

## フラスコ培養とジャー培養の違い

岸本 通雅<sup>1\*</sup>・堀内 淳<sup>2</sup>・熊田 陽一<sup>1</sup>

フラスコ培養とジャーフェンター（以下、ジャー、発酵槽）を使った培養がまったく異なる様相を示すことが多いのは本誌の読者にとっては周知の事実である。一方、基礎実験や、育種スクリーニングといった段階では、試験管培養ないしはフラスコ培養など小スケールの培養方法に頼らなければならないのも当然と考えられる。ここで注意すべきは、バイオ生産プロセスを開発する際、使用菌株はフラスコスケールでスクリーニングし、実際の生産培養はジャーで行うとなると培養条件が異なるために問題が生じてくることである。しかし、このことは近年ほとんど軽視されており、この問題のため多くの研究成果が実用化の憂き目を見ずに闇に葬られてしまったことであろう。実際ジャーの段階まできて予想外に生産性が低く、企業化をあきらめてしまうケースが最近あちこちで起こってきていると漏れ聞こえる。このようなことが繰り返されると研究当事者の心労はもとより、バイオ産業の発展をも阻害すると思われ、このよもやま話でバイオ分野に携わって居られる諸兄に警鐘をならしたいのである。

こんなことは常識と思われるだろうが、もう一度フラスコ培養と、ジャーを使ったときでどのように生産菌周りの環境が異なってくるのだろうか考えてみる。図1に示すようにこれらは主として、菌体の外側にある培養液の状態に関係する。

ここで重要なのは時間とともにこれらの環境因子が変化するところにある。フラスコ培養とジャーの培養ではまず植菌量が異なり、 $k_{La}$ （酸素移動容量係数）も異なっている。そうすると栄養源である基質の消費速度も変化し、好気条件の維持やpHの変化も異なってくるのでフラスコ培養をジャーで再現するのは簡単ではないのであ



温度  
pH  
溶存酸素濃度  
各種培地成分濃度

図1. 菌体周りの環境因子

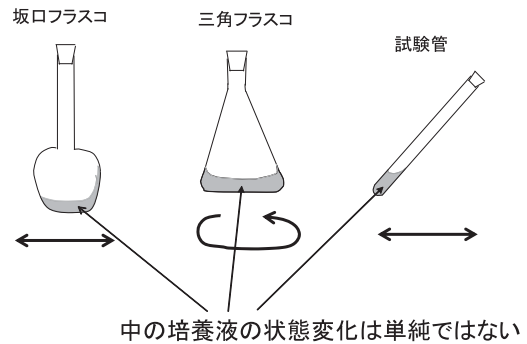


図2. 試験管培養，三角フラスコ培養

る。よくフラスコで得られたデータをジャーで再現できないとの嘆きも聞こえてくるが案外その付近に原因があるのではと考えている。図2に示すような試験管やフラスコ培養では中にある培養液の環境因子の変化は単純ではないのである。

特にカタボライトリプレッションやフィードバック阻害をうまく解除するなどしてタンパク質やアミノ酸を量産しようとするときは、要注意である。すなわちこれらの場合は菌の全体の活性が良好な状態で抑制や阻害を解除する操作をうまくやらないといけない。しかしそのベストな状況をフラスコでは起こせても、ジャーでは再現できないことがあり、さらにジャーとフラスコでは培養経過の違いから抑制や阻害をはずす操作のタイミングが異なってしまうことが多いのである。

それでもスクリーニングでは試験管ないしはフラスコ培養を用いるため、これらの培養条件が生産に都合のよい、たとえばちょうど抑制解除のタイミングなどが、フラスコ培養での生産に都合が良い菌が選ばれてくる。しかしジャー培養ではフラスコ培養と異なった経時変化をとるため、たとえ解除操作のタイミングだけと同じにしても当初はフラスコ培養より生産性の低い結果しか得られないのが常である。以上の困難はカタボライトリプレッションやフィードバック阻害に関する培養だけではなく、多くの生体を用いた生産プロセスにも起こりうると考えられる。しかし後述するようにジャーを用いて

\*著者紹介 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科（教授） E-mail: kishimoto@chem.kit.ac.jp  
<sup>1</sup>京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 <sup>2</sup>北見工業大学化学システム工学科

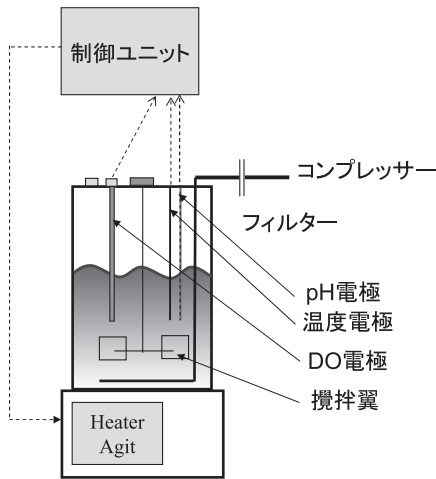


図3. ミニジャークラスの培養槽

根気よく培養条件を設定すれば、フラスコ培養より遙かに生産性をあげられることが多いのも事実である。

それではジャーを用いた培養システムを考えてみよう。ここでは主に容積2 lから10 lのミニジャークラスについて説明する。容積2 lクラスとなると容器本体の大きさは1 l容の三角フラスコとほとんど変わらず、一見スケールアップの意味も持たない程度と思ってしまう。しかしエンジニアリングサイドからみた場合、2 lから数10 m<sup>3</sup>の培養槽へのスケールアップを検討する場合よりも、三角フラスコからミニジャーへの移行段階の方が、多くの困難を伴う場合が多いのである。

図3に微生物培養に用いる典型的培養槽の模式図を示す。

比較的小型の培養槽でも図3のように温度はモニタリングすることで一定に制御できる。ほかにpH、溶存酸素濃度(DO)などもモニタリングでき、多くの場合所定の値に制御できるようになっている。三角フラスコ培養に比べモニタリングや制御が可能なシステムであるので、フラスコ培養を培養槽で再現するのは一見簡単そうであるが、実際は以下に述べる困難な問題が待ちかまえているのである。

まず三角フラスコとジャーで培養する場合には種菌の状況が異なる。スクリーニングの場合、多くの菌株ごとに培養するので、種菌をスラントから一白金耳植菌するか、チューブで凍結したストックカルチャーを解凍して植菌することが多い。これに対しジャーではフラスコ培養などで種菌培養を行い、所定量(5%以上)植菌する。したがって、最初の菌株の状態が異なる。また殺菌操作においてもフラスコ培養や試験管培養など少量の殺菌は比較的短時間に昇温操作や冷却操作が可能であるが、液

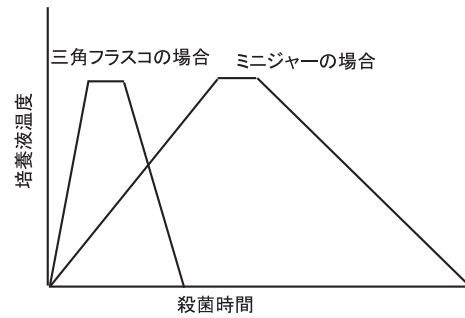


図4. 殺菌中の培養液温度変化(ミニジャー、三角フラスコともにオートクレープで殺菌した場合)

量が多いと困難である(図4)。この主な原因は、伝熱速度は伝熱面積に比例するが、殺菌に必要な熱量は液量すなわち体積に比例することにある。このために避けようがないのである。遺伝子組み換え菌や増殖速度の遅い菌株では、酵母エキスやペプトンなどに含まれるビタミンや増殖因子などの微量成分が増殖や生産に影響することが多く、これらの成分は長時間熱にさらされると変成してしまう。したがってどれだけの時間これら培地成分が高温にさらされているかが重要であるが、ミニジャースケールではこれをコントロールすることは容易ではない。

以上のような理由で、三角フラスコの培養状態がジャー培養ではなかなか再現できない。スクリーニング操作ではフラスコの環境に適合した菌株が選択されてしまうから、フラスコで得られた生産性に対し、ジャーで培養を行うと三角フラスコの生産レベルにすらなかなか到達できないことが多い。ミニジャーを使った培養は三角フラスコに比べて手間も時間もかなり余計にかかってしまうことから、極端な場合、スケールアップの代わりとして大きなフラスコを大量に使ってしまうといった議論も生じてくる。

培地成分中の微量成分を別殺菌したり、三角フラスコ培養でもジャーの培養と同じように前培養を行ったり、 $k_{La}$ をなるべくそろえ、ジャーの培養ではpH制御をあえて行わないなどの工夫を注意深く行えば(少し手間がかかるが)、少なくとも原理的には三角フラスコ培養の結果をジャー培養で得ることは可能である。

以上の問題はありますが、ジャー培養では培地成分の流加をはじめとする操作並びに制御を施すことにより生産性が著しく増加する場合がある。以下にフラスコ培養とジャー培養の違いを端的に示す例をあげていく。

フラスコ培養とジャー培養の違いの内、pHと溶存酸

素濃度の制御，基質流加の可能性についての的を絞り，これらの差異が実際の培養では数倍から数十倍以上の生産性の差異につながってくる例を示す。

ほとんどすべてのフラスコ培養では培養中にpHが低下する。これは代謝産物として有機酸が蓄積することによるが，フラスコ培養では菌体増殖により培養中期から溶存酸素が低下することにより更に促進されることが多い。

したがって大腸菌や酵母をフラスコ培養するとバッファーを用いてもpHは容易に5~5.5程度に低下し，培養中期以降の溶存酸素濃度はゼロである。ましてや乳酸菌や酢酸菌の培養では，おもな生産物が有機酸であるのでpHは4.5以下に低下し増殖が抑制・停止する。保存性の良い(雑菌汚染しにくい)酢の物のなかで培養しているようなものである。これでは，効率的な目的物質生産や代謝レベルの研究などは望むべくもなく，フラスコ培養が簡単なのはわかるがほどほどにして，早く環境条件が制御できるジャー培養に進むべきである。

pHの影響ではまったく逆の例もある。かつて温度感受性発現系を用い組換え大腸菌により酵素生産を試みたことがある<sup>1,2)</sup>。無事組換え大腸菌の作成に成功し，フラスコ培養で温度誘導をかけ目的酵素の生産を確認した。当然次のステップで生産性を向上させるためジャー培養を試みたが事件はここで起こった。増殖に最適なpH7にきっちり制御し溶存酸素濃度も十分高く制御した結果，案の定，増殖はばっちりめでぬかりなく最適なタイミングで温度誘導を行った。しかし目的酵素をまったく生産しないのである。これはどういうことかと思いつく限りのあらゆる検討を行ったがやっぱり駄目で，プラスミドが脱落したかと思い，フラスコ培養でやってみるとちゃんと生産するのである。ではフラスコ培養とジャー培養の違いは何かと，ない知恵を絞り，まさかと思いがフラスコ培養でpHが低下していることに気が付き，その影響かもしれないと考え，温度誘導と同時にpHを6.0まで低下させ，誘導後の菌体増殖を抑制したところ，劇的に(数十倍~100倍)大量生産されるようになったのである。この場合は増殖の最適条件と誘導生産の最適条件が異なり，増殖条件があまりに良いと菌体増殖がすべてに優先され，異種タンパクの生産が大きく抑制されたもので，それらが環境条件であるpHにより制御されていた例である。

あたりまえだが環境中の微生物もpH条件により優先種が大きく変わる。しかしながらそれを研究しようと思えばジャー培養によりpHを厳密に制御した培養実験を行わなくてはならない<sup>3,4)</sup>。メタン発酵の第一段階とし

て知られる酸生成段階は各種の微生物の働きにより，有機物を各種の有機酸(酢酸，プロピオン酸，その他)やアルコール，水素，炭酸ガスなどに変換し，これらは後段のメタン菌やacetogenic bacteriaの基質となる。この酸生成段階を対象に，ジャーを用いた連続培養(ケモスタット)によりpHの影響を検討した結果，pHがアルカリ側ではプロピオン酸発酵，酸性側では酪酸発酵が主体となり，pHの変化に伴い優先種が変化の様子が確認された。確かにジャーを用いた連続培養は大変で，滞留時間にもよるが1日一回のサンプリングと分析，2-3日に一回の培地作りを100日間とか休みなくやらなくてはいけないのだが，だからこそそうして得られたデータは貴重であり，そうしなければわからないことも我々の分野では多いのである。

次にカタボライトリプレッション解除のため抑制原因物質の添加を制限した流加操作を行い，生産性を上げた例を示す。

図5は脱硫酵素生産培養の経時変化を示したものである。この培養では硫黄源であるDBTの添加を押さえ気味にして培養し，脱硫比活性は最大130 mmol-2HBP/kg-DCW・hを達成した<sup>5)</sup>。最終菌体濃度も30 g/lをこえた。それに対し三角フラスコ培養ではせいぜい10 mmol-2HBP/kg-DCW・hであり，菌体濃度も10分の1程度しか得られなかったので三角フラスコ培養と比べてジャー培養による単位液量あたりの脱硫活性は約130倍となった。したがって，DBTの流加をともなったジャー培養により画期的に生産性が改善したのである。

しかし，以上の結果は決して簡単に達成できたのではなかった。当初，三角フラスコ培養の培養条件を参考にしてジャー培養したときにはほとんど脱硫活性がなかった。炭素源や硫黄源，窒素源などいろいろと変えて試行

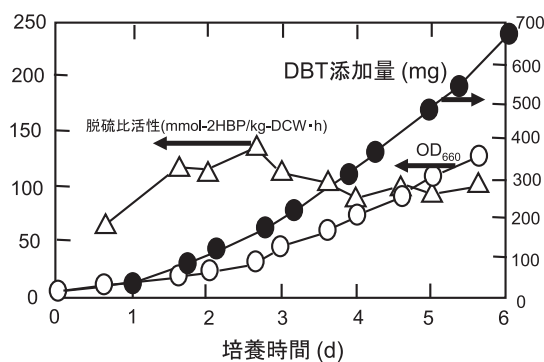


図5. 脱硫酵素生産培養の経時変化

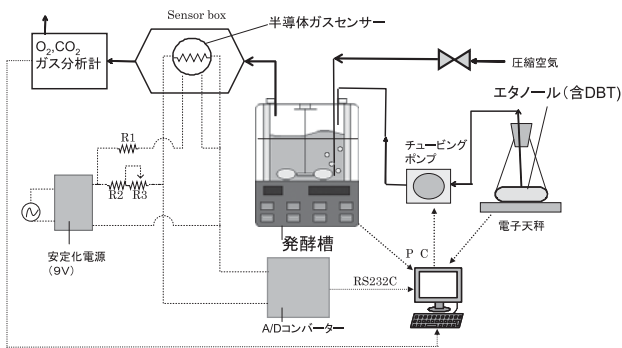


図6. エタノール流加培養システム

錯誤を半年ほど繰り返したが功を奏さなかった。その後、炭素源をエタノールにすることが生産性を上げるのに都合がよいなどの情報をえてやっとフラスコなみの比活性を得ることに成功したのである。そこで思い切って図6のようなエタノール流加培養システムを構築した。このシステムを構築した理由は、エタノールは増殖阻害物質であり濃度を制御することが望ましいと考えたからである。しかし下記のような複雑で、長時間の培養にたえられるシステムの構築はかなり手間のかかるものであった。

このシステムを作ったころはすでに、文献や研究報告などからこの培養では硫黄源からのカタボライトリプレッションが関係していることが推察できた。しかし、硫黄源を制限して流加することが、カタボライトリプレッションを解除してこのように画的に脱硫酵素の生産を増加しうるかは未知であった。硫黄源以外に炭素、窒素、リンなど多くの栄養素が必要でそれらの培養条件をすべてうまくそろえないとカタボライトリプレッションの効果を抑えても酵素生産への効果はほとんど期待できないからである。この研究以前に、筆者自身 *Streptomyces griseus* を用いたストレプトマイシン生産で同様な効果を期待して、炭素源やリン源などを制限しながら流加する培養をさんざん行ったあげく失敗した苦い経験がある。この原因はほかにストレプトマイシン生産を抑えてしまうメカニズムが菌体に存在し、この制御機構を培養技術だけでは解除できなかったためと考えている。以上の様に培養操作の改善以外に、菌株育種の段階までさかのぼった検討が必要ではないかといった懸念が常にある上、以下に述べる技術的問題も深刻であった。すなわち流加培養は回分培養より長期間に及び、システムは図6に示す如く複雑となりトラブルの可能性も高い。したがって検討を要する事項が増える割には、培養

実験を行える回数は時間的にも労力的にも限られたものとなってしまった。このことは適当な流加方法を探索できるチャンスが非常に少ないものとなってしまふことにつながるのである。この脱硫酵素生産培養でも培養時間は6日間に及ぶ上、深夜作業、無人運転など克服すべき難関は多く、決して成功を確信して始めた実験ではなかった。幸いこの実験ではDr. Hai Yanとの連携作業が非常にうまくいったのと、DBTがエタノールによく溶けることからエタノールに混ぜて微量のDBTをスムーズに流加できたことで高い脱硫酵素活性をかるうじて達成できたのである。今から思うと、このような過酷な状況下であえて培養実験を遂行し、高い脱硫酵素活性をえることは、現在の大学や研究所でも容易には達成できないと思われる。

これまでに筆者らは、上述の培養以外に、メタノールによる高濃度基質阻害を回避するため、メタノールの流加を行ったビタミンB<sub>12</sub>生産<sup>6)</sup>、エタノール流加の最適化を検討したグルタミン酸生産培養<sup>7)</sup>、協奏的フィードバック阻害を回避するためにスレオニンを制限しながら流加したリジン生産<sup>8)</sup>、呼吸商RQを指標にしてグルコース流加を制御したパン酵母生産<sup>9)</sup>、AOX1プロモータを発現させるためメタノール流加を行うscFv生産<sup>10)</sup>などを行ってきた。ストレプトマイシン生産以外は流加操作により三角フラスコ培養よりはるかに高い生産性を得ることに成功している。したがってジャーを用いた流加培養に関する技術は国際競争力のあるバイオプロセスを構築するには、非常に重要であると考えられる。昨年の米国化学工学会(AIChE)でも流加培養の効果を確認する発表が数多くみられた。

しかし、このような流加培養実験は下手をすると実験当事者に過酷な作業を要求することになる。研究を指導する人はバイオリアクターシステムの購入時点から、トラブルが起きにくく運転操作が容易で、かつ安全な培養システムの構築を真剣に追求し、長時間作業や深夜作業をできるだけ軽減するよう努め、必要な場合は交代制などを取り入れ、自らも含め特定の個人に過酷な作業を強いることがないよう注意しなければならない。

また流加培養実験におけるトラブルの多くは回分培養にはない部分、すなわち流加システムの周りでおこることが多い。通常雑菌が入らないようチュービングポンプ(ペリスタリックポンプ)が流加操作には用いられているが、長時間の運転中チューブがローターに噛み込まれてしまい、その結果破れたり詰まったりしてしまうことがある。このトラブルは、粘着テープなどでチューブを固定しローラーの中へチューブがずれ込んでいかないよ

うに工夫して凌いだが、殺菌可能でもっと安定したポンプの開発が望まれる。また最近の奇妙なトラブルでは酵母によるscFv生産において、培養開始後100時間程度の深夜にメタノール流加液の出口付近に菌体がwall growthを起こして出口をふさいでしまい、メタノール流加がストップしてしまうといった事件も起こった。これは(無菌条件をできるだけ保ちつつ)、発酵槽のふたをはずして中の様子を目視で確認し、別の予備の出口にチューブをつなぎかえることにより解決した。以上のようにジャーを使った長期にわたる流加培養実験では発泡現象、上述の様な流加システムのトラブル、冷却水漏れ、コンタミ、制御システムのダウンなど予測していないハプニングが時々起こるので注意が必要である。

昨今バイオの分野では培養技術を軽視する風潮があるが、バイオ生産技術の要である培養技術が衰退してしまうことは、バイオ産業全体の衰退につながる可能性がある。さらに抗体医薬生産などでバイオ産業の市場拡大が予想され、バイオ産業の発展が社会的側面から

も要望されているなどを考えると、実際のでもっと高度な培養技術の開発が必要となるだろう。

また身近な問題として以下のことを強調したい。すなわち微生物を用いた新規培養プロセスを実用化ないしは企業化する際には、試験管や三角フラスコの培養レベルでその生産性を確認するだけでは不十分であり、少なくともミニジャーレベルで生産性を確認しておくことが必要である。

## 文 献

- 1) Horiuchi, J. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 382 (1993).
- 2) Horiuchi, J. *et al.*: *Biotechnol. Letters*, **16**, 113 (1994).
- 3) Horiuchi, J. *et al.*: *Bioresource Technol.*, **82**, 209 (2002).
- 4) Horiuchi, J. *et al.*: *Biotechnol. Tech.*, **13**, 155 (1999).
- 5) Yan, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 361 (2000).
- 6) Yamane, T. *et al.*: *J. Ferment. Technol.*, **54**, 229 (1976).
- 7) Kishimoto, M. *et al.*: *Biotechnol. Letters*, **2**, 403 (1980).
- 8) Tada, K. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 669 (2000).
- 9) 丸山 亮ら: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 137 (1990).
- 10) Fujiki, Y. *et al.*: AICHe Annual Meeting Conference Proceedings, 626r (2011).