

## 機械的泡制御下での大腸菌 K12 株の 培養特性について

小野寺正幸\*、安藤 恵\*\*、西堀仁司\*\*\*、  
加瀬葉子\*\*\*、大川 輝\*\*\*\*

(平成10年10月31日受理)

Cultivation of *Escherichia coli* K-12 under Mechanical Foam Control.

Masayuki Onodera\*, Satoshi Andou\*\*, Hitoshi Nishibori\*\*\*, ,  
Yohko Kase\*\*\*, and Akira Ohkawa\*\*\*\*

A mechanical foam breaker with a rotating disk (MFRD) was developed. The cultivation of *Escherichia coli* K-12 was able to carry out in an aerated agitated vessel with the MFRD without the addition of antifoam agent. The growth of *E. coli* K-12 cells in a mechanical foam control system with the MFRD was also confirmed to be greater than that in a non-foaming system with antifoam agent under the same aeration rate and agitation speed conditions.

Key words: antifoam agent, *Escherichia coli* K-12, MFRD, oxygen transfer rate

### 1. はじめに

発酵プロセスにおいて、発泡は広くみられる現象である。その原因の多くは培養液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。<sup>1)</sup>特に、通気攪拌を伴う培養や発泡性の強い基質を用いた発酵プロセスにおける発泡の制御は重要な課題である。発泡を制御しない場合には、発酵槽からの培養液の流出や雑菌汚染を招く恐れがある等、多くの問題がある。現在、発泡の制御方法としては消泡剤の添加が広く用いられている。しかしながら、消泡剤の添加は、酸

---

\*物質生物システム工学科 助教授

\*\*物質生物システム工学科 助手

\*\*\*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

素移動速度の低下や菌体に対する毒性等発酵プロセスそのもののみならず、発酵生産物の分離精製操作にも悪影響を及ぼすことが指摘されている。<sup>1-10)</sup>本研究では、機械的消泡装置の一形式である回転円板型消泡装置 (MFRD) 装着通気攪拌槽を用いて大腸菌 K-12 株の培養を試みた。<sup>11)</sup>さらに、消泡剤添加系の培養と比較検討した。

## 2. 実験方法

### 2. 1 実験装置

内径 13cm の 2.5L 容ミニジャーファメンター M100 型 (東京理科器械 (株)) を使用し、その上部に直径 8.5cm の回転円板を有する MFRD を装着した (Fig. 1)。上昇泡が直接回転円板に接することを防ぐため、回転円板の直下 (1~2 mm) に回転円板と同じ直径の衝突板を設けた。本装置による消泡機構は、回転円板上にポンプにより培養液を供給し、その飛散液を上昇泡に衝突させることにより消泡を行うものである。モーターはヘイドン社製スリーワンモーター 3000H を、ポンプにはヤマト科学株式会社製コールパーマ送液定量ポンプ PA-21B を使用した。なお、実培養系では MFRD の外側のカラムはアクリル製のため、蒸気殺菌は不可能であったのでクリーンベンチ内で紫外線殺菌を行った。その他は、蒸気殺菌を行いクリーンベンチ内で装置を組み立てた。

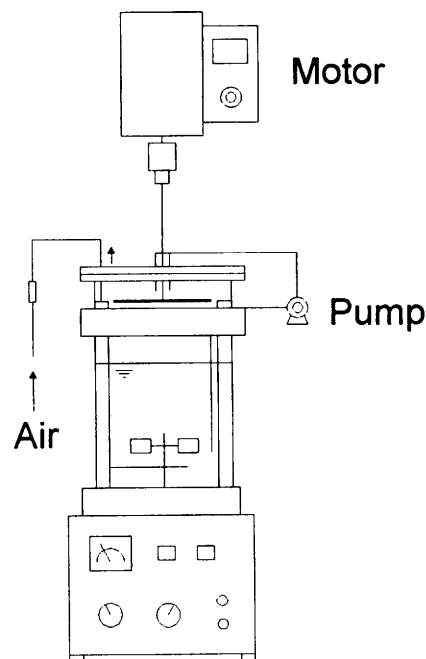


Fig. 1. MFRD 装着通気攪拌槽

本装置の水-空気系における酸素移動容量係数 ( $k_La$ ) の値を Gassing out 法により測定した。<sup>1)</sup>仕込み液量は 2L とし、水道水、水道水+液体洗剤 (三協油脂株式会社製うず潮フレッシュ、100ppm)、水道水+液体洗剤 (同上) +消泡剤 (信越化学株式会社製信越シリコーン KM70、1000ppm) の 3 種類で行った。水道水+液体洗剤の場合、まず水道水のみで窒素ガス通気により溶存酸素を追い出し、その後液体洗剤を添加し、50rpm にて 2 分間水道水と液体洗剤を混合したのち通気攪拌を行った。いずれも温度 30℃、通気量 0.5vvm、攪拌数は 200~450rpm とした。消泡系での回転円板は 2500rpm、円板上への液供給量は 9ml/sec とした。

### 2. 2 使用菌株

使用菌株には、大腸菌 K-12 株 (*Escherichia coli* K-12) を用いた。

## 2. 3 使用培地

培地として LB 培地 (トリプトン 1 %、酵母エキス 0.5 %、NaCl 0.5 %、グルコース 0.1 %) を用いた。

## 2. 4 使用消泡剤

ディスホーム CC-118 (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. 5 培養方法

振とう培養は、消泡剤の菌体への悪影響を検討するために消泡剤濃度 1000ppm、培養温度 37℃にて行った。LB 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 50rpm、100rpm、120rpm) と回転振とう培養 (回転半径 4cm、回転数 100rpm、120rpm、150rpm) を行った。

通気攪拌培養は、上記の通気攪拌槽を用いて機械的消泡系と消泡剤添加系での培養を行った。消泡剤としては、信越シリコーン KM-70 を使用し、濃度は 1000ppm とした。培養温度は 37℃で行った。シード培養としては、LB 培地 100ml 含む 300ml 容三角フラスコを用いて 37℃、12 時間往復振とう培養した。仕込み量はシード培養 200ml を新鮮培地 1.8L に接種することで 2L とした。攪拌数は 400rpm、通気量は 0.5vvm とし、pH は調節しなかった。

## 2. 6 分析方法

菌体濃度は、乾燥菌体濃度として求めた。培養液 10ml を遠心分離 (10000×g、10min、4℃) を行い、上清を取り除き、エタノール 3ml を加え、菌体を懸濁し、再度、上記の遠心操作を行い、エタノールを除去した後、少量の水を加えた。あらかじめ秤量しておいたアルミ皿に全てを注ぎ込み、110℃にて乾燥させ、乾燥重量を求めた。

# 3. 結果と考察

## 3. 1 振とう培養

*Escherichia coli* K-12 について 3 種類の消泡剤の影響を検討するために往復並びに回転振とう培養を行った。往復並びに回転振とう培養において、いずれの振とう条件においても消泡剤非添加系と添加系では菌体の増殖に差は認められず、実験に用いた 3 種類の消泡剤は *E. coli* K-12 にたいする毒性のないことを確認した。

## 3. 2 酸素移動特性

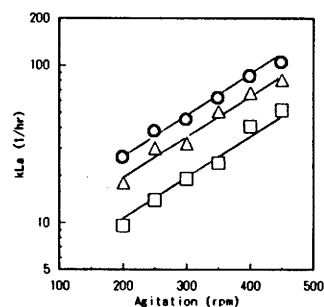


Fig. 2. 酸素移動特性

○, MFRD; △, 水; □, 消泡剤.

MFRD 装着通気攪拌槽の酸素移動容量係数の結果を Fig. 2 に示す。同一の通気攪拌条件において機械的消泡系の方が消泡剤添加系に比べて高い  $kL_a$  が得られることが認められた。

### 3. 3 通気攪拌培養

次に MFRD 装着通気攪拌槽を用いて *E. coli* K-12 の培養を試みた。Fig. 3 に通気攪拌培養の結果を示す。消泡に要する回転円板の回転数は培養開始後 1 時間目までは 2500rpm、それ以降は 2000rpm で泡の制御が可能であり、菌体の増殖は良好であった。さらに、同

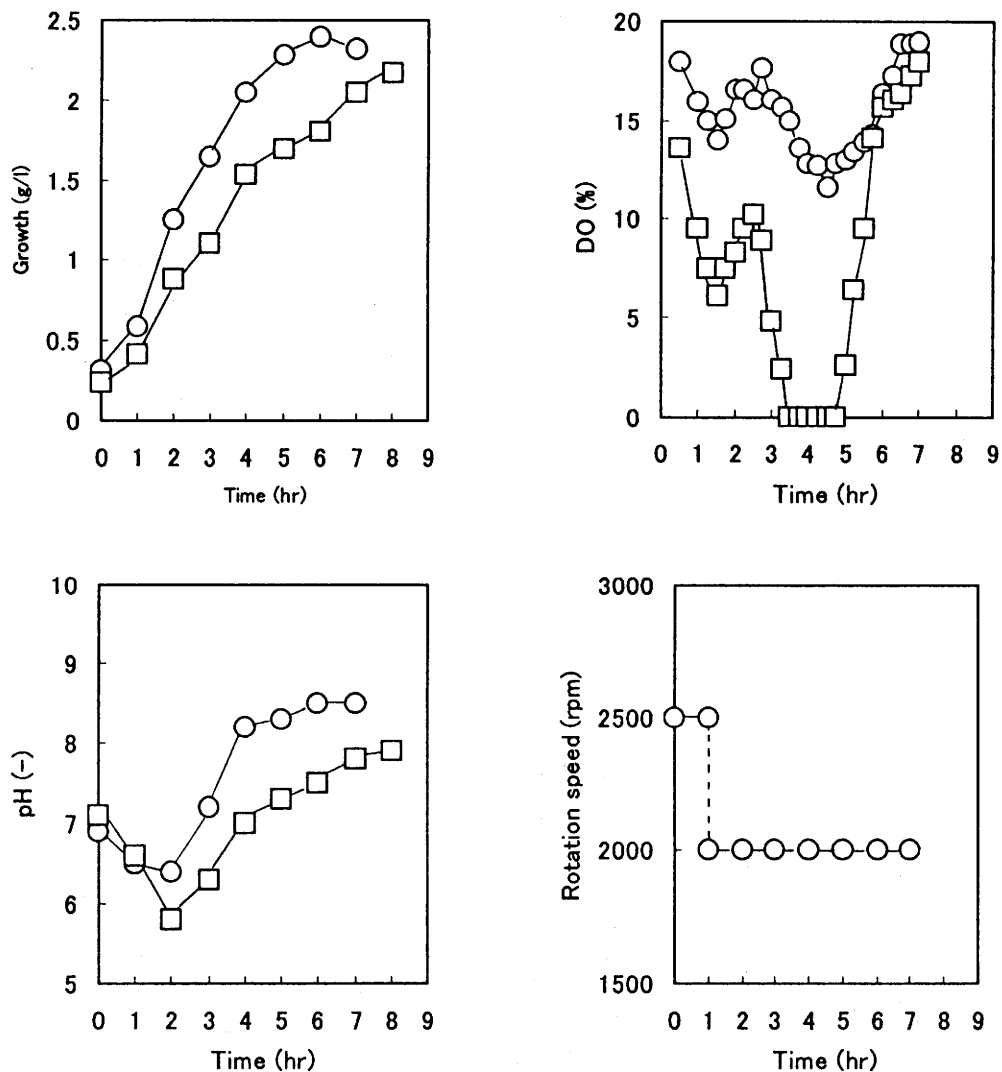


図2. *E. coli* K-12 の通気攪拌培養  
○, 機械的消泡系; □, 消泡剤添加系.

一の通気攪拌条件において、消泡剤を添加した場合と比較すると MFRD を用いた方が増殖速度が速く、本機械的消泡装置装着通気攪拌槽の有効性が示された。消泡剤添加系での増殖速度の低下は、消泡剤に菌体への直接の悪影響が認められなかったこと、Fig. 3 に示されているように溶存酸素濃度が機械的消泡系に比べて極端に低下していることから、酸素移動速度の低下に起因することが示唆された。

#### 4. まとめ

振とう培養において菌の生育に及ぼす消泡剤の影響を検討したところ、本実験で用いた 3 種類の消泡剤は、いずれも *E. coli* K-12 株の生育に及ぼす影響は認められなかった。通気攪拌培養において、同一の通気攪拌条件で、消泡剤を添加した場合と比較すると MFRD を用いた方が増殖速度が速く、培養は良好であった。これは、本実験で用いた消泡剤が直接菌体への毒性が認められないことから、消泡剤の添加による酸素移動速度の低下に起因することが示唆された。

#### 謝辞

本実験で用いた *Escherichia coli* K-12 株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）。
- 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. Microbial. (Inst. Pasteur)*, 127A, 521 (1976).
- 8) M. Berovic and A. Cimerman, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 313 (1979).
- 9) M. Onodera, H. Nishibori, H. Tanaka, N. Ogasawara and A. Ohkawa, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 486 (1993).
- 10) M. Onodera, H. Nishibori, S. Kadota, J. Tajima and A. Ohkawa, 新潟工科大学研究紀要, 1, 35 (1996).
- 11) A. Ohkawa, M. Sakagami, N. Sakai, N. Futai and Y. Takahara, *J. Ferment. Technol.*, 56, 428 (1978).