

[J. Ferment. Technol., Vol. 52, No. 1, p. 20~27, 1974]

DL- α -ブロム酪酸からイソロイシン生産に おける培養条件の検討*

松島 宏親・村田慶二郎・間瀬 泰男

三共株式会社 醸酵研究所

Culture Conditions for the Microbial Production of L-Isoleucine from DL- α -Bromobutyric Acid*

Hirochika Matsushima, Keijiuro Murata, and Yasuo Mase

Fermentation Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.,
Tanashi, Tokyo

Abstract

Culture conditions for the fermentative production of L-isoleucine from DL- α -bromobutyric acid (BB) were studied.

1) Isoleucine-producing strains were preserved by lyophilization, oil sealing, deep freezing, and periodic transfer. No difference in the isoleucine-producing ability was observed among the strains preserved by these different methods. 2) Media for seed culture were studied and the proper concentration of BB was as follows: Seed culture (BB 0%) \rightarrow Seed culture (BB 1.6%) \rightarrow Producing culture (BB 3.2%), 3) An isoleucine yield of around 14 g/l was achieved when the growth of the seed culture was 1/3~1/2 of the maximum growth. 4) Foam was generated vigorously during fermentation. The addition of large amounts of antifoam agent inhibited cell growth, so chemical and mechanical defoamers were studied. 5) Scale-up of fermenters was carried out as follows:

- (1) The oxygen transfer rate of each fermenter was measured.
- (2) The condition of aeration and agitation was studied in a 5 l jar fermenter, the optimum condition was 1.2×10^{-6} g mole O_2 /l·min of oxygen transfer rate.
- (3) The culture condition was scaled-up to 100 l and 600 l tanks based on the oxygen transfer rate, and isoleucine was formed in good yield.
- 6) Fifty per cent yield of isoleucine crystals was obtained from the culture broth. The crystals satisfied the standards set for food additives with respect to specific rotational rate, content, and weight loss in drying.

緒 言

著者らは、L-イソロイシンを醸酵法により安価に製造することを目的として、DL- α -ヒドロキシ酪酸よりL-イソロイシンを生成する細菌のスクリーニングを

行ない、すでに知られている *Bacillus* および *Pseudomonas* 属¹⁾以外に *Aerobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Serratia* 属, その他多くの菌株がイソロイシンを蓄積することを発見した。さらにDL- α -ヒドロキシ酪酸よりも安価に製造できるDL- α -ブロム酪酸(以下BBと略称する)も前駆物質として使用できることを認め、その結果をすでに報告した²⁾。このBBを原料とする方法について培地組成の検討を行ない、廃糖蜜、蔗糖またグルコー

* 醸酵法によるアミノ酸の工業的製造法に関する研究(第3報)
Studies on the Microbial Production of Amino Acids (III)

スを炭素源とする培地に *Brevibacterium roseum* ATCC 13825 を培養してイソロイシン 14-16 g/l を生成せしめることができた³⁾。

本報告においては、この結果を工業化するため、イソロイシン生産菌の保存、前培養条件、消泡、醗酵タンクのスケールアップ、イソロイシンの分離と確認等について検討した結果を述べる。

実験方法

使用菌株 DL- α -ヒドロキシ酪酸または BB より L-イソロイシンを高収率で蓄積する^{2,3)} *Brevibacterium roseum* ATCC 13825 を用いた。

菌株の保存

(1) 継代培養法 プイヨン寒天 (肉エキス 1%, ペプトン 1%, NaCl 0.3%, 寒天 2%, pH 7.0) 斜面上で 10°C にて継代保存する。

(2) 鉱油重層法 プイヨン寒天上に 20 時間生育させた菌の上に流動パラフィンを約 1 cm の厚さに入れ、10°C にて保存する。

(3) 凍結法 プイヨン寒天斜面上に 20 時間生育させた菌を -15°C で保存する。10°C で融解させてから使用する。

(4) 凍結乾燥法 プイヨン寒天斜面上で 20 時間生育させた菌を、乾燥用培地⁴⁾ (脱脂粉乳 10%, 蔗糖 5%, グルタミン酸ソーダ 1%) に分散し、アンプルに入れてドライアイス-アセトン中で凍結後、凍結乾燥し真空下でシールを行ない 10°C にて保存する。復元は蒸留水で行なう。

培地 Table 1 に示す培地を用いた。BB は、あ

Table 1. Composition of culture media.

	CO	C1	GO	G2
Cane molasses (g/l)	50	100		
Glucose			50	100
DL- α -Bromobutyric acid	16	32	16	32
Corn steep liquor	10	10	10	10
Proflo	5	5	5	5
Urea	8	8	9	9
CaCl ₂ ·2H ₂ O				1
MgSO ₄ ·7H ₂ O			0.5	0.5
Biotin (μ g/l)			30	30
Thiamine (μ g/l)			500	500
pH	7.0	7.0	7.5	7.5

Media CO and GO were used as seed media for producing media C1 and G2, respectively.

らかじめ 16% (アンモニア水で pH 7.0 に中和したものの) 溶液を 100°C 30 分間加熱して分解後 pH 7.0 にアンモニア水で中和したものをを用いた。培地の滅菌は 120°C 20 分間行なった。

培養方法および分析方法 前報³⁾ と同様にして行なった。

酸素移動速度の測定 反応系として、亜硫酸ソーダ 3~6%, 硫酸銅 10⁻³ M 溶液を使用した。通気攪拌を行ない、亜硫酸の酸化速度を 0.1 N チオ硫酸ソーダ溶液で滴定して求めた。

実験結果および考察

イソロイシン生産菌の保存 微生物は、継代移植により性質が変わり、生産能が低下する例が知られて

Table 2. Formation of isoleucine by *Brevibacterium roseum* ATCC 13825 preserved by various methods.

Method of preservation for 4 months	Growth (OD _{660 nm})			Isoleucine formed (g/l)		
	3 days	4 days	5 days	3 days	4 days	5 days
Lyophilization ^{a)}	40	43	40	11.3	12.8	12.3
Oil sealing ^{b)}	48	47	44	11.4	12.7	11.7
Freezing ^{c)}	34	39	36	12.8	12.8	13.8
Periodic transfer ^{d)}	45	50	45	12.8	13.8	13.6

The bacterial strain was cultured at 30°C in 500 ml shaking flasks containing 50 ml of Medium C1. Growth was assayed by reading the optical density at 660 nm.

a) The organism was lyophilized in a medium containing 10% of defatted milk, 5% of sucrose, and 1% of Na-glutamate, and was kept at 10°C. Distilled water was used for rehydration.

b) The organism, grown on bouillon agar (1% of meat extract, 1% of peptone, 0.3% of NaCl, 2% of agar, pH 7.0) was covered with liquid paraffin to a depth of 1 cm, and was kept at 10°C.

c) The organism, grown on bouillon agar, was kept at -15°C.

d) Bouillon agar medium was used.

いる。したがって、生産菌を生産能の低下なしに保存することは重要である。凍結乾燥法、鉱油重層法、凍結法、継代培養法の4種の保存法によりイソロイシン生産菌の保存を行なった。そのうちの1株 *B. roseum* ATCC 13825 について、保存菌株のイソロイシン生産能を試験した。継代培養法以外の保存株は、ブイヨン寒天斜面上で1日培養した後に用いた。前培養は20時間振盪培養を行なった。いずれの方法でも著しい差は認められなかった (Table 2) が、継代培養法以外は移植なしに長期保存が可能であり、最も簡便な凍結法を主に使用することとした。

前培養条件 大容量タンクによる培養では、前培養もタンク培養になるが、前培養の条件により本培養の収率に影響があるので、前培養条件を、5l ジャーフェメンターにより検討した。

(1) 前培養培地の検討 前培養培地として、Table 1 に示すごとく、本培養培地の糖濃度を 1/2 (5%)、BB濃度を 1/2 (5%) にしたものを今まで用いてきた。この CO 培地を基本として、前培養培地の BB 濃度について検討した。ブイヨン寒天斜面上を菌を一白金耳接種して24時間坂口フラスコ中で振盪培養 (種培養) し

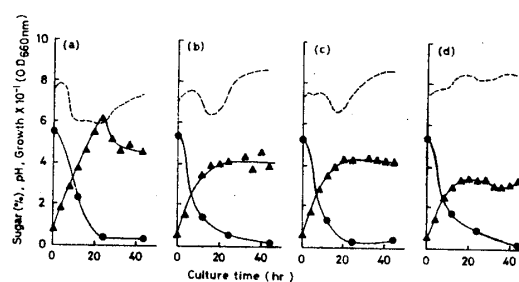


Fig. 1. Growth of *Brevibacterium roseum* in various transfers.

Brevibacterium roseum ATCC 13825 was cultured in 500 ml shaking flasks containing 50 ml of medium as seed cultures, and was inoculated to 5l jar fermenters (inoculum size 5%) containing 3l of medium as a preculture. For a basal medium, Medium CO was used. Culture conditions for the jar fermenter were as follows: temperature, 30°C; inner pressure, 0.6Kg/cm²G; air flow rate, 3.46l/min; agitation speed, 250rpm.

	BB (%) in		
	seed culture	preculture	
(a)	0	0	—▲—: Growth
(b)	0	1.6	—●—: Sugar
(c)	1.6	1.6	---: pH
(d)	1.6	3.2	

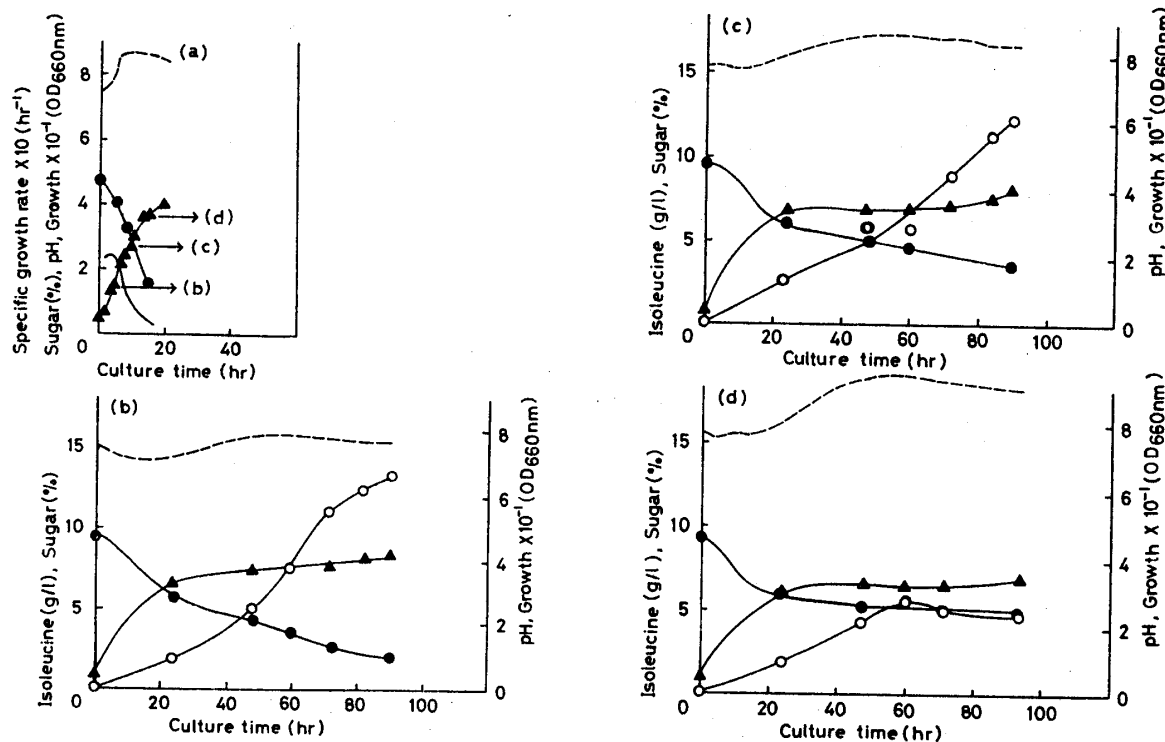


Fig. 2. Effect of age of preculture on isoleucine production.

The bacterial strain was precultured in a 5l jar fermenter containing 3l of Medium CO (a), and was inoculated to a 5l jar fermenter (inoculum size 5%) containing Medium CI as the production culture at different phases {(b)~(d)}. Growth was assayed by reading the OD at 660 nm.

—○—: Isoleucine, —●—: Sugar, —▲—: Growth, ---: pH, —: Specific growth rate

たものを, 5l ジャーフェーマンターに 5% 接種して前培養を行なった. BB 0% では, 菌の生育はきわめて良好であったが, pH の変動は大きく, BB 1.6% では, 種培養の BB 濃度 (0%, 1.6%) に無関係に同様の培養経過を示した. BB 3.2% では菌の生育はかなり抑制され, pH が徐々に上昇した (Fig. 1). 前報³⁾で報告したごとく, BB による菌の発育阻害が馴養によりかなり緩和されること, 接種のときの pH 変化, 菌の増殖を考慮すると, 前培養は BB 1.6% が適当であると考えられる. 以上のことにより, BB 濃度を種培養: 0%, 前培養: 1.6%, 本培養: 3.2% とした.

(2) 前培養時間の検討 5l ジャーフェーマンターで前培養後, 5l ジャーフェーマンターに 5% 接種して本培養を行なった. 前培養の菌体量 (OD) が, 15.0, 24.0, 36.8 になったとき, 本培養に接種した場合の結果を Fig. 2 に示す. 早い時期 (菌体量 15.0) に接種したものが良い結果を与え, 菌体量が 36.8 に達してから接種したものは, 菌の生育が悪く糖消費が少なくイソロイシンの生成は低い. 以上の結果から, 菌体量が最大生育時の 1/3~1/2 の時が適当といえる.

消泡 本醸酵の場合は, タンク培養で発泡するため, 何らかの方法で泡をおさえることが必要である.

(1) 消泡剤の添加 種々消泡剤について坂口フラス

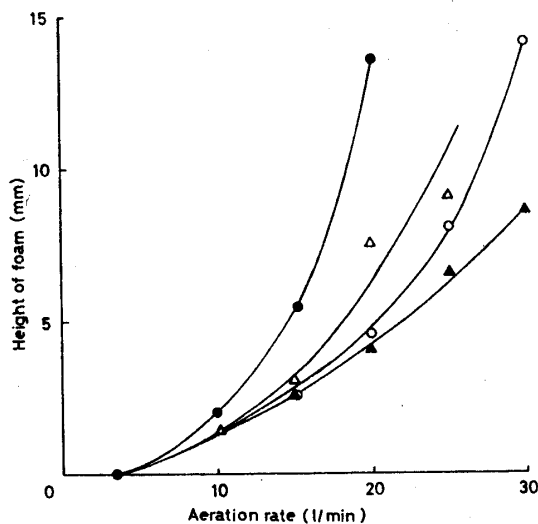


Fig. 3. Effect of anti-foam agents on defoaming.

The four day-old culture broth of a culture used for isoleucine formation with various defoaming agents was aerated in a 5l jar fermenter at 30°C (inner pressure: 0.6 Kg/cm²G, agitation speed: 250 rpm). Height of foam was measured at various aeration rates.

- : No addition,
 - △—: Adekanol LG-51* 0.0333%,
 - : Adekanol LG-51* 0.1%,
 - ▲—: Adekanol LG-703* 0.0677%
- * Purchased from Asahi Denka Co., Ltd.

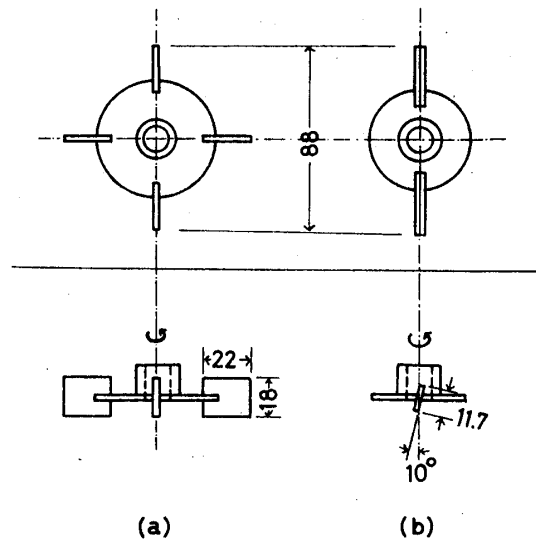


Fig. 4. Mechanical foam breakers.

(a) Four blade turbine

(b) Two blade turbine (pitched blade)

Mechanical defoamer (a) or (b) was used in a 5l jar fermenter as shown in Fig. 5.

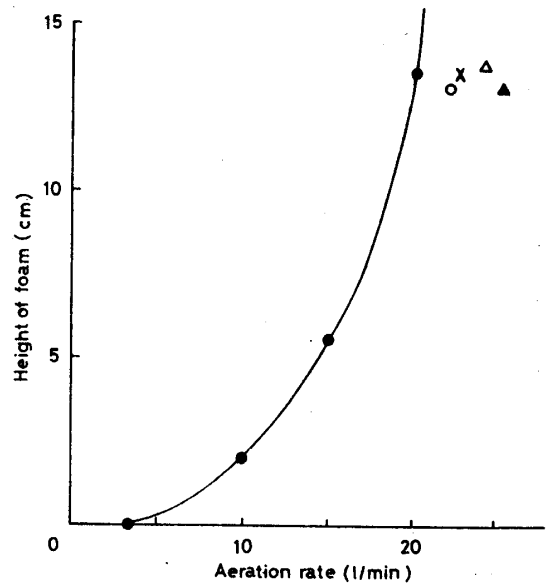


Fig. 5. Effect of foam breakers on defoaming of the culture broth of *Brevibacterium roseum* ATCC 13825 in Medium Cl.

A four day-old culture broth was aerated in a 5l jar fermenter at 30°C (inner pressure: 0.6Kg/cm²G, agitation 250 rpm).

Foam breakers*	L ₁	L ₂
●	—	—
△	(a) × 1	90
▲	(b) × 2	70
○	(b) × 1	90
×	(b) × 2	60

L: Distance between foam breakers and liquid surface in mm.

* Type {(a) or (b) shown in Fig. 4} and number of foam breakers.

コ (50 ml 仕込み) に消泡剤を1滴添加して培養を行ない検討した。その結果、大豆油、ラードオイルは消泡効果が少なく、アデカノール LG-51 (旭電化(株), 非イオン系界面活性剤) が有効であった。しかし、アデカノール LG-51 は、培養の初期に多量に加えると菌の生育を阻害した。C1 培地を用いて 5l ジャーフェーマンターで培養を行なった結果、仕込み時にアデカノール LG-51 0.008% を添加した時は、90 時間の培養で菌体量 40~60 (OD), イソロイシン 12~14 g/l に達した。しかし、仕込み時に 0.04% 添加すると、90 時間の培養で菌体量 23 (OD), イソロイシン 6.3 g/l にすぎなかった。さらに、培養終了液を 5l ジャー中で通気攪拌し、これに消泡剤を添加して生じる泡の高さから消泡剤の効果を調べた (Fig. 3)。アデカノール LG 703 (旭電化(株), 非イオン系界面活性剤) は、アデカノール LG-51 よりさらに有効であった。

(2) 機械的消泡 培養終了液を 5l ジャー中で通気攪拌し、Fig. 4 に示す消泡翼 (a) または (b) をつけて、消泡翼の効果を調べた (Fig. 5)。安定して培養できる泡の高さは 13~14 cm 以下であり、この高さで発泡する通気量で消泡剤の効果を比較した。(b) の消泡翼よりも (a) の消泡翼が有効であり、翼は1段よりも2段の方が有効であった。また後に述べるように、酸素移動速度を基準にスケールアップが可能なので、内圧を上げれば攪拌数または通気量を下げることができ、発泡を少なくすることができる。

醗酵タンクのスケールアップ スケールアップの基準として、酸素移動速度 (亜硫酸ソーダ法) を用いて 5l ジャーフェーマンターで検討を行ない、さらに 100l タンク、600l タンクにスケールアップして同様の収率が得られた。

(1) 醗酵タンクの酸素移動速度 まず 5l ジャーフェーマンターの酸素移動速度を測定した。通気量、攪拌数を変えて測定した結果 (Fig. 6)、酸素移動速度は、通気量の 0.34 乗に比例し、攪拌数の 2.9 乗に比例した。100l および 600l タンクについては、既に報告した⁵⁾。

(2) イソロイシン生成に及ぼす酸素移動速度の影響 最適の通気攪拌条件を求めため、5l のジャーフェーマンターで、酸素移動速度をかえて (通気量一定: 3.46 l/min) 培養を行ない、 $1.16 \times 10^{-3} \text{ g-mole/l-min}$ 付近がイソロイシン生成に好適であり、酸素移動速度が高くなるとイソロイシン生成が低下した (*B. ammoniagenes* IAM 1641 使用, Fig. 7)。林部⁶⁾らは、*Bacillus subtilis* を用いる α -アミノ酪酸よりのイソロイシン醗酵において、ジャーフェーマンターを用いて $K_d =$

$3 \sim 8 \times 10^6 \text{ (g-mole O}_2\text{/ml-min-atm)}$ の範囲でイソロイシンの生産が順調に行なわれることを報告している。この時の内圧を $0.6 \text{ Kg/cm}^2\text{G}$ と仮定すれば、酸素移動速度は $1.0 \sim 2.7 \times 10^3 \text{ g-mole/l-min}$ になり、本研究の結果に近い値である。

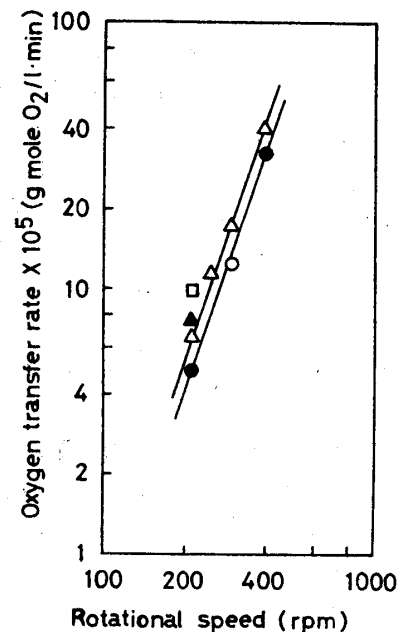


Fig. 6. Oxygen transfer rate in a 5l jar fermenter. The oxygen transfer rate was measured by the sodium sulfite method. Air flow rate (l/min): —○— 1.15, —●— 1.72, —△— 3.46, —▲— 5.2, —□— 10.15.

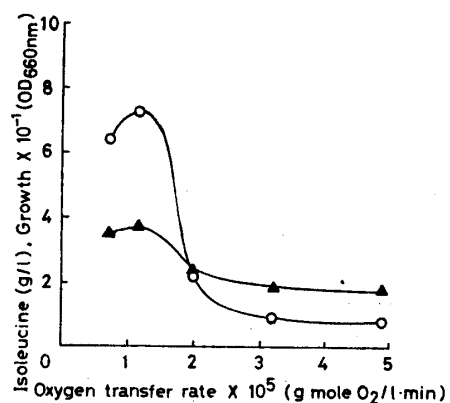


Fig. 7. The effect of oxygen transfer rate on isoleucine formation.

Brevibacterium ammoniagenes IAM 1641 was cultured in a 5l jar fermenter at 30°C for 87 hr at various agitation speeds (inner pressure: $0.6 \text{ Kg/cm}^2\text{G}$, air flow rate: 3.46 l/min). Growth was assayed by reading the optical density at 660 nm.

—○—: Isoleucine, —▲—: Growth

(3) イソロイシン生成に及ぼす通気量と攪拌数の影響 酸素移動速度一定 (1.16×10^{-3} g·mole/l·min) で通気量および攪拌数をかえて (通気量 3.46 l/min, 攪拌数 250 rpm および通気量 0.6 l/min, 攪拌数 300 rpm), 5 l ジャーフェーマンターで培養を行なった. Fig. 8 に示すごとく, 両者間で差が認められない. したがって, イソロイシン生成に対しては, この程度では通気量, 攪拌数の影響がなく, 酸素移動速度基準のスケールアップが可能であることを示している.

(4) 醗酵タンクのスケールアップ 5 l ジャーフェーマンターにおける最適酸素移動速度 1.16×10^{-3} g·mole/l·min を基準として, 100 l タンクにスケールアップして培養を行なった. 廃糖蜜を炭素源とする Medium C1 を用いて培養を行なった結果, 88 時間の培養で

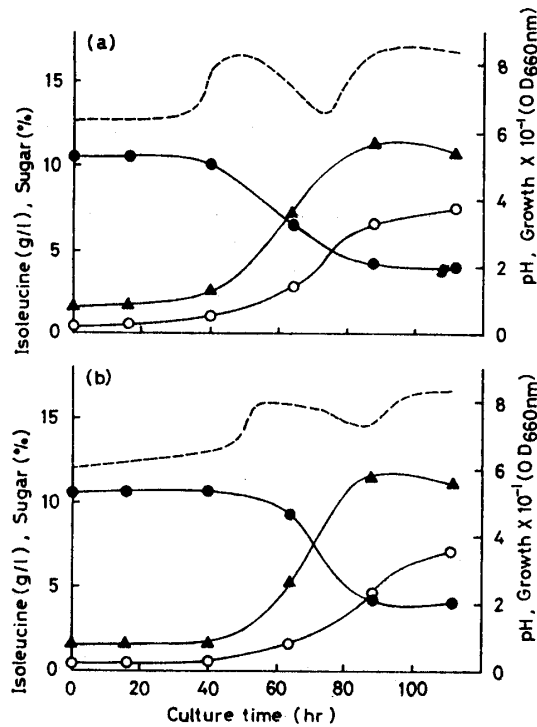


Fig. 8. Effect of agitation speed and aeration rate on isoleucine formation at a constant oxygen transfer rate.

(a) air flow rate 3.46 l/min, agitation speed 250 rpm,

(b) air flow rate 0.6 l/min, agitation speed 300 rpm.

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6871 was cultured in a 5 l jar fermenter at 30°C. Oxygen transfer rates in both (a) and (b) were the same value: 1.16×10^{-3} (g mole/l·min). Growth was measured by reading the optical density at 660 nm.

—○—: Isoleucine, —●—: Sugar,
—▲—: Growth, — — —: pH

13.9 g/l のイソロイシンが生成した. (Fig. 9). またグルコースを炭素源とする Medium G2 を用いて 72 時間培養では 16.5 g/l であった. いずれの培地においても, 5 l ジャーフェーマンターでの収率を 100 l タンクで再現することができた. さらに, Medium C1 を用いて 600 l タンクによる培養を行なった. 通気量 300 l/min, 攪拌数 205 rpm, 内圧 0.6 kg/cm²G (酸素移動速度 1.16×10^{-3} g·mole/l·min) の条件で 81 時間培養し, 14.3 g/l のイソロイシンを生成した (Fig. 10). 以上に述べたごとく, まず 5 l ジャーフェーマンターにおける最適通気攪拌条件を求め, 酸素移動速度を基

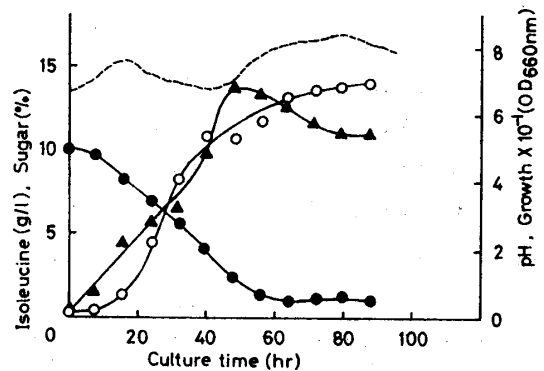


Fig. 9. Formation of isoleucine in a 100 l tank (Medium C1).

Brevibacterium roseum ATCC 13825 was cultured in a 100 l tank at 30°C (inner pressure: 0.6 Kg/cm²G, air flow rate: 40 l/min, agitation speed: 233 rpm). Growth was assayed by reading the optical density at 660 nm.

—○—: Isoleucine, —●—: Sugar,
—▲—: Growth — — —: pH.

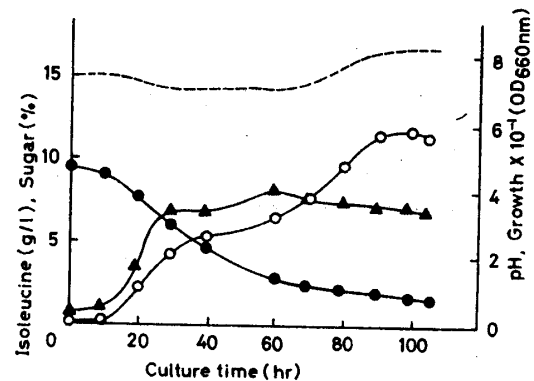


Fig. 10. Formation of isoleucine in a 600 l tank (Medium C1). *Brevibacterium roseum* ATCC 13825 was cultured in a 600 l tank at 30°C (inner pressure: 0.6 Kg/cm²G, air flow rate 300 l/min, agitation speed: 205 rpm). Growth was measured by reading the optical density at 660 nm.

—○—: Isoleucine, —●—: Sugar
—▲—: Growth, — — —: pH

準にして 100 l タンク, 600 l タンクにスケールアップすることに成功した。

(5) イソロイシンの分離確認 まず, 培養液のアミノ酸を, アミノ酸自動分析器 (Technicon 社, auto-analyser アミノ酸分析セット) によりしらべた (Table 3). アミノ酸の大部分はイソロイシンであるが, 他にアラニン, リジン, バリン, プロリンその他のアミノ酸も認められた. つぎに培養液よりイソロイシンの分離を行なった. 100 l タンク培養により得られた培養液を, Fig. 11 に示す操作により精製し, イソロイシンの結晶を得た. 培養液 49 l をシャープレス遠心分離機で遠心分離し, その上澄液を Dowex 50 W×8(H⁺) カラムに通してイソロイシンを吸着させ, アンモニア水で溶出, 濃縮を行ないメタノールを添加してイソロイシンの粗結晶 424 g を得た (上澄液よりの収率=67%). この粗結晶 40 g を水-メタノール法で再結晶し, 1 次結晶 (A-1) 20.7 g, 2 次結晶 (A-2) 1.0 g を得た. また粗結晶 40 g を等電点沈澱法によって再結晶し, 1 次

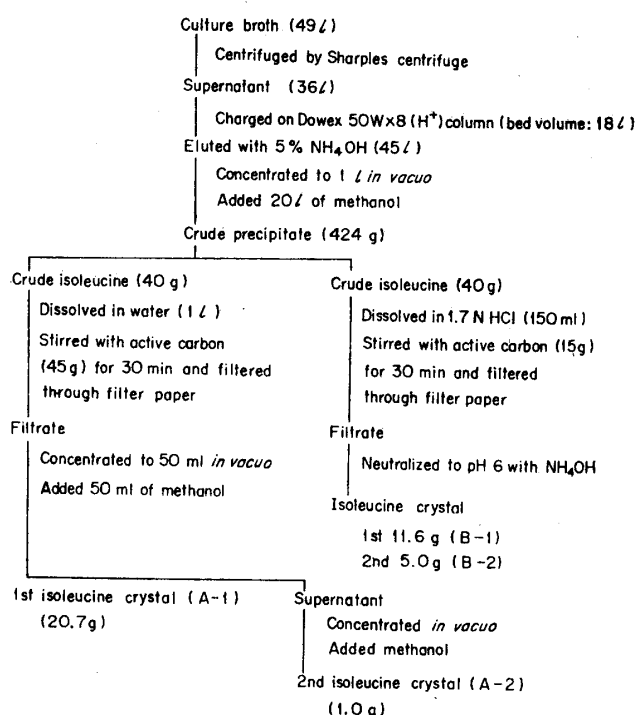


Fig. 11. Isolation of isoleucine from culture broth.

Table 3. Amino acid composition of culture fluid.

Amino acid	Concentration (g/l)	Amino acid	Concentration (g/l)
Isoleucine	13.73	Argine	0.00
Alanine	1.33	Aspartic acid	0.00
Lysine	1.19	Cystine	0.00
Valine	0.42	Cysteine	0.00
Proline	0.29	Leucine	0.00
Histidine	0.19	Methionine	0.00
Threonine	0.09	Serine	0.00
Glutamic acid	0.04	Tryptophan	0.00
Glycine	0.04	Tyrosine	0.00
Phenylalanine	0.02		

The bacterial strain was cultured at 30°C for 94 hr in a 5 l jar fermenter containing 3 l of Medium Cl.

Table 4. Analyses of isoleucine.

Sample	Amino acid* analysis (%)			[α] _D ²⁰ (C=4, 6N HCl)	Content (%)	Weight loss on drying (%)
	Ileu	Leu	Lys			
Japanese standards for food additives (1968)				+38~+41°	>98.5	<0.02
Authentic sample	102	0.0	0.0	+40.6°	99.8	0.07
Crude isoleucine	65	0.5	1.5		94.5	1.10
A-1	96	0.7	0.8	+38.9°	101.0	0.11
A-2				+35.8°	100.6	0.47
B-1	94	0.7	0.7	+36.9°	95.7	0.41
B-2				+39.2°	100.9	0.07

* Ileu: isoleucine, Leu: leucine, Lys: lysine.

結晶 (B-1) 11.6g, 2次結晶 (B-2) 5.0g を得た。これらのイソロイシン結晶を分析した結果を Table 4 に示す。すなわち, アミノ酸の自動分析を行なった結果, 粗結晶, A-1, B-1 のいずれもロイシン, リジンが含まれており, また純度は再結晶で上昇し A-1, B-1 とともに約95%であった。さらに食品添加物の規格⁷⁾に従って, 比旋光度, 含量 (過塩素酸による滴定), 乾燥減量を測定した。A-1 および B-2 が規格に適合した。なお, A-1 の粗結晶よりの収率は76%であり, 上澄液よりの通算収率は51%であった。以上の結果から, 培養液中に生成したものが L-イソロイシンであることが確認され, また培養液より L-イソロイシンを高純度, 高収率で分離する工業的精製法の可能性を示している。

要 約

DL- α -ブロム酪酸 (BB) を前駆物質とするイソロイシン醗酵において, 培養条件の検討を行なった。

1) イソロイシン生産菌を, 凍結乾燥法, 鉱油重層法, 凍結法, 継代培養法の4種の保存法で保存し, そのイソロイシン生産能を試験したが, いずれの方法も差が認められなかった。

2) 前培養培地の検討を行ない, 種培養 (BB 0%) → 前培養 (BB 1.6%) → 本培養 (BB 3.2%) の BB 濃度が良好であることを認めた。

3) 前培養時間は, 菌体量が最大生育時の 1/3~1/2 に達した時が適当である。

4) 培養中著しく発泡するが, 多量の消泡剤の添加は菌の生育を阻害するので, 消泡剤および機械的消泡について検討した。

5) 醗酵タンクのスケールアップを行なうため, まず亜硫酸ソーダ法により酸素移動速度を測定した。つぎに 5l ジャーフェーマンターを用いて通気攪拌条件の検討を行ない, 酸素移動速度がスケールアップの基準として使用可能であり $1.2 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mole} / \text{l} \cdot \text{min}$ が最適であった。この結果をもとにして, 100l タンク, 600l タンクに好収率でスケールアップすることに成功した。

6) 培養液より, 食器添加物基準の比旋光度含量, 乾燥減量に適合するイソロイシン結晶を収率51%で得た。

文 献

- 1) 和田: 特許公報 昭40-11918.
- 2) 松島, 間瀬: 醸工, **51**, 443 (1973).
- 3) 松島, 村田, 間瀬: 醸工, **51**, 775 (1973).
- 4) 高野, 照井: 第8回凍結及び乾燥記録, p. 8 (1963).
- 5) 松島, 前田, 深津, 笠原, 間瀬: 醸工, **50**, 105 (1972).
- 6) 林部, 杉橋, 佐伯, 荒川: 農化, **36**, 437 (1962).
- 7) 日本食品添加物公定書, 日本食品衛生協会 (1968).

(昭48.6.1受付)