

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14544

研究課題名（和文）気相部を介した微生物の未開拓な液内培養環境の創出と高度利用

研究課題名（英文）Development and advanced utilization of unexplored culture environment for submerged culture with microorganisms via gas phase

研究代表者

高橋 将人（Takahashi, Masato）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：60826965

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、『気相部を介した未開拓な培養環境の創出』をおこなった。従来のフラスコは、二酸化炭素（CO₂）換気能が酸素（O₂）供給能と比べて非常に小さく、意図せぬガス変動が生じる。従来のガスインキュベータを用いた培養中の振盪フラスコの気相部をモニタリングした結果、設定値を大幅に超えたCO₂が蓄積していることが明らかとなった。独自に開発した換気エンハンサーを併用することで、従来の液内振盪培養法の構成要素や利便性を維持しながら、設定値通りのガス制御ができた。また、振盪中の溶液へ効率よく強制通気できる液内振盪培養用プラグシステムを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フラスコなどの培養器を用いた液内振盪培養は、採取した環境試料中の有用微生物の集積、微生物を用いた生産技術の開発や改善を図るうえで、簡便に培養スクリーニングができる重要なバイオ技術である。原則、培養器の換気能の向上や強制的な通気をしない限り、ガス制御できないことが明らかとなった（非意図的なガス変動は、純粋培養と集積培養の両方に影響を及ぼす）。開発した換気エンハンサーとガスインキュベータの併用や、培地の揮発を抑制できる液内振盪培養用の通気プラグシステムを用いることで、培養器の気相環境を再現よく簡便に制御できる。バイオプロセス開発上流や培養を介した微生物および機能性成分の探索への導入が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study was challenged to "develop the unexplored culture environment via gas phase". In conventional shake-flasks, carbon dioxide (CO₂) ventilation capacity was much smaller than oxygen (O₂) supply capacity, induce the unintentional gas changes. The gas phase of shake-flasks during microbial cultivation used gaseous incubator were monitored. As a result, it was cleared that the flask gas phase was filled over gaseous CO₂ more than the set point. The developed ventilation enhancer combined with the gas incubator including shaking table was able to be control the gas conditions according to the set point, while maintaining the components and convenience of the conventional shaking culture method. A plug system forced aeration for microbial culture of multiple shaken vessels suppresses volatilization, was developed.

研究分野：生物工学

キーワード：微生物培養 液内振盪培養 振盪フラスコ培養 ガス制御システム 二酸化炭素換気能 酸素供給能 換気エンハンサー モニタリングデバイス

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液内振盪培養がある。特に振盪フラスコ培養法は国内外に普及し、様々な用途に多用されている。代表者は、振盪フラスコ培養中に遭遇した新奇な現象¹⁾を起点に、従来の振盪フラスコ培養中に生じる意図せぬ(未制御の)ガス変動への着目とその重要性を指摘してきた。近年、分析技術の発展により振盪フラスコの課題である低いガス供給能を打破する研究が展開されている。一方で、換気に着目した研究は限られている。そこで、代表者がこれまでに得た知見と独自に開発した換気エンハンサーを活用し、「振盪フラスコ培養法に新奇なガス環境を付与することで、微生物にとって未開拓な培養環境を創出できるのではないか?」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探索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

本来、pH を含む培地組成や温度など設定する培養因子の組み合わせは幅広いが、自然界のほとんどの微生物が未培養である点からも、集積培養や純粋培養の条件検討は限定的なノウハウに依存していると考えられる。従来法から脱却する術が提案されない限り、潜在的に有用な微生物を獲得できても、培養技術がボトルネックとなり、我々がアクセスできる微生物資源は頭打ちになることが危惧される。そこで、フラスコ気相部を介した好気的なガス環境が液内振盪培養中の微生物の生理活性に深く関与していると仮定し、微生物資源としての真価を引き出すことができる新たな基盤技術の確立を目指し、本研究では新奇なガス環境の創出を目的とした。

3. 研究の方法

代表者が開発したバイパス型モニタリングシステム (Circulation Direct Monitoring and Sampling System: CDMSS)²⁾や換気エンハンサー (Nonelectric Bellows Pump: NeBP)³⁾を活用した。CDMSS は、振盪フラスコの気液二相のそれぞれにループ構造を付与し流路内に測定ユニットやサンプリングユニットを挿入することで、振盪を中断せずに種々のガス濃度のモニタリングや培養液のサンプリングができる。NeBP は、振盪基盤のデッドスペースに設置でき、追加電力が不要で振盪由来の運動エネルギーを換気能力に変換するデバイスである。従来の振盪フラスコ培養法の特長(高い並列性と利便性)を維持しながら、培養中に生じる意図せぬ(未制御の)ガス変動を抑制できるガス制御機構の開発を実施した。

4. 研究成果

(1) 液内振盪培養の特徴を維持したガス制御機構の開発

振盪フラスコ専用のモニタリングデバイスの登場により、好気的なガス環境が液内振盪培養中の微生物挙動に影響を及ぼすことが明らかになった^{1,4)}。それに伴い、培地や培養温度のようにフラスコ気相部も重要な培養因子であることが示されつつある。特に微生物の呼吸活性の高い培養条件を設定した際、振盪培養中のフラスコ気相部のガス環境は新鮮空気と比べて大きく異なる。この現象は通気性の高いキャップタイプの培養栓でも生じる。フラスコ気相部のガスの一時的な濃度変化でさえ、振盪培養中の微生物群集構造、単一菌の増殖や物質生産に影響を及ぼすため、微生物培養におけるフラスコ気相部のガス制御が求められている。

新たな培養栓の素材の探索と評価

振盪フラスコの換気能を改善させることで簡便なガス制御ができるという仮説に基づき、モニタリングシステム CDMSS を用いて、フラスコ開口部分に通気性のある素材を貼付け換気能を評価した。具体的には、フラスコ内に CO₂ を充満させた後、培養栓を介して CO₂ がフラスコ外へ自然換気され、充満していた濃度(新鮮空気の CO₂ 濃度を考慮)が半減するまでに要する時間を CO₂ 半減期と定義し、換気能の指標とした。従来の発泡性の培養栓や紙栓は、約 30~90 min であるため、30 min 未満になる素材候補を探索した。その結果、ポリジメチルシロキサン製シートは 100 min、ウェルプレート用として市販されているガス透過性シールは 50 min を超過するため、素材検討のみでは換気能を改善することが困難であった。

換気エンハンサー NeBP とガスインキュベータの併用⁵⁾

振盪フラスコに外付けできる NeBP は、フラスコ内外を迅速にガス置換できるデバイスであるが、1 個のフラスコに対して 2 個設置する必要があった。そこで、NeBP の内部パーツ(硬球とベローズ)を最適化し、従来の通気性の培養栓付のフラスコに 1 個の NeBP を外付けすることで、半減期 10 min 未満を達成することができた(図 1)。具体的には、比重の大きい硬球に変更し、変更した硬球に対して安定して収縮運動を繰り返すことができるベローズポンプを選定した。最適化した NeBP と振盪基盤付きガスインキュベータを併用することで、培養中に生じるフラスコ気相部の非意図的なガスの濃度変動(微生物の呼吸由来)を抑制でき、設定値通りにガス

制御できた（図2）。NeBPを外付けしていない従来の振盪フラスコ内は設定値を大幅に超過した（ホモ乳酸発酵するような菌体はNeBPを外付けしなくても設定値通り制御できる）。培養器の換気能に着目したガス制御システムによって、これまで困難であった液内振盪培養法の特徴を維持した気相制御が可能となった。

培地の揮発を抑制できる液内振盪培養用の通気プラグシステム⁶⁾

(1) の実験中に、CO₂濃度のモニタリングに限らずフラスコ内に充填した溶液の揮発量を測定した。その際、従来の通気性を有した培養栓には、換気能と揮発との間に大まかなトレードオフ（高い換気能を有すると揮発量が多くなる）が認められた。特に、揮発量は初発の培地量の10%を超過するのは望ましくない。また、バイオプロセス開発の下流で扱われる培養器は、振盪フラスコ培養法とは異なり、振盪せずに攪拌装置と通気装置が付与されているのがほとんどである。そこで、培地の揮発を抑制しながら液中に強制通気できる専用プラグを開発した（図3）。専用プラグを用いることで、50 mLのworking volume下で45 hの連続通気（～60 mL/min of dry air）後でも、揮発を10%未満に抑制できた。*Escherichia coli*の培養では、未通気と比べて短時間で終了し、最大菌体濃度は1.25 倍に増加した。本強制通気システムの開発によって、これまで困難であった振盪培養中の液内への直接的なガス制御が可能となった。

本研究は、従来の培養栓で設定できるガス環境の限界を明確化し、課題を解決した革新的な培養栓付フラスコとして、大きく2つの手法（(1) と ）を提案した。今後、培養スクリーニングにおいて、換気エンハンサーNeBPとガスインキュベータの併用や培地の揮発を抑制できる液内振盪培養用の通気プラグシステムを活用することで、ガス濃度を段階的に制御することが可能となり、小スケールかつ多条件で実施される有用微生物の培養スクリーニングへの導入が期待される。

(2) 簡便かつ高精度な流加ユニットの開発⁷⁾

好気的な培養法として考案された振盪フラスコ培養は、様々な用途で用いられ最も普及した液内振盪培養法の1つであるが、ほとんどが回分型の培養である。一方で、バイオプロセス開発の上流では、回分型に限らない培養条件の拡充が求められており⁸⁾、低コストかつ高い並列性と利便性を有した流加型の培養法は重要である。また、これまで考案されている振盪フラスコ専用の流加デバイスのほとんどは、フラスコの開口部分に付与するため、流加培養に対して十分な換気能を有した設計ではない。

通気性のある培養栓付き三角フラスコを用いた振盪培養に、流加できるシステムを付与した。本システムを *Saccharomyces cerevisiae* の振盪フラスコ培養に適用した結果、振盪を中断せずサンプリングでき、独自に付与したプライミングセクションによって事前にプログラムした通りに流加溶液を高精度に供給できた。また、事前に設計した菌体収率と比増殖速度の設定値（0.5 g-dry cell/g-D-glucose と 0.2 /h）に対して、得られたそれぞれの実測値は 0.55 g-dry cell/g-D-glucose と 0.22 /h であった（回分培養では、それぞれ 0.22 g-dry cell/g-D-glucose と 0.45 /h）（図4）。これらの結果から、開発したシステムは、他の流加専用デバイスのような振盪フラスコの構成要素を欠如することなく、流加溶液の高精度のフィードフォワード制御を振盪フラスコに実装できた。また、本システムを用いて土壌試料を集積培養した結果、回分型とは異なる微生物群集構造を形成し、流加型に適した微生物種の存在が示唆された。

本研究は、従来の振盪フラスコ培養の構成要素を変更せずに、既知の製品を組み合わせ、高精度なフィードフォワード制御を提案した。専用の流加デバイスより自由度が高く、低コストであり、回分型の培養結果と直接比較できる。今後、本システムを用いて、液内振盪培養法の特徴である高い並列性と利便性を維持しながら、実際のバイオプロセス開発の上流で要求される流加制御の質を明らかにすることが期待される。

本研究により、培養器の換気能の向上や強制的な通気をしない限り、ガス制御できないことが明らかとなった（非意図的なガス変動は、純粋培養と集積培養の両方に影響を及ぼす）。開発した換気エンハンサーとガスインキュベータの併用や、培地の揮発を抑制できる液内振盪培養用の通気プラグシステムを用いることで、複数の培養器のガス環境を簡便に制御できる。また、流加ユニットを組み合わせることで、新奇なガス環境を付与しながら液相部の培養条件の拡張にも貢献でき、培養を介した微生物や機能性成分の探索への導入が期待できる。

<引用文献>

1) 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)

2) 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)

3) Masato Takahashi, Hideki Aoyagi: Development of a bellows pumping device for enhancing ventilation

to shake-flask systems. *Biochemical Engineering Journal*, **174**, 108098 (2021)

4) Ramsés A. Gamboa-Suasnavart, Norma A. Valdez-Cruz, Gerardo Gaytan-Ortega, Greta I. Reynoso-Cereceda, Daniel Cabrera-Santos, Lorena López-Griego, Wolf Klöckner, Jochen Büchs, Mauricio A. Trujillo-Roldán: The metabolic switch can be activated in a recombinant strain of *Streptomyces lividans* by a low oxygen transfer rate in shake flasks. *Microbial Cell Factories*, **17**, 189 (2018)

5) Masato Takahashi, Hideki Aoyagi: Control of carbon dioxide concentration in headspace of multiple flasks using both non-electric bellows pump and shaking incubator. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **134**, 240-247 (2022)

6) Masato Takahashi, Yoshisuke Sawada, Hideki Aoyagi: A forced aeration system for microbial culture of multiple shaken vessels suppresses volatilization. *Archives of Microbiology*, **206**, 246 (2024)

7) Masato Takahashi, Takuya Kato, Hideki Aoyagi: Development of a feed-forward control system for medium in shake-flask culture. *Biochemical Engineering Journal*, **196**, 108939 (2023)

8) Marco Scheidle, Markus Jeude, Barbara Dittrich, Sylvia Denter, Frank Kensy, Manfred Suckow, Doris Klee, Jochen Büchs: High-throughput screening of *Hansenula polymorpha* clones in the batch compared with the controlled-release fed-batch mode on a small scale. *FEMS Yeast Research*, **10**, 83-92 (2009)

< 図一覧 >

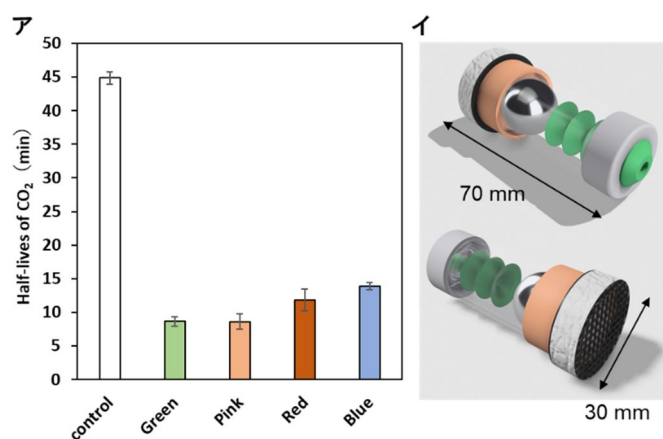


図1 NeBP の内部パーツ (ペロースポンプ) の最適化と概略図 .

(ア) CO₂ 半減期を用いた換気能の比較; (イ) 最適化された NeBP の概略図 .

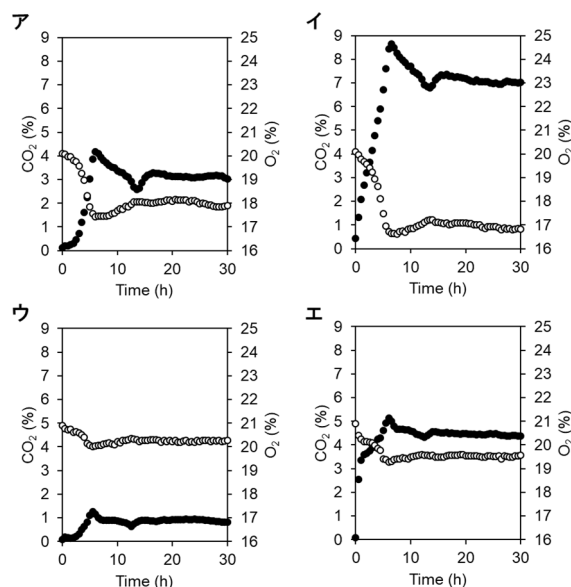


図2 大腸菌を用いた気相環境の比較 .

(ア) ガスインキュベータによる CO₂ コントロールと NeBP の両方無し ; (イ) CO₂ コントロール有り と NeBP-sf 無し ; (ウ) CO₂ コントロール無し と NeBP-sf 有り ; (エ) CO₂ コントロールと NeBP-sf の両方有り . ○と ● はそれぞれ O₂ と CO₂ を示す .

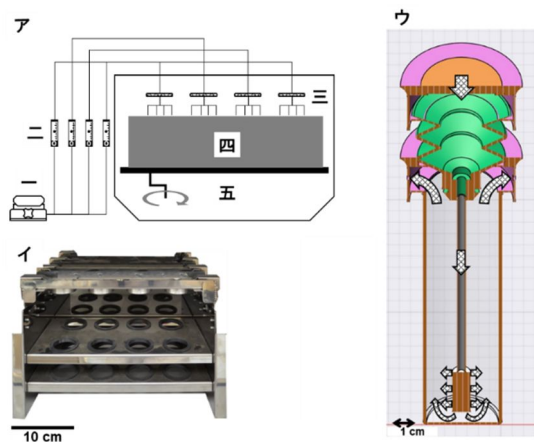


図3 通気プラグシステムの概略図。

(ア)通気システム付き振盪機[一,コンプレッサー;二,流量計;三,フィルター;四,専用ホルダー;五,振盪基盤付きインキュベータ];(イ) 専用ホルダー;(ウ) 専用プラグの断面(矢印はガスの流れを示す)。

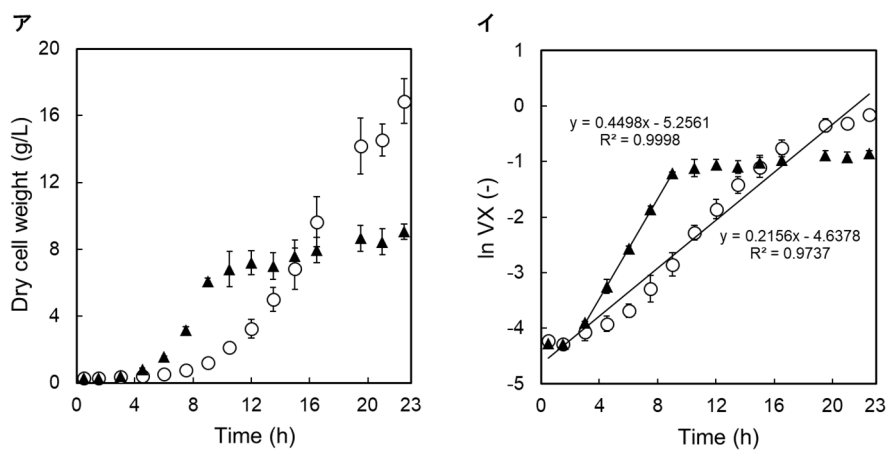


図4 酵母の培養経過に伴う乾燥菌体濃度(ア)と菌体収率(イ)の経時変化。

○と▲はそれぞれ流加条件と回分条件を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Masato, Kato Takuya, Aoyagi Hideki	4. 巻 196
2. 論文標題 Development of a feed-forward control system for medium in shake-flask culture	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical Engineering Journal	6. 最初と最後の頁 A.N. 108939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bej.2023.108939	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 Takahashi Masato, Yoshisuke Sawada, Aoyagi Hideki	4. 巻 206
2. 論文標題 A forced aeration system for microbial culture of multiple shaken vessels suppresses volatilization	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 A.N. 246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00203-024-03960-2	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 134
2. 論文標題 Control of carbon dioxide concentration in headspace of multiple flasks using both non-electric bellows pump and shaking incubator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 240-247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2022.06.006	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 高橋 将人, 青柳 秀紀	4. 巻 117
2. 論文標題 振盪フラスコによる微生物の液内培養法の特徴・課題・展望 - 非意図的な影響について -	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本醸造協会誌	6. 最初と最後の頁 736-742
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 高橋 将人	4. 巻 101
2. 論文標題 ガス環境に着目したラボスケールの液内振盪培養法の深化と新展開	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 160-174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 将人、青柳 秀紀
2. 発表標題 微生物の振盪培養に用いる培養器の換気能に着目したガス制御システムの開発
3. 学会等名 第75回日本生物工学会（一般講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋 将人
2. 発表標題 ガス環境に着目したラボスケールの液内振盪培養法の深化と新展開
3. 学会等名 第74回日本生物工学会（第1回生物学若手賞受賞講演）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 将人
2. 発表標題 気相環境に着目した新規培養法による微生物ダークマター資源の探索
3. 学会等名 日本生物工学会 研究部会シンポジウム「未培養微生物（微生物ダークマター）資源の新展開」
4. 発表年 2023年

1．発表者名 高橋 将人，青柳 秀紀
2．発表標題 振盪フラスコ培養の換気能を増大させる新規デバイスの開発
3．学会等名 第74回日本生物工学会（一般講演）
4．発表年 2022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液滴型流加システムの開発
3．学会等名 第74回日本生物工学会（一般講演）
4．発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1．著者名 青柳 秀紀，高橋 将人，高野 力，小林 和輝，斉藤 諒，長谷川 智弘，原田 玲奈	4．発行年 2023年
2．出版社 シーエムシー出版	5．総ページ数 11
3．書名 「未培養微生物研究の最新動向」第 編1章 従来の微生物培養法の特性：問題点と新たな培養法の提案	

1．著者名 高橋 将人	4．発行年 2024年
2．出版社 筑波大学研究基盤総合センター工作部門	5．総ページ数 5
3．書名 「工作ニュース」液内振盪培養中における培養器の気相ガス制御にむけて	

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------	---------