

アプリケーションデータシート #026

三角フラスコ用DO/pH/ODモニタリングシステム **SFR Vario** No.1

三角フラスコの振とう方法とエアレーション効率について



最新のテクノロジーで振とう培養における定説や慣習を再検証する【序章】

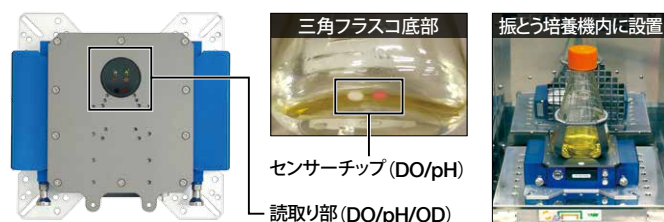
概要

一般的に行われている微生物の振とう培養法は、三角フラスコを旋回振とう機で振とうさせる手法が1933年にオランダで、振とう（坂口）フラスコを往復振とう機で振とうさせる手法が1942年に日本で、それぞれ開発されたものである¹⁾。このような経緯があるためか、振とう培養においては、海外ではほぼ旋回振とう機のみが使われ、日本では旋回振とう機に加えて試験管で振とう培養を行う場合や振とうフラスコで高い培養効率を得たい場合に往復振とう機も用いられている、といった状況である（振とうフラスコは、海外ではほとんど使われていないと思われる）。

微生物培養の教科書を紐解くと、三角フラスコは旋回振とう、振とうフラスコは往復振とうがそれぞれ適しているとあるが、タイテックにはしばしば、お客様から「三角フラスコの振とうでは、旋回と往復のどちらがエアレーション効率が高いのか」といったご質問が寄せられる。教科書の定説は古典的に過ぎるためか、このご質問にお答えするために引用できる定量的な証明を見つけることができなかった。そこで、〈SFR Vario〉を用いて実際に調べることにした。

〈SFR Vario〉と定量的な確認の方法について

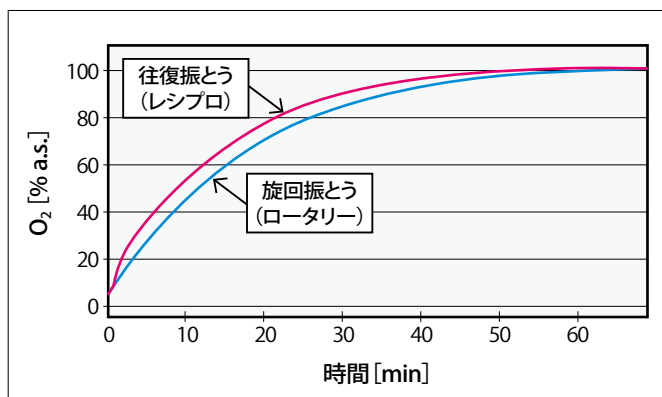
〈SFR Vario〉は、蛍光消失時間による溶存酸素（DO）および水素イオン濃度指数（pH）に加えて濁度（OD）を、いずれも非接触で同時にリアルタイムモニタリングできる装置である。タイテックの〈バイオシェーカー®〉等に載せるだけで簡単に使用できる。データはパソコンに無線送信される。DOおよびpHの測定には消耗品が必要なこと、ODは反射光方式のためOD₆₀₀換算（ユーザーが検量線を引いて求めた近似式を入力する仕様）で1未満が測定保証外であることがネックではあるが、これまで定量化しにくかった振とう培養の各パラメーターが一目瞭然になるところは関心に値すると言えよう。今回は〈SFR Vario〉と〈バイオシェーカー®〉を使用して「三角フラスコを旋回振とうした場合と往復振とうした場合のエアレーション効率の違い」を、DOのモニタリングにより定量化した。



型名	SFR Vario
測定範囲	DO : 0 ~ 100%O ₂ (0 ~ 45ppm) pH : 5.5 ~ 8.0 OD : 1 ~ 80 (OD ₆₀₀ 換算時、換算については左記参照)
使用環境温度範囲	+5°C ~ +40°C

結果と考察

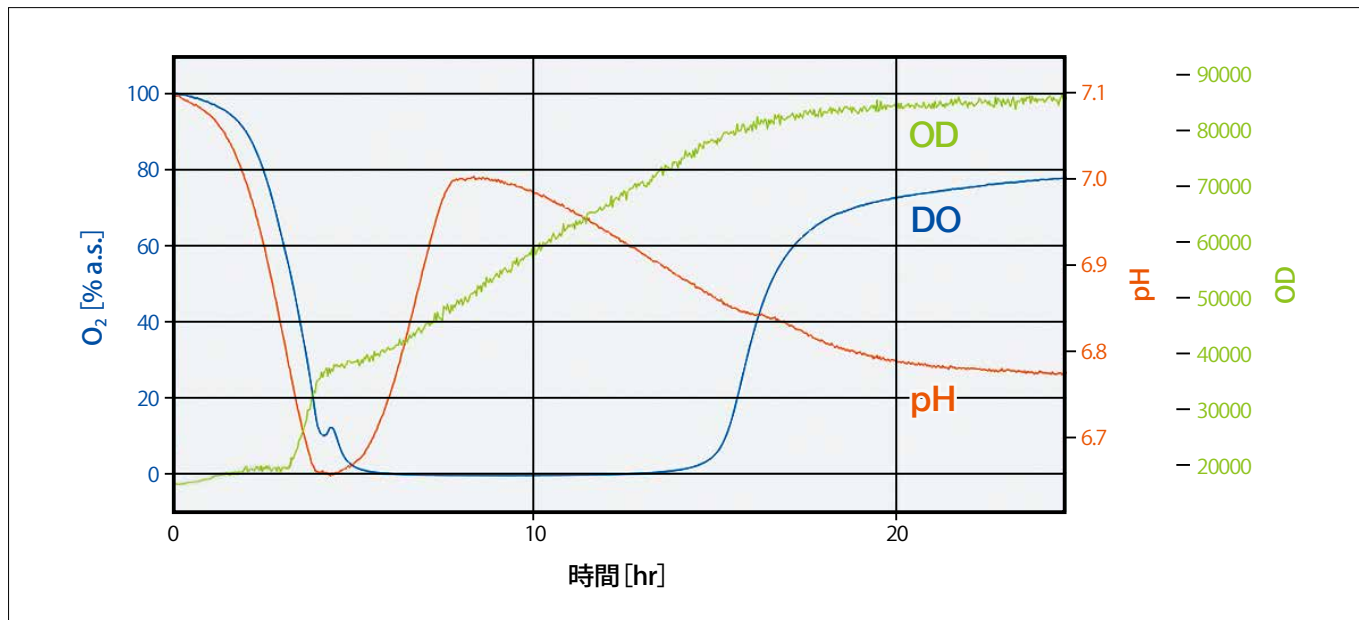
恒温振とう培養機……………バイオシェーカー® BR-23FP (往復/旋回切替式)
振とう速度、振幅、温度…150r/min、25mm、+37°C
試料……………無酸素水150mL in 500mL三角フラスコ



窒素ガス曝気ではほぼ無酸素状態にした水道水を三角フラスコに入れて〈バイオシェーカー®〉に〈SFR Vario〉とともにセットし、振とうによる「DO濃度」の変化をモニタリングした。結果、「エアレーション」は、往復振とうのほうがわずかに良いことが分かった。三角フラスコを往復振とうすると、旋回振とうと同様の液体の動きになる場合もあれば、激しく液体が飛び跳ねて三角フラスコの栓に付着してしまう場合もあった。これは、三角フラスコの容積に対する液量と振とう速度による。三角フラスコの旋回による振とう培養では、振とう速度に比例・液量に反比例して「濁度」の上昇が速くなるのが分かっているが（ADS#025を参照）、往復振とうではこのように条件によるムラやデメリットが生じた。故にわずかな溶解速度の優位性よりも確実性ということで、定説では旋回振とうが向くとしているのではないだろうか。さて、では「濁度」で比較検証するとどうなるのか？今回の検証と同じ条件では実施できなかったが、興味深いデータを続けてご紹介する（裏面を参照）。

参考

容器、培地…………… 500mL三角フラスコ (DO/pHセンサーチップ付きディスボタイプ)、YPD 100mL
振とう速度、振幅、温度…120r/min、25mm、+30°C



上図は〈SFR Vario〉で得た、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の振とう培養におけるDOおよびpH、そして濁度 (OD) のモニタリング結果である。pHに関する言及はここでは省くとして、DOおよび濁度に注目する。培養開始後、DOは濁度が増加すると同時に速やかに減少し、以後、濁度がプラトーに達するまで増加することがなかった。これは、増殖する酵母によって消費されるDOに供給が追いついていないことを示唆している。振とう培養は好気的な培養条件と思われがちだが、実際にはほとんど嫌気的な条件であることがよく分かる。発酵プロセス管理の分野ではよく知られていると思われるが、分子生物学や微生物学における遺伝子クローニングや分類同定といった、大量の菌体を必要としない用途でよく用いられる振とう培養法においては、気にされることは少ないのではないだろうか。酵母は、好気条件下では盛んに増殖するが、嫌気条件下では増殖よりもエタノール生成に代謝がシフトすることが知られている。田中博士ら²⁾によれば、振とうでDOの供給が追いつかない主な理由として、そもそもの酸素の溶解度の低さに加え、培養対象物 (ここでは酵母) が代謝の結果排出する二酸化炭素によって酸素の溶解が妨げられていること、すなわち「容器内空気の換気効率の悪さ」が指摘されている。今後はこの知見をもとに、容器内空気の換気効率の改善方法を模索していきたい。

好評発売中

三角フラスコ用
DO/pH/ODモニタリングシステム
SFR Vario

本体価格：¥2,180,000

三角フラスコ用クランプは別売です (専用、バイオシェーカー®用のものは使用できません)。125mL ~ 5Lの三角フラスコに対応します。DO/pHを測定する場合は、センサーチップがあらかじめ貼付されたディスボタイプの〈センサーフラスコ〉 (別売、5個入、125mL ~ 2L: ¥18,400 ~ ¥42,000) が必要です。パソコンは付属しません。必要なスペックについてはお問い合わせください。パソコン1台でSFR Varioを4台まで制御できます。ソフトウェアは測定項目ごとにライセンスをお求め頂く方式です (上記価格には含まれません)。



バイオシェーカー®との組合せ例

三角フラスコ用クランプ (別売)

著者・編集

タイテック株式会社
企画開発部 宣伝企画グループ
〒343-0822 埼玉県越谷市西方2693-1
TEL: 048-988-8341 FAX: 048-988-8346 E-mail: senden@taitec.org
Web: http://taitec.net/

参考文献

- 1) 田中秀夫: 生物工学会誌, **84**, 2-15(2006)
 - 2) 田中秀夫, 小川洋子: 特願141796 (2001)
- [2017年5月発行]
各製品や本紙の内容に関するお問い合わせは、左記までお願い致します。
●『バイオシェーカー』『BioShaker』は、タイテック株式会社の登録商標です。