



# 微水系エステル交換反応プロセスの制御に関する研究

泉本, 英次

---

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

1992-03-18

(Date of Publication)

2012-06-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1632

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3062382>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001632>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



神戸大学博士論文

微水系エステル交換反応プロセスの  
制御に関する研究

平成4年1月

泉本 英次

神戸大学博士論文

微水系エステル交換反応プロセスの  
制御に関する研究

平成4年1月

泉本 英次

# 目次

## 第1章 序論

1. 1	はじめに	1
1. 2	既往の研究	4
1. 2. 1	エステル交換反応に関する既往の研究	4
1. 2. 2	バイオプロセスの計測と制御に関する 既往の研究	7
1. 3	本研究の目的と内容	13

## 第2章 微量水分濃度の動的変化を考慮した回分式エステル交換反応 モデル

2. 1	緒言	15
2. 2	数式モデル	16
2. 2. 1	反応基質に関する物質収支式	17
2. 2. 2	水に関する物質収支式	19
2. 3	実験方法	21
2. 3. 1	実験方法	21
2. 3. 2	各種パラメータの決定	24
2. 3. 3	回分実験とシミュレーション結果	29
2. 4	結論	32

### 第3章 連続エステル交換反応の水分濃度・トリグリセリド組成同時制御

3. 1	緒言	33
3. 2	エステル交換反応モデル	34
3. 2. 1	連続反応プロセスフロー	34
3. 2. 2	数式モデル	35
3. 3	実験方法および条件	38
3. 4	水分濃度制御	40
3. 4. 1	制御機構	40
3. 4. 2	最適な水分濃度設定値の検討	41
3. 4. 3	制御実験結果および考察	43
3. 5	水分濃度・トリグリセリド組成同時制御	47
3. 5. 1	制御機構	47
3. 5. 2	最適コントローラの検討	48
3. 5. 3	制御実験結果および考察	52
3. 6	結論	54

### 第4章 酵素活性推定機構付フィードフォワード/フィードバック制御系による微水系エステル交換反応制御

4. 1	緒言	55
4. 2	実験方法および条件	56
4. 3	制御機構	56
4. 3. 1	フィードフォワード/フィードバック制御系	56
4. 3. 2	酵素活性推定機構	57
4. 4	数値シミュレーション	60
4. 4. 1	酵素活性推定を行わない場合	60

4. 4. 2	酵素活性推定を行った場合	67
4. 5	制御実験	68
4. 5. 1	スタートアップ実験	68
4. 5. 2	外乱実験	70
4. 6	結論	71

## 第5章 微水系連続エステル交換反応の状態推定制御

5. 1	緒言	72
5. 2	線形モデル	73
5. 2. 1	線形化	73
5. 2. 2	非線形モデルと線形モデルの比較	76
5. 3	カルマンフィルタによる状態推定制御	78
5. 3. 1	推定機構	78
5. 3. 2	制御結果	83
5. 4	結論	85

総括		86
----	--	----

## Appendix 1 グリセリド酵素複合体モデルに基づいたエステル交換

反応速度式	88
2 反応速度定数および総括物質移動係数 $K_w$ の推定手順	94
3 初期酵素活性の探索手順	96
4 酵素活性推定機構を有した $F F / F B$ 制御系における 計算手順	97
5 線形化方程式の係数マトリックス	98

使用記号	-----	101
引用文献	-----	104
本論文に関する報文	-----	112
本論文の関連文献	-----	113
謝辞	-----	114

## 第1章 序論

### 1. 1 はじめに

本論文は、微水系バイオリアクターを用いた油脂の酵素的エステル交換反応プロセスを対象とした反応制御システムについて検討したものである。

近年、油脂化学工業の分野においては、リパーゼを用いてトリグリセリドの脂肪酸残基を他の脂肪酸と交換するエステル交換反応が注目されている。従来リパーゼは主にトリグリセリドの加水分解酵素として利用されていたが、最近では微量水分系においてはエステル合成やエステル転移を触媒することが知られ、さまざまな応用が試みられるようになった。油脂の改質、すなわち安価な油脂から高価なカカオ代替脂を生産する油脂のエステル交換反応も、このようなリパーゼ酵素触媒作用の応用例の一つであり、すでに実用化されつつある。

カカオ脂の主成分は、1、3位に飽和脂肪酸であるパルミチン酸あるいはステアリン酸を、2位に不飽和脂肪酸であるオレイン酸をもつ対称型トリグリセリド [1(3)-palmitoil-3(1)stearoyl-2-glycerol (略称SOP)、あるいは1,3-distearoyl-2-oleylglycerol (略称SOS)] である。したがって、2位がオレイン酸である油脂とパルミチン酸やステアリン酸などの脂肪酸に、1、3位特異性リパーゼを作用させることによりカカオ代替脂を生産することができる。

エステル交換反応の機構図を図1-1に示す。トリグリセリド (TG) と脂肪酸 (FFA) に1、3位特異性酵素を作用させると、(1-1)式に示すような脂肪酸組成の異なった新たなトリグリセリドが生産される (エステル交換反応)。しかしながら、過剰の水分の存在下では(1-2)式に示す加水分

解反応も促進され、副生成物であるジグリセリド (DG) が生成される。  
 (1-1)式の反応を促進させるためにも微量水分の存在が不可欠であり、加水分解による副生成物の生成を抑制しつつエステル交換反応を行わせるためには、最適な水分濃度に制御することが重要である。

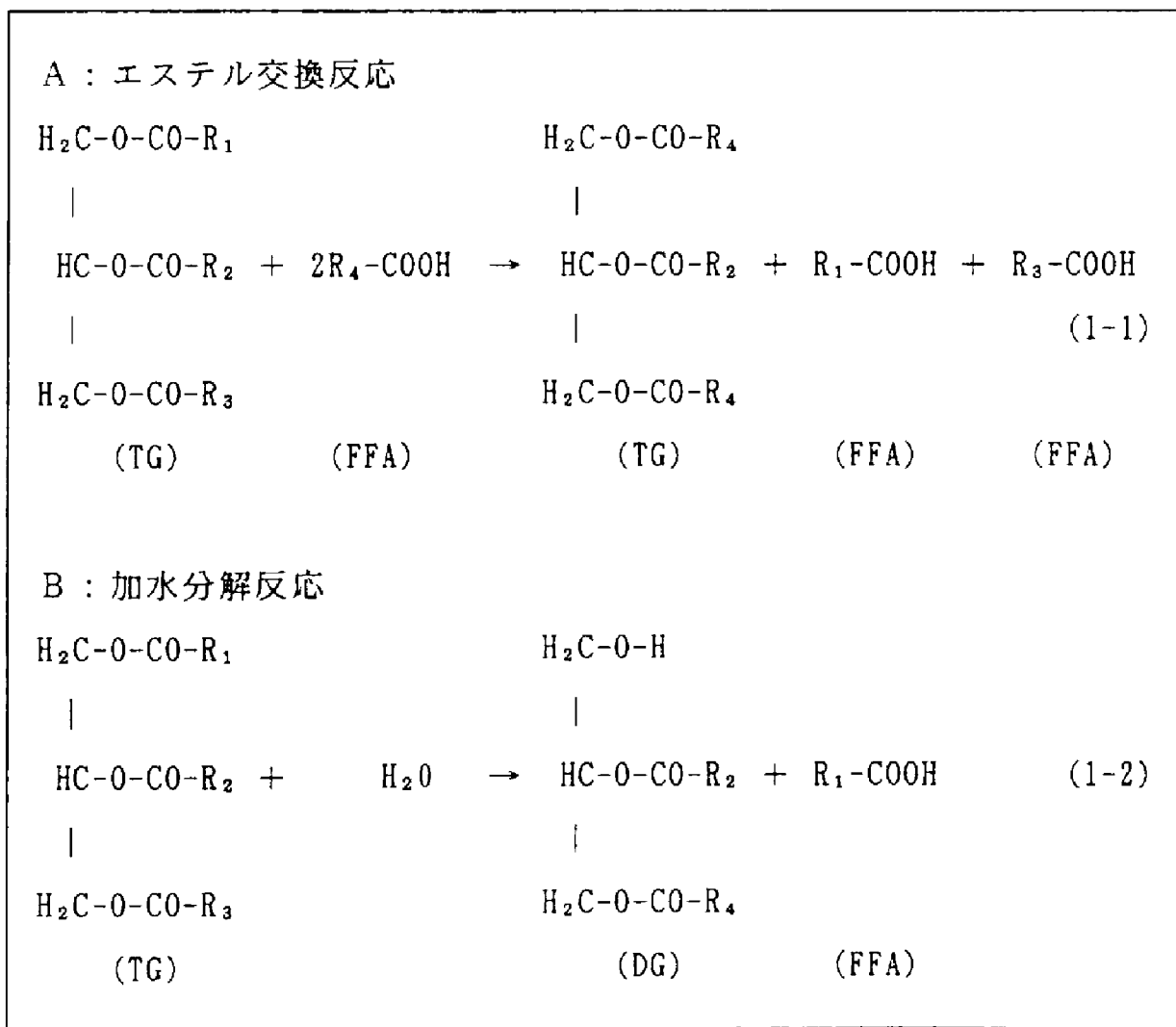


図 1 - 1 エステル交換反応機構図

したがって、このようなエステル交換反応の実用化にあたっては、効率の良いバイオリクターシステムの開発が要求される。主要な技術課題としては、

①安価で安定なリパーゼ生産技術

②微量水分濃度制御の可能なバイオリクターシステム技術  
を挙げることができる。

従来、リパーゼの使用形態は、Rhizopus属、Aspergillus属やMucor属などの各種微生物由来の代謝リパーゼ（微生物が菌体外に代謝した酵素）を珪藻土などの適当な担体に吸着固定化<sup>1, 2)</sup>したり、親油性の光硬化性樹脂に包括固定化する方法<sup>3)</sup>が一般的である。しかしながら、これらの方法は培養液と微生物との分離操作、塩析や等電点沈殿操作などによる酵素の回収など工程が繁雑となり、必ずしも工業的に有利な方法とは言い難い。さらに、珪藻土などに固定化した場合には反応槽形式はカラム充填層式となり、水分濃度制御機構の装置化が困難なため軸方向の水分濃度分布が生じるなど、改善の余地が多い。

これに対して、代謝酵素の代わりに、酵母や細菌などの微生物細胞をそのままリパーゼ酵素剤として使用する方法<sup>4)</sup>も試みられている。この場合、酵素の回収は改善されるものの、いぜんとして細胞固定化のための珪藻土を必要とし、技術的課題を残している。

これに対し、ポリウレタンフォームなどの多孔性物質よりなる微生物保持粒子（Biomass Support Particles、略称BSPs）に微生物菌体を固定化することによりエステル交換反応活性がきわめて高い微生物細胞酵素剤の生産に成功し<sup>5-8)</sup>、さらにこの酵素剤を液循環充填層式バイオリクターに適用<sup>9-11)</sup>することにより微量水分濃度制御が可能な新たな反応プロセスの開発に至った。

## 1. 2 既往の研究

### 1. 2. 1 エステル交換反応に関する既往の研究

リパーゼは、トリグリセリドを加水分解してグリセリンと脂肪酸にする酵素であり、triacylglycerol acylhydrolase, E.C. 3.1.1.3と命名されている。しかし最近、微量水分系においては、エステル合成やエステル転移を触媒することが明らかになってきた。このため、安価な油脂からカカオ代替脂を生産する油脂の酵素的エステル交換反応に関する研究が、数多く報告されている<sup>12-18)</sup>。

リパーゼによるエステル交換反応の特徴として、まず反応基質（油脂、脂肪酸）が水に難溶であることが挙げられる。しかしながら、リパーゼに限らず酵素の活性発現には、酵素がアクティブなコンフォメーション（3次元構造）を維持するために最低量の水の存在が不可欠であることが最近の研究により明らかになってきた<sup>19-21)</sup>。一方、水分が過剰に存在すると加水分解反応が促進され、副生成物のジグリセリドの生成が支配的となる。したがって、いかにして水に難溶の基質中で、酵素回りに適量の水分を保持させて反応させるかが重要な鍵となる。さらに、リパーゼによる酵素反応を工業的に効率よく実施するためには、リパーゼの触媒機能を最大限に発揮させ、酵素を有効利用できるようなバイオリアクターの開発が不可欠である。脂質類の酵素的変換を達成するためのバイオリアクターに関しては、最近活発な研究がなされており、山根<sup>22)</sup>の総説に紹介されているように、充填層型バイオリアクターや膜型バイオリアクターが報告されている。ここではバイオリアクターの構築を念頭に置いた、固定化リパーゼによるエステル転移反応の研究について紹介する。

Macrae<sup>1)</sup>は、Rhizopus niveus由来のリパーゼを珪藻土に固定化した充填層型バイオリアクターで、パーム油の中融点部とミリスリン酸を石油エーテルに溶解させた系でアシドリシスを行った。反応液の水分濃度を予め飽和濃度とすることにより、リパーゼは安定で、約600hの連続反応が可能であったと報告している。松本ら<sup>18)</sup>は、Alcaligenes起源のリパーゼをイオン交換樹脂に固定化した充填層型バイオリアクターを用い、パームオレインとステアリン酸の連続アシドリシス反応によるカカオ代替脂の生産を検討した。このプロセスの特徴は、酵素活性を維持するために系内の水分濃度を制御する代わりに、エタノールを添加する方法を開発したことであり、エステル交換率を一定に保つように流速を調整し、約360日の連続反応を実施している。Yamaneら<sup>23-25)</sup>は、Pseudomonas fluorescensのリパーゼおよび微孔性薄膜型バイオリアクターを用いて、グリセロリシス（油脂とグリセリンの反応）の連続反応を行った。この反応に関与する最も大きな因子はグリセリン中の水分であり、水分濃度の連続測定にはフローセル型の電気伝導度計が有効であることを示した。

乾燥菌体内リパーゼを用いた研究としては、太田ら<sup>4)</sup>がSaccharomyces lipolyticaと細菌の乾燥菌体によるオリーブ油とステアリン酸のアシドリシス反応を検討した。また、エステル転移反応ではないが、Bellら<sup>26)</sup>は、リパーゼを含有するRhizopus arrhizusの乾燥菌体がパルミチン酸とオクタノール、グリセリンとオレイン酸のエステル合成を触媒することを示した。Pattersonら<sup>27)</sup>は、同乾燥菌体を用いたグリセリンとオレイン酸のエステル合成反応およびセチルリノレートの合成反応をそれぞれ充填層型、攪拌槽型リアクターで実施し、単位菌体当りのエステル化率は充填層型リアクターの方が優れていることを報告した。さらにKnoxら<sup>28)</sup>は、同乾燥菌体を用いたセチルアルコールとオレイン酸からのセチルオレート、1-オクタノールとオレイン酸からオクチルオレートの合成を、乾燥菌体

を充填したリアクターと合成反応によって生成した水分を除去するためのモレキュラーシーブを充填したカラムより構成されるループリアクターシステムにより検討を行っている。

このように、エステル転移反応においては反応系内の水分濃度が重要なファクターであり、固定化酵素を用いた多くの研究においてもその影響が検討されている。しかしながら、これらは回分反応における初期水分量や充填層型リアクターに供給する原料液の水分濃度について検討しているに過ぎず、実際に反応の起きているリアクター内部の水分濃度の動的な影響については何ら検討がなされていない。

攪拌槽型連続反応器を用いて反応系内の水分濃度制御まで考慮した唯一の研究は、食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合によってなされている<sup>29)</sup>。これは、反応器に設置した $Al_2O_3$ 薄膜型露点温度センサーにより水分濃度を算出し、水分濃度が設定値をより高い場合は $N_2$ ガスの曝気により水分を除去し、逆に低い場合は水の添加によりオンオフ制御を行うものである。水分制御システムまで構築されている点は評価できるものの、

- ①粉末状固定化リパーゼを攪拌槽で用いているために、固液分離など  
実用化に向けては装置面での問題が多い、
- ②反応動特性や最適水分濃度など、最適操作条件に関する検討が  
なされていない、
- ③酵素失活による反応率の低下に対する制御システムが未検討である、  
など多くの課題が残されている。

以上のことから、固定化リパーゼを用いた微水系バイオリアクタープロセスにおける効率的生産制御システムに関する研究が待望されている。

## 1. 2. 2 バイオプロセスの計測・制御に関する既往の研究

微水系バイオリアクターによるエステル交換反応において、高いトリグリセリド生産性を達成するためには、既に述べたように反応速度の水分濃度依存性の検討をベースとした微量水分濃度制御が必要である。さらに連続反応プロセスでは反応が長期に亘るため、酵素失活に伴う動特性の変化を無視することができない。酵素活性の低下は、反応槽出口におけるトリグリセリドの組成変化をもたらすため、安定した生産を維持するには製品トリグリセリド濃度を指標とした定値制御システムの構築が不可欠である。

エステル交換反応プロセスにおける主要な状態量として、反応液の水分濃度ならびにグリセリド濃度が挙げられる。反応液の水分濃度測定は、既に石油化学工業の分野で工業的に用いられており実績もある、 $Al_2O_3$ 薄膜式露点温度センサーが利用可能である。測定原理として水分子の吸脱着によるインピーダンス変化を捉えているため、応答遅れや経年変化などの問題はあつたものの、観測信号は比較的精度のある連続データとして得られる。

一方、油脂のトリグリセリド組成分析には、一般に液体クロマトグラフィーが用いられる。クロマトグラフ分析は、同時に複数の物質の分離定量が可能なため、バイオプロセスにおける計測にも多く用いられるようになってきた。Monseurら<sup>30)</sup>は、乳酸発酵プロセスにおける基質濃度および乳酸濃度の監視のため、自動サンプリング装置、濾過機構を備えたHPLC（高速液体クロマトグラフ分析装置）システムの開発を行った。Favreら<sup>31)</sup>はK. marxianusの回分培養系におけるラクトース濃度のモニターのため、またRossら<sup>32)</sup>はEscherichia coliなどの腸内細菌発酵における炭水化物、アルコール、有機酸の定量を目的として、同じくオンラインHPLCシステムの開発を行った。また、Comberbachら<sup>33), 34)</sup>はSaccharomyces carlsbergensisによる連続エタノール発酵プロセスにおいて、発酵槽のへ

ッドガスのオンラインガスクロマトグラフ分析を行い、培養液のエタノール濃度を推定した。しかしながら、これらのクロマトグラフ分析においては、サンプルや分析機器側の温度などの条件変動により誤差が大きくなり、オフライン分析よりも精度、再現性が共に低下することが指摘されている。

このようなノイズに汚された観測データを、そのまま直接フィードバックさせた場合ノイズが増幅され、良好な制御性能が得られないことは明らかである。さらにクロマトグラフ分析では、試料の吸着分離に必要なリテンションタイムがそのまま観測要素における無駄時間遅れとなるため、フィードバック制御が一層困難なものとなる。さらに重要な問題として、本反応系における液体クロマトグラフィーによる分析では、油脂のトリグリセリド組成すなわち総トリグリセリド量に対する各構成トリグリセリドの比が得られるものの、本来制御指標とすべき対称型トリグリセリドSOSの絶対濃度を直接測定することができない。これらの問題を解決する方法の一つとして、

- ①フィードバック操作の低感度化による安定化、外乱に対する即応性を改善する方法としてのフィードフォワード／フィードバック制御系
  - ②観測データのノイズ除去や非観測変数を推定する方法として状態観測器やカルマンフィルタを用いた状態推定制御手法
- が提案されている。

### (1) フィードフォワード／フィードバック制御

化学反応や微生物反応プロセスにおける強い非線形性や外乱による制御性の低下に対して、従来より制御対象プロセスのダイナミックモデルを利用したフィードフォワード／フィードバック制御系の適用が図られている。これは、フィードフォワード制御系の特長である外乱に対する速応性や、

無駄時間に対するロバスト性をフィードバック制御系に取り入れたものである。この制御系では、フィードフォワード制御系の弱点であるプロセスモデルやモデルパラメータの同定誤差に伴う制御偏差を、フィードバック制御により補償することができる。

微生物培養プロセスへの具体的な適用例としては、Takamatsuら<sup>35)</sup>がパン酵母の半回分培養系を対象としてMRACS（モデル規範型適応制御系）およびPI調節計をフィードバックコントローラに用いたフィードフォワード／フィードバック制御系を適用し、外乱として菌体濃度初期値および基質濃度初期値に変動を与えた場合についてシミュレーションを実施し、菌体濃度および比増殖速度のプロフィール制御に有効であることを確認している。Mouら<sup>36)、37)</sup>は、Penicillium chrysogenum strain P-2による半回分ペニシリン発酵における初期の細胞増殖フェーズにおける増殖制御に炭素収支モデルに基づいたフィードフォワード／フィードバック制御系を適用し、希望のパターンに増殖制御できることを実験により確認した。Perezら<sup>38)</sup>は、K. marxianusの連続培養によるpolygalacturonasesの生産プロセスにおいて、polygalacturonasesと相関のある排ガス中の二酸化炭素濃度の定値制御にフィードフォワード／フィードバック制御系を適用した。Corderら<sup>39)</sup>は、活性汚泥処理プラントの溶存酸素濃度制御に、ラプラス領域伝達関数モデルに基づいたフィードフォワード／フィードバック制御系を構成し、外乱としての流入汚泥のBOD変化に対して操作量の空気流量が従来のフィードバック制御系に比較して20%も減少したことを報告した。また、Cardelloら<sup>40)</sup>は、回分培養反応系における溶存酸素濃度の定値制御系を対象に、フィードフォワード／フィードバック制御系を構成し、固定ゲインのPID制御系に対し制御の応答性が改善されることをシミュレーションにより示した。

多変数系へ拡張した例としては、Smithら<sup>41)</sup>がCatharanthus roseusの

植物細胞の回分培養プロセスにおける溶存酸素、二酸化炭素濃度の同時制御のために、増殖反応、物質移動および溶存ガスセンサの動特性モデルに基づいたフィードフォワード制御系を構成し、実験による検証を行っている。以上のように、フィードフォワード／フィードバック制御系は、フィードバックコントローラとしていかなるコントローラを用いるかで違いがあるものの、プラント制御のための有効な手法の一つであるといえる。これらのことから本研究では、SOS基準トリグリセリド組成の定値制御にフィードフォワード／フィードバック制御系を適用し、外乱やモデルの不確定性に対する制御性に関して検討を行った。

## (2) 状態推定制御

バイオプロセスを対象として、直接測定の不可能な状態量をオンライン推定する研究はWangら<sup>42)</sup>・<sup>43)</sup>によって始められた。彼らはイースト培養プロセスにおいて、化学量論的手法ならびに $O_2$ 、 $CO_2$ の排ガス分析値から菌体濃度、比増殖速度を推定する方法を開発した。この化学量論関係を基礎とした推定方法は、Zabriskieら<sup>44)</sup>やErickson<sup>45)</sup>により受け継がれ改良されると共に、酵母培養系のみならずペニシリン生産プロセス<sup>36)</sup>・<sup>46)</sup>やグルコン酸生産プロセス<sup>47)</sup>へ応用され、それぞれ基質、菌体、生産物の各濃度の推定に用いられた。

対象プロセスのダイナミックモデルをさらに積極的に状態推定に利用するものとしては、現代制御理論の範疇にある状態観測器（オブザーバ）に代表される。Takamatsuら<sup>48)</sup>は酵母培養系における菌体濃度、基質濃度の推定に状態観測器を適用し、また村上ら<sup>49)</sup>も連続培養系へ状態観測器の適用を検討した。

以上に述べた推定方法では、いずれの場合もシステムに存在する種々の不確定性を考慮していないので、測定データがノイズに汚されていたり、システムにノイズが加わった場合、正確な状態推定ができないという欠点を有している。これに対し、システムの状態方程式（モデル）、システムや観測値に加わるノイズの性質、状態量の初期推定値などの先験的情報をもとに、観測値をオンライン的に与えることにより、ノイズを排除して状態量を逐次的に推定するオンラインデータ処理アルゴリズムとしてカルマンフィルタが提案されている。拡張カルマンフィルタは、線形システムに対して理論展開されたカルマンフィルタを非線形系に拡張したフィルタであり、信頼性の高いセンサーが少ない微生物反応プロセスや重合反応プロセスにおいては、カルマンフィルタ理論の適用が活発に検討されている。

Stephanopoulosら<sup>50-53)</sup>は、微生物反応に関与するC、H、N、O、の各元素のマクロバランスに基づいた増殖モデルを提案し、排ガス中のCO<sub>2</sub>、O<sub>2</sub>分析値、溶存CO<sub>2</sub>、O<sub>2</sub>値やpH値から、菌体収率や増殖速度などの主要パラメータや、状態変数の推定機構について一連の検討を行った。またShiら<sup>54)</sup>は、同じく元素バランス法に基づいた拡張カルマンフィルタを、*S. cerevisiae*および*S. ambofaciens*の半回分培養系に適用し、菌体濃度の状態推定を行った。代謝経路の異なる二種類の酵母に適用できたことから、拡張カルマンフィルタの有効性を実験的にも確認できたと報告している。またLiao<sup>55)</sup>は、未同定物質の存在下でも状態を良好に推定し、かつ測定誤差に対する感度を低減化させる特異値分解を併用した拡張カルマンフィルタを提案し、アミノ酸発酵とパン酵母培養系への適用を検討した。

微生物の増殖をオーバーオールに捉えたモデルをベースとしたフィルタ理論の適用例としては、Nahlikら<sup>56)</sup>がエタノールを増殖制限基質とした*S. cerevisiae*の増殖反応に、Shioyaら<sup>57-59)</sup>は同じく*S. cerevisiae*の半回

分培養プロセスに、Schlasnerら<sup>60)</sup>はStreptomyces C5の半回分培養プロセスにそれぞれ拡張カルマンフィルタを適用し、微生物濃度や基質濃度などの状態推定やモデルパラメータの推定を行った。また、Staniskisら<sup>61)</sup>はS. cerevisiaeによるエタノール連続発酵プロセスに、Montagueら<sup>62)</sup>は半回分ペニシリン発酵プロセスに適用した。遠藤<sup>63)</sup>は、酒精酵母の回分培養系へカルマンフィルタを適用し、培養プロセスの総合監視システムを提案した。Ponsら<sup>64)</sup>は拡張カルマンフィルタと適応観測器をS. cerevisiaeの回分、半回分培養系へ適用し、古くからオンライン計測されてきた二酸化炭素生成量、酸素、アンモニア消費量の観測値から、菌体濃度、グルコース濃度、エタノール濃度を推定し、両者の性能に関して比較検討を行った。またChattawayら<sup>65)</sup>は、遺伝子組み換え菌の連続培養反応におけるプラスミドの安定性のオンライン推定に、線形カルマンフィルタを適用した。

一方、酵素反応系への適用としては、Caminalら<sup>66)</sup>がセルラーゼによるセルロースの加水分解反応を対象にカルマンフィルタを適用し、連続反応実験データからセルラーゼの熱失活のモデル同定を行った。

このように状態観測器や拡張カルマンフィルタなどの状態推定手法は、バイオプロセスに対して数多く適用され、状態推定やノイズ除去に効果的に用いられてきた。本研究では、液体クロマトグラフ分析装置による油脂のトリグリセリド組成の観測データから、本来制御指標とすべき対称型トリグリセリドSOSの絶対濃度推定に拡張カルマンフィルタを適用した。さらにカルマンフィルタによる推定値をフィードバックする状態推定制御系を構成し、その制御性に関してシミュレーションによる検討を行った。

### 1. 3 本研究の目的と内容

本研究の目的は、固定化微生物由来のリパーゼを用いた微水系バイオリアクターにより油脂をエステル交換反応させ、製品としてのトリグリセリドSOSを生産する際に、プラント操作の観点から加水分解反応によるジグリセリド等の副生を抑制し、効率的にエステル交換反応を進めるための最適な反応制御システムを開発することである。以下に本論文の各章ごとの概要を示す。

第2章では、制御システムの設計、評価に必要な微水系エステル交換反応の数学モデルについて検討を行う。微生物由来リパーゼを用いた油脂のエステル交換反応におけるグリセリド組成の動的挙動を比較的良好に表現するモデルとして、既にグリセリド酵素複合体モデルが提案されている<sup>67)</sup>。しかし、反応液の水分濃度は一定という仮定がなされており、水分濃度の動的挙動については表現できないモデルとなっている。このため、新たに水分についての物質収支を考慮し、反応速度定数や酵素失活速度定数に大きな影響を及ぼす微量水分濃度のダイナミクスまで表現することができるように導いた、改良グリセリド酵素複合体モデルについて説明する。

第3章では、連続エステル交換反応の水分濃度、トリグリセリド組成同時制御系について検討を行う。まず改良グリセリド酵素複合体モデルをベースに、基質の流入、流出およびリパーゼの失活を考慮した連続反応モデルを導く。得られたモデルに基づき、グリセリド生成量と反応液水分濃度との関係から、SOS生成量を最大とする最適水分濃度について検討した結果を示す。そして、水分濃度、トリグリセリド組成の同時フィードバック制御系を構築し、その制御性に関してシミュレーションおよび実験の両者

から得られた結果を示す。

第4章では、トリグリセリド組成の定値制御のためのオンライン酵素活性推定機構を有したフィードフォワード／フィードバック制御系について述べる。これは、液体クロマトグラフ分析装置の観測データに含まれるノイズに対して、フィードフォワード要素を加味することによりフィードバック要素の低感度化を図り、安定性および制御性の向上を目指すものである。フィードフォワード制御系が効果的に機能するためには、モデル構造やパラメータが精度良く与えられている必要がある。そのため、オンライン酵素活性推定機構として、モデルパラメータの中で最も感度の高い酵素活性初期値を、回分操作時のトリグリセリド組成の観測値に基づき逐次反復推定する機構について検討した。このオンライン酵素活性推定機構を有したフィードフォワード／フィードバック制御系を連続エステル交換反応のスタートアップ操作および外乱としての原料基質濃度変動に適用し、その制御性に関してシミュレーションおよび実験の両者により検討した結果を示す。

第5章では、最終的な制御目的であるが直接測定できない、トリグリセリドSOSの絶対濃度を制御対象とした制御手法に関して検討を行う。連続エステル交換反応プロセスのオンライン測定に用いたHPLC（高速液体クロマトグラフ分析装置）で分析されるデータは、トリグリセリド組成すなわち総トリグリセリド量に対する各構成トリグリセリドの比であり、本来制御指標とすべき対称型トリグリセリドSOSの絶対濃度を直接求めることができない。そのため、状態推定手法として用いられているカルマンフィルタをSOSの濃度推定に適用した状態推定制御系を構築し、その制御性に関してシミュレーションにより検討した結果を示す。

## 第2章 微量水分濃度の動的変化を考慮した回分式 油脂エステル交換反応プロセスのモデル化

### 2. 1 緒言

油脂のエステル交換反応における酵素反応は、既に述べたように一般的に *n*-ヘキサンなどの有機溶媒系で実施されるが、加水分解反応とエステル化反応の競合反応であることから、有機溶媒中の微量な水分濃度の差異が反応速度や製品収率に大きな影響を与えることが知られている<sup>23-25), 68), 69)</sup>。反応液中の水分濃度が高くなりすぎると加水分解反応が促進され、副生成物のジグリセリドや脂肪酸の生成が支配的となる。また逆に、水分濃度が低すぎると酵素のエステル交換活性が十分に発現せず、製品となるトリグリセリドの生産性が低下する。そのため、ジグリセリドの生成を抑制しつつ、トリグリセリドの生産性を最大にする最適な水分濃度に制御するといった反応制御の観点からその制御システムの確立の重要性が指摘されている<sup>70)</sup>。

一方、リパーゼを用いた油脂のエステル交換反応を表すモデルとして、一次反応モデルや逐次反応モデルなど幾つかのモデルが提案されているが、最近新たにグリセリド酵素複合体モデルが報告されている<sup>67)</sup>。これは、反応に際してグリセリドと酵素が複合体を形成し、反応中間体として働くものと仮定したモデルであり、反応基質の動的挙動が他のモデルに比較して精度良く表現することができる。しかしながら、反応液の水分濃度は従来のモデルと同様に一定と仮定しているため、この濃度の反応への動的影響については表現できないモデルである。

微水系バイオリアクターでは反応液の水分濃度が反応速度や反応組成に与える影響が大きく、動特性の解析や制御系の設計・評価には動的に水分濃度も表現できる数式モデルの開発が重要である。本章では、水分濃度を

加味した改良グリセリド酵素複合体モデルを提案し、反応基質のみならず水分濃度の挙動についても検討を行った。

## 2. 2 数式モデル

図2-1に対象とする回分系バイオリアクタープロセスの概略図を示す。反応槽は攪拌槽型反応槽で、中に微生物保持粒子（6mm角ポリウレタンフォーム）に固定化された乾燥菌体*Rhizopus chinensis*が封入されている。*R. chinensis*は、グリセリドの1、3位特異性を有するリパーゼ生産菌で

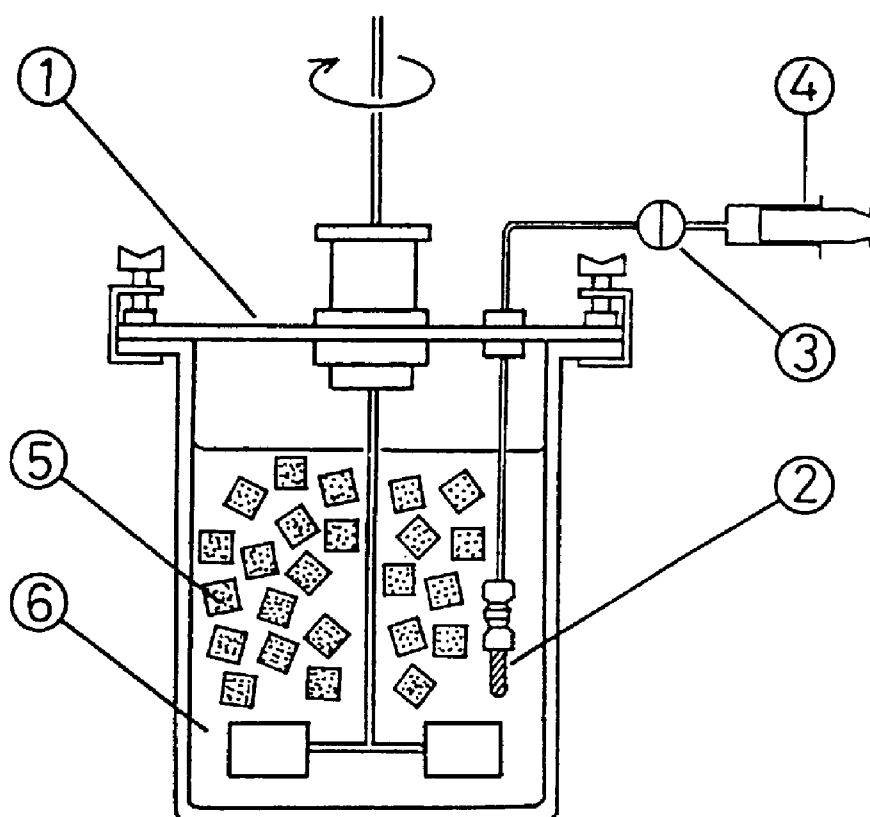


図2-1 回分反応実験装置フロー図  
(1)反応槽(2)焼結金属性フィルター(3)バルブ  
(4)シリンジ(5)微生物保持粒子(6)反応液

ある。本反応プロセスでは、原料オリーブ油の1、3位のオレイン酸基をリパーゼにより特異的にエステル交換し、製品としてSOS（アシル残基の1、3位にステアリン酸基、2位にオレイン酸基の結合した対称型トリグリセリド）の生産を目的とするものである。リパーゼを生体触媒とした油脂のエステル交換反応はこの槽内で進行する。

図2-1に示した反応槽で起こるエステル交換反応は固液二相系での反応となるので、液相（反応液）と固相（微生物保持粒子）の両者についてそれぞれ物質収支式を求めた。

### 2. 2. 1 反応基質に関する物質収支式

エステル交換反応に関与する基質として、トリグリセリド（000,P00,P0P,S00,S0P,S0S）、ジグリセリド（00X,P0X,S0X）、脂肪酸（0A,PA,SA）の計12種類の反応基質を想定した。ただし、0はオレイン酸基、Pはパルミチン酸基、Sはステアリン酸基を、XはOH基を示すものとする。液相における物質収支は、液相内蓄積量が固相への物質移動量に等しいので、次式で表現できる。

$$\frac{d C_b}{d t} = -K (C_b - C_s) \quad (2-1)$$

ただし、物質移動係数を $k$ 、有効接触面積を $A$ 、反応器容量を $V$ とすれば $K = k A / V$ である。

固相における物質収支は、固相内蓄積量が液相からの物質移動量と反応による生成量の和となることから、次式で表現できる。

$$\frac{d C_s}{d t} = -V_R K (C_s - C_b) + R_v \quad (2-2)$$

ただし、 $V_R$  は微生物保持粒子量の反応液量に対する容量比 ( $=V/V_b$ ) である。また (2-1)、(2-2) 式において、 $C_b$ 、 $C_s$ 、 $K$ 、 $R_v$  はそれぞれ以下に示す 12 種類の液側基質濃度ベクトル、微生物保持粒子内基質濃度ベクトル、総括物質移動係数マトリックスおよび反応速度ベクトルを表す。

$$C_b = \begin{bmatrix} C_{b, OOO} \\ C_{b, POP} \\ C_{b, SOS} \\ C_{b, POO} \\ C_{b, SOO} \\ C_{b, SOP} \\ C_{b, OA} \\ C_{b, PA} \\ C_{b, SA} \\ C_{b, OOX} \\ C_{b, POX} \\ C_{b, SOX} \end{bmatrix}, \quad C_s = \begin{bmatrix} C_{s, OOO} \\ C_{s, POP} \\ C_{s, SOS} \\ C_{s, POO} \\ C_{s, SOO} \\ C_{s, SOP} \\ C_{s, OA} \\ C_{s, PA} \\ C_{s, SA} \\ C_{s, OOX} \\ C_{s, POX} \\ C_{s, SOX} \end{bmatrix}, \quad K = \begin{bmatrix} K_t \\ K_t \\ K_t \\ K_t \\ K_t \\ K_t \\ K_z \\ K_z \\ K_z \\ K_d \\ K_d \\ K_d \end{bmatrix}, \quad R_v = \begin{bmatrix} \Gamma_{OOO} \\ \Gamma_{POP} \\ \Gamma_{SOS} \\ \Gamma_{POO} \\ \Gamma_{SOO} \\ \Gamma_{SOP} \\ \Gamma_{OA} \\ \Gamma_{PA} \\ \Gamma_{SA} \\ \Gamma_{OOX} \\ \Gamma_{POX} \\ \Gamma_{SOX} \end{bmatrix} \quad (2-3)$$

ここで  $R_v$  の要素は、Kyotani ら<sup>67)</sup> の提案しているグリセリド酵素複合体モデルにおける各基質の反応速度式であり、微生物保持粒子内基質濃度  $C_s$  および酵素濃度  $C_e$  の関数として表されている。なお、反応機構ならびに反応速度式の詳細は Appendix-1 に示した通りである。

## 2. 2. 2 水に関する物質収支式

液相における水の物質収支は、液相内蓄積量が固相への物質移動量に等しく、水の総括物質移動係数  $K_w (= k_w A / V)$  を導入すれば次式で表現できる。

$$\frac{d C_{b, w}}{d t} = - K_w (C_{b, w} - C_{w, w}) \quad (2-4)$$

固相における物質収支は、固相内蓄積量が液相からの物質移動量と反応による生成量との和に等しく、 $K_w$  および  $V_R$  を用いれば次式で表現できる。

$$\frac{d C_{s, w}}{d t} = V_R K_w (C_{b, w} - C_{w, w}) + r_w \quad (2-5)$$

(2-4) 式の右辺および (2-5) 式の右辺第 1 項は水分の物質移動項である。(2-1)、(2-2) 式の場合とは異なり、固相水分濃度と液相水分濃度との差をそのまま推進力とするのではなく、固相水分濃度と平衡な水分濃度  $C_{w, w}$  と液相水分濃度との差を推進力とする<sup>67)</sup>。固相水分濃度を  $C_{s, w_s}$  [g-H<sub>2</sub>O/g-dry cell] と表すと、 $C_{s, w_s}$  と平衡水分濃度  $C_{w, w}$  との水の吸着平衡関係は、次式の B E T 式により表される。

$$C_{s, w_s} = \frac{V_m C_1 X}{(1 - X) (1 - X + C_1 X)} \quad (2-6)$$

$$X = \frac{C_{w, w}}{C_{s, s t}} \quad (2-7)$$

ここで  $C_{s,i}$  は水の飽和溶解度、 $V_m$ 、 $C_1$  は B E T 式のパラメータであり、本反応系では各々  $C_{s,i} = 3.139 \times 10^{-5} \text{ mol/cm}^3$ 、 $V_m = 0.3702 \text{ g-H}_2\text{O/g-dry cell}$ 、 $C_1 = 2.447$  である<sup>9)</sup>。なお、 $C_{s,wg}$  から  $C_{s,w} [\text{mol/cm}^3]$  への換算は、乾燥菌体の平均密度がおよそ  $1.0 \text{ g/cm}^3$ 、また水の分子量が  $18.0$  であることを考慮して、次式によりなされる。

$$C_{s,w} = 18.0 \times C_{s,wg} \quad (2-8)$$

## 2. 3 実験方法

### 2. 3. 1 実験方法

#### (1) 原料

オリーブ油、ステアリン酸メチル、および溶媒としてのn-ヘキサン(いずれも和光純薬工業(株)製)を重量比で1:2:3となるように調製し、原料液とした。原料液組成を表2-1に示す。

#### (2) 反応方法

リパーゼ生産菌*R. chinensis*の固定化された微生物保持粒子40gを図2-1に示す反応槽(容量 $8.0 \times 10^3 \text{ cm}^3$ )に封入し、原料液 $7.5 \times 10^3 \text{ cm}^3$ を供給、反応温度40℃、攪拌速度200rpmで回分反応を行った。微生物保持粒子中の固定化菌体量は16.2gであり、またその酵素比活性は0.471U/gであった。反応液のサンプリングには菌体の混入を防ぐため、孔径2 $\mu\text{m}$ の焼結金属製フィルターを使用した。原料液の初期水分濃度は、123ppmおよび340ppmの2水準とした。

#### (3) 分析方法

反応液のトリグリセリド組成は、検出器として示差屈折計(昭和電工(株)製 Shodex Model SE-11)を装着した液体クロマトグラフ分析装置(日立製作所製MODEL 638-50)により分析した。カラムとしてLichrospher 100 RP-10(Merck社製)を用い、移動相溶媒としてはアセトニトリル/クロロホルム混合液(7/3 v/v)を $1.5 \text{ cm}^3/\text{min}$ で流した。カラム温度は恒温槽に

より30℃に保った。

全脂質中のトリグリセリド、ジグリセリド、脂肪酸の組成比（油脂組成）は、検出器として示差屈折計（昭和電工(株)製 Shodex Model SE-11）を装着したゲルパーミュエーションクロマトグラフ分析装置（島津製作所製 LC-3A）に、GPCカラムHSG-15を2本、HSG-20を2本（共に島津製作所製）直列に接続して分析した。移動相溶媒としてはテトラヒドロフランを用い、1.0cm<sup>3</sup>/minで流した。カラム温度は30℃とした。

反応液の遊離脂肪酸組成は、検出器として水素炎イオン化検出器を装着したガスクロマトグラフ分析装置（島津製作所製 GC-7A）により分析した。カラムとしては、3mmガラスカラムにUnisole3000（ガスクロ工業(株)製）を充填したものをを用いた。またインジェクション温度、カラム温度はそれぞれ270℃および210℃に保った。

また、反応液および微生物保持粒子内の水分濃度は、電量適定方式のカールフッシャー水分計（京都電子工業(株)製 MKC-210）により測定した。

表 2 - 1 原料液組成

反応基質	液相	固相	
トリグリセリド			
OOO	$6.288 \times 10^{-5}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
POP	$2.846 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
SOS	$5.230 \times 10^{-7}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
P00	$2.596 \times 10^{-5}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
S00	$8.195 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
SOP	$1.506 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
脂肪酸			
OA	$7.280 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
PA	$1.407 \times 10^{-5}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
SA	$7.967 \times 10^{-4}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
ジグリセリド			
OOX	$6.821 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
POX	$1.414 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
SOX	$4.580 \times 10^{-7}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
酵素	—————	$1.015 \times 10^{-3}$	U/cm <sup>3</sup>
水			
ケース 1	$4.959 \times 10^{-6}$	$3.333 \times 10^{-3}$	mol/cm <sup>3</sup>
ケース 2	$1.381 \times 10^{-5}$	$8.472 \times 10^{-3}$	mol/cm <sup>3</sup>

## 2. 3. 2 各種パラメータの決定

水分に関する物質収支を加味したことにより、(2-4)、(2-5)式中の水に関する総括物質移動係数 $K_w$ が新たなパラメータとして増加し、前記モデル中には反応速度定数 $k_1 \sim k_6$ を含め7つのパラメータが含まれる。これらのパラメータの値を決定するため、先行文献<sup>9)</sup>における回分反応実験データに基づきパラメータ同定を行った。すなわち、各トリグリセリドの組成比、各脂肪酸の組成比、全油脂中のトリグリセリド、ジグリセリド、脂肪酸に対する比(油脂組成)に着目し、各々の水分濃度ごとに時系列実験データと計算値との誤差の二乗和が最小となるように、 $k_1 \sim k_6$ および $K_w$ の値を推定した。パラメータの詳細な推定手順に関してはAppendix-2に示した通りである。なお、 $K_1$ 、 $K_2$ 、 $K_4$ についてはKyotaniら<sup>9)</sup>の値を用いた。

図2-2~7に得られたパラメータと水分濃度との関係を、先行文献<sup>9)</sup>の結果と共に示す。ただし横軸については、(2-6)、(2-7)式の水分子吸着平衡関係式を用いて反応液と平衡な固相水分濃度に変換した。水分に関する物質収支を加味したことにより、図2-2~7に見られるように $k_1$ 、 $k_2$ 、 $k_4$ は低水分濃度で値が大きくなり、 $k_3$ は逆に小さくなる傾向となった。

各反応速度定数の水分濃度依存性を、最小二乗法により直線近似した結果を図中の実線および表2-2に示す。ただし、 $k_5$ および $k_6$ については直線近似では誤差が大きくなったので、範囲を分割し2本の直線により近似した。また、水に関する総括物質移動係数は $K_w = 0.02575 \text{min}^{-1}$ が得られた。

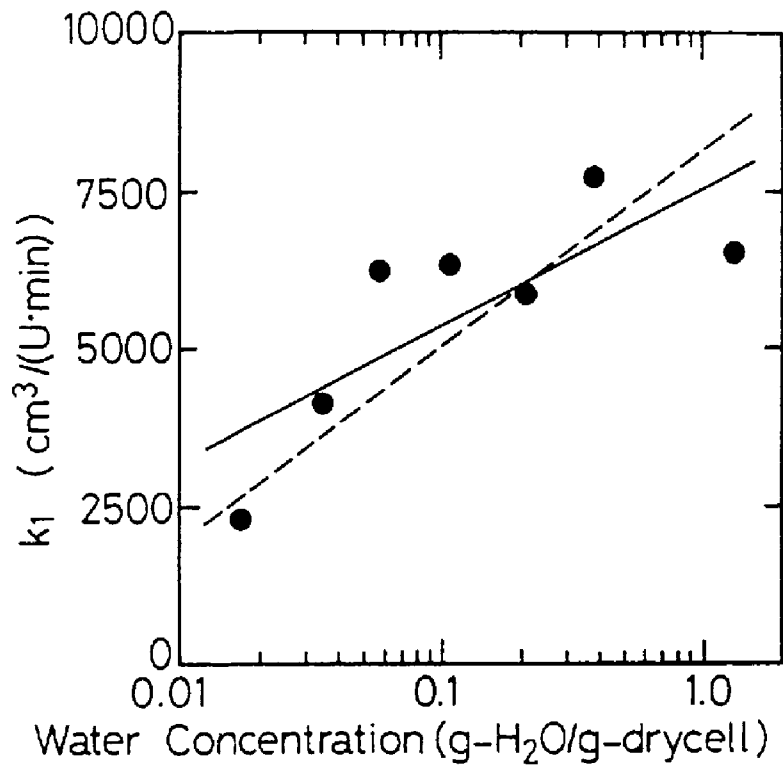


図 2 - 2 反応速度定数  $k_1$  の水分濃度依存性  
 —— : 水の物質移動を考慮した場合  
 ---- : 水の物質移動を無視した場合<sup>9)</sup>

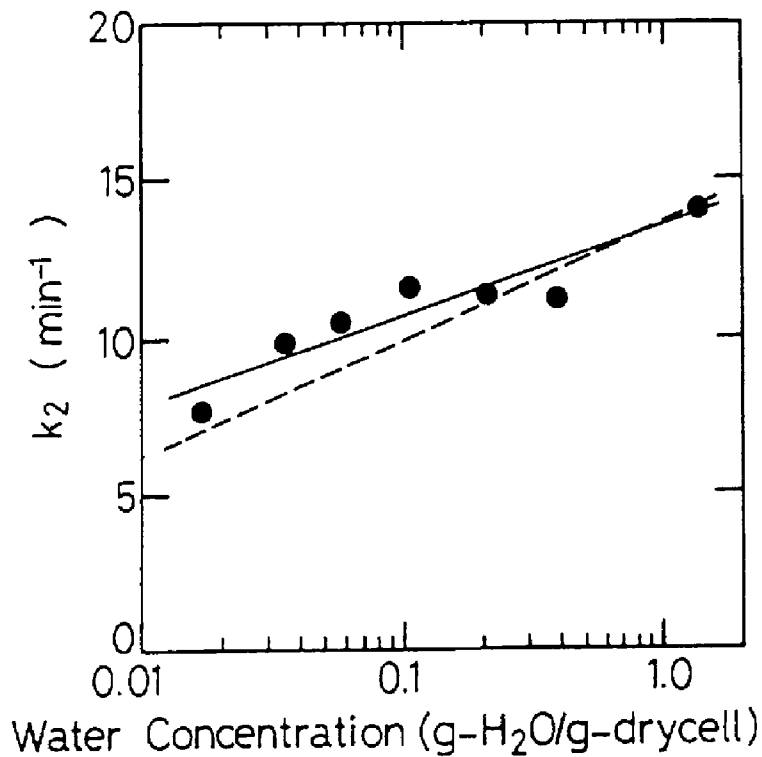


図 2 - 3 反応速度定数  $k_2$  の水分濃度依存性  
 記号は図 2 - 2 と同じ。

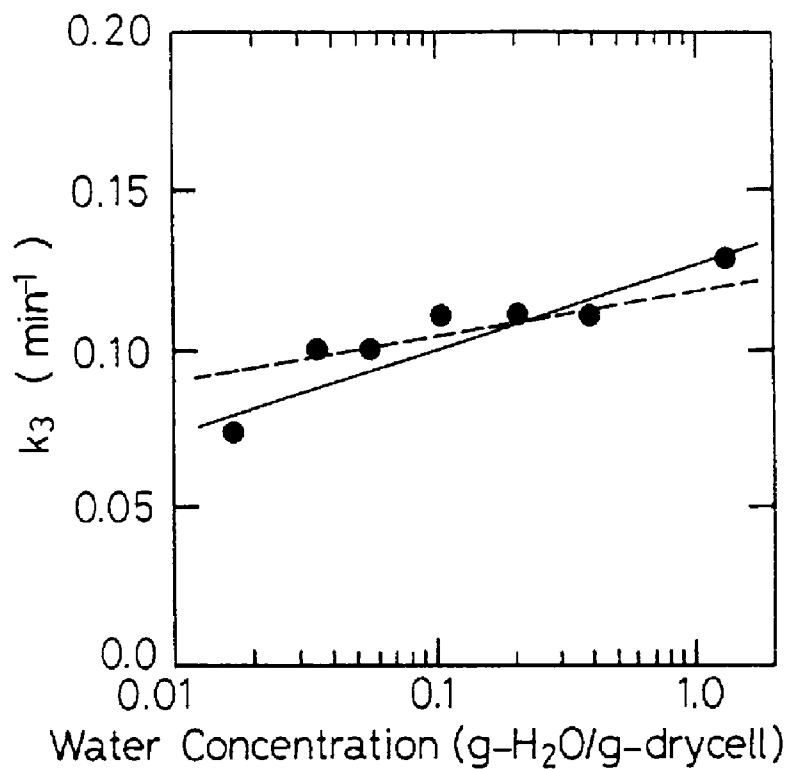


図 2 - 4 反応速度定数  $k_3$  の水分濃度依存性  
記号は図 2 - 2 と同じ。

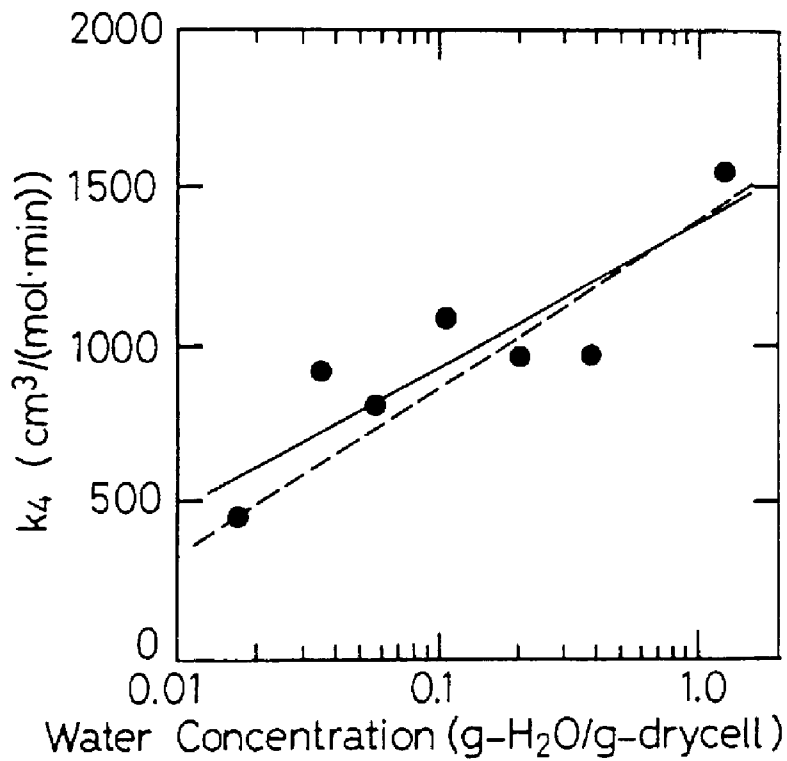


図 2 - 5 反応速度定数  $k_4$  の水分濃度依存性  
記号は図 2 - 2 と同じ。

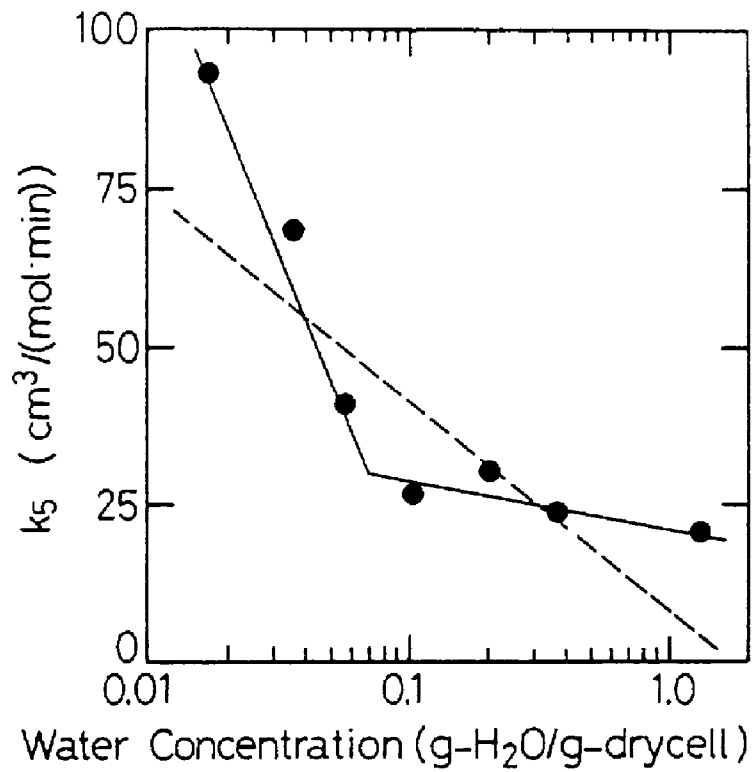


図 2 - 6 反応速度定数  $k_5$  の水分濃度依存性  
記号は図 2 - 2 と同じ。

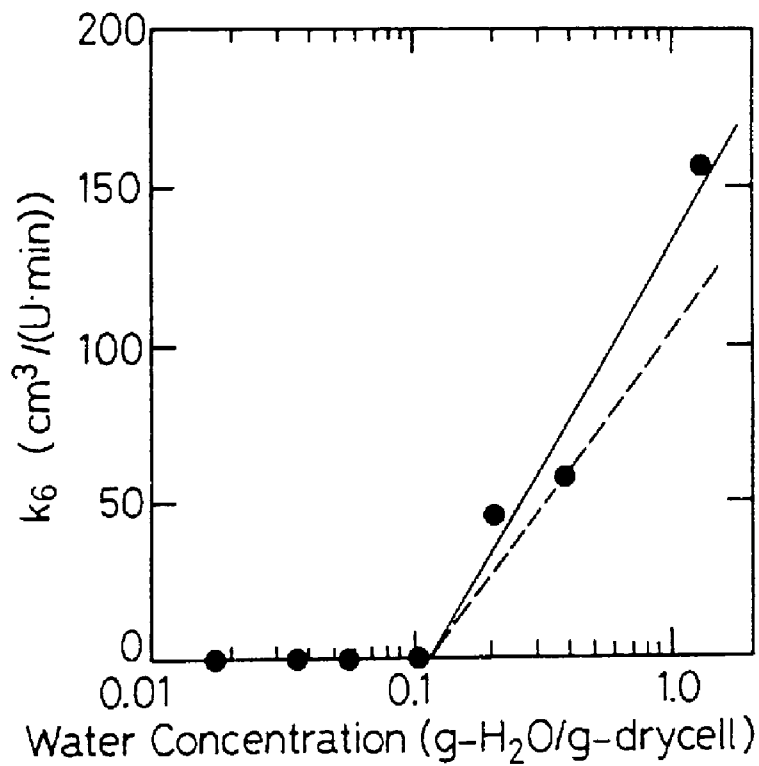


図 2 - 7 反応速度定数  $k_6$  の水分濃度依存性  
記号は図 2 - 2 と同じ。

表 2 - 2 パラメータ推定結果

---

反応速度定数

$$k_1 = 2187 \quad * \text{Log}(C_{s, w_g}) + 7587$$

$$k_2 = 2.804 \quad * \text{Log}(C_{s, w_g}) + 13.50$$

$$k_3 = 0.02370 \quad * \text{Log}(C_{s, w_g}) + 0.1275$$

$$k_4 = 450.8 \quad * \text{Log}(C_{s, w_g}) + 1381$$

$$k_5 = -100.0 \quad * \text{Log}(C_{s, w_g}) - 83.50$$

$$(0 < C_{s, w_g} < 0.079)$$

$$k_5 = -6.465 \quad * \text{Log}(C_{s, w_g}) + 20.01$$

$$(C_{s, w_g} \geq 0.079)$$

$$k_6 = 140.6 \quad * \text{Log}(C_{s, w_g}) + 133.9$$

$$(k_6 \geq 0)$$

総括物質移動係数

$$K_w = 0.02575 \text{min}^{-1}$$


---

### 2. 3. 3 回分実験とシミュレーション結果

初期水分濃度を123ppmとした回分反応実験における反応基質組成の経時変化をシミュレーション結果とともに図2-8に示す。縦軸は、トリグリセリドについては各トリグリセリドのトリグリセリド合計に対する比、脂肪酸については各脂肪酸の脂肪酸合計に対する比を示し、総トリグリセリ

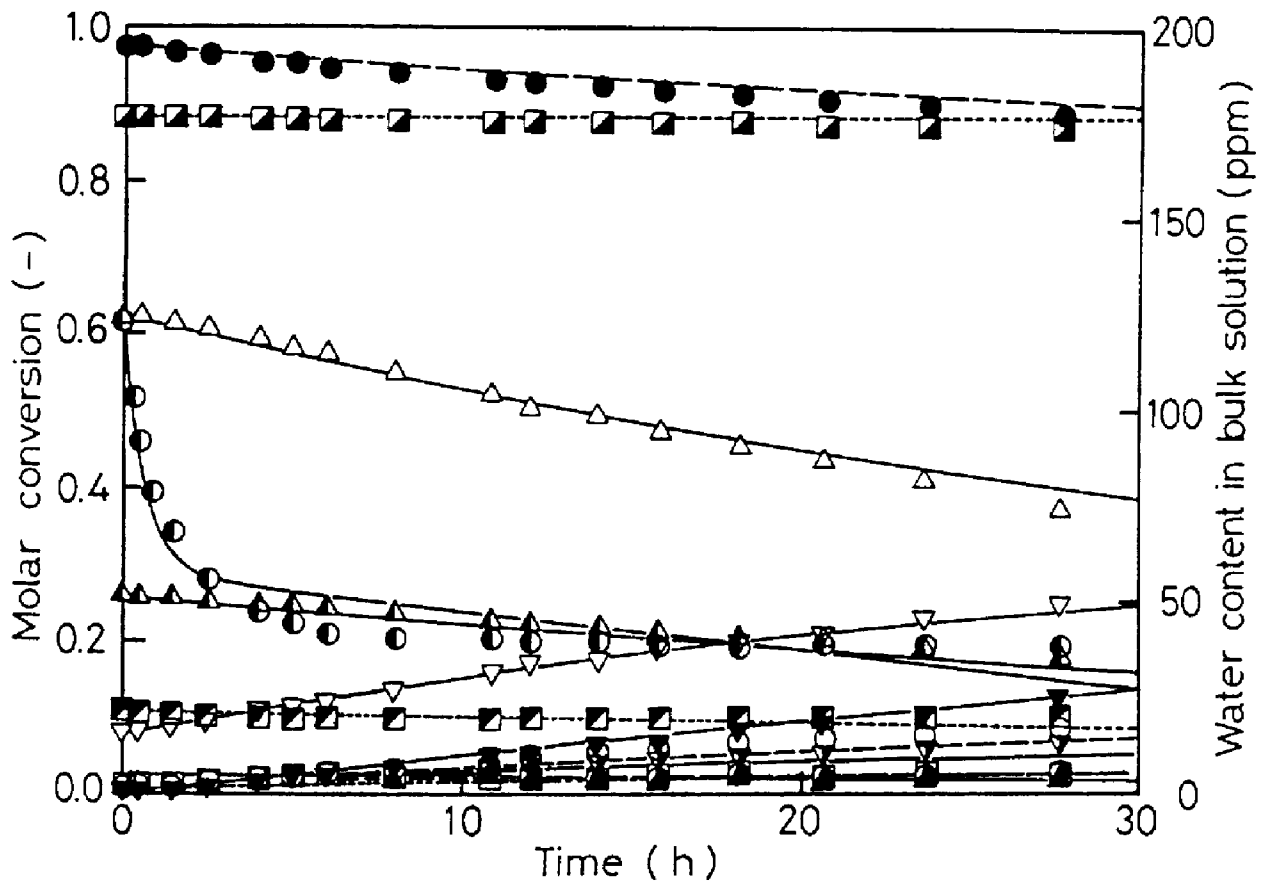


図2-8 回分反応実験におけるトリグリセリド組成および水分濃度の経時変化（初発水分濃度を123ppmとした場合）

△:000 ▲:P00 ▲:POP ▽:S00 ▽:S0P ▽:S0S  
 ○:OA ●:PA ●:SA ■:TG □:DG ▣:FA ●:水分濃度  
 ———, - - - - , ······ :計算結果

ド、総脂肪酸、総ジグリセリドは、それぞれのトリグリセリド、脂肪酸、ジグリセリドの総和（全油脂）に対する比を示す。

この図からも分るように、トリグリセリド、脂肪酸、油脂各組成の経時変化はシミュレーション結果と実験結果とがいずれも良好に一致している。一方、反応液の水分濃度に関しては反応開始直後、すなわち約3hまでの急激な濃度低下の現象は良好にとらえられている。また、3~18hでは実験値の方がやや高めになり、その後は逆に低く推移するが、ほぼ良好な結果といえる。また、初期水分濃度を340ppmとした場合の結果を図2-9に示す。

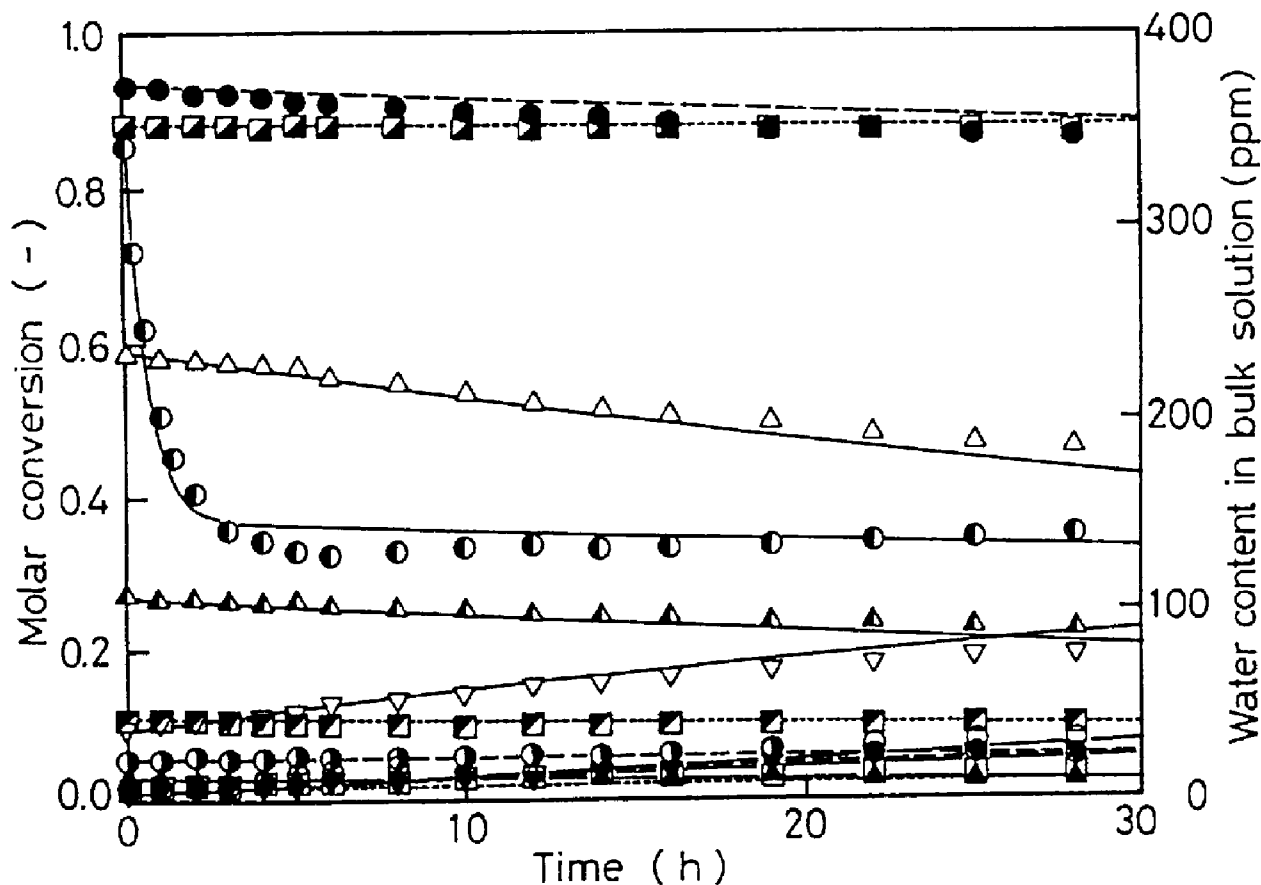


図2-9 回分反応実験におけるトリグリセリド組成および水分濃度の経時変化（初発水分濃度を340ppmとした場合）  
記号は図2-8と同じ。

ケース1と比較すればトリグリセリド、脂肪酸、油脂各組成に関してのみならず、水分濃度の挙動についても反応全般にわたり過渡状態がケース1に比べより良好に表現されている。

図2-7に示した $k_6$ の水分濃度依存性から明らかなように、水分濃度が高い場合 $k_6$ は正の値をとるため加水分解反応と逆反応に関して平衡が成り立つが、水分濃度が低い場合 $k_6$ は常に0となり、加水分解反応が一方的に進行する。したがって水分濃度の低いケース1では、水分濃度が反応平衡に達せず、徐々に低下するというシミュレーション結果になったと考えられる。しかしながら全般的には、これまで考慮されたことのなかった反応液の水分濃度に関して、反応開始直後から反応平衡に達するまでのppmレベルでの極微量の水分濃度変化を良好に表現できるモデルと考えられる。本モデルは水分濃度の微量変化のみならず水分濃度依存性の大きいトリグリセリド、脂肪酸、油脂各組成の動的挙動をも良好に表現できるので、反応器の解析、設計などにも有用なモデルであると思われる。この数式モデルをベースとして、製品トリグリセリド組成に着目した反応液組成制御系の開発および最適操作条件の探索が必要である。

## 2. 4 結論

固定化微生物由来リパーゼを生体触媒とした油脂のエステル交換反応プロセスにおいて、とくに反応系内の微量水分濃度変化を表現できる数式モデルの開発を目的とし、回分反応系を対象として検討を行った。Kyotaniら<sup>67)</sup>が提案したグリセリド酵素複合体モデルを改良し、新たに水分に関する物質収支を加味した数式モデルを導いた。モデルの未知パラメータとしての反応速度定数 $k_1 \sim k_6$ および水に関する総括物質移動係数 $K_w$ の7つのパラメータを決定するため、回分反応実験データに基づきパラメータフィッティングを行った結果、 $k_1 \sim k_6$ は微生物保持粒子内水分濃度の線形関数として近似できることが分った。さらに、得られた数式モデルは反応基質としてのトリグリセリド、脂肪酸、油脂各組成のみならず、微水系バイオリアクターにおいて最も重要な状態量といえる反応液中の水分濃度のppmレベルでの微量変化をも良好に表現することがシミュレーションおよび実験の両者により確められた。

## 第3章 連続エステル交換反応の水分濃度・トリグリセリド組成 同時制御

### 3. 1 緒言

リパーゼを用いた微水反応系での油脂エステル交換反応の反応動力学の解明を目的として、前章では回分反応系を対象に、グリセリドなどの反応基質のみならず微水系バイオリアクターにおいて重要な状態量である水分濃度の動的挙動まで良好に表現できる改良グリセリド酵素複合体モデルを開発した。しかしながら、工業生産面から考えると、連続式反応システムを応用する方が効率的に優れている。本章では、この回分反応系で検討した数式モデルを基に、原料供給および酵素失活を加味した連続反応モデルを導出した。さらに、この制御対象に対してオンオフ調節計を用いた反応液の水分濃度制御系を構成し、製品トリグリセリドおよび副生成物であるジグリセリド生成量の水分濃度依存性に関する比較を行い、最適水分濃度に関してシミュレーションにより検討した。

また、連続反応ではリパーゼの失活が起こり、製品トリグリセリドの組成が変化する。このため、ジグリセリドの生成を抑制しつつ、トリグリセリド組成を一定に保つための水分濃度・トリグリセリド組成同時フィードバック制御系を構成し、良好な定値制御性を達成するための制御系の構造や最適なコントローラ・パラメータについて実験およびシミュレーションによる検討を行った。

### 3. 2 連続エステル交換反応モデル

#### 3. 2. 1 連続反応プロセスフロー

図3-1に連続エステル交換反応の概略プロセスフローを示す。反応槽は流動層型反応槽であり、中に微生物保持粒子に固定化された乾燥菌体 *R. chinensis* が封入されている。反応槽内の流動状態を確保するため、反応槽と水分濃度調節槽の間で循環ポンプにより反応液を循環させている。製品は水分濃度調節槽からオーバーフローにより排出される。

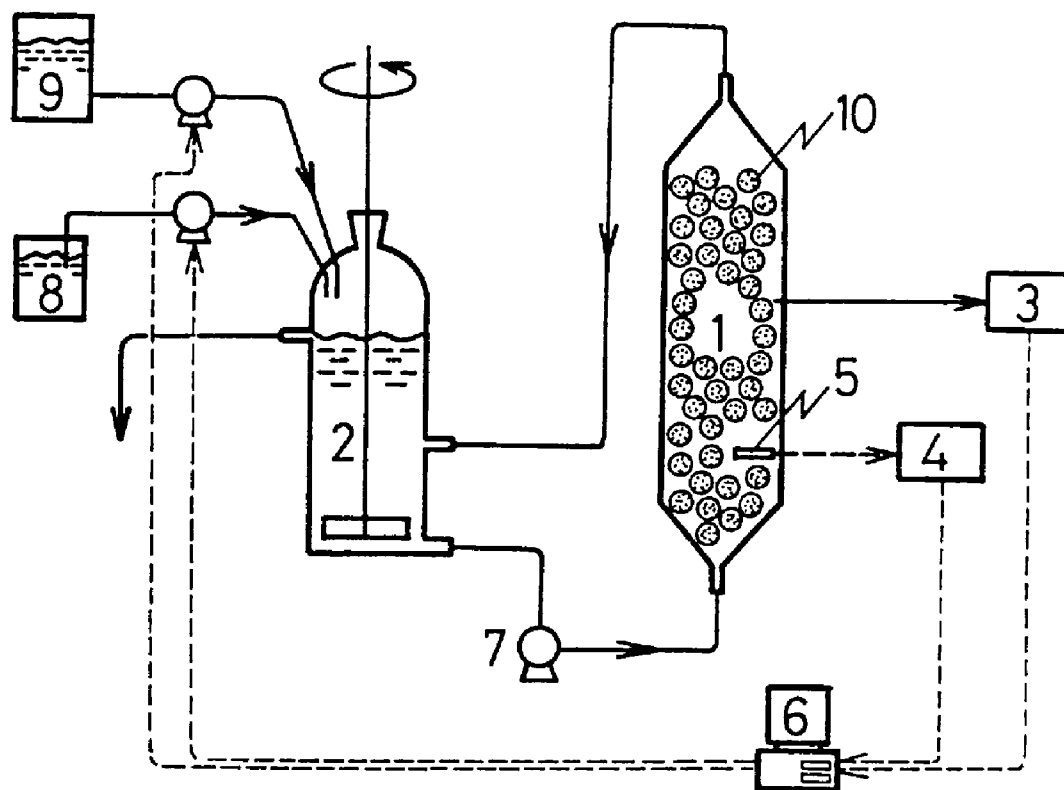


図3-1 連続反応実験装置フロー図

- (1)流動層型反応器(2)攪拌器(3)オンライン液体クロマトグラフ分析装置(4)水分計(5)水分センサー(6)パーソナルコンピュータ
- (7)循環ポンプ(8)水貯槽(9)反応液貯槽(10)微生物保持粒子

前章で導いた改良グリセリド酵素複合体モデルをベースに、基質の流入、流出項ならびに酵素失活を考慮することによって、連続エステル交換反応のモデル化を行った。

### 3. 2. 2 数式モデル

#### (1) 反応基質に関する物質収支式

図3-1に示した連続反応系における物質収支式は、改良グリセリド酵素複合体モデルに基づけば、液相（反応液）および固相（微生物保持粒子）のそれぞれにおいて次式で表される。

$$\frac{d C_b}{d t} = \frac{F_f}{V} (C_f - C_b) - K (C_b - C_s) \quad (3-1)$$

$$\frac{d C_s}{d t} = -V_R K (C_s - C_b) + R_v \quad (3-2)$$

ここで、 $F_f$ は原料供給速度であり、反応に関与する基質の種類および基質濃度ベクトル $C$ 、総括物質移動係数マトリックス $K$ 、反応速度ベクトル $R_v$ や他の記号は前章で説明した通りである。

一方、水に関する物質収支も改良グリセリド酵素複合体モデルに基づき、液相（反応液）および固相（微生物保持粒子）のそれぞれにおいて次式で表される。

$$\frac{d C_{b, w}}{d t} = \frac{F_t}{V} (C_{t, w} - C_{b, w}) - K_w (C_{b, w} - C_{w, w}) \quad (3-3)$$

$$\frac{d C_{s, w}}{d t} = V_R K_w (C_{b, w} - C_{w, w}) + r_w \quad (3-4)$$

ただし、 $C_{w, w}$ は(2-6)式から(2-8)式で求められる微生物保持粒子内水分濃度 $C_{s, w}$ と吸着平衡な水分濃度である。

## (2) 酵素失活速度式

微生物保持粒子に固定化されたリパーゼの失活速度式は、次式で表される。

$$\frac{d C_s}{d t} = -k_d C_s \quad (3-5)$$

ここで、 $k_d$ は失活速度定数である。

固定化微生物法を用いた微水系バイオリアクターにおけるリパーゼの失活速度は、微生物保持粒子内水分濃度に依存することが実験的に確認されている<sup>10)</sup>。(3-5)式をシミュレーションに用いるには、 $k_d$ が微生物保持粒子内水分濃度 $C_{s, w}$ の連続関数として表されている必要がある。そのため、これらの失活速度に関するデータ<sup>10)</sup>を用いて、計算値と実験値との誤差の二乗和が最小となるように $k_d$ を求めた結果、各水分濃度ごとに図3-2に示すプロットが得られた。

さらに、失活速度定数と微生物保持粒子内水分濃度の関係に最小二乗法による多項式近似を行えば、図3-2の実線に示す次式の実験式が得られた。

$$k_d = 0.7336 \times 10^{-4} - 0.1273 \times 10^{-1} C_{w,v} + 1.361 C_{w,v}^2 - 49.51 C_{w,v}^3 \quad (0 \leq C_{w,v} < 0.01108) \quad (3-6)$$

$$k_d = 3.263 \times 10^{-5} - 5.267 \times 10^{-5} C_{w,v} \quad (0.01108 \leq C_{w,v})$$

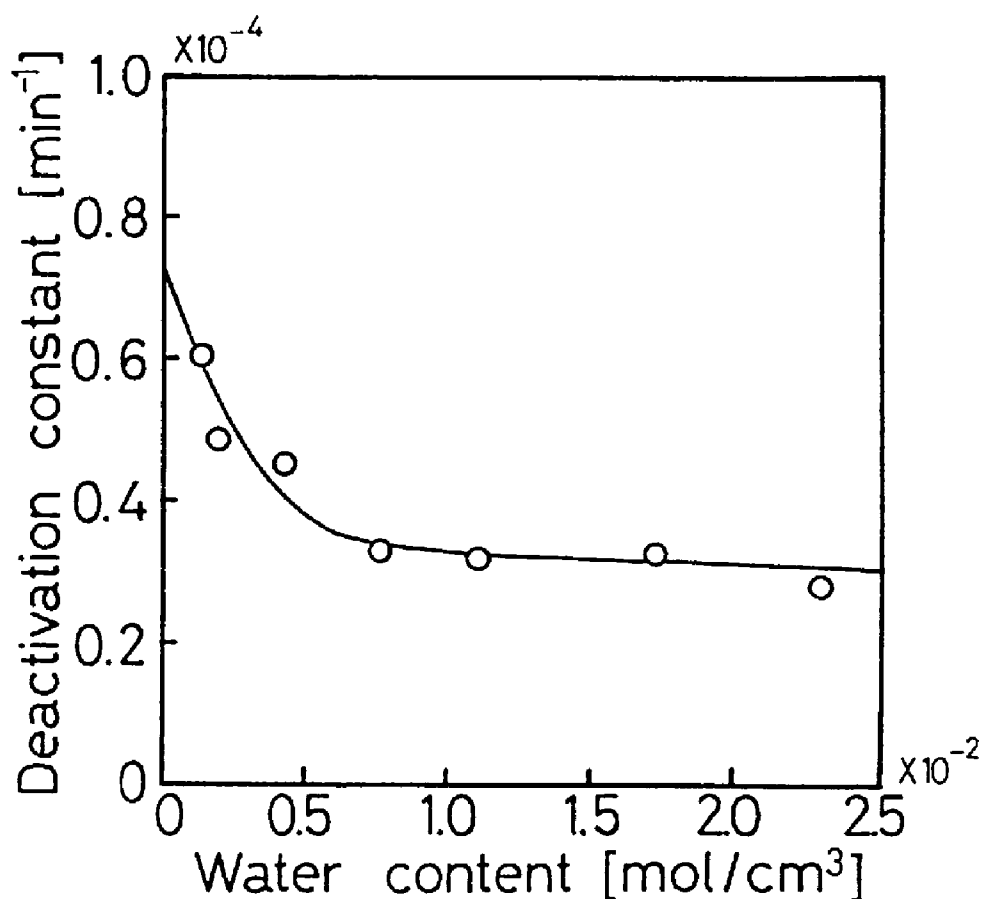


図3-2 酵素失活速度定数の水分濃度依存性

○ : 実験データからの計算値

— : (3-6) 式の関数近似結果

### 3. 3 実験方法及び条件

リパーゼ生産菌 *R. chinensis* の固定化された微生物保持粒子 80g を図 3-1 に示す流動層型反応槽（流動槽全容量  $4.0 \times 10^3 \text{ cm}^3$ ）に封入、原料液  $5.5 \times 10^3 \text{ cm}^3$  を供給し反応槽、水分濃度調節槽および液循環ラインを原料液で満たした後、反応温度  $40^\circ\text{C}$  で反応を行った。微生物保持粒子中の固定化菌体量は 32.4g であり、またその酵素比活性は  $0.577 \text{ U/g}$  であった。反応液の循環流量は  $2.4 \times 10^3 \text{ cm}^3/\text{min}$  とした。

反応液の水分濃度は、水分センサー（パナメトリクス社製ハイグロメータ・システム 1）により連続的に検出し、変換器からの電圧信号（DC0-5V）を 10/s で取り込み、1 秒間ごとに平均化処理を行った。水供給速度は  $0.60 \text{ cm}^3/\text{min}$ 、制御周期は 3min とした。1 周期におけるポンプ稼働時間は、水分濃度設定値に応じて 5~30s の範囲で設定した。また反応液のカールフィッシャー水分計によるオフライン分析も行った。

一方、反応液のトリグリセリド組成はオンライン液体クロマトグラフ分析装置（島津製 LC-6AD, C-R4A, PRG-102A, FCV-2AH）により分析した。充填カラムは Lichrospher 100 RP-10（Merck 社製）を用い、移動相溶媒としてアセトニトリル/クロロホルム混合液（7/3 v/v）を  $1.5 \text{ cm}^3/\text{min}$  で流した。カラムは恒温槽により  $30^\circ\text{C}$  に保った。この条件下でのサンプリング周期は 30min であった。水分濃度およびグリセリド組成の測定値は、制御用コンピュータ（NEC 製 FC9801X）へデータ伝送し、コンピュータにより水供給ポンプおよび原料供給ポンプの回転数制御を行った。また、原料液の調製方法ならびにその他の実験条件は前章に示した通りである。各基質濃度は表 3-1 に示す値となった。

表 3 - 1 原料液組成

反応基質	液相	固相	
トリグリセリド			
000	$7.816 \times 10^{-5}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
POP	$5.983 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
SOS	$6.630 \times 10^{-7}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
P00	$3.826 \times 10^{-5}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
S00	$1.010 \times 10^{-5}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
SOP	$2.193 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
脂肪酸			
OA	$2.680 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
PA	$4.703 \times 10^{-5}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
SA	$7.625 \times 10^{-4}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
ジグリセリド			
00X	$6.821 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
P0X	$1.414 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
S0X	$4.580 \times 10^{-7}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
酵素	—————	$5.166 \times 10^{-3}$	U/cm <sup>3</sup>
水	$2.031 \times 10^{-6}$	$1.389 \times 10^{-3}$	mol/cm <sup>3</sup>

### 3. 4 水分濃度制御

#### 3. 4. 1 制御機構

エステル交換反応における反応速度定数および酵素失活速度定数は水分濃度依存性が大きいいため、製品トリグリセリドの生成に大きな影響を及ぼすと推察される。そのため、図3-3のブロック図に示す反応液水分濃度に関するフィードバック制御系を構成した。

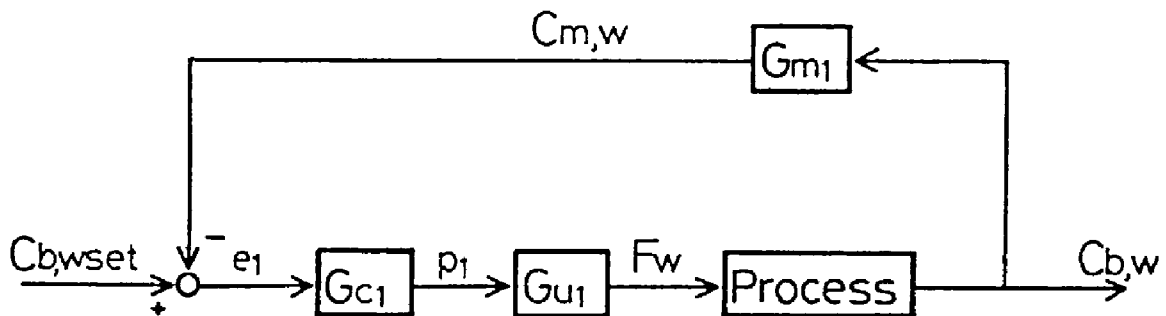


図3-3 水分濃度制御系ブロック図

操作量に水供給速度  $F_w$ 、コントローラにオンオフ調節計を用いれば、制御系の各要素は次式で表される。

$$\text{誤差信号} \quad e_1 = C_{b,wset} - C_{m,w} \quad (3-7)$$

$$\text{コントローラ} \quad p_1 = \begin{cases} 0 & (e_1 \leq 0) \\ 1 & (e_1 > 0) \end{cases} \quad (3-8)$$

操作端

$$F_w = \begin{cases} 0.60 \times p_1 & (i \cdot t_c \leq t \leq i \cdot t_c + t_{on}) \\ 0.0 & (t_{on} + i \cdot t_c \leq t \leq (i+1) \cdot t_c) \end{cases} \quad (3-9)$$

( $i = 0, 1, 2, 3, \dots$ )

観測端  $\frac{d C_{m.w}}{d t} = \frac{1}{T_1} (-C_{m.w} + C_{b.w}) \quad (3-10)$

ここで、 $t_c$ はポンプのオンオフ制御周期、 $t_{on}$  ( $t_c > t_{on}$ )はポンプの作動時間である。また、水分濃度検出器の検出特性は時定数13minの1次遅れ特性に近似でき、 $T_1$ は1次遅れ時定数である。

### 3. 4. 2 最適な水分濃度設定値の検討

連続エステル交換反応において、反応液水分濃度を制御する場合としない場合について、製品トリグリセリドSOSおよび副生成物ジグリセリドの生成に及ぼす影響についてシミュレーションにより検討した。図3-4および図3-5は、原料供給速度を $1.2 \text{ cm}^3/\text{min}$ とした場合のSOSおよびジグリセリドの総生成量を示したものである。計算に際しては、流入原料による影響を受けないように、表3-1に示した原料基質組成の中でSOSおよびジグリセリド濃度を $0.0 \text{ mol}/\text{cm}^3$ とした。さらに酵素が完全に失活する状態までシミュレーションを行い、生成量が変わらないことを確認して総生成量とした。横軸の水分濃度は、水分制御を行った場合はその制御設定値を、制御しない場合は原料中の水分濃度を示している。図3-4から分るように、水分制御を行わない場合原料中の水分濃度によらずSOS生成量は低いが、水分制御を行うことにより生成量は顕著に増加し、およそ90ppm近傍で最大生成量を示している。

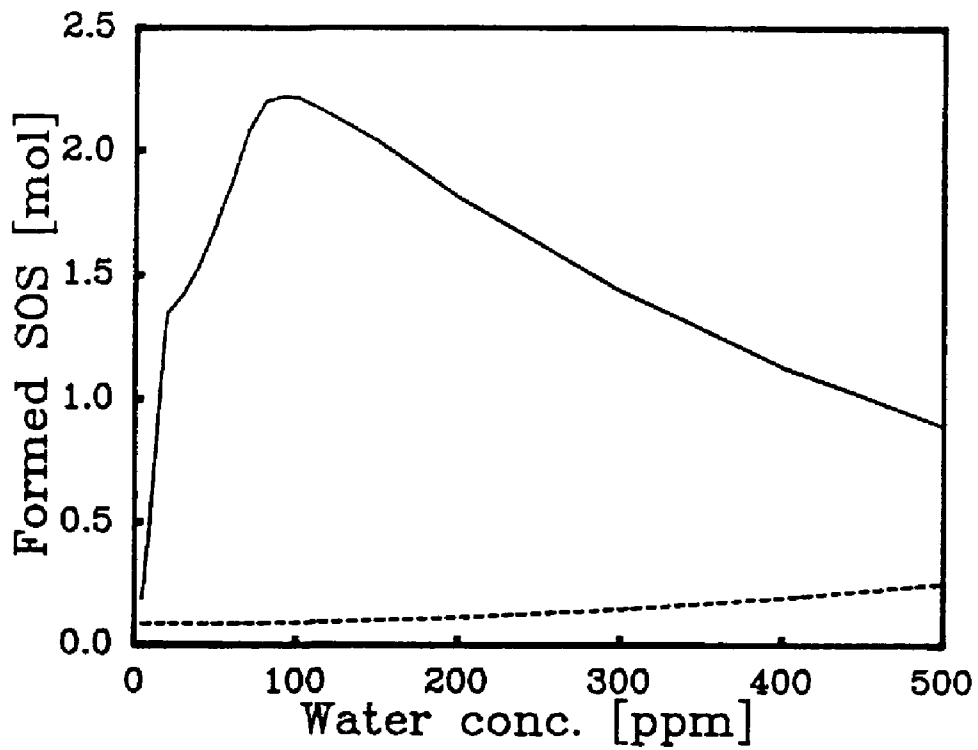


図 3 - 4 SOS生成量と水分濃度との関係  
 ----- :水分濃度を制御しない場合  
 —— :水分濃度を制御した場合

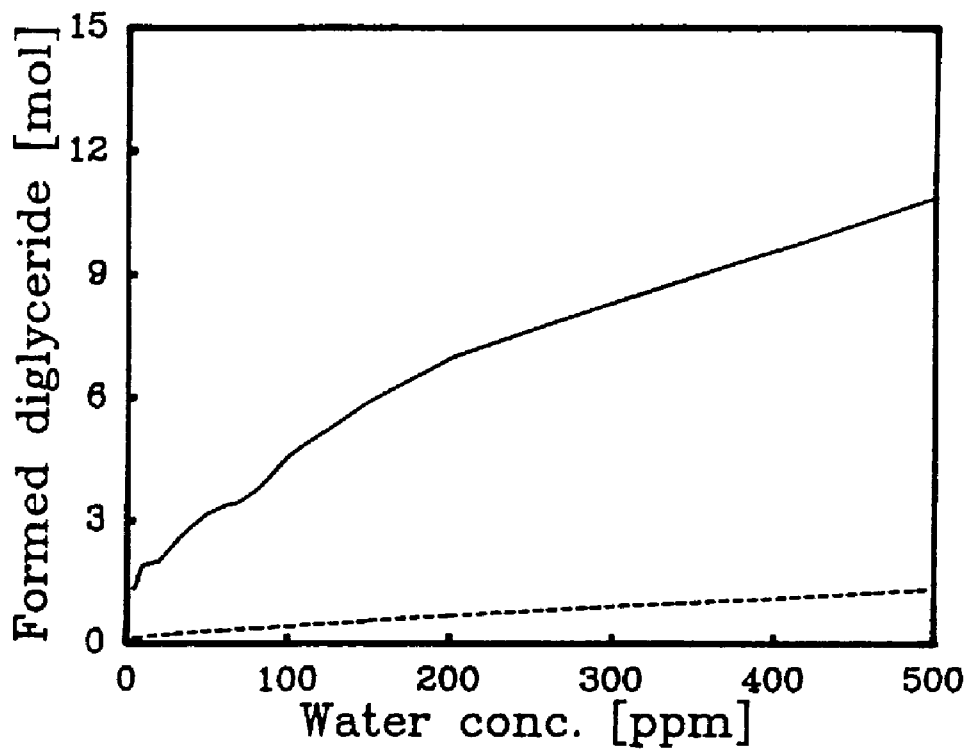


図 3 - 5 ジグリセリド生成量と水分濃度との関係  
 記号は図 3 - 4 と同じ。

SOS生成量が最大となる水分濃度設定値が存在する理由は、エステル交換反応の反応速度定数およびリパーゼの失活速度定数の水分濃度依存性に起因するものであり、このことから微水系バイオリアクターにおける水分濃度制御の重要性が示唆される。一方、副生成物のジグリセリド生成量に関しては、図3-5から分るように水分制御を行った方が逆に高くなっており、水分濃度設定値に対して単調増加の傾向が見られる。以上のことから水分濃度制御系の設定値に関して、SOS生成量を最大にするにはジグリセリドの生成が許容範囲内であれば90ppm近傍に設定するのが好ましい。しかしながら、より厳密な水分濃度設定値の決定には、コスト評価など適当な評価関数の下での最適化が必要である。

### 3. 4. 3 制御実験結果および考察

図3-3のブロック図に示した水分濃度制御系を連続反応に適用した結果を図3-6および図3-7に示す。水分濃度設定値はそれぞれ35ppmおよび90ppmとし、原料供給速度は $1.2\text{cm}^3/\text{min}$ とした。図の横軸は反応時間を、縦軸は全トリグリセリドに対する各トリグリセリドの比率および水分濃度を示す。図中のプロットは実験値、実線は計算値である。反応液の水分濃度に関しては、オンオフ調節計を用いているためラフな制御性しか得られていないが、ジグリセリド含有率（mol基準の全油脂に対するジグリセリド百分率）は、反応を通してそれぞれ1.5%および3.0%程度に抑制することができた。一方、トリグリセリド組成に着目すれば、製品SOSはトリオレイン000の減少に伴い増加するが、水分濃度を90ppmに制御した方がSOSの立ち上がりが速い。また、リパーゼの失活速度も抑えられ、結果としてSOS濃度の低下速度も小さくなることが図より明かである。以上のことから、水分濃度制御によりグリセリドの生成速度や酵素失活速度を制御できることが分った。

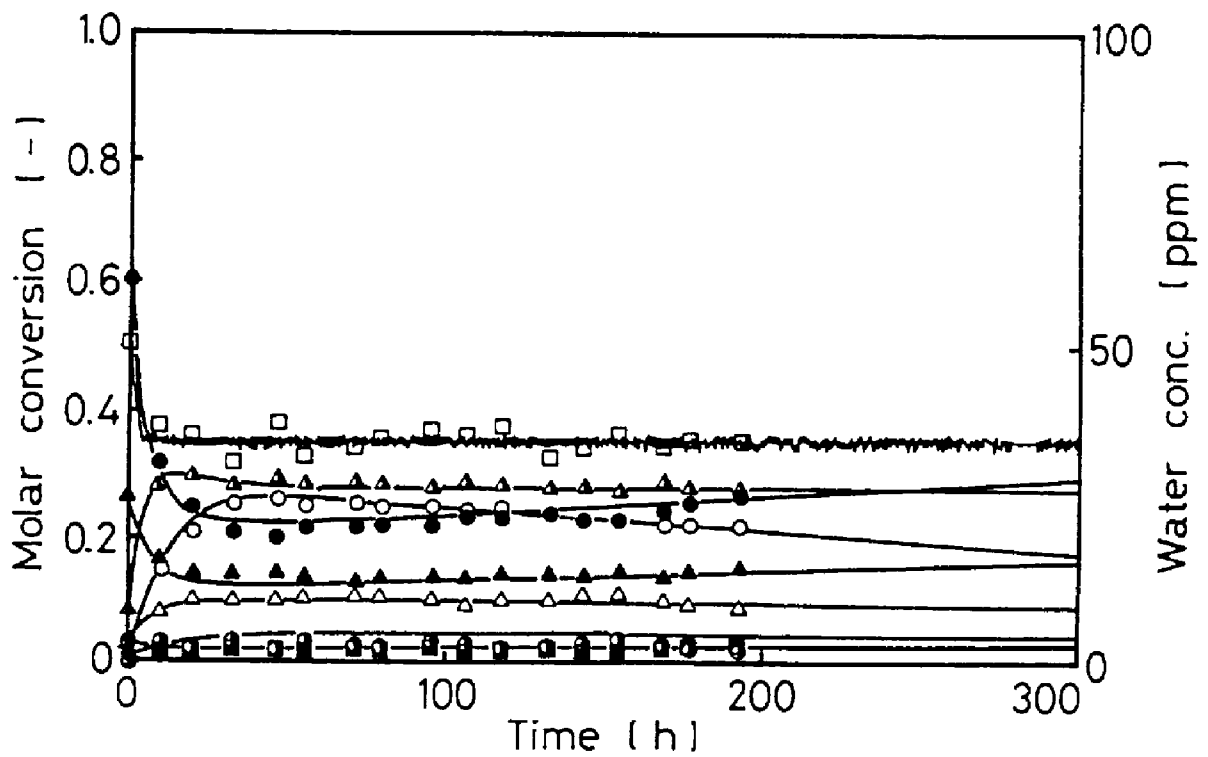


図3-6 連続反応実験におけるトリグリセリド組成および水分濃度の経時変化（初発水分濃度を35ppmとした場合）

●:000   ●:POP   ○:SOS   ▲:P00   ▲:S00   △:S0P  
 ■:ジグリセリド含有率   □:水分濃度  
 —:計算結果

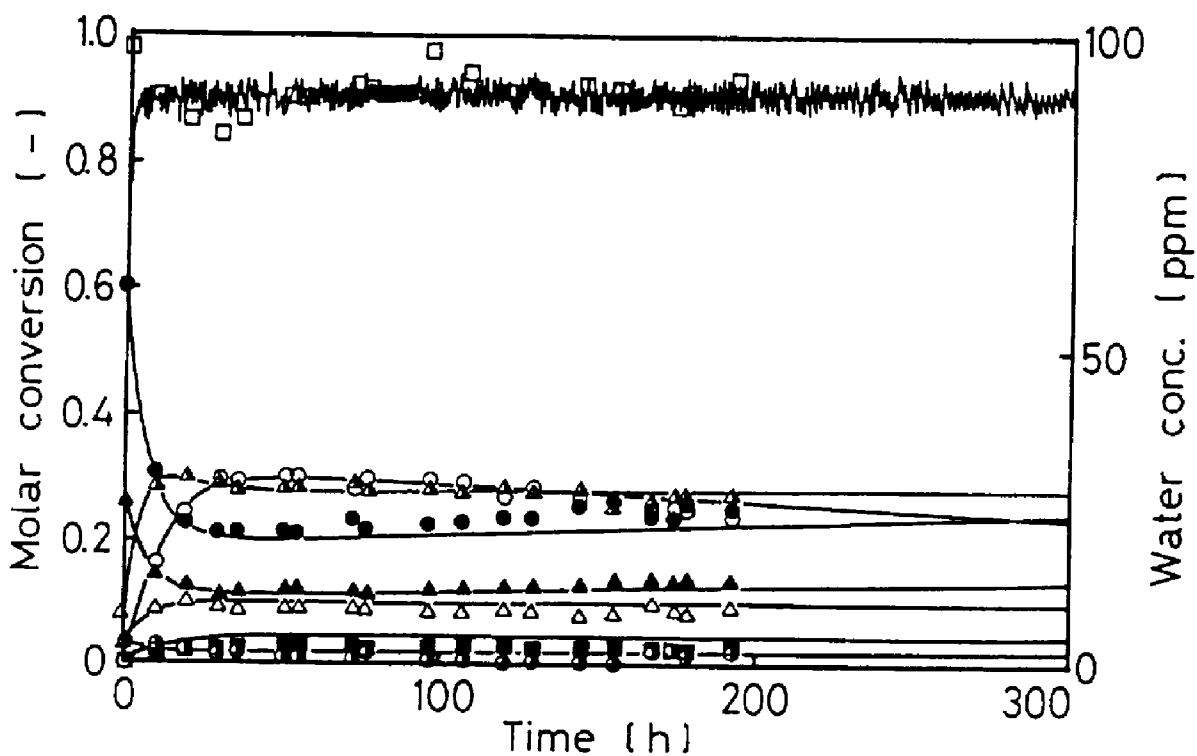


図 3-7 連続反応実験におけるトリグリセリド組成および水分濃度の経時変化（初発水分濃度を90ppmとした場合）  
記号は図 3-6 と同じ。

既に述べたように、連続反応系では酵素の失活に伴うトリグリセリドの組成変化は避けられない。したがって反応過程を通して均一組成のトリグリセリドを得るには、反応液の水分濃度制御に加えて製品SOS基準トリグリセリド組成に関する定値制御系の導入が不可欠である。次に、原料供給速度を操作量としたSOS定値制御系を付加した水分濃度・トリグリセリド組成同時制御について検討を行った。

### 3. 5 水分濃度・トリグリセリド組成同時制御

#### 3. 5. 1 制御機構

図3-8に水分濃度・トリグリセリド組成同時制御系のブロック図を示す。本制御系は水供給速度で反応液の水分濃度を、原料供給速度でトリグリセリド組成を同時制御するもので、水分濃度制御ループの構造は前節で述べた通りコントローラとしてオンオフ調節計を用いている。一方、トリグリセリド組成制御ループにおいては、トリグリセリド組成がオンライン液体クロマトグラフ分析装置により分析されるため、分析周期 $T_s$  minのサンプル値制御系となる。

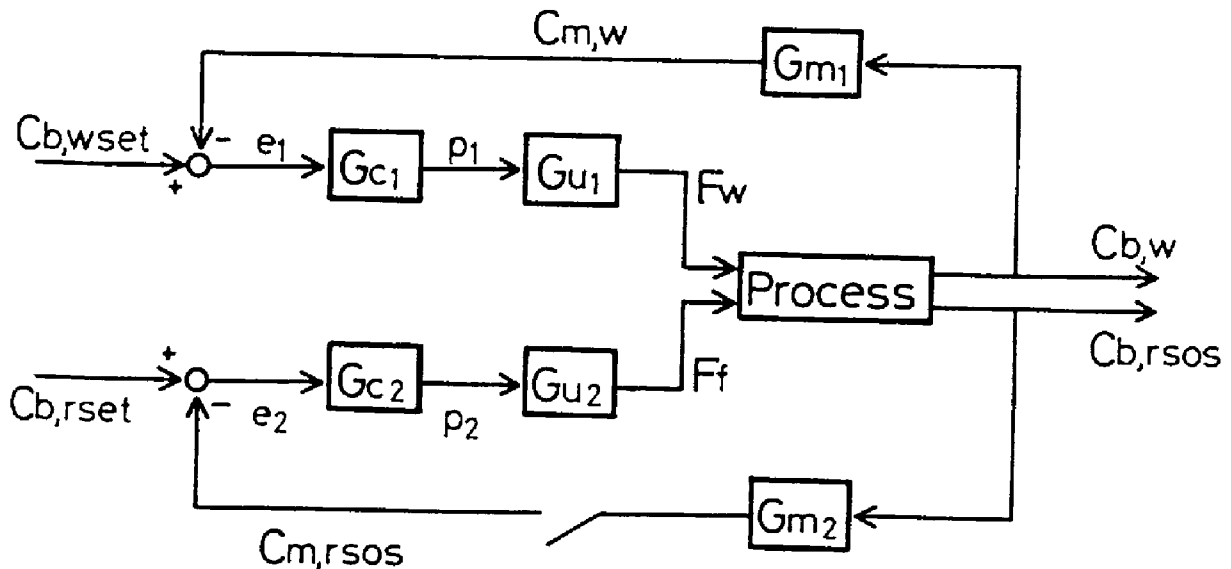


図3-8 水分濃度、トリグリセリド組成同時制御系ブロック図

操作量に原料供給速度  $F_r$ 、コントローラに P I 調節計を用いれば、制御系の各要素は次式で表される。

$$\text{誤差信号} \quad e_2(k) = C_{b, r_{set}}(k) - C_{m, r_{sos}}(k) \quad (3-11)$$

$$\text{コントローラ} \quad p_2(k) = M_i \cdot \sum_{i=1}^k e_2(i) + M_p \cdot e_2(k) \quad (3-12)$$

$$\text{操作端} \quad u_2(k) = F_r(k) = -p_2(k) \quad (3-13)$$

$$\begin{aligned} \text{観測端} \quad C_{m, r_{sos}}(k) = C_{m, sos}(k) / \{ & C_{m, ooo}(k) + C_{m, pooo}(k) + \\ & C_{m, pop}(k) + C_{m, sooo}(k) + C_{m, soop}(k) + C_{m, sos}(k) \} \\ & k=1, 2, 3, \dots \end{aligned} \quad (3-14)$$

ただし、 $C_{m, r_{sos}}$ はSOS基準トリグリセリド組成の観測値であり、 $C_{m, ooo}$ 、 $C_{m, pooo}$ 、 $C_{m, pop}$ 、 $C_{m, sooo}$ 、 $C_{m, soop}$ 、 $C_{m, sos}$ は各トリグリセリドのクロマトグラムのピーク面積を表すものとする。また、離散時間はサンプル周期を  $T_s$  として  $k T_s$  で表されるが、簡略化のため  $k$  と表すことにする。

### 3. 5. 2 最適コントローラの検討

図 3-8 に示した水分濃度・トリグリセリド組成の同時フィードバック制御系をスタートアップ操作を含めた連続反応操作に適用し、最適なコン

トローラとP Iパラメータについてシミュレーションによる検討を行った。SOS基準トリグリセリド組成の設定値は0.35とし、反応液水分濃度は90ppmにオンオフ制御した。図3-9にフィードバック・コントローラにP調節計を用いた場合のSOS基準トリグリセリド組成と原料供給速度の経時変化を示す。ただし、 $M_p=4.12$ である。設定値への到達も速くSOS組成も一定に保たれているが、設定値からのオフセットが生じている。図3-10はコントローラにP I調節計を用いた場合の結果である。ただし、 $M_p=1.65$ 、 $M_i=0.38$ とした。オフセットが消去され設定値に収束しているが、スタートアップ時の積分動作により誤差信号が積分され、大幅なオーバーシュートの生じる結果となった。

以上の結果を参考として、スタートアップ時には、設定値に到達するまでP調節計を用い、その後はP I調節計に変更するというコントローラの切り換えを行った。結果を図3-11に示す。ただし、 $M_p=2.42$ 、 $M_i=0.64$ とした。

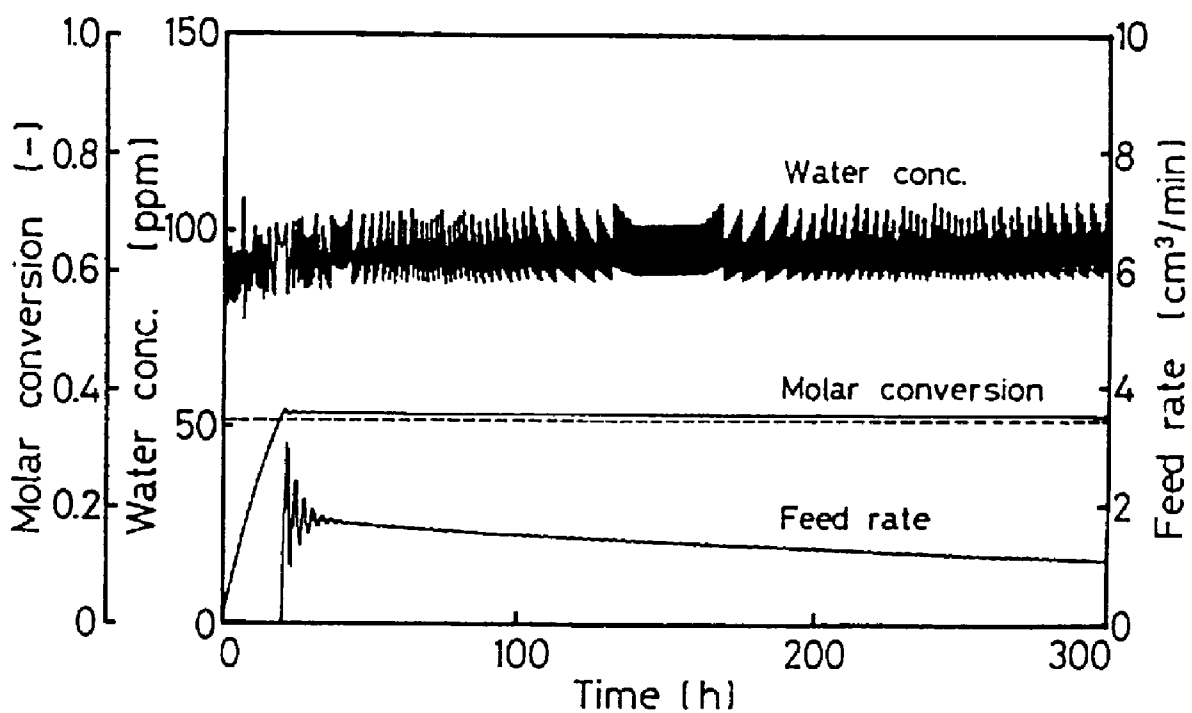


図3-9 P調節計を用いた場合のトリグリセリド組成制御結果

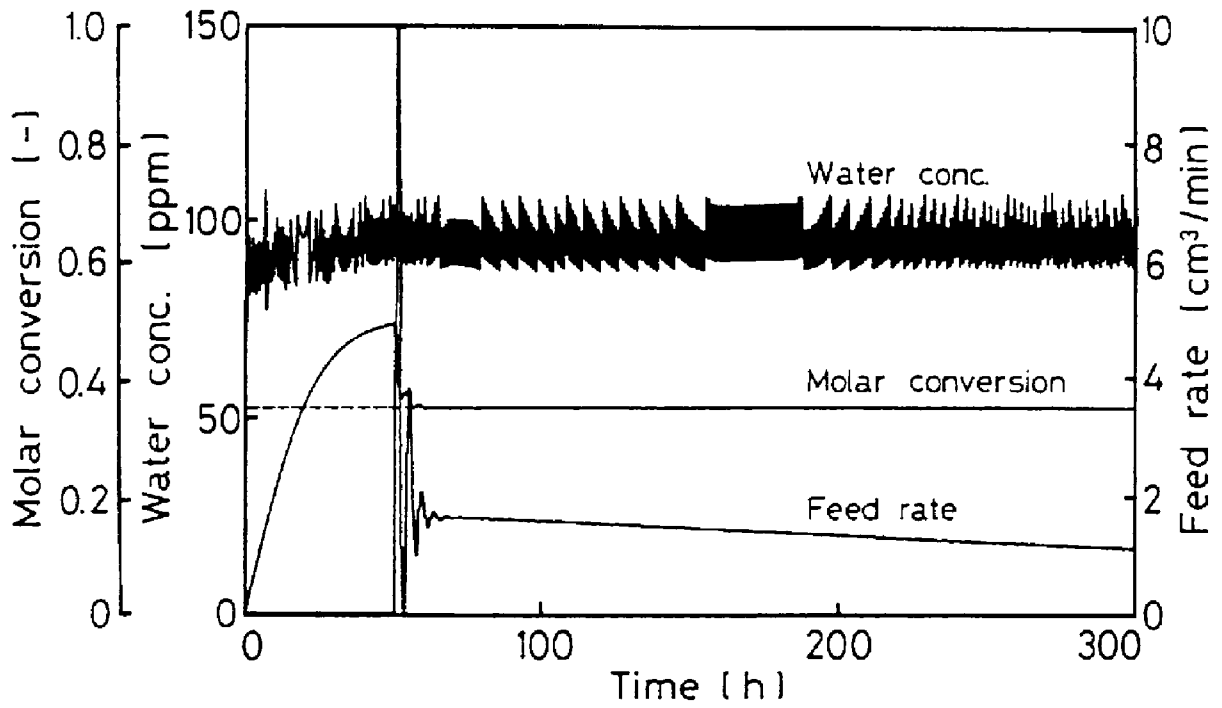


図 3 - 1 0 P I 調節計を用いた場合のトリグリセリド組成制御結果

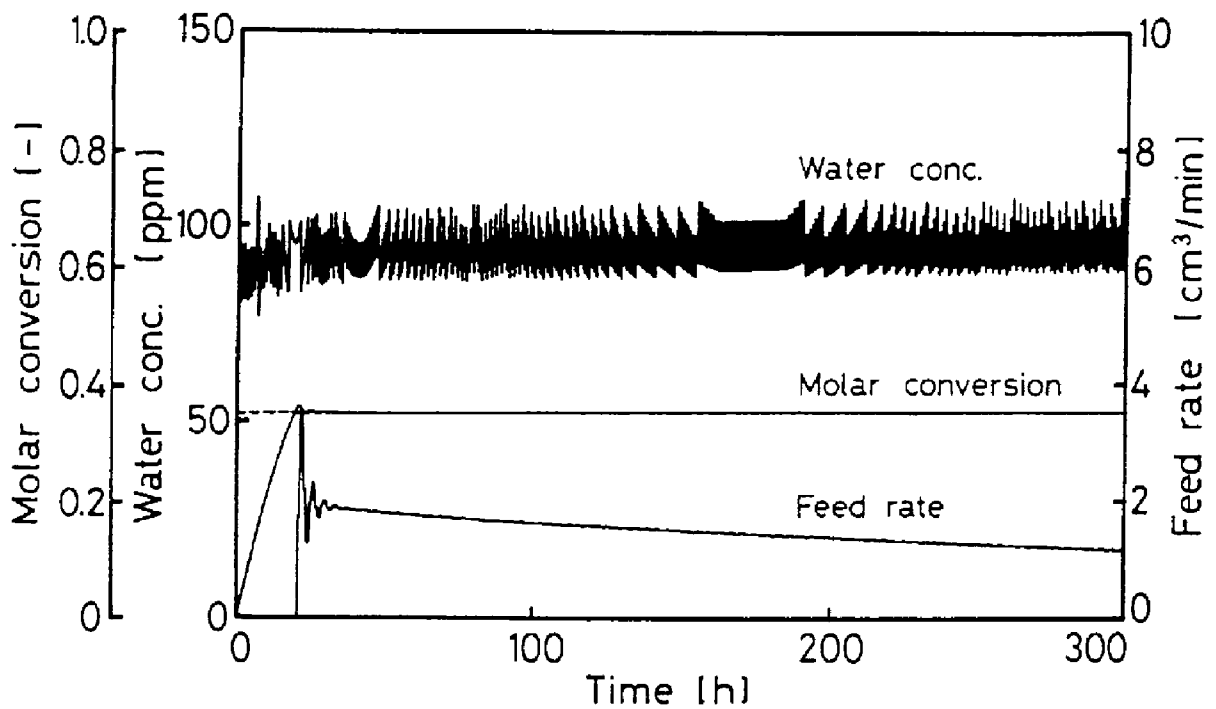


図 3 - 1 1 P / P I 調節計を併用した場合のトリグリセリド組成制御結果

P、P I 調節計の併用により、各々の調節計を単独で用いた場合の欠点が補われ、SOS基準トリグリセリド組成は立ち上がりも速く、反応過程全般を通じて良好に設定値に制御されることが分った。なお、ここで用いたP Iパラメータは全て、SOS基準トリグリセリドの設定値からの絶対誤差積分を最小にするという評価の下で、直接探索法により求めた最適パラメータである。すなわち、 $M_p$ 、 $M_i$ の探索区間をそれぞれ10等分割し、各格子点ごとに評価関数を計算する。評価関数を最小とする格子点を中心に、探索幅が前回の1/5になるように探索区間を更新し、探索を繰り返す。探索幅が0.01未満となった時点で探索を打切った。なお積分区間は、SOS基準トリグリセリド組成が設定値を越えた時点から100hまでとした。

水分濃度制御に関しては、既に述べた通りオンオフコントローラを用いているためラフな制御性しか得られていないが、トリグリセリド組成制御ループとはほとんど干渉を起こさず、いずれの場合も設定値±5ppm程度に制御できた。これは、水供給速度が水分濃度およびトリグリセリド組成の両者に影響を及ぼすのに対して、原料供給速度は水分濃度にほとんど影響を及ぼさないためであると考えられる。以上のことから、最も影響の大きい水分濃度制御系の特性を把握しておけば、相互干渉を無視して設計した水分濃度・トリグリセリド組成同時制御系により所定の制御性の得られることがシミュレーションより確められた。

### 3. 5. 3 制御実験結果および考察

数値シミュレーションにより検討した水分濃度・トリグリセリド組成同時フィードバック制御系の実用性を評価するため、定値制御実験を実施した。図3-12にPIパラメータを3通りに変化させた場合の定値制御実験結果を示す。水分濃度は各ケースとも90ppmに定値制御した。SOS基準トリグリセリド組成の設定値は0.35とした。 $M_p=5.0$ 、 $M_i=2.0$ と選んだケースではコントローラのゲインが大きく、操作量の原料供給速度が周期的に大きく変動し、SOS基準トリグリセリド組成も大幅なハンチングが継続した。コントローラのゲインを下げるにしたがってハンチングは減少し、最適パラメータの $M_p=2.4$ 、 $M_i=0.6$ ではおよそ $0.35 \pm 0.015$ 範囲に定値制御できることが実験より確かめられた。

一方、水分濃度はカールフィッシャー水分計による分析結果から $90 \pm 5$  ppm程度に制御できることが分り、ジグリセリド含有率も $3 \pm 0.2\%$ 程度に制御できた。以上のことより、図3-8に示した水分濃度・トリグリセリド組成の同時フィードバック制御系は、リパーゼを用いた微水系バイオリアクターによる油脂の連続エステル交換反応のグリセリド組成の制御に有効であることが実験からも確かめられた。

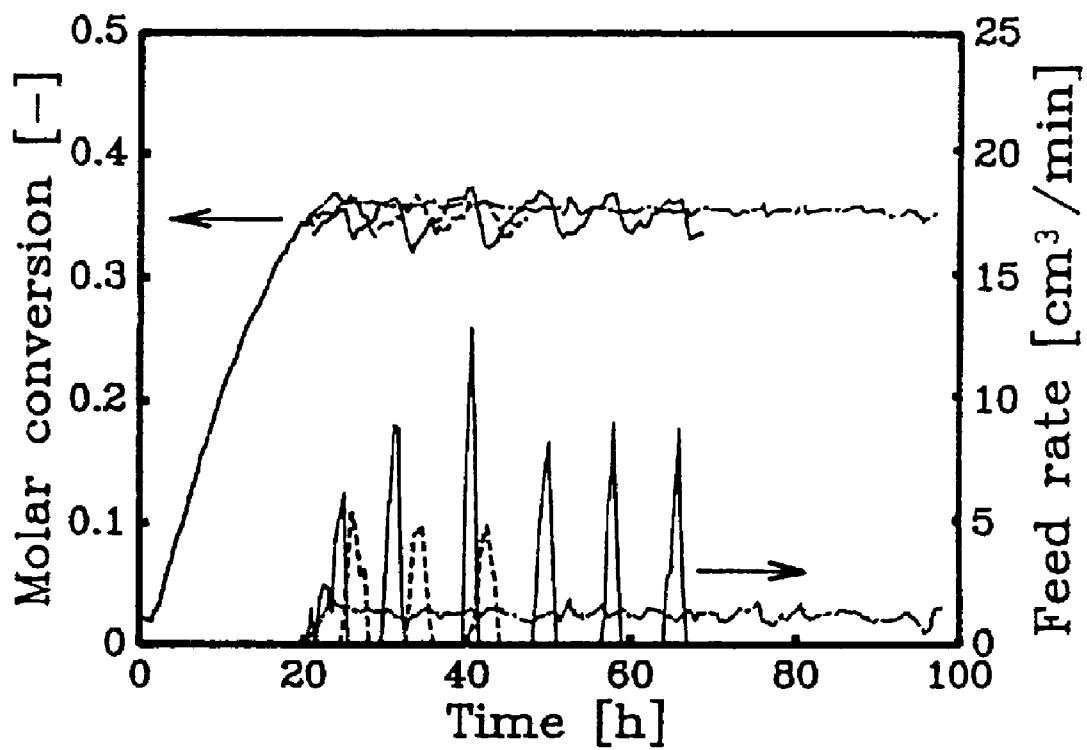


図 3-12 トリグリセリド組成の定値制御実験結果

————— :  $M_p = 5.0$ 、 $M_i = 2.0$

----- :  $M_p = 3.0$ 、 $M_i = 1.0$

- · - · - · :  $M_p = 2.4$ 、 $M_i = 0.6$

### 3. 6 結論

微水系バイオリアクターによる油脂の連続エステル交換反応プロセスのモデル化として、前章の改良グリセリド酵素複合体モデルを基に酵素失活を考慮した連続反応モデルを導いた。この連続反応プロセスを対象として、オンオフ調節計による反応液水分濃度のフィードバック制御系を構成したところ、水分濃度およびジグリセリド含有率が一定に制御できることが実験により確められた。さらにグリセリド生成量と反応液水分濃度との関係についてシミュレーションを行うと、エステル交換反応は水分濃度依存性が大きく、製品SOSは90ppm近傍で最大生成量を示し、他方副生成物のジグリセリド含有率は単調増加することが分った。

連続反応のスタートアップ操作および酵素失活によるトリグリセリド組成の変動に対し、相互干渉を無視した水分濃度・トリグリセリド組成同時フィードバック制御系を構成した。フィードバックコントローラとしてP / P I 調節計を併用したトリグリセリド組成制御系は、サンプリング周期が30分という長周期のサンプル値制御系であるにも関わらず設定値 $0.35 \pm 0.015$ の範囲に定値制御でき、またジグリセリド含有率も 3%程度に制御できることが実験およびシミュレーションの両者から確認された。

## 第4章 酵素活性推定機構付フィードフォワード／フィードバック 制御系による微水系エステル交換反応制御

### 4. 1 緒言

固定化微生物による油脂の連続エステル交換反応において、反応速度や反応収率を高めるための最適水分濃度の検討、ならびに水分濃度、トリグリセリド組成の同時フィードバック制御系について前章で検討を行った。しかしながら、油脂のトリグリセリド組成は液体クロマトグラフ分析装置により分析されるため、ベースラインのドリフトなどによる分析誤差が生じ易く、誤差を含んだ観測値がそのままフィードバックされるので制御性の精度に大きな影響を及ぼす。また、酵素活性初期値の変動や、原料ロット変更による原料組成の変動などの外乱に対しては、一般に言われているように、フィードバック制御単独では十分な制御性が期待できない。

化学反応プロセスや微生物反応プロセスにおける外乱や強い非線形性による制御性の低下に対しては、従来より制御対象プロセスのダイナミックモデルを利用したフィードフォワード／フィードバック制御系の適用が図られている。したがって本章では、微量水分濃度の動的挙動をも含めて反応動特性を良好に表現することのできる改良グリセリド酵素複合体モデルに基づいた、フィードフォワード／フィードバック（以下FF／FBと記す）制御系について検討を加えた。とくに、酵素活性の初期値に関しては、固定化微生物由来リパーゼを用いることからロットの差異によりバラツキが生じ、変動要因の一つとして考慮しなければならない。そのため、トリグリセリド組成の観測値から酵素活性をオンライン推定する、酵素活性推定機構を有するFF／FB制御系も併せて構築し、その有効性をシミュレーションおよび実験の両者により比較検討した。

## 4. 2 実験方法および条件

リパーゼ生産菌 *R. chinensis* の固定化された微生物保持粒子100gを図3-1に示す流動層型反応槽に封入し、反応温度40℃で反応を行った。微生物保持粒子中の固定化菌体量は40.5gであり、またその酵素比活性は0.912U/gであった。原料液のトリグリセリド組成、水分濃度の測定方法および、その他の実験条件は既に説明した通りである。なお、酵素活性の推定およびフィードフォワード制御量の算出にはリアルタイム性が要求されることから、エンジニアリングワークステーションSPARCstation330(サンマイクロシステムズ社製)を用い、FC9801X間とはRS-232Cによりデータ伝送した。なお、フィードバック制御演算は前章に示した通りFC9801Xにより行った。

## 4. 3 制御機構

### 4. 3. 1 フィードフォワード/フィードバック制御系

リパーゼを用いた連続エステル交換反応プロセスは、(3-5)式に示した不可逆的な酵素失活により非定常プロセスとなる。このため、酵素失活によるSOS基準トリグリセリド組成の低下を補償するFF/FB制御系について検討を行った。FF/FB制御系のブロック図を図4-1に示す。ここで、 $G_{c1}$ はPI調節計を用いたフィードバックコントローラ、 $G_{c2}$ はフィードフォワードコントローラであり、操作量は反応器への原料供給速度とした。線形システムにおいては、古典的なフィードフォワードコントローラの設計手法が適用可能である。しかし、本プロセスは非線形、非定常システムであり、以下に説明するような試行錯誤により操作量を求めた。すなわち、操作量を0から $1\text{cm}^3/\text{min}$ ずつ増加させ、システム方程式

(3-1) ~ (3-6) 式を積分しトリグリセリド組成を求める。計算値が設定値を越えない場合は操作量を再度増加させ、逆に越えた場合はステップを戻し、増分を1/10の0.1として計算を続行する。この操作を反復し、原料供給速度の有効数字が4桁得られた時点で計算を打切った。

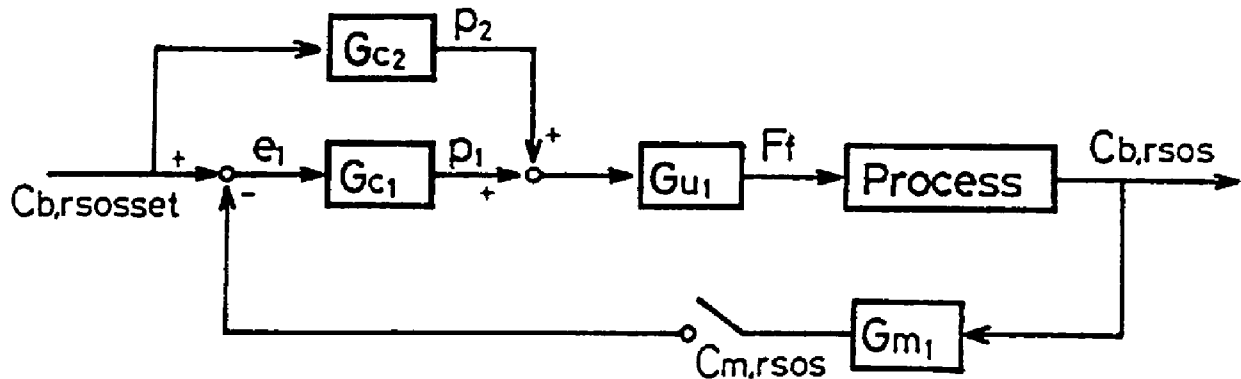


図4-1 トリグリセリド組成のフィードフォワード／フィードバック制御系ブロック図

#### 4. 3. 2 酵素活性推定機構

リパーゼの活性初期値は培養状態や後処理状態などによって変化するため、変動因子の一つとして考えられる。そのため、回分操作時におけるトリグリセリド組成の観測値からリパーゼの初期活性を推定し、フィードフォワードコントローラのモデルパラメータのオンライン同定に用いる酵素活性推定機構を考案した。初期酵素活性の推定は1変数の探索問題であり、Appendix-3に示した手順により探索を行った。

酵素活性推定機構を有したFF/FB制御系のブロック図を図4-2に示す。Gc1、Gc2は、既に説明したフィードバックコントローラ、フィードフォワードコントローラである。Gc3が酵素活性推定機構であり、オン

ライン推定された酵素活性初期値は  $G_{c2}$  へ送られ、操作量としての原料供給速度の算出に用いられる。本制御系を連続エステル交換反応のスタートアップ操作に適用した場合の計算手順はAppendix-4に示す通りである。

次に、酵素活性推定機構の推定精度をシミュレーションにより検討した。図4-3のプロット●は、酵素活性初期値を  $0.006716\text{U}/\text{cm}^3$  と仮定し、液体クロマトグラフ分析装置の平均分析誤差（誤差平均0.62%、標準偏差0.36%）を考慮して計算により作成したSOS基準トリグリセリド組成の数値実験用データである。これらの時系列データに対して、酵素活性推定機構を適用した結果を図4-3に○で示す。探索手順はAppendix-3に示した通りである。反応開始30分後から観測データを1個ずつ増やし探索を繰り返した結果、推定値は15hで  $0.006705\text{U}/\text{cm}^3$  に収束した。また図4-3の実線は、この推定値を用いた時のSOS基準トリグリセリドのシミュレーション結果である。酵素活性初期値に関する推定誤差はおよそ0.16%であり、直接探索法に基づく酵素活性推定アルゴリズムは十分な推定精度を有していることが分った。

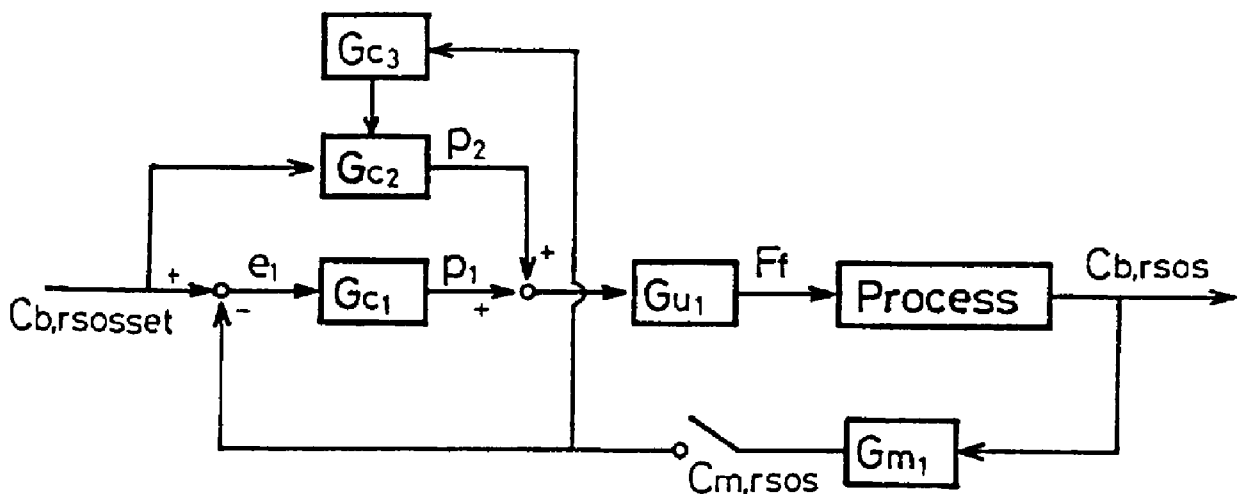


図4-2 酵素活性推定機構を有したフィードフォワード／フィードバック制御系ブロック図

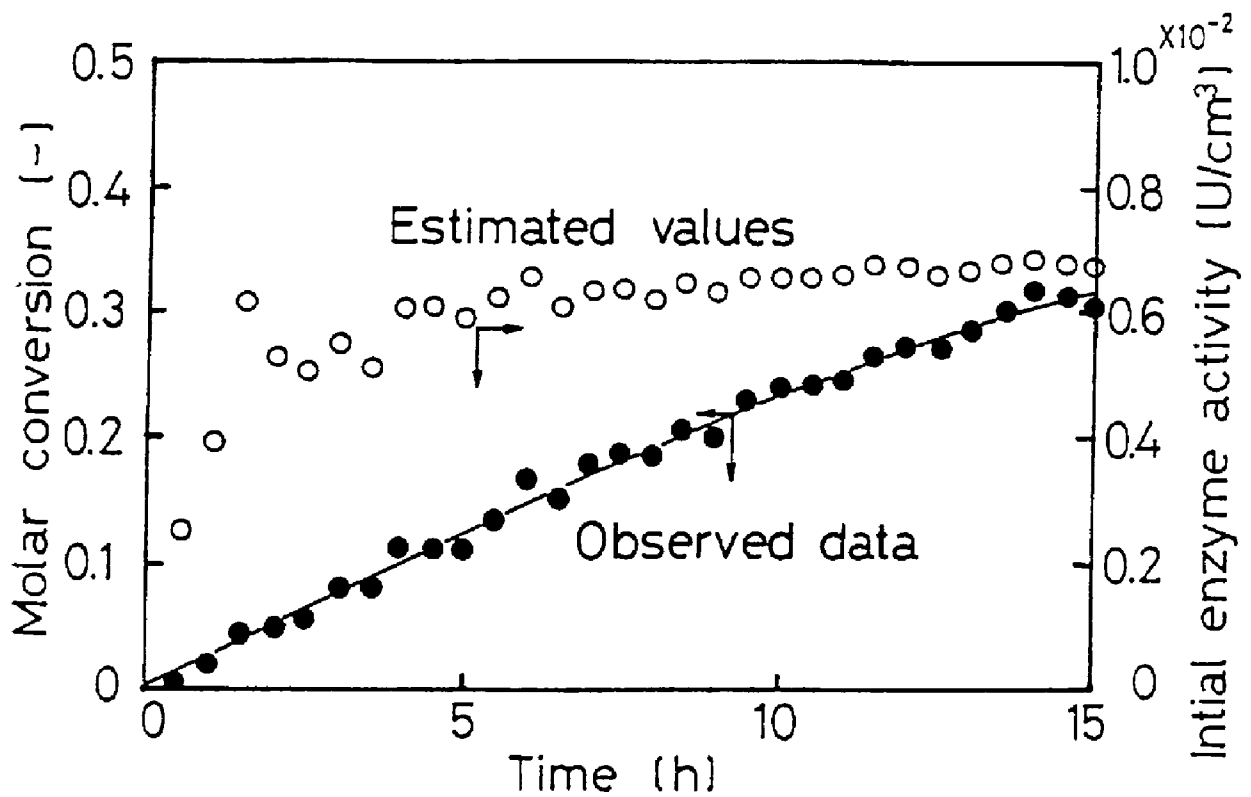


図 4 - 3 酵素活性推定機構による初期酵素活性推定結果

- : SOS組成観測値
- : 初期酵素活性推定値
- : 計算結果

## 4. 4 数値シミュレーション

### 4. 4. 1 酵素活性推定を行わない場合

連続エステル交換反応のスタートアップ操作を対象に、酵素活性推定を行わないFF/FB制御系を適用した。フィードバックコントローラのPIパラメータは $M_p=1.45$ ,  $M_i=0.04$ としたが、これらは前章に示した通り、SOS基準トリグリセリド組成の設定値からの絶対誤差積分を最小にするという評価関数の下で、直接探索法により求めた最適パラメータである。

なお、SOS基準トリグリセリド組成設定値は0.35、その他の計算条件は表4-1に示した通りである。以下、プロセスの変動要因として考えられる

- ① 酵素失活速度定数の不確定性
- ② 原料濃度の変動
- ③ 酵素活性初期値の変動

による影響について、シミュレーションを実施した。

#### (1) 酵素失活速度定数に不確定性がある場合

微生物保持粒子BSPsに固定化されたリパーゼの失活速度定数は、水分濃度を一定とした連続反応実験より(3-6)式として与えられている。しかし、水分濃度が動的に変化する状態では速度定数も変化することも考えられ、パラメータとしての不確定性が大きい。そこで、酵素失活速度定数を(3-6)式で求められる値からそれぞれ±10、30、50%変化させ、FF/FB制御系を適用し、失活速度定数に不確定性のある場合について、その制御性を検討した。結果を図4-4に示す。

表 4 - 1 原料液組成

反応基質	液相	固相	
トリグリセリド			
000	$8.258 \times 10^{-5}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
POP	$5.076 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
SOS	$1.272 \times 10^{-7}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
P00	$3.463 \times 10^{-5}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
S00	$9.909 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
S0P	$1.922 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
脂肪酸			
OA	$2.680 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
PA	$4.703 \times 10^{-5}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
SA	$7.625 \times 10^{-4}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
ジグリセリド			
00X	$1.364 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
P0X	$2.830 \times 10^{-6}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
S0X	$9.200 \times 10^{-7}$	0.000	mol/cm <sup>3</sup>
酵素	—————	$5.166 \times 10^{-3}$	U/cm <sup>3</sup>
水	$2.031 \times 10^{-6}$	$1.389 \times 10^{-3}$	mol/cm <sup>3</sup>

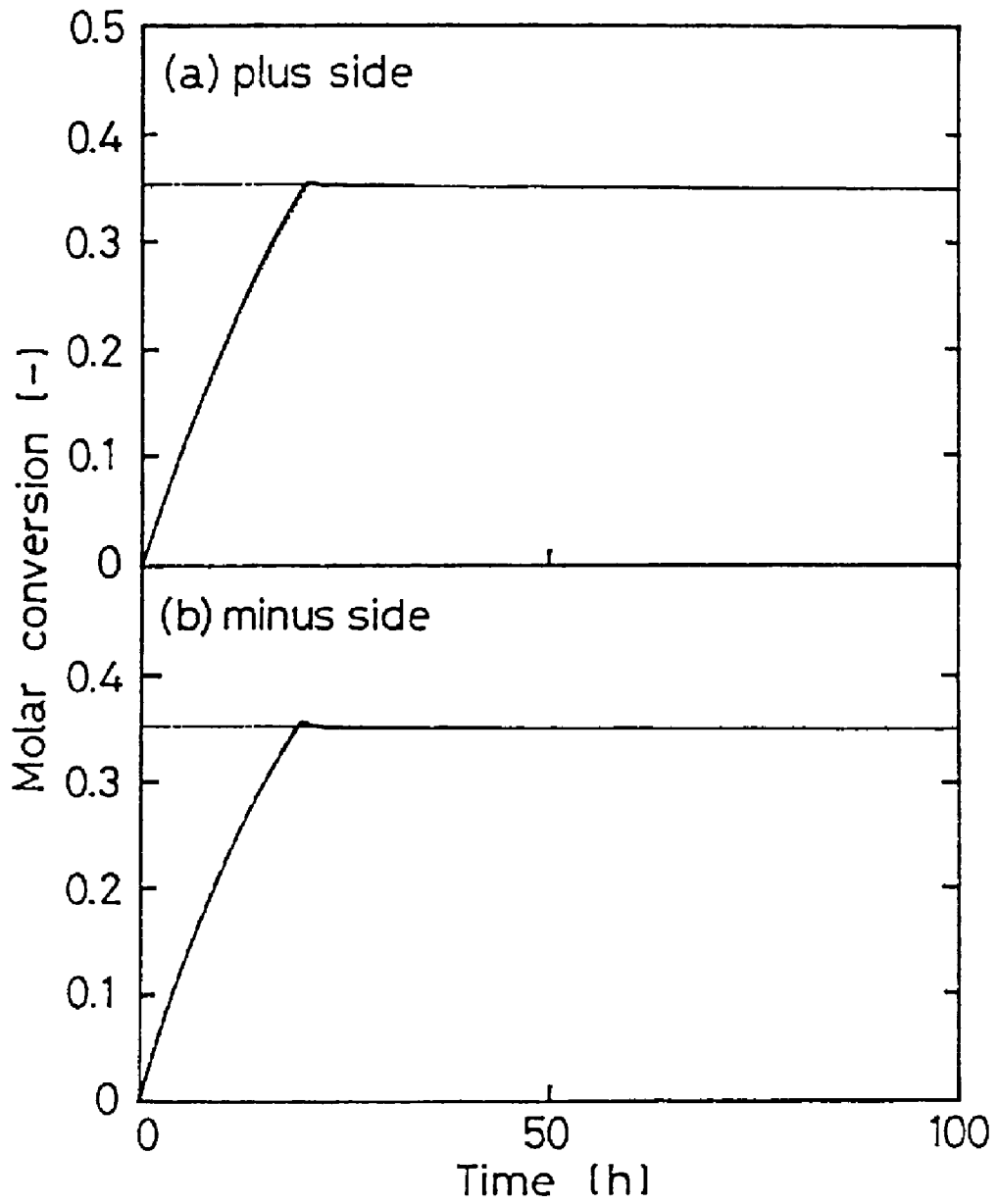


図 4 - 4 酵素失活速度定数に不確定性がある場合の  
フィードバック制御系の適用結果

— : ±10%                      - - - - : ±30%  
 ..... : ±50%                    - · - · - : 設定値

スタートアップ時、設定値到達後に微小なオーバーシュートが見られるが、その後は一定値に保たれている。このことから、失活速度定数の変動に対してはフィードバック動作が機能し、トリグリセリド組成を十分良好に定値制御できることが分った。

## (2) 原料濃度が変動する場合

原料中の基質濃度もメーカーや製造ロットの違いなどから変動する可能性があり、この場合外乱として作用する。そこで、原料中のステアリン酸濃度を反応開始50h後にそれぞれ±10、30、50%ステップ変化させて、制御性に及ぼす影響について検討した結果を図4-5に示す。ステアリン酸濃度の変動に関わらず、トリグリセリド組成は外乱投入後も一定値に保たれていることが分る。すなわち、原料組成の変動による影響はフィードバック制御により吸収され、原料組成変動に対しては、FF/FB制御系により制御できるという結果が得られた。

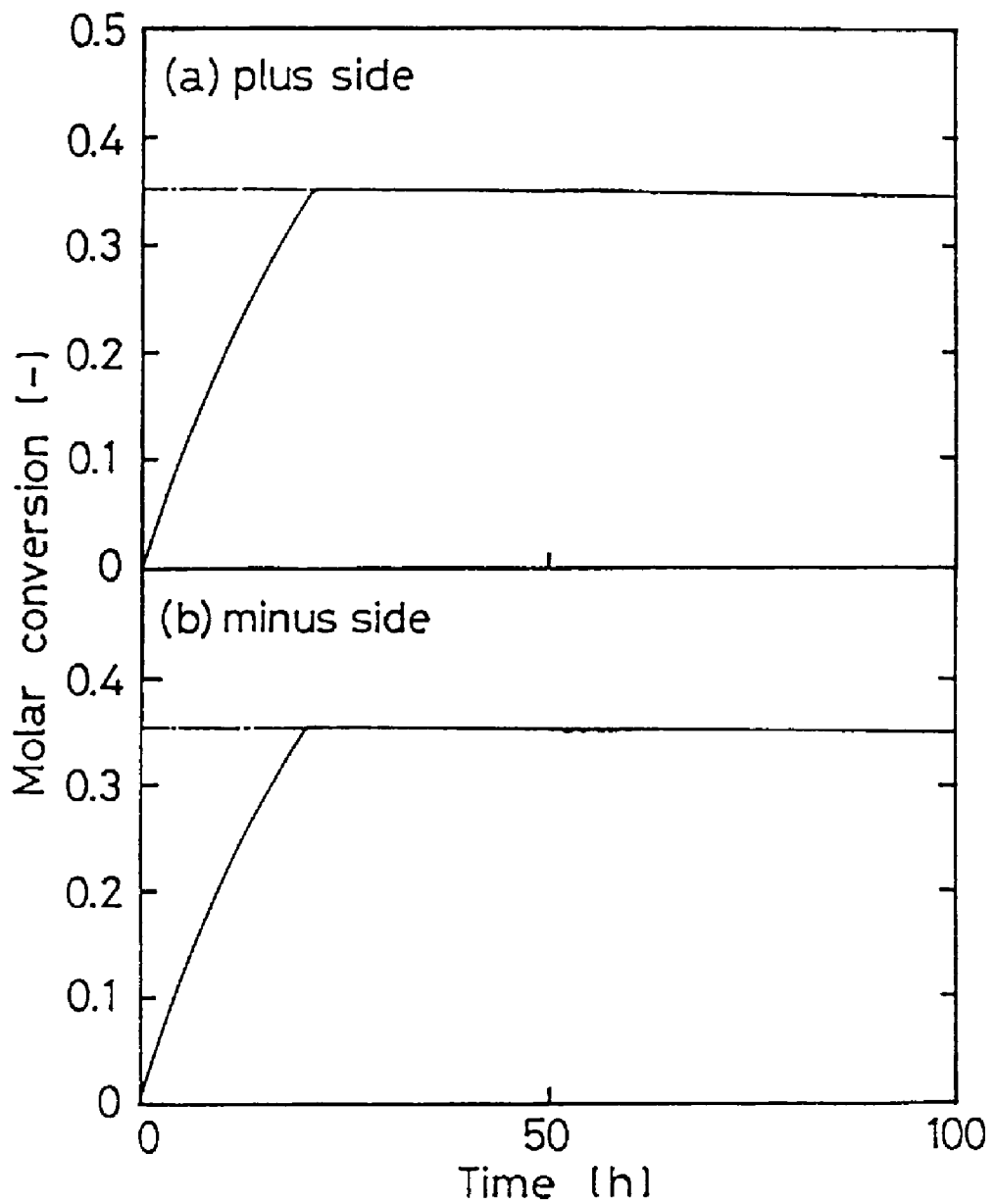


図 4-5 原料ステアリン酸濃度のステップ変動に対する  
フィードバック制御系の適用結果  
記号は図 4-4 と同じ。

### (3) 酵素活性初期値が変動する場合

既に述べたように、リパーゼの活性初期値は変動因子の一つであるため、酵素活性初期値を表4-1に示した値からそれぞれ±10、30、50%変化させ、制御性に及ぼす影響について検討を行った。結果を図4-6に示す。酵素活性を大きくした場合反応速度が大きくなり、設定値到達後およそ7hに亘り、最大3%近いオーバーシュートが生じている。逆に酵素活性が小さい場合、立ち上がり時のオーバーシュートはなくなるが、フィードバックコントローラのPIパラメータを再調整しないと設定値への収束が遅れ、実質上のオフセットが生じる。一方実プロセスにおいては、SOS基準トリグリセリド組成を設定値 $0.35 \pm 0.01$ の範囲に制御する必要がある。以上のことから、酵素活性初期値の変動がトリグリセリド組成の定値制御性に及ぼす影響は大きく、FF/FB制御系単独では制御が困難であることが分かった。

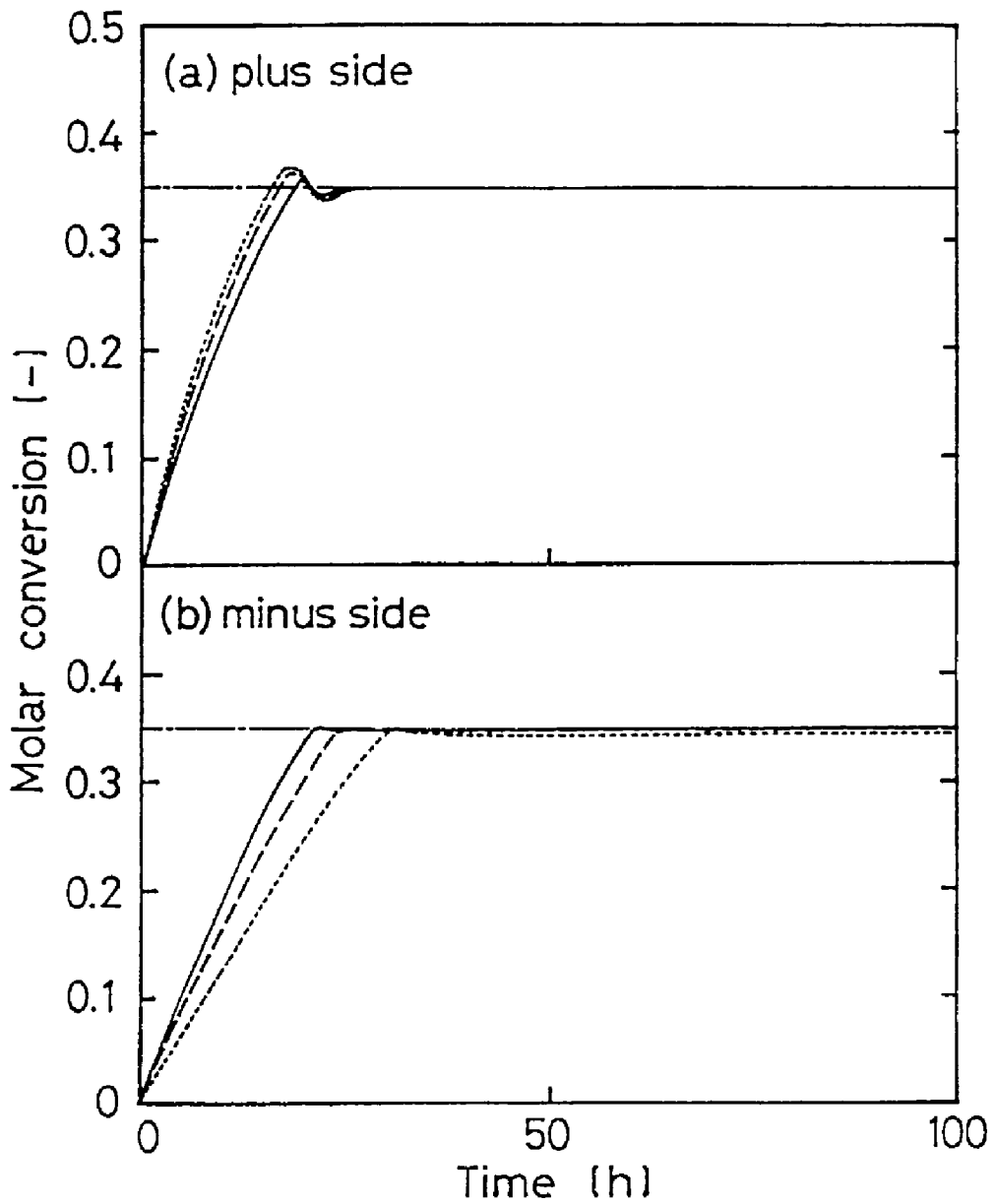


図 4 - 6 酵素活性初期値の変動に対するフィードバック制御系の適用結果  
記号は図 4 - 4 と同じ。

#### 4. 4. 2 酵素活性推定を行った場合

酵素活性推定機構により活性初期値が正確に推定されたものとして、前節に示した条件を用いてスタートアップ操作にFF/FB制御系を適用した結果を図4-7に示す。図4-6に示した酵素活性推定機構のないFF/FB制御の結果と比較して、オーバーシュートもほとんどなく、トリグリセリド組成の定値制御性を向上させることができ、酵素活性推定の有意性が確められた。

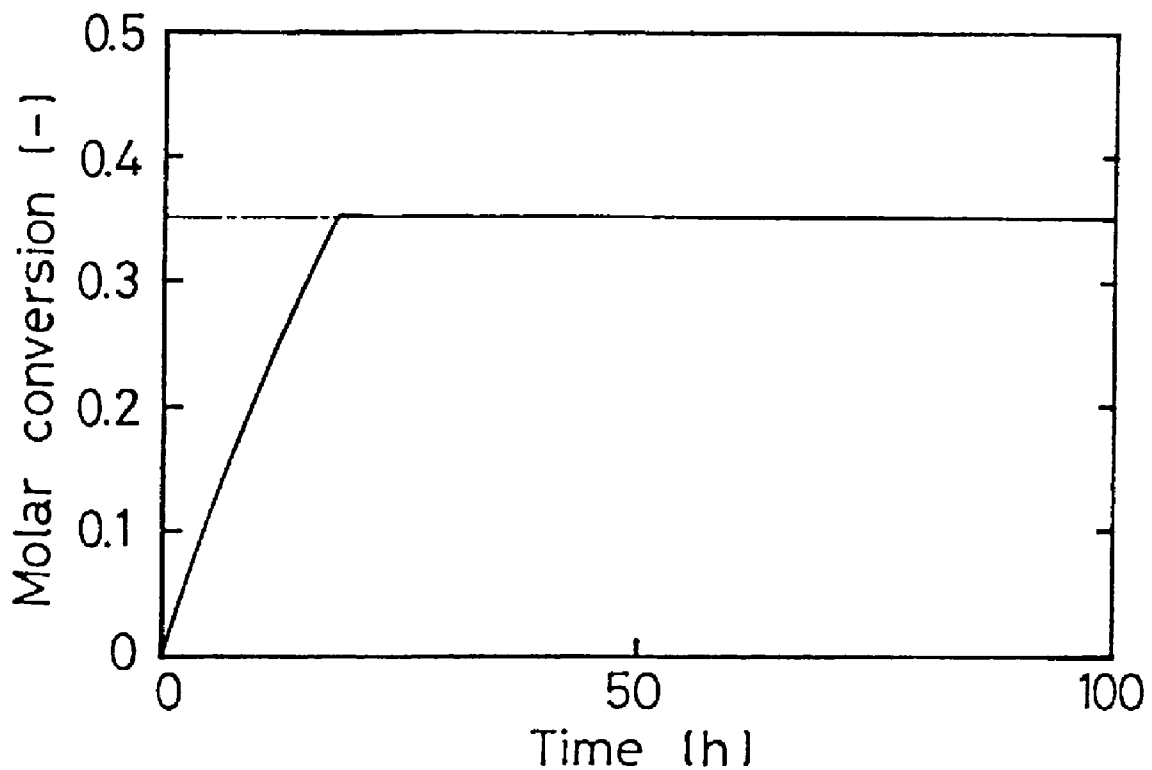


図4-7 酵素活性推定機構を有したフィードフォワード／フィードバック制御系の適用結果

## 4. 5 制御実験

### 4. 5. 1 スタートアップ実験

酵素活性推定機構を有したFF/FB制御系の実用性を評価するため、エステル交換反応のスタートアップ実験を実施した。結果を図4-8に示す。SOS基準トリグリセリド組成の設定値は0.35、液体クロマトグラフ分析装置のサンプリングタイムは30minとした。実線は酵素活性推定機構を有したFF/FB制御系を用いた場合、破線および点線は酵素活性推定機構のないFF/FB制御系を用いた場合であり、フィードフォワード制御量の算出に際して酵素活性初期値をそれぞれ+10%、-10%変動させた。図より明らかなように、酵素活性推定機構を有した制御系ではフィードフォワード制御量が正確に計算された結果、設定値にすみやかに収束し、良好な定値制御性が得られている。一方、酵素活性推定機構がなく、実際より活性が高いとした場合は、設定値到達後フィードバック動作が単独で機能するため、オーバーシュートが避けられない。また、その後もハンチングが起こるなど、定値制御性は悪い。逆に酵素活性が低いとした場合は、設定値に到達する前にフィードフォワード動作が働き、設定値に到達する前に原料供給が開始される。このため、フィードフォワード動作とフィードバック動作が互いに干渉し合い、SOS基準トリグリセリド組成は約0.34に留まり、設定値へ到達しない。以上のことから、連続エステル交換反応のスタートアップ操作において、酵素活性推定機構を有したFF/FB制御系の有意性が、シミュレーションのみならず実験からも確かめられた。

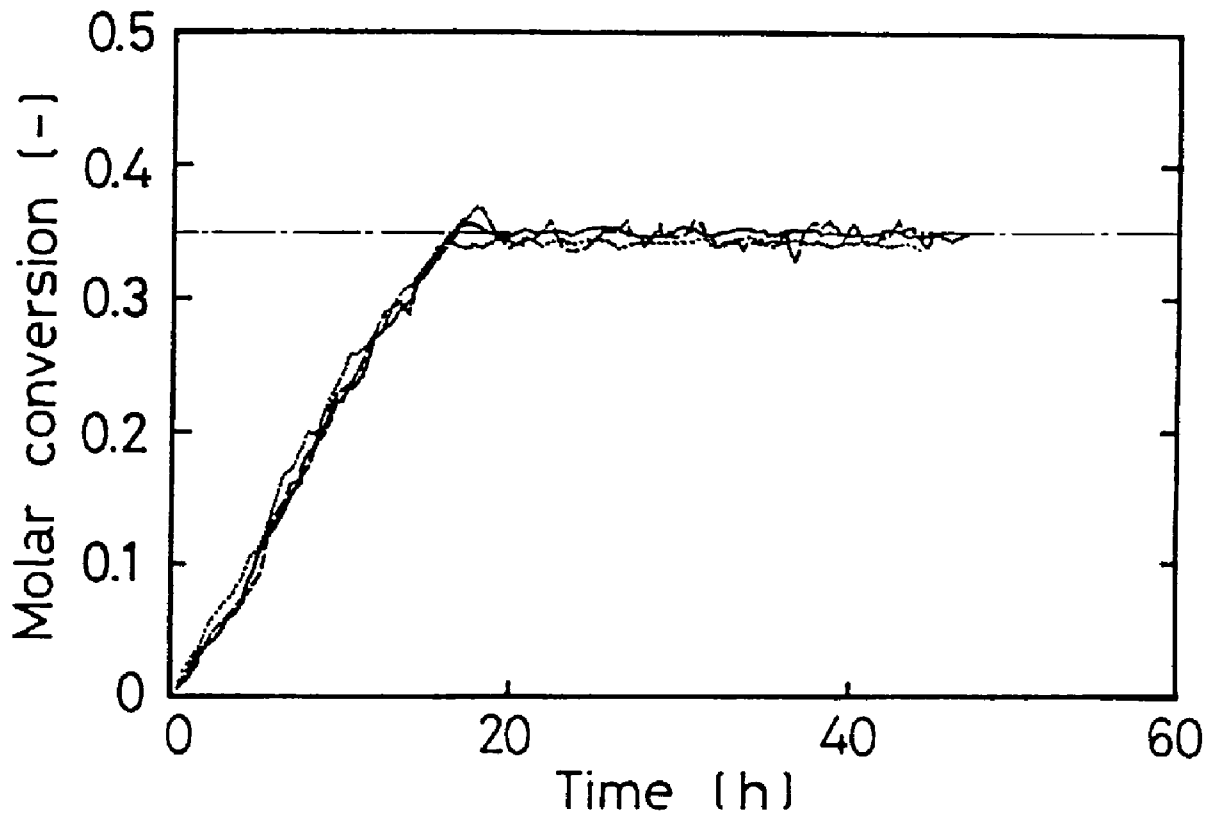


図4-8 フィードフォワード/フィードバック制御系による  
スタートアップ制御実験結果

—— : 酵素活性推定機構付      - - - - : +10%  
 ..... : -10%      - · - · - : 設定値

#### 4. 5. 2 外乱実験

外乱として、原料液のステアリン酸濃度を変動させた場合の制御実験結果を図4-9に示す。実線はステアリン酸濃度を+10%に、破線は-10%にそれぞれ時刻 $t=0$ でステップ変化させた場合の応答を表している。外乱を投入した直後、SOS基準トリグリセリド組成は両者とも幾分変動するものの、ほぼ設定値に保たれている。以上より、シミュレーションで予測されていたように、原料濃度の変動に対しては、フィードバック動作により制御できることが実験からも確かめられた。

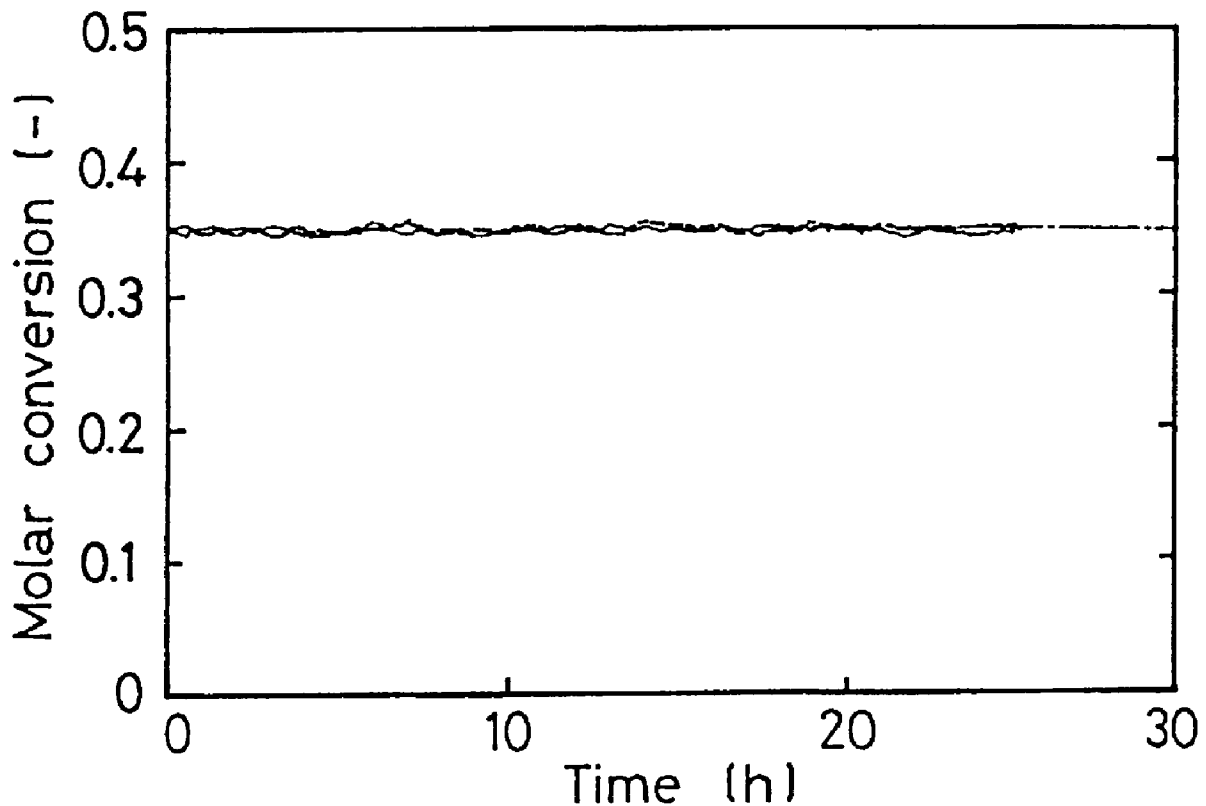


図4-9 フィードフォワード/フィードバック制御系による外乱制御実験結果

—— : +10%      - - - - : -10%  
- - - - : 設定値

#### 4. 6 結論

連続エステル交換反応プロセスでは、プラント操作上、酵素失活速度定数の不確定性、酵素活性初期値の変動および原料組成変動の3つがトリグリセリド組成の定値制御性を低下させる要因として考えられる。酵素失活速度定数の不確定性および原料組成の変動に対しては、フィードバック制御系単独により定値制御できることがシミュレーションにより確認された。一方、酵素活性初期値の変動に対しては、フィードバック制御系単独では制御不可能であることが分った。そのため、スタートアップ時の回分状態におけるトリグリセリドの観測データに基づいて初期酵素活性を反復推定するオンライン酵素活性推定機構を有したFF/FB制御系による定値制御システムを構築したところ、設定値からのオーバーシュートもなく、良好な定値制御性の得られることがシミュレーションおよび実験の両者より確められた。

## 第5章 微水系連続エステル交換反応の状態推定制御

### 5.1 緒言

連続エステル交換反応プロセスにおいては、原料濃度変動などの外乱や酵素失活によりトリグリセリド組成が変動するため、これを安定化させる制御システムの開発が重要である。このため前章では、オンライン高速液体クロマトグラフ分析装置により得られるSOS基準トリグリセリド組成、すなわち全トリグリセリド量に対するSOS量比を被制御変数とした酵素活性推定機構を有したフィードフォワード／フィードバック制御系を提案した。トリグリセリド組成は各トリグリセリドの濃度比を表しているにすぎず、プラントの工程管理から考えればSOS濃度を制御する必要がある。しかしながら、トリグリセリド濃度は直接測定することができない。

このように、通常のプロセス制御系で直接測定できるのは操作量と出力であり、状態量は必ずしも測定可能ではない。そのために状態量をフィードバックする制御が必要なときは、何らかの手段で状態推定を行わねばならない。状態変数の推定問題には、雑音の存在を考慮にいれない全く確定的な取扱いと雑音の存在を考慮した統計的な取扱いとがある。前者はD.G. Luenbergerの状態観測器 (State observer) としてよく知られており、後者としてはウィンナーフィルタの拡張としてのカルマンフィルタ理論が有名である。Takamatsuら<sup>48)</sup>や村上ら<sup>49)</sup>は、バイオプロセスへの応用として酵母の連続培養系における菌体濃度、基質濃度の推定に状態観測器の適用を試みた。しかしながら、状態観測器ではシステムに存在する種々の不確定性を考慮していないため、測定データやシステムにノイズが加わった場合、正確な状態推定が行えないなどの欠点を有している。これに対し、システムの状態方程式のみならずシステムや観測値に加わるノイズの性質、状態量の初期推定値などの先験的情報を基に、ノイズを排除して状態量を

逐次的に推定するオンラインデータ処理アルゴリズムとして開発されたのがカルマンフィルタである。カルマンフィルタは1960年代はじめにカルマンによって発表され、宇宙工学の分野で人工衛星の軌道推定に利用され成功をおさめた。その後、制御工学をはじめ通信工学、システム工学などにおける予測、推定問題に用いられるようになってきた。近年では、とくに精度の良いセンサーがあまり得られない培養プロセスや重合反応プロセスにおける状態推定やノイズ除去に多く適用されている<sup>50-66)</sup>。

本章では、連続エステル交換反応におけるトリグリセリドSOSの濃度推定にカルマンフィルタを適用した。さらに、カルマンフィルタによるSOS濃度推定値に基づいた状態推定制御系を構成し、その制御性に関してシミュレーションによる検討を行った。

## 5. 2 線形モデル

### 5. 2. 1 線形化

カルマンフィルタは、線形システムを対象として導かれた理論であり、連続エステル交換反応の動特性を表現する(3-1)～(3-4)式の非線形システム方程式に対し、定常操作点近傍で線形化を行い、線形化モデルを導いた。線形システム方程式は次式で表される。

$$\dot{\mathbf{x}}(t) = \mathbf{A} \mathbf{x}(t) + \mathbf{B} u(t) + \mathbf{D} d(t) \quad (5-1)$$

ここで、 $\mathbf{x}(t)$ は状態変数ベクトル、 $u(t)$ は操作変数、 $d(t)$ は外乱変数ベクトル、また $\mathbf{A}$ 、 $\mathbf{B}$ 、 $\mathbf{D}$ は各係数マトリックスであり、次式で表される。

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} C_b \\ C_s \\ C_{s,w} \end{bmatrix}, \quad \mathbf{u} = F_r, \quad \mathbf{d} = C_r \quad (5-2), (5-3), (5-4)$$

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & A_{22} \end{bmatrix}, \quad \mathbf{B} = \begin{bmatrix} B_1 \\ B_2 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{D} = \begin{bmatrix} D_1 \\ D_2 \end{bmatrix}$$

一方、線形化観測方程式は次式で表される。

$$\mathbf{y}(t) = \mathbf{H} \mathbf{x}(t) \quad (5-5)$$

$$\mathbf{y} = \begin{bmatrix} y_1 \\ \vdots \\ y_6 \end{bmatrix} \quad (5-6)$$

$$\mathbf{H} = \begin{bmatrix} H_1 & H_2 \end{bmatrix}$$

ここで、 $\mathbf{y}(t)$ は出力変数ベクトル、 $\mathbf{H}$ は係数マトリックスである。なお、定常操作条件は表5-1に、各係数マトリックスの要素はAppendix-5に示した通りである。

表5-1 定常操作条件

基質濃度	液相	固相	原料	
トリグリセリド				
000	$5.826 \times 10^{-6}$	$5.331 \times 10^{-6}$	$6.843 \times 10^{-5}$	mol/cm <sup>3</sup>
POP	$1.113 \times 10^{-6}$	$1.088 \times 10^{-6}$	$4.197 \times 10^{-6}$	mol/cm <sup>3</sup>
SOS	$5.919 \times 10^{-5}$	$5.965 \times 10^{-5}$	$1.074 \times 10^{-6}$	mol/cm <sup>3</sup>
P00	$4.935 \times 10^{-6}$	$4.706 \times 10^{-6}$	$3.391 \times 10^{-5}$	mol/cm <sup>3</sup>
S00	$3.189 \times 10^{-5}$	$3.207 \times 10^{-5}$	$9.226 \times 10^{-6}$	mol/cm <sup>3</sup>
S0P	$1.554 \times 10^{-5}$	$1.565 \times 10^{-5}$	$1.819 \times 10^{-6}$	mol/cm <sup>3</sup>
脂肪酸				
OA	$1.456 \times 10^{-4}$	$1.465 \times 10^{-4}$	$4.060 \times 10^{-7}$	mol/cm <sup>3</sup>
PA	$7.448 \times 10^{-5}$	$7.463 \times 10^{-5}$	$5.085 \times 10^{-5}$	mol/cm <sup>3</sup>
SA	$5.925 \times 10^{-4}$	$5.914 \times 10^{-4}$	$7.610 \times 10^{-4}$	mol/cm <sup>3</sup>
ジグリセリド				
00X	$5.389 \times 10^{-6}$	$5.290 \times 10^{-6}$	$1.902 \times 10^{-5}$	mol/cm <sup>3</sup>
POX	$2.453 \times 10^{-6}$	$2.437 \times 10^{-6}$	$4.661 \times 10^{-6}$	mol/cm <sup>3</sup>
SOX	$1.737 \times 10^{-5}$	$1.749 \times 10^{-5}$	$1.394 \times 10^{-6}$	mol/cm <sup>3</sup>
水	$3.249 \times 10^{-6}$	$3.592 \times 10^{-4}$	—————	mol/cm <sup>3</sup>
原料供給速度			2.0	cm <sup>3</sup> /min
酵素濃度			$1.031 \times 10^{-2}$	U/cm <sup>3</sup>

## 5. 2. 2 非線形モデルと線形モデルの比較

非線形モデルの線形化によって生じる誤差は、カルマンフィルタの推定精度に大きな影響を与える。(5-1)～(5-6)式で表される線形モデルが、元の非線形モデルの動特性をどの程度表現しているかをシミュレーションにより検討した。操作量である原料供給速度を、時刻 $t=0$ において定常操作条件の $2.0\text{cm}^3/\text{min}$ からそれぞれ $\pm 10$ 、 $20$ 、 $30\%$ ステップ変化させた場合のトリグリセリド組成の変化を図5-1および図5-2に示す。図5-1は原料000基準トリグリセリド組成 $y_1$ 、図5-2は製品S0S基準トリグリセリド組成 $y_6$ の応答である。 $y_1$ に関しては、線形モデル、非線形モデルによる計算結果が良好に一致している。一方 $y_6$ に関しては、定常状態で若干の誤差が生じているものの、両トリグリセリド組成の応答はほぼ一致しているといえる。しかしながら、モデルの精度の良さは、あとで行うこの線形化モデルを用いた状態推定制御系の結果を評価しないと判断することはできない。

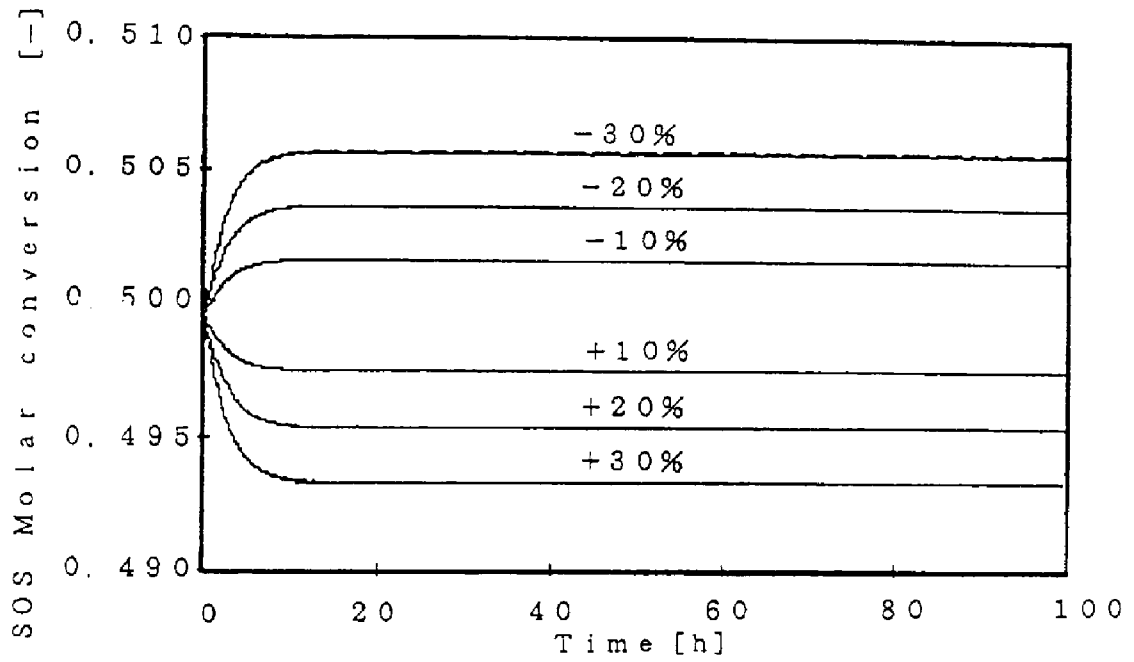


図5-1 原料供給速度のステップ変動に対する000基準トリグリセリド組成  $y_1$  の応答

————— : 非線形モデル      - - - - - : 線形モデル

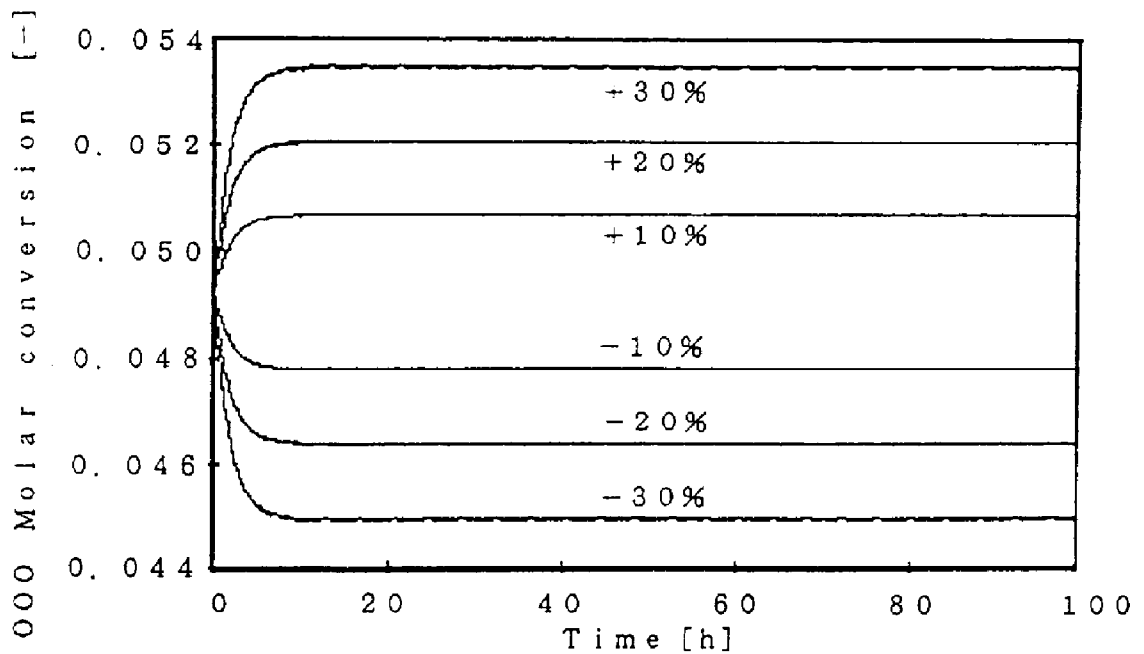


図5-2 原料供給速度のステップ変動に対するSOS基準トリグリセリド組成  $y_6$  の応答

————— : 非線形モデル      - - - - - : 線形モデル

## 5. 3 カルマンフィルタによる状態推定制御

### 5. 3. 1 推定機構

観測変数としての高速液体クロマトグラフ分析装置の分析データに比較的高レベルのノイズが加わっている場合や、システムに不確定なノイズが存在する連続エステル交換反応プロセスの定式化を行う。

(5-1) ~ (5-6) 式で表される線形連続時間システムに対して離散化を施す。 $u(t)$ 、 $d(t)$ をそれぞれ次式のステップ関数であるとする。

$$u(t) = u(k) \quad (5-7)$$

$$d(t) = d(k) \quad , \quad k\Delta t < t < (k+1)\Delta t \quad (5-8)$$

離散時刻  $t = k\Delta t$ 、 $(k+1)\Delta t$  に着目し  $z$  変換を施せば、(5-1) 式は次式に変換される。

$$x(k+1) = e^{A\Delta t} x(k) + \left( \int_0^{\Delta t} e^{A\tau} d\tau \right) B u(k) + \left( \int_0^{\Delta t} e^{A\tau} d\tau \right) D d(k) \quad (5-9)$$

(5-9) 式において、

$$P = e^{A\Delta t} \quad , \quad Q = \left( \int_0^{\Delta t} e^{A\tau} d\tau \right) B \quad , \quad R = \left( \int_0^{\Delta t} e^{A\tau} d\tau \right) D$$

とおけば、連続エステル交換反応プロセスは次式の離散系線形確率システム方程式によって表現することができる。

$$\mathbf{x}(k+1) = \mathbf{P} \mathbf{x}(k) + \mathbf{Q} u(k) + \mathbf{R} \mathbf{d}(k) \quad (5-10)$$

$$y(k) = \mathbf{H} \mathbf{x}(k) + \mathbf{v}(k) \quad (5-11)$$

ここで、 $\mathbf{d}(k)$ はガウス白色システム雑音ベクトル、 $\mathbf{v}(k)$ はガウス白色観測雑音ベクトルである。 $\mathbf{d}(k)$ 、 $\mathbf{v}(k)$ の平均値はそれぞれ0であり、その共分散行列は次式で表される。

$$E \left\{ \begin{bmatrix} \mathbf{d}(k) \\ \mathbf{v}(k) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{d}^T(k) & \mathbf{v}^T(k) \end{bmatrix} \right\} = \begin{bmatrix} \mathbf{M}(k) & 0 \\ 0 & \mathbf{N}(k) \end{bmatrix} \quad (5-12)$$

$\mathbf{M}$ はシステムノイズ共分散行列、 $\mathbf{N}$ は観測ノイズ共分散行列である。また、 $E \{ \mathbf{d}(k) \mathbf{x}^T(\kappa) \} = 0$ 、 $E \{ \mathbf{v}(k) \mathbf{x}^T(\kappa) \} = 0$ 、 $k > \kappa$ である。ここで $E$ は期待値演算子である。

(5-10)、(5-11)式で表される離散時間確率システムに対してカルマンフィルタは次の3つの式で構成される

フィルタ方程式：

$$\mathbf{z}(k+1) = \mathbf{P} \{ \mathbf{z}(k) + \mathbf{K}_c [ y(k) - \mathbf{H} \mathbf{z}(k) ] \} + \mathbf{Q} u(k) \quad (5-13)$$

カルマンゲイン：

$$\mathbf{K}_c(k) = \mathbf{L}(k) \mathbf{H}^T [ \mathbf{H} \mathbf{L}(k) \mathbf{H}^T + \mathbf{N}(k) ]^{-1} \quad (5-14)$$

推定誤差共分散行列：

$$\mathbf{L}(k+1) = \mathbf{P} \{ \mathbf{L}(k) - \mathbf{K}_c(k) \mathbf{H} \mathbf{L}(k) \} \mathbf{P}^T + \mathbf{R} \mathbf{M}(k) \mathbf{R}^T \quad (5-15)$$

(5-7) ~ (5-12) 式の計算の流れを、図5-3に示す。

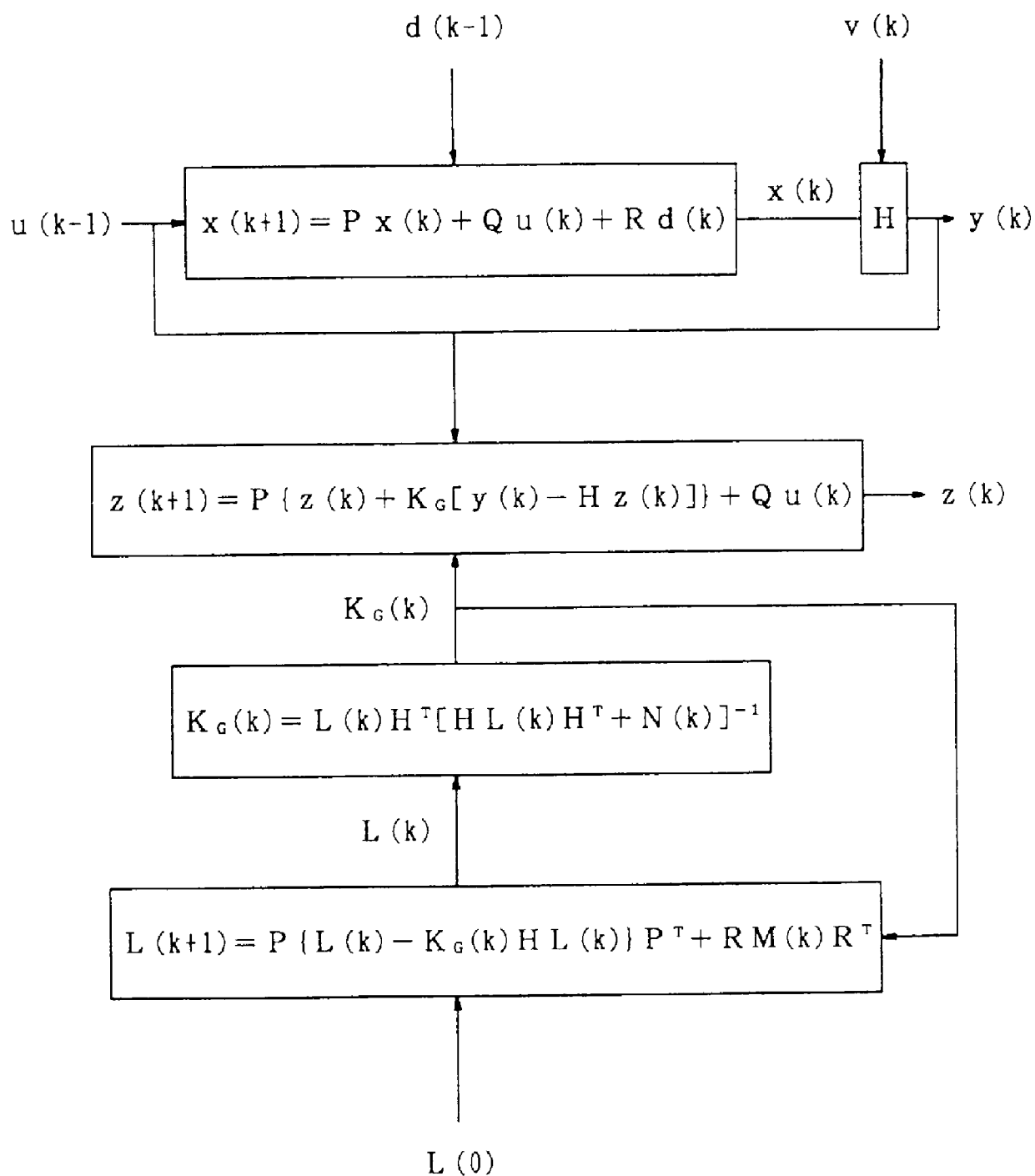


図5-3 カルマンフィルタにおける計算フロー

フィルタ方程式 (5-13) ~ (5-15) 式中の3つの共分散行列、推定誤差共分散行列L、システムノイズ共分散行列M、観測ノイズ共分散行列Nは、カルマンフィルタの推定性能に影響を及ぼすチューニングパラメータである。そのため、定常状態における状態推定問題を対象として、推定誤差積分を最小とする共分散行列のパラメータを直接探索により決定した。なお、状態変数の推定初期誤差として定常値の+1%を与えた。また観測ノイズとしては、液体クロマトグラフ分析装置の平均分析誤差（誤差平均0.62%、標準偏差0.36%）を考慮して、最大1%のノイズとなるように乱数で発生させた。定常状態におけるトリグリセリドSOS濃度の推定結果を図5-4に示す。推定誤差積分を最小とするパラメータである $L=0.0072$ 、 $M=0.0030$ 、 $N=0.0015$ を用いた場合、約60h後に推定初期誤差の影響は修正され真値に収束した。一方、パラメータ同定を行わない例として $L=M=N=0.0072$ と選んだ場合では、推定初期誤差の修正動作も緩慢で、共分散行列のパラメータが推定性能に大きな影響を及ぼすことが明らかである。

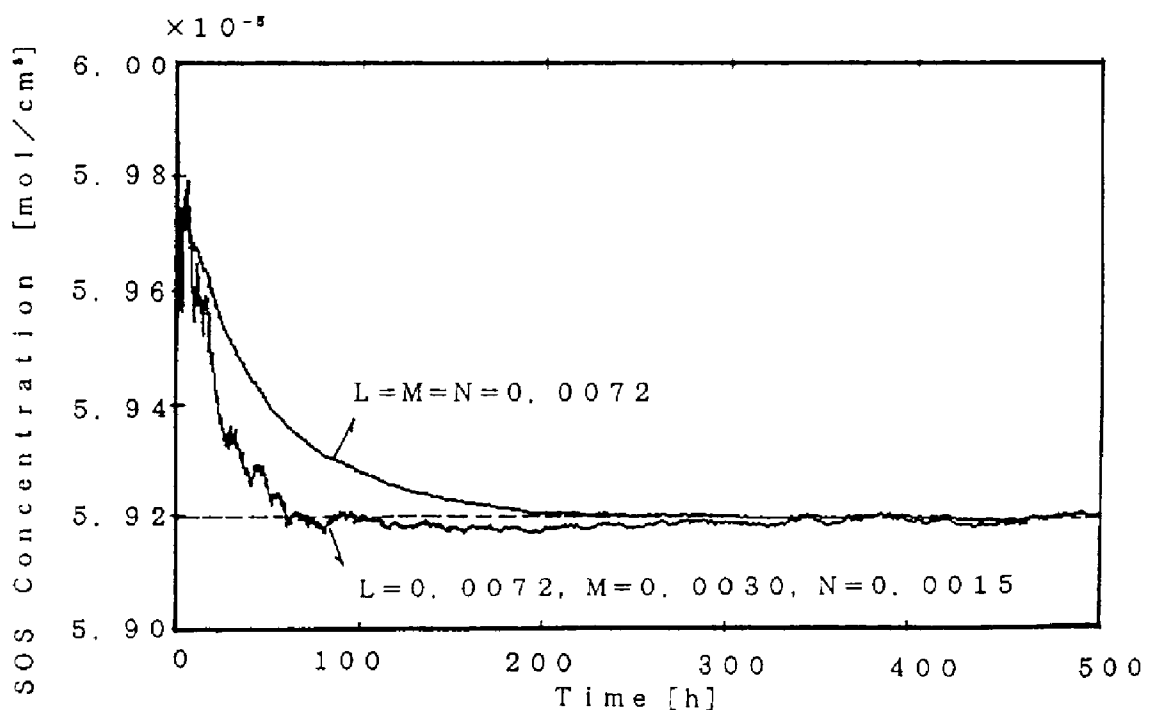


図5-4 SOS濃度の定常値推定結果に及ぼす共分散行列の影響

以上のことから、共分散行列のパラメータをチューニングしておけば、観測データにノイズが含まれる場合や初期値に推定誤差がある場合でも、カルマンフィルタにより製品トリグリセリドSOS濃度を良好に推定できることが分った。

次に、非定常状態における状態推定性能を評価するために、原料供給速度にステップ変動を与え、推定値が真値に追従するかどうかについて検討した。原料供給速度を定常操作条件からそれぞれ±5%、±10%ステップ変動させた場合のSOS濃度の応答を図5-5に示す。図から明らかなように、原料供給速度のステップ幅に依存せず、いずれの場合も推定初期誤差の影響はステップ操作後約60hで修正され、ほぼ真値に収束した。これにより、非定常状態においてもSOS濃度を良好に推定できることが分った。同時に、カルマンフィルタを用いた状態推定に際し、(5-1)～(5-6)式の線形化モデルが十分な精度を有していることが確められた。

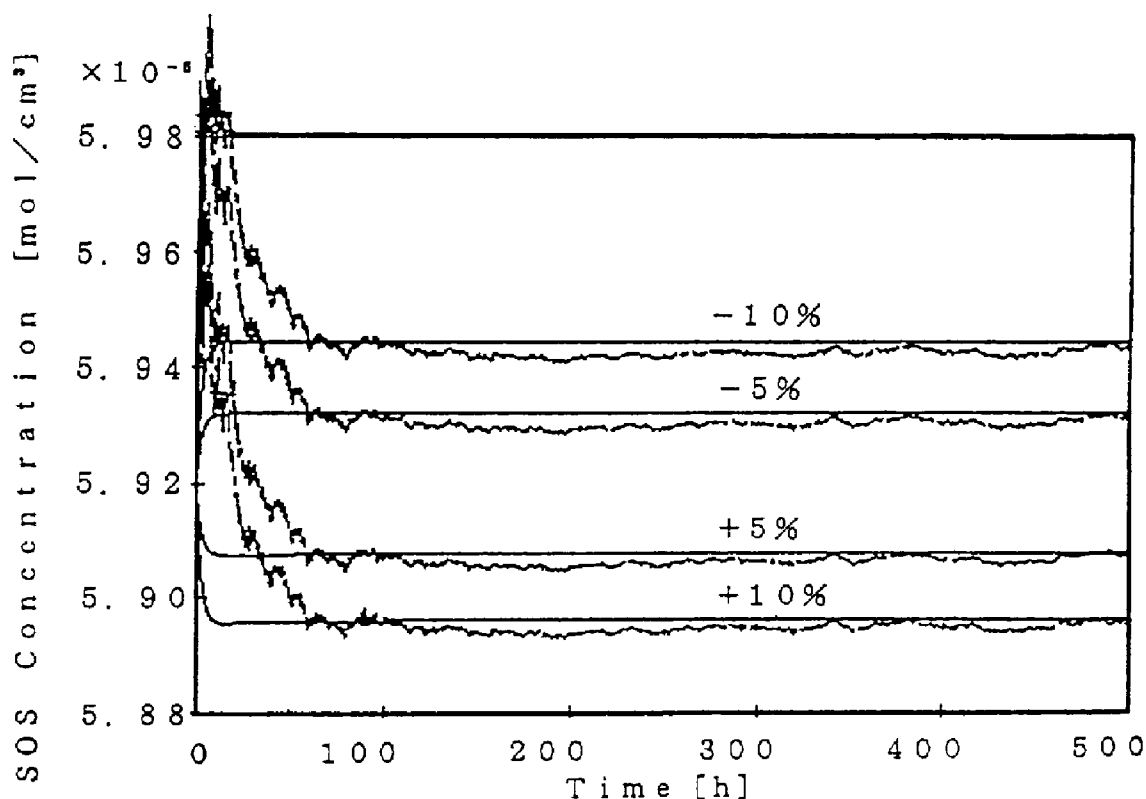


図5-5 カルマンフィルタによるSOS濃度の非定常状態推定結果  
 ———— : 実プロセス      - - - - - : 推定結果

### 5. 3. 2 制御結果

製品トリグリセリドSOS濃度の定値制御系として、カルマンフィルタによって推定されたSOS濃度のPIフィードバック制御系を構成した。なお、フィードバックコントローラのPIパラメータはZiegler-Nichols法により求め、比例ゲインは $-1.06 \times 10^7$ 、積分時間は29.7とした。制御性能を評価するために、SOS濃度設定値に+1%の設定値変化を与えた。シミュレーション結果を図5-6に示す。観測ノイズの最大値としては、1%および2%の2通りについてそれぞれ計算を行った。観測ノイズを現行の分析レベルである1%とした場合は、約100hで設定値に収束した。一方、観測ノイズを2%とした場合は、反応を開始して約50h後にオーバーシュートを起こし、その後も300h近くに亘り設定値へ収束しなかった。以上のことから、カルマンフィルタを用いた状態推定制御系により、トリグリセリドSOS濃度は良好に一定値に制御することができるが、この場合観測ノイズを現行の1%程度に抑える必要のあることが分った。

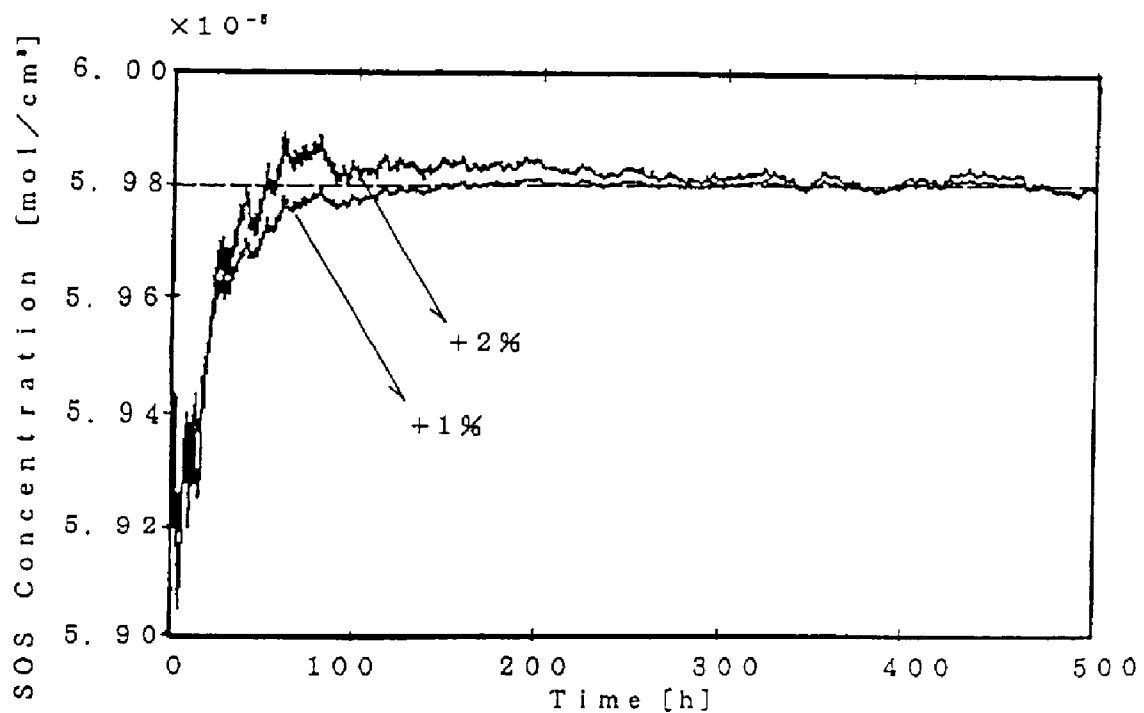


図5-6 状態推定制御性能に及ぼす観測ノイズの影響

つぎに、カルマンフィルタにおける推定初期誤差が制御性に及ぼす影響について検討を行った。状態変数の推定初期誤差をそれぞれ+1%および+2%とした場合の設定値変更による制御結果を図5-7に示す。初期推定誤差が1%の場合は比較的良好な制御性が保たれているが、初期誤差が2%と大きくなると、状態フィードバックにより操作量である原料供給速度が一時的に増加する。これにより、SOS濃度は初期値の $5.92 \times 10^{-5} \text{mol/cm}^3$ から $5.86 \times 10^{-5} \text{mol/cm}^3$ まで一旦急激に低下し、その後増加するという挙動を示しており、反応開始直後に制御性が著しく低下することが確認された。したがって、推定初期誤差をできる限り小さくする、すなわちシミュレーションの初期値である反応開始時の組成分析値の精度を確保することがきわめて重要であることが分った。

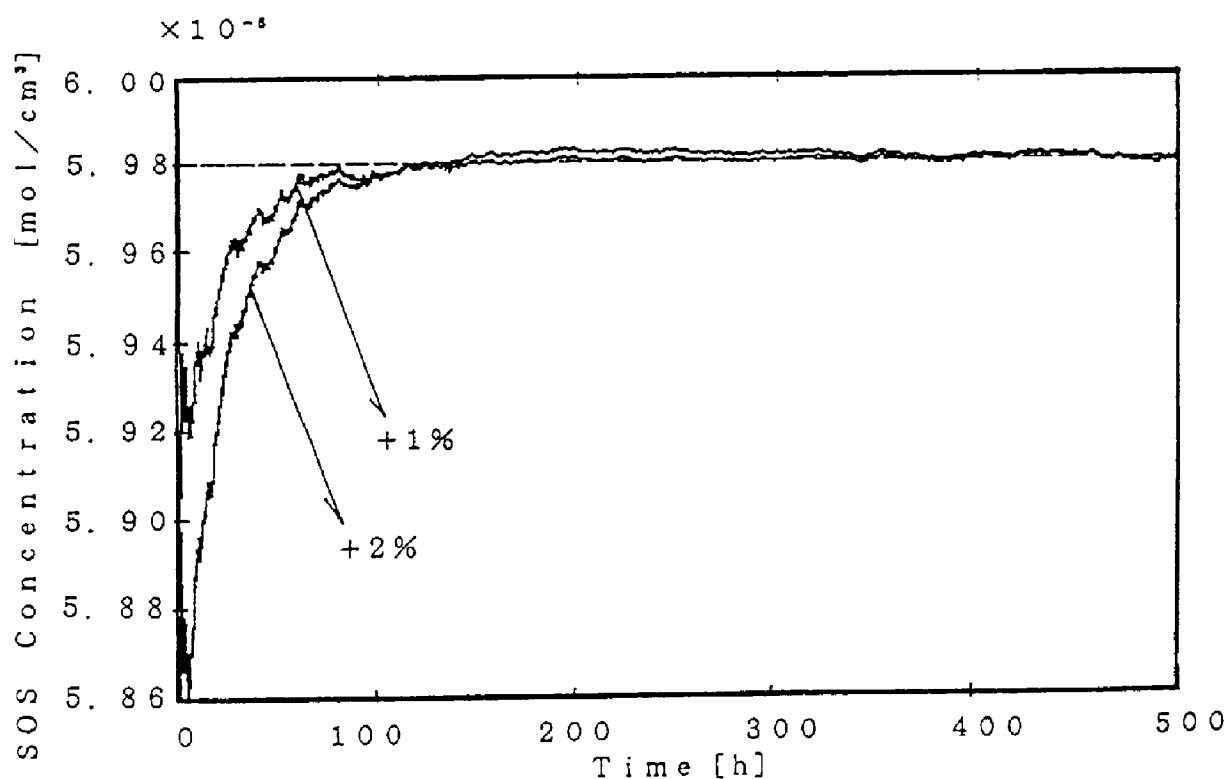


図5-7 状態推定制御性能に及ぼす推定初期誤差の影響

## 5. 4 結論

固定化微生物由来リパーゼによる油脂の連続エステル交換反応プロセスを対象に、製品トリグリセリドSOS濃度の定値制御システムについて検討した。SOS濃度は直接測定が不可能なため、高速液体クロマトグラフ分析装置により得られるトリグリセリド組成の観測データに基づいたカルマンフィルタによる状態推定制御系を構築した。

SOS濃度の状態推定に関しては、フィルタパラメータである誤差共分散行列のチューニングにより良好に状態推定できることが確かめられた。一方、カルマンフィルタによって推定されたSOS濃度に関する状態推定制御系に関しては、現行レベルの観測ノイズならびに推定初期誤差が存在しても良好な定値制御性の得られることがシミュレーション結果から明かとなった。しかしながら、ノイズレベルの増大は制御性に重大な影響を及ぼすため、ノイズの発生を極力抑制することが重要と考えられた。さらに、(5-1)～(5-6)式で示される線形化モデルは、カルマンフィルタによる状態推定および制御に有効であることが併せて確認された。

昨今、バイオプロセスのみならず広く化学プロセスにおいて、種々のクロマトグラフ分析装置によるオンライン分析が取り入れられつつあり、非観測状態量の推定、制御や観測データのノイズフィルタリングにカルマンフィルタなどの状態推定手法の利用が期待されるが、本研究のように、いかに精度のよい線形モデルが得られるかが問題である。例えば、CSTRによる非線形性の強い化学反応プロセスでは、精度よい線形化モデルを得ることは困難であり、良好な制御結果を期待することはできないと考えられる。

## 総括

本研究は、菌体内に高リパーゼ活性を有する微生物の乾燥菌体を直接リパーゼ酵素剤として用いた、油脂のエステル交換反応プロセスの反応制御システムについて工学的検討を加えたものである。

第1章では、油脂の酵素的エステル交換反応ならびにバイオプロセスの制御システムの現状についての調査結果から、とくに固定化微生物由来リパーゼを用いた微水系バイオリアクターにおける反応器操作上の課題と、課題解決のための方法論を示すことにより、本研究の目的と意義を明確化した。

第2章では、リパーゼを用いた油脂の回分式エステル交換反応を対象に、グリセリドと酵素が複合体を形成し反応中間体として働くとした改良グリセリド酵素複合体モデルを導き、同モデルが反応基質のみならず微水反応系において重要な状態量である水分濃度の微小な経時変化まで良好に表現できることを実験およびシミュレーションにより明かにした。

第3章では、改良グリセリド酵素複合体モデルにリパーゼの失活を考慮した連続モデルに基づき、グリセリド生成量と反応液水分濃度との関係から、製品トリグリセリドの生成量を最大にする最適水分濃度が90ppm近傍に存在することをシミュレーションにより確めた。さらに、加水分解反応により生じる副生成物ジグリセリドを抑制し、かつ製品トリグリセリド組成を一定に保つための水分濃度、トリグリセリド組成の同時フィードバック制御系を設計し、各出力を独立に制御できることを実験およびシミュレーションにより確認した。

第4章では、トリグリセリド組成の定値制御を目的としたオンライン酵素活性推定機構を有したフィードフォワード／フィードバック制御系を設計し、連続反応系におけるスタートアップ操作および外乱としての原料基質濃度の変動などに対して、フィードバック制御系単独の場合より良好な制御性を有していることを実験およびシミュレーションにより確認した。

第5章では、直接測定することのできないトリグリセリドSOS濃度を制御するため、線形化モデルに基づいたカルマンフィルタによる状態推定制御系を設計した。カルマンフィルタによれば、液体クロマトグラフ分析装置による観測ノイズを除去することが可能であり、SOS濃度が良好に推定制御できることがシミュレーションにより確認できた。さらに、状態推定制御系における線形化モデルの有用性を併せ確認した。

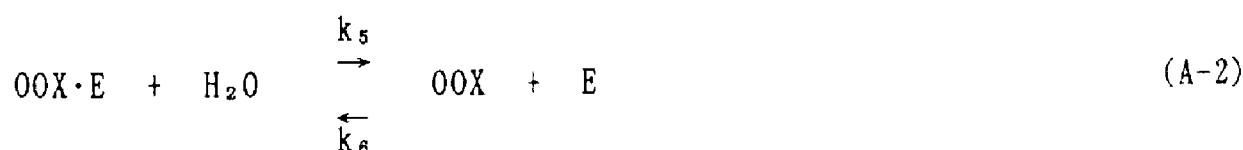
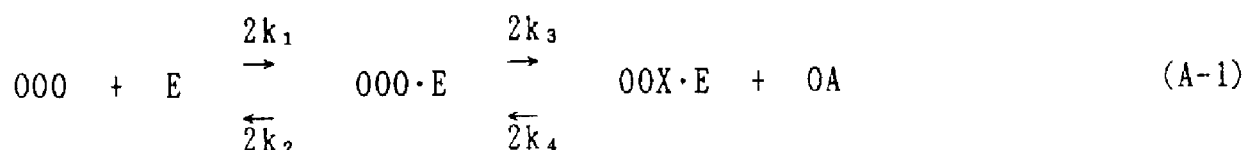
Appendix-1 グリセリド酵素複合体モデルに基づいた  
エステル交換反応速度式

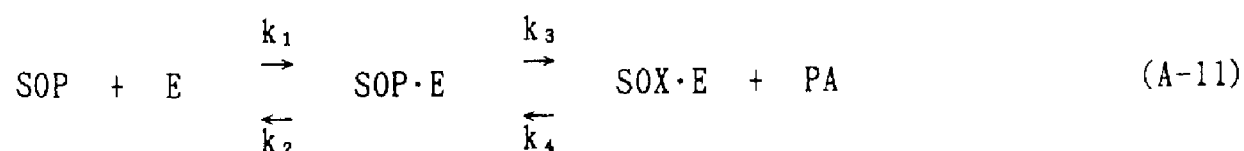
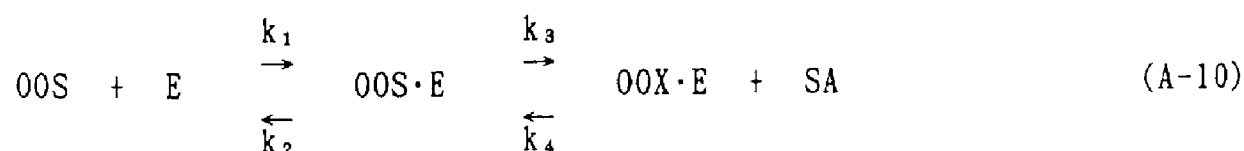
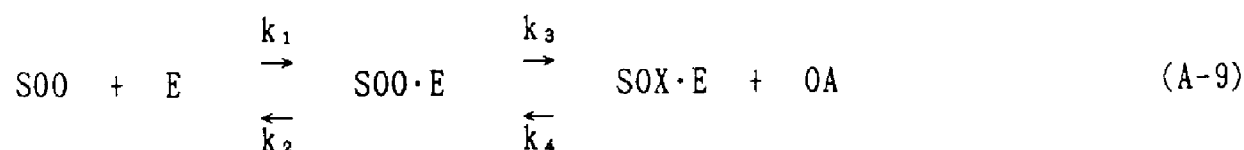
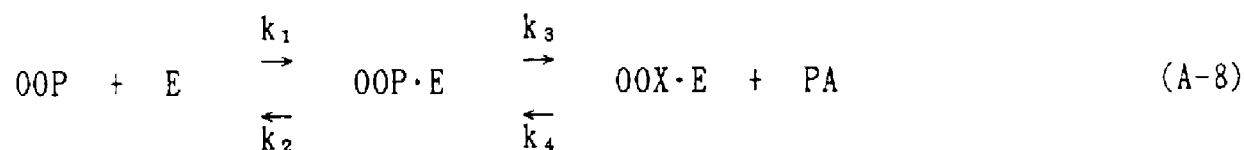
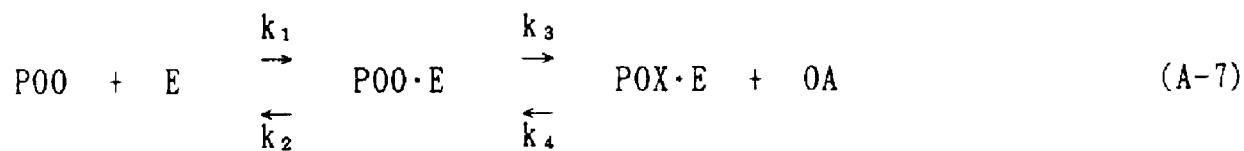
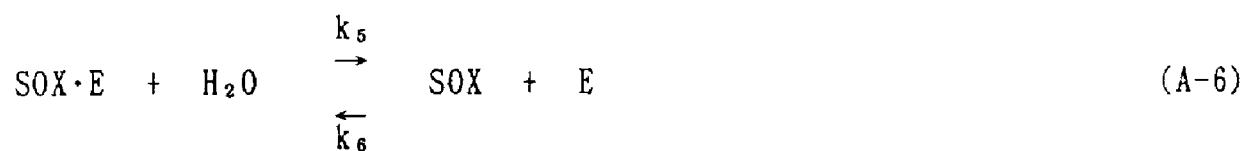
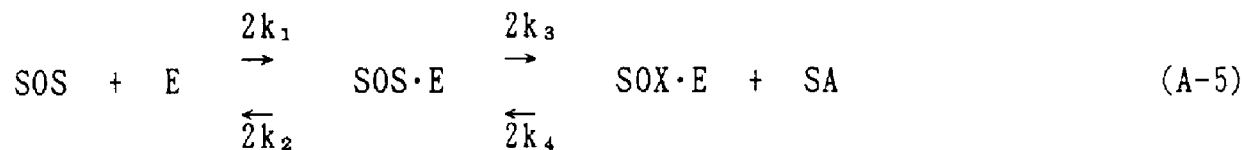
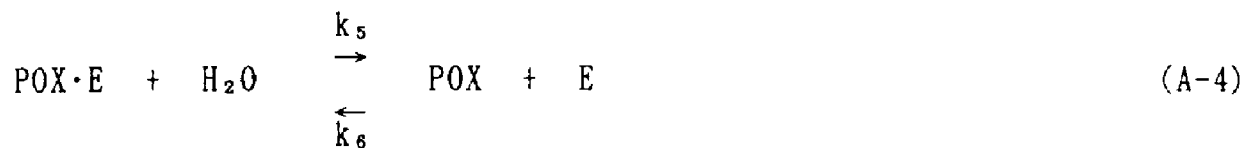
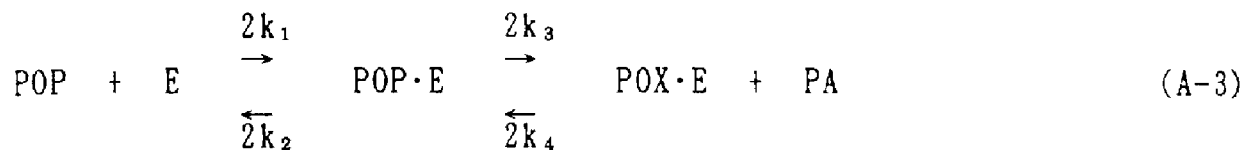
グリセリド酵素複合体モデル<sup>6,7)</sup>は、エステル交換、加水分解反応においてグリセリドと酵素が複合体を形成し、反応中間体として作用すると仮定したモデルで、以下の仮定が設けられている。

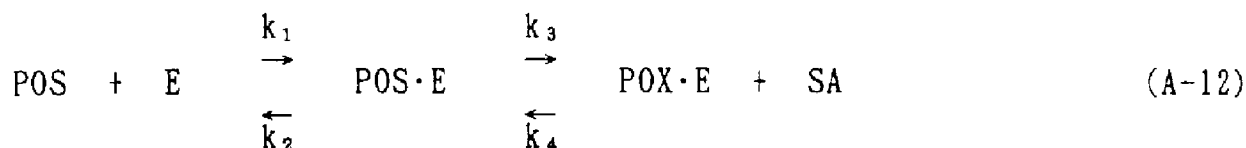
【仮定】

1. *R. chinensis*由来リパーゼは、トリグリセリドの1、3位特異性を有しており、2位の脂肪酸残基は酵素により攻撃されない。
2. 本反応条件下ではモノグリセリドの生成は認められず、モデル化の考慮外とする。
3. トリグリセリドの1、3位に同一アシル基の入った対称型トリグリセリド（例えばSOSなど）の分解速度は、確率的観点から非対称型トリグリセリド（例えばS00など）の分解速度の2倍とする。
4. リパーゼは脂肪酸特異性を有しておらず、アシル基の種類によって反応速度は異ならない。

これにより、グリセリド酵素複合体モデルによる反応速度式は (A-1) ~ (A-12) 式で示される。







ここでO、P、Sはそれぞれオレイン酸基、パルミチン酸基、ステアリン酸基を、またXは水酸基を表すものとする。したがって、例えばSOXは1位にステアリン酸基、2位にオレイン酸基を有するジグリセリド、SOPはステアリン酸基、オレイン酸基、パルミチン酸基からなるトリグリセリドを意味する。原料トリグリセリド000とステアリン酸SAから製品トリグリセリドSOSが合成される過程は以下の通りである。

1. 原料トリグリセリド000は、(A-1)式により酵素とトリグリセリド酵素複合体000・Eを形成し、瞬時にジグリセリド酵素複合体00X・Eと遊離脂肪酸0Aに分解する。
2. 00X・Eは、(A-10)式により新しい遊離脂肪酸SAと反応し、トリグリセリド酵素複合体00S・Eを経て00Sとなる。
3. S00は、(A-9)式によりSOX・Eと0Aに分解する。
4. SOX・Eは、(A-5)式により再び遊離脂肪酸SAと反応し、中間体を経て製品トリグリセリドSOSとなる。

なお加水分解反応は、エステル交換反応の中間体であるジグリセリド酵素複合体と水との間に生じる。また、エステル交換反応、加水分解反応は共に可逆反応である。

上式において、グリセリド酵素複合体に関して擬定常状態を仮定すれば、油脂のエステル交換反応における反応速度式は、各基質ごとに次式のように表される。

トリグリセリド (000, POP, SOS, P00, S00, SOP) に関して、

$$r_{000} = N \cdot C_{000} + \frac{L}{M} (P \cdot Q_0 + k_6 \cdot C_{00x}) \cdot C_{0a} \quad (\text{A-13})$$

$$r_{p0p} = N \cdot C_{p0p} + \frac{L}{M} (P \cdot Q_p + k_6 \cdot C_{p0x}) \cdot C_{pa} \quad (\text{A-14})$$

$$r_{s0s} = N \cdot C_{s0s} + \frac{L}{M} (P \cdot Q_s + k_6 \cdot C_{s0x}) \cdot C_{sa} \quad (\text{A-15})$$

$$r_{p00} = N \cdot C_{p00} + \frac{L}{M} \{ (P \cdot Q_p + k_6 \cdot C_{p0x}) \cdot C_{0a} + (P \cdot Q_0 + k_6 \cdot C_{00x}) C_{pa} \} \quad (\text{A-16})$$

$$r_{s00} = N \cdot C_{s00} + \frac{L}{M} \{ (P \cdot Q_s + k_6 \cdot C_{s0x}) \cdot C_{0a} + (P \cdot Q_0 + k_6 \cdot C_{00x}) C_{sa} \} \quad (\text{A-17})$$

$$r_{s0p} = N \cdot C_{s0p} + \frac{L}{M} \{ (P \cdot Q_p + k_6 \cdot C_{p0x}) \cdot C_{sa} + (P \cdot Q_s + k_6 \cdot C_{s0x}) C_{pa} \} \quad (\text{A-18})$$

脂肪酸 (オレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸) に関して、

$$r_{0a} = P \cdot Q_0 \cdot M_e - \frac{k_4 \cdot k_2}{M} (2P \cdot I + k_6 \cdot J) \cdot M_e \cdot C_{0a} \quad (\text{A-19})$$

$$r_{pa} = P \cdot Q_p \cdot M_e - \frac{k_4 \cdot k_2}{M} (2P \cdot I + k_6 \cdot J) \cdot M_e \cdot C_{pa} \quad (\text{A-20})$$

$$r_{sa} = P \cdot Q_s \cdot M_e - \frac{k_4 \cdot k_2}{M} (2P \cdot I + k_6 \cdot J) \cdot M_e \cdot C_{sa} \quad (\text{A-21})$$

ジグリセリド (OOX,POX,SOX) に関して、

$$r_{oox} = -k_6 \cdot M_e \cdot C_{oox} + \frac{Q}{M} (P \cdot Q_o + k_6 \cdot C_{oox}) \cdot M_e \quad (A-22)$$

$$r_{pox} = -k_6 \cdot M_e \cdot C_{pox} + \frac{Q}{M} (P \cdot Q_p + k_6 \cdot C_{pox}) \cdot M_e \quad (A-23)$$

$$r_{sox} = -k_6 \cdot M_e \cdot C_{sox} + \frac{Q}{M} (P \cdot Q_s + k_6 \cdot C_{sox}) \cdot M_e \quad (A-24)$$

水は加水分解反応にのみ関与し、ジグリセリドに対して等モルの反応を行うことから

$$r_w = -r_{oox} - r_{pox} - r_{sox} \quad (A-25)$$

となる。

ただし、

$$H = C_{oa} + C_{pa} + C_{sa}$$

$$I = C_{ooo} + C_{poo} + C_{pop} + C_{soo} + C_{sop} + C_{soo}$$

$$J = C_{oox} + C_{pox} + C_{sox}$$

$$L = k_2 \cdot k_4 \cdot M_e$$

$$M = k_2 \cdot k_4 \cdot H + (k_2 + k_3) k_5 \cdot C_{s,w}$$

$$M_1 = (2 k_4 \cdot P \cdot I + k_4 \cdot k_6 \cdot J) H$$

$$M_2 = 2 k_1 \cdot k_3 \cdot I + k_6 (k_2 + k_3) J$$

$$M_e = \frac{C_e}{1 + \frac{2 k_1 \cdot I}{k_2 + k_3} + \frac{M_1 + M_2}{M}}$$

$$N = \frac{2 k_1 \cdot k_3}{(k_2 + k_3)} M_e$$

$$P = \frac{k_1 \cdot k_3}{k_2 + k_3}$$

$$Q = (k_2 + k_3) k_5 \cdot C_{s, w}$$

$$Q_o = 2 C_{ooo} + C_{poo} + C_{soo}$$

$$Q_p = C_{poo} + 2 C_{pop} + C_{sop}$$

$$Q_s = C_{soo} + C_{sop} + 2 C_{soe}$$

## Appendix-2 反応速度定数および総括物質移動係数 $K_w$ の推定手順

1. 誤差関数を次式で定義する。

$$\text{Error} = \sum_{i=1}^{12} \int_0^t (R_{i, \text{exp}} - R_{i, \text{cal}})^2 dt \quad (\text{A-26})$$

ここで

$$R_1 = C_{b, \text{ooo}} / C_t, \quad R_2 = C_{b, \text{poo}} / C_t,$$

$$R_3 = C_{b, \text{pop}} / C_t, \quad R_4 = C_{b, \text{soo}} / C_t,$$

$$R_5 = C_{b, \text{sop}} / C_t, \quad R_6 = C_{b, \text{soo}} / C_t,$$

$$R_7 = C_{b, \text{oa}} / C_z, \quad R_8 = C_{b, \text{pa}} / C_z,$$

$$R_9 = C_{b, \text{sa}} / C_z, \quad R_{10} = C_t / C_{tt}$$

$$R_{11} = C_z / C_{tt}, \quad R_{12} = C_d / C_{tt}$$

$$C_t = C_{b, \text{ooo}} + C_{b, \text{poo}} + C_{b, \text{pop}} + C_{b, \text{soo}} \\ + C_{b, \text{sop}} + C_{b, \text{soo}}$$

$$C_z = C_{b, \text{oa}} + C_{b, \text{pa}} + C_{b, \text{sa}}$$

$$C_d = C_{b, \text{oox}} + C_{b, \text{pox}} + C_{b, \text{sox}}$$

$$C_{tt} = C_t + C_z + C_d$$

また、expは実験値、calは計算値を示す。

2. (2-4) 式において  $dC_{b, w} / dt = 0$  とし、 $C_{b, w}$  は定数として実験における水分濃度設定値を与える。また、 $C_{s, w}$  の初期値として (2-6) ~ (2-8) 式で求められる平衡な水分濃度を設定する。
3.  $k_1 \sim k_6$  および  $K_w$  に関して、誤差関数 (A-26) 式を最小とするように交互一変数探索法によりパラメータ探索を行う。

4. バルク水分濃度  $C_{b,w}$  の各水準値ごとに 1 ~ 3 の手順を繰り返し、得られた  $K_w$  について平均値を求め、 $K_w$  とする。
5. 得られた  $K_w$  を用いて、 $k_1 \sim k_6$  に関して再び 1 ~ 3 の手順を繰り返し、得られた値をパラメータ探索結果とする。

### Appendix-3 初期酵素活性の探索手順

1. 初期酵素活性の初発探索区間を設定する。本研究では探索区間として0.0から0.1を設定した。
2. 探索区間を10等分割し、各初期酵素活性の下で(3-1)~(3-6)式を時刻t=0から観測データの得られた現時刻まで積分する。
3. 評価関数を次式により計算する。

$$P. Index = \sum_{k=1}^n \{ R_{exp}(k) - C_{m, r_{ooo}}(k) \}^2 \quad (A-27)$$

ここで、

$$R_{exp}(k) = C_{m, ooo}(k) / \{ C_{m, ooo}(k) + C_{m, pop}(k) + C_{m, oos}(k) + C_{m, poos}(k) + C_{m, soos}(k) + C_{m, soop}(k) \}$$

また $C_{m, ooo}$ 、 $C_{m, pop}$ 、 $C_{m, oos}$ 、 $C_{m, poos}$ 、 $C_{m, soos}$ 、 $C_{m, soop}$ は、クロマトグラムにおける各トリグリセリドのピーク面積である。

4. (A-27)式の評価を最小とする初期酵素活性を選び、この値が中心にかつ探索幅が前回の1/5になるように探索区間を更新し、ステップ2へ戻る。
5. 探索幅が $1.0 \times 10^{-4}$ 未満となった時点で探索を打ち切る。なお探索は、観測データが新たに得られるごとに繰り返し行った。

#### Appendix-4 酵素活性推定機構を有した F F / F B 制御系における 計算手順

1. 液体クロマトグラフ分析装置による SOS 基準トリグリセリド組成の観測データを採取する。
2. スタートアップ状態であれば Appendix-3 に示した手順により初期酵素活性を推定する。
3. さらに得られた初期活性の下に (3-1) ~ (3-6) 式を積分し、次サンプリングステップにおける SOS 基準トリグリセリド組成を予測、制御設定値に到達しない場合はステップ 1 へ戻る。
4. SOS 基準トリグリセリド組成が設定値を越えた場合、あるいは既に定常操作状態にある場合は本文中に示した方法によりフィードフォワード制御量を算出する。
5. フィードバック制御量を算出し、制御動作を行う。
6. ステップ 1 へ戻り、新たな観測データが得られた時点で再度計算を繰り返す。





ここで、 i=1:000    7:0A  
           2:POP        8:PA  
           3:SOS        9:SA  
           4:P00        10:00X  
           5:S00        11:POX  
           6:SOP        12:SOX

$$H_1 = \begin{bmatrix} h_{1,1} & & & & & h_{1,6} \\ h_{2,1} & \cdot & & & & \cdot \\ \cdot & & \cdot & & & \cdot \\ \cdot & & h_{i,j} & & & \cdot \\ \cdot & & & & \cdot & \cdot \\ h_{6,1} & & & & & h_{6,6} \end{bmatrix}, \quad H_2 = \mathbf{0} \quad (5 \times 19)$$

$$h_{i,j} = \frac{\partial f_i}{\partial C_{b,j}}, \quad f_i = C_{b,i} / \sum_{k=1}^6 C_{b,k}$$

ここで、 i=j=k=1:000  
           2:POP  
           3:SOS  
           4:P00  
           5:S00  
           6:SOP

## 使用記号

A	: 線形システム方程式の係数マトリックス	[-]
B	: 線形システム方程式の係数マトリックス	[-]
$C_b$	: 液側基質濃度ベクトル	[mol/cm <sup>3</sup> ]
$C_{b, w}$	: 液側水分濃度	[mol/cm <sup>3</sup> ]
$C_{b, w, set}$	: 液側水分濃度設定値	[mol/cm <sup>3</sup> ]
$C_e$	: 酵素濃度	[U/cm <sup>3</sup> ]
$C_f$	: 原料基質濃度ベクトル	[mol/cm <sup>3</sup> ]
$C_{m, w}$	: 液側水分濃度観測値	[mol/cm <sup>3</sup> ]
$C_s$	: 微生物保持粒子内基質濃度ベクトル	[mol/cm <sup>3</sup> ]
$C_{s, w}$	: 微生物保持粒子内水分濃度	[mol/cm <sup>3</sup> ]
$C_{sat}$	: 水の飽和溶解度	[mol/cm <sup>3</sup> ]
$C_{w, w}$	: (2-6)、(2-7)式で定義される吸着平衡水分濃度	[mol/cm <sup>3</sup> ]
$C_1$	: BET式の定数	[-]
D	: 線形システム方程式の係数マトリックス	[-]
d	: 外乱ベクトル、ガウス白色システム雑音ベクトル	[-]
E	: 期待値演算子	
e	: 誤差変数ベクトル	[-]
$e_1, e_2$	: 誤差信号	[ppm, -]
$F_f$	: 原料供給速度	[cm <sup>3</sup> /min]
$F_w$	: 水供給速度	[cm <sup>3</sup> /min]
H	: 状態観測器の係数マトリックス	[-]
K	: 総括物質移動係数マトリックス	[-]
$K_G$	: カルマンゲイン	[-]

$K_t, K_d, K_z, K_w$	: 各基質の総括物質移動係数	[1/min]
$k_e$	: 酵素失活速度定数	[1/min]
$k_i$	: 反応速度定数 (i=1~6)	[1/min, cm <sup>3</sup> /(U·min), or cm <sup>3</sup> /(mol·min)]
L	: 推定誤差共分散行列	[-]
M	: システムノイズ共分散行列	[-]
$M_i, M_p$	: PIコントローラパラメータ	[-, -]
N	: 観測ノイズ共分散行列	[-]
P	: 線形確率システム方程式の係数マトリックス	[-]
$p_1, p_2$	: 操作信号	[ppm, -]
Q	: 線形確率システム方程式の係数マトリックス	[-]
R	: 線形確率システム方程式の係数マトリックス	[-]
$R_v$	: 反応速度ベクトル	[-]
r	: 各基質の反応速度	[mol/(cm <sup>3</sup> ·min)]
$T_s$	: サンプル周期	[min]
$T_1$	: 水分センサーの1次遅れ定数	[min]
t	: 時間	[min]
u	: 操作変数ベクトル	[-]
V	: 有効反応器容積	[cm <sup>3</sup> ]
$V_b$	: 微生物保持粒子容量	[cm <sup>3</sup> ]
$V_m$	: BET式の定数	[g-H <sub>2</sub> O/g-dry cell]
$V_R$	: 容量比 (= V / V <sub>b</sub> )	[-]
v	: ガウス白色観測ノイズベクトル	[-]
x	: 状態変数ベクトル	[-]
y	: 出力変数ベクトル	[-]
z	: 状態観測器、カルマンフィルタ出力変数ベクトル	[-]

<添え字>

000, P00, POP, S00, SOP, SOS, TG, t : トリグリセリド

00X, POX, SOX, DG, d : ジグリセリド

OA, PA, SA, FFA, z : 脂肪酸

e : 酵素

m : 観測値

w : 水

## 引用文献

- 1) Macrae, A.R.: "Lipase-catalyzed Interesterification of Oils and Fats", J. Am. Oil Chem. Soc., 60, 291-294 (1983)
- 2) Wisdom, R.A., P. Duninill, and M.D. Lilly: "Enzymic interesterification of Fats: Laboratory and Pilot-scale Studies with Immobilized Lipase from Rhizopus arrhizus", Biotechnol. Bioeng., 29, 1081-1085 (1987)
- 3) Yokozeki, K., S. Yamanaka, K. Takinami, Y. Hirose, A. Tanaka, K. Sonomoto, and S. Fukui: "Application of Immobilized Lipase to Regio-specific Interesterification of Triglyceride in Organic Solvent", Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14, 1-5 (1982)
- 4) 太田安英, 壇辻雅彦: 「微生物細胞を用いた油脂のエステル交換」. 油化学, 37, 38-43 (1988)
- 5) Nakashima, T., H. Fukuda, S. Kyotani, and H. Morikawa: "Culture Conditions for Intracellular Lipase Production by Rhizopus chinensis and Its Immobilization within Biomass Support Particles", J. Ferment. Technol., 66, 441-448 (1988)
- 6) Nakashima, T., H. Fukuda, Y. Nojima, and S. Nagai: "Intracellular Lipase Production by Rhizopus chinensis Using Biomass Support Particles in a Circulating Bed Fermentor", J. Ferment. Bioeng., 68, 19-24 (1989)
- 7) Nakashima, T., S. Kyotani, E. Izumoto, and H. Fukuda: "Cell Aggregation as a Trigger for Enhancement of Intracellular Lipase Production by Rhizopus Species", J. Ferment. Bioeng., 70, 83-89 (1990)

- 8) Nakashima, T. and H. Fukuda: "Effect of Aeration Rate on Intracellular Lipase Production by Rhizopus chinensis Immobilized within Biomass Support Particles in a Circulating Bed Fermentor", *J. Ferment. Bioeng.*, 70, 355-358 (1990)
- 9) Kyotani, S., H. Fukuda, Y. Nojima, and T. Yamane: "Interesterification of Fats and Oils by Immobilized Fungus at Constant Water Concentration", *J. Ferment. Technol.*, 66, 567-575 (1988)
- 10) Kyotani, S., E. Izumoto, T. Nakashima, H. Fukuda, and T. Yamane: "Interesterification of Fats and Oils by Immobilized Fungus at Constant Water Concentration", *Proc. of 5th ASIA PACIFIC CONFEDERATION OF CHEMICAL ENGINEERING, Malaysia*, 6D-8 (1990)
- 11) Kyotani, S., T. Nakashima, E. Izumoto, and H. Fukuda: "Continuous Interesterification of Oils and Fats Using Dried Fungus Immobilized in Biomass Support Particles", *J. Ferment. Bioeng.*, 71, 286-288 (1991)
- 12) 橋本征雄, 松尾高明, 沢村紀夫: 「酵素エステル基交換反応による油脂の加工」, 日本醗酵工学会大会講演要旨集, 62 (1989)
- 13) Macrae, A. R.: "Tailored Triacylglycerols and esters", *Biochem. Soc. Transactions*, 17, 1146-1148 (1989)
- 14) 橋本征雄: 「酵素エステル交換によるカカオバター様油脂の製造」, *バイオサイエンスとバイオインダストリー*, 47, 36-37 (1989)
- 15) 森弘之: 「バイオテクノロジーによる油脂の改質と応用」, *フードケミカル*, 8, 39-43 (1987)
- 16) 沢村紀夫: 「リパーゼによる油脂のエステル交換」, *フードケミカル*, 7, 49-53 (1989)
- 17) 橋本征雄: 「バイオリアクターの油脂加工への応用 - 加水分解とエステル交換」, *油脂*, 41, 62-66 (1988)

- 18) 松本渉,大嶋章夫,高木英倫:「対称型トリグリセリドの製造ーバイオリアクターによる製果用油脂の製造」,食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合編,実践バイオリアクター,p314,食品化学新聞社(1990)
- 19) Dordick,J.S.: "Enzyme Catalysis in Monophasic Organic Solvents", *Enzyme Microbiol. Technol.*,11,194-211(1989)
- 20) Zaks,A. and A.J.Russell: "Enzymes in Organic Solvents: Properties and Applications", *J. Biotechnol.*,8,259-270(1988)
- 21) Klibanov,A.M.: "Enzymes That Works in Organic Solvents", *Chemtechnology*,16,354-359(1986)
- 22) 山根恒夫:「脂質類の酵素的交換とバイオリアクター」,バイオサイエンスとバイオインダストリー,47,17-23(1989)
- 23) Yamane,T.,M.M.Hoq.,S.Itoh,and S.Shimizu: "Glycerolysis of Fat by Lipase", *J. Jpn. Oil. Chem. Soc.*,35,625-631(1986)
- 24) Yamane,T.,M.M.Hoq.,S.Itoh,and S.Shimizu: "Continuous Glycerolysis of Fat by Lipase in Microporous Hydrophobic Membrane Bioreactor", *J. Jpn. Oil. Chem. Soc.*,35,632-636(1986)
- 25) Yamane,T.,J.S.Rhee,Y.Ohta,and S.Shimizu: "Some Characteristics of Continuous Glycerolysis of Fat by Lipase with Microporous Membrane Bioreactor", *J. Jpn. Oil. Chem. Soc.*,36,474-479(1987)
- 26) Bell,G.,J.A.Blain,J.D.E.Patterson,C.E.L.Show,and R.Todd: "Ester and Glyceride Synthesis by *Rhizopus arrhizus* mycelia", *FBMS Lett.*,3,223-225(1978)
- 27) Patterson,J.D.E.,J.A.Blain,C.E.L.Show,R.Todd,and G.Bell: "Synthesis of Glycerides and Esters by Fungal Cell-bound Enzymes in Continuous Reactor System", *Biotechnol. Lett.*,1,211-216(1984)
- 28) Knox,T.and K.R.Cliff: "Synthesis of Long-chain Esters in a Loop

- Reactor System Using a Fungal Cell Bound Enzyme", *Process Biochem.*, 8, 188-192 (1984)
- 29) 食品産業バイオリクターシステム技術研究組合: 「酵素による油脂類の反応における水分自動制御方法」, 特開昭63-207393
  - 30) Monseur, X and J.C.Motte: "On-Line Monitoring During Fermentation of Whey Based on Ultrafiltration and Liquid Chromatography", *Anal.Chim.Acta.*, 204, 127-134 (1988)
  - 31) Favre, E., P.Pugeaud, J.P.Raboud, and P.Peringer: "Automated HPLC Monitoring of Broth Components on Bioreactors", *J.Autom.Chem.*, 11, 280-283 (1989)
  - 32) Ross, L.F. and D.C.Chapitol: "Simultaneous Determination of Carbohydrates and Products of Carbohydrate Metabolism in Fermentation Mixtures by HPLC", *J.Chromatogr.Sci.*, 25, 112-117 (1987)
  - 33) Comberbach, D.M. and J.D.Bu'Lock: "Automatic On-Line Fermentation Headspace Gas Analysis Using a Computer-Controlled Gas Chromatograph", *Biotechnol.Bioeng.*, 25, 2503-2518 (1983)
  - 34) Comberbach, D.M., J.M.Scharer, and M.M.Young: "An Improved Chromatographic Procedure for the Rapid Determination of Volatile Solvents via the Headspace Gas", *Biotechnol.Lett.*, 6, 91-96 (1984)
  - 35) Takamatsu, T., S.Shioya, Y.Okada, and M.Kanda: "Profile Control Scheme in a Bakers' Yeast Fed-Batch Culture", *Biotechnol.Bioeng.*, 27, 1675-1686 (1985)
  - 36) Mou, D.G. and C.L.Cooney: "Growth Monitoring and Control Through Computer-Aided On-Line Mass Balancing in a Fed-Batch Penicillin Fermentation", *Biotechnol.Bioeng.*, 25, 225-255 (1983)
  - 37) Mou, D.G. and C.L.Cooney: "Growth Monitoring and Control in

- Complex Medium: A Case Study Employing Fed-Batch Penicillin Fermentation and Computer-Aided On-Line Mass Balancing", *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 257-269 (1983)
- 38) Perez, J.R., D.L. Pyle, J.S. Rockey, and C.A. Zaror: "Modelling and Control of Polygalacturonase Production from *K.marxianus*", *Comput. Appl. Ferment. Technol. Model Control Biotechnol. Process.*, 355-359 (1989)
- 39) Corder, G.D. and P.L. Lee: "Modelling and Control of a Wastewater Treatment Plant", *Proc. of CHEMECA 84, Melbourne*, 767-774 (1984)
- 40) Cardello, R.J., and K.Y. San: "The Design of Controllers for Batch Bioreactors", *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 519-526 (1988)
- 41) Smith J.M., S.W. Davison, and G.F. Payne: "Development of a Strategy to Control the Dissolved Concentrations of Oxygen and Carbon Dioxide at Constant Shear in a Plant Cell Bioreactor", *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 1088-1101 (1990)
- 42) Cooney, C.L., H.Y. Wang, and D.I.C. Wang: "Computer-Aided Material Balancing for Prediction of Fermentation Parameters", *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 55-67 (1977)
- 43) Wang, H.Y., C.L. Cooney, and D.I.C. Wang: "Computer-Aided Baker's Yeast Fermentations", *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 69-86 (1977)
- 44) Zabriskie, D.W. and A.E. Humphrey: "Real-Time Estimation of Aerobic Batch Fermentation Biomass Concentration by Component Balancing", *AIChE J.*, 24, 138-146 (1978)
- 45) Erickson, L.E.: "Applications of Mass-Energy Balances in On-Line Data Analysis", *Biotechnol. Bioeng. Symposium*, 9, 49-59 (1979)
- 46) Schultz, J.S. and G. Sims: "Affinity Sensors for Individual Metabolites", *Biotechnol. Bioeng. Symposium*, 9, 65-71 (1979)

- 47) Swarz, J.R. and C.L.Cooney: "Indirect Fermentation Measurement as a Basis for Control", *Biotechnol. Bioeng. Symposium*, 9, 95-101 (1979)
- 48) Takamatsu, T., S. Shioya, M. Shiota, and T. Kitabata: "Application of Modern Control Theories to a Fermentation Process", *Biotechnol. Bioeng. Symposium*, 9, 283-301 (1979)
- 49) 村上勝志, 嘉納秀明, 増淵正美: 「連続発酵プロセスの対する状態観測器」, *計測自動制御学会論文集*, 20, 200-206 (1984)
- 50) Stephanopoulos, G. and K.Y.San: "Studies on On-Line Bioreactor Identification. I. Theory", *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1176-1188 (1984)
- 51) San, K.Y. and G. Stephanopoulos: "Studies on On-Line Bioreactor Identification. II. Numerical and Experimental Results", *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1189-1197 (1984)
- 52) Grosz, R., G. Stephanopoulos, and K.Y.San: "Studies on On-Line Bioreactor Identification. III. Sensitivity Problems with Respiratory and Heat Evolution Measurements", *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1198-1208 (1984)
- 53) San, K.Y. and G. Stephanopoulos: "Studies on On-Line Bioreactor Identification. IV. Utilization of pH Measurements for Product Estimation", *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1209-1218 (1984)
- 54) Shi, Y. and W.K.Yuan: "Application of Adaptive Estimation in Microbial Fermentation Process", *Chem. Eng. Sci.*, 43, 1915-1920 (1988)
- 55) Liao, J.C.: "Fermentation Data Analysis and State Estimation in the Presence of Incomplete Mass Balance", *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 613-662 (1989)
- 56) Nahlik, J. and Z. Burianec: "On-line parameter and state estima-

- tion of continuous cultivation by extended Kalman filter",  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 128-134 (1988)
- 57) Shimizu, H., T. Takamatsu, S. Shioya, and K. Suga: "An Algorithmic Approach to Constructing the On-Line Estimation System for the Specific Growth Rate", Biotechnol. Bioeng., 33, 354-364 (1989)
- 58) Shioya, S., H. Shimizu, M. Ogata, and T. Takamatsu: "Simulation and Experimental Studies of the Profile Control of the Specific Growth Rate in a Fed-Batch Culture", Proc. IFAC Symposium on Modeling and Control of Biotechnical Process, Netherland, 49-54 (1985)
- 59) 塩谷捨明: 「発酵プロセスの計測と制御」, ケミカルエンジニアリング, 1986, 8, 25-31 (1986)
- 60) Schlasner, S. M., W. R. Strohl, and W. K. Lee: "On-line Adaptive, Optimal Control of a Fed-batch Fermentation of Streptomyces C5", Proc. Am. Control Conf., 1, 687-692 (1987)
- 61) Staniskis, J. and R. Simutis: "A Measuring System for Biotechnical Processes Based on Discrete Methods of Estimation", Biotechnol. Bioeng., 28, 362-371 (1986)
- 62) Montague, G. A., A. J. Morris, A. R. Wright, M. Aynsley, and A. C. Ward: "On-line Estimation and Adaptive Control of Penicillin Fermentation", IEE Proc. Part D Control Theory Appl., 133, 240-246 (1986)
- 63) 遠藤勲: 「バイオプロセスシステムの計測と制御」, 化学装置, 1986, 5, 71-76 (1986)
- 64) Pons, M. N., A. Rajab, J. M. Flaus, J. M. Engasser, and A. Cheruy: "Comparison of Estimation Methods for Biotechnological Processes", Chem. Eng. Sci., 43, 1909-1914 (1988)

- 65) Chattaway, T. and G. Stephanopoulos: "Adaptive Estimation of Bioreactors: Monitoring Plasmid Instability", Chem. Eng. Sci., 44, 41-48 (1989)
- 66) Caminal, G., J. Lafuente, J. Lopez-Santin, M. Poch, and C. Sola: "Application of Extended Kalman Filter to Identification of Enzymatic Deactivation", Biotechnol. Bioeng, 29, 366-369 (1987)
- 67) Kyotani, S., H. Fukuda, H. Morikawa, and T. Yamane: "Kinetic Studies on the Interesterification of Oils and Fats Using Dried Cells of Fungus", J. Ferment. Technol., 66, 71-83 (1988)
- 68) 田中崇, 石原勝, 小野栄治: 「酵素を用いる油脂のエステル交換反応とその応用」, 発酵と工業, 41, 375-381 (1983)
- 69) 長田恭一, 高橋是太郎, 羽田野六男: 「微生物由来固定化リパーゼによるいわし油の改質」, 油化学, 39, 467-471 (1990)
- 70) 福田秀樹: 「エステル交換反応における微量水分制御」, 醗酵工学会誌, 67, 122-123 (1989)

## 本論文に関する報文

- (1) 「微量水分濃度の動的変化を考慮した回分式油脂エステル交換反応プロセスのモデル化」  
泉本英次、福田秀樹、中西英二  
化学工学論文集、第16巻、第4号、pp.640-646(1990)
- (2) 「微水系連続エステル交換反応プロセスの水分濃度・トリグリセリド組成同時制御」  
泉本英次、京谷晋、中嶋敏光、福田秀樹、中西英二  
化学工学論文集、第17巻、第4号、pp.701-708(1991)
- (3) 「酵素活性推定機構付フィードフォワード/フィードバック制御系による微水系エステル交換反応制御」  
泉本英次、京谷晋、中嶋敏光、福田秀樹、中西英二  
化学工学論文集、第18巻、第1号、pp.1-7(1992)
- (4) 「微水系連続エステル交換反応プロセスの状態推定制御」  
泉本英次、京谷晋、中嶋敏光、福田秀樹、中西英二  
化学工学論文集投稿予定
- (5) "Feedforward/Feedback Control of Interesterification of Fats and Oils Using a Microaqueous Bioreactor"  
Eiji Izumoto, Hideki Fukuda, Yasuhiro Nojima, and Eiji Nakanishi,  
Proceeding of Twelfth International Symposium on Chemical Reaction Engineering, Torino, Italy(1992), in press.

## 本論文の関連文献

- (1) 「固定化乾燥菌体による油脂のエステル交換反応」  
福田秀樹、中嶋敏光、京谷晋、泉本英次  
バイオインダストリー、第7巻、第7号、pp.462-469(1990)
  
- (2) "Cell Aggregation as a Trigger for Enhancement of Intracellular Lipase Production by a Rhizopus Species"  
Toshimitsu Nakashima, Susumu Kyotani, Eiji Izumoto, and Hideki Fukuda,  
Journal of Fermentation and Bioengineering,70,83-89(1990)
  
- (3) "Interesterification of Fats and Oils by Immobilized Fungus at Constant Water Concentration"  
Susumu Kyotani, Eiji Izumoto, Toshimitsu Nakashima, Hideki Fukuda, and Tsuneo Yamane,  
Proceeding of 5-th ASIA PACIFIC CONFEDARATION OF CHEMICAL ENGINEERING, Malaysia(1990)
  
- (4) "Continuous Interesterification of Oils and Fats Using Dried Fungus Immobilized in Biomass Support Particles"  
Susumu Kyotani, Toshimitsu Nakashima, Eiji Izumoto, and Hideki Fukuda,  
Journal of Fermentation and Bioengineering,71,286-288(1991)

## 謝辞

本論文は、鐘淵化学工業（株）生産技術研究所におけるバイオリアクターシステムの開発研究の一環として、昭和63年から平成3年までに行った研究成果を、神戸大学工学部化学工学科 中西英二教授の御指導の下にまとめたものであります。本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、御懇篤なる御指導と御教示を賜りました中西英二教授に心から感謝いたします。

また本論文の審査にあたり、適切なる御指導と御助言を賜りました神戸大学工学部化学工学科 片岡邦夫教授ならびに同大学農学部農芸化学科 新家龍教授に深く感謝の意を表します。

本研究テーマに携わる機会を与えてくださいました鐘淵化学工業（株）元常務取締役、初代生産技術研究所長 故森川久博士ならびに同取締役 野島康弘生産技術研究所長に心から感謝いたします。

さらに、研究グループリーダーとして、研究の細部にわたり終始適切な御指導を賜りました鐘淵化学工業（株）生産技術研究所主任研究員 福田秀樹博士に深く感謝いたします。

また、制御理論や数値シミュレーション手法に関する有益な御助言と励ましを賜りました神戸大学工学部化学工学科 南原興二氏、ならびに第5章の研究に際し精力的に御協力いただいた同大学院工学研究科修士課程二年 高野茂人氏に感謝いたします。

最後に、本研究を遂行するにあたり、研究グループメンバーとして全面的な御協力を賜りました鐘淵化学工業（株）生産技術研究所、京谷晋氏、中島敏光博士および辻村勇夫氏、ならびに絶えず御助言と激励を賜りました同生産技術研究所、山崎克彦氏、鷲見泰弘氏、河合秀樹博士、富岡寛治氏と生産技術研究所の諸氏に厚く御礼申し上げます。