

N-16 細胞外多糖類の生成を抑制する 微細気泡発生装置の開発

○伊藤 司^{1*}・久保田 智²・黒尾 健太²・山崎 隆行²

¹群馬大学大学院工学研究科社会環境デザイン工学専攻 (〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1)

²群馬大学工学部社会環境デザイン工学科 (〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1)

*E-mail: t.ito@gunma-u.ac.jp

1. 研究背景

エアレーションにおける動力の削減や処理性向上は気泡サイズを小さくすることで実現できるため様々な原理に基づく微細気泡発生装置がこれまで報告されている。たとえば高速旋回方式や気液せん断方式や圧力加減方式、超音波方式などがある。これまで報告されているいずれの方式も液体に対してせん断力や圧力や超音波などなんらかの負荷を加えるため、液体が微生物培養液の場合には微生物にダメージを与えてしまい、微生物に対する微細気泡の効果を評価できない。

我々は微生物にストレスを与えずに培養できる、これまでの発生方法とは全く異なる原理による超小型の微細気泡発生装置を開発した。これは従来液体の噴霧に利用されている振動多孔板を用いて、振動板の圧電素子に超音波振動を与えながら微細孔に空気などのガスを通すことにより微細気泡を発生させる振動多孔板を用いた微細気泡発生装置 (Microbubble Generator by an Oscillating Mesh (以降MiBos (マイボス) とよぶ) である。

本研究ではMiBosを用いて微生物を培養すると、膜分離活性汚泥法において膜ファウリングの原因とされる細胞外多糖類の生成を抑制できることを報告する。このことは細胞外多糖類の蛍光染色、細胞増殖、代謝物濃度、細胞の状態、培養液中の分子径分布、気泡径、酸素移動効率など複数の実験結果から総合的に理解することが可能であった。

2. 実験方法

2.1 装置 (MiBos バイオリクター) 概要

装置は反応槽 (容量0.5L)、コンプレッサー、発振機、振動多孔板を用いた微細気泡発生装置 (MiBos) からなる。コンプレッサーからの気体は約100kHzの超音波振動を与えた圧電素子により振動する多孔板を通り微細気泡化される。

2.2 MiBosによるDO制御性と酸素移動効率の評価

DOの制御性は、MiBos バイオリクターとDO計とDOコントローラーを用いて行った。微細気泡と散気球による粗大

気泡を比較し、DO濃度をモニタリングし、DOの変動幅からDO制御性を評価した。またその時の流量を測定した。

酸素移動効率 (以降 E_A) はMiBos バイオリクターを用いて微細気泡を発生させ、DOの時間変化と流量を飽和溶存酸素濃度に達するまで測定し、総括酸素移動容量係数 ($K_L a$) を算出し、この $K_L a$ をもとに求めた。対照として振動を与えず気泡を発生させたもの、散気球で気泡を発生させたものの E_A を算出した。

2.3 MiBos バイオリクターによる大腸菌培養

MiBos バイオリクターを用いた大腸菌K-12株の回分培養を行い、培養中の濁度、DOとDOCを測定した。培地はM9液体培地を用いた。対照系として多孔板に振動を与えずに発生させたやや粗大な気泡による培養、インキュベータ内での振とう培養を行った。培養温度は30℃および37℃で行った。

培養中の大腸菌を採取し、顕微鏡により細胞の状態 (フロックの存在や細胞形態など) を観察し、一方で蛍光レクチンにより細胞外多糖類を染色し、蛍光顕微鏡により観察と撮影を行った。

3. 結果および考察

3.1 MiBos バイオリクターによるDO制御性と酸素移動効率の評価

DO制御実験の結果を図1に示す。散気球ではDOの変動幅が約1~2mg/Lであったのに対し、MiBosでは約0.1~0.5mg/Lであった。またMiBosは1~2ml/minと極めて低流量でありながらDO制御できたが、散気球では20~30ml/min必要であった。MiBos バイオリクターは低流量で微細気泡を多数発生させることができ、気泡の上昇と攪拌により生じる微生物へのせん断力を低減できるといえる。

図2に酸素移動効率 (E_A) を算出した結果を示す。MiBos で得られた E_A は、散気球の約4倍高かった。MiBosは多孔板に振動を与えなくても約50%の E_A が得られたが、多孔板に振動を与えることで70%以上の E_A を得られた。振動多孔板による微細気泡は、比表面積が大きいこと、気泡径が小さく気泡上昇速度も小さくなること、滞留する気

泡も多数存在することから、難溶解性の気体である酸素の溶解効率が高まり、DOの制御性や E_A を向上させたと考えられる。

3.2 MiBosバイオリアクターによる大腸菌培養

MiBosバイオリアクターと振とう培養で大腸菌の最大増殖時における濁度を比較した結果を図3Aに示す。振とう培養では増殖定常時の濁度(OD600)は約1.1であった。MiBosバイオリアクターでは濁度(OD600)は約1.6と、振とう培養より1.5倍高かった。

微生物は基質の消費とともに細胞外へ高分子の代謝物を生成するが、大腸菌培養において細胞外への代謝物を培養液中の残留有機物と細胞表面の細胞外多糖類の蛍光レクチン染色によりMiBos培養と振とう培養の代謝物生成の比較を行った。MiBos培養では残留有機物の生成量が振とう培養の約25%であった(図3B)。また、蛍光レクチン染色の結果、MiBos培養では細胞表面の細胞外多糖類の生成量が振とう培養に比べて極めて少ないという結果が得られた。

培養液を顕微鏡観察すると、振とう培養や振動を与えない振動Offでの培養では細胞の集塊であるマイクロブロックが観察され、定常期以降にさらにブロックが大きくなる傾向が見られたが、一方のMiBos培養では、細胞は対数増殖期から定常期まで全細胞が分散状態にあり、マイクロブロック(細胞の集塊)は認められなかった。また、大腸菌に対するストレス環境下で見られる細胞の伸長もMiBos培養では認められなかった。

以上の結果を総合して考察すると、MiBos培養と振とう培養では細胞のエネルギーの使い方に違いがあるのではないかと考えられた。大腸菌はMiBos培養のときは振とう培養のときに比べて、より多くのエネルギーを細胞増殖に使い、細胞外多糖類の生成に回るエネルギーは少なかったと思われる。細胞外多糖類は細胞の界面への付着や、細胞同士の接着による集合体形成の際に重要な物質であると考えられている。これは増殖のためではなく、環境ストレスに対して抵抗性を高めるためである。その細胞外多糖類がMiBos培養では少なく且つ増殖量が大きく、さらに細胞のブロック化が生じなかったということで、MiBos培養ではストレスが少なく(活性へのマイナス影響が極めて少なく)増殖に適した環境で培養されたと考えられた。細胞外多糖類の生成を抑制するためには微生物へのストレスを軽減する培養が重要であるといえる。

謝辞： 微細気泡発生装置 MiBos の開発にあたり、群馬大学機械システム工学専攻の天谷賢児教授、(株)オプトニクス精密、三立応用化工株のご協力を得ました。ここに記して謝意を表します。本研究の一部は環境省循環型社会形成推進科学研究費補助金、JST A-STEP およびCRESTにより行われました。

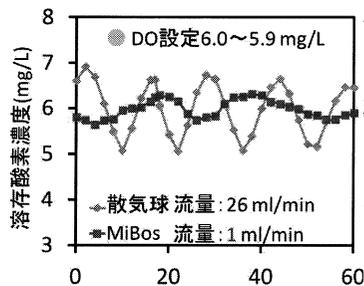


図1. MiBosによるDOの制御性と送気流量を散気球と比較

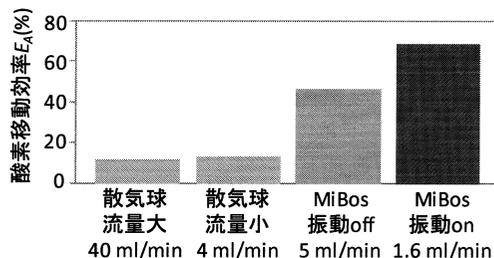


図2. MiBos バイオリアクター、MiBosを用いて振動を与えずに粗大な気泡を発生させた状態、散気球の酸素移動効率および送気流量を比較。数字は送気流量。

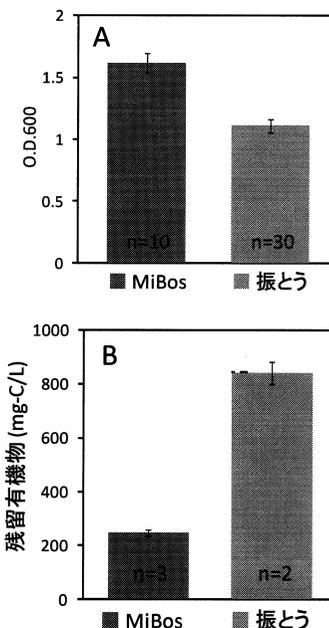


図3. MiBos を用いた大腸菌培養の最大濁度、培養液中の残留有機物濃度を振とう培養と比較。MiBos 培養は振とう培養と比較して培養時の最大濁度が 1.5 倍高く、微生物活性を向上させた(A)。MiBos 培養は残留有機物を振とう培養の4分の1に抑制(B)。