

Een technologische studie van de gistproductie met n-alkanen als koolstof- en energiebron

Citation for published version (APA):

Erdtsieck, B. (1967). *Een technologische studie van de gistproductie met n-alkanen als koolstof- en energiebron*. [Dissertatie 1 (Onderzoek TU/e / Promotie TU/e), Chemical Engineering and Chemistry]. Technische Hogeschool Eindhoven. <https://doi.org/10.6100/IR151933>

DOI:

[10.6100/IR151933](https://doi.org/10.6100/IR151933)

Document status and date:

Gepubliceerd: 01/01/1967

Document Version:

Uitgevers PDF, ook bekend als Version of Record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.tue.nl/taverne

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

openaccess@tue.nl

providing details and we will investigate your claim.

EEN TECHNOLOGISCHE STUDIE
VAN DE GISTPRODUKTIE MET N-ALKANEN
ALS KOOLSTOF- EN ENERGIEBRON

(Figuren behorende bij het proefschrift).

B. ERDTSIECK

EEN TECHNOLOGISCHE STUDIE VAN DE GISTPRODUKTIE
MET N-ALKANEN ALS KOOLSTOF- EN ENERGIEBRON.

EEN TECHNOLOGISCHE STUDIE
VAN DE GISTPRODUKTIE MET N-ALKANEN
ALS KOOLSTOF- EN ENERGIEBRON

A technological study of yeast production with n-alkanes as carbon
and energy source
(With summary in English)

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
TECHNISCHE WETENSCHAPPEN AAN DE TECHNISCHE
HOGESCHOOL TE EINDHOVEN OP GEZAG VAN DE
RECTOR MAGNIFICUS DR. K. POSTHUMUS, HOOGLERAAR
IN DE AFDELING DER SCHEIKUNDIGE TECHNOLOGIE,
VOOR EEN COMMISSIE UIT DE SENAAAT TE VERDEDIGEN
OP DINSDAG 11 JULI 1967 OM 16.00 UUR

DOOR

BOB ERDTSIECK

NATUURKUNDIG INGENIEUR
GEBOREN TE HAARLEM

DIT PROEFSCHRIFT IS GOEDGEKEURD DOOR DE PROMOTOR
PROF. DR. K. RIETEMA.

Aan mijn vrouw.

INHOUD

Hoofdstuk 1. Doel van het onderzoek en literatuuroverzicht.	11
1.1. Inleiding.	11
1.2. De aantasting van koolwaterstoffen door micro-organismen.	13
1.3. De produktie van eiwit door groei van micro-organismen op n-alkaan.	15
1.4. Probleemstelling.	19
1.5. Stofoverdracht en fasegrensvlak.	20
Hoofdstuk 2. Micro-organismen, cultuurmedium, meetmethoden.	23
2.1. Micro-organismen.	24
2.1.1. Ophoping.	24
2.1.2. Micro-organismen uit "collecties".	25
2.1.3. Keuze van micro-organisme voor het onderzoek.	26
2.2. Cultuurmedium.	27
2.2.1. Groeistofoetoevoeging.	27
2.2.2. Toevoeging chemische schuimbestrijdingsmiddelen.	28
2.2.3. Koolwaterstoffen, Vloeibare paraffine als oplosmiddel voor n-alkanen.	32
2.3. Meetmethoden.	33
2.3.1. Bepaling van de gistconcentratie.	33
2.3.1.1. Bepaling drogestof.	35
2.3.1.2. Bepaling drogestof m.b.v. sedimenthoogte.	35
2.3.1.3. Bepaling drogestof door titratie.	36
2.3.1.4. De economische coëfficiënt.	36
2.3.1.5. Bepaling van de groeikromme.	37
2.3.2. Bepaling van de alkaan-concentratie en van de alkaan-belasting.	38
2.3.2.1. Refractometrische bepaling.	38
2.3.2.2. Gaschromatografische bepaling.	39
2.3.2.3. Apparatuur.	40

2.3.2.4. Gaschromatografische bepaling bij enkelvoudig systeem.	40
2.3.2.5. Gaschromatografische bepaling bij gasolie.	41
Hoofdstuk 3. Ontwerp en beschrijving van de apparatuur.	43
3.1. De schudkolf.	43
3.2. Het fermentatievat.	44
3.3. De opstelling.	45
3.3.1. pH-regeling.	45
3.3.2. Temperatuurregeling.	45
3.3.3. Zuurstofregeling.	45
3.3.4. Opvangen van verdampend n-alkaan.	47
3.3.5. Opstelling bij toevoer van gasvormig n-alkaan.	47
3.4. Conditie's.	47
Hoofdstuk 4. Groei van micro-organismen en kinetiek.	49
4.1. Groei van micro-organismen.	49
4.2. Kinetiek.	50
Hoofdstuk 5. Stofoverdracht.	53
5.1. Stofoverdracht via opgelost n-alkaan.	54
5.2. Stofoverdracht door direct contact.	66
Hoofdstuk 6. Groei op enkelvoudig substraat.	67
6.1. Groei van <u>Candida lipolytica</u> bij stofoverdracht door één stofoverdrachtsmechanisme.	67
6.1.1. Groei bij stofoverdracht via opgelost n-alkaan.	68
6.1.2. Groei bij stofoverdracht door direct contact.	70
6.2. Groei van <u>Candida lipolytica</u> bij stofoverdracht door twee overdrachtsmechanismen gelijktijdig.	74
6.3. Groei van <u>Candida lipolytica</u> op n-alkaan. Overzicht.	79
6.4. Concentratielimitering.	80
6.5. Oppervlaktelimitering.	81

Hoofdstuk 7. Groei op meervoudig substraat.	85
7.1 Voorkweken van de gist.	86
7.2. Meetmethode.	86
7.3. Groei van gisten op mengsels van koolhydraat en koolwaterstof.	87
7.4. Groei van gisten op mengsels van twee koolwaterstoffen.	88
7.5. Groei op mengsels van meer dan twee koolwaterstoffen.	90
Samenvatting.	91
Summary.	93
Tabellen.	96
Appendix 1. Oplosbaarheid van n-alkanen in water.	128
Appendix 2. Bepaling van de diffusiecoëfficiënt.	129
Literatuurreferenties.	130
Symbolenlijst.	146
Grafieken.	

The current world shortage of food presents an unparalleled challenge to the chemical engineer. The challenge is to develop a major new industry for the production of food material by chemical and controlled biochemical means.

Mc Pherson (1).

I. DOEL VAN HET ONDERZOEK EN LITERATUUROVERZICHT

1.1. Inleiding.

De meningen over de mate waarin in de ontwikkelingslanden honger geleden wordt, zijn nogal verdeeld. Dit komt omdat de opvattingen ten aanzien van de hoeveelheid voedsel noodzakelijk voor het in stand houden van een goede gezondheid, uiteenlopen.

Meer overeenstemming is er over de kwalitatieve gebreken van de voeding. Algemeen wordt aangenomen, dat eiwittekorten in de voeding en de daarbij behorende deficiëntie-verschijnselen over de gehele wereld sterk verbreid zijn (2). In rapporten van de Food and Agriculture Organization van de Verenigde Naties (3) (4) wordt aangegeven dat de eiwitvoeding van ruim twee miljard mensen ernstige gebreken vertoont. Een half miljard mensen zijn in één of andere vorm ziek ten gevolge van eiwitondervoeding.

Het eiwitgebrek is zowel een kwalitatief als een kwantitatief probleem. Eiwitten afkomstig van verschillende voedingsmiddelen verschillen in aminozuursamenstelling en daarmee in waarde voor groei en instandhouding van het menselijk lichaam. Beoordeling is mogelijk aan de hand van een hypothetische, ideale, aminozuursamenstelling van eiwit (5) (6). De samenstelling van het ideale eiwit is gebaseerd op de behoefte van de mens aan essentiële aminozuren. Dit zijn aminozuren, die niet door het menselijk lichaam gesynthetiseerd kunnen worden. De essentiële aminozuren zijn: fenylalanine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, threonine, tryptofaan en valine. In het algemeen heeft eiwit afkomstig van plantaardig materiaal een tekort aan methionine en lysine. Dierlijk eiwit en het eiwit van microbiologische oorsprong voldoen beter aan de ideale samenstelling en zijn daarom hoogwaardiger dan plantaardig eiwit. In de ontwikkelingslanden bestaat het eiwitpakket voor een groot deel uit plantaardig eiwit.

Ook ten aanzien van de noodzakelijke hoeveelheid hoogwaardig eiwit zijn er verschillen van inzicht. De F.A.O. gaat uit van ideaal ei-

wit en van een minimumbehoefte. De behoeften verschillen naar geslacht, naar leeftijd en naar aard van het werk. Gemiddeld komt de F.A.O.norm ongeveer neer op vijf en dertig gram hoogwaardig eiwit per persoon per dag. De Voedingsraad (Nederland) heeft normen gebaseerd op de wenselijke hoeveelheid en gaat uit van gemengde voeding. De Voedingsraadnormen komen neer op zeventig tot tachtig gram gemengd eiwit, waarbij één derde tot de helft van het eiwit van dierlijke oorsprong dient te zijn. Men heeft geschat (7), dat er in 1970 in de ontwikkelingslanden een tekort van tien miljoen ton hoogwaardig eiwit zal zijn. Op basis van de huidige bevolkingsaanwas heeft men berekend, dat in het jaar 2000 ruim zes miljard mensen de aarde zullen bevolken, dat wil zeggen een verdubbeling ten opzichte van 1965-1970. De hoeveelheid eiwit verkregen op traditionele wijze - landbouw, veeteelt en pluimveeteelt, visserij - kan toenemen. Het landbouwareaal kan nog uitgebreid worden. De gemiddelde opbrengst per hectare bouwland kan verhoogd worden. De visvangst kan geïntensiveerd worden en de verwerking tot een viseiwitconcentraat kan ter hand genomen worden. Tenslotte kan de biologische waarde van het plantaardige eiwit verhoogd worden door toevoeging van aminozuren. Deze toename van de produktie zal echter in het geheel geen gelijke tred houden met de toename van de wereldbevolking. Voor het jaar 2000 wordt daarom een tekort verwacht van dertig tot veertig miljoen ton hoogwaardig eiwit. Deze hoeveelheid zal op andere wijze geproduceerd dienen te worden.

Verschillende oplossingen zijn voorgesteld. Eén der meest veelbelovende voorstellen is de produktie van eiwit uit aardoliefracties met behulp van micro-organismen (8) (34), het B.P. proces. In principe kunnen veel aardoliecomponenten (paraffinen, aromaten, naffen) dienen als koolstof- en energiebron voor micro-organismen. Voor een eventuele economische exploitatie komt vooralsnog slechts de groei van bepaalde micro-organismen op n-alkanen en olefinen in aanmerking. Deze n-alkanen en olefinen kunnen verkregen worden uit aardolie door behandeling met moleculairzeven of door ontparaffinering van daarvoor in aanmerking komende aardoliefracties. Ontparaffinering kan ook plaats vinden door groei van micro-organismen op

de aardoliefracties. De kosten van de traditionele ontparaffinerings worden dan vermeden. Hiertegenover staat dan een vrij kostbare nabewerking, het aardolievrij maken van het eiwitpreparaat.

Uit één kilogram paraffine wordt ongeveer een halve kilogram eiwit verkregen. Het tekort voor 1970 kan dus opgeheven worden door de verwerking van twintig miljoen ton paraffine. De ruwe-aardolie-productie zal in 1970 naar schatting anderhalf miljard ton bedragen. De samenstelling van de ruwe aardolie varieert met de vindplaats (paraffinebasis-olie, asfaltbasis-olie, gemengdbasis-olie). Daarom is het ondoenlijk het gemiddelde gehalte aan in aanmerking komende paraffinen te bepalen. Niettemin kan gesteld worden dat de jaarlijkse ruwe-olie-productie veel meer paraffinen bevat dan nodig is om het tekort te dekken.

Champagnat (8) komt voor eiwit verkregen door microbiologische ontparaffinerings tot een fabricageprijs (zonder belasting en zonder winst) van f 1,- per kg eiwit.

McNab (9) heeft voor een proces waarbij uitgegaan wordt van n-alkanen verkregen via moleculair-zeven, een prijs berekend van f 3,50 per kg eiwit. Voor eiwit afkomstig van andere bronnen komt hij tot de volgende prijzen: eiwit in aardnotenmeel f 1,20/kg, eiwit in soyameel f 1,20/kg, eiwit in katoenzaadmeel f 1,-/kg, eiwit in magere melkpoeder f 4,10/kg, eiwit in gist f 3,60/kg. Hierbij geldt, dat de biologische waarde van de verschillende eiwitten niet in rekening is gebracht.

1.2. De aantasting van koolwaterstoffen door micro-organismen.

De aantasting van koolwaterstoffen door micro-organismen is bekend sedert 1905. Reeds in de 19e eeuw realiseerde men zich dat methaan niet ophoopte in de atmosfeer, hoewel toch de hoeveelheid methaan, ontstaan bij de afbraak van organisch materiaal, aanzienlijk moest zijn. Methaan is weinig reactief, zodat verdwijnen langs chemische

weg onwaarschijnlijk was. Daar bij de oxydatie van methaan tot CO₂ en H₂O een aanzienlijke hoeveelheid energie vrijkomt, lag het voor de hand te onderzoeken of micro-organismen zich aan deze energiebron hadden aangepast. Kaserer (10) en Söhngen (11) vonden in 1905, gelijktijdig en onafhankelijk van elkaar, dat bacteriën in staat waren methaan te gebruiken als enige koolstof- en energiebron. In de literatuur van vóór 1905 wordt wel hier en daar melding gemaakt van koolwaterstofaantasting, Miyoshi (12), maar afdoende bewijs ontbreekt.

Het overzicht zal beperkt worden tot de aantasting van alifatische koolwaterstoffen, meer in het bijzonder tot de verzadigde alifatische koolwaterstoffen, de n-alkanen.

Het onderzoek is voornamelijk gericht geweest op het ketenproces of de ketenprocessen, de wegen waarlangs de verschillende koolwaterstoffen afgebroken worden. Daarnaast heeft men nagegaan welke micro-organismen in staat zijn koolwaterstoffen aan te tasten en welke koolwaterstoffen aangetast worden. Goede overzichten worden gegeven door Bushnell (13), Zo Bell (14), Beerstecher (15), Fuhs (16), Kester (17), Robinson (18), Castel (19), Foster (20), Zajic (21), Bricteux (22), van der Linden (23), Mc Kenna (24), Sharpley (25), Humphrey (26) en voor de Russische literatuur Shturm (27) en Pozmogova (28).

In 1948 werd door Just aangetoond, dat vetproductie door groei van bacteriën en gisten op koolwaterstoffen mogelijk was. Als koolwaterstof werd toegepast technisch Kogasin (synthetische paraffine-olie, Fischer-Tropsch synthese), op semi-technische schaal tot 50 l. vatinhoud (29) (30) (31) (32) (33). In 1963 werd door Champagnat (8) (34) een proces ontwikkeld voor de produktie van eiwit. Naast de produktie van vet en eiwit als celbestanddelen kunnen sommige verbindingen onder bepaalde omstandigheden in aanzienlijke hoeveelheden door de cellen worden afgescheiden, o.a. aminozuren (35) (36) (37) (38) (39) (40), vitaminen (41) (42) (43), enzymen (44) (45), nucleotiden en nucleotide-derivaten (46), vetzuren en esters (47) (48). In het algemeen is het groeisubstraat tevens produktsubstraat. Het is echter ook mogelijk, dat groeisubstraat en produktsubstraat ver-

schillend zijn (co-oxydatie). De mogelijkheid van co-oxydatie werd aangetoond door Leadbetter en Foster (49). Onder co-oxydatie wordt verstaan, dat een micro-organisme groeit op een koolwaterstof (het groeisubstraat) en tegelijkertijd een andere koolwaterstof (waarop het niet kan groeien) oxydeert. Door co-oxydatie is het mogelijk goedkope koolwaterstoffen om te zetten in waardevolle produkten (50) (51) (52) (53).

Deze zg. twee-component-koolwaterstof-systemen bieden zeer grote mogelijkheden. Het is ook mogelijk een koolhydraat als groeisubstraat toe te passen (53).

Bij het onderzoek naar ketenprocessen worden vaak stoffen toegevoegd die het ketenproces onderbreken. Een voorbeeld van zo'n stof is chloramphenicol. Deze onderbreking heeft dus tot gevolg, dat tussënprodukten geaccumuleerd worden. Van deze methode kan men gebruik maken om nieuwe produkten te vervaardigen (54).

1.3. De produktie van eiwit door groei van micro-organismen op n-alkaan (55) (56).

Het proces wordt uitgevoerd met bepaalde bacteriën, gisten en schimmels. Het entmateriaal dient gekweekt te zijn op koolwaterstoffen als koolstof- en energiebron (57). Na het enten treedt een "lag phase" op. Deze "lag phase" kan verminderd worden (58) door entmateriaal te gebruiken, dat zich qua groei in de exponentiële groeiperiode bevindt. Volgens Laine (59) zou deze "lag phase" geëlimineerd kunnen worden door het entmateriaal in een vóórtrap te laten groeien op koolhydraten (melasse, moutextract, suiker, sulfietloog).

Als koolwaterstoffen komen in aanmerking n-alkanen en olefinen met tien of meer C-atomen. Aromaten, naftenen en isoparaffinen worden door de toegepaste micro-organismen nauwelijks of niet aangetast. De paraffinen worden verkregen door behandeling van aardoliefracties met moleculairzeven of door ontparaffineren van aardoliefracties. Het is niet noodzakelijk de paraffinen te scheiden van de overige aardoliecomponenten. Indien geen scheiding plaatsvindt, wordt de

aardoliefractie ontparaffineerd door directe behandeling met micro-organismen. Bij ontparaffineren van aardoliefracties kan gebruik worden gemaakt van gisten (60) en van bacteriën (61). Bij microbiologische ontparaffinering verdient het soms aanbeveling de te behandelen aardoliefractie te scheiden in een paraffine-rijk en een paraffine-arm deel (62). Alleen het paraffine-rijke deel wordt behandeld met micro-organismen, waarna behandeld en onbehandeld deel weer worden samengevoegd. Voor een goede groei moet de diameter van de oliedruppels kleiner zijn dan 30μ , bij voorkeur kleiner dan 10μ (63). In fermentatievaten van industriële afmetingen, 50 tot 300 m^3 , is dit door roeren niet op economische wijze te verwezenlijken, echter wel door homogeniseren (64). Het homogeniseren van de olie kan plaatsvinden in de toevoer van de waterfase of in de toevoer van de lucht. Vaste paraffine kan eveneens als voeding gebruikt worden. In dit geval wordt de vloeibaar gemaakte paraffine verstoven in een vloeistof die een temperatuur heeft boven het smeltpunt van de paraffine. Vervolgens wordt de vloeistof afgekoeld. Het effect van het verstuiven wordt bij vloeibare druppels teniet gedaan door coalescentie, bij vaste deeltjes door agglomeratie. Dit kan tegengegaan of geheel voorkomen worden door gebruik te maken van emulgatoren. Coalescentie of agglomeratievorming kan echter ook voorkomen worden door de olie vlak voor het verstuiven of homogeniseren te vermengen met micro-organismen, bij voorkeur met gistcellen. Bij een ladingsgewijs proces verdient het aanbeveling de olie geleidelijk toe te voeren, in overeenstemming met de toename van de hoeveelheid gist (65).

De samenstelling van het cultuurmedium en de behoefte aan groeistoffen (66) zijn afhankelijk van het toegepaste micro-organisme. Het fermentatievat kan worden uitgevoerd als een geroerde tank of als een toren met zeefplaten. In het laatste geval stroomt het beluchtingsgas van onderen naar boven, het medium van boven naar onderen, via hellende zeefplaten. Het medium wordt voortdurend gerecirculeerd (55). Volgens Laine (67) wordt bij de uitvoering van het B.P. proces te Lavéra gebruik gemaakt van een zg. Lefrançois-fermentatievat (68). Deze Lefrançois-fermentatievaten werken met ge-

dwongen circulatie door luchttoevoer. De Lefrançois-vaten in de B.P. raffinaderij te Lavéra zijn echter later voorzien van roerders, omdat de emulsiëvorming onvoldoende was. Een geroerd vat is dus noodzakelijk. In dit verband moet genoemd worden het werk van Blakebrough (69) (70) met air-lift-fermentatievaten. Blakebrough komt bij vergelijking van air-lift-fermentatievaten en een geroerde tankreactor tot de conclusie, dat het air-lift-fermentatievat geschikter is voor groei van micro-organismen op gasolie dan een geroerde tankreactor. Uit zijn gegevens blijkt echter, dat in beide gevallen de groei zeer, zeer slecht is. De slechte resultaten zijn hoogstwaarschijnlijk een gevolg van een incompleet medium. Conclusies mogen, bij een dergelijk slechte groei, niet getrokken worden.

De omstandigheden, temperatuur en pH, zijn afhankelijk van het gebruikte micro-organisme. Het is noodzakelijk om de pH binnen enge grenzen constant te houden (71). In de zuurstofbehoefte van de micro-organismen kan worden voorzien door vortex-beluchting of door lucht in te leiden via een zeefplaat. De hoeveelheid lucht varieert van 5 tot 65 vol/vol/uur. (66)

In het fermentatievat groeit de gist ten koste van de zouten, de groeistoffen en de koolwaterstoffen.

Bij het optreden van infectie wordt de pH omlaag gebracht tot 1 à 3 (55). De pH wordt op deze lage waarde gehouden gedurende 30 min. à 5 uur. De omstandigheden en de duur van deze periode worden zo gekozen, dat meer dan 90 % van de verontreinigingen en minder dan 10 % van de gist gedood worden.

Bij ladingsgewijsbedrijf wordt het proces beëindigd na bereiken van de stationaire fase. Bij continubedrijf wordt uiteraard voortdurend afgetapt. Het verkregen mengsel gist / olie / waterige fase wordt gescheiden in een drietal fracties: gist, olie en de waterige vloeistof. De scheiding vindt plaats door afwisselende behandeling met oppervlakactieve stof en centrifugeren (72) (73). Toegepast kunnen worden zowel anionische, kationische als nonionische oppervlakactieve stoffen. Het effect van de behandeling wordt verhoogd door de pH op te voeren tot 7 - 9 en de temperatuur tot 60° C. De gistpasta wordt afwisselend gewassen en gecentrifugeerd, teneinde de op-

pervlakactieve stof weer te verwijderen. Indien bacteriën worden toegepast, heeft deze behandeling geen succes. Bacteriën en olie zijn op deze wijze niet te scheiden. Daarom wordt gefiltreerd en de filtratiekoek - het mengsel bacteriën/olie - wordt behandeld met een oplosmiddel om de bacteriën olievrij te maken (65).

Gist gekweekt op koolwaterstoffen heeft een hoger vetgehalte dan gist gekweekt op koolhydraten. De smaak van de gist is ranzig en pikant. Zonder meer is de gist niet geschikt voor consumptie. Voor het verwijderen van lipiden, esters, ketonen en vrije vetzuren uit de gistcellen wordt de gist nabelucht (74). Hiertoe wordt de gistpasta in een vers voedingsmedium belucht, bij afwezigheid van een koolstofsubstraat. Na de beluchting kan eventueel de behandeling met oppervlakactieve stoffen worden voortgezet. Door de nabeluchting is het gehalte aan vetbestanddelen en aardoliecomponenten aanzienlijk afgenomen. Niettemin dient door extractie het vet- en oliegehalte nog gereduceerd te worden (75) (76). De extractie en de daaropvolgende droging zijn gemakkelijker uit te voeren aan opengelegde cellen. Daarom wordt de gist eerst geautolyseerd, dan wel gehydrolyseerd of geplasmolyseerd (77) (78). De autolyse wordt bemoeilijkt door aanwezigheid van oliebestanddelen op de gist (60). Een goede voorbehandeling met oppervlakactieve stoffen is dus noodzakelijk. Door centrifugeren of door filteren worden twee fracties verkregen, een autolysaat en de celwandbestanddelen. Zowel autolysaat (77) als celwandbestanddelen (78) worden geëxtraheerd met een polair oplosmiddel, gevolgd door extractie met een mengsel van een polair oplosmiddel en een vluchtig n-alkaan. Het oplosmiddel wordt teruggewonnen door destillatie. Uit het vetextract worden bestanddelen gewonnen als sterolen. Het overblijvende vetextract kan gebruikt worden als koolstofsusubstraat voor micro-organismen.

Zowel autolysaat als celwandbestanddelen kunnen bij lage temperatuur gedroogd worden, waardoor het eiwit zijn biologische waarde behoudt.

In principe ontstaan bij de groei van micro-organismen op koolwaterstoffen celmateriaal, CO₂ en H₂O. Er ontstaan echter ook nog andere stoffen, esters bv., die opgenomen worden in de oliefase. Door deze

stoffen gaat het troebelingspunt van de olie omhoog, hetgeen uiteraard ongewenst is. Om deze stoffen te verwijderen, dient de olie een nabehandeling te ondergaan. Verwijdering kan geschieden door wassen met loog (79) of door hydrogeneren (80). Reeds eerder is opgemerkt, dat de aardoliefractie vóór het ontparaffineren gescheiden kan worden in een paraffinerijk en een paraffinearm deel. Alléén het paraffinerijke deel wordt microbiologisch ontparaffineerd. Gevonden is (62), dat na het bijeenvoegen van de beide fracties het troebelingspunt dusdanig laag is, dat nabehandeling van de olie niet noodzakelijk is.

Ter verbetering van de economie van het proces is continubedrijf aan te bevelen (81).

1.4. Probleemstelling.

Uit de octrooiliteratuur blijkt, dat de diameter van de oliedruppels kleiner dan 30μ , bij voorkeur kleiner dan 10μ moet zijn (63). Met de homogenisator bereikt men 1μ (64) en door gisttoevoeging wordt deze druppelgrootte gehandhaafd. Over de zin van deze afmetingen, over de functie van het grensvlak, wordt niets vermeld. De functie van het grensvlak kan echter pas duidelijk worden, als het overdrachtsmechanisme bekend is. Nu zijn de n-alkanen zeer slecht oplosbaar. Overdracht van het n-alkaan via oplossen in de waterfase is dus onwaarschijnlijk. Een onderzoek naar de stofoverdracht en naar de functie van het grensvlak is noodzakelijk.

In bijna alle octrooien komt de volgende zinsnede voor: "In tegenstelling met de gebruikelijke chemische werkwijzen, die voldoen aan de wet van de (chemische) massawerking, wordt de verwijderingssnelheid van de koolwaterstoffen met rechte keten praktisch niet kleiner naarmate de hoeveelheid van deze koolwaterstoffen in het totale koolwaterstofmengsel afneemt (behalve uiteraard in de eindfase van de verwijdering)". De juistheid van deze stelling moet worden nagegaan door een onderzoek naar de invloed van de n-alkaanconcentratie.

Bij microbiologische ontparaffinering is een mengsel van n-alkanen aanwezig. Monod (83) toonde aan, dat bij groei van micro-organismen op een mengsel van koolstofbevattende substraten (in zijn geval koolhydraat) diauxie op kan treden. Onder diauxie, triauxie etc. wordt verstaan, dat de micro-organismen de koolstofbevattende substraten niet gelijktijdig aantasten, doch na elkaar. Bij groei op een mengsel van n-alkanen is het dus van belang te weten of alle n-alkanen gelijktijdig verdwijnen, of dat de n-alkanen na elkaar verdwijnen. In het laatste geval is het van belang te weten, in welke volgorde de n-alkanen verdwijnen. Uit de octrooiliteratuur blijkt, dat een voorkweek op koolhydraten aanbeveling verdient. Het is dus tevens van belang te weten of diauxie optreedt bij een mengsel van koolhydraten en koolwaterstoffen.

1.5. Stofoverdracht en fasegrensvlak.

Johnson (84) heeft op grond van diffusie-overwegingen gesteld: "De concentratie van opgelost alkaan in de waterige fase is dusdanig laag, dat geen redelijke groeisnelheden te verwachten zijn op n-dodecaan en hogere n-alkanen, zelfs niet indien aangenomen wordt, dat de Michaelis - constante nul is". De bewijsvoering ontbreekt. Daar echter proefondervindelijk gebleken is, dat sommige micro-organismen zeer goed groeien op n-alkanen hoger dan n-dodecaan, heeft hij voor het onbekende overdrachtsmechanisme een hypothese opgesteld: "Groei vindt plaats aan het grensvlak, de lange alkaanketens worden een deel van het fosfolipid - micel van het celmembraan en er bestaat een lyofobe weg van de buitenzijde van het celmembraan naar de plaats van het enzym, dat verantwoordelijk is voor de eerste trap van het oxydatie-proces". Voor n-alkanen lager dan n-dodecaan zou dus de groei kunnen plaats vinden via opgelost alkaan, voor n-dodecaan en hogere n-alkanen door direct contact met het vloeibare alkaan.

Het is redelijk te veronderstellen, dat een wijziging van overdrachtsmechanisme tot uiting komt in grootheden, die de omzetting

bepalen, bv. groeisnelheidsconstante, zuurstofverbruik enz. Afwijkingen van het normale patroon van de genoemde grootheden zijn dus te verwachten. Uit de literatuur blijkt, dat inderdaad bij de n-alkanen met 10 tot 14 C-atomen afwijkingen veelvuldig optreden. (51) (85) (86) (87) (88) (89) (90) (91). Merkwaardig genoeg wordt hieraan door de auteurs geen aandacht besteed. Alléén Harris (86) merkt op, dat de zuurstofconsumptie een afwijking vertoonde bij n-decaan. Hij tracht dit te verklaren door aan te tonen, dat alleen n-decaan een ringachtige structuur zonder uitstekende methyl-eindgroep kan aannemen. In het algemeen komt de afwijking juist bij hogere n-alkanen voor. - fig. 23 -.

Afwijkingen bij n-alkanen met 4 tot 8 C-atomen treden eveneens op. Deze afwijkingen zullen waarschijnlijk een gevolg zijn van de toxische eigenschappen van de lagere, vloeibare alkanen (92).

Voor een goede groei van micro-organismen op koolwaterstoffen is een groot grensvlak koolwaterstof/cultuurvloeistof noodzakelijk. Door de koolwaterstof te dispergeren - door schudden, door inblazen van lucht of door roeren - wordt het grensvlak vergroot. Just (29) maakte gebruik van een sterke beluchting (tot 400 vol/vol/uur). Vóór Just werd echter nauwelijks gebruik gemaakt van agitatie. Alleen Tausz (93) in 1919 en Haag (94) in 1926 pasten schudcultures toe. Men was zich echter wel bewust, dat voor een goede groei een groot grensvlak noodzakelijk was. Teneinde dit te bereiken, maakte men gebruik van verschillende methoden:

adsorptie van koolwaterstoffen op vaste stoffen als aarde, siliciumdioxide, ijzerdioxide (95), zand, kieselguhr, caseïne (96), verpoederd glas (97), glaswol (14) en (volgens octrooien uit 1965) zeolieten (98) en metaal- of kunststofgaas (99),

emulgeren en vervolgens doen geleren door toevoeging van arabische gom (14), klei (100), bentoniet (86), gom (101),

verdelen van vaste paraffine in snippers, spanen, schaafsel, dunne laagjes door kristallisatie (102) (103) (104) (105),

toevoegen van vaste paraffine in gesmolten toestand, waardoor na stollen een onregelmatig oppervlak ontstond (13), (93). Indien het fermentatievat niet te groot is, is het mogelijk door

sterk roeren een voldoende groot grensvlak te verkrijgen (63). Bij fermentatievaten van industriële afmetingen kan men de koolwaterstoffen verstuiven of homogeniseren en de emulsie stabiliseren (64). Micro-organismen bezitten een zekere affiniteit voor het water/olie grensvlak. De mate van affiniteit hangt af van het micro-organisme. Mudd (106) vond, dat bacteriën ophoopten in het grensvlak. Zuurvaste bacteriën (Mycobacterium) waren weinig stabiel in het grensvlak en werden bijna kwantitatief in de oliefase opgenomen. Reed (107) constateerde, dat zuurvaste bacteriën geheel opgenomen werden in de oliefase. Saz (108) stelde vast, dat Mycobacterium kwantitatief naar het grensvlak migreerde. Volgens Raymond (109) heeft Nocardia een zeer sterke affiniteit voor het grensvlak, terwijl de affiniteit van Pseudomonas en gisten veel geringer is.

2. MICRO-ORGANISMEN, CULTUURMEDIUM, MEETMETHODEN

Voor het onderzoek werd gebruik gemaakt van de, uit een collectie afkomstige, gistsoorten : Candida lipolytica C.B.S. 599, Candida tropicalis C.B.S. 94 en Candida intermedia C.B.S. 572.

De reïncultures werden instandgehouden op het synthetisch medium volgens Wickerham (Difco's yeast morphology agar). Overenten vond éénmaal per maand plaats.

De reïncultures werden voorgekweekt op koolwaterstoffen. Deze (voorgekweekte) reïncultures werden gehandhaafd in schudculture, op het gemodificeerde Miller-medium. Elke 24 uur werd overgeënt. Bij het overenten bevonden de cultures zich in de exponentiële groeifase.

Bij het onderzoek werd steeds toegepast het Miller-medium (110), aangevuld met groeistoffen, als volgt :

KH_2PO_4	5.0 gr	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	80 μgr
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5 gr	KJ	200 μgr
CaCl_2	0.4 gr	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	400 μgr
NH_4Cl	7.0 gr	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	800 μgr
Gistextract (Difco)	0.2 gr	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	400 μgr
		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	800 μgr

Gedestilleerd water tot 1 liter.

Als koolwaterstoffen werden toegepast : n-hendecaan tot n-nona-decaan. De n-alkanen (merk Fluka) hadden een zuiverheid groter dan 99 mol %. Een uitzondering vormde n-heptadecaan, dat een zuiverheid groter dan 95 mol % had. De n-alkanen werden opgenomen in vloeibare paraffine. De vloeibare paraffine, s.g. 0.883, was van het merk B.D.H. Voor het onderzoek naar de groei van gisten op mengsels van meer dan twee koolwaterstoffen, werd gebruik gemaakt van een Kuwait zware gasolie. Deze gasolie, kooktraject 218° C tot 349° C, bevatte 17.4 % n-alkanen, voornamelijk n-decaan tot en met n-eicosaan. Het percentage n-alkanen lager dan n-decaan en hoger dan n-eicosaan was

te verwaarlozen.

Bij alle proeven werd als schuimbestrijdingsmiddel 0.5 gr Antifoam-C (merk Dow Corning) per liter cultuurvloeistof toegevoegd.

Als maat voor de gistconcentratie werd gebruikt het gewicht van de drogestof per volume-eenheid cultuurvloeistof. De drogestofconcentratie werd als volgt gemeten :

- | | |
|----------|---|
| direct | - door klassieke drogestofbepaling. |
| indirect | - door bepaling van de sedimenthoogte in hematokrietbuizen. |
| | - door bepaling van de gevormde hoeveelheid zuur. |

De bepaling van de sedimenthoogte en de bepaling van de gevormde hoeveelheid zuur werden geïjkt tegen de klassieke drogestofbepaling. Voor de bepaling van de hoeveelheid n-alkanen werden twee methoden toegepast, de gaschromatografische methode en de brekingsindexmethode. De hoeveelheden van de verschillende n-alkanen in de Kuwait zware gasolie werden alleen langs gaschromatografische weg bepaald.

2.1. Micro-organismen.

2.1.1. Ophoping.

Voor het verkrijgen van koolwaterstof-aantastende micro-organismen wordt uitgegaan van ophopingsculturen. Een cultuurmedium (al of niet aangevuld met groeistoffen) wordt geënt met een grondmonster, met rioolwater of met andere "bronnen" van micro-organismen. Verschillende auteurs (111) (112) hebben aangetoond, dat de micro-flora van de grond verandert, indien de grond doordrenkt wordt met koolwaterstoffen. Het aantal micro-organismen daalt aanvankelijk, neemt dan toe en bereikt uiteindelijk een waarde, hoger dan normaal. Andere micro-organismen hebben de overhand gekregen. Men kan daarom ook uitgaan van grondmonsters verkregen uit de nabijheid van oliebronnen of van aarde die met petroleum is voorbewerkt (10) (11) (29) (37) (88) (110) (113) (114) (115) (116) (117) (118) (119).

Gebleken is (120), dat steeds dezelfde soorten opgehoopt worden, vooral soorten van de geslachten Mycobacterium, Nocardia en Pseudomonas. Volgens Finnerty (121) zouden soorten die geen koolwaterstoffen aantasten maar wel vetzuren, de overhand krijgen. Teneinde deze ongewenste selectie tegen te gaan, past hij "transfer enrichment" toe. Dit houdt in dat de cultures tijdens het ophopen vaker overgeënt worden dan normaal gebruikelijk is. Hierdoor zou ophopen van afbraakprodukten voorkomen worden. De methode is afgeleid van de "steady state enrichment" volgens Palmer (122). Met deze methode was Finnerty in staat om een groter aantal koolwaterstof-aantastende soorten te isoleren dan met de conventionele (statische) ophopingsmethoden.

Gatellier (123) (124) geeft aan hoe door toepassing van selectieve media bacteriën, gisten dan wel schimmels opgehoopt kunnen worden. Door verschillende onderzoekers werd een zeer groot aantal koolwaterstof-aantastende gistsoorten geïsoleerd (41) (89) (125) (126) (127) (128) (129).

In veel gevallen blijft identificatie van de geïsoleerde micro-organismen achterwege. Dit is op zichzelf niet verwonderlijk. Identificatie van geïsoleerde micro-organismen is het werk van specialisten. Wanneer echter Raymond (130) gegevens publiceert over een gist die "waarschijnlijk een Candida was" en Miller (110) spreekt over "een gist, gelijkend op Candida intermedia", dan kan men stellen dat dit op zijn minst uitermate bezwaarlijk is.

2.1.2. Micro-organismen uit "collecties".

Het is mogelijk uit te gaan van reincultures afkomstig uit bestaande collecties (40) (89) (125) (127) (131) (132) (133). Alleen Hopkins (103) had hiermee geen succes. Micro-organismen afkomstig uit collecties dienen voorgekweekt te worden op koolwaterstoffen. Champagnat (61) beschrijft het voorkweken. Voor gisten gebeurt dit als volgt : enten, 3 dagen bebroeden bij 30° C onder mechanische agitatie, overenten in vers medium, opnieuw 3 dagen bebroeden, waarna de-

zelfde bewerkingen 4 à 5 maal herhaald worden.

Gatellier (134) heeft aangetoond, dat sneller een goede groei verkregen wordt, indien aan de aardoliefractie een hoeveelheid ruwe aardolie wordt toegevoegd. Aangenomen moet daarom worden dat er in de ruwe aardolie bepaalde stoffen aanwezig zijn, die beter assimileerbaar zijn dan de stoffen in de toegepaste aardoliefractie.

Fredericks (135) heeft nagegaan hoe de groei verandert, indien overgegaan wordt op een andere koolwaterstof. Op grond van zijn resultaten heeft hij een volgorde van assimileerbaarheid opgesteld.

Het voorkweken volgens Champagnat duurt 18 tot 21 dagen. Daarom is nagegaan of een zo langdurige voorkweek noodzakelijk is. Uit tabel 1 blijkt dat Candida lipolytica C.B.S. 599 en Candida tropicalis C.B.S. 94 bij overgang van koolhydraatsubstraat op koolwaterstofsubstraat, binnen 24 uur een goede groei vertoonden.

2.1.3. Keuze van micro-organisme voor het onderzoek.

Teneinde de kostprijs van het eiwit zo laag mogelijk te houden, zal het noodzakelijk blijken om het proces uit te voeren onder niet aseptische omstandigheden. Wel zal door geschikte maatregelen getracht moeten worden de kans op infectie te verkleinen. Onder deze maatregelen valt bijv. de ontsmetting van de fermentatievaten. De kans op infectie kan worden verkleind door de omstandigheden (temperatuur, pH) en de samenstelling van het cultuurmedium zodanig te kiezen, dat deze gunstig zijn voor de ontwikkeling van de gewenste soort en ongunstig voor de ontwikkeling van ongewenste soorten. Onder extreme omstandigheden - hoge temperatuur, lage pH - zullen slechts weinig soorten zich kunnen ontwikkelen. Bij voorkeur zal daarom een soort gekozen worden die zich onder extreme omstandigheden optimaal ontwikkelt. Daar zeer veel soorten groeistoffen nodig hebben voor goede groei, zal bij voorkeur een soort gekozen worden die geen groeistoffen nodig heeft.

Bij veel bacteriesoorten is toevoeging van groeistoffen niet noodzakelijk. Een nadeel is dat voor goede groei van bacteriën op koolwa-

terstoffen de pH in het algemeen 6 à 8 dient te zijn. Dit pH-traject is gunstig voor veel bacteriesoorten, zodat de kans op het optreden van infectie groot is. De afscheiding van bacteriën uit een olie/bacterie-mengsel is moeilijk.

Voor gisten is in het algemeen toevoeging van groeistoffen noodzakelijk (136) (137) (138) (139). Voor goede groei op koolwaterstoffen dient de pH 3 - 5 te zijn. Dit is gunstig. De afscheiding van gisten uit een olie/gist-mengsel is betrekkelijk eenvoudig.

Na afwegen van de voor- en nadelen werd besloten voor het onderzoek gebruik te maken van gisten, meer in het bijzonder van giststammen afkomstig uit collecties. Onderzocht werden 12 reïncultures, behorende tot 8 soorten van het geslacht Candida -tabel 2-. De stammen waren afkomstig van het Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Afdeling Gisten, Delft (C.B.S.); van de National Collection of Yeast Cultures, Nutfield, England (N.C.Y.C.) en van het Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, U.S.A. (N.R.R.L.). Voor toepassing bij het onderzoek werden tenslotte gekozen : Candida lipolytica C.B.S. 599, Candida tropicalis C.B.S. 94 en Candida intermedia C.B.S. 572.

2.2. Cultuurmedium.

2.2.1. Groeistoftoevoeging.

In de literatuur worden een groot aantal cultuurmedia gegeven die geschikt zijn voor het isoleren van micro-organismen (13) (49) (61) (110) (123) (130) (140) (141). In het algemeen bevatten deze media geen groeistoffen. Wildiers (142) heeft bewezen dat er voor groei, naast anorganische zouten en een koolstofbron, nog andere stoffen nodig zijn. Deze onbekende stoffen noemde hij bios. Tegenwoordig kent men een groot aantal groeistoffen. Voor de gistgroei zijn belangrijk : biotine, pantotheenzuur, thiamine, riboflavine, nicotinezuur en para-aminobenzoëzuur.

Gisten zijn in staat een voorraad groeistoffen aan te leggen. Na

overenten in een medium dat alleen anorganische zouten en een koolstofbron bevat, kunnen de gisten zich vermenigvuldigen dank zij hun voorraad groeistoffen. Wil men de noodzaak van groeistofoetoevoeging aantonen, dan moet tijdens de proef enkele malen overgeënt worden in een vers medium. In dit geval kan worden aangenomen dat de voorraad verbruikt is en dat groeistoffen, die eventueel bij de eerste enting meegekomen zijn, voldoende verdund zijn. Van de in de literatuur genoemde media is gekozen het Miller-medium (110), omdat voor dit medium de hoeveelheid spore-elementen nauwkeurig is aangegeven. Champagnat (61) voorziet in spore-elementen door toevoegen van kraanwater.

In tabel 3 is de opbrengst aan drogestof bij groei op het Miller-medium, bij verschillende concentraties gistextract, aangegeven. Indien geen gistextract wordt toegevoegd, is toch groei mogelijk. De groei is echter gering, zodat (bij 240 maal verdunnen) na drie overentingen de kolf "leeggespoeld" is. Uit de tabel blijkt dat reeds een zeer geringe concentratie - 0.002 % gistextract - voldoende is. Teneinde bij het onderzoek bij hogere celconcentraties groeistoflimitering te voorkomen, is gebruik gemaakt van een 10 maal hogere concentratie, dus van 0,2 gr gistextract per liter cultuurvloeistof. Daar de samenstelling van het gistextract niet bekend is, is nagegaan of toevoeging van vitamines in bekende hoeveelheden goede resultaten gaf. In tabel 4 is de opbrengst aan drogestof, bij groei op het Miller-medium, met als groeistofoetoevoeging achtereenvolgens : biotine, vitamines volgens Ter Karapetyan (143) (144) en gistextract gegeven. Hieruit blijkt dat in alle gevallen dezelfde eindconcentratie bereikt wordt. Bij toevoeging van gistextract neemt echter de opbrengst in het begin sneller toe en daarom verdient gistextracttoevoeging de voorkeur.

2.2.2. Toevoeging chemische schuimbestedingsmiddelen.

Bij de kweek van gisten in een medium met koolhydraten kan schuimvorming optreden (137) (145). De oppervlakactieve stoffen die de

schuimvorming veroorzaken, zijn in het uitgangsmateriaal aanwezig (bijv. de ligninen in de sulfietloog) en/of ze worden tijdens de gisting gevormd. De gistcellen dragen bij tot de stabilisering van de schuimlaag, daar ze zich door flotatie ophopen in het schuim en een soort "geraamte" vormen. De gist in de schuimlaag komt niet voldoende in contact met de voedingsoplossing en met de zuurstof, terwijl de gevormde warmte slechts ten dele afgevoerd kan worden, waardoor de temperatuur in de schuimlaag oploopt. Deze gist is slecht van kwaliteit en neemt niet meer aan het groeiproces deel, zodat de opbrengst laag is.

Bij cultiveren van de gist in schudkolven treedt dit verschijnsel heel sterk op, terwijl bovendien de schuimlaag zich bevindt tussen vloeistof- en gasfase en zo de overdracht van zuurstof verhindert. Er ontstaat een anaërobe toestand en de groeisnelheid neemt sterk af.

Bij het geroerde vat met keerschotten treedt flotatie eveneens sterk op. De gist (146) wordt boven de schuimlaag afgezet tegen de wanden van het vat. De schuimlaag bevindt zich als een praktisch immobiele laag boven op de vloeistof. Hierbij dient vermeld te worden, dat bij dit type de schuimhoeveelheid met de tijd toeneemt, zodat tenslotte het vat overschuimt. Daar bij dit type de lucht onder in het vat wordt ingebracht, heeft de schuimlaag geen invloed op de zuurstofoverdracht.

Voor fermentatoren van het "Vortex" type (en ook voor gemodificeerde "Vortex" systemen als de Waldhof fermentor), wordt gesteld, dat geen schuim optreedt, omdat door de Vortex werking het gevormde schuim ogenblikkelijk vernietigd wordt. Chain (146) heeft bewezen, dat wel degelijk een hoeveelheid schuim aanwezig is, doch dat een stationaire toestand bereikt wordt, waarbij schuimafbraak en schuimvorming met elkaar in evenwicht zijn. Het schuim is opgenomen in de vloeistof en vormt hiermede een stabiel geheel. Het flotatie-effect is waarschijnlijk gering of zelfs afwezig. Chain heeft aangetoond, met behulp van schuimbestrijdingsmiddelen, dat de aanwezigheid van dit schuim in de vloeistof de uitwisseling van zuurstof sterk belemmert. Mechanische schuimbestrijding - schuimbrekers, afzuigen via "Düsen",

ultrasone trillingen etc. - zijn tot nu toe geen succes gebleken. In de praktijk worden chemische bestrijdingsmiddelen - antifoam agents, in de gistfabricage wel "gistingsvet" genoemd - toegevoegd.

Bij de kweek van gisten op koolwaterstoffen doen zich genoemde verschijnselen in versterkte mate voor. De schuimvorming is sterker, omdat de beluchting krachtiger moet zijn. De lucht - behoefte is groter, daar het n-alkaanmolecuul geen zuurstof bevat (147)(148) en omdat de agitatie in verband met de emulsievorming krachtiger moet zijn. De flotatieneiging is sterker, omdat het soortelijk gewicht van het gist/alkaan-complex lager is dan het soortelijk gewicht van de gist.

Robinson (149) geeft een theoretische beschouwing over de eisen te stellen aan schuumbestrijdingsmiddelen, terwijl Gaden (150), in een bijzonder goed overzicht, niet alleen de schuumbestrijding, doch ook de schuimvorming nagaat. Een overzicht van de verschillende in de handel zijnde schuumbestrijdingsmiddelen - fabrikaat, chemische samenstelling - wordt gegeven door Goldschmidt (151). Ghosh (152) deelt ze in - op basis van olie, vetzuren, siliconen etc. - en gaat voor verschillende stoffen het schuimbrekend vermogen na.

Corman (153) vond, dat bij toevoeging van 200 p.p.m. aan sulfietoplossing de zuurstofoverdracht (O.A.R.-oxygen absorption rate, mol./liter uur) terugviel tot 12 %, terwijl Deindoerfer (154) (30 p.p.m. opgenomen in 1000 p.p.m. Carrier) in een fermentatiemedium een vermindering tot 50 % constateerde. Deindorfer meende, dat door de schuumbestrijdingsmiddelen de filmweerstand toenam als gevolg van adsorptie aan het oppervlak van de luchtbelllen. Nu is het vrij onaanneemelijk, dat in een zo complex medium een dergelijke kleine toevoeging (p.p.m.) in staat is door adsorptie de weerstand veel te wijzigen. Aiba (155) - die met een zeep, natrium laurylsulfaat, in een 1 % NaCl oplossing werkte - vond bij toevoeging van 100 p.p.m. een daling van de zuurstofoverdrachtscoëfficiënt tot 25 %. Hij kwam tot de conclusie, dat de zeep een soort kalmerende invloed had op de oscillaties en andere gecompliceerde bewegingen van het beloppervlak. Corman, Deindoerfer en Aiba werkten echter met niet-schuimende vloeistoffen.

Bij schuimende vloeistoffen heeft de toevoeging twee effecten tot gevolg. Er is een positief effect, de vernietiging van het schuim en een negatief effect, de verlaging van de zuurstofoverdracht. Welk effect in een bepaald geval doorslaggevend is, is zonder meer niet uit te maken. Bij schudkolven geeft toevoeging van schuimbekrijdingsmiddelen in het algemeen grote verbetering van de zuurstofoverdracht. Phillips (156) vond bij een geroerd vat met keerschotten een afname van de O.A.R. (tot 50 %) door toevoeging van schuimbekrijdingsmiddelen. Chain (146) vond bij "Vortex" aeratie (schuimende vloeistof), dat de O.A.R., na toevoeging, met een factor 10 toenam.

In tabel 5 is de groei met en zonder Antifoam-C (Dow Corning) weergegeven. Duidelijk blijkt, bij afwezigheid van Antifoam, dat de gist zich na zekere tijd gaat ophopen in de schuimlaag (teruglopen van de gistconcentratie). De totale hoeveelheid gist - in vloeistof en in schuimlaag - is geringer dan bij toevoeging van Antifoam.

In de literatuur zijn weinig gegevens te vinden over de concentratie van gistingsvet. Dit is niet verwonderlijk, in aanmerking genomen dat het vet naar behoefte (met behulp van schuimdetectoren) gedoseerd wordt. Bovendien lopen de in de praktijk gebruikte voedingsmedia sterk uiteen in schuimend vermogen. Ballis (157) noemt een concentratie van 1.5 % betrokken op de opbrengst aan droge gist. Reiff (137) geeft op 0.8 - 4 %, eveneens betrokken op de opbrengst drogestof. Champagnat (58) noemt 0.1 gew. % betrokken op de waterfase. Gaat men uit van 30 gr. gist (drogestof) per liter en 2 (gew) % Antifoam (betrokken op de drogestof), dan komt men tot een toevoeging van maximaal 0.6 gr/liter

De invloed van Antifoam-C concentratie is nagegaan - tabel 6 -. In schudkolven, bij een gistconcentratie van 3 gr drogestof per liter, is 0.03 gr Antifoam-C per liter reeds voldoende. Bij fermentatievaten - hogere gistconcentratie, sterke beluchting - zal een hogere Antifoam-C concentratie nodig zijn. Aan het cultuurmedium is bij alle proeven 0.5 gr. Antifoam-C per liter toegevoegd. Uit tabel 6 blijkt, dat deze concentratie niet schadelijk is voor de gistgroei.

2.2.3. Koolwaterstoffen. Vloeibare paraffine als oplosmiddel voor n-alkanen.

Bij de fermentatievaten, toegepast in dit onderzoek, vindt de temperatuurregeling plaats door koelspiralen. De glaswand boven het vloeistofniveau is op de omgevingstemperatuur, 20° C. Door opspatten zal zich regelmatig n-alkaan afzetten tegen de glaswand boven het vloeistofniveau. Deze n-alkaan druppels zullen echter na korte tijd weer terugvallen in de vloeistof. Bij toepassen van n-heptadecaan (smeltpunt + 22° C) en n-octadecaan (smeltpunt + 28° C) zal het opgespatte n-alkaan kristalliseren tegen het genoemde deel van de cylinderwand en dus blijvend onttrokken zijn aan de vloeistof. Daarom moeten deze n-alkanen opgenomen worden in een oplosmiddel. n-Nonadecaan en hogere n-alkanen zijn vast bij de toegepaste fermentatie-temperatuur (30° C). Ook voor deze n-alkanen geldt dus, dat ze opgenomen moeten worden in een oplosmiddel (bij dit onderzoek is niet gewerkt met n-alkanen in vaste toestand). Het oplosmiddel mag niet toxisch en niet vluchtig zijn. Bovendien mag het oplosmiddel niet geschikt zijn als koolstof- en energiebron. Miller (110) (158) gebruikt als oplosmiddel het 2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecaan (pristane).

De volgende oplosmiddelen werden op hun bruikbaarheid onderzocht - tabel 7 -

pristane

vloeibare paraffine, lichte fractie, s.g. 0.830 - 0.870

vloeibare paraffine, zware fractie, s.g. 0.865 - 0.890

De onderzochte oplosmiddelen waren niet-toxisch en niet-vluchtig. Op pristane en op vloeibare paraffine, lichte fractie, was enige groei merkbaar. Op vloeibare paraffine, zware fractie, werd geen groei geconstateerd. Bij toepassen van n-alkanen in combinatie met de genoemde oplosmiddelen zijn geen aanwijzingen gevonden voor het optreden van co-oxydatie.

Als oplosmiddel - in het vervolg te noemen inerte olie - is daarom toegepast vloeibare paraffine, zware fractie s.g. 0.865 - 0.890, merk B.D.H. (Voor het gehele onderzoek is gebruik gemaakt van een

bepaalde batch, s.g. 0.883, zodat de samenstelling steeds dezelfde was).

Teneinde de groei van Candida lipolytica op de verschillende n-alkanen te kunnen vergelijken, moeten de omstandigheden dezelfde zijn. Daarom zijn de bij dit onderzoek toegepaste alkanen (n-hendecaan tot en met n-nonadecaan) steeds opgelost in de inerte olie.

2.3. Meetmethoden.

2.3.1. Bepaling van de gistconcentratie.

Het aantal methoden om de concentratie van micro-organismen in een cultuurvloeistof te bepalen, is zeer groot (159) (160) (161). Ze worden onderscheiden in methoden ter bepaling van het aantal levende micro-organismen (kiemgetal) en methoden ter bepaling van de opbrengst aan celmateriaal (totaalbepaling). Bij de totaalbepaling wordt geen onderscheid gemaakt tussen levende en dode cellen. Er zijn echter methoden bekend om het percentage dode cellen in een cultuurvloeistof te bepalen (162) (163) (164).

De bepaling van het kiemgetal berust op kweken op voedingsbodems (petri-schalen, rolbuis). Methodes, gebaseerd op de totaalbepaling zijn o.a.:

drogestof, ook bepaling stikstof, aminozuren, enzymen.

microscopische telling (hemacytometer).

troebelings (159) (165) (166).

viscositeit van de suspensie (161).

gewicht natte koek, via filtreren of centrifugeren (161).

soortelijk gewicht van de suspensie (167) (168).

sedimenthoogte in hematokrietbuizen (169).

sedimentvolume (87) (121) (126) (170).

Tegen alle methodes zijn bezwaren in te brengen :

kiemgetal - maakt geen onderscheid tussen grote en kleine cellen, evenmin tussen losse cellen en meercellige klompjes, waarvan de cellen niet zijn te scheiden.

- drogestof - maakt geen onderscheid tussen protoplasma en de reservestoffen van de cel. De combinatie drogestof/stikstofgehalte heeft als bezwaar, dat de verschillende stadia van activiteit van het protoplasma niet tot uiting komen.
- troebelings - is niet alleen afhankelijk van het aantal, maar tevens van de grootteverdeling. Toepassing bij aanwezigheid van koolwaterstoffen is onjuist, omdat de koolwaterstofdruppels bijdragen tot de troebelings. Zijn uitsluitend verteerbare koolwaterstoffen aanwezig, dan kan de methode toegepast worden als de koolwaterstoffen verbruikt zijn. Een voorafgaande bewerking - behandelen met oppervlakactieve stof, centrifugeren, wassen, centrifugeren, suspenderen - is vanwege conglomeraatvorming volstrekt af te wijzen.
- sedimenthoogte - is afhankelijk van de osmotische druk en van de vorm van de cel.

Er worden echter ook methoden toegepast die met het metabolisme van de cel samenhangen : kooldioxyde-ontwikkeling, zuurstofconsumptie, nitraat- of sulfaatreductie, zuurvorming, methyleenblauwreductie enz. Deze methoden zijn tot nu toe meer als aanwijzing voor de celactiviteit dan als maat voor de celopbrengst gebruikt. De reden hiervan is dat het verband tussen de celhoeveelheid en de genoemde grootheden niet éénduidig is. Söhngen (171) gebruikte de CO₂-productie als maat voor de oxydatiesnelheid van petroleum. Ullmann (33) vond dat de CO₂-productie evenredig was met de gistconcentratie. Zowel de O₂-opneming als de CO₂-afgifte hangen sterk af van de aanwezigheid van assimileerbaar substraat.

Indien men zich de beperkingen bewust is, dan is het gebruik van de genoemde grootheden als maat voor de concentratie van de micro-organismen, zeer aantrekkelijk. De meeste grootheden : CO₂-ontwikkeling, O₂-consumptie, zuurvorming, zijn continu meetbaar zodat continue registratie van de gistconcentratie mogelijk is.

2.3.1.1. Bepaling droge stof.

Als fundamentele grootheid voor het bepalen van de groei van gistcellen werd gekozen de hoeveelheid drogestof.

De drogestofbepaling werd als volgt uitgevoerd : 40 ml van de cultuurvloeistof werd geschud met 40 ml van een 1 % Teepoloplossing en gecentrifugeerd. De afgescheiden olie werd, onder de microscoop, onderzocht op gistcellen. Het sediment werd tweemaal gewassen met de 1 % Teepoloplossing en tweemaal met gedestilleerd water. Vervolgens werd het sediment onder vacuum gedroogd bij 60° C en nagedroogd bij 105° C tot constant gewicht.

2.3.1.2. Bepaling drogestof m.b.v. sedimenthoogte.

Naast de drogestofbepaling bestond behoefte aan een snelle methode. De bepaling van de sedimenthoogte, een nauwkeuriger uitvoering van de sedimentvolumebepaling, is geschikt als snelle methode.

De voor dit onderzoek gemodificeerde hematokrietbuis had een groot reservoir, inhoud ca. 10 ml. Hierdoor was het mogelijk bij lage gistconcentraties toch een grote nauwkeurigheid te bereiken. Het capillair had een lengte van 8 cm. (onderverdeeld in 80 schaaldelen) en een diameter van 1 mm.

De bepaling werd aldus uitgevoerd. Het monster werd verdund met 1 % Teepoloplossing. Verdunning van 2 x tot 40 x, afhankelijk van de gistconcentratie. Na schudden werd 8 ml van het verdunde monster in het reservoir van de hematokrietbuis gebracht en gecentrifugeerd gedurende 10 minuten (inclusief aanlopen, exclusief uitlopen van de centrifuge). Toerental 3000 omw/min., relatieve centrifugaalversnelling aan begin capillair \pm 500 g., aan eind capillair \pm 1500 g. De sedimenthoogte is afhankelijk van de vorm van de cel. Voor elke soort werd daarom een ijkcurve opgesteld. In fig. 1 is de ijkcurve van Candida tropicalis C.B.S. 94 gegeven. Ten gevolge van gewijzigde omstandigheden of door mutatie kan de vorm van de cellen veranderen. Gedurende het onderzoek werden daarom de ijkcurven regelmatig ge-

controleerd. Wijziging van de ijkcurven tijdens het onderzoek is niet noodzakelijk gebleken. De verschillen tussen de controles waren gering en vielen binnen de meetfouten.

2.3.1.3. Bepaling drogestof door titratie.

In het algemeen ontstaat bij groei van gisten op koolwaterstoffen celmateriaal, CO_2 en H_2O . Andere eindproducten zijn weliswaar aangetoond, maar deze hoeveelheden zijn uiterst gering. (Hierbij wordt afgezien van die gevallen, waarbij de gistcellen door speciale maatregelen andere producten gaan vormen). Door de assimilatie van het ammonium-ion wordt een corresponderende hoeveelheid waterstofionen vrijgemaakt. De hoeveelheid loog die wordt toegevoegd, om de pH op constante waarde te houden is dus een maat voor de groei van de gist. De hoeveelheid loog zal variëren met NH_4 -zout, met n-alkaan, met micro-organisme en met de omstandigheden. Het toepassen van deze methode is dus aan beperkingen onderhevig.

In fig. 2 is het verband weergegeven tussen de toegevoerde hoeveelheid loog en de gevormde hoeveelheid drogestof. De grafiek geldt voor Candida lipolytica C.B.S. 599, gegroeid op het gemodificeerde Miller-medium en op n-hexadecaan als koolstofbron bij een temperatuur van 30°C en een pH van 4.0. Elk meetpunt is verkregen door een ladingsgewijze proef (in fermentatievat) in een willekeurig stadium van de vergisting af te breken en de drogestofconcentratie te bepalen. Voor elke combinatie gistsoort/n-alkaan werd een ijkgrafiek opgesteld. Uit de grafiek blijkt, dat de hoeveelheid drogestof gevormd recht evenredig is met de hoeveelheid loog toegevoerd. De evenredigheidsconstante is afhankelijk van de genoemde condities.

2.3.1.4. De economische coëfficiënt.

Onder de economische coëfficiënt (e.c.) wordt verstaan de gevormde

gewichtshoeveelheid drogestof per verbruikte gewichtseenheid koolstofsstraat, dus

$$\text{e.c.} = \frac{\text{kg drogestof gevormd}}{\text{kg koolstofsstraat verbruikt}}$$

Op dezelfde wijze kan men de gevormde hoeveelheid eiwit of de gevormde hoeveelheid vet betrekken op de verbruikte hoeveelheid koolstofsstraat. Men spreekt dan van eiwitcoëfficiënt resp. vetcoëfficiënt. In de Angelsaksische literatuur wordt in plaats van de benaming economische coëfficiënt de benaming "yield" (y) gebruikt.

Bij de groei van gist op glucose wordt een economische coëfficiënt van ongeveer 0.5 bereikt, terwijl in dit geval theoretisch een waarde van ongeveer 0.6 mogelijk is.

Daar de n-alkanen geen zuurstof bevatten, is te verwachten dat de economische coëfficiënt bij groei van gisten op koolwaterstoffen groter is dan bij groei op koolhydraten. Darlington (147), bij zijn berekening van de zuurstofbehoefte, past zelfs een economische coëfficiënt van 1.5 toe.

In fig. 3 is het verband weergegeven tussen de hoeveelheid loog toegevoerd en de hoeveelheid n-alkaan verbruikt, voor de meetpunten van fig. 2. In tabel 8 zijn alle waarden opgenomen, alsmede de waarden van de economische coëfficiënt. Hoewel de spreiding in de waarden van de economische coëfficiënt groot is, blijkt uit de metingen dat gedurende een ladingsgewijze proef de economische coëfficiënt constant is.

2.3.1.5. Bepaling van de groeikromme.

Bij elke ladingsgewijze proef werden bepaald : de totale hoeveelheid drogestof gevormd (volgens 2.3.1.1.), de titratie curve en de sedimenthoogten op enkele tijdstippen. Uit de totale hoeveelheid drogestof gevormd en de totale hoeveelheid loog toegevoerd werd de evenredigheidsconstante voor de desbetreffende proef berekend. Combinatie van de evenredigheidsconstante met de titratie-tijkromme gaf de groeikromme. De tot drogestofconcentraties omgewerkte sedimenthoogten dienden als controle.

2.3.2. Bepaling van de alkaan-concentratie en van de alkaan-belasting.

Normaal-alkanen zijn weinig reactief. Chemische bepalingsmethoden komen niet in aanmerking. In verband met de beschikbare meetapparatuur werden als fysische methoden alleen de refractometrische en de gaschromatografische methode toegepast.

Bij het onderzoek zijn de n-alkanen opgenomen in de inerte olie of in de gasolie. De refractometrische bepaling is alleen mogelijk bij zeer eenvoudige systemen. Het is tevens noodzakelijk, dat de olie afgescheiden wordt. De methode kan worden toegepast indien grote monsters ter beschikking staan. Voor meervoudige n-alkaan-systemen en voor gasolie is de refractometrische bepaling alléén niet voldoende. In dat geval moeten, naast de brekingsindex, nog de dichtheid en het moleculairgewicht bepaald worden. Van deze n-d-M methode is, gezien de onnauwkeurigheid van de moleculairgewichtbepaling, afgezien.

Het is onmogelijk om een representatief monster van een emulsie in de gaschromatograaf in te spuiten. De oliefase moet dus afgescheiden worden of de oliefase moet opgenomen worden in een, met de waterfase niet mengbaar, oplosmiddel. Daar de monsters bij de ladingswijze proeven in het algemeen klein zijn, is voor de gaschromatische bepaling de oliefase steeds opgenomen in een oplosmiddel.

2.3.2.1. Refractometrische bepaling.

Het verband tussen brekingsindex en het n-alkaangehalte van de olie werd voor elk n-alkaan door ijken vastgesteld. Het monster werd behandeld met een 1 % Teepol-oplossing en gecentrifugeerd. De afgescheiden olie werd onderzocht met behulp van een Abbe-refractometer. De Teepol-behandeling bleek geen invloed te hebben op de brekingsindex.

2.3.2.2. Gaschromatografische bepaling.

Langs gaschromatografische weg is het mogelijk de gewichtspercentages van de componenten in een mengsel te bepalen. Er geldt (172)

$$W_i = \frac{A_i/O_i}{\sum A_k/O_k}$$

waarin W = gewichtspercentage
 A = piekoppervlak
 O = specifiek piekoppervlak
 i, k = aanduiding componenten.

De sommering dient plaats te vinden over alle componenten in een mengsel. Voor het toepassen van de formule is het dus noodzakelijk, dat het specifiek piekoppervlak van elke component bekend is, terwijl tevens alle componenten vluchtig dienen te zijn. Daar in het algemeen aan één van beide eisen niet zal zijn voldaan, is de formule slechts zeer beperkt toepasbaar.

Voor twee componenten in een mengsel van meerdere componenten geldt

$$\frac{W_i}{W_j} = \frac{A_i/O_i}{A_j/O_j}$$

Indien nu het gewichtspercentage van één der componenten bekend is, is het gewichtspercentage van de tweede component te berekenen, aangenomen, dat O_i en O_j bekend zijn. De component waarvan het gewichtspercentage bekend moet zijn, dient aan het monster te worden toegevoegd en wordt "inwendige standaard" genoemd. Een bijkomend voordeel is, dat de concentratie van de standaard zo goed mogelijk gelijk gemaakt kan worden aan de te verwachten concentratie van de te bepalen component. Afwijkingen ten gevolge van niet-lineariteit van de detector kunnen aldus geëlimineerd worden. Bij de bepaling van meerdere componenten kan het soms nuttig zijn voor elke component een aparte "inwendige standaard" toe te voegen. Dit is het geval als er grote verschillen zijn in concentratie en als de componenten ver uiteen liggen.

Van de oplosmiddelen die beproefd werden, bleek toluene zeer goed te voldoen. De inwendige standaard werd opgenomen in het oplosmiddel.

2.3.2.3. Apparatuur.

Voor het gaschromatografisch onderzoek werd gebruik gemaakt van een F en M-gaschromatograaf en van een Becker-gaschromatograaf.

Gegevens F en M-gaschromatograaf model 500.

kolom : 2 meter, 4 mm. \emptyset inwendig, vulling apiezon 10 % op gaschrom 60/80 mesh, vulgewicht 8.4 gram.

drager gas : helium, overdruk aan ingang 1.5 atm., snelheid (uit luchtpiek) 0.05 m/sec.

instelling : temperatuur, brugstroom en gevoeligheid afhankelijk van de te bepalen componenten.

Gegevens Becker-gaschromatograaf type 1433 VTH.

kolom : 4 meter, 4 mm. \emptyset inwendig, vulling apiezon 10% op gaschrom 60/80 mesh, vulgewicht 16.0 gram.

drager gas : waterstof, overdruk aan ingang 2 atm., snelheid (uit luchtpiek) 0.10 cm/sec.

instelling : brugstroom 250 mA, temperatuur en gevoeligheid afhankelijk van de te bepalen component.

2.3.2.4. Gaschromatografische bepaling bij enkelvoudig systeem.

Als inwendige standaard werd een n-alkaan gekozen met 1 of 2 C-atomen meer of minder dan de te meten component. Voor elke n-alkaan combinatie werd de verhouding der specifiek oppervlakken door ijken vastgesteld. In tabel 9 zijn enkele resultaten weergegeven.

Bij de gaschromatografische bepaling wordt de hoeveelheid n-alkaan, aanwezig in het fermentatievat, bepaald. Aan de monstername dient de nodige aandacht te worden besteed. Bij monstername met de injectiespuit bleek de olie, ten gevolge van ontmenging, grotendeels in de spuit achter te blijven. Het was noodzakelijk de extractie in de spuit te doen plaatsvinden. De procedure was als volgt : injectiespuit wegen, monster nemen (grootte van het monster ongeveer éénvierde van de inhoud van de spuit), wegen, extractievloeistof in-trekken (hoeveelheid ongeveer éénvierde van de inhoud van de spuit),

wegen. Gewichten van monster en extractievloeistof zijn nu bekend. De extractievloeistof bevat de inwendige standaard in bekende concentratie. De extractie moet met de nodige voorzichtigheid worden uitgevoerd. Bij sterk schudden vormt zich namelijk een bijzonder stabiele emulsie.

In tabel 10 zijn enkele resultaten van monsternamen en extractie opgenomen. De concentratie bepaald via monsternamen en extractie voldoet binnen 5 % aan de werkelijke waarde.

Indien meerdere n-alkanen waren opgelost in de paraffine-olie, werd in het algemeen ook van meerdere inwendige standaarden gebruik gemaakt. De procedure week in dit geval echter niet af van die bij aanwezigheid van slechts één n-alkaan.

2.3.2.5. Gaschromatografische bepaling bij gasolie.

Bij de kwantitatieve bepaling van n-alkanen in een inerte oliefase mag deze inerte oliefase geen stoffen bevatten met retentietijden, die van dezelfde orde van grootte zijn als van de te bepalen component. De basislijn - het gaschromatogram van de inerte oliefase - moet in het beschouwde gebied dus vlak zijn. Aan deze voorwaarde is voldaan bij vloeibare paraffine. Bij de bepaling van de n-alkaanconcentratie in gasolie is aan deze voorwaarde echter niet voldaan. In de inerte oliefase van deze gasolie komen een groot aantal stoffen voor met retentietijden van dezelfde orde van grootte als van de n-alkanen. De basislijn is zeer grillig van vorm - fig. 4 A. Om de n-alkaanconcentratie te bepalen moet het chromatogram van de inerte oliefase - de basislijn - afgetrokken worden van het chromatogram van de gasolie. De bepaling vraagt dus tweemaal inspuiten, nl. inspuiten van een hoeveelheid van de gasolie en inspuiten van een overeenkomstige hoeveelheid van de inerte oliefase. Nu is echter inspuiten van overeenkomstige hoeveelheden praktisch uitgesloten. Bij hoeveelheden in de orde van grootte van enkele μl worden grote fouten gemaakt.

Schenck (173) heeft aangetoond, dat het mogelijk is de concentraties

van de n-alkanen te bepalen bij éénmalig inspuiten. Het monster wordt gaschromatografisch gedetecteerd, door een moleculairzeef geleid, waarbij de n-alkanen weggenomen worden en opnieuw gedetecteerd. De methode vraagt een tweetal identieke detectiesystemen. Tevens is een onderzoek naar het al of niet volledig wegnemen van de n-alkanen door de moleculaire zeef noodzakelijk.

Toepassing vraagt dus een zeer uitgebreid vooronderzoek. Daarom is van de methode afgezien. Voor de fout ten gevolge van het inspuiten werd gecorrigeerd door de inerte fase een aantal malen in te spuiten en hieruit dat chromatogram te kiezen, dat zo goed mogelijk aansloot.

De toegepaste gasolie bevatte de n-alkanen van n-decaan tot n-docosaan. Voor een goede bepaling moeten meerdere inwendige standaarden worden toegevoegd. Dit nu is bij gasolie onmogelijk. De grillige vorm van de basislijn maakt toevoeging van meerdere inwendige standaarden zinloos. De bepaling is uitgevoerd met slechts één inwendige standaard. Tussen de pieken van n-octadecaan en n-nonadecaan is de basislijn betrekkelijk vlak. fig. 5. De gekozen inwendige standaardmethyl palmitaat - heeft een retentietijd tussen die van de genoemde n-alkanen, fig. 4B en 6.

3. ONTWERP EN BESCHRIJVING VAN DE APPARATUUR

Het inleidende onderzoek - bruikbaarheid media, toe te passen micro-organismen, invloed gistextract enz. - werd uitgevoerd in schudkolven. Voor het eigenlijke onderzoek werd gebruik gemaakt van fermentatievaten.

De schudkolf - 300 ml. erlenmeyer - was voorzien van een keerschot. Dit glazen keerschot, lengte 80 mm., breedte 12 mm., was aan de bodem vastgesmolten. De afdichting van de schudkolf bestond uit drie lagen verbandgaas, fig. 7.

Het fermentatievat, inhoud 1200 cc., bestond uit een glazen cylinder en roestvrijstalen bodem en deksel. Het vat was voorzien van een dubbele turbineroerder. De luchttoevoer vond plaats via een enkele uitstroomopening onder de turbineroerder. De opstelling was voorzien van pH regeling en temperatuurregeling, fig. 8.

3.1. De schudkolf.

In het algemeen wordt voor schudkolven gebruik gemaakt van erlenmeyers of van rondbodemkolven. De kolven zijn afgesloten met een wattenprop en voldoen goed voor anaërobe cultures. Voor aërobe cultures zijn ze vaak minder geschikt. De zuurstofoverdracht is tamelijk slecht. Dit is enerzijds het gevolg van een gering uitwisselend oppervlak, anderzijds het gevolg van de weerstand van de wattenprop. Ter verbetering van de werking van schudkolven heeft men inkepingen en keerschotten aangebracht (146) (153) (174). Zo bewees Dale (174), dat bij acht inkepingen de zuurstofopname 0.2 mMol/liter min. bedroeg, bij 30 inkepingen onder overigens gelijke omstandigheden 5.3 mMol/liter min. Gaden (175) heeft aangetoond, dat één keerschot voldoende is. De verbetering door toepassen van meerdere keerschotten is miniem. Falch (176) heeft een wegwerpbare schudkolf, een kunststoftetræder, ontworpen. Door de vorm wordt de zuurstofoverdracht verbeterd.

Corman (153) vond voor een schudkolf met 72 inkepingen, dat de zuur-

stofopname 1.6 mMol/liter min. bedroeg met wattenprop en 5.1 mMol/liter min. zonder wattenprop. Schultz (177) heeft de zuurstofoverdracht nagegaan als functie van het stopgewicht van de wattenprop. Zowel de invloed van een keerschot als de invloed van de kolfafdichting is nagegaan - tabel 11. Uit de metingen blijkt, dat de invloed van het keerschot bijzonder groot is. Zonder keerschot is de groei zeer gering. De wijze van afdichten heeft geen invloed op de groei. Het keerschot bevordert zowel de zuurstofoverdracht als de emulsievorming.

Schudkolven met ingelast keerschot zijn zeer kwetsbaar. Het aanbrennen van twee inkepingen bleek slechts een gering effect te hebben. In het algemeen past men 8 tot 70 inkepingen toe. Dit is, mede met het oog op het schoonmaken van de kolven, niet aantrekkelijk. Bij het onderzoek is daarom gebruik gemaakt van schudkolven met ingelast keerschot. Als afdichting werd toegepast drie lagen verbandgaas. De schudmachine, roterende beweging, werd steeds ingesteld op 140 slagen per minuut, de amplitude bedroeg 4.2 cm.

3.2. Het fermentatievat.

Het fermentatievat is schematisch weergegeven in fig. 9. De diameter van het vat bedroeg 8.6 cm., de hoogte \pm 20 cm. en de inhoud \pm 1200 cm³. De cylinderwand was van glas, de deksel en bodem van roestvrijstaal. Het vat was voorzien van vier keerschotten. De breedte der keerschotten was 0.85 cm. In het vat was een dubbele turbineroerder aangebracht. Elke turbineroerder, diameter 4.3 cm., was voorzien van acht bladen. Elk blad had een lengte van 1.1 cm. en een hoogte van 0.85 cm. Keerschotten, turbineroerder en as werden uitgevoerd in roestvrijstaal.

Oorspronkelijk was het vat uitgevoerd met één turbineroerder. Ondanks de toevoeging van een chemisch schuimbestedingsmiddel vormde zich bij hogere gistconcentraties een stabiele schuimlaag. Een tweede turbineroerder werd daarom, als mechanische schuimbreker, gemonteerd.

3.3. De opstelling.

De principeschema's van de gebruikte opstelling zijn weergegeven in fig. 9.

3.3.1. pH regeling.

Voor de pH-regeling werd gebruik gemaakt van een Radiometer titrator TTT 1. Als pH-electrode werd een gecombineerde Radiometer-electrode GK 2021 C toegepast. De loog (100 gr. NH_4OH per liter, $\pm 2.875 \text{ N}$) werd toegevoegd via een, door de pH-meter bediende, magneetklep.

3.3.2. Temperatuurregeling.

Teneinde de temperatuur constant te houden, was in het fermentatievat een koelspiraal opgenomen. De koelspiraal was verbonden met een thermostaatbad, geregeld door een in het fermentatievat aangebrachte contactthermometer.

3.3.3. Zuurstofregeling.

Daar de ademhalingsenzymen opgenomen zijn in het waterige protoplasma, kunnen micro-organismen alleen opgelost zuurstof gebruiken. Zuurstof is tamelijk slecht oplosbaar in water. Bij 20°C lost in gedestilleerd water, in evenwicht met lucht, slechts $8.2 \cdot 10^{-3} \text{ kg/m}^3$ op. Voor lage waarden van de concentratie van de opgeloste zuurstof is de groei afhankelijk van deze concentratie. Damaschke (179) heeft de invloed van de concentratie van de opgeloste zuurstof op de ademhaling van gist nagegaan. Bij een concentratie van $3 \cdot 10^{-4} \text{ kg/m}^3$ wordt de ademhaling (uitgedrukt als het gewicht zuurstof dat per volume-eenheid en per tijds-eenheid geconsumeerd wordt door een 1 % gistsuspensie) afhankelijk van de concentratie. Beneden een concentratie van $2 \cdot 10^{-5} \text{ kg/m}^3$ is de afname van de ademhaling recht evenredig met de concentratie. De zuurstoflimitering vangt dus aan bij \pm

1/25 van de verzadigingsconcentratie. Winzler (180) gebruikt als maat de partieel spanning van de opgeloste zuurstof. Uit zijn metingen blijkt, dat bij een partieel spanning van 6 mm. Hg de ademhaling afhankelijk wordt van de partieel spanning. Daar de partieel spanning bij verzadiging 160 mm. Hg bedraagt (de partieel spanning van de zuurstof in de lucht) vangt de zuurstoflimitering aan bij $\pm 1/25$ van de partieel spanning bij verzadiging.

De oplosbaarheid van zuurstof wordt beïnvloed door de concentratie van de opgeloste zouten. Daar echter de concentratie van opgeloste zouten gedurende een proef slechts weinig verandert (zouten zijn in overmaat aanwezig), is de partieel spanning van de opgeloste zuurstof een bruikbare maat.

In het vooronderzoek werd gebruik gemaakt van regeling van de opgeloste zuurstof volgens Siegel - zie fig. 9. Als zuurstofvoeler werd gebruikt een "Clark" electrode. De electrode (fabr. Beckman) was verbonden met een Beckman pH meter model 76 / oxygen adaptor combinatie. Met de electrode werd de partieel spanning van de opgeloste zuurstof gemeten. Bij daling van de partieel spanning van de opgeloste zuurstof beneden de ingestelde waarde, werd door toevoeging van zuurstof aan de lucht de zuurstof/stikstof verhouding gewijzigd. De Siegel zuurstofregeling werd ingesteld op 10 mm. Hg partieel spanning, hetgeen, gezien de resultaten van Damaschke en Winzler, voldoende was. Bij een gasbelasting van $11 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$ (1 vol./vol. min, zoals in de industrie gebruikelijk) bleek dat de regeling overbodig was. Suppletie van zuurstof vond niet plaats. Teneinde dit te verifiëren, werd de invloed van de luchtbelasting in continu culture nagegaan. In tabel 12 zijn de resultaten gegeven. Zelfs bij een luchtbelasting van $3.7 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$ (droge stofconcentratie $14.5 \text{ kg}/\text{m}^3$, toerental 33.3/s) was de partieel spanning van de zuurstof nog 35 mm. Hg, ver boven de kritische waarde. De regeling is daarom geheel buiten werking gesteld. Alle proeven zijn uitgevoerd met een luchtbelasting van $11 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$. Bij deze luchtbelasting zal, zelfs bij veel lagere toerentallen, geen zuurstoflimitering optreden. De luchttoevoer vond plaats via een uitstroomopening onder de onderste turbineroerder.

3.3.4. Opvangen van verdampt n-alkaan.

Van de toegepaste n-alkanen zijn n-hendecaan en n-dodecaan enigszins vluchtig. Bij ladingsgewijze proeven verdween een deel van het n-alkaan door verdamping. Bij de bepaling van het n-alkaan verbruik moest voor de verdamping gecorrigeerd worden. Daartoe werd het uitstromende gas geleid door een tweetal glazen koelbuizen. De koelbuizen waren in een koelbak, temperatuur -40° C, ondergebracht. De eerste koelbuis had een grote diameter - 2.5 cm. - om dichtgroeien met ijskristallen te voorkomen. Na afloop van de ladingsgewijze proef werd de hoeveelheid alkaan in beide koelbuizen gaschromatografisch bepaald.

3.3.5. Opstelling bij toevoer van gasvormig n-alkaan.

Bij enkele proeven werd het n-alkaan niet in vloeibare, doch in gasvormige toestand toegevoerd. Het gasvormige n-alkaan (gasvormig n-hendecaan, n-dodecaan) werd meegegeven aan het beluchtingsgas. Teneinde condensatie te voorkomen, moest het beluchtingsgas onverzadigd zijn met n-alkaan. Dit werd bereikt door het beluchtingsgas te leiden door het vloeibare n-alkaan (in wasfles A - fig. 8) bij een temperatuur van 40 à 60° C en vervolgens te koelen (koeler B, 20° C). Het gas was dan, bij 20° C, verzadigd met n-alkaan. In afscheider C werd eventueel vloeibaar n-alkaan afgescheiden en vervolgens werd in een warmte-wisselaar D het gas opgewarmd tot de fermentatie temperatuur.

3.4. Conditie's.

Gezien het grote aantal variabelen werden een aantal condities bij alle proeven constant gehouden. Deze condities werden gekozen aan de hand van hetgeen over Candida lipolytica uit de literatuur bekend is. Er is dus geen onderzoek verricht naar optimale omstandigheden. Het is zeer goed mogelijk, dat de gekozen waarden niet-optimale omstandigheden voorstellen.

Deze condities waren als volgt :

temperatuur 30° C.

pH 4.0

(bij schudkolf geen pH regeling)

luchttoevoer 11 10⁻⁶ m³/s.

(bij schudkolfcultuur geen gedwongen luchttoevoer.)

4. GROEI VAN MICRO-ORGANISMEN EN KINETIEK

4.1. Groei van micro-organismen.

Bij de groei van micro-organismen kan men zes perioden onderscheiden - fig. 10 - :

- a. de lagperiode A-B, dit is de periode die verloopt voordat de vermeerdering van de micro-organismen begint. In deze periode neemt in het algemeen de massa wel toe, maar er treedt nog geen vermenvuldiging van het aantal cellen op.
- b. de overgangperiode B-C.
- c. de exponentiële periode C-D. Dit is de groeiperiode waarin de logaritme van het aantal micro-organismen of van de massa recht evenredig is met de tijd.
- d. de overgangperiode D-E.
- e. de stationaire periode E-F, gedurende welke periode het aantal micro-organismen of de massa constant blijft.
- f. de afbraakperiode F-G waarin het aantal levende micro-organismen afneemt.

Voor de groei heeft een micro-organisme een groot aantal stoffen nodig - koolstof, stikstof, en andere elementen, soms groeistoffen, zuurstof. Tenzij alle stoffen in overmaat aanwezig zijn, zal de concentratie van één van deze stoffen bepalend zijn voor de groei.

Wanneer men afziet van de lagperiode, kan de kromme beschreven worden door naast de groei de afbraak van cellen in rekening te brengen. De opname van de limiterende stof is een functie van het celoppervlak, de afbraak een functie van het celvolume.

Voor het onderzoek zijn alleen de exponentiële periode C-D en de overgangperiode D-E van belang. In deze perioden speelt in het algemeen de afbraak nog geen rol van betekenis. De exponentiële periode kan beschreven worden met

$$N = N_0 e^{\alpha t}$$

waarin N het aantal micro-organismen per volume-eenheid op het

tijdstip t .

N_0 het aantal micro-organismen per volume-eenheid op het tijdstip $t = 0$.

α constante = $(\ln 2) / \tau$, met τ de gemiddelde generatietijd.

of met

$$P = P_0 e^{\alpha t}$$

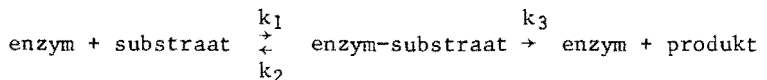
waarin P concentratie droge-stof (micro-organismen) op het tijdstip t .

P_0 concentratie droge-stof (micro-organismen) op het tijdstip $t = 0$.

In de overgangperiode D-E wordt de groei beperkt. De vermindering van de groeisnelheid kan het gevolg zijn van concentratielimitering, van de vorming van toxische produkten of van andere limiteringen.

4.2. Kinetiek.

De assimilatie is een complex van enzymatische reacties. De meeste enzym-gekatalyseerde reacties kunnen beschreven worden met de Michaelis-Menten vergelijking. Hierbij wordt er vanuit gegaan, dat de reactie verloopt via een intermediair enzym-substraat complex, aldus



Indien aangenomen wordt, dat de eerste reactie een evenwichtsreactie is, zodat $k_3 \ll k_2$, kan worden afgeleid

$$v^* = \frac{v_m^* C}{K_m + C} \quad \text{met} \quad K_m = \frac{1}{K} = \frac{k_2}{k_1}$$

waarin v^* reactiesnelheid

v_m^* maximale reactiesnelheid

K_m Michaelis-constante

C concentratie van het niet-gebonden substraat.

Voor de afleiding wordt verwezen naar de biochemische leerboeken.

De Michaelis-Menten theorie is een speciaal geval van de Briggs-Haldane theorie. Bij deze laatste theorie wordt er van uitgegaan, dat de eerste reactie geen evenwichtsreactie is.

Indien $v^* = \frac{1}{2} v_m^*$ dan is $K_m = C$, met andere woorden: K_m , de Michaelis-constante, is numeriek gelijk aan de substraatconcentratie waar bij de reactiesnelheid de helft is van de maximale reactiesnelheid.

Indien $C \gg K_m$ dan is $v^* = v_m^*$. De reactiesnelheid is onafhankelijk van de substraatconcentratie - nulde orde reactie -.

Indien $K_m \gg C$, dan is $v^* = \frac{v_m^*}{K_m} C$. De reactiesnelheid is evenredig met de substraatconcentratie - eerste orde reactie -.

De vorm van de kromme is niet erg geschikt om na te gaan, of meetpunten voldoen aan de vergelijking. Men kan de vergelijking echter omwerken.

$$\text{Uit } v^* = \frac{v_m^* C}{K_m + C} \text{ volgt } \frac{1}{v^*} = \frac{K_m}{v_m^*} \cdot \frac{1}{C} + \frac{1}{v_m^*}$$

Een grafiek van $1/v^*$ tegen $1/C$ staat bekend als het Lineweaver-Burk diagram. De grootte v_m^* kan bepaald worden uit het snijpunt van de rechte met de ordenaat, K_m uit de helling van de rechte.

$$\text{Uit } v^* = \frac{v_m^* C}{K_m + C} \text{ volgt ook } \frac{v^*}{C} = \frac{v_m^*}{K_m} - \frac{v^*}{K_m}$$

Een grafiek van v^*/C tegen v^* heet een Eadie-diagram. In dit geval kan v_m^* bepaald worden uit het snijpunt van de rechte met de abscis, de waarde K_m weer uit de helling van de rechte.

Bij de Michaelis - Menten theorie wordt uitgegaan van een homogeen systeem. Fysische limiteringen kunnen niet optreden. Opgelost substraat en enzym zijn overal met elkaar in contact.

Bij een groeiende culture kunnen wel fysische limiteringen optreden. De Michaelis - Menten theorie mag daarom niet zonder meer worden toegepast. Bovendien heeft men bij een groeiende culture niet te maken met een constante hoeveelheid enzym, maar met een zich vermeerderende hoeveelheid. In plaats van de reactiesnelheid dC/dt of de

groeisnelheid dP/dt dient de stofstroom per gewichtseenheid micro-organismen $\phi^* = 1/P \, dC/dt$ of de groeisnelheidsconstante $\mu = 1/P \, dP/dt$ gebruikt te worden.

Monod (83) heeft aangetoond, dat voor een groeiende culture de groeisnelheidsconstante μ , bij lage substraatconcentraties, afhangt van deze concentratie

$$\mu = \mu_m \left(\frac{C}{K_s + C} \right)$$

waarin μ_m = maximale waarde van de groeisnelheidsconstante.

Het verband is een type van "verzadigingskromme". De constante K_s wordt daarom wel aangeduid als "verzadigingsconstante" (181).

K_s is numeriek gelijk aan de substraatconcentratie, waarbij de groeisnelheidsconstante de helft is van de maximale waarde. Gewoonlijk heeft K_s zeer lage waarden - van de orde van grootte van mg/liter voor koolhydraten en $\mu\text{g/liter}$ voor aminozuren.

De verzadigingsconstante K_s mag niet verward worden met K_m , de Michaelis-constante. De Michaelis-constante heeft een theoretische betekenis, de verzadigingsconstante heeft slechts een empirische betekenis.

De "verzadigingskromme" kan ook geschreven worden als

$$\phi^* = \phi_m^* \left(\frac{C}{K_s + C} \right)$$

waarin ϕ_m^* = maximale waarde van de stofstroom per gewichtseenheid micro-organismen.

Een extreem voorbeeld van de toepassing van de "verzadigingsvergelijking" wordt gegeven door Proper (182). De groei van Colpoda steinii, een protozo, op Escherichia coli als substraat, bleek te voldoen aan de "verzadigingsvergelijking" met $K_s = 6.0$ mg. droge stof (E.coli) per liter en $\mu_m = 0.23$ per uur.

5. STOFOVERDRACHT

De stoffen die een micro-organisme nodig heeft voor de stofwisseling, zijn opgelost in de waterfase en worden, vanuit de waterfase, opgenomen in de cel. De stoffen worden als het ware overgedragen van de waterfase naar de cel en men spreekt daarom van stofoverdracht. Sommige stoffen zoals zuurstof en koolwaterstoffen zijn zeer slecht oplosbaar. Dergelijke stoffen moeten eerst vanuit het gas of vanuit de vloeistof, waarin ze zich bevinden, overgedragen worden naar de waterfase.

Johnson (84) heeft gesteld, dat groei van micro-organismen op opgelost n-dodecaan en hogere n-alkanen niet mogelijk is (zie 1.5.). Hij komt hiertoe op grond van "diffusie-overwegingen" zonder de stelling, langs theoretische weg of met behulp van experimenten, te bewijzen.

Vele micro-organismen zijn in staat n-dodecaan en hogere n-alkanen te gebruiken als koolstof- en energiebron. Men kan zelfs stellen, dat voor vele micro-organismen de groei op n-dodecaan en hogere n-alkanen beter is dan op n-hendecaan en lagere n-alkanen. Daarom heeft Johnson een hypothese opgesteld: "Bij groei van micro-organismen op n-dodecaan en hogere n-alkanen vindt de stofoverdracht plaats door direct contact tussen vloeibaar n-alkaan en cel."

De aanname van stofoverdracht door direct contact tussen een stof en een cel is niet nieuw. In het algemeen zijn de enzymen die bij de metabolische processen in de cel een rol spelen, aanwezig in het waterige protoplasma. De cel kan de stoffen die deelnemen aan de metabolische processen opnemen, indien deze stoffen opgelost zijn in de waterfase. Ook de zuurstof wordt op deze manier opgenomen. Bartholomew (183) houdt echter op grond van indirecte bewijzen - voorkeur van de cellen voor het gas/vloeistof grensvlak, schuimflotatie van micro-organismen - een directe zuurstofoverdracht van luchtbel naar cel voor mogelijk. Bij schimmels (mycelium) of bij agglomeraten van cellen zou, door de insluiting van luchtbelllen, de bijdrage van de stofoverdracht door direct contact zelfs belangrijk kunnen zijn. De

meningen over de mogelijkheid van overdracht van zuurstof door direct contact lopen uiteen.

Hoewel stofoverdracht door direct contact de mogelijkheid biedt om de groei op hogere n-alkanen te verklaren, zal eerst bewezen moeten worden, dat met stofoverdracht via opgelost n-alkaan de groei op hogere n-alkanen niet verklaard kan worden.

5.1. Stofoverdracht via opgelost n-alkaan.

De snelheid van het n-alkaantransport van oliedruppel naar enzymoppervlak kan beschreven worden met de filmtheorie. Bij de filmtheorie wordt er van uitgegaan, dat zich een stationaire concentratieverdeling van de getransporteerde component heeft ingesteld in een laminair gebied ter weerszijden van het grensvlak tussen twee fasen. Voor het grensvlak olie/water wordt aan de oliezijde een oliefilm, aan de waterzijde een waterfilm aangenomen. Voor het grensvlak water/cel wordt aan de waterzijde een waterfilm aangenomen. Aan celzijde moet men voorts rekenen met celwand en inwendige celweerstand. De dikte van de films kan van enkele μ 's tot enkele millimeters zijn, afhankelijk van de mate van turbulentie en van de fysische eigenschappen van de vloeistoffen.

Daar aan het grensvlak twee films worden aangenomen, spreekt men van de tweefilm-theorie. Indien echter gebruik zou worden gemaakt van zuiver n-alkaan (in plaats van een n-alkaan/inerte olie mengsel), dan vervalt de oliefilm.

De weerstand tegen stoftransport zit, volgens deze theorie, geheel in de films. In de grote massa van de waterfase is geen weerstand tegen stoftransport aangenomen en dus is de concentratie van het n-alkaan in de waterfase, C^V , overal in de waterfase (buiten de film) dezelfde. Evenzo is de concentratie van het n-alkaan in de oliephase, C_o , overal in de oliephase (buiten de oliefilm) dezelfde.

De stofoverdracht van de oliedruppel naar enzymoppervlak valt uiteen in twee trappen:

- a. overdracht van de oliedruppel naar de waterfase,
- b. overdracht van de waterfase naar enzymoppervlak.

De stofstroom van druppel naar waterfase is gelijk aan de stofstroom van de waterfase naar cel.

Het stoftransport door een film vindt plaats door diffusie. De drijvende kracht wordt gevormd door de concentratiegradiënt over de film. De stofstroom wordt gegeven door

$$\phi = D A \Delta C / \delta \quad \underline{1}$$

waarin	ϕ	stofstroom	kg/s
	D	diffusiecoëfficiënt	m ² /s
	A	grensvlak	m ²
	ΔC	concentratieverschil	kg/m ³
	δ	filmdikte	m

De stofstroom kan ook geschreven worden als

$$dS/dt = D_0 \Delta C / \delta \quad \underline{2}$$

met	dS/dt	omzettingssnelheid	kg/m ³ s
	D_0	specifiek grensvlak	m ² /m ³

De grootheid D_0 / δ kan men definiëren als de stofoverdrachtscoëfficiënt K , zodat

$$dS/dt = K D_0 \Delta C \quad \underline{3}$$

Voor overdrachtstrap a geldt

$$dS/dt = K_a D_0^a \Delta C_a \quad \underline{4}$$

waarin	K_a	stofoverdrachtscoëfficiënt voor de stofoverdracht van olie- naar waterfase	m/s
	D_0^a	specifiek grensvlak, betrokken op de oliedruppels	m ² /m ³

*in het geval van
overdracht van olie
naar water*

De stofoverdrachtscoëfficiënt K_a is samengesteld uit de partiële stofoverdrachtscoëfficiënt k_a^w voor de waterfilm, de partiële stofoverdrachtscoëfficiënt k_a^o voor de oliefilm en de faseverdelingscoëfficiënt m_a , aldus

$$1/K_a = 1/k_a^w + 1/m_a k_a^o \quad 5$$

waarin $m_a = C_{ag}^o / C_{ag}^w$, terwijl C_{ag}^o en C_{ag}^w de concentraties van het opgeloste n-alkaan aan het grensvlak voorstellen, aan olie- resp. waterzijde.

Voor het twee-vloeistoffasen-systeem n-alkaan/water is m zeer groot. De n-alkanen n-hendecaan tot en met n-hexadecaan zijn bij 30° C in elke verhouding mengbaar met de inerte olie. Voor de bepaling van de orde van grootte van m kan de concentratie van het n-alkaan in de oliefase gesteld worden op 300 kg/m³. De concentratie aan het grensvlak is van dezelfde orde van grootte. De n-alkanen zijn zeer slecht oplosbaar in de waterfase. De verzadigingsconcentratie van n-hendecaan in water bij 30° C is 3.26 10⁻⁵ kg/m³ (zie Appendix 1). De concentratie aan het grensvlak is van dezelfde orde van grootte. Voor n-hendecaan is m_a ongeveer 10⁷. De term $1/m_a k_a^o$ is te verwaarlozen ten opzichte van $1/k_a^w$, waardoor $K = k_a^w$. Voor de beschouwing van de stofoverdracht van oliedruppel naar waterfase is alleen de waterfilm van belang, zodat

$$dS/dt = k_a^w \cdot O^o (C^* - C^w) \quad 6$$

waarin C^* de oplosbaarheid van het n-alkaan in water kg/m³.

Voor overdrachtstrap b geldt

$$dS/dt = K_b \cdot O^c \cdot \Delta C_b \quad 7$$

met K_b stofoverdrachtscoëfficiënt voor de stofoverdracht van waterfase naar enzymoppervlak

m/s

O^c specifiek grensvlak, betrokken op de gistcellen

m²/m³

Inhoud op elke pag.

De stofoverdrachtscoëfficiënt K_b is samengesteld uit de partiële stofoverdrachtscoëfficiënt k_b^w voor de waterfilm, de partiële stofoverdrachtscoëfficiënt k_b^c voor de cel (celwand en inwendige van de cel) en de faseverdelingscoëfficiënt m_b - in formule

$$1/K_b = 1/k_b^w + 1/m_b k_b^c \quad \underline{8}$$

Indien nu de enzymatische reactie zeer snel is vergeleken bij het stoftransport dan reageert elk n-alkaan-molecuul, dat door diffusie het grensvlak water - cel bereikt, onmiddellijk weg. In dit geval mag gesteld worden

$$dS/dt = k_b^w O^c C^w \quad \underline{9}$$

De overdrachtstrappen a en b moeten nu gecombineerd worden.

Uit 9 volgt $C^w = \frac{dS/dt}{k_b^w O^c} \quad \underline{10}$

Ingevuld in 6 geeft dit

$$dS/dt \left(1 + \frac{k_a^w O^o}{k_b^w O^c} \right) = k_a^w O^o C^*$$

of na omwerken

$$dS/dt = C^* \left(\frac{1}{\frac{1}{k_a^w O^o} + \frac{1}{k_b^w O^c}} \right) \quad \underline{11}$$

Stellen we nu

$$\frac{1}{k_a^w O^o} + \frac{1}{k_b^w O^c} = \frac{1}{KO} \quad \underline{12}$$

dan is $ds/dt = \overline{K^O} C^*$ 13

De omzettingssnelheid ds/dt is te berekenen, indien de oplosbaarheid C^* , de specifieke grensvlakken O^O en O^C en de partiële overdrachtscoëfficiënten k_a^w en k_b^w bekend zijn.

De oplosbaarheid in water van de hogere n-alkanen kan door extrapolatie bepaald worden - zie Appendix 2 -.

Voor het specifiek grensvlak O geldt algemeen

$$O = 6 B / d \quad \underline{14}$$

waarin B volumeconcentratie van de deeltjes m^3/m^3
d diameter van de deeltjes m

Voor het specifieke grensvlak betrokken op de oliedruppels geldt

$$O^O = 6 B^O / d^O \quad \underline{15}$$

waarin B^O volume oliedruppels per volume
eenheid cultuurvloeistof m^3/m^3
 d^O gemiddelde diameter van de olie-
druppel m

In 6.5. wordt voor n-hexadecaan de gemiddelde druppelgrootte bepaald. Van de daar gevonden waarden kan gebruik gemaakt worden voor een eerste benadering van O.

Voor het specifieke grensvlak betrokken op de gistcellen geldt

$$O^C = 6 B^C / d^C \quad \underline{16}$$

waarin B^C volume gistcellen per volume
eenheid cultuurvloeistof m^3/m^3
 d^C equivalente diameter van de gistcel m

Hierbij wordt onder equivalente diameter verstaan de diameter van een bol met dezelfde verhouding oppervlakte/inhoud als de gistcel. De stofoverdrachtscoëfficiënt wordt bepaald door de diffusiecoëfficiënt en de filmdikte. Voor de berekening van de stofoverdrachts-

coëfficiënt moet de diffusie door een film nagegaan worden.

Hiertoe beschouwen we een bol in water. Het water strekt zich naar alle zijden oneindig ver uit.

Zuivere diffusie wordt beschreven door

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) \quad \underline{17}$$

In de stationnaire toestand is $\frac{\partial C}{\partial t} = 0$

Overgang op poolcoördinaten geeft

$$\frac{d^2 C}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC}{dr} = 0$$

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dC}{dr} \right) = 0$$

$$r^2 \frac{dC}{dr} = C_1 \quad \text{of} \quad C = -\frac{C_1}{r} + C_2$$

De randvoorwaarden, voor diffusie van een bol naar de omringende vloeistof, zijn

$$\text{voor } r = \infty \quad \text{is } C = 0$$

$$\text{voor } r = R \quad \text{is } C = C^*$$

$$\text{zodat } C_2 = 0 \quad \text{en } C^* = \frac{-C_1}{R}$$

Voor de stofoverdracht geldt

$$-D \frac{dC}{dr} = k^w (C^* - C_\infty) \quad \underline{18}$$

Wij nemen nu aan, dat C_∞ , de concentratie op grote afstand van de bol, gelijk nul is.

Hieruit volgt

$$\frac{dC}{dr} = -\frac{k^w}{D} C^* = \frac{k^w}{D} \frac{C_1}{r}$$

$$\text{Voor } \frac{dC}{dr} \text{ is reeds afgeleid } \frac{dC}{dr} = C_1 r^{-2}$$

$$\text{dus } C_1 r^{-2} = \frac{k^w}{D} C^1 r^{-1} \quad \text{of} \quad 1 = \frac{k^w}{D} r$$

Voor het boloppervlak is $r = R$, dus $\frac{k^w d}{D} = 2$ met $d = 2R$.

De dimensieloze groep $\frac{k^w d}{D}$ wordt het getal van Sherwood genoemd,
 dus $Sh = \frac{k^w d}{D} = 2$. 19

De diffusiecoëfficiënt voor de diffusie van n-alkaan in water kan bepaald worden met behulp van de relatie van Wilke (zie Appendix 2). Uit $Sh = 2$ kan, met de waarde van de druppeldiameter d en de diffusiecoëfficiënt, de waarde van de stofoverdrachtscoëfficiënt k^w berekend worden.

Bij een geroerd fermentatievat, zoals is toegepast bij dit onderzoek, vindt het stoftransport niet alleen plaats door diffusie, maar ook door convectie. Bij stroming kan de stofoverdracht beschreven worden door de sommatie van diffusiebijdrage en convectiebijdrage. Voor een enkele bol geldt

$$Sh = A + B Re^{0.5} Sc^{0.33}$$

waarbij volgens Frössling (184) $A = 2$ $B = 0.60$

en volgens Ranz (185) $A = 2$ $B = 0.55$

In de gegeven relatie stelt Re voor het getal van Reynolds, waarbij $Re = vd/\nu$ en Sc het getal van Schmidt, met $Sc = \nu/D$.

De toepassing van de vergelijking stuit op bezwaren. De hydrodynamische condities in het geroerde fermentatievat zijn niet bekend. De snelheid v van de druppel t.o.v. de omringende vloeistof is, gemiddeld over de tijd, nul. Maatgevend is de gemiddelde snelheidsfluctuatie van de druppel t.o.v. de omringende fase, doch deze snelheidsfluctuatie is niet bekend. Men kan echter wel stellen, dat deze fluctuatie gering is, waarschijnlijk in de orde van grootte van cm/sec. Daar de druppeldiameter d eveneens gering is (10^{-4} tot 10^{-5} m), is Re klein zodat Sh tot 2 nadert.

De genoemde relaties hebben betrekking op de overdracht van een enkele bol. In het geroerde fermentatievat is het aantal druppels echter zeer groot.

Het is noodzakelijk na te gaan in hoeverre empirische relaties toegepast kunnen worden. Deze relaties moeten betrekking hebben op de

stofoverdracht, in een geroerd vat, van een zwerm druppels naar de continue fase.

Voor de stofoverdracht van vloeistofdruppels naar continue fase zijn uit de literatuur geen relaties bekend. Voor de stofoverdracht van vaste deeltjes naar de continue fase zijn wel relaties beschikbaar. Nu mag voor zeer kleine diameters de oliedruppel beschouwd worden als een starre bol. Toepassing van relaties voor de stofoverdracht van vaste stofdeeltjes naar een vloeistof is daarom gerechtvaardigd. Hixson (186) heeft de stofoverdracht van een zwerm vaste deeltjes naar de omringende vloeistof, in geroerde tankreactoren, nagegaan. Hij komt voor de stofoverdracht tot de volgende relatie

$$\frac{k^w D}{D} = 0.16 \left(\frac{n D^2 \rho}{\eta} \right)^{0.62} \left(\frac{\eta}{\rho D} \right)^{0.5} \quad \underline{20}$$

waarin	D	vatdiameter	m
	n	toerental	1/s
	ρ	dichtheid van de continue fase	kg/m ³
	η	dynamische viscositeit van de continue fase	kg/m s

Als karakteristieke lengte gebruikt Hixson de vatdiameter. In de formule komt de afmeting van de deeltjes niet voor. Dit wil zeggen, dat de partiële stofoverdrachtscoëfficiënt onafhankelijk is van de deeltjesdiameter. Voor een concreet geval - vatdiameter $8.4 \cdot 10^{-2}$ m, continue fase water, disperse fase olie, n-hendecaan als getransporteerde component, toerental 25.0/s - wordt voor k^w gevonden $0.95 \cdot 10^{-4}$ m/s. Voor een oliedruppel met diameter 15μ volgt hieruit $Sh = 2.1$ Voor een gistcel, equivalente diameter 5μ , is $Sh = 0.7$ Theoretisch kan het getal van Sherwood niet kleiner zijn dan twee. Geconcludeerd moet worden dat voor de deeltjesdiameters toegepast bij dit onderzoek, de relatie van Hixson niet geldig is.

Nagata (188) heeft de stofoverdracht van vaste deeltjes naar een vloeistof eveneens nagegaan. Hij kon zijn metingen correleren met behulp van de vergelijking

$$\frac{k^w D}{D} = \beta \left(\frac{D^2 n}{\nu} \right)^{0.2} \left(\frac{\nu}{D} \right)^{0.5} \left(\frac{d}{D} \right)^{-0.8} \quad \underline{21}$$

waarin ν kinematische viscositeit m^2/s
 d deeltjes diameter m

en β een evenredigheidscoëfficiënt, afhankelijk van het dichtheidsverschil tussen vaste fase en vloeistoffase.

De formule bevat zowel de vatdiameter als de deeltjesdiameter. Bij toepassen van de Nagata relatie blijkt, dat de Sherwood waarden onaanneemelijk hoog worden (orde van grootte 100). Daar Nagata, evenals Hixson, werkte met grote deeltjes (0.1 tot 1 cm.) is het duidelijk, dat de Nagata vergelijking niet mag worden toegepast voor zeer kleine deeltjes.

Calderbank (187) heeft waargenomen, dat bij het verstuiven van een gas in een vloeistof de gasbellen zich gedroegen als starre bollen. Hij toonde aan, dat de stofoverdracht van vaste deeltjes naar de vloeistof en van luchtbellen naar de vloeistof gecorreleerd kon worden door de vergelijking

$$Sh = 2.0 + 0.31 \left(\frac{d^3 \Delta \rho g}{n D} \right)^{0.33} \quad \underline{22}$$

waarin $\Delta \rho$ het dichtheidsverschil tussen vaste fase en vloeistoffase of tussen gasfase en vloeistoffase.

Onder de eerder genoemde omstandigheden is voor een oliedruppel met diameter 15 μ volgens de Calderbank relatie $Sh = 2.6$ Voor een gistcel, equivalente diameter 5 μ , is $Sh = 2.2$

Voor zeer kleine deeltjes is de convectiebijdrage gering en in benadering geldt voor overdrachtstrap a

$$Sh = k_a^w d^0 / D = 2 \quad \underline{23}$$

en voor overdrachtstrap b

$$Sh = k_b^w d^c / D = 2 \quad \underline{24}$$

In beide gevallen wordt beschouwd de diffusie van n-alkaan in water, zodat de diffusiecoëfficiënten gelijk zijn.

De omzettingssnelheid kan berekend worden. Invullen van 15, 16, 23 en 24 in 12 geeft

$$\frac{1}{K^0} = \frac{(d^0)^2}{12 D B^0} + \frac{(d^c)^2}{12 D B^c} \quad \underline{25}$$

Combineren van 13 en 25 geeft tenslotte

$$dS/dt = \frac{12 D C^*}{\frac{(d^0)^2}{B^0} + \frac{(d^c)^2}{B^c}} \quad \underline{26}$$

De relatie $Sh = 2$ geldt voor overdracht van een bol naar een medium dat zich naar alle kanten oneindig ver uitstrekt. Indien de afstanden tussen de deeltjes groot zijn vergeleken met de afmetingen van de deeltjes, kan inderdaad ieder deeltje (oliedruppel of gistcel) beschouwd worden als een bol in een medium dat zich naar alle kanten oneindig ver uitstrekt. De betrekking $Sh = 2$ mag voor oliedruppel en voor gistcel worden toegepast. De omzettingssnelheid wordt gegeven door formule 26.

Bij de proefnemingen is veelal uitgegaan van een volumeconcentratie van olie van $0.05 \text{ m}^3/\text{m}^3$. In 6.5. wordt uit metingen, met behulp van celconfiguratie-modellen, de gemiddelde druppelgrootte van de oliedruppels bepaald. Afhankelijk van het model wordt gevonden $15\text{-}20 \mu$ of $55\text{-}65 \mu$. Bij een olievolumconcentratie van $0.05 \text{ m}^3/\text{m}^3$ en een druppeldiameter van 15μ bedraagt de hartafstand der druppels gemiddeld 35μ . Bij dezelfde olievolumconcentratie en een druppeldiameter van 60μ bedraagt de hartafstand der deeltjes 150μ .

Aan de voorwaarde dat de afstand tussen de deeltjes groot is vergeleken met de afmeting van de deeltjes, is voor oliedruppels slechts in grove benadering voldaan.

Experimenteel is voor Candida lipolytica C.B.S. 599, gekweekt op n-

alkanen, vastgesteld dat 1 kg droge stof 225×10^{11} cellen bevat. Indien aangenomen wordt, dat de gistsuspensie homogeen verdeeld is, dan bedraagt bij een droge-stof- concentratie van 2 kg/m^3 de hartafstand van de gistcellen 30μ . Bij een drogestofconcentratie van 15 kg/m^3 bedraagt de hartafstand 16μ .

Aan de voorwaarde dat de afstand tussen de deeltjes groot is vergeleken met de afmeting der deeltjes, is ook voor gistcellen slechts in grove benadering voldaan.

Het is daarom noodzakelijk om na te gaan hoe groot de stofoverdracht is, indien niet aan de voorwaarde voldaan is.

We beschouwen hiertoe het geval, dat de afstand tussen de deeltjes klein is vergeleken met de afmetingen van de grootste deeltjes, de oliedruppels. Dit wil zeggen, dat de gistcellen zich tot dicht bij het olieoppervlak bevinden. Het n-alkaan zal nu niet ver doordringen in de waterfase. Dicht bij het oppervlak van de oliedruppel wordt het n-alkaan reeds geheel weggenomen door de gistcellen. Er is slechts stofoverdracht naar de eerste zone van gistdeeltjes rond de oliedruppel. Indien de onderlinge afstand tussen de gistcellen ℓ^c genoemd wordt, dan is deze eerste zone een schil met dikte ℓ^c . De gemiddelde afstand tussen de gistcellen in deze zone en de oliedruppel is dan $\frac{1}{2} \ell^c$.

In dit geval mag gesteld worden, dat de concentratie van het n-alkaan op een afstand van $\frac{1}{2} \ell^c$ van het druppeloppervlak gemiddeld gelijk nul is. De omzettingssnelheid wordt nu gegeven door

$$dS/dt = ID \ O^0 \ dC/dr = ID \ O^0 \ C^*/\frac{1}{2} \ell^c \quad 27$$

De gemiddelde afstand van de gistcellen kan als volgt berekend worden. Het volume van de gistcel is $\pi(d^c)^3 / 6$. Per m^3 cultuurvloeistof zijn dan $6 B^c / \pi(d^c)^3$ gistcellen aanwezig. Het volume van de gistcel met invloedssfeer is $\pi(d^c + \ell^c)^3 / 6$. Het totaal volume per m^3 is dan $B^c (d^c + \ell^c)^3 / (d^c)^3$. Bij dichtste bolstapelning is dit volume 0.735 m^3 , dus

$$B^c (d^c + \ell^c)^3 / (d^c)^3 = 0.735$$

of

$$d^c = d^c \left\{ \frac{(0.735)^{0.33}}{(B^c)^{0.33}} - 1 \right\} \approx d^c \left\{ \frac{1}{(B^c)^{0.33}} - 1 \right\}$$

Invullen in 27 geeft voor de omzettingssnelheid

$$dS/dt = \frac{12 \text{ ID } C^* B^0}{d^0 d^c \left\{ \frac{1}{(B^c)^{0.33}} - 1 \right\}} \quad \underline{28}$$

De beide mogelijkheden

onderlinge afstand deeltjes groot vergeleken met de deeltjes diameter

onderlinge afstand deeltjes klein vergeleken met de deeltjes diameter

vormen uitersten. Alle andere mogelijkheden liggen hier tussenin. Uitgaande van een viertal proeven (groei-krommen in de figuren 18, 20, 13 en 14) zijn voor een droge - stof-concentratie van $2,5 \text{ kg/m}^3$ de waarden van dS/dt berekend, zowel volgens formule 26 als volgens formule 28. De resultaten zijn opgenomen in de tabellen 13 en 14. In de tabellen zijn ook opgenomen de gemeten waarden van dS/dt .

Uit de resultaten blijkt dat het geen verschil maakt volgens welk model de stofoverdracht berekend wordt. Beide modellen zijn blijkbaar even goede benaderingen van de werkelijkheid.

Voor n-hendecaan is de gemeten waarde zeven maal zo groot als de berekende waarde. Hieruit blijkt dat de groei van Candida lipolytica op n-hendecaan slechts voor een betrekkelijk klein gedeelte verklaard kan worden uit de stofoverdracht via opgelost n-alkaan.

Voor n-dodecaan is de gemeten waarde dertig maal zo groot als de berekende waarde. De groei van Candida lipolytica op n-dodecaan kan slechts voor een gering gedeelte verklaard worden uit stofoverdracht via opgelost n-alkaan. Voor n-tridecaan en n-hexadecaan is de groei op opgelost n-alkaan te verwaarlozen.

De groei van Candida lipolytica op n-tridecaan en hogere n-alkanen

moet dus plaatsvinden door stofoverdracht door direct contact. Bij groei van Candida lipolytica op n-hendecaan en n-dodecaan treden beide stofoverdrachtsmechanismen gelijktijdig op.

5.2. Stofoverdracht door direct contact.

Het mechanisme van de stofoverdracht door direct contact is nog onbekend. Men zou kunnen veronderstellen, dat de n-alkanen, via de lipoproteïnen van het celmembraan, oplossen in de vetbestanddelen van de cel. De oplosbaarheid van de n-alkanen in de vetbestanddelen zal afnemen met de ketenlengte. Op deze wijze is aannemelijk te maken, dat voor de groei een bovenste grens is gesteld aan de ketenlengte. Deze bovenste grens is afhankelijk van het toegepaste micro-organisme. Harris (86) bericht groei van een Micrococcus op n-C₂₈ H₅₈ (octacosaan), Tausz (93) groei van Bact. aliphatic. op n-C₃₃ H₆₈ (triacontaan) en n-C₃₄ H₇₀ (tetratriacontaan) en Hopkins (103) groei van Aspergillus versicolor op n-alkanen tot en met n-C₃₄ H₇₀.

6. GROEI OP ENKELVOUDIG SUBSTRAAT

In het voorgaande hoofdstuk is aangetoond, dat bij groei van Candida lipolytica 599 op n-alkanen de stofoverdracht via opgelost n-alkaan niet groot genoeg is om de groei te verklaren.

Bij n-hendecaan en n-dodecaan als koolstofbron kan de groei voor een deel verklaard worden uit stofoverdracht via opgelost n-alkaan. Om de groei volledig te verklaren moet aangenomen worden, dat het n-alkaan tevens overgedragen wordt door direct contact. Het n-alkaan wordt dus overgedragen door twee stofoverdrachtsmechanismen gelijktijdig.

Bij n-tridecaan en hogere n-alkanen als koolstofbron is de stofoverdracht via opgelost n-alkaan te verwaarlozen. Het n-alkaan wordt uitsluitend overgedragen door direct contact.

De bestudering van de groei op n-hendecaan en n-dodecaan wordt door het gelijktijdig optreden van twee stofoverdrachtsmechanismen bemoeilijkt. Bij groei op n-hendecaan en n-dodecaan is het echter mogelijk gebleken de stofoverdracht door direct contact te voorkomen. Bij toevoer van het n-alkaan in gasvorm, via het beluchtingsgas, gaat het alkaan door gasabsorptie in oplossing in het cultuurmedium. Indien het beluchtingsgas onverzadigd is met n-alkaan, kan geen condensatie optreden. Er is dan in het cultuurmedium geen vloeibaar n-alkaan aanwezig en bijgevolg is stofoverdracht door direct contact uitgesloten. De opstelling voor het toevoeren van n-alkaan via het beluchtingsgas is beschreven in 3.3.

In het nu volgende zijn de grootheden, indien toegepast in verband met de stofoverdracht via opgelost n-alkaan, voorzien van het teken ' en indien toegepast in verband met de stofoverdracht door direct contact, voorzien van het teken ''.

6.1. Groei van Candida lipolytica bij stofoverdracht door één stofoverdrachtsmechanisme.

De stofoverdracht via opgelost n-alkaan kan bestudeerd worden door

toevoer van n-hendecaan en n-dodecaan in gasvorm.

De stofoverdracht door direct contact kan bestudeerd worden door groei op n-tridecaan en hogere n-alkanen.

6.1.1. Groei bij stofoverdracht via opgelost n-alkaan.

De groeikrommen voor groei op n-hendecaan en n-dodecaan, bij toevoer van het n-alkaan via de gasfase, zijn weergegeven in de figuren 11 en 12. In elke figuur is de drogestofconcentratie P zowel op logaritmische schaal als op lineaire schaal uitgezet tegen de tijd. De gegevens van de proeven zijn opgenomen in de tabellen 15 en 16. De omstandigheden bij groei op n-hendecaan en bij groei op n-dodecaan zijn dezelfde. In 3.3.3. is, in verband met de zuurstofoverdracht, de invloed van de toegevoerde luchthoeveelheid nagegaan. Uitgaande van de resultaten werd de luchttoevoer op $11 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$ vastgesteld. Bij groei van gisten op n-alkaan, met toevoer van het n-alkaan via de gasfase, dient de lucht niet alleen voor zuurstoftoevoer, maar tevens voor n-alkaantoevoer. De invloed van de luchttoevoer op de overdracht van het n-alkaan is niet nagegaan. Daar het gehalte aan n-alkaan in de toevoerlucht laag was, werd voor de gasabsorptie proeven de luchttoevoer op $11 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3/\text{s}$ gebracht. De invloed van het toerental op de overdracht van het n-alkaan is evenmin nagegaan. Het toerental werd bij deze proeven ingesteld op 30.0/s. In de tabellen 15 en 16 zijn tevens opgenomen de grootheden, die met behulp van de groeikrommen bepaald zijn.

De groeikromme voor groei op opgelost n-hendecaan heeft dezelfde vorm als de groeikromme voor groei op n-dodecaan. De exponentiële groeiperiode gaat over in een lineaire groeiperiode. De overgang is door een verticale, onderbroken lijn aangegeven. Uiteraard zal tussen beide genoemde groeiperiodes een overgangperiode optreden, doch deze overgangperiode duurt blijkbaar zo kort dat deze, gezien de meetnauwkeurigheid, niet aantoonbaar is. De groeisnelheidsconstante voor groei van Candida lipolytica op opgelost n-hendecaan bedraagt $0.59 \cdot 10^{-4}/\text{s}$ en voor groei op opgelost n-dodecaan $0.56 \cdot 10^{-4}/\text{s}$.

De stofoverdracht van gas naar vloeistof kan beschouwd worden met behulp van de tweefilm-theorie. Aan het fasegrensvlak lucht / water wordt aan de luchtzijde een luchtfilm, aan de waterzijde een waterfilm aangenomen. De stofoverdrachtscoëfficiënt wordt in dit geval samengesteld uit de partiële stofoverdrachtscoëfficiënt voor de luchtfilm k^l , de partiële stofoverdrachtscoëfficiënt voor de waterfilm k^w en de faseverdelingscoëfficiënt m , aldus

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{k^w} + \frac{1}{mk^l} \quad 29$$

waarbij in dit geval $m = C_g^l / C_g^w$.

De waarde van m is van de orde van grootte van twintig.

De waarde van k^l is veel groter dan de waarde van k^w . Dit is als volgt in te zien. De waarde van k wordt bepaald door de relatie $k = D/\delta$. De diffusiecoëfficiënt van n-alkaan in lucht is ruwweg zeventienduizend maal zo groot als in water. De filmdikte hangt af van de mate van turbulentie en van de fysische eigenschappen van de betrokken stoffen. Daar echter de viscositeit van lucht ongeveer vijftig maal zo klein is als van water, is de dikte van de luchtfilm in elk geval geringer dan de dikte van de waterfilm. Hieruit volgt

$$k^l \gg k^w.$$

De term $1/mk^l$ is te verwaarlozen ten opzichte van de term $1/k^w$. Hieruit volgt : $K = k^w$. De vloeistoffilm is bepalend voor de stofoverdracht. Voor de stofoverdracht geldt nu

$$(dS/dt)' = k^w (C^+ - C^w)$$

waarin C^+ de concentratie van het opgelost n-alkaan in het cultuurmedium, in evenwicht met de n-alkaan-concentratie in het doorstromende gas. Hierbij is er van uitgegaan, dat het verschil tussen de concentraties van het n-alkaan in in- en uitstromend gas gering is. Dit is het geval, indien het verbruik gering is ten opzichte van de toevoer. Bij de proeven is gewerkt met lage droge-stof-concentraties, zodat aan de voorwaarde voldaan is.

Gedurende de exponentiële groeiperiode neemt $(dS/dt)'$ toe. Dit kan alleen, als C^w daalt. Voor lage waarden van C^w wordt de concentratie bepalend voor de groei. De groei is dan gelimiteerd en de exponen-

tiële groeiperiode eindigt. Daar in dit geval $C^W \rightarrow 0$ is

$$(dS/dt)' \rightarrow k^W \cdot 0 \cdot C^+ = \text{constant.} \quad 30$$

De lineaire groeiperiode vangt aan. De omzettingssnelheid aan het einde van de exponentiële groeiperiode is gelijk aan de maximale waarde van de omzettingssnelheid, in formule

$$(dS/dt)'_{ln} = (dS/dt)'_{max.} \quad 31$$

en, daar de economische coëfficiënt constant is, geldt ook

$$(dP/dt)'_{ln} = (dP/dt)'_{max.} \quad 32$$

Zowel voor n-hendecaan (tabel 15) als voor n-dodecaan (tabel 16) wordt inderdaad voldaan aan deze betrekking.

Uit de metingen blijkt, dat voor n-hendecaan de waarde van $(dP/dt)'_{ln}$ driemaal zo groot is als voor n-dodecaan.

Bij groei op n-hendecaan en bij groei op n-dodecaan heeft de luchtbelasting dezelfde waarde. Ook het toerental is in beide gevallen hetzelfde. Het specifiek grensvlak zal in beide gevallen even groot zijn.

De fysische eigenschappen, die de stofoverdrachtscoëfficiënt k^W bepalen, verschillen zeer weinig bij beide alkanen. Ook de waarde van k^W is in beide gevallen even groot.

De waarden van $(dS/dt)'$ moeten zich verhouden als de waarden van C^+ en dus als de waarden van C^* , de verzadigingsconcentraties.

De verzadigingsconcentratie van n-hendecaan in water is driemaal zo groot als de verzadigingsconcentratie van n-dodecaan in water. Aan de evenredigheid is voldaan.

De groei van Candida lipolytica, bij toevoer van gasvormig n-alkaan, kan geheel verklaard worden uit de stofoverdracht van luchtfase naar waterfase.

6.1.2. Groei bij stofoverdracht door direct contact.

De groeikromme voor groei op n-tridecaan - fig. 13 - en de groeikrommen voor groei op n-hexadecaan - fig. 14 en 15 - vertonen grote overeenkomst met de groeikrommen bij stofoverdracht via opgelost n-

alkaan. De groei is exponentieel tot betrekkelijk hoge droge-stof-concentraties. De exponentiële groeiperiode gaat, zonder aantoonbare tussenperiode, over in de lineaire groeiperiode. De overgang is aangegeven door een onderbroken, verticale lijn. De lineaire periode is betrekkelijk kort.

Uit de groeikrommen blijkt, dat voor groei op n-tridecaan en hogere n-alkanen

$$(dS/dt)''_{ln} = (dS/dt)''_{max.} \quad \underline{33}$$

Voor stofoverdracht geldt algemeen

$$dS/dt = K O \Delta C \quad \underline{3}$$

Voor het specifiek oppervlak geldt

$$O'' = q f N \quad \underline{34}$$

waarin	O''	contact oppervlak per m ³ cultuurvloeistof	m ² /m ³
	q	contact oppervlak tussen druppel en cel	m ²
	f	fractie van N, dat deelneemt aan het directe contact	-
	N	aantal micro-organismen per m ³ cultuurvloeistof	l/m ³

zodat $dS/dt = K q f N \Delta C \quad \underline{35}$

De stofoverdracht kan in het algemeen verbeterd worden door verhoging van de turbulentie. Teneinde na te gaan of ook bij stofoverdracht door direct contact de overdracht verbeterd kan worden door verhoging van de turbulentie, moet formule 35 nader bekeken worden.

De stofoverdrachtscoëfficiënt K wordt bepaald door de contactweerstand olieoppervlak / cel en de weerstand tegen n -alkaantransport van celwand naar enzymoppervlak. Deze weerstanden worden niet beïnvloed door de mate van turbulentie. Het contactoppervlak q zal evenmin beïnvloed worden door de mate van turbulentie. Het is echter mogelijk dat f , de fractie van N dat deelneemt aan het direct contact, afhankelijk is van de mate van turbulentie en dus van het toerental. De invloed van het toerental is nagegaan. Uit de metingen blijkt, dat $(dS/dt)''_{ln}$ en dus volgens formule 33 $(dS/dt)''_{max}$ onafhankelijk is van het toerental. Voor fig. 14 - groei op n -hexadecaan, toerental 20.0/s - wordt gevonden $(dS/dt)''_{max}$ is $11.0 \cdot 10^{-4} \text{ kg/m}^3 \text{ s}$. Voor fig. 15 - groei op n -hexadecaan, toerental 30.0/s - heeft $(dS/dt)''_{max}$ de waarde $10.7 \cdot 10^{-4} \text{ kg/m}^3 \text{ s}$.

Bij toenemende waarde van N zal het gehele oliedruppeloppervlak bezet raken met gistcellen, zodat

$$O^0 = 0'' \quad \quad \quad \underline{36}$$

waarin O^0 oppervlak van de oliedruppels
per m^3 cultuurvloeistof m^2/m^3

Daar bij toenemende turbulentie de gemiddelde druppelgrootte zal afnemen, is O^0 een functie van het toerental. De stofstroom is in dit geval afhankelijk van het toerental. Deze wijze van limitering, de zg. oppervlaktelimitering, treedt bij de in deze paragraaf behandelde groeikrommen niet op. Voordat het oppervlak geheel bezet is met gistcellen, zal de groei afnemen t.g.v. concentratielimitering. In 6.4. zal worden aangetoond, dat het einde van de exponentiële groeiperiode het gevolg is van concentratielimitering. Door opvoeren van de concentratie van het n -alkaan in de olie kan echter een toestand gecreëerd worden, waarbij oppervlakte-limitering wel optreedt, voordat een andere wijze van limitering een rol zal gaan spelen. In 6.5. wordt de oppervlakte-limitering nagegaan.

De waarden gevonden voor de groeisnelheidsconstante, bij groei van Candida lipolytica op n -tridecaan en hogere n -alkanen zijn opgenomen in tabel 17.

In de literatuur zijn weinig gegevens over groeisnelheidsconstanten bij groei van gisten op n-alkanen. Miller (110) (158) geeft voor de groeisnelheidsconstante waarden van $0.28 \cdot 10^{-4}/s$ tot $0.42 \cdot 10^{-4}/s$, voor n-dodecaan tot n-octadecaan. Azoulay (189) geeft voor alle n-alkanen een waarde van $1.17 \cdot 10^{-4}/s$. De afwijkingen zijn aanzienlijk. In aanmerking moet echter worden genomen dat noch Miller, noch Azoulay aangeven hoe de desbetreffende waarden verkregen zijn. Zij geven geen groeikrommen en geven evenmin aanwijzingen over de toegepaste meetmethoden.

In tabel 13 zijn de waarden, gevonden voor de economische coëfficiënt, gegeven. De economische coëfficiënt neemt toe met de ketenlengte en wordt constant voor n-hexadecaan en hogere n-alkanen.

Het is niet uitgesloten, dat het n-alkaan niet volledig afgebroken wordt. Restprodukten van de n-alkaan-afbraak zijn meermalen aangetoond in de cultuurvloeistof. Indien de lengte van de restketen onafhankelijk is van de oorspronkelijke n-alkaan-ketenlengte, dan kan hieruit de toename van de economische coëfficiënt verklaard worden. Indien de restketen ongeveer 6 C-atomen zou bevatten, dan is voor korte n-alkaanketens de rest relatief groot t.o.v. het deel van de keten, dat afgebroken wordt. De economische coëfficiënt is laag. Bij toenemende alkaanketens wordt de rest relatief steeds geringer t.o.v. het deel van de keten, dat afgebroken wordt. De economische coëfficiënt neemt toe met de ketenlengte.

De toename van de economische coëfficiënt zal steeds geringer worden bij toenemende ketenlengte en dus nadert de economische coëfficiënt min of meer tot een limietwaarde.

De waarden van de economische coëfficiënt gevonden door Miller en Azoulay zijn redelijk goed in overeenstemming met de bij dit onderzoek gevonden waarden - fig. 24 -. De tendens van de toename is steeds dezelfde, de absolute waarden verschillen. Gezien het feit dat met verschillende gistsoorten of tenminste met verschillende stammen van Candida lipolytica gewerkt is, zijn de afwijkingen aanvaardbaar.

6.2. Groei van Candida lipolytica bij stofoverdracht door twee stofoverdrachtsmechanismen gelijktijdig.

Bij groei op n-hendecaan en n-dodecaan vindt stofoverdracht plaats door twee stofoverdrachtsmechanismen gelijktijdig. De groeikrommen voor de groei op n-hendecaan, fig. 16, 17, 18 en 19 en voor de groei op n-dodecaan, fig. 20 zijn duidelijk afwijkend van de vorm bij stofoverdracht door één stofoverdrachtsmechanisme.

De exponentiële groeiperiode gaat niet over in een lineaire groeiperiode, maar in een tussenperiode die verscheidene uren duurt. De overgang is weer aangegeven door een onderbroken, verticale lijn. De tussenperiode gaat over in de lineaire groeiperiode en deze overgang is eveneens aangegeven door een onderbroken, verticale lijn. Uit de groeikrommen blijkt, dat

$$(dS/dt)_{\text{ln}} < (dS/dt)_{\text{max.}} \quad \underline{37}$$

De gegevens en de grootheden die met behulp van de groeikrommen bepaald zijn, zijn opgenomen in de tabellen 19 (voor n-hendecaan) en 20 (voor n-dodecaan).

Voor n-hendecaan heeft de groeisnelheidsconstante $1/P \, dP/dt$ de waarde $0.53 \cdot 10^{-4}/s$. Voor groei op n-hendecaan bij stofoverdracht via opgelost n-alkaan werd gevonden - zie tabel 15 - $0.59 \cdot 10^{-4}/s$.

Voor n-dodecaan heeft de groeisnelheidsconstante $1/P \, dP/dt$ de waarde $0.51 \cdot 10^{-4}/s$. Voor groei op n-dodecaan bij stofoverdracht via opgelost n-alkaan werd gevonden - zie tabel 16 - $0.51 \cdot 10^{-4}/s$. De verschillen zijn betrekkelijk gering.

Het is niet bekend, op welke wijze een bepaalde cel van n-alkaan wordt voorzien. Er doen zich, theoretisch, verschillende mogelijkheden voor.

Het is mogelijk, dat een deel van de cellen zich bevindt in de massa van de waterfase en van n-alkaan wordt voorzien door stofoverdracht via opgelost alkaan. Het overige deel van de cellen bevindt zich dan in direct contact met de oliedruppel en wordt voorzien van n-alkaan door stofoverdracht door direct contact. Maar een cel, die in direct

contact is met een oliedruppel, is slechts voor de helft van zijn oppervlak met de oliedruppel in contact. De andere helft van het oppervlak is naar de waterfase gekeerd. Het is waarschijnlijk, dat deze cel via dit deel van zijn oppervlak voorzien wordt door stofoverdracht via opgelost n-alkaan.

Een andere mogelijkheid is, dat elke cel in direct contact is met een oliedruppel. In dit geval wordt elke cel van n-alkaan voorzien door beide overdrachtsmechanismen.

Tot nu toe is aangenomen, dat bij direct contact de helft van het oppervlak bij dit directe contact is betrokken. Het is echter niet uitgesloten, gezien de kromming van druppel en cel, dat een veel geringer deel van het oppervlak bij dit contact betrokken is. Bovendien zal elke cel, in direct contact met een oliedruppel, een deel van het grensvlak olie/water blokkeren. Naarmate meer cellen in direct contact zijn met de olie, neemt de stofstroom van oliefase naar waterfase af.

Door centrifugeren is daarom getracht vast te stellen, welk deel van de gistcellen zich in de massa van de waterfase bevindt.

Het soortelijk gewicht van de gistcel is ongeveer 1.07. Het soortelijk gewicht van de olie varieert van 0.77 tot 0.88, afhankelijk van het n-alkaan gehalte. Het gist/olie-complex bevat voornamelijk olie, zodat het soortelijk gewicht van het gist/olie-complex kleiner is dan 1.00. Door centrifugeren moet in principe een scheiding mogelijk zijn tussen cellen in de waterfase en cellen in contact met de olie. De resultaten waren echter niet reproduceerbaar. Mogelijk kwam een deel van de gistcellen, die zich bevonden in de massa van de waterfase, tijdens het centrifugeren (of reeds tijdens het hantieren van het monster vóór het centrifugeren) terecht in de tussenruimten van de gist/olie-agglomeraten.

Stel, dat per m^3 cultuurvloeistof N' cellen zich in de massa van de waterfase bevinden, terwijl N'' cellen in direct contact zijn met het olieoppervlak, zodat

$$N = N' + N''$$

Voor de stofoverdracht via opgelost n-alkaan geldt

$$(dS/dt)' = \frac{12 \text{ ID } C^*}{\frac{(d^0)^2}{B^0} + \frac{(d^c)^2}{B^c}} \quad \underline{26}$$

Indien de oliedruppels zeer groot zijn in vergelijking met de gistcellen, dan mag gesteld worden

$$\frac{(d^c)^2}{B^0} \ll \frac{(d^0)^2}{B^c} \quad \underline{39}$$

omdat B^0 en B^c van dezelfde orde van grootte zijn.

Noemen we ψ de fractie vrij olieoppervlak, dat wil zeggen de fractie van het olieoppervlak dat niet bezet is met gistcellen, dan is

$$(dS/dt)' = \frac{12 \text{ ID } C^* B^0}{(d^0)^2} \psi \quad \underline{40}$$

Voor de stofoverdracht door direct contact geldt

$$(dS/dt)'' = K \ q \ f \ N \ \Delta C \quad \underline{35}$$

Nu is $f \ N = N''$ zodat, met $K \ q \ \Delta C = \gamma$,

$$(dS/dt)'' = \gamma \ N'' \quad \underline{41}$$

De stofstroom is samengesteld uit de bijdrage van de stofoverdracht via opgelost n-alkaan en de bijdrage van de stofoverdracht door direct contact, dus

$$dS/dt = (dS/dt)' + (dS/dt)''$$

waaruit, met 40 en 41

$$dS/dt = \frac{12 \mathbb{D} C^* B^0}{(d^0)^2} \psi + \gamma N'' \quad \underline{42}$$

Van O^0 , het oppervlak der oliedruppels per m^3 cultuurvloeistof, is de fractie $(1 - \psi) O^0$ "bezet" met gistcellen, dus

$$(1 - \psi) O^0 = q N''$$

en met $O^0 = 6 B^0 / d^0$ volgt hieruit

$$\psi = 1 - \frac{q N'' d^0}{6 B^0}$$

zodat

$$dS/dt = \frac{12 \mathbb{D} C^* B^0}{(d^0)^2} - \frac{2 \mathbb{D} C^* N'' q}{(d^0)} + \gamma N'' \quad \underline{43}$$

Bij toenemend toerental zal d^0 , de gemiddelde druppeldiameter, afnemen.

In 6.5. is het verband tussen de gemiddelde druppelgrootte en het toerental nagegaan - fig. 35 en 36 -.

Uit de metingen volgt, dat in benadering

$$d^0 = c_p n^{-0.7} \quad \underline{44}$$

Combinatie van 43 en 44 geeft

$$dS/dt = 12 c^2 \mathbb{D} C^* B^0 n^{1.4} - 2 c \mathbb{D} C^* N'' q n^{0.7} + \gamma N'' \quad \underline{45}$$

Bewezen is reeds, dat de stofoverdracht door direct contact onafhankelijk is van het toerental, zodat $\gamma N'' = c_3$.

Stellen we $12 c^2 \text{ID } C^* B^0 = c_1$ en $2 c \text{ID } C^* N'' q = c_2$, dan is

$$dS/dt = c_1 n^{1.4} - c_2 n^{0.7} + c_3 \quad \underline{46}$$

Voor lage droge-stofconcentraties is het olieoppervlak, dat bezet is met gistcellen, te verwaarlozen ten opzichte van het olieoppervlak, dat niet bezet is met gistcellen, zodat $\psi \rightarrow 1$.

Uit 42 volgt nu

$$dS/dt = \frac{12 \text{ID } C^* B^0}{(d^0)^2} + \gamma N'' \quad \underline{47}$$

en, met 44,

$$dS/dt = 12 c^2 \text{ID } C^* B^0 n^{1.4} + \gamma N'' \quad \underline{48}$$

of

$$dS/dt = c_1 n^{1.4} + c_3 \quad \underline{49}$$

Het verband tussen omzettingssnelheid en toerental, voor groei van Candida lipolytica op n-hendecaan, is nagegaan.

In fig. 21 is $(dS/dt)_{1n}$, de omzettingssnelheid aan het einde van de exponentiële groeiperiode, uitgezet als functie van het toerental. Hieruit blijkt

$$dS/dt = c_4 n^{1.5} + c_5 \quad \underline{50}$$

Uit de overeenkomst tussen 49 en 50 kan besloten worden, dat bij groei van Candida lipolytica op n-hendecaan, bij lage droge stofconcentraties, de "afscherming" van het olieoppervlak door gistcellen verwaarloosd kan worden.

Het is mogelijk de stofoverdracht via opgelost n-alkaan relatief onbelangrijk te maken t.o.v. de stofoverdracht door direct contact zodat in benadering gesteld kan worden, dat de groei uitsluitend plaatsvindt door stofoverdracht door direct contact.

De stofoverdracht via opgelost n-alkaan is een functie van het toerental. Door het toepassen van lage toerentallen kan de absolute waarde van deze stofstroom gering gemaakt worden. Bij hoge celconcentraties (door het toepassen van hoge entconcentraties) is de bijdrage van de stofoverdracht via opgelost n-alkaan relatief klein ten opzichte van de stofoverdracht door direct contact. Door combinatie van beide methoden kan de relatieve bijdrage van de stofoverdracht via opgelost n-alkaan zo klein gemaakt worden, dat deze stofstroom in benadering verwaarloosd kan worden ten opzichte van de stofstroom door direct contact.

Bij groei van Candida lipolytica op n-hendecaan en n-dodecaan wordt onder de zo juist geschetste omstandigheden voor de groeisnelheidsconstante gevonden (tabel 21)

voor n-hendecaan $0.32 \cdot 10^{-4}/s$

voor n-dodecaan $0.37 \cdot 10^{-4}/s$

Deze waarden zijn veel lager dan bij stofoverdracht via opgelost n-alkaan.

6.3. Groei van Candida lipolytica op n-alkanen. Overzicht.

In fig. 22 zijn de waarden van de groeisnelheidsconstante als functie van de ketenlengte uitgezet. Voor n-hendecaan en n-dodecaan zijn de waarden bij stofoverdracht via opgelost n-alkaan, bij gelijktijdig optreden van twee stofoverdrachtsmechanismen en bij stofoverdracht door direct contact opgenomen.

Voor n-hendecaan en n-dodecaan is het gelijktijdig optreden van twee stofoverdrachtsmechanismen "normaal", voor n-tridecaan en hogere n-alkanen is de stofoverdracht door direct contact de "normale" wijze van stofoverdracht. De getrokken kromme in fig. 22 geeft daarom het "normale" verband weer tussen groeisnelheidsconstante en ketenlengte.

In 1.5. is gesteld dat, blijkens de literatuur, veelvuldig anomaliteiten zijn waargenomen bij de groei van micro-organismen op n-alkanen met ketens van 10 - 14 C-atomen. Het kolommendiagram - fig. 23 -

toont aan, dat de groei minimaal is voor n-tridecaan/n-tetradecaan. Door vergelijken van de figuren 22 en 23 blijkt, dat het dal in de kromme het gevolg is van het optreden van de twee overdrachtsmechanismen bij n-hendecaan en n-dodecaan. Door de bijdrage van de stofoverdracht via opgelost n-hendecaan en n-dodecaan, neemt bij beide alkanen de totale stofoverdracht sterk toe.

De groeisnelheidsconstante voor de groei op n-alkaan bij stofoverdracht door direct contact, neemt geleidelijk toe met de ketenlengte. De vorm van de kromme (fig. 22, eerste deel een onderbroken, tweede deel een volle lijn) is identiek met de vorm van de kromme in fig. 24. Indien de stofoverdracht uitsluitend zou plaatsvinden door direct contact, zou geen dal optreden.

De stofstroom per gewichtseenheid drogestof $1/P \, dS/dt$ kan afgeleid worden uit $1/P \, dP/dt$. De economische coëfficiënt is constant (zie 2.3.1.4.), zodat

$$\text{e.c.} = \frac{(P-P_o)}{(S_o-S)} = \frac{d(P-P_o)}{dt} / \frac{d(S_o-S)}{dt} = \left| \frac{dP}{dS} / \frac{dS}{dt} \right|$$

In $1/P \, dP/dt$ kan dP/dt vervangen worden door het produkt van economische coëfficiënt en dS/dt .

In tabel 22 zijn de waarden van $1/P \, dS/dt$ voor groei van Candida lipolytica C.B.S. 599 op de verschillende n-alkanen, opgenomen. Uit de gegevens blijkt dat $1/P \, dS/dt$ bij stofoverdracht door direct contact nagenoeg constant is. Voor stofoverdracht via opgelost n-alkaan is $1/P \, dS/dt$ ongeveer 50 % hoger.

6.4. Concentratielimitering.

Voor lage waarden van de koolstofsubstraatconcentratie wordt deze concentratie limiterend. Bij stofoverdracht door direct contact is de concentratie van het n-alkaan in de oliefase, C^o , de bepalende concentratie.

De groei van Candida lipolytica als functie van C^o is, voor n-hexadecaan, nagegaan in schudkolfcultuur - fig. 25 en 26. Voor lage substraatconcentraties is de groei inderdaad afhankelijk van deze sub-

straatconcentratie. Bij schudkolfcultuur wordt de pH niet bijgesteld. Met toenemende celconcentratie daalt de pH. De groei is afhankelijk van de pH. De groei daalt niet alleen t.g.v. de dalende n-hexadecaanconcentratie, maar tevens t.g.v. de dalende pH.

Bij de proeven in het fermentatievat is de pH constant gehouden. Uit de groeikrommen en de substraatverbruikkrommen kan de groeisnelheid als functie van de substraatconcentratie bepaald worden - tabel 23. De groeisnelheidsconstante kan, met behulp van de economische coëfficiënt, omgezet worden tot de waarde $1/P \, dS/dt$. In de figuren 27, 29 en 31 zijn de verzadigingskrommen voor groei op n-tridecaan, n-hexadecaan en n-nonadecaan weergegeven. In de figuren 28, 30 en 32 zijn de overeenkomstige Eadie-diagrammen uitgezet. De waarden van de verzadigingsconstante K_s zijn opgenomen in tabel 24. In deze tabel zijn naast de waarden van K_s opgenomen de waarden van $1/P \, dS/dt$. De waarden van $1/P \, dS/dt$ zijn in dit geval iets hoger dan volgens 6.3.

De resultaten tonen aan dat voor lagere waarden van de n-alkaanconcentratie in de oliefase, de groei afhankelijk wordt van deze concentratie. De afhankelijkheid kan beschreven worden met behulp van de verzadigingsvergelijking.

6.5. Oppervlaktelimitering.

Bij stofoverdracht door direct contact is het theoretisch mogelijk, dat bij hoge gistconcentraties het grensvlak geheel bezet is met gistcellen. In dit geval zullen uitsluitend de cellen aan het grensvlak vermenigvuldigen. De groei is dan gelimiteerd door het beschikbare oppervlak. Tijdens de groei worden de verschillende substraten verbruikt. Tegen de tijd dat de hoge drogestofconcentratie bereikt is, kan een substraat zover verbruikt zijn dat de concentratie van dat substraat limiterend is. Dit geldt dan met name voor de n-alkaanconcentratie. Dit kan voorkomen worden, door uit te gaan van een zeer hoge entconcentratie.

In fig. 33 - tabel 25 - zijn de resultaten weergegeven van een twee-

tal groeiproeven op n-hexadecaan.

Bij deze proeven, gelijktijdig ingezet, zijn alle omstandigheden dezelfde. De enting is eveneens dezelfde, naar kwaliteit en hoeveelheid. Slechts de oliebelasting en de oliesamenstelling zijn verschillend.

Voor hoge n-alkaanconcentraties is de groei onafhankelijk van de concentratie. Het verschil in oliesamenstelling (80 % n-hexadecaan bij proef no. 1, 50 % n-hexadecaan bij proef no. 2) heeft geen invloed. Een mogelijke concentratielimitering wordt door het opgevoerde n-hexadecaan-gehalte vermeden. Uit het bovenstaande blijkt, dat de proeven slechts verschillen in oliebelasting.

De oliebelasting is laag gehouden, opdat bij benadering het grensvlak evenredig zal zijn met de oliebelasting.

Voor de exponentiële periode is in beide gevallen de groeisnelheidsconstante $0.67 \cdot 10^{-4}/s$. Bij een vaste-stofconcentratie van $2.86 \text{ kg}/\text{m}^3$ gaat voor proef 1 de groei over in de fase $dP/dt = \text{constant} = 1.9 \cdot 10^{-4} \text{ kg}/\text{m}^3\text{s}$. Alkaanconcentratielimitering kan in dit punt nog niet optreden. Er is geen zuurstof- of andere limitering, want bij proef 2 blijft de gist bij deze vaste-stofconcentratie in de exponentiële periode. Bij een vaste-stofconcentratie van $5.24 \text{ kg}/\text{m}^3$ gaat voor proef 2 de groei over in de fase $dP/dt = \text{constant} = 3.5 \cdot 10^{-4} \text{ kg}/\text{m}^3 \text{ s}$. Alleen het grensvlak is in beide gevallen verschillend en dus moet de overgang van exponentiële periode naar lineaire periode een gevolg zijn van grensvlaklimitering.

Het grensvlak kan limiterend zijn bij de overdracht van n-alkaan van oliefase naar waterfase. Aangetoond is echter dat voor n-hexadecaan de stofoverdracht via opgelost n-alkaan volkomen te verwaarlozen is, zodat deze vorm van limitering uitgesloten is. Het grensvlak kan ook limiterend zijn ten aanzien van het aantal cellen, dat aan het grensvlak een plaats kan vinden. Bij de overgang is het grensvlak volledig bezet. Nadat het grensvlak volledig bezet is, groeien alleen de cellen aan het grensvlak - N actief - waarbij N_{actief} het aantal cellen per m^3 olie voorstelt. Daar N_{actief} bij volledige oppervlakte bezetting constant is, zijn dN/dt en dP/dt constant.

De gegevens in tabel 25 tonen aan, dat bij overgang van exponentiële

fase naar de lineaire fase de gist/olie verhouding dezelfde waarde heeft.

In principe zou, na de overgang, dN/dt langzaam moeten afnemen. Er is verbruik van n-alkaan, zodat de oliebelasting en dus het fase-grensvlak steeds kleiner wordt. Een volledig "bezet" grensvlak wil echter zeggen dat er wel open plekken zijn, maar dat deze plekken elk voor zich kleiner zijn dan de doorsnede van een gistcel. Een nieuwe gistcel kan zich dus niet meer aan het grensvlak invoegen, maar er is wel speling. Bij kleiner worden van de druppels door alkaanverbruik zal, binnen zekere grenzen, de bezetting dezelfde blijven.

Men kan nu een grove schatting maken van de druppelgrootte, indien bekend is

- a) het verband tussen droge stof en aantal gistcellen
- b) de gemiddelde afmetingen van de gistcel
- c) de rangschikking van de cellen aan het grensvlak

Het verband tussen droge stof en aantal gistcellen is, uit metingen, bekend. Voor Candida lipolytica gekweekt op n-alkanen in de reeks n-hendecaan tot n-octadecaan geldt, onder de eerder geschetste proefomstandigheden, dat 1 kg droge stof = $225 \cdot 10^{11}$ cellen. Als gemiddelde afmetingen van Candida lipolytica werd gevonden $13 \mu \times 4 \mu$. (microscopisch bepaald). Als extreme mogelijkheden van de rangschikking van de cellen aan het grensvlak kan gelden :

alle cellen bevinden zich met de lange as evenwijdig aan het grensvlak - fig. 34, celrangschikking 1.

alle cellen bevinden zich met de lange as loodrecht op het grensvlak - fig. 34, celrangschikking 2.

Voor de gemiddelde druppeldiameter geldt $d^0 = 6 B^0 / O^0$, waarin B^0 de oliebelasting en O^0 het specifiek grensvlak.

Voor de berekeningen moet echter niet worden uitgegaan van het fase-grensvlak, maar van het boloppervlak, waarop de "doorsneden" van de gistcellen zich bevinden.

In de figuren 35 en 36 is, voor beide mogelijkheden van celrangschikking, de gemiddelde druppelgrootte uitgezet als functie van het

toerental. Uit de figuren blijkt, dat de gemiddelde druppeldiameter afneemt met toenemend toerental.

Getracht is de druppelgrootte rechtstreeks te bepalen. Op deze wijze kan het verband tussen toerental en gemiddelde druppelgrootte geverifieerd worden. Tevens kan dan bepaald worden, welke celrangschikking optreedt bij de fermentatieproeven.

Een meting van de gemiddelde druppelgrootte met behulp van troebelingsmetingen is niet mogelijk, omdat de aanwezige gistcellen en luchtbellen eveneens bijdragen tot de troebeling. Om dezelfde reden kunnen ook andere metingen, bijv. met de Coulter counter, niet worden toegepast. Bepaling van de druppelgrootte met behulp van een microscoop bleek eveneens onmogelijk. In het monster bleken alleen zeer grote druppels (diameters groter dan 100μ) en zeer kleine druppels (diameters kleiner dan 1μ) aanwezig. Hieruit kan besloten worden, dat de aanwezige druppels (met uitzondering van de kleinste druppels) samengevloeid waren. De druppelgrootte-verdeling in het monster komt dus niet overeen met de druppelgrootte-verdeling in het cultuurmedium in het fermentatievat.

7. GROEI OP MEERVOUDIG SUBSTRAAT

Monod (83) heeft bewezen dat bij groei van micro-organismen op mengsels van koolhydraten, diauxie op kan treden. Onder diauxie wordt verstaan : het uiteenvallen van de groeikromme van een cultuur, die twee koolstofbronnen bevat, in twee groeikrommen gescheiden door een lagperiode. Bij bepaalde combinaties van koolhydraten, glucose/saccharose onder andere, worden beide substraten gelijktijdig verbruikt. Bij andere combinaties, bijvoorbeeld glucose/galactose, wordt eerst de glucose geheel verbruikt. Hierna treedt een lagperiode op, waarna de galactose verbruikt wordt.

Bij de produktie van eiwit uitgaande van koolwaterstoffen als koolstofsubstraat, worden n-alkanen met meer dan 10 C-atomen toegepast. De paraffinen worden verkregen door behandeling van aardoliefracties met moleculairzeven of door ontparaffineren van aardoliefracties. Soms wordt uitgegaan van onbehandelde aardoliefracties. Van welke grondstof ook wordt uitgegaan, steeds bevat de grondstof een groot aantal verschillende koolwaterstoffen, die in aanmerking komen als substraat. Het is niet uitgesloten dat bij groei van micro-organismen op koolwaterstoffen diauxie optreedt. De groei van gisten op mengsels van n-alkanen dient onderzocht te worden.

Bij de ladingsgewijze produktie wordt uitgegaan van entmateriaal, dat is voorgekweekt op koolwaterstoffen. Niettemin treedt na enten een lagperiode op. Laine (58) heeft gesteld, dat deze lagperiode geëlimineerd kan worden door het entmateriaal in een voortrap te laten groeien op koolhydraten. Men zou echter verwachten dat door voorkweek op koolhydraat de lagperiode verlengd zou worden in plaats van geëlimineerd. Een onderzoek naar diauxie bij groei op mengsels van koolhydraat en koolwaterstof is eveneens noodzakelijk.

Het onderzoek heeft tot nu toe betrekking gehad op groei op enkelvoudig koolstofsubstraat. Het entmateriaal was steeds voorgekweekt op het toegepaste koolstofsubstraat. Bij groei op meervoudig koolstofsubstraat doet zich de vraag voor of het verschil maakt, op welke van de twee koolstofbronnen het entmateriaal is voorgekweekt. Het voorkweken - anders dan reeds in 2.1. is behandeld - moet worden

nagegaan.

7.1. Voorkweken van de gist.

De groei van Candida lipolytica C.B.S. 599 op, achtereenvolgens, n-hendecaan tot en met n-octadecaan, met entmateriaal voorgekweekt op n-tetradecaan (fig. 37), n-pentadecaan (fig. 39), n-hexadecaan (fig. 38), n-heptadecaan (fig. 40) en op een mengsel van n-hendecaan tot en met n-hexadecaan (fig. 41), is nagegaan. De hoeveelheid entmateriaal is bij de verschillende series verschillend. De series mogen daarom onderling niet zonder meer vergeleken worden. Binnen een serie is de hoeveelheid en de kwaliteit van de entgist dezelfde. De waarden in een serie kunnen wel onderling vergeleken worden. De series zijn meerdere malen herhaald. De gegeven kolommendiagrammen zijn representatief voor de verkregen resultaten. Uit de kolommendiagrammen blijkt :

bij voorkweek op n-tetradecaan en n-hexadecaan

groei op n-tridecaan < groei op n-tetradecaan

groei op n-hexadecaan ≤ groei op n-heptadecaan

bij voorkweek op n-pentadecaan en n-heptadecaan

groei op n-tridecaan > groei op n-tetradecaan

groei op n-hexadecaan > groei op n-heptadecaan

Het maakt verschil of de gist, bij groei op n-hexadecaan, is voorgekweekt op n-hexadecaan of op n-pentadecaan. Het maakt dan waarschijnlijk meer verschil of de gist, bij groei op n-hexadecaan, is voorgekweekt op n-hexadecaan of op een koolhydraat. Daarom is bij elk mengsel de groei nagegaan met entmateriaal voorgekweekt op koolstofcomponent no. 1 en met entmateriaal voorgekweekt op koolstofcomponent no. 2.

7.2. Meetmethode.

Monod maakte, voor het aantonen van diauxie, gebruik van troebelingsmetingen. Gezien de goede resultaten die bij het onderzoek wer-

den verkregen met de drogestofbepaling door titratie (zie 2.3.1.3.), werd nagegaan of de titratiekromme geschikt was voor het aantonen van diauxie. Uit de metingen van Monod blijkt, dat bij het mengsel glucose/galactose diauxie optreedt. De controle op de geschiktheid van de titratiekromme werd daarom uitgevoerd met het mengsel glucose/galactose. Daar echter Candida lipolytica C.B.S. 599 slechts groeit op glucose, werd Candida tropicalis C.B.S. 94 toegepast. De titratiekrommen voor de groei van Candida tropicalis C.B.S. 94 op glucose/galactose, met entmateriaal voorgekweekt op glucose (fig. 42) en met entmateriaal voorgekweekt op galactose (fig. 43), tonen duidelijk het optreden van diauxie. Vergelijking met de titratiekrommen voor de groei op glucose (fig. 44) en de groei op galactose (fig. 45) bewijst, dat onafhankelijk van de koolstofbron waarop de gist is voorgekweekt, steeds eerst glucose wordt aangetast. Uit de vorm van de krommen, vooral uit de vorm van de diauxische lag, blijkt dat de groei op galactose al een aanvang neemt, voordat de glucose geheel verdwenen is. Uit het voorgaande blijkt, dat titratiekrommen geschikt zijn voor het aantonen van diauxie.

7.3. Groei van gisten op mengsels van koolhydraat en koolwaterstof.

De titratiekrommen voor de groei van Candida tropicalis C.B.S. 94 op glucose/n-hexadecaan, respectievelijk met entmateriaal voorgekweekt op glucose (fig. 46) en met entmateriaal voorgekweekt op n-hexadecaan (fig. 47), vertonen eveneens duidelijk diauxie. Bij het ingaan van de diauxische lag werd de hoeveelheid n-alkaan per m³ cultuurvloeistof gaschromatografisch bepaald. Het n-alkaan is, bij het ingaan van de lag, nog in de oorspronkelijke hoeveelheid aanwezig. De lagperiode is veel duidelijker dan bij de krommen van 7.2. Bij voorkweken op n-hexadecaan is de diauxische lagperiode geringer en de groeisnelheid op n-hexadecaan groter dan bij voorkweken op glucose. Hieruit blijkt dat voor Candida tropicalis C.B.S. 94 bij groei op n-hexadecaan, een voorkweek op glucose nadelig is.

De titratiekrommen voor de groei van Candida tropicalis C.B.S. 94

op galactose/n-hexadecaan, respectievelijk met entmateriaal voorgekweekt op galactose (fig. 48) en met entmateriaal voorgekweekt op n-hexadecaan (fig. 49), vertonen eveneens diauxie. De diauxie is veel minder uitgesproken dan bij glucose/n-hexadecaan, zelfs minder dan bij glucose/galactose. Uit fig. 49 blijkt dat de afbraak van het n-hexadecaan (gaschromatografisch bepaald) begint, lang voor het galactose geheel verdwenen is. De volgende afbraakvolgorde blijkt te bestaan

glucose
galactose
n-hexadecaan

onafhankelijk van de koolstofbron waarop de gist is voorgekweekt. De titratiekrommen voor de groei van Candida lipolytica C.B.S. 599 op glucose/n-hexadecaan, respectievelijk met entmateriaal voorgekweekt op glucose (fig. 50) en met entmateriaal voorgekweekt op n-hexadecaan (fig. 51), tonen aan dat er in dit geval nauwelijks diauxie optreedt.

De stelling van Laine (58) dat de lagperiode bij groei op n-alkaan geëlimineerd wordt door voorkweek op koolhydraat, is in zijn algemeenheid onjuist. Bij groei van Candida tropicalis C.B.S. 94 op n-hexadecaan wordt bij voorkweek op galactose de lagperiode vermindert, bij voorkweek op glucose daarentegen de lagperiode vergroot. Bij groei van Candida lipolytica C.B.S. 599 op n-hexadecaan wordt bij voorkweek op glucose de lagperiode geëlimineerd. Voor elke soort moet nagegaan worden, welk koolhydraat het gewenste effect heeft.

7.4. Groei van gisten op mengsels van twee koolwaterstoffen.

De titratiekrommen voor de groei van Candida lipolytica C.B.S. 599 op mengsels van twee n-alkanen vertonen geen diauxie - fig. 52, 53 en 54 -. Dit wil zeggen dat bij mengsels van n-alkanen de gistcel alle aanwezige n-alkanen gelijktijdig aantast, onafhankelijk van het

n-alkaan, waarop het entmateriaal is voorgekweekt.

In tabel 26 is voor enkele proeven het verloop van de hoeveelheid n-alkaan per m^3 cultuurvloeistof (gaschromatografische bepaling) met de tijd gegeven. Uit de getallen blijkt, dat inderdaad de aanwezige n-alkanen gelijktijdig verdwijnen. Hiermee is het bewijs, dat er geen diauxie optreedt bij de groei van Candida lipolytica C.B.S. 599 op mengsels van n-alkanen, rechtstreeks gegeven.

In 6.3. is aangegeven hoe $1/P \text{ dS}/\text{dt}$ bepaald kan worden door in de groeisnelheidsconstante $1/P \text{ dP}/\text{dt}$ de waarde dP/dt te vervangen door het produkt van economische coëfficiënt en dS/dt . De waarde van $1/P \text{ dS}/\text{dt}$ kan echter ook bepaald worden door uit te gaan van de substraatverbruikkromme. Uit de substraatverbruikkromme volgt de waarde van dS/dt . Combinatie van dS/dt en de bijbehorende waarde van P geeft $1/P \text{ dS}/\text{dt}$.

In fig. 55 is de groeikromme voor groei van Candida lipolytica C.B.S. 599 op het mengsel n-pentadecaan/n-hexadecaan gegeven. Het aantal gaschromatografische bepalingen van het n-alkaan is betrekkelijk gering en een rechtstreekse constructie van het $\Delta\text{S}/\text{tijd}$ -diagram daarom onnauwkeurig. Voor de exponentiële groeiperiode is echter $\ln\Delta\text{S}$ recht evenredig met de tijd. Uit het verband $(\ln\Delta\text{S})/\text{tijd}$ kan voor elk tijdstip de waarde van ΔS en de $\Delta\text{S}/\text{tijd}$ -kromme bepaald worden. In fig. 56 is de verbruikkromme voor n-pentadecaan, in fig. 57 de verbruikkromme voor n-hexadecaan geconstrueerd. Op elk tijdstip is nu de waarde van dS/dt voor n-pentadecaan en de waarde van dS/dt voor n-hexadecaan bekend. Daar aangenomen kan worden dat elke cel toevoer krijgt van beide n-alkanen moeten, om $1/P \text{ dS}/\text{dt}$ te verkrijgen, de waarden van dS/dt gecombineerd worden met de totale drogestofconcentratie P. Uit tabel 27 blijkt dat $1/P \text{ dS}/\text{dt}$ per n-alkaan constant is en gelijk aan $0.42 \cdot 10^{-4}/\text{s}$. De totale waarde van $1/P \text{ dS}/\text{dt}$ is dan $0.84 \cdot 10^{-4}/\text{s}$. Dit is volledig in overeenstemming met de waarde genoemd in 6.3. Voor n-dodecaan is de waarde afwijkend : $0.64 \cdot 10^{-4}/\text{s}$. Bij groei op uitsluitend n-dodecaan moet $1/P \text{ dS}/\text{dt}$ tweemaal zo groot zijn : $1.28 \cdot 10^{-4}/\text{s}$. In 6.3. werd gevonden $1.17 \cdot 10^{-4}/\text{s}$, zodat ook voor n-dodecaan de overeenstemming zeer goed is.

7.5. Groei op mengsels van meer dan twee koolwaterstoffen.

Het onderzoek naar de groei op mengsels van meer dan twee koolwaterstoffen is uitgevoerd met gasolie. De ladingsgewijze proeven werden in verschillende stadia van ontparaffinering afgebroken en de olie-fase gaschromatografisch onderzocht. In fig. 5 is een gaschromatogram van de onbehandelde gasolie en in fig. 6 een gaschromatogram van de gedeeltelijk ontparaffineerde gasolie weergegeven. De resultaten zijn opgenomen in tabel 28. Uit de gegevens blijkt, dat alle n-alkanen gelijktijdig en in dezelfde mate verdwijnen, hetgeen volledig in overeenstemming is met hetgeen gevonden werd voor mengsels van alkanen.

SAMENVATTING

In 1963 werd een proces voor de bereiding van een eiwit-vitaminen-concentraat, op basis van groei van micro-organismen op n-alkanen, bekend gemaakt. Door deze publicatie is de belangstelling voor de aantasting van koolwaterstoffen door micro-organismen sterk toegenomen.

Informatie over de stofoverdracht bij groei van micro-organismen op koolwaterstoffen is echter niet beschikbaar. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek had tot doel de grondslagen van de stofoverdracht toe te passen op het genoemde eiwit-vitaminen-concentraat-proces, teneinde de mogelijkheden en de beperkingen van het proces na te gaan.

In hoofdstuk 1 wordt, na een kort overzicht over het onderzoek naar de aantasting van koolwaterstoffen door micro-organismen, het biosynthese proces besproken.

In het volgende hoofdstuk wordt nagegaan, welke micro-organismen toegepast kunnen worden. Als micro-organismen zijn gekozen de gisten Candida lipolytica C.B.S. 599 en Candida tropicalis C.B.S. 94. De keuze wordt toegelicht. De eisen welke de micro-organismen stellen aan substraat en milieu, worden genoemd. De meetmethoden welke in aanmerking komen om de groei kwantitatief te volgen worden besproken, de bruikbaarheid en de nauwkeurigheid proefondervindelijk vastgesteld.

Het ontwerp van het fermentatievat wordt besproken in hoofdstuk 3. De opstelling en de regelinstallaties, noodzakelijk om het proces te realiseren, worden belicht.

Nadat in hoofdstuk 4 is aangegeven hoe de groei mathematisch kan worden beschreven en kort is ingegaan op de reactiekinetiek, wordt in hoofdstuk 5 de stofoverdracht behandeld. Aangetoond wordt, dat de groei van gisten op n-alkanen niet verklaard kan worden met behulp van stofoverdracht via opgelost n-alkaan. Teneinde de groei te verklaren, wordt gebruik gemaakt van de hypothese opgesteld door Johnson : het micro-organisme verblijft aan het olie-water grensvlak, de

lange n-alkaanketens worden een deel van het fosfolipid-micel van het celmembraan en er bestaat een lyofobe weg van de buitenzijde van het celmembraan naar het enzymoppervlak.

In hoofdstuk 6 worden de groeikrommen voor de groei van Candida lipolytica op de verschillende n-alkanen behandeld. Voor de groeisnelheidsconstante worden waarden gevonden van $0.32 \cdot 10^{-4}$ /s tot $0.69 \cdot 10^{-4}$ /s en voor de economische coëfficiënt waarden van 45 - 85 %, afhankelijk van het toegepaste n-alkaan.

Aangetoond wordt, dat de waarde $1/P \cdot dS/dt$, de verbruikte hoeveelheid n-alkaan per tijdseenheid per gewichtseenheid micro-organismen, constant is. $1/P \cdot dS/dt$ heeft echter bij stofoverdracht via opgelost n-alkaan een andere waarde dan bij stofoverdracht door direct contact. Voor lage n-alkaan-concentratie in de olie wordt de n-alkaan-concentratie bepalend voor de groei. Voor hoge gist/olie verhouding wordt het fasegrensvlak bepalend voor de groei. Uitgaande van een bepaalde celrangschikking aan het oppervlak van de oliedruppel kan de diameter van de oliedruppels berekend worden.

In hoofdstuk 7 wordt de groei van Candida tropicalis en Candida lipolytica op koolstofsubstraatmengsels behandeld.

Bij groei van Candida tropicalis op glucose/galactose, op glucose/n-hexadecaan en op galactose/n-hexadecaan trad een diauxische lagperiode op.

Bij groei van Candida lipolytica op glucose/n-hexadecaan was de diauxische lag echter zeer gering en bij groei op mengsels van n-alkanen niet meer aantoonbaar.

SUMMARY

The utilization of various hydrocarbons by microorganisms has recently received a good deal of attention. It has been suggested that petroleum might serve as a raw material for the biosynthesis of edible products, at least animal feed supplements. A process for the production of a protein-vitamin concentrate has been reported. In this process microorganisms were grown on crude petroleum fractions. The growth of microorganisms on hydrocarbon substrates has not been thoroughly studied in terms of mass transfer. The purpose of this investigation has been to apply the principles of mass transfer to the biochemical process involved, in order to gain insight into the possibilities and limitations of the process.

Chapter 1 deals with the process proper.

In Chapter 2 the limitations of enrichment-culture techniques are discussed. For the study use was made of culture-collection strains. Candida undoubtedly are the one group of yeasts best recognized in respect to the capacity to utilize n-alkanes. Screening of Candida species showed that Candida lipolytica C.B.S. 599 and Candida tropicalis C.B.S. 94 were usable. Both Candida lipolytica and Candida tropicalis did not grow on unsupplemented mineral salts/n-alkane media. It was shown that on a mineral salts/n-alkane medium, fortified with yeast extract, adaptation could be accomplished within 24 hours after transfer from a carbohydrate to a hydrocarbon medium.

n-Alkanes ranging from n-hendecane (C_{11}) through n-nonadecane (C_{19}), dissolved in liquid paraffin, were used. The liquid paraffin did not support growth. No evidence of co-oxidation was detected.

Cell concentration was measured by drying and by determining sedimentation height in a hematocrit tube, n-alkane concentration by gaschromatography and refractive index. Before measuring, all samples were treated with Teepol. Growth was followed by measuring the amount of base as a function of time.

A short description of shake flask, fermentation vessel and set-up

- including the pH, temperature and oxygen control systems - is given in Chapter 3.

The growth of microorganisms and the reaction kinetics are dealt with in Chapter 4.

In Chapter 5 the principles of mass transfer are applied to the growth of cells on n-alkanes. It is clearly shown that transfer of dissolved n-alkane cannot explain the growth of yeasts. The hypothesis of Johnson is used. The organism attaches itself to a droplet of alkane and the long alkane chains become a part of the phospholipid micelle of the cell membrane. There exists a lyophobic pathway from the outside of the cell membrane to the locus of the enzyme responsible for the primary attack on the hydrocarbon.

When growing on n-hendecane and n-dodecane the n-alkane is transferred through dissolution and through the Johnson direct contact mechanism.

When growing on n-tridecane and higher n-alkanes the n-alkane is transferred through direct contact only.

In Chapter 6 growth curves for n-alkane - grown cells on n-alkanes are given. Growth rate constants of $0.32 \cdot 10^{-4}/s$ - $0.69 \cdot 10^{-4}/s$ were found during the exponential growth phase. Cell yields were 45 - 85% based on n-paraffin utilization, weight conversion basis.

When using lower alkanes (C_{11} - C_{12}) the n-alkane consumption was corrected for evaporation.

The specific rate of n-alkane consumption - $1/P \, dS/dt$ - was shown to be constant. The values for mass transfer through dissolved n-alkane and for mass transfer through direct contact differed. The culture appeared to exhibit minimum growth in the C_{13} - C_{14} range. This minimum is explained.

For low n-alkane concentrations in the oil the n-alkane concentration became rate-limiting.

For high yeast/oil ratios the interphase area became rate-limiting. By assuming a certain cell-configuration the diameter of the oil-drops could be calculated.

In Chapter 7 growth on mixtures of carbon sources is shown. Growth of Candida tropicalis on a glucose/galactose mixture showed diauxic

(diphasic) lag, both with glucose-grown and galactose-grown cells. On a glucose/n-hexadecane mixture the diauxic lag was very pronounced.

Growth of Candida lipolytica on glucose/n-hexadecane showed hardly any diauxic lag. On n-alkane mixtures no trace of diauxic lag was found.

TABELLEN

Tabel 1. Het voorkweken van gisten op koolwaterstoffen.

Fermentatievat	: schudkolf
Micro-organismen	: <u>Candida tropicalis</u> C.B.S. 94 <u>Candida lipolytica</u> C.B.S. 599
Koolwaterstof	: n-hexadecaan 8 kg/m ³ cultuurvloeistof.
Eerste enting	: vanaf schuine buis agar.
Tijd tussen overentingen	: 24 uur.

Micro-organisme	<u>C. trop.</u>	<u>C. lip.</u>	<u>C. trop.</u>	<u>C. lip.</u>
Hoeveelheid entvloeistof	2 ml	2 ml	1/4 ml	1/4 ml
kg drogestof per m ³ ,	3.29	3.16	2.51	2.64
na 24 uur	3.38	3.55	2.63	2.58
	3.31	3.46	2.62	2.65
	3.35	-	2.65	2.77
	3.13	3.22	2.58	2.72
	3.19	-	2.67	2.76
	3.30	3.78	2.70	2.71
	3.09	3.43	2.76	2.53
		3.46	2.71	
		3.39	2.65	
		3.46		
		3.57		
		3.56		
		3.57		

Tabel 2. Onderzoek gistsoorten.

Fermentatievat : schudkolf.

Koolwaterstof : n-hexadecaan, 8 kg/m³ cultuurvloeistof.

<u>Candida lipolytica</u> C.B.S. 599	- groei goed
<u>Candida lipolytica</u> N.C.Y.C. 153	- groei slecht
<u>Candida tropicalis</u> C.B.S. 94	- groei goed
<u>Candida tropicalis</u> N.C.Y.C. 4	- groei goed
<u>Candida intermedia</u> C.B.S. 572	- groei goed
<u>Candida intermedia</u> N.R.R.L. - Y 6328-1	- groei goed
<u>Candida utilis</u> N.C.Y.C. 193	- groei matig
<u>Candida utilis</u> N.C.Y.C. 321	- groei matig
<u>Candida guilliermondi</u> N.C.Y.C. 145	- groei goed
<u>Candida rugosa</u> N.C.Y.C. 130	- groei goed
<u>Candida pulcherrima</u> C.B.S. 610	- groei goed
<u>Candida reukauffii</u> C.B.S. 1903	- groei matig

Tabel 3. Invloed gehalte gistextract.

Fermentatievat : schudkolf.
 Micro-organisme : Candida tropicalis C.B.S. 94.
 Koolwaterstof : n-hexadecaan 8 kg/m³ cultuurvloeistof.
 Tijd tussen overentingen : 24 uur.
 Hoeveelheid enting : 1/4 ml

Gistextract	Droge stof in kg/m ³						
	%	begin	eind	begin	eind	begin	eind
0	0.01	0.78	0.003	0.21	0.001	-	
0.002	0.01	2.05	0.008	1.94	0.008	2.26	
0.004	0.01	2.53	0.011	1.89	0.008	1.76	
0.008	0.01	2.48	0.011	2.63	0.011	2.50	
0.02	0.01	2.58	0.011	2.41	0.010	2.52	
0.04	0.01	2.20	0.009	3.00	0.013	2.80	
0.08	0.01	1.98	0.008	2.56	0.011	2.55	

Tabel 4. Invloed toevoeging groeistoffen.

Fermentatievat : schudkolf.
 Micro-organisme : Candida intermedia C.B.S. 572.
 Koolwaterstof : n-hexadecaan 8 kg/m³ cultuurvloeistof.

Tijd (uren) na aanvang proef.	Drogestof in kg/m ³ .			
	A	B	C	D
0	0.02	0.02	0.02	0.02
17	-	0.02	0.18	0.03
26	-	0.05	2.30	0.07
42	-	1.10	2.80	1.90
49.5	-	2.05	3.15	2.10
67	-	3.00	3.35	3.00
70	0.05	3.45	3.50	3.40

A = zonder groeistoffen.

B = 8 mg biotine per m³.

C = 0.2 kg gistextract (Difco) per m³.

D = vitamine-toevoeging volgens Ter - Karapetyan.

Tabel 5. Groei van gisten met en zonder toevoeging van het schuim-
bestrijdingsmiddel Antifoam-C (Dow Corning).

Fermentatievat : schudkolf.
 Micro-organisme : Candida tropicalis C.B.S. 94.
 Koolwaterstof : n-hexadecaan 8 kg/m³ cultuurvloeistof.

Tijd (uren) na aanvang proef	Droge stof kg/m ³ geen Antifoam-C	Tijd (uren) na aanvang proef	Droge stof kg/m ³ Antifoam-C 30 p.p.m.
0	0.04	0	0.04
19	1.30	17	1.52
22	2.02	21	2.33
24	2.20	24	2.87
42	1.20	40	3.18
45	1.35	43	3.21
48	1.30	45	2.97
		48	2.85
		69	2.90

Eindconcentratie zonder Antifoam - vloeistof 1.30 kg/m³
 schuim 1.27 kg/m³ } 2.57 kg/m³
 met Antifoam 2.90 kg/m³

Tabel 6. Invloed concentratie Antifoam-C (Dow Corning).

Fermentatievat	: schudkolf.
Micro-organisme	: <u>Candida tropicalis</u> C.B.S. 94.
Koolwaterstof	: n-hexadecaan 8 kg/m ³ cultuurvloeistof.
Duur van de proef	: 24 uur.
Enting	: 0.013 kg/m ³ .
Antifoam-C (p.p.m.)	Droge stof (kg/m ³)
30	2.83
60	3.03
120	2.61
240	3.19
383	3.11
617	3.40

Tabel 7. Groei van gist op pristane en vloeibare paraffine.

Fermentatievat	: schudkolf.
Micro-organisme	: <u>Candida lipolytica</u> C.B.S. 599.
Koolwaterstof	: pristane, vloeibare paraffine (lichte fractie), vloeibare paraffine (zware fractie).
Koolhydraat	: glucose.
Duur van de proef	: 20 uur.
Enting	: 0.03 kg/m ³ .

pristane	dr. stof	pristane +	glucose	dr. stof
kg/m ³	kg/m ³	kg/m ³	kg/m ³	kg/m ³
8	0.20	8	10	4.2
16	0.28	16	10	4.2
24	0.32	24	10	4.4

vl. par.	dr. stof	vl. par. +	glucose	dr. stof
licht		licht		
kg/m ³	kg/m ³	kg/m ³	kg/m ³	kg/m ³
8	0.17	8	10	4.2
16	0.30	16	10	4.3
24	0.33	24	10	4.1

vl. par.	dr. stof	vl. par. +	glucose	dr. stof
zwaar		zwaar		
kg/m ³	kg/m ³	kg/m ³	kg/m ³	kg/m ³
8	-	8	10	4.2
16	0.09	16	10	4.3
24	0.13	24	10	4.2

Tabel 8. Verband droge stof en hoeveelheid loog getriteerd.
Economische coëfficiënt.

Fermentatievat : volgens 3.2.
Micro-organisme : Candida lipolytica C.B.S. 599.
Koolwaterstof : n-hexadecaan.

Droge stof	NH ₄ OH (2.875 N)	n-Hexadecaan	Economische coëfficiënt
kg	ml	kg	
-	44.28	18.55	-
8.93	20.26	9.20	0.97
9.05	25.91	11.50	0.79
10.27	25.57	10.63	0.97
10.18	29.78	12.69	0.80
13.98	44.57	17.53	0.80
18.73	52.88	21.59	0.87
-	25.34	9.34	-
10.82	29.35	13.47	0.80
2.63	9.76	4.42	0.60
5.95	17.29	8.08	0.74
10.66	32.32	13.93	0.77
6.04	22.46	9.21	0.66
-	7.77	3.07	-
-	27.52	11.50	-
8.86	29.31	11.74	0.76
1.46	2.90	1.59	0.92
2.43	2.34	5.73	1.04
-	15.95	6.68	-
1.48	5.18	2.19	0.68
-	7.50	3.21	-
-	12.62	5.63	-
-	2.67	1.37	-
-	4.11	1.74	-
8.58	24.69	-	-
6.29	17.25	-	-

Tabel 8. (vervolg)

Droge stof	NH ₄ OH (2.875 N)	n-Hexadecaan	Economische coëfficiënt
kg	ml	kg	
17.81	56.98	-	-
1.48	4.70	-	-
2.49	10.57	-	-
0.93	3.40	-	-

Tabel 9. Verhouding specifiek oppervlakken.

Gaschromatograaf : F en M, model 500.
 Brugstroom : 130 m A.
 Temperatuur : n-dodecaan - n-tetradecaan 160° C
 n-tridecaan - n-tetradecaan 160° C
 n-pentadecaan - n-tetradecaan 200° C
 n-hexadecaan - n-tetradecaan 200° C
 Oplosmiddel : toluen.

n-tridecaan/n-tetradecaan		n-pentadecaan/n-tetradecaan	
Gewichts- verhouding	Verhouding spec.opp.en	Gewichts- verhouding	Verhouding spec.opp.en
0.990	1.033	0.477	0.984
	1.017		0.975
	1.019		0.967
	1.027		0.973
	1.031		0.964
1.830	1.024	0.929	0.977
	1.035		0.982
	1.031		0.981
	1.033		0.980
	1.020		0.975
0.513	1.037	2.692	0.965
	1.041		0.980
	1.047		0.967
	1.057		0.976
	1.037		0.984
gemiddeld stand.	1.033	gemiddeld stand.	0.975
deviatie	0.010	deviatie	0.007

Tabel 9. (vervolg)

Overzicht. Basis : specifiek opp. n-tetradecaan = 1

n-dodecaan	spec. opp. 1.08
n-tridecaan	1.03
n-tetradecaan	1
n-pentadecaan	0.98
n-hexadecaan	0.94

Tabel 10. Bepaling alkaangehalte door monsternamen en extractie.

Gaschromatograaf	: F en M, model 500.
Brugstroom	: 130 m A.
Temperatuur	: 200 ^o C.
Monster	: n-hexadecaan in cultuurvloeistof.
Extractie vloeistof	: toluen.
Inwendige standaard	: n-tetradecaan (opgenomen in toluen).

Gewicht		n-tetradecaan	verhouding	n-hexadecaan	
gr.		gew. %	piek opper-	gew. %	
monster	extractie	in toluen	vlakken +)	gemeten	ingewogen
vloeistof					
4.889	4.597	5.000	1.042	4.79	4.79
4.792	4.638	5.000	1.072	4.79	4.79
4.371	4.614	1.000	0.815	1.37	1.34
4.353	6.004	1.000	1.066	1.37	1.34
4.238	4.790	1.000	0.938	1.28	1.34
3.972	4.628	1.000	0.958	1.29	1.34

+) gemiddelde van 5 gaschromatografische bepalingen.

Tabel 11. Invloed van de keerschotten en de afdichting van de schud-
kolf op de gistgroei.

Fermentatievat	: schudkolf.
Micro-organisme	: <u>Candida tropicalis</u> C.B.S. 94.
Koolwaterstof	: n-hexadecaan, 8 kg/m ³ cultuurvloeistof.
Enting	: 0.014 kg/m ³ .
Duur van de proef	: 24 uur.

Afdichting	Droge stof (kg/m ³)		Droge stof (kg/m ³)	
	met keerschot		zonder keerschot	
één laag verbandgaas	3.18	3.14	0.17	0.24
vier lagen verbandgaas	3.14	2.99	0.50	0.16
laag vette watten	3.01	2.90	0.29	0.24
vette watten prop	3.08	3.18	0.21	0.28

Tabel 12. Invloed van de luchttoevoer.

Fermentatievat	: volgens 3.2.
Micro-organisme	: <u>Candida lipolytica</u> C.B.S. 599.
Werkwijze	: continu.
Toevoer Miller medium	: $0.024 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$.
Toevoer olie	: $0.0012 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$.
Oliesamenstelling	: 50 (gew.) % n-hexadecaan. 50 (gew.) % inerte olie.
Toerental	: 33.3/s

Luchttoevoer		Instelling gedurende (uur)	Droge stof (gemiddeld) kg/m ³	Partieel span-
m ³ /s	vol/vol/min.			ning opgeloste zuurstof (30°C) mm Hg
$7.0 \cdot 10^{-6}$	0.65	24	14.5	70
$5.4 \cdot 10^{-6}$	0.50	24	14.2	52
$3.7 \cdot 10^{-6}$	0.34	24	14.4	36

Tabel 13. Stofoverdracht via opgelost n-alkaan.

Fermentatievat : volgens 3.2.
 Micro-organisme : Candida lipolytica C.B.S. 599.

Koolwaterstof	n-hendecaan	n-dodecaan	eenheden
Bij aanvang			
Oliebelasting	$56 \cdot 10^{-3}$	$39 \cdot 10^{-3}$	m^3/m^3
Oliesamenstelling	50	50	gew.% n-alkaan
	50	50	gew.% inerte olie
Toerental	26.7	23.3	l/s
Diameter druppels ⁺	$14.3 \cdot 10^{-6}$	$15.4 \cdot 10^{-6}$	m
Verzadigingsconc.	$3.3 \cdot 10^{-5}$	$1.0 \cdot 10^{-5}$	kg/m^3
Diffusie coëfficiënt	$0.68 \cdot 10^{-9}$	$0.65 \cdot 10^{-9}$	m^2/s
Voor P = 2.5 kg/m^3			
Groecurve	Fig. 18	Fig. 20	
Economische coëfficiënt	0.48	0.50	
Droge stof conc. P	2.5	2.5	kg/m^3
Oliebelasting	$49.2 \cdot 10^{-3}$	$32.5 \cdot 10^{-3}$	m^3/m^3
Specifiek oppervlak	$20.6 \cdot 10^3$	$12.7 \cdot 10^3$	m^3/m^3
dS/dt berekend vlg. <u>26</u>	$3.3 \cdot 10^{-5}$	$0.7 \cdot 10^{-5}$	$kg/m^3 \cdot s$
dS/dt berekend vlg. <u>28</u>	$4.1 \cdot 10^{-5}$	$0.7 \cdot 10^{-5}$	$kg/m^3 \cdot s$
dS/dt gemeten	$29.5 \cdot 10^{-5}$	$25.4 \cdot 10^{-5}$	$kg/m^3 \cdot s$

⁺ volgens 6.5.

Tabel 14 . Stofoverdracht via opgelost n-alkaan.

Fermentatievat : volgens 3.2.
 Micro-organisme : Candida lipolytica C.B.S. 599.

Koolwaterstof	n-tridecaan	n-hexadecaan	eenheden
Bij aanvang			
Oliebelasting	29 10^{-3}	51 10^{-3}	m^3/m^3
Oliesamenstelling	54	50	gew.% n-alkaan
	46	50	gew.% inerte olie
Toerental	23.3	20.0	1/s
Diameter druppels ⁺	15.4 10^{-6}	16.8 10^{-6}	m
Verzadigingsconc.	3.2 10^{-6}	7.7 10^{-8}	kg/ m^3
Diffusie coëfficiënt	0.62 10^{-9}	0.56 10^{-9}	m^2/s
Voor P = 2.5 kg/ m^3			
Groeicurve	Fig. 13	Fig. 14	
Economische coëfficiënt	0.52	0.83	
Droge stof conc. P	2.5	2.5	kg/ m^3
Oliebelasting	22.8 10^{-3}	47.1 10^{-3}	m^3/m^3
Specifiek oppervlak	8.9 10^3	16.8 10^3	m^3/m^3
dS/dt berekend vlg. <u>26</u>	0.16 10^{-5}	0.005 10^{-5}	kg/ m^3 s
dS/dt berekend vlg. <u>28</u>	0.15 10^{-5}	0.006 10^{-5}	kg/ m^3 s
dS/dt gemeten	23.5 10^{-5}	21.0 10^{-5}	kg/ m^3 s

⁺ volgens 6.5.

Tabel 15. Groeisnelheid en groeisnelheidsconstante, bij groei op n-hendecaan, met stofoverdracht door gasabsorptie.

Fermentatievat : volgens 3.2.
 Micro-organisme : Candida lipolytica C.B.S. 599.

toerental	$(dP/dt)_{ln.}$	$(dP/dt)_{max.}$	$1/P \ dP/dt$	$(P)_{ln.}$	oplosbaarheid n-hendecaan
1/s	kg/m ³ s	kg/m ³ s	1/s	kg/m ³	kg/m ³
30.0	$1.74 \cdot 10^{-4}$	$1.74 \cdot 10^{-4}$	$0.58 \cdot 10^{-4}$	3.00	$3.24 \cdot 10^{-5}$
30.0			$0.59 \cdot 10^{-4}$		
			<hr/>		
			$1/P \ dP/dt$		
			$0.59 \cdot 10^{-4}$		

Tabel 16. Groeisnelheid en groeisnelheidsconstante, bij groei op n-dodecaan, met stofoverdracht door gasabsorptie.

Fermentatievat : volgens 3.2.
 Micro-organisme : Candida lipolytica C.B.S. 599.

toerental	$(dP/dt)_{ln.}$	$(dP/dt)_{max.}$	$1/P \ dP/dt$	$(P)_{ln.}$	oplosbaarheid n-dodecaan
1/s	kg/m ³ s	kg/m ³ s	1/s	kg/m ³	kg/m ³
30.0	$0.55 \cdot 10^{-4}$	$0.55 \cdot 10^{-4}$	$0.55 \cdot 10^{-4}$	1.00	$1.00 \cdot 10^{-5}$
30.0			0.57 "		
30.0			0.56 "		
			<hr/>		
			$1/P \ dP/dt$		
			$0.56 \cdot 10^{-4}$		

Tabel 17. Groeisnelheidsconstante bij groei op n-tridecaan en hogere n-alkanen.

Fermentatievat	: volgens 3.2.
Micro-organisme	: <u>Candida lipolytica</u> C.B.S. 599.
Oliebelasting	: 0.03 m ³ /m ³ tot 0.05 m ³ /m ³
Oliesamenstelling	: 50 (gew.) % n-alkaan. 50 (gew.) % inerte olie.

Voor de metingen, gemerkt * is de oliebelasting 0.0125 m³/m³ en kan de oliesamenstelling afwijkend zijn.

n-tridecaan		n-tetradecaan		n-pentadecaan	
toerental	1/P dP/dt	toerental	1/P dP/dt	toerental	1/P dP/dt
1/s	1/s	1/s	1/s	1/s	1/s
23.3	0.45 10 ⁻⁴	26.7	0.49 10 ⁻⁴	26.7	0.53 10 ⁻⁴
23.3	0.43 "	26.7	0.47 "	26.7	0.59 "
23.3	0.44 "				
	-----		-----		-----
	1/P dP/dt		1/P dP/dt		1/P dP/dt
	0.44 10 ⁻⁴		0.48 10 ⁻⁴		0.56 10 ⁻⁴

n-hexadecaan		n-heptadecaan		n-octadecaan	
toerental	1/P dP/dt	toerental	1/P dP/dt	toerental	1/P dP/dt
1/s	1/s	1/s	1/s	1/s	1/s
16.8	0.62 10 ⁻⁴	26.7	0.69 10 ⁻⁴	26.7	0.71 10 ⁻⁴
20.0	0.70 "	26.7	0.65 "	26.7	0.66 "
30.0	0.71 "				
15.5	0.65 " *				
16.3	0.69 " *				
16.7	0.66 " *				
16.7	0.69 " *				

Tabel 17. (vervolg)

n-hexadecaan		n-heptadecaan		n-octadecaan	
toerental	1/P dP/dt	toerental	1/P dP/dt	toerental	1/P dP/dt
1/s	1/s	1/s	1/s	1/s	1/s
17.2	0.67	"	*		
17.2	0.67	"	*		
21.6	0.66	"	*		
27.5	0.65	"	*		
26.7	0.66	"			
26.7	0.69	"			
26.7	0.70	"			
26,7	0.61	"			
26.7	0.67	"			
<hr/>		<hr/>		<hr/>	
	1/P dP/dt		1/P dP/dt		1/P dP/dt
	0.67 10 ⁻⁴		0.67 10 ⁻⁴		0.69 10 ⁻⁴

Tabel 18. Economische coëfficiënt.

	kg droge stof gevormd
e.c. =	<u>kg n-alkaan verbruikt</u>
n-hendecaan	0.45
n-dodecaan	0.48
n-tridecaan	0.50
n-tetradecaan	0.56
n-pentadecaan	0.65
n-hexadecaan	0.81
n-heptadecaan	0.80
n-octadecaan	0.85

Tabel 19. Groeisnelheid en groeisnelheidsconstante, bij groei op vloeibaar n-hendecaan.

Fermentatievat : volgens 3.2.
 Micro-organisme : Candida lipolytica C.B.S. 599.
 Oliebelasting : 0.056 m³/m³
 Oliesamenstelling : 50 (gew.) % n-hendecaan.
 50 (gew.) % inerte olie.

toerental 1/s	(dP/dt) _{1n} kg/m ³ s	(dP/dt) _{max} kg/m ³ s	1/P dP/dt 1/s	(P) _{1n} kg/m ³	(P) _{bm} kg/m ³	(dS/dt) _{1n} kg/m ³ s
16.7	0.60 10 ⁻⁴	-	0.52 10 ⁻⁴	1.14	-	1.33 10 ⁻⁴
20.0	0.89 "	2.00 10 ⁻⁴	0.55 "	1.62	4.8	1.98 "
23.3	1.06 "	2.44 "	0.53 "	2.00	5.4	2.35 "
26.7	1.33 "	2.28 "	0.54 "	2.46	5.6	2.95 "
30.0	1.47 "	3.00 "	0.52 "	2.83	6.2	3.27 "
33.3	1.82 "	-	0.56 "	3.25	-	4.04 "
20.0	-	-	0.51 "	-	-	-
20.0	-	-	0.51 "	-	-	-

1/P dP/dt	Stand. deviatie
0.53 10 ⁻⁴	0.02 10 ⁻⁴

Tabel 20. Groeisnelheidsconstante bij groei op vloeibaar n-dodecaan.

Fermentatievat	: volgens 3.2.
Micro-organisme	: <u>Candida lipolytica</u> C.B.S. 599.
Oliebelasting	: $0.039 \text{ m}^3/\text{m}^3$
Oliesamenstelling	: 50 (gew.)% n-dodecaan. 50 (gew.)% inerte olie.

toerental	$1/P \text{ dP}/\text{dt}$		
$1/\text{s}$	$1/\text{s}$		
20.0	$0.51 \cdot 10^{-4}$		
20.0	0.51 "		
20.0	0.54 "		
20.0	0.47 "		
23.3	0.49 "		
23.3	0.51 "		
23.3	0.52 "	$1/P \text{ dP}/\text{dt}$	Stand. dev.
23.3	0.48 "	$0.51 \cdot 10^{-4}$	$0.02 \cdot 10^{-4}$
23.3	0.52 "		
23.3	0.51 "		

Tabel 21. Groeisnelheidsconstante voor groei op n-hendecaan en n-dodecaan, bij laag toerental.

Fermentatievat	: volgens 3.2.
Micro-organisme	: <u>Candida lipolytica</u> C.B.S. 599.
Oliebelasting	: $0.05 \text{ m}^3/\text{m}^3$.
Oliesamenstelling	: 50 (gew.) % n-alkaan. 50 (gew.) % inerte olie.

n-hendecaan		n-dodecaan	
toerental	$1/P \text{ dP/dt}$	toerental	$1/P \text{ dP/dt}$
$1/s$	$1/s$	$1/s$	$1/s$
15	$0.32 \cdot 10^{-4}$	15	$0.37 \cdot 10^{-4}$
15	0.32 "	15	0.40 "
			0.36 "
			0.36 "
	<hr/>		<hr/>
	$1/P \text{ dP/dt}$		$1/P \text{ dP/dt}$
	$0.32 \cdot 10^{-4}$		$0.37 \cdot 10^{-4}$

Tabel 22. Overzicht groeisnelheidsconstante $1/P \text{ dP/dt}$ (1/s) en stofstroomdichtheid $1/P \text{ dS/dt}$ (kg/kg s) bij groei op n-alkanen

	Groei door direct contact		Groei via opgelost n-alkaan	
	$1/P \text{ dP/dt}$	$1/P \text{ dS/dt}$	$1/P \text{ dP/dt}$	$1/P \text{ dS/dt}$
n-hendecaan	$0.32 \cdot 10^{-4}$	$0.72 \cdot 10^{-4}$	$0.59 \cdot 10^{-4}$	$1.31 \cdot 10^{-4}$
n-dodecaan	0.37 "	0.78 "	0.56 "	1.17 "
n-tridecaan	0.44 "	0.89 "		
n-tetradecaan	0.48 "	0.86 "		
n-pentadecaan	0.56 "	0.86 "		
n-hexadecaan	0.67 "	0.83 "		
n-heptadecaan	0.67 "	0.83 "		
n-octadecaan	0.69 "	0.81 "		

Tabel 23. Stofstroomdichtheid (kg/kg s) als functie van de concentratie van het n-alkaan in de olie.

Fermentatievat : volgens 3.2.
 Micro-organisme : Candida lipolytica C.B.S. 599.
 Toerental (1/s) : 26.7
 Oliebelasting bij aanvang : 0.05 m³/m³.

n-tridecaan			n-hexadecaan			n-nonadecaan		
1/P	dS/dt	C ^o	1/P	dS/dt	C ^o	1/P	dS/dt	C ^o
kg/kg s		kg/m ³	kg/kg s		kg/m ³	kg/kg s		kg/m ³
0.81	10 ⁻⁴	132	0.75	10 ⁻⁴	260	0.68	10 ⁻⁴	150
0.77	"	121	0.84	"	228	0.58	"	131
0.67	"	112	0.75	"	190	0.59	"	121
0.70	"	105	0.75	"	147	0.59	"	107
0.63	"	98	0.64	"	111	0.49	"	94
0.58	"	88	0.48	"	63	0.44	"	80
0.61	"	77	0.30	"	34	0.46	"	67
0.59	"	64	0.21	"	16	0.43	"	51
0.54	"	55				0.32	"	35
0.47	"	48				0.25	"	19
0.45	"	39						
0.40	"	29						
0.31	"	26						
0.32	"	20						
0.26	"	17						
0.19	"	9						

Tabel 24. Waarden van K_s en $(1/P \, dS/dt)_{\max.}$, bepaald volgens de methode der kleinste kwadraten.

	K_s (kg/m ³ olie)	$(1/P \, dS/dt)_{\max.}$ 1/s
n-tridecaan	48	1.00 10 ⁻⁴
n-hexadecaan	75	1.06 "
n-nonadecaan	56	0.86 "

Tabel 25. Oppervlakte-limitering bij constant toerental.

Fermentatievat	: volgens 3.2.	
Micro-organisme	: <u>Candida lipolytica</u> C.B.S. 599.	
Koolwaterstof	: n-hexadecaan.	
Toerental (1/s)	17.2	17.2
Oliebelasting bij aanvang (m^3/m^3)	$10 \cdot 10^{-3}$	$20 \cdot 10^{-3}$
Alkaangehalte olie bij aanvang (gew.)%	80	50
Oliebelasting bij volledige oppervlak- te bezetting (m^3/m^3)	$6.73 \cdot 10^{-3}$	$12.94 \cdot 10^{-3}$
Droge stof concentratie bij volledige oppervlakte bezetting (kg/m^3)	2.86	5.24
(1/P dP/dt) max. (1/s)	$0.67 \cdot 10^{-4}$	$0.67 \cdot 10^{-4}$
" (1/uur)	0.24	0.24
(dP/dt) max. ($kg/m^3 \cdot s$)	$1.9 \cdot 10^{-4}$	$3.5 \cdot 10^{-4}$
Gist/olie bij volledige oppervlakte bezetting ($kg \text{ droge-stof}/m^3 \text{ olie}$)	$0.40 \cdot 10^3$	$0.42 \cdot 10^3$

Tabel 26. Het n-alkaan verbruik bij groei van gisten op n-alkaan mengsels.

Fermentatievat	: volgens 3.2.
Micro-organisme	: <u>Candida lipolytica</u> C.B.S. 599.
Toerental	: 33.3/s
Oliebelasting	: 0.04 m ³ /m ³ .
Mengsel	: n-pentadecaan (40 gew. %), n-hexadecaan (40 gew. %), vloeibare paraffine (20 gew. %).

Enting aangepast aan n-hexadecaan.

Tijd na

enten (uren)	n-pentadecaan verbruikt kg/m ³ cultuurvloeistof	n-hexadecaan verbruikt kg/m ³ cultuurvloeistof	verhouding
18.00	1.1	1.0	1.10
21.00	2.1	2.1	1.00
23.00	3.4	3.7	0.92
24.30	4.6	5.0	0.92

Mengsel	: n-heptadecaan (40 gew. %), n-hexadecaan (40 gew. %), vloeibare paraffine (20 gew. %).
---------	---

Enting aangepast aan n-hexadecaan.

Tijd na

enten (uren)	n-heptadecaan verbruikt kg/m ³ cultuurvloeistof	n-hexadecaan verbruikt kg/m ³ cultuurvloeistof	verhouding
18.00	4.9	4.7	1.04
20.00	7.7	7.7	1.00
21.30	10.9	10.7	1.02

Mengsel	: n-tridecaan (40 gew. %), n-hexadecaan (40 gew. %), vloeibare paraffine (20 gew. %).
---------	---

Tabel 26. (vervolg)

Enting aangepast aan n-hexadecaan.

Tijd na

enten	n-tridecaan verbruikt	n-hexadecaan verbruikt	
(uren)	kg/m ³ cultuurvloeistof	kg/m ³ cultuurvloeistof	verhouding
20.00	1.6	1.6	1.00
23.00	3.0	2.9	1.03
25.00	4.5	4.4	1.02

Tabel 27. Waarden van $1/P \text{ dS/dt}$ (kg/kg s) bij groei van gisten op n-alkaan-mengseis.

Fermentatievat : Volgens 3.2.
 Micro-organisme : Candida lipolytica C.B.S. 599.
 Toerental : 33.3/s
 Oliebelasting : $0.04 \text{ m}^3/\text{m}^3$.

Mengsel	Enting voorge- kweekt op	$1/P \text{ dS/dt}$ kg/kg s
n-hexadecaan 40%	n-hexadecaan	n-hexadecaan
n-heptadecaan 40%		$0.43 \cdot 10^{-4}$
vl. paraffine 20%		n-heptadecaan $0.45 \cdot 10^{-4}$
n-hexadecaan 40%	n-hexadecaan	n-hexadecaan
n-pentadecaan 40%		$0.45 \cdot 10^{-4}$
vl. paraffine 20%		n-pentadecaan $0.41 \cdot 10^{-4}$
n-hexadecaan 40%	n-tetradecaan	n-hexadecaan
n-tetradecaan 40%		$0.43 \cdot 10^{-4}$
vl. paraffine 20%		n-tetradecaan $0.45 \cdot 10^{-4}$
n-hexadecaan 40%	n-hexadecaan	n-hexadecaan
n-tridecaan 40%		$0.42 \cdot 10^{-4}$
vl. paraffine 20%		n-tridecaan $0.43 \cdot 10^{-4}$
n-hexadecaan 40%	n-dodecaan	n-hexadecaan
n-dodecaan 40%		$0.44 \cdot 10^{-4}$
vl. paraffine 20%		n-dodecaan $0.64 \cdot 10^{-4}$

Tabel 28. Percentage n-alkaan in een behandelde Kuwait zware gasolie.

	Origineel	In verschillende stadia van ontparaffinering.						
n-decaan	0.11	0.03	0.04	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02
n-hendecaan	0.14	0.07	0.06	0.05	0.05	0.03	0.02	0.03
n-dodecaan	0.28	0.19	0.16	0.12	0.12	0.06	0.06	0.06
n-tridecaan	0.99	0.70	0.57	0.45	0.48	0.24	0.27	0.31
n-tetradecaan	1.78	1.38	1.09	0.80	0.82	0.41	0.43	0.52
n-pentadecaan	2.37	1.81	1.14	0.83	0.87	0.41	0.42	0.41
n-hexadecaan	2.10	1.65	0.91	0.79	0.62	0.33	0.33	0.31
n-heptadecaan	1.97	1.51	0.76	0.66	0.46	0.37	0.26	0.20
n-octadecaan	1.49	1.07	0.48	0.54	0.35	0.36	0.24	0.15
n-nonadecaan	1.41	1.02	0.43	0.50	0.30	0.27	0.14	0.10
n-docosaan	1.14	0.77	0.38	0.42	0.33	0.19	0.16	0.17
totaal	13.78	10.20	6.02	5.21	4.45	2.69	2.35	2.28

APPENDIX

Appendix 1. Oplosbaarheid van n-alkanen in water.

McAuliffe (82) heeft de oplosbaarheid van n-pentaaan, n-hexaan, n-heptaan en n-octaan in water gemeten. Lindenberg (191) heeft vastgesteld dat vanaf n-pentaaan de logaritme van de oplosbaarheid recht evenredig is met het molaire volume van de koolwaterstoffen. Met behulp van de stelling van Lindenberg kan dus door extrapolatie de oplosbaarheid van hogere n-alkanen gevonden worden.

Johnson (84) heeft op deze wijze de oplosbaarheid van de hogere n-alkanen bepaald - fig. 58 -. De extrapolatie van n-pentaaan/n-octaan naar bijv. n-hexadecaan is gewaagd en de, door deze extrapolatie verkregen, waarden zijn onbetrouwbaar.

Bij het bepalen van de oplosbaarheid van de n-alkanen is er daarom van uitgegaan, dat in benadering de oplosbaarheid in water recht evenredig is met de dampspanning van het desbetreffende alkaan. De dampdruk is te bepalen met behulp van de vergelijking van Antoine

$$\log P = A - B / (T + C)$$

waarin P dampdruk

A, B, C. constanten

T temperatuur

Dreisbach (192) geeft de waarden van de constanten A, B en C voor de beschouwde temperatuur.

De logaritme van de dampdruk is in figuur 58 uitgezet als functie van het molaire volume. Het molaire volume is numeriek gelijk aan het moleculair-gewicht, gedeeld door het soortelijk gewicht.

Voor n-pentaaan tot en met n-octaan is de logaritme van de oplosbaarheid eveneens uitgezet als functie van het molaire volume. Door de punten is een rechte getrokken, evenwijdig aan de log. P/mol.volumen kromme.

Op deze wijze wordt gevonden

voor n-hendecaan is de oplosbaarheid $3.26 \cdot 10^{-5} \text{ kg/m}^3$

voor n-hexadecaan is de oplosbaarheid $7.69 \cdot 10^{-8} \text{ kg/m}^3$

Uit fig. 50 blijkt, dat de interpretatie van Johnson aanleiding geeft tot waarden die twee tot vijfmaal zo laag zijn als bij de uiteindelijk toegepaste methode.

Appendix 2. Bepaling van de diffusiecoëfficiënt.

De diffusiecoëfficiënt kan worden bepaald met behulp van figuur 59. Deze figuur is ontleend aan Wilke (193).

Weergegeven is het verband tussen het molaire volume en de grootheid $F = T / D \eta$.

Hierin is T absolute temperatuur $^{\circ} K$
D diffusiecoëfficiënt van de non-electrolyt in het oplosmiddel cm^2/s
 η viscositeit van het oplosmiddel c.p.

De molaire volumina zijn berekend volgens de wet van Kopp. Deze wet zegt, dat het molaire volume een additieve functie is van de atomaire volumina. De bijdragen van de atomen zijn als volgt

voor C is het atomaire volume 14.8

voor H is het atomaire volume 3.7

Uit de grafiek volgt o.a.

voor n-hendecaan is $D_{30^{\circ} C} = 0.676 \cdot 10^{-9} m^2/s$

voor n-hexadecaan is $D_{30^{\circ} C} = 0.557 \cdot 10^{-9} m^2/s$

LITERATUURREFERENTIES

1. Mc Pherson, A.T. Synthetic foods are a necessity. Chem. Eng. Progr. 61 (10), 101-5 (1965).
2. den Hartog, C. Nieuwe voedingsleer. 3e, opnieuw bewerkte, druk 1966. Het Spectrum N.V., Utrecht.
3. Cook, R.C. Population and food supply. Freedom from hunger campaign, basic study no. 7. Food and Agriculture Organization. 1962.
4. Pawley, W.H. Possibilities of increasing world food production. Freedom from hunger campaign, basic study no. 10. Food and Agriculture Organization. 1963.
5. F.A.O. Protein requirements. Nutritional studies no. 16. 1957.
6. National Research Council U.S.A. Evaluation of protein quality. 1963.
7. U.S. Department of Agriculture. The world food budget 1970. Foreign Agricultural Economic Report no. 19. 1964.
8. Champagnat, A., Vernet, Ch., Laine, B., Filosa, J. Biosynthesis of protein-vitamin concentrates from petroleum. Nature 197 (4862), 13-4 (1963).
9. Mc Nab, J.G. Potential for microbial proteins. World Food Supply Symposium. 133 rd. A.A.A.S. Annual meeting 27 December 1966. Washington D.C.
10. Kaserer, H. Ueber die Oxydation des Wasserstoffes und des Methans durch Mikro-organismen. Z. Landwirtsch. Versuchsw. Oesterr. 8, 789 - 94 (1905).
11. Söhngen, N.L. Over bacteriën, welke methaan als koolstofvoedsel en energiebron gebruiken. Koninkl. Ned. Akad. Wetenschappen, Amsterdam. Verslag vergadering Wis- en Natuurkundige Afdeling. 30-8-1905.
12. Miyoshi, M. Die durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. Jahrb. Wiss. Botan. 28, 269 - 89 (1895).
13. Bushnell, L.D., Haas, H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. J. Bacteriol. 41, 653 - 73 (1941).

14. Zo Bell, C.E. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.* 10, 1 - 49 (1946).
15. Beerstecher, E. *Petroleum microbiology*. Elsevier, New York. 1954.
16. Fuhs, G.W. Der mikrobielle Abbau von Kohlenwasserstoffen. *Arch. Mikrobiol.* 39, 374 - 422 (1961).
17. Kester, A.S. Studies on the oxidation of hydrocarbons by microorganisms. Ph. D. Thesis, University of Texas, 1961.
18. Robinson, D.S. The oxidation of selected hydrocarbons by a certain microorganism. Ph. D. Thesis, University of Manchester, 1961.
19. Castel, P. La catalyse enzymatique par les micro-organismes et ses applications industrielles. *Rev. Inst. Franc. Pétrole Ann. Combustibles Liquides.* 17, (19), 1149 - 80 (1962).
20. Foster, J.W. Hydrocarbons as substrates for micro-organisms. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 28, 241 - 74 (1962).
21. Zajic, E.J. Biochemical reactions in hydrocarbon metabolism. *Develop. Ind. Microbiol.* 6 (2), 16 - 27 (1964).
22. Bricteux, J. L'utilisation par les bactéries des n-paraffines comme seule source de carbone débuté par l'oxydation d'un groupe méthyle terminal et produit les alcool, aldéhyde et acide homologues. Université de Liège, Faculté des Sciences, Dissertation 1965.
23. van der Linden, A.C., Thyse, G.J.E. The mechanisms of microbial oxidations of petroleum hydrocarbons. *Advan. Enzymol.* 27, 469 - 546 (1965).
24. Mc Kenna, E.J., Kallio, R.E. The biology of hydrocarbons. *Ann. Rev. Microbiol.* 19, 183 - 208 (1965).
25. Sharpley, J.M. *Elementary petroleum microbiology*. Gulf publ. Cy. Houston. 1966.
26. Humphrey, A.E. A critical review of hydrocarbon fermentations and their industrial utilization. *Biotechnol. Bioeng.* 9 (1), 3 - 24 (1967).

27. Shturm, L.D. Studies on hydrocarbon assimilation by microorganisms. *Microbiology (U.S.S.R.)* 27 (6), 723 - 33 (1958).
28. Pozmogova, I.N. Cultivation of liquid n-alkane consuming microorganisms. *Izv. Akad. Nauk. S.S.S.R. Ser. Biol.* 31 (3), 568 - 80 (1966).
29. Just, F., Schnabel, W. Submerse Massenzüchtung von Bakterien auf nicht kohlenhydrathaltigen Nährstoffen. *Branntweinwirtschaft* 2, 113 - 4 (1948).
30. Just, F. Submerse Massenzüchtung von Kohlenwasserstoffzehrenden Mikroorganismen. *Angew. Chem.* 62 (4), 85 - 6 (1950).
31. Just, F., Schnabel, W., Ullmann, S. Submerse Züchtung von kohlenwasserstoffzehrenden Hefen und Bakterien. *Brauerei-Wiss. Beil.* 4 (8), 57-60 (1951), 4 (9), 71-5 (1951), 4 (12), 100-3 (1951), 5 (1), 8-13 (1952).
32. Schnabel, W. Submerse Massenzüchtung von Mikroorganismen auf der Basis von Kohlenwasserstoffen. Dissertation Humboldt-Universität Berlin 1950.
33. Ullmann, S. Submerse Züchtung von Kohlenwasserstoffzehrenden Bakterien. Dissertation Technische Universität Berlin 1951.
34. Champagnat, A., Vernet, Ch., Laine, B., Filosa, J. Deparaffinage microbiologique avec production de concentrés protéines-vitamines. VI World Petroleum Congress, Section IV-Paper 4. Frankfurt 21-6-1963.
35. Yamada, K., Takahashi, J., Kobayashi, K. The utilisation of hydrocarbons by microorganisms. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* 26 (9), 636 (1962).
36. Shiio, I., Otsuka, S.I., Ishii, R., Katsuya, N., Iizuka, H. Microbial production of amino acids from hydrocarbons. I Preliminary screening of glutamic acid producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 9 (1), 23 - 30 (1963).
37. Yamada, K., Takahashi, J., Kobayashi, K., Imada, Y. Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganisms. I. Isolation of amino acids producing bacteria from soil. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* 27 (5), 390 - 5 (1963).

38. Takahashi, J., Kobayashi, K., Imada, Y., Yamada, K. Utilization of hydrocarbons by microorganisms. IV. Effects of corn-steep liquor and thiamine on L-glutamic acid of hydrocarbons by micro-organisms. Appl. Microbiol. 13 (1), 1-4 (1965).
39. Iguchi, T., Takeda, I.; Seno, S. L-glutamate formation from hydrocarbons by microorganisms. Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 29 (6), 589 - 90 (1965).
40. Ajinomoto Co. Inc. Werkwijze voor het bereiden van aminozuur. Neth. Appl. 295.270 - 12-7-1963.
41. Tausson, T.A. Oxidation of paraffinwax by yeasts and yeastlike organisms. Mikrobiologiya 8, 823 - 33 (1939).
42. Fujii, K., Shimizu, S., Fukui, S. Formation of vitamins and their functions in hydrocarbon fermentation. Production of vitamin B₁₂ using several kinds of bacteria in hydrocarbon media. J. Fermentation Technol. (Hakkô Kôgaku Zasshi) 44 (4), 185 - 91 (1966).
43. Dikanskaya, E.M., Balabanova. Intensified synthesis of riboflavin by yeasts grown on hydrocarbons and carbohydrates. IX Int. Congr. Microbiol. Moscow. July 24-30, 1960. Abstr. C 1/18. Abstracts of papers p 258.
44. Takahashi, J., Imada, Y., Yamada, K. Lipase formation by microorganisms grown on hydrocarbons. Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 27 (5), 396 (1963).
45. Morihara, K. Production of proteinase on noncarbohydrate carbon sources by Pseudomonas aeruginosa. Appl. Microbiol. 13 (5), 793 - 7 (1965).
46. Iguchi, T., Takeda, I. Inosine formation from hydrocarbons by Corynebacterium petrophilum. Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 30 (7). 709 (1966).
47. Taggart, M.S. Utilization of hydrocarbons by bacterial fermentation. U.S. 2.396.900 - 19-3-1946.
48. Harris, R.G., Strawinsky, R.J. Processing of hydrocarbons. U.S. 2.697.061 - 14-12-1954.

49. Leadbetter, E.R., Foster, J.W. Studies on some methane utilizing bacteria. Arch. Mikrobiol. 30, 91 - 118 (1958).
50. Davis, J.B., Raymond R.L. Oxidation of alkyl-substituted cyclic hydrocarbons by a Nocardia during growth on n-alkanes. Appl. Microbiol. 9, 383 - 8 (1961).
51. Ooyama, J., Foster, J.W. Bacterial oxidation of cycloparaffinic hydrocarbons. Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol. 31, 45 - 65 (1965).
52. Davis, J.B., Raymond, R.L. Microbiological oxidation of hydrocarbons. U.S. 3.057.784.
53. Hill, I.D. Microbial oxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons. Can. 729.158 - 25-5-1965.
54. Was, D.A. Werkwijze voor de microbiologische oxydatie van organische verbindingen. Neth. Appl. 302.203 - 19-12-1963.
55. Champagnat, A., Laine, B.M., Vernet, C., Filosa, J.A., Winh, K.C. Perfectionnements concernant la production de micro-organismes et un traitement des hydrocarbures par des micro-organismes et produits obtenus. Fr. 1.393.517 - 15-2-1965.
56. Vernet, C., Hondermarck, J.C. Perfectionnements dans la production de produits tirés de micro-organismes. Fr. 1.417.349 4-10-1965.
57. Champagnat, A., Filosa, J. Procédé de production de levures à partir de fractions du pétrole. Fr. 1.297.619 - 21-5-1962.
58. Laine, B.M., Filosa, J.A. Perfectionnements relatifs à la production de micro-organismes. Fr. 1.385.718 - 7-12-1964.
59. Laine, B.M., Filosa, J.A. Procédé de production de micro-organismes. Fr. 1.385.720 - 7-12-1964.
60. Champagnat, A. Procédé de déparaffinage des fractions du pétrole par voie micro-biologique. Fr. 1.316.506 - 26-12-1962.
61. Champagnat, A. Procédé de déparaffinage des fractions du pétrole à l'aide de bactéries. Fr. 1.334.466 - 1-7-1963.
62. Laine, B.M. Perfectionnements aux procédés de cultures d'un microorganisme. Fr. 1.416.057 - 20-9-1965.

63. Laine, B.M., Vernet, Ch., Champagnat, A., Vinh, K.C. Procédé perfectionné de culture de micro-organismes. Fr. 1.385.717 7-12-1964.
64. Champagnat, A., Laine, B. Perfectionnement à la culture de micro-organismes sur substrat hydrocarbures. Fr. 1.357.040 - 24-2-1964.
65. Laine, B.M., Filosa, J.A. Procédé perfectionné de production de micro-organismes. Fr. 1.385.719 - 7-12-1964.
66. Laine, B.M., Filosa, J.A. Procédé de raffinage de mélanges d'hydrocarbures permettant d'éliminer, au moins en partie, les hydrocarbures à chaîne droite. Fr. 1.416.056 - 20-9-1965.
67. Laine, B., Vernet, C., Evans, G. Du pétrole aux protéines. Dechema Colloquium - 21-10-1966. Frankfurt.
68. Lefrançois, L. Développement en continu de la levure et autres microorganismes. Inds. Aliment. et Agr. (Paris) 81, 513- 7 (1964).
69. Blakebrough, N., Nimmons, I., Shepherd, P.G. Performance of air-lift fermenters. Symposium Inst. Chem. Engrs. North Western Branch. Manchester 14 - 12 - 1965.
70. Blakebrough, N., Shepherd, P.G., Nimmons, I. Equipment for hydrocarbon fermentations. Biotechnol. Bioeng. 9 (1), 77 - 89 (1967).
71. Filosa, J.A. Perfectionnements concernant la culture des micro-organismes. Fr. 1.384.253 - 23-11-1964.
72. Champagnat, A. Procédé de récupération de levures pures à partir d'une émulsion comprenant des levures et des hydrocarbures dans un milieu minéral aqueux. Fr. 1.297.033 - 14-5-1962.
73. Champagnat, A. Perfectionnements aux procédés de culture de micro-organismes. Fr. 1.385.722 - 7-12-1964.
74. Filosa, J.A. Procédé d'amélioration de la production de micro-organismes. Fr. 1.384.252 - 23-11-1964.

75. Champagnat, A. Perfectionnement à la production de levures alimentaires à partir des fractions du pétrole. Fr. 1.340.225 9-9-1963.
76. Champagnat, A., Laine, B. Perfectionnements à la production de micro-organismes à partir d'hydrocarbures. Fr. 1.381.311 - 2-11-1964.
77. Champagnat, A. Procédé de production de concentrés protéines-vitamines à partir des fractions du pétrole. Fr. 1.361.910 20-4-1964.
78. Laine, B.M. Traitement de micro-organismes. Fr. 1.393.337-15-12-1965.
79. Vernet, C., Filosa, J.A. Procédé d'élimination totale ou partielle des hydrocarbures à chaîne droite contenus dans des mélanges d'hydrocarbures. Fr. 1.384.251 - 23-11-1964.
80. Laine, B.M. Procédé permettant d'éliminer partiellement et totalement des hydrocarbures à chaîne droite présents dans des mélanges d'hydrocarbures. Fr. 1.385.721 - 7-12-1964.
81. Champagnat, A., de Mayo, C. Procédé et installation pour la production de levures alimentaires à partir de fractions du pétrole. Fr. 1.320.058 - 28-1-1963.
82. McAuliffe, C. Solubility in water of paraffin, cycloparaffin, olefin, and aromatic hydrocarbons. J. Phys. Chem. 70 (4), 1267 - 75 (1966).
83. Monod, J. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Thèses, Université de Paris 1941.
84. Johnson, M.J. Utilization of hydrocarbons by micro-organisms. Chem. and Ind. (London) 36, 1532-7 (1964).
85. Webley, D.M., de Kock, P.C. The metabolism of some saturated aliphatic hydrocarbons, alcohols and fatty acids by Proactiniomyces opacus Jensen. Biochem. J. 51, 371-5 (1952).
86. Harris, J.O. Respiration studies of a Micrococcus capable of oxidizing hydrocarbons. Arch. Biochem. Biophys. 70, 457-63 (1957).

87. Takahashi, J., Kobayashi, K., Kawabata, Y., Yamada, K. Utilization of hydrocarbons by micro-organisms. III Production of bacterial cell from hydrocarbons. Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 27 (12), 836-42 (1963).
88. Iizuka, H., Komagata, K. Microbiological studies on petroleum and natural gas. I. Determination of hydrocarbon-utilizing bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 10 (3), 207-21 (1964).
89. Komagata, K., Nakase, T., Katsuya, N. Assimilation of hydrocarbons by yeasts. I. Preliminary screening. J. Gen. Appl. Microbiol. 10 (4), 313 - 21 (1964).
90. Kyowa Hakko Kogyo Co, Procéd  de culture de cellules de levure dans des milieux contenant des hydrocarbures comme sources de carbone nutritif. Fr. 1.414.402 6-9-1965.
91. Takeda, J., Iguchi, T., Kawamura, T., Horiguchi, S., Hayakawa, S., Senoh, S. Production of microbial cells from hydrocarbons. Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 29 (9) 796 - 803 (1965).
92. Lukins, H.B., Foster, J.W. Utilization of hydrocarbons and hydrogen by Mycobacteria. Z. Allgem. Mikrobiol. 3, 251-64 (1963).
93. Tausz, J., Peter, M. Neue Methode der Kohlenwasserstoffanalyse mit Hilfe von Bakteri n. Centr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II 49, 497 - 554 (1919).
94. Haag, F.E.  ber die Bedeutung van Doppelbindungen im Paraffin des Handels f r das Wachstum von Bakteri n. Arch. Hyg. 97, 28 - 46 (1926).
95. S hngen, N.L. Einfluss von Kolloiden auf mikrobiologische Prozesse. Centr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II 38, 621 - 47 (1913).
96. Greig-Smith, R. Note on the destruction of paraffins by Bac. prodigiosus and soil-organisms. Proc. Linnean Soc. N.S. Wales 39, 538 - 41 (1914).
97. Tausson, W.O., Aleshina, W.A.  ber die bakterielle Sulfatreduktion bei Anwesenheit der Kohlenwasserstoffe. Mikrobiologiya 1, 229 - 51 (1932).
98. Raymond, R.L. Increasing rate of microbial fermentation with zeolites. U.S. 3.224.946 - 21-10-1965.

99. Hitzman, D.O. Hydrocarbon fermentation process. U.S. 3.212.993-19-10-1965.
100. Muller, F.M. On methane fermentation of higher alkanes. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 23, 369 - 84 (1957).
101. Isenberg, D.L., Bennett, E.O. Bacterial deterioration of emulsion oil. II. Nature of the relationship between aerobes and sulfate-reducing bacteria. *Appl. Microbiol.* 7, 121 - 5 (1959).
102. Rahn, O. Ein Paraffin zersetzender Schimmelpilz. *Centr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II*, 382 - 4 (1906).
103. Hopkins, S.J., Chibnall, A.C. Growth of *Aspergillus versicolor* on higher paraffins. *Biochem. J.* 26, 133 - 42 (1932).
104. Hoitzmann, P., Bouchard, G. Sur le métabolisme de la paraffine par les micro-organismes. *Compt. Rend.* 226, 2181-2 (1948).
105. Mc.Clung, N.M. A method for testing paraffin utilization by micro-organisms. *Mycologia* 47, 424 - 7 (1955).
106. Mudd, S., Mudd, E.B.H. Penetration of bacteria through capillary spaces. IV. A kinetic mechanism in interfaces. *J. Exp. Med.* 40, 633 - 45 (1924).
107. Reed, G.B., Rice, C.E. The behaviour of acid-fast bacteria in oil and water systems. *J. Bacteriol.* 22, 239 - 47 (1931).
108. Saz, A.K. The effect of long-chain compounds, particularly hydrocarbons, on the metabolism of tubercle bacilli. *Arch. Biochem.* 22, 195 - 203 (1949).
109. Raymond, R.L., Davis, J.B. n-Alkane utilization and lipid formation by a *Nocardia*. *Appl. Microbiol.* 8, 329 - 34 (1960).
110. Miller, T.L., Lie, S., Johnson, M.J. Growth of a yeast of normal alkanes. *Biotechnol. Bioeng.* 6, 299 - 307 (1964).
111. Baldwin, I.L. Modifications of the soil flora induced by applications of crude petroleum. *Soil Sci.* 14, 465-75 (1922).
112. Matthews, A. Partial sterilisation of soil by antiseptics. *J. Agr. Sci.* 14, 1 - 57 (1924).
113. Tausson, W.O. Über die Oxydation der Benzolkohlenwasserstoffe durch Bakterien. *Planta* 7 (5), 735 - 58 (1929).

114. Stone, R.W., White, A.G.C., Fenske, M.R. Microorganisms attacking petroleum and petroleum fractions. *J. Bacteriol.* 39, 91 (1940).
115. Davis, J.B., Raymond, R.L., Stanley, J.P. Areal contrasts in the abundance of hydrocarbon oxidizing microbes in soils. *Appl. Microbiol.* 7, 156 - 65 (1959).
116. Yamada, K., Takahashi, J., Kobayashi, K. Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganisms. II. Taxonomical studies on the amino acids producing bacteria from hydrocarbons. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* 27 (11), 773 - 83 (1963)
117. Iizuka, H., Komagata, K. Microbiological studies on petroleum and natural gas II. Determination of Pseudomonads isolated from oil-brines and related materials. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 10 (3), 223 - 31 (1964).
118. Iizuka, H., Komagata, K. Microbiological studies on petroleum and natural gas III. Determination of Brevibacterium, Arthrobacter, Micrococcus, Sarcina, Alcaligenes and Achromobacter isolated from oil-brines in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 11 (1), 1 - 14 (1965).
119. Iizuka, H., Komagata, K. Microbiological studies on petroleum and natural gas IV. Microflora of Higashiyama oil mining field. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 11 (1), 15 - 23 (1965).
120. Stone, R.W. Current problems in the oxidation of hydrocarbons by microorganisms. *Develop. Ind. Microbiol.* 4, 5-8 (1963).
121. Finnerty, W.R., Hawtrey, E., Kallio, R.E. Alkane-oxidizing micrococci. *Z. Allgem. Mikrobiol.* 2 (3), 169 - 77 (1962).
122. Palmer, F.E., Ordal, E.J. Steady-state enrichment cultures of aquatic and marine microorganisms. *Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriologists)* p. 45 (1961).
123. Gatellier, C. Production by natural adaptation of various types of microorganisms capable of assimilating and converting petroleum fractions: application to dewaxing and the synthesis of protein. *Petr. Chem. U.S.S.R.* 3 (4), 322 - 4 (1964) - *Neftekhimiya* 3 (5), 811 - 2 (1963).

124. Gatellier, C. Procéd e d'obtention et d'isolement de microorganismes et applications de ces microorganismes. Fr. 1.388. 652 - 4-1-1965.
125. Komagata, K., Nakase, T., Katsuya, N. Assimilation of hydrocarbons by yeasts II. Determination of hydrocarbon assimilating yeasts. J. Gen. Appl. Microbiol. 10 (4), 323 - 31 (1964).
126. Takahashi, J., Kawabata, Y., Yamada, K. The utilization of hydrocarbons by microorganisms V. Screening of yeast for cell production from hydrocarbons and their R.N.A. contents. Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 29 (4), 292 - 9 (1965).
127. Stcholakova, I.F., c.s. Selection of fodder yeasts which have high activity of growth and accumulation biomass on hydrocarbons of petroleum. IX Intern. Congr. Microbiol. Moscow. July 1966. Paper C 1/6.
128. Kryuchkova, A.P., Rodionova, G.S., Stepanenko, V.G. The utilization of various yeast cultures for the biosynthesis of proteins from hydrocarbons. IX Intern. Congr. Microbiol. Moscow July 1966. Paper C 1/5.
129. Iizuka, H., Goto, S. Microbiological studies on petroleum and natural gas. VIII. Determination of red yeasts isolated from oil-brines and related materials. J. Gen. Appl. Microbiol. 11 (4), 331-7 (1965).
130. Raymond, R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. Develop. Ind. Microbiol. 2, 23 - 32 (1961).
131. Jerusalimsky, N.D., Skryabin, G.K. Problems of microbiology of hydrocarbons, Izv. Akad. Nauk S.S.S.R. Ser. Biol. 30 (1), 53-7 (1965).
132. Koval, E.Z., Bilai, V.J., Pidoplichko, N.M., Buchalo, A.S., Milko, A.A. The hydrocarbon utilization of soil micromycetes. IX intern. Congr. Microbiol. Moscow July 1966. Paper C 1/7.
133. Scheda, R. Kohlenwasserstoffzehrende Hefen. Branntweinwirtschaft. 20 (13), 373 - 6 (1966).

134. Gatellier, C. Procédé d'adaptation de levures pour permettre leur développement dans un milieu à base d'hydrocarbures. Fr. 1.427.623. 3-1-1966.
135. Fredricks, K.M. Adaptation of bacteria from one type of hydrocarbon to another. *Nature* 209 (5027), 1047-8 (1966).
136. Jørgensen, A., Hansen, A. *Micro-organisms and fermentation*. Griffin, London 1948.
137. Reiff, F. editor. *Die Hefen. Band II. Technologie der Hefen*. Verlag Carl, Nürnberg, 1960.
138. Burkholder, P.R. Vitamin deficiencies in yeasts. *Am. J. Botany* 30, 206 - 11 (1943).
139. Burkholder, P.R., Mc Veigh, I., Moyer, D. The growth factors of yeasts. *J. Bacteriol.* 48, 385 - 91 (1944).
140. Tausson, W.O. Über die Oxidation der Wachse durch Mikroorganismen. *Biochem. Z.* 193, 85 - 93 (1928).
141. Dworkin, M., Foster, J.W. Studies on *Pseudomonas methanica* (Söhngen) (Nov. comb.) *J. Bacteriol.* 72, 646 - 59 (1956).
142. Wildiers, E. Nouvelle substance indispensable au développement de la levûre. *Cellule Rec. Cytol. Histol.* 18, 313 - 31 (1901).
143. Ter Karapetyan, M.A., Makarova, E.N. Requirements for B-vitamins of some strains of *Candida*. *Izv. Akad. Nauk Armyan. S.S.R. Biol. Nauki* 16 (5), 15 - 24 (1963).
144. Makarova, E.N., Oganesyanyan, S.P. Effects of B-vitamins on the growth of yeast. *Izv. Akad. Nauk Armyan. S.S.R. Biol. Nauki* 16 (3), 45 - 53 (1963).
145. Cook, A.H. editor. *The chemistry and biology of yeasts*. Academic Press New-York 1958.
146. Chain, E.B., Gualandi, G. Aeration studies II. *Rend. Ist. Super. Sanità* 17, 5 - 60 (1954).
147. Darlington, W.A. Aerobic hydrocarbon fermentation - a practical evaluation. *Biotechnol. Bioeng.* 6, 241 - 2 (1964).
148. Guenther, K.R. Aerobic hydrocarbon fermentation - a thermodynamic evaluation. *Biotechnol. Bioeng.* 7, 445 - 6 (1965).

149. Robinson, J.V., Woods, W.W. A general method of selecting foam inhibitors. Natl. Advisory Comm. Aeronaut. tech. Note 1025 (1946).
150. Gaden, E.L. jr., Kevorkian, V. Foams in chemical technology. Chem. Eng. 63 (Oct.) 173 - 84 (1956).
151. Goldschmidt, M.C., Koffler, H. Effect of surface-active agents on penicillin yields. Ind. Eng. Chem. 42 (9), 1819 - 23. (1950).
152. Ghosh, D., Pirt, S.J. Antifoam agents in aerobic fermentations. Evaluation of the activities of antifoam preparations. Rend. Inst. Super. Sanità 17, 149 - 67 (1954).
153. Corman, J., Tsuchiya, H.M., Koepsell, H.J., Benedict, R.G., Kelley, S.E., Feger, V.H., Dworschack, R.G., Jackson, R.W. Oxygen absorption rates in laboratory and pilot-plant equipment. Appl. Microbiol. 5, 313 - 8 (1957).
154. Deindoerfer, F.H., Gaden, E.L. jr. Effect of liquid physical properties on oxygentransfer in penicillin fermentation. Appl. Microbiol. 3, 253 - 7 (1955).
155. Aiba, S., Toda, K. Effect of surface active agent on oxygen absorption in bubble aeration. I. J. Gen. Appl. Microbiol. 9 (4), 443 - 53 (1963).
156. Phillips, K.L., Spencer, J.F.T., Sallans, H.R., Roxburgh, J.M., Effect of antifoam agents on oxygen transfer in deep tank fermentations. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 2 (1), 81 - 91 (1960).
157. Ballis, A.K. Yeast production from wood-sugars by the Bergins process. F.I.A.T. final report no. 493, 1946.
158. Miller, T.L., Johnson, M.J. Utilization of normal alkanes by yeasts. Biotechnol. Bioeng. 8, 549 - 65 (1966).
159. Thorne, R.S.W., Bishop, L.R. Quantitative studies on yeast suspensions by turbidometric and other methods. J. Inst. Brewing 42, 15 - 26 (1936).
160. White, J. A critical survey of methods for the determination of yeast quantity. Am. Brewer 81 (8). 40 - 6, 70 - 1 (1947).

161. Stewart, E.D. Yeast estimation methods. When and how to apply them. *Food Inds.* 20 (4), 119 (1948).
162. Borzani, W., Vairo, M.L.R. Quantitative adsorption of methylene blue by dead yeast cells. *J. Bacteriol.* 76, 251-5 (1958).
163. E.B.C. Yeast group. Estimation of yeast viability. *J. Inst. Brewing* 68, 14 - 20 (1962).
164. Kleyn, J., Mildner, R., Riggs, W. Yeast viability as determined by methylene blue staining. *Brewers Dig.* 37 (6), 42-6 (1962).
165. Simek, F., Egyed, K., Kiss, I., Nagy, G.Y. Vermehrungskinetische Untersuchungen in der Eiweissfütterung wichtiger, Kohlenwasserstoffe assimilierender Mikroorganismen, *Konf. Spiritusind.* Okt. 1964. Budapest.
166. Arima, K., Ogino, S., Yano, K., Tamura, G. Studies on utilization of hydrocarbons by yeasts. Part I. Studies on culture conditions of yeasts. *Agr. Biol. Chem. Tokyo* 29 (11), 1004 - 8 (1965).
167. Linderström - Lang, K., Lanz, H. Studies on enzymatic histochemistry XXIV Dilatometric micro-estimation on peptidase activity. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg Sér. Chim.* 21, 315 - 38 (1935 - 1938).
168. Atkin, L., Feinstein, M., Gray, P.P. Estimation of yeast concentration by means of the specific gravity gradient tube. *Wallerstein Lab. Commun.* 11 (35), 289 - 97 (1948).
169. Karadshi, F., Wilmot, J., Dakin, P.E. An improved yeast counting technique through the use of the micro-centrifuge. *Am. Soc. Brewing Chemists Proc. Ann. Meet.* 44 - 7 (1964).
170. Stewart, J.E., Kallio, R.E., Stevenson, D.P., Jones, A.C., Schissler, D.O. Bacterial hydrocarbon oxidation. I. Oxidation of n-hexadecane by a gram-negative coccus. *J. Bacteriol.* 78, 441 - 8 (1959).
171. Söhngen, N.L. Bensen, Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff und Energiequelle für Mikroben. *Centr. Bakt. Parasitenk. Abt. II* 37, 595 - 609 (1913).

172. Littlewood, A.S. Gaschromatography. Principles, technique and applications. Academic Press 1962.
173. Schenck, P.A., Eisma, E. Quantitative determination of n-alkanes in crude oils and rock extracts by gaschromatography. Adv. Org. Geochem. 1963. Proc. Int. Meeting. Milan 1962.
174. Dale, R.F., Amsz, J. jr., Ping, S., Peppler, H.J., Rudert, F.J. A continuous feeding assembly for laboratory fermentations. Appl. Microbiol. 1, 68 - 9 (1953).
175. Gaden, E.L. Improved shake flask performance. Biotechnol. Bioeng. 4, 99 - 103 (1962).
176. Falch, E.A., Hedén, C.G. Disposable shaker flasks. Biotechnol. Bioeng. 5, 211 - 20 (1963).
177. Schultz, J. Cotton closure as an aeration barrier in shaken flask fermentations. Appl. Microbiol. 12 (4). 305 - 10 (1964).
178. Siegell, S.D., Gaden, E.L. Automatic control of dissolved oxygen levels in fermentations. Biotechnol. Bioeng. 4 (3), 345 - 56 (1962).
179. Damaschke, K. Atmungsmessungen von Hefe. - in : F. Tödt. Elektrochemische Sauerstoffmessungen, pp. 42 - 58. W. de Gruyter, Berlin 1958.
180. Winzler, R.J. The respiration of bakers' yeast at low oxygen tension. J. Cellular Comp. Physiol. 17 (3), 263 - 76 (1941).
181. Herbert, D. Some principles of continuous culture. in "Recent progress in microbiology," pp. 381 - 96. Symposium, Stockholm 1958.
182. Proper, G., Garver, J.C. Mass culture of the protozoa Colpoda steinii. Biotechnol. Bioeng. 8, 287 - 96 (1966).
183. Bartholomew, W.H., Karow, E.O., Sfat, M.R., Wilhelm, R.H. Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations. Mass transfer of oxygen in submerged fermentation of Streptomyces griseus. Ind. Eng. Chem. 42 (9), 1801 - 9 (1950).

184. Frössling, N. Über die Verdunstung fallender Tropfen. Gerlands Beitr. Geophysik 52, 170 - 216 (1938).
185. Ranz, W.E., Marshall, W.R. Evaporation from drops. Part I. Chem. Eng. Progr. 48 (3), 141 - 6 (1952). Part II Chem. Eng. Progr. 48 (4), 173 - 80 (1952).
186. Hixson, A.W., Baum, S.J. Agitation. Mass transfer coefficients in liquid - solid agitation systems. Ind. Eng. Chem. 33 (4), 478 - 85 (1941).
187. Calderbank, P.H., Jones, S.J.R. Physical rate processes in industrial fermentation. - Part III. Mass transfer from fluids to solid particles suspended in mixing vessels. Trans. Inst. Chem. Engrs (London). 39, 363 - 8 (1961).
188. Nagata, S., Adachi, M., Yamaguchi, I. Rate of solution of solid particles in agitated liquids. Mem. Fac. Eng. Kyoto Univ. 20, 72 - 91 (1958)
189. Azoulay, E., Couchoud-Beaumont, P., Senez, J.C. Croissance de Candida lipolytica à partir des glucides et à partir des hydrocarbures paraffiniques. Ann. Inst. Pasteur 107, 520-33 (1964).
190. Miller, T.L., Johnson, M.J. Utilization of gas-oil by a yeast culture. Biotechnol. Bioeng. 8 (4), 567 - 80 (1966).
191. Lindenberg, A.B. Sur une relation simple entre le volume moléculaire et la solubilité dans l'eau des hydrocarbures et dérivés halogénés. Compt. Rend. 243, 2057 - 60 (1956).
192. Dreisbach, R.R. Physical properties of chemical compounds 2. American Chemical Society. Washington 1959.
193. Wilke, C.R. Estimation of liquid diffusion coefficients. Chem. Eng. Progr. 45, 218 - 24 (1949).

SYMBOLENLIJST

symbool		eenhe
A	oppervlak, grensvlak	m ²
B	volumeconcentratie van de deeltjes	m ³ /m ³
B ^C	volume gistcellen per volume- eenheid cultuurvloeistof	m ³ /m ³
B ^O	volume oliedruppels per volume- eenheid cultuurvloeistof	m ³ /m ³
C	concentratie van het opgeloste koolstofsubstraat	kg/m ³
C _g ¹	concentratie van het n-alkaan aan het grensvlak, aan luchtzijde	kg/m ³
C ^O	concentratie van het opgeloste n-alkaan in de oliefase	kg/m ³
C _{ag} ^O	concentratie van het opgeloste n-alkaan aan het grensvlak, aan oliezijde	kg/m ³
C ^w	concentratie van het opgeloste n-alkaan in de waterfase	kg/m ³
C _{ag} ^w	concentratie van het opgeloste n-alkaan aan het grensvlak, aan waterzijde	kg/m ³
C _∞	concentratie van het opgeloste n-alkaan in de waterfase, op grote afstand van een druppel	kg/m ³
C*	oplosbaarheid van het n-alkaan in water	kg/m ³
C ⁺	concentratie van het opgelost n-alkaan in het cultuurmedium, in evenwicht met de n-alkaan concentratie in het door- stromende gas	kg/m ³

d	diameter	m
d^c	equivalente diameter van de gistcel	m
d^o	gemiddelde diameter van de oliedruppel	m
dC/dt	reactiesnelheid	$kg/m^3 s$
dP/dt	groeisnelheid - hoeveelheid droge stof gevormd per tijdseenheid per eenheid van volume cultuurvloeistof	$kg/m^3 s$
$(dP/dt)_{ln}$	groeisnelheid aan het einde van de exponentiële groeiperiode	$kg/m^3 s$
$(dP/dt)_{max}$	maximale waarde van de groeisnelheid	$kg/m^3 s$
dS/dt	omzettingssnelheid - hoeveelheid n-alkaan omgezet per tijdseenheid per volume eenheid cultuurvloeistof	$kg/m^3 s$
$(dS/dt)'$	omzettingssnelheid bij stofoverdracht via opgelost n-alkaan	$kg/m^3 s$
$(dS/dt)''$	omzettingssnelheid bij stofoverdracht via direct contact	$kg/m^3 s$
$(dS/dt)_{ln}$	omzettingssnelheid aan het einde van de exponentiële groeiperiode	$kg/m^3 s$
$(dS/dt)'_{ln}$	omzettingssnelheid bij stofoverdracht via opgelost n-alkaan, aan het einde van de exponentiële groeiperiode	$kg/m^3 s$
$(dS/dt)''_{ln}$	omzettingssnelheid bij stofoverdracht door direct contact, aan het einde van de exponentiële groeiperiode	$kg/m^3 s$
$(dS/dt)_{max.}$	maximale waarde van de omzettingssnelheid	$kg/m^3 s$
$(dS/dt)'_{max}$	maximale waarde van de omzettingssnelheid bij stofoverdracht via opgelost n-alkaan	$kg/m^3 s$
$(dS/dt)''_{max.}$	maximale waarde van de omzettingssnelheid bij stofoverdracht via direct contact	$kg/m^3 s$

D	diameter fermentatievat	m
ID	diffusie-coëfficiënt	m ² /s
e.c.	economische coëfficiënt (de verhouding tussen de hoeveelheid droge stof gevormd en de hoeveelheid n-alkaan verbruikt)	-
f	fractie van N ₂ dat deelneemt aan het directe contact	-
g	versnelling van de zwaartekracht	m/s ²
k ^l	stofoverdrachtscoëfficiënt voor de luchtfilm	m/s
k ^o _a	partiële stofoverdrachtscoëfficiënt voor de oliefilm	m/s
k ^w _a	partiële stofoverdrachtscoëfficiënt voor de waterfilm	m/s
k ^c _b	partiële stofoverdrachtscoëfficiënt voor de cel (celwand en inwendige van de cel)	m/s
k ^w _b	partiële stofoverdrachtscoëfficiënt voor de waterfilm rond de gistcel	m/s
K	"overall" stofoverdrachtscoëfficiënt	m/s
K _a	stofoverdrachtscoëfficiënt voor de stofoverdrachtstrap olie - water	m/s
K _b	stofoverdrachtscoëfficiënt voor de stofoverdrachtstrap water - gistcel	m/s
K _m	Michaelisconstante	kg/m ³
K _s	verzadigingsconstante	kg/m ³
ℓ ^c	gemiddelde afstand tussen de gistcellen	m
m	fase verdelingscoëfficiënt	-
m _a	fase verdelingscoëfficiënt voor het systeem olie/water	-

m_b	fase verdelingscoëfficiënt voor het systeem water/cel	-
n	toerental van de roerder	1/s
N	aantal micro-organismen per volume eenheid	1/m ³
N_o	aantal micro-organismen per volume eenheid, op tijdstip $t = 0$	1/m ³
N'	aantal micro-organismen, niet in contact met de olie, per m ³ cultuurvloeistof	1/m ³
N''	aantal micro-organismen, in direct contact met de olie, per m ³ cultuurvloeistof	1/m ³
N_{actief}	aantal micro-organismen per volume eenheid, aanwezig aan het grensvlak van de druppels, bij volledige oppervlakte bezetting	1/m ³
O	specifiek grensvlak	m ² /m ³
O^c	oppervlakte van de gistcellen per volume eenheid cultuurvloeistof	m ² /m ³
O^o	oppervlakte van de oliedruppels, per volume eenheid cultuurvloeistof	m ² /m ³
O''	contact oppervlak olie - gistcel, per volume eenheid cultuurvloeistof	m ² /m ³
P	concentratie droge stof (micro-organismen)	kg/m ³
P_o	concentratie droge stof (micro-organismen) op tijdstip $t = 0$	kg/m ³
$(P)_{1n}$	concentratie droge stof (micro-organismen) aan het einde van de exponentiële groeiperiode	kg/m ³
$(P)_{bm}$	concentratie droge stof op het tijdstip, waarop dP/dt maximaal wordt	kg/m ³

q	contact oppervlak tussen oliedruppel en gistcel	m ²
r	afstand tot centrum van de oliedruppel	m
R	straal van de oliedruppel	m
Re	getal van Reynolds ($v \rho d/\eta$ of vd/v)	-
S	n-alkaan belasting (gewicht n-alkaan, als disperse fase aanwezig, per volume eenheid cultuurvloeistof)	kg/m ³
Sc	getal van Schmidt (v/D of $\eta/\rho D$)	-
Sh	getal van Sherwood ($k d/D$)	-
t	tijd	s
T	temperatuur	°K of °C
v	snelheid	m/s
v*	reactiesnelheid	
v _m *	maximale waarde van de reactiesnelheid	
W	gewichtspercentage	
x	coördinaat	m
y	coördinaat	m
z	coördinaat	m
α	groeisnelheidsconstante $1/N \, dN/dt = (\ln 2)/\tau$	1/s
β	evenredigheidscoëfficiënt	-
γ	evenredigheidscoëfficiënt	-
δ	filmdikte	m
η	dynamische viscositeit	kg/m s
μ	groeisnelheidsconstante $1/P \, dP/dt = \alpha$	1/s
μ_m	maximale waarde van de groeisnelheidsconstante	1/s

ν	kinematische viscositeit (η/ρ)	m^2/s
ρ	dichtheid	kg/m^3
τ	gemiddelde generatietijd	s
ϕ	stofstroom	kg/s
ϕ_m	maximale waarde van de stofstroom	kg/s
ϕ^*	$1/P dS/dt$, de stofstroom per gewichts- eenheid droge stof (micro-organismen)	$kg/kg s$
ψ	fractie van het olie oppervlak, dat niet bezet is met gistcellen	-

Index : slaat op

a	stofoverdrachtstrap olie - water
b	stofoverdrachtstrap water - enzymoppervlak
c	cel
g	grensvlak
i	component
j	component
k	component
l	lucht
o	olie
w	water
'	stofoverdracht via opgelost n-alkaan
"	stofoverdracht door direct contact

LEVENSBESCHRIJVING

De schrijver van dit proefschrift werd in 1925 te Haarlem geboren. In 1943 behaalde hij het diploma H.B.S.-b. Van November 1945 tot Januari 1949 was hij in militaire dienst. Van Januari 1949 tot September 1952 was hij als laboratoriumassistent werkzaam bij de N.V. Joh. Enschedé en Zn. te Haarlem.

In September 1949 ving hij aan met de studie voor natuurkundig ingenieur aan de Technische Hogeschool te Delft. Gedurende de periode September 1952 tot September 1954 was hij achtereenvolgens als P₁/P₂ assistent op het Laboratorium voor Technische Fysica en als research assistent op het Laboratorium voor Fysische Technologie, T.H. Delft, werkzaam.

Het afstudeerwerk werd verricht onder leiding van Prof. ir. H. Kramers. In Mei 1954 behaalde hij het diploma natuurkundig ingenieur. Van Oktober 1954 tot April 1957 was hij als wetenschappelijk medewerker van Prof. dr. ir. H.A. Leniger werkzaam op het Laboratorium voor Technologie van de Landbouwhogeschool te Wageningen.

In April 1957 trad hij in dienst van Thomassen en Drijver N.V. te Deventer, als hoofd van het Natuurkundig Laboratorium.

In Juli 1958 werd hij benoemd tot wetenschappelijk hoofdamtenaar aan de Technische Hogeschool te Eindhoven. Sedertdien is hij als medewerker van Prof. dr. K. Rietema werkzaam op het Laboratorium voor Fysische Technologie.

EEN TECHNOLOGISCHE STUDIE
VAN DE GISTPRODUKTIE MET N-ALKANEN
ALS KOOLSTOF- EN ENERGIEBRON

(Figuren behorende bij het proefschrift).

B. ERDTSIECK

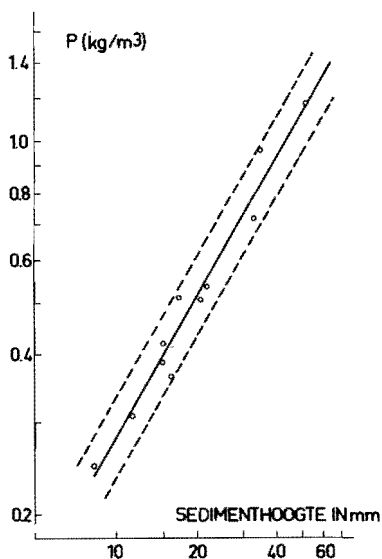
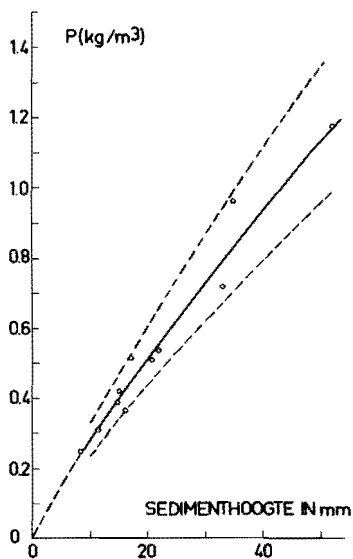


Fig. 1 IJkgrafiek sedimenthoogte / drogestofconcentratie, voor Candida tropicalis C.B.S. 94, bij groei op n-alkanen.

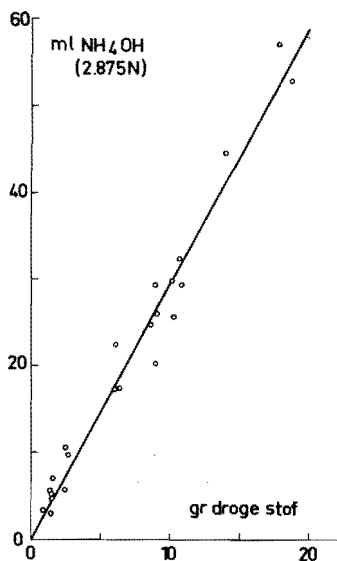


Fig. 2 IJkgrafiek drogestof/loog

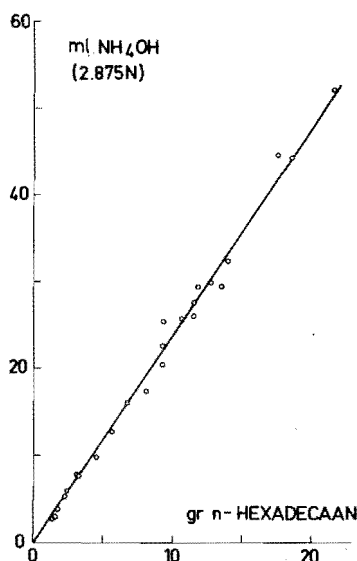


Fig. 3 IJkgrafiek n-alkaan/loog

voor Candida lipolytica C.B.S. 599, bij groei op n-hexadecaan.

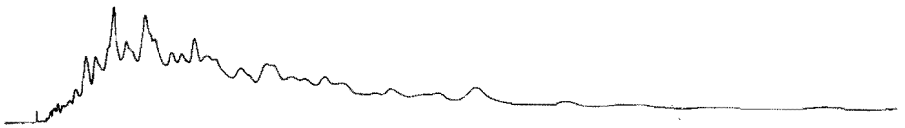


Fig. 4A Gaschromatogram van de ontparaffineerde Kuwait zware gasolie (basislijn).

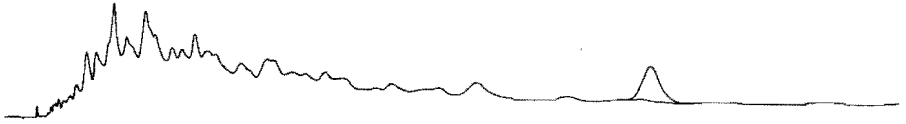


Fig. 4B Gaschromatogram van de ontparaffineerde Kuwait zware gasolie met methylpalmitaatpiek.

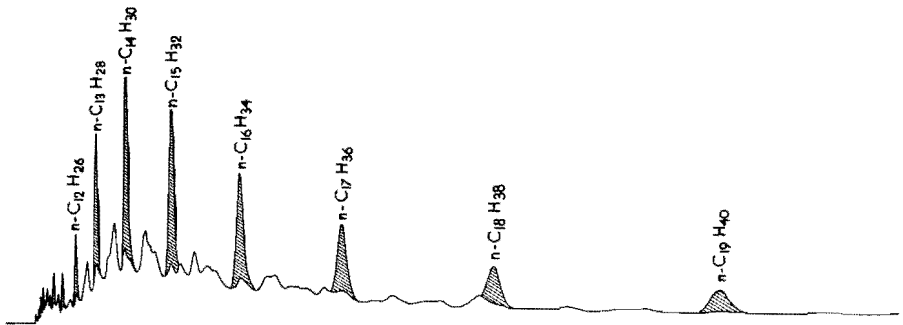


Fig. 5 Gaschromatogram van de Kuwait zware gasolie. De n-alkaanpieken zijn gearceerd.

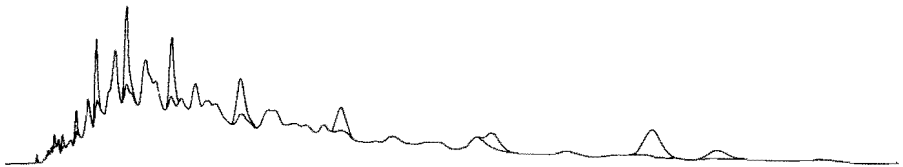


Fig. 6 Gaschromatogram van de gedeeltelijk ontparaffineerde Kuwait zware gasolie, met methylpalmitaatpiek.

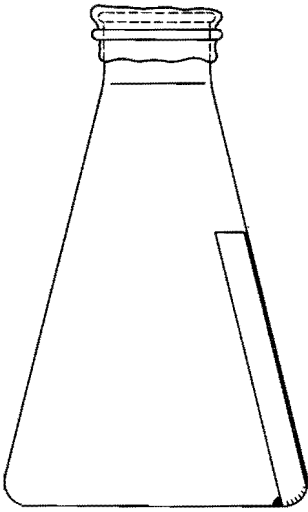


Fig. 7 Schudfles.

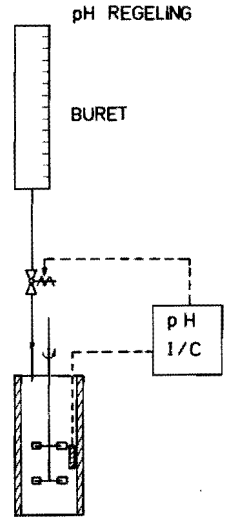


Fig. 8

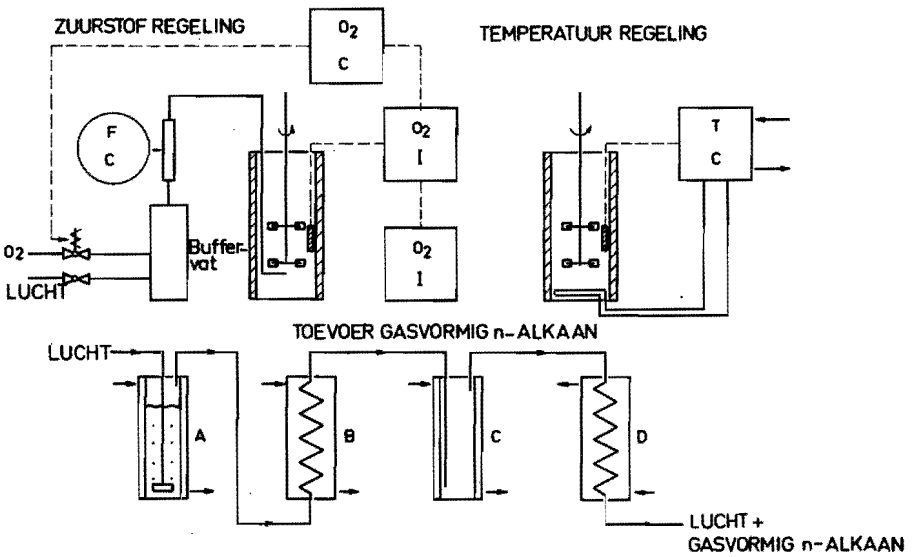
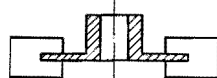
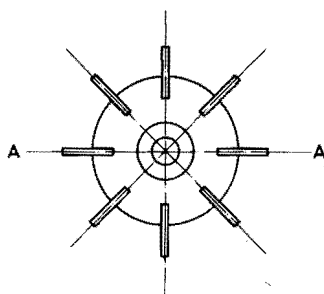
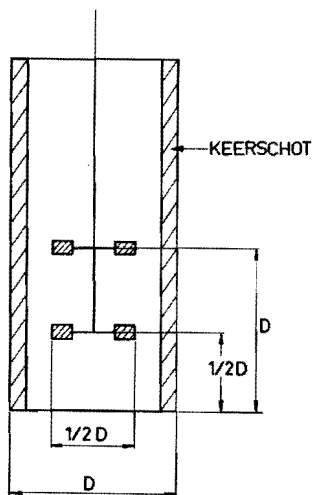


Fig. 8 Schema's van opstelling en regeling.



DOORSNEDE A-A

Fig. 9 Fermentatievat en roerder.

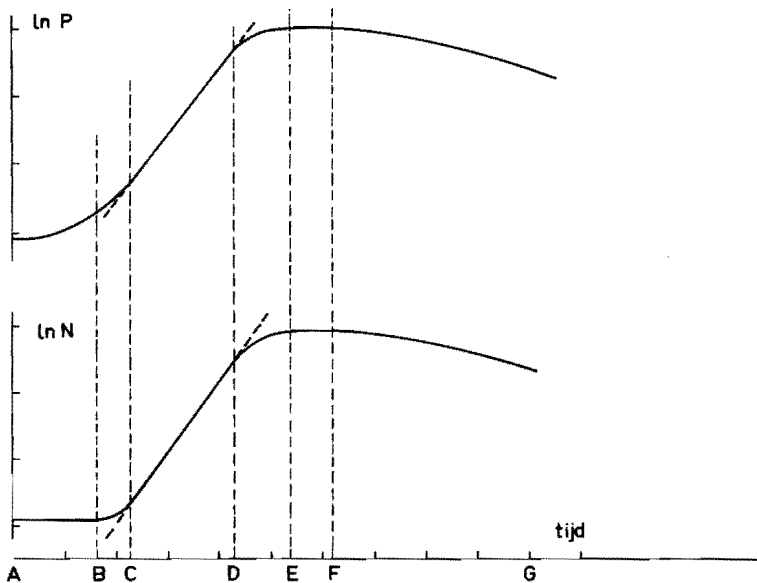


Fig. 10 Groeikrommen (schematisch).

Groei-krommen van Candida lipolytica C.B.S. 599. Toevoer : gasvormig n-alkaan.

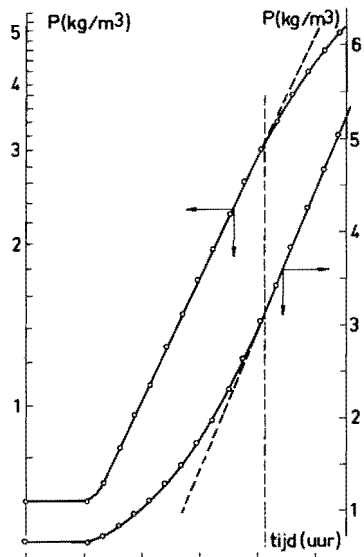


Fig. 11 Groei op n-hendecaan.

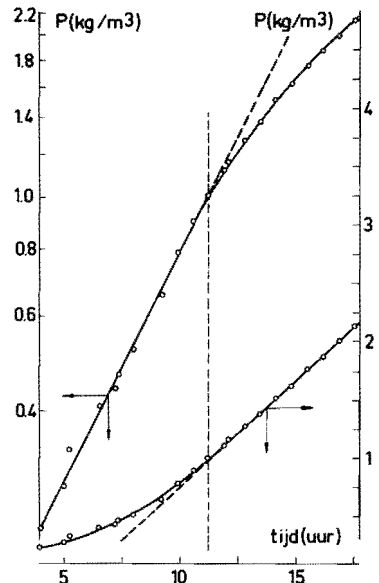


Fig. 12 Groei op n-dodecaan.

Groei-krommen van Candida lipolytica C.B.S. 599, voor groei op vloeibaar n-alkaan.

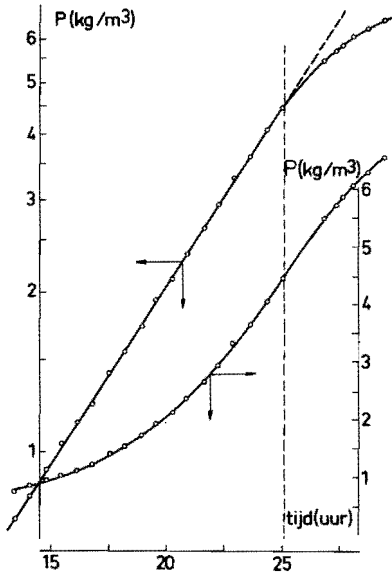


Fig. 13 Groei op n-tridecaan.
Toerental 23.3/s.

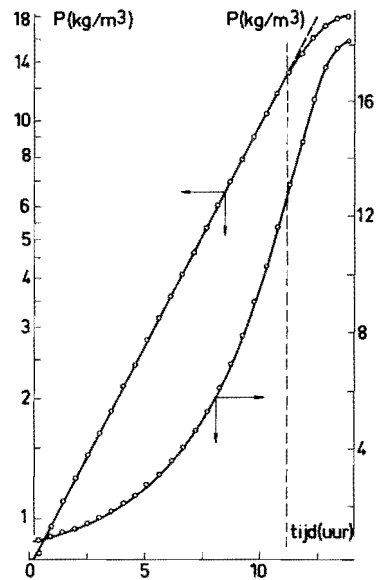


Fig. 14 Groei op n-hexadecaan.
Toerental 20.0/s.

Groei-krommen van Candida lipolytica C.B.S. 599, voor groei op vloeibaar n-alkaan.

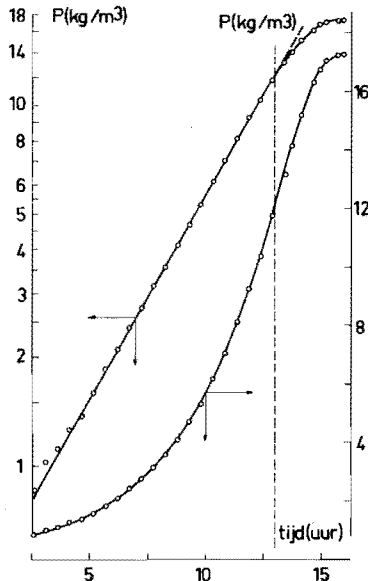


Fig. 15 Groei op n-hexadecaan.
Toerental 30.0/s

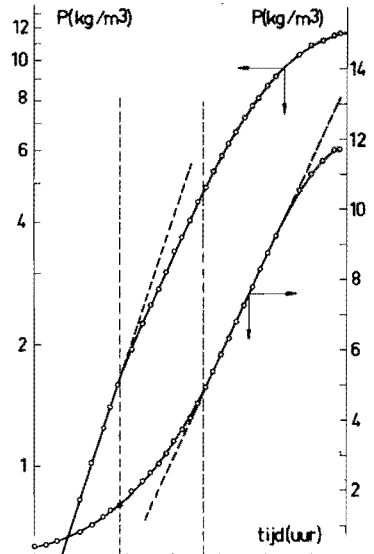


Fig. 16 Groei op n-hendecaan.
Toerental 20.0/s.

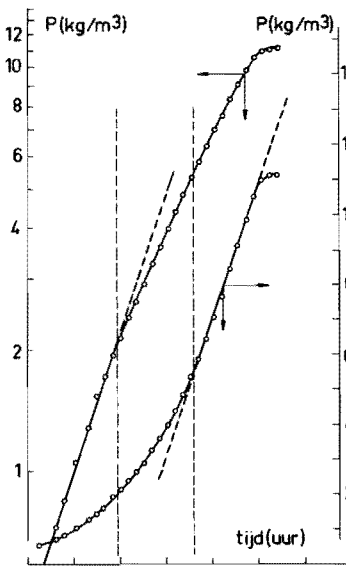


Fig. 17 Groei op n-hendecaan.
Toerental 23.3/s.

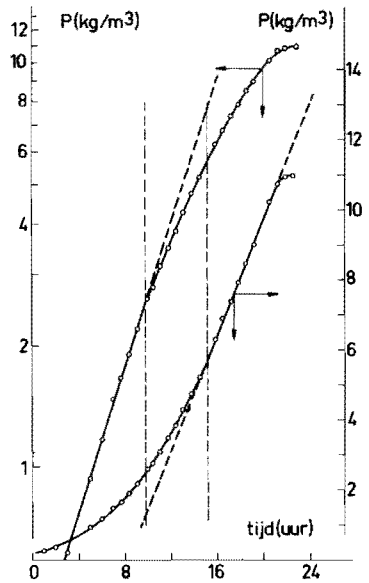


Fig. 18 Groei op n-hendecaan.
Toerental 26.7/s.

Groekrommen van Candida lipolytica C.B.S. 599, voor groei op vloeibaar n-alkaan.

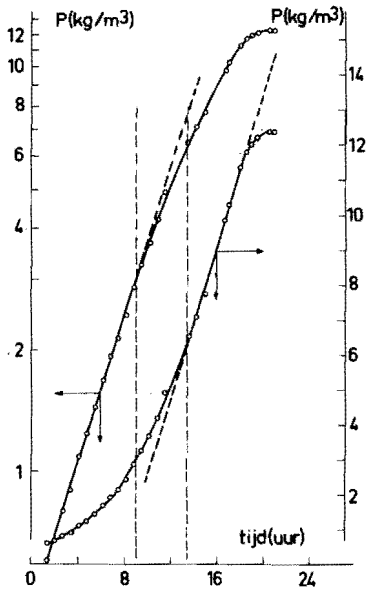


Fig. 19 Groei op n-hendecaan.
Toerental 30.0/s.

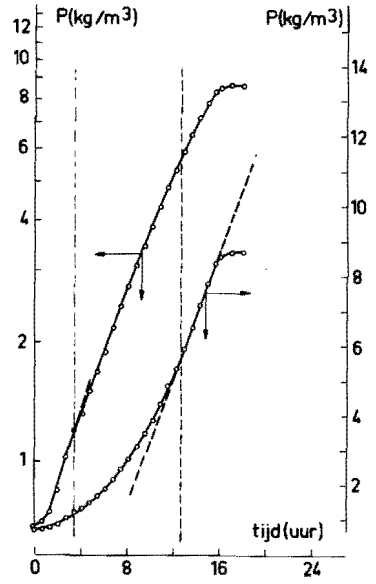


Fig. 20 Groei op n-dodecaan.
Toerental 23.3/s.

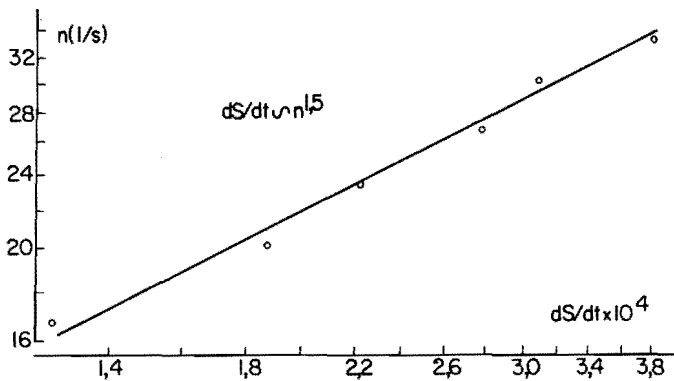


Fig. 21 $(dS/dt)_{1n}$, de omzettingssnelheid aan het einde van de exponentiële groeiperiode, als functie van het toerental.

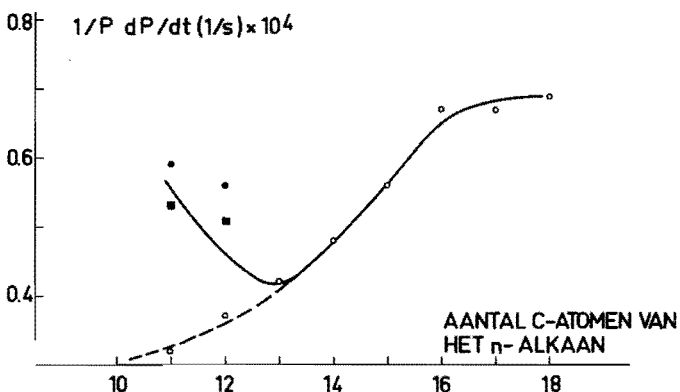


Fig. 22 Groeiselheidsconstante $1/P \frac{dP}{dt}$ als functie van de n-alkaanketenlengte.

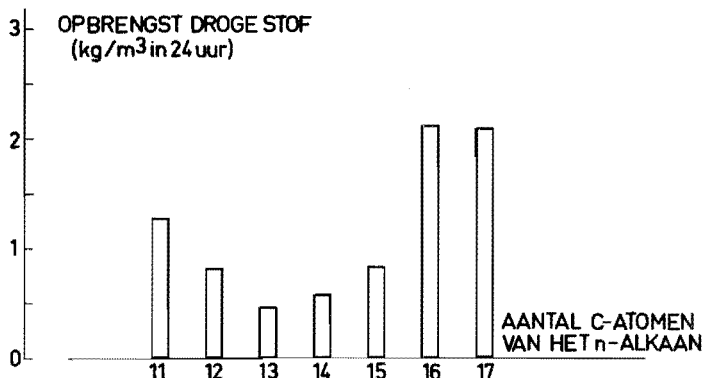


Fig. 23 Kolomendiagram van de opbrengst drogestof als functie van de n-alkaanketenlengte (schudculture).

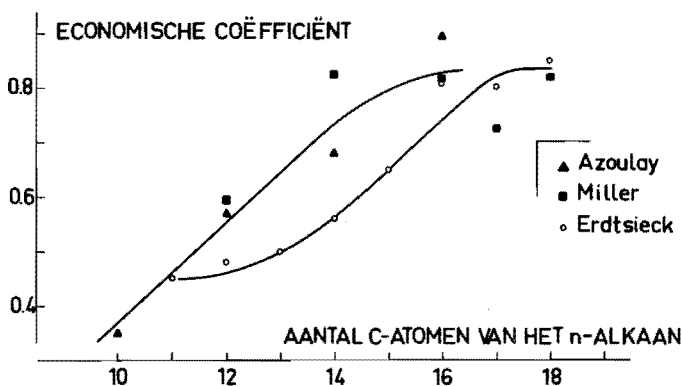


Fig. 24 Economische coëfficiënt als functie van de n-alkaanketenlengte.

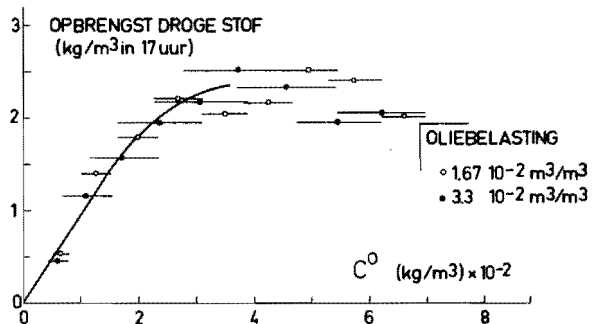


Fig. 25 Invloed oliebelasting.

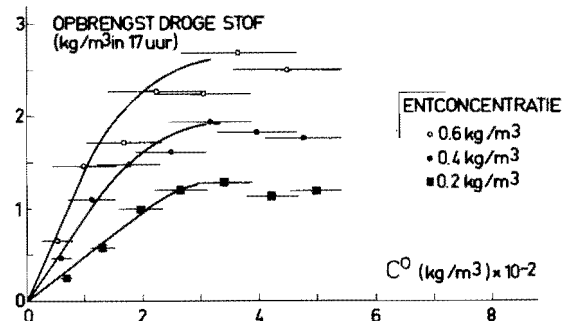


Fig. 26 Invloed entconcentratie.

Groei van Candida lipolytica C.B.S. 599 op n-tridecaan.

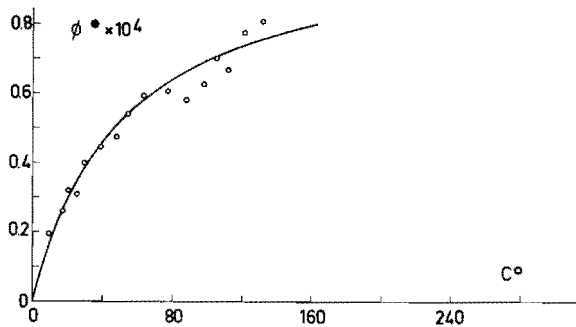


Fig. 27 Verzadigingskromme.

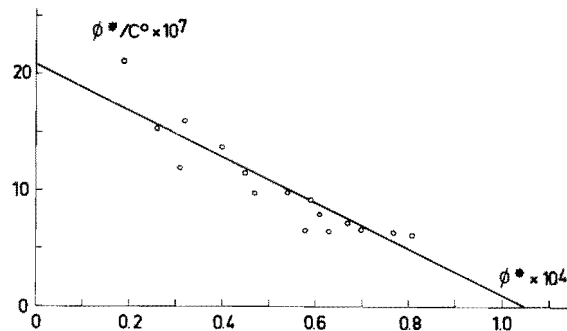


Fig. 28 Eadie-diagram.

Groei van Candida lipolytica C.B.S. 599 op n-hexadecaan.

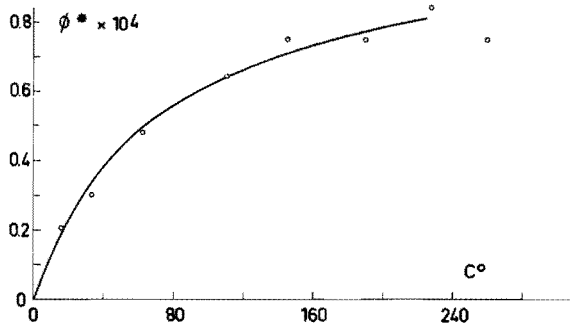


Fig. 29 Verzadigingskromme.

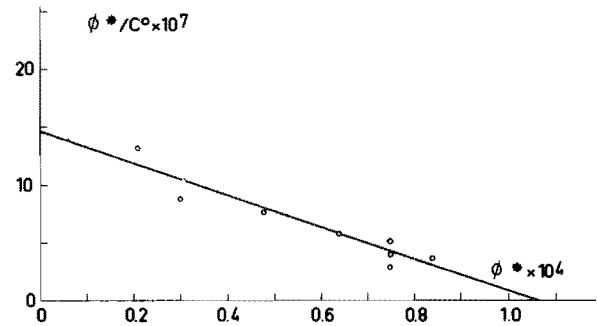


Fig. 30 Eadie-diagram.

Groei van Candida lipolytica C.B.S. 599 op n-nonadecaan.

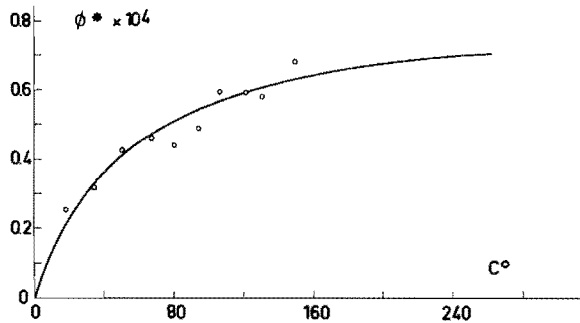


Fig. 31 Verzadigingskromme.

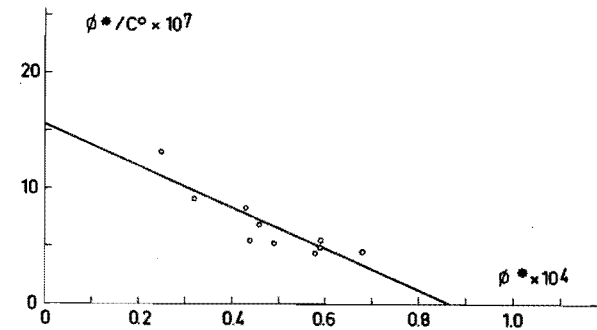


Fig. 32 Eadie-diagram.

Groei van Candida lipolytica C.B.S. 599 op n-hexadecaan.

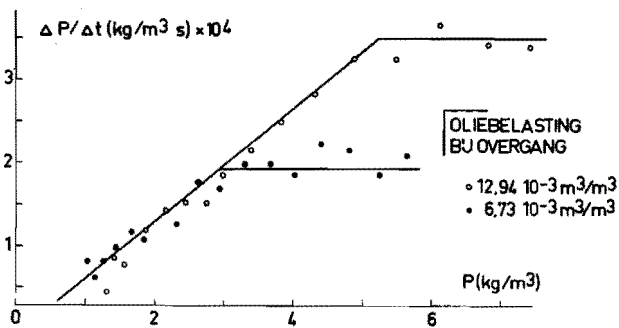


Fig. 33 Groeiselheid als functie van de drogestofconcentratie.

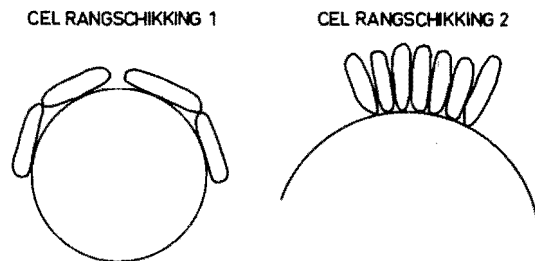


Fig. 34 Celrangschikking

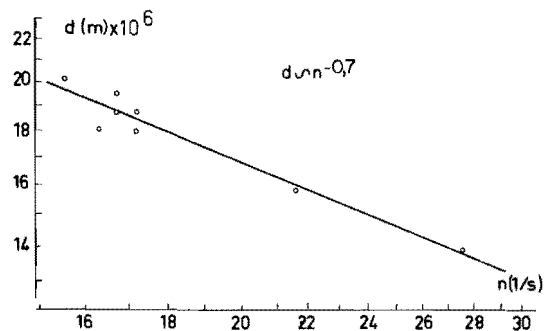


Fig. 35 Druppeldiameter als functie toerental Rangschikking 1.

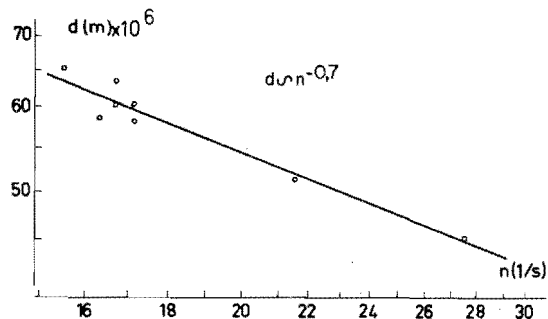


Fig. 36 Druppeldiameter als functie toerental Rangschikking 2.

Kolommendiagram van de opbrengst drogestof voor verschillende n-alkaanketenlengten bij groei van *Candida lipolytica* C.B.S. 599, in 'schudculture.

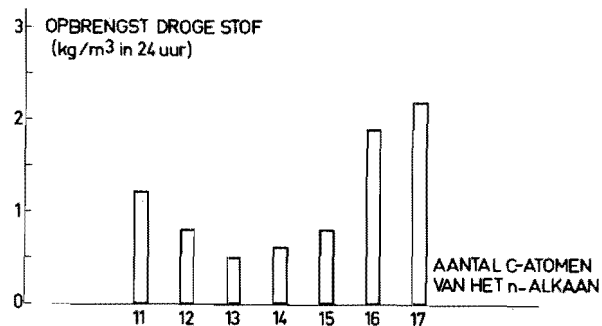


Fig. 37 Entmateriaal voorgekweekt op n-tetradecaan.

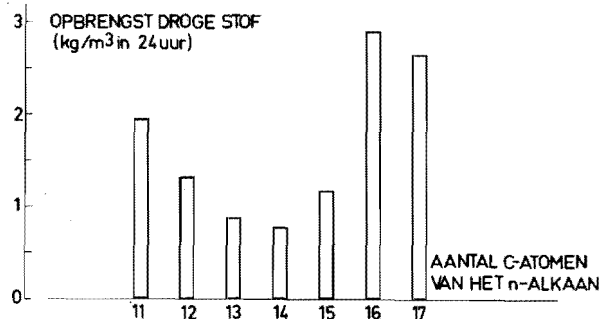


Fig. 39 Entmateriaal voorgekweekt op n-pentadecaan.

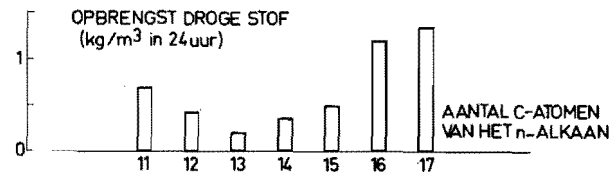


Fig. 38 Entmateriaal voorgekweekt op n-hexadecaan.

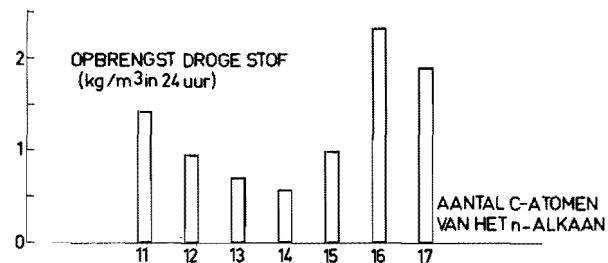


Fig. 40 Entmateriaal voorgekweekt op n-heptadecaan.



Fig. 41 Entmateriaal voorgekweekt op een mengsel van n-hendecaan tot en met n-hexadecaan.

Titratiekrommen voor de groei van *Candida tropicalis* C.B.S. 94 op koolhydraten. Aanvangsconcentratie glucose 15.4 kg/m^3 , aanvangsconcentratie galactose 15.4 kg/m^3 .

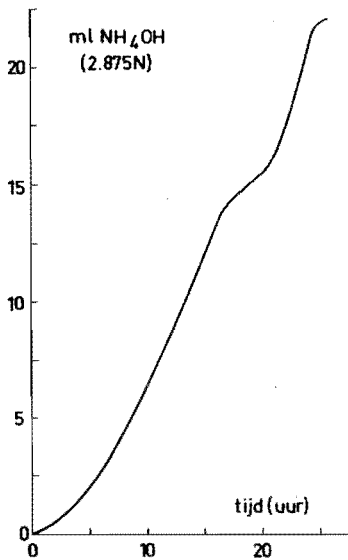


Fig. 42 Glucose/galactose.
Entmateriaal voorgekweekt op glucose.

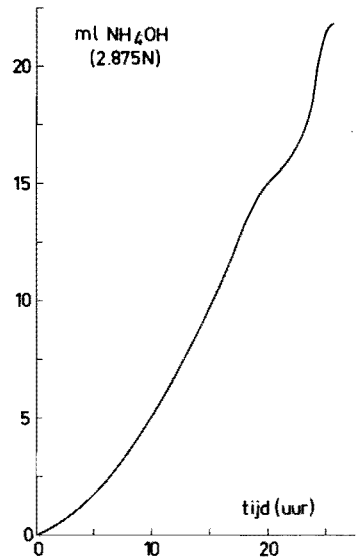


Fig. 43 Glucose/galactose.
Entmateriaal voorgekweekt op galactose.

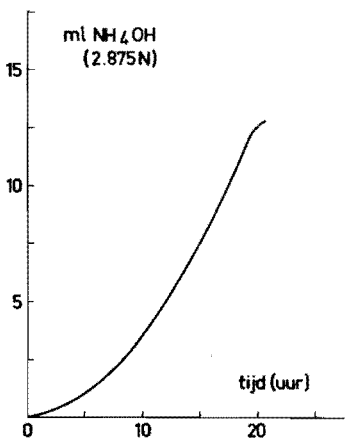


Fig. 44 Glucose.
Entmateriaal voorgekweekt op glucose.

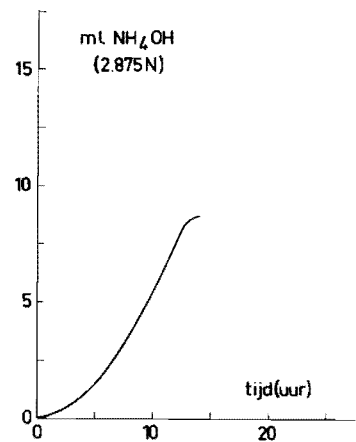


Fig. 45 Galactose.
Entmateriaal voorgekweekt op galactose.

Titratiekrommen voor de groei van Candida tropicalis C.B.S. 94 op mengsels van koolhydraat/koolwaterstof. Aanvangsconcentratie glucose 15.4 kg/m³, aanvangsconcentratie galactose 15.4 kg/m³, aanvangsbelasting n-hexadecaan 7.2 kg/m³.

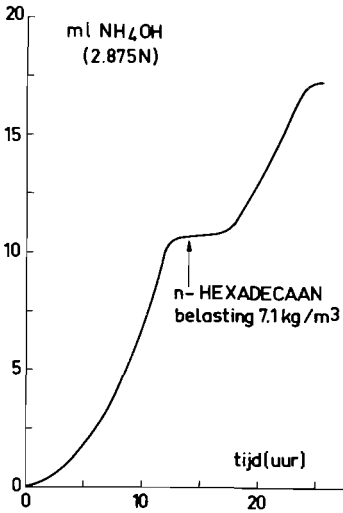


Fig. 46 Glucose/n-hexadecaan, voorkeek op glucose.

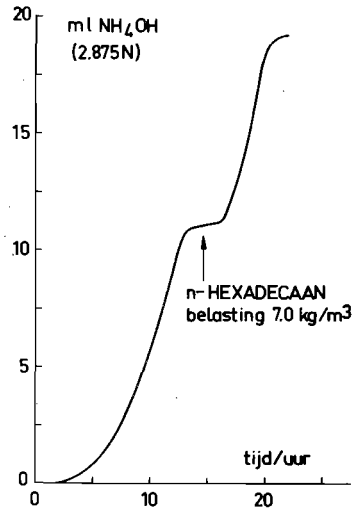


Fig. 47 Glucose/n-hexadecaan, voorkeek op n-hexadecaan.

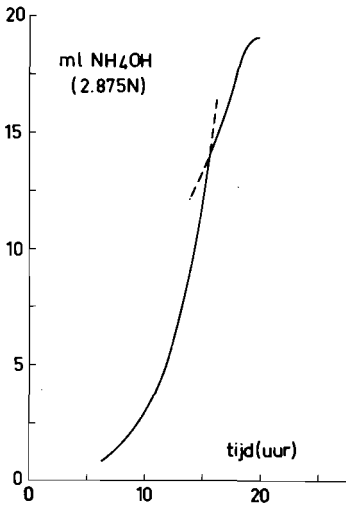


Fig. 48 Galactose/n-hexadecaan, voorkeek op galactose.

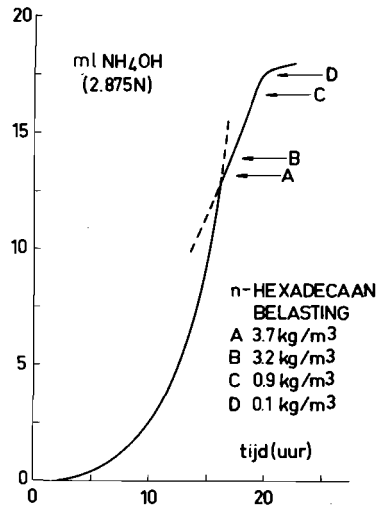


Fig. 49 Galactose/n-hexadecaan, voorkeek op n-hexadecaan.

Titratiekrommen van de groei van Candida lipolytica C.B.S. 599 op een mengsel van glucose/n-hexadecaan. Aanvangsconcentratie glucose 15.4 kg/m³. Aanvangsconcentratie n-hexadecaan 7.2 kg/m³.

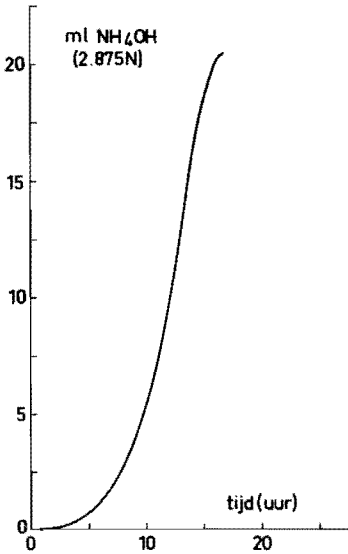


Fig. 50 Entmateriaal voorgekweekt op glucose.

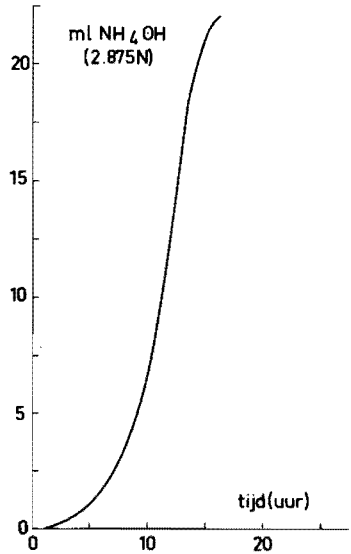


Fig. 51 Entmateriaal voorgekweekt op n-hexadecaan.

Titratiekrommen van de groei van Candida lipolytica C.B.S. 599 op mengsels van n-alkanen.

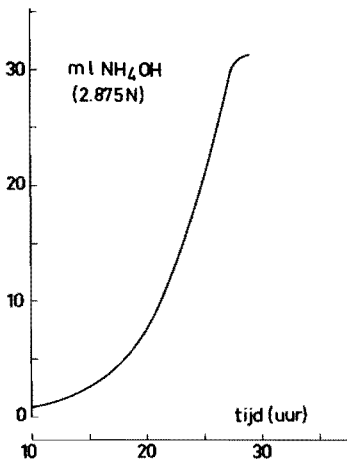


Fig. 52 Op n-dodecaan/n-hexadecaan, voorkweek op n-dodecaan.

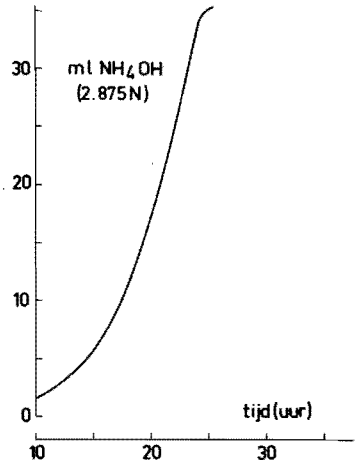


Fig. 53 Op n-tetradecaan/n-hexadecaan, voorkweek op n-tetradecaan.

Groei van *Candida lipolytica* C.B.S. 599 op een mengsel van n-pentadecaan/n-hexadecaan. Entmateriaal voorgekweekt op n-hexadecaan.

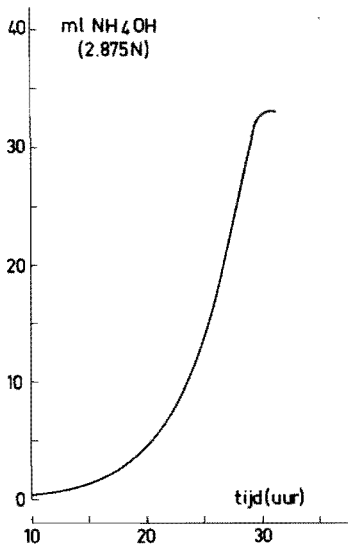


Fig. 54 Titratiekromme.

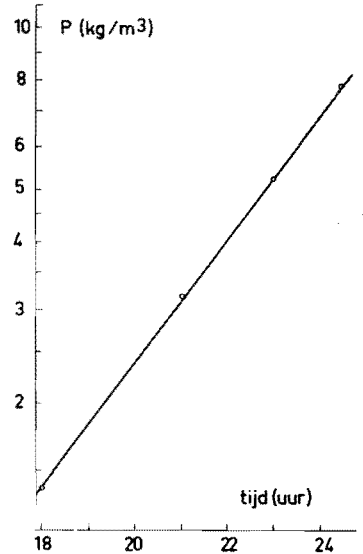


Fig. 55 Groeikromme.

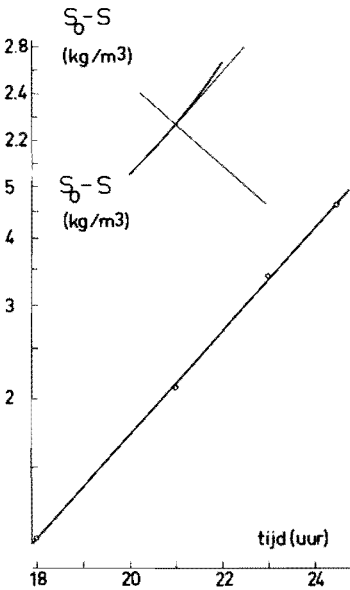


Fig. 56 Substraatkromme. Verbruik n-pentadecaan.

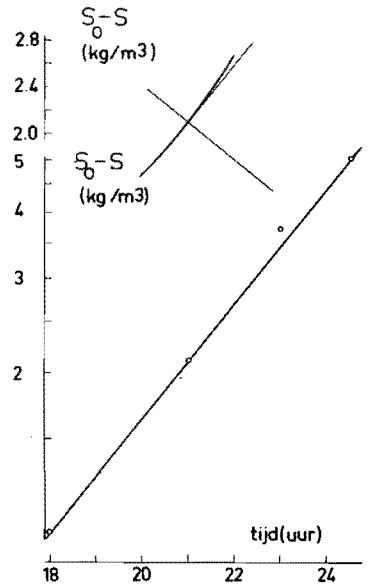


Fig. 57 Substraatkromme. Verbruik n-hexadecaan.

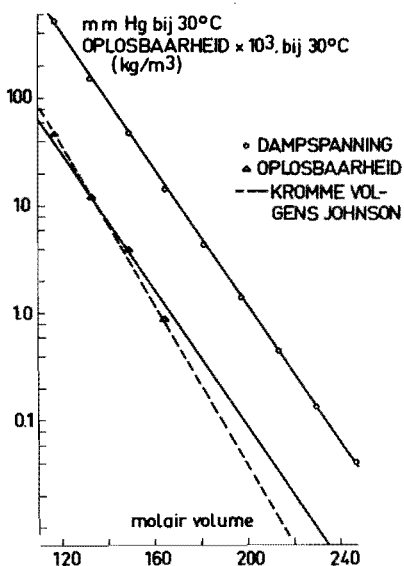


Fig. 58 Verband tussen oplosbaarheid n-alkanen en molaire volume.

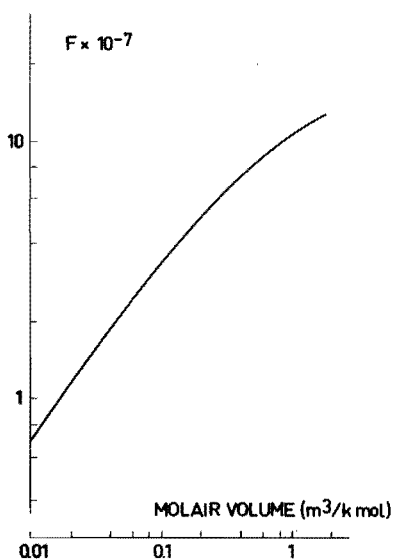


Fig. 59 De functie $F = T / ID \mu$ in afhankelijkheid van het molaire volume. Oplosmiddel : water.