

微生物培養中のサンプリング操作は増殖に影響を及ぼす
～火炎殺菌によりフラスコ内のCO₂濃度が上昇～

研究成果のポイント

1. 培養中の微生物をサンプリングする際に行う火炎殺菌操作が、増殖に影響を及ぼすことがわかりました。
2. 火炎殺菌操作は短時間でも、フラスコ気相部のCO₂濃度を上昇させることを見出しました。
3. 本研究成果は、これまで未解明だった、振盪(しんとう)フラスコ培養法におけるサンプリング操作が微生物に及ぼす影響の一端を明らかにしたもので、新規な微生物機能の活用を進める上で重要な知見です。

国立大学法人筑波大学 生命環境系 高橋将人 博士研究員と青柳秀紀 教授は、培養中の微生物に対する火炎殺菌操作^{注1)}がフラスコ気相部および微生物に及ぼす影響を、世界で初めて報告しました。

微生物を振盪フラスコ培養^{注2)}する際、微生物や培養液の挙動を分析するためにサンプリングを実施します。サンプリングにおいては、フラスコの振盪の中断、クリーンベンチへのフラスコの移動、フラスコ上部にある培養栓の開封、フラスコおよび培養栓の火炎殺菌といった一連の操作が行われます(図1)。これらの操作が、微生物に何かしらの影響を及ぼすことは、微生物培養に携わる熟練者は経験的に感じていた可能性はあります。しかしながら、その詳細を科学的に捉えた研究はほとんどありません。本研究グループはこれまでに、振盪を中断せずにサンプリングできるシステムや、それと併せて二酸化炭素(CO₂)や酸素(O₂)濃度をモニタリングできる独自技術を開発し、フラスコ内の気相環境(特にCO₂)が、培地と同様に重要な培養因子であることを明らかにしてきました(参考文献1-6)。

本研究では、サンプリングを行う際の火炎殺菌操作に注目し、ブンゼンバーナーによって生じる燃焼ガスが、フラスコ気相部のCO₂濃度に及ぼす影響を種々の条件で実測し、また、高いCO₂濃度を有した燃焼ガスが三角フラスコの上部から流入する様子を、流体解析することに成功しました。これらの知見に基づき、火炎殺菌操作の一時的なCO₂濃度の上昇を模倣し、振盪フラスコ培養した結果、微生物の振盪フラスコ培養中に一般的に実施してきた火炎殺菌操作は、微生物の増殖に影響を及ぼすことが明らかとなりました。本研究成果は、振盪フラスコ培養法の未制御因子の理解に寄与すると共に、再現性の高い培養の実現や新たな培養条件の拡張(それに伴う新規な微生物機能や新規微生物資源の開拓)にも貢献できる可能性があり、微生物培養関連分野において産業面でも新たな潮流を生むことが期待されます。

本研究の成果は、2020年6月30日付「Scientific Reports」で公開されました。

- * 本研究は、公益財団法人 野田産業科学研究所 奨励研究助成「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」(研究期間2019年4月～2020年3月)/ 科研費若手研究「振盪培養中のフラスコ気相環境が微生物にもたらす影響の解明と新規振盪培養法の提案」(研究機関2020年4月～2022年3月)/ 科研費基盤研究(B)「従来の微生物培養法の特性解析と未培養微生物単離培養法の開発」(研究期間2019年4月～2022年3月)/ 公益財団法人 住友電工グループ社会貢献基金「ダークマター微生物資源利用・生物化学工学講座」(講座期間2017年4月～)によって実施しています。
- * 本研究におけるCFD解析は、東京ガス株式会社 基盤技術部 基盤技術研究所 熱流体チーム 本澤尚史 研究員、富永隆一 チームリーダーとの共同研究により実施されました。

研究の背景

振盪フラスコ培養中に種々の培養因子の経時変化を把握するためには、サンプリングが必要です。そのための専用デバイスもいくつか開発されているものの(参考文献4)、一般には、振盪を中断し、手作業でサンプリングが行われます。一方で、サンプリング方法に対する厳密な規定はなく、個々の実験者の技量に依存しています。サンプリングの際、振盪培養中にフラスコを振盪機から取り出しクリーンベンチへの移動すること(振盪の中断)で、一時的な O_2 移動速度が減少することが報告されています。また、サンプリングの有無や間欠的な培養栓の開封の有無によって、振盪フラスコ培養中の土壌試料が、異なる培養微生物群集構造を形成するといった現象が報告されています(参考文献2)。経験豊富な熟練者たちは、経験則に基づき、些細と捉えがちな操作にも注意を払ってきた可能性はありますが、サンプリングが振盪フラスコ培養に及ぼす影響に関する知見は不足しています。我々は、これまでに振盪培養中におけるフラスコ気相部の CO_2 濃度の変化が培養微生物群集構造に影響を及ぼすことを報告しており、サンプリング過程に含まれる種々の操作の中で、火炎殺菌^{注 3)}や培養栓の開封などのフラスコ気相部のガス環境を変動させる操作が、培養液中の微生物に影響を及ぼすのではないかと推測しました。しかし、サンプリングは煩雑な手作業であるため、個々の操作が培養に及ぼす影響を評価するのは困難でした。

本研究では、フラスコの開口部分への火炎殺菌操作による燃焼ガスの挙動を流体解析(Computational Fluid Dynamics, CFD)解析し、我々がこれまで開発してきたモニタリングデバイス(参考文献 1, 4)と、フラスコ気相部へ間欠的にガスを通気できるシステム(参考文献 2)を利用し、火炎殺菌操作に起因する燃焼効果による CO_2 がフラスコ気相部と振盪フラスコ培養に及ぼす影響を調査しました。

研究内容と成果

本研究では、バイパス型モニタリングデバイス^{注 3)}を用いて、微生物培養のサンプリング過程で行う火炎殺菌操作では、燃焼効果により CO_2 が発生し、フラスコ気相部内に高濃度の CO_2 が蓄積することを実証しました。火炎殺菌の操作時間が短い方が、フラスコ気相部に充満する CO_2 濃度が低くなりました(図2)。ただし、測定原理上、フラスコ気相部内のガスを意図的に混合させているため、フラスコの開口部分から燃焼ガスの換気(排気)が促されています。したがって、実際のサンプリング過程の火炎殺菌操作では、実測値よりも高い CO_2 濃度がフラスコ気相部に充満していることが考えられます。このことを裏付けるように、CFD解析では、高い CO_2 濃度を有した燃焼ガスがフラスコ気相部に流入していることが明らかとなりました(図3)。また、火炎殺菌操作の一時的な CO_2 濃度の上昇を模倣し、複数種の微生物を用いて振盪フラスコ培養した結果、増殖に影響を及ぼすことが明らかとなりました(図4)。特に、*P. saccharophila*および、*A. pasteurianus*がフラスコ気相部の CO_2 に感受性が高いことがわかります。本研究により、振盪フラスコ培養中の一般的なサンプリングを行う際の火炎殺菌操作はフラスコ気相部の CO_2 濃度を上昇させ、微生物に影響を及ぼすことが明らかとなりました。

今後の展開

火炎殺菌操作の代替として、高温の熱風処理が考えられますが、火炎のような色が無く操作性に課題が残ります。そのため、再現性よく振盪フラスコ培養を実施するには、従来のサンプリング方法の厳格化だけでなく、サンプリング用のフラスコの準備や、本研究のような、振盪を中断せずにサンプリングできるシステムの構築が必要です。

大腸菌の培養では、高濃度の CO_2 が含まれたガスの間欠的な通気によりヒト様コラーゲンの生産が向上したことが報告されています。間欠的な通気だけでなく、詳細な気相部の制御(CO_2 や O_2 の一定濃度の維持や、段階的な濃度変動)により、未開拓の培養条件を実装できると考えられます。また、それに伴う新規な微生物機能や微生物資源の開拓にも貢献できる可能性があります。今後さらに、サンプリング操作や植菌操作などを含めた振盪フラスコ培養の全体像を理解し、その機能を拡張するため、振盪フラスコ培養に適合した専用システムの開発等に取り組んでいきます。

参考図

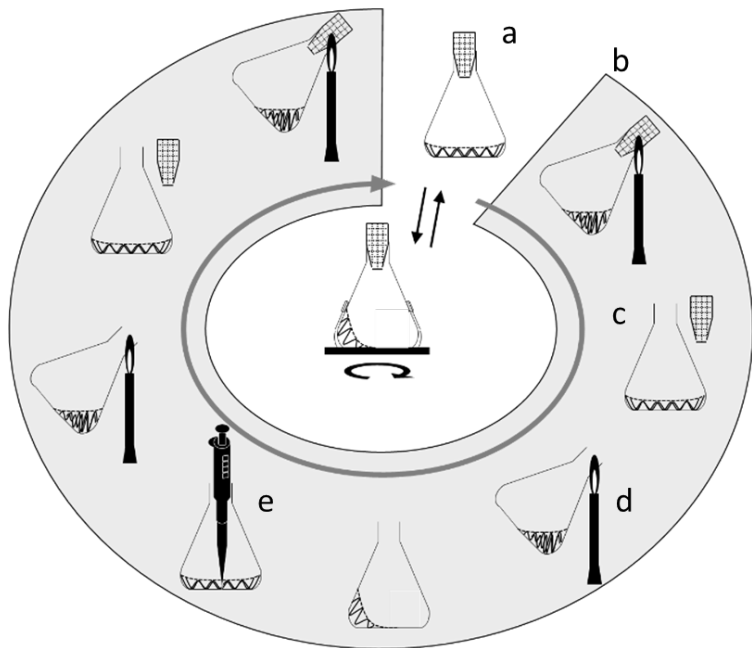


図1 微生物培養の一般的なサンプリング過程(a, 振盪の中断; b, クリーンベンチ内での無菌作業; c, 培養栓の開封; d, 火炎殺菌操作; e, 培養液の採取)

時計まわりにサンプリング時の操作を示しており、グレー部分はクリーンベンチ内の操作を示しています。火炎殺菌操作が繰り返されていることがわかります。

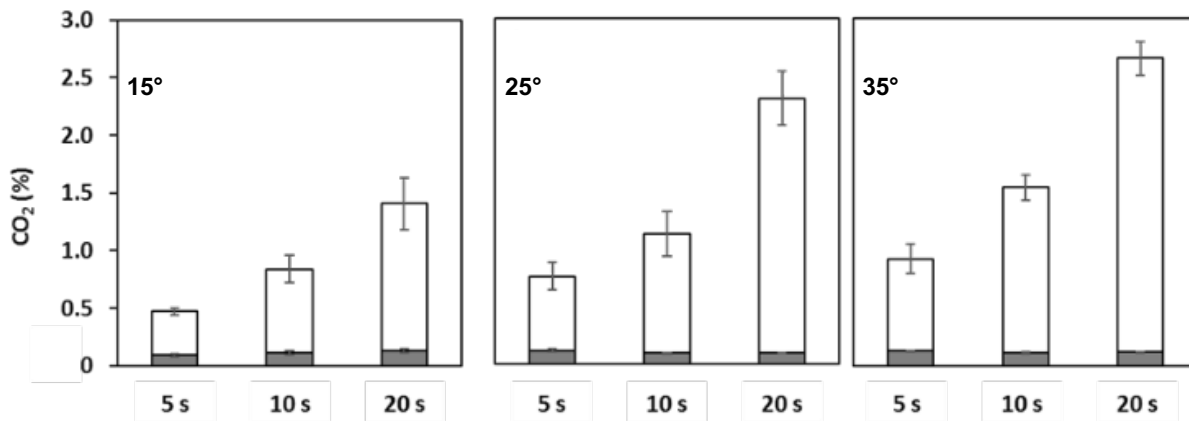


図2 火炎殺菌時の CO₂ 濃度

火炎殺菌時の操作時間と角度に対する三角フラスコ内の CO₂ 濃度の蓄積を調べました。グレー部分は開始時の CO₂ 濃度、白部分がブンゼンバーナーの燃焼ガスによる最大 CO₂ 濃度を示しています。

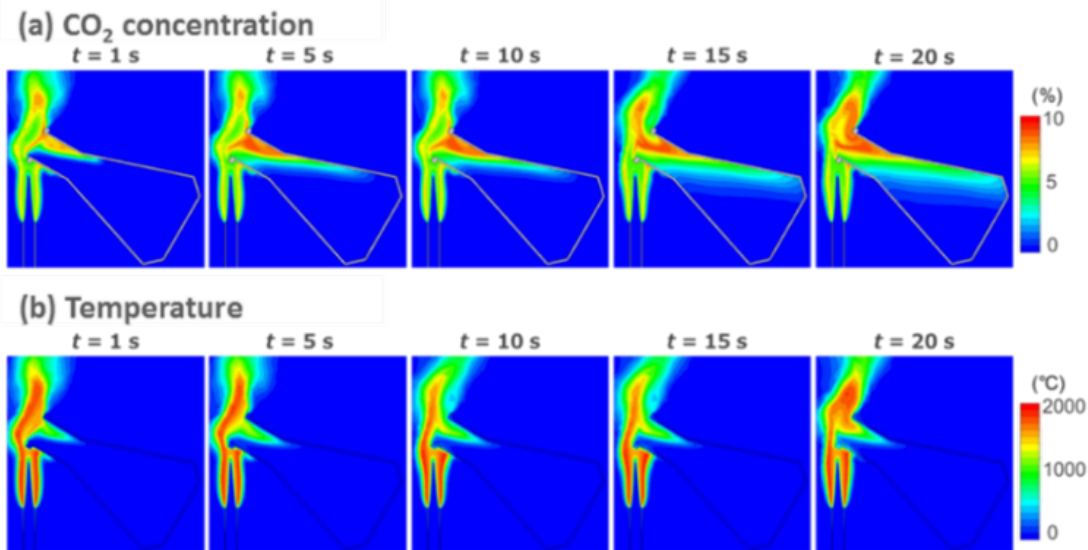


図3 火炎殺菌のCFD解析

開口部分での火炎殺菌中のフラスコ内のCO₂濃度分布と温度分布を示しています。

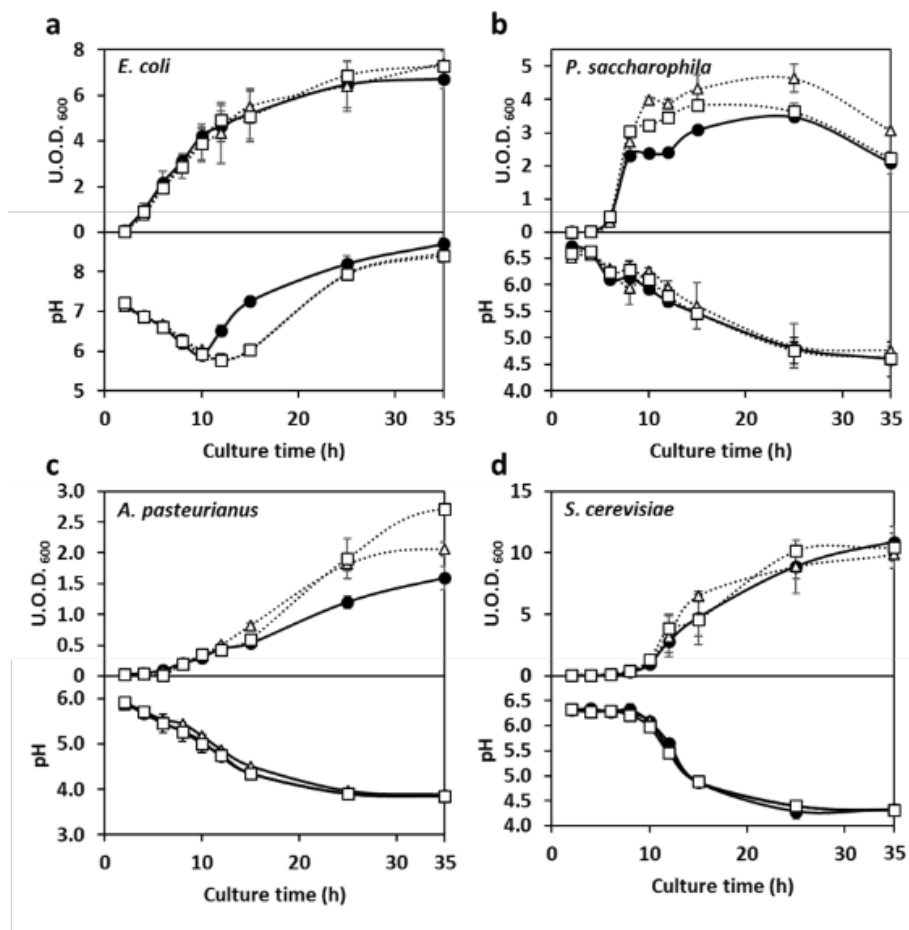


図4 複数の微生物(a, *E. coli*; b, *P. saccharophila*; c, *A. pasteurianus*; d, *S. cerevisiae*)を用いて振盪フラスコ培養を実施した際の増殖(U.O.D.₆₀₀)とpHの経時変化

全条件には通気性の培養栓を用いており、振盪の中断や培養栓を開封せず、独自のシステムでサンプリングしました。●の実線がcontrol(間欠的な通気なし)、△と□の点線はサンプリング後にCO₂ガスを間欠的に通気し、火炎殺菌操作の一時的なCO₂濃度を模倣した条件を示しています。*P. saccharophila*および、*A. pasteurianus*がフラスコ気相部のCO₂に感受性が高いことがわかります。

用語解説

注1) 火炎殺菌

無菌操作を実施する上で必要な作業の一つで、①高温効果によるフラスコ上部の口部分と培養栓の外側に付着している雑菌の殺菌、②高流速効果によるフラスコや培養栓に付着している雑菌やほこりの排除、などの役割があります。フラスコだけでなく試験管を用いた微生物の培養、継代や植菌時にも実施する一般的な操作です。

注2) 振盪フラスコ培養

微生物の培養において、酸素を供給するために、液体培地を入れたフラスコを激しく振り動かす方法。1933年に初めて用いられて以来、様々な微生物の好気的な液内培養法として国内外で広く使用されています。往復式や回転式など、いくつかの振盪方式があります。

注3) バイパス型モニタリングデバイス(Circulation Direct Monitoring and Sampling System:CDMSS)

本研究グループが開発した、高速で振盪するフラスコ内の培養液の状態を把握するための装置。振盪フラスコ培養中の培養液と気相部のガスを循環させ O₂ と CO₂ 濃度をモニタリングできます。

参考文献

1. Takahashi M, Sawada Y, Aoyagi H. (2017) Development of a circulation direct sampling and monitoring system for O₂ and CO₂ concentrations in the gas-liquid phases of shake-flask systems during microbial cell culture. *AMB express*. 7: 163. doi: 10.1186/s13568-017-0464-4.
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. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.01.009.(公益社団法人日本生物工学会 第 27 回 生物工学論文賞受賞参考: 生物工学会誌 98, 71, 2020)
3. Takahashi M, Aoyagi H. (2018) Monitoring of CO₂ and O₂ concentrations in the headspace of Sakaguchi flasks during microbial cell culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 6637-6645. doi: 10.1007/s00253-018-9076-4.
4. Takahashi M, Aoyagi H. (2018) Practices of shake-flask culture and advances in monitoring CO₂ and O₂. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 4279-4289. doi: 10.1007/s00253-018-8922-8. (invited review)
5. 高橋将人、青柳秀紀 (2019) 従来の振盪フラスコ培養法の解析と利用. *生物工学会誌* 97, 559-562.
6. Takahashi M, Aoyagi H. (2020) Analysis and effect of conventional flasks in shaking culture of *Escherichia coli*. *AMB express*. 10: 77. doi: 10.1186/s13568-020-01013-7.

掲載論文

【題名】 Analysis of the influence of flame sterilization included in sampling operations on shake-flask cultures of microorganisms

(微生物の振盪フラスコ培養中のサンプリング操作に含まれる火炎滅菌の影響の分析)

【著者名】 Takahashi M, Honzawa T, Tominaga R, Aoyagi H

【掲載誌】 *Scientific Reports*(DOI: 10.1038/s41598-020-66810-3)

問合わせ先

青柳 秀紀(あおやぎ ひでき)

筑波大学 生命環境系 細胞機能開発工学研究室／微生物サステナビリティ研究センター (MiCS) 教授