

## 深海微生物実験システムを用いた高水圧下 における培養実験

稲田 哲哉\*<sup>1</sup> 平 清\*<sup>1</sup> 菊間 敏雄\*<sup>1</sup>  
鈴木掀三郎\*<sup>1</sup> 許 正憲\*<sup>1</sup> 森屋 和仁\*<sup>2</sup>  
小松 徹史\*<sup>3</sup>

これまでに高水圧下での大量培養の試みはほとんど行われていなかった。本センターで開発した深海微生物実験システムの培養槽を用いることで高水圧下での大量のアルコール発酵実験が初めて可能となった。2種類の酵母*Saccharomyces cerevisiae* (IFO 2347とY-44; 相模湾の1,100mの深海から分離された酵母菌)を用いたこの実験で100kgf/cm<sup>2</sup>や200kgf/cm<sup>2</sup>の高水圧が発酵を抑制するよりむしろ増進する結果を得た。本実験において、移送容器を用いることにより減圧なしのサンプリングが可能となり、その有用性が示された。

耐圧性菌や好熱性菌等の高水圧培養実験を行い、これらの実験において、高水圧下での頻繁なサンプリングを行うために新たに小型のサンプリングチューブを開発した。また、嫌気状態を維持するために内槽内のベローズの材質を検討し、絶対嫌気性菌の高水圧培養も可能となった。さらにモニター用窓の結露防止のために窒素ガスの吹きつけと窓周辺の空気の吸引を行うことが有効であることが示された。

キーワード：微生物，高水圧，アルコール発酵，培養，サンプリング，嫌気，結露

## Cultivations of several microorganisms under high hydrostatic pressure using the Deep-sea Baro/Thermophile Collecting and Cultivating System

Tetsuya INADA\*<sup>4</sup> Kiyoshi TAIRA\*<sup>4</sup>  
Toshio KIKUMA\*<sup>4</sup> Kimio SUZUKI\*<sup>4</sup>  
Masanori KYO\*<sup>4</sup> Kazuhito MORIYA\*<sup>5</sup>  
Tetsushi KOMATSU\*<sup>6</sup>

- 
- \* 1 深海環境プログラム推進課
  - \* 2 北海道糖業(株) (前深海環境プログラム)
  - \* 3 深海環境プログラム
  - \* 4 DEEP Promotion Division
  - \* 5 Hokkaido Sugar Co., Ltd. (Formerly DEEP STAR Group)
  - \* 6 DEEP STAR Group

Little effort has been made to develop a large scale cultivating system under high hydrostatic pressure. In this paper, several microorganisms under high hydrostatic pressure were cultivated in culture vessels which are subsystems of the Deep-sea Baro/Thermophile Collecting and Cultivating System (DEEP BATH system). It became possible to carry out large scale ethanol fermentation under high hydrostatic pressure by using this DEEP BATH system. In this experiment *Sacchromyces cerevisiae*-IFO 2347 strain and Y-44 strain isolated from a depth of 1,100m in Sagami Bay-fermented more effectively at 100kgf/cm<sup>2</sup> and 200kgf/cm<sup>2</sup> than atmospheric pressure in culture vessels. We could also sample without decompression by using transfer units. A barotolerant bacterium and a thermophilic archaeobacterium were also grown under high hydrostatic pressure in this DEEP BATH system. For these experiments, we developed new small sampling tubes to sample frequently without decompression. We succeeded to cultivate a strictly anaerobic bacterium in this system by material improvement of inner vessels for contamination of oxygen. In addition, we showed the importance of blow of nitrogen gas to the window and aspiration of air to monitor the growth of bacteria in culture vessels without dew condensation.

**Key Words :** Microorganisms, High hydrostatic pressure, Ethanol fermentation, Cultivation, Sampling method, Anaerobic condition, Dew condensation

## 1 はじめに

深海環境は暗黒、低温、高水圧という特徴を持ち、一般に常圧下に生息する生物の生命活動を抑制する。しかし、そのような極限環境においても、多くの微生物が生息していることが報告されている。そして、これら微生物の中には、有用物質を生産する微生物や環境の浄化を行う微生物が含まれている。このような有用な微生物を高水圧下で効率よく培養するために、深海環境に生息する微生物の高水圧に対する適応機構、耐圧メカニズムの解明は非常に有意義であるといえる。

深海底から採集した微生物の実験を支援するために、深海微生物実験システムは1993年の8月に完成した(写真1)。実験システムは採泥器、希釈装置、分離装置、培養槽の4つのサブシステムからなっており、分離装置と培養槽には微生物の増殖を測定するために増殖モニターが設けられている<sup>1)2)</sup>。

深海には常圧下では死滅したり生育阻害を受ける絶対好圧性菌が生息すると考えられる。本実験システムは、深海の環境(圧力、温度)を保ったまま、海底の泥を採集、希釈、分離及び大量培養することによって絶対好圧性菌の研究に用いる装置である。その使用圧力範囲は0~680kgf/cm<sup>2</sup>、使用温度範囲は採泥器と希釈装置が0~10℃、分離装置と培養槽が0~300℃(全装備では0~150℃)である。

現在、本実験システムは深海底から採集した泥からの絶対好圧性菌の探索だけでなく、種々の微生物の加圧培

養実験にも利用されている。これまでに、酵母菌の高水圧下でのアルコール発酵、耐圧性菌の高水圧下における培養実験及び好熱性菌の高温・高水圧下における培養実験等が実施されてきた。

本報告では、培養槽を使った高水圧下での大量培養の最初の試みであった酵母菌のアルコール発酵<sup>3)</sup>の実験方法及び結果ならびに耐圧性菌、好熱性菌の培養実験<sup>4)</sup>等

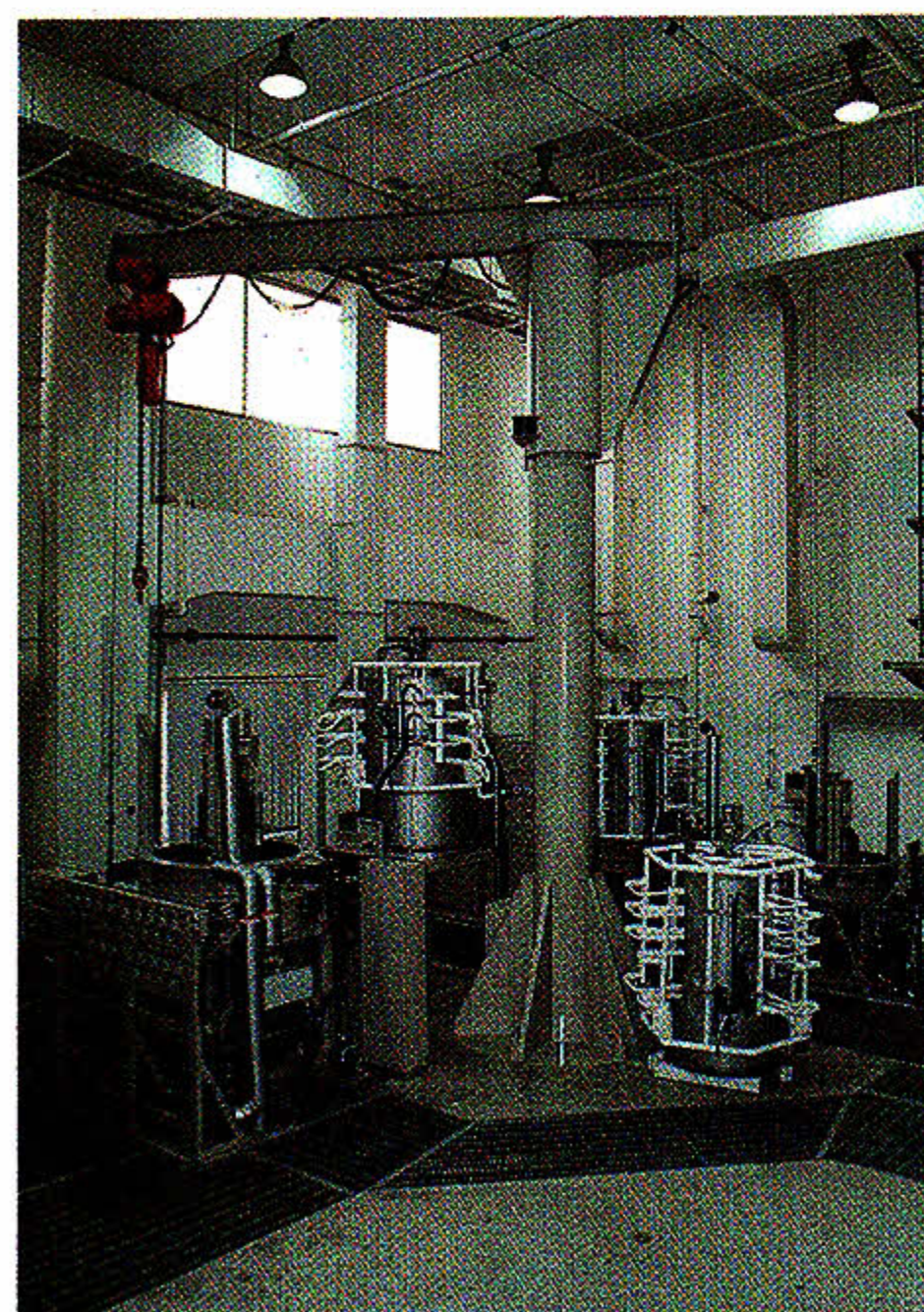


写真1 深海微生物実験システム

Photo 1 On land facilities of DEEP BATH

の実施時に直面した問題を解決するために行なった減圧なしのサンプリング方法の開発、嫌気状態を確保するための内槽用ベローズの改良そして結露の防止方法について報告する。

## 2 培養槽を用いたアルコール発酵実験

本実験システムの培養槽を使用することによって、初めて酵母菌の高水圧下での大量アルコール発酵実験が可能となった。

培養槽は図1に示すように、パイレックスガラス製内

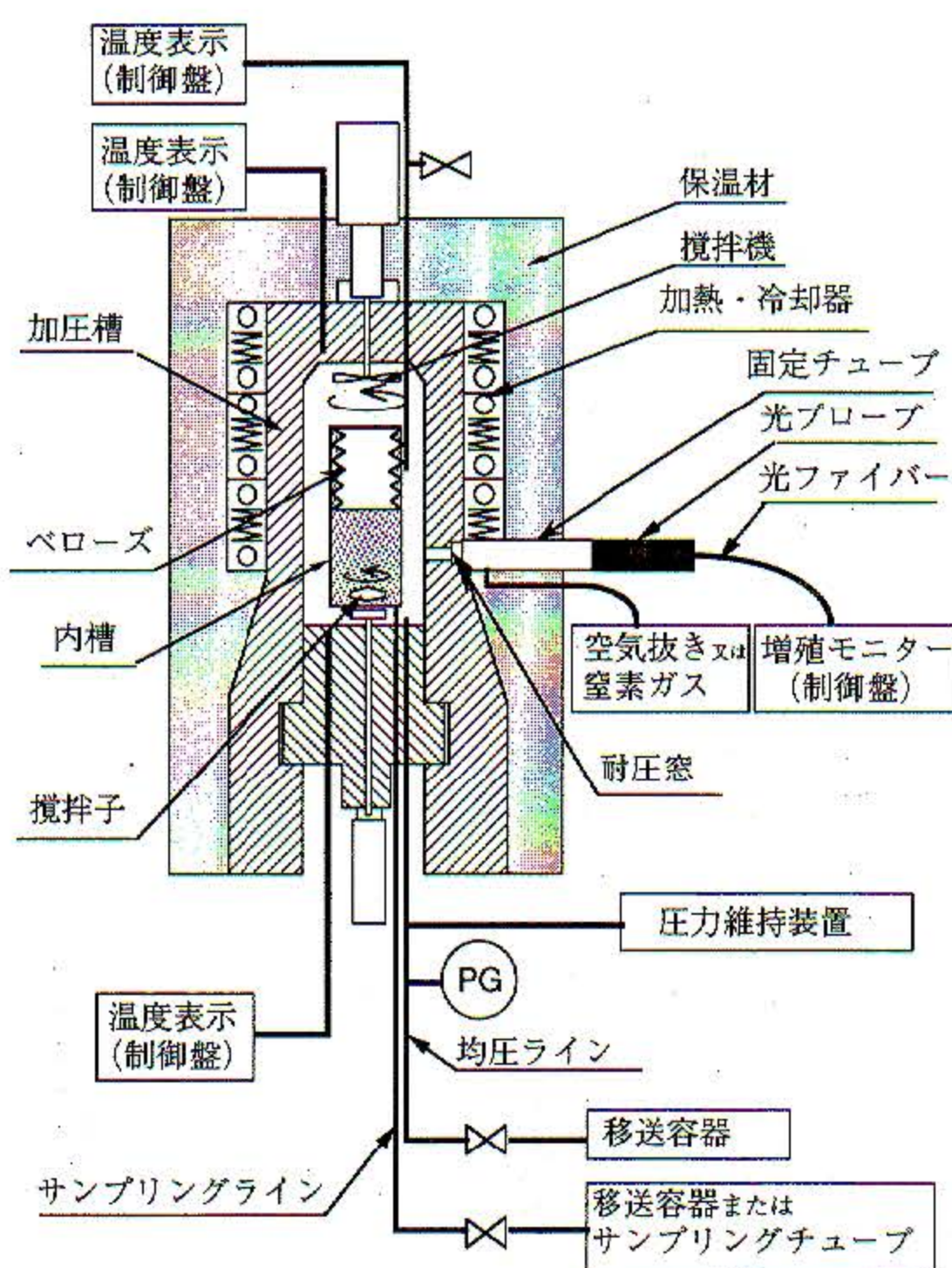


図1 培養槽の断面図

Fig.1 Schematic diagram of Culture vessel

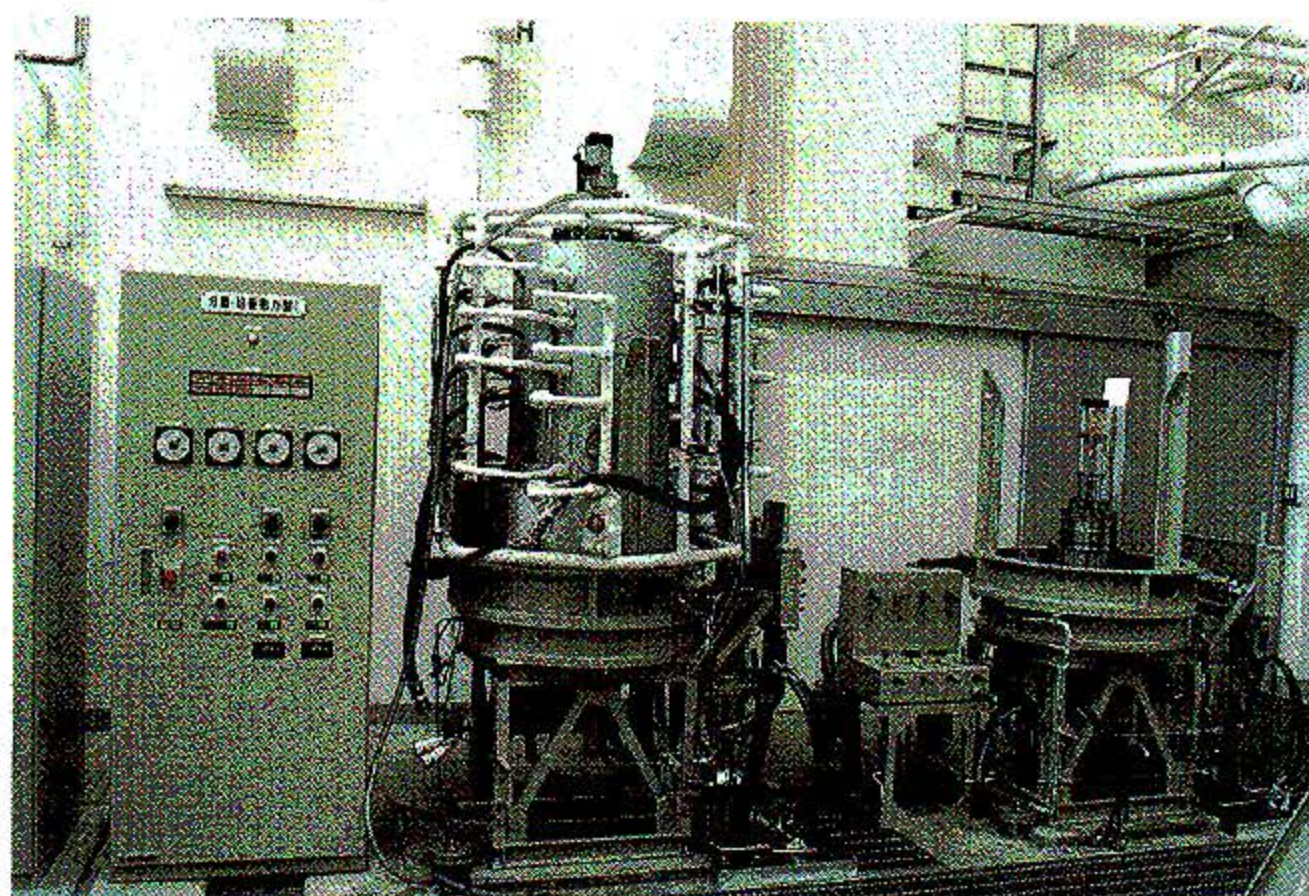


写真2 培養槽

Photo 2 Culture vessels (left:external view, right: interior view).

槽およびベローズ、ベースフランジそして加圧槽、加熱・冷却器、保温材からなる容器等で構成されていて、現在、2基設置されている(写真2)。

以下に酵母菌の高水圧下でのアルコール発酵の実験の一連の作業について説明する。

まず、実験の前処理として、内槽につながるサンプリングラインに121℃以上蒸気を20分間流して滅菌する。

次にクリーンベンチにて、前培養後の種菌と発酵用培地とを内槽に混ぜて入れる。初期の生菌数はおよそ  $5 \times 10^7 / \text{ml}$  である。本実験では、2種類の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた。IFO2347株(協会NO.7)とY-44株であり、前者は、代表的なアルコール生産菌で、後者は相模湾の1,100mの深海から分離された酵母菌である。種菌の培養には500mlのYPG培地(Bacto-Yeast extract, 0.5(w/v)%: Bacto-pepton, 1(w/v)%: D-glucose, 1(w/v)%), 発酵実験には15(w/v)%のD-glucoseを含むYPG培地1,000mlが使われた。

この実験では同時にコントロールとして培養槽を使用しない大気圧下における開放系の培養も行った。

内槽を取り付けた後、クレーンを用いて容器をかぶせた(写真3)。培養槽の容器は約1.6tもあり、脱着には細心の注意を要する。

容器をかぶせたら、温度制御用の配管ならび温度センサーの信号線等を接続し、圧力、温度を設定後、培養実験を開始する。培養槽によるアルコール発酵は大気圧、100kgf/cm<sup>2</sup>及び200kgf/cm<sup>2</sup>の下で、無攪拌状態、20℃にて3日間行った。分析のため一日間隔で培養槽から発酵培養液のサンプルをとり、アルコールの濃度とpH値を測定した。

高水圧下で培養している培養液の一部を、その培養を中断することなく、サンプリングするために移送容器を使用した(写真4)。この移送容器は図2のように培養槽に接続後、培養槽内と均圧することで、圧力を保持したまま培養液を最大60ml抽出できる。サンプリングライン内の残留液の影響を無くし、正確な内槽内の培養液を抽出するために、このサンプリング作業は2回繰り返され、1回目の試料は廃棄された。この試料の排出は、移送容器を培養槽から切り離れた後、圧力を落としてから行った。

培養実験終了後、圧力を落として培養槽の容器を開けた。写真5に培養後の内槽の様子を示す。

後処理としてサンプリングラインを再び蒸気滅菌する。

このような前処理の蒸気滅菌から後処理の蒸気滅菌までを1サイクルとし、培養実験を行う。

この実験の分析結果を表1に示す。これらの結果より、開放環境の方が培養槽のような密閉環境よりアルコール生産性が高いこと、および密閉環境では高水圧下の方が大気圧下よりアルコール生産が高いことが示された。この原因として、培養中生成されるCO<sub>2</sub>ガスが開放環境より密閉環境の方が蓄積しやすくアルコールの生産を抑制しているが、100kgf/cm<sup>2</sup>や200kgf/cm<sup>2</sup>の高水圧下ではCO<sub>2</sub>の溶解度が高まりCO<sub>2</sub>ガスの影響を受けにくくなることが考えられた。

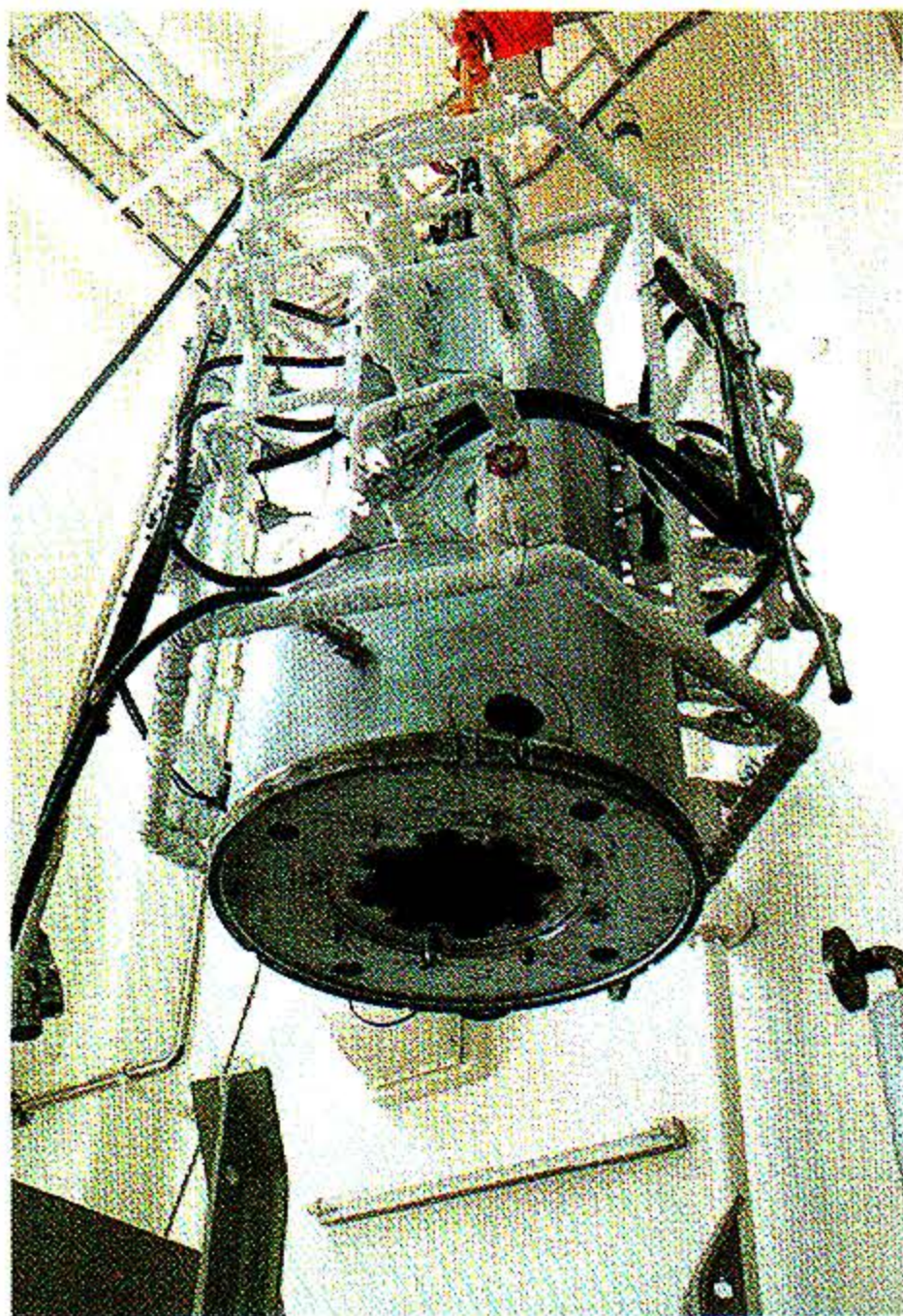


写真3 培養槽容器の装着  
Photo 3 Hoisting pressure vessel for putting it on.

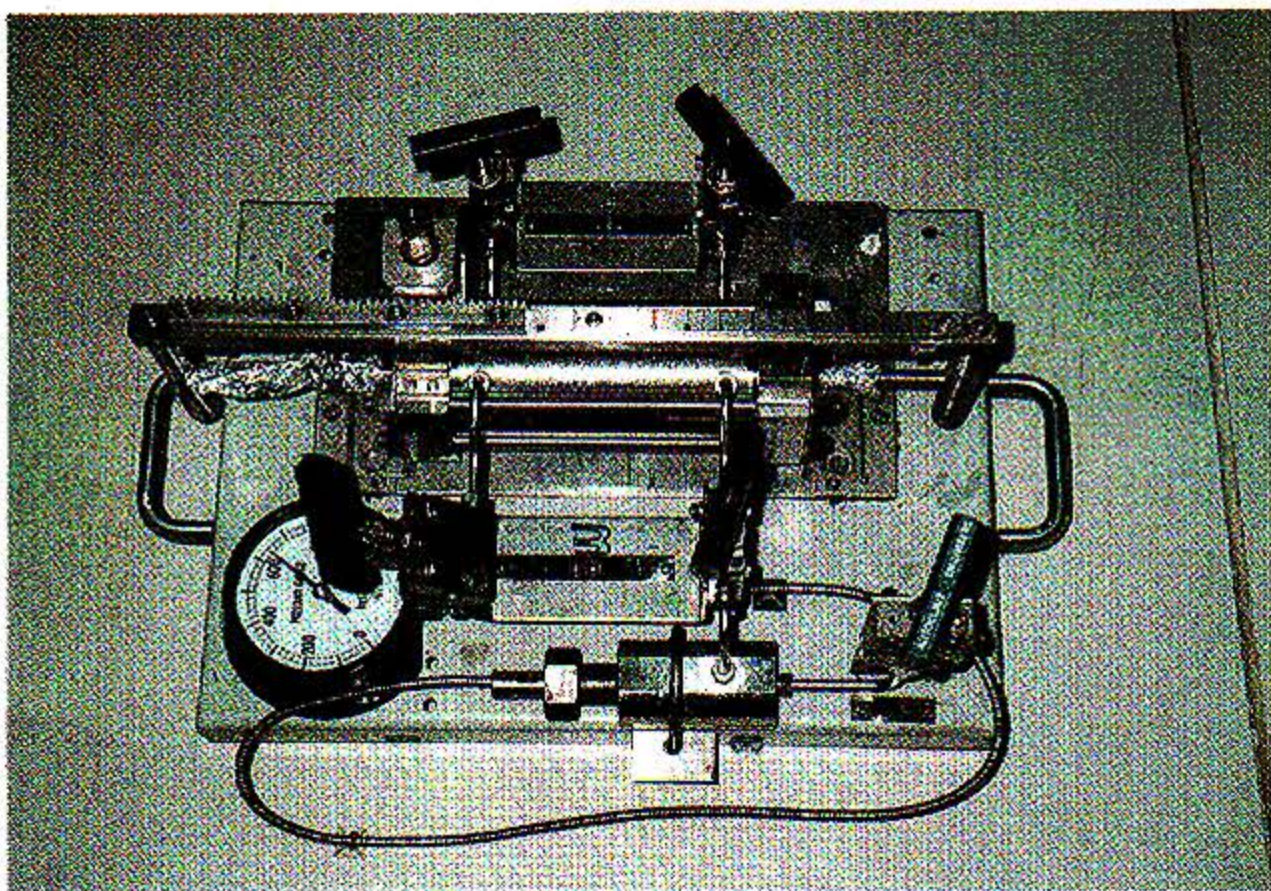


写真4 移送容器  
Photo 4 Transfer unit.

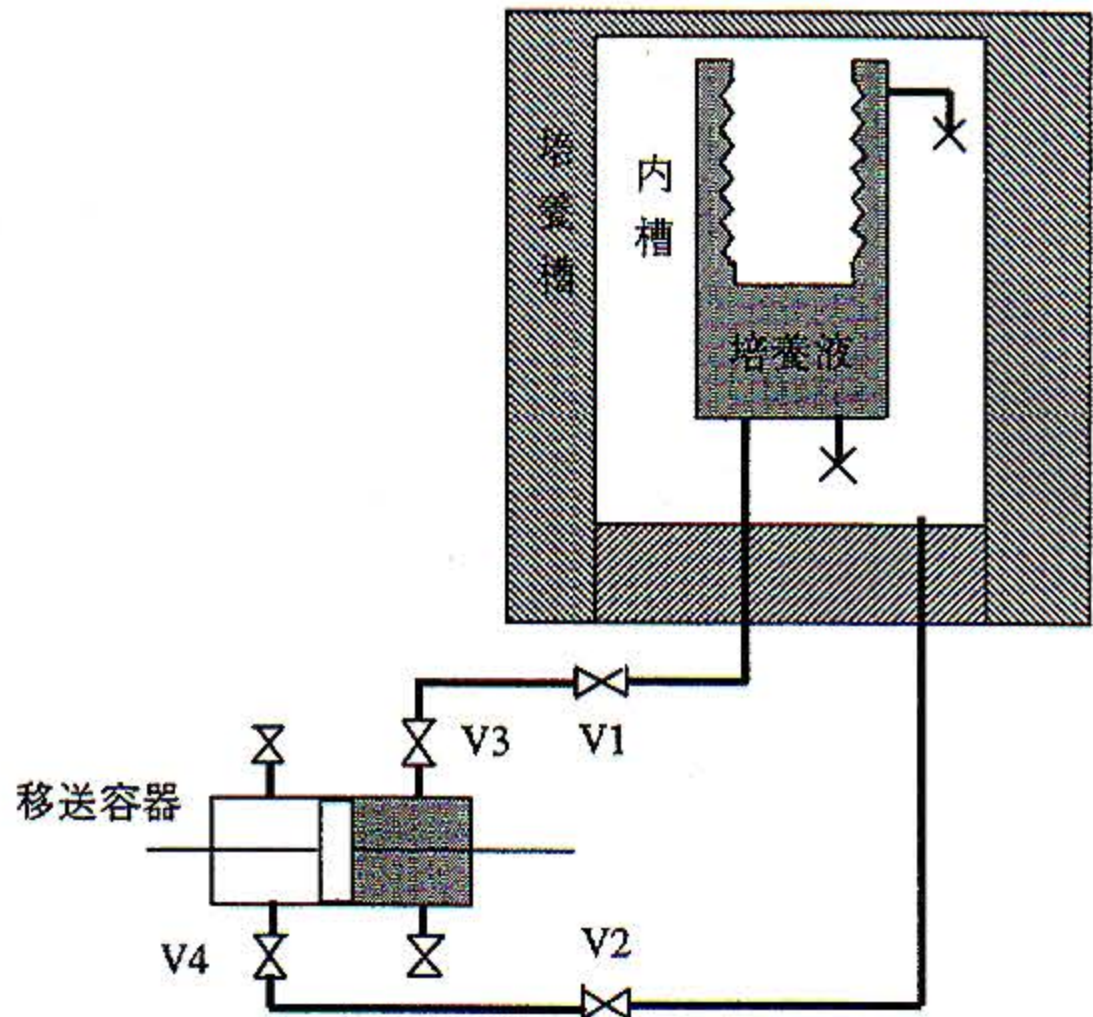


図2 移送容器を使ったサンプリング  
Fig. 2 Sampling under high hydrostatic pressure using a transfer unit.

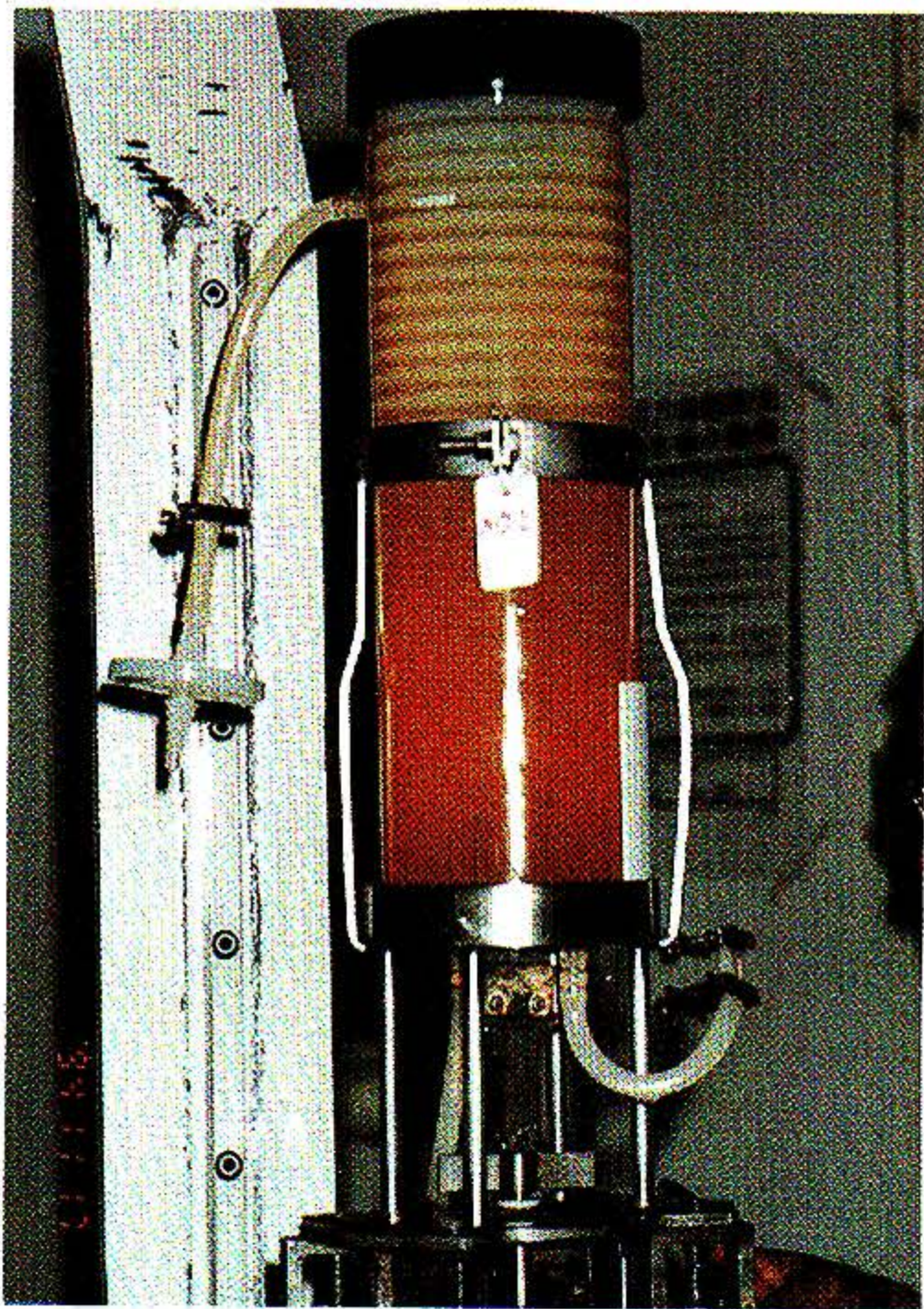


写真5 実験後の内槽の培養状況  
Photo 5 State of cultivation in cell after this experiment.

表1 アルコール生産量 (v/v%)  
Table 1 Course of ethanol production.

|        |                        | IFO2347 |      |      | Y-44 |      |      |
|--------|------------------------|---------|------|------|------|------|------|
|        |                        | 1日      | 2日   | 3日   | 1日   | 2日   | 3日   |
| コントロール |                        | 6.31    | 7.80 | 7.88 | 6.27 | 7.78 | 7.86 |
| 培養槽    | 大 気 圧                  | 4.95    | 6.15 | 6.50 | 4.92 | 6.09 | 6.44 |
|        | 100kgf/cm <sup>2</sup> | 5.90    | 6.51 | 6.91 | 5.86 | 6.49 | 6.81 |
|        | 200kgf/cm <sup>2</sup> | 5.82    | 6.41 | 6.78 | 5.75 | 6.30 | 6.72 |

### 3 頻繁なサンプリングをともなう培養実験

耐圧性菌の高水圧下における培養実験では、高水圧下での培養中、短い間隔でサンプリングを行うことが必要となった。

培養中にその圧力ならび温度を保持したままサンプリングする方法として、次の2方法が考えられていた。

① 移送容器を用いる。

② バルブを絞り気味に開けて試料を抽出する。

しかし、このいずれの方法にも次のような欠点があった。それは、移送容器を用いると滅菌に時間を要し頻繁なサンプリングは不可能であること、そして、バルブを絞り気味に開けるとバルブに菌体が滞留しその絞り具合により得られる菌体量が変わり、内槽内の試料が正しく取り出せないことである。

移送容器は現在3台用意されているが、サンプリング後、滅菌し再使用できるまで約4時間を要し、30分間隔に培養槽2基からサンプリングすることは到底不可能であった。移送容器は単に試料の抽出のみを行うのではなく、抽出と同時に新しく培地を注入することを目的としているためピストンを内蔵した大きな容器となっていたのである。

そこで、圧力を落とさず、菌体の滞留を防止し、しかも頻繁なサンプリングに対応できるように滅菌が容易なサンプリングチューブを考案した。

サンプリングチューブは写真6のようにU字型をした配管とバルブで構成され、サンプリングの量を約5cc確保できるとともに、そのままオートクレーブに入れられる形状とした。

配管系統図(図3)で、サンプリングチューブを用いた場合の操作手順と利用方法は以下の通りである。

まず、バルブV1を閉めたままサンプリングチューブを接続する。これで、培養槽の内槽とサンプリングラインを経てサンプリングチューブにつながる。この状態で、まずバルブV4を閉め、V1、V2、V3を全開する。するとサンプリングチューブ内は培養液で満たされる。しかし、これは、正確な内槽内の培養液ではなくサンプリングライン内の残留液が混じっている。そこでサンプリングチューブ内に内槽内の培養液を満たすため、バルブV4を圧力が下がらないように絞り気味に開け約20mlほど流し出す。そして絞り気味に開けたバルブV4での菌の滞留の影響を受けないように、バルブV2とV3との間のサンプルを用いる。こうして内槽内の培養液を頻繁に抽出することができるようになった。

表2にサンプリングチューブを用いた場合とバルブを

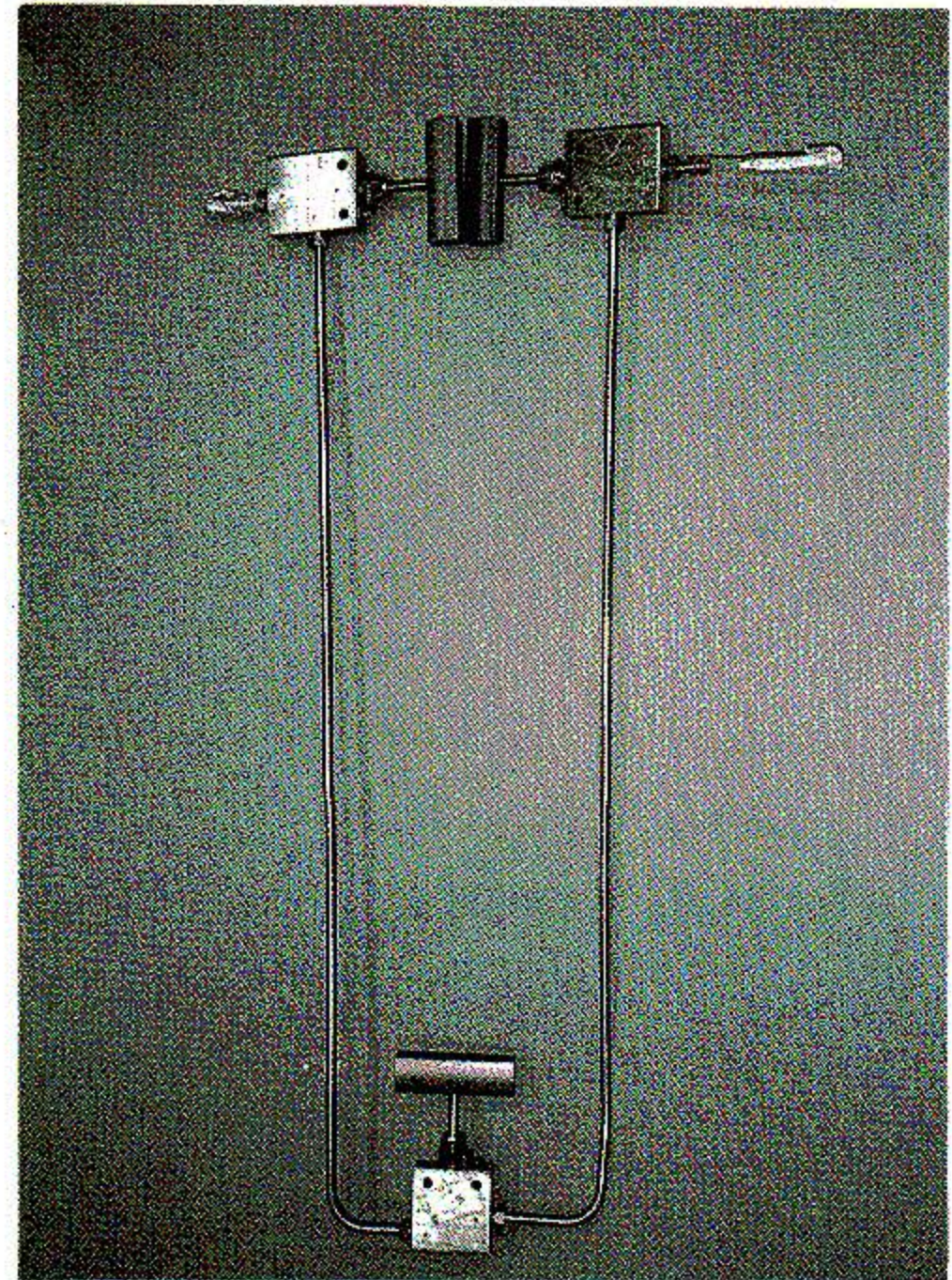


写真6 サンプリングチューブ  
Photo 6 Sampling-tube.

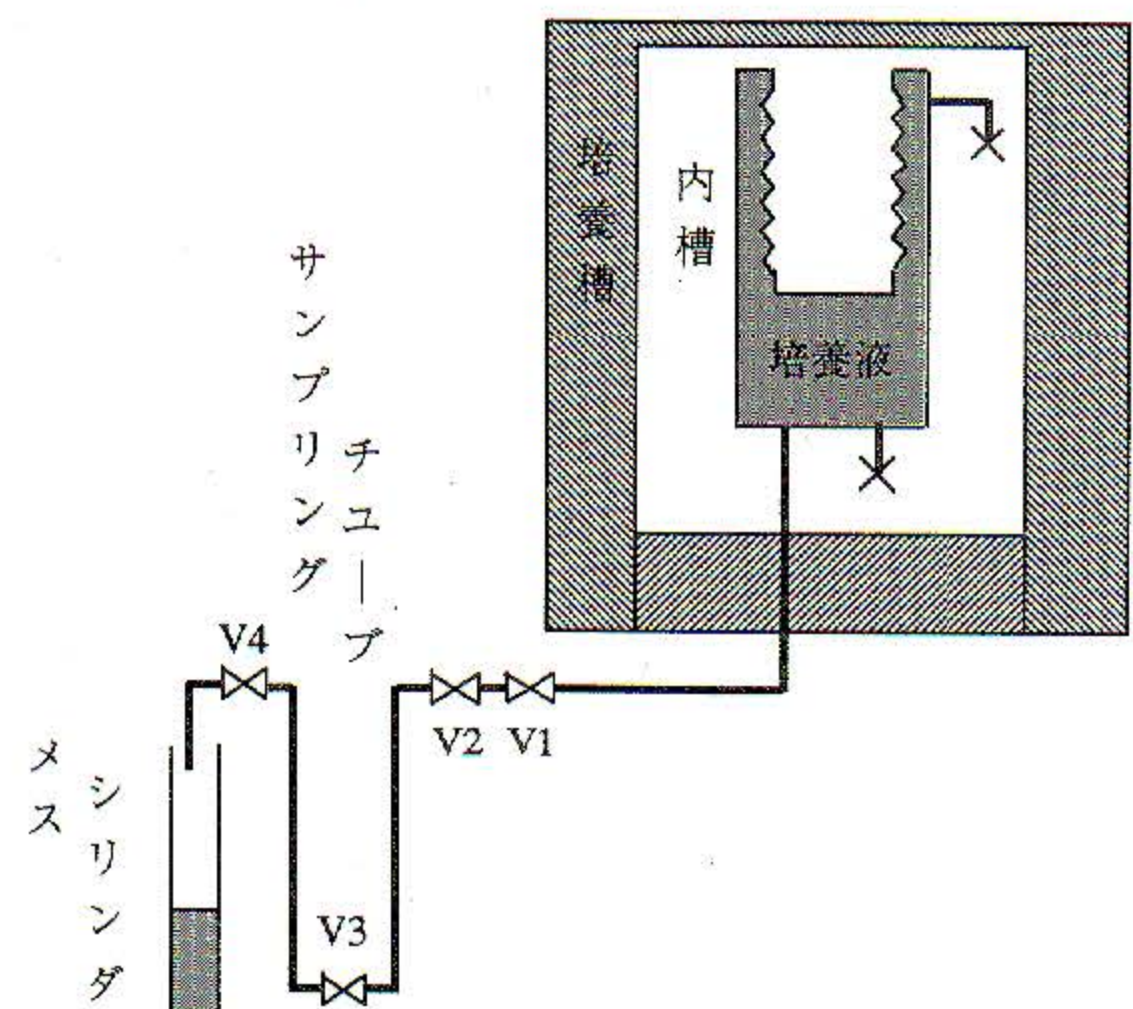


図3 サンプリングチューブを使ったサンプリング  
Fig.3 Sampling under high hydrostatic pressure using a sampling-tube.

表2 サンプリング方法と菌体濃度  
Table 2 Microbes density.

|                  | 菌体濃度 (OD <sub>600</sub> 値) |
|------------------|----------------------------|
| サンプリングチューブを使った場合 | 1.6                        |
| バルブを絞って取った場合     | 0.5 ~0.8                   |

500kgf/cm<sup>2</sup>; 37°C

絞って取り出した場合の菌体濃度を示す。内槽内の菌体濃度が $OD_{600}=1.6$ の時、バルブを絞った状態に取り出すと $OD_{600}=0.5\sim0.8$ と低く、しかも、バルブの絞り具合によりその値が安定しない。ところがサンプリングチューブを用いると $OD_{600}=1.6$ で内槽内の培養液がそのままサンプリングできたことがわかる。

#### 4 酸素の侵入を嫌った培養実験

好熱性菌の高温・高水圧下における生育実験に使用した菌株は、深海熱水鉱床より分離した新種の超好熱性古細菌 *Thermococcus peptonophilus*<sup>5)</sup> で、地球大気中のように酸素が存在する中では生存できない絶対嫌気性菌である。

このような絶対嫌気性菌を取り扱う場合には加圧媒体である純水中の溶存酸素やサンプリング時における空気の侵入に細心の注意を払わなければならない。

ベローズは圧力を内槽内に伝達し、加圧媒体と培養液を均圧にするために必要だが、シリコンゴムはガス透過性が高いので、ガス透過性が低く高真空関係のシールに用いられているフッ素ゴム（商品名バイトン）に材質を変更した。酸素の混入は発色試薬（レゾアルリン）を入れることにより確認した。この試薬は酸素が入ると赤く変色するが、2つの内槽にそれぞれのベローズを組み込み圧力媒体である純水中に120時間放置した結果、シリコンゴム製では無色から赤色に変色したが、フッ素ゴム製では全く変色しないことが確認できた（写真7）。

サンプリング中に酸素が培養槽内に入らないように、サンプリング時にサンプリングチューブ内をポンプにて真空（真空度：約650mmHg）にした。サンプリングチューブを取り付け後、バルブV2、V3、V4を開け、真空ポンプで引きながら、バルブV4を閉め、後は前章と同じ要領で試料を採取した（図4）。発色試薬（Resazurin）にて変色の有無を確認したが、このサンプリング方法では変色は見られなかった。

#### 5 室温との温度差が大きい培養実験

培養実験を行うのに実験システムが設置されている室内の温度と培養温度が大きく異なることがある。好熱性菌では培養温度が90℃前後であり、深海底泥を用いた培養実験では5℃前後であった。

好熱性菌を用いた実験では、耐圧窓周辺の水分が高温のため蒸発し、湿気を含んだ温かい空気が増殖モニターの光プローブのガラス表面で冷やされ結露した。この結露は、固定チューブ内の温かい空気を吸い出すことで防

止した。

逆に、深海底泥を用いた培養実験は低温で行われ、このために室内の空気に含まれている水分が耐圧窓で結露した。密封性が高い場合には固定チューブ内の空気抜きにすることで結露を防げるのだが、培養槽の光プローブの取り付け状況はその構造上、密封性がそれほど高くなかった。この空気抜きの方法では防止することができなかった。そこで、光プローブの固定チューブ内に窒素ガスを

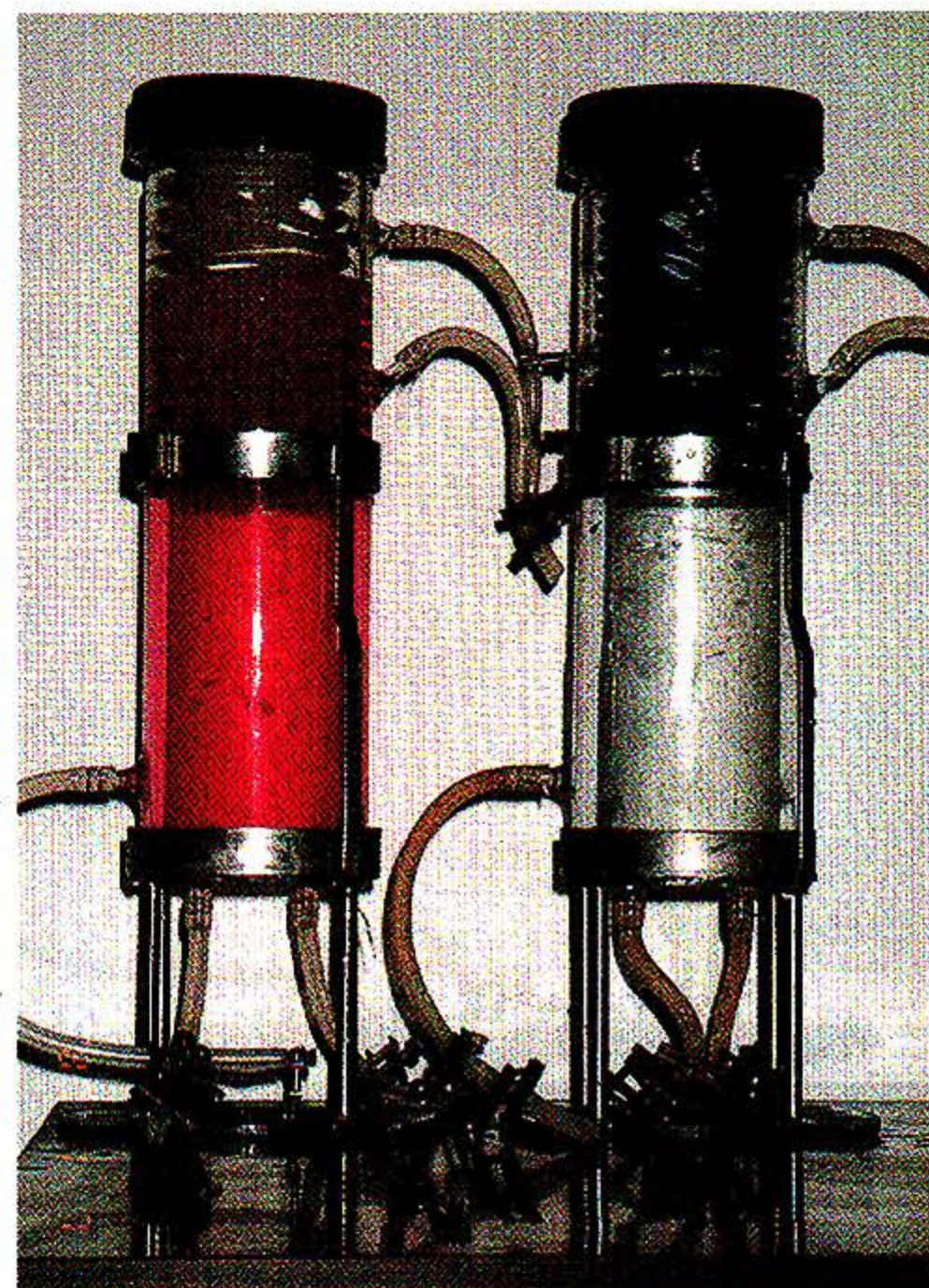


写真7 ベローズからの酸素の浸透

Photo 7 Oxygen osmosis from bellows (left:silicon rubber, right:fluoric rubber).

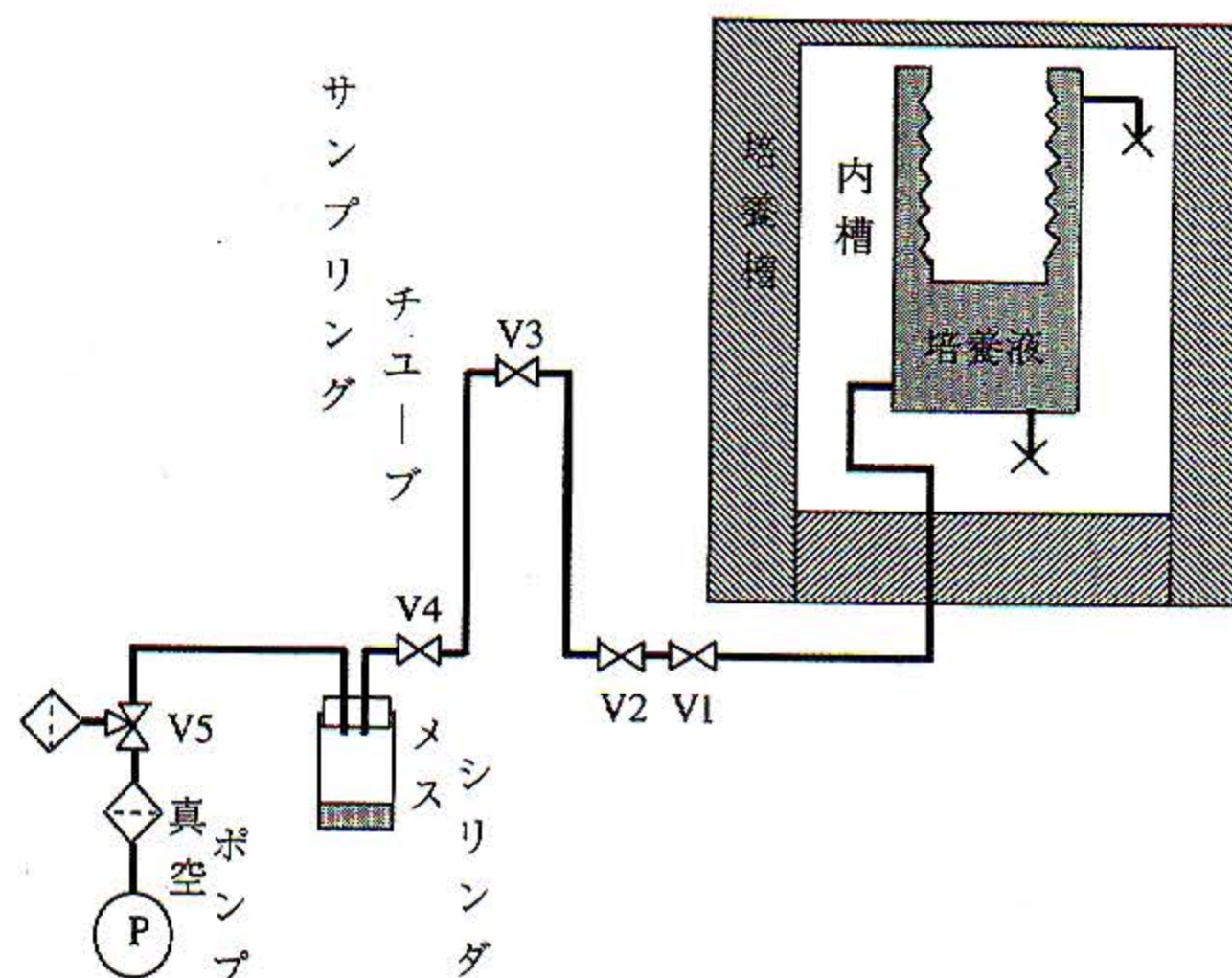


図4 嫌気性菌のサンプリング

Fig 4 Sampling under high hydrostatic pressure using a sampling-tube and a vacuum pump.

吹き込み続けた。窒素ガスは水の露点温度が約 $-65^{\circ}\text{C}$ であり、 $5^{\circ}\text{C}$ 程度のガラス表面では結露が発生しなかった。

## 6 まとめ

高水圧下での培養実験では通常ビニールパウチに培養液と菌体を入れて耐圧容器の中で加圧して行う方法が多く用いられているが、ビニールパウチを加圧すると、パウチシール部から内部への加圧水の混入やパウチそのものの破損により、データの再現性が欠けたりすることもある。また、パウチでの攪拌は困難である。しかし、本実験システムの培養槽を用いた場合、大量な培養および攪拌による均一な培養が可能なることから再現性のよいデータが得られた。アルコール発酵の実験では攪拌しなかったが、耐圧性菌や好熱性菌の実験では攪拌を行い良好な結果を得ている。

高水圧下で培養中のサンプリングに際し、移送容器やサンプリングチューブを用いて、培養槽内を常圧に戻すことなく、サンプルの抽出が可能となった。吸引しながらサンプリングすることにより培養槽内への酸素の混入を妨げることも確認できた。以上のように、高圧、嫌気という培養条件を保ったままのサンプリング方法を開発した。今後、未知なる深海微生物の培養を行うためには、さらなる改良が必要になるだろう。また現在、本実験システムの機能向上のために、自動的な連続サンプリングの可能性を検討中である。

## 7 おわりに

現在、圧力と温度を一定に保ったまま高水圧大量培養を行い、減圧なしでサンプリングできるのは我々の知る限り世界でも実験システムだけである。

今後、このような特長を有する本実験システムが多くの研究に用いられ、重大な発見が得られることが期待さ

れる。

なお、本実験を行うにあたり、酵母菌のアルコール発酵では海洋科学技術センター深海環境プログラムの服巻辰則氏（現、日本エヌ・ユー・エス㈱）、秀島彩美氏、好熱性菌の培養では加藤千明博士（チームリーダー）、J. M. Gonzalez 博士、柳林美樹氏、窓の結露防止では㈱三菱総合研究所石川正道博士、中村裕彦博士に協力および助言を頂き深く感謝致します。

## 参考文献

- 1) 許 正憲, 稲田哲哉, 菊間敏雄, 鈴木掀三郎, 平清: 「深海微生物実験システム」の開発. 海洋科学技術センター研究発表会要旨集, 20, 19-22. (1995)
- 2) 稲田哲哉, 池本栄子, 許 正憲, 長沼 毅: 深海微生物に必要な機器開発・技術開発. 海洋科学技術センター試験研究報告, 31, 93-104. (1995)
- 3) Moriya, K., Inada, T., Kyo, M., and Horikoshi, K.: Large-scale fermentation under high hydrostatic pressure using a newly developed Deep-sea Baro/Thermophile Collection and Cultivation System, J. Mar. Biotechnol., 2, 175-177. (1995)
- 4) 稲田哲哉, 平 清, 菊間敏雄, 鈴木掀三郎, 許正憲, 小松徹史: 深海微生物実験システム培養槽の高圧下におけるサンプリング方法の確立. 海洋科学技術センター研究報告会要旨集, 21, 138-139. (1995)
- 5) Gonzalez, M. J., Kato, C., and Horikoshi, K.: *Thermococcus peptonophilus* sp. nov., a fast-growing, extremely thermophilic archaeobacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents., Arch. Microbiol., 164, 159-164. (1995)

（原稿受理：1995年12月13日）