

1Ip11 基質の交換が可能な新規微生物培養装置の開発 — 培地支持基盤素材の評価 —

○馬場 康輔¹, 野田 尚宏², 青柳 秀紀¹, 関口 勇地²
 (¹筑波大院・生命環境, ²産総研)
 aoyagi@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

【背景】地球上の微生物の殆どは未だ人為的な分離・培養が困難であり、その状態は不明な部分が多い。これまで、微生物の分離・培養には固形培地を利用したコロニー形成に基づくものが殆どであったが、固形培地では培養中の培地成分の交換や変更は不可能であった。また、固化剤である寒天が微生物の生育に少なからず影響を与えており、寒天上で生育しない微生物も数多く存在することも古くから知られている。我々は固形培地の欠点を克服するため、培地成分の連続的交換ができ、コロニー形成が可能な微生物培養装置を開発し、様々な難培養性微生物の分離・培養を実現することを目指している。本研究では培養装置の開発に先立ち、装置に用いる最適な培地支持基盤等について検討を行った。【方法と結果】LB液体培地を吸収パッドや高吸水性ポリマー等の支持基盤に保持させ、その上に数種類のメンブレンフィルターを敷いた。各メンブレン上で *Escherichia coli* を培養し、CFU カウントを行った結果、いくつかの組み合わせでは寒天培地と同程度のコロニー形成能が確認された。特に高吸水性ポリマーとポリカーボネートメンブレンの組み合わせは、寒天と同程度の培養能を示しており、培養装置に用いる培地支持基盤として有用であることが示唆された。現在、生育に長期間を要する *Gemmatimonas aurantiaca* についても同様の試験を行っており、得られた結果に基づき最適な素材を選択し、環境サンプルを用いた培養可能な菌叢の解析や新規培養装置の開発について検討を行う予定である。

Evaluation of solid surfaces for colony formation of microbial cells

○Kosuke Baba¹, Naohiro Noda², Hideki Aoyagi¹, Yuji Sekiguchi²
 (¹Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, ²AIST)

Key words colony formation, cultivation device, membrane filter

1Ip13 培養温度と通気条件が設定可能な小型振盪培養システムの開発 (第3報)

土田 貴之¹, ○高橋 将人¹, 澤田 宜介², 青柳 秀紀¹
 (¹筑波大院・生命環境, ²いわしやバイオサイエンス)
 aoyagi@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

【目的】フラスコ等を用いた振盪培養法や培養条件は、ペニシリンが工業生産された1950年代に確立され、今日まで用いられてきた。近年、新たな微生物機能の利用性の拡大が求められている。我々は従来の培養法や培養条件を見直すことで微生物利用の新たな可能性が見出せると考え、フラスコ振盪培養法に換わる新規な小型振盪培養システム (High Aeration and Ventilation [HAV] リアクター) を開発⁽¹⁾し、微生物スクリーニングへの活用を提案した⁽²⁾。本研究では、HAVリアクター特有の培養条件で集積培養を行い、その有効性を評価した。【方法と結果】HAVリアクターは三角フラスコよりも酸素移動容量係数 ($k_L a$) が2.93倍、揮発速度定数 (k_v) が46倍、高い値を設定でき、既存のフラスコにはない培養環境を実現できた。HAVリアクターで種々の条件を設定して環境サンプルの集積培養を行い、PCR-DGGE法で菌叢解析を行った。 $k_L a$ と k_v を変化させ、菌叢を解析した結果、HAVリアクターでは特定の微生物の濃縮が認められた。また、HAVリアクターは高い $k_L a$ と k_v を有する環境を好む菌の培養に適していることが示唆された。培養温度が菌叢に及ぼす影響を解析した結果、特定の微生物の濃縮が認められた。5%CO₂ 通気条件下で、菌叢を解析した結果、Airを通気した場合とは異なる菌叢が得られた。HAVリアクターを用いて $k_L a$, k_v , 培養温度、通気するガスの種類等を変化させることにより、新規微生物をスクリーニングできる可能性が示唆された。(1) H21 生物工学会要旨 P.175, (2) H22 生物工学会要旨 P.52.

A novel method for in-vessel temperature and aeration control of an orbital culture system (part 3).

Takayuki TSUCHIDA¹, ○Masato TAKAHASHI¹, Yoshisuke SAWADA², Hideki AOYAGI¹
 (¹Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, ²Iwashiya Biosci.)

Key words aeration, screening, temperature, ventilation

1Ip12 微生物培養用の米ペプトンの作成と利用 (第2報)

○渡部 侑子, 吉川 春芳, 青柳 秀紀
 (筑波大院・生命環境)
 aoyagi@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

【目的】大豆ペプトン (ポリペプトン) は食品添加物や培地成分など様々な用途に用いられてきたが、近年、アレルギー表示の義務化により、社会的ニーズとして大豆ペプトンに替わる植物性ペプトンが求められている。我々は低アレルゲンの米に着目し、実用的な微生物培養用の米ペプトンを作成し、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の細胞やプロトプラストを対象にその有用性を示した⁽¹⁾。本研究では、米ペプトンの利用性の拡大を目指し、ビフィズス菌や乳酸菌等の有用な食品微生物の培養への適用を試みた。【方法と結果】モデル微生物として JCM 登録株の *Bifidobacterium breve* 等のビフィズス菌や *Lactobacillus casei* 等の乳酸菌を複数種実験に用いた。米ペプトンは前報⁽¹⁾に従い作成した。大豆ペプトンを含む液体培地で前培養を行い、大豆ペプトン培地と米ペプトン培地で液体培養を行った結果、米ペプトン培地ではいずれの菌株も大豆ペプトン培地と比べて同程度以上の増殖が認められ (*B. breve* JCM 1273 や *L. casei* JCM 1134 では増殖促進効果が認められた)、米ペプトンがビフィズス菌や乳酸菌の培養に有効である事が示された。米ペプトン培地で前培養を行い同様に検討した結果、米ペプトン培地の増殖促進効果が明確に示された (全般的にビフィズス菌に比べて乳酸菌で強い増殖促進効果が見られた)。現在、ビフィズス菌や乳酸菌の pH 制御培養および米ペプトンが有する他の機能の探索について検討中である。(1) H22 生物工学会要旨 p. 54.

Preparation of rice peptone for culturing microbial cells and it's application (Part 2).

○Yuuko WATANABE, Haruka YOSHIKAWA, Hideki AOYAGI
 (Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words bifidobacteria, lactic acid bacteria, rice peptone

1Ip15 微小重力培養を活用した微生物の新規スクリーニング法の開発【第2報】

○黒田 晶葉, 青柳 秀紀
 (筑波大院・生命環境)
 aoyagi@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

【目的】近年、従来の培養法により単離培養できる微生物は自然界に存在する微生物の1%前後であることが示唆され、新たな培養法が求められている。この現状を踏まえ、我々は微小重力環境に着目し、微小重力培養条件が環境サンプルの微生物叢に及ぼす影響を解析した⁽¹⁾。その結果、微小重力条件に対する感度が微生物の種類により大きく異なることを明らかにした⁽¹⁾。本研究では、微小重力培養と通常重力培養を種々組み合わせた際に生じる微生物叢の挙動を解析し、微生物の新規スクリーニング法としての微小重力培養の有効性を評価した。

【方法および結果】Schneider, LB, R2A など各種培地に環境サンプルを接種し、微小重力培養と通常重力培養を種々組み合わせる培養を行い、微生物叢の培養経過を比較すると共に、DGGE法による菌叢解析を行った。その結果、微小重力培養により特異的に増殖が促進する微生物の存在が認められた。また、異なる孔径を有する種々のフィルターで環境サンプルを濾過した後に各種培地に接種し、微小重力培養を行ったところ、培養できる微生物の数や種類が大きく異なった。さらに、微小重力培養した培養液を、寒天平板培地に塗布して培養した結果、微小重力培養で特異的に増殖する微生物を寒天平板培地上で培養できる可能性が示唆された。以上の結果を基盤に種々検討を行った結果、微小重力培養は微生物の新規スクリーニング法として有効に活用できる可能性が示された。

(1) H22 生物工学会要旨 P.52

Development of a novel method for screening microorganisms using microgravity culture (Part 2)

○Akiha Kuroda, Hideki Aoyagi
 (Grad. Sch. Life. Env. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words Microgravity culture, Filtration, Screening