

平成21年6月15日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2006～2008
課題番号：18510085
研究課題名（和文） 泡沫層存在下での低環境負荷型界面活性剤の高効率・低コスト生産システム
研究課題名（英文） 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：微生物の生産する、環境に優しい界面活性剤（バイオサーファクタント）の効率的な生産法を検討した。微生物反応器に取り付けた消泡装置で培養中の発泡をコントロールし、泡沫層を存在させることにより、生産されたバイオサーファクタントを泡沫層に濃縮させ、反応器から直接濃縮液を取り出せることを明らかにした。バイオサーファクタントの回収率は85%、取り出した泡沫の液量は培養初期液量の16%であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,300,000	0	2,300,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	420,000	4,120,000

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、低環境負荷型材料、消泡、泡沫分離

1. 研究開始当初の背景

界面活性剤は、工業用や家庭用など幅広い分野にわたり様々な用途に用いられている。環境関連の分野においても、油の洗浄・分散・微生物による分解促進（バイオレメディエーション）など油汚染環境の浄化に用いられている。しかし現在用いられている界面活性剤の多くは石油由来の合成界面活性剤であり、その難分解性や生物に対する毒性などから起こる二次的な環境汚染が問題となっている。一方、微生物が生産する界面活性剤バイオサーファクタントは高い生分解性を有し、生物に対する毒性が低い上、合成界面

活性剤に匹敵する界面活性能を持っている。さらに生物薬理作用、保湿作用などの性質を持つものもあり、多くの分野で合成界面活性剤に代替しうるポテンシャルを有している。しかし、バイオサーファクタントは合成界面活性剤に比べ生産コストが高いという経済的な問題点を抱えており、実用化されているものについても用途は限定されている。

研究代表者は、微生物反応器における機械的消泡技術に関する研究を行い、既存の微生物反応器を改良することなく、攪拌翼の種類を変更させるのみで、培養中の発泡をコントロールできる反応器を開発した。界面活性物

質であるバイオサーファクタントは、微生物反応器内に泡沫層が存在すれば、その泡沫層に濃縮していくと予想される。一台の微生物反応器で生産と濃縮（粗分離）を実施すれば、その後の分離精製工程を減らすことができると考え、バイオサーファクタントの生産コスト削減に寄与するべく本研究に従事した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、発泡を制御する装置を備えた微生物反応器を用いて、泡沫層の存在下、環境に負荷をかけない、安全性に優れた界面活性剤バイオサーファクタントを、生産と分離を組み合わせたハイブリッド方式で効率良く生産する技術を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 菌株と培地

① 菌株

微生物としては、納豆から分離した細菌株を用いた。16SrDNA-Full塩基配列解析の結果、その菌株は *Bacillus subtilis* に帰属する菌であることが判明した。しかし、既存の菌株とは完全に一致しなかったため、その菌株を *Bacillus subtilis* NT1 と命名した。

② 培地

培地としては栄養培地（肉エキス 10 g/L、ポリペプトン 10 g/L、NaCl 5 g/L）を用いた。

(2) 実験装置

実験には、2.5 L 容（内径：0.130 m、高さ：0.190 m）と 10 L 容（内径：0.186 m、高さ：0.375 m）のジャーフェーマンターを使用した。

① 2.5 L 容ジャーフェーマンター

シード培養としては、栄養寒天スラントで生育した菌を 1 白金耳、300 mL 三角フラスコ内の 100 mL の培地に接種し、回転振とう機（振とう速度：128 rpm）で 30 °C、24 hr 培養した。ジャーフェーマンターに 975 mL の培地を入れ、シード培養液 25 mL を加えて、計 1 L で実験を行った。培養温度は 30 °C で行った。通気は、上部空間に吹き込む、表面通気法により行った。攪拌翼には、タービン型インペラーと棒状インペラーを用いた。

② 10 L 容ジャーフェーマンター（図 1）

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。培養温度は 30 °C で行った。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 0.5 L/min、攪拌速度 800 rpm で行った。

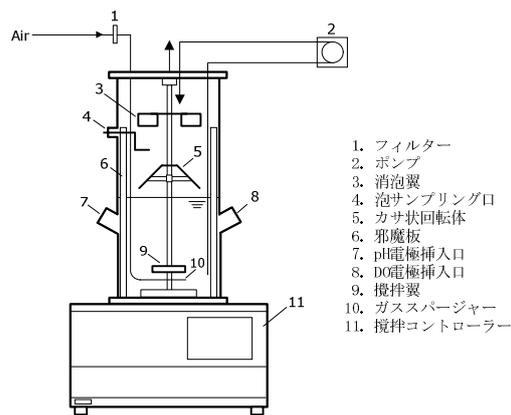


図 1 10 L 容ジャーフェーマンターの概略図

1. フィルター
2. ポンプ
3. 消泡翼
4. 泡サンプリング口
5. カサ状回転体
6. 邪魔板
7. pH電極挿入口
8. DO電極挿入口
9. 攪拌翼
10. ガススパージャー
11. 攪拌コントローラー

(3) 機械的消泡技術

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。消泡翼による泡コントロールを容易にするため、カサ状回転体の設置と消泡翼上への液供給を行った。カサ状回転体は、液表面から 6.5 cm の高さで、消泡翼と液表面の間に取り付けられた。この回転体は、カサの内部に泡沫を取り込むため、泡沫の上昇を抑える効果がある。一方、回転している消泡翼上への液供給は、内壁付近に溜まっている破泡後の泡を下方に流す効果がある。その液供給量は 0.15 mL/s とした。

(4) 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。

(5) バイオサーファクタントの質量分析

精製したバイオサーファクタントを溶解液に溶かした後、結晶化し、MALD/TOF-MS による質量分析を行った。レーザー源としては、波長 337 nm の窒素レーザーを用いた。マトリックスとしては、ゲンチシン酸（2,5-dihydroxybenzoic acid）を用い、正イオンモードで検出した。

(6) 表面張力と乳化活性の測定

バイオサーファクタントとの比較のため、

陰イオン系界面活性剤 SDS と非イオン性界面活性剤 TritonX-100 を用いた。

表面張力は、表面張力計を用いて 25 °C で測定した。

乳化活性は、乳化指数 (E_{24}) を用いることにより評価した。油としては、ケロシンを使用した。界面活性剤の水溶液 4 mL を含む試験管に、ケロシンを 6 mL 注いだ。2 分間攪拌して 24 hr 静置した後、乳化層、油層、水層の高さを測定した。 E_{24} は、乳化層、油層および水層の高さの和に対する乳化層の高さの比として算出した。

4. 研究成果

(1) バイオサーファクタントの同定

Bacillus subtilis が生産するバイオサーファクタントとしては、7 個のアミノ基からなる環状リポペプチドのサーファクチンが知られている。本研究で使用した *Bacillus subtilis* NT1 が生産するバイオサーファクタントとサーファクチンを、MALD TOF-MS を用いる質量分析法で比較した。図 2 に、*Bacillus subtilis* NT1 が生産するバイオサーファクタントとサーファクチンの TOF-MS スペクトルを示す。サーファクチンのモノイソトピック質量は 1035.6 であり、プロトンが付加した 1036.6 で、強いピークが生じた。一方、*Bacillus subtilis* NT1 が生産するバイオサーファクタントも、同様に、1036.6 で強いピークを示した。また、両方とも、1058.6 のピークも強く出ているが、よく見られるナトリウム付加 (+23) と考えられた。この結果から、*Bacillus subtilis* NT1 が生産するバイオサーファクタントは、サーファクチンであると推測された。

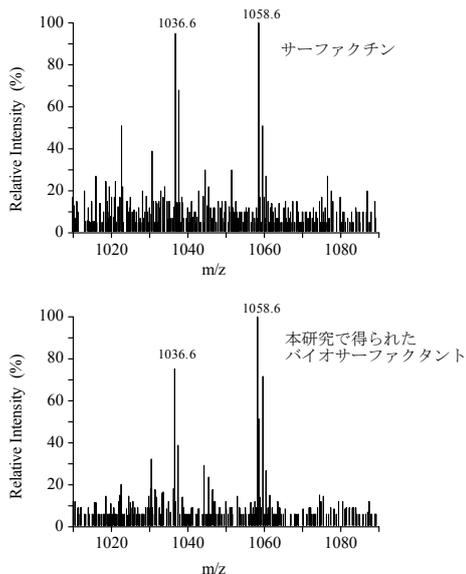


図 2 TOF-MS スペクトル

(2) バイオサーファクタントの表面活性

Bacillus subtilis NT1 が生産するバイオサーファクタントの界面活性剤としての特性を明らかにするため、表面張力低下能と乳化活性を調べた。

①表面張力低下能

図 3 に、蒸留水を溶媒とするバイオサーファクタント溶液の濃度と表面張力の結果を、SDS と TritonX-100 の結果とともに示す。蒸留水の表面張力は、バイオサーファクタント濃度 100 mg/L 程度で、72 mN/m から 29.5 mN/m に低下した。また、他の合成界面活性剤に比べて、低濃度で急激に低下していることがわかる。

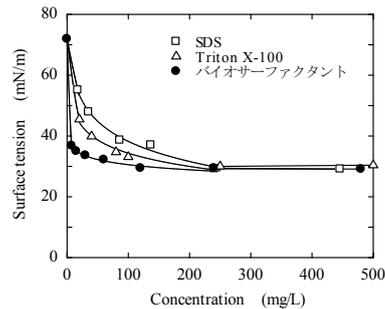


図 3 界面活性剤水溶液の表面張力

②乳化活性

図 4 に、蒸留水に溶かした界面活性剤の濃度と乳化指数 E_{24} の関係を示す。バイオサーファクタントと TritonX-100 の E_{24} の値は、250 mg/L 以上で、約 70 % となった。SDS については、250 mg/L において、 E_{24} の値は、数%と低く、1600 mg/L の濃度になると、70 % 程度になった。

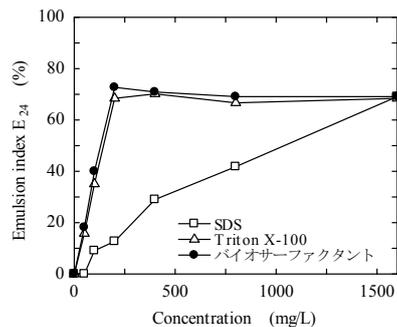


図 4 界面活性剤水溶液の乳化活性

以上の結果から、バイオサーファクタントの表面張力低下能および乳化活性は、合成界面活性剤に匹敵する能力を持つことが示された。

(3) バイオサーファクタント生産に及ぼす酸素供給の影響

実験には、2.5L 容のジャーフェーマンターを用いた。一般的な酸素供給方法である、液

中への空気の吹き込みでは、発泡が生じてしまうため消泡剤を加えなければならない。しかし、消泡剤の添加は、酸素移動速度の大幅な減少や生育阻害を及ぼす恐れがある。酸素供給量のみによる影響を調べるため、液上部の空間に空気を送り、液表面から酸素を吸収させる方法を採用した。この酸素供給法では、液表面での乱れが、液中への酸素供給量を決める。そのため、攪拌翼として、液面の乱れの少ない棒状インペラーと、液面の乱れが大きいタービン型インペラーを用いた。実験は、(I) 棒状インペラーで通気量 2 L/min と攪拌速度 1000 rpm、(II) タービン型インペラーで通気量 0.5 L/min と攪拌速度 250 rpm、および (III) タービン型インペラーで通気量 5 L/min と攪拌速度 500 rpm の 3 条件で行った。図 5(a)~(c) に、培養結果を示す。図 5(a) の DO の変化からわかるように、酸素供給量の大きさは、条件 (I) < 条件 (II) < 条件 (III) の順であった。図 5(b) の細胞増殖を表す OD₆₀₀ については、条件 (II) と条件 (III) の場合には、それぞれ 30 hr と 24 hr にピークを迎えて、その後減少する傾向にあった。酸素供給量の少ない条件 (I) では、48 hr まで徐々に増加する傾向にあった。図 5(c) のバイオサーファクタント濃度に関しては、条件 (II) と条件 (III) に比べて、酸素供給量の少ない条件 (I) の方が明らかに高いことがわかった。

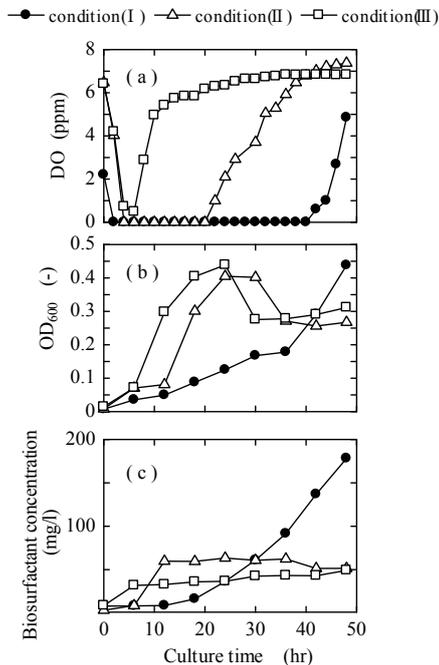


図 5 2.5L 容ジャーフェルメンターによる培養結果

(4) 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 10L 容のジャーフェルメンターを用いて、*Bacillus subtilis* NT1 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 6(a)~(c) に結果を示す。図 6(a) と (b) は、泡沫層と培養液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、泡沫をサンプリングし、液体に戻した後に測定した結果である。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 6(c) は、培養期間中の DO と pH の変化を示す。菌体量については、培養液中でも泡沫層中でもほとんど変化がなかった。細胞が気泡表面に集まり、泡沫層に移動して、泡沫層中での細胞濃度が高くなる場合もあるが、*Bacillus subtilis* NT1 は、特にそのような現象は生じなかった。一方、バイオサーファクタントは、明らかに、培養液部よりも泡沫層の部分での濃度が高かった。これは、培養液部で作られた後、泡沫層に移動し、濃縮していることを示している。また、培養期間中、泡の液含率の値はあまり変化せず、0.04 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 4% であったことを示している。

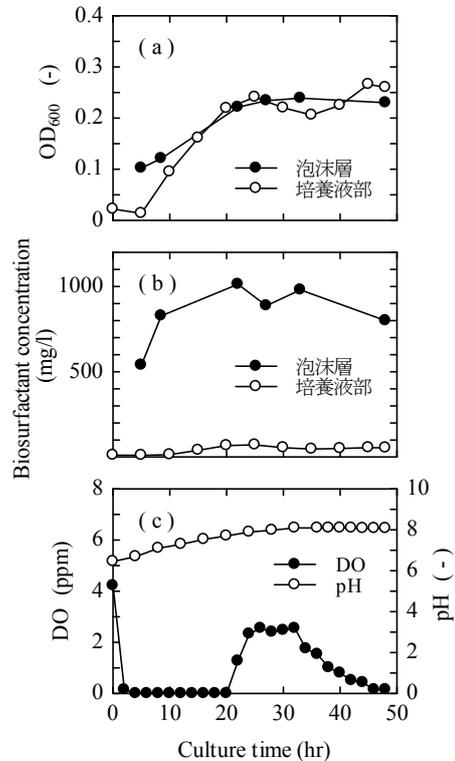


図 6 消泡装置を備えた 10L 容ジャーフェルメンターによる培養結果

(5) バイオサーファクタントの濃縮と収量

培養液と泡沫層でのバイオサーファクタント濃度、泡沫層の体積および液含率の値を用いて、バイオサーファクタントの濃縮比と収量を求めた。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。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。図7に、図6に示した培養結果のバイオサーファクタントの濃縮比と槽全体のバイオサーファクタントの収量を示す。濃縮比については、9 hrまでは、約60で、その後減少し、10~20ぐらいでほぼ一定となっている。バイオサーファクタントの収量は、培養時間の増加とともに増加し、30 hr以降少し減少した。図6(a)と(c)に示されるように、30 hr以降に酸素が消費されて、少し菌体が増殖している。この結果から考えると、図7にみられる30 hr以降のバイオサーファクタント収量の減少は、培地中の炭素源が消費されつくした後、炭素源としてバイオサーファクタントが消費されたものと予想される。

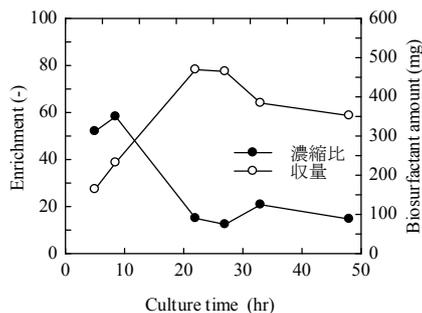


図7 バイオサーファクタントの濃縮比と収量

(6) 泡沫取り出し操作によるバイオサーファクタントの濃縮と回収

図6(b)と図7に示される結果から計算すると、48 hrの培養終了時に泡沫層を全て取り出した場合、泡沫によるバイオサーファクタントの回収率(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)は、50%であった。これは、培養液中にバイオサーファクタントが50%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であることを示唆している。図7に示されるように、バイオサーファクタント生産量が最大となる22 hr以降では、濃縮比はあまり変化しなかった。これは、液流出のない回分操作であるため、濃縮が平衡に達したものと考えられる。そこで、培養期間中に、泡沫を取り出す操作を加えて、泡沫によるバイオサーファクタントの回収量を調査した。今回の実験

では、培養器から取り出す泡沫の液量を、仕込み培養液量の10%とし、3回(5 hr: 100 mL, 20 hr: 200 mL, 30 hr: 100 mL)に分けて取り出した。48 hr培養した場合について、培養期間中に泡沫を取り出した場合と、取り出さなかった場合のバイオサーファクタント回収量の比較を行った。泡沫を取り出す操作の場合は、3回の時の回収量に加え、48 hrに泡沫を全て取り出したとして算出した。泡沫を取り出した場合のバイオサーファクタント回収量は、泡沫を取り出さない場合に比べて、約3.8倍増加した。また、48 hrでのバイオサーファクタントの回収率は、85%にまで向上した。液低減率については、仕込み液量の16%にまで液量を減らすことができた。

(7) 今後の展望

消泡装置を用いて微生物反応器内に泡沫層を存在させながらバイオサーファクタント生産を実施した場合、泡沫にバイオサーファクタントが濃縮すること、並びに泡沫を回収することで分離精製に移す液量を大幅に減らすことができることを明らかにした。今後は、泡沫層への分離特性を明らかにし、最適な操作条件を見出すことから、回収率をさらに高め、本生産法の確立を図って行きたい。

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)

[学会発表] (計2件)

- ① 竹園 恵、泡沫を利用した環境調和型界面活性剤バイオサーファクタントの生産、新潟地方化学工学懇話会第120回講演会—技術・学術講演—『各界における環境技術に関する最新の取り組み』、2008年12月10日、新潟大学駅南キャンパス「CLLIC」
- ② 竹園 恵、泡沫層存在下でのバイオサーファクタント生産、化学工学会新潟大会、2008年8月21日・22日、新潟大学工学部

[その他]

教育学術新聞、大学発!!エコ技術・エコ商品、「微生物から界面活性剤」、2008年6月25日掲載

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