

## 甘蔗糖蜜を炭素源とするクロレラの培養について

(沖縄クロレラ研) O比嘉義邦, 渡慶次登喜江

1. 目的 甘蔗の製造過程で副産物として生産される廃糖蜜は、古くからアルコール醗酵、食飼料用醗母の生産原料として利用されているが、廃糖蜜を炭素源とするクロレラ等微細藻類の培養に関する報告は少ない。一般に、クロレラの糖蜜資化率は低いといわれ、寺塚等<sup>1)</sup>は、糖蜜中に含まれる蔗糖を酸加水分解することにより炭素源としてクロレラの培養が可能であると報告している。しかしながら、クロレラの増殖率、藻体濃度に関して高い値を得ていない。今回、演者等は、沖縄本島に産するクロレラ野性株を15株分離し、その中から糖蜜資化率の高い株をスクリーニングして、クロレラ藻体の安価な生産を目的とした、甘蔗糖蜜を唯一炭素源とするクロレラの基礎的培養条件、更に、糖蜜培養で得たクロレラ藻体の一般成分、アミノ酸組成、クロロフィル含有量などを検討したので報告する。

2. 方法 1) 糖蜜の前処理; 糖蜜は不溶性の無機塩などの夾雑物を含有するため、そのまま培養に用いることができないので、4~5倍量の水で希釈し、連続遠心器により14000 rpmで清澄処理したものを本実験に使用した。2) 供試藻株; 本報で実験に供したクロレラ野性株は、沖縄本島各地から15株を採取し、各々、1%グルコースを含有するMyers-4NA5培地(硝酸カリウム5g, 硫酸マグネシウム2.5g, リン酸-カリウム1.25g, 硫酸第一鉄0.003g, Arnon-As液1ml, 蒸留水1000ml, pH 5.5)を使用して混釈分離法により純粋分離した。次に、2%糖蜜を含有するMyers培地にて5日間振盪培養を行い比較的増殖率の高い野性株, MA004, MA005, MA008, MA016株を得た。更に、これら4株も2%糖蜜液体培地中で照度400~1000, 温度25~30°Cの条件下で60~90日間静置培養で馴致した。馴致処理した4株の中から増殖率が最も高い *Chlorella* sp. MA016株を得た。これも更に、1%糖蜜を含有するMyers培地により純化した。その後、1%糖蜜を含有するMyersの寒天斜面培地に保存して本実験に供した。3) 培養の実施; Myers-4NA5培地を基本培地として、窒素源は尿素, 硫酸アンモニウム, 硝酸カリウムを用いた。糖蜜は0.5~5%(V/V)で使用し至適濃度を検討した。光源は白色けい光ランプを使用した。培養は、500ml容の肩付フラスコ(液量100ml, 200ml), NBS MF-114型ジャーファーマンター(液量5l, 10l)を使用し、培養条件は温度10~40°C, 照度0~10 Klux, pH 3.0~10.0に設定し、振盪もしくは通気攪拌培養を実施した。連続培養は糖蜜制限によるケモスタット培養法を行った。クロレラの乾燥重量(g/l), 藻体容積(PCV ml/l), 細胞数, 一般成分, アミノ酸組成, 全クロロフィル量は常法に従い、還元糖量はソモジー法によって測定した。

3. 結果 1) 供試藻株の形態および生理的特性; 細胞は球形で4~10μ, 核1個を有し、ピレノイドをもたない、葉緑体1個を有し通常カップ状である、細胞内に2~8個の自生胞子を形成し分裂する、細胞壁は平滑で粘質膜をもたない。明、暗条件下で、グルコース、フラクトース、サッカロース、マルトース、ラクトース、キシロース、酢酸、リンゴ酸、

## シンポジウム (生化学工業などにおける副産物の利用)

クエン酸, 酒石酸なども炭素源として資化する。特に, グルコース, フラクトース, サッカロース, マルトースの資化性にすぐれている, 硝酸塩を還元し, アミンを要求しない, 酵母エキスは増殖を促進しない, ゼラチンを液化しない, 色素はクロロフィル a, b,  $\alpha$ -カロテン,  $\beta$ -カロテン, ルテイン, ビオラキサンチン, ネオキサンチン等を生成する, 生育限界 pH は酸性側 3.5~4.5, アルカリ側 9~10, 生育限界温度は低温側 10°C, 高温側 40°C であった。本種の同定は, Shihira 等<sup>2)</sup>の分類法に準じたが, 現在も引き続き検討中で, ここでは仮に *Chlorella* sp. MA016 株とする。2) 培養条件および培養特性; 糖蜜濃度は 0.5~4.0 % で良好な増殖がみられ, 特に 2 % で増殖率は最も高く, 最大比増殖速度 ( $\mu_{max}$ ) は 0.25 hr<sup>-1</sup> であった。至適温度は 27~30°C, 至適 pH は 5.5~6.5, 至適照度は 5~10 Klux, 暗所では増殖速度は低下した。窒素源は尿素, 硝酸カリウムが良好で, 硫酸アンモニウムは良くなかった。また, 糖蜜培地において十分な増殖を得るためには Mg 塩, リン酸塩, 鉄塩, 微量金属の添加が必要であった。クロロフィル生成量は照度, 窒素源に影響され, 照度 5~10 Klux 硝酸カリウムを使用した場合に 4.8% の高い含有率を示した。一般に, クロレラ等微細藻類をグルコースなどの糖を炭素源として培養した場合, クロロフィル生成量は低下する (グルコースブリーチング) 傾向にあるが, 本種において糖蜜を炭素源として使用した場合ブリーチング化はみられなかった。ジャーファーメンターにおける回分培養では, 2 % 糖蜜を含有する尿素-Myers 培地において平均増殖速度 ( $\mu_{avg}$ ) は 12.5 PCV/day, 対糖収率 (Y%) は 0.44 であった。糖蜜制限による連続培養では希釈率 (D hr<sup>-1</sup>) 0.2 まで藻体濃度 7.0 g/l で定常状態を維持した, 生産率は希釈率 0.2 hr<sup>-1</sup> で最大値 1.4 g/l·hr を得た。藻体の粗蛋白質は 60%, クロロフィル生成量は 2.9~4.8%, アミノ酸組成は, リジン, アルギニン, アスパラギン酸, グルタミン酸, バリン, ロイシンが多く, シスチン, メチオニンが少なかった。以上の結果から, 甘蔗糖蜜を炭素源として, サッカロース資化性能をもつ *Chlorella* sp. MA016 株を培養することにより蛋白質, クロロフィル含量の高いクロレラ藻体の生産が可能であった。

文献: 1) 特公 昭 47-38191

2) Shihira, I., Krauss, R. W. (ed.): *Chlorella, Physiology and Taxonomy of Forty-one Isolates*. Univ. of Maryland, College Park, Maryland (1963).