

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 4 日現在

機関番号：54601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420771

研究課題名(和文)好気性微生物の大量培養を目的としたバイオリアクター向け高性能攪拌翼の開発

研究課題名(英文) Development of High-Performance Impeller for Bioreactor to Mass Culture of Aerobic Microorganisms

研究代表者

中村 秀美 (Nakamura, Hidemi)

奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・教授

研究者番号：70198232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エレメント積層型攪拌翼(MSE翼)は、網目構造を持つ板を何枚にも重ね、ハニカム構造にした攪拌翼である。従来一般的な攪拌翼と比較して格段に大きな表面積を有し、剪断特性に優れており、穏和な条件で攪拌できるため好気性微生物の大量培養を目的としたバイオリアクターへの適用が期待される。本研究では、酵母を用いた通気攪拌による好気培養において、通気条件による酸素移動容量係数の大きさや剪断応力による菌の損傷について検討を行い、MSE翼の優位性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mass culture of aerobic microorganisms is in need of damage to them and taking in much oxygen to the tank. Mixer with Stacked Elements impeller (MSE impeller) has a honeycomb structure that is made of stainless steel plate. As it has a larger surface area and better shear property than conventional impeller (Disk turbine impeller), the application of bioreactor to mass culture of aerobic microorganisms is expected. In this study, the superiority of MSE impeller by considering aeration condition and damage to them was revealed by shear stress at aerobic cultivation by aeration-agitation in yeast.

研究分野：化学工学

キーワード：攪拌 バイオリアクター 好気性微生物

1. 研究開始当初の背景

バイオプロセスで使用されているバイオリアクターにおいては、微生物培養・有用生理活性物質生産等を効率的に行わせるために、スケールアップの容易さ・汎用性の高さから攪拌翼を備えた攪拌槽が広く使用されている。攪拌翼としてはディスクタービン翼(DT翼)や傾斜パドル翼等が広く使用されているが、低速攪拌では攪拌槽内の微生物濃度を均一にすることができず、高速攪拌すると翼周辺部の剪断応力が大きいために微生物を傷つけ、破壊し、その生物活性を低下させるという問題がある。また、好気性微生物培養における粘度の高い溶液の攪拌に使用されている翼径の大きなフルゾーンやマックスブレンド等の攪拌翼は、酸素移動容量係数は大きいものの気泡の分散が効率的ではなく、スパージャーを工夫して通気する必要がある。そこで、均一に且つ微生物の生物活性度も低下させないように混合することができる攪拌翼が求められていた。

新規に開発されたエレメント積層型攪拌翼(Mixer with Stacked Elements: MSE翼)は従来の攪拌翼の欠点である翼周辺部の剪断応力及び酸素移動容量係数の問題を解決する画期的な攪拌翼であり、スケールアップや材質の変更等も容易であるため既存の市場を塗り替える可能性がある。

2. 研究の目的

エレメント積層型攪拌翼(MSE翼)は、網目構造を持った板を何枚にも重ねてハニカム構造を持つ攪拌翼であり、流体は積層内で繋がっている多数の網目を通る際、分割・合流により混合されるとともに、乱流や渦流等によっても混合されるという特徴を有する。また、従来型の攪拌翼と比較して格段に大きな表面積を有するために剪断特性に優れており、穏和な条件で攪拌できるため好気性微生物の大量培養を目的としたバイオリアクターへの適用が期待される。本研究では、従来型の6枚ディスクタービン翼と比較して好気性条件下でも発酵能力を有する酵母を用いて、2倍以上のアルコール発酵効率を有する酵母培養条件を探索し、MSE翼を用いた攪拌槽の流動解析や酸素移動容量係数、剪断応力などの基本的攪拌特性のデータと併せて、MSE翼の優位性を実験的及び理論的に解明した。

3. 研究の方法

(1) 実験装置

Fig. 1 は本研究で用いたステンレス製のエレメント(直径 100 mm、厚さ 2 mm、分割数 MSE1-8、MSE2-18) (アイセル(株))である。Fig. 2 は比較に用いた 6 枚ディスクタービン翼(6DT翼: 直径 100 mm、厚さ 10 mm)である。

また、Fig. 3 はエレメントを 20 枚重ねたエレメント積層型攪拌翼である。Fig. 4 に示すように攪拌槽は、内径 200 mm、高さ 250 mm、液高 200 mm で、その液容量は 6 L となっており、外側に恒温水用のジャケットが付属している。また、通気は気泡分散が攪拌翼の真下から行えるようにスパージャーのノズルを設置してある。無通気の場合は液相内が無通気状態になるようにノズルを気相部分に設置した。

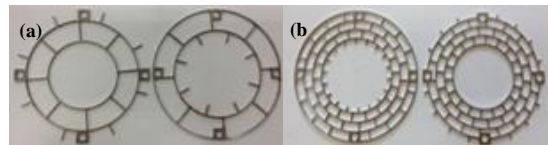


Fig. 1 Elements (a)MSE1 (b)MSE2



Fig. 2 6-Disc turbine (6DT)



Fig. 3 Mixer with stacked elements

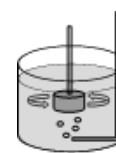


Fig. 4 Stirred tank

(2) MSE翼の流動特性の検討

MSE翼には、外内径、板厚、孔サイズ、積層枚数、攪拌槽内径等多くのパラメーターがあり、酵母培養に適用するためにはこれらのパラメーターを検討し、適したパラメーターを決定することが必要である。攪拌翼の基本特性として最も重要である攪拌トルクを測定して従来型のDT翼と比較を行い、攪拌槽の流動特性を明らかにした。

(3) MSE翼の酸素移動容量係数の測定

表面ガス吸収(無通気)及び通気ガス吸収における酸素移動容量係数 k_{La} の測定を亜硫酸ソーダの空気酸化反応においてヨウ素滴定により酸化速度を算出する亜硫酸ソーダ法と、溶存酸素計を用い液中の酸素の溶解速度を直接測定するダイナミック法(Static method)を用いて行い、攪拌翼の形状、攪拌状態や溶液粘度が k_{La} に及ぼす影響について明らかにした。

(4) 酵母培養における生菌率の測定

MSE翼とDT翼の剪断応力による微生物への影響を明らかにするために、酵母を培養し、攪拌の時間経過ごとに溶液をサンプリングし、生酵母の呈色反応によって生菌、死菌の割合を測定し、剪断応力との関係を明らかにした。

(5) MSE翼の酵母培養性能に対する最適条件の探索

MSE翼及び比較対象としてのDT翼を取り付けた攪拌槽にYM培地と好気性条件下でも発酵能力を有する特異株の酵母を入れ、所定時間ごとに培地をサンプリングする。サン

プリング液中に含まれる発酵により産生するアルコールをガスクロマトグラフで分析し、その経時変化を求めた。攪拌翼形状の違い、攪拌回転数等の操作因子を変化させて実験を行い、攪拌翼の違いによる酵母培養性能の最適条件について検討を行った。

4. 研究成果

(1) MSE 翼の流動特性

流動特性の一例として、攪拌翼の種類を変えた場合の回転数と攪拌動力の関係を Fig. 5 に示した。

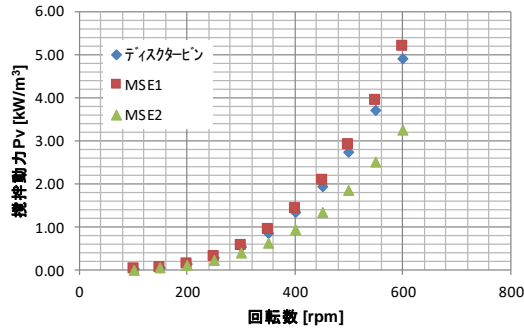


Fig.5 Relations of rotations number and agitation power

同じ回転数に対する攪拌動力 P_v の値は 6 枚ディスクタービン翼、MSE1 では同様な値を得た。MSE2 は両者と比較して、低い P_v 値となっているが、これはハニカムが密になったことにより液抵抗が大きくなり、液通過量が低下したことが原因であると思われる。

Fig. 6 に翼設置高さ C と槽径 D の比を変化させた場合の攪拌レイノルズ数 Re と動力数 N_p の関係を示したものである。

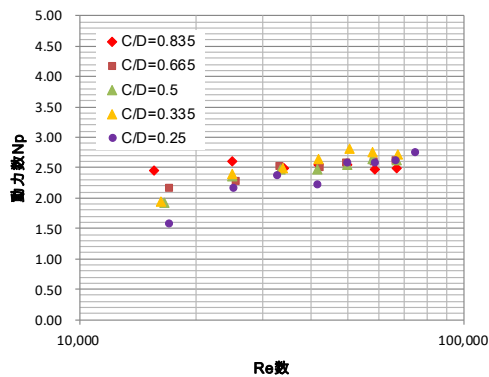


Fig. 6 Relations of Reynolds number and power number

どの C/D 比の場合も N_p 値は Re 数 3×10^4 以上でほぼ一定になった。また、翼設置位置の影響は、翼設置位置が低い方が N_p 値が少し大きくなる傾向があることが分かった。

(2) MSE 翼の酸素移動容量係数の測定

表面ガス吸収（無通気）の場合における酸素移動容量係数 k_{La} を攪拌翼の種類を変えて求めた結果を Fig. 7 に示した

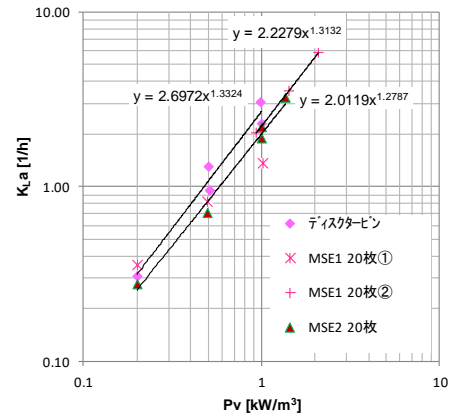


Fig. 7 Relations of agitation power and oxygen transfer capacity coefficient

タービン翼の k_{La} は他の翼に比べて少し高くなっているが、MSE1 と MSE2 はほぼ同じ k_{La} 値が得られている。Fig. 5 の結果より、MSE2 は、同一回転数では MSE1 より P_v の値が低くなったが、気-液分散面では通液量が小さくなくてもほぼ同等の結果が得られていることが分かる。

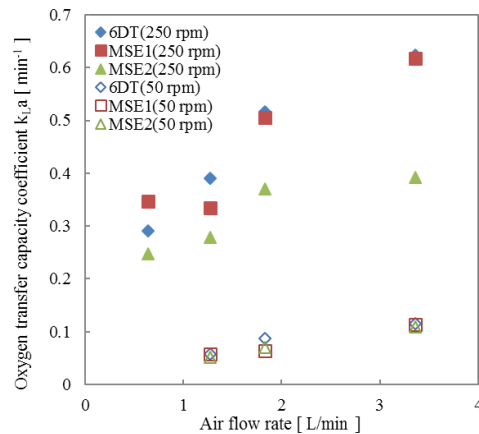


Fig. 8 Oxygen transfer capacity coefficients in each of air flow rates

通気攪拌における攪拌翼の気泡分散性能について検討するために、回転数を変化させて、酸素移動容量係数 k_{La} の測定を行った。その結果、Fig. 8 に示すように回転数 250 rpm において 6DT と MSE1 の k_{La} が最も高くなることがわかった。MSE2 の k_{La} が低くなった原因として、MSE2 は MSE1 と比較して分割数が多いため孔径が小さく、気泡がハニカム構造内に入り込み、目詰まりを起こしてしまったことが考えられる。

(3) 酵母培養における生菌率の測定

攪拌翼の剪断応力による微生物の死滅への影響を検討するために、攪拌培養によるワイン酵母の生菌数と死菌数の経時変化を測定した。その結果を Fig. 9 (a)6DT、(b)MSE1、(c)MSE2 に示した。6DT 翼や MSE2 翼を用いた場合より、MSE1 翼を用いた場合の方がワイン酵母の生菌数の濃度が大きく、死菌数の

濃度が小さいことがわかる。また、MSE1 翼を用いた場合の死滅菌の増殖速度は 6DT 翼や MSE2 翼を用いた場合の増殖速度より緩やか増加していることから、MSE1 翼の剪断応力による菌への損傷が 6DT 翼と比べて少ないことが分かった。これらの結果より、MSE1 翼の優位性、すなわち MSE1 翼が好気性微生物の培養に最も適しているということが明らかとなった。

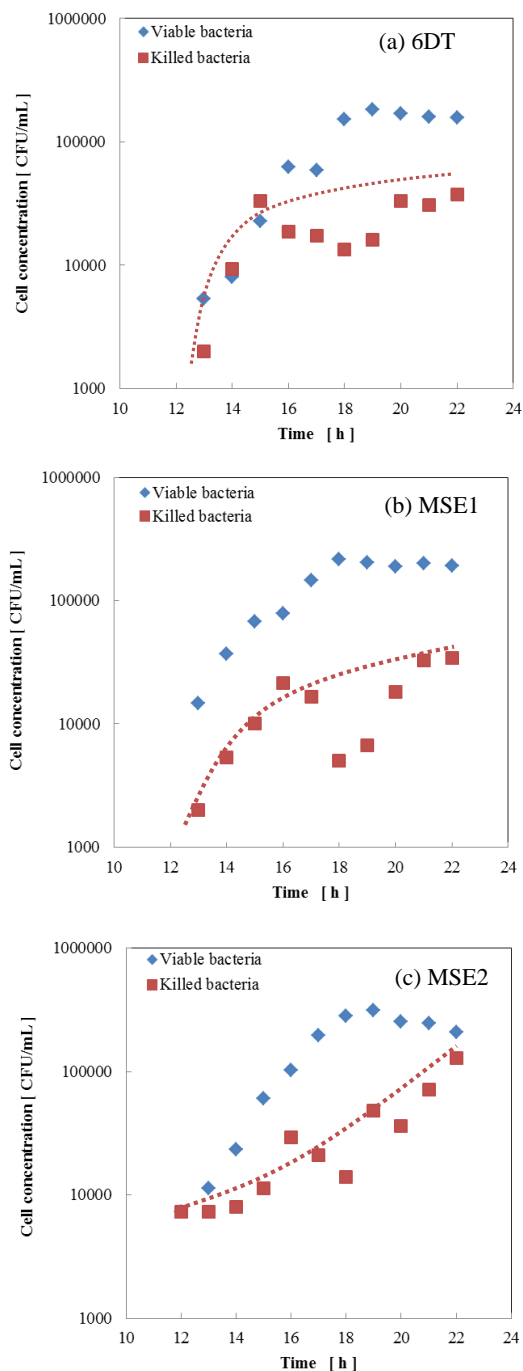


Fig. 9 Time course of viable bacteria concentration and killed bacteria concentration (a) 6DT, (b) MSE1, (c) MSE2)

6DT と MSE1 が 250 rpm において最も高い k_{La} を示したことで、酸素を効率良く取り込むことができること、同じ回転数においては

攪拌動力も大きいので、剪断応力が大きいと考えられた。しかしながら、MSE1 を用いた攪拌培養によるワイン酵母の死菌数の増加速度が 6DT および MSE2 を用いた場合と比較して緩やかであることから MSE1 が菌体に対してはもっとも穏やかに攪拌できることが分かる。剪断応力が一番小さいと考えられた MSE2 が最も死滅菌の割合が多いことから、気体の分散状態が菌体への損傷に影響を与えることが示唆された。

(4) MSE 翼の酵母培養性能に対する最適条件の探索

Fig. 10 は一例として、MSE1 と 6DT を用いた場合のワイン酵母のアルコール発酵の掲示変化を示したものである。

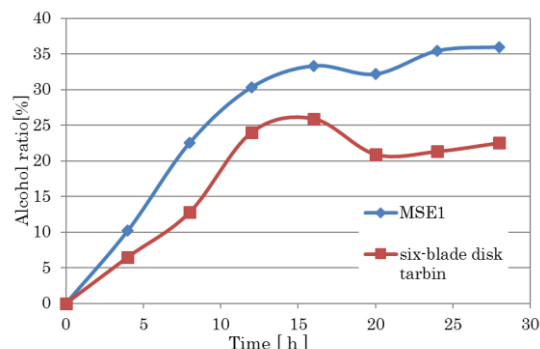


Fig. 10 Time course of Alcohol ratio for 6DT and MSE1

MSE1 の方が 6DT を用いた場合に比べて、アルコールの発酵速度が速く、また最終のアルコール発酵率も高く、1.6 倍の発酵効率を得られることが分かった。これは今までの結果より MSE1 を攪拌翼に用いることで、菌体への損傷が少なく、効率よく好気性菌の培養が行われていることに起因するものであり、MSE1 の優位性が検証できた。しかしながら、無通気の場合の 6DT 翼と MSE 翼の発酵効率の差 (2 倍) より小さくなったことから、酸素の攪拌槽内での移動がアルコール発酵に影響を与えることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 2 件)

澤田 廉, 林 啓太, 中村秀美, 好気性微生物の大量培養を目的としたバイオリクター向け高性能攪拌翼の開発, 化学工学会第 48 回秋季大会, 2016 年 9 月, 徳島。

Ren Sawada, Keita Hayashi, Ayuko Itsuki, Hidemi Nakamura, “Development of High-Performance Impeller for Bioreactor to Mass Culture of Aerobic Microorganisms”, The Symposium series of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) (2016, 10, Miyazaki, Japan)

[その他]

ホームページ等

<http://chemhp.chem.nara-k.ac.jp/content/images/Private%20Directry/Hayashi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 秀美 (NAKAMURA, Hidemi)

奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・
教授

研究者番号：70198232

(2) 研究分担者

林 啓太 (HAYASHI, Keita)

奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・
講師

研究者番号：10710783