

〔醸酵工学 第56巻 第5号 662-675. 1978〕
照井会長退任記念特集号

総 説

メタノール資化性菌の培養工学的諸問題*

三村 精男・和田 雅彦**

旭化成工業株式会社技術研究所, **食品発酵化学事業部

1. はじめに

メタノール資化性菌の研究は、主として細菌について、1950年代からメタン資化性菌の代謝研究の中でとりあつかわれてきた。1969年、緒方ら¹⁾によりメタノール資化性酵母が発見され、一方英国の Imperial Chemical Industry (ICI) の微生物たんぱく質の活発な研究開発の情報²⁾が入ってくるにつれて、1973年ごろより、わが国でもメタノールを原料とする発酵研究が注目され、それ以来、主として微生物たんぱく質の生産を目的とした微生物の分離が行われ、数多くのメタノール資化性菌が発見された。そしてメタノール資化性菌のたんぱく質生産研究を通じて、メタノールを発酵原料に利用する技術は確立され、企業生産の段階まできていることは周知の通りである。

1973年石油価格の高騰以来、メタン系の化石資源に価格競争力がつき、それまでの *n*-パラフィンに代わって C_1 化合物がクローズアップされており、特に将来産油国におけるジャンボ・メタノール・プラントによる燃料用メタノールの生産が実現するとき、発酵原料としてのメタノールは糖蜜やでん粉などの糖質と十分に競合するものと考えられる。

著者らは、メタノール資化性菌のたんぱく質生産研究を行ってきたが、その過程でメタノール資化性酵母、グラム染色陽性細菌、陰性細菌をとりあつかった。これらのメタノール資化性菌の培養を通して、メタノール利用発酵に共通する培養工学的な問題点を、われわれの経験を中心にしてまとめてみたい。

なおメタノールの発酵生産への利用³⁻⁵⁾やメタノ-

ール資化性菌のたんぱく質の生産⁶⁻⁹⁾については、既にすぐれた総説があるので、それらとの重複をできるだけ避けて解説する。

2. 原料メタノールの動向

わが国におけるメタノールの消費実績は、昭和48年の123万トン进行ピークにして以降低下しており、昭和50年の実績は95万トン弱であった。このうち約50%がホルムアルデヒド、約15%がジメチルテレフタル酸向けであり、いずれも合成高分子の原料である。ここ数年この比率はほとんど変わっていない。日本化学工業協会¹⁰⁾が産業構造審議会報告「産業構造の長期ビジョン」の業種別生産額推移をもとにして、将来のメタノールの需要を予測しているが、それによると、昭和60年で190万トン、昭和75年で350万トンになっている。これらの予測には、将来の大型用途として注目される微生物たんぱく質（発酵利用）や発電用、工業用、自動車用などの燃料向け^{11,12)}の新しい需要は含まれていない。微生物たんぱく質の生産のためには、ほぼその2倍量のメタノールが必要である。一方燃料用メタノールについては、日本化学工業協会の予測によると、わが国の燃料用メタノールは産油国におけるジャンボ・メタノール・プラントのなり行きによるとしながらも、1980年代にはLNGの電力向け供給に限界が生じ、1985年にはメタノールの輸入が実現すると仮定し、LNGの補完的燃料として約660万トンの需要が見込まれると予測している。化学工業用原料としては酢酸、エタノールが開発されている。

いずれにせよ、将来相当多量のメタノールが輸入し消費されるものと考えられており、発酵原料としてのメタノールは益々重要になってくるものと思われる。Table 1に示したようにメタノールは糖蜜と競合することが考えられるが、¹³⁾これには高い生産性をもった

* The Problems on the Fermentation Engineering of Methanol Assimilating Microorganisms —A Monograph— †MIMURA, A. and WADA, M. (†Asahi Chemical Industry Co. Ltd., Technical Research Laboratory, Samejima, Fuji-shi, Shizuoka-ken 416)

Table 1. Comparison of fermentation feedstocks.¹³⁾

	Carbon content (%)	Price (¥/kg)	Price (¥/kg-C)
<i>n</i> -Paraffin	0.85	100	118
Acetic acid	0.40	110	275
Ethanol	0.52	220	420
Methanol	0.375	55	146
Molasses	0.40	33*	83
High test molasses	0.40	96*	240
Glucose syrup	0.40	145*	363

* As sugar.

メタノール資化性菌の発見と前述のジャンボ・メタノール・プラントの実現が重要な要因であろう。なおメタノールの大規模利用に関するテクノロジーアセスメントが報告¹⁴⁾されている。

3. メタノール資化性微生物

メタノール資化性微生物は、研究の初期においては、あまり多くは存在しないのではないかと考えられていたが、メタノール資化菌の分離研究が行われるにつれて、思ったより多く存在するというのが実感であろう。現在までに入手できる資料(学術文献、特許)からメタノール資化性菌の genus をまとめると Table 2 のようになる。どの genus の菌株が多いかを示すために研究に用いられた菌株の累計をとってみた。これには同じ菌種と思われるものの重複もあろうが、その究明は難しいので、一応異なった菌株として累計したものである。これによるとメタノール資化性細菌のほとんどは、グラム染色陰性の桿菌であり、一部の genus に集中していることがわかる。obligate methylotrophs では *Methanomonas*, *Methylomonas* が多く、facultative methylotrophs では *Pseudomonas* が最も多い。通常の手法で集積培養分離をすれば必ず *Pseudomonas* が分離されるため多くの研究者によって分離されている。ついで *Protoaminobacter*, *Achromobacter* が多いようである。これ以外のグラム染色陰性細菌では分離頻度は低い興味深いものとしては、海洋性細菌と思われる *Aeromonas*, 腸内細菌に属する *Klebsiella*, *Serratia* も見出されている。

一方グラム染色陽性細菌は少なく、いわゆる発酵生産用微生物としてなじみの深い *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Bacillus* などに認められているにすぎない。一般にグラム染色陽性菌はメタノールに生育する速度

Table 2. Genera of methanol-assimilating microorganisms presented in academic reports and patent applications up to 1977.

Bacteria		Occurrence*
Obligate methylotroph		
<i>Methylomonadaceae</i>	<i>Methylomonas</i>	##
	<i>Methylococcus</i>	+
	(<i>Methanomonas</i>)	(++)
Facultative methylotroph		
Gram-negative		
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	###
	(<i>Protoaminobacter</i>)	(##)
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella</i>	+
	<i>Serratia</i>	+
<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>	+
	<i>Aeromonas</i>	+
<i>Neisseriaceae</i>	<i>Neisseria</i>	+
<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>	+
Uncertain affiliation		
	<i>Hyphomicrobium</i>	++
	<i>Microcylus</i>	++
	<i>Alcaligenes</i>	++
	<i>Acetobacter</i>	+
	<i>Flavobacterium</i>	+
	<i>Chromobacterium</i>	+
	(<i>Achromobacter</i>)	(++)
Gram-positive		
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	+
Coryneform group		
	<i>Corynebacterium</i>	+
	<i>Arthrobacter</i>	+
	<i>Brevibacterium</i>	+
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>	+
<i>Nocardaceae</i>	<i>Nocardia</i>	+
Actinomycetes		
<i>Streptomyetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	+
Yeast		
Ascosporogenous yeasts		
<i>Saccaromycetoideae</i>	<i>Saccharomyces</i>	++
	<i>Pichia</i>	++
	<i>Hansenula</i>	##
Asporogenous yeasts		
<i>Cryptococcoideae</i>	<i>Torulopsis</i>	###
	<i>Candida</i>	##
	<i>Kloeckera</i>	++
<i>Rhodotoruloideae</i>	<i>Rhodotorula</i>	+
Fungi		
	<i>Cliocladium</i>	+
	<i>Paecilomyces</i>	+
	<i>Penicillium</i>	+
	<i>Trichoderma</i>	+

* Chance of finding: +: infrequent
 ++: moderately infrequent
 ##: moderately frequent
 ###: frequent

が低いようである。しかしグラム染色陽性菌のみを分離するスクリーニング法をとれば、生育速度の高い資化性菌の分離も可能である。著者らは *Corynebacterium* 属に属する細菌を分離し μ_{max} 0.24 (hr⁻¹) を認めてい

る。¹⁵⁾ メタノールを利用する発酵生産を目的とするならば、よく生育するグラム染色陽性菌を多数分離することが重要であると考えている。

酵母では *Torulopsis*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Saccharomyces* の5属に比較的多くのメタノール資化性菌が認められている。この他に *Kloeckera*, *Rhodotorula* を含めて7属しか発見されておらず、酵母のメタノール資化能はかなり限定された属に集まっている。これらの酵母はすべて *facultative methylotrophs* である。酵母にはメタノールによく生育するものが多くあり、飼料たんばくの製造に用いられようとしている。しかしこれ以外の発酵生産物は認められていない。

その他の菌種では放線菌では *Streptomyces* に1株、かびでは *Cliocladium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Penicillium* にメタノール資化性が認められているのみである。

メタノール資化性菌は、糖質、酢酸、エタノール、*n*-パラフィンなどのように C_2 単位で代謝される通常の微生物とは根本的に異なる C_1 代謝によるために、メタノール資化性菌の分布に限界があるものと思われるが、 C_2 代謝の微生物に比較すれば分離研究の歴史は浅く、これから数多くのメタノール資化性菌が分離される可能性がある。いずれにせよ、菌体以外の発酵生産物を目的とするには現在発見されている菌株では少ない。発酵生産が期待されるグラム染色陽性菌や放線菌などを精力的に分離することにより、メタノール利用発酵の道は切り開かれて行くものと思われる。

4. メタノール培養系の工学的な諸問題

水によく溶けるが、蒸気圧が高く、またメタノール資化性菌に対しても低濃度で生育阻害を示すメタノールを発酵原料にするため、工学的な問題が多くある。すなわち第1には、メタノールの最適濃度の維持に関するものであり、生育阻害を避け、かつメタノールの蒸発損失を抑えることであり、第2は最適酸素供給条件の確保に関するものである。これらの培養工学的な問題について著者が行った研究を中心に概観する。

メタノール濃度と生育速度 メタノールが微生物の生育阻害作用をもつことは古くから知られていたが、メタノールに強い親和性をもつメタノール資化性菌についても、比較的低濃度でその生育を阻害する。つまり生育の誘導時間、比増殖速度係数、さらには菌体収率は培養系のメタノールの濃度によって著しく変化する。*Torulopsis*,¹⁶⁾ *Candida*¹⁷⁾ に属するメタノール資化

Table 3. Optimum concentration of methanol for growth.

Microorganism	Methanol concentration (g/l)	Reference
<i>Candida</i> N-17	~3	17)
<i>Methylomonas methanolica</i>	0.3~3.2	18)
<i>Aeromonas methanocola</i>	~3.2	20)
<i>Protoaminobacter ruber</i>	~0.79	24)

性酵母の培養では、メタノールの濃度の影響は、ほぼ0.5% (w/v) あたりからあらわれている。微生物によってはさらに高濃度まで影響を受けないものもあり、たとえば *Torulopsis methanolovescens* では1% (w/v) 程度まで影響を受けなかった。¹⁶⁾ また Dostalek ら¹⁸⁾ は *Methylomonas methanolica* の培養条件の検討を行い、比増殖速度は 0.3 g/l までは高い値を維持できたが、それ以上では μ は急激に低下することを示している。

Methylomonas,¹⁸⁾ *Pseudomonas*,¹⁹⁾ *Aeromonas*,²⁰⁾ *Corynebacterium*²¹⁾ などのメタノール資化性細菌においても、おおむね 0.5~1% (w/v) 以下にメタノールを維持することが重要である。しかし細菌の場合にはメタノールに対して順養させることによって、より高濃度、たとえば 1.5~2% (w/v) のメタノールでも正常な生育を示す。¹⁹⁾ これらの現象より、メタノールの蒸発損失を考慮するとき、培養系のメタノール濃度は、できる限り低濃度に維持しつつ培養することが望ましいことになる。

メタノールの逐次供給方式 メタノール発酵の工業的設備では、高感度の計測器を用いたコンピューター自動制御によるメタノール濃度の最適維持が可能であるが、実験室の培養設備では、培養条件の検討に際し、もっともやっかいなものにメタノールの逐次供給がある。以下に述べる方式は、メタノール資化性菌の増殖に関係したパラメーターを用いることによるメタノールの低濃度逐次供給方法を考察したものである。

a) 溶存酸素 (D. O.) のシグナルによる供給方法^{15, 22)} この方法は太橋²³⁾ により酵母の糖質 fed-batch culture に用いられたのが最初である。この方法は、基質に対する微生物の代謝活性のレスポンスが早い場合に有効である。すなわち Monod の増殖式における K_s 値が比較的小さいものでは培地中の基質の完全消費と共に酸素の消費が中断され、その結果培養系は瞬時のうちに酸素供給過多になるため、D.O. が急上昇する。このシグナルをとらえて基質を速やかに供

Table 4. Comparison of Monod's constant, K_s , for methanol of methanol-assimilating microorganisms and for various substrates of other microorganisms.

Microorganism	Substrate	K_s (g/l)	Reference
<i>Candida</i> N-17	Methanol	0.05*	17)
<i>Methylobacterium methanolicum</i>	//	0.002	18)
FM-02T (bacterium)	//	0.00156	24)
<i>Pseudomonas methanolicum</i>	//	0.002	25)
<i>Pseudomonas extorquens</i>	Oxygen consumption for methanol oxidation	0.00065	26)
<i>Corynebacterium methanophilum</i>	//	0.0167	**
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Glucose	0.2	27)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	//	0.015	28)
<i>Fusarium solani</i>	//	0.72	29)
<i>Candida utilis</i>	Ethanol	5.05	30)
<i>Pseudomonas ovalis</i>	Acetate	0.095	31)
<i>Corynebacterium netrilophilus</i>	Acetoamide	0.14	32)
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Phenol	0.56	33)

* Calculated by the authors.

** Unpublished data.

給するものである。この方法では、必ず一度基質の飢餓状態を経過するため、頻繁にメタノールの供給を行うことは微生物の正常な代謝を乱すおそれがあるが、適当な時間間隔で操作すれば、きわめて安定な培養が可能である。

メタノール資化性菌とその他の微生物の対基質 K_s 値を比較したのが Table 4 である。これよりメタノール資化性菌のメタノールに対する K_s 値は著しく小さく、メタノールに対する親和性が高いことが理解される。このようにメタノール資化性菌は、低濃度のメタノールにおいて最大の μ で生育できるのであり、培養系で制御すべきメタノール濃度は、きわめてせまい濃度範囲となる。

一般に、メタノール資化性菌のメタノール消費に対する D.O. のレスポンスは、きわめて敏感である。

Corynebacterium methanophilum の培養系において種々なメタノール濃度での D.O. シグナルへのレスポンスを見たものが Fig. 1 である。高い菌体濃度では 25 mg/l 以上のメタノールに対してレスポンスしているが、10 mg/l ではほとんどレスポンスしなかった。これは添加したメタノールが直ちに消費され、消費酸素量が溶存酸素計の感度以下であるためと考えられる。これより、この方法によれば原理的にはメタノールが 25 mg/l の低濃度培養も可能になる。

メタノールに対するこのような高い親和性を利用し

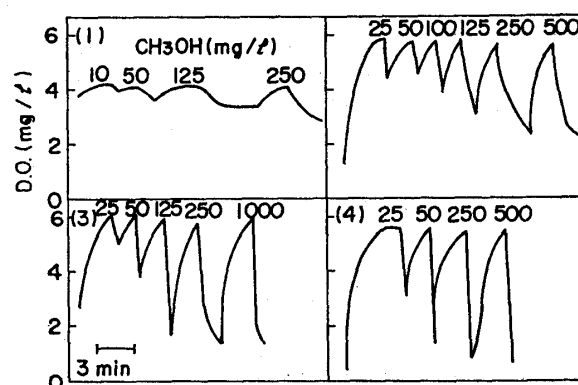


Fig. 1. Response of D.O. signal to addition of methanol to the culture of *Corynebacterium methanophilum*.

(1) 10 hr-2.7 g/l, (2) 20 hr-7.0 g/l,
(3) 32 hr-11.5 g/l, (4) 40 hr-16.0 g/l

て、D.O. シグナルによりメタノールを低濃度に維持しながら逐次供給を行い、安定な培養を行った1例を Fig. 2 に示す。

この方法の欠点は、基質の飢餓状態を頻繁にくりかえすことであり、特に菌体濃度が高くなると、メタノールの添加回数が多くなるため、菌の代謝に悪い影響が与えられるものと懸念される。³⁴⁾ *Aeromonas methanocola*²⁰⁾ を連続培養したとき、1回のメタノール供給量を変えることでメタノール飢餓回数を変化させた実験では、Fig. 3 に示したように最適なメタノール添加回

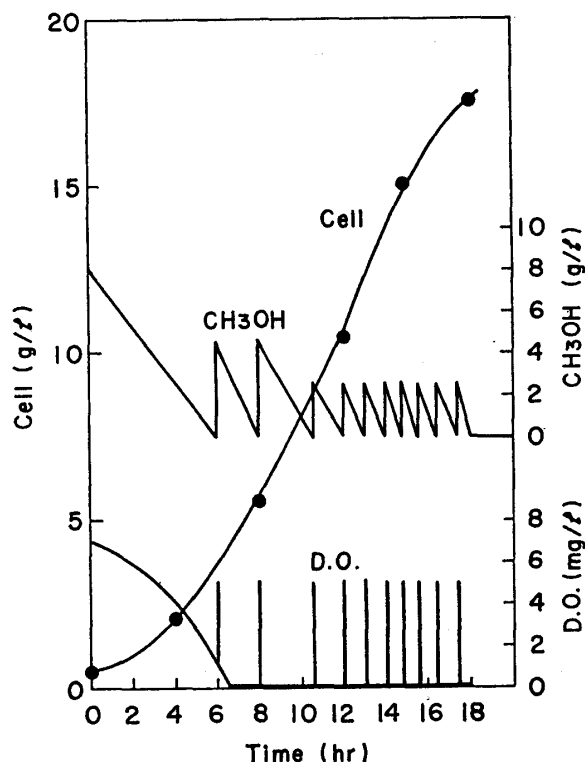


Fig. 2. Typical growth of *Aeromonas methanocola* in 20-l fermentor under automatic methanol feeding with D.O. signal.

Cultivation was carried out at 35°C and pH 7.0. Aeration and agitation were kept at 1.5 vvm and 600 rpm, respectively.

数は3~4回/hrであった。つまり18~20 g/lの菌体濃度では1回のメタノール供給量が16 g/10 l 培地(培養液中メタノール濃度の範囲は1.6 g/l~0 g/l)が最も高い菌体の生産性を示した。低い添加回数での生育の低下はメタノールの1回当たりの供給量が多くなるために生じるメタノールの濃度阻害であり、また高い添加回数では頻繁な飢餓状態による生育阻害が考えられる。このように菌体濃度によって最適なメタノール添加条件を見出すことにより、メタノールの供給過剰をまねくことなく安定な培養を行うことができる。この方法を利用すれば、酸素供給速度をもってスケールアップすることが可能である (Fig. 9を参照)。

清水ら³⁶⁾はこの方法によって *Protoaminobacter ruber* を65時間培養し、最大菌体濃度 85 g/l まで回分培養ができたと報告している。

b) pH stat による逐次添加方法³⁶⁻³⁸⁾ 培養系への供給液のメタノールとアンモニア混合液の C/N 比率を事前に決定しておき、この混合液をもって pH を

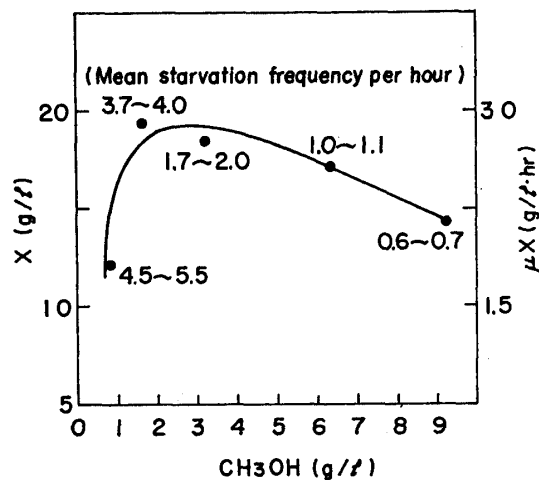


Fig. 3. Effect of starvation frequency on the growth of *Aeromonas methanocola* in continuous culture.

Cultivation conditions were as described in Table 11. Aeration and agitation were kept at 2.0 vvm and 600 rpm, respectively.

コントロールすると同時にメタノールを供給する方法である。この方法は既にグルコースや酢酸などにおいて利用されている。

西尾ら³⁷⁾によると *Pseudomonas* AM-1 の場合、メタノール(純度99%)とアンモニア(29%)の比率を100:23 (v/v) に、また *Klebsiella* sp. では100:18.3の混合液で pH コントロールすることにより、バランスよくメタノールの逐次供給が行えることを示し、*Pseudomonas* AM-1 を85時間培養し、35.7 g/l の菌濃度を得ている。著者ら³⁸⁾も *Candida methanophilum* の培養において C/N 比率を15.5~17.0 (g/g) にしたメタノールとアンモニアの混合液を供給することによって、pH をコントロールしつつメタノールの逐次供給培養を行っている。

しかしこの方法は、培養系への外乱により菌の代謝バランスがくずれた時には、安定な状態に回復することができないため、所定のメタノール濃度が維持できなくなる。したがって他の手段でメタノールをモニターする必要がある、実用化には、まだ問題が残っているものと考えられる。

c) Exponential fed-batch culture²⁴⁾ 菌体の増殖に合わせて指数関数的にメタノールの供給速度を上昇させて菌の生育に必要なメタノールを過不足なく供給する方法であり、山根ら²⁴⁾により提案された。 *Protoaminobacter ruber* の増殖速度式において μ は

$$\mu = f(s) = \frac{\mu_{max}}{\frac{K_s}{S} + 1 + \left(\frac{S}{K_i}\right)^n}$$

$$\mu_{max} = 0.181 \text{ hr}^{-1}$$

$$K_s = 0.00156 \text{ g/l}$$

$$K_i = 25.6 \text{ g/l}$$

$$n = 2$$

となり、 $f'(s) > 0$ の領域では、いわゆる Monod 式の関係が成立しているメタノール濃度域であり、 μ はメタノール濃度 S に対し安定したレスポンスをするが $f'(s) < 0$ ではメタノールの濃度阻害のため、一度メタノール濃度がこの領域の S になると μ は低下し、益々培養系のメタノール濃度は上昇する。Protoaminobacter ruber の場合、この境界濃度は 0.79 g/l であるとしている。山根ら²⁴⁾ はこの方法によって、Protoaminobacter ruber を培養し、50 時間で 25 g/l の菌体濃度を得ている。

この方法は、あらかじめ生育に関する速度定数を設定しておき、それらによるプログラミングを行うことに特徴があり、微生物の代謝に関連した制御因子を用いることによって広く応用されうる基本的な考え方である。しかし現在の段階では、微生物の代謝を完全に制御する因子がわかっていないので、仮に温度上昇や、酸素供給停止などの外乱が生じたときには、微生物の代謝活性が低下し、メタノール濃度は上昇傾向をとるため $f'(s) < 0$ の不安定領域に入る可能性がある。

d) コンピューター自動制御 回分式、連続式培養ともに、理想的な状態としてはメタノール濃度を低濃度に、しかも定常に維持しつつ培養することである。このためにはメタノールの蒸気圧が高いことを利用して、培養槽からの排気ガス中に蒸散する極微量のメタノールを、たとえば flame ionizing detector,³⁹⁾ catalytic combustion analyzer¹⁸⁾ などで測定し、得られたメタノール濃度と他の培養条件 (pH, 温度, 希釈速度, 通気条件など) と組み合わせたコンピューター制御により、あらかじめ設定したメタノールの最適濃度に自動制御する考え方である。Hoechst 社の demonstration plant におけるメタノール濃度はコンピューター制御によって 0.005% 以下に維持されているという。⁴⁰⁾

メタノールの蒸発損失 メタノールは蒸気圧が高いため通気培養においては、排気と共にある程度のメタノールが飛散する。通常の通気かくはん培養条件で、どの程度のメタノールが蒸発するかを調べてみた。

メタノール水溶液に通気するときの物質収支式は次

式で示される。

$$-V \frac{dC_L}{dt} = C_G Q$$

$$C_G = \alpha K C_L$$

両式より

$$\ln \frac{C_L}{C_i} = -\alpha K q t$$

ただし

V : 水溶液の容量 [l]

C_L : 水溶液の濃度 [g/l]

C_G : 排気中の濃度 [g/l-air]

Q : 通気空気量 [l/hr]

α : 飽和度係数 [-]

K : 蒸発係数 [-]

q : $= Q/V$ [hr^{-1}]

通気かくはん槽にメタノール水溶液を入れて所定の条件で通気かくはんし、上式によってメタノールの蒸発係数を求めると Table 5 のようになる。温度や装置の条件により異なるがメタノールの蒸発係数はほぼ $1.5 \sim 3.5 \times 10^{-4}$ である。ちなみにエタノールでは 1.45×10^{-4} (28°C),³¹⁾ 2×10^{-4} (30°C),⁴¹⁾ *i*-プロパノールでは 3.8×10^{-4} (30°C)⁴¹⁾ の値が報告されており、いずれもメタノールと同程度の蒸発係数である。

一方メタノール水系の平衡蒸気圧のデータ^{42,43)} からこの系がヘンリーの法則にしたがうとして、ヘンリー係数よりメタノールと空気との平衡係数 (蒸発係数に相当する) を計算すると Table 6 のようになる。この値と実験値を比較すれば、通常の通気かくはん条件下では、培養槽からの排気はメタノールでほぼ飽和されているものと推察される。

実際のメタノール培養系におけるメタノールの蒸発

Table 5. Apparent evaporation rate constant, αK , of methanol.

Aeration rate	0.5 vvm	1.0	1.5
αK	1.9	1.7	1.7×10^{-4}
α	0.91	0.79	0.81
(28°C)			
Temperature	28°C	32	36
αK	1.7	2.4	3.5×10^{-4}
α	0.79	0.90	1.05
(1.0 vvm)			

Table 6. Theoretical evaporation rate constant calculated from equilibrium data for methanol solution.^{42,43)}

C_L	Temperature		
	28°C	32	36
3.0 g/l	1.84	2.63	3.18×10^{-4}
5.0	2.08	2.61	3.33
10.0	2.10	2.64	3.36
50.0	2.14	2.69	3.43

損失量を求めるため、20 l 容量ジャーフェーマンターの排気を 5 l ジャーフェーマンター 2 基に直列につなぎ、メタノールの回収をはかった。この方法によるメタノールの回収率は、20 l ジャーフェーマンターのメタノール濃度が 0.8 g/l では 100.3%，4.0 g/l では 87.3%，9.3 g/l では 74.0% であった。 *Aeromonas methanocola* を同じ通気かくはん条件で培養した時の蒸発量は、Table 7 に示したように、培養後半の菌体濃度の高い時期での平均蒸発率は、供給したメタノールの 3.1% であった。これより見掛けの蒸発係数を求めると 3.15×10^{-4} となり、通常の培養系においても、ほぼ理論通りの蒸発が行われていることが理解される。

メタノール資化性菌の増殖に対する最適メタノール

Table 7. Actual evaporation of methanol during the cultivation of *Aeromonas methanocola* in a 20-l fermentor.²⁰⁾

Time (hr)	Cell (g/l)	Methanol fed (g)	Methanol absorbed (g)	Evaporation (%)
0	0.5	(initial) 80	—	—
4	1.7			
8	7.7	(7hr-10) 200		
10	10.5	(10-12) 65.6	2.32	3.5
12	13.2	(12-14) 41.6	0.86	2.1
14	14.6	(14-16) 41.6	1.36	3.3
16	15.6			
Average (10 hr-16)		148.8	4.54	3.1

Cultivation was carried out at 35°C with a working volume of 10 l. pH was controlled at 7.0 ± 0.2 with aqueous ammonia. Aeration and agitation were kept at 1.0 vvm and 600 rpm, respectively. Methanol concentration was maintained at less than 0.8 g/l with an automatic feeding device.²¹⁾ Apparent evaporation rate constant, aK , calculated from this experiment was 3.15×10^{-4} .

の濃度範囲は、Table 3 に示したように、ほぼ 3 g/l 以下であるから、蒸発損失を防ぐためにはできる限りメタノールを低濃度に維持しながら培養することが望ましい。

酸素要求量と収率係数 *Aeromonas methanocola* の元素組成の 1 例は、炭素 44.4%，窒素 13.2%，水素 7.0%，酸素 24.4%，粗灰分 9.0% であり、これより菌体 100 g を 1 モルとした菌体組成の実験式は $C_{3.7}H_{7.03}N_{0.944}O_{1.65}Ash$ で示される。²⁰⁾ 今メタノールに対する菌体収率係数 $Y_{X/S}$ (g/g) を 0.5, 0.3 とするとき菌体生成反応式はそれぞれ次式で示される。

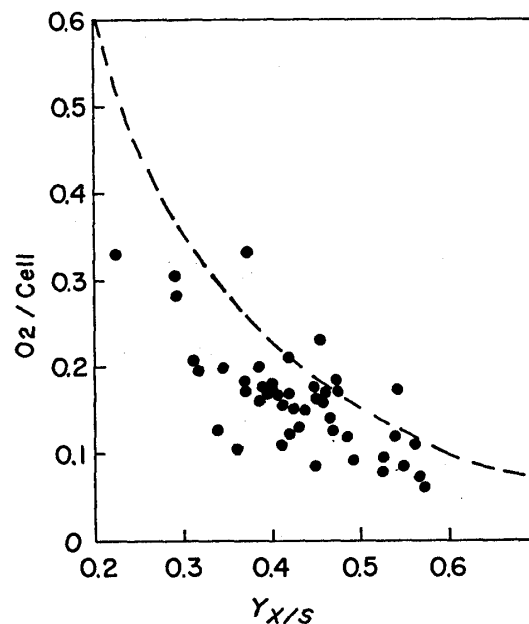
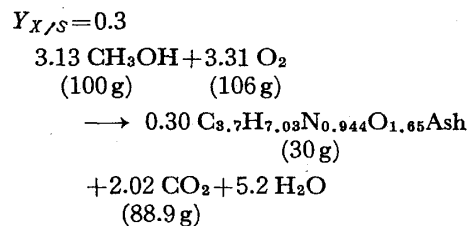
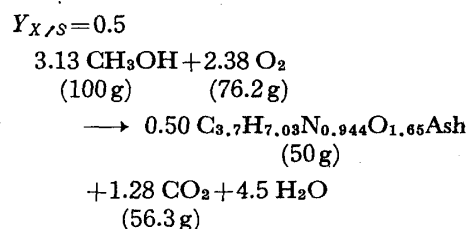


Fig. 4. Relationship between cell yield coefficient, $Y_{X/S}$, and oxygen demand, O_2/cell .
 --: Experimental equation for growth of *Aeromonas methanocola*.
 ●: Experimental data from the cultivation of *A. methanocola* in 20-l fermentor.

Table 8. Analysis of carbon balance during the cultivation of *A. methanocola*.²⁰⁾

	Fed (g)	Consumed for eq. (1) (g)	Consumed* for eq. (2) (g)	Evaporation** loss (g)	Total (g)
Methanol	384	328	34.4	11.5	374
Carbon	144	123	12.9	4.3	140
Recovery	—	0.85	0.09	0.03	0.97
Eq. (1), cell formation $\text{CH}_3\text{OH} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{cell} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$					
Eq. (2), by-product formation $\text{CH}_3\text{OH} \longrightarrow \text{Organic compounds}$					
Eq. (3), evaporation $\text{CH}_3\text{OH} \longrightarrow \text{CH}_3\text{OH}$					

* Calculated from the "total organic carbon" in supernatant of fermented broth.

** Estimated as 3%, as shown in Table 7.

この式より $Y_{X/S}$ と、単位菌体生成に要する酸素量 O_2/cell (g/g) の関係は Fig. 4 に示される曲線ようになる。この曲線に対して、*Aeromonas methanocola* の 20 l ジャーフェーメンター培養による結果をプロットすると、Fig. 4 のように、ほとんどのプロットが曲線の左下方へ偏在してくる。これは、 $Y_{X/S}$ を菌体生成反応式がメタノールから菌体と CO_2 のみが生成すると仮定しているために生じるものであり、メタノールの炭素の菌体および CO_2 への回収率で $Y_{X/S}$ を補正すると実験式の曲線に近づいてくる。これより実験値と曲線のへだたりは、菌体生成反応式の他に代謝産物の生成、メタノールの蒸発損失が影響しているものと考えられる。

Aeromonas methanocola の 20 l ジャーフェーメンターにおける炭素バランスの実験例を Table 8 に示した。培養において起こっている現象は、(1) 菌体生成反応、(2) 副産物生成反応、および (3) 蒸発が考えられる。まず、生成菌体量と酸素消費量を測定する。これより単位生成菌体当たりの酸素消費量 O_2/cell を求め、先に示した実験式より導いた曲線より菌体生成反応 (1) に利用されたメタノール量と、この反応により発生し

た炭酸ガス量を算出する。かくして得られた値は、菌体収率係数 0.47 に対し、 O_2/cell は 1.45 となる。また (1) の反応によるメタノール炭素の菌体および炭酸ガスへの炭素回収率は 85% と計算される。次に (2) の副産物生成反応は、生成物の酸化還元レベルがメタノールと同程度と仮定すると、無酸素反応と考えることができる。培養終了液の除菌上澄液中の total organic carbon を測定し、これの生成に要するメタノール量を算出すると約 9% となる。また先述の蒸発実験より、培養中のメタノールの蒸発損失を 3% とすれば、メタノール炭素の総合回収率は 97% となり、メタノール資化性菌の培養における炭素バランスの実態がほぼ明らかになる。

種々のメタノール資化性菌について、菌体収率係数と酸素要求量の実測値をまとめたものが Table 9 である。これらの値は菌体収率係数によって変化するが、酸素要求量は、ほぼ生成菌体の 1.5~2 倍であることが理解される。

メタノール培養系への酸素の供給 メタノールは分子中に 50% の酸素を含むため、培養に際して要求される酸素量は *n*-パラフィンを炭素源とする時に比較

Table 9. Oxygen demand of methanol-assimilating microorganisms.

	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{X/O}$ (g/g)	O_2/cell (g/g)	R.Q. (mol/mol)	CO_2/cell (g/g)	Reference
<i>Hansenula polymorpha</i>	0.37	0.36	2.78	—	—	44)
<i>Pseudomonas</i> AM-1	0.33	0.37	2.72	0.49	1.83	45)
<i>Pseudomonas methanolica</i>	0.52	0.65	1.54	—	—	25)
<i>Methylobacterium methanolicum</i>	0.48	0.53	1.89	0.52	1.34	18)
<i>Aeromonas methanocola</i>	0.47	0.69	1.45	0.57	1.85	20)
<i>Corynebacterium methanophilum</i>	0.47	0.54	1.84	—	—	22)

Table 10. Optimum D.O. for growth of methanol-assimilating microorganisms.

Microorganism	Optimum D.O.	Reference
<i>Candida</i> N-17	2~10 ppm (batch)	17)
	1~5 (continuous)	17)
<i>Pseudomonas</i> AM-1	28.5~110 mmHg	45)
<i>Methylomonas methanolica</i>	0.8~3.9 ppm	18)

して低い値である。⁴⁾ 一方培養時に維持すべきメタノール発酵系の溶存酸素濃度は Table 10 のように、ほぼ 1 ppm 以上であるとされている。^{17,18,45)} 今、菌体の生産性を $3.5 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{hr}$ とすれば、培養槽に要求される酸素供給の容量係数 k_{La} は 800 hr^{-1} にもなり、かなり高い酸素供給条件となる。このような高い酸素供給能をもった培養槽としては、従来の通気かくはん培養槽では投入動力が著しく高くなるため経済的ではないので、ほとんどの培養槽が通気のみによる tower type fermentor である。すなわち ICI では pressure cycle fermentor,⁴⁶⁾ Hoechst では loop reactor,⁴⁰⁾ わが国の三菱瓦斯化学工業㈱では、perforated plate tower type fermentor¹⁷⁾ を開発している。ここでは、これらの培養槽についての解説は多く紹介されているので^{6,7,40)} 省略し、著者らが行ったメタノール資化性菌の培養における k_{La} の挙動についての基礎的知見のいくつかを紹介したい。

培地成分が十分に吟味され、メタノールの供給も微生物の代謝に都合よく行われるとき、生育を律速するものは、酸素の供給速度であることは間違いない。*Aeromonas methanocola* を空気通気および空気と酸素の混合気で培養系の溶存酸素濃度を 1 ppm 以上に維持しつつ培養した時の生育の比較を Table 11 および Fig. 9 に示した。菌体の生産性は酸素供給律速になっていることが認められる。

培養槽の酸素供給能の測定には亜硫酸ソーダ法がよく用いられる。しかし亜硫酸ソーダ法による酸素供給速度 K_dP_g ($\text{gO}_2/\text{l} \cdot \text{hr}$) と実際のメタノール培養系への酸素の溶解速度には、かなりのギャップが認められている。すなわち、*Aeromonas methanocola* の場合、Fig. 5 に示したように菌体収率係数 0.5 の時の酸素要求量を菌体生産性の 1.55 倍とすると、亜硫酸ソーダ法で測定した K_dP_g から期待される菌体生産性は、 $K_dP_g/1.55$ となるが、実際の培養系では、これより低くなり、亜硫酸ソーダ法 K_dP_g の約 1/3 の菌体生産性しか発揮さ

Table 11. Effect of O_2 -enriched gas on the growth of *Aeromonas methanocola* in continuous cultivation.²⁰⁾

Agitation (rpm)	600	700	500	600
Aeration (vvm)	1.5 (air)	2.0 (air)	2.0 (air)	(N_2 : 60%)* (O_2 : 40)
X (g/l)	14.1	13.9	12.3	23.5
μX (g/l hr)	2.12	2.08	1.85	3.53
$Y_{X/S}$ (g/g)	0.48	0.46	0.48	0.52
Crude protein (%)	76.5	77.5	76.3	78.5
RNA (%)	10.5	9.6	10.1	10.6

Cultivation was carried out in a 20-l fermentor at 35°C and pH 7.0.

Methanol was added with an automatic feeding device and medium containing constituents other than methanol was fed continuously to the fermentor.²¹⁾ Mean dilution rate was kept at $0.15 \text{ (hr}^{-1}\text{)}$.

* D.O. was maintained at 1 ppm.

れていない。倉石ら¹⁷⁾によると *Candida* N-17 の多孔板 tower type fermentor による培養では亜硫酸ソーダ法 K_dP_g の約 60% しか実効しなかったとしている。いずれにせよ、菌体生産性の約倍量の K_dP_g をもつ培養槽が必要であると思われる。

Aeromonas methanocola を空気をを用いて通気かくはん培養した時のマスバランス法による k_{La} の変化を Fig. 6 に示した。培養の経過とともに k_{La} は著しく低下しており、特に培養後期の低下が著しい。これは菌体量の増加に関係しており、培養液の液質の変化によるも

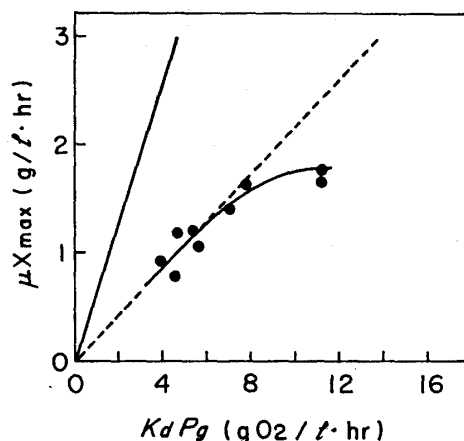


Fig. 5. Relationship between oxygen absorption rate of fermentor estimated by sulfite method, K_dP_g and productivity of cell mass, $\mu X_{\max}$, in the cultivation of *Aeromonas methanocola* in 20-l fermentor.

—: $\mu X = K_dP_g/1.55$ (theoretical line)
 ---: $\mu X = K_dP_g/4.65$ (experimental line)
 ●: Experimental data.

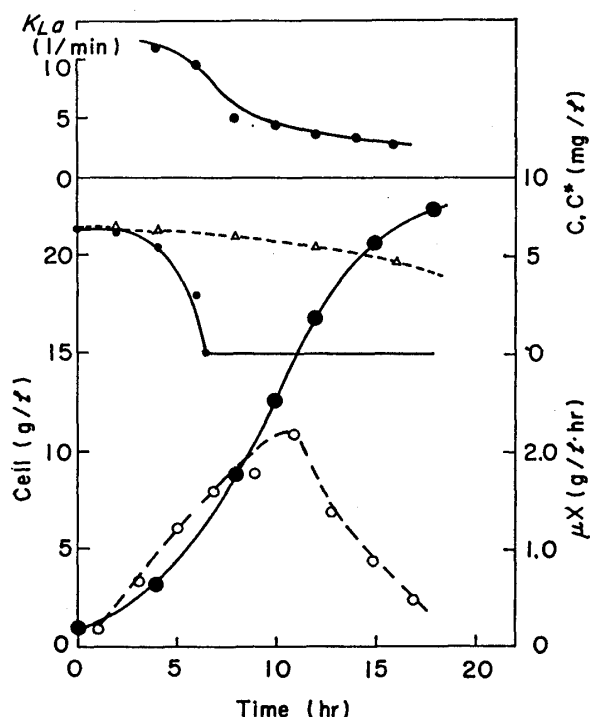


Fig. 6. Change of oxygen absorption rate coefficient measured by mass balance method, $K_L a$, during the cultivation of *Aeromonas methanocola* in a 20-l fermentor.

Cultivation was carried out at 35°C and pH 7.0. Aeration and agitation were kept at 1.5 vvm and 600 rpm, respectively. Methanol concentration was maintained at less than 0.8 g/l using the automatic feeding device.

—●—: Dissolved oxygen concentration, C .
 ---△---: Saturate dissolved oxygen concentration, C^* .
 —●—: Cell growth.
 ---○---: Cell productivity, μX .

のと考えている。なお興味深い現象として、メタノールの極微量は、亜硫酸ソーダ法の $K_d P_g$ に大きな影響を与えることが認められている (Fig. 7)。実際の培養系で、このような現象が起こっているかは不明であるが、ちょうどメタノール資化性菌の最適メタノール濃度範囲において著しく低い $K_d P_g$ になっているのは皮肉な現象といえよう。メタノールのもつ界面活性作用により気泡が微細になることはよく認められるが、詳細な解析は行っていない。

5. メタノール資化性菌の菌体生産

メタノール資化性菌を用いて、微生物たんぱく質を生産する技術と、安全性、有効性さらには経済性については総説^{9,47)}があるのでそちらを参照していただき、ここでは著者らが経験したことをもとにして述べてみ

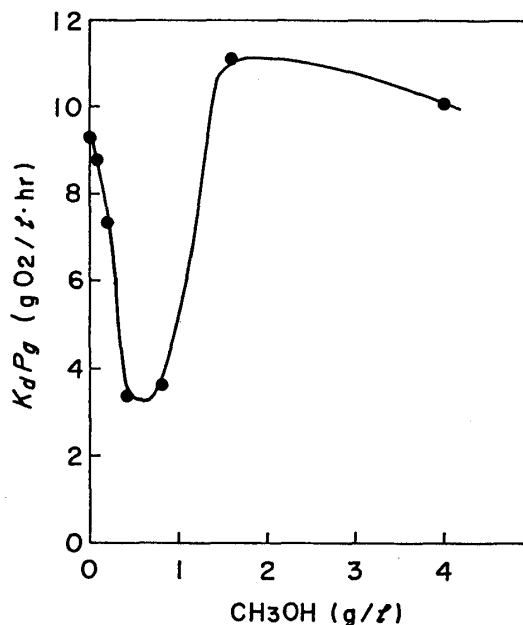


Fig. 7. Effect of methanol on the oxygen absorption rate estimated by sulfite method, $K_d P_g$. Experiment was carried out in a 20-l fermentor with a working volume of 10 l. Aeration and agitation were kept at 1.0 vvm and 600 rpm, respectively. Temperature was kept at 35±1°C.

たい。

微生物たんぱく質の生産を企画するとき、最も重要なことは菌株の選択である。著者らは酵母として *Candida methanophilum*,³⁸⁾ グラム染色陽性細菌として *Corynebacterium methanophilum*,²¹⁾ さらにグラム染色陰性細菌として *Aeromonas methanocola*²⁰⁾ の3菌種について研究を行った。これらはすべて新菌種であり、その特徴の概略を Table 12 に示した。またこれらの菌種の顕微鏡写真を Fig. 8 に示した。以下に、これら3菌種を微生物たんぱく質生産の観点から比較してみたい。

培養成績の比較 3菌種ともに、最適な培地組成には大きな差は認められず、通常ミネラル、アンモニアを含むものであればよく生育するので、経済性においては大差はないものと考えられる。特に注目しなければならないのは、培養温度と食塩耐性である。培養温度は、冷却コストの削減と雑菌汚染防止のために高温が好ましい。*Can. methanophilum*, *Cory. methanophilum* とともに 30~32°C が上限であったが *Aer. methanocola* は 39°C でも十分に培養が可能であった。一方食塩耐性は、海水培地中での培養を可能にするが、*Aer. methanocola* は、8%食塩まで生育ができるものであった。それぞれの菌種について検討した最適培養条

Table 12. Description of methanol-assimilating microorganisms.^{20,21,38)}

Yeast	Gram-Positive bacteria	Gram-Negative bacteria
<i>Candida methanophilum</i>	<i>Corynebacterium methanophilum</i>	<i>Aeromonas methanocola</i>
1.5~2.5×5~7 μm	0.7~0.9×1.0~2.7 μm	0.4~0.7×0.8~1.2 μm
Elliptical to elongate	Short rod	Short rod
Grayish-white colony	Pale creamy colored	Grayish-creamy colored
No pigment	No pigment	No pigment
No ascospore	No spore	No spore
	Non motile	Motile (polar flagella)
Biotin requirement	No requirement	Thiamine requirement
Assimilation of carbohydrates		
Glucose, Sucrose, Maltose, Ethanol.	Glucose, Galactose, Maltose, Ethanol.	Glucose, Sucrose, Maltose, Ethanol.
Isolated from soil	Soil	Sea water

件における生育曲線の比較を、Fig. 9 に示した。μ_{max} は *Can. methanophilum* は 0.15 (hr⁻¹), *Cory. methanophilum* は 0.24 (hr⁻¹), さらに *Aer. methanocola* は連続培養における wash-out 曲線より 0.66 (hr⁻¹) であることが認められた。グラム染色陰性細菌が最も速く生育することは、通常の菌株分離操作では、グラム染色陰性細菌のみ分離される事実と矛盾しない。しかし著者らが分離したグラム染色陽性の *Cory. methanophilum* の生育速度は、必ずしも低いものではなく、十分に実用化しうる生育速度であると考えている。

菌体収率は、*Can. methanophilum* が最も低くて、0.36 であり、両細菌は0.47~0.52と高い値を示している。これらの培養成績の概要を Table 13 にまとめた。

なお菌体の培養液からの分離回収は、*Aer. methanocola* はなんらかの前処理をする新しい分離技術の開発が必要であったが、*Can. methanophilum*, *Cory. methanophilum* は通常の遠心分離機の使用が可能であった。

微生物たんぱく質の品質の比較 最適培養条件で培養して調製した3菌種の菌体の品質を Table 14 に比較して示した。いずれもクリーム色系のきれいなパウダーであるが、細菌の方が酵母よりも微粉末である。粗たんぱくは *Aer. methanocola* が最も高く、*Cory. methanophilum*, *Can. methanophilum* の順であった。逆に炭水化物含量は、酵母が最も高かった。微生物たんぱく質の *in vitro* での評価の1要因であるペプシン人工消化率は、酵母、グラム染色陰性菌はほとんど完全に消化されたが、グラム陽性菌はやや消化率が低かった。しかしこれは菌体の加熱処理などにより改善できるものであった。

3菌種の必須アミノ酸組成を Table 15 に示した。多少の変化はあるが、いずれも同じようなアミノ酸組成である。一般に言われているように、酵母にはL-リジンが多く、反対に細菌ではL-シスチン、L-メチオニン等の含硫アミノ酸が多く含まれる傾向がうかがわれ

Table 13. Growth of methanol-assimilating microorganisms.^{20,21,38)}

	<i>Candida methanophilum</i>	<i>Corynebacterium methanophilum</i>	<i>Aeromonas methanocola</i>
Optimum temperature	25~30°C	28~32	35~36*
Optimum pH	5~6	6.5~7.5	6.5~7.5
NaCl tolerance	Grow upto 2%	Grow upto 5%	Grow upto 8%
μ _{max}	0.15 hr ⁻¹	0.24	0.66
Productivity (batch culture)	16.5 g/l (48 hr)	21.2 g/l (34 hr)	22.5 g/l (18 hr)
Cell yield for methanol (Y _{X/S})	0.36	0.47	0.47~0.52
Oxygen demand (O ₂ /cell)	—	1.84	1.45

* *Aeromonas methanocola* can grow at 39°C in continuous culture.

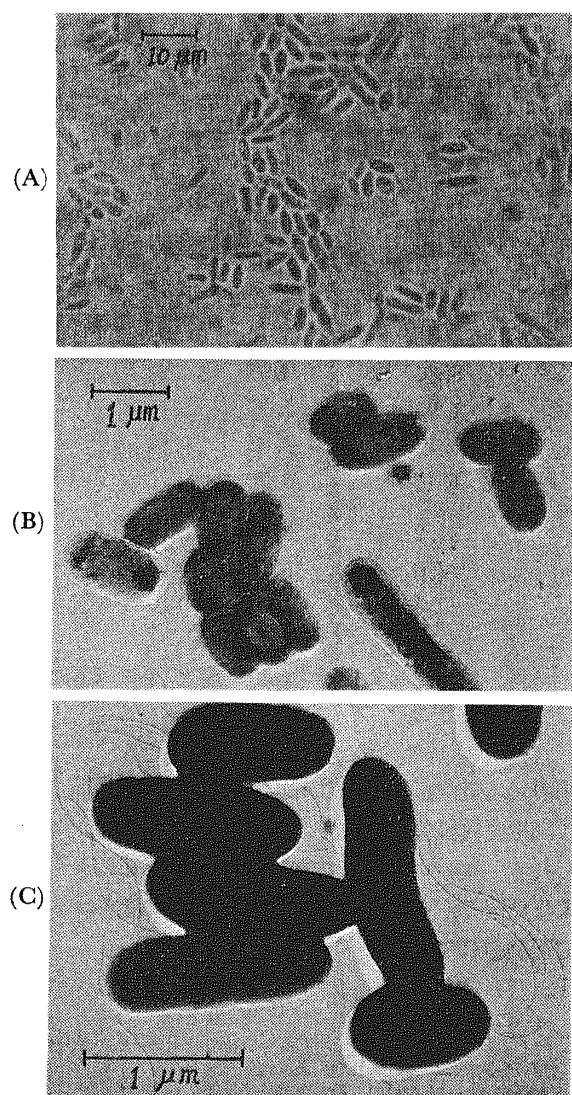


Fig. 8. Photomicrograph and electron micrographs of methanol-assimilating microorganisms.

- (A) *Candida methanophilum* SY-97
 (B) *Corynebacterium methanophilum* R-194
 (C) *Aeromonas methanocola* R-1332

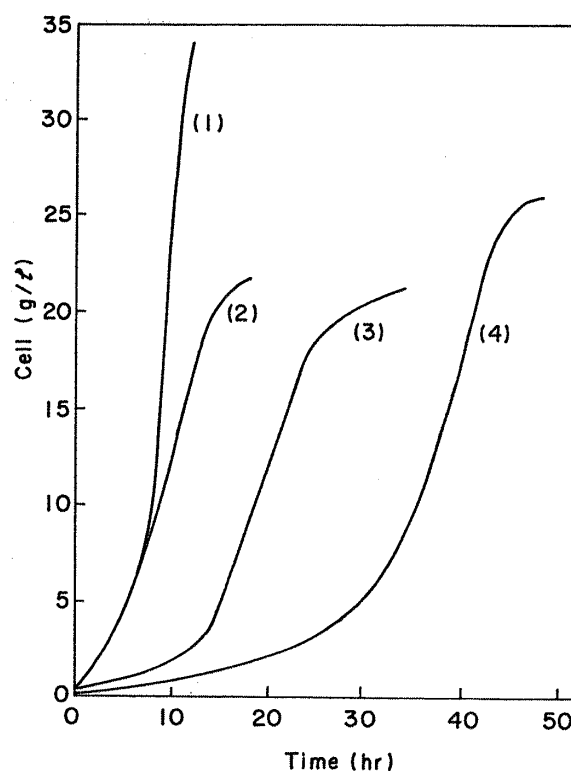


Fig. 9. Growth of methanol-assimilating microorganisms in 20-l fermentor under the optimum cultivation conditions for each microorganism.
 (1) *Aeromonas methanocola*, oxygen-enriched gas was supplied.
 (2) *Aeromonas methanocola*, air was supplied.
 (3) *Corynebacterium methanophilum*, air was supplied.
 (4) *Candida methanophilum*, air was supplied.

る。いずれの菌種についても、必須アミノ酸は全菌体アミノ酸の0.41~0.46であり大きな差はなかった。

以上の諸成績より、アミノ酸バランスも3菌種で同じ程度であるから、これらの微生物たんぱく質の価値は、乾燥菌体中の全アミノ酸含有量で比較できよう。

Table 14. Chemical composition of methanol-assimilating microorganisms.^{20, 21, 38)}

	<i>Candida methanophilum</i>	<i>Corynebacterium methanophilum</i>	<i>Aeromonas methanocola</i>
Crude protein	59.5%	68.4	81.4
Extractable lipid	4.6	10.9	5.3
Carbohydrates	22.1	11.7	7.8
Crude fiber	2.2	0.6	0.25
Crude ashes	10.1	6.8	8.0
Pepsin digestability	97.3	83.3	95.9
Appearance of SCP	Cream powder	Cream powder	Grayish-cream powder

Table 15. Comparison of essential amino acid profiles.^{20,21,38)}

Amino acid (g/100 g CP)	<i>Candida methanophilum</i>	<i>Corynebacterium methanophilum</i>	<i>Aeromonas methanocola</i>
Lysine	6.14	5.15	5.25
Threonine	4.57	3.86	3.51
Cystine	1.56	1.42	1.25
Methionine	1.21	1.55	2.01
Valine	4.94	4.77	5.29
Isoleucine	4.82	4.61	5.14
Leucine	6.49	6.26	6.98
Tyrosine	3.26	1.96	2.95
Phenylalanine	4.07	3.17	3.85
Tryptophan	0.61	1.46	0.79
Essential amino acid	37.7	34.2	37.0
Total amino acid	86.7	82.6	80.9
Essential AA/Total AA	0.43	0.41	0.46
Crude protein (% of dry cell)	59.5	68.4	81.4
Total amino acid (% of dry cell)	51.6	56.5	65.8

Can. methanophilum の全アミノ酸含有量を100とすれば、*Cory. methanophilum* 109, *Aer. methanocola* 128 となり、グラム陰性細菌が最も高い値となる。

メタノール資化性菌をはじめとする種々な微生物たんぱく質の家禽、家畜、水産生物を用いる栄養学的試験研究や安全性に関する研究は、わが国では農林水産省畜産試験場、家畜衛生試験場、東海区水産研究所、淡水区水産研究所、科学飼料協会などの専門研究機関で行われており、メタノール資化性菌の微生物たんぱく質の飼料としての有効性、安全性が認められる研究成果が得られている。

6. お わ り に

いわゆる化石系炭素源を利用する発酵研究は、酢酸から始まり、*n*-パラフィンを経て、メタン、メタノールなどの C_1 化合物の時代になっている。微生物たんぱく質の生産研究を中心として、ここ数年間活発な研究が行われ、メタノール利用発酵の利点や問題点が明らかになってきた。一方エネルギーや資源の有効利用の考えは、発酵原料にも影響を与え、より省エネルギー、省資源の発酵プロセスの開発が望まれよう。こうした観点からみると、目的生産物が微生物たんぱく質にせよ他の代謝産物にせよ、メタノールは糖蜜と並んで重要な発酵原料となることは間違いないと思われる。そうしたメタノール利用発酵を世に出すためには、従

来の考え方から脱皮した新しい発想による研究、とくに高生産性の菌株の発見と育種、培養方法の研究が待たれる。微生物たんぱく質の開発を通じてメタノール資化性菌を生育させる培養技術は企業化技術の段階まで開発されているからである。

この総説は、日本農芸化学会大会 C_1 微生物利用 シンポジウム (1978年4月名古屋) で発表したものをまとめたものである。メタノールの利用発酵の研究を遂行するにあたり、有益な助言と指導をいただいた、当社食品発酵化学事業部長大沢岳義博士、大沢浩氏、成田喜久雄氏、曾和常雄博士に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) 緒方, 西川, 大杉, 柄倉: 醸工, **48**, 470 (1970).
- 2) MacLennan, D. G., Gow, J. S., Stringer, D. A.: *Process Biochemistry*, p. 22, June (1973).
- 3) 緒方, 加藤: 石油と微生物, **8**, 4 (1972).
- 4) Cooney, C. L., Levine, D. W.: *Advances in Applied Microbiol.*, **15**, 337 (1972).
- 5) Ribbons, D. W., Harrison, J. E., Wadzinski, A. M.: *Annual Review of Microbiology*, **24**, 135 (1970).
- 6) 尾崎: 食品工業, **17**, No. 4, p. 27 (1974).
- 7) 山内, 上林: SCP (Single Cell Protein) の生産と利用, p. 64, 醸酵協会, 東京 (1975).
- 8) 加藤: 油化学, **23**, 445 (1974).
- 9) 加藤: 化学経済, 9月号, p. 39 (1977).

- 10) 水素利用 サブシステムの 総合的検討と 周辺技術
に関する研究 (サンシャイン計画委託研究), 日
本化学工業協会, 東京 (1977).
- 11) 石垣: 石油と石油化学, **21**, 22 (1977), **21**, 34
(1977).
- 12) Anonymous: *Chemical Week*, Nov. 30, p. 28
(1977).
- 13) Saito, T.: *Process Biochemistry*, p. 17, March
(1977).
- 14) メタノールの大規模利用に関するテクノロジー・
アセスメント報告書, 日本産業技術振興協会,
東京 (1976).
- 15) 三村, 和田, 坂下, 橋本, 曾和: 醸酵工学会大
会要旨集, p. 102 (1975).
- 16) Goto, S., Okamoto, R., Kuwajima, T., Taka-
matsu, A.: *J. Ferment. Technol.*, **54**, 213 (1976).
- 17) 倉石, 寺尾, 三原, 渡辺, 浦上, 上林, 外村,
藤井: 日農化関東支部大会 (1973).
- 18) Dostálek, M., Molin, N.: Report No. 37,
Karolinska Institute, Avdelningen för Tillämpad
Mikrobiologi, (1973).
- 19) Yamada, S., Nabe, K., Wada, M., Chibata, I.:
J. Ferment. Technol., **55**, 436 (1977).
- 20) Mimura, A., Wada, M., Kobayashi, M., Seo,
T.: *J. Ferment. Technol.* in preparation.
- 21) Mimura, A., Wada, M., Sakashita, H., Hashi-
moto, Y., Sowa, T.: *J. Ferment. Technol.*, **56**,
243 (1978).
- 22) 矢野, 小林, 清水: 醸酵工学会大会要旨集 p. 215
(1976).
- 23) 大橋: 工業化学雑誌, **61**, 100 (1958).
- 24) Yamane, T., Kishimoto, M., Yoshida, F.: *J.*
Ferment. Technol., **54**, 229 (1976).
- 25) 沢田, 沢田, 高田, 照井: 農芸化学会大会要旨
集, p. 133 (1971).
- 26) Harrison, D. E. F.: *J. Appl. Bacteriol.*, **36** 301,
309 (1973).
- 27) Herbert, D.: *Recent Progress in Microbiology*,
Almqvist Wiksell, Stockholm (1959).
- 28) 永井, 沖, 林: 醸酵工学会大会要旨集, p. 91
(1977).
- 29) Shimizu, T., Taguchi, H.: *J. Ferment. Technol.*,
48, 277 (1970).
- 30) Goto, S., Kitai, A., Ozaki, A.: *J. Ferment.*
Technol., **51**, 582 (1973).
- 31) Ghose, T. K., Mukhopadhyay, S. N.: *J.*
Ferment. Technol., **54**, 738 (1976).
- 32) Mimura, A., Kawano, T., Yamaga, K.: *J.*
Ferment. Technol., **48**, 68 (1970).
- 33) 正田, 塚腰: 醸酵工学会大会要旨集, p. 190
(1975).
- 34) Brooks, J.D., Meers, J.L.: *J. General Microbiol.*,
77 513, (1973).
- 35) Shimizu, S., Yano, T., Kobayashi, T.: *Ab-*
stracts of 2nd International Symposium on Microbial
Growth on C₁-Compounds, p. 184, Pushchino
(1977).
- 36) 西尾, 土屋, 林, 永井: 醸酵工学会大会要旨集,
p.230 (1976).
- 37) Nishio, N., Tsuchiya, Y., Hayashi, M., Nagai,
S.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 151 (1977).
- 38) Mimura, A., Wada, M., Nakano, T., Haya-
kawa, S., Iguchi, T.: *J. Ferment. Technol.*, in
press.
- 39) Reuss, M., Gnieser, J., Reng, H. G., Wagner,
F.: *Europ. J. Appl. Microbiol.*, **1**, 295 (1975).
- 40) Faust, U., Präve, P., Sukatsch, D. A.: *J.*
Ferment. Technol., **55**, 609 (1977).
- 41) Akiba, T., Fukimbara, T.: *J. Ferment. Technol.*,
51, 134 (1973).
- 42) 藤田: 化学工学, **27**, 270 (1963).
- 43) 化学工学便覧, 化学工学協会編, 丸善, 東京
(1968).
- 44) Cooney, C. L., Levine, D. W., Snedecor, B.:
Food Technol., **29**, 2, (1975).
- 45) MacLennan, D. G., Ousby, J. C., Vasey, R. B.,
Cotton, N. T.: *J. General Microbiol.*, **69**, 395
(1971).
- 46) Slater, L.: *Food Engineering*, p. 68, July (1974).
- 47) 日比野: 化学経済, p. 34, 9月号 (1977).

(昭53. 6.28受付)