石油醱酵とくにその化学工学的問題

に関する二、三の実験的検討*

合 葉 修 一**・洪 桂 林**

東京大学 応用微生物研究所

緒 言

世界人口の急激な増加に伴う蛋白源の不足を解決する一つの手段として、石油蛋白の研究が近年活発に行なわれている。

これらの研究は主として石油質化菌***の探索¹⁾、菌体の組成²⁾および石油質化に伴う代謝反応³⁾などに関連し、工業装置としての反応槽の設計および操作上必要な化学工学的諸検討に及ぶものは皆無といっても過言ではない。

従来、醱酵原料として広く使用されてきた炭水化物和異なり、石油 (*n*-パラフィン系炭化水素、以下、油と略称する) の水に対する溶解度は小であり、油の微生物による質化反応は固 (微生物)、液 (培地****) および気 (空気) の異相系反応に対比して考えなければならない問題を含んでいる。このような意味から、石油蛋白の製造上、望ましい反応条件を決定するには、単に微生物学的検討のみならず化学工学的研究が必要と考えられる。

筆者らは、油を炭素源とする微生物の回分反応槽に関し、どの程度まで油滴を微粒化する必要があるかについて一つの知見を得た¹⁾。

Table 1 Medium composition

Component	Amount [g]
Oil	1.0 to 41.0 g
<i>n</i> -C ₁₂ H ₂₆	
<i>n</i> -C ₁₃ H ₂₈	
<i>n</i> -C ₁₄ H ₃₀	
<i>n</i> -C ₁₅ H ₃₂	
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	1.5 g
KH ₂ PO ₄	3.5 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.5 g
Yeast extract	0.1 g
Tap water	1,000 ml

* <Some Experiments on Continuous Cultivation of Yeast Cells from *n*-Alkanes>

Received on April 8, 1970

化学工学協会第35年会 (昭和45年4月4日、於東京) にて研究発表

** Shuichi Aiba and K.L. Haung (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo)

*** 石油を炭素源とし、窒素化合物、無機塩類などを栄養源として増殖する微生物をここでは石油質化菌と総称する。

**** 栄養源を含む培養液のことをいう。

本研究の目的は、この石油醱酵の回分反応を連続反応に発展させて微生物の生育環境を時間的に一定に保つことにより、前記の微粒化の条件について、さらに検討を加えることである。微生物の連続醱酵はその反応モデルを作る際に最も理想的な系と考えられるからである。

1. 実験装置および方法

1.1 供試微生物

酵母の一種属 (*Candida guilliermondii*) を使用した。

1.2 培地組成

油 (*n*-パラフィン系炭化水素、C₁₂H₂₆~C₁₅H₃₂の混合物) を炭素源とした。油以外の栄養組成を Table 1 に示す。ただし、供給培地中の油濃度が 10 g/l 以上の場合は、硫安、酵母エキスの濃度をそれぞれ Table 1 の2倍、4倍とし、油以外の制限基質が出現しないように注意した。

1.3 実験装置

酵母の連続増殖反応に使用した実験装置の概要を Fig.

Fig. 1 Schematic diagram of experimental apparatus

Fig. 2 X vs. S_0 for low oil concentration; assessment of Eq. (22), $\delta=0.25$, $r'=0.25$

1に示す。反応槽は円筒型（内径 30cm, 高さ 45cm, ガラス製）であり、内部には 4 枚の邪魔板（幅 3cm）を有し、攪拌翼は標準平羽根タービン型（羽根数 6, 直径 11cm）であり、槽底に設けたスเปージャ（孔数 28, 孔径 1mm）から無菌空気を供給した。

油および油以外の栄養物質は 2 台のプランジャ型ポンプによって別々に供給した。

1・4 連続反応操作

まず回分反応を行ない槽内の菌体濃度*が高くなった後に、油および油以外の栄養物の供給を開始し連続反応を行なった。

反応条件は、液量=8L, 希釈率（平均滞留時間の逆数） $D=0.065\sim0.079\text{hr}^{-1}$, 温度=30°C, 空気吹込速度=0.5vvm (volume of air per volume of medium per min), pH=4, 攪拌速度 $N=660\sim1170\text{rpm}$, 供給液中の油濃度 $S_0=1.23\sim41\text{g/l}$ である。

反応液の酸素濃度はベックマン型酸素電極により測定し、微生物の増殖に対する臨界値（約 1ppm）よりも高いことを確認した。pH の調整には pH 自動記録調節装置を使用し、アルカリ液として 2N の NaOH 溶液を用いた。

一定の時間間隔で排出液中の菌体濃度の概略値を光电比色計（波長=610mμ）を用いて迅速に測定し、この濃度が少なくとも 24~48hr にわたり一定になることを確認して、それぞれの反応条件における定常状態とした。

1・5 菌体濃度測定

定常状態に達した後、採取した反応液（約 200cc）を遠心分離し、菌体と液体を分離した。その際、菌体に着した油を完全に洗浄するために界面活性剤（Scourol）の 0.4% 水溶液を 100cc 加えた。分離した菌体は 105°C

* 単位容積の反応液に含まれる微生物の質量

** S_0 の大きな範囲では、特性式 Eq. (22) に示される菌体濃度 X と S_0 の関係を実験的に検討することを目的とし、排出液中の残存油濃度 S の測定は省略した。

Fig. 3 X vs. S_0 for high oil concentration; assessment of Eq. (22), Data points (triangles) are for $N=880\text{rpm}$

で 24hr 乾燥後、秤量した。

1・6 残存油濃度測定**

採取した反応液およびほぼ等量の n -ヘキサンを分液漏斗に入れてよく振盪した後、静置し、その上澄液を遠心分離して反応液中の残存油を n -ヘキサンで抽出した。抽液液中の油を完全に抽出するために上記の操作を 5 回繰り返して得た抽出液（500~800cc）を 40°C で約 25cc まで濃縮した。そのあと、この濃縮液を吸着カラム（シリカゲル）に通し有機物を除去した。なお、この有機物除去操作に関連してカラムなどに残存する濃縮液を回収するため新たに n -ヘキサンを加えたので、この液を再び 40°C で約 10cc まで減圧濃縮したものを分析用試料とし昇温ガスクロマトグラフで定量分析した。

2. 実験結果

連続定常反応で得た実験結果を Table 2, Fig. 2 および Fig. 3 に示す。同図に示す曲線群については次節で述べる。

Table 2 から、 N , D を一定とした場合、 S_0 を増大すれば排出液中の残存油濃度 S も増大することがわかる。

一般に、水に溶解しやすい炭水化物を炭素源とする微生物反応においては、その炭素源を制限基質（菌体濃度を $X[\text{g/l}]$ としたとき、比増殖速度 $\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$ を一義的に決定する基質）として連続定常増殖反応が行なわれる限り、 S は S_0 に無関係に D によって一義的に決定されるはずであるから、 X と S_0 の関係は直線的であり Fig. 2 のような曲線にならないと考えられる。

Table 2 Experimental data of the continuous cultivation of yeast cells for low oil concentration

N [rpm]	D [hr ⁻¹]	S_0 [g/l]	X [g/l]	S [g/l]	$Y_{x/s}$
660	0.079	3.16	2.34	0.0158	0.67
		4.21	2.64	0.0277	
		5.27	3.14	0.158	
		6.32	3.58	1.10	
880	0.065	1.23	1.08	0.00034	0.74
		2.46	1.98	0.00065	
		3.69	2.98	0.00221	
		4.92	3.52	0.00291	
		6.15	3.61	0.0842	
		7.38	4.25	0.392	
1,170	0.068	3.68	3.09	0.0048	0.78
		6.78	4.39	0.668	

この事実、槽内の油濃度(=S)自体が必ずしも制限基質濃度に対応するとは考えられないことを示唆している。

また、Fig. 2 によれば、 S_0 —一定の場合、菌体濃度は攪拌速度によって変化する。これも、溶存酸素および炭素源以外の栄養物が不足していない限り、水に可溶性な炭水化物(グルコースなど)を用いる場合には見受けられない現象であり、異相系反応に模擬されるべき石油醱酵においては分散相(油)の微粒化の速度が微生物の濃度に顕著な影響を与えると予想される。

3. 理論的考察

油を炭素源として容積Vの攪拌槽において微生物の増殖を行なう。この攪拌槽には油を含む新鮮な培地を一定速度Fで供給し、XとSを含む懸濁液が排出される。油以外の栄養物は十分に存在し微生物の増殖を制限するのは油のみであると仮定する。また、槽内における油滴の分散状態は場所によらないとする。

著者らは、回分培養¹⁾において攪拌速度が大きいほど微生物の比増殖速度が高くなるという結論を得た。すなわち、微生物が消費する油滴は小径のもののみであると推定される。

微生物が資化する最大の油滴質量を m_b とすれば、 m_b より小さい油滴の物質収支は次式で表現される。

$$\begin{aligned} & \frac{d}{dt} \left(\int_0^{m_b} S(t) f(m, t) dm \right) \\ &= \int_0^{m_b} \Gamma(m, t) dm - \int_0^{m_b} \Lambda(m, t) dm \\ & - X(t) \int_0^{m_b} k(m, t) dm \\ & - D \int_0^{m_b} S(t) f(m, t) dm \end{aligned} \quad (1)$$

ただし

$$D \equiv F/V$$

左辺は槽内における質量 m_b 以下の油量の時間的変

化、右辺第1項は m_b より大きい油滴が分裂して m_b より小さい範囲に入ってくる速度、第2項は m_b より小さい油滴が合一してその範囲外へ出る速度、第3項は菌体が油を消費する速度、第4項は槽外へ排出される油の流出速度である。ここでは、攪拌槽へ供給する油滴の質量はすべて m_b 以上であると考ええる。

他方、菌体についての物質収支は次式で表現される。

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x X - DX \quad (2)$$

左辺は槽内における菌体濃度の時間的変化、右辺第1項は増殖速度、第2項は排出速度を表わす。

定常状態では Eqs. (1), (2) においていずれも左辺=0、ゆえに Eq. (2) から

$$\mu_x = D \quad (3)$$

さらに、菌体が油を消費する速度は

$$X \int_0^{m_b} k(m) dm = \mu_x \frac{X}{Y_{x/s}} = D \frac{X}{Y_{x/s}} \quad (4)$$

ただし、 $Y_{x/s}$ は油の資化効率を示し

$$Y_{x/s} \equiv \frac{dX}{-dS}$$

Eqs. (1), (4) から

$$D \frac{X}{Y_{x/s}} = \int_0^{m_b} \Gamma(m) dm - \int_0^{m_b} \Lambda(m) dm - DS^{**} \quad (5)$$

ただし

$$S^{**} \equiv \int_0^{m_b} S f(m) dm$$

S^{**} は微生物が資化する油滴の濃度を示し、かつ増殖に対する制限因子、すなわち、石油醱酵における制限基質濃度と考えられ、その値は μ_x (連続定常状態では D に等しい) によって一義的に決定される。

ところで、液-液系の分散、合一の現象を微視的に考察する際に統計的手法の果たす役割は大きいと考えられ、そのような化学工学的研究^{5,6)} も近年多く見られるが、実際問題として統計的手法をそのままある特殊な系に適用できるまでには至っていないと考えられる。ここでは、一つの方法として、油滴の分散、合一の速度差が油滴の比界面積の関数で表示されると仮定した。すなわち、

$$\int_0^{m_b} \Gamma(m) dm - \int_0^{m_b} \Lambda(m) dm = g(a) = a\alpha^{\delta} \quad (6)$$

ただし

$$\alpha, \delta > 0$$

ここで問題とする油滴は Kolmogoroff の最小乱子より小さいと仮定する。したがって、ここでは Chen²⁾ らの方法にならい、粘性小領域における比界面積と操作条件の関係式を導いた。

さて、槽内の油の容積率を ϕ 、Sauter 平均径を $\bar{d}_s$ とすれば、比界面積は

$$a = 6\phi/\bar{d}_s \quad (7)$$

$$\text{ただし } \phi = S/\rho_s \quad (8)$$

$$\bar{d}_p = \frac{\int_0^\infty d_p^3 P(d_p) d(d_p)}{\int_0^\infty d_p^2 P(d_p) d(d_p)} \quad (9)$$

粒径 d_p の油滴が存在する確率 $P(d_p)$ は

$$P(d_p) = \frac{\left(\frac{\pi}{6} d_p^3 \rho_l \right)}{\pi d_p^3 \sigma} \quad (10)$$

乱流域における流体の単位質量当たりのエネルギーは

$$\chi = \int_{1/\epsilon_p}^\infty E(\epsilon) d\epsilon \quad (11)$$

また、粘性小領域におけるエネルギースペクトル³⁾は

$$E(\epsilon) = \gamma \epsilon^2 \nu^{-1} \epsilon^{-7} \quad (12)$$

撹拌槽内の流体の単位質量当たりのエネルギー消費速度 ϵ は

$$\epsilon = \alpha' n^3 L^2 \quad (13)$$

Eqs. (12), (13) を Eq. (11) に代入して積分すると

$$\chi = \alpha' n^4 L^2 \nu^{-4} d_p^3 \quad (14)$$

Eq. (14) を Eq. (10) に代入すると

$$P(d_p) = \frac{\left(\frac{\alpha'}{6} \right) \cdot N_{W_s} \cdot N_{S_s} \cdot \left(\frac{d_p}{L} \right)^7}{\left(\frac{\alpha'}{6} \right) \cdot N_{W_s} \cdot N_{S_s} \cdot \left(\frac{d_p}{L} \right)^7} \quad (15)$$

Eqs. (9), (15) から

$$\frac{\bar{d}_p}{L} = \alpha'' N_{W_s}^{-1/7} N_{S_s}^{-4/7} \quad (16)^{23}$$

Eqs. (6), (7), (8), (16) から, Eq. (5) は

$$D \frac{X}{Y_{X/S}} = \alpha \left(\frac{6}{\rho_s \alpha'} \right)^{1/4} \left(\frac{1}{L} \right)^{1/4} N_{W_s}^{1/4} N_{S_s}^{4/4} S^3 - DS^{**} \quad (17)$$

無次元数 N_{S_s} , N_{W_s} において n を唯一の操作変数とすれば上式は次のようになる。

$$D \frac{X}{Y_{X/S}} = \gamma' n^{1/4} S^3 - DS^{**} \quad (18)$$

Eq. (18) の右辺第1項は, m_b よりも小さい油滴の生成速度を示し, それは S と n の関数として表わされる。

上式から

$$S = \left(\frac{D}{\gamma'} \right)^{1/3} \left(\frac{X}{Y_{X/S}} + S^{**} \right)^{1/3} n^{-1/12} \quad (19)$$

Eq. (19) によれば, D と n が決まれば, S と X の値はある一定の関係を示す。この関係式をさらに発展させて操作変数 S_0 および n と X の関係式を次に求める。

つぎに, 槽内の油全体について物質収支を取れば

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \mu_X \frac{X}{Y_{X/S}} \quad (20)$$

定常状態では上式の左辺=0 となり, かつ Eq. (3) が成立するから

$$\frac{X}{Y_{X/S}} + S = S_0 \quad (21)$$

Eq. (19) を Eq. (21) に代入すれば

$$\frac{X}{Y_{X/S}} + \left(\frac{D}{\gamma'} \right)^{1/3} \left(\frac{X}{Y_{X/S}} + S^{**} \right)^{1/3} n^{-1/12} = S_0 \quad (22)$$

Eq. (22) は石油醗酵における定常連続操作を代表する特性式と考えられる。すなわち, 同式の右辺は単位容積の供給液中に含まれる油量, 左辺第1項はそのうちで菌体に変化された油量, 第2項は未反応の残存油量を示し, 本式に撹拌速度 n が含まれていることが石油醗酵の大きな特徴である。

本実験では D を低くしたので S^{**} の値は小さくなり, Eq. (22) において $X/Y_{X/S} \gg S^{**}$ となるので以下の考察では S^{**} を無視した。しかしながら, 微生物が消費する油滴は臨界粒子 (質量 m_b) 以下のものであるというモデルを否定するものではない。ただし, D が高い場合には S^{**} を省略することができない。

Eq. (22) において, D および S_0 を一定とした場合, n の増大と X の増大とは対応する。また, Eq. (22) において n を一定とした場合に S_0 を増大すれば X が増大し, その結果 Eq. (19) により S が増大する。すなわち, 微生物が養化する油滴の大きさに上限があるという前提のもとに導いた反応モデルにより, 石油醗酵の特徴が一応説明できると考えられる。

Eq. (19) が示すように, S と X の間には特定の関係が存在するが, 油濃度の測定は抽出, 濃縮などの多くの過程を経て行なうために, 特に濃度の低い場合には誤差が大きいと考えられるので, Eq. (19) からさらに Eq. (22) を求め, 定量の容易な S_0 と X の関係を論ずることにした。しかし, 従来の炭水化物などの醗酵においては S_0 を変化しても S は一定になるが, 石油醗酵では S は S_0 とともに増加する傾向にあり, それを Table 2 に示す。

Fig. 2 および Fig. 3 に示す実線は特性式 Eq. (22) を表わしたもので, 同式中の D , $Y_{X/S}$ の値は Table 2 中のものを採用し, 定数 γ' および δ は S_0 が 10 g/l 以下の実験結果に合うように電子計算機 (HITAC 5020 E) を用いて推定した。Fig. 3 に示す S_0 が 10 g/l 以上の実験結果も特性式が示す前述の傾向と大体において一致する。

結 言

n -パラフィン系炭化水素を炭素源 (制限基質) とする酵母の増殖系を設計し操作する際の要点を, 特に連続定常操作を用いることによって検討し, 次のような結果を得た。

(1) 流系反応槽について油滴の population balance を考察し, かつ, 酵母が養化する油滴の大きさに上限を設けて, 石油醗酵の特性式 Eq. (22) を導いた。

(2) 石油醗酵では供給液中の炭素源 (油) 濃度 S_0

¹ 排出液中の油滴の分布を測定した実験結果などから S^{**} の値を推定すると mg/l のオーダーである。それに対して $X/Y_{X/S}$ は g/l のオーダーである。なお, 詳細は別途報告する予定である。

と菌体濃度 X は Fig. 2 および Fig. 3 のように、直線的対応関係を示さず、この対応関係は Eq. (22) によって与えられ、図中の実線で示される。ただし $S^{**} \ll X/Y_{x/s}$ と考える。

(3) 希釈率 D および回転数 N がいずれも一定の場合、 S_0 の増大に伴い排出液中の油濃度 S が増大する。これは Eq. (22) と Eq. (19) から説明される。ただし同式において $S^{**} \ll X/Y_{x/s}$ と考える。

(4) D および S_0 を一定とした場合、 X は N の関数である。

特性式 Eq. (22) は、連続長期にわたる運転に基づく微生物の変異、その他の微生物学的因子にはいっさい触

れていない。実際には、これらの微生物学的因子をも考慮することが必要なことはもちろんである。

[付 記] ガスクロマトグラフによる油の分析に際しご協力を下さった日本揮発油(株)浜崎実氏、および、ガスクロマトグラフの使用上種々の便宜をはかられたオリエンタル酵母(株)に謝意を表します。

本研究のまとめに際し種々討論を繰り返された理化学研究所遠藤勲氏、川崎重工業(株)平石康博氏ならびにガスクロマトグラフによる油の追加測定に際し協力された本研究室小野寺正幸氏に謝意を表します。

なお、本研究費の一部は文部省の科学試験研究費によったことを付記する。

Nomenclature

a	= oil-medium interfacial area per unit volume of medium	[cm ² /cm ³]	$X, X(t)$	= cell mass concentration	[g/l]
d_p	= oil droplet diameter	[cm]	$Y_{x/s}$	= yield factor, ratio of cell mass produced to oil mass consumed ($\equiv \Delta X / -\Delta S$)	[-]
$\bar{d}_p$	= volume-surface mean (Sauter mean) diameter of oil droplets	[cm]	a, a', a'', a'''	= proportionality constants	[-]
D	= dilution rate ($\equiv F/V$)	[hr ⁻¹]	γ, γ'	= proportionality constants	[-]
$E(\epsilon)$	= turbulent energy spectrum	[cm ³ /sec ³]	$\Gamma(m, t)dm$	= rate at which droplets of mass m to $m+dm$ are produced by breakage of larger droplets than the critical size per unit volume	[g/l·hr]
F	= feed rate	[m ³ /hr]	δ	= power	[-]
$f(m, t), f(m)$	= droplet size (mass) distribution function	[gr ⁻¹]	ϵ	= energy consumed per unit mass of medium per unit time	[cm ² /sec ³]
$g(a)$	= function	[g/l·hr]	κ	= wave number	[cm ⁻¹]
$k(m, t)dm, k(m)dm$	= microbial uptake rate of oil droplets between m and $m+dm$	[hr ⁻¹]	$\Lambda(m, t)dm$	= rate at which droplets of mass m to $m+dm$ are lost through coalescence to the range larger than the critical size per unit volume	[g/l·hr]
L	= impeller span	[cm]	μ_x	= specific growth rate ($\equiv \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$)	[hr ⁻¹]
m	= oil droplet mass	[g]	ν	= kinetic viscosity	[m ² /sec]
m_c	= critical mass of single oil droplets which can be metabolized	[g]	ρ	= medium density	[g/l]
n	= rotation speed of impeller	[rps]	ρ_d	= oil density	[g/l]
N	= rotation speed of impeller	[rpm]	σ	= interfacial tension between oil droplet and medium	[g/sec ²]
N_{We}	= Weber number ($\equiv \rho n^2 L^3 / \sigma$)	[-]	ϕ	= volume fraction of oil	[-]
N_{Re}	= Reynolds number ($\equiv nL^2/\nu$)	[-]	χ	= energy derivable from unit mass of turbulent medium	[cm ² /sec ³]
$P(d_p)$	= probability of appearance of d_p	[-]	Ψ	= function	[-]
$S, S(t)$	= oil concentration in effluent	[g/l]			
S_0	= oil concentration in fresh medium	[g/l]			
S^{**}	= limiting substrate concentration ($\equiv \int_0^{m_c} S f(m) dm$)	[g/l]			
t	= time	[hr]			
V	= working volume of reactor vessel	[m ³]			

Literature cited

- 1) Aiba, S., K. L., Haung, V. Moritz and J. Someya: *J. Ferment. Technol.*, **47**, 211 (1969)
- 2) Chen, H. T. and S. Middleman: *A. I. Ch. E. Journal*, **13**, 989 (1967)
- 3) Hinze, J. O.: *Turbulence*, 194 (1959)
- 4) Kester, A. S. and J. W. Foster: *J. Bacteriol.*, **85**, 859 (1963)
- 5) Madden, K. J. and G. L. Damerell: *A. I. Ch. E. Journal*, **8**, 233 (1962)
- 6) Miller, T. L. and M. J. Johnson: *Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 549 (1966)
- 7) Shio, I., H. Iizuka, Ishii, R. and N. Katsuya: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **2**, 23 (1963)
- 8) Valentas, K. J. and N. R. Amundson: *Ind. Eng. Chem., Fundamentals*, **5**, 533 (1966)