

ハプト藻 *Phaeocystis* sp.の外被多糖 (ハプトース) について

物質・環境システム工学コース

1055014 山下志津香

目次

要旨	1
緒言	2
第一章 目的藻 <i>Phaeocystis</i> sp. の培養	3
1-1 目的藻 <i>Phaeocystis</i> sp.	
1-2 <i>Phaeocystis</i> sp. の培養、回収	
第二章 <i>Phaeocystis</i> sp. 外被多糖の構成単糖の分析	6
2-1 目的	
2-2 材料および方法	
2-2-1 <i>Phaeocystis</i> sp. の調製	
2-2-2 塩酸を用いた加水分解後の溶出糖量の変化	
2-2-3 加熱温度を変えたときの溶出全糖量の変化	
2-2-4 構成単糖の分析	
2-2-5 ハプトース粉末化の工程	
2-2-6 粉末ハプトースの分析	
2-2-7 灰分組成の分析	
2-2-8 灰分除去	
2-2-9 粉末ハプトースの見かけの分子量	
2-3 結果	
2-3-1 塩酸を用いた加水分解後の溶出糖量の変化	
2-3-2 加熱温度を変えたときの溶出全糖量の変化	
2-3-3 構成単糖の分析	
2-3-4 粉末ハプトースの分析	
2-3-5 灰分組成の分析	
2-3-6 灰分除去	
2-3-7 粉末ハプトースの見かけの分子量	
考察	
総括	19
謝辞	21
参考文献	22

要旨

ハプト藻 *Phaeocystis* sp. がその外被に多糖を持ち、それらが互いに粘着する性質を持つことを利用して生分解性プラスチックフィルムの研究開発が行われ、農業用マルチフィルムとしての工業化が進みつつある。

このハプト藻 *Phaeocystis* sp. 外被多糖の応用範囲は、生分解性プラスチックだけにとどまらず、さらに広げることが可能と思われる。またプラスチックの強度を向上させるには他の物質との混合や改質を行うことも重要と思われる。そのため外被多糖の組成、単糖配列等を知ることが必要と考え、それらの分析を行った。

ハプト藻 *Phaeocystis* sp. は人工海水を使用した PES 培地を使用し、100L タンクにて開放型培養(25℃ 明期 16 時間 暗期 8 時間)を行い、4 週間培養したものを集藻機で集藻し、遠心分離して得られたペースト状の藻体を 4℃にて冷蔵保存したものを実験に使用した。

保存した藻から培地成分を取り除くため水で洗浄した後、塩酸で加水分解し、遊離した糖成分をフェノール・硫酸法によって全糖測定を、ソモジ-ネルソン法によって還元糖測定を測定した。

その結果外被多糖は、80℃以上の水を用いた温浴のみでも遊離し、多糖の結合も壊れないことが分かった。温浴によって外被多糖は藻体からはがれ、水に溶けるので、温浴後の溶液を遠心分離して、上清の多糖と沈殿の藻体とに分離することが出来た。

上清の多糖はゼリー状で大量の水を含んでいるため、これをより扱いやすくするためにロータリーエバポレーターにかけて、濃縮し、その後フラッシュエバポレーションや凍結乾燥法によって粉末とした。このハプト藻 *Phaeocystis* sp. 由来の多糖を『ハプトース』と呼ぶことにした。粉末化によって、分析時の基本量を定めやすくなっただけでなく多方面への応用も行いやすくなった。

粉末化した粗ハプトースの成分 (表 1)を分析した。ハプトースの糖の精製が十分でないことは、以降の分析、多方面への応用の妨げになる可能性がある。そこで塩酸を加えて灰分を溶解し、水に対して透析を行うことで糖の精製を試みた。灰分の陽イオン分析結果はイオンクロマトグラフィーによって Mg、Na、Ca、K、Li であるとわかった (表 2)。カルシウムは、ハプト藻のコッコリスと呼ばれる炭酸カルシウムの殻に由来し、その他の灰分は培地成分の混入と推測

される。得られた精製ハプトースの見かけの分子量はゲル濾過クロマトグラフィーによって約 400 万であると推定できた。

表 1 ハプトース成分組成

糖量	灰分	水分	粗脂質	粗脂質
40%	35%	10%	4%	4%

表 2 ハプトース灰分組成

Li	Na	K	Mg	Ca
1.4%	11.5%	2.8%	14.0%	5.3%

緒言

近年、合成ポリマーの化学技術が大いに進展し、私たちの生活は大変豊かなものとなってきた。プラスチックは多くの利点を持っていることからあらゆる分野で使用されている。このように本来の目的のために使われているかぎりはとても便利なものなのだが、廃棄する際には利点の一つである安定性、耐久性が逆に問題となる。汎用合成ポリマーの多くは廃棄されたあと腐らないため、環境に負荷を与え、焼却に際しては高温を発生し焼却炉を損傷するなどの問題を引き起こしている。また従来のプラスチックは化石資源である石油を大量に消費するので、将来において環境問題だけでなく資源問題からも考えなければならない。そうした中で近年用途によってはそれらに生分解性が求められている。

そこで我々研究チームは外被に多糖類を持つ海洋性微細藻類の *Phaeocystis* sp. を用いてプラスチックの作製を試作した。このフィルム状プラスチックは藻と廃パルプから出来ているので生分解性であり、生物由来なのでリンや窒素をもっていることからそのまま土に混ぜ込んでしまえば肥料にすることも出来て、張替えの手間も省くことが出来るという利点があることから畑のマルチフィルムとしての使用が考えられている。

しかし、まだ強度の面では改良の必要がある。強度を上げるためには多糖の組成成分などを調査する必要がある、また後に述べる結果から、多糖が藻本体から容易に分離させるので多糖だけを集めることができるようになり新しい材料とすることができた。その材料を使って浄水剤などの新しい分野での利用も考えられている。このような多方面への利用や改良が考えられている材料について調査する必要があると考え、ハプト藻 *Phaeocystis* sp. の外被多糖（ハプトース）について研究した。

第一章

目的藻 *Phaeocystis* sp. の培養

1-1 目的藻 *Phaeocystis* sp.

Phaeocystis sp. はハプト藻綱プリネシウム目に属し、藻体周囲に寒天状物質を持ち、不動の群体を形成する単細胞の海藻である。顕微鏡写真では *Phaeocystis* sp. 周囲の寒天状物質である多糖の存在を視覚化するために、墨汁を用いて寒天状多糖を白く浮き上がらせている（図 1-1）。藻の大きさは、藻体自身が 4~5 μm で、寒天状多糖を入れると 15~20 μm になる。生育場所は沿岸域を中心にどのような海域にでも見いだされるごく一般的な藻である。今回の実験に用いた *Phaeocystis* sp. は沖縄県近海で採取、単離されたものを用いた。

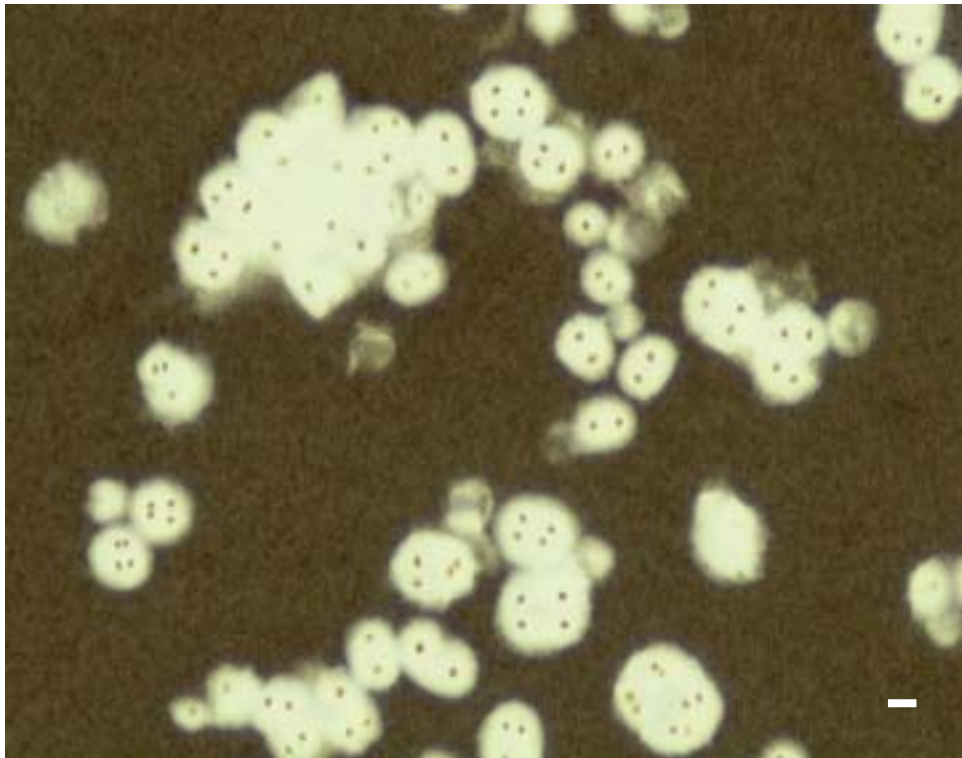


図 1-1 *Phaeocystis* sp. の顕微鏡写真

Bar=10 μm

Phaeocystis sp.の培養にはすべて人工海水（アクアマリン 八洲薬品）を用い、*Phaeocystis* sp.用の強化培地（PES）を加えたもので培養を行った。培養の環境はすべて平均照度 3000Lux、明期 16 時間暗期 8 時間の周期で、温度は 25℃であった。培養はまず 1 %寒天培地に *Phaeocystis* sp.入りの溶液を白金耳を用いて塗布する。10 日ほどで褐色のシングルコロニーができる。そのコロニーを二週間ごとに 10ml、50ml、500ml と無菌しんとう培養をしながらスケールアップさせていき、最終的に 100L の蓋付ポリカーボネート製のタンクに移し、エアポンプによるエアレーションによって通気（20L/min）、攪拌と同時に二酸化炭素を供給しながら約 4 週間培養した（図 1-2）。



図 1-2 *Phaeocystis* sp.の 100L タンク培養の様子

4 週間後、*Phaeocystis* sp.が十分に培養されたタンクから連続集藻器を用いて藻の回収を行った。連続集藻器を用いて約 15 分で 100L を 10L にまで濃縮した後、4,000×g、20 分で遠心分離を行い *Phaeocystis* sp.を回収し、500ml のポリエチレン製ボトルにいれ 4℃で保存を行った。回収した藻はゼリー状であった。

NaNO ₃	350	mg
β -Naglycerophosphate	50	mg
Vitamin B12	10	μ g
Thiamine HCl	500	μ g
Biotin	5	μ g
2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol [Tris(hydroxymethyl)aminomethane]	500	mg
Fe(as EDTA; 1:1 molar)*	25	ml
P- II metals**	25	ml
純水	50	ml

Fe(as EDTA; 1:1 molar)*

Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	70.2	mg
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	66	mg
純水	100	ml

P- II metals**

H ₃ BO ₃	11.4	mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	4.9	mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	16.4	mg
ZnCl ₂	1	mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.41	mg
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100	mg
純水	100	ml

980mlの人工海水に20mlのPESを加え、1 M HClでpHを7.8に調整する。

Phaeocystis sp. の培養に用いた

Provasoli の栄養塩強化海水（PES）培地の組成

第二章

Phaeocystis sp. 外被多糖（ハプトース）の構成単糖の分析

2-1 目的

現在まで *Phaeocystis* sp. を用いた生分解性プラスチックを作るために、その乾燥温度、強度を上げるために廃パルプとの混合の試み、またその混合比、加圧条件の検討が行われ、より強度のあるフィルムを作るための条件の検討が行われてきた。このような最適条件の選択以外では化学処理によって強度を上げる必要がある。化学修飾を行うにあたっては、*Phaeocystis* sp. 外被多糖の構成単糖の分析が必要となる。またハプトースの粉末化に成功し、浄水剤などの新分野への利用が考えられている。このような多方面への研究開発のためにも新素材であるハプトースについての分析を行う必要がある。

2-2 材料および方法

2-2-1 *Phaeocystis* sp. の調製

原材料として 100L タンクにて 4 週間培養後、集藻し 4℃ の低温室に保存しておいた *Phaeocystis* sp. を用いた。藻に残っている培地成分除去のために 4,000 ×g、10 分で 3 回、イオン交換水にて洗浄を行った。

2-2-2 塩酸加水分解後の溶出糖量の変化

塩酸の濃度を変えて *Phaeocystis* sp. を直接加水分解したときに溶出してきた糖量の変化を調べた。まずイオン交換水にて培地を洗浄し、*Phaeocystis* sp. を 5g 測り取り、そこに 0.5M、1M、2M の塩酸を加え、均一になるようによく攪拌し、沸騰水中で還流冷却しながら加水分解を行った。同時にコントロールとして水でも同様の操作を行った。一定時間ごとに加水分解溶液を遠沈管にとり、冷却後 2,000 ×g、10 分で遠心分離を行い、上清と藻体に分けた。その上清を 5ml 取り、水酸化ナトリウムにて中和し、水を加えて 10ml とした。その上清

に溶出した糖については、全糖をフェノール硫酸法、還元糖をソモジ-ネルソン法にて測定し、同様にグルコースの検量線を用いてグルコース換算として算出した。

2-2-3 加熱温度を変えたときの溶出全糖量の変化

40℃、60℃、80℃、100℃と加熱温度を変化させ溶出する全糖量を測定した。洗浄済み *Phaeocystis* sp. を 5g 測り取り、一定時間ごとに加温溶液を遠沈管にとり、冷却後、2,000×g、10 分で遠心分離を行い、上清と藻体に分けた。その上清中の全糖量をフェノール硫酸法を用いて測定した。

2-2-4 構成単糖の分析

加水分解が終了したと思われるサンプルを用いて構成単糖の分析を行った。1mg/ml のハプトース溶液を 0.5M 塩酸中で 2 時間加水分解したサンプルを中和せずにバイアルにいれて乾燥した。このとき反応バイアル中にグルコース換算の全糖量 10nmol となる量を添加した。バイアルに窒素を吹き付けて加水分解溶液の水分を塩酸とともに蒸発させた後、50 μ l のイオン交換水を加えて残渣を溶かした後再度窒素を吹き付けて乾燥を行った。乾燥させた加水分解物が入った反応バイアルにピリジン：メタノール：水（15：30：10）を 50 μ l、無水酢酸を 2 μ l 加え、30 分室温で放置し N-アセチル化を行った。N-アセチル化の終わったバイアルに糖質蛍光標識装置（PALSTATION model4000、TaKaRa）とピリジルアミノ化キット（PALSTATION Pyridylation Reagent Kit ”単糖分析用”、TaKaRa）を用いてピリジルアミノ化を行いピリジルアミノ化単糖を作った。ピリジルアミノ化単糖を単糖分析用カラム PALPAK TYPEA（TaKaRa）を用いて分析した。カラム温度 65℃、移動相には 0.7M ホウ酸（水酸化カリウムを用いて pH9.0 に調製）とアセトニトリル 9：1 の混合液を用い流量 0.3ml/min で HPLC を用いて分析を行った。糖の定量は蛍光検出器を用いて、励起光 310nm で 380 nm の蛍光を測定しクロマトパック（CR-7A,shimazu）に記録した。検出されたピークの糖は標準物質（PA-Monosaccharide Mixsture、TaKaRa）と比較して同定した。

2-2-5 ハプトース粉末化の工程

前述の実験結果より *Phaeocystis* sp. が熱水中で外被の多糖がはく離し、遠心分離をすることで裸になった藻体と多糖を含んだ溶液とに分離することが判明した。この *Phaeocystis* sp. 外被多糖をハプト藻由来の糖であるということからハプトースと命名し、この段階で集められた糖は後述するように灰分その他を

含んでいるので粗ハプトースである。

洗浄済みの *Phaeocystis* sp. をイオン交換水に入れ、100℃で 30 分加温して藻から多糖を外し、4,000×g、10 分で遠心分離を行い藻体と粗ハプトース溶液とに分けた。その粗ハプトース溶液が希薄なので効率をあげるためにロータリーエバポレーター（ROTARY VACUUMEVAPORATER N-11、EYELA）を用いて濃縮した。この過程で生じた塊を除去するためにステンレスメッシュ（80 メッシュ）でろ過後、80℃に加温しながらフラッシュエバポレーター（SPRAY DRYER SD-1000、EYELA）にかけ粉末とするか、またはステンレスメッシュでろ過後の溶液を凍結乾燥をし、高速ミルサーを用いて粉末化した。

2-2-6 粉末ハプトースの分析

秤量した粉末ハプトースを 105℃の乾燥器に入れ、重量の減少を追って平衡に達したと思われる点で得た重量現象を水分量とした。灰分の測定は粉末ハプトースを磁性るつぽに入れ、550℃で 2 時間灰化を行い、残った重量から灰分を算出した。粗タンパク質の測定は、粉末ハプトース中の窒素を常法に従って硝酸態に変換し、同様に処理したアルブミンの検量線からアルブミン換算で表した。粗脂質はメタノール-クロロホルムによる抽出物を粗脂質として溶媒乾固後の重量を測定した。糖量はフェノール硫酸法で全糖測定した。

2-2-7 灰分組成の分析

前述の分析の結果より糖量の次に多かった灰分の組成を調べるために粉末多糖の灰分をイオンクロマトグラフィーを用いてカチオン分析用カラムで分析をした。灰化した粉末多糖を一定量の水に溶解させ、0.22 μm のフィルターでろ過を行い、不溶性物質を除去した。その溶液はカラム

（DIONEX CS12A）を用い、カラム温度 35℃、溶離液は 20mM メタンスルホン酸、流量 1.2ml/min で行った。検出には IC-20（DIONEX）を用い、溶出されるカチオンの電気伝導度を検出した。

2-2-8 灰分除去

ハプトースを利用して多糖の製品を開発していく上で、多糖以外の成分が多いと支障があると考え、灰分の除去を試行した。灰分除去の完成度の確認を、イオンクロマトグラフィーのカチオン測定で行った。灰分除去操作後の灰分量は灰化させた重量を測定した。またその灰分組成をイオンクロマトグラフィーで定量して灰分除去後の効果を確認した。

粉末粗ハプトースに塩酸を加え、加水分解をできるだけ防ぐために冷却しながら 2 時間攪拌溶解させ、その溶液を水に対して 24 時間透析（wako ダイアランシスメンブラン 平均分子量 16,000）をした。用いた塩酸は 0.1M、1 M、2 M、4 M で行った。またコントロールとして塩酸を使わず水でも同様の操作を行った。透析時間は 4M 塩酸での処理液を水酸化ナトリウムで中和した溶液を水に対して透析した時 24 時間後に溶液中の塩が除去できたことから一律に 24 時間とした。

透析後凍結乾燥—高速ミルサーの過程をへて作った粉末精製ハプトースを磁性るつぼに入れ、電子レンジ用るつぼを用いて約 850°C で灰化させた。

灰化した粉末多糖を一定量の水に溶解し、フィルターろ過（0.22 μm ）を行い、不純物を除去した。その溶液はカラム（DIONEX CS12A）を用い、カラム温度 35°C、溶離液は 20mM メタンスルホン酸、流量 1.2ml/min でクロマトを行った。検出には IC-20（DIONEX）を用い、溶出されるカチオンの電気伝導度を検出した。試料内標準物質としてリチウムを使用した。

2-2-9 粉末ハプトースの見かけの分子量

ハプトースの見かけの分子量をゲルろ過クロマトグラフィーを用いて測定した。粉末精製ハプトースを 1mg/ml の濃度で溶解し、不純物を除去するためにフィルターろ過（0.45 μm ）を行った。カラムは S-500HR（Pharmacia）、カラム温度は室温、移動相は水を用いた。標準物質として BLUE DEXTRAN（MW 2,000,000）DEXTRAN（MW5,000,000～40,000,000）を用いた。

2-3 結果

2-3-1 塩酸を用いた加水分解後の溶出糖量の変化

塩酸濃度を変えて行った *Phaeocystis* sp. の加水分解による溶出糖量の時間経過を図 2-1 に示した。全糖量の増加より、塩酸が入っている場合はいずれも加えた直後から上清中に全糖が検出され、その量は時間経過とともに増加した。また塩酸による加水分解の進行とともに上清中の還元糖量も増加した。このことから塩酸を加えた直後から藻体外被の多糖がはく離して、上清中に遊離し、また酸による加水分解が進行して還元糖も増加したものと考えられる。塩酸の濃度に依存して還元糖の生成（加水分解）の傾きは異なっているが、0.5M の塩

酸を用いて 2 時間加水分解を行うことで還元糖量の増加はほぼ終了し、加水分解は終わったものと考えられた。一方、イオン交換水のみで加熱したものでは、入れた直後には上清に全糖量としての糖は確認されなかったが、30 分加温することで上清に糖が確認できた。還元糖は実験終了の 3 時間後まで増加は認められなかった。以上の結果より、*Phaeocystis* sp. の懸濁液に塩酸を加えるか、あるいは加温することにより藻から外被多糖が剥離してくることがわかった。塩酸を混入すると加水分解が進行し糖鎖が切断される可能性があるため、イオン交換水で加温することとした。

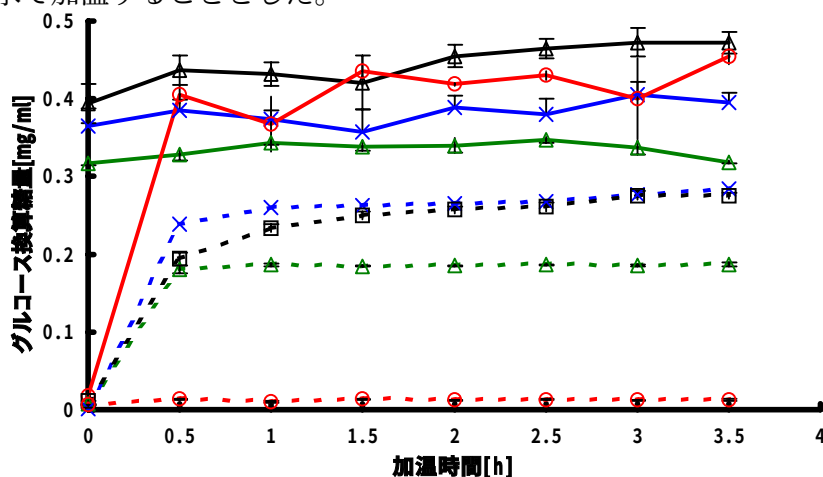


図2-1 塩酸濃度を変えた時の溶出糖量の変化

実線：全糖量 点線：還元糖量

○：0M HCl △：0.5M HCl □：1M HCl ×：2M HCl

加熱処理前後の *Phaeocystis* sp. の顕微鏡映像（図 2-2）からは、加温前の藻の周囲には墨汁で染まらない白い多糖の層が確認でき、加温後には周囲の多糖の層が確認できず、藻だけが確認でき、外被多糖は剥離して上清中に存在しているということがわかった。

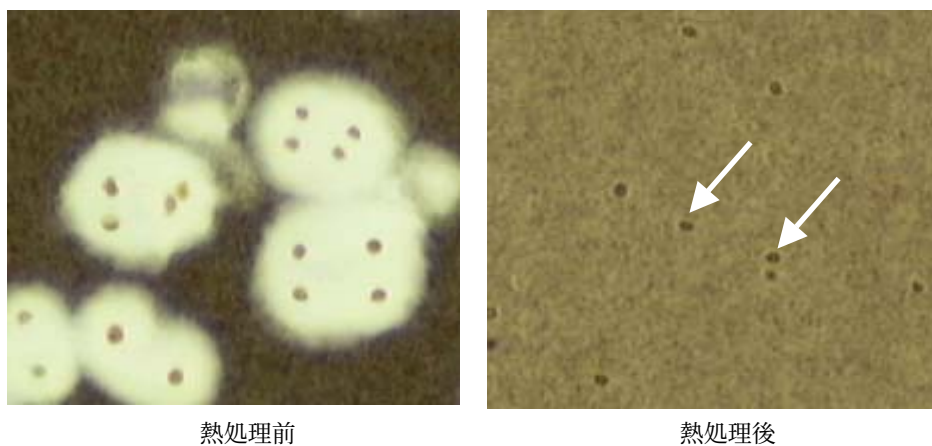


図 2-2 100℃熱水処理前後の *Phaeocystis* sp. の顕微鏡写真

2-3-2 加熱温度を変えたときの溶出全糖量の変化

加熱温度を変えて行った *phaeocystis* sp. 藻体の温浴による溶出糖量の時間経過を示した (図 2-3)。沸騰水中で加温したものは 30 分以内で溶液中にほとんど最大量の糖の存在が確認できた。80℃では 1.5 時間後に沸騰水での最大溶出糖量に追いついた。40℃、60℃では 4 時間加温後にはわずかな増加が見られたが、80℃、100℃の溶出糖量と比べるとかなりの差が確認できた。このため 60℃以下では

外被多糖が完全にはく離するにはかなりの時間が必要だと思われる。

Phaeocystis sp. を熱水中で加温することで、沸騰水中なら 30 分の加温でほぼ完全にはく離させることがわかった。

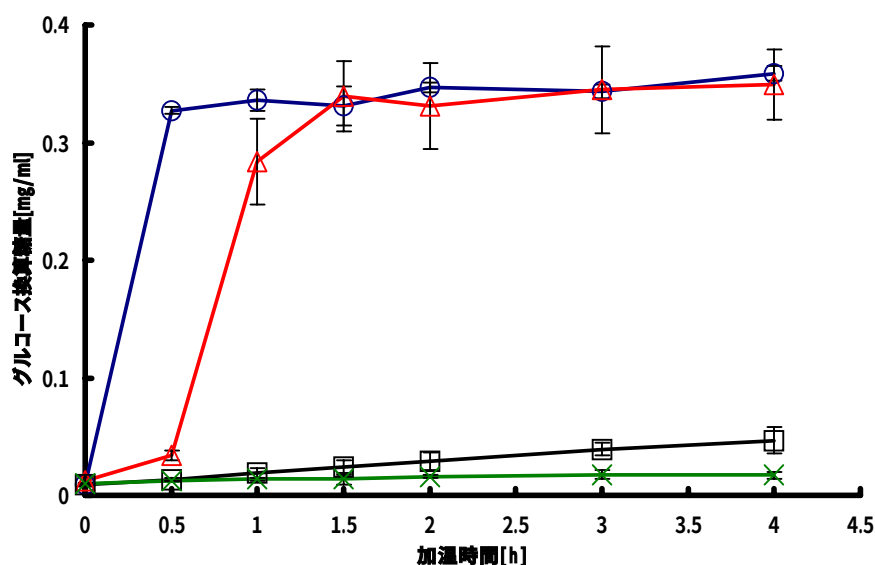


図2-3 加熱温度を変えた時の溶出全糖量の変化

○ : 100℃ △ : 80℃ □ : 60℃ × : 40℃

2-3-3 構成単糖の分析

Phaeocystis sp. 外被多糖を加水分解して得た単糖の HPLC 分析結果 (図 2-4) を示した。単糖分析用カラムを用いた HPLC 分析の結果、キシロースとグルコースのみが検出された。面積からの推定ではキシロースとグルコースはほぼ等量であったので、この外被多糖はキシロースとグルコースを 1 : 1 で含んでいるということがわかった。さらに加水分解の進んだ試料を分析したところ糖残基の総量は増えたが、キシロースとグルコース以外の糖は検出されず、またこの 2

種の糖残基の比率に変化はなかった。

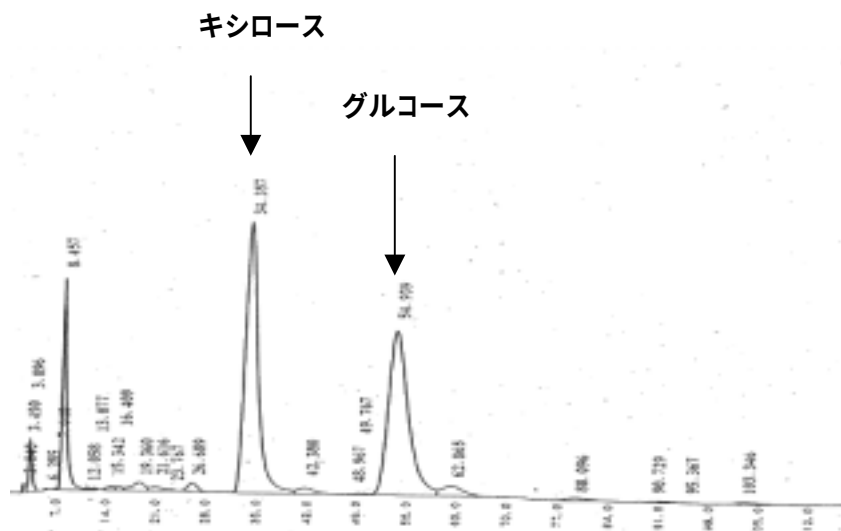


図 2-4 外被多糖の構成単糖の HPLC 分析結果

2-3-4 粉末ハプトースの分析

粉末粗ハプトースの組成（表 2-1）を示した。粉末重量の約 40%が糖質であった。灰分は全体の約 35%含まれていた。たんぱく質、脂質は一桁少なく 4%で、ほぼ炭水化物の塊だということがわかった。

水分	10%
糖量	40%
灰分	35%
粗蛋白質	4 %
粗脂質	4 %

計	93%
---	-----

表 2-1 粉末ハプトースの組成

2-3-5 灰分組成の分析

カチオンのイオンクロマトグラフィーによる粗ハプトースの灰分としてリチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムが検出され、その割合は図 2-5、表 2-2 のようになった。

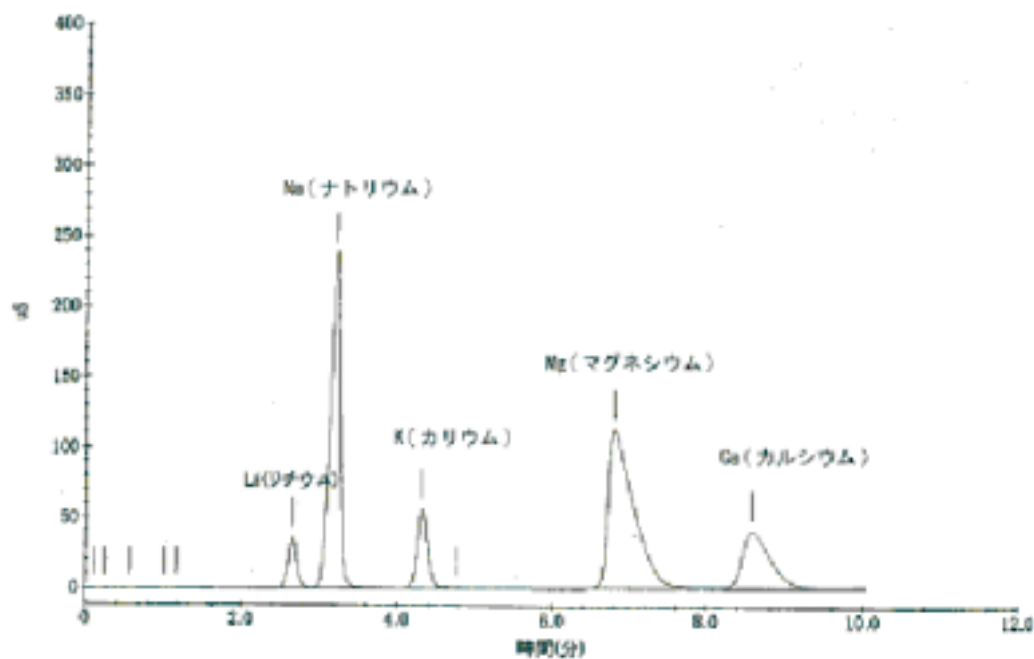


図2-5 イオンクロマトグラフィーでの灰分組成分析

リチウム	ナトリウム	カリウム	マグネシウム	カルシウム
1.4%	11.5%	2.8%	14.0%	5.3%

表 2-2 灰分組成割合

2-3-6 灰分除去

塩酸の濃度を変えた時の灰分の除去率を表 2-3 に示した。0M では 24 時間透析前後で 30%と灰分量の変化は見られなかった。0.1M 塩酸では、全体の成分量に対して 20%、1M では 10%、2M では 7%、4M では 3%と塩酸濃度が高くなるにつれて除去率は増加した。

また灰分除去前後でスケールを合わせるために試料内標準物質としてリチウムを使用し、除去処理前後でのイオンクロマトグラフィーで灰分の除去を確認できた（図 2-6）。

除去前の灰分	除去処理後の灰分			
	0.1M	1M	2M	4M
30%	20%	10%	7%	3%

表 2-3 除去前後の灰分量

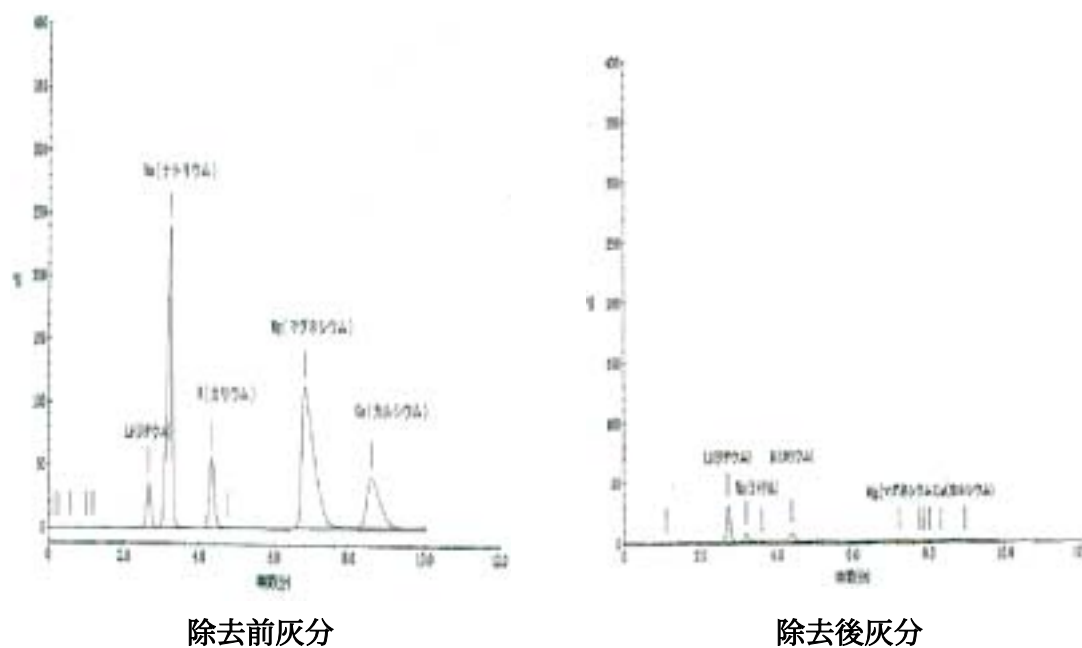


図 2-6 灰分除去前後での灰分量の変化

2-3-7 粉末ハプトースの見かけの分子量

標準物質として用いた BLUE DEXTRAN (MW 2,000,000) DEXTRAN (MW5,000,000 ~40,000,000) の検出時間より粉末ハプトースの見かけの分子量は BLUE DEXTRAN の分子量である 2000,000 よりは十分に大きいということが推測された (図 2-7)。

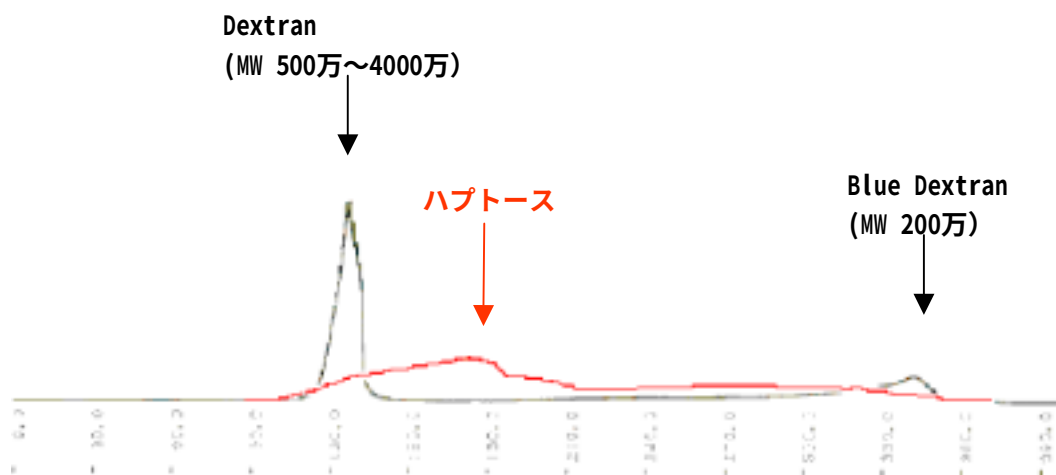


図 2-7 粉末化ハプトースのゲルろ過クロマトグラフィー

2-4 考察

Phaeocystis sp.の外被多糖を分析するために、藻から多糖だけを分離しようとして様々な試行を行ったがいずれも成功にいたらず、また回収できる多糖の量が少なすぎるなどの問題が生じ、目的を達し得なかった。そのため糖を藻についたままで直接加水分解を行い、分解されて溶出した単糖を分析することで構成単糖を調査しようと試みた。

塩酸で加水分解を行うと *Phaeocystis* sp.から糖を含む多糖外被がはく離し、分解されながら溶出することがわかり構成単糖が分析できるようになった。ところが熱水中でも外被多糖がはく離することがわかり、しかも熱水中では塩酸を用いないため多糖が加水分解されることなく抽出できた。また水での溶出全糖量の加熱温度依存性の測定結果より、多糖をはく離させるときの温度は 80℃以上であればよいこともわかった。この抽出方法は分析を行っていく上でとても有益であった。この外被多糖をハプト藻由来の糖であることからハプトースと呼ぶこととした。このように容易にはく離し、遠心分離によって藻体とハプトースとに分けることができるようになり、さらに粉末化を行うことができた。藻についたままのハプトースの場合、その含水量や細胞数ともに異なるため多糖を定量的に扱うことができず、扱うたびにフェノール硫酸法にて全糖量の測定を行わなければならなかった。しかしこの粉末化を行うことで持ち運びに便利で、より定量的に取り扱いのできる、保存のきく試料を作ることができた。この粉末化ハプトースはその保存性があり、持ち運びが容易、定量的にあつかうことができるという特性から浄水剤などへの利用が考えられている。このようにハプトースを容易にはく離させ粉末化を行うことでさらなる分野への可能性を開くことができた。またフィルムの強度や、疎水性、耐水性を増加させるための化学修飾にもより効果的であると推測される。

*Phaeocystis globosa*の多糖は6種類の糖とメチル化糖(Rijssel *et al.*, 2000)や、7種類の糖で構成されているもの(Printer, 1983)などの報告もあり、Rijsselは *Phaeocystis* sp.の多糖の構成は種によるものよりも、地域や季節などの環境によって左右されると報告している。今回の単糖分析ではキシロースとグルコースの2種類の構成糖が確認できたが、これは我々の *Phaeocystis* sp.が2種類の単糖で構成されている種であるのか、外環境と実験室内における環境の差が構成糖の種類に変化をもたらしたもののなのかは未知であり、この種を他の環境

で培養し構成単糖の確認を行うことが必要である。

酵素を用いて結合様式の確認を試みたが、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、プルラナーゼ、ラミナーゼでも分解は確認できなかった。また構成単糖の配列についても不明である。

ハプトースの成分分析を行ったことにより、そのほとんどが糖であるということがわかった。さらに糖量の次に多く含まれている灰分を除去することができ精製をすることができた。このことはフィルムの強度・疎水性を高めるための化学修飾や浄水剤に使用する際のさらなる浄水効果向上のために有効であると思われる。しかしこの方法では塩酸を使用することで加水分解が起きており、ハプトースの見かけの分子量測定と同様の方法を用いて行った、灰分除去前後でのゲルろ過クロマトグラフィー (S-500HR、Pharmacia) では溶出時間に差が見られ、見かけの分子量が減少していることがわかった。使用した透析膜が分子量 16,000 以下のものしか通さないために灰分除去前後でのフェノール硫酸法での全糖量の変化は見られなかった。この灰分除去法では時間がかかり、糖も加水分解されることからさらなる改良が必要である。

分子量測定をゲルろ過クロマトグラフィーにて行ったが、多糖の構造や配列なども不明であるため見かけの分子量測定のみとなった。生物由来であることから分子量分布にばらつきがみられる可能性があるため、ハプトースの配列、結合様式、構造を決定し平均分子量の測定を行う必要がある。

総括

現在、分解性のプラスチックの材料としては化石資源を原料として最初から分解されるように設計された合成高分子、微生物の作る高分子、植物・動物由来の天然高分子が挙げられる。そして有用成分を作り出す従属栄養の微生物を原材料とするには餌となる有機物や適切な培養状況を作り出すことが必要となる。付加価値の高い有用成分を回収することができ、付加価値の高い製品ができるならともかく、使い捨てられるプラスチックに使用するためにはエネルギー、資源、労力、価格を考えると不適當である。分解されるように設計された化石資源を原料としたものは、資源の問題からも使用するには不適切である。また植物や動物由来の天然高分子はデンプン、セルロース、キチン、キトサンなどが挙げられ、現在商品化も進んでいる。しかしこのような生分解性プラスチックはその多くが食料を原料としたものであり、食用の原料は人間や家畜が使用すべきで、プラスチックの原料とするべきではない。生分解性のプラスチックを作成する際の原料としては使い捨てても人間が困らないものを選択すべきである。そこで我々研究チームは太陽光と二酸化炭素と水によって増殖をし、多糖を多く含んでいる植物である海藻の利用を考えた。大型藻は有用多糖を多量に回収することができる。しかし大型藻を海中から収穫することは、山に木を切りに行くことと同じである。多糖原料の回収を簡便化するには、陸上で液体培地で単細胞藻を培養すればパイプ輸送が可能となり、ろ過や遠心分離で集めることができる。

しかし、実際に単細胞藻を利用するには大量培養を行うことが必要であり、屋外で天日開放型培養を広大な敷地で行う必要がある。屋外で培養を行うことは滅菌培養タンクを用いたバッチ法での培養とは異なり、外部からのコンタミネーションの可能性が高くなり、目的藻だけを培養することが困難となる。そこで目的藻だけを選択的に培養する方法のひとつとして塩濃度の調節による選択培養を行う必要が出てくる。塩濃度を高めに設定し、塩耐性をもつ目的藻のみが増殖できる環境を作ることでその環境に適応できないものを増殖できないようにすれば選択的な天日開放型培養が可能となる。実際にその方法を用いてイスラエルやメキシコで *Donaliella* sp. の大量培養が行われている。この方法を行うには塩耐性がない淡水藻に塩耐性を持たせるよりも海産藻にさらなる塩耐性を持たせる方が有利であると考え海産の単細胞藻である *Phaeocystis* sp. を目的藻とした。我々は2倍塩濃度の海水で正常に生育する馴化株を開発した。

現在、この目的藻と廃パルプとの混練フィルムの作成に成功しており、工業化へ試行中である。しかしこの生分解性フィルムは強度などの面でまだ改良の必要がある。そこで本研究結果のようにハプトースが容易にはく離し、粉末化を行うことでさらなる研究開発の可能性が広がると考えられる。また粉末化を行うことで、フィルムだけでなく浄水剤などの多方面の利用が可能である。

地球環境の保全が重要視されている昨今において、このような生物材料を用いた研究開発は大変重要なことであり、また必要なことである。さらなる多方面への応用を模索するためまだ解明できていない未知の部分について今後さらに研究を行う必要がある。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、絶えず懇切な御指導と御助力を賜った高知工科大学工学部向畑恭男教授に深く感謝の意を表します。また、研究遂行上種々の有益なる御尽力をいただいた高知工科大学榎本恵一教授、大濱武教授、有賀修助教授、佐塚正樹講師、大阪教育大学生田享介助手に厚く御礼申し上げます。

本研究遂行にあたって絶えず御協力いただいた森川彰氏、田中宣秀氏、関裕美氏、石川香織氏、江村英人氏、岡花直人氏、環境生物工学研究室の卒業生及び在籍する諸君にここに厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 大石不二夫 (2000) : 図解プラスチックのはなし、日本実業出版社、東京
- 桜井直樹、山本良一、加藤陽治 (1991) : 植物細胞壁と多糖類、培風館、東京
- 白石信夫、谷吉樹、工藤謙一、福田和彦 (2000) : 実用化進む生分解性プラスチック、工業調査会、東京
- 土肥義治 (1990) : 生分解性高分子材料、工業調査会、東京
- 広田望 (1990) : 改訂版食品栄養実験、地球社、東京
- Biersmith, A. and R. Benner (1998) : Carbohydrates in phytoplankton and freshly dissolved organic matter. *Mar. Chem.*, 63, 131-144.
- Chen, Y. Q., N. Wang, P. Zhang, H. Zhou and L. H. Qu (2002) : Molecular evidence identifies bloom-forming *Phaeocystis* (Prymnesiophyta) from coastal water of southeast China as *Phaeocystis globosa*. *Biochem. Sys. Ecol.*, 30(1), 15-22.
- Hegarty, S. G. and T. A. Villareal (1998) : Effect of light level and N:P supply the competition between *Phaeocystis* cf. *Pouchetii* (Hariot) Lagerheim (Prymnesiophyceae) and five diatom species. *J. Exp. Mar.*, 226, 241-258.
- Hiroe, M., S. Sawant and K. Nisizawa (1977) : Analysis of sugar constituents of brown algal polysaccharides in view of comparative biochemistry. *Bull. Jap. Soc. Phycol.*, 25, 196-187.
- Rijssel, M. V. I. Janse, D. J. B. Noordkamp, W. W. C. Gieskes (2000) : An

inventory of factors that affect polysaccharide production by
Phaeocystis
globosa. *J. Sea Res.*, 43,297-306.