

継続的な酸素供給を可能にした高圧培養装置の開発と 深海由来酵母を用いた装置評価



New type of pressurized cultivation method providing oxygen for piezotolerant yeast

○開俊樹¹⁾ 関口峻允²⁾ 加藤千明¹⁾ 秦田勇二¹⁾ 丸山正¹⁾ 阿部文快^{1,3)} 小西正朗¹⁾
¹⁾独立行政法人 海洋研究開発機構 ²⁾東京海洋大学 ³⁾青山学院大学 理工学部

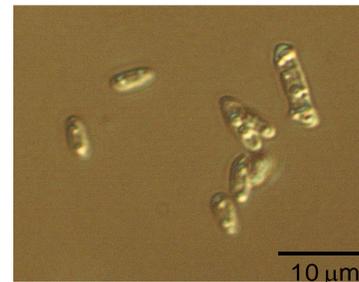
要旨

低温高圧の深海底には環境に適応した好圧性細菌 (piezophilic bacteria) が豊富な生命圏を形成しており、その中には人類にとって有益な未知の微生物も多く存在している。深海に棲息する細菌と古細菌の為の培養技術は既に確立されており、増殖に与える高水圧の影響は様々な菌で報告されている。一方でrRNA遺伝子の統計解析から(偏性)好気性細菌の存在が十分に示唆されていたが、既存の培養装置は閉鎖系であり、真菌や酵母菌を培養するには酸素供給という問題点を解決する必要があった。そこで我々は空気飽和培地の循環システムと高圧下でのメンブレンリアクターシステムを組み合わせ、新たな高圧培養装置を開発した。この技術は高水圧環境下での好気性真菌や酵母菌を検出するのに有用であり、代謝や遺伝子発現の解析に大きな貢献が可能である。

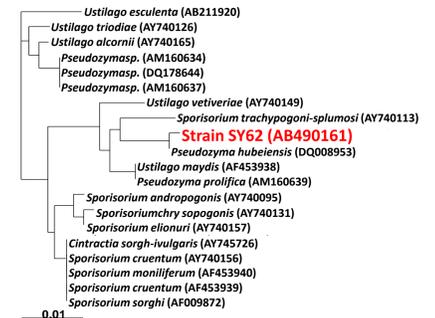
方法

新たに開発した装置は、高圧培養容器 (PV-100, シン・コーポレーション) と高圧ポンプ (X-LC 3185 PU, JASCO) を組み合わせて実現した。リザーバートankから空気飽和した培地またはフロリナート (Fluorinert® FC-72, 住友3M) を循環させる事で、高圧培養容器内部に酸素を継続的に供給する事を可能とした (HPMR-ASMC法: high pressurized membrane reactor system using air-saturated medium circulation system)。この装置の性能評価には、深海由来酵母 *Pseudozyma hubeiensis* SY62 株を用いた¹⁾。YM培地で24時間前培養したのち、本培養培地 (50 g/l glucose, 3.0 g/l NaNO₃, 0.25 g/l MgSO₄, 0.25 g/l KH₂PO₄, 2.0 g/l yeast extract, 100 mg/l chloramphenicol, 100 mg/l streptomycin (pH 6.0)) で100倍希釈した菌液を透析膜に入れ、48時間25°Cで培養し乾燥菌体重量を測定した。

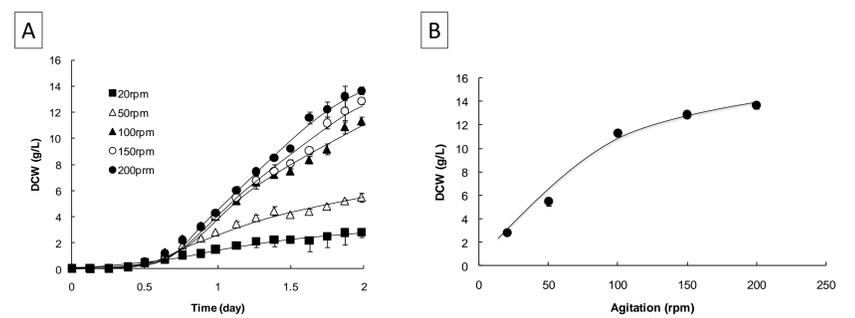
¹⁾ Konishi, M., Fukuoka, T., Nagahama, T., Morita, T., Imura, T., Kitamoto, D., and Hatada, Y.: Biosurfactant-producing yeast isolated from *Calypptogenea soyoeae* (deep-sea cold-seep clam) in the deep sea. *J. Biosci. Bioeng.* 110, 169-175 (2010).



装置評価に用いた深海由来酵母 *Pseudozyma hubeiensis* SY62



Pseudozyma hubeiensis SY62 の分子系統解析 (18S RNA D1/D2領域)

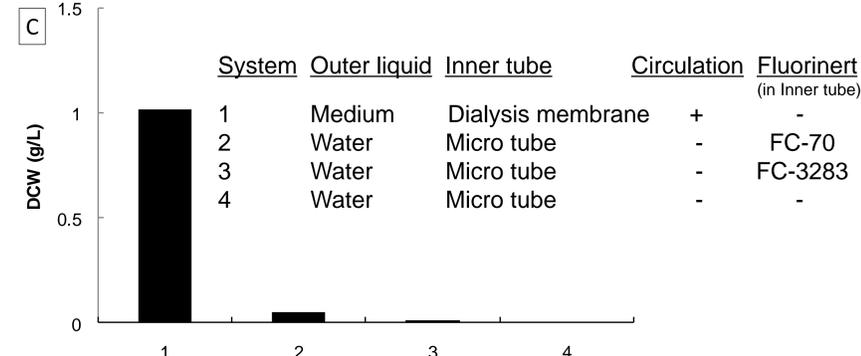
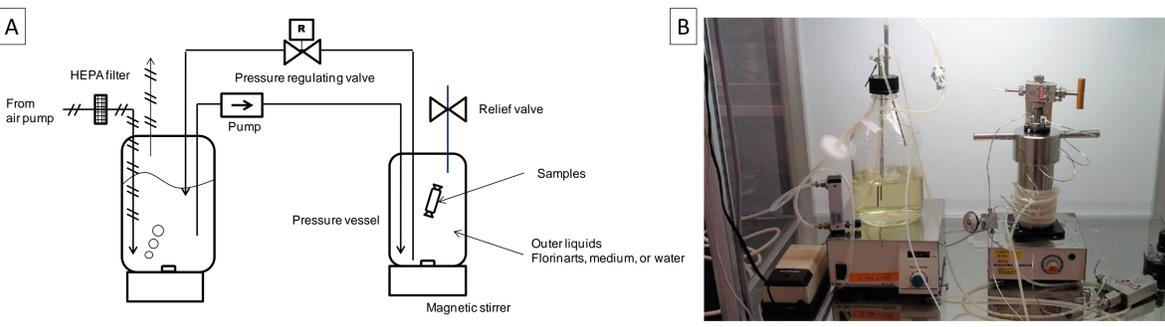


Pseudozyma hubeiensis SY62 培養時における酸素供給の効果
 A:異なる振とう回転数で培養した場合の菌体増加量の比較 (25°C, 0.1MPa, 48hrs)
 B:異なる振とう回転数で48時間培養後の菌体量の比較

培地循環型好気性高圧培養装置の開発および評価

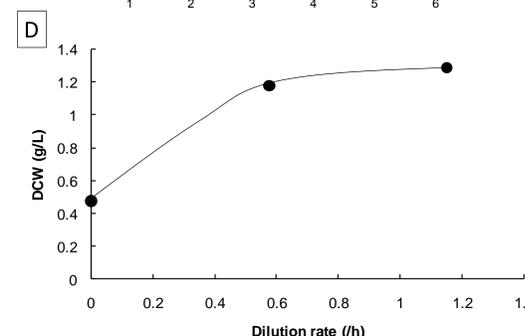
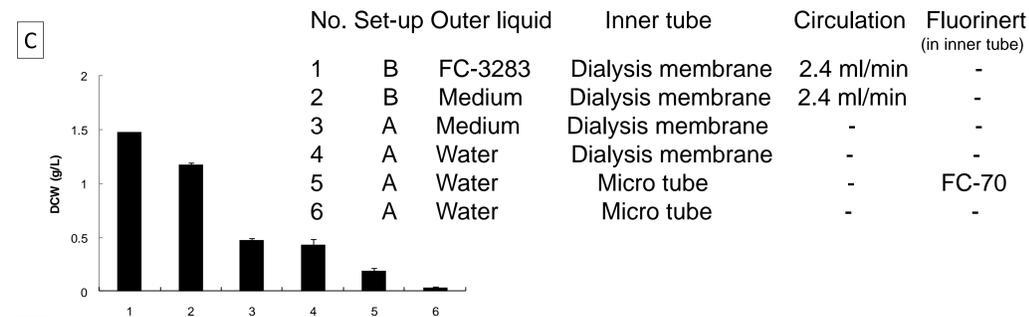
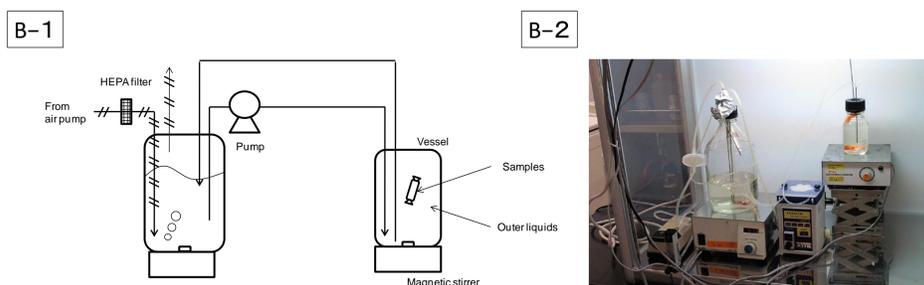
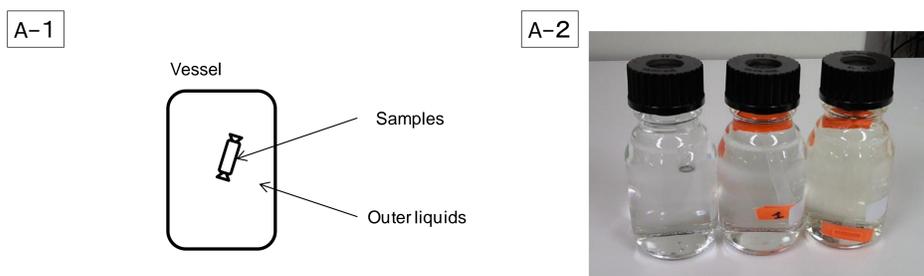
結論

- 培地またまフロリナートを酸素のキャリアーとして循環させ、高水圧状態を保持したまま好気性微生物を培養する装置の開発に成功した (HPMR-ASMC法: high pressurized membrane reactor system using air-saturated medium circulation system)
- 既存の方法とHPMR-ASMC法を比べた結果、深海由来酵母 *Pseudozyma hubeiensis* SY62 は20倍も増殖が促進された
- HPMR-ASMC法は透析膜での酸素移動に律速があり、培養液に対する透析膜の比表面積拡大が効率的な酸素供給を可能にすると示唆された



培地循環型好気性高圧培養装置 (HPMR-ASMC法) の優位性について

A:HPMR-ASMC法の概念図 B:HPMR-ASMC法の実機写真 C:HPMR-ASMC法を用いて、菌体を入れる容器と循環する酸素キャリアーの種類を変えて培養した結果 従来の方法はMicrotubeに酸素飽和フロリナートを入れ菌体を培養する方法だったが、HPMR-ASMC法では格段に菌体の増殖が促進されている



培養液の循環速度を増加させても顕著な菌体量の増加が認められない
 ↓
 透析膜における酸素の移動が律速
 ↓
 さらなる効率的な酸素供給の為には 培養液に対する透析膜の比表面積を高めることが重要

培地循環型好気性高圧培養装置 (HPMR-ASMC法) の酸素供給方法に関する考察

A-1:閉鎖系培養装置概念図 A-2:閉鎖系培養写真 B-1:循環系培養装置概念図 B-2:循環系培養装置写真
 C:培地循環の有無と菌体容器、酸素キャリアーの組み合わせで、菌体の増殖量を比較した結果 D:培地の循環速度を変化させた場合の菌体増殖量変化