

ボツリオコッカスの培養促進に関する諸条件の効果について

日大生産工（院） ○野崎 久寛
日大生産工 遠藤 茂勝

1. はじめに

トウモロコシなどを原料とするバイオ燃料は、燃料であると同時に我々の食料でもあるため、食用作物以外での燃料生産技術の開発が望まれている。

そのような中、光合成を行うことで、たんぱく質と炭化水素を作り出す性質を持つ微生物としてボツリオコッカスがあり、新たな資源としての活用が期待されている。

微生物は適切な養分と環境を整えれば、人為的な培養も可能であり、次世代のエネルギーとしての実用化を考え、この微生物の大量培養を目的とした。

本研究では、ボツリオコッカス（*Botryococcus braunii* Kützing NIES-2199）の培養促進のための培地条件について検討を行った。

2. 培地成分と条件

培養実験では、一般的に、藻類に有効であるとされる C 培地（緑藻用）を基礎培地に設定し、これを基に培地に含まれる成分のうち、培養に最も効果的な成分を見出すため、成分の比率を変化させながら培養を行った。

C 培地については、Table-1 に示すように成分 A～E の 5 つに分類し、効果を検証した。

2.1 培地の成分構成

(1) 培地条件 1

一般的に、藻類は窒素、リン酸、カリウムが増殖

に有効な成分とされていることから、本実験では窒素成分を含む試薬 A・B のみについて組成比率を変化させた。比率調整をしていない基礎培地（以後 OR 培地という）に対して、試薬 A の効果を検証するために A のみ 10 倍、100 倍したものを AT、AH、試薬 B の効果を検証するために B のみを 10 倍、100 倍したものを BT、BH とし、同様に、A および B をそれぞれ 10 倍したものを ATBT、100 倍したものを AHBH とした。

培養環境は、すべて蛍光灯下（約 1460Lux）で 24 時間照射し、室温 25℃に保ち培養した。

(2) 培地条件 2

培養条件 1 の結果より、試薬 A が培養に効果的に働き、試薬 B を増加させた培地は効果的な増殖が確認できなかったことから、次の条件として、試薬 A のみの比率を変化させた培地を作製し、どの割合が最も効率よく培養できるかの検討を行った。

培養条件は Table-2 に示すように、試薬 A のみを OR 培地の 10 倍、50 倍、100 倍、150 倍として、計 4 種類の条件で比較・検討を行った。

培養環境は、すべて培養条件 1 と同じにした。

3. 実験結果および考察

培養結果の判定については、デジタル画像を用い、菌の色素面積のピクセル数から判定した。すべての培地において、時間経過に伴って増殖量がどの程度

Table-1 実験に用いた培地の成分構成（培地条件 1）

培地記号	薬品名				
	A (mg)	B (mg)	C (mg)	D (mg)	E
	Ca (NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	KNO ₃	β -Na ₂ グリセロリン酸	MgSO ₄ · 7H ₂ O	ビタミンB ₁₂ 0.01 μg ビオチン 0.01 μg チアミンHCl 1 μg PIV metals 0.3mℓ トリスアミノメタン 50mg
OR	15	10	5	4	
AT	×10	10	OR培地に同じ	OR培地に同じ	OR培地に同じ
AH	×100	10			
BT	15	×10			
BH	15	×100			
ATBT	×10	×10			
AHBH	×100	×100			

The effect of many conditions about the culture promotion of *Botryococcus*
Hisanori NOZAKI, Shigekatsu ENDO

進行したかを、培養日のピクセル数を 1.00 とし、それぞれの培地において、1 週間ごとの色素ピクセル数の割合と比較し、増殖量として示した。

(1) 培養条件 1 における増殖効果

それぞれの培地について培養日から 1 週間間隔の増殖量を縦軸にとり、変化を示したものが Fig.1 である。1 週間が経過した時点で、培地 AT は OR に比べて増殖が多く、それ以外の培地では OR より増加が少ないことがわかる。測定から 2 週間経過したところで、AT に関しては初期の量の約 2.1 倍と著しい増加がみられ、5 週後では約 2.6 倍であった。

この結果から、試薬 A を増加させることで増殖量が増加することが確認できた。しかし、AH 培地のように適量以上に増加させると、OR 培地よりも増加量が少なく、逆に増殖を抑制することになり、培養には適さないといえる。また、試薬 B を増加させた培地においても OR 培地よりも増殖が少なく、試薬 B を増加させることは効率的ではないと考えられる。

この結果により、試薬 B よりも試薬 A のほうが有効な成分であると考えられる。

(2) 培養条件 2 における増殖効果

培養条件 1 の結果と同様の手順で、時間経過に伴う菌体の増殖量を解析した。

試薬 A の効果については Fig.2 に示すように、増殖量を縦軸に示したもので、50 倍の培地が培養開始から 33 日目で約 1.33 倍に増殖し、10 倍の培地よりも効果が高く、最も効率よく培養できていることがわかる。しかし、条件 1 の結果でも示されたように、試薬 A の濃度を 100 倍や 150 倍のように濃くすることは増殖を抑制することが確認できた。

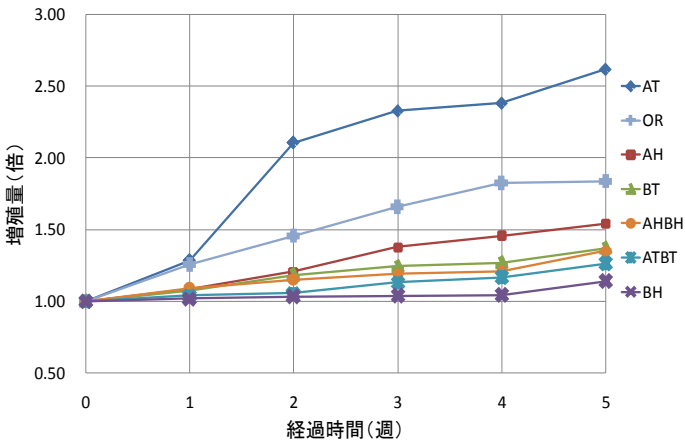


Fig. 1 時間経過に伴う菌体の増加量 (AT～BH)

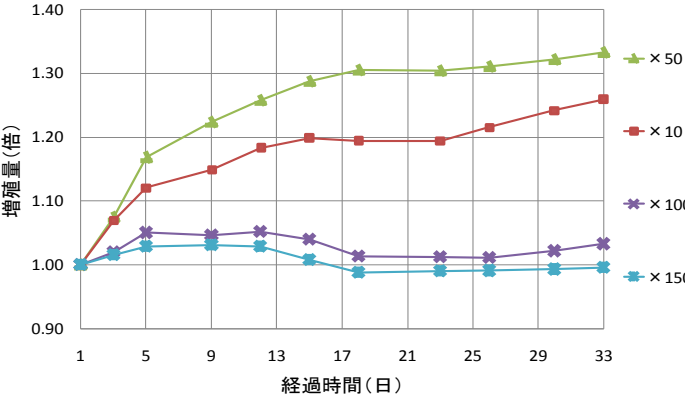


Fig. 2 時間経過に伴う菌体の増加量 (×10～×150)

4. まとめ

- 1) 実験 1 より、ボツリオコッカスの培養には、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ が効果的に作用することが確認できた。 KNO_3 を増加させた培地においても、増殖を確認することはできたが、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を増加させた場合よりも効果は少なく、高速かつ大量に培養することについては適していないといえる。
- 2) 実験 2 より、100ml 当たり 750mg の $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 加えることが、最も培養に適していることがわかったが、適量以上加えると逆に増殖を抑制してしまうことが確認できた。

Table-2 実験に用いた培地の成分構成 (培地条件 2)

培地記号	薬品名				
	A (mg)	B (mg)	C (mg)	D (mg)	E
	Ca(NO ₃) ₂ ・4H ₂ O	KNO ₃	β-Na ₂ グリセロリン酸	MgSO ₄ ・7H ₂ O	ビタミンB ₁₂ 0.01 μg ビオチン 0.01 μg チアミンHCl 1 μg PIV metals 0.3m0 トリスアミノメタン 50mg
	OR	15	10	5	4
×10	×10	OR培地に同じ	OR培地に同じ	OR培地に同じ	OR培地に同じ
×50	×50				
×100	×100				
×150	×150				