
 総 説

半回分発酵の速度論*

昭和52年度学会賞受賞

山 根 恒 夫

京都大学工学部化学工学教室

1. はじめに

半回分発酵とは、発酵中、ある特定の制限基質（1成分または2成分以上でもよい）を発酵槽へ供給するが、目的生成物（菌体または菌体外代謝産物）は収穫時まで抜きとらないような発酵法である。この特性から考えると、本質的には回分発酵に属する発酵であり、その1つの変形とみなされよう。日本語では別名、流加法と呼ばれる。英語では semi-batch fermentation または fed-batch fermentation（菌体生産が主目的の場合は semi-batch culture または fed-batch culture）^{1,2)} と呼ばれ、extended culture という言葉も時として用いられている。^{3,4)} ドイツ語では, Zulaufs verfahren と呼ばれている。これらの呼称のうち、semi-batch という言葉は、反応工学では既に確立した用語となっているが、微生物反応の半回分操作においては、供給されるのは微生物に摂取される栄養物質である場合が多いので、fed-batch という言葉が一番適切のように思う。事実、最近の英文の報文ではこの言葉が多く見受けられ、ほぼ定着したと言ってよからう。

この発酵プロセスないし操作法で、一番古く（第1次世界大戦後であるという）また一番よく知られている例は、パン酵母製造においてアルコールの生成をできるだけ抑えるために、低糖濃度を維持するように糖を逐次的に添加する方法であろう。⁵⁾ 流加法によるパン酵母の製造は、後にみるように、今日でもいろいろ改良が加えられており、工業的に重要な半回分発酵プロセスである。歴史上、次いで現われたのは、ペニシ

リン発酵において、エネルギー源（たとえば、グルコース、フラクトースなど）とペニシリンの前駆体（たとえばフェニル酢酸）とを逐次添加する方法である。⁶⁾ 半回分発酵において、どのような栄養物を添加基質とし、どのように添加するかは、企業の know how に属する極秘技術であり、工業的半回分発酵の詳細を知ることには困難であるが、相当数の発酵がこの方法で行われているのではなかろうか。

半回分発酵の利点は、培養液中の供給基質濃度を任意に制御できることである。すなわち、回分発酵では、必要な培地成分はすべて、一度に前以って加えられ、それらの濃度はまったく制御されないで微生物まかせである。これに対して半回分発酵では、制限基質（類）は目的に応じて少しずつ供給されるので、培養液中の濃度を最適に制御できる。一方、連続培養（ケモスタット）では、制限基質も含めてすべての培地成分が一定の値に維持される。したがって、微生物の置かれている環境制御という視点からすると、半回分発酵は回分発酵と連続発酵との中間に位置する発酵であると言える。現在、雑菌汚染、フェージ汚染、あるいは突然変異などの問題により、工業的な連続発酵は、single-cell protein 生産など限られた発酵以外は実施されていないし、今後も当分は連続発酵が支配的となることはないであろう。ゆえに、回分プロセスの改良という観点から半回分発酵はますます重視されるであろう。

一般的に言って、ある培地成分の濃度の大小が生産性や収量に著しく影響されるような場合には半回分発酵が従来の回分発酵より有利である。そのような場合としては、次の6つの場合が挙げられる。

高菌体濃度培養⁷⁻⁹⁾ 1 l 当たり 50~150 g DCW 程度の高菌体濃度を達成しようとする時、それに必要

* Kinetic Studies on Fed-batch Fermentations. —A Monograph—YAMANÉ, T. (Department of Chemical Engineering, Kyoto University, Kyoto 606).

な栄養素を一度に仕込めば高濃度となり、たとえ通常は基質阻害を起こさないと考えられているような基質でも阻害的に作用する。よって、栄養素は流加しなければならない。

高濃度基質阻害のある場合^{3,10,11)} メタノール、酢酸、芳香族化合物など、比較的低い濃度でも増殖阻害を起こす基質の場合は、基質を流加することにより、誘導期の短縮と増殖阻害の軽減が期待される。

グルコース効果の存在する場合^{5,7)} 酵母(主としてパン酵母)の培養において、糖濃度が高くなりすぎると、たとえ溶存酸素が十分存在していても、糖からエチルアルコールが生成し、それだけ菌体の対糖収率が低下する。この現象は、グルコース効果あるいはCrabtree効果と呼ばれる。¹²⁾ よって、糖濃度は酵母の対糖収率低下をきたさない程度に低く抑えなければならない。パン酵母生産において、流加法が採用されるゆえんである。

異化物抑制 (catabolite repression) を受ける場合^{6,13-19)} グルコースのように容易に資化される炭素源で微生物を回分的に増殖させると、ある種の酵素、とくに異化代謝に関係する酵素(群)の生合成は抑制させる。この効果は異化物抑制 (catabolite repression) と呼ばれる。そのような酵素生合成の抑制効果に打ち勝つ1つの強力な手段が流加法であり、これによって、糖濃度を低下させ、増殖を抑え、酵素生成は脱抑制されるのである。また、ペニシリンなどの抗生物質の生合成代謝にも異化物抑制効果がみられ、流加法は収量の向上をもたらす。⁹⁾

栄養要求性変異株 (auxotroph mutant) を用いる発酵²⁰⁾ 栄養要求性変異株を用いる発酵では、要求される物質を過剰に加えると、菌体増殖のみが起こって、目的代謝産物の生成は少ない。一方、非常に不足の場合も菌体増殖は抑えられ、その微生物による代謝産物の生成は少ない。したがって、その中間に最適濃度があるはずであり、それを達成するためには半回分発酵を実施せねばならないであろう。

その他 *Eremothecium ashbyii* によるリボフラビン生産において、グルコースあるいはイノシトールあるいは両者の微量逐次添加により収量が増加するという報告がある。²¹⁾

さて、半回分発酵の要点は、基質濃度を制御することであるから、その中心的問題は、何を流加するかということと、いかに流加するかということである。後者には、いつ流加を開始するかという問題も含まれる。前者を決定するのは、微生物生理学、生化学、遺伝学の領域に属する。エンジニアリングは後者とかかわりがある。流加の仕方により、半回分発酵を分類することが可能である。Table 1に、1つの分類を示した。以下、この分類に従って、著者らの研究を中心に説明する。

2. フィードバック制御のない半回分発酵

この半回分発酵では、基質の流量はあらかじめ設定された通りに変化する。この方式は、次の思想的背景に基づいている。すなわち、フィードバック制御を伴わない方式でも、そのプロセスを表現する数式モデルが正確であり、接種菌の生理的条件や培養の初期条件を一定に保てば、培養経過が予期した状態から著しくはずれることはなく、再現性よく実施できる。通常の無機反応や有機反応に比較すれば、微生物反応は遅いので、このことは十分認めてよいであろう。また、フィードバック制御方式を採用するにしても、その制御系の設計にあたって、半回分発酵の数式モデルは多くの情報を提供する。

半回分発酵の最も簡単な数式モデルは次のようである。

$$\frac{d(vx)}{dt} = \mu \cdot vx \quad (1)$$

$$\mu = g(s) \quad (2)$$

$$\frac{d(vs)}{dt} = f_v s_f - \frac{1}{k_y} \frac{d(vx)}{dt} - m \cdot vx \quad (3)$$

$$\frac{dv}{dt} = f_v - k_{vap} \quad (4)$$

Table 1. Classification of fed-batch fermentation (or culture).

(A) without feed-back control	(B) with feed-back control
constantly fed-batch	{ indirectly directly
exponentially fed-batch	
optimized fed-batch	{ constant-value control program control optimal control
others	

$$\pi = h(\mu) = h\{g(s)\} \quad (5)$$

ただし,

$$\mu \equiv \frac{1}{vx} \frac{d(vx)}{dt} \quad (6)$$

$$\pi \equiv \frac{1}{vx} \frac{d(vp)}{dt} \quad (7)$$

(1) 式は微生物の増殖速度式であり, その中に含まれる比増殖速度 μ は (2) 式により培養液中の流加基質濃度 s の関数と考える. 体積変化がある場合, μ は (6) 式のようになる. すなわち, $(1/vx)d(vx)/dt$ が真の μ であり, これ以外にはない. (3) 式は流加基質に関する物質収支式であり, 右辺第 1 項は流入項を, 第 2 項は菌体生成速度から逆算した基質の消失を, 第 3 項は維持代謝のための基質消失を, それぞれ表す. さらに, 基質が揮発性の場合には, 通気による損失も考慮せねばならないかも知れない. なお, 流加基質を構成する主要な元素に関する収支(たとえば, 炭素収支)を考える場合には, 菌体の元素組成とすべての代謝産物とを考慮せねばならない. (4) 式は, 培養液体積の増加を表し, k_{vap} は通気によって廃気ガスとともに失われる単位時間当たりの水分である. 短時間の発酵においては, k_{vap} を考えなくてもよいが, 抗生物質発酵のように長時間を要する好気発酵では, 通気による水分蒸発も無視できない.²²⁾ なお, 嫌気発酵の場合は, $k_{vap}=0$ であることは自明である. (5) 式で, 発酵における速度論においてしばしば採用される考えに従い, 生産物の比生成速度 π が μ の関数であるとすると, (2) 式により μ は s の関数であるから, π は s の関数となり, (5) 式は, s を制御すれば π が制御できることを示している. (1)~(7)式は, 体積変化を考慮した場合の数式モデルであるが, 流加基質が液体である場合や, 基質が濃厚水溶液である場合には, 体積変化を無視してもさしつかえない発酵もあろう. その時は, (1) 式は $dx/dt = \mu x$ となり, (2) 式では $f_v s_f = f_s$ (質量流量) とおけばよく, (4) 式はなくなり, 数式モデルは簡単になる.

定流量半回分発酵 (Constantly fed-batch fermentation) f_v あるいは f_s が一定の場合で最も簡単な半回分発酵である. 従来の半回分発酵は大部分これに属する.^{2,6,13-18)} この半回分発酵の数学的解析は著者ら,^{2,23,24)} Pirt,²⁵⁾ Dunn と Mor²⁶⁾ によってなされ, ほぼ完成した. 著者らは, (1), (3), (4) ($k_{vap}=0$ を仮定した) 式を次式のような形で無次元化し, $g(s)$ として Monod 式 ($\mu = \mu_{max} s/(k_s + s)$) を適用して, 計算機を用いて数値積分し, 種々な初期条件・操作条件

によるこの培養系の挙動を調べた.

$$\left. \begin{aligned} X &= \frac{x}{x_0 + k_y/s_0} \\ S &= \frac{s}{s_0 + x_0/k_y} \\ \Theta &= \mu_{max} \cdot t \\ K_s &= \frac{k_s}{s_0 + x_0/k_y} \\ V &= v/v_0 \\ \hat{\mu} &= \mu/\mu_{max} \end{aligned} \right\} \quad (8)$$

一般に, 基質溶液が流入することによって培養液体積が増加するが, その影響(希釈効果)を基質自体の供給速度 ($=f_v s_f = f_s$) と独立に考えたのが著者らの解析の特徴である. すなわち,

$$\frac{dv}{dt} = 10^{-3} \left(\frac{f_w}{\rho_w} + c \frac{f_s}{\rho_s} \right) \quad (9)$$

f_s, f_w, c, m は次式で無次元化される.

$$\left. \begin{aligned} F_s &= \frac{f_s}{(s_0 + x_0/k_y)v_0\mu_{max}} \\ F_w &= \frac{10^{-3}f_w}{\rho_w v_0 \mu_{max}} \\ C &= \frac{10^{-3}c}{\rho_s} \left(s_0 + \frac{x_0}{k_y} \right) \\ F_v &= F_w + CF_s \\ M &= \frac{mk_y}{\mu_{max}} \end{aligned} \right\} \quad (10)$$

f_s を一定にして, f_w を変化させれば, 希釈の効果がわかる. 結果は, Fig. 1 に示すように, 時間対菌体総量の関係として最もよく整理できることがわかった. この流加方式の最大の特徴は, 直線増殖が起こることである. しかし, $S_0 > K_s$ か $F_s > 1.0$ の時は, その前に指数増殖期が現われる. Fig. 2 からわかるように, この指数増殖から, 直線増殖への移行はきわめて急激であり, 直線増殖期では μ はずっと低くなり, 時間的にあまり変化しない. 無次元菌体濃度 X は, Fig. 3 に示すように, 初期条件と希釈の程度によっていろいろな場合が起こり, 減少することもある. また, $F_s = F_v$ の時は, 時間が経過すると $X=1.0$ となり, 菌体濃度が時間的に変化せず一定となる. とくに, $X_0=1.0, F_s = F_v$ の時は最初から $X=1.0$ となる. Pirt は, このように, 定流量半回分培養において菌体濃度が時間的に変化しない状態を「準定常状態」と名付けた.²⁵⁾ しかし, 菌体濃度が時間的に変化するかどうかは, 微生物の増殖の程度と希釈の程度の大小によって決まるのであって, 微生物の置かれている環境の状態からすると, 後

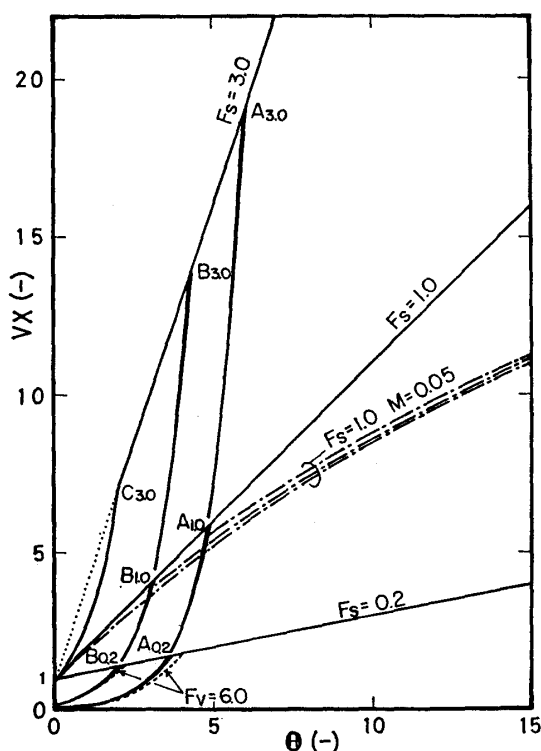


Fig. 1. Total cell mass, VX , as a function of time, Θ , for $K_s=0.005$ and $F_s=3.0, 1.0$ or 0.2 . The solid lines are for $F_v=0.0\sim 2F_s$ and $M=0.0$. The broken lines are for $F_s=0.2, F_v=6.0$ and $M=0.0$. The chained lines are for $F_s=1.0, F_v=0.0\sim 2.0$ and $M=0.05$. The symbols A, B and C show transition points from exponential growth phase to linear growth phase.

述するように、直線増殖期では $S \approx \text{const.}$ であるから、準定常状態にあると言える。 S の経時変化を Fig. 4 に示す。この図より、 S は指数増殖から直線増殖へ移行する時点できわめて急激に(数百分の一に)減少すること、直線増殖期においては、 S は K_s より低いところでゆるやかに減少しその値は F_v にはよらないこと、などがわかる。 F_s を変えた時、直線増殖期における S がどのように変化するかは興味あるが、Fig. 5 からわかるように、 F_s を 0.1 から 100 まで変えても、 S はいずれも K_s より低くさほど変わらないと言える。

以上の数値計算の結果に基づき、定流量流加法を2つの増殖期に分け、それぞれについて近似式に導いた。まとめて Table 2 に示す。

次に、Table 2 の不等式や近似式が実際の程度有効かどうかを検証するため、グリセリンあるいはその水溶液を定流量で供給し、*Enterobacter cloacae* NCIB 8271 を培養した。グリセリンを選んだのは、水と完全に混合する液体であるから、基質のみの流加から希

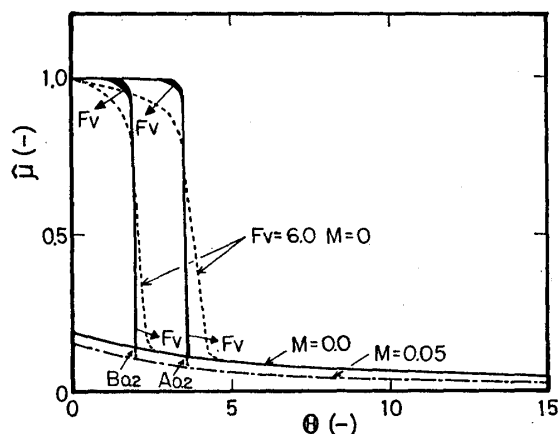


Fig. 2. Variation in dimensionless specific growth rates μ with dimensionless time Θ for the case of $K_s=0.005$ and $F_s=0.2$. The solid lines are for $F_v=0.0, 0.1, 0.2$ or 0.4 and $M=0.0$. The broken lines are for $F_v=6.0$ and $M=0.0$. The chained lines are for $F_v=0.0, 0.1, 0.2$ or 0.4 , $M=0.05$ and $X_0=1.0$. The values of μ in the exponential growth phase for $F_v=0.0, 0.1, 0.2$ or 0.4 , $M=0.05$ and $X_0=0.05$ or 0.2 are almost the same as those for $M=0.0$ and the corresponding values of F_v and of X_0 .

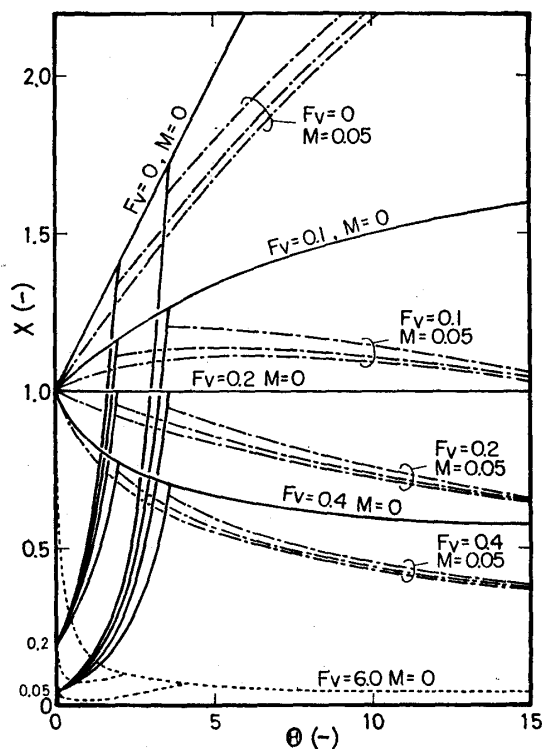


Fig. 3. Time-course of dimensionless cell concentration, X for $K_s=0.005$ and $F_s=0.2$. The values of X in exponential growth phase for $M=0.05$ agree with those for $M=0.0$.

薄水溶液の流加まで広い範囲が取れ、流量と流加液中の濃度とを組み合わせればほとんどあらゆる場合がカ

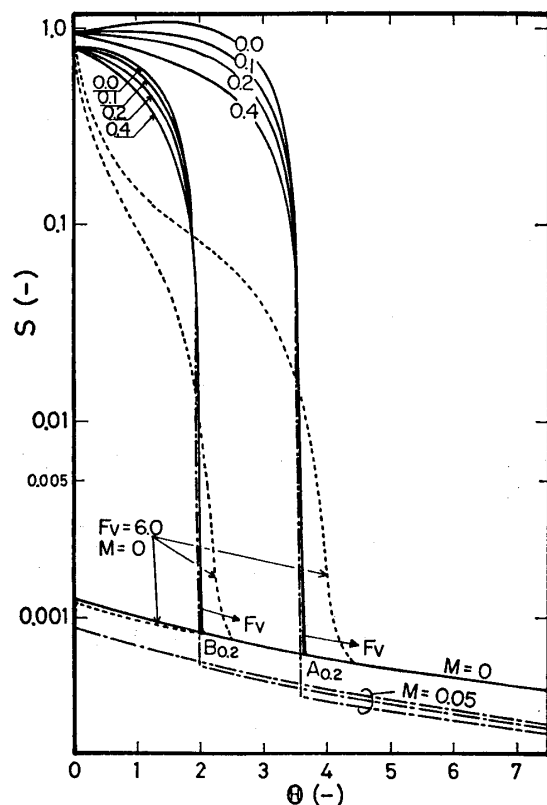


Fig. 4. Relationship between S and Θ for the case of $K_s=0.005$, $F_s=0.2$, $F_v=0.0, 0.1, 0.2, 0.4$ or 6.0 and $M=0.0$ or 0.05 . The figure on each line represents the value of F_v . The broken lines are for $K_s=0.005$, $F_s=0.2$, $F_v=6.0$ and $M=0.0$. The chained lines are for $K_s=0.005$, $F_s=0.2$ and $M=0.05$. The values of S in exponential growth phase for $M=0.0$, but are omitted here.

バーできるからである。Fig. 6 と Fig. 7 は希釈しないで、グリセリンのみを流加した場合である。 x, s の経時変化の実測値と近似式とはよく一致している。特徴的なことは、指数期から直線期へ移行する時点で DO が急激に増加することである。このことは、すべての実験において認められ、定流量流加法における培養経過のモニタリングとしてきわめて有効である。Fig. 8 と Fig. 9 は、グリセリン水溶液を流加した場合である。希薄溶液を多量に流加すると、指数増殖期でも x は減少する。Fig. 10 は x がほぼ一定となった例である。条件により、他にもいろいろ経時変化のパターンがあるが、どのような場合でも、Table 2 の近似式がよく適用できた。これらの近似式や不等式は、定流量半回分培養の設計・運転に有効である。

なお、Pirt は、半回分発酵で収穫時に発酵液を一部残し、同じ発酵槽内で次の半回分発酵の種菌として使

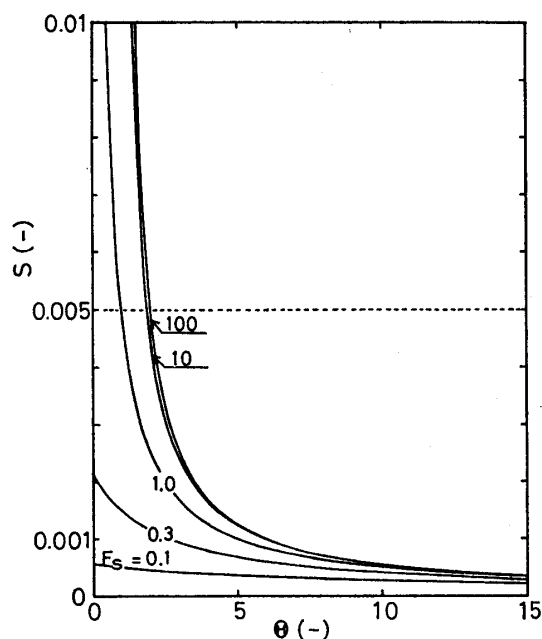


Fig. 5. Time-course of S in linear growth phase with each value of F_s as parameter for the case of $K_s=0.005$.

い、これを繰り返すような操作法を“Repeated fed-batch fermentation (culture)”と呼び、通例の回分発酵と生産性について理論的に比較検討している。^{25, 27)} また、定流量半回分培養により微生物の維持代謝係数 m が実測できる。²⁸⁾

定流量半回分培養では直線増殖が起こることは、古くから報告されている。^{29, 30)}

指数的流加法 (Exponentially fed-batch culture)
微生物の増殖は理想的には時間に関して指数関数的であり、ケモスタッドでは流量によって s を制御し μ を一定に保っている。よって、半回分操作によっても μ を一定に保つよう s を制御できるはずである。(1)～(4)式において、微生物が指数的に増殖するための条件は次のようである。

体積増加を考慮した場合：

$$\left. \begin{aligned} s_0 &= g^{-1}(k) \\ f_v &= \frac{k/k_y + m}{s_f - s_0} v_0 x_0 e^{kt} \end{aligned} \right\} \quad (11)$$

体積増加が無視できる場合：

$$\left. \begin{aligned} s_0 &= g^{-1}(k) \\ f_s &= (k/k_y + m) v_0 x_0 e^{kt} \end{aligned} \right\} \quad (12)$$

(11), (12)式からわかるように、流量を時間に関して指数関数的に増加させることになるので、このタイプの半回分操作を指数的流加法と呼ぶことにする。この操作方式では、

Table 2. The equations characteristic of constantly fed-batch culture.

- 1) The condition for attaining linear growth from the start of substrate-feeding:

$$\left. \begin{array}{l} s_0 \approx 0 \\ f_s \leq x_0 v_0 \mu_{max} / k_y \end{array} \right\} \quad (1)$$

- 2)
- x
- and
- s
- in the exponential growth phase:

$$x = \frac{v_0 x_0 \exp(\mu_{max} t)}{10^{-3}(f_w/\rho_w + cf_s/\rho_s)t + v_0} \quad (2)^*$$

$$s = \frac{f_s t + v_0(s_0 + x_0/k_y) - (v_0 x_0/k_y) \exp(\mu_{max} t)}{10^{-3}(f_w/\rho_w + cf_s/\rho_s)t + v_0} \quad (3)^*$$

- 3)
- x
- and
- s
- in the linear growth phase (
- $m=0$
-):

$$x = \frac{k_y \{f_s t + v_0(s_0 + x_0/k_y)\}}{10^{-3}(f_w/\rho_w + cf_s/\rho_s)t + v_0} \quad (4)^*$$

$$s = \frac{k_s f_s}{(\mu_{max} t - 1)f_s + \mu_{max} v_0(s_0 + x_0/k_y)} \quad (5)$$

- 4)
- x
- and
- s
- in the succeeding growth phase with the case of
- $m \neq 0$
- :

$$x = \frac{f_s/m - (f_s/m - v_T x_T) \exp\{-mk_y(t-t_T)\}}{10^{-3}(f_w/\rho_w + cf_s/\rho_s)t + v_0} \quad (6)^*$$

$$s = \frac{k_s m k_y (f_s/m - v_T x_T) \exp\{-mk_y(t-t_T)\}}{\mu_{max} f_s/m - (f_s/m - v_T x_T)(mk_y + \mu_{max}) \exp\{-mk_y(t-t_T)\}} \quad (7)$$

- 5) Equation of the transition time,
- t_T
- :

$$v_0 x_0 \exp(\mu_{max} t_T) = k_y f_s t_T + v_0(x_0 + s_0 k_y) \quad (8)$$

* In these equations, $f_v t + v_0$ can be substituted for $10^{-3}(f_w/\rho_w + cf_s/\rho_s)t + v_0$ with good approximation.

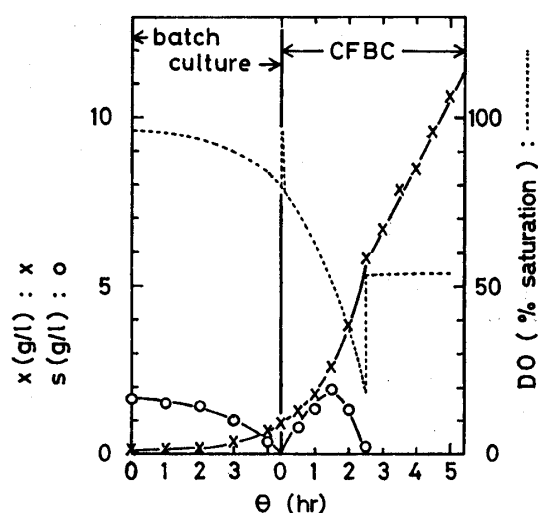


Fig. 6. Time course of a batch culture followed by a constantly fed-batch culture. In the constantly fed-batch culture undiluted glycerol was fed into the fermentor and the initial glycerol concentration was nearly zero ($f_s=9.20$ g/hr, $f_w=0.0$ and $v_0=2.84$ l). The solid lines passing through the experimental data of x in the exponential and in the linear growth phases represent eqs. (2) and (4) in Table 2, respectively. The solid line passing through the experimental data of s in the exponential growth phase of the constantly fed-batch culture represents eq. (3) in Table 2.

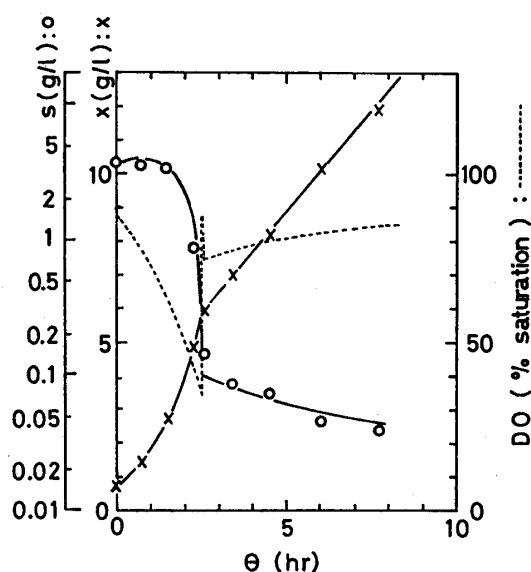


Fig. 7. Time course of a constantly fed-batch culture with undiluted glycerol feed into the fermentor and the initial glycerol of 4.0 g/l ($f_s=5.38$ g/hr, $f_w=0.0$ and $v_0=2.90$ l). The solid lines passing through the experimental data of x in the exponential and in the linear growth phases represent eqs. (2) and (4) in Table 2, respectively. The solid line passing through the experimental data of s in the exponential growth phase represents eq. (3) in Table 2. The solid line passing through the experimental data of s in the linear growth phase represents eq. (5) in Table 2 assuming $k_s=0.345$ g/l.

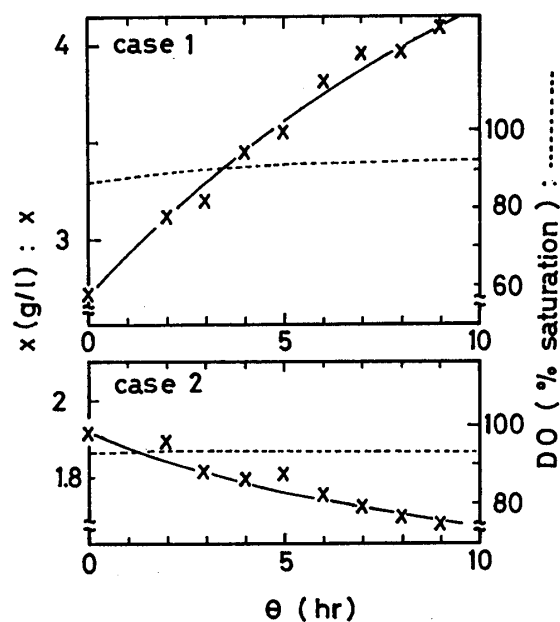


Fig. 8. Time courses of constantly fed-batch cultures with feeding of dilute aqueous solution of glycerol and the initial glycerol concentrations of almost zeros (case 1: $f_s=0.793$ g/hr, $f_w=98.5$ g/hr and $v_o=1.90$ l; case 2: $f_s=0.207$ g/hr, $f_w=103$ g/hr and $v_o=1.95$ l). The solid lines passing through the experimental data of x represent eq. (4) in Table 2.

- (i) $s=s_0$ となり s は培養期間中一定に保たれる。
- (ii) $\mu=k$ となり, μ は $k \leq \mu_{max}$ の範囲で外部から任意に制御できる。

という2つのユニークな特徴がある。この2点からして、指数的流加法はケモスタットに類似している。

このタイプの流加法は、パン酵母の培養において、一定の時間に増殖する菌体量から必要糖蜜量を計算し添加する方式に起源を発する。⁵⁾ また、Martin と Falsenfeld は、指数関数的に基質の添加を増加すれば、微生物はその添加の指数と等しい値の μ で増殖することを示した。³¹⁾ しかし、この流加法に関する前述のような数学的解析は、著者ら¹⁰⁾ や Lim ら³²⁾ によってなされ、ほぼ完成した。

この流加法は、メタノールのように、高濃度では誘導期の延長と増殖速度の低下を示す基質を用いて、最短の時間で可能な限り多量の菌体を得るのに適している。¹⁰⁾ 著者らは、さらに、このような高濃度基質阻害のある場合の指数的流加法は、 s が $dg(s)/ds > 0$ の範囲では安定、 $dg(s)/ds \leq 0$ の範囲では不安定であることを理論・実験面から示した。Fig. 11, Fig. 12 はそれぞれ $k=0.17$ hr⁻¹, 0.09 hr⁻¹ に設定し $dg(s)/ds > 0$ の範囲でメタノールを流加基質とした実施例である。い

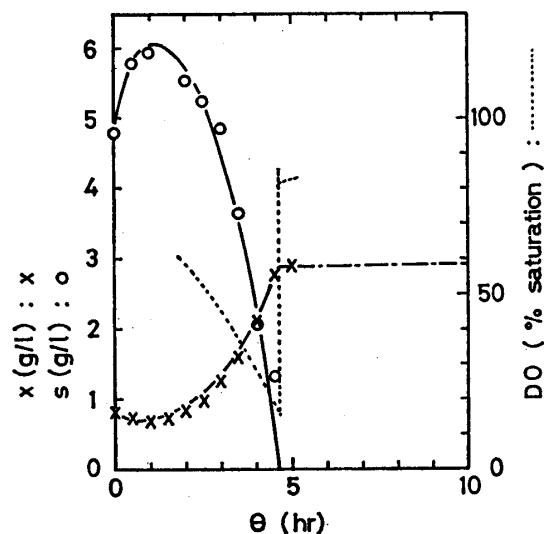


Fig. 9. Time course of a constantly fed-batch culture with feeding of very dilute aqueous solution of glycerol ($f_s=7.30$ g/hr, $f_w=805$ g/hr and $v_o=0.65$ l).

The solid lines passing through the experimental data of x and of s represent eqs. (2) and (3) in Table 2, respectively.

The chained line represents the theoretical variation in cell concentration estimated by eq. (4) in Table 2.

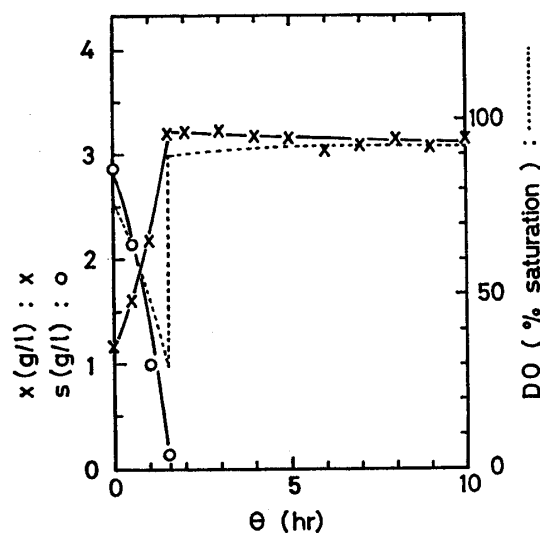


Fig. 10. Time course of constantly fed-batch culture in which a "quasi-steady state" was attained ($f_s=0.367$ g/hr, $f_w=91.5$ g/hr and $v_o=1.86$ l).

The solid lines passing through the experimental data of x in the exponential and in the linear growth phases represent eqs. (2) and (4) in Table 2, respectively. The solid line passing through the experimental data of s represents eq. (3) in Table 2.

ずれも、 $\mu=k$ となり、かつ、 $s=\text{const.}$ となっている。Fig. 13 は $dg(s)/ds < 0$ の範囲で実施した例である。 s

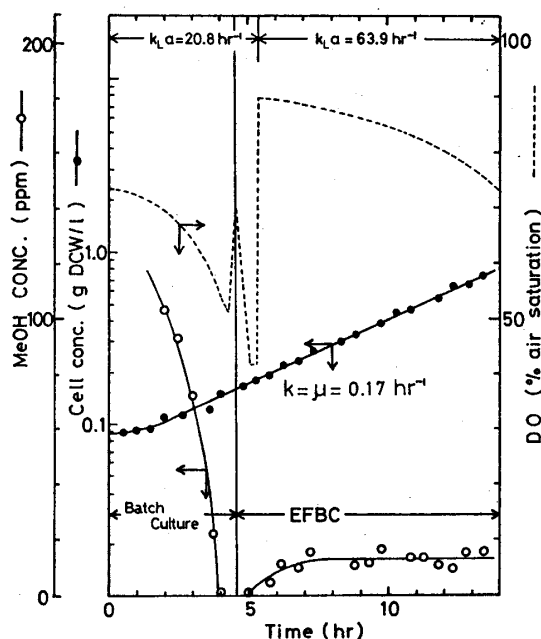


Fig. 11. Example of the time course of exponentially fed-batch culture (EFBC) in stable region, which follows a batch culture. Conditions: $k=0.17 \text{ hr}^{-1}$, $x_0=0.15 \text{ g/l}$ and $k_y=0.3 \text{ g/g}$.
—●—: Cell concentration, —○—: Methanol concentration.

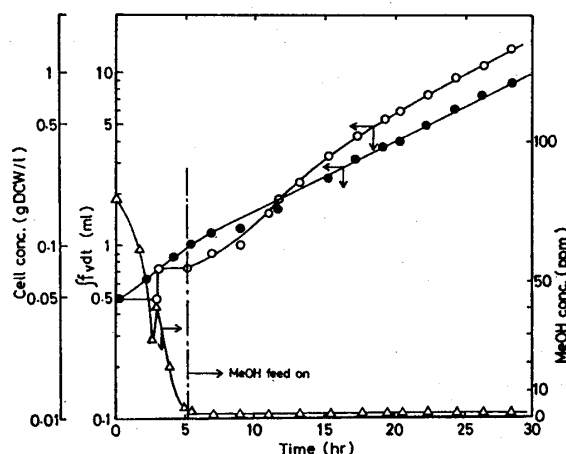


Fig. 12. Time course of exponentially fed-batch culture in stable region. Conditions: $k=0.09 \text{ hr}^{-1}$, $x_0=0.098 \text{ g/l}$, and $k_y=0.3 \text{ g/g}$.
—●—: Cell concentration, —△—: Methanol concentration, —○—: Integral amount of methanol feed.

は一定とはなっていない。

(11)式あるいは(12)式に従って流加すれば、理想的には $vx=v_0x_0e^{kt}$, $s=s_0$ (const.) となるわけであるが, s_0 と初期流量 f_{s0} を正確に設定することや, パラメータ k_y , k , v_0 , μ_{max} を正確に求めることは困難であって,

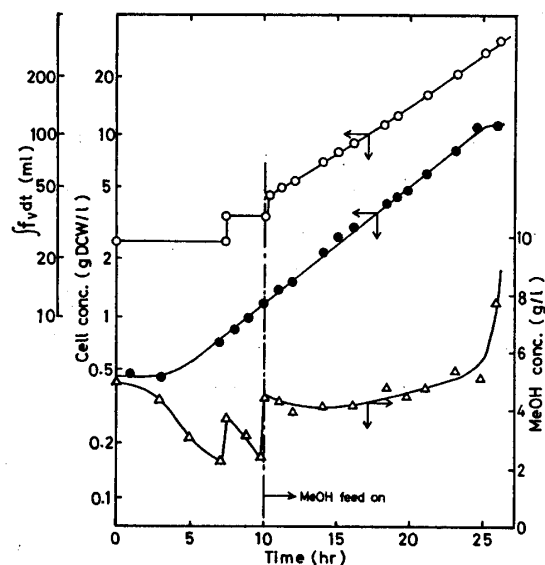


Fig. 13. Time course of exponential fed-batch culture in unstable region. Conditions: $k=0.16 \text{ hr}^{-1}$, $x_0=1.16 \text{ g/l}$, and $k_y=0.3 \text{ g/g}$.
—●—: Cell concentration, —△—: Methanol concentration, —○—: Integral amount of methanol feed.

どうしても大なり小なり不確かさ(誤差)を含む。Kishimoto は, システムパラメータや初期条件の不確かさが, システムの挙動(理想状態としての指数増殖からの偏倚)にどのように影響するかを感度解析の手法を用いて明らかにした。³³⁾ 最も正確に求めたり設定しなければならないのは, μ_{max} と k とである。

一般に, 細胞内に存在する物質を短時間で多量に生産しようとするれば, μ_{max} 附近で, 指数的流加法を行い, 最終菌体濃度を可能な限り増大させることである。メタノール酸化性菌によるビタミン B₁₂ の生産がこの例である。著者らは, バクテリアの1株を指数的流加法で培養し, 50時間でビタミン B₁₂ 2.46 mg/l という成績を得た。¹⁰⁾ この値は, 当時としては, 非糖類を炭素源として得られたビタミン B₁₂ 生産発酵の既往の研究よりはるかに高い値であった。

最適化半回分発酵 (Optimized fed-batch fermentation) 前述の2種類の流加法は, 基本的なものとして意義があるが, 半回分発酵により菌体外に分泌する代謝産物を生産しようとする場合, 流量は目的に応じて最適に変化させるべきである。このように最適化された半回分発酵を最適化半回分発酵と呼ぶことにする。Fishman と Biryukov は, ペニシリン発酵に対する数式モデルを提出し, 与えられた時間内で最大収量を得るためのグルコース溶液の最適流量変化を

決定した.³⁴⁾ 提出したモデルには, パラメーターが9個含まれ, その数値の決定, および最適化には相当な計算が必要であったと想像される. Ohno らは, 以前彼らが実験で決定した数式モデルを使って, リジン発酵の半回分操作を最適化した.²⁰⁾ 適用された数学的手法は, グリーン定理を基礎にした試行法である.

著者らは, 半回分発酵の最適化を工学的観点から一般的に論じた.³⁵⁾ システム方程式 (1)~(7) 式 (ただし, (4) 式において $k_{vap}=0$ と仮定) において, 初期条件 $x=x_0, v=v_0$, を与えて, $f_v \geq 0, vx \leq (vx)_{\max}$ という束縛条件下で収量もしくは生産性を最大にするには, s_0 をいくらし f_v をどのように変化させるべきかを考える. すなわち,

$$J = v_f p_f = \int_0^t h(\mu) \cdot vx \cdot dt \longrightarrow \max. \quad (13)$$

ただし, t_f は固定.

$$J/t_f = v_f p_f / t_f \longrightarrow \max. \quad (14)$$

ただし, t_f は自由.

(1)~(7), (13), (14) 式は次の4つの特徴を持っている:

- (i) x はいつも v との積として現われる.
- (ii) 目的関数の (13) 式あるいは (14) 式は μ と vx とのみに依存し, t や f_v を陽関数的に含まない.
- (iii) システム方程式 (1) は μ と vx のみの関数で, t や f_v を陽関数的に含まない.
- (iv) v は次式のように μ と vx の関数として表せる.

$$v = \frac{\{g^{-1}(\mu_0) - s_f\} v_0 - \int_0^t (\mu/k_g + m) \cdot vx \cdot dt}{g^{-1}(\mu) - s_f} \quad (15)$$

これらの特徴より, $f_v \geq 0$ という束縛条件をひとまず置くと, 問題を単純化できる. すなわち, (1) 式と (5) 式だけを用いて, μ を操作変数, vx を状態変数として, 最適な μ を決定する方法である. 単純化された問題を一般的に解くため次のように無次元化する:

$$X = vx/v_0 x_0, \quad u = \mu/\mu_{\max}, \quad T = \mu_{\max} \cdot t \quad (16)$$

問題は,

$$\frac{dX}{dT} = uX \quad (17)$$

$$J_f = \int_1^T h_1(u) X dT \quad (18)$$

(17) 式をシステム方程式とし, (18) 式で定義される J_f または J_f/T_f を最大にする $u(T)$ を求めることである. ただし, 次のような束縛条件がある.

$$X_0=1, 0 \leq u \leq 1, 1 \leq X \leq X_{\max} \quad (19)$$

最適な $u(T)$ と $X(T)$ が求まるとそれを (15) 式に代入して $v(t)$ が求まり, (4) 式よりそれを t に関して微分することにより $f_v(t)$ が始まる. 詳細は原報³⁵⁾ にゆずるが, 解は次の3つのパターンのうちいずれかである:

$$(A) \quad u_{opt} = u^* \quad 0 \leq T \leq T_f \quad (20)$$

$$(B) \quad \left. \begin{array}{l} u_{opt} = 1 \quad 0 \leq T \leq T_s \\ u_{opt} = u^* \leq u_s \quad T_s \leq T \leq T_f \end{array} \right\} \quad (21)$$

$$(C) \quad u_{opt} = \text{const.} \quad 0 \leq T \leq T_f \quad (22)$$

X 対 u の位相面で示すと Fig. 14 のようである. u^* は次式で与えられる.

$$\int_{u_s}^u \frac{h_1''(u)}{h_1(u) - h_1'(u)u} du = T - T_s \quad (23)$$

これに対応する X は次式で与えられる.

$$\frac{X}{X_s} = \frac{h_1(u_s) - h_1'(u_s)u_s}{h_1(u) - h_1'(u)u} \quad (24)$$

解のパターン (C) は $h_1(u) - h_1'(u)u = 0$ を満足する u であり, u は一定となるからこれは前述の指数的流加法にはかならない. このように最適化手法を使っても指数的流加法となる場合があるのは興味あることである.

以上の一般解をもとに, 次の4つの問題が解ける:

- (1) X_f : 自由, T_f : 固定という条件下で J_f を最大にすること, (ii) X_f : 固定, T_f : 自由という条件下で J_f を最大にすること, (iii) X_f : 固定, T_f : 固定という条件下で J_f を最大にすること, (iv) X_f : 自由, T_f : 固定という条件下で J_f/T_f を最大にすること.

さて, 上述の単純化された解では, $f_v \geq 0$ という条件を無視しているので, 最適経路に沿って f_v を計算した時, 負になるところでは実行不能である. このような事態は発酵初期に起こる恐れがある. そのような場合は, 準最適操作として '最初回分操作を行い, 次いで, もとの最適経路 ($u=u^*$) に沿った操作' を提唱した. X 対 u の位相面で示すと Fig. 15 のように, A_0A_1 ,

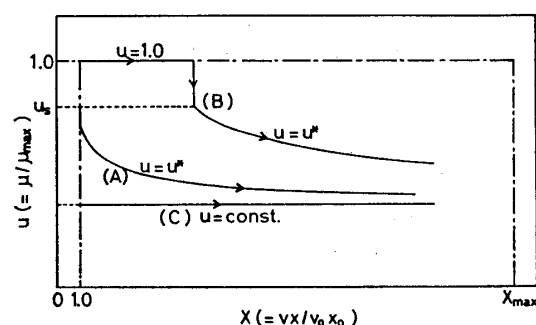


Fig. 14. Three possible optimal trajectories of u vs. X .

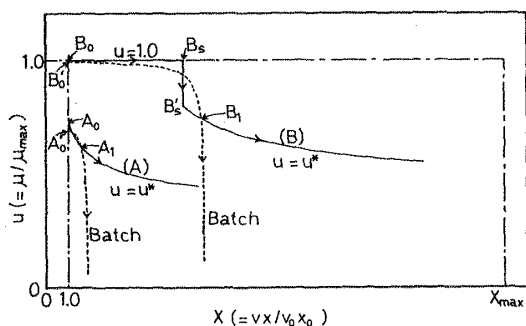


Fig. 15. Determination of "suboptimal" trajectories of u vs. X for cases (A) and (B).

$B_0B_sB'_sB_1$ を, $A_0'A_1$, $B_0'B_1$ に置き換えることである。このようにして求めた準最適操作が最適操作と比較してどの程度有効であるかを知るため, $h_1(u) = u^2(1.05 - u)$ という関数形を与え, 実際にありそうな数値を代入して計算したところ, その差は高々数%であることがわかった。実際の流量変化を計算してみると Fig. 16 のようになり, いずれも時間とともに流量が増大してゆくパターンを示している。

ここに提出した半回分発酵における代謝産物生産のための最適流量変化を求める1つの簡単な手法は, π 対 μ の関係がどのような形でも適用可能である。

しかし, 上述の理論は, 合成培地または半合成培地の場合はうまく適用できるであろうが, 天然培地を用いた場合は, 発酵経過も複雑であって最適化は容易でない。著者らが試みた, ペプトン-無機塩培地による *Bacillus megaterium* からの菌体外 β -アミラーゼ生産がそのよい例である。³⁶⁾ この酵素の生成はグルコースで回分培養しても異化物抑制を受け, ほとんど酵素は蓄

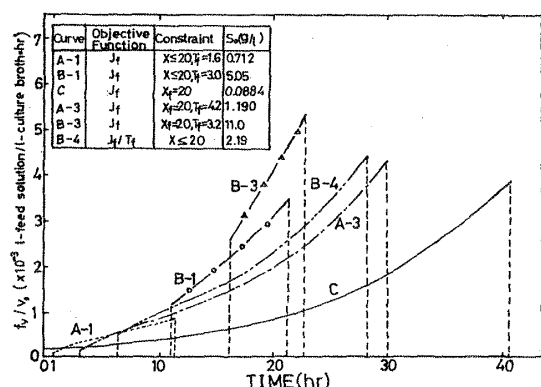


Fig. 16. Example of "suboptimal" feeding programs of the limiting substrate for the case: $h_1(u) = u^2(1.05 - u)$, $a = 0.11$, $b_0 = 0.072$, $x_0 = 0.50$ g/l and $s_f = 500$ g/l. The period of $f_0/v_0 = 0$ before the start of feeding corresponds to batch operation.

積しない。グルコースの流加は酵素生成に対して顕著な効果があったが, 増殖曲線は diauxic の様相を示し, k_y と μ は一定でなく著しく変化した。このような場合に, 常に $s \approx 0$ に保つためには次のようにすればよい:

$$\left. \begin{aligned} s_0 &\approx 0 \\ f_v(t) \left(\equiv \frac{dv}{dt} \right) &= \frac{1}{s_f k_y(t)} \left[\frac{d(vx)}{dt} \right]_t \\ &= \frac{\mu(t)(vx)_t}{s_f k_y(t)} \end{aligned} \right\} \quad (25)$$

実際には, 発酵を3つの期間に分け, それぞれの期間内で μ と k_y を一定とした指数流加法を実施することにより, 回分操作における値の3.6倍の酵素収量を得ることができた。

工業的半回分発酵では, 天然培地を用いることが多く, 最適流量変化を決定するには, 試行錯誤法もやむを得ないであろう。

流量を時間的に変化させる装置 定流量流加法では, 希望する範囲の流量が得られるポンプがあれば間に合うが, 指数的, 最適化, および他の流加法を実施するには, 基質供給流量を時間的に変える装置が必要である。Martin と Felsenfeld は, "exponential gradient generator" という流量を指数関数的に増加させる装置を考察した。³¹⁾ この装置では, 指数関数以外は不可能である。著者らが最初に製作したのは, 回転ドラム型流量制御装置である。¹⁰⁾ ドラムに張る黒い紙の形を変えれば任意の流量変化が可能であるが, ポンプ(あるいは電磁弁)のオン・オフがある。すなわち, マクロ的には流量はほぼスムーズに変化するが, ミク

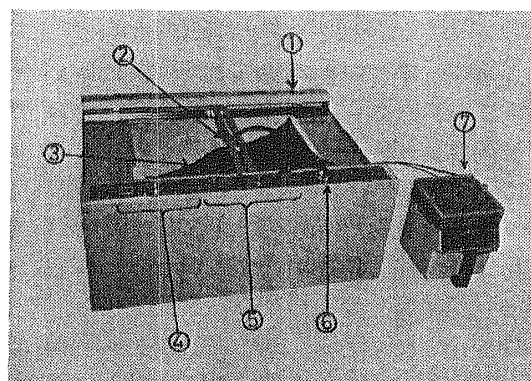


Fig. 17. The automatic curve tracer and the feeding pump.

① main switch, ② photo-probe, ③ curve on white paper, ④ tracing-speed controller, ⑤ tracing-mode converter, ⑥ lower and upper limiters, ⑦ peristaltic pump.

ロ的(10秒前後)には流加は間欠的であり、この点が最大の欠点である。次に試作したのは、曲線自動追跡装置である(Fig. 17).⁸⁶⁾ この装置でも、描く曲線は任意でよく、どのような流量変化も実現できる。しかも、センサーは曲線を連続的に追跡してゆくので、流量は完全に連続的に変化する。Srinivasan らは、液体クロマトグラフで用いられるグラジエント溶出法と類似した、流加液中の基質濃度を時間的に高めてゆく方法を発表している。⁸⁷⁾ また、Minami らは、一連のタイマーとリレーから成るプログラム制御による自動流加装置を発表している。⁸⁸⁾ この方法では、基質の質量流量は時間に関して直線的に増加する。流量を変化させるのはコンピュータを使っても勿論可能である。⁸⁹⁾ これらのうち、著者は、経費、流加の連続性、任意流量変化の可能性、操作の容易性などにより、実験室的には曲線自動追跡装置が一ぱん優れていると考える。

3. フィードバック制御がある半回分発酵

基質をあらかじめ決められた通りに流加する方式では、途中、発酵が好ましくない状態に陥っても、それに対処するのが困難である。したがって、可能ならば、何らかのフィードバック制御を行いたいと考えるのは当然である。ある場合には、これは直接現場の技術者が手動で行う。以下に述べるように、フィードバック制御を行う半回分発酵も、パン酵母生産の技術革新の歴史と深いつながりがある。

フィードバック制御のある半回分発酵は、制御方式の観点から、間接的なものと直接的なものに分類できよう。また、制御される流加基質濃度の観点から、一定値に保つ場合(定値制御)と、濃度を時間的に変化させて制御する場合(プログラム制御)とに分類できよう。後者は、たとえば、発酵の初期、濃度を高く保ち、後半に入って低く保つ、といった場合を想定している。

間接的フィードバック制御のある場合 プロセスに密接に関連している可観測なパラメータを制御指標とする方式である。制御指標としては、溶存酸素濃度(DO),⁴⁰⁻⁴⁴⁾ 呼吸商(RQ),⁴⁵⁻⁴⁷⁾ pH,^{3, 49)} 代謝産物、蛍光⁵³⁾ などが報告されている。

DO を一定に保つ方式では、基質濃度が臨界値より低下すると DO が上昇し、基質がある程度以上に存在すると DO が減少する現象を利用する。培養の進行とともに菌体濃度が上昇し、それにつれて酸素需要も多くなるから、通気量・かくはん速度を増やすかして気液間酸素移動容量係数 k_La を増加させるか、もしくは

は、空気に純酸素を補充して推進力を高めるかして、いずれにしても酸素移動速度を大きくしていかなければならない。オン・オフ的に流加することが多く、微生物は基質に関して半飢餓状態とそうでない状態とに交互に頻繁にさらされる。

RQ を制御指標とする方式は、パン酵母製造において提案されており、炭酸ガス生成速度と酸素消費速度とを実測し、両者の比 RQ を1.0より少し高い水準に保って糖濃度を低レベルに抑え、その結果、副産物であるエタノール生成を減少させる。Wang らは、発酵槽入口、出口の O_2 と CO_2 の分圧を正確に実測し、それらのデータをコンピュータに入力し、物質収支式から RQ を計算し、精密の流加を制御している。⁴⁷⁾ Endo と Inoue は、その時々菌体濃度と糖濃度の増分から濃厚糖液を滴下する時間間隔を決定しているが、これも半回分発酵のコンピュータ制御を最終目標にした研究である。⁴⁸⁾

pH を制御指標とする方式では、発酵の進行とともに培地成分が消費され、pH が設定値からずれる(通常減少する)現象を利用する。あるいは、酢酸のようにそれ自身 pH の変化をきたす基質の流加に応用される。³⁾ この制御方式では、無機塩を主体とした合成培地であることが望ましい。

代謝産物濃度を制御指標とする方式は、代謝産物は副産物であり、できるだけその生成を抑えたい場合に利用できる。パン酵母生産におけるエタノールがそのよい例である。^{7, 50-52)}

最後に、特異な制御方式として、細胞内に存在する NADH の蛍光を利用する方法がある。⁵³⁾

RQ や生細胞の蛍光のように、生物学的パラメータを制御指標に用いることは、大変興味ある方式である。

直接的フィードバックのある場合 培養液中の流加基質濃度を連続的、あるいは間欠的に測定し、その値を制御指標とする方法である。もし、基質が揮発性で、廃気ガス中の分圧と培養液中の濃度とがほぼ平衡にあれば、培養液から抜け出た直後のガスの分圧が制御指標に使える。Reuss らの方法はこれに近い。⁴⁾ また、矢野らは、細いシリコンチューブを使用するチューピング法で、培養液中のメタノール濃度を直接測定し、メタノールの流加を制御する方法を発表した。⁵⁴⁾ 揮発性基質に対しては広く応用できるよい方法であろう。

4. 半回分発酵のスタートアップ

半回分発酵の要は、培養液中の流加基質濃度を制御することであるから、流加開始時に多量の基質が存在してはならない。しかし、一般に発酵では初期に誘導期があり、それを短縮するためにはどうしてもある量は存在していなければならない。そこで、少量の基質を加え、しばらくは回分操作を行い、activeに増殖している状態から低下してから半回分操作をスタートするのがよい。Fig. 6 と Fig. 11 は、それぞれ、定流量流加法と指數的流加法のスタートアップをも示している。これらの流加法では、DO を連続計測し、回分操作中、基質がほとんどなくなって DO が急激に上昇し始める時に流加を開始するとよいことがわかった。

5. 今後の展望

従来、“フィーディング法”として散発的に実施されてきた発酵は、Table 1 のいずれかに属し、半回分発酵として統一的に整理できることを述べた。回分発酵の次の段階として、いきなり連続発酵を考える前に、技術的にははるかに容易であり生産性の向上が期待できる半回分発酵を考えるのが現実的であろう。その際、正確なシステム方程式を同定し、それに基づいて最適な流量変化を数理的に確立し、培養液中の供給基質濃度を直接測定し、“最適フィードバック制御 (optimal feed-back control)”を行う方式が最も望ましいが、現在の技術レベルでは実現されていない。しかし、重要なことは、目的に応じて流加方式もおおのずから異なるのであって、場合によっては定流量操作で十分目的を達することもある。高等な制御（たとえばコンピュータ制御）をすれば、それだけ設備投資もかかるが、簡単な流加方式と比較して生産性はさほど向上しないといった場合も当然あり得る。

フィードバック制御のない半回分発酵では、システムを表現する数式モデルの正確さが、操作の成否の鍵を握る。プロセス・システムをより精密に表現するように数式モデルに改良を加え、最適化された流量で操作が実施されるようになるであろう。

間接的フィードバック制御を行う半回分発酵では、可能な限り多種類の可観測変数の実測データをオンラインコンピュータに入力し情報処理して、最適な流量を計算させ、その流量で実施される傾向がますます盛んになるだろう。

直接的フィードバック制御を行うには、発酵液中の流加基質濃度の計測が必要である。ところが、現在限られた生化学的物質の濃度のみが発酵中計測可能であるにすぎないのは残念である。計測は連続的に行える“センサー”によることが望ましいが、間欠的計測でも、その時間間隔が短ければ、サンプル値制御が可能であろう。

最後に、どの流加方式を採用するかは、その時々技術的・経済的状況と期待される生産性向上の程度の兼ね合いによることを再度強調したい。

本研究に対して種々指導と助言を賜りました京都大学名誉教授吉田文武先生、京都大学教授福井三郎先生、高松武一郎先生、佐田栄三先生に謹んで感謝の意を表します。本研究においては、岸本通雅氏、塚野正文氏、平野茂樹氏、久米辰雄氏、森川泉氏の諸君に全面的な協力いただきました。深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Burrows, S.: *The yeast* (Rose, A. H., Harrison, J. S.) Vol. 3, 349, Academic Press, New York (1970).
- 2) Yoshida, F., Yamane, T., Nakamoto, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 257 (1973).
- 3) Edwards, V.H., Cottschalk, M.J., Noojin, A.Y., III, Tuthill, L.B., Tannahill, A.L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 975 (1970).
- 4) Reuss, M., Gnieser, J., Reng, H.G., Wagner, F.: *European J. Appl. Microbiol.*, **1**, 295 (1975).
- 5) White, J.: *Yeast Technol.*, **31**, John Wiley Sons Inc., New York (1954).
- 6) Hosler, P., Johnson, M.J.: *Ind. Eng. Chem.*, **45**, 871 (1953).
- 7) 福田, 塩谷, 岡田, 森川: 日本特許 51-103042 (1976).
- 8) Shimizu, S., Yano, T., Kobayashi, T.: *Microbial Growth on C₁-Compound* (Abstracts of The Second International Symposium, Pushchino, USSR) p. 184 (1977).
- 9) Srinivasan, V. R., Fleenor, M. B., Summers, R. J., Bumm, M. W.: U. S. Patent 4062727 (1977).
- 10) Yamane, T., Kishimoto, M., Yoshida, F.: *J. Ferment. Technol.*, **54**, 229 (1976).
- 11) Shimizu, S., Tanaka, A., Fukui, S.: *J. Ferment. Technol.*, **47**, 551 (1969).
- 12) Crabtree, H. G.: *Biochem. J.*, **23**, 536 (1929).

- 13) Clark, D. J., Marr, A. G.: *Biochem. Biophys. Acta*, **92**, 85 (1964).
- 14) Hsu, E. J., Vaughn, R. H.: *J. Bacteriol.*, **98**, 172 (1969).
- 15) Yamane, K., Suzuki, H., Nishizawa, K.: *J. Biochem.*, **67**, 9 (1970).
- 16) Hulme, M. A., Strank, D. W.: *Nature*, **226**, 469 (1970).
- 17) 野口, 宮川, 荒尾: 醸工, **38**, 511 (1960).
- 18) Hockenhull, D. J. D., Mackenzie, R. M.: *Chemistry and Industry*, 607 (1968).
- 19) Gray, P. P., Dunnill, P., Lilly, M. D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 1179 (1973).
- 20) Ohno, H., Nakanishi, F., Takamatsu, T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 847 (1976).
- 21) 小島, 吉川, 岡崎, 照井: 醸工, **50**, 716 (1972).
- 22) Kao, E. I.: *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1493 (1976).
- 23) Yamané, T., Hirano, S.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 156 (1977).
- 24) Yamané, T., Hirano, S.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 380 (1977).
- 25) Pirt, S. J.: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **24**, 415 (1974).
- 26) Dunn, I. J., Mor, J.-R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1805 (1975).
- 27) Trilli, A., Michelini, V., Mantovani, V., Pirt, S. J.: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **27**, 219 (1977).
- 28) Marr, A. G., Nilson, E. H., Clark, D. J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **144**, 536 (1963).
- 29) Jordan, R. C., Jacobs, S. E.: *J. Bact.*, **48**, 579 (1944).
- 30) Monod, J.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **3**, 371 (1949).
- 31) Martin, R. G., Felsenfeld, G.: *Anal. Biochem.*, **8**, 43 (1964).
- 32) Lim, H. C., Chen, B. J., Cregan, C. C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 425 (1977).
- 33) Kishimoto, M., Yamané, T., Yoshida, F.: *J. Ferment. Technol.*, **54**, 891 (1976).
- 34) Fishman, V. M., Biryukov, V. V.: *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 4*, 647 (1974).
- 35) Yamané, T., Kume, T., Sada, E., Takamatsu, T.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 587 (1977).
- 36) Yamané, T., Tsukano, M.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 233 (1977).
- 37) Srinivasan, V. R., Fleenor, M. B., Summers, R. J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 153 (1977).
- 38) Minami, K., Yamamura, M., Shimizu, S., Ogawa, K., Sekine, N.: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 35 (1978).
- 39) 山根, Rindone, W., Undén, Å., Hedén, C.-G.: 醸酵工学会大会要旨集, p. 105 (1975).
- 40) 大橋: 工化, **61**, 1001 (1958).
- 41) Hospodka, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 117 (1966).
- 42) 藤尾, 三分一, 上田: 醸工, **49**, 626 (1971).
- 43) Miskiewicz, T., Lesniak, W., Ziobrowski, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1829 (1975).
- 44) 矢野, 小林, 清水: 醸酵工学会大会要旨集, p. 215 (1976).
- 45) Dietrich, K. R.: *Ablaufverwertung und Abwasserreinigung*, A. Huttig, Heidelberg (1959).
- 46) Aiba, S., Nagai, S., Nishizawa, Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1001 (1976).
- 47) Wang, H. Y., Cooney, C. L., Wang, D. I. C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 69 (1977).
- 48) Endo, I., Inoue, I.: *Proceedings of The 2nd PACHEC*, Denver, USA, p. 583 (1977).
- 49) Nishio, N., Tsuchiya, Y., Hayashi, M., Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 151 (1977).
- 50) U.S. Patent 3002894 (1959): Patentausswertung Vogelbusch GmbH Aut. (1958).
- 51) U.S. Patent 3010881 (1960): Patentausswertung Vogelbusch GmbH Aut. (1959).
- 52) 西山, 安田, 三輪, 山中, 広瀬: 農芸化学会大会要旨集, p. 208 (1977).
- 53) Ristroph, D. L., Watteeuw, C. M., Armiger, W. B., Humphrey, A. E.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 599 (1977).
- 54) 矢野, 小林, 清水: 醸酵工学会大会要旨集, p. 325 (1977).

(昭53. 5. 4受付)