

氏 名	山 根 恒 夫
	やま ね つね お
学 位 の 種 類	工 学 博 士
学 位 記 番 号	論 工 博 第 664 号
学位授与の日付	昭 和 49 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	液状ノルマルパラフィンを用いる微生物培養の速度論
論文調査委員	(主 査) 教 授 吉 田 文 武 教 授 永 田 進 治 教 授 福 井 三 郎

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は液状 *n*-パラフィンを基質とする微生物培養の速度論を生物化学工学の立場から研究した結果をまとめたもので、緒論、第1篇（炭化水素醗酵の速度論，6章），第2篇（炭化水素醗酵に関連したガス吸収，2章）からなっている。

緒論では炭化水素を用いる微生物培養に関する工学的な問題点と本研究の目的を述べている。

第1篇第1～第6章では液状炭化水素を用いる微生物培養の速度論的研究を，微生物がどういう形で炭化水素を取り込むかを解明することを主たる目的として，行った結果がまとめられている。

第1章では微生物による炭化水素の取り込み機構に関する既往の研究を整理，紹介し，問題点を示している。液状炭化水素は水溶液培地に難溶であるため，一般に行われているのは二液相培地を用いる培養，すなわち水溶液培地中に液状炭化水素を油滴として分散し，微生物は水溶液中で増殖させる方法であるが，この場合微生物が炭化水素を取り込む機構は，(A)油滴との直接々触によるか，(B)水溶液相中に僅かに溶けた炭化水素を取り込むか，(C)水溶液中に含まれる炭化水素の極めて小さい粒子，いわゆるサブミクロン粒子を取り込むかについて従来種々の仮説が行われていたが，いずれも実験的証明を伴わず，この点を解明することが，本研究の主目的の一つであった。

第2章では回転円板型醗酵槽中の炭素基質を含まない水溶液培地に，空気中に含ませた炭素数9～18位の *n*-パラフィンの蒸気を連続的に吸収させて，酵母 *Candida tropicalis* を培養し，炭化水素の液相が存在しなくとも，この微生物は十分増殖し得ること，さらにその場合の比増殖率は油水二液相培地を用いた振盪培養の場合の比増殖率とよく一致することを示し，このことから油滴と微生物との直接々触による炭化水素の取り込みは無視し得ると推論している。しかし，水溶液培地中の炭化水素の溶解度と拡散係数から計算すると，分子状に溶解した炭化水素のみで，得られた増殖速度を説明することは難かしく，いわゆるサブミクロン微粒子として水溶液培地中に含まれるパラフィンを酵母が取り込む可能性がある」と論じ，その傍証として，孔径 0.8μ のメンブランフィルターを通り 0.1μ のフィルターを通らない *n*-ヘキサデ

カン含有水を分析したところ、溶解度の10倍以上に *n*-ヘキサデカンが含まれていることを見出した。

第3章は第2章で得られた定性的な結論をさらに確かめるため炭素源を含みぬ水溶液培地を入れた攪拌機付培養槽に、別に *n*-ヘキサデカンを超音波処理して、 0.5μ 以下のサブミクロン微粒子として水の中に分散したエマルションを連続的に供給する半回分培養（流加法）によって、*Candida tropicalis* を培養した結果を述べている。この場合、培地中の *n*-ヘキサデカン濃度は通常の二液相炭化水素醗酵に比べると著しく低かったが、実験結果を整理したところ、増殖が基質の供給によって律速される直線増殖期の菌体収率は、基質の供給が十分な指数増殖期の約2倍であった。この収率の変化を考慮し、かつ培地中のエマルション状基質の濃度と比増殖率との間に、第5章で述べる Monod 式が成立するとして、基質の収支式と増殖速度式を連立させて、半回分培養をシミュレートし、実験結果と良好な一致をみた。

第4章は半回分培養から連続培養への切り換えの最適条件に関する理論と実験である。著者は基質の収支式に基いて、半回分培養から連続培養への切り換えを遷移期なしに円滑に行うための三条件を導き、それを *n*-ヘキサデカンのサブミクロンエマルションを供給する *Candida tropicalis* 培養実験の結果に適用して、それらの条件が正しいことを実証した。

第5章では培地中の炭化水素のサブミクロン微粒子の濃度と微生物の増殖速度との間の定量的な関係を求めるために、前章と同じ系について行ったケモスタット形式の連続培養について述べている。この実験の結果から、液状炭化水素基質がサブミクロン微粒子である場合にも Monod の式が成立することを知り、この系の飽和定数 K_s を 0.109 g/l と定めた。また菌体収率は希釈率（比増殖率）によって著しく変化することがわかった。

第6章では微生物を含む水溶液培地中に含まれる炭化水素のサブミクロン微粒子の大きさと濃度を知るために、著者が開発した濾過と抽出を用いる分別定量法について述べ、さらに炭化水素の油滴を含む通常の二液相培地を用いて *Candida tropicalis* の回分培養実験を行い、著者の方法を用いて定量した水溶液培地中に含まれる炭化水素のサブミクロン微粒子の濃度と比増殖率の間の関係は前章の実験で得た油滴が存在しない場合の関係と同じであることを知った。この事実は二液相培地を用いる通常の培養においても菌は水溶液培地中のサブミクロン微粒子のみを取込むことを示すもので、極めて重要な結果である。

第2篇は炭化水素醗酵に関連した酸素ガスの吸収についての研究結果を述べている。

第1章は油水エマルションへの酸素吸収速度に関する実験結果について述べている。一般に液状炭化水素を用いる醗酵では炭化水素は水溶液培地中に油滴として分散されるが、このような油水二液相混合物への酸素の吸収の液相容量係数 k_{La} が単なる水溶液への酸素吸収の k_{La} とどう変るかについては従来ほとんど研究がなかった。著者は通気攪拌槽を用いて、ケロシン、流動パラフィン、トルエン、オレイン酸等を分散相、水を連続相とする二液相混合物への酸素の吸収を、これらに界面活性剤を加えた場合も含めて、実験した。その結果ケロシンや流動パラフィンを水の中に分散したの系のように拡がり係数が負で、油滴が気泡の表面上にレンズ状に浮く系では k_{La} は油の分率の増加につれて減少するが、トルエンやオレイン酸を水の中に分散したの系のように拡がり係数が正の系では、 k_{La} は油の分率とともに一旦減少した後再び増加した。界面活性剤の添加の影響もこれに似ていた。著者はこれらの結果について定性的な考察を加えた。

第2章は第1篇第2章の培養実験に用いた回転円板型気液接触装置を用いて酸素を水に吸収させる場合の理論と実験結果を述べている。この型の装置に関する研究は従来全く行われていない。表面が滑らかな円板の表面の液相物質移動係数 k_L は滲透説から導いた理論値よりやや低かったが、適当なメッシュの全網製円板を用いた場合は、気液接触時間が0.2~1.5秒のとき、 k_L は理論値とよく一致し、この型の装置がガス吸収の基礎研究にも有用であることを示した。

論文審査の結果の要旨

液状 *n*-パラフィン炭素源とする微生物の培養については、いわゆる石油蛋白の製造にも関連して、微生物学や応用生化学の立場からは多くの研究がなされたが、生物化学工学的な面では、種々の未解決の問題が残されていた。この種の醗酵が通常の糖質炭素源を用いる醗酵と著しく異なる点は、炭素源である液状パラフィンは水溶液培地にほとんど不溶であるため、二つの液相が存在することである。水溶液中に生存する微生物が液状炭化水素をどういう形で取り込むかについては、(A)微生物が油滴との直接々触によってそれを取り込む (B)水溶液中に僅かに溶けた炭化水素を取り込む (C)水溶液に含まれる炭化水素の極めて微細な、いわゆるサブミクロン粒子を取り込むなどの各種の仮説があったが、いずれも実験的に証明されていなかった。また二液相培地へ通気する場合の酸素の吸収速度もほとんど研究されていなかった。

著者の研究は極めて独創的な各種の手法を用いて、これらの諸問題を解明したもので、得られた成果は次の通りである。

(1) 回転円板型醗酵槽内の水溶液培地中へ *n*-パラフィンの蒸気を連続的に吸収させ、炭化水素の液相が存在しない状態で酵母 *Candida tropicalis* を培養し、その比増殖率は通常の二液相培地を用いた場合と等しいことを認め、このことから微生物と油滴との直接接触による炭化水素の取り込みは無視できると推論した。さらに、この場合の比増殖率は水溶液培地中の炭化水素の溶解度と拡散係数からは説明できないことや、水溶液培地中に溶解度以上に炭化水素が定量されたことから、微生物が炭化水素のサブミクロン粒子を取り込む可能性を示唆した。

(2) *n*-ヘキサデカンの0.5ミクロン以下のいわゆるサブミクロン微粒子のエマルジョンを攪拌式醗酵槽の水溶液培地中へ連続供給する半回分(流加)方式により *Candida tropicalis* を培養し、炭化水素のサブミクロン粒子は有効な基質であること、また増殖が基質の供給によって律速される直線増殖期の菌体収率は基質が十分に存在する指数増殖期のその約2倍であること、さらに半回分培養中の経過が導いた数式モデルとよく一致することを示した。

(3) *n*-ヘキサデカンのサブミクロン粒子も水溶液培地も連続的に供給するケモスタット方式により、*Candida tropicalis* の連続培養を行い、基質のサブミクロン粒子の濃度と比増殖率との間に Monod 式が成立することを知り、その飽和定数を定めた。また菌体収率は比増殖率によって著しく変ることを知った。

(4) 二液相培養の場合の水溶液培地中に含まれる炭化水素のサブミクロン微粒子を分別定量する方法を開発し、前項の Monod 式は従来の二液相培養における水溶液培地中の炭化水素のサブミクロン粒子の濃度と比増殖率との関係にも適用できることを確かめた。さらにこのことから二液相が存在する場合でも、微生物は水溶液培地中の炭化水素のサブミクロン粒子を取り込むことにより増殖すると結論した。

(5) 前記(3)の連続培養の開始は半回分培養から連続培養に切り換えるという方式で行ったが、このような場合に、遷移期なしに定常状態に移行させるための操作条件を理論的に求め、実験の結果がよく理論と合うことを示した。

(6) ケロシン，流動パラフィン，トルエンおよびオレイン酸を水の中に分散したエマルションへの酸素吸収実験を行い，液相容量係数 $k_L a$ は，油の分率が増すにつれ，負の広がり係数を有する系では単調に減少し，正の広がり係数を有する系では一旦減少した後再び増大することを知り，その原因について定性的な解釈を下した。

(7) 回転円板型気液接触装置（醗酵槽）における水への酸素吸収に関する実験と理論的考察を行い，適当な金網製円板を用いるときは，円板上の液相物質移動係数は滲透説から導いた理論値とよく一致することを示した。

以上要するに本論文は液状炭化水素を用いる醗酵における微生物の増殖速度に関連した従来未解決であった幾つかの生物化学工学的問題を各種の独創的な実験手法により解明し，理論的考察をも行ったもので，学術上はもちろん工業上も寄与するところが少なくない。

よって，本論文は工学博士の学位論文として価値あるものと認める。