

マンノシルエリスリトールリピッド生産における溶存酸素濃度の影響と新規形状攪拌翼（スーパーミックス，HS100+HR100）の性能評価

玉井正弘，松下修司*

Influence of dissolved oxygen concentration and performance evaluation of a new shape impeller (Super Mix, HS100 + HR100) on mannosylerythritol lipid production

Masahiro Tamai and Shuji Matsushita*

Using the mannosylerythritol lipid (MEL)-producing yeast, *Pseudozyma tukubaensis* TM-181, the performance (as measured by MEL production) of a new shape stir impeller (Super-Mix, HS-100 + HR100) was evaluated. As a control, a general turbine-type stir impeller was used. After the midpoint of cultivation, the viscosity of the culture broth increased rapidly. DO (dissolved oxygen concentration) was maintained by controlling the agitation of the stir impeller until the midpoint of cultivation. Using the Super-Mix impeller, the MEL production rate was always high, and in each fermentor, and reached $2.28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ at 5 ppm (DO). During cultivation, the agitation and total agitation of the Super-Mix was always low in each DO setting.

キーワード： バイオサーファクタント，マンノシルエリスリトールリピッド，*Pseudozyma tukubaensis* TM-181，通気攪拌型培養槽，攪拌翼

バイオサーファクタントは、微生物によって植物油から生産できる界面活性剤であり、乳化能、分散能、可溶性などに加えて、低毒性、高い生分解性、広範囲な生物活性などの有益な機能を持っている。マンノシルエリスリトールリピッド (MELs) は、疎水基として脂肪酸とアセチル基、親水基として糖アルコールであるエリスリトールとマンノースを含むバイオサーファクタントの一種である。MELs の生産に関して、振とうフラスコ¹⁰⁻¹²や通気攪拌型培養槽¹³⁻¹⁵を用いた回分培養が検討されてきた。酸素を多量に必要とする培養では、酸素供給量が律速となって効率的な生産を維持できなくなり生産時間が長くなる。MELs 生産菌の増殖及び MELs 生産には酸素を要求するために、MELs の生産性を上げるには酸素供給速度を高くできる通気攪拌型培養槽の使用が有効である。

通気攪拌型培養槽は縦型の円筒状タンク形状であり、空気は、空気送入管を通じて供給される。空気送入管の直ぐ上に設置した攪拌翼を培養液中で高速で回転させることにより供給された空気の気泡径を小さくし、邪魔板で気泡の滞留時間を長くすることにより培養液中に酸素が溶けやすくなるようにしている。

通常、液中での酸素の移動速度⁹⁾は、次式で表せる。

$$\begin{aligned} \text{酸素移動速度} &= (\text{濃度勾配}) / (\text{抵抗}) \\ &= \text{酸素移動速度係数} \times \text{濃度勾配} \end{aligned}$$

大気圧下 25℃、空気 (酸素濃度 : 21%) での純水中の飽和酸素濃度は、僅かに 8.1ppm と低く、濃度勾配により酸素移動速度を大きく保つことは困難である。

一方、MELs 生産において、培養中期以降培養液の粘性が次第に高くなる現象が観察された。培養液の粘度上昇は、酸素移動速度に影響を与えている可能性がある。

そこで、本研究では MELs 生産菌を用いた通気攪拌型培養槽での MELs 生産において、従来から用いられてきたタービン翼を対照として、佐竹化学機械工業株式会社と株式会社三ツワフロンテックが開発した新規形状の攪拌翼 (スーパーミックス翼) について、省エネルギー効果を中心とした性能を評価したので、結果を報告する。

実験方法

1. 供試菌株

植物の葉より分離した *Pseudozyma tukubaensis* TM-181¹³⁻¹⁵を MELs 生産菌として使用した。菌株は、ポテトデキストロース斜面培地 (スラント) で 30℃、2 日間培養後 5℃ で保存した。

* 広島県商工労働局次世代産業課

2. 培地組成

(1) 前々培養用培地

グルコース 30g, 硝酸アンモニウム 2g, リン酸 2 水素 1 カリウム 0.2g, 硫酸マグネシウム・7 水和物 0.2g, 酵母エキス 2g に 1L の水道水を加えて, 121°C で 10 分間殺菌した。

(2) 前培養用培地

亜麻仁油 30g, 硝酸アンモニウム 0.5g, リン酸 2 水素 1 カリウム 0.4g, 硫酸マグネシウム・7 水和物 0.2g, 酵母エキス 1g, コーンステープリカー 4g に水道水を加えて 1L とした後に 121°C で 10 分間殺菌した。

(3) 本培養培地

亜麻仁油 200g, 硝酸アンモニウム 0.5g, リン酸 2 水素 1 カリウム 0.4g, 硫酸マグネシウム・7 水和物 0.2g, 酵母エキス 1g, コーンステープリカー 4g に水道水 800mL を加えて 121°C で 20 分間殺菌した。

3. 培養方法

(1) 培養装置

Fig. 1 に示した装置を用いた。本培養培地 2.5L を 5L 容培養槽 (三ツワフロンテック製) に加えて滅菌した。

排気ガス中の酸素及び炭酸ガス濃度は, O_2 - CO_2 メーター (EX-1562, エイブル製) によってモニターした。

(2) 攪拌翼

新規形状攪拌翼としてスーパーミックス (SM, HS100 + HR100, 三ツワフロンテック製) を用いた。対照として従来より培養槽の攪拌翼として使用されてきたタービン翼 (TB) を用いた。使用した攪拌翼の形状を Fig. 2 に示した。

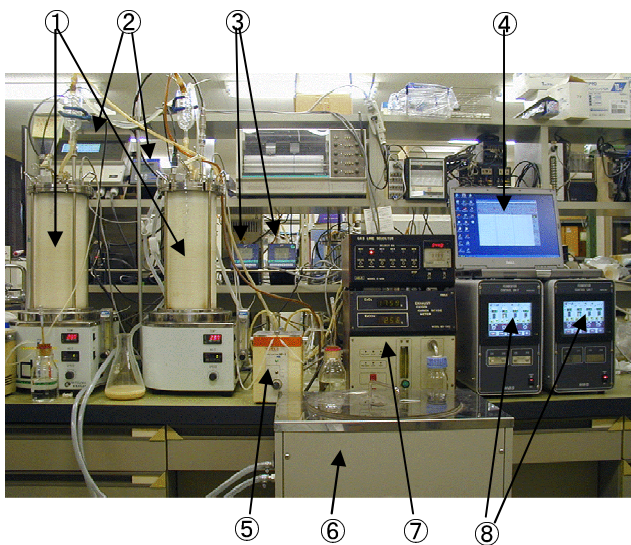


Fig. 1 Experimental set-up

- ① jar fermentor ② DOmeter ③ pHmeter ④ computer
- ⑤ peristaltic pump ⑥ circulator low temp ⑦ gas analyzer
- ⑧ controller

(3) 前々培養

保存していたスラントから 8mL の前々培養培地を含む試験管に 1 白金耳接種し, 振とう培養器で 120rpm, 30°C, 2 日間培養した。

(4) 前培養

前々培養を 100mL の前培養培地を含む 500mL 容の坂口フラスコに接種し, 振とう培養器で 120rpm, 30°C, 2 日間培養を行った。

(5) 本培養

前培養を 2.5L の本培養培地を入れた 5L 容卓上型発酵槽 (三ツワフロンテック製) に接種して, 30°C, $2.5Lmin^{-1}(1vvm)$ のエアレーション速度で 96~122 時間培養した。培養液の pH は, 培養槽に装着した pH センサーにより測定し, 14%(w/v) のアンモニア溶液を流加することにより 5.4 に制御した。

培養液中の溶存酸素濃度 (DO) は, 培養槽にセンサーを装着して培養槽内の攪拌羽根の回転数を調節することにより 1, 3 及び 5ppm に制御した。

4. 分析方法

培養液中の MELs, トリアシルグリセロール (TG), ジアシルグリセロール (DG), モノアシルグリセロール (MG) 及び脂肪酸 (FA) は, 培養液 5mL に酢酸エチル 10mL を加えて 2 分間激しく振とうして抽出を行った。静置後, 上層の有機溶媒層を回収した。この操作を 2 回繰り返して分析試料とした。試料をクロマトロッドにチャージし, ベンゼン/クロロホルム/酢酸(50/20/0.7)の溶媒を用いて 30 分展開した。乾燥後, TLC-FID Analyzer (Iatoroscan TH-10, Yatoron Laboratories 製) を用いて分析した。標準物質として, *Pseudozyma tukubaensis* TM-181 の精製 MEL-B, Trilinolein, 1,3-Dilinolein, 1-Monolinolein, Linoleic acid を用いた。乾燥菌体濃度は, 酢酸エチル層を除いた後の水層を, 遠心分離器を用いて 10 000rpm, 10 分間遠心した。沈殿物を 0.9%(w/v) の生理食塩水で 2 回洗浄し, 105°C で 1 夜乾燥した。粘度は, 培養槽より培養液を 70mL 採取し, 直ちに粘度計 (BM 型, 東京計器製造製) を用いて測定した。

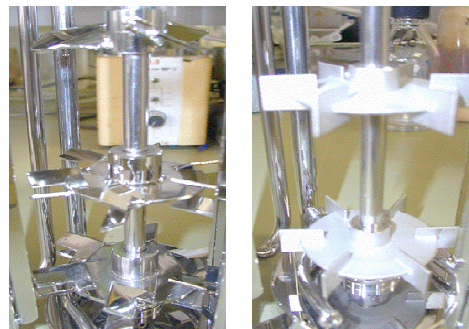


Fig. 2 Shape of stir impeller

Left : Super-mix (HS100 + HR100), Right : Turbine.

実験結果および考察

1. 培養液の粘度変化

スーパーミックス及びタービン翼を用いて 700rpm の一定回転数で回分培養を行った。培養の経時変化を Fig. 3 に示した。

スーパーミックス及びタービン翼共に同様の経時変化となった。原料である亜麻仁油 (トリアシルグリセロール: TG) は, MELs 生産菌が菌体外に分泌するリパーゼの作用により時間の経過と共に次第に減少し, 約 60 時間でほぼ完全に分解された。TG の中間分解生成物である DG 及び MG は検出されなかった。TG の最終分解生成物である脂肪酸は, 時間の経過と共に次第に増加し, 約 50 時間で最高値となった後, 次第に減少した。MELs 生産菌が, TG の分解生成物であるグリセロールと脂肪酸を基質として MELs を細胞内で合成し, 細胞外に分泌することにより培養液中の MELs 濃度は次第に増加した。培養終了時の 108 時間での MELs 濃度は, スーパーミックスで 144.8gL^{-1} , タービン翼で 137.3gL^{-1} であった。

スーパーミックス及びタービン翼での MELs 生産の様子を Fig. 4 に示した。48 時間 (A) では, 共に培養液中に多量の気泡を含んで発泡している。70 時間 (B) では, 左のスーパーミックスで発泡が収まっているが, 右のタービン翼では発泡が継続している。発泡が収まっている時に培養液の粘度が高くなり, DO が低下し, 攪拌速度の増加が観察された。このような発泡と消泡を不定期に繰り返しながら MELs が生産された。

Fig. 3 に示したように培養液の粘度は, 58 時間まで次第に増加した後, 72 時間でほぼ 0 Pa sec まで低下した。この後, 粘度は急速に上昇し, 96 時間でタービン翼とスーパーミックスでそれぞれ 2.50 と 2.25 Pa sec の最高値に達した。これらの値は, 濃厚ソースや 75% ショ糖溶液に相当する。MELs の精製物は水飴状であるため, MELs 濃度の増

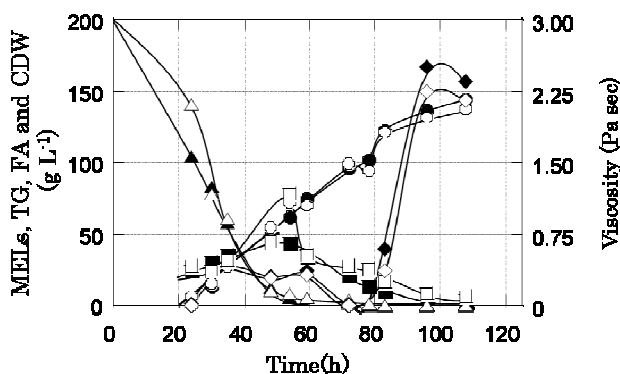


Fig. 3 Time course of MELs production and viscosity in culture broth

Symbols: ●, ○, MELs; ▲, △, TG; ■, □, FA; ◆, ◇, viscosity.

Open and closed symbols indicate Turbine and Super-mix.

加が粘度上昇に大きな影響を与えていることは明らかであるが, MELs 濃度が 100gL^{-1} 位まではあまり粘度は上昇せず, 100gL^{-1} 以上で急激に上昇する理由は明らかではない。

2. DO 設定値 1ppm における培養

DO 設定値を 1ppm, 最低回転数を 300rpm として, 回転数を調節して培養を行った。培養の経時変化を Fig. 5 に示した。時間の経過と共にスーパーミックス及びタービン翼の DO は, 次第に減少し, 10 時間で 1ppm に達した後は次第に回転数が増加した。30 時間以降 86 時間まで, 回転数はほぼ一定値となり, スーパーミックスがタービン翼に対して 80rpm 程度低い値であった。86 時間以降, DO が 1ppm 以下で変動し, DO を上昇させるために回転数が大きく変動した。

DO が大きく変動し始める 86 時間での MELs 濃度は, 約 90gL^{-1} であり, この濃度は, Fig. 3 における粘度が上昇を開始する濃度である。この時, 培養液は発泡が収まり, 攪拌の様子から粘性が高くなっていると推測された。

一方, 設定 DO を維持できている場合の培養液は, 発泡し, 粘性が低いような状況が観察された。粘度の上昇により培養液への酸素の移動速度が低下することで DO が低下し, DO 値を上昇させるために回転数が増加したと考えられる。

MELs, TG, FA の経時変化は, Fig. 3 と同様の傾向であった。乾燥菌体重量 (CDW) は, 時間の経過と共に増加した。120 時間後でのスーパーミックス及びタービン翼の MELs, FA 及び CDW 濃度は, それぞれ 135.9 と 140.1 , 6.4 と 6.0 及び 45.3 と 39.1gL^{-1} であった。TG は残存していなかった。

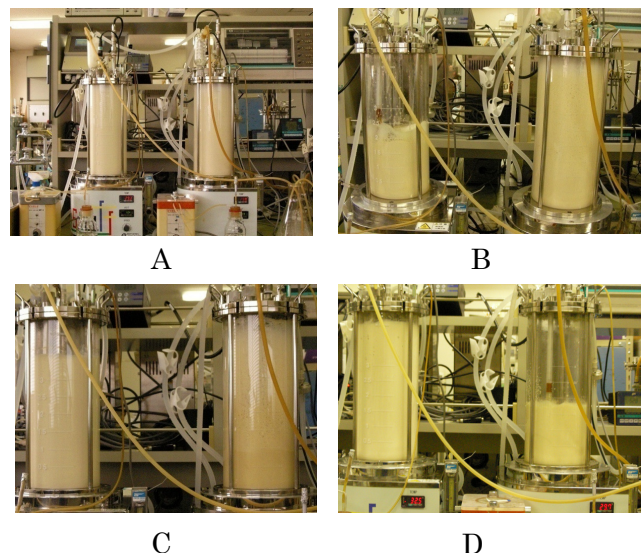


Fig. 4 Appearance of MELs production by with jar fermentor

Left: Super-mix (HS100+HR100), Right: Turbine.
A, 48h; B, 70h; C, 110h; D, 120h.

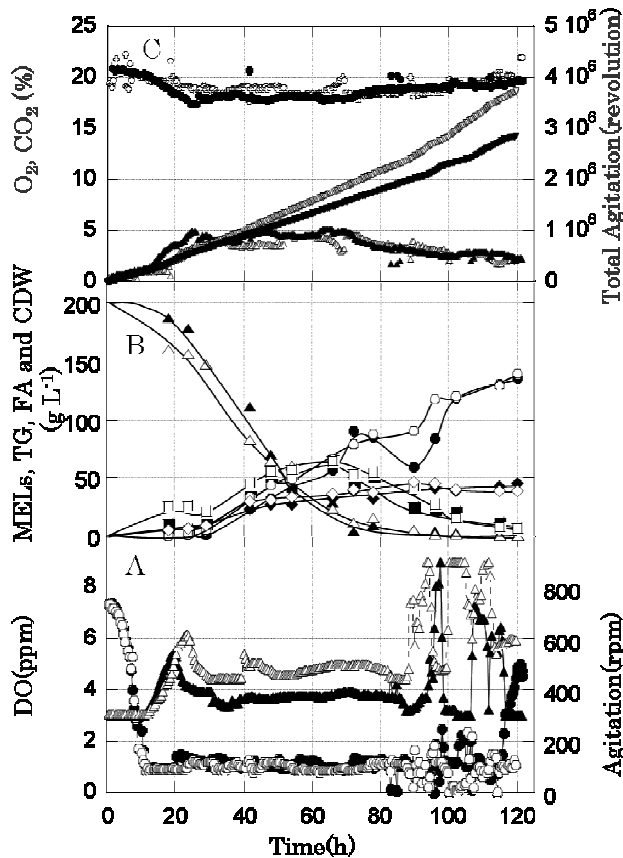


Fig. 5 Time course of cultivation on 1ppm of DO

Symbols : (A) ●, ○, DO ; ▲, △, agitation ; (B) ●, ○, MELs, ▲, △, TG ; ■, □, FA ; ◆, ◇, cell dry weight ; (C) ●, ○, O₂ ; ▲, △, CO₂ ; ▼, ▽, total agitation.

Open and closed symbols indicate Turbine and Super-mix.

排気ガス中の酸素濃度は、24時間まで次第に減少し、これに伴い炭酸ガス濃度が増加した。24時間以降、一定値を保持した後に次第に増加した。炭酸ガス濃度は、酸素濃度に対応した変化となった。これは、菌体の増殖及び脂肪酸のβ酸化などによる酸素消費と炭酸ガスの生成のためである。攪拌翼の積算回転数は、時間の経過と共にほぼ直線的に増加した。スーパーミックスは、タービン翼に比較して低い積算回転数となる経過となった。120時間での積算回転数は、スーパーミックスで 2.85×10^6 revolution、タービン翼で 3.72×10^6 revolutionとなり、スーパーミックス翼が低い値となった。

3. DO 設定値 3ppm における培養

DO 設定値を 3ppm、最低回転数を 400rpm として、回転数を調節して培養を行った。培養の経時変化を Fig. 6 に示した。1ppm の場合と同様に、時間の経過と共にスーパーミックス及びタービン翼の DO は、次第に減少し、10時間で 3ppm に達した後は次第に回転数が増加した。20時間以降 60 時間まで、回転数はほぼ一定値となり、スーパーミックスが 100rpm 程度低い値であった。60 時間以

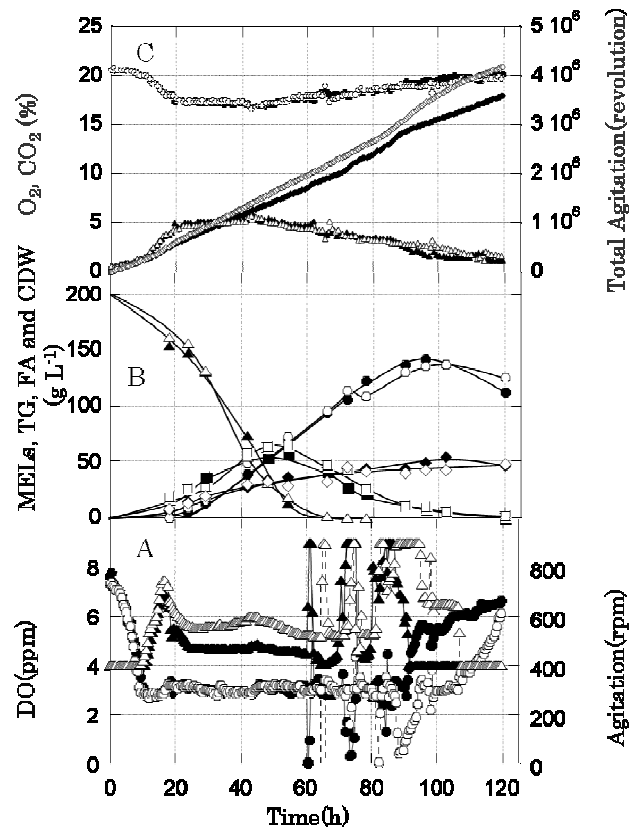


Fig. 6 Time course of cultivation on 3ppm of DO

Symbols are the same as Fig. 5.

降、DO が 3ppm 以下で変動し、DO を上昇させるために回転数が大きく変動した。

DO が大きく変動し始める 60 時間での MELs 濃度は、約 80 g L^{-1} であり、この濃度は、Fig. 3 における粘度が上昇を開始する濃度である。培養液の発泡や粘性の状況は、1ppm の場合と同様であった。

MELs, TG, FA 及び CDW の経時変化は、Fig. 5 と同様の傾向であった。培養は 120 時間まで行ったが、MELs の最高濃度はスーパーミックスで 142.9 g L^{-1} 、タービン翼で 137.2 g L^{-1} であった。この時、TG と FA はほぼ消費し、CDW 濃度は、 49.3 と 42.3 g L^{-1} であった。

排気ガス中の酸素濃度及び炭酸ガス濃度、ならびに攪拌翼の積算回転数は、1ppm と同じ傾向であった。3ppm の設定値においてもスーパーミックスは、タービン翼に比較して低い積算回転数となる経過となった。96 時間での積算回転数は、スーパーミックスで 3.02×10^6 revolution、タービン翼で 3.44×10^6 revolution となり、スーパーミックスが低い値となった。

培養は、スーパーミックス及びタービン翼でそれぞれ 3 回行ったがいずれも同様の傾向であった。

4. DO 設定値 5ppm における培養

DO 設定値を 5ppm、最低回転数を 400rpm として、回転数を調節して培養を行った。培養の経時変化を Fig. 7 に

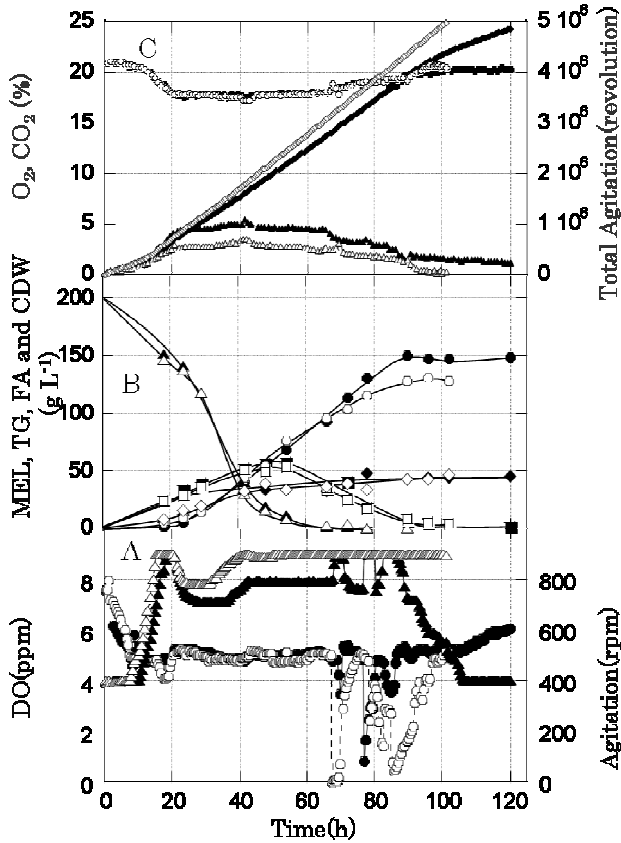


Fig. 7 Time course of cultivation on 5ppm of DO

Symbols are the same as Fig. 5.

示した。1及び3ppmの場合と同様に、時間の経過と共にスーパーミックス及びタービン翼のDOは、次第に減少し、10時間で5ppmに達した後は次第に回転数が増加した。20時間以降68時間まで、回転数はほぼ一定値となり、スーパーミックスが110rpm程度低い値であった。68時間以降、DOが5ppm以下で変動し、DOを上昇させるために回転数が大きく変動した。

DOが大きく変動し始める60時間でのMELs濃度は、Fig. 3における粘度が上昇を開始する濃度である約100g L⁻¹であった。培養液の発泡や粘性の状況は、1及び3ppmの場合と同様であった。

MELs, TG, FA及びCDWの経時変化は、1及び3ppmの場合と同様であった。培養は102と120時間まで行ったが、MELsの最高濃度はスーパーミックスの90時間で148.1g L⁻¹、タービン翼の96時間で131.3g L⁻¹であった。この時、TGとFAはほぼ消費し、CDW濃度は、42.5と43.4g L⁻¹であった。

排気ガス中の酸素濃度及び炭酸ガス濃度、ならびに攪拌翼の積算回転数は、1及び3ppmと同じ傾向であった。5ppmの設定値においてもスーパーミックスは、タービン翼に比較して低い積算回転数となる経過となった。96時間での積算回転数は、スーパーミックスで4.21×10⁶revolution、タービン翼で4.71×10⁶revolutionと

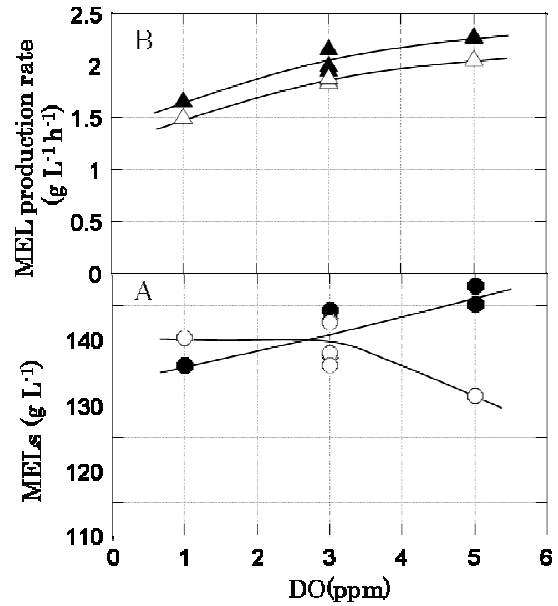


Fig. 8 Influence of DO and stir impeller on MELs production

Symbols : (A) ●, ○, maximum value of MELs ; (B) ▲, △, MELs production rate.

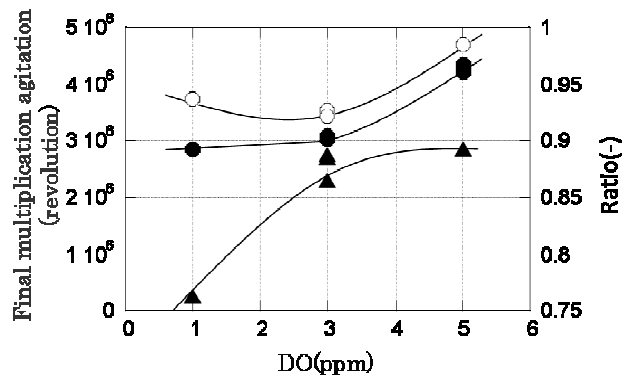


Fig. 9 Influence of DO and stir impeller on the final multiplication agitation

Symbols : ●, ○, total agitation ; ▲, ratio.

なり、スーパーミックスが低い値となった。

培養は、スーパーミックス及びタービン翼でそれぞれ2回行ったがいずれも同様の傾向であった。

5. MELs 生産に及ぼす溶存酸素濃度と攪拌翼の影響

これまでの培養結果を基にMELs生産に及ぼすDOと攪拌翼の形状の影響について調べた。結果をFig. 8に示した。

MELsの最高濃度は、スーパーミックスでは設定DOの増加により上昇した。逆にタービン翼では減少した。MELs生産速度は、いずれの設定DOにおいてもスーパーミックスが高い値となった。さらに、設定DOの増加により、MELs生産速度は次第に増加した。

本研究で最も効率的にMELsを生産できた条件は、スーパーミックスを用いて5ppmの設定DOであった。この条

件での最高 MELs 濃度と MELs 生産速度は、それぞれ 148.1g L^{-1} と $2.28\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ であった。なかでも、MELs 生産速度は、これまでの報告の中で最も高い値である。

タービン翼を対照として、スーパーミックスの省エネルギー性能を以下に示したように積算回転数で評価した。結果を Fig. 9 に示した。

各設定 DO における積算回転数 (1ppm : 120 時間, 3 及び 5ppm : 96 時間) は、タービン翼の 1ppm を除いて設定 DO の増加により増加した。これは通気速度が一定のため高い DO を維持するために攪拌速度を高くすることが求められるためである。さらに、スーパーミックスは、常にタービン翼よりも低い値となった。スーパーミックスの省エネルギー効果を明らかにするために、次式によりスーパーミックスとタービン翼の最終積算回転数の比率を次式により計算した。

$$\text{最終積算回転数の比率} = \frac{\text{スーパーミックスの最終積算回転数}}{\text{タービン翼の最終積算回転数}}$$

Fig. 9 より、1ppm で 24%、3ppm で 14%、5ppm で 11% 程度積算回転数を減少できた。今回は、積算消費電力は測定していないが、積算回転数にはほぼ比例すると考えられ、スーパーミックスが攪拌に要するモーターの消費電力をタービン翼よりも低くできると考えられる。

要 約

通気攪拌型培養槽を用いた MELs 生産菌による MELs 生産において、従来から用いられているタービン翼を対照として、新規形状の攪拌翼 (スーパーミックス) の性能を評価した。

- 1) MELs 濃度が 100g L^{-1} となる培養中期以降、培養液の粘度が急速に上昇した。
- 2) DO は、攪拌翼の回転数を制御することにより培養中期までは設定した数値を維持できたが、中期以降は DO 及び回転数の変動により設定 DO を安定に維持できなかった。
- 3) MELs の最高濃度は、タービン翼では設定 DO の上昇により減少したが、スーパーミックスでは増加し、90 時間で 148.1g L^{-1} であった。
- 4) MELs 生産速度は、各設定 DO において常にスーパーミックスが高く 5ppm で $2.28\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ であった。
- 5) 培養中の回転数及び最終積算回転数は、各設定 DO において常にスーパーミックスが低かった。最終積算回転数の比率は、スーパーミックスが 10% 以上低く抑えられた。

文 献

- 1) Kawashima, H., Nakahara, T., Oogaki, M. and Tabuchi, T., Extracellular production of a mannosylerythritol lipid by amutant of *Candida* sp. from n-alkanes and triacylglycerols. *J. Ferment. Technol.*, **61**, 143-149 (1983).
- 2) Kitamoto, D., Akiba, S., Hioki, C. and Tabuchi T., Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida Antarctica*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 31-36 (1990).
- 3) Kitamoto, D., Haneishi, K., Nakahara, T. and Tabuchi T., Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 37-40 (1990).
- 4) Kitamoto, D., Fujishiro, T., Nakane, T and Nakahara, T., Production of mannosylerythritol lipids by resting cells of *Candida Antarctica*. *Biotechnol. Lett.*, **14**, 305-310 (1992).
- 5) Kitamoto, D., Yanagishita, H., Haraya, K. and Kitamoto, K., Effect of cerulenin on the production of mannosylerythritol lipids as biosurfactant by *Candida antarctica*. *Biotechnol. Lett.*, **17**, 25-30 (1995).
- 6) Kitamoto, D., Ikegami, T., Suzuki, G., Sasaki, A., Takeyama, Y., Idemoto, Y., Koura, N. and Yanagishita, H., Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. *Biotechnol. Lett.*, **23**, 1709-1714 (2001).
- 7) Adamczak, M. and Bednarski, W., Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactant produced by *Candida antarctica*. *Biotechnol Lett.*, **22**, 313-316 (2000).
- 8) Kim, H.S., Jeon, J.W., Kim, B.H., Ahn, C.Y., Oh, H.M. and Yoon, B.D., Extracellular production of glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipids by *Candida* sp. SY-16 using fed-batch cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 391-396 (2006).
- 9) Rau, U., Nguyen, L.A., Schulz, S., Wray, V., Nimtz, M., Roeper, H., Koch, H. and Lang, S., Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 551-559 (2005).
- 10) Rau, U., Nguyen, L.A., Roeper, H., Koch, H. and Lang, S., Fed-batch bioreactor production of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 607-613 (2005).
- 11) Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T. and Kitamoto, D., Discovery of *Pseudozyma rugulosa* NBRC 10877 as a novel producer of the glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipids, based on rDNA sequence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 305-313 (2006).
- 12) Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., Yamamoto, S., Kitagawa, M., Sogabe, A. and Kitamoto,

- D., Identification of *Pseudozyma* graminicola CBS 10092 as a producer of glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipids. *J. Oleo. Sci.*, **57**, 123-131 (2008).
- 13) 玉井正弘, 三好省三, 田村幸吉, 太田雅也, 松浦史登, 糖脂質を生産する酵母の探索, 広島県立西部工業技術センター研究報告, **48**, 32-35 (2005).
- 14) 玉井正弘, 三好省三, 田村幸吉, 太田雅也, 松浦史登, マンノシルエリスリトールリピッド生産に及ぼす炭素源の影響, 広島県立西部工業技術センター研究報告, **49**, 1-4 (2006).
- 15) 玉井正弘, 田村幸吉, マンノシルエリスリトールリピッドの製造方法, 特開 2009-296908 (2009.12.24).