

微生物の好気培養に及ぼす消泡剤の影響について

小野寺正幸*、西堀仁司**、門田 智**、田島 淳**、大川 輝***

(平成8年10月31日受理)

Effects of Antifoam Agents on Aerobic Microbial Cultivation.

Masayuki Onodera*, Hitoshi Nishibori**, Satoshi Kadota**,
Jun Tajima** and Akira Ohkawa***

The effects of antifoam agents on the growth of baker's yeast and fungi were studied. No inhibitory effect on the growth of the above microorganisms was found in shaken cultures. However, an inhibitory effect of antifoam agents on the growth of the baker's yeast was found in the aerated stirred cultivation using a jar fermentor due to the decrease of the oxygen transfer rate.

Key words: antifoam agent, microorganism, oxygen transfer rate

1. はじめに

発泡は多くの微生物培養プロセスにおいて問題となっている。原因の多くは培地成分中のタンパク質で、これが気相と培養液の界面に濃縮し、簡単に破壊されない液の薄膜を形成すると考えられている。1) 発泡を制御しない場合には、仕込み液量の低下、エアフィルターが湿って雑菌汚染を招くおそれや培養液のロスなど正常な培養操作は不可能となる。

発泡の制御法としては消泡剤の添加によって泡を制御する化学的方法が現在広く用いられている。しかし、消泡剤の添加は酸素移動速度を低下させるなど培養プロセスそのものみならず、培養生産物の分離精製操作においても樹脂の劣化やなどの悪影響を及ぼすことが知られている。2~4) 八木と吉田は通気攪拌槽と気泡塔における物質移動の消泡剤の影響

* 物質生物システム工学科 助教授

** 新潟大学工学部化学システム工学科

*** 新潟大学工学部化学システム工学科 教授

について研究し、消泡剤 10ppm 程度の添加で酸素移動容量係数 (k_La) は約 60% 減少することを報告した。彼らはこれが消泡剤添加によって引き起こされた気泡の合一による気泡サイズ分布の変化、すなわち気泡界面積の減少によるものと考察している。⁵⁾ また、高橋と吉田は、培地の k_La は消泡剤の添加により急激に減少し、200ppm 以上で k_La の減少はレベルオフすることなどを示した。⁶⁾ さらに、消泡剤の存在は微生物菌体そのものにも毒性など何らかの影響があることも指摘されている。^{7,8)} しかしながら、これらの問題に関するより具体的なデータはこれまでほとんど報告されていないように思われる。そこで、本研究では、振とう培養と通気攪拌培養における微生物（酵母と糸状菌）の増殖に及ぼす消泡剤の影響について実験的に検討した。

2. 実験方法

2. 1 使用菌株

酵母として中越酵母株式会社製パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を、糸状菌として黄麹菌 *Aspergillus oryzae* と黒麹菌 *Aspergillus niger* を使用した。

2. 2 使用培地

MY 培地（グルコース 1%、ペプトン 0.5%、酵母エキス 0.3%、麦芽エキス 0.3%）を使用した。

2. 3 使用消泡剤

ディスホーム BC-51Y、BF-7、CA-123、CA-220、CB-442、CC-118、CE-120R（日本油脂株式会社）、信越シリコーン KM-70（信越化学株式会社）、アデカノール LG-294（朝日電化工業株式会社）

2. 4 培養方法

振とう培養は、酵母と糸状菌について消泡剤の毒性を検討するために消泡剤濃度 1000ppm、培養温度 30℃にて行った。酵母については MY 培地 100ml 含む 300ml 容三角フラスコを用いて往復振とう培養（振幅 4cm、振とう数 75rpm、100rpm）と回転振とう培養（回転半径 4cm、回転数 100rpm、150rpm）を行った。糸状菌については MY 培地 100ml 含む 500ml 容坂口フラスコを用いて往復振とう培養（振幅 4cm、振とう数 120rpm）を行った。

通気攪拌培養は、酵母について 2.5l 容ミニジャーファメンター（東京理化工業株式会社製 M-100 型）を用いて消泡剤として CC-118（濃度 1000ppm）、培養温度 30℃にて流加培養を行った。シード培養としては、300ml 容三角フラスコで培地量 100ml とし、30℃、12 時間往復振とう培養した。初期仕込量は、新鮮培地 1.4l（MY 培地のグルコース濃度を 0.5%にしたもの）にシード培養液 100ml を加え、1.5l とした。攪拌数 350rpm、通

気量 0.5vvm とし、3、6、9、12 時間後にそれぞれ別々に殺菌したグルコース (5g/10ml) とペプトン (1g/10ml) を間欠的に添加した。

2. 5 分析方法

生育量は、あらかじめ恒量を求めてある Whatman Glass Microfibre Filters GF/B にて培養液を吸引ろ過し、蒸留水にて洗浄後、110°C で 1 時間乾燥させ乾燥菌体重量として求めた。培養液中のグルコース定量は DNS 法により、エタノールの定量はガスクロマトグラフィにてそれぞれ定量した。^{9,10} 溶存酸素濃度 (DO (%)) は、東京理科器械株式会社製の発酵用酸素電極 (DO-1 型) を用いて測定した。

3. 結果と考察

3. 1 振とう培養

パン酵母について 9 種類の消泡剤の影響を調べるために往復並びに回転振とう培養を行った。Fig. 1 に往復振とう培養での消泡剤ディスホーム BC-51Y の結果について示す。

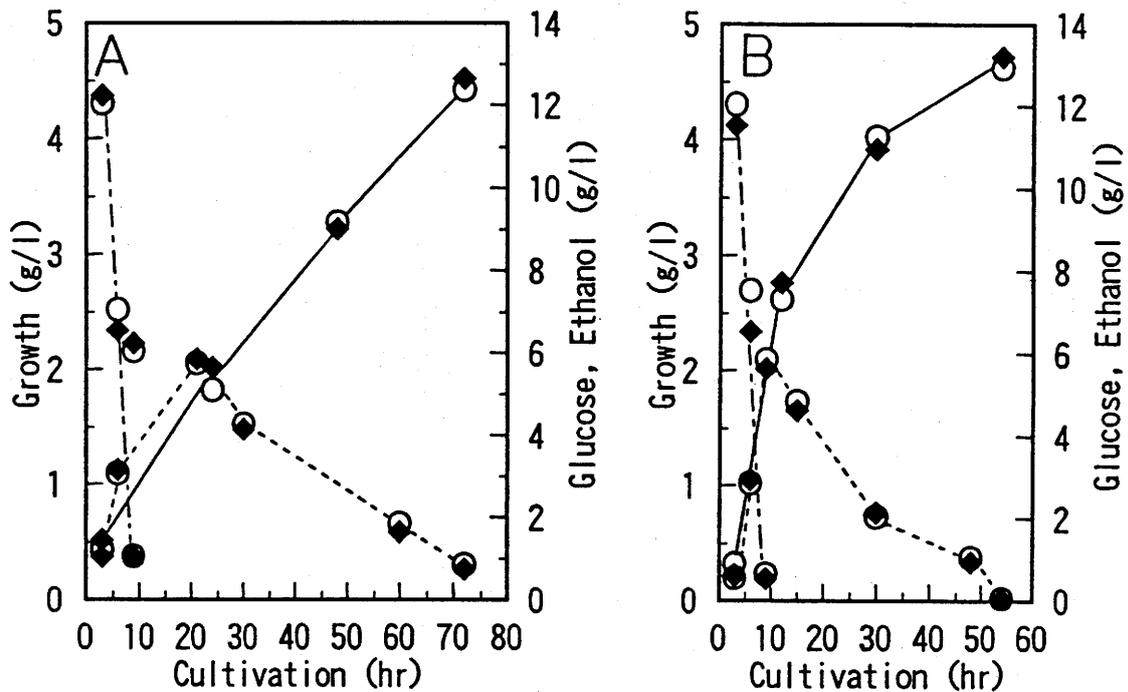


Fig. 1. Time course of baker's yeast cultivation with reciprocated shaking.

A, 75rpm; B, 100rpm; ○, control; ◆, BC-51Y; —, growth; ---, glucose; - · - ·, ethanol.

消泡剤非添加系と添加系において、増殖、グルコース、エタノールの経時変化に差は認められず、BC-51Yのパン酵母の悪影響は認められなかった。他の消泡剤についても同様の結果が得られた。Fig. 2に回転振とう培養での消泡剤ディスホームCA-123の結果について示す。往復振とう培養と同様に増殖、グルコース、エタノールの経時変化に差は認められず、CA-123のパン酵母の悪影響は認められなかった。他の消泡剤についても同様の結果が得られた。糸状菌について消泡剤ディスホームCC-118、CE-120R、信越シリコンKM-70の3種類の影響を調べたところ、いずれの消泡剤も *Aspergillus oryzae* と *Aspergillus niger* の生育に悪影響は認められなかった。これらの結果は、今回調べた消泡剤はパン酵母と糸状菌 (*A. oryzae* と *A. niger*) に毒性のないことを明らかにし、さらに自由液表面の乱れによって空気を巻き込む振とう培養では酸素移動

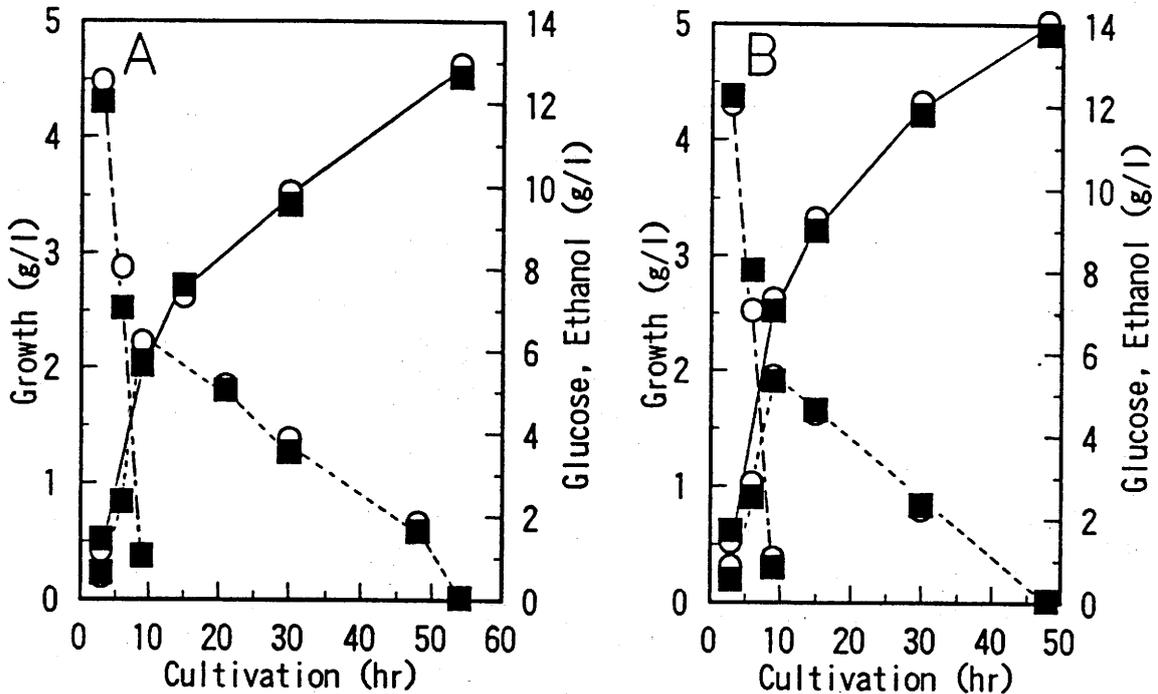


Fig. 2. Time course of baker's yeast cultivation with rotational shaking.

A, 100rpm; B, 150rpm; ○, control; ■, CA-123; —, growth; ---, glucose; ···, ethanol.

速度が消泡剤の存在によって影響されないことを示唆するものである。

3. 2 通気攪拌培養

次に通気攪拌培養でのパン酵母の増殖に及ぼす消泡剤の影響について検討した。ミニジャーフェメンターによる酵母の流加培養における消泡剤 (ディスホームCC-118、1000

ppm) の影響の培養結果を Fig. 3 に示す。消泡剤非添加系では、わずかながらの発泡は認められたがジャーファメンター外部への培養液の流出はなく、20 時間で菌体量は約 9.2g/l に達した。一方、消泡剤添加系では、全く発泡は観察されず、20 時間での菌体量は約 6.6g/l

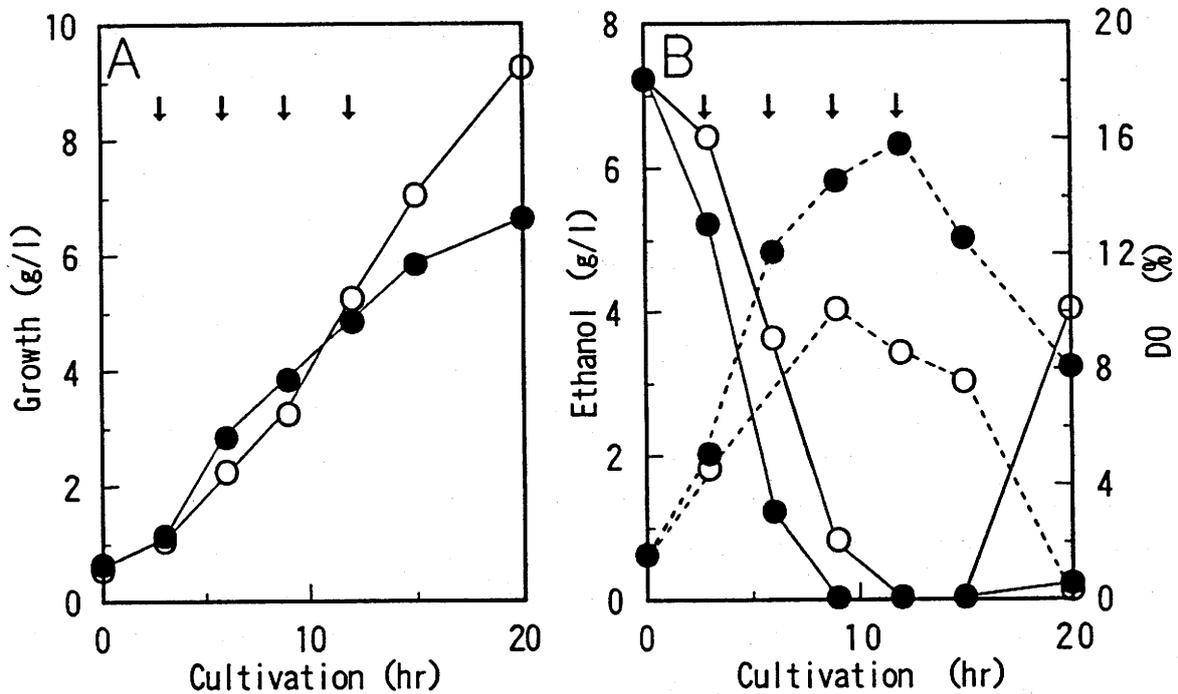


Fig. 3. Time course of baker's yeast cultivation in a jar fermentor.

A, growth; B, ethanol(---) and DO(—); ○, control; ●, CC-118. Arrows indicate feeding of glucose and peptone.

までしか達しなかった。消泡剤添加系での酵母菌体増殖への悪影響は、本実験に使用した消泡剤(デスホームCC-118)は菌体への毒性は認められなかったこと、培地中のエタノールと溶存酸素濃度の経時変化を考慮にいれると、酸素移動速度の低下に起因する酸素供給不足に帰結される。

以上、本研究では微生物の実培養における消泡剤の影響について実験的検討を行った。今回調べた範囲では、消泡剤はいずれも菌体への毒性は認められなかった。培養プロセスでの消泡剤の添加の影響は以下のように酸素供給の方法の違いにより異なることを明らかにした。まず、実験室レベルでよく用いられている酸素の培地への供給が主として自由液表面の乱れによる振とう培養においては、消泡剤の添加は酸素移動に影響を及ぼさないことが示唆された。一方、微生物の工業レベルでの培養に広く使われている気泡からの培地への酸素供給を主とする通気攪拌培養では、消泡剤の添加により酸素移動速度の低下に起因

する増殖への悪影響を認めた。このことは、振とう培養から通気攪拌培養へのスケールアップに際して酸素供給速度を適切に評価しなければならないことを指摘している。

謝辞

パン酵母を供与していただきました中越酵母株式会社に感謝いたします。糸状菌を供与していただきました新潟大学農学部応用生物化学科内山武夫教授に感謝いたします。消泡剤を提供していただきました日本油脂株式会社に感謝いたします。

文献

- 1) P. F. Stanbury and A. Whitaker 著、石崎文彬 訳: 発酵工学の基礎 (学会出版センター, 1988), pp. 85~86.
- 2) M. J. Hall, S. D. Dickinson, R. Pritcard and J. I. Evans, *Prog. Ind. Microbiol.*, 12, 169 (1973).
- 3) W. C. McGregor, J. F. Weaver, and S. P. Tansey, *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 385 (1988).
- 4) K. Yamagiwa, H. Kobayashi, A. Ohkawa and M. Onodera, *J. Chem. Eng. Japan*, 26, 13 (1993).
- 5) H. Yagi and F. Yoshida, *J. Ferment. Technol.*, 52, 905 (1974).
- 6) H. Takahashi and F. Yoshida, *J. Ferment. Technol.*, 57, 349 (1979).
- 7) B. Plichon, A. Decq and J. B. Guillaume, *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 127A, 521 (1976).
- 8) M. Berovič and A. Cimerman, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 313 (1979).
- 9) G. L. Miller, *Anal. Chem.*, 31, 426 (1959).
- 10) M. Onodera, Y. Endo and N. Ogasawara, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1947 (1989).