

〔醸酵工学会誌 第69巻 第5号 355-362, 1991〕

連続発酵における質量流量計を使用したアルコール濃度のオンライン測定†

松浦 一雄*・広常 正人・仲田富士男・浜地 正昭

大関(株)総合研究所
〒663 西宮市今津出在家町4-9

(平成3年2月21日受付 平成3年6月10日受理)

On-line estimation of ethanol concentration in continuous fermentation using a mass-flow meter. KAZUO MATSUURA,* MASATO HIROTSUNE, FUJIO NAKADA, and MASAOKI HAMACHI (General Research Institute, Ozeki Co., Ltd., 4-9 Imazu Dezaike-cho, Nishinomiya-shi, Hyogo 663) Hakkokogaku 69: 355-362, 1991.

A method for the estimation of ethanol concentration using a mass-flow meter to detect the CO₂ evolved from a continuous fermentor was developed. In a single-stage reactor, an estimating equation was theoretically constructed from a differential equation of mass balance for ethanol production. It was:

$$P_t = \exp\left(-\int_{t_0}^t D dt\right) \left\{ \int_{t_0}^t \exp\left(\int_{t_0}^t D dt\right) K V_{CO_2} / V dt + P_{t_0} \right\}.$$

Here, if the dilution rate, D , and CO₂ gas flow rate, V_{CO_2} , from time t_0 to t were given, the ethanol concentration could be determined. The constant, K , defined as the amount of ethanol produced (g) per liter of evolved CO₂, was affected by the temperature in the continuous fermentor. A learning method to identify the constant in the running reactor is proposed. By this method, when about 10 ethanol measurements were obtained by gas chromatography, the constant was identified with near accuracy, and differences between the measured and calculated values were very narrow.

前報^{1,2)}において糖化液を用いた清酒の連続醸造に関し繰り返し半回分発酵槽(以後前槽とする)とこれに連結したカラムからなる装置が、雑菌汚染に対して強い抵抗力を持っていること、また、その装置を運転、設計するのに必要な動力学的研究を報告した。一方、杜氏の高齢化や慢性的な人手不足などを考えると、本バイオリアクターシステムのオンライン計測および制御は実現すべき課題であった。

清酒醸造においてアルコールの計測は最大の要点であり、そのオンライン計測の試みがいくつか報告されている。近藤ら³⁻⁵⁾は従来の清酒醸造において、自動サンプリング装置、チュービングセンサー法、超音波

音速度計を、大石ら⁶⁾は液化仕込みにおいて振動式密度計により醪中のアルコール濃度および比重を正確に測定し得ることを報告している。

今安ら、⁷⁾柴田⁸⁾は、清酒醸造も含めた回分発酵におけるアルコール濃度の測定が、発生するCO₂ガスを測定することによって可能であることを報告しているが、連続発酵方式におけるアルコール濃度の測定に関する報告はない。これは槽からの発酵液の流出、希釈を伴うため回分発酵における方法が適用できないためである。

本報では、連続発酵槽内のアルコール濃度を、質量流量計を用いて発生するCO₂ガスを測定することにより推定することを目的として研究を行ったので報告する。

† 清酒の連続醸造に関する研究(第3報)。

* 連絡先, Corresponding author.

実験方法

供試菌株 *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai-701 を用いた。

培地組成 半合成培地として、1 l 中 KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, ポリペプトン 10 g, 酵母エキス 5 g を含むものを用いた。糖化液は前報¹⁾に従い調製した。

固定化酵母 担体としてアルギン酸ナトリウム 3 %, 塩化カルシウム 2 % を用い、前報¹⁾に従い調製し、これを前培養後 4°C にて保存し、適宜使用した。

分析 エタノールはガスクロマトグラフィーを用いて測定した。

装置 連続発酵槽から発生する CO_2 を測定するために、発酵槽から流出する気液混合状態の発酵液をガス液分離装置に導き、大半の CO_2 ガスを分離した。本装置の概略図を Fig. 1 に示すが、発酵液はまず槽 A に入り、ここで液は管 B を通り槽 C に落下し、槽 C での増分は貯蔵槽に送られる。一方槽 A 中のガスが槽 C へ移動しないよう槽 C 内の液部が示す管 B への圧力が、ガスが槽 C へ与える圧力に勝る程度に十分な容積を槽 C が持つように製作した。ガス液分離装置は以上のように構成し、流出する液部に溶存する

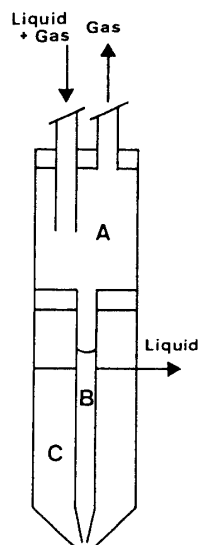


Fig. 1. Schematic diagram of gas-liquid separator.

Fermented sake consisting of liquid and gas from the continuous fermentor enter compartment A; the liquid phase of the sake flows down to compartment C, through the tube B. On the other hand, the gas phase exiting from compartment A is sent to a flask of 60% H_2SO_4 and a mass-flow meter.

CO_2 は測定しておらず、誤差要因として振舞うと考えられるため後述の校正方法を用意し、誤差を吸収することとした。

槽 A から流出するガスを 60% 硫酸水溶液槽を通過させることにより水分を除いた。なお回分発酵槽および前槽から発生するガスは直接硫酸槽に導いた。ガス流速は KOFLOC 社製質量流量計にて測定した。本装置の示す流速値は 20°C, 1 気圧における値として出力され、A/D コンバータを介してコンピュータに取り込み、温度データ、通液速度とともに保存した。

結果および考察

アルコール濃度推定式

1. 回分発酵槽 回分発酵におけるアルコール濃度の測定にはいくつかの報告があるが、杉本ら²⁾は次の式により測定可能であったと報告している。回分発酵におけるアルコール生成に関する状態方程式は、

$$dP/dt = \nu X \quad (1)$$

であり、ここで、 t は時間、 P はアルコール濃度、 X は菌体濃度、 ν は比生成速度である。アルコール生成は化学量論的に CO_2 生成と比例関係にあるとして、(1) 式は次のように書き換えられる。

$$dP/dt = K V_{\text{CO}_2} / V \quad (2)$$

ここで、 V_{CO_2} は CO_2 発生速度、 K は定数であり、今、

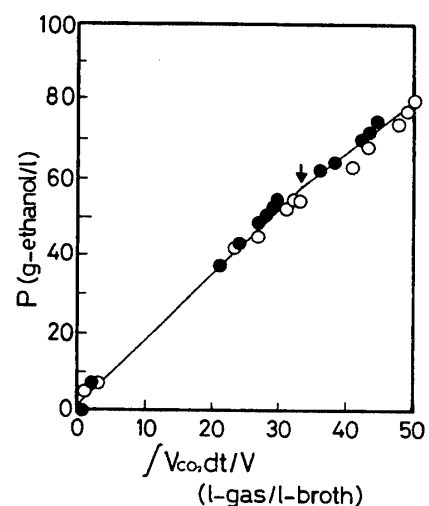


Fig. 2. Relationship between evolved CO_2 gas volume and produced ethanol in batch fermentation at room temperature. The arrow indicates the turning point of the slope. Two mass-flow meters were employed; ○ and ●.

換算定数と呼び、単位 CO_2 発生量あたりのアルコール生成量を示す。 V は発酵液容量である。(2) 式を時間 t_0 から t まで積分すると、

$$P_t = P_{t_0} + K/V \int_{t_0}^t V_{\text{CO}_2} dt \quad (3)$$

すなわち、ガス積算量(流量)はアルコール濃度の増加量と比例関係にあることを示している。この式を用いて、回分発酵におけるガス発生速度の積算値とアルコール濃度を測定した結果を Fig. 2 に示した。容量 300 ml の三角フラスコに半合成培地 300 ml を入れ、室温にて発酵させた。ほぼ、その関係は直線的であるが、図中矢印で示した部分を境として、わずかにその傾きが変化していることが観察される。前半部の傾きは $K=1.99$ (g-ethanol/l- CO_2 gas), 後半部は 1.69 であった。これは、増殖にともなう発酵により生ずる、 CO_2 の寄与が矢印部分を境として無くなったか、あるいは少なくなったため¹⁰⁾であると推察できる。また、 CO_2 ガスとアルコールが等モル生成するとすると 20°C , 1 気圧でその傾きは 1.91 であるが、得られた値はこれに近いものであった。

完全な回分発酵においてはこのことを考慮した上で適用すべきであるが、清酒醸造では主発酵期間である留時以降の酵母増殖はほとんどなく、また、今回の装置はアルコール濃度が前槽において 2-6 v/v% (15.8-39.5 g/l), カラムにおいて 10 v/v% (79 g/l) 前後になるよう運転されるので、前槽では増殖が寄与する発酵、カラムにおいては増殖が寄与しない発酵が生じているとみなして今回このことは無視した。

2. 前槽 本報の発酵システムは前槽において繰り返し回分発酵を行っているが連続的に抜取りを行い、固定化酵母充填カラムに通液している。このため、前槽では液量の減少を考慮する必要があったので次の式によった。

$$P_t = P_{t_0} + K_f \int_{t_0}^t V_{\text{CO}_2} / V_t dt \quad (4)$$

ここで、 V_t は時間 t における液量を示しており、換算定数 K_f は他の発酵形式における定数と便宜上区別するため添え字をつけた。Fig. 3 に式(4)に基づき前槽における液量の減少を考慮した CO_2 発生量とアルコール濃度の増加量をプロットした。この結果は 2.6 l/容量ミニジャーを用い、温度が $10-25^\circ\text{C}$ の間で変動し、初発仕込量 1.5 l の前槽から流速 $0-0.04$ l/h で抜

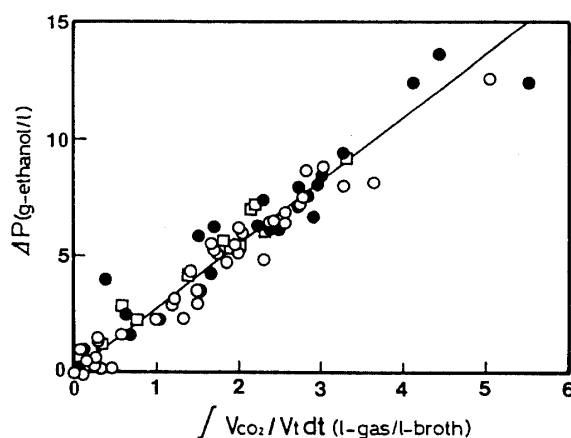


Fig. 3. Relationship between evolved CO_2 gas volume and produced ethanol in the pre-fermentor operated by the repeated fed-batch method. Symbols are the results of different experiments; ○, ●, and □.

取りを行った場合のものである。このとき 1 日に一度抜き取った量に等しい培地を供給した。アルコール濃度の実測値のなかに測定誤差 ($\delta_{n-1}=0.1137$) が含まれているため、若干のばらつきがあるものの、良好な直線関係が得られた。また、この時換算定数 K_f は半合成培地を用いた場合 $K_f=2.62$ (図中○) であり糖化液を用いた場合 2.75 (●), 2.96 (□) と求められ、3 回の実験結果とも大差なく、すべてのデータを用いた場合 2.71 となった。したがって、液量を考慮することにより、抜取りをともなう発酵に関しても発生ガスの測定により生成するアルコール濃度を推定できることが分かった。しかし、Fig. 2 で得られた値 1.69 および 1.99, また、理論値 1.91 と比べかなりの差があり、発酵槽を開放し培地供給を行う際に添加した培地量の分だけ発生ガス量を小さく見積ったため大きな値となったと考えられた。

3. 連続発酵槽 次に、連続発酵におけるアルコール濃度のオンライン測定方法について検討した。一般に単槽型の連続発酵槽において、物質収支に基づく速度式は次のように示すことができる。

$$dP/dt = \nu X - DP \quad (5)$$

ここで、 D は希釈率である。(5) 式中右辺第一項は菌体によるアルコール濃度の増加速度を示すものであるから、回分発酵の式(1), (2) をもとに書き換え、

$$dP/dt = K_2 V_{\text{CO}_2} / V - DP \quad (6)$$

式(5)における X は、より一般化したものとして、遊

離酵母および固定化酵母の両方を含むものとして取り扱った。さて、式(6)を非同次型の微分方程式として積分すれば、時間 t におけるアルコール濃度 P_t は

$$P_t = \exp\left(-\int_0^t D dt\right) \left\{ \int_0^t \exp\left(\int_0^t D dt\right) K_2 V_{CO_2} / V dt + P_0 \right\} \quad (7)$$

すなわち、式(7)により、 CO_2 ガス流速、アルコール濃度の初期値および希釈率を知ることができれば、時間 t におけるアルコール濃度を知ることが可能となる。

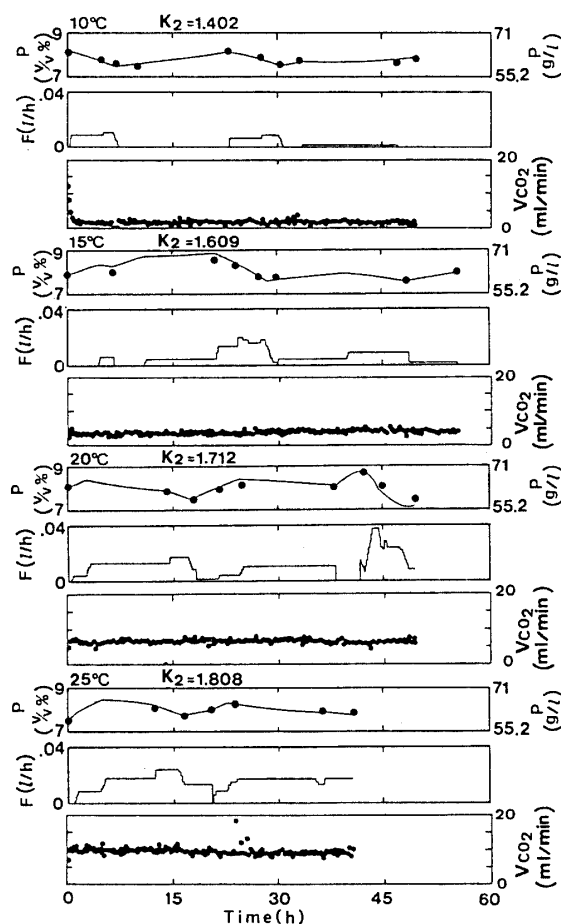


Fig. 4. Simulation analysis of continuous fermentation with immobilized yeast cells according to Eq. (7). Lines were calculated from the dilution rate (feed rate divided by broth volume) and gas flow rate. Symbols are measured values. Conversion constants, K_2 , were decided at various temperatures by the shooting method, i.e. iteration until the square sums of differences of the simulated and measured values were minimum. P , ethanol conc.; F , feed rate; V_{CO_2} , CO_2 flow rate every 10 minutes.

以上のようにしてアルコール濃度の推定式が導かれたので、実際に連続運転した結果に適用した。全容量 565 ml, 固定化酵母 105 ml の連続発酵槽を用意し、グルコース濃度 200 g/l の半合成培地を通液しながら、アルコール濃度がほぼ 8 v/v% (142 g/l) となるよう希釈率(流速)を適宜変えた実験結果を Fig. 4 に示した。実験は、10, 15, 20, 25°C にてそれぞれ行った。 CO_2 発生速度はコンピュータに取り込まれたのち、台形公式にて積分し、希釈率とともに保存した。実験終了後、保存しておいたアルコール濃度の初期値、希釈率、ガス流量より、式(7)を用いて実測値と推定値の差の二乗和が最小となるように換算定数を決定した。その換算定数は温度の影響を受けていることが明らかであったが、一旦換算定数が決定されれば良好に実測値を説明していることが分かった。Fig. 4 の結果をもとに、温度の対数値と換算定数をプロットしたところ (Fig. 5), 相関係数が最大となったので、次の経験式により温度補償を行うこととした。

$$K_2 = K_3 \log(T) + K_4 \quad (8)$$

ここで、 T は温度 (°C) であり、 K_3, K_4 は定数であり、それぞれ 1.01, 0.402 と求められた。換算定数 K_2 が温度に影響を受ける理由について次のことが考えられた。温度により発酵槽内の気体状 CO_2 の量が異なるため槽内の液正味量が変化していたのか、発酵液とともに流出する溶存 CO_2 が温度に影響を受け、流量計で測定するガス流量を小さくあるいは大きく見積ってしまったと考えられた。

式(7), (8)において、希釈率が $D=0$ の場合、回分発酵における式とみなすことができる。そこで、前槽

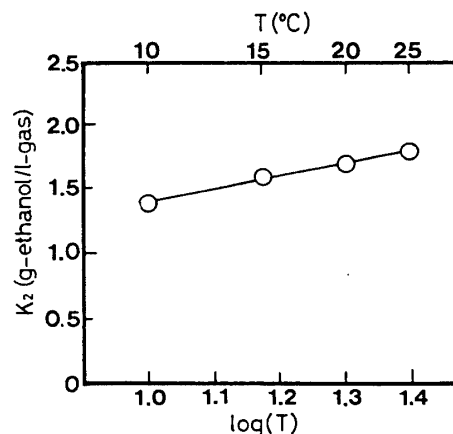


Fig. 5. Effect of temperature on conversion constant in continuous fermentor.

において温度を変えた場合、換算定数が影響を受けるか否かを調べてみた。前述のミニジャーにて各温度を一定条件に保ちつつ流速 0.01–0.02 (l/h) で採取を行った。この時培地の補給は行わなかった。その結果、Fig. 6 に示すように前槽に関して換算定数は影響を受けず一定値とみなして差し支えないと思われた。この時の傾きは $K_1=1.73$ であり理論値 1.91 に近い値が得られた。連続発酵槽の場合、希釈されていることおよび、発酵液が流出しているという事実が温度補償の必要性を生じせしめている原因であると考えられた。

換算定数の同定方法 固定化酵母を含む発酵槽において式 (7) 中の希釈率を知るためには固定化酵母ゲルの容量を測定する必要があるが、固定化酵母ゲルの容量は、固定化後の前培養により酵母増殖にともないゲルが膨張するため、その割合をあらかじめ予測することは困難である。また、用いるガス流量計を使用前に厳密に校正しなければ、以前使用した換算定数をそのまま用いる場合には危険をとまらう。また、前槽においては培地補給を行うことにより誤差要因が増す。

以上のような理由により、いかなる状態にあっても本測定系を使用可能とするために運転途中にアルコール濃度の実測値を与えれば換算定数を適宜同定するような機能を持たせることが望ましいと考えた。

前槽においては式 (4) 中のアルコール濃度の上昇、 $(P_t - P_0)$ に対するその間の液量考慮済みのガス発生量の間で線形の回帰計算を行うことで換算定数が同定可能である。さらにそれらのデータを記憶していき、新しいアルコールの実測値が得られるたびに過去のデータと共に回帰計算をするという手順を繰り返し学

習すれば実測値を測定する際のサンプリング、および分析誤差による同定誤差を小さくできるはずである。すなわち、Fig. 3 における傾きが同定済みの換算定数 K_1 と言うことができる。

一方、連続発酵槽に関して、換算定数 K_2 は温度の影響を受け、式 (8) のようになることを示したが、式 (7) を K_3 と K_4 由来の項に整理しなおして次の式のよう書き換え換算係数同定に使用することがまず考えられる。

$$P_t / \exp(-\int_{t_0}^t D dt) - P_{t_0} = K_3 \int_{t_0}^t \exp(\int_{t_0}^t D dt) \log (T) V_{CO_2} / V dt + K_4 \int_{t_0}^t \exp(\int_{t_0}^t D dt) V_{CO_2} / V dt \quad (9)$$

式 (9) 中の左辺の値とその時の右辺第一項中の K_3 以外の部分を回帰計算し得られた傾きを K_3 とし、切片を式 (9) 中の右辺第二項の K_4 以外の部分で除した値を K_4 とすれば同定可能であると考えられる。望ましくは式 (9) を用いて係数同定を行うべきであるが、実際には連続発酵槽内の温度はごく限られた範囲でしか変動しないので、回帰計算でこれらの換算定数 K_3 , K_4 を同定することは誤差が大きくなる恐れがあると思われた。そこで、今回は、換算定数の温度に対する影響は変動しないとみなし、 $K_3=1.01$ として固定し、 K_4 のみを同定することとした。式 (9) を再度書き換えて、

$$P_t / \exp(-\int_{t_0}^t D dt) - P_{t_0} - K_3 \int_{t_0}^t \exp(\int_{t_0}^t D dt) \log (T) V_{CO_2} / V dt = K_4 \int_{t_0}^t \exp(\int_{t_0}^t D dt) V_{CO_2} / V dt \quad (10)$$

とすることにより、式 (10) の左辺と右辺中の K_4 を除く部分を回帰計算に適用し、その傾きをとれば換算定数 K_4 が同定できることになる。

前槽付き連続発酵槽におけるオンライン測定 以上のようにして導き出された方法を、前槽を持つ固定化酵母を充填した連続発酵槽におけるアルコール濃度のオンライン測定に適用した。実際に糖化液を用い、前槽容量 1.5 l, リアクター容積 0.563 l, ゲル容積 30 ml とした場合の結果を Fig. 7 に示した。この結果は前槽において適応制御¹¹⁾ リアクターにおいてファジィ制御¹¹⁾ を行った結果である。前槽における 1 日ごとの目標濃度を 5 v/v% (39.5 g/l) とし、流出液の濃度が 9 v/v% (71 g/l) となるようガス流量計からの入力値を

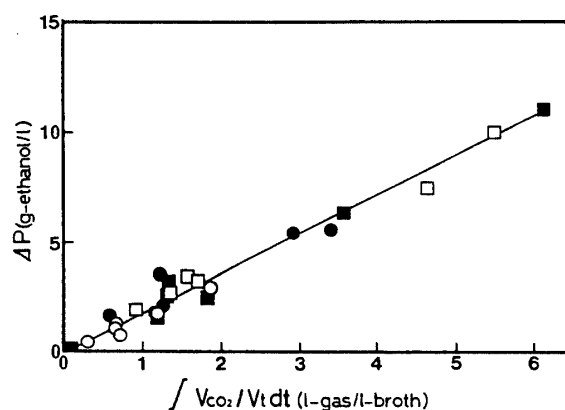


Fig. 6. Effect of temperature on conversion constant in the pre-fermentor operated by the repeated fed-batch method.

Symbols: ○, 10°C; ●, 15°C; □, 20°C; ■, 25°C.

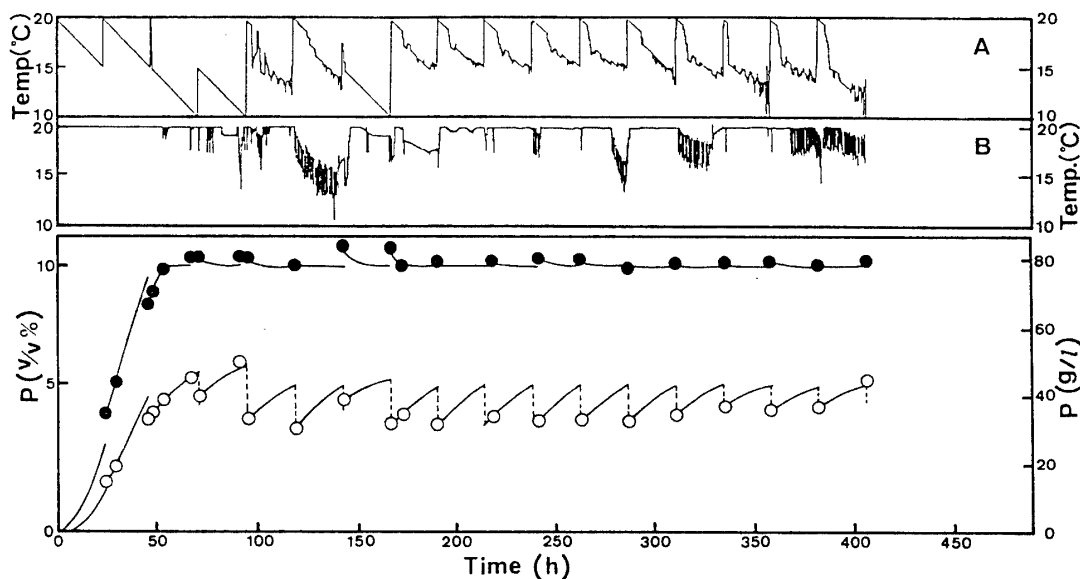


Fig. 7. On-line estimation of ethanol concentration in continuous fermentation with the pre-fermentor operated by the repeated fed-batch method. Solid lines are calculated results according to Eqs. (4), (8) and (11). Broken lines express the dilution by added saccharified solution. Symbols are measured values: ○, pre-fermentor; ●, continuous fermentor. Temperatures in A indicate the pre-fermentor; temperatures in B indicate the continuous fermentor.

もとに制御した。このため、前槽中の温度は10-20°Cの範囲で変化し、リアクターにおいても希釈率と温度が刻々と変化している。また、このとき連続発酵槽中のアルコール濃度の推定式は前槽からのアルコール流入を伴うためこれを考慮する必要があった。

$$P_t = \exp\left(-\int_{t_0}^t D dt\right) \left\{ \int_{t_0}^t \exp\left(\int_{t_0}^t D dt\right) (K_2 V_{CO_2} / V + DP) dt + P_{t_0} \right\} \quad (11)$$

ここで、 P' は前槽中のアルコール濃度である。

Fig. 7に示されるように、運転開始時に頻繁にアルコール濃度実測値を与えてやり換算定数を同定すれば、連続発酵槽の13番目のデータ以後のアルコール濃度推定値と実測値の差の平均は0.091%, その分散は0.139であり、実測値測定に使用したガスクロマトグラフィーの繰り返し精度は分散にして0.1137であることを考えると十分使用に耐え得るものであった。なお、Fig. 7中の実線の途切れは新しく与えた実測値へ推定値をシフトさせてあるためである。また、この時の前槽と連続発酵槽の換算定数 K_1 , K_2 の学習の過程をFig. 8に示したが、原点を必ず通過する回帰計算方法 (without intercept) によれば約10数回実測値を与えれば換算定数の同定が完了することが分かった。この時

前槽の換算係数 K_1 は、最終的に2.74と同定された。

Fig. 3において求められた値は2.71であり前槽においては再現性が高かった。また、連続発酵槽における換

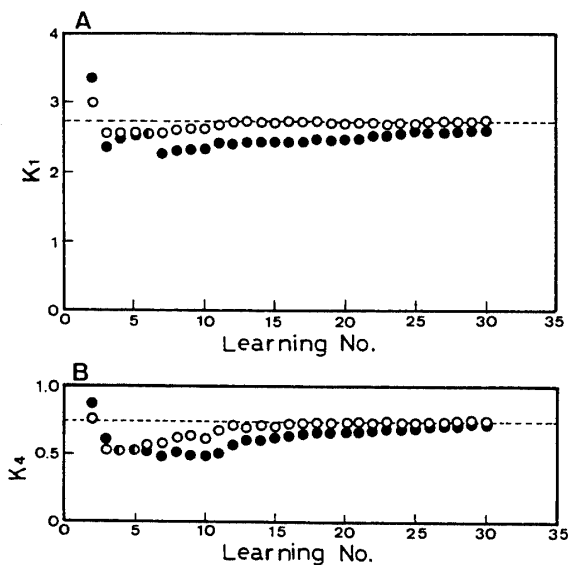


Fig. 8. Learning patterns of conversion constants in Fig. 6.

(A), pre-fermentor operated by the repeated fed-batch method. (B), continuous fermentor. The results were compared using the linear least squares method with intercept, ● and without intercept, ○. Broken lines are the convergent values.

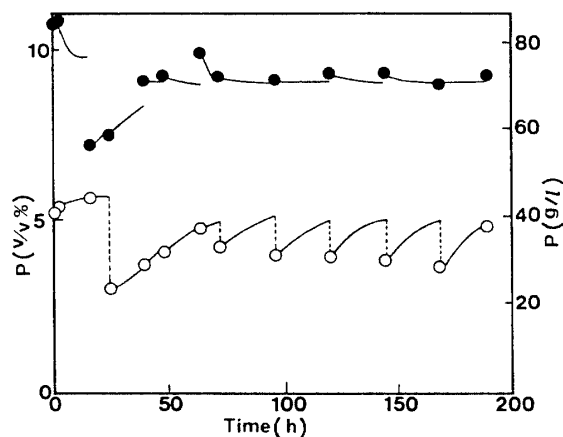


Fig. 9. On-line estimation of ethanol concentration in the continuous fermentor without agitation. Lines and symbols are the same as in Fig. 6.

算定数を示す式(8)中の定数 K_4 は0.402であったが、Fig. 8 (B) では0.715であり再現性は比較的悪かった。これは、固定化酵母を含む発酵であるからであろうと考えられるが、以上に示した学習方法により修正が可能であった。

攪拌を行わない場合の測定 本方法は完全混合型の状態方程式から導き出されたものであり、実際によく使用される固定化酵母の充填型のリアクターに適用できるか否か、攪拌を伴わない装置にて本方法を適用してみた。攪拌を行わないこと以外は Fig. 7 の実験結果と同様の条件にて行った。その測定結果を Fig. 9 に、そのときの換算定数の同定の過程を Fig. 10 に示した。

開始後しばらくは換算定数が不確かであるため実測値との差は非常に大きいですが、同定が進むにつれてその差が小さくなり実測値を7回程度与えた頃にはほぼその差が0.2%以内に収まるようになり、換算定数 K_4 は0.898と求められた。したがって、ゲルにより発生する CO_2 ガスによる対流のみの混合状態においても本方法が有効であることが分かった。

以上までに述べた方法は実測値により発酵開始時に校正するという条件付きであり、換算係数が同一の測定系では再現性があるが、発酵形式により影響を受けることによる。これらのことは溶存 CO_2 濃度と深く関わっていることが予想され、 DCO_2 センサーなどで補正すればより正確なセンサーとなる可能性がありこのことは今後の課題である。また、本方法は、二酸化炭素の発生とセンシングの対象となる成分の生成が比例関係にある場合、ほかの嫌氣的発酵生産にも有効であると思われる。

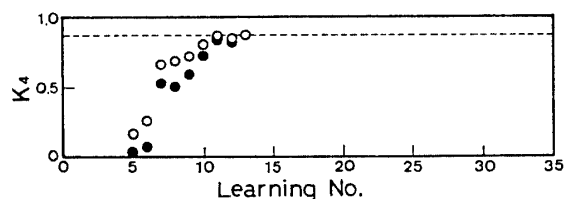


Fig. 10. Learning pattern of conversion constant of the continuous fermentor in Fig. 8. Symbols are the same as in Fig. 7.

要 約

1. 二酸化炭素発生速度を監視することにより、連続発酵槽内のアルコール濃度を精度よくオンライン測定することが可能であった。

2. 連続発酵槽内のアルコール濃度推定式は、状態方程式から導かれる、次の式によって行った。

$$P_t = \exp\left(-\int_{t_0}^t D dt\right) \left\{ \int_{t_0}^t \exp\left(\int_{t_0}^t D dt\right) K_2 V_{\text{CO}_2} / V dt + P_{t_0} \right\}$$

3. ガス流量をアルコール濃度に換算する定数は連続発酵において温度の影響を受けたため次の式で温度補償した。

$$K_2 = K_3 \log(T) + K_4$$

4. 簡単な学習則を用意することにより、未知の換算定数を発酵中に10回程度実測値を与えて同定することができた。それ以降のアルコール濃度の推定値と計算値の差の平均は0.091%であり、その分散は0.139%であった。

記 号

- D : dilution rate, $D=F/V$, 1/h
 F : feed rate of medium, l/h
 K : conversion constant in batch fermentor, g-ethanol/l-gas
 K_1 : conversion constant in pre-fermentor, g-ethanol/l-gas
 K_2 : conversion constant in continuous fermentor, g-ethanol/l-gas
 K_3, K_4 : constant
 P : ethanol concentration, g/l
 t : time, h
 t_0 : initial time, h
 T : temperature, $^{\circ}\text{C}$
 V : volume of broth, l

V_{CO_2} : CO₂ flow rate, l/h

X : cell concentration of immobilized yeast and free yeast, g/l

ν : specific ethanol production rate, g-ethanol/g-cell/h

本報告をまとめるにあたり、終始御指導頂きました弊社常務取締役総合研究所長布川弥太郎博士に深謝致します。

本報告の一部は、平成二年度醸造協会大会にて発表した。

文 献

- 1) 広常正人, 仲田富士男, 浜地正昭, 本馬健光: 醸協, **82**, 582-586 (1987).
- 2) 松浦一雄, 広常正人, 仲田富士男, 浜地正昭: 醸酵工学, **69**, 345-354 (1991).
- 3) 佐藤和夫, 近藤恭一, 太田剛雄, 吉沢 淑, 中村 欽一: 醸協, **80**, 553-558 (1985).
- 4) 近藤恭一, 元吉 徹, 三島秀夫, 竹村成三, 佐藤和夫, 吉沢 淑: 醸協, **81**, 810-814 (1986).
- 5) 近藤恭一, 三島秀夫, 竹村成三, 佐藤和夫, 吉沢 淑: 醸協, **83**, 416-419 (1988).
- 6) 大石 薫, 富永光則, 川戸章嗣, 安部康久, 杉並孝二, 今安 聰: 醸酵工学, **68**, 475-481 (1990).
- 7) 今安 聰, 杉並孝二: 特許, 昭49-25360.
- 8) 柴田正人: 醸酵工学, **57**, 445-452 (1979).
- 9) 杉本芳範, 田中伸哉, 古川彰久, 渡辺和夫, 吉田敏臣, 田口久治: 醸協, **82**, 205-210 (1987).
- 10) Luedeking, R., Piret, E. L.: *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.*, **1**, 393-412 (1959).
- 11) 松浦一雄, 広常正人, 仲田富士男, 浜地正昭: 醸酵工学, 印刷中.