明 細 書

発明の名称 :

ワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法及びワックスエステル製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、バイオ燃料の原料となるワックスエステルを高含有する微細藻ユーグレナを低エネルギー・低コストで生産することが可能なワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法及びワックスエステル製造方法に関する。

背景技術

[0002] 地球温暖化問題がクローズアップされる昨今において、温室効果ガスの一つである二酸化炭素ガスの排出量を抑制することや、二酸化炭素を固定することにより大気中の二酸化炭素濃度を低減することは、大きな課題となっている。

このような状況下、固定化された二酸化炭素を含有する化石燃料をエネルギーとして使用することは、固定した二酸化炭素を再度大気中へ放出することにつながり、環境問題となっている。また化石燃料は有限な資源であるため、枯渇の問題もある。

上記のような問題を解決するために、化石燃料以外の燃料源が必要とされており、高等植物や藻類を原料としたバイオ燃料の開発に対する期待が高まっている。

[0003] バイオ燃料原料の候補となる高等植物としては、大豆、トウモロコシ、パームなどが知られているが、可食性作物を原料とする場合、食糧不足への懸念から問題になっている。一方、ジャトロファ、カメリナなどの非食性植物からの生産も進められているが、単位面積当りの生産量が低いことが問題となっている。

[0004] 一方、池や沼に広く生息する光合成微生物や原生動物は、植物と同様の光合成能を持ち、水と二酸化炭素から炭水化物や脂質を生合成し、細胞内に数

十質量％蓄積する。その生産量は、植物に比べて高く、単位面積当たりで、これらの生産量が高いと言われるパームの１０倍以上あることが知られている。

[0005] ところで、光合成微生物の一種である微細藻ユーグレナは鞭毛虫の一群で、運動性のある藻類として有名なミドリムシを含む。大部分のユーグレナは、葉緑体を持っており、光合成を行って独立栄養生活を行うが、捕食性のものや吸収栄養性のものもある。ユーグレナ（Euglena）は、動物学と植物学の双方に分類される属である。

[0006] 動物学では、原生動物門（Protozoa）の鞭毛虫綱（Mastigophorea）、植物鞭毛虫亜綱（Phytomastigophorea）に属する目の中にミドリムシ目（Euglenida）があり、これは三つの亜目、Euglenoidina、Peranemoidina、Petalomonadoidinaよりなる。

Euglenoidinaには、属としてEuglena、Trachelemonas、Strombonas、Phacus、Lepocinelis、Astasia、Colaciumが含まれる。植物学では、ミドリムシ植物門（Euglenophyta）があり、その下にミドリムシ藻類綱（Euglenophyceae）、ミドリムシ目（Euglenales）があって、この目に含まれる属としてはEuglenaの他、動物分類表と同様である。

[0007] ユーグレナは炭水化物としてパラミロン（Ｐａｒａｍｙｌｏｎ）を細胞内に蓄積する。パラミロンは、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体の粒子である。

[0008] ユーグレナは嫌気状態に置かれると、貯蔵多糖であるパラミロンを分解して脂肪酸と脂肪アルコールからなるワックスエステルを最終産物とするワックスエステル発酵を行う。

[0009] 非特許文献１には、ユーグレナを光照射下で培養した後、窒素源のない培地に置換した実験区では１細胞当たりのパラミロン蓄積量が増加するが、窒素源を添加した培地に置換した実験区では１細胞当たりのパラミロン含有量が低下することが記載されている。

特許文献１には、ユーグレナを好気的に培養し、その後嫌気条件下に置く

ことで貯蔵多糖パラミロンを発酵させてロウ・エステル（ワックスエステル）に変換させることが記載されている。

[0010] 特許文献２には、微細藻ユーグレナを好気的に培養し、不飽和脂肪酸を添加した後、嫌気条件下に置くことで貯蔵多糖パラミロンを発酵させてワックスエステルに変換させることで、良質の潤滑油として用いられるマッコウ鯨油の代替原料となる不飽和ワックスエステルを生産する方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特公平３－６５９４８号公報

特許文献2：特公平５－２７３８４号公報

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Sumida et al., Ammonia- and Linght-InducedDegradation of Paramylum in Euglena gracilis. Plant Cell Physiol. 28(8). P1587-1592 (1987)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] しかしながら、非特許文献１では、パラミロンの分解制御についてのみ記載されており、ワックスエステル発酵との組み合わせは示唆されていない。

[0014] また、特許文献１には、好気的培養の方法として、炭素源としてグルコース等の有機物を添加するか、通常の光合成条件下で培養する等の一般的な方法しか開示されていない。

バイオ燃料の製造において、グルコース等の炭素源を用いる培養法はコストに合わず、二酸化炭素の固定にもつながらない。

[0015] また、特許文献２に開示された技術は、不飽和ワックスエステルを高収量で得ることを目的としているが、バイオ燃料の原料としては飽和ワックスエステルである方が望ましい。

[0016] 本発明の目的は、上記各問題点を解決することにあり、光合成により二酸化炭素を炭素源として微細藻ユーグレナを好気的に培養した後、窒素飢餓状態でさらに培養することで細胞当たりのパラミロン蓄積量を増加させ、その後嫌気状態に置くことで、ワックスエステル高含有ユーグレナを生産することが可能なワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法及びワックスエステル製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0017] 上記課題は、本発明に係るワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法によれば、微細藻ユーグレナを好気的に培養する第１の工程と、前記微細藻ユーグレナが培養されている培地を窒素飢餓状態としてさらに培養する第２の工程と、細胞を嫌気状態下に保持する第３の工程とから成ることにより解決される。

[0018] このように、好気的に培養→窒素飢餓状態においてさらに培養→細胞を嫌気状態下に保持という一連の工程を実行することにより、ワックスエステルの含有量が高いユーグレナを効率的に生産することができる。

つまり、工程２の窒素飢餓状態における培養により、ユーグレナに炭水化物を十分に蓄積させることができる。

このため、工程３にて、工程２で培養した細胞を嫌気状態に置くことにより、工程２で十分に蓄積された炭水化物をワックスエステルに変換させることとなるため、結果的に工程３におけるワックスエステル蓄積量は飛躍的に増加することとなる。

換言すれば、これら工程１→工程２→工程３を組み合わせることにより、ワックスエステルの蓄積量が飛躍的に増加するという有利な効果を生じることとなる。

また、窒素飢餓状態で培養したユーグレナの細胞は嫌気処理直後でも培養時と同じ緑色を呈し、死滅する細胞はほとんどなく、細胞の大きさも嫌気処理前と変化しない。

つまり、窒素源を含まない培地で嫌気処理を行うと、窒素源を含む培地に

比べてユーグレナの細胞の生存率が大幅に改善するという有利な効果も生じる。

[0019] また、このとき、前記窒素飢餓状態は、前記培地を窒素欠乏培地に置換することにより創出すると、効率良く窒素飢餓状態が創出できるため好適である。

このように、好気的に培養→窒素欠乏培地に置換してさらに培養→細胞を嫌気状態下に保持という一連の工程を実行することにより、ワックスエステルの含有量が高いユーグレナを効率的に生産することができる。

[0020] 具体的には、前記第１の工程においては、前記微細藻ユーグレナを、窒素源を含まない培地で好気的に培養を開始するとともに、流加量を適宜調節して窒素源を加えて継続的かつ好気的に培養を行い、細胞濃度が一定に達したところで窒素源の流加を停止し、前記第２の工程においては、窒素飢餓状態に置いてさらに培養を行うと好適である。

更に、具体的には、前記第１の工程においては、二酸化炭素ガスを通気することにより、二酸化炭素源と混入している酸素源が付与されるものであり、前記二酸化炭素ガスは、発電所から排出されるものであるとより好適である。

[0021] このように構成されることによって、培養をメスアップして工業化することが可能となり、大量生産を行うことができる。

更に、排ガスとして取得できる二酸化炭素ガスを有効に活用することができるため、コスト面で有利であるとともに、環境面においても非常に有用な技術となる。

なお、工程２の窒素飢餓状態は、工程１で窒素源の流加を停止しているため、ユーグレナが窒素源を全て資化してしまう結果創出される。

[0022] また、前記第３の工程においては、不活性ガス通気、静置処理、遠心分離による濃縮から選択される少なくとも一つの方法により嫌気処理を行うと好適である。

これは、一種の方法を選択しても良いし、複数の方法を組み合わせてもよ

い。

[0023] また、上記課題は、本発明に係るワックスエステル製造方法によれば、請求項１乃至請求項５いずれかに一項に記載のワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法により生産されたワックスエステル高含有ユーグレナを使用し、有機溶媒で油分画を抽出して抽出液を得、該抽出液を濃縮してワックス成分を得る工程、前記ワックス成分からワックスエステルをカラムにより分離して第１の精製を行う工程、を実施することにより解決される。

[0024] このように、本発明においては、培養されたユーグレナより、簡易にワックスエステル成分を精製することができる。

このユーグレナは、上記請求項１乃至請求項６に記載の方法により、ワックスエステルを高含有した状態で簡易かつ大量に培養することができる。

よって、本発明によれば、大量に培養されたユーグレナを利用して、良質でクリーンな燃料を安定的に供給することが可能となる。

[0025] 具体的には、前記濃縮は、５０度±１０℃の範囲で実施すると好適である。

この温度より低いと、ワックス成分の粘性により突沸し、濃縮器であるエバポレータ内にワックス成分が噴出する可能性を否定できない。

[0026] 更に具体的には、前記第１の精製を行う工程により得られた前記ワックスエステルを加水分解し第２の精製を行う工程を次工程として実施すると好適である。

このように構成されていると、第１の精製において粗生成されたものを、第２の精製により更に精製を重ねることができ、より良質な燃料を提供することができる。

つまり、第１の精製を行う工程後、第２の精製において加水分解を行うことによって、炭素鎖が短くなり、揮発性が増して、燃料としての価値が上がる。

[0027] また、前記第１の精製を行う工程において、前記カラムに適用する溶出溶媒としてヘキサン若しくは、エーテルを１０容量％以下混合したヘキサンと

エーテルの混合溶媒を使用すると好適である。

このように構成されていると、効率よくクロロフィルを分離することができるとともに、他の色素も有効に排除することができるため好適である。

よって、より良質な燃料を提供することができる。

[0028] なお、上記ワックスエステル製造方法によりユーグレナから製造されたワックスエステルは、良質なバイオ燃料となり、これらは大量に安定的に提供することができる。

また、これはクリーンなエネルギーであり、環境問題等の改善に大きく寄与するものである。

[0029] 以上のように、前記課題を解決するため、本発明に係るワックスエステル製造方法は、ユーグレナを好気的に培養する培養工程と、培養工程の後、窒素飢餓状態でさらに培養することにより炭水化物を蓄積させる培養工程と、培養した細胞を嫌気状態に置くことにより炭水化物をワックスエステルに変換させる嫌気発酵工程とを含むことを最大の特徴としている。

発明の効果

[0030] 本発明によれば、光合成によって固定化した二酸化炭素から油脂含有量の多いバイオマス原料を安価に提供することができる。

また、本発明によってバイオ燃料を製造すればエネルギー自給率の向上にもつながる。

図面の簡単な説明

[0031] [図1]本発明の第１の実施形態に係るワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法を示す工程図である。

[図2]本発明の第２の実施形態に係るワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法を示すフローチャートである。

[図3]本発明の一実施形態に係るワックスエステルの製造方法を示す工程図である。

発明を実施するための形態

[0032] 以下、本発明の一実施形態を図面に基づいて説明する。

なお、以下に説明する構成は本発明を限定するものでなく、本発明の趣旨の範囲内で種々改変することができるものとする。

本実施形態は、好気的条件下でユーグレナを培養し、その後窒素飢餓状態でさらに培養した後、嫌気状態に置くことでワックスエステルを高含有させたユーグレナの生産方法に関する。

[0033] （第１の実施形態）

図1により、本発明に係るワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法の第１の実施形態について説明する。

本生産方法は、ユーグレナを窒素源添加した培地で好気的に培養する工程１（第１の工程に相当）と、窒素源を含まない培地に置換して好気的に培養する工程２（第２の工程に相当）と、嫌気処理を行い、炭水化物をワックスエステルに発酵させる工程３（第３の工程に相当）とを含んでいる。

[0034] まず、工程１におけるユーグレナの培養は、二酸化炭素源として大気を培地に通気することにより行うこともできるが、培養効率を上げるため、二酸化炭素ガスを培地に通気する方が好ましい。

つまり、大気や二酸化炭素ガスには酸素も含まれているため、これによって好気的に培養を行うものである。

二酸化炭素ガスの通気は、例えば、工場や発電所等から排出される燃焼排ガスを利用することにより行うことができる。このとき、集塵機、脱硝装置、脱硫装置等により燃焼排ガス中の塵埃、ＮＯｘおよびＳＯｘを取り除いておくのが好ましい。また、攪拌は通気によるエアリフト方式や、攪拌ハネを用いる方法等、一般的な技術を用いることができる。

[0035] 光は蛍光灯等の人工光を照射することにより行うこともできるが、より低エネルギー・低コストに培養するために太陽光のみで培養を行うことが望ましい。

また、培地の水温は、２９±１℃に制御するのが好ましい。

ただし、水温制御にエネルギーを投入しないように温度制御は行わないか、水温制御を行うにしても、ユーグレナが死滅するような高温にならないよ

う冷却を行うことや、冬季や夜間に水温が低下しすぎないように暖める等の最小限の制御を行うと好適である。

[0036] ユーグレナの培地組成は、例えば、改変Cramer-Myers培地（（NH_4）$_2$ＨＰO_4 １．０ｇ／Ｌ、KH_2PO_4 １．０ｇ／Ｌ、$MgSO_4$・７H_2O ０．２ｇ／Ｌ、$CaCl_2$・２H_2O ０．０２ｇ/Ｌ、ＥＤＴＡ・２Ｎａ ０．０５ｇ／Ｌ、$Fe_2(SO_2)_3$・７H_2O ３ｍｇ／Ｌ、$MnCl_2$・４H_2O １．８ｍｇ／Ｌ、$CoSO_4$・７H_2O １．５ｍｇ／Ｌ、$ZnSO_4$・７H_2O ０．４ｍｇ／Ｌ、Na_2MoO_4・２H_2O ０．２ｍｇ／Ｌ、$CuSO_4$・５H_2O ０．０２ｇ／Ｌ、チアミン塩酸塩（ビタミンB_1） ０．１ｍｇ／Ｌ、シアノコバラミン（ビタミンB_{12}）、（ｐＨ３．５））を用いることができる。なお、（NH_4）$_2$ＨＰO_4は、（NH_4）$_2SO_4$やNH_3ａｑに変換することも可能である。

なお、培地組成がこれに限定されるものでないことは言うまでもない。

[0037] 培地のｐＨは、２～７．５の範囲内であればよいが、３．５又は５．５に調整するのが好ましい。特に、４．５以下の酸性とすることで、動物性プランクトンや細菌等のコンタミネーションを有効に抑制することができる。

[0038] 次いで、工程２では、窒素源を含まない培地に置換して、さらに培養を行う。

工程２における窒素源を含まない培地組成は、例えば、Ｒｅｓｔｉｎｇ培地、１％マンニトール、０．２％ $MgCl_2$・６H_2O、０．１４％ KH_2PO_4を用いることができる。

なお、培地組成は窒素源が含まれていない限り、これに限定されるものでないことは言うまでもない。

[0039] 次いで、工程３では、培養したユーグレナの嫌気処理を行う。

嫌気処理は、通常、培養後の培地に窒素ガス等の不活性ガスを通気することにより行う。また、嫌気処理は培地を静置することによっても行うことができる。培地を攪拌せずに静置すると細胞が沈降し、高密度になることによって結果的に酸素不足となるためである。遠心分離により高密度状態を作り

出すことで嫌気処理を行ってもよい。

このときのｐＨは、極端に低い、又は高い値でなければよく、光照射の有無はワックスエステル発酵には影響がない。保持温度はユーグレナが死滅するような高温、培地が凍結するような低温でなければ良い。通常、６時間～７２時間でワックスエステル発酵は終わる。

[0040] なお、工程２の窒素飢餓状態における培養により、ユーグレナに炭水化物を十分に蓄積させることができる。

このため、工程３にて、工程２で培養した細胞を嫌気状態に置くことにより、工程２で十分に蓄積された炭水化物をワックスエステルに変換させることとなるため、結果的に工程３におけるワックスエステル蓄積量は飛躍的に増加することとなる。

[0041] 換言すれば、これら工程１→工程２→工程３を組み合わせることにより、ワックスエステルの蓄積量が飛躍的に増加するという、各工程単独では得られない有利な効果を生じることとなる。

[0042] また、下記実施例にて詳述するが、窒素飢餓状態で培養したユーグレナの細胞は嫌気処理直後でも培養時と同じ緑色を呈し、死滅する細胞はほとんどなく、細胞の大きさも嫌気処理前と変化しない。

つまり、窒素源を含まない培地で嫌気処理を行うと、窒素源を含む培地に比べてユーグレナの細胞の生存率が大幅に改善するという有利な効果も生じる。

以上より、これら工程１→工程２→工程３を組み合わせることによって、従来と比して飛躍的多量のワックスエステルを含有した細胞活性の高いユーグレナを得ることができる。

[0043] （第２の実施形態）

図２により、本発明に係るワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法の第２の実施形態について説明する。

なお、培地組成、培養条件等は、第１の実施例と同様であるため、同様の説明は省略し、相違点のみ説明する。

[0044] 工程１における好気培養工程は、第１の実施形態の工程１における改変Cramer-Myers培地から窒素源を抜いたものを使用する。

つまり、スタート段階では、窒素源を含まない培地で好気的にユーグレナの培養を開始する。

工程１においては、まず、ステップＳ１において、ユーグレナを接種した培地に窒素源を流加する。

[0045] そして、ステップＳ２により好気培養を行う。

次いで、ステップＳ３において、窒素源添加を終了してよいか否かを判定する。

ステップ３において、窒素源添加を終了しないと判定されれば（ステップＳ３：Ｎｏ）、処理は、ステップＳ１に戻り窒素源を流加する。

また、ステップ３において、窒素源添加を終了してよいと判定されれば（ステップＳ３：Ｙｅｓ）、処理は、ステップＳ４に進み、窒素源添加を終了する。

つまり、工程１においては、窒素源を徐々に流加し、窒素源を含む好気培養を行うこととなる。

この窒素源の流加量等は、天候、気温等の条件に依存し、これらの条件を勘案することにより適宜調整される。

なお、窒素源添加を終了する目安としては、本実施形態においては、上記条件等も勘案しながら、例えば、細胞濃度が一定に達した時期等が選択される。

[0046] 次いで、工程２（ステップＳ５）において、継続して好気培養を必要期間行う。

このとき、初期の段階では窒素源が残留しているが、時間が経つにつれ窒素源はユーグレナにより資化され、窒素源飢餓状態となる。

このため、所謂工程２の「好気培養工程　窒素源なし」という培養工程が成立する。

次いで、ステップＳ６にて、工程３の嫌気発酵工程が実施されるが、この

工程は、第１の実施形態と同様である。

[0047] なお、窒素源を添加する方法としては、窒素源を培養開始時に一度に投入する方法も考えられる。

この場合は、初期の段階では窒素源が残留しているが、時間が経つにつれ窒素源はユーグレナにより資化され、窒素源飢餓状態となる。

このため、窒素飢餓状態での好気培養、すなわち、「好気培養工程　窒素源なし」という培養工程が成立することとなる。

[0048] 上記第２の実施形態に係るワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法は、工業化ラインにスケールアップした際に有効である。

つまり、連続運転により培養を行うことが可能となり、培地置換のための遠心分離作業等が不要となる。

よって、培養に必要なエネルギー使用量を減少させて、ワックスエステル高含有ユーグレナの大量生産に有効に適用される。

[0049] 次いで、図３を参照し、本実施形態に係るユーグレナからのワックスエステル製造方法の工程を説明する。

まず、工程１でユーグレナを培養する。これは、上記第１の実施形態又は第２の実施形態に係る生産工程に係る培養である。

[0050] 次いで、工程２でワックスエステルを抽出する。

その後、工程２で得られた成分を工程３で第１の精製にかけ、次いで、工程４で第２の精製にかけ、ワックスエステルを得る。

第１の精製では、有機溶媒によりユーグレナからワックスエステルを抽出し、第２の精製では、カラムによりワックスエステルの分離精製を行う。

このようにして精製されたワックスエステルはこれを含有するバイオ燃料として有効に利用することができる。

実施例

[0051] （ワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法について）

以下に、本発明に係るワックスエステル高含有ユーグレナについて、一実施例を示して具体的に説明する。

[0052] この実施例では、Euglena graclilis Z株を用いた。

培地は改変Cramer-Myers培地（（$(NH_4)_2HPO_4$ １．０ｇ／Ｌ、KH_2PO_4 １．０ｇ／Ｌ、$MgSO_4・7H_2O$ ０．２ｇ／Ｌ、$CaCl_2・2H_2O$ ０．０２g/Ｌ、ＥＤＴＡ・２Ｎａ ０．０５ｇ／Ｌ、$Fe_2(SO_2)_3・7H_2O$ ３ｍｇ／Ｌ、$MnCl_2・4H_2O$ １．８ｍｇ／Ｌ、$CoSO_4・7H_2O$ １．５ｍｇ／Ｌ、$ZnSO_4・7H_2O$ ０．４ｍｇ／Ｌ、$Na_2MoO_4・2H_2O$ ０．２ｍｇ／Ｌ、$CuSO_4・5H_2O$ ０．０２ｇ／Ｌ、チアミン塩酸塩（ビタミンB_1） ０．１ｍｇ／Ｌ、シアノコバラミン（ビタミンB_{12}）、（ｐＨ５．５））をオートクレーブ滅菌することにより調整した。

[0053]（工程１：好気培養）

調製した培地８８０ｍｌを１Ｌ容量の振とうフラスコに入れた後、初期濃度が約０．０５ｇ／Ｌになるようにユーグレナの種藻体を接種し、２９℃に設定した人工気象器（サンヨー社製、ＧＲＯＷＴＨ ＣＡＢＩＮＥＴ）内で９日間振とう培養した。光照射強度は約１００μｍｏｌ／（m^2・ｓ）とし、光照射時間は２４時間連続とした。フラスコには、通気濃度１０％の二酸化炭素ガスを供給した。

[0054]（工程２：窒素欠乏培養）

９日間培養した後、培養液を２つに分け、窒素源を含まない培地、窒素源を含む培地それぞれに置換した。

具体的には、８８０ｍｌの培養液から４２０ｍｌずつの培養液をとり分け、それぞれ遠心分離して上清を捨てた後、一方の沈殿には窒素源を抜いた改変Cramer-Myers培地（以下、窒素源欠乏培地） KH_2PO_4 １．０ｇ／Ｌ、$MgSO_4・7H_2O$ ０．２ｇ／Ｌ、$CaCl_2・2H_2O$ ０．０２g/Ｌ、ＥＤＴＡ・２Ｎａ ０．０５ｇ／Ｌ、$Fe_2(SO_2)_3・7H_2O$ ３ｍｇ／Ｌ、$MnCl_2・4H_2O$ １．８ｍｇ／Ｌ、$CoSO_4・7H_2O$ １．５ｍｇ／Ｌ、$ZnSO_4・7H_2O$ ０．４ｍｇ／Ｌ、$Na_2MoO_4・2H_2O$ ０．２ｍｇ／Ｌ、$CuSO_4・5H_2O$ ０．０２ｇ／Ｌ、チアミン塩酸塩（ビタミンB_1） ０．１ｍｇ／Ｌ、シアノコバラミン（ビタミンB_{12}）、（ｐＨ５．５））を

４２０ｍｌ、もう一方の沈殿には新たなＣＭ培地（窒素源含む）を４２０ｍｌ加えて沈殿を懸濁した。

窒素源欠乏培地に置換した培養液をサンプル１、新たなＣＭ培地に置換した培養液をサンプル２とする。

[0055] 培地交換をした後、サンプル１とサンプル２共に、２９℃に設定した人工気象器内で４８時間さらに振とう培養した。光照射強度は約１００μｍｏｌ／（m^2・ｓ）とし、光照射時間は２４時間連続とした。フラスコには、通気濃度１０％の二酸化炭素ガスを供給した。

[0056] （工程３：嫌気処理）

培地置換培養をした後、サンプル１とサンプル２の乾燥重量を測定し（表１Ａ）、２９℃に設定した人工気象器内で遮光してフラスコを密栓し、静置することにより細胞を嫌気状態に置いた。

[0057] 培養液中におけるユーグレナ細胞の乾燥重量の測定方法は以下の通りである。

１０５℃で３０分間、乾燥機内であらかじめ乾燥し、重量を測定した約１μｍの孔径をもつガラスろ紙ＧＳ－２５（ＡＤＶＡＮＴＥＣ社製）で培養液１ｍｌをろ過した。次にガラスろ紙を１０５℃に設定した乾燥機に入れて１時間乾燥させた。その後、真空デシケータ内で減圧しながら２０分間脱湿・冷却後、精密天秤にて重量測定した。ろ過前後のろ紙の重量の差を、１ｍｌ当たりの乾燥重量とした。

[0058] ４８時間嫌気処理を行った後、両サンプルを回収した。回収した４００ｍｌの培養液を、遠心分離機（コクサン社製、Ｈ－１０３ＦＮ）を用いて５分間、３，０００ｒｐｍ、常温で遠心分離した後、上清を捨て、沈殿した藻体を回収した。回収した藻体は冷凍した後、凍結乾燥した。

[0059] （脂質の抽出）

５０ｍｌ容量のナスフラスコを真空デシケータ内で1時間程度乾燥させ、ナスフラスコ自体の重量を測定した。凍結乾燥したユーグレナ粉末をスパーテルなどで破砕し、その粉末を５０ｍｌ容量の三角フラスコに測りとった。こ

のとき、サンプル１の重量は０．６９３ｇ、サンプル２の重量は０．４８０ｇであった（表１Ｂ）。

次に、各サンプルに２０ｍｌのヘキサンを加えて懸濁した。粉末のダマをさらに破砕するため、３０秒間超音波破砕した。自然沈降後の上清をパスツールピペットにて５０ｍｌ容量の蓋付ガラス製遠心管に移し、１０分間、３，０００rpmにて遠心分離し、上清はろ紙（Advantec社、NO.2）を介してろ過した。

抽出操作は、溶媒をかえながら計９回繰り返した。

つまり、ヘキサンを用いて上記の抽出操作を３回繰り返した後、有機溶媒をアセトンにかえて同様に３回抽出操作を行い、最後にヘキサンとアセトンを１：１で混合した溶媒を用いて３回抽出操作を行った。

その後、ロータリーエバポレータ（東京理化器械社製、ＲＯＴＡＲＹ　ＶＡＣＣＵＵＭＥＶＡＰＯＲＡＴＯＲ）を用いて、ろ液入りのナスフラスコを４０～５０℃で湯浴し、ヘキサン・アセトンを蒸発させた。少量のヘキサンを用いて、ナスフラスコ内を洗いこみながら、秤量済みのナスフラスコに移した。この操作を４回繰り返した後、上記と同様にヘキサンを蒸発させた。

ナスフラスコにアルミホイルでフタをし、真空デシケータに入れて残りのヘキサンを蒸発させながら、３０分～１時間程度、乾燥させた。

ユーグレナ粉末から脂質を抽出した後のナスフラスコの重量を測定し、最初に測定したナスフラスコ自体の重量を差し引いて、脂質重量を算出した（表１Ｃ）。

なお、本抽出方法によって抽出される脂質は、そのほとんどがワックスエステルで構成されている。

[0060] 本実験の結果、最終的な粗脂質の抽出量は窒素欠乏培地で培養したサンプル１が０．１８８ｇ、窒素源を含むＣＭ培地で培養したサンプル２が０．１５７ｇであり、窒素欠乏培地で培養した方が粗脂質の終了は０．０３１ｇ多かった（表１Ｃ）。

[0061] また、嫌気処理前の乾燥重量に対する粗脂質の含有率は、窒素欠乏培地で

培養したサンプル１は２３％、窒素を含むＣＭ培地で培養したサンプル２は１６％であり、窒素欠乏培地で培養した方が脂質含有率も７％高かった（表１Ｃ／Ａ）。

[0062] さらに、サンプル１は嫌気処理の前後で約０．１２０ｇ細胞重量が減少していたが、サンプル２では０．５０７ｇも細胞数が減少していた（表１Ｂ）。嫌気処理直後のサンプル２の培養液は茶色く変色しており、顕微鏡観察したところ、死滅した細胞が多く、生きている細胞も大きさは小さくなっていた。一方、サンプル１は嫌気処理直後でも培養時と同じ緑色を呈し、顕微鏡観察したところ、死滅した細胞はほとんどなく、細胞の大きさも嫌気処理前と変わらなかった。以上の結果から、窒素源を含まない培地で嫌気処理を行うと、窒素源を含む培地に比べて細胞の生存率が大幅に改善することがわかった。

結果を、表１にまとめる。

[0063] [表1]

	A 嫌気処理前 乾燥重量 （ｇ／４００ｍｌ）	B 嫌気処理後 乾燥重量 （ｇ／４００ｍｌ）	C 粗脂質 抽出量 （ｇ／４００ｍｌ）	C／A 脂質含有率 （％）
サンプル１ （窒素源 欠乏培地）	０．８１３	０．６９３	０．１８８	２３
サンプル２ （ＣＭ培地）	０．９８７	０．４８０	０．１５７	１６

[0064] 以上より、窒素飢餓状態に置いた実験区では、窒素源を含む培地で培養した実験区に比べて最終的な脂質の収量が増加した上、嫌気処理前後の細胞の生存率も著しく改善することがわかった。

[0065] （ワックスエステルの分離精製について）

次いで、ユーグレナからワックスエステルを抽出して精製する手順の一実施例について説明する。

本実施形態においては、粉末化したユーグレナを使用して、ユーグレナ体内に貯蔵されていたワックスエステルを抽出して精製した（工程２）。

（材料）

ユーグレナ粉末	１０ｋｇ
ヘキサン	６０Ｌ
エーテル	１Ｌ
Wakogel C-300	３００ｇ

[0066] １．抽出及びろ過

（１）ユーグレナ１ｋｇを秤量し、２．５Ｌヘキサンに縣濁した

（２）ブレンダーにて激しく撹拌した

３０秒×３回

（３）１０分間室温で放置し、ユーグレナ粉末を自然沈殿させた

（４）上澄液をろ紙にて吸引ろ過した

（５）沈殿物をブフナーロートに移し、沈殿物に付着した油成分を搾った

（６）（４）の炉液及び（５）の回収液をナスフラスコに移し、ロータリーエバポレーターで濃縮した（濃縮条件：温度５０℃±１０℃、減圧度１００ｍｍＨｇ～１５０ｍｍＨｇ）この濃縮液を以下、「濃縮サンプル」と記す。

[0067] ２．分離精製（工程３）

（１）ガラスカラム（100φ）にヘキサンで縣濁したWakogel C-300を３０センチ程度充填（約３００ｇ充填）した

（２）１カラムボリュームのヘキサンを流してカラムを平衡化した

（３）約５００ｇ程度の濃縮サンプルをカラムにアプライした

（４）溶出溶媒にて、カラムに保持された濃縮サンプルからワックス成分を分離した溶出溶媒は、

ａ．ヘキサン：エーテル＝１００：　０（以下、「溶出溶媒ａ」と記す）

ｂ．ヘキサン：エーテル＝　９５：　５（以下、「溶出溶媒ｂ」と記す）

ｃ．ヘキサン：エーテル＝　９０：１０（以下、「溶出溶媒ｃ」と記す）

の３種類を使用した

（５）分離したワックス成分を酸加水分解を行うことにより第２の精製を行った（工程４）。

[0068] 結果

上記方法により実施したワックスエステルの抽出結果を示す。

（１）ユーグレナ１０Ｋｇから、約３Ｌ程度のワックス成分が抽出された。

最終的な回収率より、一度のヘキサン抽出で、ワックス成分はほぼ全て回収できると考えられる。

（２）ろ過を行う際には、ろ過性が良好ではないため、ろ紙上にセライトを撒いてろ過を行った。

（３）濃縮を行う際には、３０℃前後程度で濃縮を行うと、揮発熱によって濃縮液が冷えて表面からワックス成分の粘性が高まり、突沸によってエバポレーター内に噴出する。これを回避するために、５０℃前後程度で濃縮を行うと、ワックス成分の粘性が低下し、突沸によってエバポレーター内に噴出することを回避できた。

（４）１カラムボリュームのヘキサンを流してカラムを平衡化した後、約５００ｇ程度の濃縮サンプルをカラムにアプライしたが、２８０ｇ程度は保持されず、そのまま溶出した。そのため、溶出溶媒ａを２カラムボリューム流し、保持されていない成分を溶出して濃縮した。

（５）次に、溶出溶媒ｂを３カラムボリューム分流して溶出及び濃縮を行ったところ、ワックス成分は、黄色の色素とともに溶出されることがわかった。

（６）次に、完全にワックス成分を溶出するために、溶出溶媒ｃを３カラムボリューム分流して溶出及び溶出を行った。

この際、約２４０ｇ（３００ｍＬ）程度のワックス成分が回収できた。

なお、クロロフィル成分は分離できたが、いくつかの色素は非常に低濃度

ながらも残存していた。

[0069] 考察

上記の結果より、ワックス成分を２４０ｇ程度保持するために必要であったカラム容量は、約２Ｌ（約１ｋｇ）で、溶出に要した溶媒の量は、９カラムボリューム（約１８Ｌ）であった。

ワックス成分が２．５ｋｇであった場合、必要なカラム容量は、約２４Ｌ（約１２ｋｇ）であり、溶出に要する溶媒の容量は約２００Ｌ程度であることがわかる。

[0070] 以上のように、分離後、加水分解を行うことによって、ワックスエステルの炭素鎖が短くなり、揮発性が増して、燃料としての価値が上がる。

そして、このワックスエステルをバイオ燃料として有効に使用することができる。

ユーグレナは、健康食品等にも使用されているとおり、簡易に手に入る微生物であるとともに、大量に培養することが可能である。

このような微生物であるユーグレナより良質なワックスエステルを回収することにより、クリーンなエネルギーを安定的に供給することができる。

なお、本例においては、有機溶媒での抽出を実行したが、抽出方法はこれに限られることはなく、例えば、水での分離、二酸化炭素流体を用いた方法、圧搾等の物理的方法も用いることができる。

請求の範囲

［請求項1］ 微細藻ユーグレナを好気的に培養する第１の工程と、前記微細藻ユーグレナが培養されている培地を窒素飢餓状態としてさらに培養する第２の工程と、細胞を嫌気状態下に保持する第３の工程とから成るワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法。

［請求項2］ 前記窒素飢餓状態は、前記培地を窒素欠乏培地に置換することにより創出することを特徴とする請求項１に記載のワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法。

［請求項3］ 前記第１の工程においては、前記微細藻ユーグレナを、窒素源を含まない培地で好気的に培養を開始するとともに、流加量を適宜調節して窒素源を加えて継続的かつ好気的に培養を行い、細胞濃度が一定に達したところで窒素源の流加を停止し、

前記第２の工程においては、窒素飢餓状態に置いてさらに培養を行うことを特徴とする請求項１に記載のワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法。

［請求項4］ 前記第１の工程においては、二酸化炭素ガスを通気することにより、二酸化炭素源と混入している酸素源が付与されることを特徴とする請求項１又は請求項３に記載のワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法。

［請求項5］ 前記二酸化炭素ガスは、発電所から排出されるものであることを特徴とする請求項４に記載のワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法。

［請求項6］ 前記第３の工程においては、不活性ガス通気、静置処理、遠心分離による濃縮から選択される少なくとも一つの方法により嫌気処理を行うことを特徴とする請求項１に記載のワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法。

［請求項7］ 請求項１乃至請求項６いずれかに一項に記載のワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法により生産されたワックスエステル高含有

ユーグレナを使用し、

有機溶媒で油分画を抽出して抽出液を得、該抽出液を濃縮してワックス成分を得る工程、

前記ワックス成分からワックスエステルをカラムにより分離して第１の精製を行う工程、

を実施することを特徴とするワックスエステル製造方法。

［請求項8］ 前記濃縮は、５０度±１０℃の範囲で実施することを特徴とする請求項７に記載のワックスエステル製造方法。

［請求項9］ 前記第１の精製を行う工程により得られた前記ワックスエステルを加水分解し第２の精製を行う工程を次工程として実施することを特徴とする請求項７に記載のワックスエステル製造方法。

［請求項10］ 前記第１の精製を行う工程において、前記カラムに適用する溶出溶媒としてヘキサン若しくは、エーテルを１０容量％以下混合したヘキサンとエーテルの混合溶媒を使用したことを特徴とする請求項７に記載のワックスエステル製造方法。