

DA
1480
1995
HG

ビタミンB₁₂生産のための
プロピオン酸菌の高密度培養プロセスの開発

筑波大学大学院
農学研究科
応用生物化学専攻

中野 和典

寄贈	
中野	平成
和典氏	年
	月
	日

96004894

目 次

緒論	1
第1章 生産物分離を伴う培養に関する既往の研究	4
1-1 膜分離の利用	4
1-1-1 膜分離の特性	4
1-1-2 培養における膜分離の利用	5
1-1-3 ファウリングのメカニズム	6
1-1-4 膜面の掃流によるファウリングの抑制効果	7
1-1-5 逆洗によるファウリングの抑制効果	9
1-1-6 電場によるファウリングの抑制効果	10
1-1-7 微生物の高密度培養への応用	10
1-2 溶媒抽出による培養液からの生産物の分離	14
1-2-1 溶媒抽出の利用	14
1-2-2 溶媒抽出による有機酸の分離	15
1-2-3 溶媒抽出を利用した培養と問題点	16
1-3 吸着による培養液からの生産物の分離	18
1-3-1 吸着による発酵生産物の回収	18
1-3-2 吸着を利用した培養	21
第2章 回転型セラミック膜分離装置のろ過特性とこれを用いた高密度培養の可能性	23
2-1 序	23
2-2 回転型セラミック膜分離装置の仕様	25
2-3 回転型セラミック膜分離装置のろ過特性	28
2-3-1 ろ過抵抗の測定理論	28

2-3-2	実験材料および方法	31
2-3-3	結果および考察	34
2-4	回転型セラミック膜分離装置を用いたリジン発酵	46
2-4-1	実験材料および方法	46
2-4-2	結果および考察	49
2-5	結論	51
第3章	回転型セラミック膜分離装置によるプロピオン酸菌の灌流培養	52
3-1	序	52
3-2	実験材料および方法	53
3-3	結果および考察	59
3-3-1	プロピオン酸菌の流加培養	59
3-3-2	プロピオン酸菌の灌流培養	59
3-3-3	逆洗を伴ったプロピオン酸菌の灌流培養	62
3-3-4	灌流培養の問題と改善策	70
3-4	結論	71
第4章	プロピオン酸除去方法の選定	73
4-1	序	73
4-2	抽出溶剤の選択	74
4-2-1	抽出溶剤の条件	74
4-2-2	実験材料および方法	74
4-2-3	結果および考察	76
4-3	吸着剤の選択	78
4-3-1	吸着剤の条件	78
4-3-2	実験材料および方法	78
4-3-3	結果および考察	80

4-4	結論	91
第5章	活性炭によるプロピオン酸除去システムに関する基礎的研究	92
5-1	序	92
5-2	活性炭に対する有機酸の吸着等温線	94
5-2-1	実験材料および方法	94
5-2-2	Langmuir式についての理論	94
5-2-3	結果および考察	95
5-3	活性炭に対する酢酸およびプロピオン酸二成分系の吸着平衡式	107
5-3-1	二成分系吸着平衡式の理論	107
5-3-2	実験材料および方法	108
5-3-3	結果および考察	108
5-4	活性炭の粒内表面拡散係数	111
5-4-1	粒内拡散係数の測定理論	111
5-4-2	実験材料および方法	117
5-4-3	結果および考察	117
5-5	活性炭カラムの破過曲線	121
5-5-1	破過曲線の理論	121
5-5-2	実験材料および方法	134
5-5-3	結果および考察	134
5-6	活性炭の再生	144
5-6-1	実験材料および方法	144
5-6-2	結果および考察	146
5-7	結論	148
第6章	活性炭によるプロピオン酸除去を伴ったプロピオン酸菌の 高密度培養	150

6-1 序	150
6-2 実験材料および方法	150
6-3 結果および考察	155
6-4 活性炭カラムを用いた灌流培養システムの問題点	158
6-5 結論	160
第7章 総括	161
Appendix 1. 粒内拡散係数の計算プログラム	169
Appendix 2. 単成分系における破過曲線の計算プログラム	171
Appendix 3. 二成分系における破過曲線の計算プログラム	174
付記	178
謝辞	180
参考文献	181

緒 論

微生物による有用物質の発酵生産を効率良く行うためには、有用物質の比生産速度を低下させることなく菌体濃度をできるだけ高めることが重要である。しかし、発酵生産においては、しばしば生産物による微生物の増殖阻害が起り、従来の回分および流加操作による発酵では効率的な発酵生産が行えない場合が多い。このため、発酵における生産物阻害を回避するために多くの研究がなされてきた。膜分離を用いた灌流培養システムがその一つとして挙げられるが、未解決の問題も多く残されている¹⁻¹⁸⁾。

灌流培養は、新鮮培地を連続的に供給する一方で膜分離によって菌体をリアクター内に保持しながら培養液を抜き取る培養法である。この方法で増殖阻害物質濃度を低く保つためには、多量の新鮮培地の供給を必要とし、供給した新鮮培地と同等の多量の培養廃液が生じる。また、菌体濃度の増加とともに稀釈率を高くすることが必要となり、リアクター内での基質の滞留時間が短くなるため、基質の利用効率も低下する¹⁻⁵⁾。さらに、高い稀釈率のもとでは、膜のファウリングが生じ易くなるなどの問題も生じる⁴⁻¹¹⁾。

本論文は、このような灌流培養における問題を解決し、生産物阻害を伴う微生物の高密度培養を効率的に行う為のプロセス開発を目的として実験的研究を行ったもので、7章からなっている。

第1章では、本研究の意義を明確にするため、分離を伴う培養に関する既往の研究として、膜分離、溶媒抽出および吸着に焦点を絞り、それぞれの分離法の特徴および現状、また培養に応用する際の問題点について紹介した。

第2章では、膜分離を利用した高密度培養に用いることを目的として、ファウリングに強いと考えられる回転型セラミック膜分離装置を試作した。この装置の基礎データを得るために、培養を想定した条件下で過実験を試みた。実際の培

養系では、菌の好気性、嫌気性によらず培養液中に酸素、窒素および二酸化炭素等の気泡が存在する。しかし、これまでにろ過において培養条件を考慮して気泡の影響について検討した報告例は少なく、特に回転型ろ過装置を用いた場合の報告例に関しては見あたらない。このため、通気系及び無通気系においてパン酵母懸濁液を用いたろ過実験を行い、気泡のろ過速度に及ぼす影響について検討を行った。また、回転型セラミック膜分離装置の実用性を確認するために、生産物阻害を伴う発酵の一つである野性株の *Corynebacterium glutamicum* を用いたリジン発酵に回転型セラミック膜装置を用いて高密度培養を行うことを試みた。

第3章では、生産物阻害を伴う微生物の高密度培養プロセスの開発として、プロピオン酸菌の一種で、ビタミン B₁₂ 生産菌の一つとして用いられている *Propionibacterium freudenreichii* の高密度培養を効率的に行うプロセスの開発に着手した。本菌の培養においては、副生産物として分泌される酢酸およびプロピオン酸が菌の増殖を阻害するため、従来の回分および流加培養では、高い菌体濃度を得ることは困難であった¹⁹⁾。そこでこれらの有機酸による増殖阻害を低減するために、回転型セラミック膜分離装置を用いた灌流培養を行った。

第4章では、第3章で明らかになった灌流培養の問題点（未利用の基質を含む多量の培養廃液が生じる点）を改善するために、増殖阻害物質を培養ろ液から選択的に除去する方法について検討を行った。菌に対する毒性の強いプロピオン酸を除去する方法として溶媒抽出法および吸着法が考えられ、これらについて比較検討を行った。

第5章においては、第4章の結果より選定された活性炭に関して、吸着特性および活性炭によるプロピオン酸除去システムの確立に必要なカラム交換時期の予測について検討を行った。中性条件下での活性炭による有機酸の吸着のメカニズムについては不明な点が多い。本論文では、有機酸の吸着機構が解離型と非解離型の有機酸では異なると考え、有機酸を解離型と非解離型に分けて整理し、それ

その吸着特性について検討を行なった。また培養液中には酢酸およびプロピオン酸が含まれており、吸着性が似ている点から一方を無視して吸着平衡を整理することはできないと考えられた。そこで単成分系だけでなく、二成分系の吸着平衡式についても検討を行った。培養系におけるプロピオン酸除去システムとして活性炭充填カラムを用いるためには、カラムが吸着飽和に達する時期を知る必要がある。このため、パーソナルコンピューターによる数値計算プログラムを作製し、活性炭カラムの破過曲線をシミュレートすることを試みた。またカラム出口の pH の変化に着目し、これをモニタリングすることによってカラムの交換時期を判断することを試みた。最後に活性炭の再生法についての検討を行った。

第6章では、プロピオン酸菌の灌流培養に活性炭カラムによるプロピオン酸除去システムを組み入れて、低い稀釈率により高密度培養を行うことを試みた。これによって得られた結果を、活性炭カラムを用いない従来の灌流培養での高密度培養の結果と比較し、プロピオン酸除去システムを導入した高密度培養プロセスについてその有効性および問題点に関して考察を行った。

第7章では、結論を兼ねて本研究の総括を述べた。

第1章 生産物分離を伴う培養に関する既往の研究

微生物の培養においては、しばしば代謝産物による増殖阻害が見られ、これが発酵における生産性を低下させる原因として問題となってきた。増殖阻害を軽減するためには、培養液から阻害物質を除去する操作が必要である。増殖阻害物質が有用物質であれば、この操作は生産物の分離精製プロセスの第一段階としても有効な操作となり重要である。これまでに発酵の生産性の改善および生産物の分離回収手段として、増殖阻害物質除去に関して様々な試みがなされてきた。この章では、その中から膜分離、抽出、吸着を利用した研究について紹介する。

1-1 膜分離の利用

1-1-1 膜分離の特性

膜分離とは、膜に存在する細孔によるふるい分けによって、溶質分子を溶媒分子から分ける操作である。このような膜の作用は、生物体内の至るところで行われており、これが物質の分離手段としてきわめて有効なものであることは古くから知られていた。それにもかかわらず、その本格的な応用が遅れていたのは、もっぱら適当な性質を備えた膜が人工的に得られなかったためである。膜分離の起源は、1854年に Grahamがぼうこう膜による透析現象を見出したことにさかのぼる。1950年代に海水脱塩の研究が始まり、逆浸透法が開発されたことをきっかけに膜材料の開発が活発になり、優れた特性を持った膜が作られるようになった。それに伴い膜分離の応用分野は、急速に拡大してきた²⁰⁾。様々な分離法の中で膜分離が求められる理由は、膜分離が相変化を伴わない分離法であることである。処理物質が生化学物質である場合、熱変性が問題となることが多いが、膜分離は加熱操作によらないため処理物質の熱変性の心配がない。また、加熱操作によら

ないため、所用エネルギーの少ない分離法でもある。現在膜分離は、海水脱塩をはじめとして、食品、化学、医薬品工業や廃水処理等、様々な分野で利用されている²¹⁾。

1-1-2 培養における膜分離の利用

微生物による有用物質の生産においては、菌体濃度をできるだけ高くし、比生産速度を高く保つことが生産性を高める手段として重要である。通常の回分培養においては、栄養源の枯渇やしばしば見られる代謝生産物の蓄積による増殖阻害などによって高い菌体濃度が得られない。したがって、生産物が菌体内に蓄積されるため高い菌体濃度が望まれるような発酵には回分培養は適していないと言える。これらの問題を乗り越え、高い菌体濃度を得るために流加培養²²⁻²⁴⁾や反復回分培養^{1, 24, 25)}が行われてきた。しかし、流加培養は基質を断続的に加えることで栄養源の枯渇を防ぎ発酵期間を延長するものであるため、生産物による阻害が強い場合には生産性の改善はあまり期待ができない。一方反復回分培養においては、菌体の分離に膜を利用するなどして培養液を入れ換える操作を行うため生産物阻害を防ぐのには有効であるが、操作が煩雑で雑菌汚染の危険性の高い点が問題であると言える。

これらの非連続的な培養に対し、連続的な培養法である灌流培養は生産物阻害が存在する発酵に適していると考えられる。膜分離を用いた灌流培養は、基質を連続的に供給する一方で膜分離によって菌体をリアクター内に保持しながら培養液を連続的に抜き取る培養法である。灌流培養が生産物阻害が存在する培養に適していると考えられる根拠は、基質を連続的に加えることにより栄養源の枯渇を防ぐためだけでなく、増殖阻害物質を洗い流す効果が期待できるためである。また、生産物が菌体外に放出される場合には生産物の分離回収が同時に行える培養法としても期待され、検討が行われてきた¹⁻¹⁷⁾。

微生物を用いた灌流培養においては、一般的に微生物は通さない程度の孔径を有する精密ろ過膜によってろ過が行われている。このため、用いる膜の性質や問題点が、そのまま培養の生産性に大きな影響を及ぼす重要な要素となる。近年の製膜技術の進歩により、高性能な膜が生産されるようになったが、膜分離の欠点が無くなったわけではない。膜分離の欠点は、ファウリングが起ることである。ファウリングによりろ過が不可能になった場合、無菌操作を必要とする培養においては、膜を交換することは容易ではなく、培養を中断することを余儀なくされる^{4,6,10)}。また培養における生産性は稀釈率に支配されることが多い。このためファウリングによって稀釈率が制約される場合には、培養における生産性も制限されることになる^{4,5,9,11)}。膜分離は廃水処理等へも応用されている^{12,26-30)}。廃水処理においては、膜がどれだけ長期間のろ過操作においてファウリングを起こさず耐えられるか否かが重要な要素である。これらのことから膜分離においては、膜のファウリングを如何に抑制するかが重要な検討課題とされ研究されてきた。ファウリングを抑える手段を確立するために様々な研究がなされ、それが高密度培養にも応用されている。以下にその概要について述べる。

1-1-3 ファウリングのメカニズム

ファウリングの原因は、膜面に形成されるゲル層やケーキ層によるものと膜細孔の目詰まりによるものの二つに分けられる^{26,27,29-31)}。ろ過においては、ろ過に伴って懸濁物質が阻止され膜面付近に蓄積するため、膜面付近の懸濁物質濃度が上昇する濃度分極現象が起る^{18,32,33)}。この現象により膜細孔に最も近い膜面上は懸濁物質濃度が極端に高くなるため、その結果ゲル状またはケーキ状に懸濁物質が形成されて、ゲル層やケーキ層が生じると考えられている。また濃度分極現象により浸透圧が増加して実質的なろ過圧力が低下することも透過流束を減少させる要因となる³³⁾。これに対し膜細孔の目詰まりは、膜の細孔径よりも小さ

い物質が原因で起る。菌体分離膜として使用される膜は精密ろ過膜であるが、ケーキ層によるダイナミック効果^{26-30,33)}がある場合の目詰まりの原因は、限外ろ過と同様で菌体破碎による微小な菌体の破片や菌体由来の蛋白質であると考えられている^{34,35)}。これらのファウリングのメカニズムは、膜細孔径が異なる膜を用いた実験によって説明されている^{26,31)}。清水らは、0.05～1.6 μmの細孔径を持つ4種類の管状アルミナ膜を用いてろ過実験を行い、孔径が小さい膜ではケーキ層抵抗が大きくなり、また孔径が大きい膜では目詰まり抵抗が大きくなる結果を得ている³¹⁾。このことは、孔径が小さいと膜によって阻止される物質による濃度分極現象が起き易くケーキ層が形成され易くなるためケーキ層抵抗が大きくなり、一方、孔径が大きいと膜細孔を通過する物質が多くなるために目詰まりによる抵抗が大きくなることを示している。

1-1-4 膜面の掃流によるファウリングの抑制効果

膜面に生じるケーキ層やゲル層を防ぐ手段として、膜面を液体のせん断応力で掃流する方法が採用されている。与えるせん断応力が大きいほどケーキ層やゲル層の成長が抑えられ、ろ過速度が大きくなることが様々なろ過法で実証されている^{13,26,36-38)}。その代表的な方法は、クロスフローろ過である。クロスフローろ過とは、膜透過方向に対して直角方向に高流速で懸濁液を流して膜面に生じるせん断応力を利用し、ケーキ層やゲル層の形成を防ぐろ過法である。細孔径の異なるセラミックを用いて、透過流束に対するクロスフロー液流速の影響について検討した結果が報告されている^{26,27,31)}。これらの研究により、高い液流速の場合、小さい細孔径の方が高い透過流束が得られることが分かっている。これは高い液流速では、ケーキ層形成が抑制され、ケーキ層によるダイナミック効果が減少し、その結果細孔径が大きな膜ほど細孔の目詰まりが生じるためである。

一方、長時間のろ過や懸濁物質濃度によっては、クロスフローろ過を用いても

ケーキ層やゲル層は完全には除去されない。このため、クロスフローろ過におけるケーキ層除去性能改善のための試みもなされている。Imasakaらは、メタン発酵における菌体濃縮にセラミック膜を用いて、気-液二相および気-液-固三相でのクロスフローろ過を行った²⁸⁾。そして気泡や固体粒子が、ケーキ層除去性能の改善に有効であることを報告している。しかし同時に、気泡や固体粒子を懸濁液に混入させると、混入させなかった場合よりも最終的に透過流束が減少したことも報告している。これは過度なケーキ層の掃流によりケーキ層によるダイナミック効果がなくなり、目詰まりが促進されるためと考えられた。精密ろ過の場合、ケーキ層は自己防御ダイナミック膜として働き、微粒子を阻止して膜細孔の目詰まりを防ぐと考えられている。このようなダイナミック効果を用いると、精密ろ過膜によっても限外ろ過に匹敵する分離を行なうことができることも報告されている³³⁾。このようなことから、ケーキ層を自己防御ダイナミック膜として働ける程度残して、膜細孔の目詰まりを防ぐことが重要であると考えられている^{26-30, 33)}。

通常のカロスフローろ過は膜を固定した状態で行なわれてきたが、円筒型の膜を回転させて、膜面に生じるテイラー渦流によるせん断応力を利用して、ケーキ層やゲル層の形成を防止する方法が検討されてきている^{36, 37, 39-41)}。これらの方法においては、テイラー渦流によってケーキ層はほとんど掃流されるので、膜の目詰まりが主なる過抵抗となっていると考えられている。この目詰まりを防ぐ手段として、周期的なダイナミックろ過法が報告されている。村瀬らは、ろ過を行なう時は膜を静止させてケーキ層が生じるダイナミックろ過を行い、周期的にろ口を閉めてろ過が起らない状態にして膜を回転させ、ケーキ層を除去する方法を用いた⁴⁰⁾。この方法により、粘着性が大きく従来ケーキ層を十分に掃流できなかった難ろ過性スラリーのろ過速度をかなり改善できるとしている。また、テイラー渦流によるせん断応力を利用したろ過は、血しょう分離に有効であることが

報告されている⁴¹⁾。血しょう分離においては、赤血球が破壊されることを避けねばならない。赤血球の溶血は、医療において様々な弊害をもたらすためである。テイラー渦流によるボルテックスを利用すると、せん断応力によりケーキ層の形成を防ぐと同時に、赤血球の破壊も避けることができる。このため、溶血を起こさないで高い透過流束が得られる血しょう分離器として実用化が試みられている。

また、円盤型の膜を回転させて膜面に生じるケーキ層やゲル層を掃流するろ過方法が検討されている^{42,43)}。従来のクロスフローろ過では、高流速を生み出すための循環ポンプが菌体に損傷を与え、この破砕菌体由来のタンパク質等が目詰まりの一因と考えられた。しかしこの方法によると、液を循環させるタイプのクロスフローろ過と比較して菌体の損傷による蛋白質の生成を五分の一に抑えられることが報告されている。

その他に報告されている膜面の掃流を利用したろ過方法として、振動板型フィルターによるろ過がある^{38,44)}。これは振動板をケーキ表面に平行に振動させることによって発生する流体のせん断作用を利用して膜面を掃流するろ過法である。村瀬らは、平板状の濾紙を用いた振動板型フィルターによるろ過について検討を行い、通常のケーキろ過の場合と比較してケーキ層の厚さをかなり抑制できることを報告している³⁸⁾。

1-1-5 逆洗によるファウリングの抑制効果

膜面の掃流によるファウリングの抑制では、適度なケーキ層によるダイナミック効果を重視した報告が多く見られるが、その一方で逆洗を行なうことによって目詰まりを防ぎ、ダイナミック効果を利用しないで大きな透過流束を得ようとする試みがある^{13,45,46)}。Matsumotoらは、セラミック膜を用いた酵母懸濁液のクロスフローろ過に逆洗を取入れて、その効果について検討を行っている⁴⁶⁾。定期的ろ過を停止し、ろ液を用いた逆洗を行うことにより、膜細孔の目詰まりを改

善し、ろ過開始時の大きな透過流束を取り戻すことが出来ることを報告している。しかし、微生物からなるケーキ層は粘着性が大きく、圧密化もしやすいことから、一度生じたケーキ層やひどい目詰まりをあとから液流によって除去することは困難であると考えられる。このため大きな透過流束を得るためには、逆洗間隔を短く設定して、目詰まりがひどくなる前に頻繁に逆洗を行う必要がある。

1-1-6 電場によるファウリングの抑制効果

溶質がタンパク質のように電荷を持つ場合、膜を介して同電荷を印加すると、これが溶質の持つ電荷に作用して反発するため、濃度分極層やゲル層の形成が制限される。このような原理を利用したものが電気ろ過である^{47,48)}。木村らは、真鍮製のハウジングを陰極とし、他方の電極（陽極）として管の中心にステンレス棒を設置したセルロースアセテート膜を用いて電気限外ろ過を行っている⁴⁷⁾。この装置を卵白アルブミン溶液のろ過に応用したところ、ゲル層形成の抑制に電場の効果があることが確認されている。狩谷らは、セラミック膜を用いた電気ろ過を行っている⁴⁸⁾。微生物が負に帯電していることを利用して、ステンレス製のハウジングを陽極、セラミック膜内部のステンレス製液だまり防止棒を陰極として電圧をかけ酵母懸濁のろ過を行った結果、電圧をかけない場合の3倍の透過流束を得ている。しかし、ろ過開始5時間後、電極として用いたステンレスの溶出が起こりろ過を中断せざるを得なくなったとされており、電極として用いる容器の材質について検討が必要であることが報告されている。

1-1-7 微生物の高密度培養への応用

代謝産物が増殖阻害物質となる培養の生産性改善に、膜分離はよく利用されている¹⁻¹⁸⁾。膜分離によって細胞濃度が濃縮された培養液を再び培養槽にもどして細胞を再利用するシステム（灌流培養）は、セルリサイクルシステムとも呼ばれ

ている。ここでは、膜分離が応用されている様々な培養について紹介し、最後に問題点についてまとめた。

1) アセトン・ブタノール発酵への応用

Schloteらは、酢酸セルロース限外ろ過膜を Clostridium acetobutylicum によるアセトン・ブタノール発酵に応用して灌流培養を行い、稀釈率が大きいほど生産物による増殖阻害が軽減され生産性が改善される結果を報告している²⁾。

Ferrasらは、培養期間中の膜のファウリング対策として二本のセラミック膜を用いたクロスフローろ過によるアセトン・ブタノール培養を行なった⁶⁾。一方の膜がファウリングを起こしても、もう一方を用いて培養を続け、その間にファウリングを起こした膜の洗浄再生を行なうという方法を用いている。培養は連続して 500 時間続けられ、最高菌体濃度は 125 g/l に達している。

2) エタノール発酵への応用

酵母によるアルコール発酵においては、エタノールが増殖阻害因子となるため、通常の日本酒のエタノール濃度 14 % を回分培養によって効率良く安定して得るのは困難であった。Watanabeらは、ホローファイバーを反復回分培養による日本酒の生産に応用した²⁵⁾。その結果、エタノール濃度を一ヶ月の間 14 % に維持できたことを報告している。

Nishizawaらは、高い菌体濃度による高いエタノール生産性を得るため、ホローファイバーを用いて培養を行っている¹⁴⁾。パン酵母を用いて稀釈率 0.58 h^{-1} で 30 時間培養を行い、菌体濃度 85 g/l 及びエタノール生産性として 27 g/l/h を得ている。

Hoffmannらは、Saccharomyces cerevisiae を用いた培養にクロスフローろ過を応用している¹⁵⁾。そして稀釈率 0.64 h^{-1} で菌体濃度 90 g/l を達成し、エタノー

ル生産性は 44 g/l/h に改善されたことを報告している。

3) 乳酸発酵への応用

乳酸発酵においては、乳酸が増殖阻害となっている。乳酸濃度の増加にしたがって乳酸菌の比増殖速度は段々と減少し、乳酸濃度が 22 g/l 以上になると急速に比増殖速度は減少することが知られている⁷⁾。Taniguchiらは、セラミック膜を用いたクロスフローろ過を Bifidobacterium longum の培養に応用して乳酸濃度を低く保ち、回分培養の 7 倍の菌体濃度を得ている⁸⁾。また Taniguchiらは、同様にして Streptococcus cremoris 及び Lactobacillus casei の培養に応用した際には、回分培養と比較してそれぞれ 19 倍及び 9 倍の菌体生産性を得ている⁷⁾。

乳酸を安定的に一定生産速度で生産する培養プロセスにも膜分離が利用されている。高密度培養において比乳酸生産速度が徐々に低下することから、乳酸発酵が増殖関連型であることが見いだされた。Wangらは、培養液の採取法としてホローファイバーによるろ過と、ろ過によらずそのまま抜き取る方式を併用し、これをオンラインにより管理することにより比乳酸生産速度と比増殖速度を安定的に一定に管理している¹⁶⁾。

Holstらは、Streptococcus lactis を用いた SOD (superoxide dismutase) の生産において、乳酸による阻害を避けるためホローファイバーを用いている³⁾。その結果 SOD 生産性は回分培養の 4 倍に改善された。

チーズホエーの処理にも膜分離は利用されている。チーズホエー中に残存するラクトースを有効に利用するため、Lactobacillus bulgaricus による乳酸発酵が行われているが、乳酸による阻害のため菌体濃度を高めることが困難で処理速度は遅かった。Mehaiaらは、ホローファイバーをチーズホエー処理に応用し、菌体濃度を 8 倍にまで増加させチーズホエーの処理速度を改善している⁹⁾。

4)有機酸生産菌への応用

プロピオン酸菌の培養においては、代謝生産物であるプロピオン酸が増殖阻害を起こすことが問題であった。Hatanakaらは、Propionibacterium shermaniiによるビタミン B₁₂の生産にホローファイバーを応用し、プロピオン酸濃度を低く保ち、回分培養の 24倍のビタミン B₁₂濃度を得ている¹⁰⁾。

Reedらは、Clostridium thermoaceticum による酢酸の生産にクロスフローろ過を利用している。酢酸が増殖阻害物質であるため、稀釈率を増加させて酢酸濃度を抑制すると生産性が改善されることを報告している⁴⁾。

Enzmingerらは、Saccharomycopsis lipolytica を用いたクエン酸発酵にホローファイバーを応用し、200 時間安定的にクエン酸を生産させ、物質収支の面でのセルリサイクルシステムの有効性を報告している¹⁷⁾。

廃水処理の嫌気処理においては、生産される酢酸が菌の増殖を阻害するため、菌体濃度が制限されることが問題であった。Omstead らは、廃水処理にポリスルホン限外ろ過膜を応用し、酢酸濃度を低く抑えることによつてろ過膜を使用しない場合の 20倍の菌体濃度を得ている¹²⁾。

5)その他の培養への応用

Streptomyces olivaceus により生産される抗体 β -lactamは、不安定であるため早く回収することが望ましい。Harrisらは、 β -lactamの生産にセラミック膜を応用して連続的な抗体の回収を試みた¹¹⁾。その結果、セルリサイクルにより菌体を有効に利用しながら、完全な抗体を回収できたことを報告している。

Danielらは、D-ソルビトールから L-ソルボースを生産する培養とグルコースから 2-ケトグルコン酸を生産する培養に、セラミック膜によるクロスフローろ過を利用している⁵⁾。前者の培養には Gluconobacter oxydans を用い、後者の培養には Serratia marcescens を用いている。これらの培養において稀釈率を増加させ

ることにより菌体濃度が増加し、生産性を改善できたことが報告されている。

6) 灌流培養による高密度培養における問題点

これらの研究から、膜分離を用いた灌流培養は、菌体を有効に利用できる点で優れており、またろ過速度を増加させて稀釈率を上げることが可能であれば、生産性がかなり改善されることがわかる¹⁻⁵⁾。しかし、依然として膜のファウリングによりろ過速度が律速となっているため、現状にとどまっている例も見られた⁴⁻¹¹⁾。高い菌体濃度の培養液中で菌体が占める体積の割合は、50~70%にもなる。ろ過においては、残りの30~50%を占める液体をろ過することになる⁴⁹⁾。このような菌体濃度では、菌体濃度増加に伴い液粘度が飛躍的に増加することろ過を行なう上で過酷な条件となる¹⁾。また消泡剤がファウリングの原因になることも報告されている¹¹⁾。したがって、高密度条件下での膜分離におけるろ過性能が、培養の成否を分けていると言える。

灌流培養は基質を連続的に供給することによって増殖阻害物質を洗い流す培養法であり、このため増殖阻害物質とともに基質も流出するため基質の利用効率にも問題があると考えられるが、これについて検討を行なった報告は見あたらない。今後の課題として、増殖阻害物質濃度を低く抑える点だけでなく、基質の利用効率をも考慮した高密度培養法について検討を行なう必要がある。

1-2 溶媒抽出による培養液からの生産物の分離

1-2-1 溶媒抽出の利用

溶媒抽出は、おもに金属の濃縮、分離及び精製について検討が行われてきた。1842年 Peligot がエーテルを用いてウランを抽出したことに始まり、プルトニウム、コバルト、ニッケル、ユーロピウム、アメリカシウム、銅、鉄、亜鉛等、多

数の金属の抽出に関して検討がなされ、現在では工業的分離操作として実用化されているものが多い^{50,51)}。溶媒抽出は濃縮、分離及び精製が同時に行えることから、培養液からの生産物の回収においても有効な手法として期待できる。その一例は有機酸発酵である。従来有機酸発酵においては、菌体を除去した培養液に水酸化カルシウムを加え、有機酸をカルシウム塩として沈澱させて回収を行っていた。この工程は硫酸による処理をも必要とし複雑であった^{52,53)}。溶媒抽出法はこれらの工程を簡略化するだけでなく、有機酸発酵において問題となっている生産物阻害を防ぎ、高密度培養を行うための手段としても期待できる⁵⁴⁾。

1-2-2 溶媒抽出による有機酸の分離

廃水処理において生じる酢酸の回収は、酢酸エチルやジエチルケトンを用いた抽出により行われてきた。しかしこれらの溶媒では、3 wt % 以上の酢酸は処理できなかつたため、より分配係数が大きい溶媒が望まれていた⁵⁵⁾。TOPO (トリオクチルフォスフィンオキシド) や TOA (トリオクチルアミン) や DOA (ジオクチルアミン) が低級脂肪酸に対して大きな分配係数を持つ溶媒として見い出され、これらを抽出におけるキャリアーとして利用した研究がなされるようになった。

Niitsuらは、TOPOをキャリアーとしてヘキサンに溶かし、酢酸やプロピオン酸など 11種の有機酸について抽出平衡定数を測定している⁵⁶⁾。Hanoらも同様に TOPOを含むヘキサンを用いて 14種の有機酸の抽出平衡について検討を行い、抽出速度が有機酸の疎水性によって支配されていることを明らかにした⁵²⁾。

CHENらは、TOAをキャリアーとしてエタノールに溶かし、4種の低級脂肪酸の抽出平衡を測定した⁵⁷⁾。そしてこの結果を有機相への分配とキャリアーと脂肪酸の会合を考慮したモデルで評価している。Wennerstenは、クエン酸の抽出について、TOAをキャリアーとして様々な溶媒を用いて検討し、溶媒によって選択性が異なることや、分配係数が影響を受けることを報告している⁵⁸⁾。

坂井らは、キャリアーとして DOA (アンバーライト LA-2) を用い、様々な溶媒での抽出平衡を測定し、溶媒の効果について検討している⁵⁹⁾。Kawanoらは、キャリアーとして DOA (アンバーライト LA-2) と TOAを用いて、両者のプロピオン酸抽出速度の比較を行った⁶⁰⁾。抽出速度は、会合体の有機相への脱離速度を律速とした界面移動速度によって決まることを報告している。

1-2-3 溶媒抽出を利用した培養と問題点

抽出を培養に応用することを前提とした場合、考慮すべき条件の一つとして忘れてはならないものに pHがある。これまでにあげた研究においては、有機酸水溶液の pHの調製を行っていない。したがってこれらの結果は一般的に低い pHでの抽出結果ということになり、低い pHが培養条件に合致する場合にしか適用できない。そこで Nuchnoiらは、抽出を培養に応用することを考慮し、多孔性テフロン平膜に TOPOを含有するケロシン溶液を含浸させた液膜を用いて、様々な pHにおいて 4種の低級脂肪酸の抽出を行っている⁶¹⁾。そして非解離型の脂肪酸だけが TOPOと会合していることを明らかにしている。この結果より、有機酸の抽出においては、非解離型の脂肪酸の存在が重要であり、有機酸の pKa (Ka: 酸解離定数) より低い pHでの抽出が有効であることを報告している。

培養に抽出を応用する場合、菌体を含む培養液から直接抽出を行うと、液-液界面に菌が集まり、液-液接触面積が制限されることによって抽出速度が制限されることが問題になる。Crabbeらは、菌体濃度が 0.1 g/l の時、菌体濃度がゼロの時と比較して抽出速度が 86 % 低下することを報告している⁶²⁾。界面に菌が集まることを防ぐために、膜分離による菌体の分離や菌の固定化やホローファイバーなどの支持膜の利用が行われている。Minierらは、界面に菌が集まることを防ぐため平均サイズ 5 mm のレンガに菌体を固定化し、n-ドデカノールを抽出溶剤に用いてエタノール発酵に抽出を応用した⁶³⁾。抽出を利用してエタノールを分離

したことにより、糖消費が 2倍以上改善されたことが報告されている。

Nuchnoiらは、多孔性テフロン平膜を支持膜として菌の界面への集合を防ぎ、これに TOPOを含有するケロシン溶液を含浸させて廃液処理の酸発酵に応用した⁶⁴⁾。この発酵においては、酢酸や酪酸が菌の増殖を阻害しており、これらの酸の抽出を試みている。菌の最大比増殖速度は pH 5.5で得られるが、酢酸及び酪酸の pKaは 4.77及び 4.85であり、抽出はこれより低い pHで行うことが有効である。そこで抽出と発酵を両立させるため、pHは 4.8が選択されている。この結果、酸の生成が 5倍に改善されている。

Boeyらは、TOAを n-ヘプタンなど様々な溶媒に溶かして培養液からのクエン酸の回収を試みた⁵⁴⁾。クエン酸は 3 段階に解離するため pKaは 3 つ存在し、比較的高い pH でも抽出は可能であるが、完全な非解離型となる pH 3 以下が抽出を行うのに最も効果的であることを報告している。

Busche らは、*Clostridium thermoaceticum*を用いて pH 6で酢酸発酵を行った培養液から 2-ブタノンを用いて酢酸の抽出を行った⁶⁵⁾。抽出を行うためには培養液の pHを下げる必要があり、75 atmで二酸化炭素を作用させている。そして大幅に生産コストを下げるには低い pHまたは高酢酸濃度のもとで生育出来る菌を使用する必要があることを述べている。

このように有機酸発酵に抽出を応用した例の多くは、培養に適する pHと抽出に適する pHとのギャップが問題となっている。唯一 pKaより大きい pHで抽出が行えた報告として、ペニシリンの抽出がある。Likidisらは、DOA (アンバーライト LA-2) をキャリアーとして n-酢酸ブチルに含有させ、培養液からのペニシリンの抽出を行った^{66,67)}。ペニシリンは弱酸であり pKa は 2.75であるが、pH 4.6 ~5.1 で抽出を行って 72~96 %のペニシリンが抽出されたことが報告されている。

また、有機溶媒の多くは生物に対して毒性を示す。したがって分離目的物質に対して大きな分配係数を持つ有機溶媒を選択しても、有機溶媒が菌の増殖を阻害

してしまうために有効に使えない例もある。Yabannavarらは、乳酸発酵における乳酸の抽出分離に乳酸に対して大きな分配係数を持つアラミン 336を応用している⁶⁸⁾。しかしアラミン 336の毒性が強いため、微生物に対して無毒であるオレイルアルコールで 15 %に希釈したアラミンを用いており、大きな分配係数を生かせていない。これは、膜分離などで菌体を分離した培養液から抽出操作により増殖阻害物質を分離した場合でも、有機溶媒の毒性が強い場合には僅かに培養液に残される有機溶媒が菌の増殖を阻害するためであり、抽出操作を培養系に応用する際の問題となっている。そこで、これを逆抽出を取り入れた二段階抽出を行うことで改善した例が報告されている。Hondaらは、先に述べたアラミン 336の毒性を除きかつ分配係数が高い状態で使うため、アラミンによる抽出操作を行なった培養液をすぐに培養槽に戻さず、オレイルアルコールによって培養液中のアラミンを逆抽出した後に戻す二段階の抽出を乳酸発酵に取り入れた⁶⁹⁾。これによりアラミンの毒性は除かれ、アラミン 336は 40 %の濃度で用いられている。しかし同時に、より高い分配係数を持つ DOAなどの第二級アミンは二段階抽出によっても毒性を排除できず、利用できなかったことも報告しており、抽出溶剤の毒性の問題は依然として残されている。

1-3 吸着による培養液からの生産物の分離

1-3-1 吸着による発酵生産物の回収

流体相と固体の表面が接触している時、流体相中の特定成分が固体の表面に対して親和性があると、この成分に関しては流体相の内部の濃度と固体表面の濃度が異なる状態が作りだされる。この現象が吸着であり、様々な親和力を利用した吸着剤が存在する。主な親和力に疎水性や親水性による親和力と、イオン（電荷）による親和力がある。また同荷電のイオンの中でも親和性に差があり、これ

を利用したものがイオン交換樹脂である。吸着剤による物質の回収は相変化を伴わないため省エネルギーであり、これらの親和性を利用した様々な有機物の回収が検討されている⁷⁰⁻⁷²⁾。

有機酸は代表的な発酵生産物の一つであり、主に希薄水溶液として得られる。活性炭は、水溶液から酢酸やプロピオン酸など低級脂肪酸を回収する場合によく利用されてきた吸着剤である。活性炭表面は概して疎水性であり、水との親和性が小さいため、疎水性の強い物質がよく吸着されるといわれている⁷³⁾。同じ官能基をもつ同系列の有機物質は、分子量が大きくなるほど疎水性が大きくなると考えられている。Giustiらは、活性炭を用いて様々な有機物の吸着を測定し、分子量の増加にしたがって吸着量が増加する結果から、疎水性の強い物質がよく吸着されることを確認している⁷⁰⁾。しかし有機酸は、溶液の pH によっては、解離してイオンとして存在するため親水性となる。このため、非解離状態でなければ有機酸は活性炭に吸着されないことが言われてきた。Kiplingは、活性炭による酢酸の吸着を pH を変化させた様々な条件下で行い、pH 7 以上では吸着が全く起らない結果を得ている⁷⁴⁾。これにより、吸着が非解離型の分子によるとし、イオン状態の酢酸は吸着されないことを報告している。また吸着が起らないのは、pH による活性炭表面の性質の変化ではなく、溶液の電気化学的な性質によるとしている。一方 Getzenらは、様々な pH で 3,6-ジクロロ-2-メトキシ安息香酸など 4 種の有機酸を活性炭に吸着させ、吸着がイオンと分子の両方で起ることを報告している⁷⁵⁾。この吸着においては、最大吸着量が各有機酸の pKa とほぼ同じ pH で得られており、イオンの吸着量が分子の吸着量と同等である結果が得られている。

活性炭以外にも有効な吸着剤が報告されている。エタノールやブタノールの回収に有効であると考えられ検討されている吸着剤として、アンバーライトとモレキュラシーブ（シリカライト）がある。アンバーライトは、ローム・アンド・ハース社が開発した巨大網状構造樹脂で、目的に応じて樹脂の極性やイオン交換性

が異なる製品を選択できる^{76,77)}。一方モレキュラシーブ（シリカライト）は、ユニオン・カーバイト社により開発された結晶性ゼオライトであり、表面は疎水性で、ゼオライトと異なりイオン交換能はないとされている⁷⁸⁾。Neilらは、シリカライトを用いたアルコールの濃縮を報告している⁷⁸⁾。シリカライトを用いた吸着、脱着操作によるエタノールの濃縮では、2%の溶液を35%に濃縮している。またブタノールの場合には、0.5%の溶液を98%にまで濃縮できたことを報告している。Kleinらも、エタノールの回収にシリカライトを用いて良好な結果を報告している⁷⁹⁾。他にもPittらは、エタノール発酵液からのエタノールの回収にシリカライト、アンバーライト XAD-2及び XAD-7 を用いて、これらの吸着剤の実用性について検討を行っている⁸⁰⁾。有機酸の回収については、アンバーライトを用いた検討が行われている。Richardらは、アンバーライト XAD-1及び XAD-2を用いて低級脂肪酸の吸着を行い、分子量が大きいほど吸着量が増加することから、吸着が疎水性結合によるものであることを考察している⁸¹⁾。吸着が疎水性によるか親水性によるかは、溶媒の質によって異なることが報告されている。Paleosらは、酢酸と酪酸を水とトルエンに溶かして、中間的な極性を持つアンバーライト XAD-6及び XAD-7を用いて吸着を行った⁸²⁾。そして、極性溶媒である水中では疎水性の大きい酪酸が多く吸着され、逆に非極性溶媒であるトルエン中では親水性の大きい酢酸が多く吸着される結果を得ている。

吸着剤の選択についても検討が行われている。Fritzらは、吸着剤として吸着タイプのアンバーライト XAD-2と、陰イオン交換体のアンバーライト A-26を用い、溶液の pHを変化させて様々な pH条件下で酢酸やプロピオン酸の吸着量を測定し、吸着タイプとイオン交換タイプの比較を行った⁸³⁾。その結果、有機酸がイオンとして存在する塩基性溶液ではイオン交換体が有効であり、有機酸が分子状態である酸性溶液では吸着剤が有効である結果を得ている。これらのことから、回収目的物の状態に応じて吸着剤を選択すべきであることを報告している。

1-3-2 吸着を利用した培養

様々な発酵生産物について吸着による回収が検討されているが、培養への応用では改善すべき問題点が指摘されている。Lenckiらは、エタノール発酵に様々な吸着剤を応用した⁸⁴⁾。吸着剤としてシリカライトを選択し、発酵槽に直接投入して用いたところ、エタノール濃度は低く保たれたが糖消費能は改善されなかった。これは、菌がシリカライトに吸着されることと、シリカライトの Al_2O_3 が菌の増殖を阻害することが原因であった。このためシリカライトを充填槽に詰めて用い、シリカライトの分解と菌の吸着を防ぐことができれば、良好な結果が得られると考察されている。

アンバーライト XAD-4 及び XAD-7を用いた場合についても問題が指摘されている。これらの吸着剤は、培地成分を吸着するため菌の増殖が制限されること、そして培地成分の吸着によってエタノール吸着能が 20 %低下することが判明している。またこれらの吸着剤も、菌を吸着し増殖を阻害することが報告されている。

Ennisらも、チーズホエー廃液を基質としたアセトン・ブタノール・エタノール発酵にシリカライト及びアンバーライト XAD-16を応用したが、これらの吸着剤が培地成分を吸着するため、良好な基質消費は実現できなかったことを報告している⁸⁵⁾。Nayveらは、動物細胞の培養において増殖阻害を起こすアンモニアの選択的除去にゼオライトを利用している⁸⁶⁾。ゼオライトの選択にあたり培地成分の吸着が少ないことを選択条件の一つとし、ゼオライト A3を選択している。そして培養にゼオライトを応用した結果、アンモニア濃度は阻害レベル以下に保たれ、高い細胞濃度と細胞生存率を得たことが報告されている。Masumaらもアンモニアの除去にゼオライトを利用している⁸⁷⁾。*Streptomyces fradiae*によるチロシンの生産にゼオライトを応用してアンモニア濃度を低く保ち、生産性を 3倍に改善している。

以上のように発酵生産物の吸着による回収は検討されているものの、実際の培

養に応用された例は多いとはいえない。ここに述べた例からも明らかのように、培養系への吸着の応用に関しては、培地成分の吸着がおもな問題となっている。これを逆に利用したケースも報告されている。Hondaらは、植物細胞の培養において必要な植物ホルモンの供給に活性炭を用いている⁸⁸⁾。活性炭と植物ホルモン 2,4-Dとの平衡関係をもとに、2,4-Dが消費されて濃度が減少すると予め活性炭に吸着させた 2,4-Dが溶出し供給されるシステムを提案し、センサー等を用いなくてホルモン濃度を制御している。この例より、予め吸着剤に対して培地成分を飽和状態にしておくことが、培地成分の吸着の解決法の一つとして考えられる。吸着剤に対する目的吸着物質の親和性が高ければ、予め吸着させた培地成分に対して置換吸着も起こり得る。培養において置換吸着について述べられた例は見られなかったが、吸着剤の選択の段階において考慮すべき問題である。

第2章 回転型セラミック膜分離装置のろ過特性とこれを用いた高密度培養の可能性

2-1 序

灌流培養において膜分離は、菌体および生産物の分離方法として用いられている。既往の研究で述べたように、膜分離を用いた灌流培養における問題の一つは、膜のファウリングが起ることにより、大きな透過流束が得られなくなることである。膜のファウリングは、灌流培養に限らず膜分離を用いるすべてのプロセスにおいて問題となっている。そこで、ファウリングを防止して大きな透過流束を得るためにクロスフローろ過や中空の繊維状の膜を束ねたホローファイバーが開発され、用いられるようになった。しかし、現在用いられているホローファイバーの多くは、膜材質の耐熱性から蒸気滅菌ができない。また、ホローファイバーはその構造状の問題から、膜の洗浄および再生が困難な場合が多い。これらのことから、培養系に用いる際に必要な性質を十分に持ち合わせているとはいえない。一方クロスフローろ過においては、高流速で液を流すために菌体に与える損傷が問題となる^{34, 35)}。既往の研究で紹介したように、クロスフローろ過よりも、膜自身を回転させるろ過法の方が、菌体に与える損傷が少ないことが報告されている^{41, 43)}。これらのことから本研究においては、灌流培養における膜分離装置としてセラミック膜を用いた回転型ろ過装置を用いることにした。

セラミック膜は無機材質であるため、有機材質からなる膜にない優れた性質を持っている。一般的にセラミック膜は耐熱性に優れており、700℃の高温処理による熱再生が可能であるほか、機械的強度が大きく剛性を有しており圧力や熱による細孔径の目開きが起らない。本研究で用いたセラミック膜（高アルミナ質）も蒸気殺菌や薬液洗浄が可能であり、また耐食性にも優れていることから微生物培

養系での使用に十分耐えられる特性を備えている。

報告されている従来の回転型ろ過装置は、円筒型の膜を回転させることにより生じるテイラー渦流を利用したせん断応力によって付着層の形成を防ぐ仕組みとなっている^{36, 37, 39-41}。しかし、テイラー渦流を発生させるためには、膜面とハウジングの間隙が狭い精密な構造が必要とされる。このため、高速で回転する膜面とハウジングの接触による事故の可能性を考慮すると、構造の精密さが追求されるため製作コストがかかり、また、運転におけるメンテナンスにも気を配る必要性が生じる。しかしながら、クロスフローろ過の原理からすると、膜面掃流に必要なせん断応力を作用させることができればテイラー渦流は必要ではないことが考えられた。このため本研究では、膜面とハウジングの間隙が大きい回転型ろ過装置を試作した。このようなテイラー渦流を利用しない回転型ろ過装置については報告されていない。このため、ろ過特性すなわち膜回転速度やろ過圧力などの操作変数のろ過（透過流束）に対する影響について知見を得る必要がある。また、実際の培養系では、菌の好気性、嫌気性にかかわらず培養液中に酸素、窒素および二酸化炭素などの気泡が存在する。しかし、これまででろ過において培養条件を考慮して気泡の影響について検討した報告例は少なく、特に回転型ろ過装置における気泡の影響については報告されていない。そこで、本章では、回転型セラミック膜分離装置によるろ過において、膜回転速度、ろ過圧力および通気が透過流束に及ぼす影響について検討を行った。また、回転型セラミック膜分離装置の実用性を確認するため、灌流培養によるリジン発酵を行った。野性株の *Corynebacterium glutamicum* を用いたリジン発酵は、典型的な生産物阻害の一例であり、菌体外に分泌されるリジンによって菌の増殖が阻害されるため、回分培養では生産性を上げることは困難であった。本実験では、回転型セラミック膜分離装置をリジン発酵に応用して灌流培養を行い、リジンを系外に取り出すことにより菌体及びリジンの生産性の改善を試みた。これにより回転型セラミック膜分

離装置が、実際の培養においてファウリング等を起こさずに長期使用に耐えられるか否かについての検討を行った。

2-2 回転型セラミック膜分離装置の仕様

供試膜は、日本ガイシ（株）製非対称構造のアルミナ系管状セラミック膜で、細孔径 0.2 μm 、長さ 30 cm、内径 22.4 mm、外径 30.2 mm、有効膜面積は 246 cm^2 である。仕様を、Table 2-1に示した。装置は共軸二重円筒型で、内筒がセラミック膜である。外筒（ハウジング）はステンレス製で、内径 69.5 mmとなっており、内筒との間隙は 19.7 mmである。回転型セラミック膜分離装置の概略を Fig.2-1に示した。セラミック膜は、中空で下部に穴を持つ主軸に固定されており、モーターによって回転を行なう仕組みとなっている。

膜の回転により生じる膜表面とハウジング内面の角速度の差によりテイラー渦流が生じる。安定なテイラー流が形成されるためには、(2-1)式で定義されるテイラー数が 40~4000の範囲になければならない³⁹⁾。

$$Ta = (\omega R_2 d / \nu) [2d / (R_2 + R_3)]^{0.5} \quad (2-1)$$

Ta : テイラー数 [-]

ω : 角速度 [s^{-1}]

R_2 : セラミック膜の外半径 [m]

R_3 : ハウジングの内半径 [m]

d : セラミック膜とハウジングの間隙 [m]

ν : 液体の動粘度 [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]

このため、テイラー渦流を生じさせるためには、膜表面とハウジングの間隙を小さくする必要がある。村瀬らが使用した回転型ろ過装置の間隙は、5~7 mmである^{36, 37, 40)}。テイラー渦流がケーキ層除去に有効であることは、既往の研究に述べ

Table 2-1 Specification of rotating ceramic membrane module.

ID × OD × L	22.4 × 30.2 × 300	[mm]
Effective membrane area	246	[cm ²]
Pore size (Skin layer, Support layer)	0.2, 5.0	[μm]
Membrane thickness (Skin layer, Support layer)	60, 4000	[μm]
Inner diameter of housing	69.5	[mm]
Annular gap	19.7	[mm]

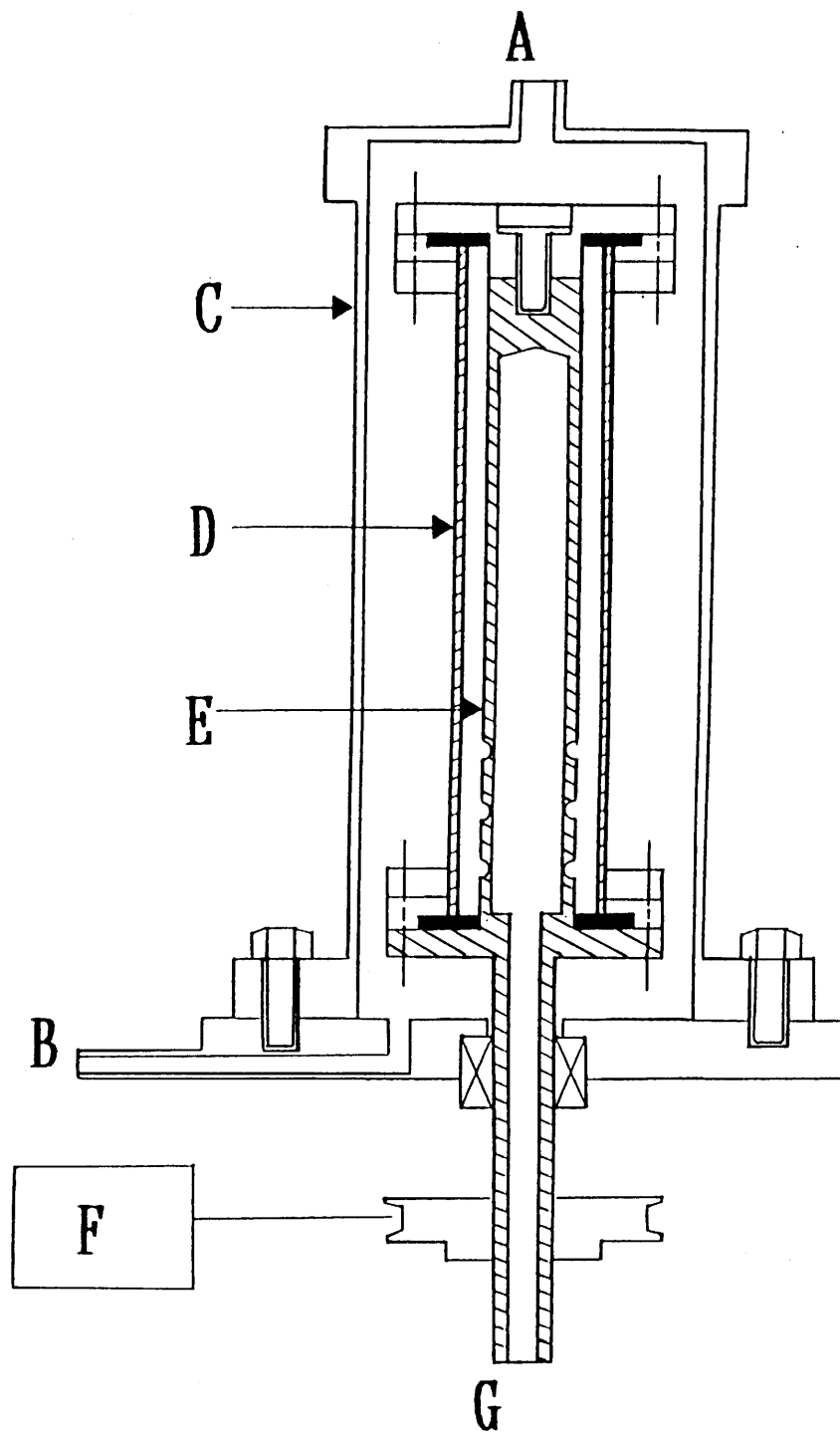


Fig. 2-1 Schematic construction of a rotating ceramic membrane module. A: outlet; B: inlet; C: housing; D: ceramic membrane; E: hollow shaft; F: electric motor; G: filtrate

た通りであるが、このような狭い間隙を持ちながら膜を高速で回転させる運転を行なうためには、精密な構造が要求され、回転型ろ過装置の作製においてコストが高くなる。クロスフローろ過のケーキ層除去原理を考えると、テイラー渦流によらなくても必要なせん断応力を膜面に与えることができればケーキ層は十分掃流されると考えられる。この考えにより、本研究では大きな間隙を持つ回転型ろ過装置を製作した。ろ過実験においては、0 rpm又は 950 rpm以上の回転数で装置の運転を行ったが、950 rpmでのテイラー数は 39000であり、本実験ではテイラー渦流は生じなかったと考えられた。

2-3 回転型セラミック膜分離装置のろ過特性

2-3-1 ろ過抵抗の測定理論

透過流束を左右するろ過抵抗には、膜自体のろ過抵抗、ゲル層またはケーキ層によるろ過抵抗及び膜細孔の目詰まりによるろ過抵抗の三つの抵抗が考えられる。これらの抵抗を求めるために、三つの手順によるろ過実験を行った。ろ過を始めると透過流束はろ過時間の経過とともに減少していき、ある平衡値に達する。これは、ろ過に伴う濃度分極等で生成するケーキ層の生成速度と、ケーキ層の掃流速度が、ある時間後に平衡に達するためであると考えられている。この時の透過流束を定常透過流束とし、整理に用いることにした。それぞれのろ過抵抗の計算法について以下に述べる。

全ろ過抵抗 R は、膜自体の抵抗 R_m と目詰まりによる抵抗 R_p とケーキ層やゲル層による抵抗 R_c の和で表わされる^{26,27,29-31)}。

$$R = R_m + R_p + R_c \quad (2-2)$$

Ruthのろ過速度式より、透過流束 J は (2-3)式で表わされる⁸⁹⁾。

$$J = (P - P_c) / \eta (R_m + R_p + R_c) \quad (2-3)$$

J : 透過流束 [m/s]

R : ろ過抵抗 [m⁻¹]

P : 操作圧力 [Pa]

P_c : 遠心力 [Pa]

η : 粘度 [Pa·s]

膜が回転する際、膜細孔中の液体は、遠心力によってろ過の方向と反対方向に力を受ける。このため真のろ過圧力は、操作圧力から遠心力を引いた値となる。遠心力 P_cは、(2-4)式によって求められる⁹⁰⁾。本回転型セラミック膜装置における膜回転速度と遠心力の関係を Table 2-2に示した。

$$P_c = \rho \omega^2 [(R_2)^2 - (R_1)^2] / 2 \quad (2-4)$$

ρ : 密度 [kg/m³]

R₁ : セラミック膜の内半径 [m]

パン酵母液の粘度は、Vandの式である(2-5)式を用いて求めた⁹¹⁾。

$$\eta = \eta_w (1 + 2.5\phi + 7.25\phi^2) \quad (2-5)$$

η_w : 溶媒の粘度 [Pa·s]

φ : 菌体の体積割合 [-]

したがって透過流束 Jを測定することによって (2-3)式より全抵抗 Rを求めることができる。

膜面上のケーキ層やゲル層を除去した後、純水を用いて透過流束を測定すると、この透過流束は目詰まりによる抵抗と膜自身の抵抗によるものと考えられる。この透過流束を J_pとすると (2-6)式で表わされる。

$$J_p = (P - P_c) / \eta (R_m + R_p) \quad (2-6)$$

この式より目詰まりによる抵抗と膜自身の抵抗の和 R_m + R_pを求めることができる。全抵抗 Rから R_m + R_pの値を引くとケーキ層による抵抗 R_cを求めることができる。また、パン酵母懸濁液を用いたろ過実験の前に純水を用いた透過流束を測

Table 2-2 Centrifugal force of rotating ceramic membrane.

Rotation speed [min ⁻¹]	Tip velocity [m/s]	Centrifugal force [kPa]
0	0	0
950	1.5	0.51
1300	2.1	0.95
1900	3.0	2.03
2500	4.0	3.51

定すると、この透過流束は膜自身の抵抗によるものと考えられるから、この透過流束を J_m とすると (2-7) 式で表わされる。

$$J_m = (P - P_c) / \eta R_m \quad (2-7)$$

この式より膜自身の抵抗 R_m を求めることができる。また、 $R_m + R_p$ の値から R_m の値を引くことで目詰まり抵抗 R_p が求められる。

2-3-2 実験材料および方法

ろ過実験に用いた装置の概略および写真をそれぞれ Fig.2-2 および Photo 2-1 に示した。攪拌槽中（攪拌速度 500 rpm）の純水または酵母懸濁液は、ローラーポンプによって一定流速 (16 ml/s) で回転型セラミック膜分離装置へと送り込まれ、ろ過によって濃縮された液は、再び攪拌槽へ戻るリサイクル方式となっている。ろ過にかかわらず懸濁液濃度を一定に保つため、レベルセンサーを用いて純水の供給を制御した。ろ過圧力は、窒素ポンプを用いて一定に保った。ろ過実験においては、ろ過圧力および膜回転速度の影響についてそれぞれ 20~71 kPa 及び 0~2500 rpm の範囲で検討を行った。通気はエアポンプを用いてスパージャーを通して行い、通気速度は $1.5 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{min}$ で、一定とした。ろ過圧力を一定に保つため、通気は循環形式で行った。

まず最初に、ろ過実験を始める前のセラミック膜の再生状態を確認するため、ろ過圧力 10 kPa で純水を用いたろ過を行い、一定量 (10 min で 900 ml 程度) のろ液が得られることを確認してからろ過実験を行った。純水中の混合物が膜細孔の目詰まりの原因となることを防ぐため、ろ過実験に用いる純水はすべて孔径 0.2 μm のフィルター (PALL JAPAN Co.) で処理したものを用了。

つぎにセラミック膜自体のろ過抵抗の測定のため、純水を用いて所定のろ過圧力及び膜回転速度でろ過を行い、平衡に達した透過流束（定常透過流束）を求めた。続いて懸濁液を用いたろ過実験を行った。ろ過に用いる懸濁液として、日東

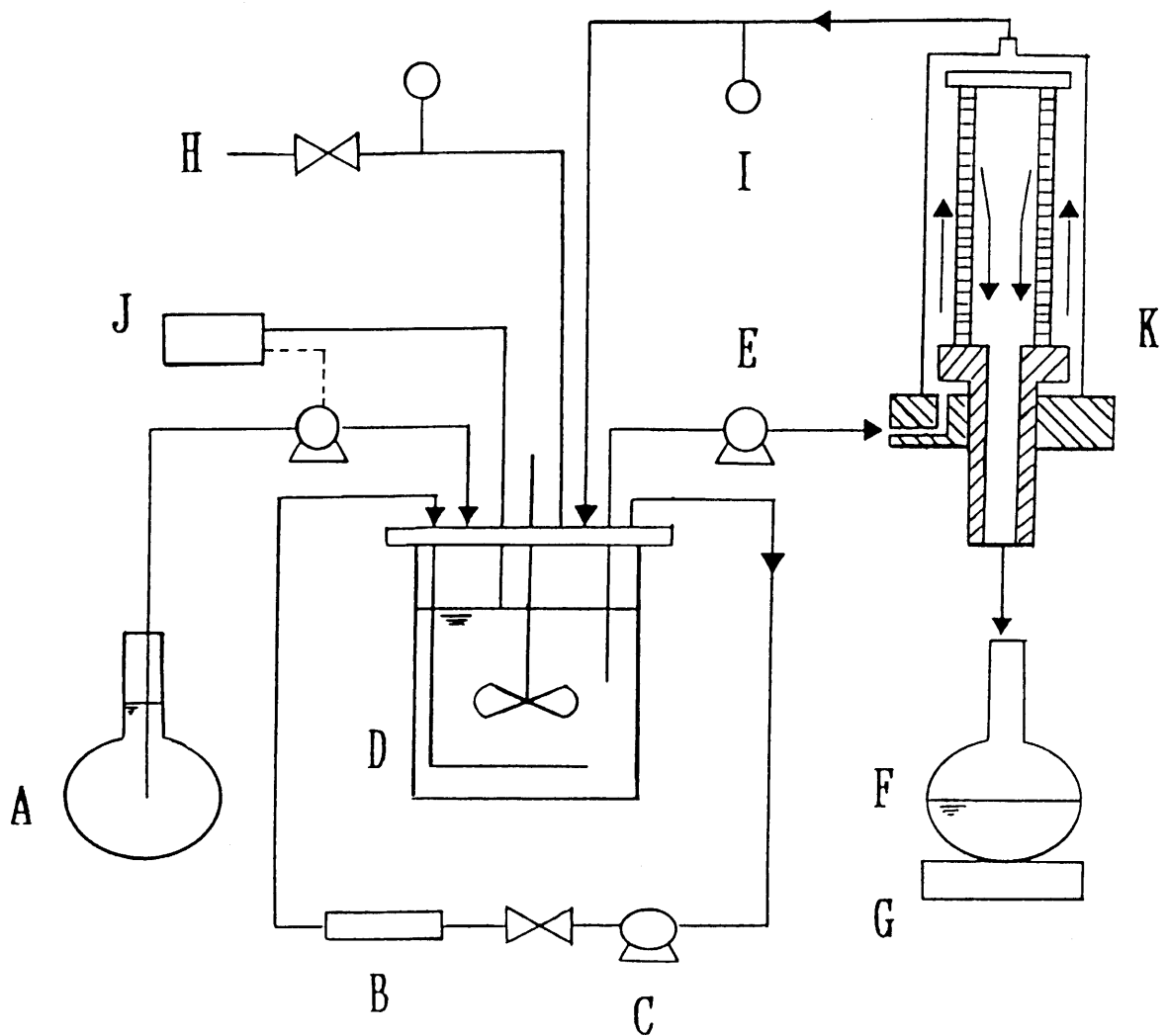


Fig. 2-2 Experimental setup for measuring permeation flux.
 A: distilled water; B: flow meter; C: aeration pump;
 D: fermentor; E: roller pump; F: filtrate; G: electronic balance;
 H: N₂ gas; I: pressure gauge; J: level controller; K: rotating ceramic membrane module



Photo 2-1 Experimental setup for filtration experiment.

酵母（株）製パン酵母を蒸留水に懸濁させ、濃度を乾燥重量で 50 g/l に調製したものをを用いた。透過流束は、10 分間に得られたろ液の重量を測定して求めた。10 分間に得られる透過流束の減少が、3 %以内となった時点を選定透過流束とし、ろ過実験を停止した。

つぎに、膜の目詰まりによるろ過抵抗を求めるための実験を行った。回転型ろ過装置からセラミック膜を取り出し、膜表面に形成されたケーキ層やゲル層をスポンジを用いて洗い流した後、再び回転型ろ過装置にセラミック膜を装着して純水を用いたろ過を行った。透過流束が一定に達した時の値を平衡値とした。

実験後、次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて以下の要領でセラミック膜の洗浄を行った。有効塩素 1000 ppm に調製した溶液を用いて 30 分間逆洗を行った後、有効塩素 500 ppm の溶液に 12 h 以上漬漬した。

2-3-3 結果および考察

1) 無通気系におけるろ過特性

無通気系において膜回転速度及びろ過圧力が透過流束に及ぼす影響を Fig.2-3 に示した。ろ過圧力による定常透過流束の差は、ほとんどみられなかった。一方、膜回転速度は、透過流束に大きな影響を及ぼした。回転速度 1300 rpm までは膜回転速度が速くなるにつれて定常透過流束は大きくなったが、それ以上では膜回転速度に関わらず定常透過流束はほぼ一定となった。この結果より 1300 rpm 以上の回転速度では、付着層が完全に掃流されていると考えられ、十分なせん断力を与えればテイラー渦流によらなくても付着層の除去が可能であることが明らかとなった。パン酵母懸濁液のろ過後、膜を取り出して観察したところ、セラミック膜の表面にゲル状の物質（ゲル層と考えられる）が観察された。したがって、ゲル層は回転によるせん断力では除去できないことがわかった。セラミック膜上に観察されたゲル層の一例を Photo 2-2 に示した。

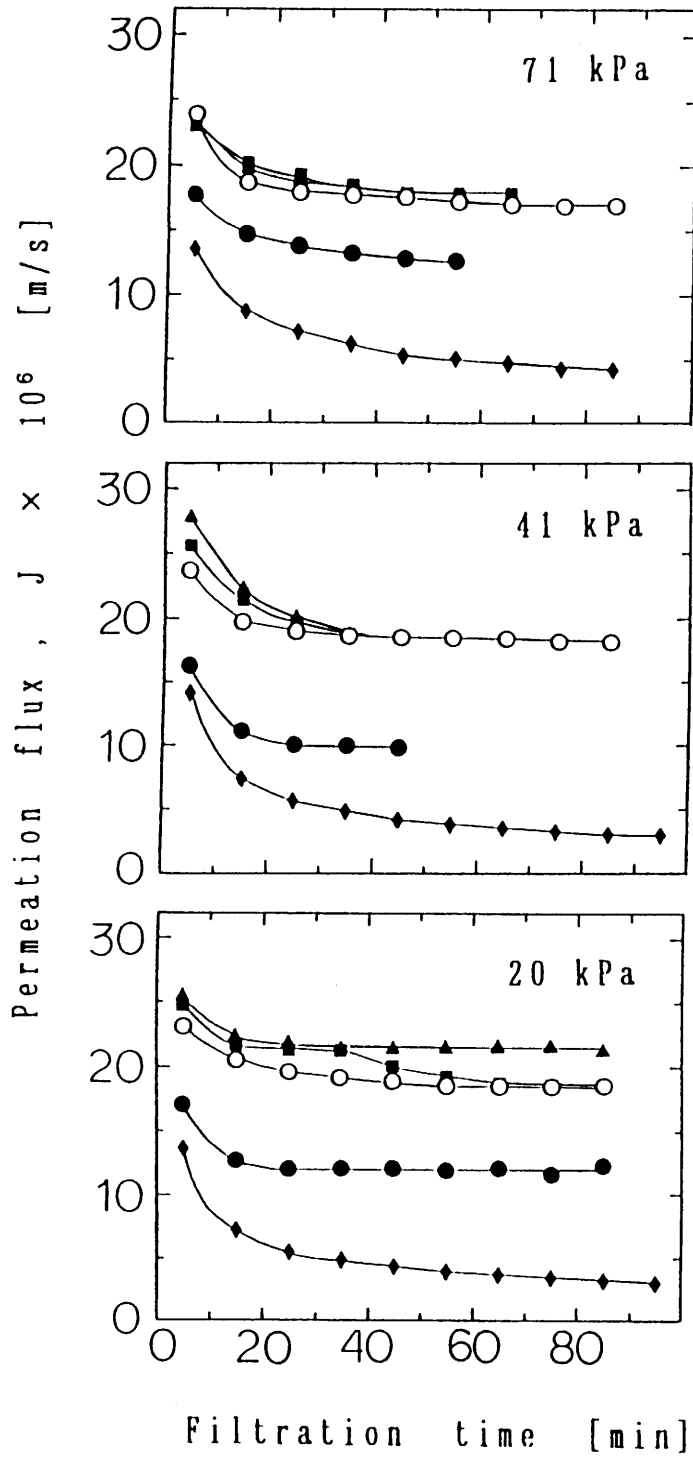


Fig. 2-3 Effects of the rotating speed and filtration pressure on the permeation flux under unaerated condition.
 Rotation speed (min⁻¹): ◆ 0, ● 950, ○ 1300, ▲ 1900, ■ 2500

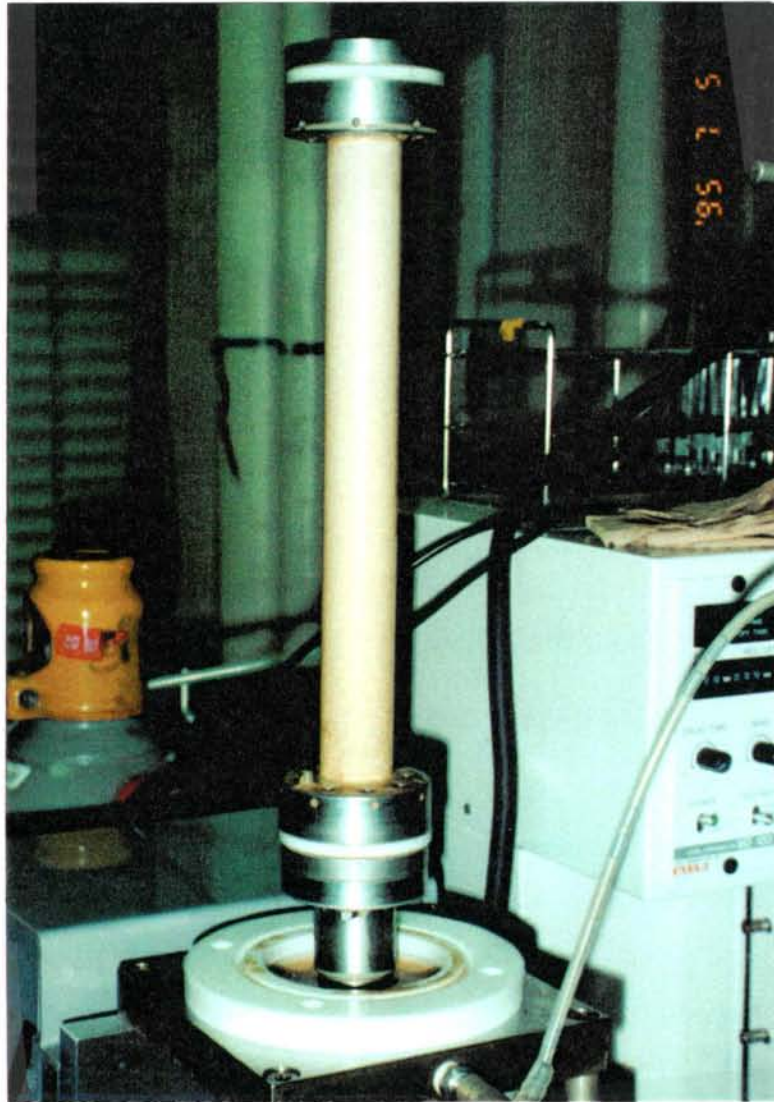


Photo 2-2 Gel layer observed on the surface of ceramic membrane after filtration experiment.

各ろ過圧力での、ろ過抵抗に対する膜回転速度の影響を Fig. 2-4に示した。各ろ過圧力で、それぞれ回転速度が 1300 rpm以下では、膜回転速度の増加に伴いケーキ層抵抗 R_c が減少している。1300 rpm以上では、膜回転速度に関わらず各ろ過抵抗はほぼ一定であった。このことから 1300 rpm以上に膜回転速度を上げて、ケーキ層抵抗を減らすことはできないことが明らかとなった。またゲル層が確認されたことから、膜回転速度が 1300 rpm以上での R_c はゲル層による抵抗であることが明らかとなった。一方、ゲル層が存在することにより、目詰まりによる抵抗 R_p は、ほぼ一定に保たれていると考えられる。したがって本回転型ろ過装置によるろ過は、ダイナミック効果を有効に利用できているといえる。

2) 通気系におけるろ過特性

通気系において、膜回転速度及びろ過圧力が透過流束に及ぼす影響を Fig.2-5に示した。ろ過圧力が 20kPaの時に得られた定常透過流束は、ろ過圧力 41 kPa及び 71 kPaで得られた定常透過流束よりも小さかった。これは、無通気系とは異なる結果である。また膜回転速度が速くなるにつれて、定常透過流束は増加した。このことは、無通気系と異なり、1300 rpm以上の膜回転速度でもケーキ層が完全には掃流されていないことを示唆している。パン酵母懸濁液のろ過後、セラミック膜を取り出して観察したところ、膜回転速度 2500 rpmの時でも膜表面にケーキ層が付着していることが確認できた。したがって、通気によってケーキ層の掃流効果が低減されることが明らかになった。これは、無通気系とはかなり異なった結果である。また、既往の研究で述べたように、クロスフローろ過においては、気泡はケーキ層の除去に効果的な働きをすることが報告されている。³⁸⁾したがって回転型ろ過装置においては、気泡が全く逆の働きをしていることになる。セラミック膜上に見られたケーキ層の一例を Photo 2-3に示した。

各ろ過圧力での、ろ過抵抗に対する膜回転速度の影響を Fig. 2-6に示した。各

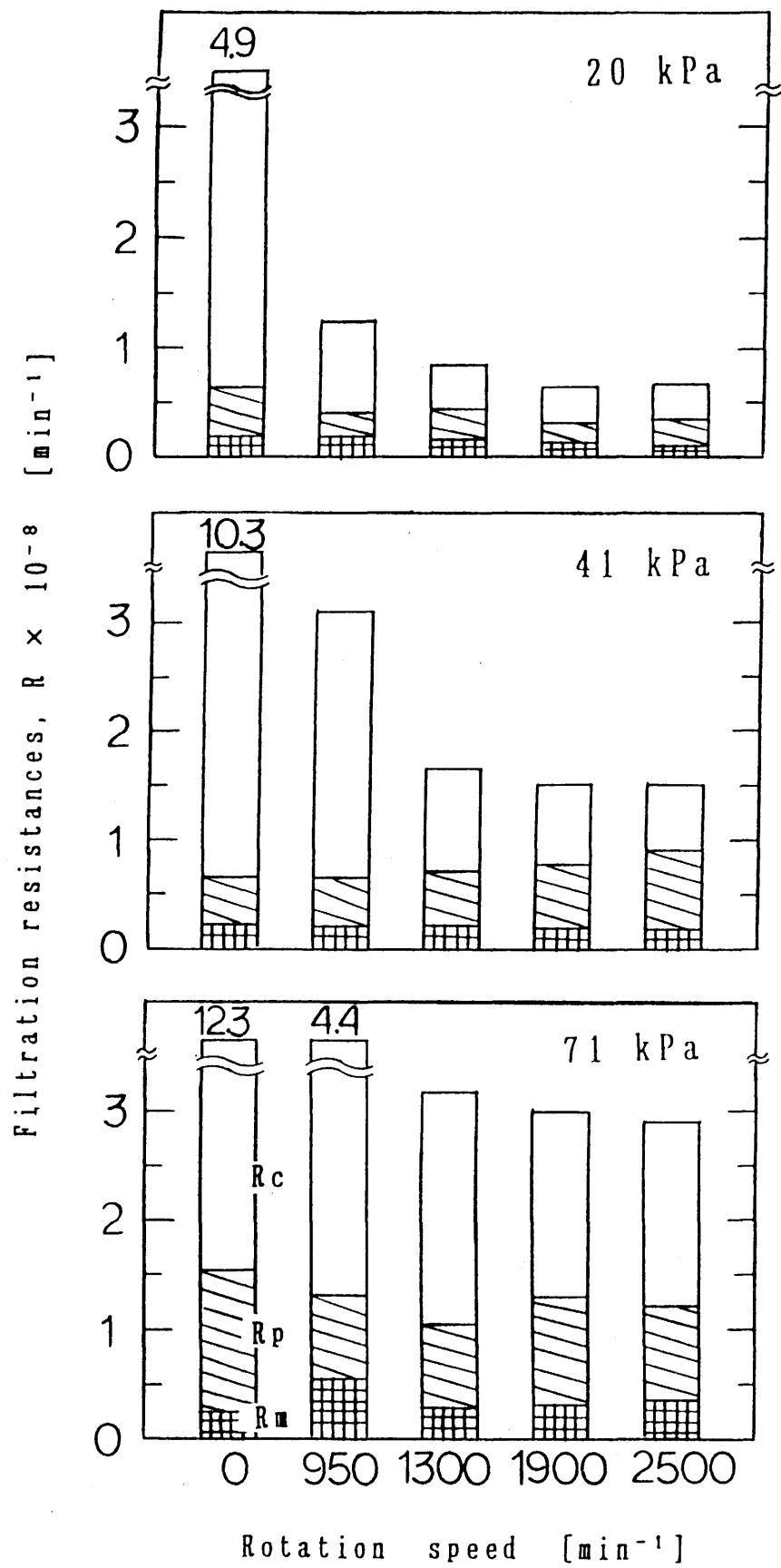


Fig. 2-4 Filtration resistances under unaerated condition.
 □ R_c , ▨ R_p , ▩ R_m

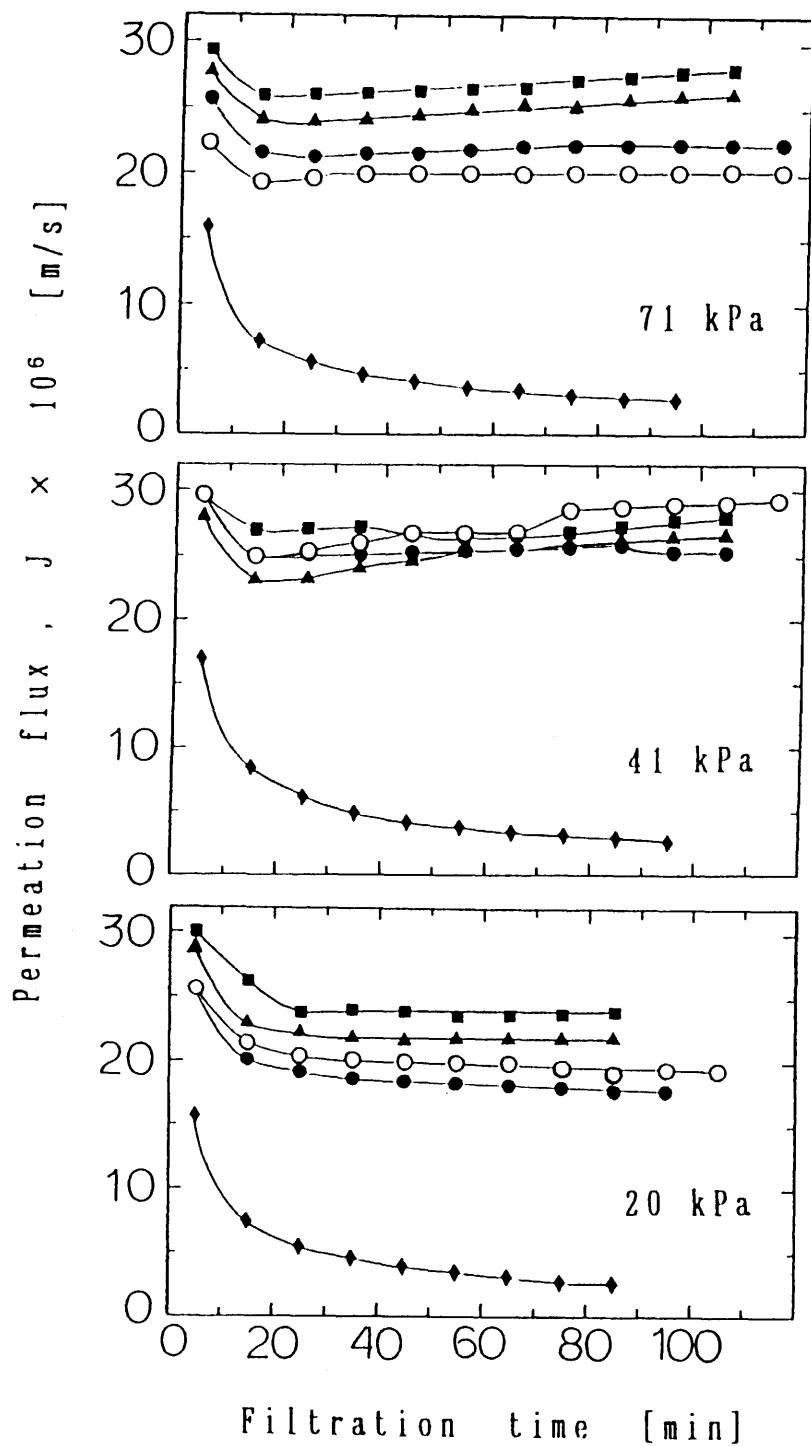


Fig. 2-5 Effects of the rotating speed and filtration pressure on the permeation flux under aerated condition.

Rotation speed (min⁻¹): ◆ 0, ● 950, ○ 1300, ▲ 1900, ■ 2500



Photo 2-3 Cake layer observed on the surface of ceramic membrane after filtration experiment.

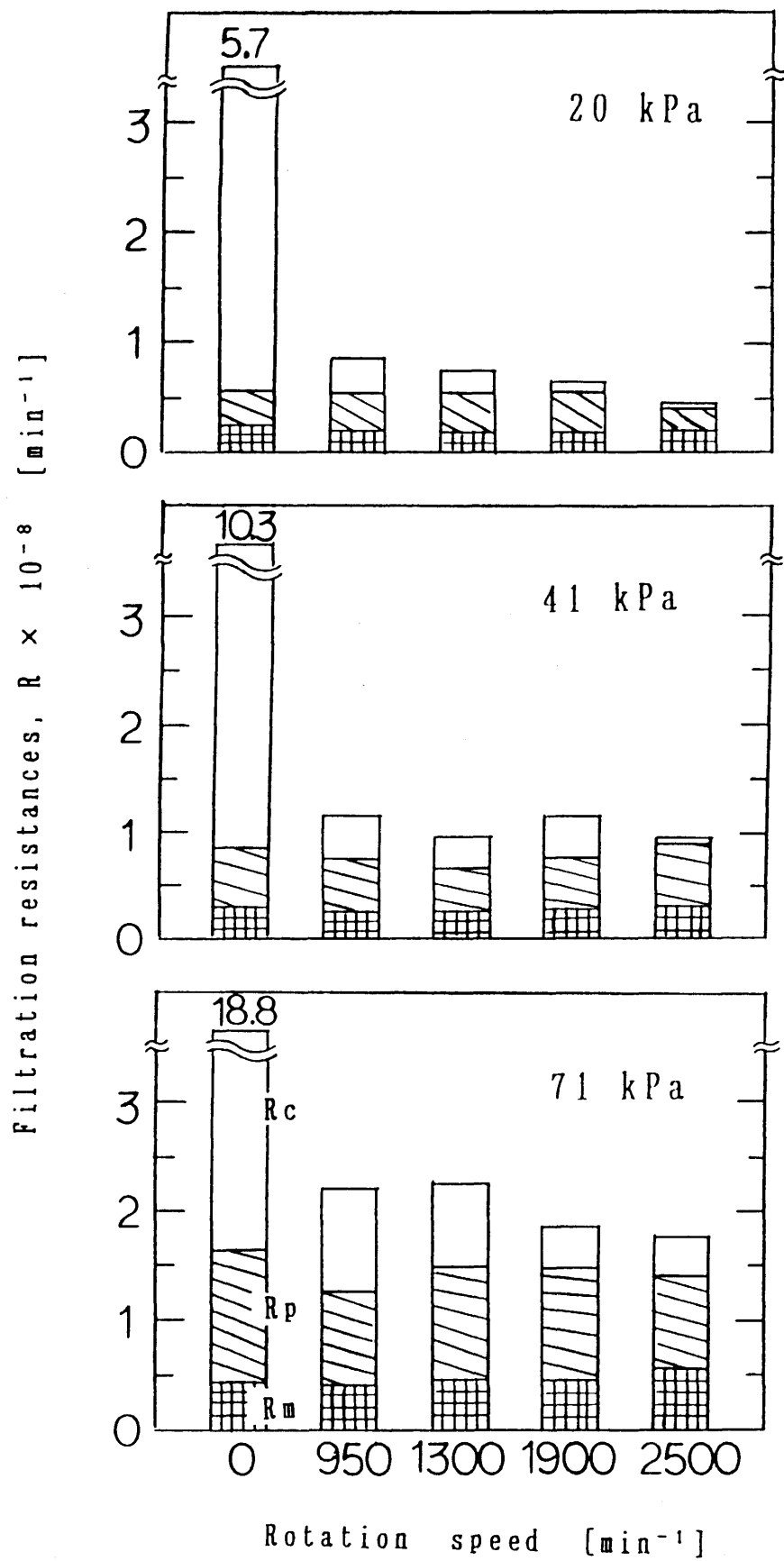


Fig. 2-6 Filtration resistances under aerated condition.

□ R_c , ▨ R_p , ▩ R_m

ろ過圧力で、膜回転速度の増加に伴いケーキ層抵抗 R_c が減少している。したがって 2500 rpm以上の膜回転速度を与えれば、更にケーキ層抵抗を低減できることが考えられた。目詰まり抵抗 R_p は、ケーキ層の存在によるダイナミック効果により、ほぼ一定に保たれたと考えられた。

3) 通気系と無通気系の比較

無通気系及び通気系の定常透過流束を比較した図を Fig. 2-7に示した。無通気系では、ろ過圧力が定常透過流束に影響を及ぼさなくなる限界圧力が、17 kPa以下であるのに対し、通気系では限界圧力は、20~38 kPaとなり、通気によってろ過圧力の効果が低減されることが明らかとなった。定常透過流束は無通気系より通気系の方が大きくなる結果となった。通気系ではケーキ層が十分に掃流されていないにもかかわらず大きな定常透過流束が得られたことから、通気による気泡がケーキ層の形成やろ過抵抗になんらかの影響を及ぼしていることが考えられた。

ろ過圧力 71 kPaでの通気系及び無通気系のろ過抵抗を比較した図を Fig. 2-8に示した。両者の定常透過流束の差は、付着層による抵抗 R_c であることがわかる。装置のハウジングをプラスチック製の透明なものにして気泡の挙動を観察すると、気泡は遠心力により膜表面に集まることが確認された。この気泡の存在が、通気系において形成されるケーキ層の圧密化を防ぐと考えられ、ろ過抵抗が小さいケーキ層が形成されると推察された。また、通気系においてろ過圧力の効果が低減することも、膜表面に観察された気泡の影響であると考えられた。

4) クロスフローろ過との比較

本実験で得られたデータを、日本ガイシ（株）の無通気系で得られたデータと比較した結果を Table 2-3に示した。酵母懸濁液濃度とろ過圧力は多少の差があるが、周速度は同じである。この結果より、得られる定常透過流束は、回転型ろ過

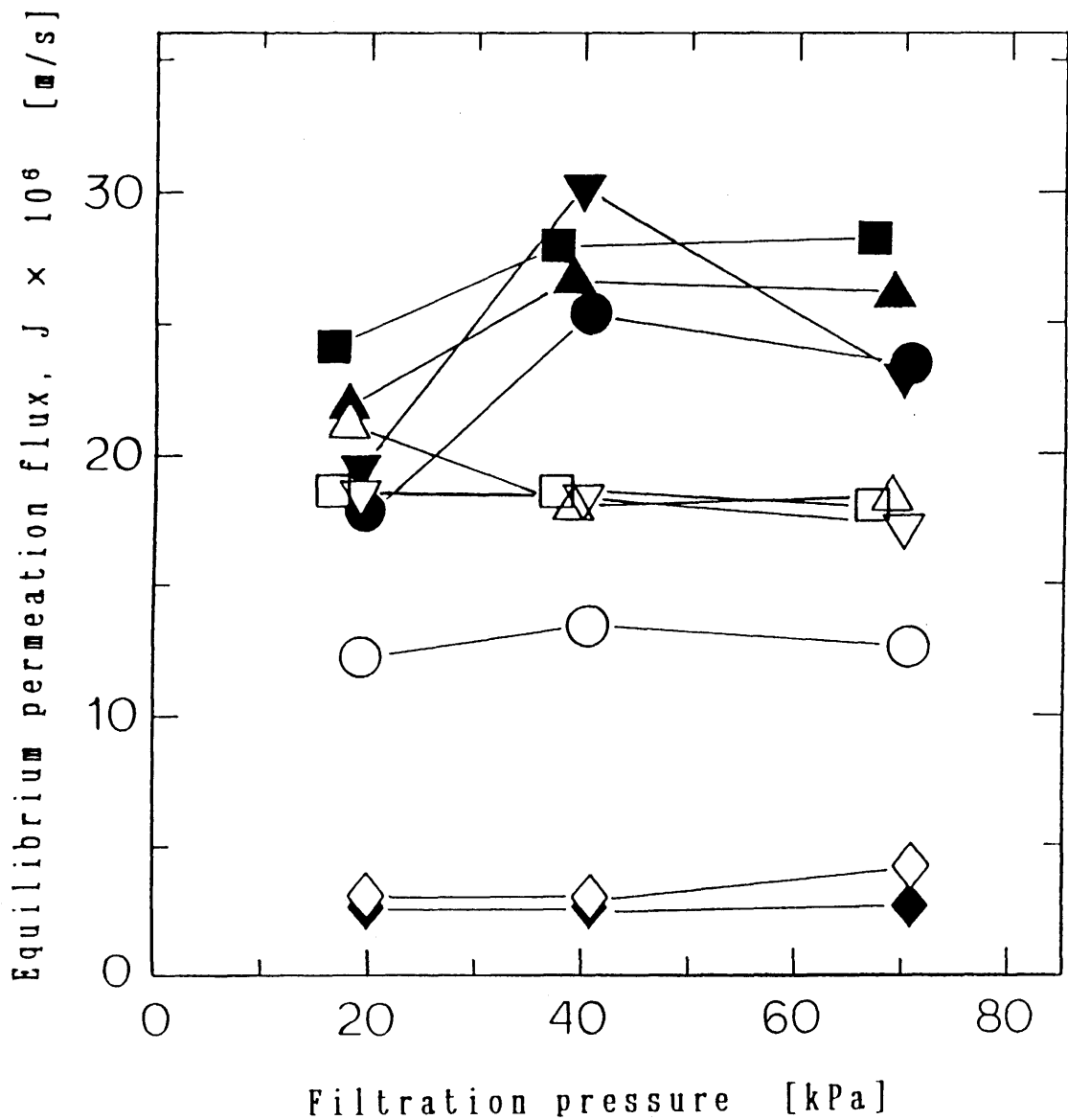


Fig. 2-7 Differences in equilibrium permeation flux under un-aerated and aerated conditions. Rotation speed (min⁻¹): \diamond 0, \circ 950, ∇ 1300, \triangle 1900, \square 2500, where open and closed key show un-aerated system and aerated system, respectively.

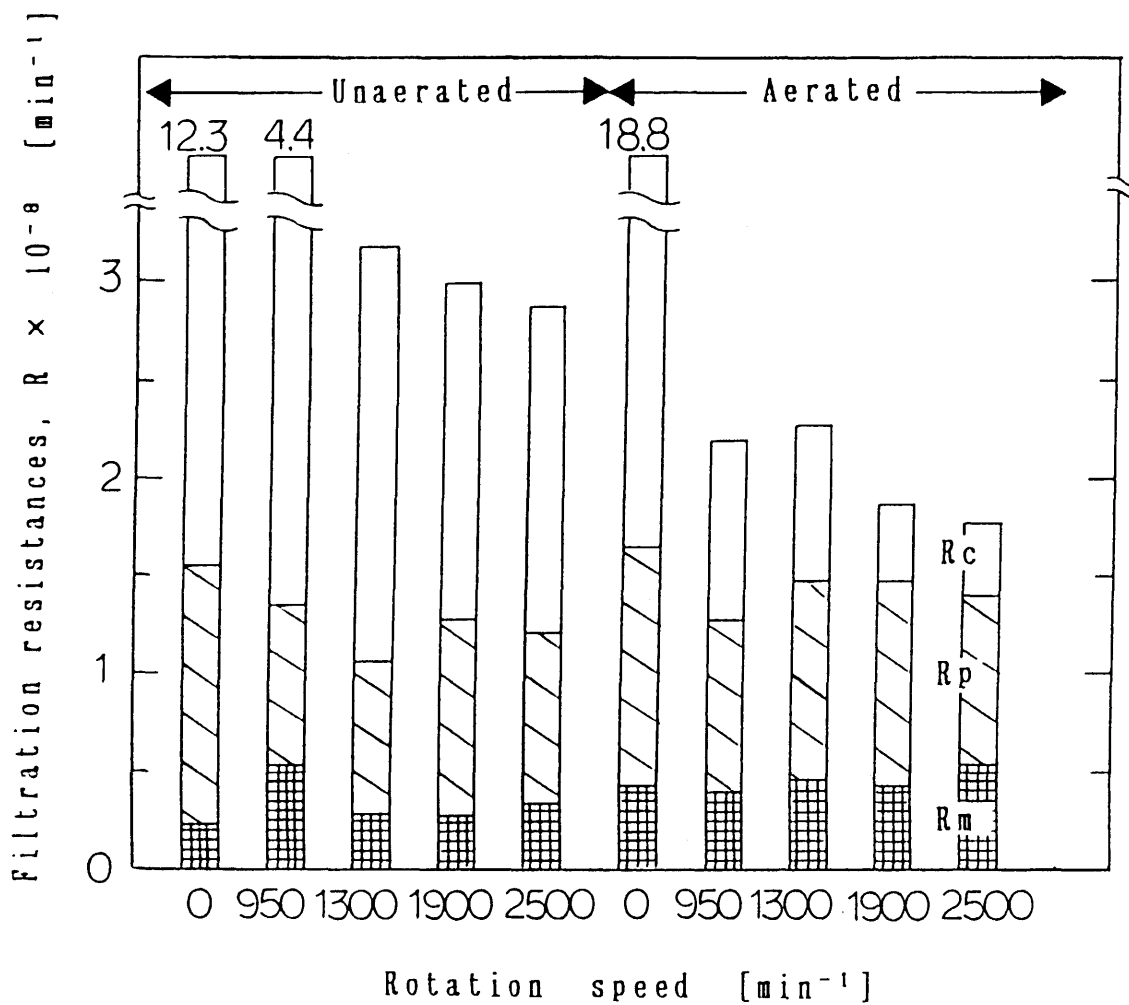


Fig. 2-8 Filtration resistances obtained at a constant filtration pressure of 71 kPa. \square R_c , ▨ R_p , ▩ R_m

Table 2-3 Permeation flux between rotating filtration and static cross-flow filtration.

	Yeast conc. [wt %]	Filtration pressure[kPa]	Rotation speed [min ⁻¹]	Tip velocity [m/s]	Filtration flux [m/s]
Rotaing filtration [Aerated condition] (This work)	5.1	39	1900	3.0	2.67×10^{-5}
Rotaing filtration [Un aerated condition] (This work)	5.0	39	1900	3.0	1.83×10^{-5}
Rotaing filtration (Nihon Gaishi Co.)	4.5	49	1200	3.0	2.03×10^{-5}
Static cross-flow filtration (Nihon Gaishi Co.)	4.5	49	-	3.0	1.58×10^{-5}

装置の方がクロスフローろ過装置よりも大きいことが分かる。また本実験で得られた無通気系の定常透過流束は、日本ガイシのものより僅かに小さかったが、通気系で得られた定常透過流束は、日本ガイシのデータと比較しても大きな値であることが分かった。これらのことから、本研究で用いた回転型セラミック膜分離装置においては、気泡が定常透過流束を増加させる有効な働きをしていることが確認され、本回転型セラミック膜装置が、気泡を伴う微生物培養系に応用するのに適していることが示唆された。

2-4 回転型セラミック膜分離装置を用いたリジン発酵

2-4-1 実験材料および方法

使用菌株：リジン生産性の野性株として *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21942を用いた。寒天スラント培地にこれを植菌し、30℃で 24 h 静置培養したものを 4℃で冷蔵した。

基質と培養方法：菌の賦活のため、寒天スラント培地に植菌し 30℃で 12 h 静置培養した。ついで、三角フラスコ中の 100 ml の種培地に植菌し 30℃、300rpm で 24時間の振とう培養を行った。こうして得られた種培養液 200 ml を 1.3 l の本培養培地が入った発酵槽に移し、本培養を開始した。それぞれの培地組成は Table 2-4 に示した。培養装置は Fig. 2-9 に示した。本培養は、攪拌速度 900 rpm、通気は流速 1 l/min (2/3 vvm) で溶存酸素濃度を 3 ppm に保ち、温度及び pH は、それぞれ 30℃及び 6.8-7.0 で行った。pH は 2 N NaOH 及び 20 % H₃PO₄ を自動制御により供給して調製された。発泡は、消泡剤の添加により抑制した。

培養は最初回分培養によって行い、培地中のグルコースが消費された時点より回転型セラミック膜分離装置を用いた灌流培養に移行した。新鮮培地の供給によ

Table 2-4 Composition of media for lysine fermentation.

Component	Seed medium [g/l]	Production medium [g/l]
Glucose	10	100~300
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	25
K ₂ HPO ₄	0.4	1
KH ₂ PO ₄	0.4	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4	0.4
Urea	2	—
Peptone	10	5
Yeast extract	10	5
Casamino acid	1	0.5
NaCl	1	2
FeSO ₄	—	0.002
CuSO ₄	—	0.001
Thiamine	—	0.001
Biotin	—	0.0004

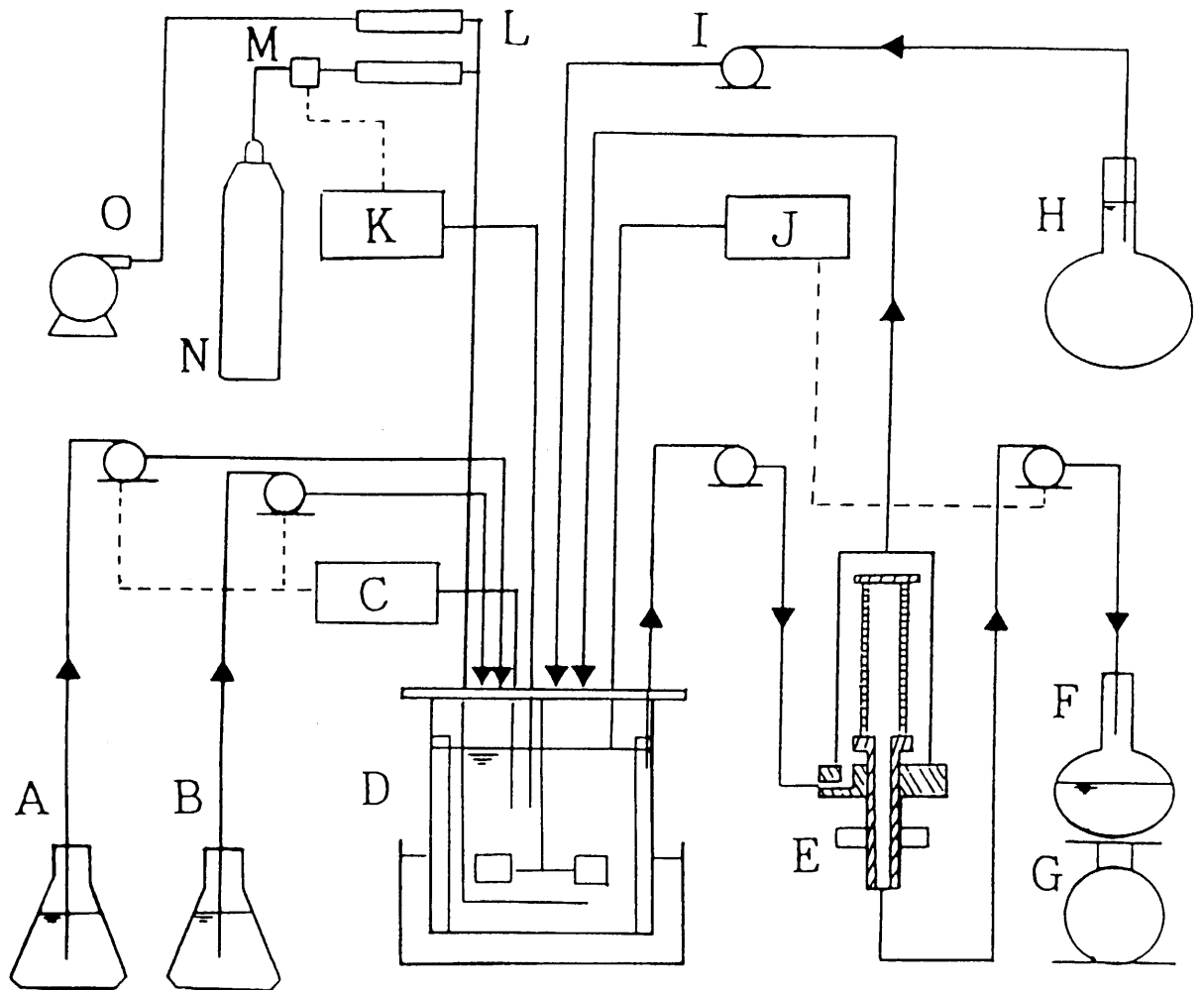


Fig. 2-9 Schematic diagram of perfusion culture with cell recycling. A, alkaline solution; B, acid solution; C, pH controller; D, fermentor; E, rotating ceramic membrane module; F, filtrate; G, balance; H, medium; I, peristaltic pump; J, level controller; K, D.O. controller; L, flow meter; M, solenoid valve; N, cylinder; O, air compressor.

り稀釈率は、 0.43 day^{-1} で一定に保ち、新鮮培地のグルコース濃度は、培養の経過とともに 294 g/l まで増加させた。回転型セラミック膜分離装置への培養液の供給は、流速 $1.6 \times 10^{-5} \text{ m}^3/\text{s}$ で行った。発酵槽内の培養液量を一定に保つため、レベルコントローラーで制御されたペリスターポンプを用いた抜取りによりろ過を行った。膜回転速度は、 1900 rpm に設定した。

分析方法： 乾燥菌体重量は、孔径 $0.8 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルター（東洋濾紙）で培養液を吸引ろ過し 105°C で 12 h 乾熱した後、メンブレンフィルターの重量を測定し、ろ過前後のメンブレンフィルターの重量差より求めた。グルコース濃度は、グルコーステストキット C（和光純薬工業）を用いて測定した。L-リジンの濃度は、ニンヒドリン法により分光光度計を用いて 425 nm の吸光度を測定して求めた。ニンヒドリン法の手順は以下の通りである。

- ① $6\text{N H}_3\text{PO}_4$ 0.4 ml に対し酢酸 0.6 ml を混合した溶液を 70°C に加熱してニンヒドリン試薬 0.025 g を溶かし、ニンヒドリン溶液を作る。
- ② サンプル 1 ml にニンヒドリン溶液 1 ml と酢酸 1 ml を加えパラフィルムで密封して 100°C で 1 時間 放置する。
- ③ 室温まで冷却してから酢酸を加え、全量を 5 ml にする。
- ④ 分光光度計（島津製作所、UV-140-02）で 425 nm の吸光度を測定する。

2-4-2 結果および考察

回転型セラミック膜分離装置を用いた灌流培養を *C. glutamicum*に応用した結果をFig. 2-10に示した。培養は約 150 時間 続けられ、最終菌体濃度は 120 g/l に達した。菌体濃度の増加に伴ってリジン濃度も増加し、回分培養の 2.5 倍の 22 g/l に達した。また、リジンの生産性は回分培養の 3 倍となった。この培養では稀釈率が一定であるためリジン濃度が上昇し、菌の増殖が 80 h 以降停止したと考え

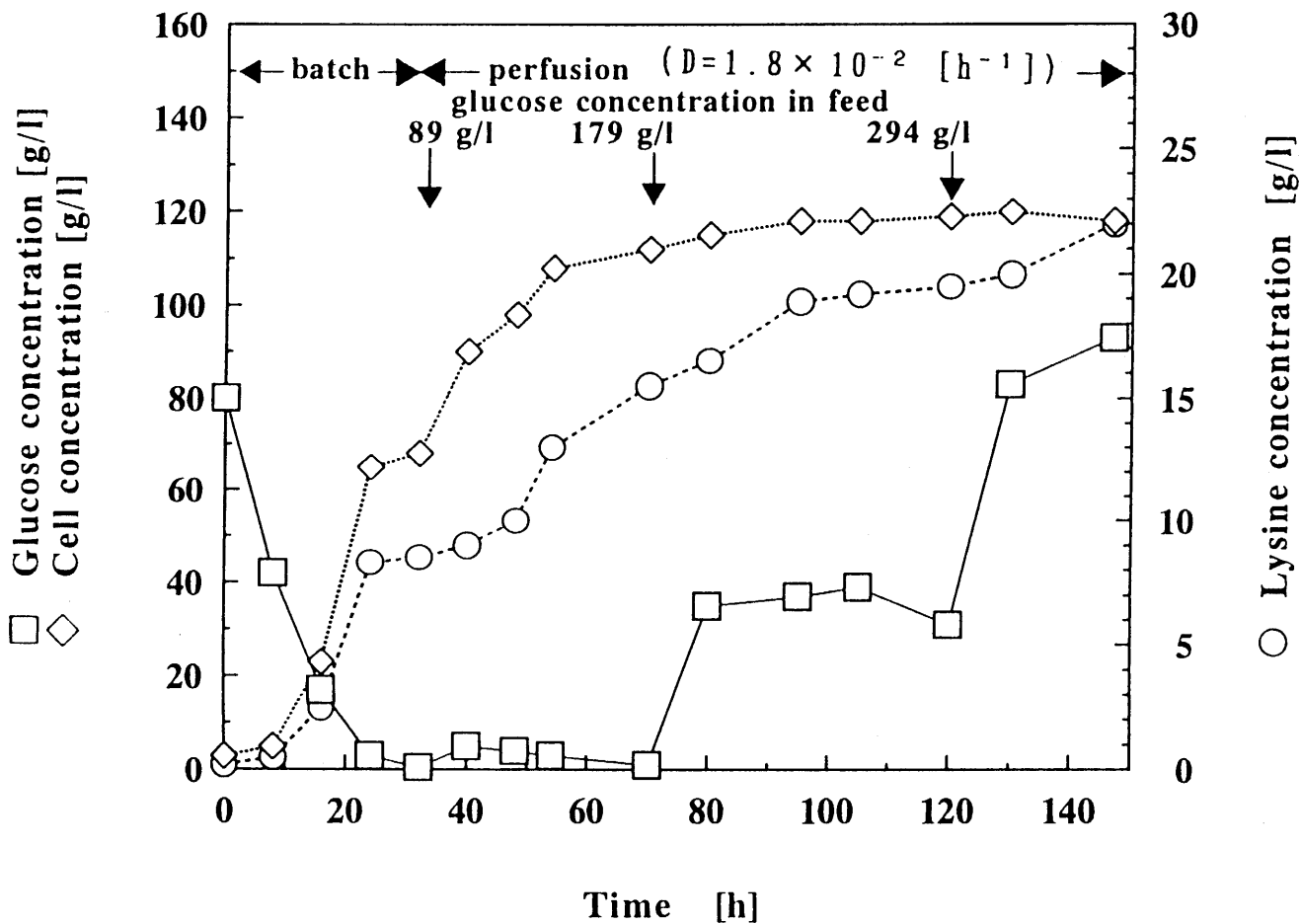


Fig. 2-10 Time course of lysine production by perfusion culture using rotating ceramic membrane module.

られた。稀釈率をリジン生産速度とともに大きくすれば、更に菌体濃度およびリジンの生産性を改善できたと考えられる。また、高い菌体濃度にもかかわらずこの培養期間中において膜のファウリングは起らなかった。これらの結果から、本回転型セラミック膜分離装置が長期間の灌流培養による高密度培養にも十分に耐えられるろ過性能を持つことが確認された。

2-5 結論

従来のクロスフローろ過装置や回転型ろ過装置と比較して膜面とハウジングの間隙が大きい回転型セラミック膜分離装置を試作し、そのろ過特性と性能について検討を行った。本研究で得られた結論を以下に述べる。

(1) 回転型セラミック膜分離装置によるろ過において、無通気系では膜の回転によりケーキ層は掃流されるが、ゲル層は掃流されずに残った。したがって必要なせん断応力を与えれば、テイラー渦流が無くてもケーキ層が掃流されることが明らかとなった。

(2) 通気系における回転型セラミック膜分離装置の運転においては、気泡の影響によりろ過圧力の効果および膜の回転によるケーキ層の掃流効果が低減される。

(3) 通気系において形成されるケーキ層は、気泡によって圧密化が抑制されるため透過抵抗が小さい。このため通気系では、無通気系よりも大きい定常透過流束が得られる。

(4) 回転型セラミック膜分離装置は、菌体濃度が 120 g/l におよぶ高密度培養においても 150 時間の培養期間中ファウリングを起こさず灌流培養が行えた。したがって回転型セラミック膜分離装置は、灌流培養により微生物の高密度培養を実現する菌体分離装置として十分なるろ過性能を持つと言える。

3-1 序

プロピオン酸菌は一般的にチーズの生産に利用されている菌として知られているが、ビタミン B₁₂生産菌の一つとしても用いられている。ビタミン B₁₂は、人体内において炭水化物、脂質、アミノ酸および核酸の代謝において必要な補酵素であり、10種以上の生化学反応に関与していることから、食料品や各種栄養剤の微量添加物として重要な成分の一つである⁹²⁾。また、ビタミン B₁₂は、悪性貧血の特効薬として広く用いられており、脳の活性を促進することから痴呆症の予防および治療薬としても期待されている⁹³⁾。このようにビタミン B₁₂は医薬品としても需要が大きく、将来的にも新たな需要が生み出されることが期待できるが、現状では1 kg当り 1000万円オーダーで供給されており、安価に安定的に供給されているとは言えない。この理由の一つは、ビタミン B₁₂の化学構造が極めて複雑であり、化学的合成が非常に困難なため生産を発酵法に頼らざるを得ないことである⁹³⁾。プロピオン酸菌を用いたビタミン B₁₂の生産は、従来回分または流加培養で行なわれてきた。プロピオン酸菌によって生産されたビタミン B₁₂は、菌体外に放出されず菌体内に保持されるため、ビタミン B₁₂の生産性を向上させるためには高密度培養が有効と考えられる。しかし、副生産物として分泌される酢酸やプロピオン酸が菌の増殖を強く阻害するため、回分培養や流加培養では高い菌体濃度を得ることは困難であった¹⁹⁾。

本章で検討する灌流培養は、新鮮培地を連続的に供給する一方で、膜分離により菌体はリアクター内にとどめながら培養液の排出を行なう連続的な培養法である。灌流培養においては、新鮮培地を供給することにより増殖阻害物質を洗い流すこと、すなわち稀釈効果によりその濃度を低く抑えることが可能と考えられる。

したがって、増殖阻害の軽減による菌体の高密度化が期待できるため、ビタミン B₁₂の生産性を向上させることが可能であると考えられる。

そこで本章では、回転型セラミック膜分離装置を用いて灌流培養を行い、プロピオン酸菌の高密度培養を試みた。また、その結果から効率的なプロピオン酸菌の高密度培養システムについて考察した。

3-2 実験材料及び方法

使用菌株と種菌培養：ビタミン B₁₂生産菌として知られる Propionibacterium freudenreichii ATCC 8262 (別名：Propionibacterium shermanii) を使用した。ライヒマニ接種用培地 (日水製薬、05803) に寒天 1.5 %を添加して作製した高層寒天培地に穿刺培養し、嫌氣的に 30 °Cで 3~4日間培養した後、3~10 °Cで保存した。菌の植え継ぎは 1~2ヶ月毎に行った。

P. freudenreichiiを賦活するため、増殖培地 20 mlの入った試験管に保存培地から植菌し、BBL GasPak (BECTON DICKINSON) を用いて嫌気状態にした嫌気ボックス中で試験管培養を 30 °Cで 72 時間行った。この培養液 1.25 mlを125 mlの増殖培地が入った三角フラスコに移し、これを嫌気状態にして 30 °Cで 72 時間培養を行い種菌とした。培地組成を Table 3-1に示した。

コーンステープリカー(CSL)：培地成分の一つとして使用した CSLは明治製菓 (株) より譲与して頂いた。CSLはコーンスターチを製造する場合の副産物であり安価であるうえ、灰分、ビタミン及びアミノ酸などを豊富に含むため古くから発酵工業において用いられている⁹³⁾。一般的な CSLの組成を Table 3-2に示した。

Table 3-1 Composition of media for vitamin B₁₂ fermentation.

Component	Seed medium [g/l]	Production medium [g/l]
Glucose	25	15~150
CSL	40	80 1)
NH ₄ NO ₃	3	-
KH ₂ PO ₄	0.4	0.4
CoCl ₂ · 6H ₂ O	-	0.045
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.01	0.01
NaHPO ₄ · 12H ₂ O	1.5	1.5
Nicotinamide	-	0.03
Calcium pantothenate	0.01	0.01
Anti foam (BC-51Y)	-	0.1
CaCO ₃	10	-

1) Solid substances were removed by filtration using filter paper after the pH of CSL was adjusted to 7 by adding 25 % ammonia solution and boiling for 5 min.

Table 3-2 Components contained in CSL

Component	Per cent [wt. %]
Solids	40 ~ 60
Lactic acid	12 ~ 27
Total nitrogen	7.4 ~ 7.8
Amino nitrogen	2.6 ~ 3.3
Reducing sugars	1.5 ~ 14
Ash	18 ~ 20

回分及び流加培養：種菌培養で得られた培養液を 2.7 l (流加培養では 1.5 l) の培地が入った 3 l 容量の発酵槽に接種して、本培養を開始した。本培養は、温度 30 °C、攪拌速度 150 min⁻¹で行い、pHは 5N アルカリ液 (3N NH₄OH + 2N Na₂CO₃) の供給を pHコントローラーで自動制御することにより 6.5に保った。また、嫌気状態を保つため、窒素ガスを 1/40 vvmで液相通気した。流加培養における培地の供給は、アルカリ液と連動して行った。

灌流培養：まず最初に回分培養を行い、培地中のグルコースが消費された時点で新鮮培地の供給を開始し、連続培養に移行した。培地の供給速度及び供給培地のグルコース濃度は、培養経過に応じて増加させた。ワーキングボリュームを一定を保つため、培養液の採取は、セラミック膜によって菌体が除去された培養液をレベルコントローラーで制御されたペリスターポンプで抜き取ることで行った。回転型セラミック膜分離装置の膜回転速度は、1300 rpmに設定した。培養装置図を Fig.3-1に示した。

分析方法：乾燥菌体重量は、孔径 0.8 μmのメンブレンフィルター (東洋濾紙) で培養液を吸引ろ過し、105 °Cで 12時間メンブレンフィルターを乾熱して重量を測定し、ろ過前後の重量差より求めた。

グルコース濃度は、グルコーステスト C (和光純薬工業) により分光光度計を用いて波長 505 nmにおける吸光度を測定して求めた。

酢酸及びプロピオン酸濃度は、培養液を 3500 rpmで 10分間遠心分離して得られる上澄みをサンプルとしてガスクロマトグラフィー (島津製作所、GC-8A) を用いて測定した。測定においては、内部標準液としてエタノールを用いた。測定条件は Table 3-3に示した。

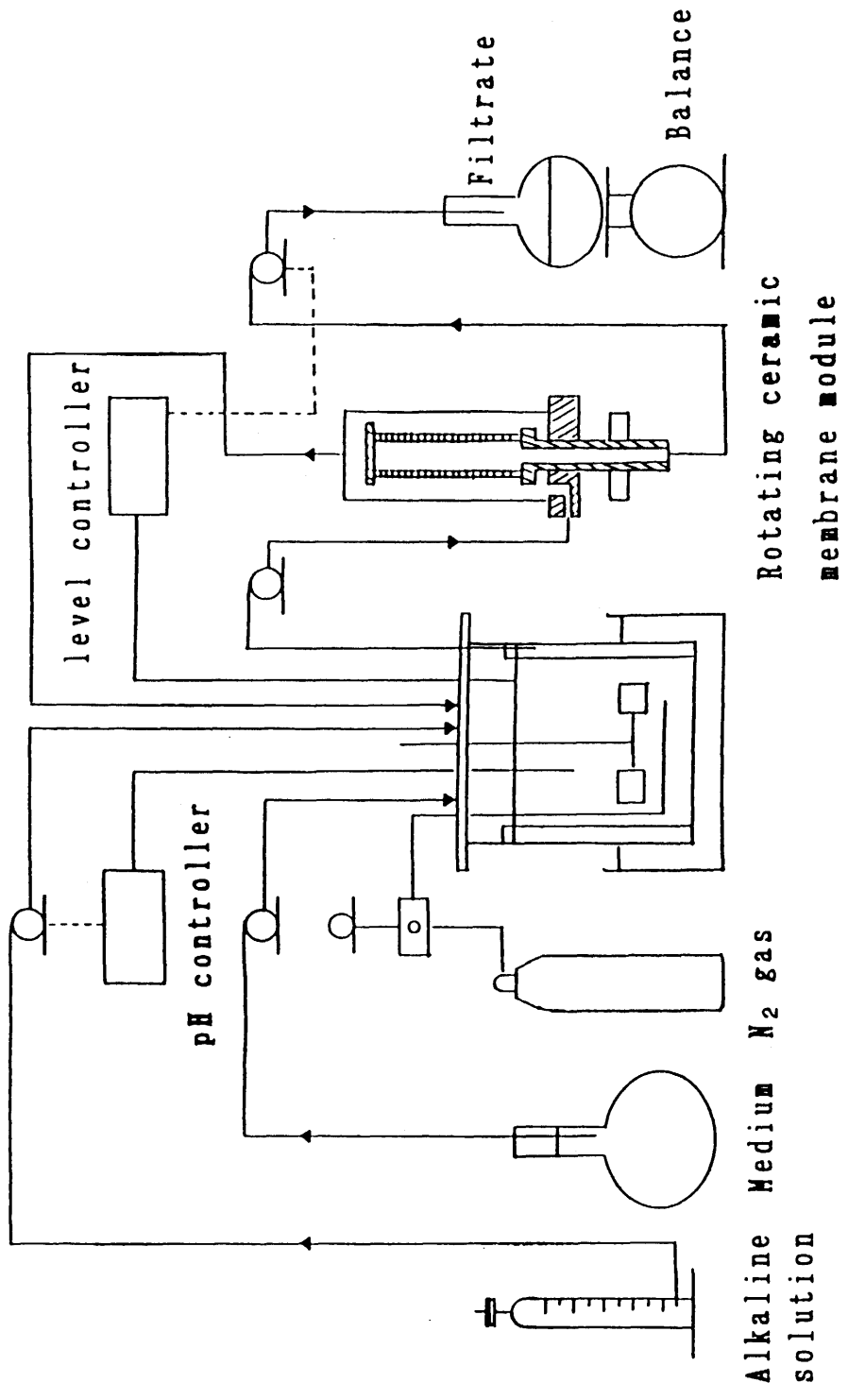


Fig. 3-1 Schematic diagram of perfusion culture coupled with rotating ceramic membrane module.

Table 3-3 Analytical condition of organic acid by gas chromatography.

Analyzer	Shimazu GC-8A
Detector	FID
Carrier gas	N ₂
Column temp. [°C]	190
Injector temp. [°C]	210
Sample size [μl]	1

Column description	
Packing material	Porapak Type Q
Length [m]	2
Inside diameter [mm]	3.2

3-3 結果および考察

3-3-1 プロピオン酸菌の流加培養

従来行われてきた流加培養の結果について確認するため、プロピオン酸菌の流加培養を行った。培養結果を Fig. 3-2 に示した。培養時間 138 時間までは菌体濃度は増加し続け、最大菌体濃度は 16.7 g dry-wt/l に達した。しかし、それ以降は一定となっている。これはプロピオン酸濃度が約 30 g/l まで増加したため、菌の増殖が完全に阻害されたためと考えられた。酢酸と比較してプロピオン酸の毒性が強いことが報告されており¹⁹⁾、プロピオン酸濃度が 30 g/l 付近に達すると増殖がほとんど期待できないことが確認された。この結果より、流加培養ではプロピオン酸が蓄積するため、プロピオン酸が増殖阻害レベル (約 30 g/l) に達するまでしか菌体濃度の増加は期待できないことが明らかである。

3-3-2 プロピオン酸菌の灌流培養

膜分離を用いた灌流培養はプロピオン酸濃度を低く抑えるのに有効であると考えられる。Fig. 3-3 は、回転型セラミック膜分離装置を用いた灌流培養の結果である。40 h の回分培養後、新鮮培地の供給を開始し灌流培養へと移行した。新鮮培地の供給による稀釈効果により、プロピオン酸濃度は培養時間 120 時間までは低いレベルに保たれ、培養時間 149 時間までは菌体濃度は増加している。その結果、最大菌体濃度は 52.5 g dry-wt/l に達し、流加培養の 3.1 倍となった。しかし、菌体濃度の増加とともにプロピオン酸生産速度が大きくなり、培養時間 120 時間以降はプロピオン酸濃度を低下させることができていない。そのためプロピオン酸による増殖阻害により、菌体濃度は一定となっている。この培養の平均稀釈率は 0.033 vvh であったが、さらに稀釈率を増加させれば菌体濃度を改善できると考えられた。またこの培養は 300 時間に及ぶ長期間の培養であったが、セラミック

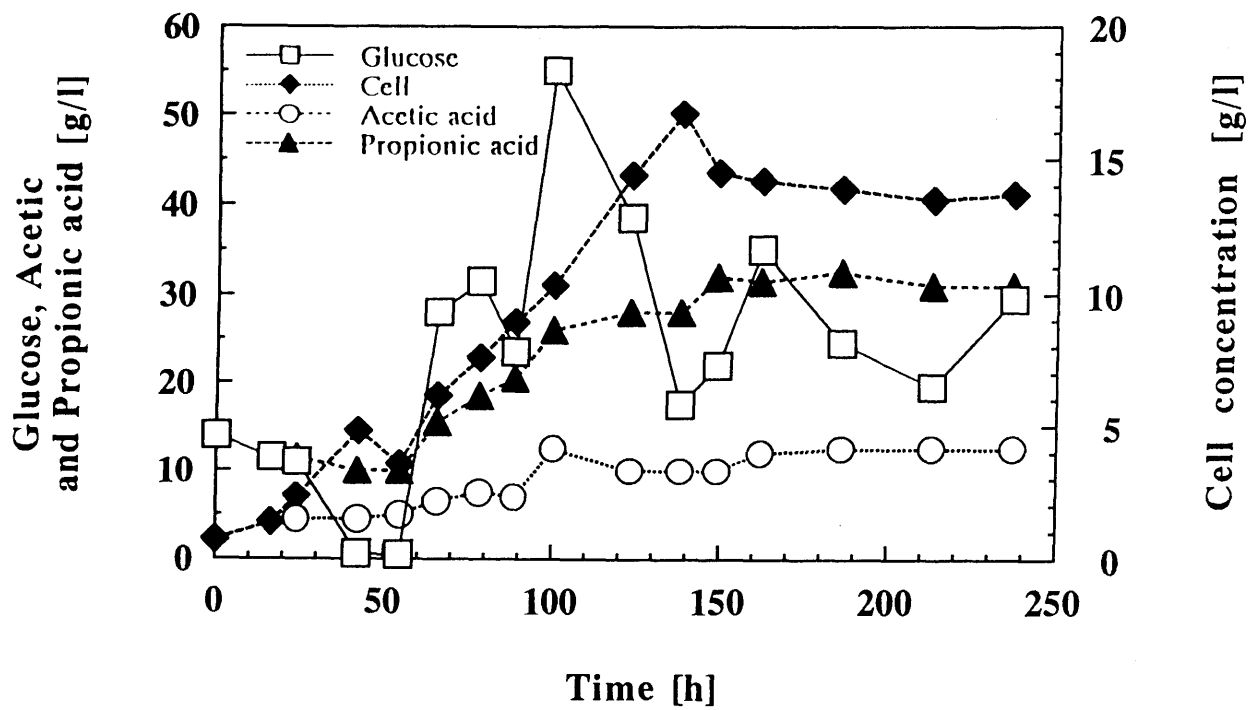


Fig. 3-2 Time course of fed batch culture of *P. freudenreichii*.

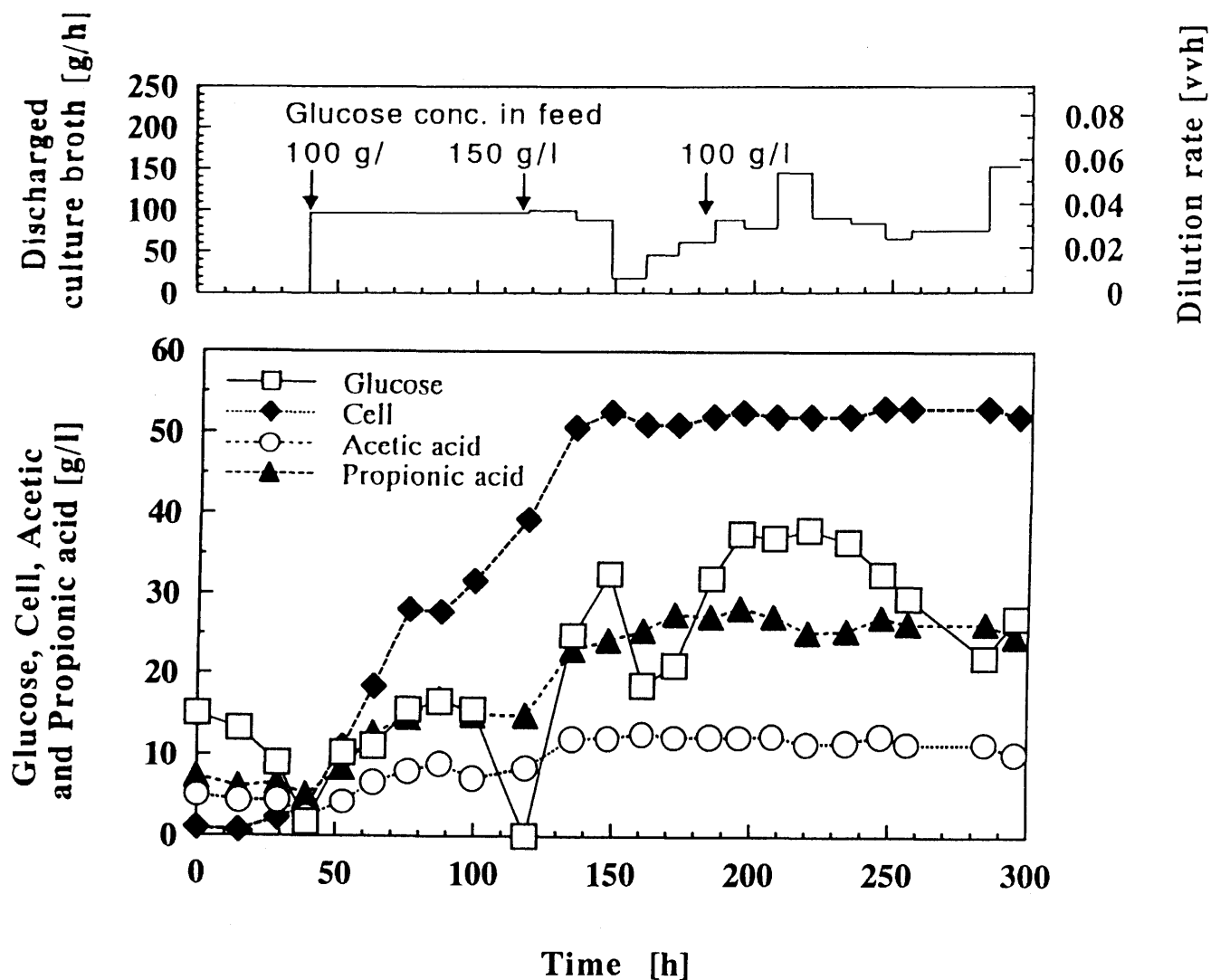


Fig. 3-3 Time course of perfusion culture of *P. freudenreichii* coupled with rotating ceramic membrane module.

ク膜のファウリングは起らなかった。したがって回転型セラミック膜分離装置によるろ過にはまだ余裕があり、更に稀釈率を増加させることが可能と考えられた。

そこで更に高密度な菌体を得るため、菌体濃度の増加に伴って稀釈率を増加させた灌流培養を行なった。その結果を Fig.3-4に示した。52 hの回分培養の後、稀釈率 0.026 vvhで灌流培養を開始した。稀釈率は培養経過に伴って増加され、230 hには 0.11 vvhに達した。その間プロピオン酸濃度は 30 g/l以下に抑えられている。その結果、最終的に菌体濃度は 168 g/lに達した。これは流加培養の10倍の値である。しかし、セラミック膜のファウリングが生じたため、0.11 vvhの稀釈率を維持することは出来なかった。また、270 hには回転型セラミック膜にトラブルが生じたため、培養はやむなく終了した。この培養の結果より、灌流培養において稀釈率を高くしプロピオン酸濃度を低く抑えることにより、飛躍的に菌体濃度を増加させることができることが明らかとなった。

3-3-3 逆洗を伴ったプロピオン酸菌の灌流培養

更に稀釈率を増加させて高い菌体濃度を得るためには、セラミック膜のファウリングを防止しなければならない。そこで回転型セラミック膜装置に逆洗装置を組み込み、灌流培養を行った。培養装置図および培養装置の写真をそれぞれ Fig.3-5および Photo 3-1に示した。結果を Fig.3-6に示した。40 hの回分培養の後、稀釈率 0.029 vvhで灌流培養を開始した。ろ過と共にセラミック膜の逆洗も行った。既往の研究で述べたように逆洗間隔は短い方が良いため、逆洗ポンプを正回転 10 s、負回転 5 sに設定し、10秒のろ過毎に 5秒のろ液による逆洗を行った。ワーキングボリュームを一定に保つため、レベルコントローラーで制御されたペリスターポンプでろ液を系外に抜き取るシステムで灌流培養を行った。稀釈率を培養経過に伴って増加させ、180 hに稀釈率は 0.124 vvhに達したが、セラミック膜にファウリングが生じたため、この値を維持することは出来なかった。し

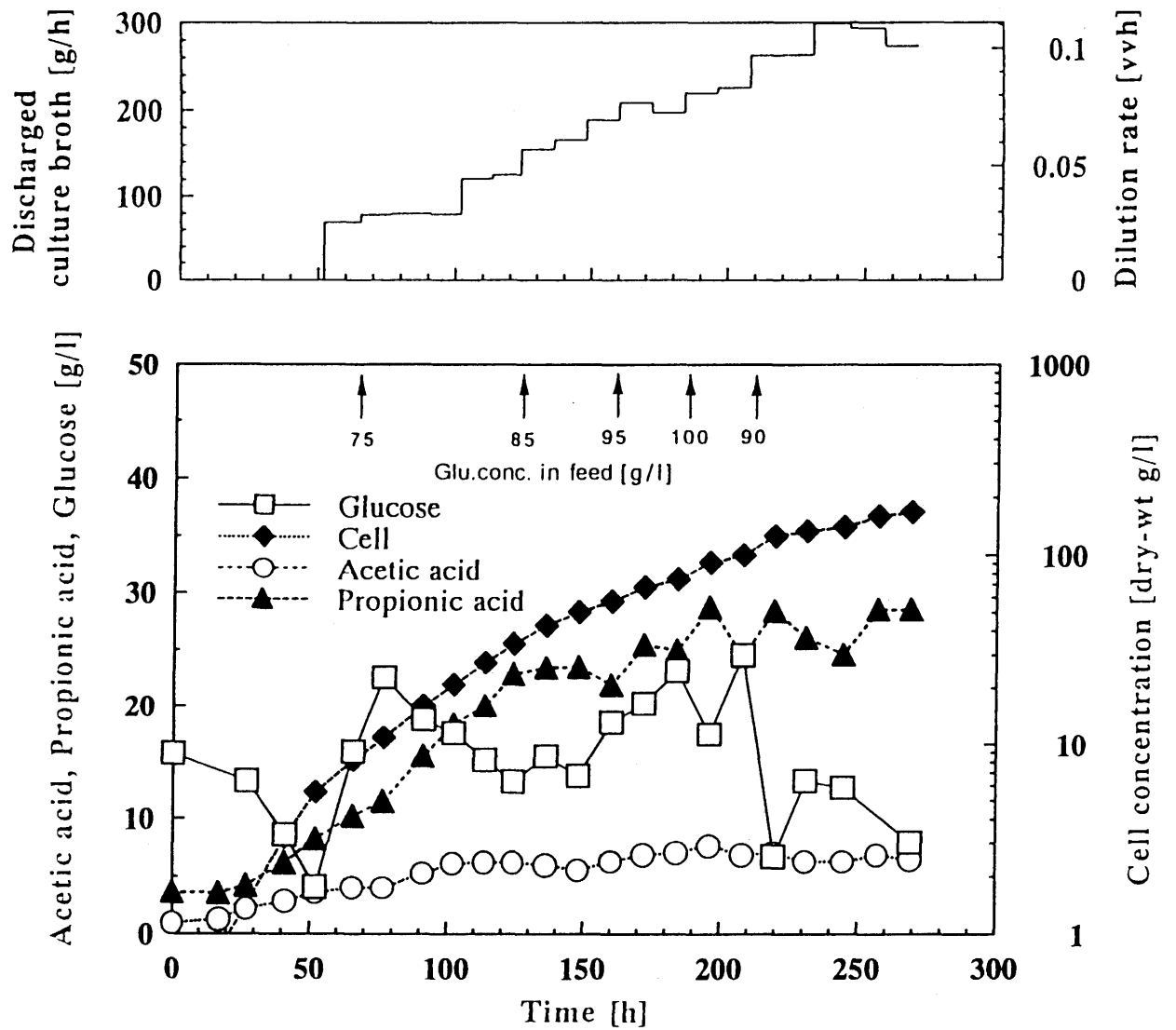


Fig. 3-4 Time course of perfusion culture coupled with rotating ceramic membrane module.

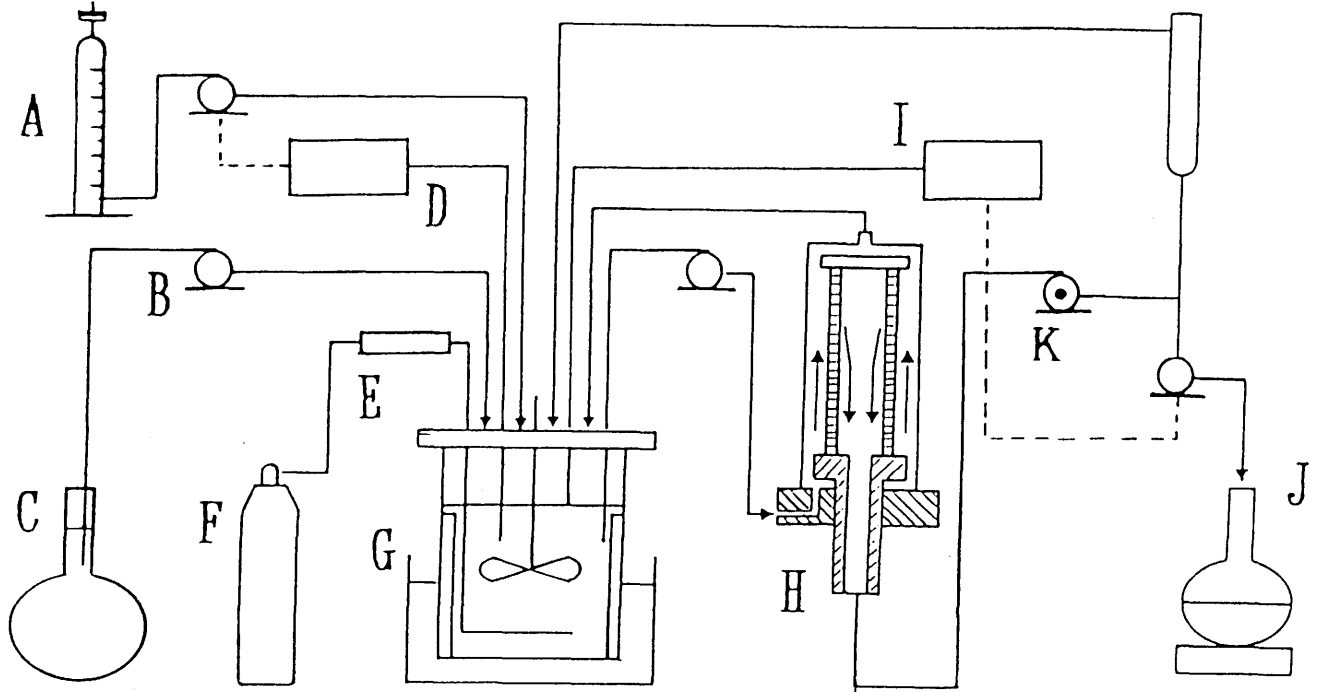


Fig. 3-5 Schematic diagram of perfusion culture coupled with rotating ceramic membrane with back-washing system. A, alkaline solution; B, peristaltic pump; C, medium; D, pH controller; E, flow meter; F, N₂ gas; G, fermentor; H, rotating ceramic membrane; I, level controller; J, discharged culture broth; K, reversible pump.



Photo 3-1 Experimental setup for perfusion culture coupled with rotating ceramic membrane module and back-washing system.

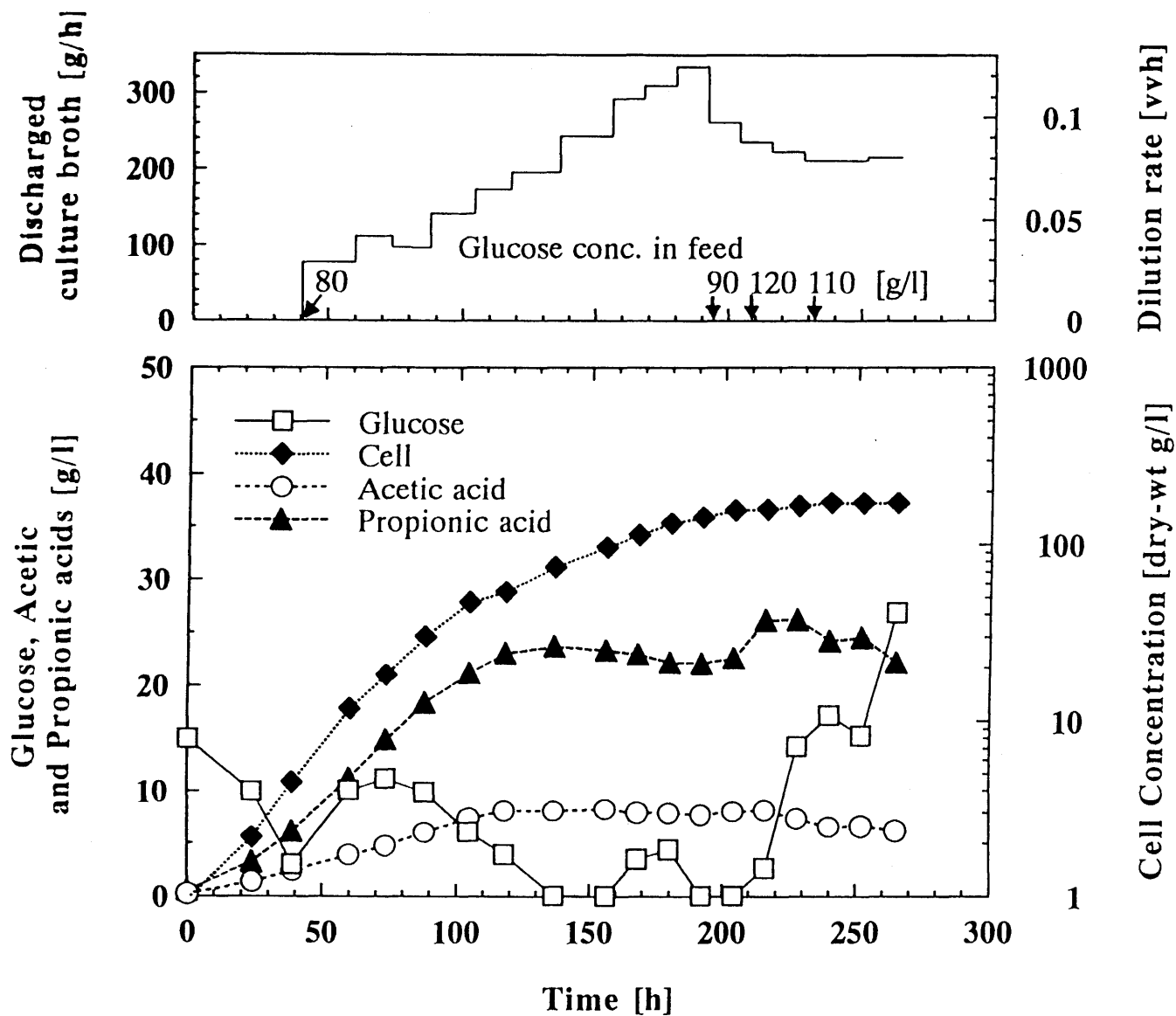


Fig. 3-6 Perfusion culture of *P. freudenreichii* coupled with rotating ceramic membrane module with back-washing system.

かし、この後 0.083 vvhの稀釈率は維持できていることから、ファウリングの原因はセラミック膜に目詰まりが生じたことではなく、高密度菌体によるろ過抵抗の増大のためと考えられた。したがって稀釈率を維持出来なくなった事は、このような高密度菌体条件による透過流束の限界を示していると考えられた。培養は 265 h続けられ、菌体濃度は最終的に 172 g/lに達した。これは流加培養の 10.3 倍の値である。また、この培養によって 6.3 g/lのグルコース、6.8 g/lの酢酸および 21.9 g/lのプロピオン酸を含む 45 lの培養廃液が得られた（膜単位面積当りの透過液量 183 cm³/cm²）。この廃液量は、ワーキングボリュームの 16.7倍に相当する量であった。

プロピオン酸菌の培養の目的は、ビタミン B₁₂の生産である。したがって、いくら高密度な菌体を得られても、菌体あたりのビタミン B₁₂の生産性が低下して、ビタミン B₁₂の生産量が改善されなければ意味がない。そこで、ビタミン B₁₂の比生産速度について検討を行った。ビタミン B₁₂の生合成経路は、大きく分けるとアデノシルコピナマイドを合成する経路、2,5-ジメチルベンズイミダゾール (DMB)を合成する経路およびこれら二つの合成物とリン酸化リボシルを結合させてアデノシルコバラミン（ビタミン B₁₂）を合成する経路の三つの経路から成っている⁹⁴⁾。Fig.3-7にビタミン B₁₂の構造を示した。実際のビタミン B₁₂の生産の現場では、嫌気条件下で十分量の菌体を得た後、DMBを加えて好気条件下においてビタミン B₁₂の誘導を行なっている⁹⁵⁾。

この培養で 40 h、すなわち回分培養から灌流培養へと移行した時の菌体および 180 hの菌体を、それぞれ回分培養で得られる菌体および灌流培養による高密度培養で得られる菌体とした。両者の菌体内のビタミン B₁₂濃度の測定を日本石油（株）に依頼した結果を Table 3-4に示した。アデノシルコバラミン（ビタミン B₁₂）のアデノシルコピナマイド（ビタミン B₁₂前駆体）に対する割合は、回分培養に比較して灌流培養において小さくなっている。これは灌流培養において新

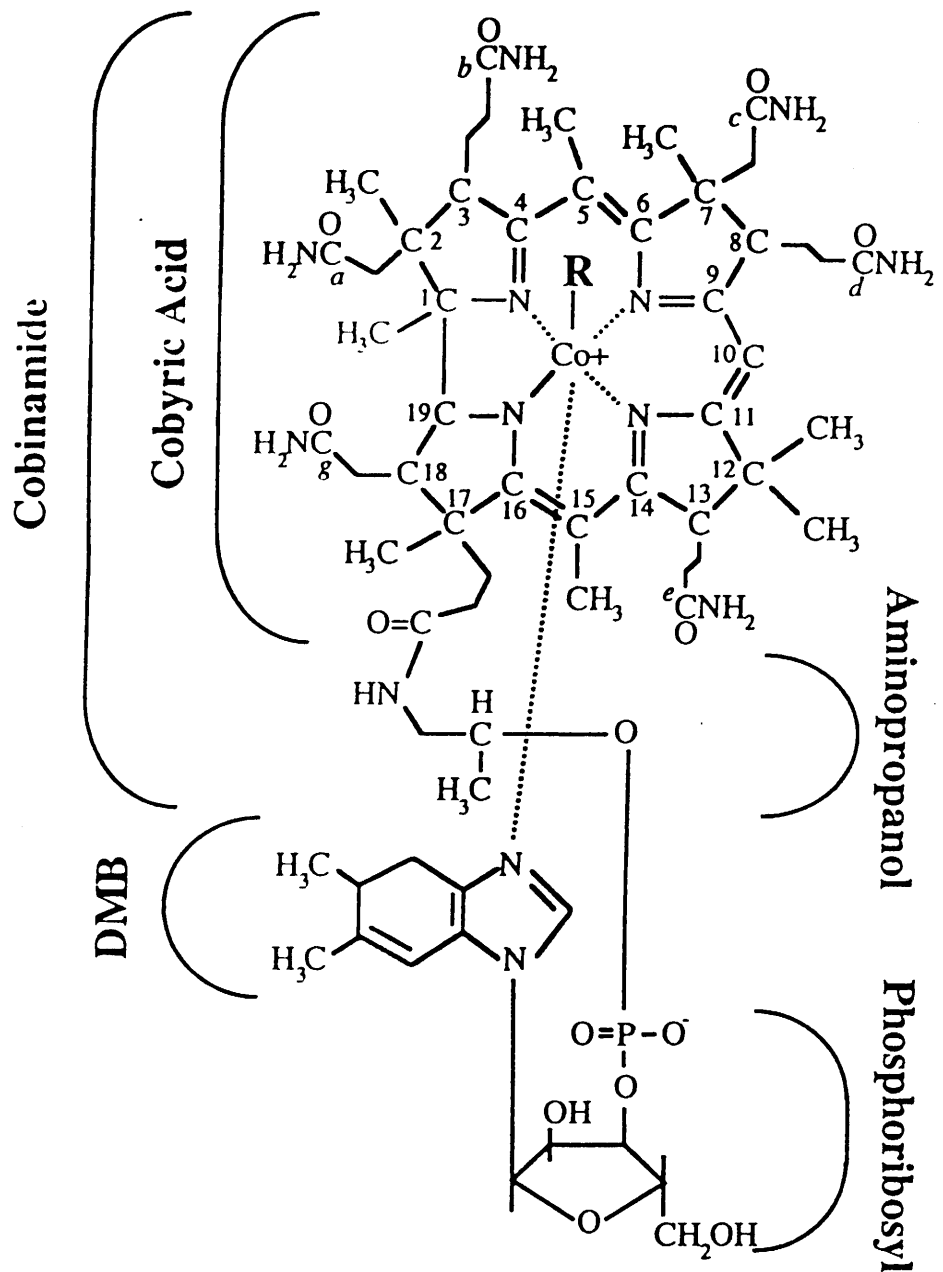


Fig. 3-7 Structure of vitamin B₁₂. Central carbon atoms are numbered; peripheral amidated carboxyl groups are lettered. R groups include CN (cyanocobalamin), CH₃ (methylcobalamin), and adenosyl (adenosyl cobalamin).

Table 3-4 Comparison of intracellular vitamin B₁₂ and its precursor between batch and perfusion culture.

Vitamin B ₁₂ related compound	Concentration of the compound [μ mol/g-cells]	
	Batch culture	Perfusion culture
(1) Adenosyl cobinamide	0.0691	0.1517
(2) Adenosyl cobalamin	0.1521	0.0642
Total concentration of (1) and (2)	0.2212	0.2159

鮮培地の供給に伴って、供給培地中に溶けていた酸素が持ち込まれたためと考えられた。酸素の存在によってアデノシルコピナマイドの比率が高くなることが言われている。したがって灌流培養において新鮮培地を嫌気状態にすれば、アデノシルコピナマイドの割合は回分培養と同等になると思われた。一方、アデノシルコピナマイドとアデノシルコバラミンの総計は、回分および灌流培養の両者でほぼ同じ値となっている。これにより灌流培養による高密度菌体においては、ビタミン B₁₂の比生産性は変化しないことが明らかになった。したがって灌流培養による菌体濃度の高密度化は、ビタミン B₁₂の生産量の改善に有効であることが証明された。

3-3-4 灌流培養の問題と改善策

3-3-3の結果に見られるように生産物阻害を伴う培養に灌流培養を応用すると、高密度菌体を得ることは可能であるが、プロピオン酸などの増殖阻害物質濃度を稀釈するために多量の新鮮培地を供給するため、未消費培地成分を含む多量の培養廃液が生じる。したがって供給した基質をベースにした生産性、つまり基質の利用効率は、良いとは言えない。基質の利用効率は、供給培地の基質濃度を低くして発酵槽内の基質濃度を可能な限り低く保つことで改善の余地はあると考えられる。しかし、そのためには更に高い新鮮培地の供給速度が必要となるが、本研究でも見られたように、高密度菌体条件下で稀釈率を大きくするには膜分離が律速となる可能性が高い。また培養廃液中に有用な生産物が含まれる場合には、稀釈率が大きければ大きいほど生産物濃度は低くなるために、その回収が困難になるという問題もある。さらに、稀釈率を高くした結果生じる多量の培養廃液の処理は、コストがかかり非経済的である。これらのことから、基質の利用効率を改善するために供給培地の基質濃度を低くし稀釈率を大きくすることは、膜分離に負担がかかり困難であるばかりでなく、生産物の分離精製や廃液処理まで含めた

総合的な見地から効率的ではないと言える。これらの問題点を克服するためには、灌流培養プロセスの改善が必要である。プロセスの改善策として培養廃液からプロピオン酸を選択的に除去することが考えられる。培養廃液からプロピオン酸を除去することができれば、培養廃液を発酵槽にリサイクルして再利用するシステムを確立することが出来る。このシステムならば培養廃液量を最小限にすることが出来るため、低い稀釈率で高密度な菌体を得られる灌流培養プロセスが確立できるものと考えられる。

3-4 結論

回転型セラミック膜分離装置を用いた灌流培養によって *P. freudenreichii* の高密度培養を行い、以下の結論を得た。

(1) 流加培養の結果より、プロピオン酸濃度が約 30 g/lになると菌の増殖が完全に阻害される。

(2) 稀釈率を最大 0.124 vvhまで高めた灌流培養によって、流加培養で得られた菌体濃度の 10.3倍の 172 g/lの高密度菌体を得られた。これにより高い稀釈率による灌流培養によってプロピオン酸菌の菌体濃度を飛躍的に改善できることが明らかになった。

(3) ビタミン B₁₂の菌体あたりの生産性は、灌流培養による高密度条件下でも減少せず、高密度な菌体を得ることがビタミン B₁₂の生産性の改善に有効であることが明らかとなった。

(4) 160 g/l程度の高密度菌体条件下では、逆洗の有無に関わらず回転型セラミック膜分離装置による透過流束は制限され、 3.78×10^{-6} m/s (0.124 vvh)の透過流束(稀釈率)が限界であった。

(5) 稀釈率を最大 0.124 vvhまで高めた灌流培養では、未消費培地成分を含む 45 lもの培養廃液が生じた。これはワーキングボリュームの 16.7倍に相当する量であった。これにより高い稀釈率による灌流培養は、培地成分の利用効率や多量の培養廃液が生じる点において効率的とは言えず、システムの改善が必要と考えられた。

第4章 プロピオン酸除去方法の選定

4-1 序

培養液からのプロピオン酸の選択的な除去方法の一つとして、溶媒抽出法が考えられる。溶媒抽出によってプロピオン酸の除去が行えれば、ホローファイバーに抽出溶剤を含浸させた液体膜を用いることにより、培養液から菌体を分離しないでプロピオン酸を選択的に直接除去することが可能と考えられる。したがって回転型セラミック膜装置などの菌体分離装置は必ずしも必要でなくなり、システムが簡略化されるため、実用化する際のスケールアップにおいて有利である。

もう一つのプロピオン酸の除去法として、吸着法（イオン交換を含む）が考えられる。吸着による物質の回収は、吸着剤と物質の親和性に大きく依存し相変化を伴わないため、省エネルギー型の分離であるだけでなく、選択的な物質の回収が可能な操作でもある^{73,75,77}。また、溶媒抽出における逆抽出と比較すると吸着させた物質の脱着は容易に行えることが多いため、酢酸やプロピオン酸を副生産物として分離精製するプロセスとしては吸着法が有利であると考えられる。本研究の場合、回転型セラミック膜装置により菌体が分離された培養液が得られるため、既往の研究で述べたような吸着剤と菌体の接触による問題は生じない。これらのことから、溶媒抽出法と吸着法について検討を行うことにした。

本研究においては、培養における最適 pH が 6.5 であることから、中性条件下でプロピオン酸の分離が行なえる抽出溶剤または吸着剤が選定できることが望ましいが、中性付近の pH において溶媒抽出法や吸着法によって有機酸の分離回収を行なった報告は少ない。プロピオン酸は pH によって解離状態が異なり、中性条件下ではイオン（解離）の状態で存在している。したがってプロピオン酸の回収においては pH の影響は無視できないと考えられる。そこでこの章では、まず抽出溶剤

または吸着剤によるプロピオン酸分離に対する pH の影響について検討を行った。次に実際の培養系を想定してモデル培養液を用いた実験を行い、培地成分がプロピオン酸の分離に及ぼす影響について検討を行った。これらの結果より、培養系での使用に最も適していると思われるプロピオン酸除去法を選定した。

4-2 抽出溶剤の選択

4-2-1 抽出溶剤の条件

抽出溶剤の条件としてプロピオン酸に対する分配係数が大きいことが重要である。溶媒抽出法が成立するためにはプロピオン酸が培養液よりも抽出溶剤に対して親和性を持っていなければならない。プロピオン酸は弱酸に分類され、溶液の pH によってその解離状態が変化する。プロピオン酸の解離定数は 1.22×10^{-5} である。この解離定数を用いることにより pH によるプロピオン酸の解離状態を計算することができる。解離定数によって求められるプロピオン酸の解離曲線を Fig.4-1 に示した。この解離曲線を見て分かる通り、培養条件である pH 6.5 においては 99 % のプロピオン酸が解離状態、すなわちイオンの状態で存在している。したがって培養条件の pH でプロピオン酸の分離を行なうとすると、解離状態のプロピオン酸に親和性を持つ抽出溶媒が必要である。また有機溶媒の中には微生物に対して毒性を持つものが少なくない。微生物培養系に応用することを前提とした場合、微生物に対する毒性の有無も重要な条件である。

4-2-2 実験材料および方法

抽出溶媒：抽出溶媒としてよく用いられているオレイルアルコールおよびリン酸トリブチル(TBP)を用いた。オレイルアルコールは微生物に対して毒性がなく、ブタノール、アセトン、イソプロパノール、エタノール等の抽出に用いられてい

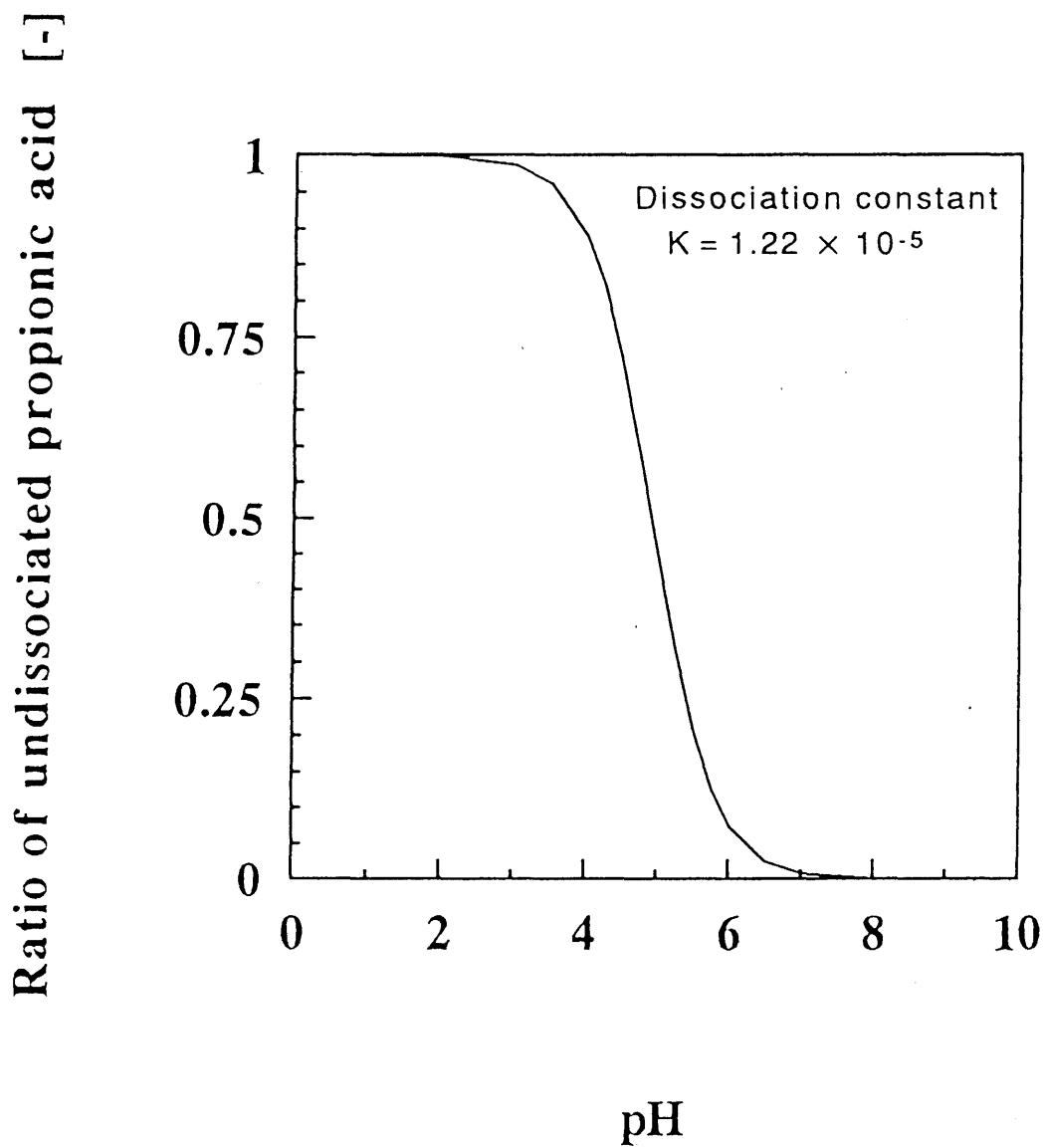


Fig.4-1 Dissociation curve of propionic acid.

る。一方、TBPは微生物に対する毒性を考慮しなければならないが、低級脂肪酸、乳酸、メトキシエタノール、ウラン等の抽出に用いられている実績がある。

抽出実験：プロピオン酸菌の培養における酢酸とプロピオン酸の生産量の割合は 1:2から 1:3である。そこで培養液のモデルとして酢酸とプロピオン酸の割合を 1:2に調整した水溶液を用いて実験を行なった。水溶液の pHはアンモニア水を用いて調整した。80 ml容量の試験管に調整した有機酸水溶液 10 mlと抽出溶媒 10 mlを加え 30 °Cで 24時間振とうを行ない平衡化させた。平衡後、水層中の酢酸およびプロピオン酸濃度をガスクロマトグラフィーを用いて測定した。測定条件は第3章と同様である。

4-2-3 結果および考察

TBPを抽出溶媒として用いて pHがプロピオン酸の分配係数（油層中のプロピオン酸濃度 C_s / 水層中のプロピオン酸濃度 C_w ）に及ぼす影響について検討した結果を Table 4-1に示した。水溶液の pHが低い場合には溶媒抽出が行なわれ易く分配係数が大きくなったのに対し、pHが高くなるとほとんど溶媒による抽出は行われず、分配係数がゼロになった。オレイルアルコールを抽出溶媒として用いた場合にも pHの影響は同様であり pHが高い領域では溶媒による抽出は行われなかった。これらの結果は、溶媒による抽出は非解離型のプロピオン酸に対しては有効であるが、pHが高くプロピオン酸が解離型で存在する場合には適用できないことを示している。培養条件である pH 6.5においては 99 %のプロピオン酸が解離状態、すなわちイオンの状態で存在している。したがって培養条件の pHのままで溶媒抽出によりプロピオン酸の分離を行うことは出来ないと判断した。

Table 4-1 Effect of pH on the extraction of organic acid with TBP.

pH	Distribution constant	
	Acetic acid (Cs/Cw)	Propionic acid (Cs/Cw)
2.72	2.51	2.19
3.49	1.59	1.57
4.07	1.13	0.98
4.51	1.06	0.98
5.48	0	0
6.51	0.01	0.02

4-3 吸着剤の選択

4-3-1 吸着剤の条件

吸着剤の選択においては、第一に目的物質に対する親和性を考慮しなければならない。親和性を支配する親和力には、疎水性に起因するものと電荷に起因するものがある。培養条件の pH ではプロピオン酸が解離型（イオン）の状態が存在する。培養条件の pH のままでプロピオン酸を分離するには、利用すべき親和力は必然的に電荷に起因するものということになる。したがって、同電荷における親和性の差を利用したイオン交換樹脂や、反対電荷の引力を利用した吸着剤が理論的に適していると思われる。親和性の次に吸着剤に求められる条件は、吸着した物質の脱着が容易に行えることである。脱着によって吸着剤の吸着能力が再生でき、これを再利用できることが重要である。酢酸やプロピオン酸などの低級脂肪酸は、化学工業において生産される様々な物質の原料として利用されている^{65,70)}。さらにプロピオン酸は、抗菌剤としても高い需要がある。そのため脱着によって吸着した有機酸を回収できると、これを副生産物として利用することができるため有利である。脱着が容易に行えることは、生産物の分離精製プロセスとして重要である。

4-3-2 実験材料および方法

吸着剤：使用した吸着剤を Table 4-2 に示した。Amberlite 陰イオン交換樹脂は Cl⁻ 型で発売されているため、必要に応じて自前で OH⁻ 型に変換した。変換法として、まず樹脂をカラムに詰め樹脂体積の 20 倍量の 1 N NaOH 溶液を 1 ml/min/cm² の流速で流し、次に 4 倍量の脱イオン水を流して洗浄を行った。

吸着実験：80 ml 容量の試験管にプロピオン酸水溶液を 10~50 ml 取り、0.4~

Table 4-2 Adsorbents used in this work.

Adsorbent	Company	Mode of separation	Property
Kurisubarl G-700	Nittesu Kogyo	Adsorption	
Kurisubarl GL-700	Nittesu Kogyo	Adsorption	
Activated charcoal	Toyo Karugon	Adsorption	
DIAHOPE S-80	Mitsubishi Chem.	Adsorption	
Carbon for chromato.	Wako Pure Chem.	Adsorption	
Activated charcoal	Wako Pure Chem.	Adsorption	Made from coconut husk
Amberlite XAD-2	Rohm and Haas	Adsorption	Hydrophobic
Amberlite XAD-7	Rohm and Haas	Adsorption	Intermediate hydrophilic
Amberlite IRA-68 Cl-型	Rohm and Haas	Anion Cl- exchange	Intermediate basic anion
Amberlite IRA-400 Cl-型	Rohm and Haas	Anion Cl- exchange	Strongly basic anion
Amberlite IRA-94S Cl-型	Rohm and Haas	Anion Cl- exchange	Weakly basic anion
Amberlite IRA-68 OH-型		Anion OH- exchange	Intermediate basic anion
Amberlite IRA-400 OH-型		Anion OH- exchange	Strongly basic anion
Amberlite IRA-94S OH-型		Anion OH- exchange	Weakly basic anion
Resin AG 1-X8	Bio-Rad	Anion OH- exchange	

2 gの吸着剤を加えて室温 30 °Cで 24時間振とうを行って平衡化させた。次に平衡化させた溶液を遠心分離(7000 G, 10 min)にかけて得られる上澄をフィルター (ADVANTEC DISMIC-25CS, TOYO Roshi Co.)で処理して吸着剤を完全に除いた後、溶液中のプロピオン酸濃度を測定した。プロピオン酸濃度の測定にはガスクロマトグラフィーを用いた。プロピオン酸水溶液の pHは、アンモニア水を用いて調節を行った。

吸着剤の再生：活性炭の再生はエタノールを用いた洗浄または浸漬により行った。再生活性炭は蒸留水で洗浄し乾熱器で乾燥させた後、プロピオン酸水溶液を用いた吸着実験に用いてプロピオン酸の吸着量を測定した。この値を新品の活性炭の値と比較することで再生率を測定した。陰イオン交換樹脂 Resin AG 1-X8の再生は 1 N NaOHをカラムに流した後、脱イオン水を流して洗浄することで行った。また必要に応じてカラムにエタノールを流す操作を行った。Resinの再生率は、活性炭の場合と同様に、プロピオン酸水溶液を用いた吸着実験によってプロピオン酸の吸着量を測定し、新品の Resinでの吸着量と比較することで求めた。

4-3-3 結果および考察

水溶液系での吸着実験： 吸着実験は pHおよび有機酸濃度を変えて繰り返し行った。実験 Run 1およびRun 2では、pH無調整のプロピオン酸水溶液を用いて吸着量の比較を行った。これらの実験での pHは無調整のため、初期 pHは 2.7付近と低い値であった。したがって Run 1および Run 2では、非解離型のプロピオン酸に対する吸着量を比較したことになる。結果を Table 4-3に示した。クリスバールと比較して活性炭は全体的に吸着量が大きく、活性炭が非解離型のプロピオン酸の吸着に適していることが示された。使用した活性炭の中で最も吸着量が大きかったのは、ヤシガラ系活性炭である和光純薬の製品であった。

Table 4-3 Screening of adsorbents using propionic acid solution at low pH.

Experimental run number	Adsorbent	Initial condition of acid solution		Adsorbed quantity Q [mol/kg]
		pH	Concentration of acid [mol/m ³]	
1	A. charcoal (Wako)	2.73	135	2.38
	Kurisubarl G-700	2.73	135	0.53
	Kurisubarl GL-700	2.73	135	0.43
2	A. charcoal (Toyo K.)	2.73	203	2.02
	DIAHOPE S-80	2.73	203	2.09
	Carbon for chromat.	2.73	203	1.82
	A. charcoal (Wako)	2.73	203	2.28

実験 Run 3においては、培養液のモデルとして酢酸およびプロピオン酸の二成分の水溶液を用い、初期 pHを培養条件と同等の 6.5に調整して吸着量を比較した。結果を Table 4-4に示した。Amberlite XADシリーズは極性が調整された吸着剤であるが、吸着量は活性炭を下まわる結果となった。この条件では、プロピオン酸はほとんどが解離型（イオン）の状態が存在しているため、吸着量は解離型のプロピオン酸の吸着によると考えられる。それにもかかわらず検討した吸着剤の中では、和光純薬の活性炭が最大の吸着量を示した。

続いて陰イオン交換樹脂について検討を行った。実験 Run 4は Run 3と同様な条件で行われ、陰イオン交換樹脂について良好な結果が期待されたが、Table 4-4に示されるように活性炭の吸着量を下まわる結果となった。これはイオン交換樹脂のイオン交換基に問題があるためであった。Amber-lite陰イオン交換樹脂は、イオン交換基が Cl^- 型の状態で市販されている。しかしイオン交換樹脂における陰イオンの選択性は、 $\text{OH}^- < \text{Propionate} < \text{Acetate} < \text{Cl}^-$ の順に高くなるため、イオン交換基に Cl^- を用いるとプロピオン酸よりも Cl^- の方が選択性が高いことになり、プロピオン酸イオンは交換されにくい。したがってプロピオン酸イオンをイオン交換させるためには、プロピオン酸よりも選択性が低い OH^- をイオン交換基にしなければならないことが明らかであった。

実験 Run 5は、イオン交換基を自前の操作で OH^- に変換したイオン交換樹脂を用いて行ったものである。その結果、強塩基性樹脂のAmberlite IRA-400のプロピオン酸吸着量が改善され最も良い結果となったが、それでも活性炭の吸着量を上回ることはできなかった。Amberlite IRA-68および 94Sにおいては、 OH^- に変換する操作によって逆にプロピオン酸吸着量が減少する結果となった。これらの結果より、Amberlite IRA-400のイオン交換基を自前で OH^- に変換してしばらく実験を行ったが、データのばらつきが目についた。BIO-RAD社のカタログによると、イオン交換樹脂において OH^- の選択性は最も低く、 Cl^- の選択性は OH^- の 22倍であった。

Table 4-4 Screening of adsorbents using model organic acid solution.

Experimental run number	Adsorbent	Initial condition of acid solution		Adsorbed quantity	
		pH	Concentration of acid [mol/m ³]	Propionic acid [mol/kg]	
				Acetic acid	Propionic acid
3	Activated charcoal	6.48	251	405	1.11
	Amberlite XAD-2	6.48	251	405	0.72
	Amberlite XAD-7	6.48	251	405	0.80
4	Activated charcoal	6.47	271	396	0.82
	Amberlite IRA-400 (Cl-)	6.47	271	396	0.04
	Amberlite IRA-94S (Cl-)	6.47	271	396	0.43
5	Amberlite IRA-68 (Cl-)	6.47	271	396	0.74
	Amberlite IRA-400 (OH-)	6.92	212	391	0.71
	Amberlite IRA-94S (OH-)	6.92	212	391	0.24
6	Amberlite IRA-68 (OH-)	6.92	212	391	0.43
	Amberlite IRA-400 (OH-)	6.90	249	400	0.52
	Resin AG 1-X8	6.90	249	400	1.71

したがって、 Cl^- から OH^- への変換が安定的に完全に行われているか否かについて疑問が生じた。そこで実験 Run 6として、イオン交換基が OH^- である市販のイオン交換樹脂 Resin AG 1-X8 (BIO-RAD) との比較を行うことにした。その結果は Table 4-4に示されるように、自前で変換した Amberlite IRA-400と比較して、市販のResin AG 1-X8は大きなイオン交換能力を示した。また、この値は同条件で活性炭で得られる値の約 2倍であり、解離型のプロピオン酸の吸着量としては最大であった。

培養液系での吸着実験： 培養液系は水溶液系と比較して含有される成分が多いため、目的物質よりも選択性が大きい物質が吸着またはイオン交換されてしまう可能性があり、水溶液系と同じ結果が得られるとは限らない。そこでモデル培養液としてグルコース 20 g/lおよび CSL 80 g/lを含むプロピオン酸水溶液を作製し、Resin AG 1-X8による吸着実験に使用した。また、実際にイオン交換樹脂を培養系で使用する際には、新鮮培地とともに樹脂をカラムに詰めるため、イオン交換樹脂はプロピオン酸とのイオン交換の前に培地成分と平衡状態になっていると考えられる。これを想定してグルコース 20 g/lおよび CSL 80 g/lを含む培地に一晚漬けた Resinを培地処理 Resinとして準備した。モデル培養液を用いた未使用 Resinおよび培地処理 Resinの吸着実験の結果と、水溶液系における Resinの吸着実験の結果を Fig. 4-2に示した。水溶液系と比較して培養液系では、最大吸着量が 40 %低下している。また、培地処理 Resinは更に吸着量が少ない結果となった。これらの結果は、プロピオン酸のイオン交換に対する培地成分の影響が非常に大きいことを示している。先にも述べたように、イオン交換基に用いられている OH^- は他の陰イオンに比べて選択性が最も低い。したがって培養液に含まれる陰イオンの多くが交換されている可能性が高く、これが吸着量が減少した原因であると考えられた。また、プロピオン酸イオンの選択性は OH^- の 2.6倍であるが、

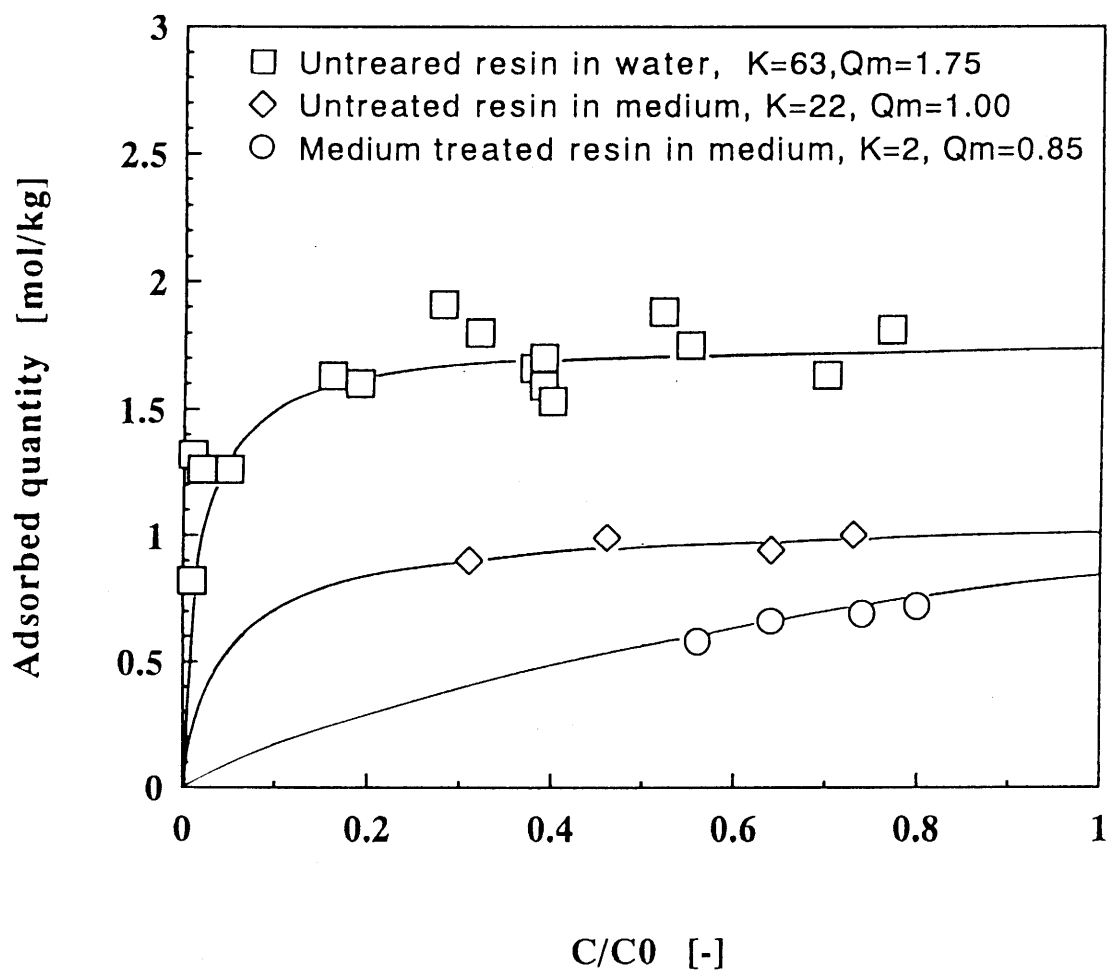


Fig. 4-2 Effect of medium on adsorbed quantity with resin AG 1-X8. Solid lines show the theoretical values.
 $Q = Q_m \cdot K \cdot C / (C_0 + K \cdot C)$

決して高いとは言えない。したがって一度吸着した培地成分を後からプロピオン酸が追い出すような現象は起こりにくいと考えられた。これにより培地成分と平衡に達した培地処理 Resinと未使用 Resinのイオン交換量に差が生じたと考えられた。これらの結果より、培養系での Resinの最大プロピオン酸吸着量は 1 mol/kg以下になると考えられた。

先に得られた結果より、活性炭は非解離型のプロピオン酸の吸着に適していることが明らかである。そこで、活性炭によって非解離型のプロピオン酸を吸着する際の培地成分の影響について検討を行った。モデル培養液として、グルコース 15 g/l、CSL 80 g/l、 KH_2PO_4 0.4 g/l、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/lを含むプロピオン酸水溶液を用いて吸着実験を行った結果と、水溶液系で得られた結果を Fig.4-3 に示した。水溶液系と比較して培養液系での吸着量は少なく、非解離型のプロピオン酸の吸着においても、培地成分の影響が存在することが明らかとなった。しかしながら、Fig.4-3から得られる Langmuir定数の最大吸着量 Q_m 値は、水溶液系では 2.89、培養液系では 2.72となり、イオン交換と比較すると培地成分の影響はかなり少ないことが分かった。

吸着剤の再生実験： まず初めに Resin AG 1-X8を詰めたカラム（樹脂体積 148 cm^3 ）にグルコース 20 g/l、CSL 80 g/lおよびプロピオン酸 19 g/lを含むモデル培養液を流して Resinを飽和させた。このカラムに水酸化ナトリウム溶液を流して再生を行なった結果を Table 4-5に示した。水酸化ナトリウム溶液を 500 ml流した時点では、再生率は約 50 %でありその後更に再生操作を続けたが、4 l流した時点でも再生率はさほど改善されなかった。そこでエタノールを 1 l流したところ再生率が約 80 %まで回復した。したがって、培地系で用いた Resinを再生するには、イオン交換基を再生する操作だけでなく、疎水的な親和性で吸着したと考えられる培地成分を脱着する操作が必要なことが明らかとなった。これは、

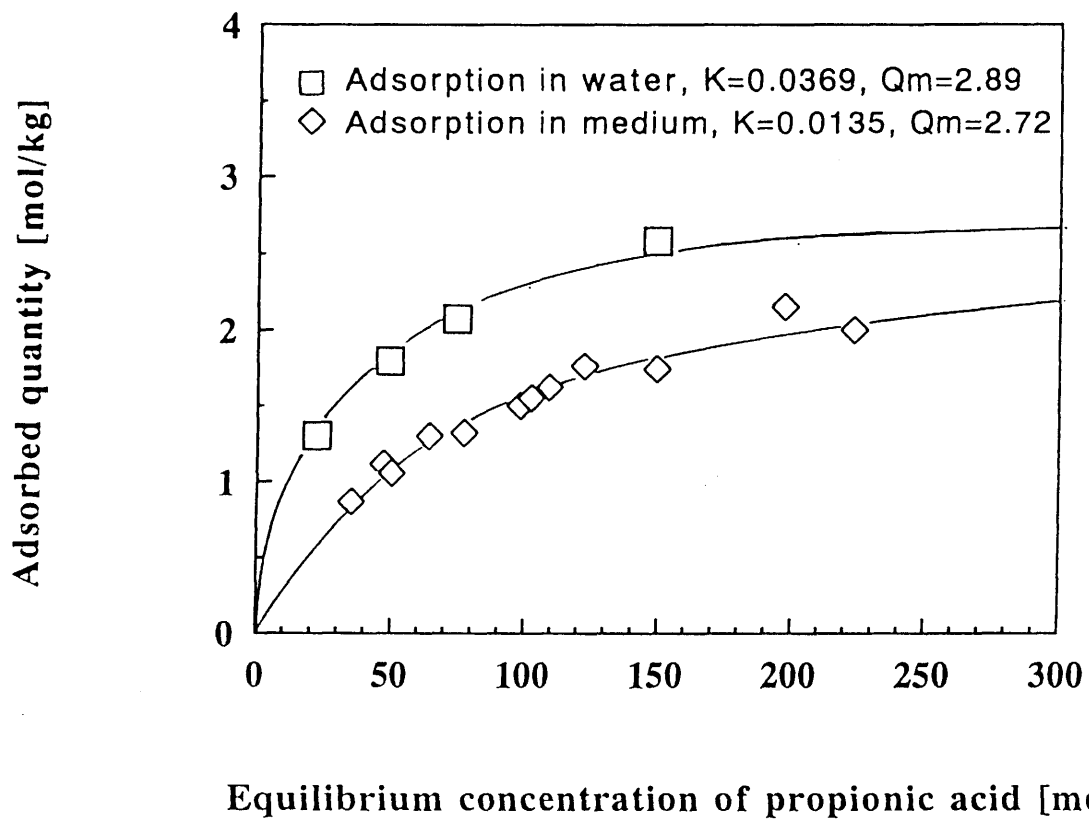


Fig. 4-3 Effect of medium on adsorbed quantity with activated charcoal. Solid lines show the theoretical values. $Q = Q_m \cdot K \cdot C / (1 + K \cdot C)$

Table 4-5 Results of regeneration of resin AG 1-X8.

Treatment	Regenerated ratio [%]
Feeding 1N NaOH of 0.5 ℓ	52.8
Feeding 1N NaOH of 4.0 ℓ	56.3
Feeding ethanol of 1.0 ℓ	79.4

Resinを使用すると、モデル培養液に対して陰イオンの交換によるイオン交換作用だけでなく、疎水的な親和力による吸着作用も働くことを示している。また再生率がエタノールを用いた操作により大幅に改善されたことから、吸着作用によって吸着した培地成分がイオン交換能力に及ぼす影響が大きいことが示唆されている。

吸着飽和活性炭として、グルコース 15 g/l、CSL 80 g/l、 KH_2PO_4 0.4 g/l、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/lおよびプロピオン酸 25 g/lを含むモデル培養液を使用した破過曲線の測定で得られた使用済み活性炭 1080 gを再生実験に用いた。1080 gの活性炭に対し毎回 1 lのエタノールを使用して繰り返し回分式で再生を行った結果を Table 4-6に示した。再生率は繰り返し回分の回数とともに増加し、4回目で 90 %に達している。したがって活性炭においては、エタノールによる操作だけで、培地系で用いた活性炭の再生が行えることが明らかとなった。

吸着剤の選択： pHが培養条件のままの中性において培養液からプロピオン酸を分離できる吸着剤について検討を行ってきた。その結果 Resin AG 1-X8が検討を行った吸着剤およびイオン交換樹脂の中で最も吸着量が大きいことが明らかとなった。しかし、実際に応用される培地系において予想されるイオン交換能は 1 mol/kg以下になると考えられた。また再生実験の結果より OH^- 型のイオン交換樹脂は、培地成分の影響が大きいことが明らかとなった。これらに加えて Resin AG 1-X8が高価 (38000 円/ 500 g) であることを考慮すると Resinを培養系に応用することは得策ではないと判断された。一方 pHを下げてプロピオン酸の分離を行う場合、活性炭はプロピオン酸の吸着および脱着の両面で比較的培地成分の影響が少ない結果が得られており、実用的と考えられた。pHが 2.7付近であれば予想されるプロピオン酸吸着能は 2.72 mol/kgと大きく、活性炭が安価 (2500 円 / 500 g) であることも有利な点として挙げられる。また活性炭は耐熱性が高いこ

Table 4-6 Results of regeneration of activated charcoal by ethanol.

Run number	Regenerated ratio [%]	Propionic acid concentration in ethanol [mol/m ³]
1	53	535
2	73	392
3	83	265
4	90	—

とから培養に応用する際の蒸気滅菌にも十分耐えられるため、滅菌に関して特別な操作が必要でないことも培養に適した点として挙げることができる。これらの結果から、中性条件で培養液からプロピオン酸を除去することは断念し、培養ろ液の pH を下げて、非解離型のプロピオン酸を活性炭による吸着によって分離する方法を用いることにした。

4-4 結論

培養液からプロピオン酸を分離除去する方法として、溶媒抽出および吸着について検討を行い、培養系に適していると思われる手法を選定した。本章で得られた結論を以下に述べる。

(1) 水溶液の pH が低い場合には溶媒抽出が行なわれ易く分配係数が大きくなったのに対し、pH が高くなるとほとんど溶媒による抽出はおこなわれず、分配係数がゼロになった。したがって溶媒による抽出は非解離型のプロピオン酸に対しては有効であるが pH が高くプロピオン酸が解離型で存在する場合には適用できないことが明らかとなった。

(2) 使用した吸着剤の中で解離型のプロピオン酸の分離能が最も高かったのは OH⁻型陰イオン交換樹脂の Resin AG 1-X8であった。しかし OH⁻型イオン交換樹脂によるプロピオン酸の分離は培地成分の影響が大きいことから、培養系においては十分な吸着能力が期待できないと判断された。

(3) 培養系における吸着能力、再生性および経済性より、培養ろ液の pH を下げて活性炭による吸着によって非解離型のプロピオン酸を分離する手法が最適であると考えられた。

第5章 活性炭によるプロピオン酸除去システムに関する基礎的研究

5-1 序

酢酸やプロピオン酸は、中性の条件下すなわち解離型では、活性炭に吸着されないという報告例がある⁷⁴⁾。しかし、第4章の吸着実験の結果から、中性の条件下でも活性炭に対して有機酸の吸着が起こることが明らかとなった。活性炭の表面には様々な官能基が存在することが知られており、解離型の有機酸が吸着される可能性は十分考えられる。しかし、中性の条件下での有機酸の吸着についてはほとんど検討されておらず、吸着のメカニズムについては不明な点が多い。したがって、これらの有機酸の吸着機構を明らかにすることは、吸着剤の基礎研究として価値があり、また活性炭を培養系に応用する上で必要と考えられた。そこで、本研究では酢酸、プロピオン酸および酪酸を用いて水溶液中の有機酸を解離型と非解離型に分けて考え、有機酸の吸着量が解離型と非解離型の有機酸両方の吸着量の和であると仮定して実験データを整理することを試みた。また、活性炭を培養系に応用するための基礎データとして培養液系についても同様な実験および整理を行い、水溶液系との比較を行った。

実際の培養系では酢酸およびプロピオン酸の両方が存在し、両者の活性炭への吸着機構は同様であると考えられる。そのため、活性炭によるプロピオン酸の吸着において酢酸の影響を無視することはできないと思われた。そこで酢酸およびプロピオン酸からなる二成分系の吸着平衡式を水溶液系および培地系の両系において求めた。また酢酸、プロピオン酸および酪酸の中から二つを組み合わせた二成分系溶液を調整して吸着実験を行い、求めた選択係数から有機酸の吸着機構について考察を行った。

活性炭によるプロピオン酸除去システムは、活性炭充填カラムを作製しこれに

培養液を流す方式で確立される。活性炭カラムは時間の経過とともにプロピオン酸に対して吸着飽和に達し、吸着能力が無くなる。この現象をカラムの破過と呼ぶが、カラムの破過を予想することができればカラムの交換を効率的に行うことができる。したがって、カラム出口の有機酸濃度の経時変化（破過曲線）を数値計算によって求められることが望ましい。そこで、まず破過曲線の数値計算に必要な定数である粒内拡散係数の測定を行った。次に破過曲線の数値計算法として、吸着理論を適用した物質収支に基づく基礎式を求め、数値計算プログラムを作製した。初めに、単成分系を想定した計算プログラムを作製し、これによるシミュレーションが実測値と一致するのを確認した。次にこの計算プログラムを参考にして、二成分系を想定した数値計算プログラムを作製した。そしてこのプログラムによるシミュレーションと実測値との比較を行った。また、カラムの破過に伴うカラム出口 pH の変化に着目して、カラム出口 pH のモニタリングによってカラム交換時期の判断が行えるか否かについても検討を行なった。

活性炭による吸着によって培養液から分離された有機酸を生産物として利用するためには、吸着された有機酸を活性炭から脱着する操作が容易に行えることが重要である。この操作は、同時に活性炭の再生を行うことにもなる。低い pH において吸着した有機酸は非解離型である。したがって、疎水的な作用で吸着していると考えられ、脱着には有機溶媒が有効であると思われる。そこで、数種類の有機溶媒を用いた脱着実験を行った。吸着においては培地成分による影響が大きいことが明らかになった。そのため、脱着においても培地成分の影響があるか否かについて検討を行った。最後に、カラムに詰めた活性炭に有機溶媒を流して溶出曲線を測定し、回分操作で再生した場合と比較を行って活性炭の再生方法について考察を行った。

5-2 活性炭に対する有機酸の吸着等温線

5-2-1 実験材料および方法

吸着実験： 80 ml容量の試験管に有機酸水溶液を 10 ml取り、0.5~2 gの活性炭を加えて室温 30 °Cで 24時間振とうを行って平衡化させた。次に平衡化させた溶液を遠心分離(7000 G, 10 min)にかけて得られる上澄をフィルター(ADVANTEC DISMIC-25CS, TOYO Roshi Co.)で処理して活性炭を完全に除去した後、溶液中の有機酸濃度を測定した。有機酸濃度の測定にはガスクロマトグラフィーを用いた。有機酸水溶液の pHはアンモニア水を用いて調節した。モデル培養液としてグルコース 15 g/l、CSL 80 g/lを含む有機酸水溶液を用いた。

5-2-2 Langmuir式についての理論

Langmuirは、被吸着物質が吸着剤表面から脱着する速度と流体相から吸着剤に吸着する速度の間に平衡が成立すると仮定して、被吸着物質濃度と吸着量の関係を求めた⁹⁶⁾。吸着剤の表面が被吸着物質によって覆われている割合を θ とすると、吸着速度は覆われていない部分の割合 $1-\theta$ に比例する。この吸着速度は、吸着剤表面に接触する被吸着物質分子の数(分子の濃度: C)及び実際に吸着する分子の割合 K_a にも比例する。したがって吸着速度は、 $K_a C (1-\theta)$ となる。

一方、被吸着物質によって被覆された吸着剤表面からの脱着率を K_d とすると、脱着速度は $K_d \theta$ となる。

吸着速度と脱着速度が平衡状態にあるとき、(5-1)式が成立する。

$$K_d \theta = K_a C (1-\theta) \quad (5-1)$$

ここで $K = K_a / K_d$ とすると

$$\theta = K C (1-\theta)$$

$$K C = \theta (1 + K C)$$

θ は被吸着物質による表面被覆率だから、吸着量を Q 、最大吸着量を Q_m とすると

$$\theta = Q / Q_m = K C / (1 + K C) \quad (5-2)$$

又は $C / Q = C / Q_m + 1 / Q_m K \quad (5-3)$

(5-2)式及び (5-3)式は Langmuir式と呼ばれ、単分子層吸着モデルを表わす。本実験は培養への応用を想定しているため、多分子層吸着モデルが必要なほど高濃度のプロピオン酸水溶液を用いた吸着は行わない。したがってこの単分子層吸着モデルで十分間に合うと考えられた。

5-2-3 結果および考察

(1) 有機酸吸着における pHの影響について

酢酸とプロピオン酸濃度の比を 1:2に調節した水溶液をモデル水溶液として用いて pHの影響について検討を行った。Fig. 5-1はプロピオン酸の吸着量に対する pHの影響を示した図である。pHが大きくなるにしたがってプロピオン酸吸着量は減少しており、pHの影響が大変大きいことが明らかである。ところで水溶液の pHは、吸着平衡前後で変化する。活性炭の場合、水溶液の pHの初期値が 6.9 である時、吸着平衡後の pHは 8 以上になる。第3章でも触れたように、Fig.3-1に示したプロピオン酸の解離曲線に従い pH 8以上ではプロピオン酸の 99 %以上が解離状態である。したがって 吸着平衡後の pHが 8以上の時、吸着平衡は解離型のプロピオン酸と活性炭の間で成立していることになる。そこで Fig. 5-1において pHの初期値が 6.9及び8では、吸着はすべて解離状態のプロピオン酸によるものと考えることができる。逆に、吸着平衡後の pHが非解離型のプロピオン酸しか存在しない時には、吸着はすべて非解離型のプロピオン酸によるものと考えることができる。非解離型および解離型のプロピオン酸の両方が存在する pHにおいては、それぞれのプロピオン酸の吸着量の和が活性炭の吸着量ということになる。

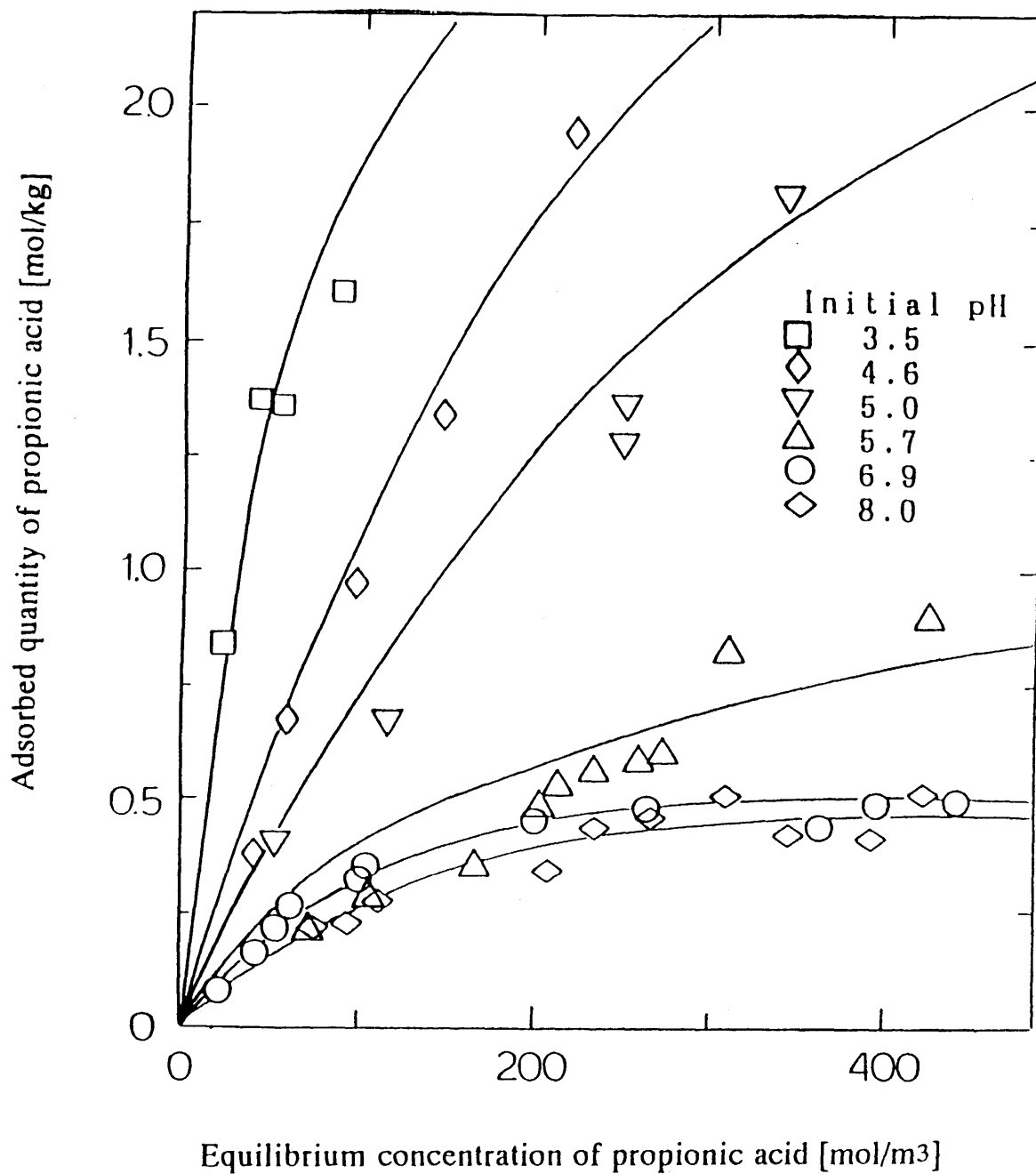


Fig. 5-1 Effect of pH on the adsorption isotherms of propionic acid on activated charcoal in binary system (acetic and propionic acids).

Fig.5-1より活性炭は一般的に考えられてきた非解離型のプロピオン酸だけでなく解離型のプロピオン酸も吸着することが明らかである。しかし、解離型および非解離型のプロピオン酸の吸着機構は異なると思われる。そこで単成分の有機酸溶液による吸着実験を行い、解離型および非解離型の有機酸の吸着機構について検討を行うことにした。

(2) 解離型および非解離型の有機酸の吸着等温線

有機酸の吸着は、解離型においては有機酸がイオンであることから極性（親水）的な親和力に支配されていると考えられる。一方、非解離型においては非極性（疎水）的な親和力によると考えられる。そこで、吸着における極性の影響に着目して、鎖長の異なる有機酸を用いて吸着実験を行った。用いた有機酸は、酢酸、プロピオン酸および酪酸であり、鎖長が長くなるほど非極性である。水溶液系と培養液系での差異についても検討を行うため、吸着実験は両方の系について行った。培養液系では、グルコース 15 g/l、CSL 80 g/l、 KH_2PO_4 0.4 g/lおよび $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/lを含む有機酸溶液をモデル培養液として用いた。まず pH が 8以上の条件で吸着実験を行い、この結果より得られた吸着量と有機酸の平衡濃度の関係から、解離型の有機酸の吸着平衡式を求めた。次に pH無調整（有機酸の存在によって pHは酸性）の条件で吸着実験を行い、得られた吸着量から解離型の有機酸による吸着量（吸着平衡時の pHより求まる解離型の有機酸濃度から計算した値）を引いた値を求め、これと非解離型の有機酸の平衡濃度（吸着平衡時の pHより求まる）の関係から、非解離型の吸着平衡式を求めた。このような手法を用いた理由は pH調整に用いる試薬にある。pHを 8以上にするのに用いたアンモニアの有機酸の吸着に対する影響は少ないが、pHを低くするのに必要な強酸の吸着に対する影響は大きいためである。酢酸、プロピオン酸および酪酸の吸着等温線をそれぞれ Figs.5-2、5-3および 5-4に示した。点線はそれぞれの実験データか

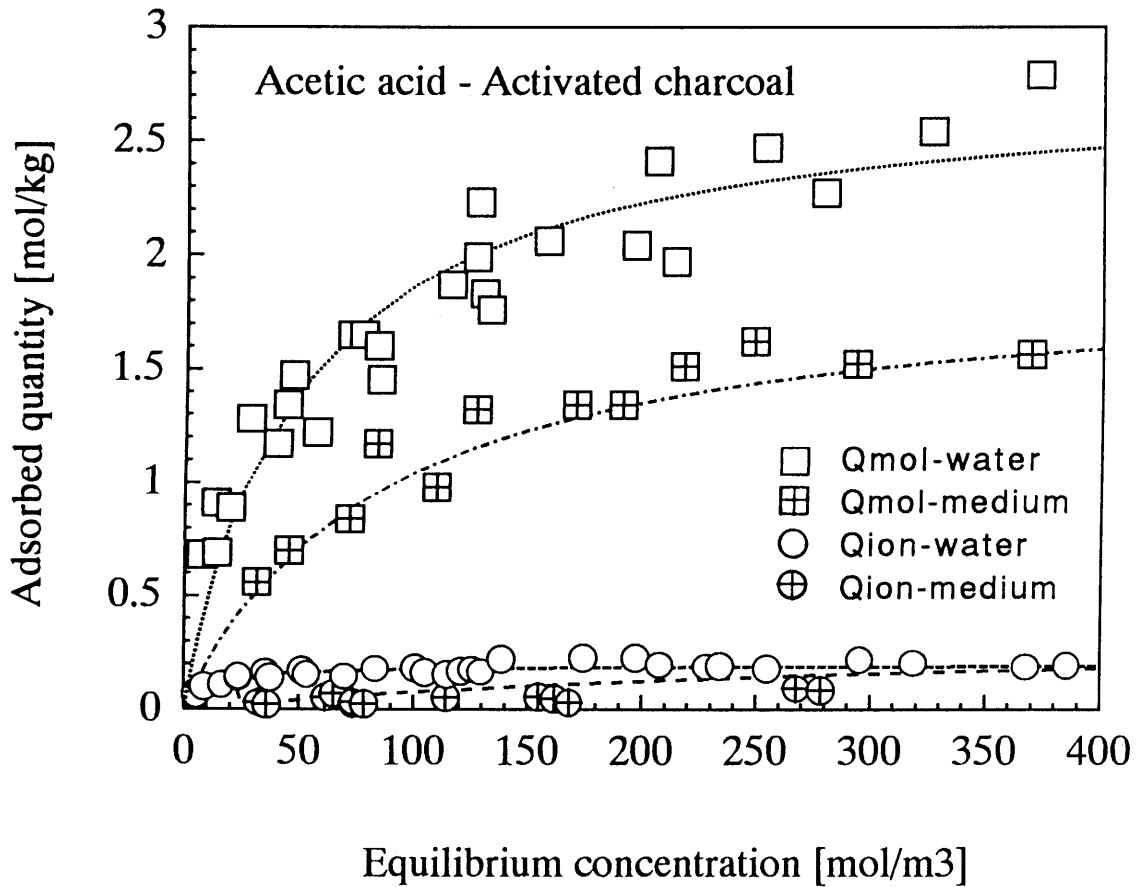


Fig. 5-2 Adsorption isotherms of acetic acid on activated charcoal under different condition. Qmol-water, Qmol-medium, Qion-water and Qion-medium show the adsorbed quantity under the condition of pH 3 water solution, pH 3 medium, pH 8 water solution and pH 8 medium, respectively. The dotted lines show the results of calculation using constants shown in Table 5-1.

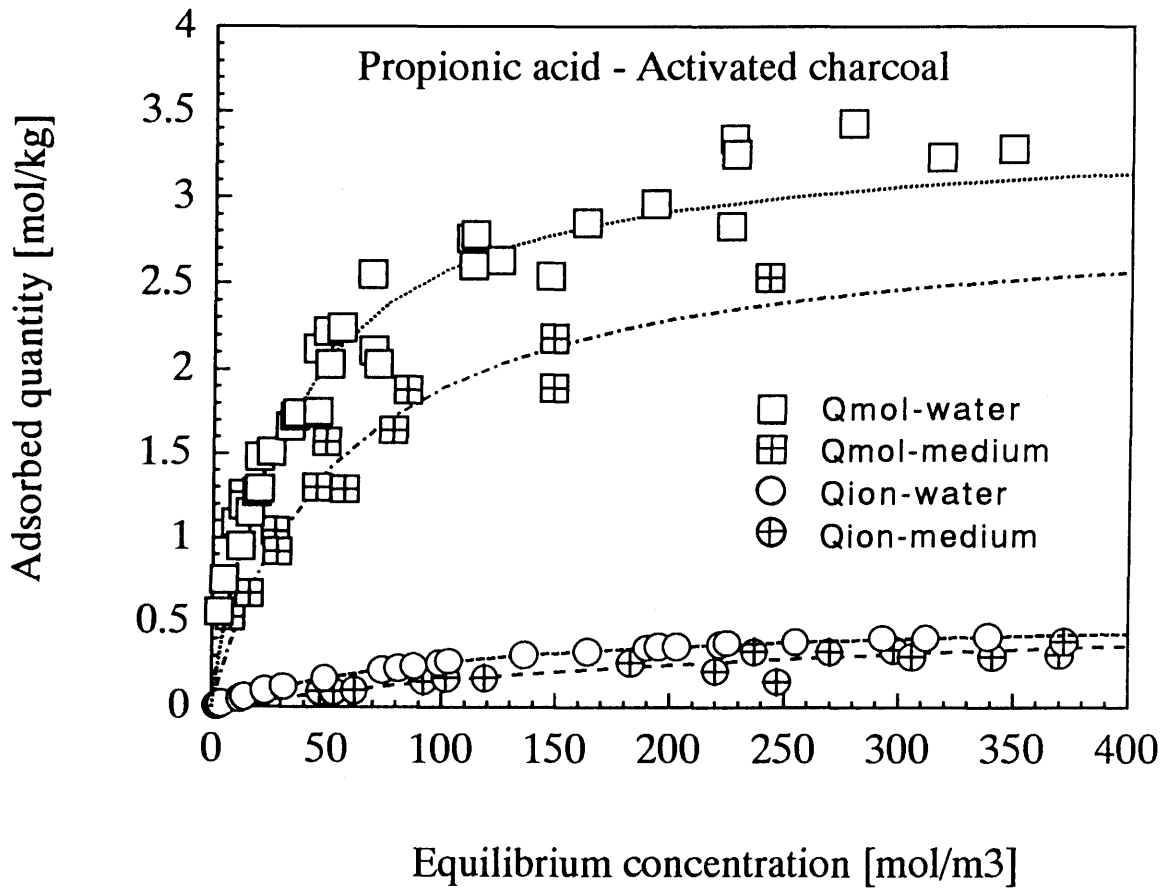


Fig. 5-3 Adsorption isotherms of propionic acid on activated charcoal under different condition. Keys are same as shown in Fig. 5-2. The dotted lines show the results of calculation using constants shown in Table 5-1.

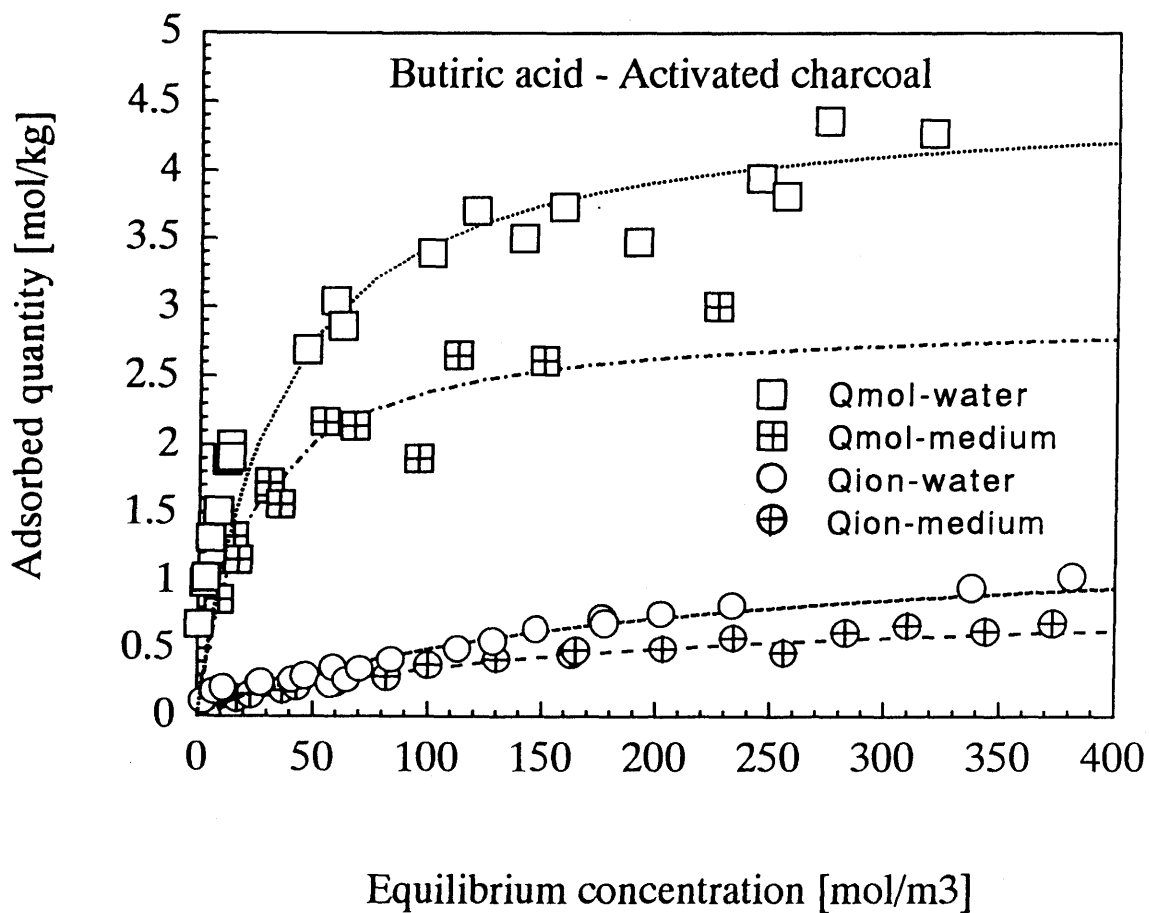


Fig. 5-4 Adsorption isotherms of butyric acid on activated charcoal under different condition. Keys are same as shown in Fig. 5-2. The dotted lines show the results of calculation using constants shown in Table 5-1.

ら最小二乗法によって求めた Langmuir 曲線である。これらの実験で得られた各有機酸の Langmuir 定数を Table 5-1 に示した。非解離型および解離型の有機酸で比較を行うと、有機酸の鎖長にかかわらず非解離型の有機酸の方が圧倒的に吸着されやすいことが明らかである。水系および培地系で比較を行うと、解離型および非解離型の有機酸の両方が培地成分の影響を受け、水系と比較して培地系では吸着量が減少してしまうことが分かる。鎖長の長さの異なる有機酸で比較を行うと、解離型および非解離型にかかわらず、鎖長が長い有機酸の方が吸着量が大きくなる傾向が得られた。これにより吸着機構が親水的な作用であると考えられる非解離型（イオン）の有機酸の吸着においても、疎水性が大きい方が活性炭に吸着されやすいことが示された。

（3）有機酸の選択係数

有機酸が生産される発酵では複数の有機酸が存在することが多く、本研究で行なったプロピオン酸菌の培養でも酢酸およびプロピオン酸が生産される。このような多成分系において吸着を行う場合、選択係数が有用である。ここでは選択係数を次のように定義した。

$$\text{Separation factor} = (Q_a / C_a) / (Q_b / C_b) \quad (5-4)$$

Q_a, Q_b ; a成分および b成分の吸着量

C_a, C_b ; a成分および b成分の平衡濃度

選択係数の検討は水系および培地系で行ったが、pHが高い条件では吸着量の関係上誤差が大きくなることが予想され行わなかった。選択係数を求める実験条件は Table 5-2 に示したように酢酸、プロピオン酸および酪酸のうちから二つの有機酸を組合せ、両有機酸の初濃度の和および活性炭量を一定とした。これらの実験の結果を酢酸-プロピオン酸、酢酸-酪酸およびプロピオン酸-酪酸の系についてそれぞれ Figs. 5-5、5-6 および 5-7 に示した。図中の点線は、実験結果より算出

Table 5-1 Adsorption parameters of Langmuir formula,
 $Q = \frac{Q_{m,mol}K_{mol}C_{mol}}{(1+K_{mol}C_{mol})} + \frac{Q_{m,ion}K_{ion}C_{ion}}{(1+K_{ion}C_{ion})}$.*

	$Q_{m,mol}$	K_{mol}	$Q_{m,ion}$	K_{ion}
<Water system>				
Acetic acid	2.73	0.0213	0.197	0.102
Propionic acid	3.43	0.0315	0.573	0.009
Butiric acid	4.46	0.0324	1.360	0.006

<Medium system>				
Acetic acid	1.98	0.0116	0.104	0.009
Propionic acid	2.84	0.0192	0.760	0.003
Butiric acid	2.94	0.0456	0.863	0.007

* mol; molecule

Table 5-2 Separation factors for the binary systems in the adsorption of organic acids on activated charcoal.

System	Adsorbate		A ₀ + B ₀ [mol/m ³]	A. charcoal [g]	Separation factor [-]
	A	B			
Water, pH 3	Acetic acid	Propionic acid	500	2	3.34
	Acetic acid	Butiric acid	500	2	11.74
Water, pH 8	Propionic acid	Butiric acid	500	2	4.06
	Acetic acid	Propionic acid	500	2	7.74
Medium, pH 3	Acetic acid	Butiric acid	500	2	33.31
	Propionic acid	Butiric acid	500	2	5.64
Medium, pH 3	Acetic acid	Propionic acid	500	2	3.42
	Acetic acid	Butiric acid	500	2	9.49
Medium, pH 3	Propionic acid	Butiric acid	500	2	3.24

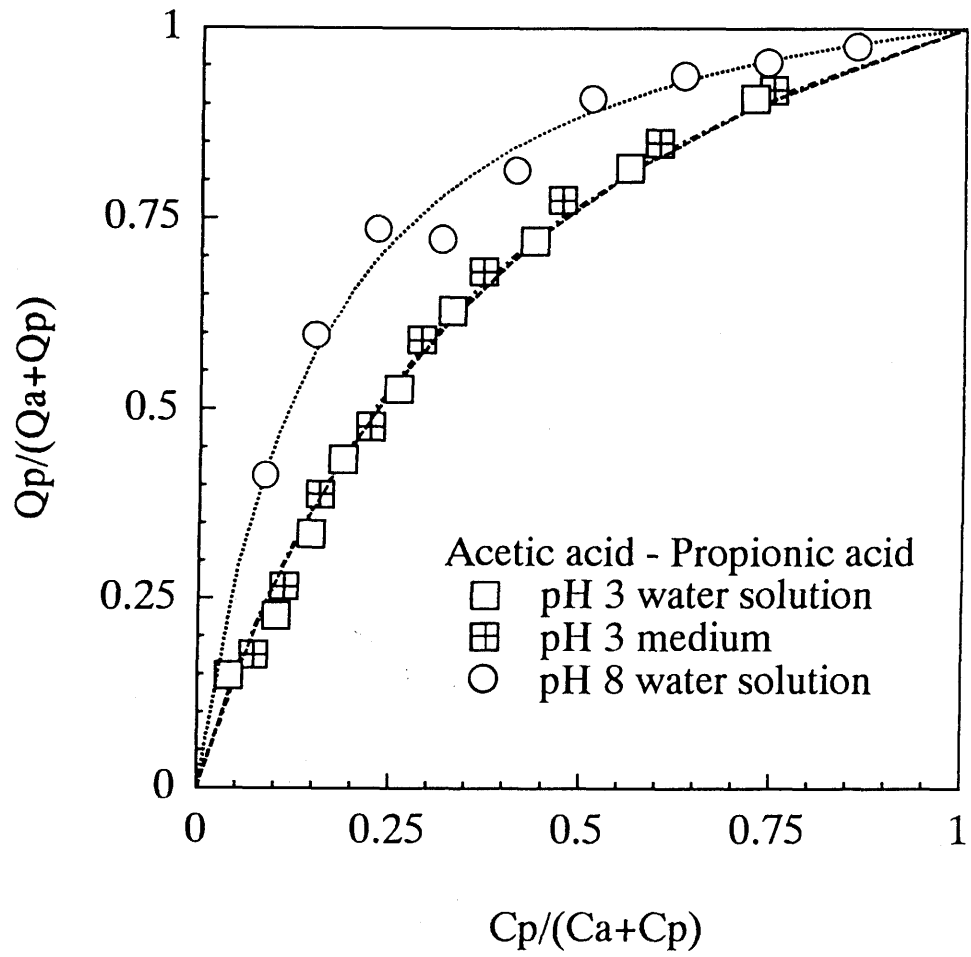


Fig. 5-5 Relation between fractional concentrations of organic acids in liquid and activated charcoal phases for adsorption. The dotted lines show the results of calculation using separation factor shown in Table 5-2.

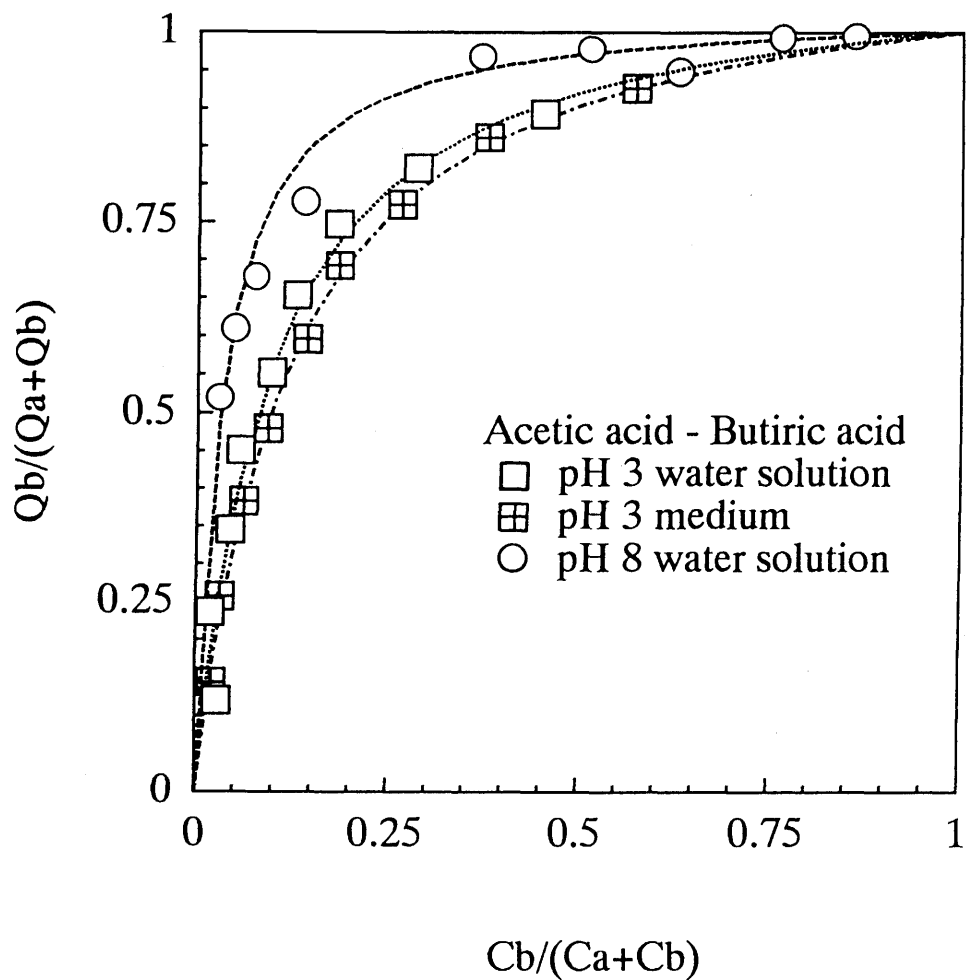


Fig. 5-6 Relation between fractional concentrations of organic acids in liquid and activated charcoal phases for adsorption. The dotted lines show the results of calculation using separation factor shown in Table 5-2.

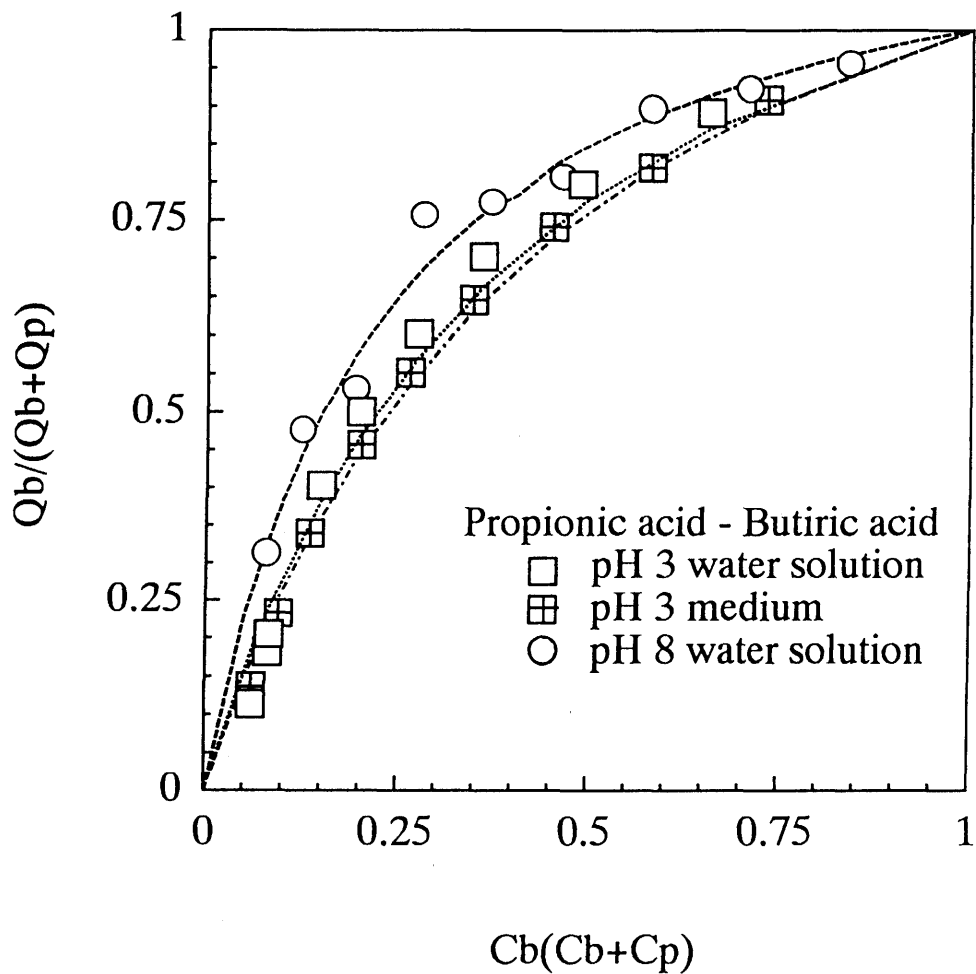


Fig. 5-7 Relation between fractional concentrations of organic acids in liquid and activated charcoal phases for adsorption. The dotted lines show the results of calculation using separation factor shown in Table 5-2.

された選択係数による計算値を示している。算出された選択係数についてTable 5-2に示した。各有機酸の組合せにおいて吸着条件による比較を行うと、水系および培養液系で選択係数に大きな差異は生じないことが分かる。非解離型と解離型の有機酸で比較すると、解離型の有機酸の吸着においては選択係数が大きくなる傾向が示された。この結果は(2)で述べた吸着機構が親水的な作用であると考えられる非解離型(イオン)の有機酸の吸着においても、疎水性が大きい方が活性炭に吸着されやすいことを支持するだけでなく、疎水性の影響が非解離型の有機酸の吸着より解離型の有機酸の吸着の場合に、より顕著に表れることを示している。

5-3 活性炭に対する酢酸およびプロピオン酸 2 成分系の吸着平衡式

5-3-1 二成分系吸着平衡式の理論

プロピオン酸菌の培養では酢酸およびプロピオン酸が生産される。このため活性炭でプロピオン酸を除去しようとしても、両有機酸が活性炭に吸着することが明らかである。したがってプロピオン酸除去システムを設計するためには、少なくとも酢酸とプロピオン酸の二成分を考慮した平衡式について検討しなければならない。酢酸およびプロピオン酸の単成分の吸着平衡がそれぞれ Langmuir型の吸着平衡式になることが確認された。これにより、二成分系の吸着平衡もLangmuir型になることが予想される。単一成分の吸着平衡が Langmuir式で表わされる時、多成分系においては(5-5)式のような Langmuir型の式が成立する⁹⁷⁾。

$$Q_I = Q_{m,I} K_I C_I / (1 + \sum K_J C_J) \quad (5-5)$$

ここで Iは着目成分で、Jは任意の成分である。Qは吸着量、 Q_m は最大吸着量、Kは Langmuir定数、Cは平衡濃度を表わしている。今回の場合、酢酸とプロピオン酸からなる二成分系であるから Pをプロピオン酸、Aを酢酸とすると

$$Q_P = Q_{m,P} K_P C_P / (1 + K_P C_P + K_A C_A) \quad (5-6)$$

$$Q_A = Q_{m,A} K_A C_A / (1 + K_P C_P + K_A C_A) \quad (5-7)$$

(5-6)式と(5-7)式より

$$Q_P / Q_A = (Q_{m,P} / Q_{m,A}) (K_P / K_A) (C_P / C_A) \quad (5-8)$$

となるので、 (Q_P / Q_A) と (C_P / C_A) の関係から (K_P / K_A) を求めることができる。この関係を満足する任意の K_P 、 K_A を用いて吸着量 Q を求め、実測値と比較して最もよく一致する値 K_P 、 K_A を試行錯誤法によって求める。

5-3-2 実験材料および方法

モデル培養液としてグルコース 15 g/l、CSL 80 g/l、 KH_2PO_4 0.4 g/lおよび $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.5 g/lを含む溶液に、酢酸およびプロピオン酸を加えた。pHはHClを添加して約3に調整した。この二成分系培養液について、酢酸とプロピオン酸の濃度比を変えて吸着平衡を測定した。吸着実験は水溶液系について行った。80 ml容量の試験管に水溶液を10 ml取り、1~2 gの活性炭を加えて室温30℃で24時間振とうを行い、水溶液中の酢酸またはプロピオン酸濃度を測定した。測定にはガスクロマトグラフィーを用いた。

5-3-3 結果および考察

吸着実験で得られた結果を5-3-1の理論にしたがって整理した。 (C_P / C_A) を横軸に、 (Q_P / Q_A) を縦軸にとって両者の関係を求めた結果をFig. 5-8に示した。この結果、水溶液系では $(K_P / K_A) = 3.69$ 、培養液系では $(K_P / K_A) = 3.17$ の関係が成立することが分かった。Langmuir定数を決定するために、この結果を用いてさらに検討を進めた。 $Q_{m,P}$ および $Q_{m,A}$ としてTable. 5-1に示した値を用いて、 Q_P および Q_A に関して実測値と比較して最もよく一致する値を与える K_P 、 K_A を試行錯誤法によって求めた。求めた二成分系の吸着平衡式の定数をTable 5-3に示した。

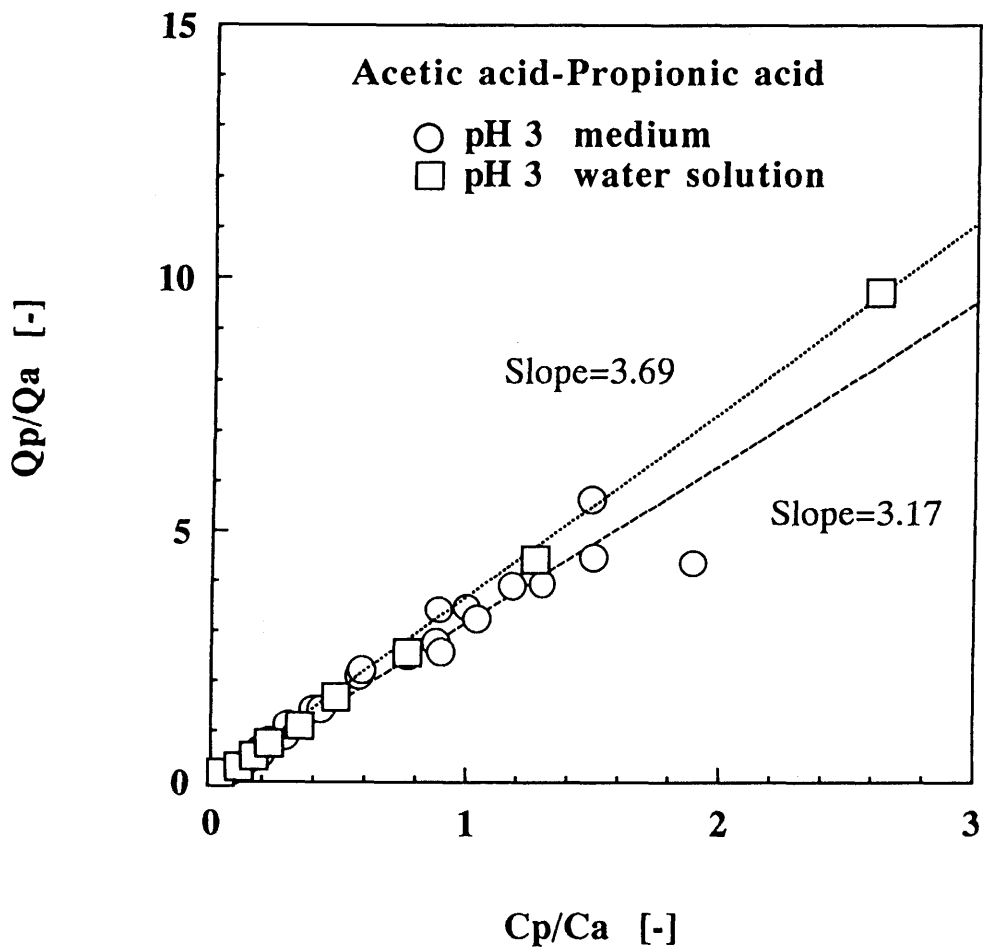


Fig.5-8 Relation between proportions of acetic and propionic acids in liquid and activated charcoal phases for adsorption.

Table 5-3 Adsorption parameters of Langmuir formula,
 $Q_{\text{pro}} = Q_{\text{mpro}}K_{\text{pro}}C_{\text{pro}}/(1+K_{\text{pro}}C_{\text{pro}}+K_{\text{ace}}C_{\text{ace}})$ or
 $Q_{\text{ace}} = Q_{\text{mace}}K_{\text{ace}}C_{\text{ace}}/(1+K_{\text{pro}}C_{\text{pro}}+K_{\text{ace}}C_{\text{ace}})$.*

System	Q_{mpro}	K_{pro}	Q_{mace}	K_{ace}
Water	3.43	0.038	2.73	0.013
Medium	2.84	0.031	1.98	0.014

* ace; acetic acid, pro; propionic acid

Table 5-3に示した二成分系での Langmuir定数の有効性を確認するため、これらの定数を用いて、実験で得られた平衡濃度から求めた Q_p および Q_a の計算値と、それぞれの吸着量の実測値の比較を行った。水溶液系および培養液系の結果を、それぞれ Fig.5-9および 5-10に示した。両者とも計算値と実測値はほぼ一致する結果が得られている。

5-4 活性炭の粒内表面拡散係数

5-4-1 粒内拡散係数の測定理論

粒内拡散係数を求めるために、物質移動における物質収支に基づいた数値計算プログラムを作製した。この計算プログラムに様々な粒内拡散係数を代入し、吸着質の濃度変化の実測値に最も良く合う曲線を与える粒内拡散係数を試行錯誤法によって求めた⁹⁸⁾。粒内拡散係数を求める基礎式を導くために、以下のような仮定を用いた。

- (1)液相は完全混合であり、液境膜抵抗は無視できる。
- (2)粒子（活性炭）は球形である。
- (3)粒内の物質移動について表面拡散が律速である。

粒内における拡散抵抗は有機酸濃度によらず一定であるとみなすと、粒内の物質収支より、

$$\partial q / \partial t = D_s \left(\partial^2 q / \partial r^2 + (2/r) \cdot \partial q / \partial r \right) \quad (5-9)$$

ただし、 D_s ：粒内拡散係数 [m^2/s]、 r ：粒内半径方向位置 [m]、

q ：吸着量 [mol/kg]

粒子表面の物質移動から、

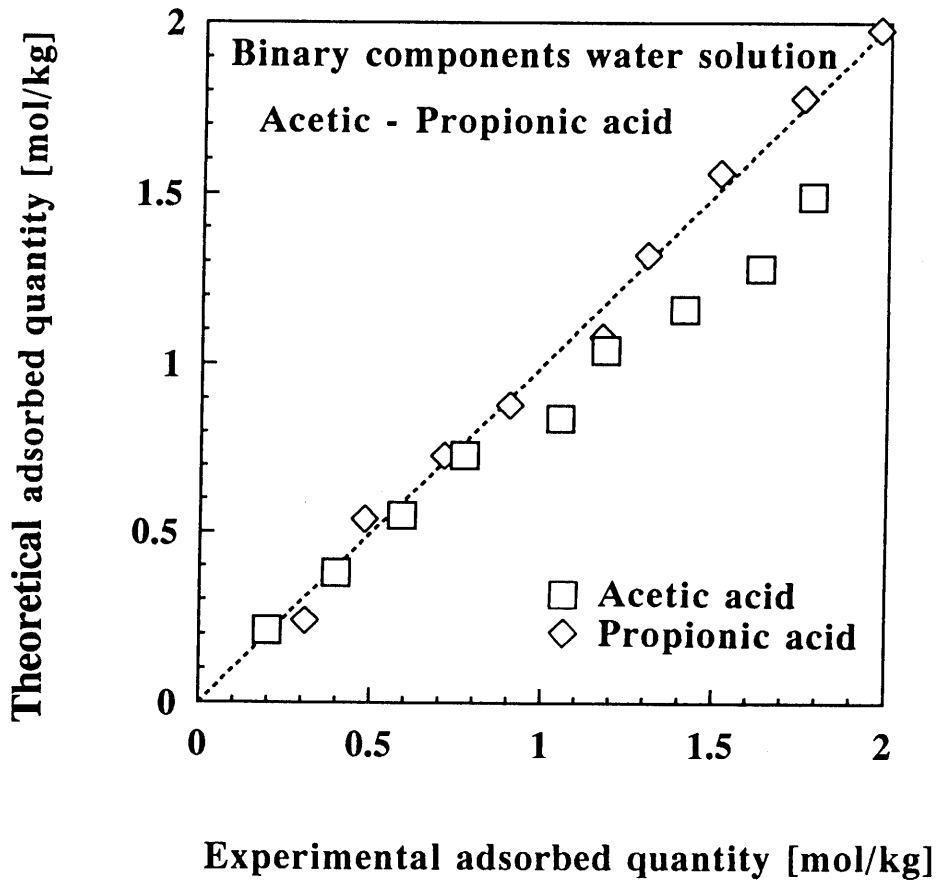


Fig. 5-9 Comparison of experimental value and theoretical value obtained by calculations using constants shown in Table 5-3.

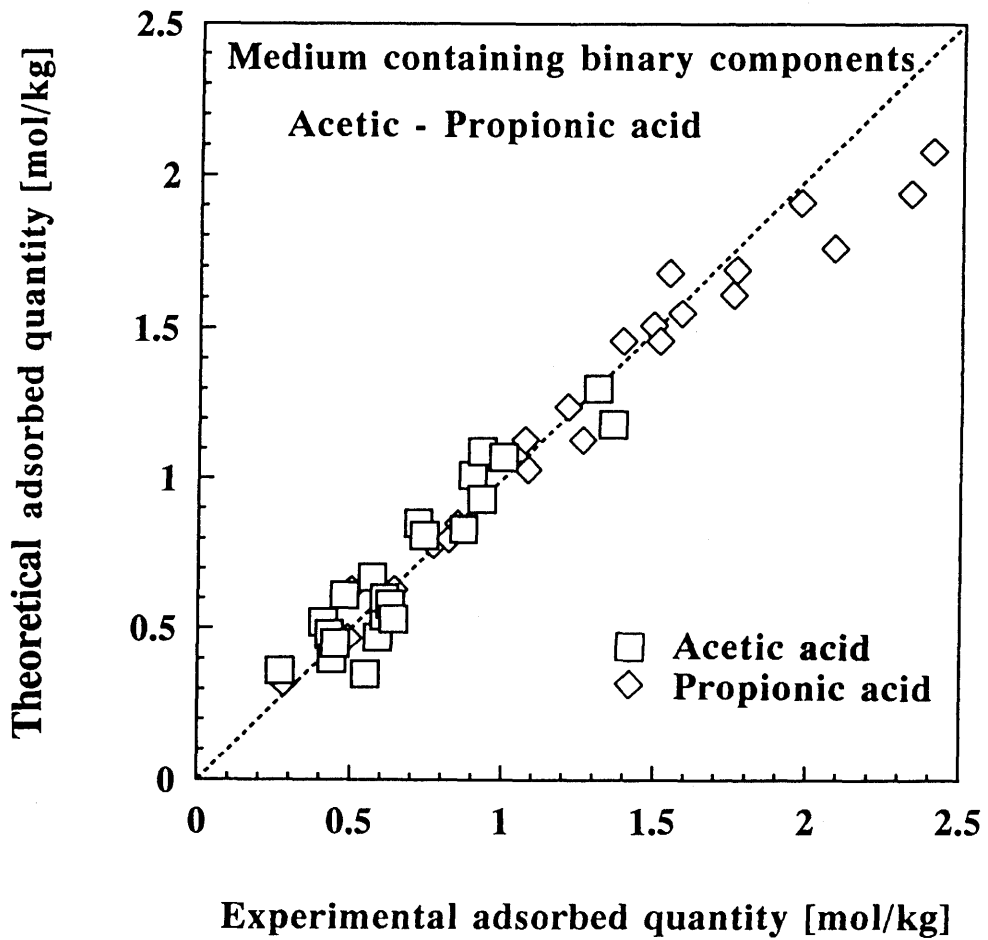


Fig. 5-10 Comparison of experimental value and theoretical value obtained by calculations using constants shown in Table 5-3.

$$V_L (dc/dt) = -D_s S \rho_p (\partial q / \partial r)_{r=b} \quad (5-10)$$

ただし、 V_L ：液相体積 [m^3]、 S ：全粒子の表面積 [m^2]、 b ：粒子半径 [m]

C ：平衡濃度 [mol/m^3]、 ρ_p ：粒子密度 [kg/m^3]

粒内の濃度分布は同心円状であるので、

$$(\partial q / \partial r)_{r=0} = 0 \quad (5-11)$$

固液の平衡関係は Langmuir 式で表わされるので

$$q = q_m KC / (1 + KC) \quad (5-12)$$

ただし、 q_m ：最大吸着量 [mol/kg]、 K ：Langmuir 定数 [m^3/mol]

ここで、 n_p ：粒子数 [-]、 V_s ：全粒子の体積 [m^3]、 W_s ：全粒子の質量 [kg]

とすると、

$$\begin{aligned} S \rho_p &= (n_p \cdot 4 \pi b^2) \rho_p = \rho_p (3/b) (n_p (4/3) \pi b^3) \\ &= (3/b) \rho_p V_s = 3 W_s / b \end{aligned} \quad (5-13)$$

よって、(5-10)式より、

$$dc/dt = - (3 D_s W_s / V_L b) (\partial q / \partial r)_{r=b} \quad (5-14)$$

以上が基礎式である。

次に無次元化のために、 $X \equiv C/C_0$ 、 $Y \equiv q/q_0$ 、 $\tau \equiv D_s t / b^2$ 、 $R \equiv r/b$ とする。

(5-9)式より

$$\partial Y / \partial \tau = \partial^2 Y / \partial R^2 + (2/R) \partial Y / \partial R \quad (5-15)$$

この (5-15)式を解くための境界条件は (5-10)式より、

$$dY/d\tau = -3\beta (dY/dX) (\partial Y / \partial R)_{R=1} \quad (5-16)$$

ただし、 $\beta = W_s q_0 / V_L C_0$ とし、 C_0 ：初濃度 [mol/m^3]、 q_0 ： C_0 に平衡な吸着量 [mol/kg]である。

粒子表面においては (5-12)式より

$$Y = X / (k + (1 - k) X) \quad \text{ただし、} k = 1 / (1 + K C_0) \quad (5-17)$$

これを变形すると

$$X = k Y / (1 - (1 - k) Y) \quad (5-18)$$

粒子中心部においては濃度分布はないので、

$$(\partial Y / \partial R)_{R=0} = 0 \quad (5-19)$$

$C_{t=0}$: $t = 0$ における有機酸濃度 [mol/m³]、 $X_{t=0} \equiv C_{t=0} / C_0$ とすると、

初期条件は、

$$X = X_{t=0} = 1 \quad \text{および} \quad Y = 0 \quad (0 \leq R \leq 1) \quad (5-20)$$

次にこれらの無次元化式を数値計算によって解く。陽解法における差分近似式を導出するために、

$$R = m \cdot \Delta R \quad (0 \leq m \leq M) \quad (5-21)$$

$$\tau = n \cdot \Delta \tau \quad (0 \leq n) \quad (5-22)$$

とおく。

(I) 中間半径位置 ($1 \leq m \leq M-1$)

(5-15)式の差分化に以下の式を用いる。

$$\partial Y / \partial \tau = (Y_{m,n+1} - Y_{m,n}) / \Delta \tau$$

$$\partial Y / \partial R = (Y_{m+1,n} - Y_{m-1,n}) / 2 \Delta R$$

$$\partial^2 Y / \partial R^2 = (Y_{m+1,n} - 2 Y_{m,n} + Y_{m-1,n}) / \Delta R^2$$

(5-15)に代入して項を整理すると、

$$Y_{m,n+1} = \lambda (1 - 1/m) Y_{m-1,n} + (1 - 2\lambda) Y_{m,n} + \lambda (1 + 1/m) Y_{m+1,n} \quad (5-23)$$

ただし、 $\lambda = \Delta \tau / \Delta R^2$ とした。

(II) 中心位置 ($m = 0$)

(5-18)式を用いて、

$$1/R (\partial Y / \partial R) = (\partial^2 Y / \partial R^2)_{R=0} \quad (5-24)$$

これを用いて (5-14)式を变形すると、

$$(dY/d\tau)_{R=0} = 3 (\partial^2 Y / \partial R^2)_{R=0} \quad (5-25)$$

(5-25)式を差分化すると

$$\begin{aligned} Y_{0,n+1} &= 3\lambda Y_{-1,n} + (1-6\lambda) Y_{0,n} + 3\lambda Y_{1,n} \\ &= (1-6\lambda) Y_{0,n} + 6\lambda Y_{1,n} \end{aligned} \quad (5-26)$$

ただし、中心からの距離が同じであるから、 $Y_{1,n} = Y_{-1,n}$ とした。

(Ⅲ) 粒子表面 ($m = M$)

任意の関数 $Y(A, B)$ についてテイラー展開を 2 次の項まで取ると、

$$\begin{aligned} Y(A - \Delta A, B) &= Y(A, B) - (\partial Y / \partial A) \Delta A \\ &\quad + (1/2) (\partial^2 Y / \partial A^2) \Delta A^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Y(A - 2\Delta A, B) &= Y(A, B) - (\partial Y / \partial A) 2\Delta A \\ &\quad + (1/2) (\partial^2 Y / \partial A^2) 4\Delta A^2 \end{aligned}$$

これらから ΔA^2 の項を消去すると

$$\begin{aligned} \partial Y / \partial A &= (1/2 \Delta A) (3Y(A, B) \\ &\quad - 4Y(A - \Delta A, B) + Y(A - 2\Delta A, B)) \end{aligned} \quad (5-27)$$

(5-27)式を用いると

$$(\partial Y / \partial R)_{R=1} = (3Y_{M,n} - 4Y_{M-1,n} + Y_{M-2,n}) / 2\Delta R \quad (5-28)$$

(5-28)式を用いて (5-16)式を差分化すると

$$\begin{aligned} (Y_{M,n+1} - Y_{M,n}) / \Delta \tau &= -3\beta (dY/dX) ((3Y_{M,n} - 4Y_{M-1,n} \\ &\quad - Y_{M-2,n}) / 2\Delta R) \end{aligned}$$

また (5-18)式を微分すると

$$dX/dY = (1 - (1-k)Y)^2 / k \quad (5-29)$$

故に

$$\begin{aligned} Y_{M,n+1} &= (-3\beta/2) (\Delta \tau / \Delta R) (dY/dX) Y_{M-2,n} \\ &+ 6\beta (\Delta \tau / \Delta R) (dY/dX) Y_{M-1,n} + (1 - (9\beta/2) (\Delta \tau / \Delta R) \\ &\quad (dY/dX)) Y_{M,n} \end{aligned} \quad (5-30)$$

ただし、 $dX/dY = (1 - (1 - k) Y_{n,n})^2 / k$

以上が陽解法における差分式である。

実際の計算においては(5-20)式の初期条件のもとで(5-18)、(5-23)、(5-26)および(5-30)式を繰り返し計算することによって数値解が求められる。BASICによる計算プログラムを Appendix 1に示した。また Appendix 1による計算例として、同じ実験条件のもとで拡散係数を変えた場合の平衡状態に到る推移について Fig.5-11に示した。

5-4-2 実験材料および方法

グルコース 7.5 g/lおよび CSL 40 g/lを含む溶液に有機酸を加えモデル培養液とした。pHを3に調整したモデル培養液 1 lに活性炭 50 gを加え、温度を 30 °Cに保ち、攪拌装置を用いて攪拌速度 200 min⁻¹で攪拌を行った。活性炭投入後、適当な時間間隔で溶液をサンプリングし、有機酸濃度の変化を測定した。有機酸の測定はガスクロマトグラフィーを用いて行った。

5-4-3 結果および考察

酢酸およびプロピオン酸について粒内表面拡散係数を求める実験を行った。結果をそれぞれ Fig. 5-12および Fig. 5-13に示した。これらのグラフの点線は数値計算の結果である。数値計算においては、Langmuir定数は Table 5-1の培養液系のものを用いた。活性炭は円筒状であったため、粒子半径として活性炭の縦長および横長を20回ノギスで測定し平均値を取り、この結果より求まる相当直径として 4.08×10^{-3} [m]を使用した。実測データに最もよく合う曲線を与える粒内拡散係数を数値計算を用いた試行錯誤法によって求めた結果、酢酸およびプロピオン酸においては、それぞれ 2.08×10^{-10} [m²/s]および 1.42×10^{-10} [m²/s]と決定した。

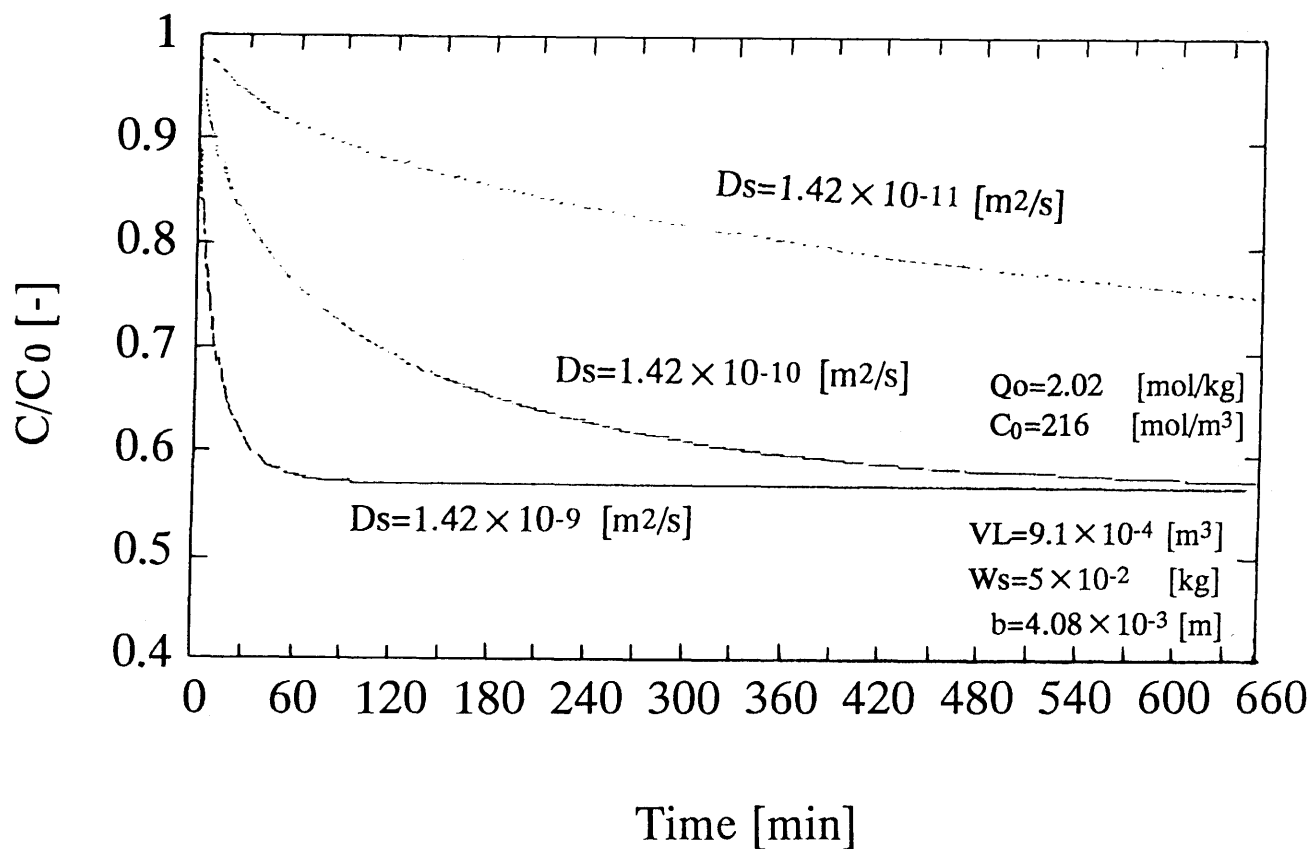


Fig. 5-11 Effect of diffusion constant on propionic acid concentration profile for adsorption onto activated charcoal.

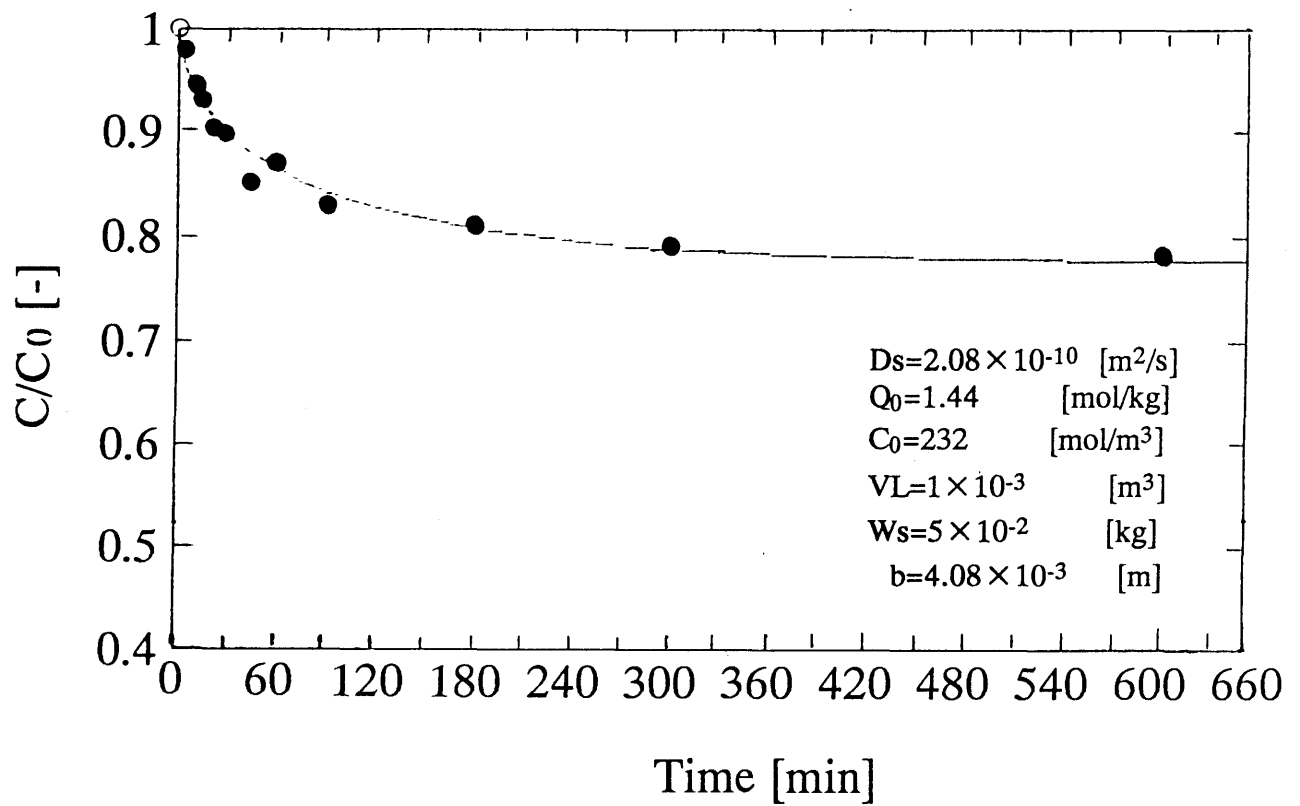


Fig. 5-12 Change of the equilibrium attainability with time for adsorption of acetic acid onto activated charcoal in medium system.

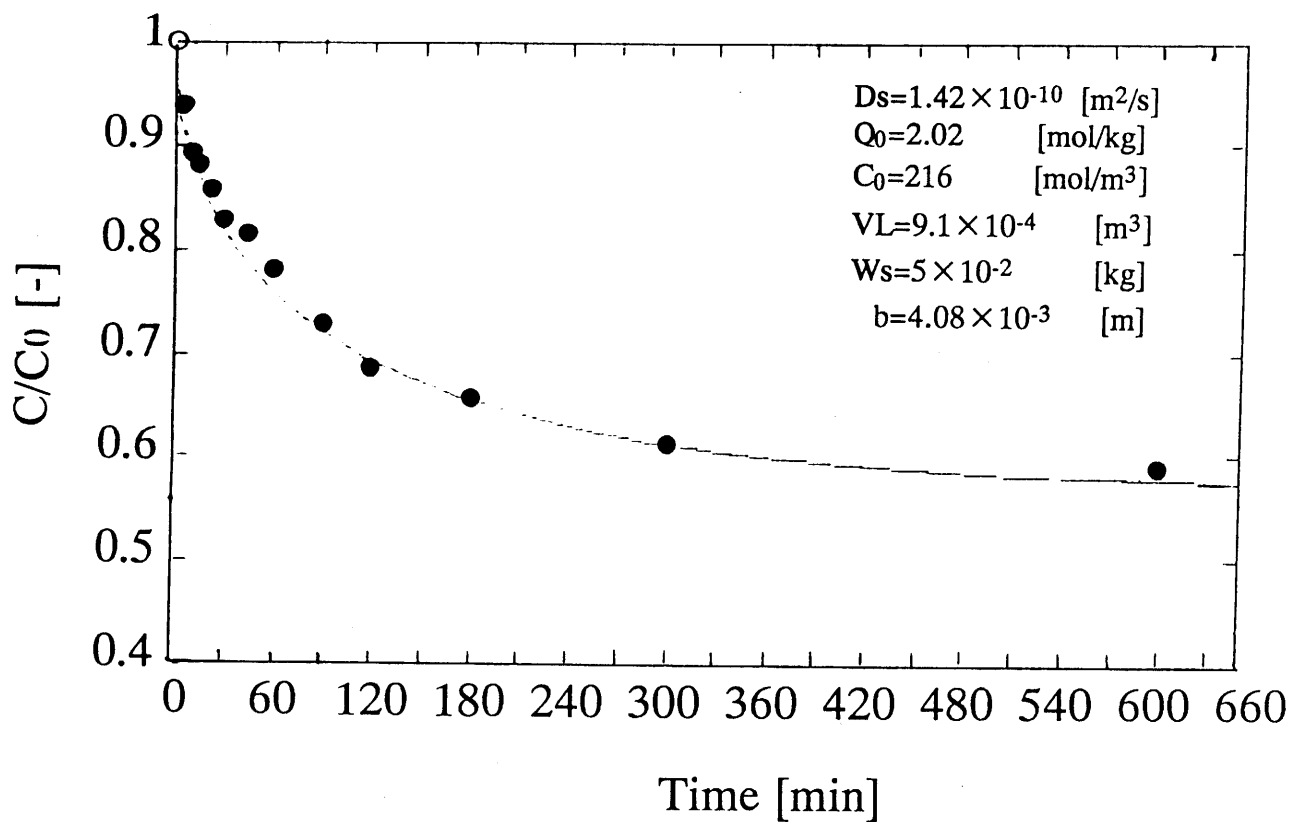


Fig. 5-13 Change of the equilibrium attainability with time for adsorption of propionic acid onto activated charcoal in medium system.

5-5 活性炭カラムの破過曲線

5-5-1 破過曲線の理論

(1) 基礎式

本研究室では、すでに元木⁹⁸⁾が Henry型の吸着における破過曲線の数値計算を行なって良好な結果を残している。そこで、本研究の吸着は Langmuir型であるが、固定層内の流動状態の基本的な理論および数値計算を行なうための計算プログラムを作製する手法については、元木の修士論文を参考にした。

破過曲線を計算するために固定層吸着理論の基礎式を用いる。固定層における軸方向の混合を拡散モデルで表わすと、物質収支から次式が得られる。

$$u \left(\frac{\partial c}{\partial z} \right) + \varepsilon \left(\frac{\partial c}{\partial t} \right) + \gamma \left(\frac{\partial q}{\partial t} \right) = \varepsilon D_L \left(\frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) \quad (5-31)$$

ただし、 u : 空塔速度 [m/s]、 z : 固定層内軸方向位置 [m]、 ε : 空隙率 [-]、 γ : 充填密度 [kg/m³]、 q : 粒子平均の吸着量 [mol/kg]、 D_L : 軸方向混合拡散係数 [m²/s]

カラム内の液の流動がピストン流の状態であれば (5-31)式の右辺の拡散項を無視することができる。そのため通常の実験条件では、右辺の拡散項を無視した式で計算を行なっている。しかし、一般的に流動の状態を表わすレイノルズ数が 1 以下の場合には、軸方向の拡散混合を無視できないようである。レイノルズ数は、次式で定義される。

$$R_e = 2 u b \rho_F / \varepsilon \mu_F \quad (5-32)$$

ただし、 R_e : レイノルズ数 [-]、 ρ_F : 流体の密度 [kg/m³]、 μ_F : 流体の粘度 [Pa·s]、 b : 粒子半径 [m]

本研究ではカラムへの液供給速度として、第3章で行なった灌流培養の結果より 0.3 l/hを想定した。作製したカラムに活性炭を詰め、この流速で液を供給した

場合の空塔速度からレイノルズ数を計算すると、活性炭粒子の半径を 4.08×10^{-3} [m]、充填率を 0.6 とし、 ρ_F および μ_F についてはそれぞれ、 1000 [kg/m³] および 8.02×10^{-4} [Pa·s] の値を用いると $Re=0.19$ となる。したがって本研究の条件では、軸方向の混合拡散を無視することができないと考えられ、破過曲線の計算において通常無視されている軸方向の混合拡散を含む (5-31) 式を用いて数値計算を行うことにした。

次に、流体から活性炭粒子への物質移動速度を表わす (5-31) 式の左辺第 3 項について境膜における物質移動式で表わすと、

$$\gamma (\partial q / \partial t) = k_F a_v (c - c_F) \quad (5-33)$$

ただし、 k_F : 境膜物質移動係数 [m/s]、 a_v : 比表面積 [m²/m³]、 c_F : 界面における液相濃度 [mol/m³]

(5-33) 式を解くためには、(5-9) 式と連立させる必要があり、計算が複雑である。そこで境膜物質移動係数の代わりに総括物質移動係数 K_F [m/s] を用いて (5-33) 式を書き直すと、

$$\gamma (\partial q / \partial t) = K_F a_v (c - c_s) \quad (5-34)$$

ただし、 C_s : q に平衡な液相濃度 [mol/m³] である。

この式を解くためには K_F の値が必要であるが、河添らによると K_F は次式によって求められる⁹⁹⁾。

$$K_F = \alpha \left((1/k_f) + (1/\beta k_s) + (2 b a_v / P_e u) \right)^{-1} \quad (5-35)$$

ただし、 P_e : ペクレ数 ($= 2 b u / \varepsilon D_L$) [-]、 $\beta = q_0 / c_0$ 、

c_0 : 初濃度 [mol/m³]、 q_0 : c_0 に平衡な吸着量 [mol/kg]

k_f : 流体境膜物質移動係数 [kg/m²hΔc]、

k_s : 粒子内物質移動係数 [kg/m²hΔq]

液混合の状態を表わすペクレ数はレイノルズ数が 20 以下の場合にはほぼ 0.5 となる。 α の値は 1~1.3 と考えてよい。また a_v 、 k_f および k_s は次式のように関連される。

$$a_v = 3(1 - \varepsilon) / b \quad (5-36)$$

$$k_f = 1.09(u / \varepsilon)(\mu_F / \rho_F D_F)^{-2/3}(2bu\rho_F / \mu_F)^{-2/3} \quad (5-37)$$

ただし D_F : 分子拡散係数 [m^2/s]である。

$$k_s = 1.5 D_s \gamma / b^2 a_v \quad (5-38)$$

固液の平衡関係は Langmuir型の吸着式で表わせる。吸着物質が単成分であるとすると、

$$q = q_m K c_s / (1 + K c_s) \quad (5-39)$$

以上が固定層破過曲線の数値計算のための基礎式である。実際の計算においては、(5-36)~(5-38)式を用いて各パラメーターの値を決め、(5-31)、(5-33)および(5-39)式を連立させて解くことになる。

次に、これらの基礎式を解くための境界条件と初期条件を述べる。カラムの出口において装置内外の濃度は等しいので、

$$(\partial c / \partial z)_{z=z_m-} = 0 \quad (5-40)$$

ただし、 z_m : 層長 [m]である。ここで z_m のマイナス記号は、(5-40)式の左辺がカラム内側の濃度分布により決定される $z = z_m$ の位置の微分項であることを表わしている。また、 $t > 0$ においてカラムの入口における境界条件は、 $z = 0 \pm$ における物質収支から次式で与えられる。

$$c_{z=0+} = c_{z=0-} + (\varepsilon D_L / u) (\partial c / \partial z)_{z=0+} \quad (5-41)$$

ここで、 c は $z = 0$ の位置で不連続であるため、その値や微分項は境界付近の極限值で表わされる。 0 の指数位置のプラス記号およびマイナス記号は、それぞれ装置の内と外の極限值を示している。

初期条件は、次のとおりである。

液相濃度について、

$$t = 0, 0 \leq z \leq z_m \text{ に対して、 } c = 0 \quad (5-42)$$

固相濃度について、

$$t = 0, 0 \leq z \leq z_m \text{ に対して、 } q = 0 \quad (5-43)$$

q に平衡な液相濃度について

$$t = 0, 0 \leq z \leq z_m \text{ に対して、 } c_s = 0 \quad (5-44)$$

(2) 無次元化

基礎式の無次元化のために $Z = z K_F a_v / u$ 、 $X = c / c_{z=0-}$ 、 $Y = q / q_{z=0-}$

$X_s = c_s / c_{z=0-}$ 、 $T = t K_f a_v / \gamma$ 、 $A = q_{z=0-} / c_{z=0-}$ 、 $B = \varepsilon / \gamma$ 、

$C = \varepsilon D_L K_F a_v / u^2$ と定義する。

(5-34)式より、

$$A (\partial Y / \partial T) = X - X_s \quad (5-45)$$

(5-39)式より、

$$Y = X_s / (k + (1 - k) X_s) \quad (5-46)$$

$$\text{故に } X_s = k Y / (1 + (k - 1) Y) \quad (5-47)$$

ただし、 $k = 1 / (1 + K c_0)$

(5-45)と (5-31)式より、

$$(\partial X / \partial Z) + B (\partial X / \partial T) + (X - X_s) = C (\partial^2 X / \partial Z^2) \quad (5-48)$$

次に、境界条件を無次元化する。

(5-40)式より、

$$(\partial X / \partial Z)_{z=z_m-} = 0 \quad (5-49)$$

(5-41)式より、

$$X_{z=0+} = 1 + C (\partial X / \partial Z)_{z=0+} \quad (5-50)$$

初期条件は (5-42)、(5-43)および (5-44)式より次のように無次元化される。

液相濃度について、

$$T = 0, 0 \leq Z \leq Z_m \text{ に対して } X = 0 \quad (5-51)$$

固相濃度について、

$$T = 0, \quad 0 \leq Z \leq Z_m \quad \text{に対して} \quad Y = 0 \quad (5-52)$$

Yに平衡な液相濃度について

$$T = 0, \quad 0 \leq Z \leq Z_m \quad \text{に対して} \quad X_s = 0 \quad (5-53)$$

(3) クランクーニコルソン法による差分化

差分近似式導出のための差分格子について次のように定義する。

ΔZ : 軸方向の格子間隔、 j : 軸方向の格子番号、 $j_m = Z_m / \Delta Z$ として、

$$Z = j \cdot \Delta Z \quad (0 \leq j \leq j_m) \quad (5-54)$$

ΔT : 時間方向の格子間隔、 n : 時間方向の格子番号として、

$$T = n \cdot \Delta T \quad (0 \leq n) \quad (5-55)$$

$$\lambda_1 = \Delta T / \Delta Z \quad (5-56)$$

$$\lambda_2 = \Delta T / \Delta Z^2 \quad (5-57)$$

軸方向の差分格子点番号 J に対応する X および Y の値を表わすものとして、それぞれ X_J および Y_J とする。 $T = T + \Delta T$ における各パラメーターを表わすために添字+を用いる。

初期条件は (5-51)、(5-52) および (5-53) 式より、次のように書き換えられる。

液相濃度について、

$$n = 0, \quad 0 \leq j \leq j_m \quad \text{に対して} \quad X_J = 0 \quad (5-58)$$

固相濃度について、

$$n = 0, \quad 0 \leq j \leq j_m \quad \text{に対して} \quad Y_J = 0 \quad (5-59)$$

Qに平衡な液相濃度について

$$n = 0, \quad 0 \leq j \leq j_m \quad \text{に対して} \quad X_{s,J} = 0 \quad (5-60)$$

次に $X_{s,J}$ および X_{J+} を計算するための差分近似式について述べる。

< $X_{s,J}$ の差分近似式 >

(5-45)式について時間方向について前進差分を用い、右辺を $T = T$ と $T = T + \Delta T$ のときの値の平均で表わして、

$$\begin{aligned} A (Y_{J^+} - Y_J) / \Delta T \\ = (1/2) ((X_{J^+} - X_{s,J^+}) + (X_J - X_{s,J})) \end{aligned} \quad (5-61)$$

(5-61)式を変形して

$$\begin{aligned} Y_{J^+} = (\Delta T / 2A) (X_{J^+} - X_{s,J^+} \\ + X_J - X_{s,J} + (2A / \Delta T) Y_J) \end{aligned} \quad (5-62)$$

(5-46)式を用いて Y_{J^+} および Y_J を消去すると

$$\begin{aligned} X_{s,J^+} / (k + (1-k) X_{s,J^+}) = (\Delta T / 2A) (X_{J^+} - X_{s,J^+} \\ + X_J - X_{s,J} + (2A / \Delta T) X_{s,J} / (k + (1-k) X_{s,J})) \end{aligned} \quad (5-63)$$

ここで、 $B_J = X_J - X_{s,J} + (2A / \Delta T) X_{s,J} / (k + (1-k) X_{s,J})$ とすると、

$$\begin{aligned} X_{s,J^+} = (\Delta T k / 2A) (X_{J^+} - X_{s,J^+} + B_J) \\ + (\Delta T (1-k) / 2A) X_{s,J^+} (X_{J^+} - X_{s,J^+} + B_J) \end{aligned} \quad (5-64)$$

この式を X_{s,J^+} の項でまとめると

$$\begin{aligned} (\Delta T (k-1) / 2A) (X_{s,J^+})^2 + (\Delta T (1-k) / 2A) X_{J^+} \\ + (\Delta T (1-k) / 2A) B_J - (\Delta T k / 2A) - 1) X_{s,J^+} \\ + \Delta T k / 2A (X_{J^+} + B_J) = 0 \end{aligned} \quad (5-65)$$

(5-65)式より X_{s,J^+} は二次方程式の解の公式で表わすことができるから、

$$a = \Delta T (k-1) / 2A, \quad b = (\Delta T (1-k) / 2A) X_{J^+} + (\Delta T (1-k) / 2A) B_J - (\Delta T k / 2A) - 1, \quad c = \Delta T k / 2A (X_{J^+} + B_J)$$

とおくと、

$$X_{s,J^+} = (-b \pm (b^2 - 4ac)^{0.5}) / 2a \quad (5-66)$$

< X_J の差分近似式 >

X_J を求めるための差分近似式は、カラム入口、カラム中間位置およびカラム出口の3つに分けて導かれる。まずカラム入口における差分近似式を導く。

任意の関数 $Y(A, B)$ についてテイラー展開を2次の項まで取ると、

$$Y(A + \Delta A, B) = Y(A, B) + (\partial Y / \partial A) \Delta A + (1/2) (\partial^2 Y / \partial A^2) \Delta A^2$$

$$Y(A + 2\Delta A, B) = Y(A, B) + (\partial Y / \partial A) 2\Delta A + (1/2) (\partial^2 Y / \partial A^2) \Delta 2A^2$$

これらから ΔA^2 の項を消去すると

$$\partial Y / \partial A = (1/2 \Delta A) (-3Y(A, B) + 4Y(A + \Delta A, B) - Y(A + 2\Delta A, B)) \quad (5-67)$$

これを用いて (5-50) 式を $T = T + \Delta T$ のときについて差分化する。 $X_{z=\theta^+}$ を X_{θ^+} に置き換えて、

$$X_{\theta^+} = 1 + (C/2 \Delta Z) (-3X_{\theta^+} + 4X_{1^+} - X_{2^+}) \quad (5-68)$$

故に、

$$X_{\theta^+} = (1/2 \Delta Z + 3C) (4CX_{1^+} - CX_{2^+} + 2\Delta Z) \quad (5-69)$$

カラム中間位置について (5-48) 式より

$$B(\partial X / \partial T) = C(\partial^2 X / \partial Z^2) - (\partial X / \partial Z) - (X - X_s) \quad (5-70)$$

左辺を前進差分、右辺を $T = T$ と $T = T + \Delta T$ のときの中心差分の平均で表わして

$$B(X_{J^+} - X_J) / \Delta T = (C/2) ((X_{J+1^+} - 2X_{J^+} + X_{J-1^+}) / \Delta Z^2 + (X_{J+1} - 2X_J + X_{J-1}) / \Delta Z^2) - (1/2) ((X_{J+1^+} - X_{J-1^+}) / 2\Delta Z + (X_{J+1} - X_{J-1}) / 2\Delta Z) - (1/2) (X_{J^+} - X_{s,J^+} + X_J - X_{s,J}) \quad (5-71)$$

これを (5-56) と (5-57) 式を用いて変形すると、

$$\begin{aligned}
 B (X_J^+ - X_J) &= (C \lambda_2 / 2) (X_{J+1}^+ - 2 X_J^+ + X_{J-1}^+ + X_{J+1} - 2 X_J \\
 &+ X_{J-1}) - (\lambda_1 / 4) (X_{J+1}^+ - X_{J-1}^+ + X_{J+1} - X_{J-1}) \\
 &- (\Delta T / 2) (X_J^+ - X_{s,J}^+ + X_J - X_{s,J})
 \end{aligned} \tag{5-72}$$

故に、

$$\begin{aligned}
 X_J^+ &= (1 / (4 B + 4 C \lambda_2 + 2 \Delta T)) ((2 C \lambda_2 - \lambda_1) X_{J+1}^+ + (2 C \\
 &\lambda_2 + \lambda_1) X_{J-1}^+ + 2 \Delta T X_{s,J}^+ + (2 C \lambda_2 - \lambda_1) X_{J+1} + (4 B - 4 C \lambda_2 - \\
 &2 \Delta T) X_J + (2 C \lambda_2 + \lambda_1) X_{J-1} + 2 \Delta T X_{s,J})
 \end{aligned} \tag{5-73}$$

ここで、 $C_J = (2 C \lambda_2 - \lambda_1) X_{J+1} + (4 B - 4 C \lambda_2 - 2 \Delta T) X_J + (2 C \lambda_2 + \lambda_1) X_{J-1} + 2 \Delta T X_{s,J}$ とすると、

$$\begin{aligned}
 X_J^+ &= (1 / (4 B + 4 C \lambda_2 + 2 \Delta T)) ((2 C \lambda_2 - \lambda_1) X_{J+1}^+ \\
 &+ (2 C \lambda_2 + \lambda_1) X_{J-1}^+ + 2 \Delta T X_{s,J}^+ + C_J)
 \end{aligned} \tag{5-74}$$

カラム出口について (5-49) 式を中心差分で表わすと、

$$\begin{aligned}
 (X_{J_m+1}^+ - X_{J_m-1}^+) / 2 \Delta Z &= 0 \\
 (X_{J_m+1} - X_{J_m-1}) / 2 \Delta Z &= 0
 \end{aligned}$$

したがって $X_{J_m+1}^+ = X_{J_m-1}^+$ 、 $X_{J_m+1} = X_{J_m-1}$ が得られる。

これを (5-73) 式に用いると、

$$\begin{aligned}
 X_{J_m}^+ &= (1 / (2 B + 2 C \lambda_2 + \Delta T)) ((2 C \lambda_2 X_{J_m-1}^+ + \Delta T X_{s,J_m}^+ \\
 &+ (2 B - 2 C \lambda_2 - \Delta T) X_{J_m} + 2 C \lambda_2 X_{J_m-1} + \Delta T X_{s,J_m})
 \end{aligned} \tag{5-75}$$

ここで、 $C_{J_m} = (2 B - 2 C \lambda_2 - \Delta T) X_{J_m} + 2 C \lambda_2 X_{J_m-1} + \Delta T X_{s,J_m}$ とすると、

$$\begin{aligned}
 X_{J_m}^+ &= (1 / (2 B + 2 C \lambda_2 + \Delta T)) ((2 C \lambda_2 X_{J_m+1}^+ + \Delta T X_{s,J_m}^+ \\
 &+ C_{J_m})
 \end{aligned} \tag{5-76}$$

以上がクランク・ニコルソン法における差分近似式である。

<漸化式の導出>

次に、これらの差分近似式を解くためにSOR法（逐次過緩和法）における漸化式を求める。緩和係数を ω [-]とすると、収束を最も早める ω は次式で与えられる。

$$\omega = 1 / (1 + (1 - \mu^2)^{1/2}) \quad (5-77)$$

ただし、 $\mu = (\lambda / (\lambda + 1)) (\cos(\pi / s))$

さらにSOR法における緩和回数を k として、 k 回目の緩和による X_J^+ および Y_J^+ の値をそれぞれ $X_J^{(k)+}$ および $Y_J^{(k)+}$ とする。

(5-66)式より、 $X_{s,J}$ を求めるための漸化式は

$$X_{s,J}^{(k+1)+} = \omega (-b \pm (b^2 - 4ac)^{0.5}) / 2a - (\omega - 1) X_{s,J}^{(k)+} \quad (5-78)$$

(5-69)式より、 X_θ^+ を求めるための漸化式は

$$X_\theta^{(k+1)+} = (\omega / 2 \Delta Z + 3C) (4C X_1^{(k)+} - C X_2^{(k)+} + 2 \Delta Z) - (\omega - 1) X_\theta^{(k)+} \quad (5-79)$$

(5-74)式より、 X_J^+ を求めるための漸化式は

$$X_J^{(k+1)+} = (\omega / (4B + 4C\lambda_2 + 2\Delta T)) ((2C\lambda_2 - \lambda_1) X_{J+1}^{(k)+} + (2C\lambda_2 + \lambda_1) X_{J-1}^{(k+1)+} + 2\Delta T X_{s,J}^{(k+1)+} + C_J) - (\omega - 1) X_J^{(k)+} \quad (5-80)$$

(5-76)式より、 $X_{J_m}^+$ を求めるための漸化式は

$$X_{J_m}^{(k+1)+} = (\omega / (2B + 2C\lambda_2 + \Delta T)) ((2C\lambda_2 X_{J_{m+1}}^{(k+1)+} + \Delta T X_{s,J_m}^{(k+1)+} + C_{J_m}) - (\omega - 1) X_{J_m}^{(k)+}) \quad (5-81)$$

具体的な計算方法としては、パーソナルコンピュータを用いて(5-78)~(5-81)式をプログラム化し、繰り返し計算を行なわせることによって破過曲線を求める

ことができる。計算プログラムのフローシートを Fig.5-14に示した。また Fig. 5-14に従って数値計算を行うプログラムを Appendix 2に示した。Appendix 2を用いてシミュレーションを行った例として、有機酸の初濃度が破過曲線に及ぼす影響についてのシミュレーションを Fig.5-15に、液供給速度が破過曲線に及ぼす影響についてのシミュレーションを Fig.5-16にそれぞれ示した。

(4) 二成分系破過曲線の数値計算

多成分系の破過曲線の計算は、基本的にはこれまで述べてきた単成分系での計算と同じである。異なる点は、単成分系での吸着平衡式を多成分系での吸着平衡式に直し、また各成分について固定層での物質収支および速度式を立てることである⁹⁷⁾。したがって今回の場合、数式で異なるのは (5-78)式だけであり、次のように変形される。

プロピオン酸について解くと、(5-6)を無次元化して、

$$Y_P = X_P / k_2 (1 + k_3 X_P + k_4 X_A) \quad (5-82)$$

ただし、A, Pはそれぞれ酢酸およびプロピオン酸についてである。

また、 $k_2 = 1 / (1 + k_3 + k_4)$ 、 $k_3 = K_P C_{P0}$ 、 $k_4 = K_A C_{A0}$

(5-82)式を用いて差分化を行なうと、(5-66)式は (5-83)式に書き換えられる。

$$X_{P_s, J^+} = (-b \pm (b^2 - 4ac)^{0.5}) / 2a \quad (5-83)$$

ただし、 $a = \Delta T k_2 k_3 / 2A$ 、 $b = (\Delta T k_2 / 2A) (2 - k_3 X_{PJ^+} - k_3 B_{PJ} + k_4 X_{As, J^+})$ 、

$c = -(\Delta T k_2 / 2A) (X_{PJ^+} + B_{PJ} + k_4 X_{As, J^+} X_{PJ^+} + k_4 X_{As, J^+} B_{PJ})$ 、

$B_{PJ} = X_{PJ} - X_{Ps, J}$

$+ (2A / \Delta T) (X_{Ps, J} / k_2 (1 + k_3 X_{Ps, J} + k_4 X_{As, J}))$

数値計算においては、酢酸についても同様な式を用いる。そして、それぞれについて(5-79)~(5-81)式を用いて計算を行なう。二成分系での数値計算プログラム

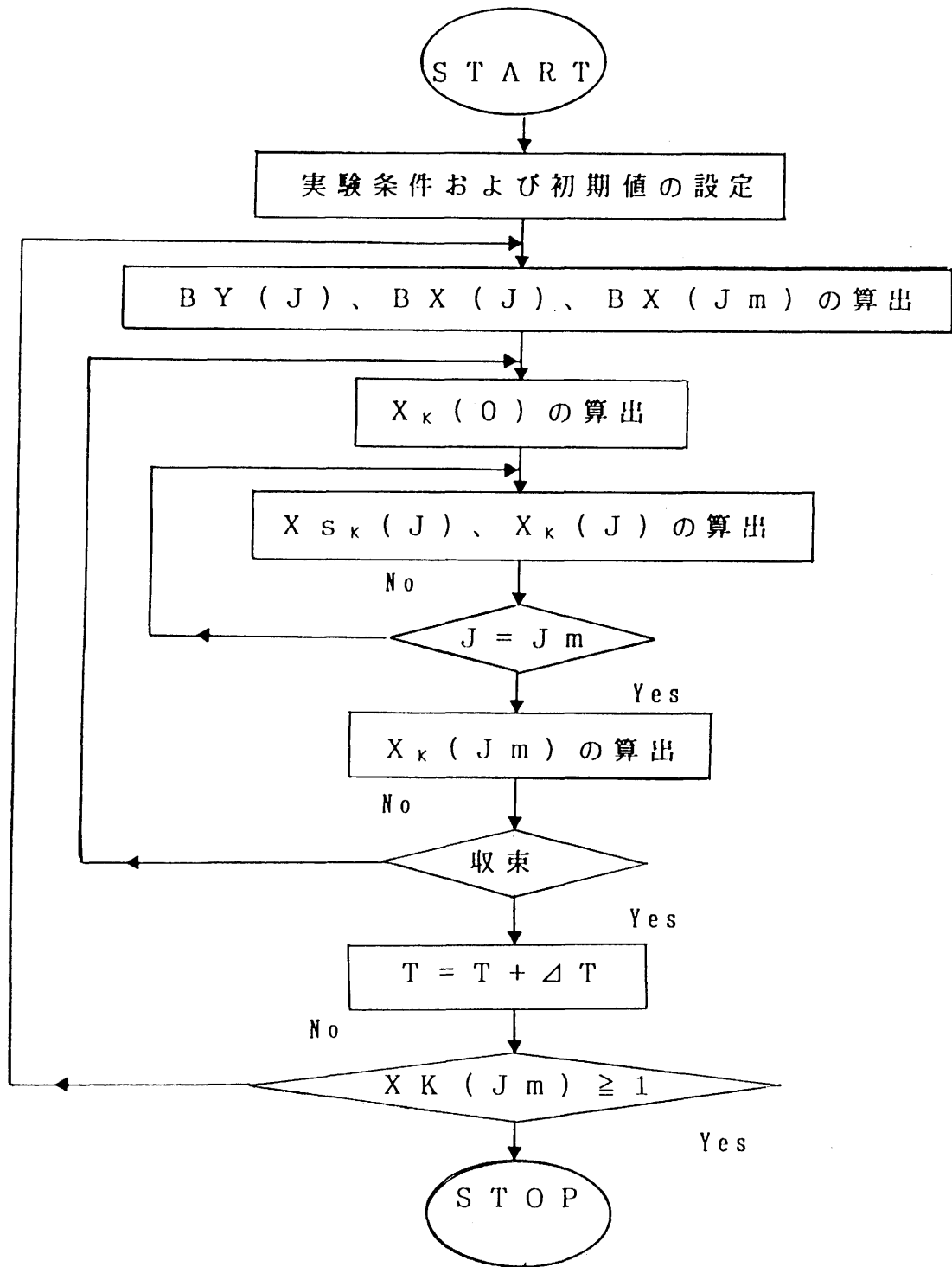


Fig. 5-14 Flow sheet of the numerical calculation of breakthrough curve.

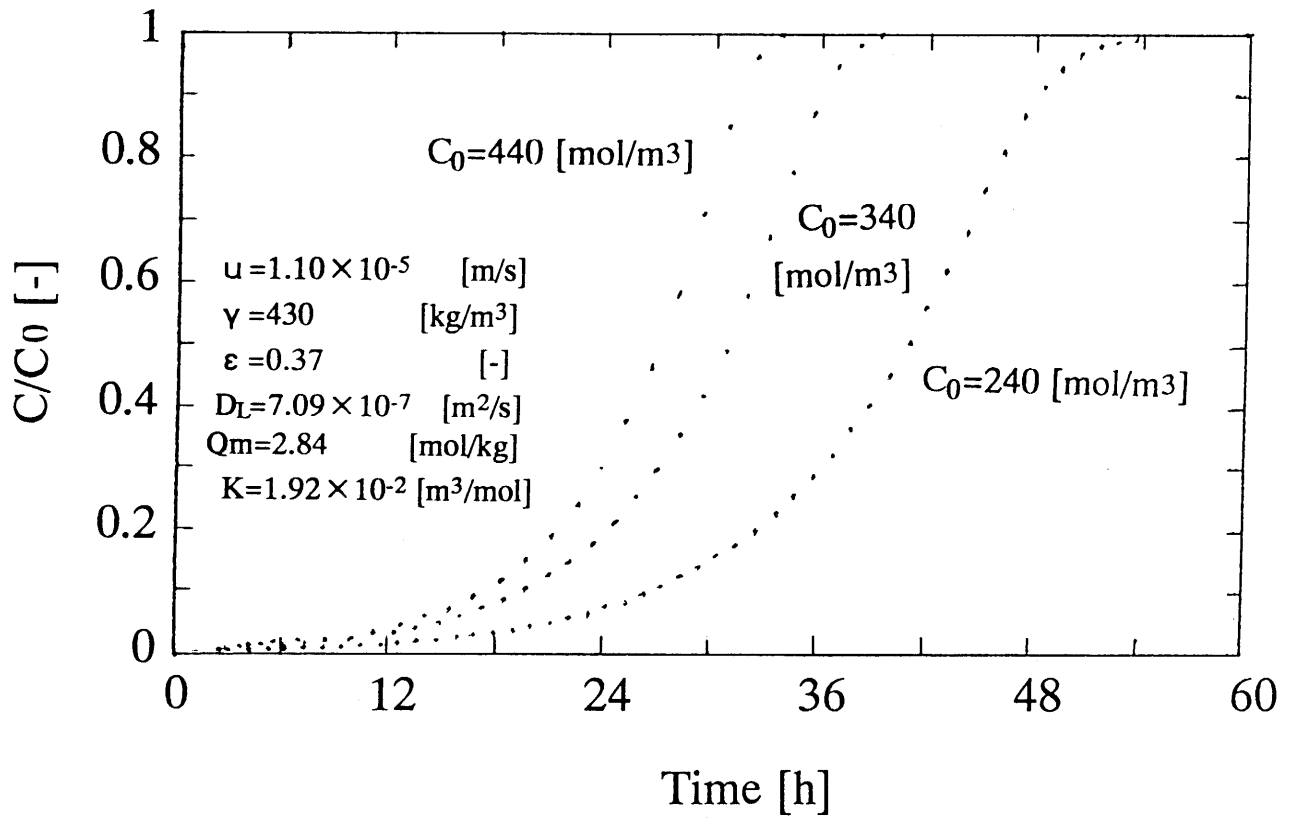


Fig. 5-15 Effect of propionic acid concentration on breakthrough curve of activated charcoal packed column.

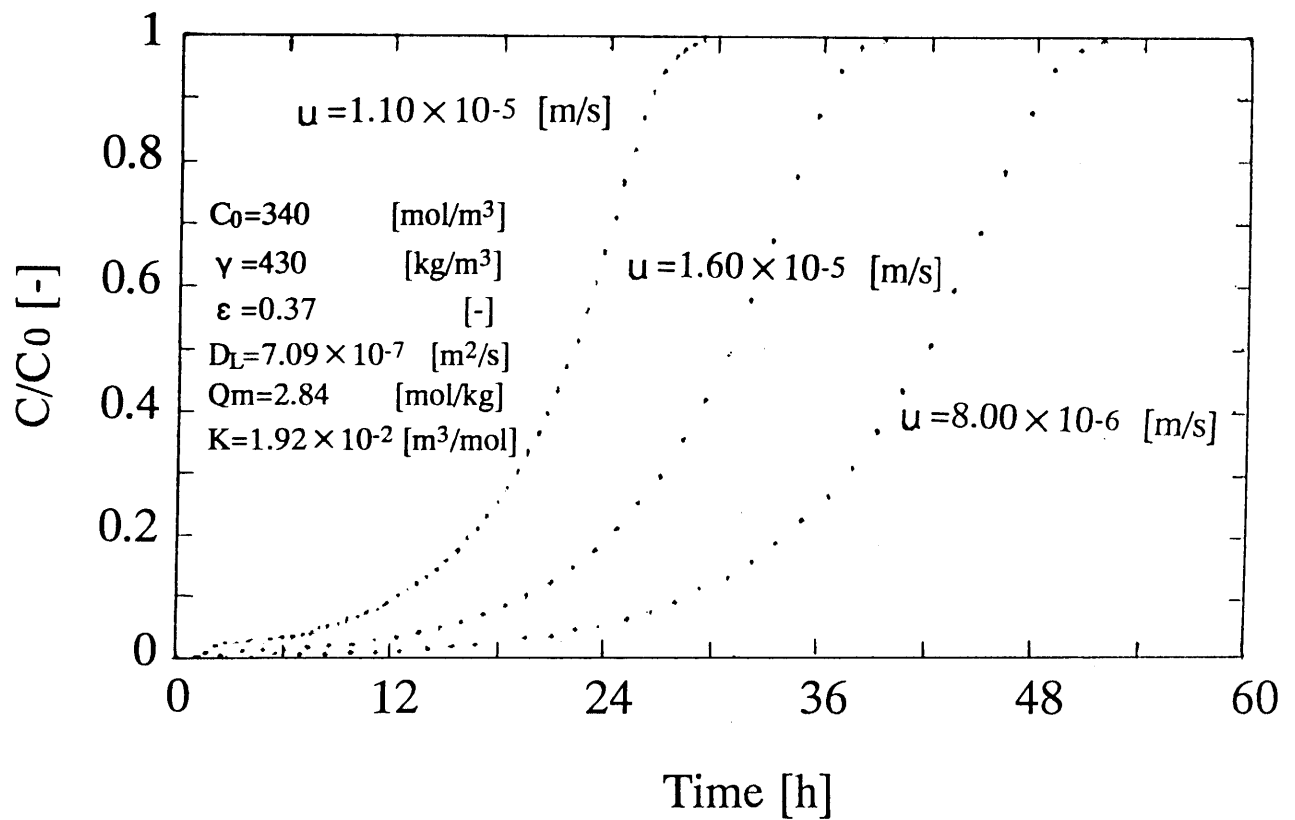


Fig. 5-16 Effect of superficial fluid velocity on breakthrough curve of activated charcoal packed column.

を Appendix 3に示した。

5-5-2 実験材料および方法

培養で用いることを想定して、半径 5 cm、高さ 32 cmで、活性炭を約 1.2 kg 詰められる容量を持つカラムを準備した。このカラムを用いて、破過曲線の測定を行った。有機酸溶液としてグルコース 15 g/l、CSL 80 g/lおよび有機酸を含むモデル培養液および細胞を除いた実培養液を用いて実験を行った。溶液中の有機酸が非解離型になるようにするため、カラム入口の前に pH調整槽を設けて 5 N HClを添加することで pHを 3に調整した。pHが 3に調整された溶液を一定速度でカラムに供給し、カラム出口の有機酸濃度、Cl⁻濃度および pHの経時変化の測定を行った。破過曲線の測定における実験装置の写真および実験条件を、それぞれ Photo 5-1および Table 5-4に示した。

5-5-3 結果および考察

(1) 破過曲線とシミュレーションとの比較

Table 5-4に示したように Run 1として酢酸を含まない、すなわちプロピオン酸単独系のモデル培養液を用いて、破過曲線の測定を行った。粒内拡散係数は、Fig.5-13で得られた値を用いた。計算結果を Fig.5-17に示した。Appendix 2によるシミュレーションの結果と実測値は、ほぼ一致している。信頼できるシミュレーションが行えると、カラムの交換時期が予測できるため操作上非常に役立つ。カラム交換の時期を $C/C_0 = 0.1$ 、つまりカラム出口濃度が入口濃度の 10%に達した時と想定した場合、シミュレーションによる交換時期は実測値による交換時期よりも少し早めになるが、操作上安全な値を与えている。

Run 2として酢酸およびプロピオン酸を含むモデル培養液を用いた場合の破過曲線の測定を行った。結果を Fig.5-18に示した。酢酸が初めに破過し、続いてプロ

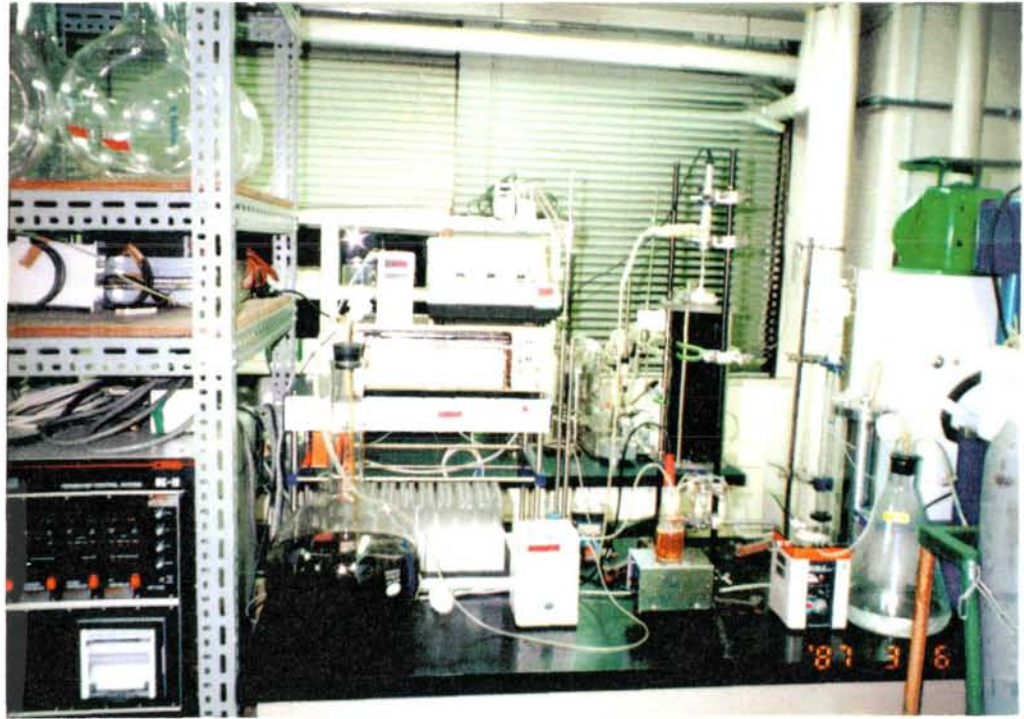


Photo 5-1 Experimental setup for measurement of breakthrough curve of activated charcoal packed column.

Table 5-4 Experimental conditions for the measurement of breakthrough curve.

Run No.	System	Composition of solution [mol/m ³]		Bed height [cm]	Activated charcoal [g]
		Acetic acid	Propionic acid		
1	Single component model culture broth	0	340	31.5	New 1080
2	Binary components model culture broth	127	324	30.5	New 1030
3	Binary components model culture broth	137	314	31.5	Regenerated 1100
4	Actual culture broth	110	269	31.5	New 1100

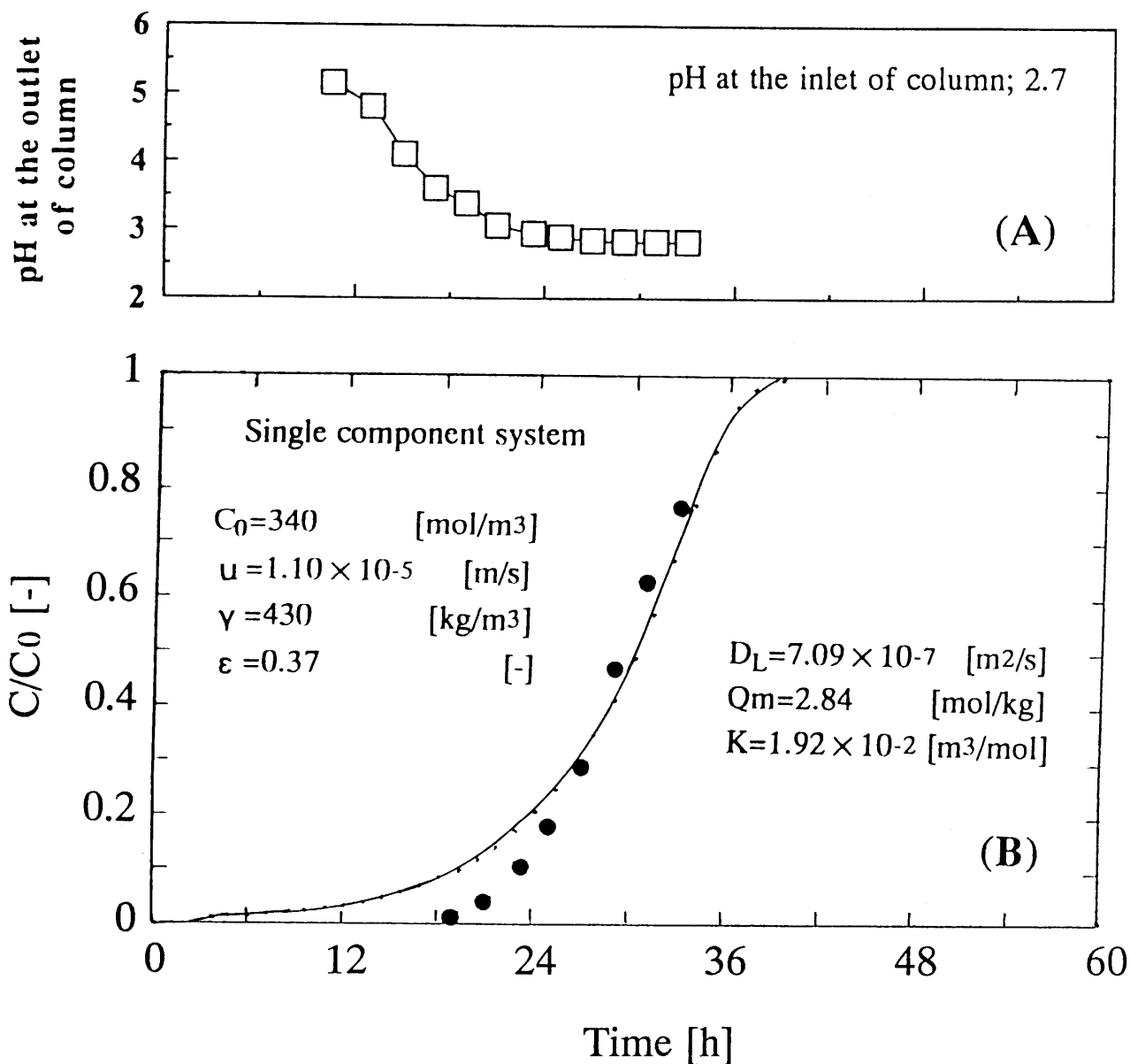


Fig. 5-17 Breakthrough curve of activated charcoal packed column using model culture broth which includes only propionic acid (B) and time course of pH at the outlet of the column (A). The solid line shows the result of numerical calculation.

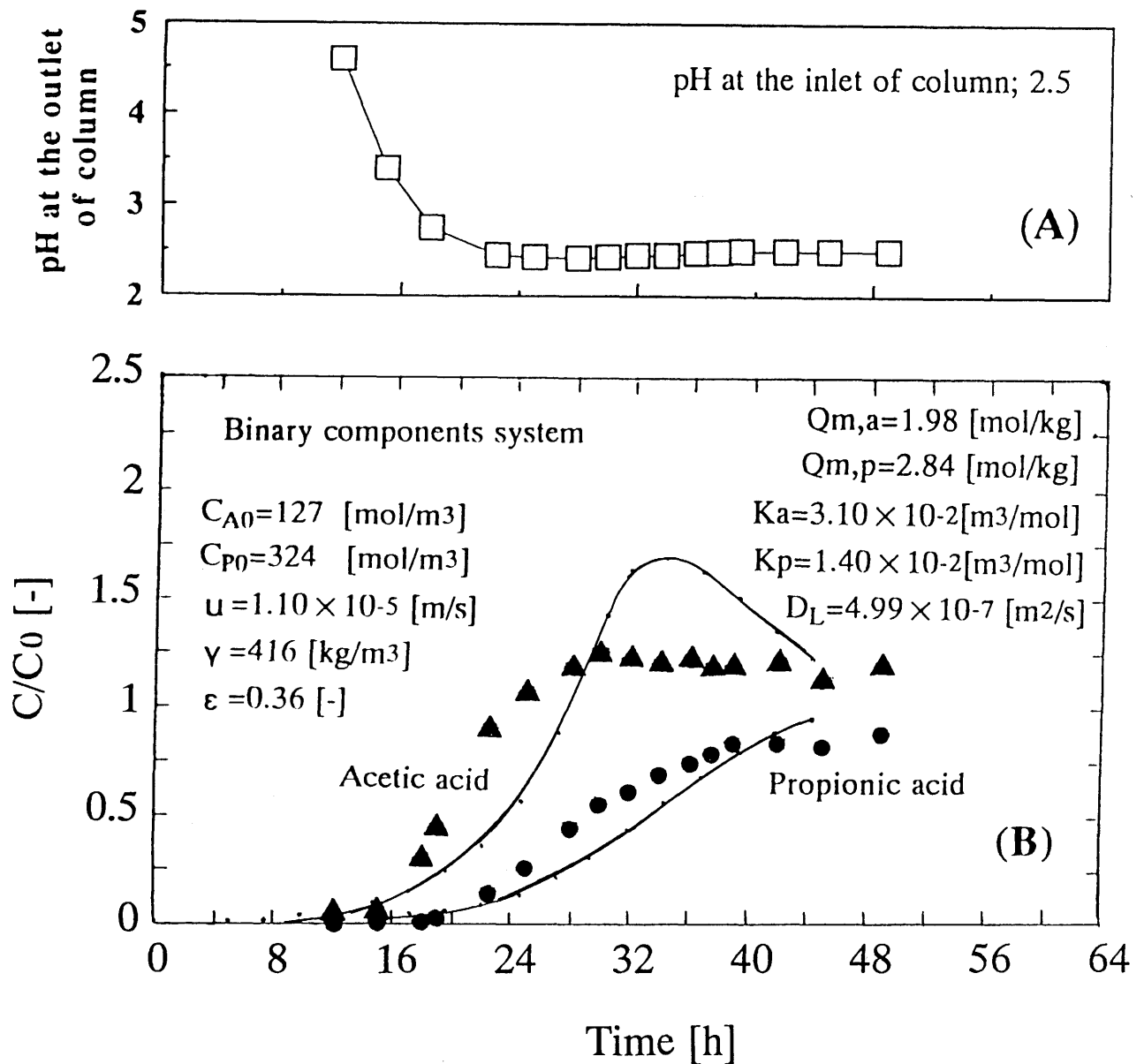


Fig. 5-18 Breakthrough curve of activated charcoal packed column using model culture broth (B) and time course of pH at the outlet of the column (A). The solid lines show the results of numerical calculation.

ピオン酸が破過している。これは酢酸よりもプロピオン酸の方が、活性炭に対して吸着され易いことを示しており、酢酸およびプロピオン酸を用いて求めた選択係数 (Separation factor) や Langmuir定数の結果を反映している。また酢酸のカラム出口濃度 C/C_0 が 1 を越える現象が確認された。これはカラムの出口濃度が入口濃度よりも高くなったことを示している。この現象は、多成分系の吸着において置換吸着が起る場合に見られる現象である¹⁰⁰⁾。したがって、酢酸およびプロピオン酸の二成分系においても、一度吸着した酢酸が後から吸着してきたプロピオン酸に追い出される置換吸着が起っていると考えられた。

Appendix 3によるシミュレーションの結果は、酢酸およびプロピオン酸の両者について実測値よりも破過が遅れる結果となった。実測値とのズレの大きさは、酢酸よりもプロピオン酸の方が少なくなっている。Fig.5-17で示したように、単成分系ではシミュレーションおよび実測値において二成分系ほどのズレは生じなかった。両者のシミュレーションの数値計算上で異なる点は吸着平衡式である。ここで用いている吸着平衡式は、回分で十分に平衡状態に達した状態で得られるものである。したがってシミュレーションの結果が実測値とズレた原因として、二成分系の吸着平衡式が置換吸着の途上にあるような状態を速度的な面において表わしきれていないことが考えられた。Run 2におけるカラムへの液供給速度は 5.2 ml/minであった。これは、第 3章の結果より、実際の培養におけるカラムへの培養液の供給速度が 5 ml/min前後になると考えられたためであるが、液供給速度を低くすれば、カラム内の状態がより置換吸着の平衡状態に近くなると考えられ、シミュレーションの結果が実測値に近くなると考えられる。

Run 3として、Run 2で用いた活性炭をエタノールに浸漬して再生した活性炭を用いて破過曲線の測定を行なった。再生については 5-6で詳細を述べる。Run 3の結果を Fig.5-19に示した。Run 2と比較すると、破過時間は多少早くなっているが、エタノールによって再生ができており、十分に使用に耐えられることが明ら

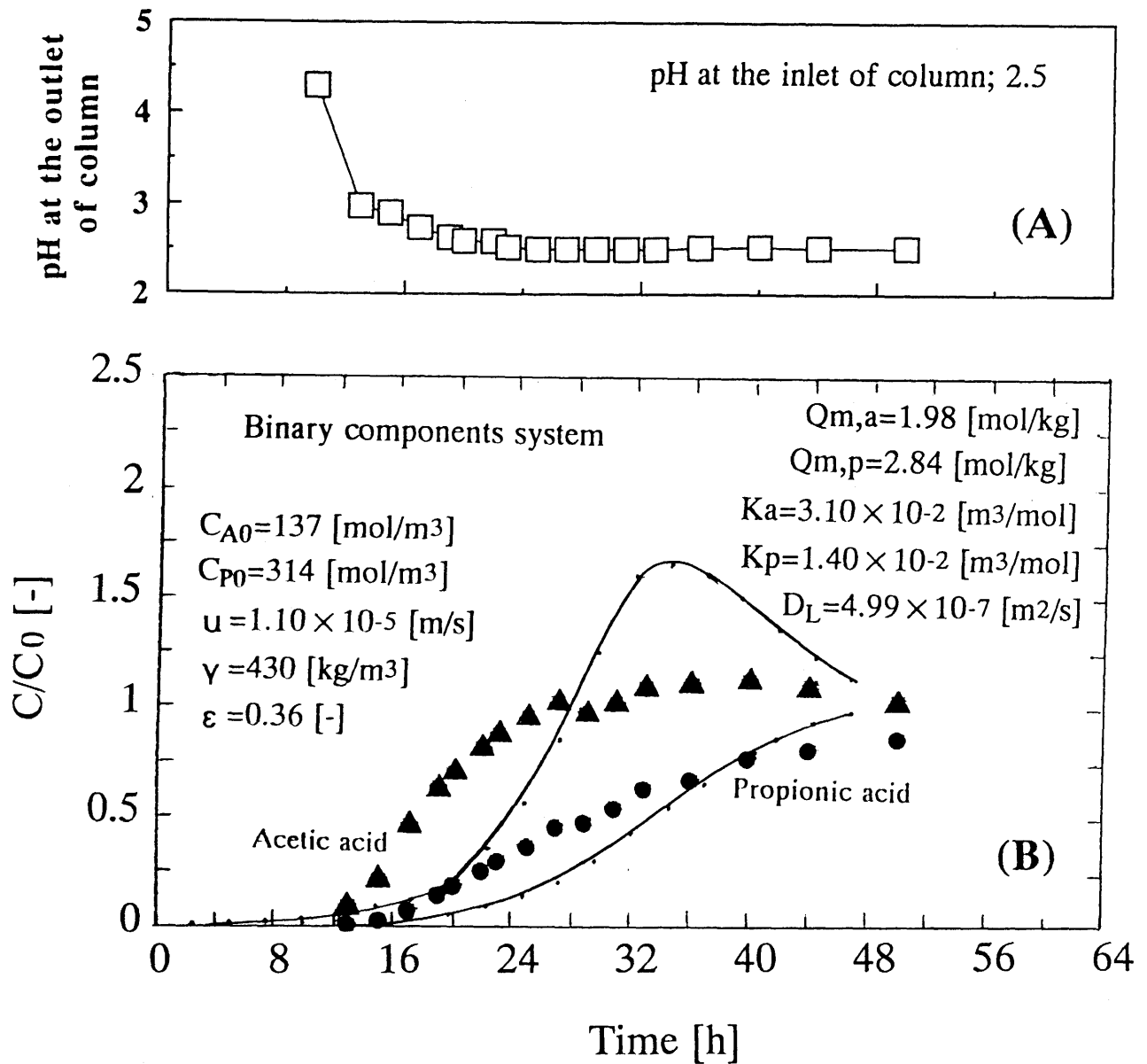


Fig. 5-19 Breakthrough curve of regenerated activated charcoal packed column using model culture broth (B) and time course of pH at the outlet of the column (A). The solid lines show the results of numerical calculation.

かである。しかし、シミュレーションの値とのズレは、破過時間が早くなった分だけ大きくなっている。

Run 4では、Fig.3-6に示した培養で得られた培養ろ液を用いて破過曲線の測定を行った。結果を Fig.5-20に示した。モデル培養液と同様に置換吸着が起っていることが明らかである。しかし、シミュレーションの結果と実測値とのズレは、モデル培養液を用いた場合よりも大きくなった。この原因として考えられることは、三つ挙げられる。それは、実培養液中に炭酸ガスが含まれているために、活性炭カラム中に気泡が生じてしまうことと、培養においては pH制御のためにアルカリを添加するが、このため活性炭カラムに液を供給する前の pH調整において多くの HClを要すること、および実培養液中に有機酸の吸着に影響する物質が生じていることである。カラム中に気泡が生じるとカラム内の流動状態が均一でなくなり、偏流が生じることが考えられる。また HClの吸着に対する影響は明確ではないが、有機酸の吸着量を減らす傾向にあることが、吸着実験から経験的に分かっている。これらの事から、培養に組み入れた活性炭カラムの破過曲線を正確にシミュレーションすることは困難であり、正確なシミュレーションを行なうためには検討すべき問題が残されている。

(2) カラム出口 pHのモニタリングによるカラム破過の予測

Fig.5-17から Fig.5-20においてカラム出口の pHの経時変化に着目すると、有機酸の破過と出口 pHの間には何等かの関係が存在するように見える。pHに最も大きな影響を及ぼすと考えられるのは、カラム入口で添加される HClである。そこで有機酸、グルコースおよび HClについて、実培養液を用いて破過曲線を測定した。結果を Fig.5-21に示した。この結果より、カラムの破過は HCl、グルコース、酢酸そしてプロピオン酸の順に起ることが明らかとなった。また、グルコースのカラム出口濃度 C/C_0 が 1を越えたことから、グルコース、酢酸およびプロピオ

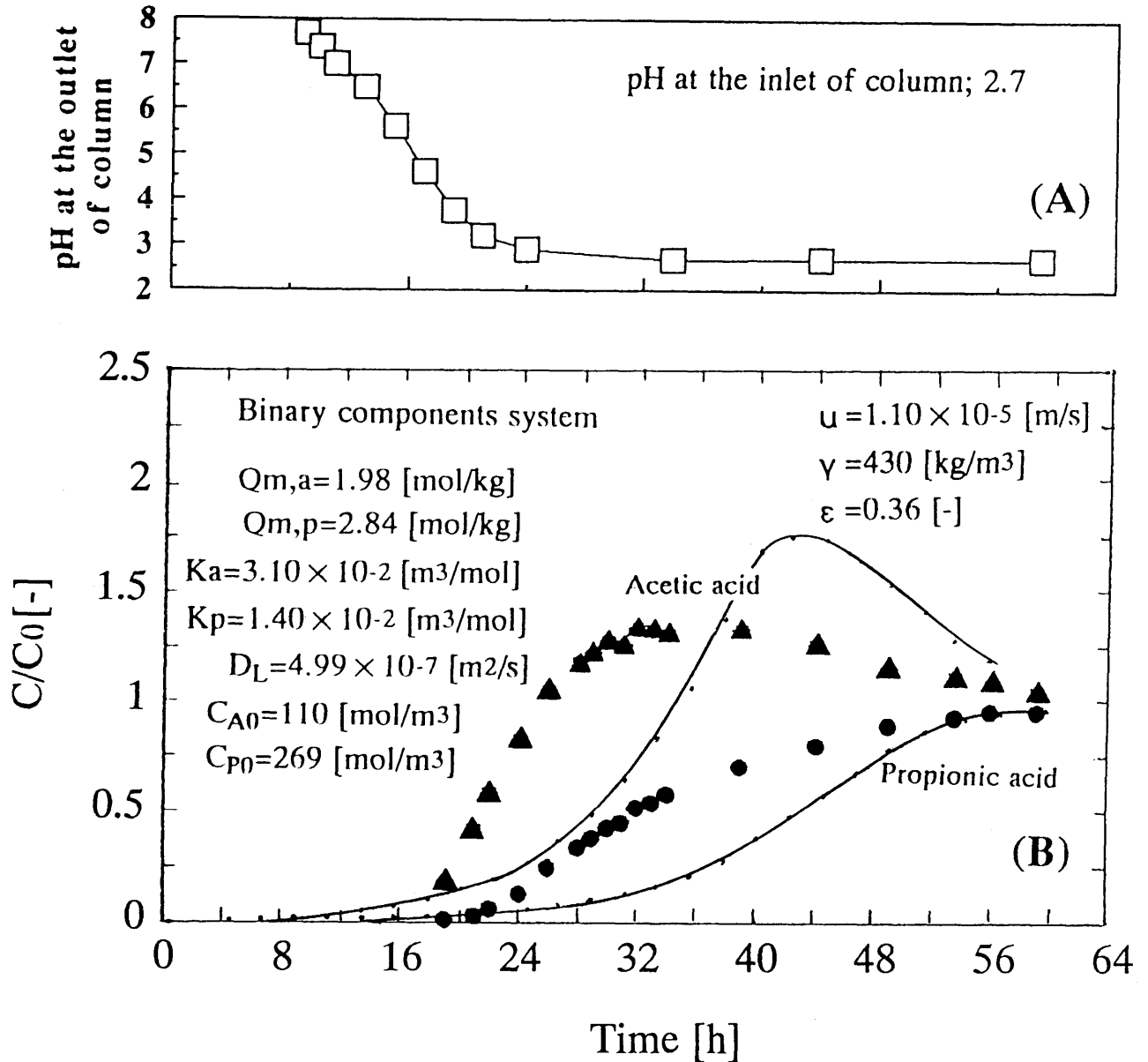


Fig. 5-20 Breakthrough curve of activated charcoal packed column using culture broth obtained at the perfusion culture shown in Fig. 3-6 (B) and time course of pH at the outlet of the column (A). The solid lines show the results of numerical calculation.

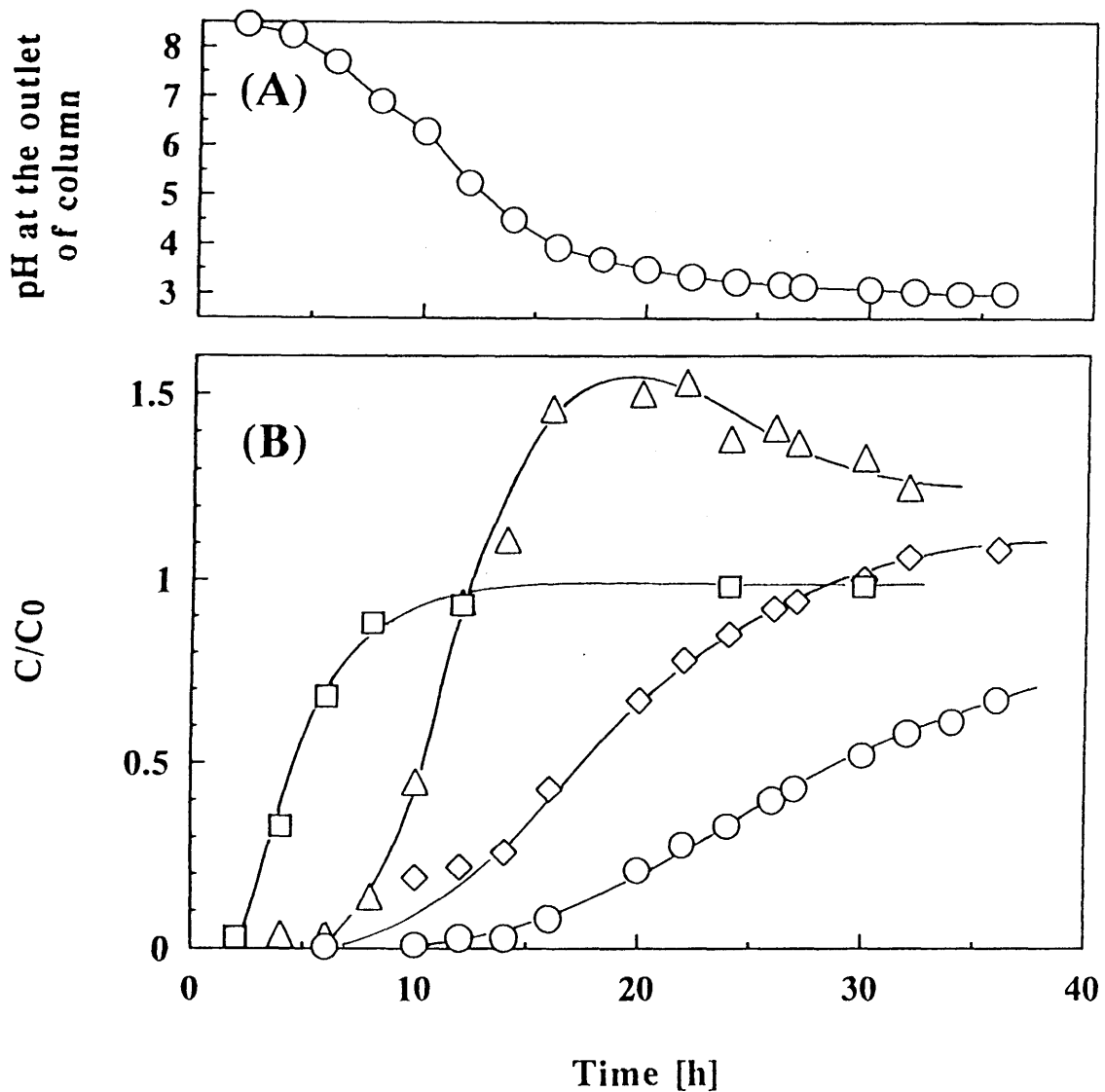


Fig. 5-21 Breakthrough curve of activated charcoal packed column using culture broth (B) and time course of pH at the outlet of the column (A). Symbols; \circ , propionic acid; \diamond , acetic acid; \triangle , glucose; \square , hydrogen chloride.

ン酸の間で置換吸着が起っていることが明らかとなった。

一方カラム出口 pHとの関係であるが、HClは 10 h付近で完全に破過しているにもかかわらず、カラム出口の pHは中性付近である。したがって HClの破過がカラム出口の pHに及ぼす影響はさほど大きくないと言える。カラム出口の pHは最初は 8以上を示したが、時間の経過とともに減少しプロピオン酸の破過が始まるあたりで 4付近となっている。そして最終的には、カラム入口 pHと同じ 3に漸近する形になっている。Fig.5-17から Fig.5-20においても、この結果とほぼ同様な傾向を示している。したがって、カラム入口の pHを 3に制御する場合、カラム出口の pHが 3.5~4の間を示している時にカラムを交換すれば、プロピオン酸の破過が 15 %前後の時点でカラムの交換を行ったことになると考えられた。これらのことからカラム出口の pHをモニタリングすることは、有機酸の出口濃度を正確に把握することはできないものの簡便であり、カラム交換時期を判断する指標として有用であることが明らかである。

5-6 活性炭の再生

5-6-1 実験材料および方法

再生剤の検討： 活性炭 50 gを 250 mlの pH 2.6、プロピオン酸濃度 30 g/l のプロピオン酸水溶液またはグルコース 15 g/l、CSL 80 g/l、 KH_2PO_4 0.4 g/l および $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/lを含むモデル培養液に 24 h浸漬し、プロピオン酸吸着飽和活性炭とした。この活性炭を蒸留水で 3回洗浄した後、200 mlの再生剤に 24 h浸漬した。これらの再生処理の後、活性炭を蒸留水で 3回洗浄して乾燥させて再生率の測定を行った。再生率の測定は 2 gの再生活性炭および 2 gの未使用活性炭を用いてプロピオン酸水溶液に対する吸着実験を行い、再生活性炭と未使用活性炭のプロピオン酸吸着量を比較して行った。用いた再生剤を Table 5-5

Table 5-5 Results of the regeneration of activated charcoal.

Reagent used for regeneration	Using condition of activated charcoal	Relative adsorption capacity [-]
Ethanol	Water system	0.98
Ethanol	Medium system	0.95
Methanol	Water system	0.91
Methanol	Medium system	0.91
Isopropanol	Water system	0.91
Isopropanol	Medium system	0.92
n-propanol	Medium system	0.94
Aceton	Medium system	0.95
1 N NaOH + 1 N HCl	Medium system	0.53

に示した。

再生法の検討： 連続法として、プロピオン酸水溶液で吸着飽和させた活性炭カラム (r: 1.25 cm、h: 37 cm、活性炭 75 g) にエタノールを 1.6 ml/minの流速で流して、カラム出口のプロピオン酸濃度の経時変化を測定した。回分法として 1080 gの吸着飽和活性炭を 1 lのエタノールに 24 h以上浸漬した。これを 4回繰り返した。

5-6-2 結果および考察

再生剤の検討： 様々な再生剤による再生結果を Table 5-5に示した。水溶液系で飽和させた活性炭と培養液系で飽和させた活性炭において、再生率に大きな違いは見られなかった。したがって再生においては、培地成分も脱着されたと考えられ、また培養液系での使用にもかかわらず、活性炭の吸着能力は 90 %以上は回復できることが明らかとなった。最も良好な再生率を示したのはエタノールおよびアセトンであった。扱い易さの点ではエタノールが優れているため、これ以後の活性炭の再生においてはエタノールを用いることにした。

再生方法の検討： 活性炭カラムにエタノールを連続的に供給して得られたプロピオン酸の溶出曲線を Fig.5-22に示した。この結果より連続式においては、プロピオン酸の溶出が後半においてテーリングする傾向にあることが問題と考えられた。これは、テーリングによりエタノールの必要量が増えるだけでなく、得られるプロピオン酸濃度が低くなってしまうからである。分離精製操作において生産物濃度が薄まることは好ましくない。そこで回分操作での再生を試みた。結果を Table 4-6に示した。回分操作においてはプロピオン酸濃度は高濃度に保たれているが、再生率が 90 %に達するまでに 4回の操作を必要とし非常に時間がかか

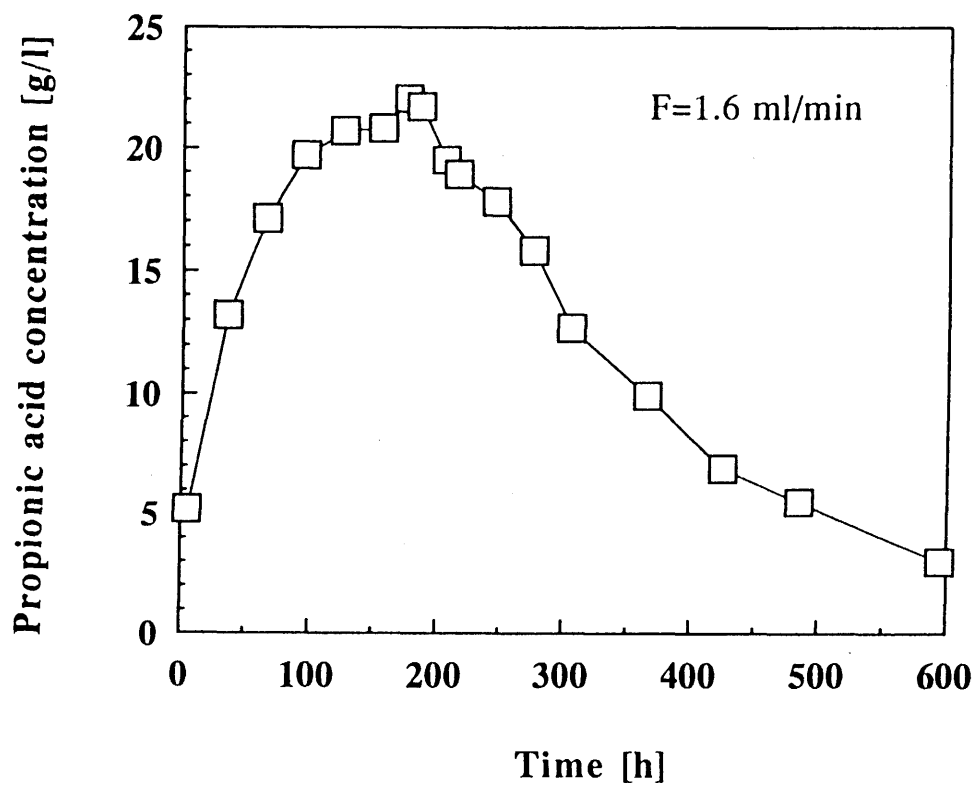


Fig. 5-22 Elution curve of propionic acid from activated charcoal.

ることが示唆された。これらの結果を総合すると再生方法としては、活性炭カラムにエタノールを再循環させる回分式を繰り返し行なうことが、連続式および回分式の長所を兼ね備えることができるため最善と判断された。

5-7 結論

活性炭によるプロピオン酸の吸着について、基礎的な吸着機構から培養に応用することを想定した破過曲線および活性炭の再生方法に到るまで検討を行った結果、次のような結論が得られた。

(1) 非解離型および解離型の有機酸で比較を行うと、有機酸の鎖長にかかわらず非解離型の有機酸の方が圧倒的に吸着されやすい。

(2) 水系および培地系で比較を行うと、解離型および非解離型の有機酸の両方が培地成分の影響を受け、水系と比較して培地系では吸着量が減少する。

(3) 鎖長の長さの異なる有機酸で比較を行うと、解離型および非解離型にかかわらず、鎖長が長い有機酸の方が吸着量が大きくなる。吸着機構が親水的な作用であると考えられる非解離型（イオン）の有機酸の吸着においても、疎水性が大きい方が活性炭に吸着されやすい。

(4) 酢酸、プロピオン酸および酪酸の中から二つを組合せた二成分溶液においては、水溶液系および培養液系で選択係数に大きな差異は生じない。

(5) 酢酸、プロピオン酸および酪酸の中から二つを組合せた二成分溶液においては、解離型の有機酸の吸着においては非解離型の有機酸の吸着よりも、選択係数が大きくなる。この結果は、吸着機構が親水的な作用であると考えられる非解離型（イオン）の有機酸の吸着においても、疎水性が大きい方が活性炭に吸着されやすいことを支持するだけでなく、非解離型の有機酸の吸着より解離型の有機

酸の吸着の方が、疎水性の影響が大きいことを示す。

(6) Appendix 2による数値計算によって、単成分系の有機酸溶液は培地成分の有無にかかわらず良好なシミュレーションが行える。

(7) Appendix 3による数値計算によると、モデル培養液と比較して実培養液で実測値とのズレが大きくなった。正確なシミュレーションを行うためには、更に培養に付随する因子の影響を検討する必要がある。

(8) 培養液においては、活性炭カラムの破過は HCl、グルコース、酢酸そしてプロピオン酸の順に起こる。また、グルコース、酢酸およびプロピオン酸の間で置換吸着が起こる。

(9) カラム出口の pHは破過した有機酸を反映しており、カラムの交換時期を判断する方法としてカラム出口 pHのモニタリングを行なうことが有効であることが明らかになった。

(10) 水溶液系および培養液系の差異にかかわらず、用いた再生剤による活性炭の再生率に大きな違いは見られない。したがって再生においては、培地成分も脱着されたと考えられ、活性炭の吸着能力は 90 %以上は回復できる。

(11) 活性炭の再生において、エタノールおよびアセトンが用いた再生剤の中で最も良好な再生率を示した。

(12) 回分式および連続式の再生結果より、有機酸によって吸着飽和に達した活性炭の再生方法として活性炭カラムにエタノールを再循環させる回分式を繰り返し行う方法が、効率的な再生法と考えられた。

第6章 活性炭によるプロピオン酸除去を伴ったプロピオン酸菌の高密度培養

6-1 序

プロピオン酸菌の高密度培養を行うには、発酵槽内のプロピオン酸濃度を低く保つ必要があり、稀釈率が高い灌流培養が有効である。しかし、そのためには多量の新鮮培地を供給しなければならず、結果として多量の培養廃液が生じる。培養廃液中の酢酸およびプロピオン酸濃度は、稀釈率が高いほど薄くなり回収が困難になる。また稀釈率が高いと発酵槽内での滞留時間が短くなるため、基質の利用率は低くなる。これらの観点から、従来の灌流培養に活性炭カラムを導入し、培養液からプロピオン酸を除去することで培養液が再利用できるシステムを考案した。このシステムによればプロピオン酸の除去を活性炭による吸着によって行うことができるため、新鮮培地の供給による稀釈効果に頼る必要がない。そのため稀釈率を低くすることができ、上述のような灌流培養の問題点が改善できると考えられた。そこで本章では活性炭カラムを用いた灌流培養によるプロピオン酸菌の高密度培養を行い、その結果を従来の灌流培養と比較してその効果について評価した。さらに、活性炭カラムを用いた灌流培養の問題点についても検討を行った。

6-2 実験材料および方法

前培養：種菌として 4 °C で保存していたライヒマニスラントを用いた。（第3章と同様）接種は 180 ml の前培養液の入った三角フラスコに行い 30 °C、嫌気状態でフラスコ培養を 72 h 行なった。前培養液の培地組成は Table 6-1 に示した。

Table 6-1 Compositions of media used in this work

Component [g/dm ³]	Seed culture	Batch culture	Feed of Perfusion Culture		Medium used for packed column
			without PARS a)	with PARS	
Glucose	25	15	80 ~120	400	20
CSL	40	80	80	400	320
NH ₄ NO ₃	3	—	—	—	—
KH ₂ PO ₄	0.4	0.4	0.4	2	1.6
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1.5	1.5	1.5	7.5	6
CoCl ₂ · 6H ₂ O	—	0.045	0.045	0.225	0.18
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.01	0.01	0.01	0.05	0.04
Calcium pantothenate	0.01	0.01	0.01	0.05	0.04
Nicotinamide	—	0.03	0.03	0.15	0.12
CaCO ₃	10	—	—	—	—
Antifoam b)	—	0.1	0.1	0.5	—

a) PARS, propionic acid removal system

b) BC-51Y (Nihon Yushi Co.)

本培養：培養装置図および培養装置の写真をそれぞれ Fig. 6-1および Photo 6-1に示した。本培養は 30 °C、N₂液相通気 1/40 vvm、攪拌速度 150 min⁻¹で pHを 6.5に自動制御して行った。自動制御においてはアルカリ液として 3 N NH₄OHと 2 N Na₂CO₃の混合液を用いた。回転型セラミック膜分離装置の回転速度は 1500 rpmとし、ファウリングを防ぐため 10 秒毎に 5秒の逆洗が行なわれるように逆洗ポンプを設定した。供給培地および活性炭カラムの準備に使用した培地の組成を Table 6-1に示した。第3章で 172 g/lの高密度菌体を得られた培養に対し、稀釈率（培地供給速度）を 5分の 1にして培養を達成させるため、供給培地の各培地成分濃度は 5倍に設定した。第5章の吸着実験の結果より、培地成分、特に CSLが活性炭に吸着されることが明らかである。そこで活性炭の培地成分の吸着を軽減するため、活性炭 1.05 kgを詰めたカラムに CSL濃度を通常の 4倍にした培地を供給して活性炭カラムを作製し、活性炭が培地成分に対して吸着飽和となるようにした。

N₂ガスの供給によってリアクター内を嫌気状態にし、前培養液の接種を行い本培養を開始した。ワーキングボリュームは 2.7 lとした。40 時間の回分培養の後、新鮮培地の供給および活性炭カラムへの培地の循環を開始した。セラミック膜によって菌体が除かれた培養液は、まず pH調整槽で 5.5 N塩酸の塩酸を添加することで pHを 3に調整され、5 ml/minの流速で活性炭カラムへと送られる。そして、活性炭カラムで有機酸が除去された培養液は、カラム出口に設置した pHモニタリング部を通して pHが測定された後に発酵槽に戻される。また、ワーキングボリュームを一定に保つため、活性炭カラムを通った培養液の一部は、レベルコントローラーによって制御されたペリスターポンプによって系外へと排出される。プロピオン酸除去システムとして、このような系を灌流培養に組み入れて高密度培養を試みた。

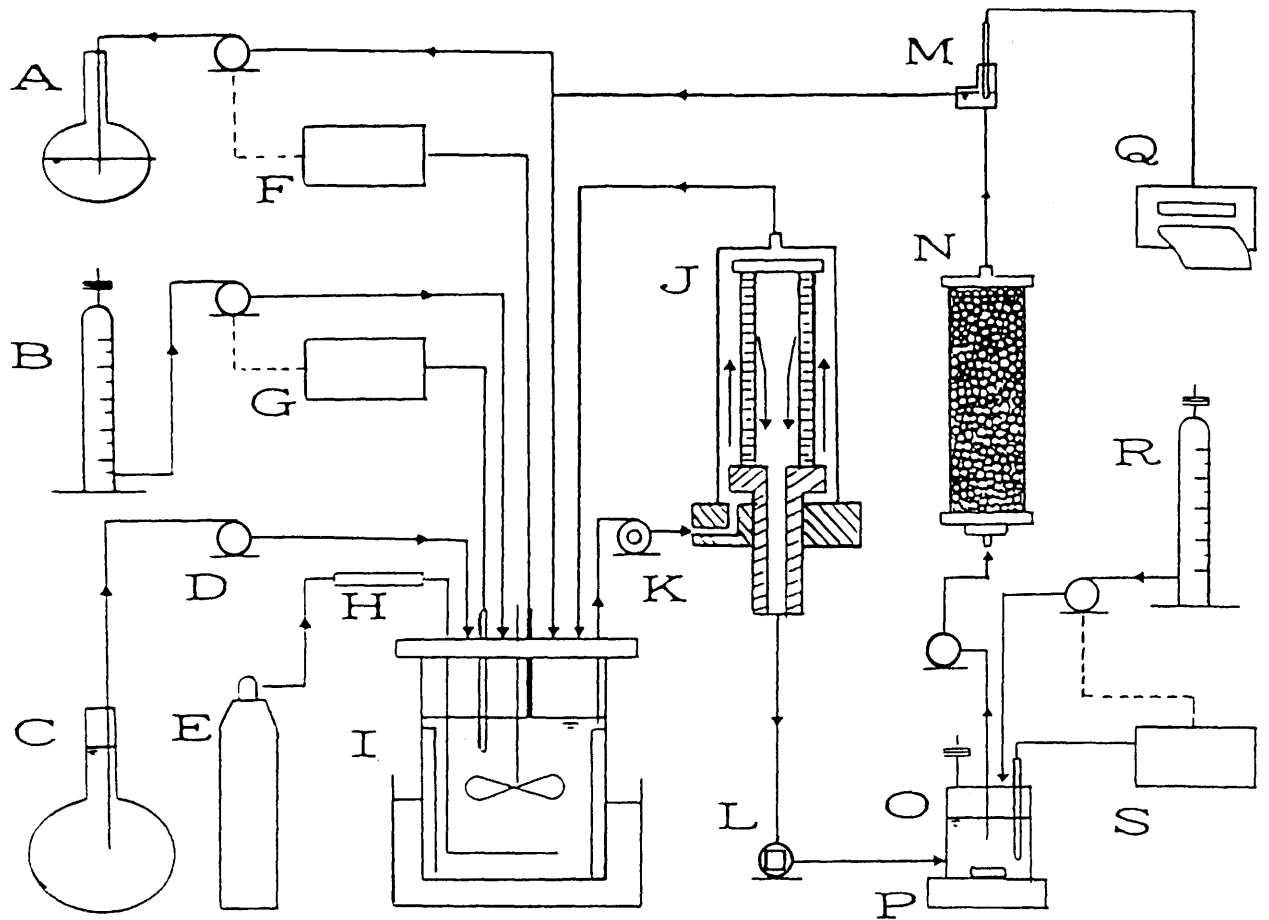


Fig. 6-1 Schematic flow diagram of perfusion culture system with propionic acid removal. A, discharged waste; B, alkaline solution; C, medium; D, peristaltic pump; E, N₂ cylinder; F, level controller; G, pH controller; H, flow meter; I, fermentor; J, rotating ceramic membrane module; K, roller pump; L, reversible pump; M, pH sensor; N, activated charcoal packed column; O, pH control vessel; P, magnetic stirrer; Q, recorder; R, acid solution; S, pH controller.

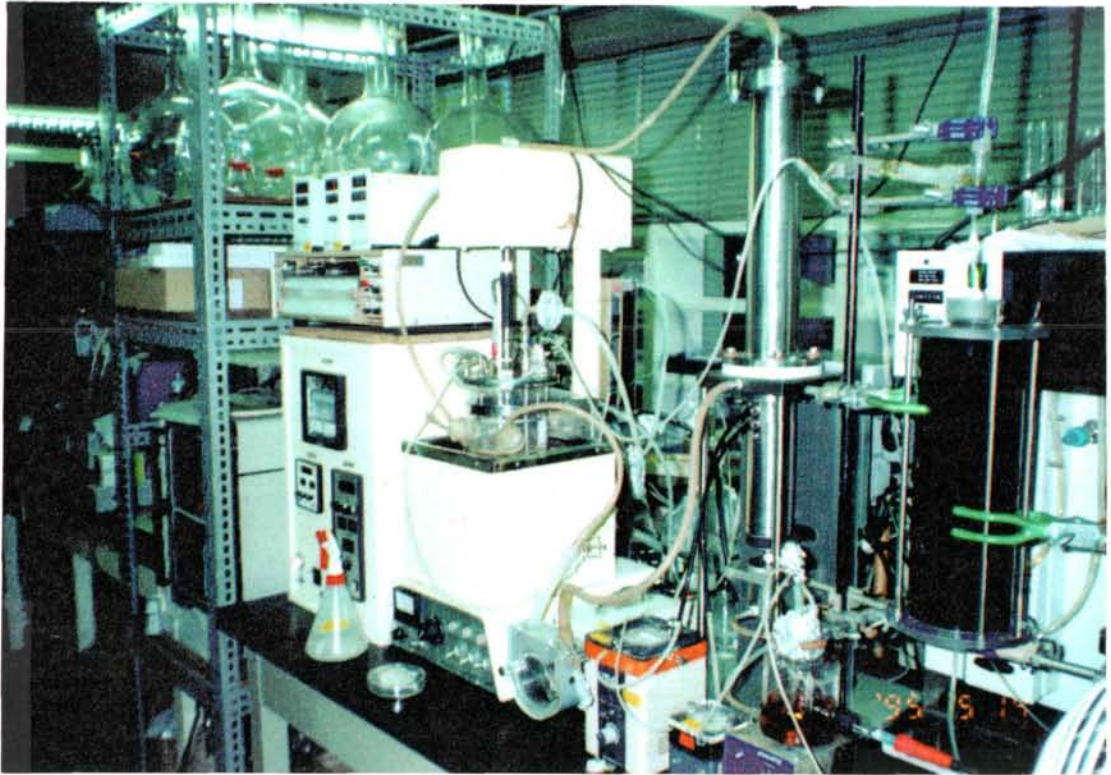


Photo 6-1 Experimental setup for perfusion culture with propionic acid removal system.

6-3 結果および考察

活性炭カラムを用いた灌流培養の結果を Fig.6-2に示した。40 hの回分培養の後、灌流培養を開始した。灌流培養の開始とともに培養ろ液の活性炭カラムへの供給を一定速度（5 ml/min、稀釈率 0.11 h^{-1} に相当）で行った。一方、稀釈率は初めは 0.011 h^{-1} で開始されたが、菌の増殖に伴うグルコース消費速度の増加に合わせて培地供給速度を増加させた結果、最大で 0.034 h^{-1} に達した。活性炭カラムによるプロピオン酸の除去によって、このように低い稀釈率でも菌濃度は増加し続けた。活性炭カラムの交換はカラム出口の pHが 3に達する前に行った。培養は 290 h続けられ、この培養期間を通じてカラムの交換は 9回行われた。その結果、培養廃液にはほとんど有機酸が含まれておらず、pHのモニタリングによってカラムの破過がほぼ予想できたことが示された。また発酵槽内のプロピオン酸濃度は約 15 g/lに抑えることができた。その結果、菌体濃度は 157 g/lに達した。セラミック膜の回転速度を 1500 rpmとした結果、培養期間において膜のファウリングによるトラブルは起らなかった。

この培養で得られた結果および第3章で述べた灌流培養の結果を Table 6-2において比較した。活性炭によるプロピオン酸除去システムを伴った灌流培養によって排出された培養廃液量は 14.3 lであった。この値はワーキングボリュームの 5.3倍に相当し、活性炭を用いなかった灌流培養の 3分の 1以下であり、活性炭カラムを灌流培養に組み込むことによって稀釈率を低くすることが可能となり、培養廃液量を大幅に低減することができた。また活性炭によるプロピオン酸除去システムを伴った灌流培養では、培養において生産された酢酸およびプロピオン酸を活性炭によって分離回収することができた。活性炭によって吸着された有機酸はエタノールをカラムに流すことで容易に脱着することができ、これにより活性炭も吸着能力を 90 %以上回復できることから再利用が可能であることは第5章で述べた。この培養では 9回に渡るカラムの交換において合計 10.5 kgの活性炭を

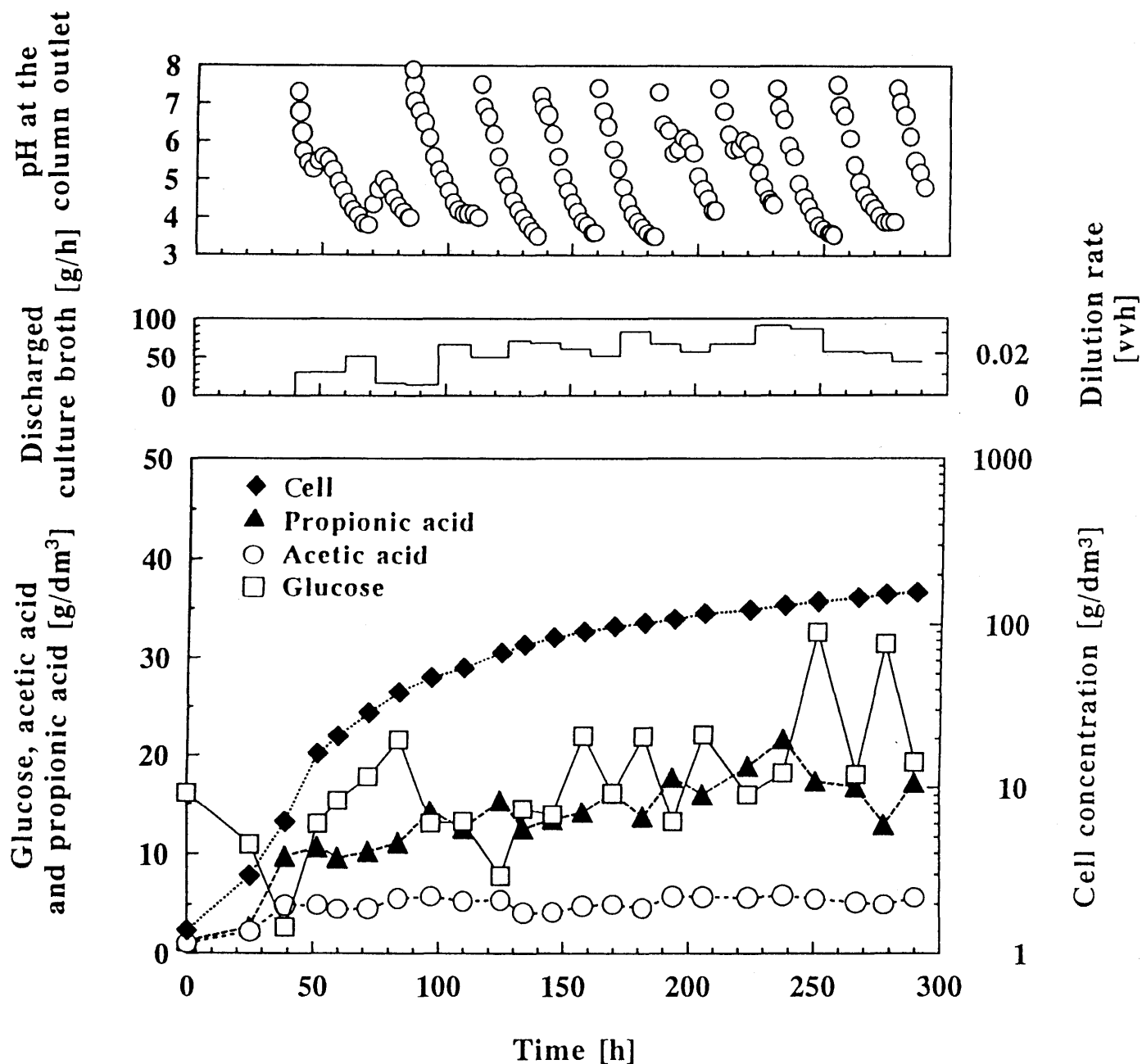


Fig. 6-2 Perfusion culture of *P. freudenreichii* with propionic acid removal system using activated charcoal. Perfusion culture and propionic acid removal were started simultaneously. The circulation rate of the filtrate through the activated charcoal packed column was 0.3 dm³/h.

Table 6-2 Comparison of some parameters taken at the end of perfusion cultures without and with propionic acid removal system.

	Without PARS a)	With PARS
Culture time [h]	265	290
Glucose supplied [g]	3498	2468
Alkali supplied [dm3]	6.3	4.7
Acid supplied [dm3]	—	4.2
Medium supplied [dm3]	39.0	5.4
Waste discharged [dm3]	45.3	14.3
Cell mass produced [g]	467	424
Acetate produced [g]	325	283
Propionate produced [g]	1055	898
Cell production efficiency b)	0.134	0.172
Acetate production efficiency b)	0.093	0.115
Propionate production efficiency b)	0.302	0.364

a) PARS, propionic acid removal system

b) Production efficiency, yield based on the supplied glucose

用いた。この内、各回のカラムから乾燥重量で 20 gの活性炭を取り出し、これらをカラムに詰めてエタノールによる脱着を行った。脱着方法として、第5章で述べたようにエタノールを循環させる操作を繰り返し行うことにした。脱着は 500 mlのエタノールを 24 h以上循環させる方式で行い、エタノールを交換することにより 3回の繰り返し回分操作を行った。これらの 3回の脱着操作によって、吸着された有機酸はほぼ完全に脱着された。これにより得られた有機酸の量から 10.5 kgの活性炭に吸着された有機酸の総量を算出した結果、酢酸およびプロピオン酸はそれぞれ 283 gおよび 898 gであった。これらの値を用いて供給したグルコースあたりの収率（グルコースの利用効率）を算出し、活性炭を用いなかった灌流培養で得られた値との比較を行った。Table 6-2に示したように、活性炭によるプロピオン酸除去システムを伴った灌流培養によって、菌体、酢酸およびプロピオン酸に関してグルコースの利用効率が改善されたことが明らかになった。これは、稀釈率を低く維持できたことによって培地成分の発酵槽内滞留時間が長くなったためであると考えられる。

6-4 活性炭カラムを用いた灌流培養システムの問題点

上述したように Fig. 6-2の培養においては、プロピオン酸濃度を約 15 g/lに抑えることができたにもかかわらず、最終的に得られた菌体濃度は活性炭を用いなかった灌流培養で得られた菌体濃度を上回ることができなかった。これは培養時間で 100 h過ぎから比増殖速度が低下したためである。供給培地の濃度を変えるなどして行った活性炭を用いた灌流培養 4回分、および活性炭を用いなかった灌流培養 2回分の増殖曲線の比較を Fig. 6-3に示した。この図に示された範囲においては、活性炭を用いた灌流培養の増殖曲線はすべてプロピオン酸濃度が 20 g/l以下に抑えられており、プロピオン酸による増殖阻害の影響はないと考えられた。しかし、培養時間 100 hを過ぎるあたりでの比増殖速度を比較してみる

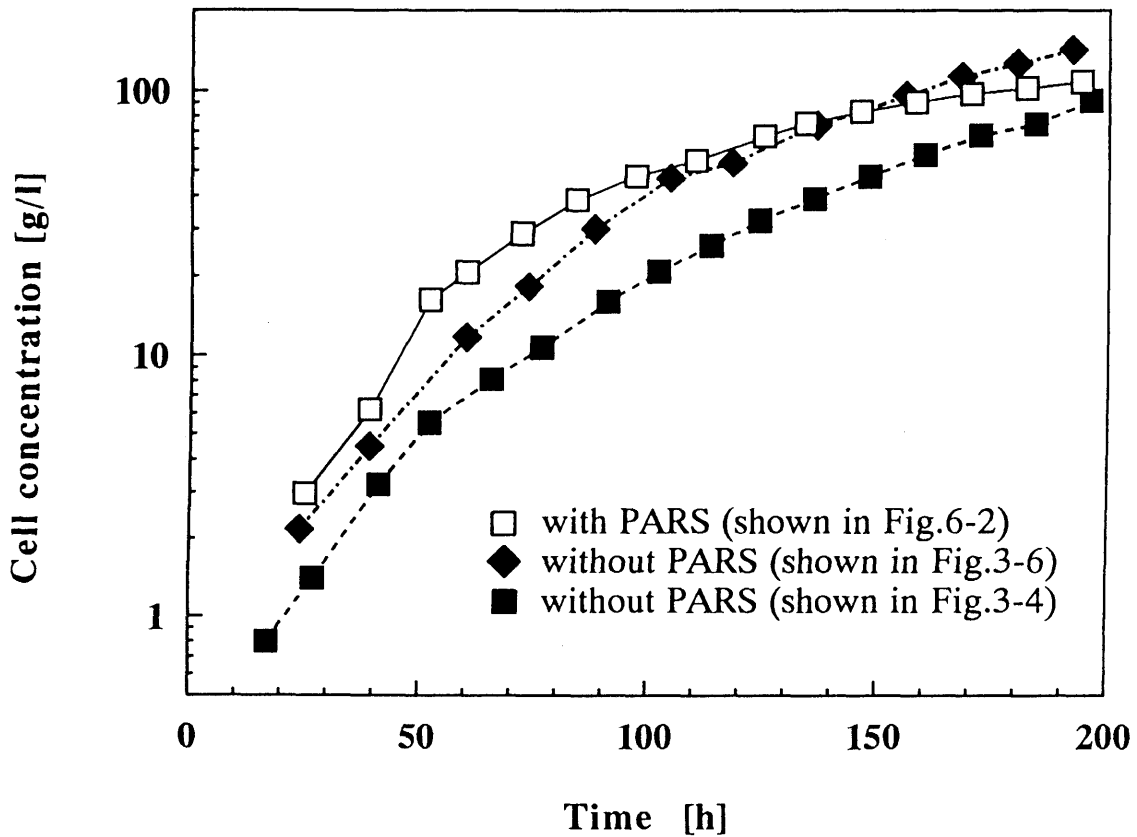


Fig.6-3 Comparison of growth rate of the *P. freudenreichii* in perfusion culture with and without activated charcoal packed column. The opened keys and closed keys show the results of the perfusion culture with and without activated charcoal packed column, respectively. PARS, propionic acid removal system

と、活性炭を用いた灌流培養での比増殖速度は、活性炭を用いなかった灌流培養での比増殖速度を下回っていることが明らかである。したがって活性炭カラムを用いた系においては、何等かの理由で増殖阻害が起きていることが考えられた。

6-5 結論

活性炭によるプロピオン酸除去システムを組み入れた灌流培養により、低い稀釈率で高密度培養を行うことを試みた。その結果、次のような結論を得た。

(1) 活性炭カラムの交換をカラム出口の pH が 3 に達する前に行った結果、培養廃液にはほとんど有機酸が含まれていなかったことから、pH のモニタリングがカラムの破過を予想する有効な指標になり得ることが示された。

(2) 活性炭によるプロピオン酸除去システムを伴った灌流培養によって低い稀釈率で高密度培養を行うことが可能であり、灌流培養による高密度培養での培養廃液量を大幅に低減することができることが明らかになった。

(3) 活性炭によるプロピオン酸除去システムを伴った灌流培養では、生産された有機酸は活性炭によって分離回収された。活性炭によって分離された有機酸はエタノールにより簡単に脱着することができた。

(4) 活性炭によるプロピオン酸除去システムを伴った灌流培養では、低い稀釈率で高密度培養が可能である。これにより培地成分の発酵槽内滞留時間が長くなり、従来の高い稀釈率の灌流培養と比較して培地成分の利用効率が改善されることが明らかになった。

(5) 活性炭によるプロピオン酸除去システムを伴った灌流培養では何等かの増殖阻害が認められ、培養時間の経過にともない従来の灌流培養よりも菌の比増殖速度が低下することが分かった。

第7章 総括

本論文は、ビタミン B₁₂生産菌として用いられているプロピオン酸菌の効率的な高密度培養プロセスの確立を目的として研究を行ったものである。生産物阻害を伴う発酵における生産性を改善する培養法として、膜分離を用いた灌流培養が様々な発酵に応用されているが、膜分離におけるファウリングの問題および効率的な培養という観点において未解決の問題が残されている。そこで本研究では、ファウリングを効果的に防ぐため、回転型セラミック膜分離装置を試作して灌流培養に応用した。また灌流培養における高い稀釈率の必要性を排除するため、灌流培養に増殖阻害物質の除去システムを導入することを提案し、プロピオン酸菌の灌流培養に活性炭カラムによるプロピオン酸除去システムを組み入れ、低い稀釈率で高密度培養を行うことを試みた。

第1章では、分離を伴う培養に関する既往の研究において、菌体の分離方法として利用される膜分離と、生産物の分離方法として利用される溶媒抽出および吸着に関して現状と問題点について紹介し、本研究の意義を明らかにした。

第2章では、灌流培養における膜分離装置として試作した円筒状の膜を回転させるタイプの膜分離装置である回転型セラミック膜分離装置のろ過特性について検討を行った。従来の回転型ろ過装置は、膜面とハウジングとの隙間を狭くすることにより生じるテイラー渦流を利用してケーキ層やゲル層などの付着層を膜面から掃流するものであった。しかし、このような回転型ろ過装置は、膜面とハウジングの間隙が狭い精密な構造を必要とするため製作コストがかかり、膜面とハウジングの接触による事故の危険性があった。そこで本研究では、膜面掃流に必要なせん断応力を作用させることができればテイラー渦流は必ずしも必要ではないと考え、膜面とハウジングの間隙が大きい回転型ろ過装置を試作した。分離膜として、微生物の培養に応用が可能な性質（耐熱性、耐薬品性、耐腐食性）を備

えているセラミック膜を選択した。試作した回転型セラミック膜分離装置について基礎データを得るために、培養を想定した条件下でろ過実験を試みた。実際の培養系では、菌の好気性、嫌気性によらず培養液中に酸素、窒素および二酸化炭素等の気泡が存在するため、気泡がろ過に及ぼす影響について検討を行うことが必要であると思われた。そこで通気系および無通気系において、パン酵母懸濁液を用いたろ過実験を行ったところ興味深い結果が得られた。無通気系においては、1300 rpm以上の膜回転速度によって膜面のケーキ層は掃流されたが、ゲル層は掃流されないで残った。これにより必要なせん断応力を与えれば、テイラー渦流が無くてもケーキ層が掃流されることが明らかになった。一方、通気系においては、2500 rpmの膜回転速度においてもケーキ層は掃流されないで残り、ケーキ層の掃流効果が低減された。しかし見かけ上は通気系の方が無通気系に比較して膜面にケーキ層等の付着層が多く観察されるにもかかわらず、得られる透過流束は、通気系の方が大きいことが分かった。これは通気系で形成される付着層のろ過抵抗が小さいことを示しており、遠心力によって膜面に集まる気泡の働きでケーキ層の圧密化が抑制されるためと考えられた。通気系においてこのような気泡の効果が期待できることによって、回転型セラミック膜分離装置が培養系への応用に適していることが示唆された。また通気系では、ろ過圧力の効果が低減されたことから、気泡がろ過圧力にも影響することが明らかになった。回転型セラミック膜分離装置の実用性を確認するために、生産物阻害を伴う発酵の一つである野性型の *Corynebacterium glutamicum* を用いたリジン発酵に回転型セラミック膜分離装置を用いて高密度培養を試みた。この結果 150時間の培養期間において膜のファウリングによる問題は起きず、120 g/l の高密度菌体が達成された。これにより、回転型セラミック膜が灌流培養による高密度培養を達成するのに十分なる過性能を持つことが確認された。

第3章では、生産物阻害を伴う微生物の高密度培養プロセスの開発として、プ

ロピオン酸菌の一種であり、ビタミン B₁₂生産菌の一つとして用いられている Propionibacterium freudenreichii の高密度培養を効率的に行うシステムの開発に着手し、回転型セラミック膜分離装置を用いた灌流培養を行った。まず初めに半回分培養を行いプロピオン酸による阻害を確認したところ、プロピオン酸濃度が約 30 g/l になると菌の増殖は全く期待できないことが分かった。プロピオン酸による増殖阻害を低減するため、回転型セラミック膜分離装置を用いた灌流培養を行ったところ、稀釈率を最大で 0.124 vvh まで高めた灌流培養によって半回分培養で得られた菌体濃度の 10.3 倍に相当する 172 g/l の高密度菌体を得られた。しかし、その一方でワーキングボリュームの 16.7 倍に相当する 45 l もの未利用培地成分を含んだ培養廃液が生じた。これにより、灌流培養によってプロピオン酸菌の高密度培養を行うためには、プロピオン酸濃度を阻害レベル以下に保つために高い稀釈率が必要であり、これによって菌体の高密度化は行えるが、供給した基質当りの生産性つまり培地成分の利用効率が低下することや多量の培養廃液が生じる点において効率的ではないと考えられ、問題が残されていることが明らかになった。また回転型セラミック膜分離装置を用いたプロピオン酸菌の高密度培養において、膜の逆洗操作の有無にかかわらず、菌体濃度が 160 g/l 程度に達すると膜のファウリングが生じて稀釈率 (3.78×10^{-6} m/s 以上の透過流束) を維持できなくなった。これは菌体の高密度化によるろ過抵抗の増大によって膜透過流束が制限されたためと考えられ、回転型セラミック膜分離装置によるろ過の限界であると判断された。

第 3 章の結果より、プロピオン酸菌の灌流培養において高い菌体濃度を効率的に得るには培養システムの改善が必要であると考えられた。灌流培養において排出される培養ろ液から、選択的に増殖阻害物質 (プロピオン酸) を除去することができれば、培養ろ液を培養槽にリサイクルすることによって排出される培養廃液量を低減することができる。これにより低い稀釈率で高密度培養が行うことが

可能となり、培地成分の発酵槽内滞留時間が長くなることによって培地成分の利用効率も改善されると考えられた。このようなシステムを確立するためには、まずプロピオン酸の選択的な除去法を確立しなければならない。そこで第4章では、プロピオン酸の除去方法として、溶媒抽出および吸着法について検討を行った。培養での pH は 6.5 であるが、このような中性条件下で有機酸の回収を行った例は少ない。これは中性においては、プロピオン酸が解離状態つまり陰イオンとして存在しているためである。そこで陰イオン交換体が適していると考えられ、吸着剤の候補の一つに加えて検討を行った。溶媒抽出においては pH が高くなるに従って分配係数が小さくなる傾向が得られた。これにより溶媒抽出は非解離型のプロピオン酸に対しては有効であるが、pH が高くプロピオン酸が解離型で存在する場合には適用できないことが明らかになった。一方 pH を中性としたプロピオン酸水溶液を用いた吸着実験においては、陰イオン交換体である Resin AG 1-X8 が最も大きな吸着量を示した。しかし培地成分を含むモデル培養液による吸着実験においては培地成分による影響が大きく、Resin の吸着容量は水溶液系での 60 % 以下となることが分かった。これはプロピオン酸イオンを分離するためには、陰イオン交換基が最も選択性の低い OH^- でなければならないためであり、イオン交換基の選択性が低いために培地成分の影響が大きくなると考えられた。また、モデル培養液において使用した Resin の再生は、水酸化ナトリウムだけでは行えず、エタノールによる再生操作によって 80 % までイオン交換容量が再生された。これはイオン交換作用ではない作用で培地成分が Resin に吸着し、これがイオン交換容量にも影響を及ぼしていることを示している。これにより Resin は実用的ではないと判断し、中性条件においてプロピオン酸を分離することは断念した。吸着実験の結果より、培養系に適していると考えられた吸着剤は活性炭であった。pH 3 での活性炭のプロピオン酸吸着量は、モデル培養液においても十分に大きな値であり、エタノールによる再生によって吸着容量が 90 % 以上再生されることから、

プロピオン酸の除去システムとして、培養ろ液の pH を低く調整して活性炭を吸着剤として用いることにした。

活性炭による有機酸の吸着においては、中性条件下での吸着についてはほとんど検討されていない。また、第 4 章では非解離型の有機酸の吸着が見られるなど吸着機構に関しては不明な点が多い。そこで第 5 章では、活性炭による有機酸の吸着機構を明らかにするため、鎖長の異なる有機酸として酢酸、プロピオン酸および酪酸を用いた吸着実験を行い、吸着された有機酸を解離型と非解離型に分けて整理することを試みた。その結果、有機酸の吸着機構に関して次のようなことが明らかになった。有機酸の鎖長にかかわらず、解離型より非解離型の有機酸の方が吸着されやすい。解離型および非解離型にかかわらず、有機酸の吸着は培地成分の影響を受け吸着量が減少する。また解離型および非解離型にかかわらず、鎖長が長い有機酸ほど吸着量が大きくなる。これは吸着機構が親水的な作用であると考えられる非解離型の有機酸においても、疎水性が大きい方が吸着されやすいことを示している。有機酸を二つ組み合わせた二成分系での吸着特性の検討を行った。その結果、酢酸、プロピオン酸および酪酸の中から組み合わせた二成分溶液を用いた吸着においては、培地成分の有無にかかわらず選択係数はほぼ一定であることが分かった。また非解離型の有機酸よりも、解離型の有機酸の吸着の方が選択係数が大きくなった。これは、非解離型の有機酸より親水性であるはずの解離型の有機酸の方が、疎水性の影響が顕著に表れることを示している。活性炭カラムによるプロピオン酸除去システムを培養系に応用する際に必要なカラム交換時期の予測について検討を行った。培養系においては、吸着機構が同じと考えられる酢酸およびプロピオン酸が同時に存在するため、吸着平衡式においては一方の存在を無視することはできないと考え、二成分系の吸着平衡式を求めた。活性炭カラムの破過曲線の数値計算を行うために吸着理論を適用した物質収支に基づく基礎式を求め、パーソナルコンピュータによる数値計算プログラムを作

製した。まずプロピオン酸が単独で存在する場合、つまり単成分系の破過曲線をシミュレートする計算プログラムを作製し、シミュレーションの結果を実測値と比較したところ、ほぼ一致した。そこで単成分系の計算プログラムを参考にして二成分系の吸着平衡式を用いた計算プログラムを作製し、シミュレーションの結果と実測値との比較を行ったが、正確なシミュレーションは行えなかった。この主な原因として培養液中に含まれる炭酸ガスがカラム内に気泡として蓄積してしまうことや、pHの調整に用いられる塩酸の影響が大きいことが考えられた。また平衡状態で測定された二成分系の吸着平衡式が、カラム内で起きている置換吸着現象を反応速度的な面でフォローできていないことが考えられた。これらのことにより、数値計算による正確なシミュレーションを行うには、さらに培養に付随する因子について検討を行なう必要があると思われた。しかしながら、カラム出口の pHがカラムの破過にともなって変化することが明らかになった。カラム出口 pHは有機酸の破過を反映しており、カラム出口の pHのモニタリングが、カラムの交換時期を判断する指標として有効であることが分かった。最後に、活性炭の再生について検討を行った。その結果、用いた系が水溶液系および培養液系に関わらず、エタノールやアセトンによる再生操作によって吸着容量が 90 %以上再生できることが明らかになった。再生操作としては、活性炭カラムにエタノールを再循環させる回分操作を繰り返し行なう方法が効率的であると判断された。

第6章においては、活性炭カラムによるプロピオン酸除去システムを組み入れた灌流培養を行い、低い稀釈率で高密度培養を行うことを試みた。活性炭カラムによるプロピオン酸の除去によって、低い稀釈率においてもプロピオン酸濃度を抑えることが可能であった。カラム出口の pHを指標として活性炭カラムの交換を行ったところ、培養廃液中には有機酸はほとんど含まれておらずカラム出口の pHのモニタリングが有効であることが示された。この培養によって菌体濃度は 157 g/lに達したが、活性炭カラムを用いない灌流培養での値を上回ることはでき

なかった。活性炭カラムを用いた培養においては、培養後期の比増殖速度が減少しており、何等かの増殖阻害が起きていると考えられた。一方、培養期間を通じて生じた培養廃液量は、活性炭カラムを用いない従来の灌流培養の3分の1以下で、ワーキングボリュームの5.3倍に相当する14.3 lであり、活性炭カラムによるプロピオン酸除去システムが培養廃液の低減に有効であることが示された。また、低い稀釈率による発酵槽内滞留時間の延長により、培地成分の利用効率においても改善が見られた。これらの結果により、灌流培養に増殖阻害物質除去システムを取り入れることにより、低い稀釈率で高密度培養を行なうことが可能となること及びその有効性が示された。

培養廃液は一般的に高濃度の有機物を含有し色度も高いため、その処理には相応のコストと時間がかかる。培養廃液処理にかかる時間とコストを低減するには生じる培養廃液量を減らすことが最も効果的であり、本研究において低い稀釈率によって培養廃液量を低減できたことは、発酵生産にかかるコストの削減に効果的である。また、活性炭によるプロピオン酸の除去操作は、高密度培養を行いながら同時に酢酸およびプロピオン酸を培養液から分離回収する操作でもある。活性炭からの有機酸の脱着はエタノール等を使用することで簡便に行え、エタノールからの有機酸の分離も減圧蒸留によって行えることが確認できている。したがって、活性炭に吸着された有機酸の分離精製操作は簡便であると考えられ、プロピオン酸菌の灌流培養に活性炭によるプロピオン酸除去システムを組み入れることは、生産された有機酸を副生産物として利用する上で大きなメリットとなる。これらに加えて基質の利用効率が改善される点から、活性炭によるプロピオン酸除去システムを組み入れることで、プロピオン酸菌の高密度培養を経済的に効率良く行うプロセスが達成され、実用化の可能性が切り開かれたと言える。本研究では行わなかったが、プロピオン酸除去システムは回分培養や半回分培養にも応用が可能であり、菌体濃度および生産性の改善が期待できる。プロピオン酸除去

システムを用いた発酵プロセスのスケールアップにおいては、膜分離が問題になることが予想されるが、膜材質を近年開発が進んでいる軽量のステンレス製にすることなどで膜分離のスケールアップを図ることができると考えられる。また、プロピオン酸除去システムによってリアクターボリューム当りの生産性を高められることから、従来と同じ生産量を確保するのに必要なスケールは小さくて済む利点があり、スケールダウンが可能となる。

本研究における残された問題としては、第5章における二成分系の破過曲線に関して数値計算による正確なシミュレーションを行なうためには、培養に付随する因子の影響として、気泡が蓄積することによるカラム内の流動状態の変化やpH調整槽で添加される塩酸が活性炭による有機酸の吸着に及ぼす効果についてさらに検討を行うことが必要であることが明らかになった。第6章では、活性炭を用いた培養系において、活性炭を用いない系と比較して培養後半に比増殖速度の低下が見られることが分かり、課題として残されている。この増殖阻害の原因としては、明確ではないが、塩酸の添加に伴うリアクター内塩濃度の増加が考えられる。増殖阻害の原因を明確にして比増殖速度を改善することができれば、培養時間の短縮が期待できるため、さらに効率的に高密度培養が行えるプロセスを確立することができると考えられる。

Appendix 1. 粒内拡散係数の計算プログラム

```

1      '*****
2      '*** DIFFUSION COEFFICIENT INSIDE PARTICLE SUSPENDED IN ***
3      '*** PERFECT-MIXED LIQUID (LANGMUIR TYPE ADSORBENT) ***
4      '*** ACTIVATED CARBON VS. PROPIONIC ACID ***
5      '*** BY K. NAKANO APR 8, 1994 ***
6      '*****
100 CHAIN MERGE "B:GRAPH-N.BAS",110,ALL
110 '===== READ OF MEASURED VALUES =====
120 READ NDATA : 'NUMBER OF MEASURED VALUES
130 DATA 13
140 READ CO : 'INITIAL CONCENTRATION IN SOLUTION
150 DATA 16.04
160 DIM T(NDATA),C(NDATA),CDATA(NDATA)
170 FOR I=1 TO NDATA
180 READ T(I),C(I)
190 CDATA(I)=C(I)/CO
200 NEXT I
210 DATA 0,16.04,5,15.03,10,14.30,15,14.16,20,13.76,30,13.29,45,13.09
211 DATA 60,12.55,90,11.68,120,11.01,180,10.54,300,9.80,600,9.46
220 '===== SET OF CONDITIONS FOR CALCULATION =====
230 READ M : 'DIVIDING NUMBER IN RADIUS DIRECTION
240 DATA 30
250 READ MN : 'PARAMETER FOR PRINT
260 DATA 2
270 READ R : 'CONSTANT DEFINED BY DT/DR^2
280 DATA 0.17
290 READ TL : 'END TIME OF CALCULATION
300 DATA 650
310 '===== READ OF EXPERIMENTAL CONDITIONS =====
340 READ VL,WS,PR : 'LIQUID VOLUME, BEADS VOLUME AND PARTICLE RADIUS
350 DATA 9.10E-04,5.00E-02,4.08E-03
360 READ DS : 'DIFFUSION COEFFICIENT
370 DATA 8.50E-09
380 '===== CALCULATION OF CONSTANTS=====
390 BETA=WS/VL
400 DR=1/M : DT=R*DR^2 : 'INCREMENT OF R AND T
410 '===== PRINT OF DATA AND CONSTANTS =====
420 A$=" ###.###^" : C$=" [mol/m^3] "
430 LPRINT " T C C/CO "
440 LPRINT " [min] [mol/m^3] [-] " : LPRINT
450 FOR I=1 TO NDATA
460 LPRINT USING " "+A$+" "+A$+" "+A$;T(I),C(I),CDATA(I)
470 NEXT I : LPRINT
480 LPRINT USING " M= ### MN= #### ";M;MN
490 LPRINT USING " DT= "+A$+"DR= "+A$+"TL= "+A$;DT;DR;TL
500 LPRINT " VL= ";VL;"[m^3]"; WS= "[kg]"; PR= "[m]"
510 LPRINT USING " DS= ###.###^" [m^2/min]";DS : LPRINT
520 '===== PREPARATION OF FIGURE (CALL SUBROUTINE GRAPH-N) =====
530 WX1=0 : WY1=.4 : WX2=650 : WY2=1
540 SX1=70 : SY1=300 : SX2=510 : SY2=10
550 DX=30 : DY=.1 : NXS=2 : NYS=1
560 XAXIS$="TIME [min]" : YAXIS$="C/CO [-]"
570 GOSUB 10000
580 '===== PLOT OF MEASURED VALUES =====
590 FOR I=1 TO NDATA
600 X=FNX(T(I)) : Y=FNY(CDATA(I))
610 'CIRCLE(X,Y),4:PAINT(X,Y)
620 NEXT I
630 '===== CALCULATION =====
640 DIM YQ(M+1),YYQ1(M+1),YYQ2(M+1),YYQ(M+1)
650 '===== SET OF INITIAL VALUES =====
660 FOR I=0 TO M-1 : YQ(I)=0 : NEXT I
670 YQ(M)=1!
680 '===== START OF CALCULATION =====
690 FOR I=1 TO M-1
700 YYQ(I)=R*(1-1/I)*YQ(I-1)+(1-2*R)*YQ(I)+R*(1+1/I)*YQ(I+1)

```

```

710 NEXT I
720 YYQ(0)=6*R*YQ(1)+(1-6*R)*YQ(0)
730 D=(3*DT*BETA)/(2*DR)
731 A=.0093      ' Q0/C0
733 B=.754      ' 1-k
734 C=.246      ' k
740 YYQ(M)=YQ(M)-3*BETA*DT*A/2/C/DR*(1-B*YQ(M))^2*(3*YQ(M)-4*YQ(M-1)+YQ(M-2))
750 FOR I=0 TO M : YQ(I)=YYQ(I) : NEXT I
760 K=K+1 : TT=TT+DT
770 IF K MOD MN <>0 THEN 690
780 XC=C*YQ(M)/(1-B*YQ(M))
790 RT=TT*PR^2/DS
800 X=FNX(RT) : Y=FNY(XC)
810 PSET (X,Y)
820 IF RT<TL THEN 690
830 COPY 2
840 END

```

Appendix 2. 単成分系における破過曲線の計算プログラム

```

1      '*****
2      '**** ESTIMATION OF BREAK THROUGH CURVE IN PACKED BED ****
3      '**** DIFFUSION MODEL/LOW REYNOLDS NUMBER/LANGMUIR ADSORPTION ***
4      '**** BY K. NAKANO APR 27, 1994 ****
5      '*****
100 CHAIN MERGE "B:GRAPH-N.BAS",110,ALL
105 SCREEN 3
110 '***** EXPERIMENTAL CONDITION *****
120 PE=.5 : 'PEKURE NUMBER [-]
130 RA=.00408 : 'RADIUS OF ADSORBENT [m]
140 DF=5.8E-09 : 'DIFFUSION CONSTANT OF PROPIONIC ACID MOLECULE [m^2/s]
150 DS=1.42E-10 : 'SURFACE DIFFUSION CONSTANT [m^2/s]
160 K1=.0315 : 'LANGMUIR CONSTANT IN MEDIUM [m^3/mol]
165 QM=3.43 : 'MAXMAM ADSORVED QUANTITY [mol/kg]
170 U=.0000159 : 'LINEAR VELOCITY OF COLUMN [m/s]
180 ZM=.26 : 'BED HEIHGT [m]
190 GAM=445 : 'PACKED DENSTY [kg/m^3]
200 EPS=.366 : 'RATION OF EMPTY [-]
210 VIS=.000802 : 'VISCOSITY OF WATER [Pa·s]
220 DEN=1000 : 'DENSTY OF WATER [kg/m3]
230 C0=270 : 'PROPIONIC ACID CONC. IN FEED [mol/m^3]
240 AV=3*(1-EPS)/RA : 'SPECIFIC SURFACE AREA [m^2/m^3]
250 RE=2*RA*U*DEN/EPS/VIS : 'REYNOLDS NUMBER[-]
260 DL=2*RA*U/EPS/PE : 'MIXED DIF. CONSTANT OF TANGENTIAL TO CENTER [m^2/s]
270 KF=1.09*U/EPS*(2*RA*U*DEN/VIS)^(-2/3)*(VIS/DEN/DF)^(-2/3) : '[m/s]
280 KS=15*DS*GAM/RA^2/AV : '[kg/m^2·s]
290 A=QM*K1/(1+K1*C0) : 'Q0/C0 [m^3/kg]
295 K2=1/(1+K1*C0)
300 KKF=1/1.15/(1/KF+1/A/KS+2*RA*AV/PE/U) : '[m/s]
310 '
320 '***** PARAMETER OF CALCULATION *****
330 E=.000001
340 DT=.002
350 LA1=.005
360 DZ=DT/LA1
370 LA2=LA1/DZ
380 OM=1.1
390 RJM=ZM*KKF*AV/U/DZ
400 IF RJM-INT(RJM)>=.5 THEN JM=INT(RJM)+1 ELSE JM=INT(RJM)
405 B=EPS/GAM
410 C=EPS*DL*KKF*AV/U^2
411 K3=DT*(K2-1)/2/A
412 K4=DT*K2/2/A
413 '***** READ OF MEASURED VALUES *****
414 READ NDATA : ' NUMBER OF MEASURED VALUES
415 DATA 12
416 DIM T(NDATA),C(NDATA),D(NDATA),G(NDATA),S(NDATA)
417 FOR I=1 TO NDATA
418 READ T(I),C(I)
419 NEXT I
420 DATA 19,0.005,21.5,0.005,23.5,0.009,26,0.034,28,0.136,29,0.266,
430 DATA 30,0.382,31,0.594,32,0.707,34,0.872,36,0.961,37.5,0.989
431 FOR I=1 TO NDATA
432 'READ T(I),D(I)
433 NEXT I
434 DATA
435 FOR I=1 TO NDATA
436 'READ S(I),G(I)
437 NEXT I
438 DATA
439 '***** PREPARATION OF FIGURE (CALL SUBROUTINE GRAPH-N)*****
440 WX1=0 : WY1=0 : WX2=60 : WY2=1!
441 SX1=70 : SY1=300 : SX2=510 : SY2=10
442 DX=6 : DY=.1 : NXS=2 : NYS=2
443 XAXIS$="Time [hour]" : YAXIS$="C/C0 [-]"
444 GOSUB 10000

```



```

445 '***** PLOT OF MEASURED VALUES *****
446 FOR I=1 TO NDATA
447 X=FNX(T(I)) : Y=FNY(C(I))
448 CIRCLE(X,Y),4:PAINT(X,Y)
449 NEXT I
450 FOR I=1 TO NDATA
451 X=FNX(T(I)) : Y=FNY(D(I))
452 'CIRCLE(X,Y),4
453 NEXT I
454 FOR I=1 TO NDATA
455 X=FNX(S(I)) : Y=FNY(G(I))
456 'CIRCLE(X,Y),2:PAINT(X,Y)
457 NEXT I
458 '***** DIMENSION *****
459 DIM Y(JM),YK(JM),YKO(JM),X(JM+1),XK(JM+1),XKO(JM+1)
460 DIM XS(JM),XSK(JM),XSKO(JM),BY(JM),BX(JM)
470 '
480 '***** INITIAL VALUE *****
530 FOR J=1 TO JM
531 XS(J)=0
532 NEXT J
533 FOR J=0 TO JM
540 X(J)=0
550 NEXT J
551 FOR J=1 TO JM
552 XSK(J)=0
553 NEXT J
560 XKO(0)=2*DZ/(2*DZ+3*C)
570 FOR J=1 TO JM
580 XKO(J)=0
590 NEXT J
604 '
610 N=1
620 '
630 '***** BY(J),BX(J),BX(JM) *****
640 FOR J=1 TO JM
650 BY(J)=X(J)-XS(J)+2*A/DT*XS(J)/(K2+(1-K2)*XS(J))
660 NEXT J
670 FOR J=1 TO JM-1
680 BX(J)=(2*C*LA2-LA1)*X(J+1)+(4*B-4*C*LA2-2*DT)*X(J)
685 +(2*C*LA2+LA1)*X(J-1)+2*DT*XS(J)
690 NEXT J
700 BX(JM)=(2*B-2*C*LA2-DT)*X(JM)+2*C*LA2*X(JM-1)+DT*XS(JM)
710 '
720 L=0
730 '
740 '***** XK(0) *****
745 XK(0)=OM/(2*DZ+3*C)*(4*C*XK0(1)-C*XK0(2)+2*DZ)-(OM-1)*XK0(0)
750 '
755 IF ABS(XK(0)-XK0(0))>=E THEN L=1
760 XK0(0)=XK(0)
765 '
766 J=1
767 '
770 '***** YK(J) *****
780 XSK(J)=OM/2/K3*(K3*XK0(J)+K3*BY(J)+K4+1-SQR((-K3*XK0(J)-K3*BY(J)-K4-1)
781 *(-K3*XK0(J)-K3*BY(J)-K4-1)-4*K3*K4*(XK0(J)+BY(J))))-(OM-1)*XSK0(J)
790 '
800 IF ABS(XSK(J)-XSK0(J))>=E THEN L=1
810 XSK0(J)=XSK(J)
820 '
910 '***** JUDGE OF EXIT OF COLUMN *****
920 IF J=JM GOTO 1030
930 '
940 '***** XK(J) *****
950 XK(J)=OM/(4*B+4*C*LA2+2*DT)*((2*C*LA2-LA1)*XK0(J+1)+(2*C*LA2+LA1)

```

```

951 *XK0(J-1)+2*DT*XSK0(J)+BX(J))-(OM-1)*XK0(J)
960 '
970 IF ABS(XK(J)-XK0(J))>=E THEN L=1
980 XK0(J)=XK(J)
990 '
1000 IF J=JM GOTO 1020
1001 J=J+1
1002 GOTO 780
1010 '
1020 '*****          XK(JM)          *****;
1030 XK(JM)=OM/(2*B+2*C*LA2+DT)*(2*C*LA2*XK0(JM-1)+DT*XSK0(JM)
1031 +BX(JM))-(OM-1)*XK0(J)
1040 '
1050 IF ABS(XK(JM)-XK0(J))>=E THEN L=1
1060 XK0(J)=XK(JM)
1070 '
1080 '*****          JUDGE OF LIMITTING          *****
1130 '
1140 FOR J=0 TO JM
1150 IF ABS(XK(J))>=1.1 THEN STOP
1160 NEXT J
1170 '
1180 IF L=0 GOTO 1210 ELSE 720
1205 '*****          OUT PUT OF      T      ,      XK(J)          *****
1210 T=N*DT*GAM/KKF/AV/60^2
1211 RT=T
1212 PRINT "T=";T;"(h)";
1213 FOR J=0 TO JM STEP 1
1214 PRINT XK(J);
1215 NEXT J
1216 PRINT XK(JM)
1220 IF N=1*INT(N/1) GOTO 1230 ELSE 1270
1230 XC=XK(JM) : RT=T
1231 LPRINT "T=";T;"###XK(JM)=";XK(JM);"####"
1240 X=FNX(RT) : Y=FNY(XC)
1250 CIRCLE(X,Y),1,2 : PAINT(X,Y),,2
1260 '*****          JUDGE OF FINAL CONC.          *****
1270 IF XK(JM)>=.99 THEN 1365 ELSE 1311
1280 '*****          NEXT TIME PREPARATION          *****
1311 FOR J=1 TO JM
1312 XS(J)=XSK(J)
1313 NEXT J
1320 FOR J=0 TO JM
1330 X(J)=XK(J)
1340 NEXT J
1350 N=N+1
1360 GOTO 640
1365 COPY 2
1370 END

```

Appendix 3. 二成分系破過曲線の計算プログラム

```

1      '*****
2      '**** ESTIMATION OF BREAK THROUGH CURVE IN PACKED BED      ****
3      '**** DIFFUSION MODEL/LOW REYNOLDS NUMBER/LANGMUIR ADSORPTION ****
4      '**** BINARY SYSTEM ****
5      '**** BY K. NAKANO APR 27, 1994 ****
6      '*****
100 CHAIN MERGE "B:GRAPH-N.BAS",110,ALL
105 SCREEN 3
110 '***** EXPERIMENTAL CONDITION *****
120 PE=.5 : 'PEKURE NUMBER [-]
130 RA=.00408 : 'RADIUS OF ADSORBENT [m]
140 DF=5.8E-09 : 'DIFFUSION CONSTANT OF PROPIONIC ACID MOLECULE [m^2/s]
150 DSP=1.42E-10 : 'SURFACE DIFFUSION CONSTANT OF PROPIONIC [m^2/s]
151 DSA=2.08E-10 : 'SURFACE DIFFUSION CONSTANT OF ACETIC [m^2/s]
160 KP=.031 : 'LANGMUIR CONSTANT OF PROPIONATE [m^3/mol]
161 KA=.014 : 'LANGMUIR CONSTANT OF ACETATE [m^3/mol]
165 QMP=2.84 : 'MAXIMUM ADSORBED QUANTITY OF PROPIONIC [mol/kg]
166 QMA=1.98 : 'MAXIMUM ADSORBED QUANTITY OF ACETIC [mol/kg]
170 U=.000011 : 'LINEAR VELOCITY OF COLUMN [m/s]
180 ZM=.305 : 'BED HEIGHT [m]
190 GAM=416 : 'PACKED DENSITY [kg/m^3]
200 EPS=.36 : 'RATON OF EMPTY [-]
210 VIS=.000802 : 'VISOSITY OF WATER [Pa·s]
220 DEN=1000 : 'DENSITY OF WATER [kg/m3]
230 CP0=324 : 'PROPIONIC ACID CONC. IN FEED [mol/m^3]
235 CA0=127 : 'ACETIC ACID CONC. IN FEED [mol/m^3]
240 AV=3*(1-EPS)/RA : 'SPECIFIC SURFACE AREA [m^2/m^3]
250 RE=2*RA*U/DEN/EPS/VIS : 'REYNOLDS NUMBER[-]
260 DL=2*RA*U/EPS/PE : 'MIXED DIF. CONSTANT OF TANGENTIAL TO CENTER [m^2/s]
270 KF=1.09*U/EPS*(2*RA*U/DEN/VIS)^(-2/3)*(VIS/DEN/DF)^(-2/3) : '[m/s]
280 KSP=15*DSP*GAM/RA^2/AV : '[kg/m^2·s]
281 KSA=15*DSA*GAM/RA^2/AV : '[kg/m^2·s]
290 A=QMP*KP/(1+KP*CP0+KA*CA0) : 'QP0/CP0 [m^3/kg]
291 D=QMA*KA/(1+KP*CP0+KA*CA0) : 'QA0/CA0 [m^3/kg]
295 K2=1/(1+KP*CP0+KA*CA0)
296 K3=KP*CP0
297 K4=KA*CA0
300 KKFP=1/1.15/(1/KF+1/A/KSP+2*RA*AV/PE/U) : '[m/s]
301 KKFA=1/1.15/(1/KF+1/A/KSA+2*RA*AV/PE/U) : '[m/s]
310 '
320 '***** PARAMETER OF CALCULATION *****
330 E=2
340 DT=.004
350 LA1=.006
360 DZ=DT/LA1
370 LA2=LA1/DZ
380 OM=1.1
390 RJM=ZM*KKFP*AV/U/DZ
400 IF RJM-INT(RJM)>=.5 THEN JM=INT(RJM)+1 ELSE JM=INT(RJM)
410 B=EPS/GAM
420 C=EPS*DL*KKFP*AV/U^2
421 E=EPS*DL*KKFA*AV/U^2
422 K5=2*A/DT/K2
423 K6=2*D/DT/K2
424 '
425 '***** PREPARATION OF FIGURE (CALL SUBROUTINE GRAPH-N)*****
426 WX1=0 : WY1=0 : WX2=64 : WY2=2.5
427 SX1=70 : SY1=300 : SX2=510 : SY2=10
428 DX=4 : DY=.25 : NXS=2 : NYS=2
429 XAXIS$="Time [hour]" : YAXIS$="C/CO [-]"
430 GOSUB 10000
431 '***** READ OF MEASURED VALUES *****
432 READ NDATA
433 DATA 16
434 READ CP,CA
435 DATA 24.01,7.62

```

```

436 DIM T(NDATA),CP1(NDATA),CP2(NDATA),CA1(NDATA),CA2(NDATA)
437 FOR I=1 TO NDATA
438 READ T(I),CP1(I)
439 CP2(I)=CP1(I)/CP
440 NEXT I
441 DATA 12,0.13,15,0.41,18,0.41,19,0.77,22.5,3.47,25,6.31,28,10.66,30,13.22,
442 DATA 32,14.79,34,16.66,36,17.84,37.5,18.89,39,19.99,42,20.14,45,19.61,
443 DATA 49,21.05
444 FOR I=1 TO NDATA
445 READ T(I),CA1(I)
446 CA2(I)=CA1(I)/CA
447 NEXT I
448 DATA 12,0.35,15,0.44,18,2.32,19,3.34,22.5,6.83,25,8.15,28,9.00,30,9.50,
449 DATA 32,9.30,34,9.16,36,9.27,37.5,8.97,39,9.08,42,9.25,45,8.53,49,9.04
453 '***** DIMENSION *****
454 DIM X(JM+1),XK(JM+1),XKO(JM+1)
460 DIM XS(JM),XSK(JM),XSKO(JM),BY(JM),BX(JM)
470 DIM XA(JM+1),XAK(JM+1),XAKO(JM+1)
475 DIM XAS(JM),XASK(JM),XASKO(JM),BYA(JM),BXA(JM)
476 '***** PLOT OF MEASURED VALUES *****
477 FOR I=1 TO NDATA
478 X=FNX(T(I)) : Y=FNY(CP2(I))
479 CIRCLE(X,Y),4:PAINT(X,Y)
480 NEXT I
481 FOR I=1 TO NDATA
482 X=FNX(T(I)) : Y=FNY(CA2(I))
483 CIRCLE(X,Y),4:PAINT(X,Y)
484 NEXT I
485 '***** INITIAL VALUE *****
490 FOR J=1 TO JM
500 XS(J)=0
510 NEXT J
511 FOR J=1 TO JM
512 XAS(J)=0
513 NEXT J
514 FOR J=0 TO JM
515 XA(J)=0
516 NEXT J
517 FOR J=0 TO JM
518 X(J)=0
519 NEXT J
520 FOR J=1 TO JM
530 XASK(J)=0
540 NEXT J
550 FOR J=1 TO JM
552 XSK(J)=0
553 NEXT J
560 XKO(0)=2*DZ/(2*DZ+3*C)
570 FOR J=1 TO JM
580 XK0(J)=0
590 NEXT J
600 XAKO(0)=2*DZ/(2*DZ+3*E)
601 FOR J=1 TO JM
602 XAKO(J)=0
603 NEXT J
604 '
610 N=1
620 '
630 '***** BY(J),BX(J),BX(JM),BYA(J),BXA(J),BXA(JM)*****
640 FOR J=1 TO JM
650 BY(J)=X(J)-XS(J)+2*A/DT*XS(J)/K2/(1+K3*XS(J)+K4*XAS(J))
660 NEXT J
670 FOR J=1 TO JM-1
680 BX(J)=(2*C*LA2-LA1)*X(J+1)+(4*B-4*C*LA2-2*DT)*X(J)
681 +(2*C*LA2+LA1)*X(J-1)+2*DT*XS(J)
690 NEXT J

```

```

700 BX(JM)=(2*B-2*C*LA2-DT)*X(JM)+2*C*LA2*X(JM-1)+DT*XS(JM)
710 FOR J= 1 TO JM
711 BYA(J)=XA(J)-XAS(J)+2*D/DT*XAS(J)/K2/(1+K3*XS(J)+K4*XAS(J))
712 NEXT J
713 FOR J=1 TO JM-1
714 BXA(J)=(2*E*LA2-LA1)*XA(J+1)+(4*B-4*E*LA2-2*DT)*XA(J)
715 +(2*E*LA2+LA1)*XA(J-1)+2*DT*XAS(J)
716 NEXT J
717 BXA(JM)=(2*B-2*E*LA2-DT)*XA(JM)+2*E*LA2*XA(JM-1)+DT*XAS(JM)
720 L=0
730 '
731 '***** XAK(0) *****
732 XAK(0)=OM/(2*DZ+3*E)*(4*E*XAKO(1)-E*XAKO(2)+2*DZ)-(OM-1)*XAKO(0)
733 IF ABS(XAK(0)-XAKO(0))>=E THEN L=1
734 XAKO(0)=XAK(0)
740 '***** XK(0) *****
745 XK(0)=OM/(2*DZ+3*C)*(4*C*XKO(1)-C*XKO(2)+2*DZ)-(OM-1)*XKO(0)
750 '
755 IF ABS(XK(0)-XKO(0))>=E THEN L=1
760 XKO(0)=XK(0)
761 '
762 J=1
763 '
770 '***** XSK(J) *****
780 XSK(J)=OM/(2*K3)*(K3*XKO(J)+K3*BY(J)-K4*XASK(J)-1-K5+SQR((K4*XASK(J)+1
781 +K5-K3*XKO(J)-K3*BY(J))*(K4*XASK(J)+1+K5-K3*XKO(J)-K3*BY(J))+4*K3
782 *(XKO(J)+BY(J)+K4*XASK(J)*XKO(J)+K4*XASK(J)*BY(J)))-(OM-1)*XSKO(J)
790 '
800 IF ABS(XSK(J)-XSKO(J))>=E THEN L=1
810 XSKO(J)=XSK(J)
820 '
821 '***** XASK(J) *****
822 XASK(J)=OM/(2*K4)*(K4*XAKO(J)+K4*BYA(J)-K3*XSK(J)-1-K6+SQR((K3*XSK(J)+1
823 +K6-K4*XAKO(J)-K4*BYA(J))*(K3*XSK(J)+1+K6-K4*XAKO(J)-K4*BYA(J))+4*K4
824 *(XAKO(J)+BYA(J)+K3*XSK(J)*XAKO(J)+K3*XSK(J)*BYA(J)))-(OM-1)*XASKO(J)
827 IF ABS(XASK(J)-XASKO(J))>=E THEN L=1
828 XASKO(J)=XASK(J)
930 '***** XAK(J) *****
931 XAK(J)=OM/(4*B+4*E*LA2+2*DT)*((2*E*LA2-LA1)*XAKO(J+1)+(2*E*LA2+LA1)
932 *XAKO(J-1)+2*DT*XASKO(J)+BXA(J))-(OM-1)*XAKO(J)
933 '
934 IF ABS(XAK(J)-XAKO(J))>=E THEN L=1
935 XAKO(J)=XAK(J)
940 '***** XK(J) *****
950 XK(J)=OM/(4*B+4*C*LA2+2*DT)*((2*C*LA2-LA1)*XKO(J+1)+(2*C*LA2+LA1)*XKO(J-1)
951 +2*DT*XSKO(J)+BX(J))-(OM-1)*XKO(J)
960 '
970 IF ABS(XK(J)-XKO(J))>=E THEN L=1
980 XKO(J)=XK(J)
990 '
1000 IF J=JM GOTO 1010
1001 J=J+1
1002 GOTO 764
1010 '
1011 '***** XAK(JM) *****
1012 XAK(JM)=OM/(2*B+2*E*LA2+DT)*(2*E*LA2*XAKO(JM-1)+DT*XASKO(JM)+BXA(JM))
1013 -(OM-1)*XAKO(J)
1014 '
1015 IF ABS(XAK(JM)-XAKO(J))>=E THEN L=1
1016 XAKO(JM)=XAK(JM)
1020 '***** XK(JM) *****
1030 XK(JM)=OM/(2*B+2*C*LA2+DT)*(2*C*LA2*XKO(JM-1)+DT*XSKO(JM)+BX(JM))
1031 -(OM-1)*XKO(J)
1040 '
1050 IF ABS(XK(JM)-XKO(J))>=E THEN L=1

```

```

1060 XK0(J)=XK(JM)
1070 '
1080 '***** JUDGE OF LIMITTING *****
1130 '
1180 IF L=0 GOTO 1210 ELSE 720
1205 '***** OUT PUT OF T , XK(J) *****
1210 T=N*DT*GAM/KKFP/AV/60^2
1211 RT=T
1212 PRINT "T=";T;"(h)";
1213 FOR J=0 TO JM STEP 1
1214 PRINT XK(J);
1215 NEXT J
1216 PRINT XK(JM)
1220 IF N=1*INT(N/1) GOTO 1221 ELSE 1270
1221 XD=XAK(JM) : RT=T
1230 XC=XK(JM) : RT=T
1231 LPRINT "T=";T;"####XK(JM)=";XK(JM);"####XAK(JM)=";XAK(JM);"##"
1240 X=FNX(RT) : Y=FNY(XC)
1249 CIRCLE(X,Y),1,2 : PAINT(X,Y),,2
1251 X=FNX(RT) : Y=FNY(XD)
1252 CIRCLE(X,Y),1,3 : PAINT(X,Y),,3
1260 '***** JUDGE OF FINAL CONC. *****
1270 IF XK(JM)>=.9423 THEN 1365 ELSE 1311
1280 '***** NEXT TIME PREPARATION *****
1311 FOR J=1 TO JM
1312 XS(J)=XSK(J)
1313 NEXT J
1314 FOR J=1 TO JM
1315 XAS(J)=XASK(J)
1316 NEXT J
1320 FOR J=0 TO JM
1330 X(J)=XK(J)
1340 NEXT J
1341 FOR J=0 TO JM
1342 XA(J)=XAK(J)
1343 NEXT J
1350 N=N+1
1360 GOTO 640
1365 COPY 2
1370 END

```

付 記

本研究の一部は、下記の学会および学術雑誌において発表された。

学術雑誌：

1. Kazunori Nakano, Masatoshi Matsumura and Hiroshi Kataoka: Application of a Rotating Ceramic Membrane to Dense Cell Culture. J.Ferment. Bioeng.,76,49-54(1993).
2. Kazunori Nakano, Hiroshi Kataoka and Masatoshi Matsumura: High Density Cell Culture of Propionibacterium freudenreichii coupled with Propionic acid Removal System with Activated Charcoal. J.Ferment. Bioeng.,81,(1996) (in press).

学会発表：

1. Kazunori Nakano, Masatoshi Matsumura and Hiroshi Kataoka: Separation Performance of Rotating Ceramic Membrane and Its Application to Dense Cell Culture. 化学工学会 第24回秋季大会 研究発表講演要旨集 第2分冊 p.171(1991)
2. Kazunori Nakano, Masatoshi Matsumura and Hiroshi Kataoka: Removal Characteristic of Propionic Acid from Culture Broth using Adsorbents. 化学工学会 第25回秋季大会 研究発表講演要旨集 第2分冊 p.139(1992)
3. Kazunori Nakano, Masatoshi Matsumura and Hiroshi Kataoka: Application of Rotating Ceramic Membrane to Dense Cell Culture. 6th World Filtration Congress, Japan. Abstract Book p.688(1993)

4. Kazunori Nakano, Masatoshi Matsumura and Hiroshi Kataoka: High Dense Cell Culture of Propionibacterium with Selective Removal of Propionic Acid. 化学工学会 第 26回秋季大会 研究発表講演要旨集 第 1分冊 p.141(1993)
5. Kazunori Nakano, Masatoshi Matsumura and Hiroshi Kataoka: High Dense Cell Culture of Propionibacterium and Recovery of Organic Acids from Culture Broth. 化学工学会 第 27回秋季大会 研究発表講演要旨集 第 2分冊 p.202(1994)
6. 中野 和典、松村 正利: 活性炭による有機酸除去を伴ったプロピオン酸菌の高密度培養 日本生物工学会大会 講演要旨集 p.165(1995)

謝 辞

本研究は、筑波大学応用生物化学系教授、松村正利博士、新潟工科大学教授、片岡廣博士のご指導のもとに行なわれたものであり、その間適切なご助言とご教示を賜り、心から感謝の意を表わします。

研究成果を論文としてまとめるにあたりましては、筑波大学応用生物化学系教授、田中秀夫博士並びに同大学同学系教授、向高祐邦博士および同大学農林工学系教授、前川孝昭博士に多大なご助言とご教示をいただきました。ここに厚くお礼申し上げます。

本研究で使用した培地成分を提供していただいた明治製菓株式会社の蛭田修氏、ならびに菌株を提供していただき、ビタミン B₁₂の分析においてご協力していただいた日本石油株式会社の平沢和明氏に深くお礼申し上げます。

そして、本研究における諸実験の遂行にあたりご協力いただきました生物プロセス工学研究室の皆様へ感謝致します。

参考文献

1. Watanabe,T., Aoki,T., Honda,H., Taya,M., Kobayashi,T.: Production of ethanol in repeated-batch fermentation with membrane type bioreactor. *J.Ferment.Bioeng.*, 69, 33-38 (1990).
2. Schlote,D., Gottschalk,G.: Effect of cell recycle on continuous butanol-acetone fermentation with Clostridium acetobutylicum under phosphate limitation. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 24, 1-5 (1986).
3. Holst,O., Hansson,L., Berg,A.C., Mattiasson,B.: Continuous culture with complete cell recycle to obtain high cell densities in product inhibited culture; cultivation of Streptococcus lactis for production of superoxide dismutase. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 23, 10-14(1985).
4. Reed,W.M., Bogdan,M.E.: Application of cell recycle to continuous fermentative acetic acid production. *Biotechnol.Bioeng.Symp.*, 15, 641-647 (1985).
5. Bull,D.N., Young,M.D. : Enhanced product formation in continuous fermentations with microbial cell recycle. *Biotechnol.Bioeng.*, 23, 373-389 (1981).
6. Ferras,E., Minier,M., Goma,G.: Acetonobutylic fermentation: improvement of performances by coupling continuous fermentation and ultrafiltration. *Biotechnol.Bioeng.*, 28, 523-533 (1986).
7. Taniguchi,M., Kotani,N., Kobayashi,T.: High-concentration cultivation of lactic acid bacteria in fermentor with cross-flow filtration. *J.Ferment.Technol.*, 65, 179-184 (1987).
8. Taniguchi,M., Kotani,N., Kobayashi.: High concentration of Bifidobacterium longum in fermenter with cross-flow filtration. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 25, 438-441 (1987).
9. Mehaia,M.A., Cheryan,M.:. Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor. *Enzyme Microb.Technol.*, 8, 289-292 (1986).
10. Hatanaka,H., Wang,E., Taniguchi,M., Iijima,S., Kobayashi,T.:

Production of vitamin B₁₂ by a fermentor with a hollow-fiber module. Appl.Microbiol.Biotechnol., 27, 470-473 (1988).

11. Harris,T.A.J., Reuben,B.G., Cox,D.J., Vaid,A.K.: The cross-flow filtration of an unstable β -lactam antibiotic fermentation broth. J.Chem.Tech.Biotechnol., 42, 19-30 (1988).
12. Omstead,D.R., Jeffries,T.W., Naughton,R., Gregor,H.P.: Membrane controlled digestion: anaerobic production of methane and organic acids. Biotechnol.Bioeng.Symp., 10, 247-258 (1980).
13. Kavanagh,P.R., Brown,D.E.: Cross-flow separation of yeast cell suspensions using a sintered stainless steel filter tube. J.Chem.Tech.Biotechnol., 38, 187-200 (1987).
14. Nishizawa,Y., Mitani,Y., Tamai,M.,: Ethanol production by cell recycling with hollow fibers. J.Ferment.Technol., 61, 599-605 (1983).
15. Hoffmann,H., Kuhlmann,W., Meyer,H.D., Schugerl,K.: High productivity ethanol fermentations with cross-flow membrane separation techniques for continuous cell recycling. J.Mem.Sci., 22, 235-243 (1985).
16. Wang,E., Hatanaka,H., Iijima,S., Takebayashi,T., Shi,Z., Shimizu,K., Matsubara,M., Kobayashi,T.: Control of cell and lactate concentration in a hollow-fiber bioreactor for lactic acid fermentation. J.Chem.Eng.Jap., 21, 36-40 (1988).
17. Enzminger,J.D., Asenjo,J.A.: Use of cell recycle in the aerobic fermentative production of citric acid by yeast. Biotechnol.Lett., 8, 7-12 (1986).
18. Nakao,S., Yumoto,S., Kimura,S.: Analysis of rejection characteristics of macromolecular gel layer for low molecular weight solutes in ultrafiltration. J.Chem.Eng.Jap., 15, 463-468 (1982).
19. Nanba,A., Nukada,R., Nagai,S.: Inhibition by acetic and propionic acids of the growth of Propionibacterium shermanii. J.Ferment.Technol., 61, 551-556 (1983).

20. 萩原 文二, 橋本 光一: 膜による分離法, 講談社, 1-2 (1974).
21. 松宮 弘幸, 柴田 栄彦, 飯野 和美: 走るバイオ企業, ジャパンタイムズ, 190-192 (1988).
22. Mori,H., Yano,T., Kobayashi,T., Shimizu,S.: High density cultivation of biomass in fed-batch system with do-stat. J.Chem. Eng.Jap., 12, 313-319 (1979).
23. Yano,T., Kobayashi,T., Shimizu,S.: Silicone tubing sensor for detection of methanol. J.Ferment.Technol., 56, 421-427 (1978).
24. Mori,H., Yamane,T., Kobayashi, T.: Comparison of cell production among fed-batch, repeated fed-batch and continuous cultures at high cell concentration. J.Ferment.Technol., 61, 391-401 (1983).
25. Shimizu,K., Kobayashi,T., Nagara,A., Matsumoto,M.: Improved performance with multiple fermentations for repeated batch cultivation for non-growth-associated products. Biotechnol.Bioeng., 27, 743-755 (1985).
26. 松本 豊, 戸塚 好之, 坂田 正, 東登 喜久, 高橋 渉: セラミック膜によるメタン発酵液のろ過性能. 化学工学論文集, 14, 462-468 (1988).
27. 今坂 卓男, 兼国 伸彦, 宗 浩之, 吉野 成: セラミック膜モジュールを用いた気液二相クロスフローろ過. 化学工学論文集, 15, 638-644 (1989).
28. Imasaka,T., Kanakuni,N., So,Hiroyuki., Yoshino,Shigeru.: Cross-flow filtration of methane fermentation broth by ceramic membranes. J.Ferment.Bioeng., 68, 200-206 (1989).
29. 清水 康利, 六代 稔, 遠矢 幸男, 栢分 英助, 矢沢 哲夫, 田中 博史, 江口 清久: アルミナ膜のろ過運転に伴うろ過特性変化. 化学工学論文集, 15, 788-794 (1989).
30. 今坂 卓男, 兼国 伸彦, 輪島 尚人, 吉野 成: セラミック膜を用いた均一粒子懸濁液のクロスフローろ過特性. 化学工学論文集, 15, 299-305 (1989).
31. 清水 康利, 六代 稔, 遠矢 幸男, 栢分 英助, 矢沢 哲夫,

- 田中 博史, 江口 清久: メタン発酵液のろ過特性への膜抵抗の影響.
化学工学論文集, 16, 145-151 (1990).
32. Le, M.S., Atkinson, T.: Crossflow microfiltration for recovery of intracellular products. Proc. Biochem., February, 26-31 (1985).
33. 木村 尚史: 分離膜. 化学工学会誌, 50, 14-18 (1986).
34. 神武 正信, 内田 幸生, 佐藤 孝義, 下田 幸三, 渡辺 敦夫, 中尾 真一: 膜のファウリングの原因と洗浄による透過流束の回復性. 日本農芸化学会誌, 61, 677-681 (1987).
35. 神武 正信, 内田 幸生, 佐藤 孝義, 下田 幸三, 木村 利昭, 相良 康重, 渡辺 敦夫, 中尾 真一: ファウリング膜の走査型電子顕微鏡による観察とファウリング物質の分析. 日本農芸化学会誌, 61, 683-689 (1987).
36. 村瀬 敏郎, 入谷 英司, P.チッドポン, 渥美 邦夫, 白戸 紋平: 回転円筒型ダイナミックフィルターによる難ろ過性スラリーの薄ケーキ層ろ過. 水質汚濁研究, 11, 307-313 (1988).
37. 村瀬 敏郎, 入谷 英司, P.チッドポン, 加納 勝博, 渥美 邦夫, 白戸 紋平: 回転円筒型セラミック膜フィルターによる高速精密ろ過. 化学工学論文集, 15, 630-637 (1989).
38. 村瀬 敏郎, 入谷 英司, P.チッドポン, 柳下 和彦, 吉田 和正, 杉山 達夫, 白戸 紋平: 振動板型ダイナミックフィルターによる薄ケーキ層ろ過. 化学工学論文集, 14, 135-140 (1988).
39. Kroner, K.H., Nissen, V., Ziegler, H.: Improved dynamic filtration of microbial suspensions. Biotechnol., 5, 921-926 (1987).
40. 村瀬 敏郎, 入谷 英司, P.チッドポン, 加納 勝博: 回転円筒型セラミック膜フィルターによる周期的ダイナミックろ過. 化学工学論文集, 15, 1179-1185 (1989).
41. Ohashi, K., Tashiro, K., Kushiya, F., Matsumoto, T., Yoshida, S., Endo, M., Horio, T., Ozawa, K., Sakai, K.: Rotation-induced Taylor vortex enhances filtrate flux in plasma separation. Trans. Am. Soc. Artif. Organs, 34, 300-307 (1988).

42. 白戸 紋平, 村瀬 敏郎, 山崎 春夫, 岩田 政司, 稲吉 正人:
溝付回転円板によるダイナミックろ過におけるろ室内流動状態. 化学工学論
文集, 11, 162-167 (1985).
43. 福島 幸生, 昆 正浩: 膜分離操作の菌体損傷への影響. 化学工学協会第
55年会講演要旨集, 257 (1990).
44. Mellows, W.A.: A vibratory filtration model for candle-type
filters. Powder Technol., 43, 203-212 (1985).
45. Matsumoto, K., Katsuyama, S., Ohya, H.: Separation of yeast by cross
flow filtration with backwashing. J. Ferment. Technol., 65, 77-83
(1987).
46. Matsumoto, K., Katsuyama, S., Ohya, H.: Cross-flow filtration of
yeast by microporous ceramic membrane with backwashing. J. Ferment.
Technol., 66, 199-205 (1988).
47. 木村 尚史, 野村 剛志: 限外ろ過における電場の効果. 膜, 7,
245-250 (1982).
48. 狩谷 成男: 「セラミック膜フィルターの分離特性」 筑波大学 農林学類
生物応用化学専攻 卒業論文 (1989).
49. 清水 祥一, 山根 恒夫: バイオリアクターシステム, 共立出版, 95-98
(1987).
50. 村山 勝男: 錯体形成による金属抽出システムおよび展望. 化学工学会誌
42, 204-207 (1978).
51. 中塩 文行, 井上 勝利, 近藤 和生: 錯体形成による金属の抽出.
化学工学会誌, 42, 182-199 (1978).
52. Hano, T., Matsumoto, M., Ohtake, T., Sakai, K., Hori, F.: Extraction
equilibria of organic acids with tri-n-octylphosphineoxide.
J. Chem. Eng. Jap., 23, 734-739 (1990).
53. Kertest, A.S., King, C.J.: Extraction chemistry of fermentation
product carboxylic acids. Biotechnol. Bioeng., 28, 269-282 (1986).

54. Boey, S.C., Garcia, M.C., Pyle, D.L.: Extraction of citric acid by liquid membrane extraction. *Chem. Eng. Res. Des.*, 65, 218-223 (1987).
55. Golob, J., Grilc, V., Zadnik, B.: Extraction of acetic acid from dilute aqueous solutions with trioctylphosphine oxide. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, 20, 433-435 (1981).
56. Niitsu, M., Sekine, T.: Solvent extraction equilibria of acids. The extraction of several mono and dicarboxylic acids with trioctylphosphine oxide in hexane. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 51, 705-709 (1978).
57. Chen, F., Tanaka, H., Naka, Y., Oshima, E.: Extraction of lower carboxylic acids from aqueous solution by tri-n-octylamine. *J. Chem. Eng. Jap.*, 22, 6-11 (1989).
58. Wennersten, R.: The extraction of acid from fermentation broth using a solution of a tertiary amine. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 33B, 85-94 (1983).
59. 坂井 渡, 中塩 文行, 常行 輝夫, 井上 勝利: 高分子アミンによる酢酸の抽出平衡. *化学工学会誌*, 33, 1221-1224 (1969).
60. Kawano, Y., Kusano, K.: Extraction rate of propionic acid with long-chain alkylamine in horizontal rectangular channel. *J. Chem. Eng. Jap.*, 16, 519-521 (1983).
61. Nuchnoi, P., Yano, T., Nishino, N., Nagai, S.: Extraction of volatile fatty acids from diluted aqueous solution using a supported liquid membrane. *J. Ferment. Technol.*, 65, 301-310 (1987).
62. Crabbe, P.G., Tse, C.W., Munro, P.A.: Effect of microorganisms on rate of liquid extraction of ethanol from fermentation broths. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 939-943 (1986).
63. Minier, M., Goma, G.: Ethanol production by extractive fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1565-1579 (1982).
64. Nuchnoi, P., Izawa, I., Nishio, N., Nagai, S.: Extractive acidogenic fermentation by a supported liquid membrane. *J. Ferment. Technol.*, 65, 699-702 (1987).

65. Busche, R.M., Shimshick, E.J., Yates, R.A.: Recovery of acetic acid from dilute acetate solution. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 12, 249-262 (1982).
66. Likidis, Z., Schugerl, K.: Recovery of penicillin by reactive extraction in centrifugal extractors. *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 1032-1040 (1987).
67. Likidis, Z., Schlichting, E., Bischoff, L., Schugerl, K.: Reactive extraction of penicillin G from mycel-containing broth in a countercurrent extraction decanter. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 1385-1392 (1989).
68. Yabannavar, V.M., Wang, D.I.C.: Extractive fermentation for lactic acid production. *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 1095-1100 (1991).
69. Honda, H., Toyama, Y., Takahashi, H., Nakazeko, T., Kobayashi, T.: Effective lactic acid production by two-stage extractive fermentation. *J. Ferment. Technol.*, 79, 589-593 (1995).
70. Giusti, D.M., Conway, R.A., Lawson, C.T.: Activated carbon adsorption of petrochemicals. *J. Water Poll. Control. Fed.*, 46, 947-965 (1974).
71. Linner, E.R., Gortner, R.A.: Interfacial energy and the molecular structure of organic compounds. *J. Phys. Chem.*, 39, 35-67 (1935).
72. 河野 恵宣, 花村 賢一郎, 羽野 忠: 活性炭に対する極性有機酸の吸着平衡. *化学工学論文集*, 16, 411-413 (1990).
73. 浦野 紘平: 水溶液に対する活性炭の吸着性能. *化学工学会誌*, 40, 397-401 (1976).
74. Kipling, J.J.: The adsorption of acetic acid and n-butylamine from aqueous solutions by activated charcoals. *J. Chem. Soc.*, 1483-1497 (1948).
75. Getzen, F.W., Ward, T.M.: A model for adsorption of weak electrolytes on solids as a function of pH. *J. Colloid Interface. Sci.*, 31, 441-453 (1969).

76. 野崎 正士: 樹脂吸着剤. 化学工学会誌, 35, 1310-1314 (1971).
77. ケネス・A・キューン, 野崎 正士: 合成吸着剤アンバーライト XAD. 別冊化学工業, 15-3, 工場操作シリーズ No.7, 143-163 (1971).
78. Milestone, N.B., Bibby, D.M.: Concentration of alcohols by adsorption on silicalite. J.Chem.Tech.Biotechnol., 31, 732-736 (1981).
79. Klein, S.M., Abraham, W.H.: Adsorption of ethanol and water vapors by silicalite. Am.Ind.Chem.Eng.Symposium series., 79, 53-58 (1983).
80. Pitt, W.W., Haag, G.L., Lee, D.D.: Recovery of ethanol from fermentation broths using selective sorption-desorption. Biotechnol.Bioeng., 25, 123-131 (1983).
81. Gustafson, R.L., Albright, R.L., Heisler, Joel., Lirio, J.A., Reid, Octavius.T.: Adsorption of organic species by high surface area styrene-divinylbenzene copolymers. I.E.C.Prod.Res.Dev., 7, 107-115 (1968).
82. Paleos, J.: Adsorption from aqueous and nonaqueous solutions on hydrophobic and hydrophilic high surface-area copolymers. J.Colloid Interface Sci., 31, 7-18 (1969).
83. Fritz, J.S., Tateda, A.: Studies on the anion exchange behavior of carboxylic acids and phenols. Analytical Chem., 40, 2115-2119 (1968).
84. Lencki, R.W., Robinson, C.W., Moo-young, M.: On-line extraction of ethanol from fermentation broths using hydrophobic adsorbents. Biotechnol.Bioeng.Symp., 13, 617-628 (1983).
85. Ennis, B.M., Qureshi, N., Maddox, I.S.: In-line toxic product removal during solvent production by continuous fermentation using immobilized *Clostridium acetobutylicum*. Enzyme Microb.Technol., 9, 672-675 (1987).
86. Nayve, F.R.P., Motoki, M., Matsumura, M., Kataoka, H.: Selective removal of ammonia from animal cell culture broth. Cytotechnology, 6, 121-130 (1991).

87. Masuma, R., Tanaka, Y., Omura, S.: Ammonium ion-depressed fermentation of tylosin by the use of a natural zeolite and its significance in the study of biosynthetic regulation of the antibiotic. *J. Ferment. Technol.*, 61, 607-614 (1983).
88. Honda, H., Itoh, T., Shiragami, N., Unno, H.: Phytohormone control for plant cell culture using a bioreactor equipped with in-line feeding column. *J. Chem. Eng. Japan*, 26, 291-296 (1993).
89. Ruth, B. F.: Studies in filtration; nature of fluid flow through filter septa and its importance in the filtration equation. *Ind. Eng. Chem.*, 27, 806-816 (1935).
90. 大山 義年: 化学工学 II, 岩波書店, 134-137 (1963).
91. Deindoerfer, F. H., West, J. M.: Rheological properties of fermentation broths. *Adv. Appl. Micro.*, 2, 265-273 (1960).
92. 田宮 信雄, 八木 達彦 訳: コーン・スタンプ生化学 第5版, 東京化学同人, 166-171 (1988).
93. 日本ビタミン学会 編: ビタミンと医学, 化学同人, 117-132 (1989).
94. Prescott, S. C., Dunn, C. G.: *Industrial microbiology*, 739-751. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York (1949).
95. Roth, J. R., Lawrence, J. G., Rubenfeld, M., Higgins, S. K., Church, G. M.: Characterization of the cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 175, 3303-3316 (1993).
96. Florent, J., Ninet, L.: *Microbial technology*, 2nd ed, vol 1, 496-509. Academic Press. Inc. (1979).
97. 真田 雄三, 鈴木 基之, 藤元 薫: 新版 活性炭 基礎と応用, 講談社, 73-74 (1992).
98. 化学工学協会編, 化学工学便覧, 改訂 5版, 丸善, 603 (1984).

99. 元木 政道: 「動物細胞培養におけるアンモニアの選択的除去に関する基礎的研究」 筑波大学 農学研究科 応用生物化学専攻 農学修士論文, 52-65 (1988).
100. 化学工学協会編, 化学工学便覧, 改訂 4版, 丸善, 864-865 (1984).
101. 化学工学協会編, 化学工学便覧, 改訂 4版, 丸善, 872 (1984).