

# バイオ燃料生産に適したラビリンチュラ類の選択的分離培養法

竹井 耀英<sup>1</sup>、田岡 洋介<sup>1</sup>、松田 高宣<sup>2</sup>、泉 可也<sup>2</sup>、林 雅弘<sup>1</sup>  
1宮崎大・農・海洋生物環境 2BITS

## 目的

海洋性真核微生物の一種であるラビリンチュラ類において、多くの種が高度不飽和脂肪酸を豊富に含有することが知られている。しかし、一部の種では飽和あるいは一価不飽和脂肪酸を主に蓄積し、バイオ燃料に適した脂肪酸組成を持つ。本研究では、バイオ燃料生産に適したラビリンチュラ類の効率的な分離培養方法の確立を目的に、属レベルでデンプン資化性に差異があることを利用した分離培養法を検討した。

## 実験方法

沖縄県八重山諸島周辺海域より海水等のサンプル計47サンプルを採取し、3種類の培地を用いた分離とアミラーゼ活性試験、コロニーの色彩判別により分離株を9つのグループに分離し、属レベルでの選択的分離の評価を行った。

〈1.分離〉 松花粉釣餌法を用いて、3種類の培地で分離を行った。

〈2.アミラーゼ活性試験〉

### 試験培地

L培地、LS培地分離株はLS培地に植菌し試験を行った。SS培地分離株は、1/20濃度SS培地に植菌し試験を行った。

### 培養条件

28°Cで5日間培養した。

培養後、ルゴール液を散布しClear zoneの有無を確認した。

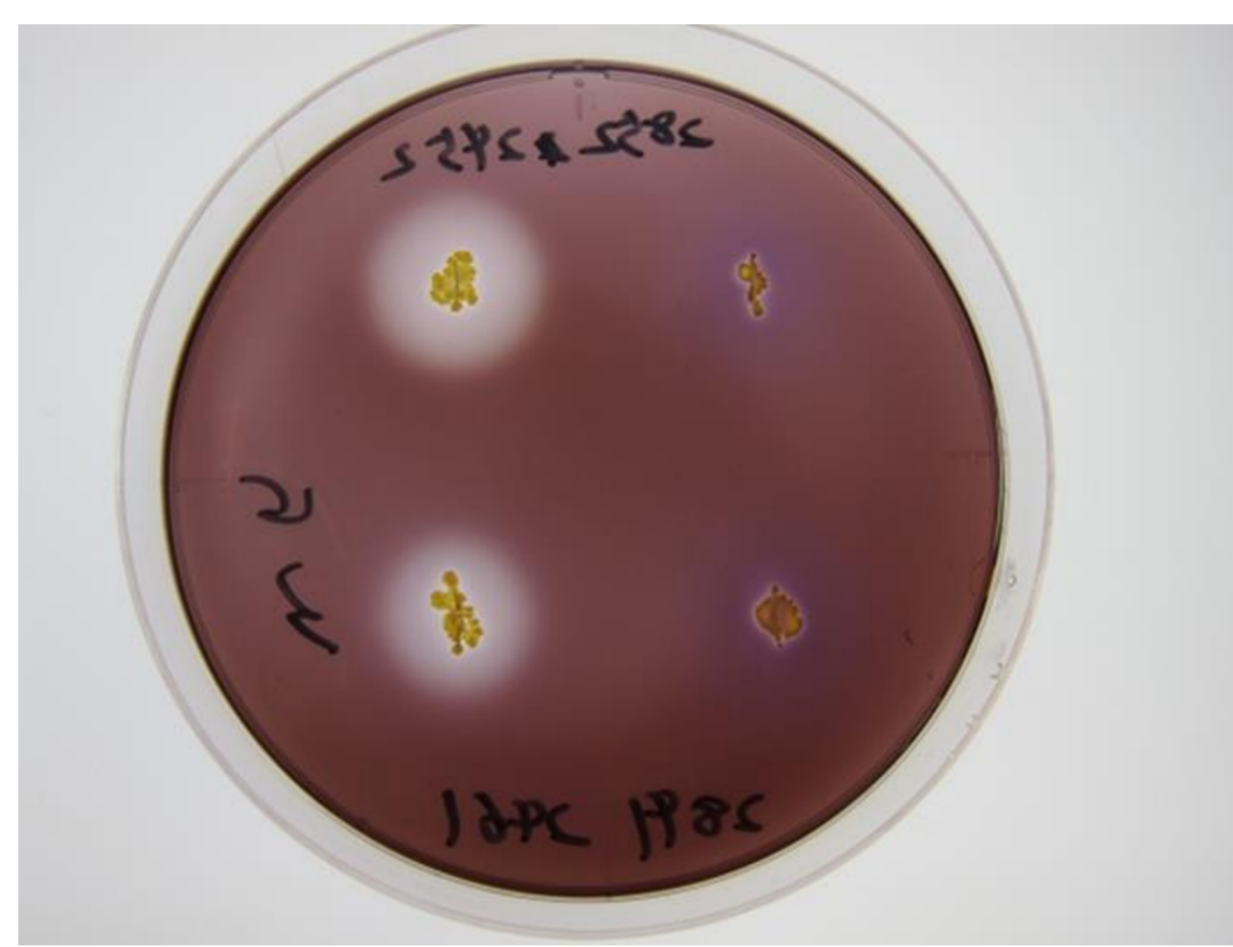


Fig.1 Amylase activity test  
left Clear zone: Positive  
right No Clear zone: Negative

## 分離に用いた培地組成

Leichmannii medium (L)	
B <sub>12</sub> Culture Agar "Nissui"	5.0 g
Agar	13.5 g
½Artificial sea water	1 L

Starch synthetic medium (SS)	
Soluble starch	20.0 g
KNO <sub>3</sub>	5.78 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.16 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.16 g
Agar	15.0 g
½Artificial sea water	1 L

Leichmannii starch medium (LS)	
Yeast extract	0.85 g
Peptone	0.85 g
Soluble starch	1.1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
Tween80	0.1 g
Tomato juice supernatant	25 ml
Agar	15.0 g
½Artificial sea water	1 L

pH 7.0に調整しオートクレーブ後、ビタミン混合溶液1 mlと抗生物質混合溶液5 mlを加えた。

Vitamin mixture	
Vitamin B <sub>1</sub>	200 mg
Vitamin B <sub>2</sub>	10 mg
Vitamin B <sub>12</sub>	10 mg
Distilled water	100 ml

Antibiotics mixture	
Penicillin G potassium	5.0 g
Streptomycin sulfate	5.0 g
Distilled water	100 ml

〈4.分離株のGenus-specific PCRを用いた属レベルでの同定〉

分離株はGenus-specific PCR(Nakai et al. 2013)を用いて、各グループにおける属レベルの分布を分析した。

### PCR protocol

95°C 5min	35cyc	※Annealing temperature
95°C 45s		<i>Aurantiochytrium</i>
60°C 45s		was 58°C
72°C 30s		<i>Parietichytrium, Ulkenia</i>
72°C 5min		was 62°C

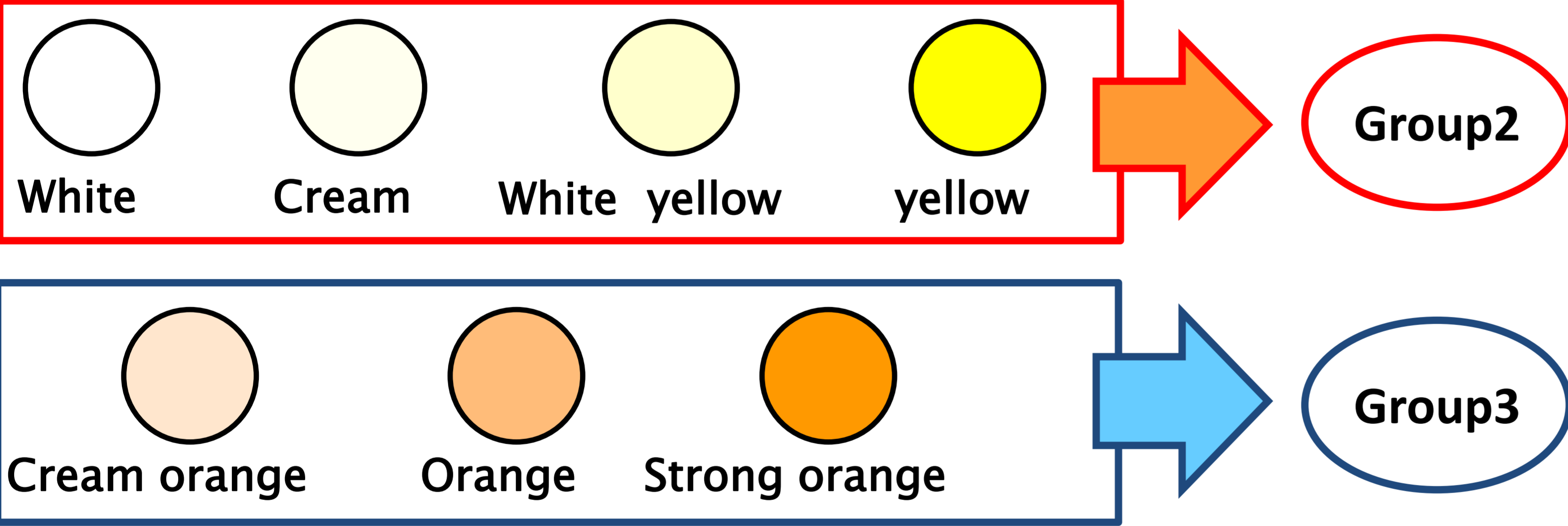
また一部の株について18S rRNA遺伝子のシーケンスを行い系統樹を作成した。

### PCR protocol

94°C 60s	30cyc	18S001
94°C 30s		5'-AACCTGGTTGA
55°C 30s		TCCTGCCAGTA-3'
72°C 90s		18S13
72°C 7min		5'-CCTTGTACGAC
		TCACCTTCCT-3'

## 〈3.色彩判別〉

プレート上のコロニーを色彩により、2グループに分離した。



## 結果

L培地で53株、LS培地で30株、SS培地で5株分離した。これらをグルーピングしたところ、SS培地ではGroup1, Group2で0株、Group3で5株となった。LS培地ではGroup1で1株、Group2で30株、Group3で0株となった。L培地ではGroup1で2株、Group2で51株、Group3で0株となった。(Fig.2)

分離株をGenus-specific PCRにかけた結果は、LS培地とL培地のGroup2において*Schizochytrium*属が多く検出され、L培地のGroup1では*Aurantiochytrium*属が検出された。(Fig.3) また、SS培地のGroup3で分離された株は、どのプライマーでも増幅は確認されなかったが、そのうちの2株(2411, 2511)をシーケンス後、系統解析を行った結果*Thraustochytrium striatum*であった。(Fig.4)

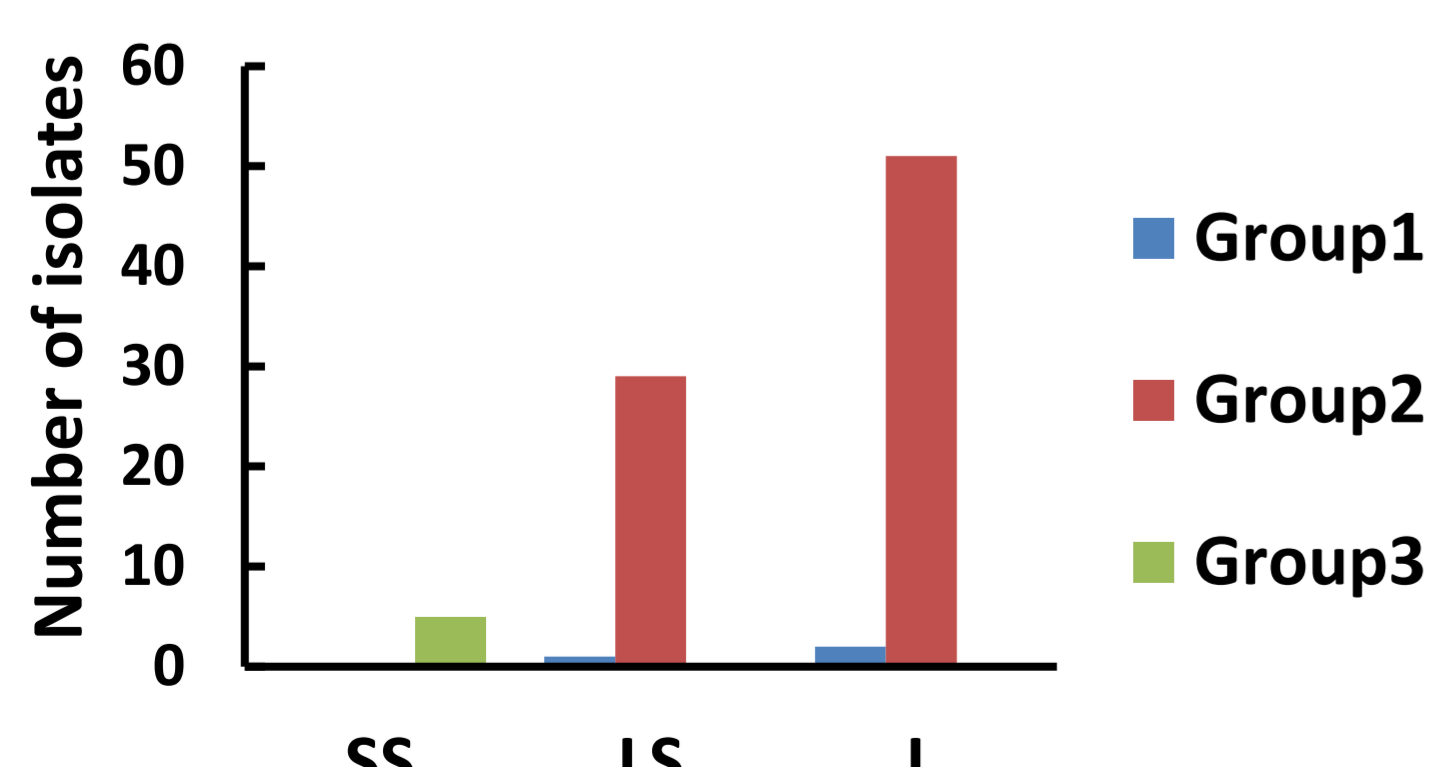


Fig.2 Grouping in each mediums

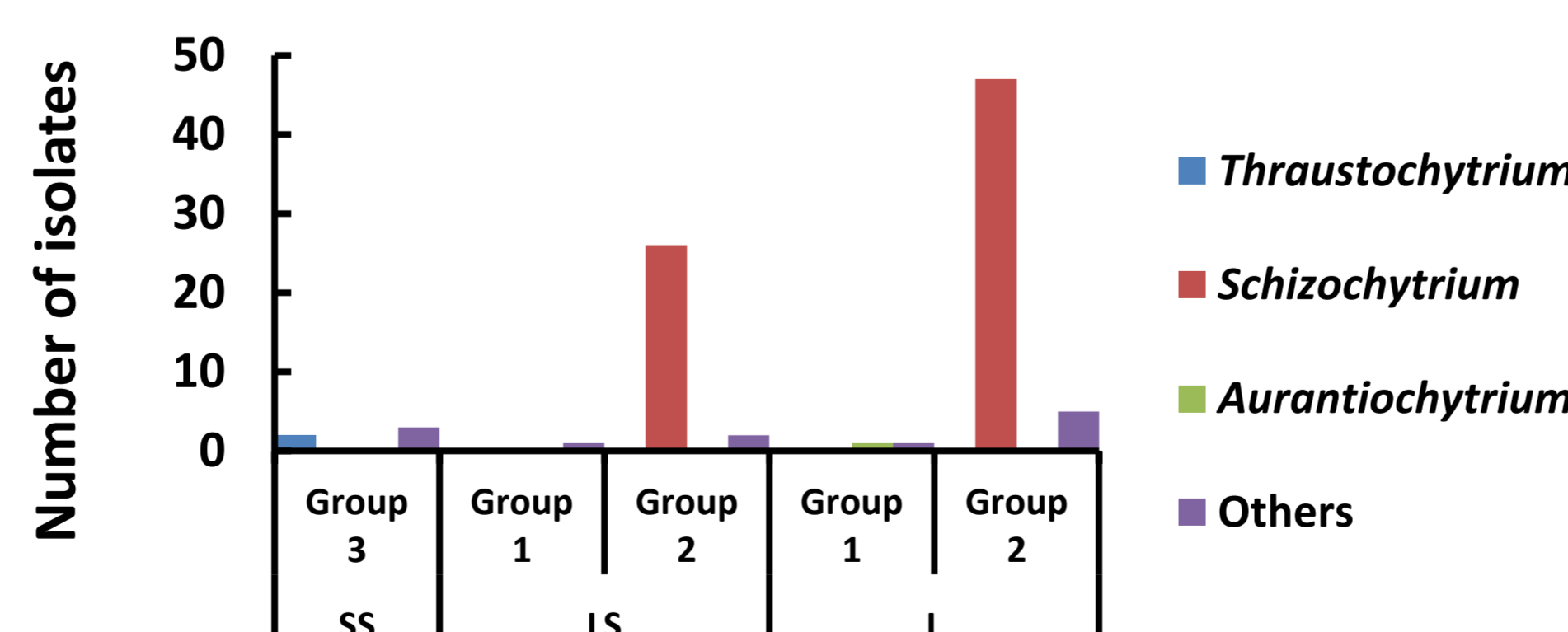


Fig.3 Classification used of Genus-specific PCR

## 考察

*Schizochytrium*属は一価不飽和脂肪酸及び飽和脂肪酸を多く含む脂肪酸組成を持つためBDF生産に適している。このため、L培地、LS培地で分離した株のうち、アミラーゼを産生する淡色の株を選択的に抽出すると、BDF生産に適した*Schizochytrium*属が遺伝子解析を行わなくても分離出来ると考えられ、SS培地で分離し、橙色素を産生する株は、*Thraustochytrium striatum*が選択的に分離出来ると考えられる。しかし、分離された属に偏りがあるため、今後も実験を行いデータの蓄積を行う必要があると考えられる。

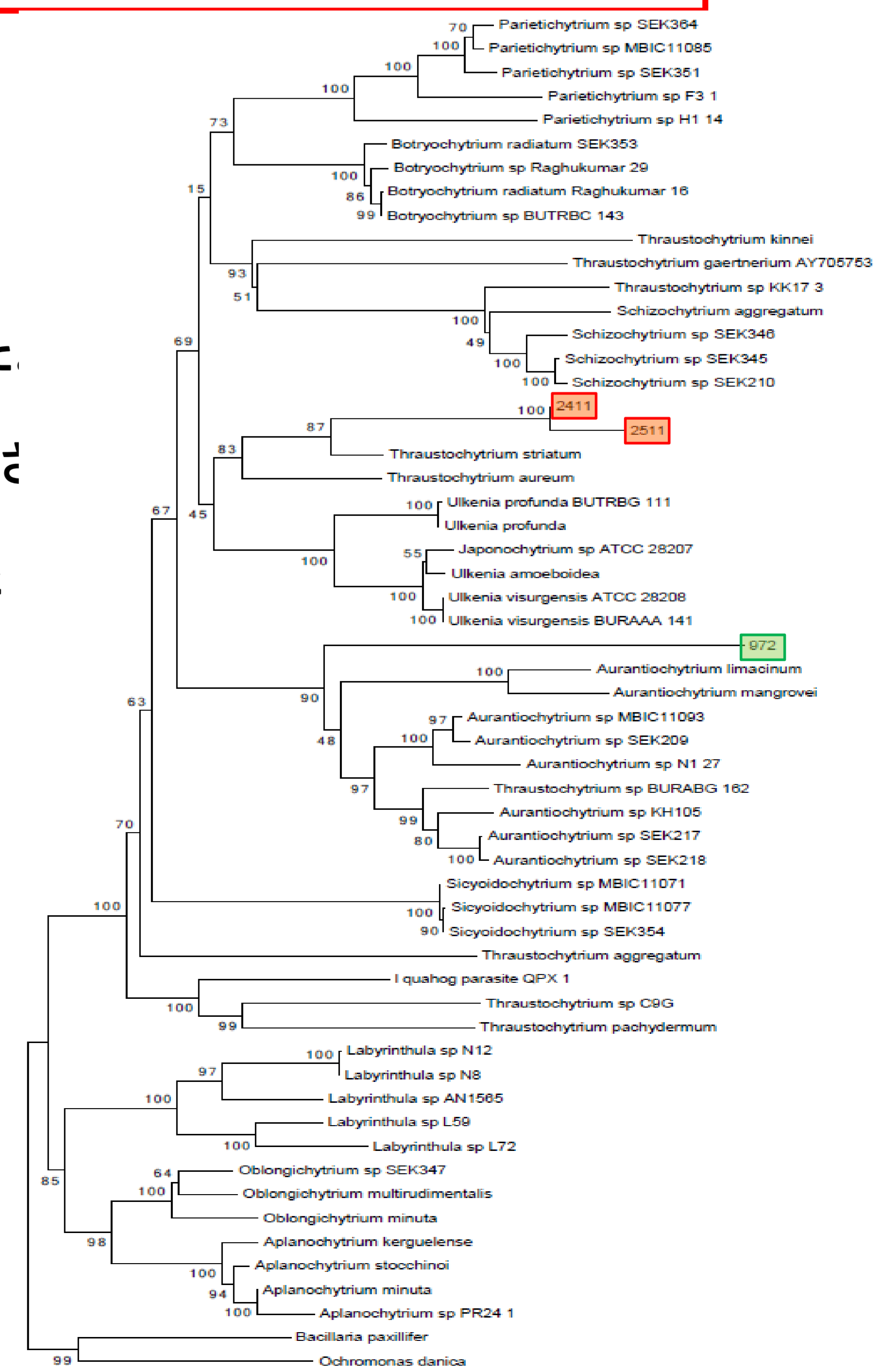


Fig.4 Phylogenetic tree based on 18S rRNA gene sequence data of thraustochytrids