

振盪培養中のフラスコ気相部に充満する CO₂ が微生物や微生物群集構造に及ぼす影響の解析とその利用

高橋 将人
筑波大学 生命環境系

研究成果：

微生物培養中に生じる CO₂ の気相部への蓄積は、フラスコの形状に限らず通気性の培養栓の種類によっても、振盪フラスコ培養に影響を及ぼすことが示された。また、フラスコ気相部の CO₂ 濃度を一定にまたは間欠的に制御する培養法は、従来法と異なる微生物挙動を示し、様々な生理活性に影響を及ぼしうることを示された。

研究の目的

振盪フラスコ培養法は、フラスコが高速振盪しており培養因子の把握や制御が困難である¹⁾。そのため、様々なフラスコ条件（培養栓の種類、フラスコの形状、振盪条件）の検討が十分になされてきたとは言いがたい。振盪フラスコ培養が真価を最大限に発揮するためには、フラスコ内の培養環境を把握する手段、および、適切なフラスコ条件の選定法が求められる。独自に開発した Circulation Direct Monitoring and Sampling System (CDMSS；振盪を中断せずにサンプリングやモニタリングが可能) を用いて微生物培養法を研究する中で、CO₂ に着目している²⁾ (and references therein)。本研究では、CDMSS を活用し従来の培養栓付きのフラスコを用いた培養器全体の換気能を評価（フラスコ気相部と外気との総ガス移動速度の定量化）し、新奇フラスコ条件の創出を試みた。さらに、新奇なフラスコ条件が微生物に及ぼす影響を解析した。

方法

フラスコ気相部に CO₂ を充満させた後に、様々な通気性を有する培養栓と種々のフラスコを組み合わせた条件下で、CO₂ 濃度を CDMSS でモニタリングし CO₂ 濃度が半減する時間を算出し、換気能を定量化した。また、得られた CO₂ 換気能を参考に CDMSS と通気デバイスを PID 制御機器で連結することで、従来の培養栓やフラスコを用いながらフラスコ気相部の CO₂ 濃度を制御できるシステムを開発した。開発した CO₂ 制御型の振盪フラスコ培養法と従来法を比較した。

結果

新奇的なフラスコ条件の創出を目指し、既存の三角フラスコ、坂口フラスコ、円筒型フラスコの換気能力と酸素供給能力を評価した³⁾。種々のフラスコの形状を用いて *Escherichia coli* を振盪培養した結果、酸素供給能力だけでなく換気能力も重要であることが示された (Fig. 1)³⁾。また、CO₂ 半減期を指標に、シリコンを発泡させた通気性を有した培養栓として幅広く使われているプラグ型とキャップ型の培養栓の換気能を評価した。両者の CO₂ 半減期は異なり (Fig. 2)、その差は微生物の増殖に影響を及ぼすことが明らかとなった⁴⁾。また、培養栓は素材によって大きな差が認められた。振盪条件による CO₂ 半減期の変化はほとんどなかった。

独自に開発した CO₂ 制御型の振盪フラスコ培養法と従来法を比較するために、*Pelomonas saccharophila* を純粋培養した結果、フラスコ気相部の CO₂ 濃度を高く制御することで増殖が増大した⁴⁾。従来の振盪培養法で、フラスコ気相部の CO₂ 濃度が上昇する要因として、フラスコの形状や培養栓を含めた培養条件下の微生物呼吸だけでなく、サンプリング時の火炎殺菌操作にも注目した。火炎殺菌の実操作を模倣した実測と CFD による燃焼ガスのシミュレートでフラスコ気相部に高濃度 CO₂ が蓄積することを実証した (Fig. 3)。 *Acetobacter pasteurianus*, *E. coli*, *P. saccharophila*, *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、経時的なサンプリング時に生じる間欠的な CO₂ 濃度の上昇のみを模倣し、振盪フラスコ培養を行った結果、*A. pasteurianus*,

P. saccharophila で増殖が大きくなった⁵⁾。また、単一菌だけでなく微生物集団として、もろ味を種々の条件で振盪フラスコ培養した結果、フラスコ気相部の条件によって従来とは異なる培養微生物群集構造を形成した。

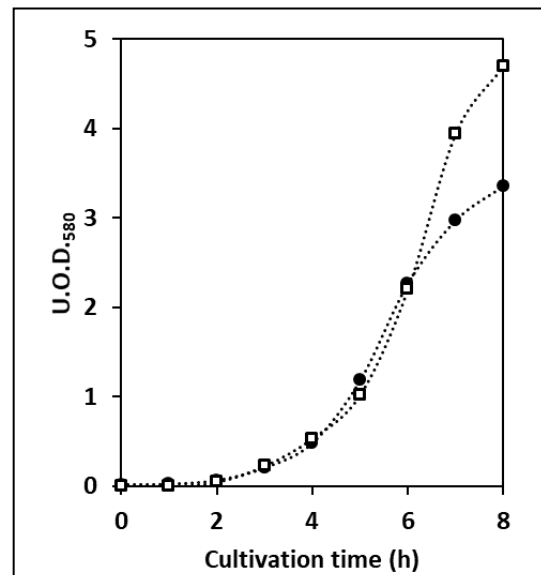


Fig. 1 同等の酸素供給能力を有した振盪培養中の *E. coli* の増殖経過。●, 三角フラスコ; □, 円筒型フラスコ。

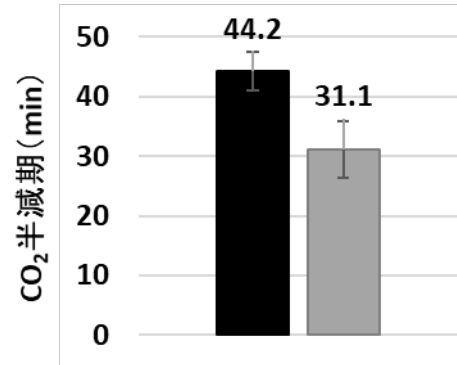


Fig. 2 通気性を有した培養栓の換気能。黒, プラグ型; 灰, キャップ型。

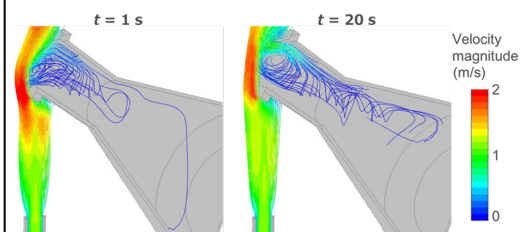


Fig. 3 サンプリング過程の火炎殺菌操作によって生じる高濃度 CO₂ を含んだ燃焼ガスがフラスコ内に流入する様子。

結論

通気性を有した培養栓は、培地を含めた微生物の培養条件に応じて選定する必要がある。培養栓の選定時には、キャップ型とプラグ型といった形状だけでなく、素材や発泡方法にも留意することで再現性のよい微生物培養につながる事が明らかとなった。従来の好気的な振盪培養中のフラスコ気相環境は培地と同様に重要な培養因子であり、フラスコ気相部の CO₂ 濃度を一定または間欠的に制御することで、新奇なフラスコ条件を提供できた。CO₂ に注目した振盪フラスコ培養は、増殖に限らず様々な生理活性に影響を及ぼすことが示唆され、振盪フラスコ培養法が多用されている上流のバイオプロセス開発への貢献が期待される。

文献 (※3-5 が本研究成果が含まれた原著論文)

- 1) Takahashi, M., Aoyagi, H. (2018) Practices of shake-flask culture and advances in monitoring CO₂ and O₂. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**: 4279-4289.
- 2) Takahashi, M., Aoyagi, H. (2018) Effect of intermittent opening of breathable culture plugs and aeration of headspace on the structure of microbial communities in shake-flask culture. *J. Biosci. Bioeng.* **126**: 96-101.
- 3) Takahashi, M., Aoyagi, H. (2020) Analysis and effect of conventional flasks in shaking culture of *Escherichia coli*. *AMB Express* **10**: 77.
- 4) Takahashi, M., Aoyagi, H. (2020) Analysis of porous breathable stopper and development of PID control for gas phase during shake-flask culture with microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**: 8925-8936.
- 5) Takahashi, M., Honzawa, T., Tominaga, R., Aoyagi, H. (2020) Analysis of the influence of flame sterilization included in sampling operations on shake-flask cultures of microorganisms. *Sci. Rep.* **10**: 10385.