

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15097

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Analysis of effects of flask gas phase on microorganisms during shaking culture and proposal of new shaking culture method

研究代表者

高橋 将人 (Takahashi, Masato)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：60826965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、『従来法で設定できる培養環境の明確化』および、『未開拓の培養環境の創出』をおこなった。フラスコの形状および培養栓の種類に注目し、微生物培養で普及している従来の振盪フラスコ培養法で実現できる培養環境を把握するため、種々のフラスコ条件の酸素(O₂)供給能と二酸化炭素(CO₂)換気能を定量化した。その結果、従来の三角フラスコや坂口フラスコではCO₂換気能がO₂供給能と比べて非常に小さいことが明らかとなった。また、換気能を改善できる独自開発したデバイスを付与した新たな振盪培養法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

振盪フラスコ培養法は、微生物を用いた生産技術の開発や改善を図るうえで、作業しやすいスケールで低コストかつ多検体を検討できる重要な液内培養技術である。これまで意図せず換気不十分で使用されてきたため、非意図的な二酸化炭素の影響が潜在していたことが明らかとなった。開発した小型の換気デバイス(外部電力が不要で、フラスコを設置する振盪基盤のデッドスペースに外付けできる)を付与することで、液内振盪培養中のフラスコ気相部の培養環境を制御でき、バイオプロセス開発上流の培養条件の検討や、培養を介した微生物種および物質生産のスクリーニングに期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study was challenged to "clarify the conventional culture environment" and "create the unexplored culture environment". In order to understand the microbial culture environment that can be set by the conventional shake-flask culture conditions, the oxygen (O₂) supply capacity and carbon dioxide (CO₂) ventilation capacity of various flask conditions, focusing on the shape of the flasks and the type of culture-stoppers were quantified. As a result, it was cleared that CO₂ ventilation capacity was much smaller than O₂ supply capacity during shaking culture used by Erlenmeyer flasks and Sakaguchi flasks. Therefore, novel device was developed for enhancing ventilation to shake-flask systems. The small device does not require additional electrical power.

研究分野：培養工学

キーワード：液内振盪培養 振盪フラスコ培養法 モニタリングデバイス 二酸化炭素換気能 酸素供給能 微生物ガス制御

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在に至るまで微生物学を支えてきた根幹的な培養技術の一つにフラスコを用いた液内振盪培養がある。振盪フラスコ培養法は国内外で普及しており、様々な用途に使用されている。代表者は、振盪フラスコ培養中に遭遇した新奇な現象を起点に、従来の振盪フラスコ培養法で設定できる培養環境を明確化する重要性を指摘してきた。近年、フラスコ内の分析技術の発展に伴い、振盪培養中のガス濃度のモニタリングが実現可能となった。そこで、代表者が独自に開発したモニタリングデバイスを活用し、「現在の振盪フラスコ培養法の設定限界は何か？それを打破した未開拓の培養環境を創出するためには何をすればよいのか？」という問いに答えることは、上流のバイオプロセスの新たな開発や改善の提起に直結する重要な知見につながると考え、本研究を遂行した。

2. 研究の目的

微生物を用いたバイオ生産技術の開発や改善を図るうえで、作業しやすいスケールで低コストかつ多検体を検討できる振盪フラスコ培養法は重要な液内培養技術である。代表者は、振盪フラスコ培養中の微生物群集構造が、培養中に行う通常のサンプリングの有無によって異なるという現象を見出した。興味深いことに、サンプリングプロセスの無菌的な培養栓の開封を繰り返した条件で集積した微生物群集の中には、複数種の培地検討だけでは集積しなかった特異的な微生物の存在を認めている。この現象と向き合い、本研究では、『従来法で設定できる培養環境の明確化』および、『未開拓の培養環境の創出』をおこなうことを目的とした。

3. 研究の方法

振盪培養中のフラスコ内の気相部や培養液内の種々の培養因子をモニタリングでき、振盪を中断せずにフラスコ内のガスや培養液をサンプリングできる独自開発のデバイス (Circulation Direct Monitoring and Sampling System : CDMSS) を活用し、サンプリングプロセスのような意図せず微生物に影響を及ぼしている培養因子も含め、従来法で設定可能なフラスコ条件の全体像を明確化し、従来の振盪フラスコ培養では設定できなかった未開拓の培養環境の創出を試みた。

4. 研究成果

(1) サンプリング操作中の意図せぬ影響の解析と利用¹⁾

振盪培養中のフラスコ内の培養環境を把握するためには、様々な培養因子を測定する必要があるため、測定対象が限定されるモニタリングだけでなく、サンプリングも重要である。振盪フラスコのサンプリングプロセスは、(ア) 振盪の中断、(イ) 振盪基盤からの着脱、(ウ) クリーンベンチへの持ち込み、(エ) 培養栓の開封、(オ) フラスコの開口部分の火災殺菌、(カ) フラスコの開口部分からの培養液の採取、という一連の流れであることが多い(図1)。代表者は、上述のプロセス(エ)の有無により、集積培養中の微生物群集構造が変動することを見出している²⁾。また、プロセス(ア)に該当する振盪フラスコ培養時の振盪の中断によって、酸素(O_2)供給能力が一時的に減少することが、RAMOSを用いて報告されている³⁾。

本研究では、国内外を通じて詳細に解析されていない火災殺菌操作に着目し、CDMSSを用いて、ブンゼンバーナーによって生じる燃焼ガスのフラスコの開口部分への流入を検証した。その結果、ブンゼンバーナーの火災でフラスコの開口部分を手作業で炙った際、接触時間が長いほど、フラスコ内の二酸化炭素(CO_2)濃度が上昇することが明らかとなった。また、火災殺菌操作による CO_2 の流入は、手作業に起因するため、個人差が生じやすいことが示唆された。そこで、支配的な構成要素と推察される2つの因子(フラスコの開口部分を炙る操作角度と操作時間)を選定し、フラスコやバーナーを固定したレール状の専用基板とCDMSSを用いて調査した。その結果、手作業を模倣できる操作角度や操作時間を見出した(図2)。また、検討した操作角度では、全条件において高濃度の CO_2 を含んだ燃焼ガスがフラスコ内に流入し、操作時間の長期化に伴いフラスコ内への CO_2 蓄積が増大することを実証した。したがって、振盪フラスコ培養を再現よく行うならば、培養終了まで同一のフラスコからサンプリングを行わない、または、従来とは異なるサンプリング方法を考案する必要がある。

サンプリングプロセスから見出した現象を解析し活用する事で、新たな培養制御も期待できる。具体的には、従来のサンプリングプロセスの火災殺菌操作による意図せぬフラスコ内への CO_2 蓄積を活用するために、振盪培養を中断せずにサンプリングできるデバイスを作成し、火災殺菌操作による一時的な CO_2 の蓄積を模倣できるシステムを構築した。間欠的に制御された CO_2 通気条件下で振盪フラスコ培養した結果、増殖が増大した微生物種が認められた。また、微生物

に限らず様々な細胞を用いた多種多様な培養法において、種々のサンプリングプロセスを整理し各操作を評価することは、サンプリングが培養に及ぼす影響の理解やサンプリングの機械化・自動化においても重要である。本研究は、手作業による非意図的な振盪フラスコの培養環境の変動を実測し、支配因子を抽出し、環境変動を模倣・利用した点において国内外を通じて先駆的な成果である。

(2)振盪フラスコで設定できる培養環境の明確化

フラスコ⁴⁾

三角フラスコと円筒型フラスコを用いた旋回振盪および坂口フラスコを用いた往復振盪中の溶存 O_2 濃度や CO_2 分圧をモニタリングし、独自に作成した解析プロセスを活用してデータ処理した。総括酸素移動容量係数(k_La)を指標として O_2 供給能を評価する際、初発の溶存 O_2 濃度をゼロにする操作が必要である。窒素を過剰に通気する方法が多用されるが、フラスコ気相部の O_2 分圧が意図せず大気 O_2 分圧と比べて極端に低下する問題があった。本研究では、CDMSSを用いてフラスコ気相部の O_2 分圧を確認しながら、 O_2 分圧が大気と同程度になるように注意深く調整・維持し、精度よく k_La を算出し O_2 供給能を評価した。 CO_2 換気能は、フラスコ気相部から外気に換気されるポテンシャルを解析するために独自に係数(k_G)を定義し評価した。その結果、従来のフラスコ(三角フラスコや坂口フラスコ)では CO_2 換気能が O_2 供給能と比べて非常に小さいことが明らかとなった。一方で、円筒型フラスコでは従来のフラスコと比べて、高い CO_2 換気能を有したが、 O_2 供給能が小さかった。円筒型フラスコに0リング型のバフフルを付与することで、円筒型フラスコの特徴である高い CO_2 換気能を維持しながら、従来のフラスコと同程度の O_2 供給能を有することができた(図3)。呼吸活性が大きくなる微生物培養の条件(高い k_La や基質濃度、増殖速度が大きい微生物)下では、意図せずフラスコ気相部に CO_2 が充満し、それに伴い溶存 CO_2 濃度も大きくなることが示唆された。

培養栓⁵⁾

振盪フラスコ培養法の構成要素の1つである通気性のある培養栓はフラスコと同様に数多くの種類があるが、その選定基準は実験者の経験則に起因していることが多い。代表者は、特定のフラスコ内に CO_2 を充満させた後、培養栓を介して CO_2 がフラスコ外へ自然換気され、新鮮空気時の CO_2 濃度を考慮した充満濃度が半減するまでの時間(CO_2 半減期)を指標として、培養栓付きフラスコの換気能力を評価した。その結果、栓の種類(素材や多孔性の程度)に依存するが、通気性のある培養栓が付与された三角フラスコの CO_2 半減期は約30~90分程度であり、微生物の振盪培養中に意図せず気相と液相の両方の CO_2 濃度を増大させ、培養条件によっては、微生物の培養挙動に影響を及ぼすことが明らかとなった。半減期を用いて培養経過に伴う CO_2 変化をシミュレーションした結果に基づき、種々検討した結果、 CO_2 半減期が約10分未満だとフラスコ内の CO_2 蓄積を抑制しやすい傾向であることが示唆された。

これまでの振盪フラスコの評価は、溶存 O_2 が枯渇しやすいため k_La が注目されてきた。本研究では、 CO_2 を活用した振盪フラスコの評価を加えることで、 O_2 供給能と CO_2 換気能のマッピング、また、 CO_2 半減期によるフラスコ気相部のシミュレーションが可能となった。今後、革新的な培養栓付きフラスコを開発するためには、培養液中に供給する O_2 と微生物によって排出される CO_2 の両方のガスにバランスよく着目することが重要である。本研究で用いたフラスコや培養栓の評価方法は、他の培養器の評価でも同様に活用できることが期待され、培養器の設計において大きな波及効果を及ぼす研究成果である。

(3)未開拓の培養環境の創出⁶⁾

本研究を含めた代表者のこれまでの研究から、振盪培養で用いられる従来の通気性のある培養栓付きフラスコでは、フラスコ気相部の換気不十分により、培養経過に伴う O_2 分圧と CO_2 分圧の経時的な変動⁷⁾(併せて、ヘンリーの法則に従い経時的な酸素移動速度[OTR]と溶存 CO_2 濃度の変動)や、フラスコ気相部の鉛直方向のガス濃度勾配⁸⁾が生じる。サンプリング操作だけでなく、意図せず生じている振盪フラスコの不均一性に着目し、振盪培養中の気相環境の均一化を試みた。

具体的には、CDMSSとガスシリンダーを電磁弁で接続し、適切なPID制御を行うことで、培養栓付きフラスコ内の CO_2 濃度を一定に制御することができた。モニタリングデバイスを用いたフラスコ気相部の制御は他にも報告されているが培養栓を介した換気が考慮されていない³⁾。また、このようなモニタリングシステムと連結した振盪フラスコ培養法は、特定の培養条件を詳細に把握・制御するためには有効であるが、設置スペースやシステムの複雑性の点からスループットに課題が残る。そのため、簡便に多検体の培養を並列に実施できる振盪フラスコ培養法の特徴を維持しながら、かつ、従来のフラスコや培養栓を使用しながら、フラスコ内の気相環境制御が求められる。そこで、上述した要求を満たすことができる新規デバイスNonelectric bellows pump for shake-flask(NeBP-sf)を独自に考案、開発した(図4)。NeBP-sfは、追加の外部電力を必要とせず、フラスコを設置する振盪基盤のデッドスペースに設置し、振盪(水平方向の様式)で生じる運動エネルギーを換気能力に変換するデバイスである。具体的には、振盪条件に応じて、デバイス内に装填されている硬球が往復運動し、内蔵されているペローズを繰り返し押し

出す。それに伴い押し出された空気がフラスコ気相部へ送り込まれ、換気能力が増大するメカニズムである。そのため、NeBP-sf が付与された培養栓付きフラスコの換気能力は、振盪条件に依存して大幅に向上し、培養経過に伴うフラスコ気相部の O₂ や CO₂ の濃度変化を抑制することができた。

国内外を通じて、初めて水平方向の振盪を活用した換気能力増大デバイスである。現段階では、1つのフラスコに対して NeBP-sf を 2 つ設ける必要があるため、今後、換気能力のパフォーマンスを改善するためにデバイスを最適化する。NeBP-sf が外付けされた培養栓付き振盪フラスコの気相部は、フラスコ外の気相環境と速やかに平衡化でき、フラスコを設置しているインキュベーター内の気相環境を制御することで、個々のフラスコ気相部のガス濃度を簡便かつ並列に制御できることが期待される。

本研究成果は、従来の振盪フラスコ培養中のモニタリング⁹⁾に留まらず、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、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起点としても期待できる。

<引用文献>

- 1) Masato Takahashi, Takafumi Honzawa, Ryuichi Tominaga, Hideki Aoyagi: Analysis of the influence of flame sterilization included in sampling operations on shake-flask cultures of microorganisms. *Scientific Reports*, **10**, 10385 (2020)
- 2) Masato Takahashi, Hideki Aoyagi: Effect of intermittent opening of breathable culture plugs and aeration of headspace on the structure of microbial communities in shake-flask culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **126**, 96-101 (2018)
- 3) Tibor Anderlei, Werner Zang, Manfred Papaspyrou, Jochen Büchs: Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*, **17**, 187-194 (2004)
- 4) Masato Takahashi, Hideki Aoyagi: Analysis and effect of conventional flasks in shaking culture of *Escherichia coli*. *AMB Express*, **10**, 77 (2020)
- 5) Masato Takahashi, Hideki Aoyagi: Analysis of porous breathable stopper and development of PID control for gas phase during shake-flask culture with microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **104**, 8925-8936 (2020)
- 6) Masato Takahashi, Hideki Aoyagi: Development of a bellows pumping device for enhancing ventilation to shake-flask systems. *Biochemical Engineering Journal*, **174**, 108098 (2021)
- 7) Masato Takahashi, Yoshisuke Sawada, Hideki Aoyagi: 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 (2017)
- 8) Masato Takahashi, Hideki Aoyagi: Monitoring of CO₂ and O₂ concentrations in the headspace of Sakaguchi flasks during liquid culture of microorganism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**, 6637-6645 (2018)
- 9) Masato Takahashi, Hideki Aoyagi: Practices of shake-flask culture and advances in monitoring CO₂ and O₂. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**, 4279-4289 (2018)

<図一覧>

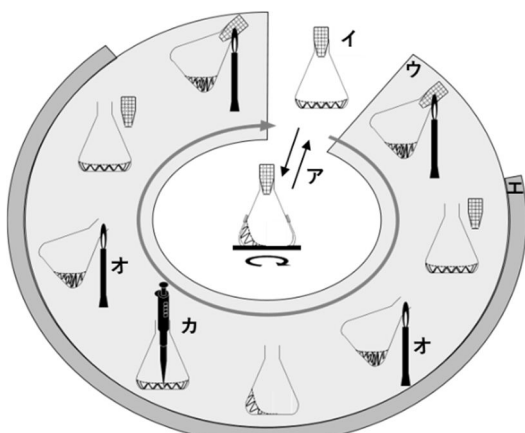


図1 従来の振盪フラスコからのサンプリング過程。

(ア) 培養の中断; (イ) 振盪基盤からの着脱; (ウ) クリーンベンチへの持ち込み; (エ) 培養栓の開封; (オ) フラスコ開口部分の火炎殺菌; (カ) フラスコ開口部分からの培養液の採取。

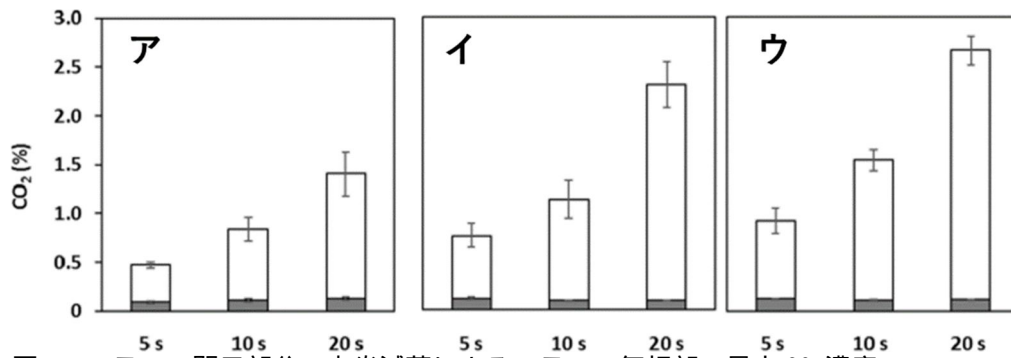


図2 フラスコ開口部分の火炎滅菌によるフラスコ気相部の最大CO₂濃度。白色と灰色はそれぞれ最大濃度と初期濃度を、条件(ア-ウ)はそれぞれフラスコの操作角度15, 25, 35°を示す。

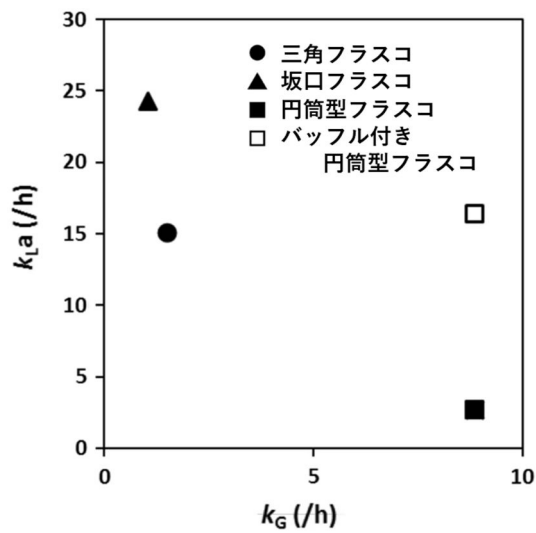


図3 4種類の振盪フラスコにおけるk_Laとk_Gのマッピング。

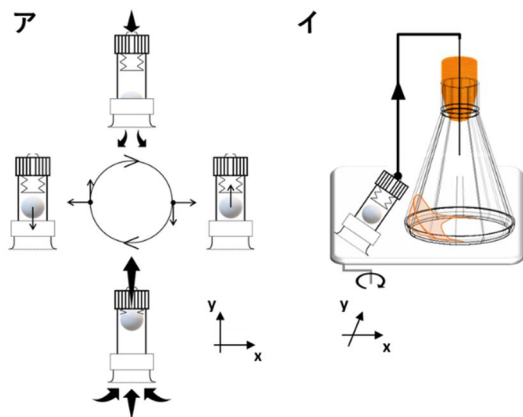


図4 旋回振盪中のNeBP-sfの挙動。(ア)内蔵されている硬球がベローズを押し出し空気が送り込まれる構造;(イ)振盪フラスコとの接続イメージ。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Masato Takahashi, Hideki Aoyagi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Analysis and effect of conventional flasks in shaking culture of Escherichia coli | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 AMB Express | 6. 最初と最後の頁 77 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13568-020-01013-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Masato Takahashi, Takafumi Honzawa, Ryuichi Tominaga, Hideki Aoyagi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Analysis of the influence of flame sterilization included in sampling operations on shake-flask cultures of microorganisms | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 10385 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66810-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Masato Takahashi, Hideki Aoyagi | 4. 巻 104 |
| 2. 論文標題 Analysis of porous breathable stopper and development of PID control for gas phase during shake-flask culture with microorganisms | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology | 6. 最初と最後の頁 8925-8936 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-020-10847-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Masato Takahashi, Hideki Aoyagi | 4. 巻 174 |
| 2. 論文標題 Development of a bellows pumping device for enhancing ventilation to shake-flask systems | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical Engineering Journal | 6. 最初と最後の頁 108098 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bej.2021.108098 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 高橋 将人 |
| 2. 発表標題 振盪フラスコ培養中の気相環境の解析と利用 |
| 3. 学会等名 日本生物工学会東日本支部 賀詞交換会 日本生物工学会東日本支部長賞記念講演（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 加藤 拓也, 高橋 将人, 青柳 秀紀 |
| 2. 発表標題 微生物培養におけるフラスコスケールの高性能な流加システムの開発 |
| 3. 学会等名 第10回日本生物工学会東日本支部コロキウム |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高橋 将人, 青柳 秀紀 |
| 2. 発表標題 サンプリング過程に含まれる火炎殺菌操作が微生物の振盪 フラスコ培養に及ぼす影響の解析 |
| 3. 学会等名 第73回日本生物工学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高橋 将人 |
| 2. 発表標題 これまで気づかなかったフラスコスケールの振盪培養法の実態 |
| 3. 学会等名 日本生物工学会 バイオインフォマティクス相談部会 第5回講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

TSUKUBA JOURNAL 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
<https://www.tsukuba.ac.jp/journal/biology-environment/20200630180048.html>

日本の研究.com. プレスリリース
<https://research-er.jp//articles/view/90047>

公益社団法人 日本生物工学会 東日本支部 第5回(2020年)日本生物工学会東日本支部長賞 受賞
https://www.sbj.or.jp/branch/branch_higashinohon_award.html

第10回日本生物工学会東日本支部コロキウム「微生物の根幹的な培養技術の実践と最前線」オーガナイザー
https://www.sbj.or.jp/event/branch_esbj_colloquium_20220310.html

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|