

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：33108

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510101

研究課題名（和文） 環境負荷の低減を指向した界面活性剤の効率的生産技術の開発

研究課題名（英文） Development of Efficient Production System of Biosurfactants Utilizing Foam

研究代表者

竹園 恵（TAKESONO SATOSHI）

新潟工科大学・工学部・教授

研究者番号：20288252

研究成果の概要（和文）：微生物反応器に取り付けた消泡翼による発泡制御下、バイオサーファクタント生産菌 *Bacillus subtilis* ATCC 21332 の好気培養に成功した。反応器内における泡沫層の存在により、バイオサーファクタントの生産と濃縮を同時に行うことができた。バイオサーファクタントの回収率は、培養終了後に泡沫分離を行うことで92.3%まで高めることができた。この生産法は、処理液量が減少するため分離工程における運転コスト削減に貢献する。

研究成果の概要（英文）：In the aerobic culture of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to produce a biosurfactant, foam control using a foam-breaking impeller fitted to a stirred-tank reactor succeeded. Production and enrichment of the biosurfactant were accomplished simultaneously in the stirred-tank reactor with the presence of the foam layer. The foam fractionation operation after the end of cultivation improved the recovery of biosurfactant up to 92.3%. The volume of treating liquid, which the biosurfactant was enriched, could be reduced. Therefore, this technique contributes to a lowering of running costs in separation and purification processes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：バイオサーファクタント、界面活性剤、低環境負荷型材料、発泡制御、泡沫分離、消泡翼

1. 研究開始当初の背景

（1）微生物が生産する天然界面活性剤バイオサーファクタントは、合成界面活性剤に比べて、生分解性が高く、生物に対する毒性が低いため、環境に負荷をかけない界面活性剤として期待されている。しかし、合成界面活

性剤に比べて生産コストが高いという課題があり、実用化されているものが少ない。

（2）本生産法は、微生物反応器内に泡沫層を存在させ、バイオサーファクタントの生産と同時に、泡沫層に濃縮させて、反応終了後に濃縮液を直接取り出す方法である。従来法

では、分離工程で大量の液体を処理するが、本生産法は少量の液体を処理することになるため、生産コストの大半を占める分離コストの削減が期待できる。

(3) 研究代表者が開発した発泡制御装置を備えた微生物反応器を用いることにより、バイオサーファクタント生産中の発泡をコントロールできた。泡沫層へのバイオサーファクタントの濃縮率は 20 倍以上となり、期待通りに濃縮することがわかったが、回収率としては 70%程度に留まった。この生産システムを確立するためには、回収率を更に高める必要がある。

2. 研究の目的

(1) 泡沫層が存在する、微生物反応器内での界面活性剤の分離メカニズムは、培養液中での起泡分離と泡沫層中での泡沫分離である。培養液および泡沫層におけるバイオサーファクタントの分離特性を明らかにする。

(2) 本生産システムにおいて、バイオサーファクタントの生産量と回収性能を向上させる最適な微生物培養条件および反応器操作条件を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 菌株と培地

① 菌株

微生物としては、リポペプチド型バイオサーファクタントであるサーファクチンを生産する *Bacillus subtilis* ATCC21332 株を用いた。

② 培地

培地としては、次の組成の培地を用いた。グルコース 40 g/L、 NH_4NO_3 4 g/L、 KH_2PO_4 4 g/L、 Na_2HPO_4 5.7 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L、 CaCl_2 7.8×10^{-4} g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1 g/L、 $\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5×10^{-4} g/L、酵母エキス 5 g/L。

(2) 実験装置

実験には、10 L 容 (内径 : 0.186 m、高さ : 0.375 m) のジャーフェーマンター (図 1) を使用した。シード培養としては、栄養寒天スラントで生育した菌を 2 白金耳、2 本の 500 mL 三角フラスコ内の 200 mL の培地にそれぞれ接種し、温度 30 °C、回転振とう速度 128 rpm で 24 hr 振とう培養した。ジャーフェーマンターに 3.6 L の培地を入れ、シード培養液 400 mL を加えて、計 4 L で実験を行った。温度は 30 °C で 48 hr 培養した。通気は、スパージャーを通す液中散気法で行った。攪拌翼には、棒状インペラーを用いた。通気量 1.0 ~ 2.5 L/min、攪拌速度 800 rpm で行った。消泡翼として、攪拌軸上の槽底から 0.31 m の高さに六枚下付羽根タービンを取り付けた。回転している消泡翼上への液供給量は 4.67 mL/s とした。

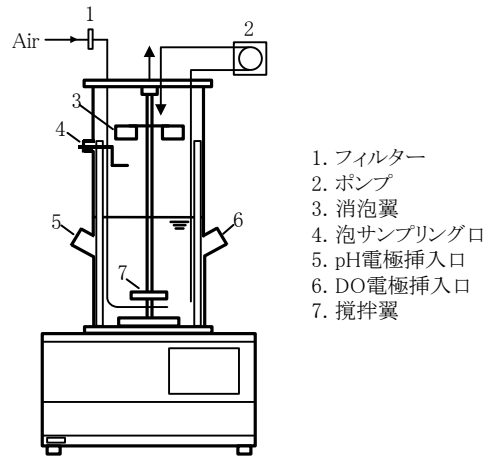


図 1 10 L 容ジャーフェーマンターの概略図

(3) バイオサーファクタント濃度の測定

遠心分離機 (10000×g、4 °C、10 min) により細胞を培養液から除去した。上澄み液 5 mL に、6N の HCl を 0.1 mL 加えて一晩沈殿させた。沈殿物を遠心分離機 (14000×g、4 °C、90 min) により分離した後、クロロホルム/メタノール (2 : 1, v/v) を用いて溶媒抽出した。真空遠心濃縮機を用いて溶媒を除去し、バイオサーファクタントを得た。その定量には、逆相液体クロマトグラフィーを用いた。移動相成分として、アセトニトリルと 50mM 酢酸アンモニウムバッファーの混合液

(51:49, v/v) を使用した。移動相の流量は、0.8 mL/min とした。UV 検出器の波長は、210 nm とした。

4. 研究成果

(1) 泡沫層存在下におけるバイオサーファクタント生産

消泡装置を備えた 10 L 容のジャーフェーマンターを用いて、*Bacillus subtilis* ATCC 21332 の培養を実施した。消泡は、48 hr の培養終了時まで達成させることができ、泡沫層を存在させることができた。図 2(a)~(c) に、通気量 2.5 L/min の場合の培養結果を示す。図 2(a)と(b)は、泡沫層と培養液部の二つの領域で測定した、菌体量を反映する OD₆₀₀ 値とバイオサーファクタント濃度の変化をそれぞれ示している。泡沫層の値は、泡沫層の上部と下部の平均値である。培養開始後、5 hr までは安定した泡沫層が生成されなかったため、泡沫を採取できなかった。図 2(c) は、培養期間中の DO と pH の変化を示している。培養液部の菌体量は時間と共に増えるが、泡沫層ではほとんど変化しなかった。泡沫層におけるバイオサーファクタント濃度は、培養液部に比べて著しく高かった。これは、バイオサーファクタントが培養液部で生産された後、泡沫層に移動して濃縮することを示している。培養期間を通して、DO 不足は観察されなかった。pH はほとんど変化しなかった。

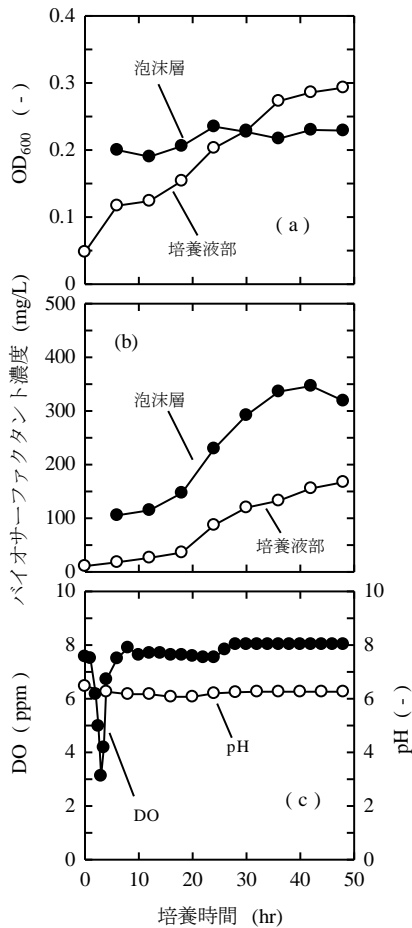


図2 通気量 2.5 L/min の場合の培養結果

(2) バイオサーファクタントの濃縮性能

図3に、通気量を変化させた場合のバイオサーファクタント濃縮比の結果を示す。濃縮比は、培養液中のバイオサーファクタント濃度に対する泡沫層のバイオサーファクタント濃度の比として算出した。通気量が 1.0 L/min の場合には、濃縮比は 18 hr まで増加し、その後減少する傾向にあった。一方、通気量が 2.0 および 2.5 L/min の場合には、6 hr の時が最も高く、その後減少した。通気量が高くなり、泡沫の上昇速度が高くなるほど、バイオサーファクタントの濃縮比は減少する傾向にあった。

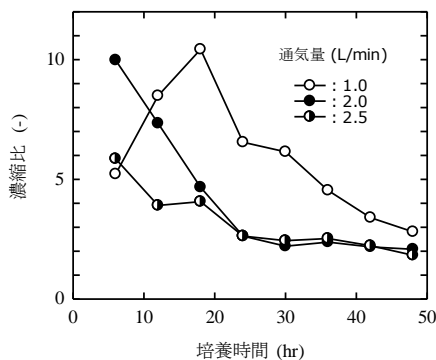


図3 バイオサーファクタントの濃縮比

(3) 泡沫層の液含率および体積

培養期間中の泡沫層の液含率（泡の液ホールドアップ）および体積の変化を調べた。図4(a)に泡の液ホールドアップ、図4(b)に泡沫層の体積の経時変化をそれぞれ示す。泡沫層の体積は、消泡翼の高さと、泡沫層と培養液の境界面の高さを読み取ることにより算出した。いずれの通気条件でも、泡の液ホールドアップの値は、培養期間中あまり変化せず 0.2 付近であった。なお、泡のサンプル位置を変化させて測定したが、ほとんど変化がなかった。これは、泡沫層全域での液体含量がほぼ 20% であったことを示している。泡沫層の体積は、6 hr まで急激に増加し、その後徐々に増加する傾向にあった。これは、界面活性剤であるバイオサーファクタントが生産されて泡立ちが激しくなったことによる。

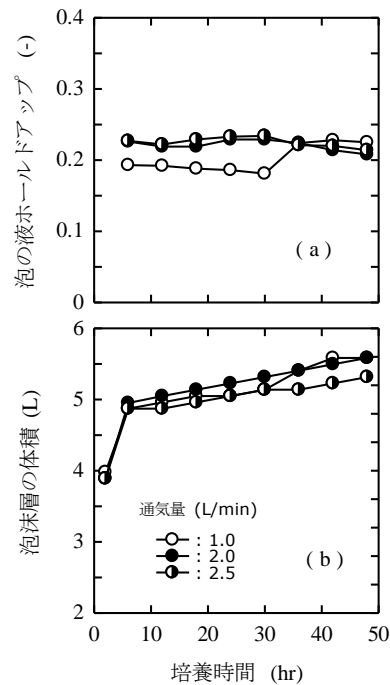


図4 泡沫層における泡の液ホールドアップと体積

(4) バイオサーファクタントの生産量

培養液部と泡沫層におけるバイオサーファクタント濃度、泡沫層における泡の液ホールドアップおよび泡沫層の体積の値を用いて、バイオサーファクタントの生産量を求めた。図5に、通気量を変化させた場合のバイオサーファクタント生産量の結果を示す。通気量が高いほど、バイオサーファクタント生産量は増加した。48 h 後の培養終了時でみると、通気量 2.5 L/min の場合、バイオサーファクタントが 812 mg 生産された。これは、培養液 1 L あたり 203 mg 生産されることを示している。

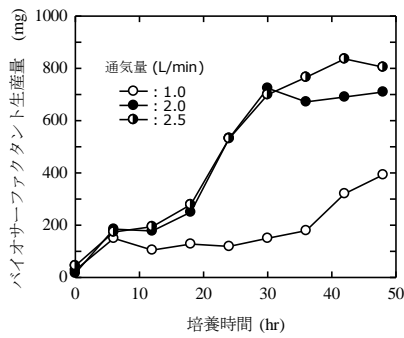


図5 バイオサーファクタントの生産量

(5) 泡沫によるバイオサーファクタントの回収性能

図6に、通気量を変化させた場合のバイオサーファクタント回収率の結果を示す。回収率は、泡沫層および培養液中のバイオサーファクタント量に対する泡沫層中のバイオサーファクタント量の比として算出した。回収率は、通気量の増加と共に減少する傾向にあった。48 hrの培養終了時でみると、泡沫によるバイオサーファクタントの回収率は40~60%の範囲であった。

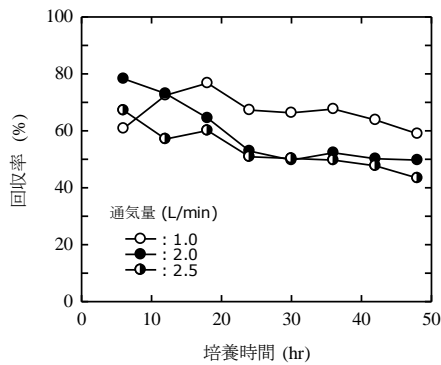


図6 泡沫によるバイオサーファクタントの回収率

(6) バイオサーファクタント回収率の改善

図6に示されるように、培養終了時に泡沫層を全て取り出したとしても、培養液中にバイオサーファクタントが40~60%残ることになり、泡沫によるバイオサーファクタントの回収が不十分となる。これを改善するため、培養終了時に泡沫分離操作を1 hr実施した。泡沫分離の通気量は、1.0 L/minで一定とした。図7に、泡沫分離操作中の培養液中のバイオサーファクタント濃度の結果を示す。いずれの通気条件でも、1 hrの泡沫分離操作で、培養液中のバイオサーファクタント濃度が減少し、十分にバイオサーファクタントの残存量が少なくなった。図8に、各通気条件における泡沫分離操作の有無による回収率の変化を示す。1 hr泡沫分離を行うことにより、バイオサーファクタントの回収率が大きく向上し、最大92.3%であった。

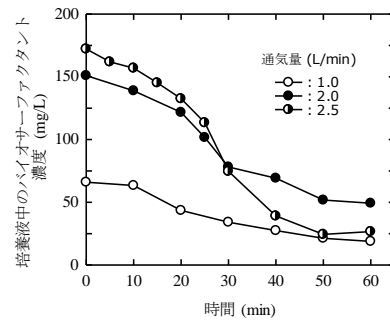


図7 泡沫分離による液中の濃度変化

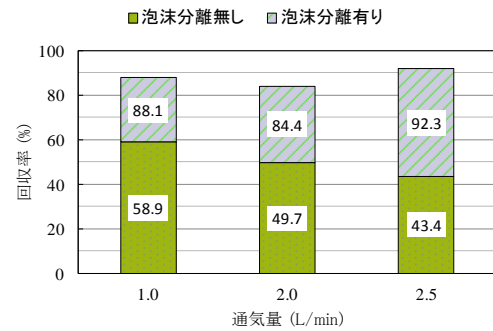


図8 泡沫分離の有無による回収率の違い

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Satoshi Takesono, Jinghao Dong, Masayuki Onodera, Application of a stirred-tank fermenter under mechanical foam control to a biosurfactant production, Trends in Chemical Engineering, 12, 29-36 (2009). [査読有]

[学会発表] (計1件)

① Satoshi Takesono, Production and enrichment of a lipopeptide biosurfactant utilizing foam in a stirred-tank reactor, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010年12月19日, ハワイコンベンションセンター.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹園 恵 (TAKESONO SATOSHI)
新潟工科大学・工学部・教授
研究者番号: 20288252

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

()
研究者番号: