が適すると考えられるが、従属栄養性培養の場合、グルコースなど炭素源コストが培地コストに追加される。本研究と同等の培養サイズで使用するグルコース量 (500g ボトルで購入) で試算すると、1Lで10日間あたり、培地コストのみで約110円となり、本研究における培地コスト28円の約4倍となる。また、従属栄養性培養では、光照射に関するコストは削減できたとしても、バクテリアのコンタミネーションを避けるため、たとえ小規模であっても完全密閉式の培養装置が必要となり、大きな初期設備コストがかかることも考慮されなくてはならない。さらに、緒言で述べたような医薬用途、食用用途などの場合には、安全衛生管理のためのコストも追加されると思われる。*E. gracilis* による培養では、単純にバイオマス生産やパラミロン生産を増加させるだけでなく、トータルコストを十分に考慮した培養計画が必要であろう。

摘 要

ユーグレナ (ユーグレナ藻綱) は、近年医薬効果を示すことで注目されているパラミロンと呼ばれる物質を細胞内に蓄積することが知られている。本研究では、ユーグレナ藻綱の一種 *Euglena gracilis* 3株 (NIES-47, NIES-48, NIES-49) を用い、独立栄養性培養時におけるバイオマス生産性、パラミロン含有率を検証した。その結果、3株の中で最大のバイオマス生産性は、NIES-48株で $0.103 \pm 0.011 \text{ g/L/day}$ であった。また、パラミロンの最大含有率もNIES-48株で、 $6.78 \pm 1.09\%$ であることが判明した。同株の10日間1Lあたりの培養コストを計算したところ、1123.8円であることが分かった。*E. gracilis* 大量培養の際の最適な培養方法は、バイオマス生産、パラミロン含有率、トータルコストなどを考慮する必要がある。

引 用 文 献

1. Leedale, G.F., Meeuse, B.J.D., Pringsheim, E.G. (1965). Structure and physiology of *Euglena spirogyra*. I and II. *Archiv. für Mikrobiol.* **50**, 68-102.
2. Vismara, R., Barsaniti, L., Lupetti, P., Passarelli, V., Mercati, D., Dallai, R., Gualtieri, P. (2000). Ultrastructure of the pellicle of *Euglena gracilis*. *Tissue & Cell* **32**, 451-456.
3. 洲崎敏伸 (2004). ユーグレナ運動, 原生动植物学雑誌, **37**, 169-190.
4. Marchessault, R., Deslandes, Y. (1979). Fine structure of (1-3)- β -D-glucans: Curdlan and paramylon. *Carb. Res.* **75**, 231-242.
5. Kondo, Y., Kato, A., Hojo, H., Nozoe, S., Takeuchi, M., Ochi, K. (1992). Cytokine-related immunopotentiating activities of paramylon, a β -(1-3)-D-Glucan from *Euglena gracilis*. *J. Pharmacobio-Dyn.* **15**, 617-621.
6. Russo, R., Barsanti, L., Evangelista, V., Frassanito, A.M., Longo, V., Pucci, L., Penno, G., Gualtieri, P. (2017). *Euglena gracilis* paramylon activities human lymphocytes by upregulating pro-inflammatory factors. *Food Sci. Nut.* **5**, 205-214.
7. 小泉未希・吉井唯・湯浅正洋・澤村弘美・渡邊敏明・吉田絵梨子・鈴木健吾 (2013), スギ花粉症モデルマウスにおけるユーグレナの効果についての検討, 日本食生活学会誌, **24**, 171-176.
8. 大中信輝・竹崎潤・川嶋淳・高橋円・青江誠一郎 (2018), *Euglena gracilis* EOD-1株が産生するパラミロンの機能性, 神鋼環境ソリューション技報, **14**(2), 2-10.
9. 中野長久・大串美沙・渡邊敏明 (2017): ユーグレナはどこまで高栄養食源として貢献し得るか-その機

- 能と応用－, ビタミン, **91**, 323-330.
10. Inui,H., Miyatake,K., Nakano,Y., Kitaoka,S. (1982). Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *FEBS Letters* **150**, 89-93.
 11. 鈴木健吾 (2017), ユーグレナ由来ジェット燃料生産の可能性, 日本エネルギー学会機関誌えねるみくす, **96**, 50-55.
 12. Matsumoto,T., Inui,H., Miyatake,K., Nakano,Y., Murakami,K. (2009). Comparison of nutrients in *Euglena* with those in other representative food sources. *Eco-Engineering* **21**, 81-86.
 13. Grimm,P., Risse,J.M., Cholewa,D., Müller,J.M., Beshay,U., Friehs,K., Flaschel,E. (2015). Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of α -tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion. *J. Biotech.* **215**, 72-79.
 14. Ivusic,F., Santek,B. (2015). Optimization of complex medium composition for heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* and paramylon production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **38**, 1103-1112.
 15. Cramer,M., Myers,J. (1952). Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*. *Arch. Mikrobiol.* **17**, 384-402.
 16. 清水裕士 (2016), フリーの統計分析ソフト HAD : 機能の紹介と統計学習・教育, 研究実践における利用方法の提案, メディア・情報・コミュニケーション研究, **1**, 59-73.
 17. Ogawa,T., Tamoi,M., Kimura,A., Mine,A., Sakuyama,H., Yoshida,E., Maruta,T., Ishikawa,T., Shigeoka,S. (2015). Enhancement of photosynthetic capacity in *Euglena gracilis* by expression of cyanobacterial fructose-1, 6-/sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase leads to increases in biomass and wax ester production. *Biotechnol. for Biofuels* **8**, 80.
 18. Ación,F.G., Fernández,J.M., Magán,J.J., Molina,E. (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotech. Adv.* **30**, 1344-1353.