硫酸塩還元菌の代謝に及ぼす鉄イオンの影響*

馬場文雄**, 鈴木紹夫**, 瀬尾眞浩***

** 味の素株式会社 生産技術研究所

*** 北海道大学大学院工学研究科

Effects of Ferrous Ions on the Metabolism of Sulfate-reducing Bacteria*

Fumio Baba**, Tsuguo Suzuki** and Masahiro Seo***

** Technology & Engineering Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.

*** Graduate School of Engineering, Hokkaido University

Effects of ferrous ions on the growth and activity of sulfate-reducing bacteria (SRB) have been investigated using biological and analytical techniques for a better understanding of its metabolism in corrosive media with high contents of metal ions. In-situ gravimetry by the quartz crystal microbalance (QCM) technique was also applied to examine the sulfide-producing process in the medium. The growth of SRB increased with increasing ferrous ion concentration up to 0.01 M and retarded above 0.01 M. In the low concentration region (0.00036 M-0.01 M) ferrous ions enhanced the growth of SRB, whereas in the high concentration region (0.03 M-0.7 M) ferrous ions gave the opposite effect due to high osmotic pressure. The FeS producing ability was closely related to the growth of bacteria, therefore it seems that SRB accelerates the corrosion of metal in the medium including 0.01 M ferrous ions. QCM technique was able to detect sensitively the amount of FeS attached on the electrode surface, which was proportional to the total amount of FeS in the medium. Thus it was found that QCM technique is powerful for monitoring the FeS producing process.

Key words : metabolism, sulfate-reducing bacteria, SRB, ferrous ions, biological, QCM, FeS

1. 緒 言

工業用水として河水を利用している鉄の配管などに、微生物による深刻な被害が生じる場合があり、かなり以前から知られている^{1)~3)}。特に嫌気性環境で増殖し金属の腐食を著しく促進させる硫酸塩還元菌の存在は、例えば錆こぶ内で腐食速度を著しく増加させるなどの影響があり、腐食科学的な立場から重要な問題であると考えられ、多くの研究がなされてきた^{4)~7)}。しかし、微生物腐食を根本的に防止するために重要であると考えられる腐食科学と微生物学とを組み合わせた総合的な研究例は少ない。例えば、腐食が進行しつつある鉄表面近傍において、腐食生成物としての Fe^{2+} が菌体を取り囲み、

菌体の生命活動に種々の影響を与えることが予測されるが、このような観点からの研究はあまり行われていない。本研究においては、腐食生成物である金属イオンが菌体の生命活動にどのような影響を与えるかを調べることとし、その第1段階として、腐食生成物として最も多いと思われる Fe^{2+} が、菌体の増殖および物質代謝⁸⁾にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

2. 実験方法

2.1 菌体の培養

実験に供した菌体は、多摩川の河底から採取し液体培地で嫌気的な条件で予備培養をおこなって数回植え継いだもので、顕微鏡観察結果および菌体の硫酸塩還元能力の測定結果から、硫酸塩還元菌の存在を確認した。本培養のための液体培地はオートクレーブ中で 120°C 、20分殺菌した後、純度 99.998% 以上の高純度窒素を除菌フィルターを介して $100\text{ cm}^3/\text{min}$ の流量で培地に吹き込ん

* 第41回腐食防食討論会(松山, 1994), 1995年3月協会北海道支部研究発表会(札幌, 1995)で発表

** 〒210 川崎市川崎区鈴木町1-1 (1-1, Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki, 210 Japan)

*** 〒060 札幌市北区北13条西8丁目 (Kita-13 jo, Nishi-8 chome, Kita-ku, Sapporo, 060 Japan)

Table 1 Chemical composition of culture medium.

50%Na-lactate	10cm ³
East-extract	0.4g
Pepton	3.0 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
Na ₂ SO ₄	3.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.6 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	(0.1~200.0)g
Distilled water	1000cm ³
pH	7.0

で嫌気状態にしながら所定の Fe^{2+} の濃度になるように硫酸第一鉄を添加した⁹⁾。 Fe^{2+} の量は $3.6 \times 10^{-4} \text{ M} \sim 0.7 \text{ M}$ の範囲で一定に調整した。培地は最終的に NaOH 溶液で pH 7.0 に調整した。培地の組成を Table 1 に示す。試薬はすべて特級試薬を用いた。これらの菌体を液体培地 500 cm³ に 0.5 cm³ 接種して 37°C で 60 時間以上培養して本培養とした。

2.2 菌体の増殖と物質代謝の測定

菌体の増殖を培地中の菌体数を調べることにより、また菌体の物質代謝を培地中に生成した H_2S の量および硫化鉄（ここでは FeS として取り扱う）の量の経時変化を測定することによりそれぞれ求めた。菌体数は希釈法によって最確数 MPN (Most Probable Number)/cm³ で求めた^{10),11)}。培地中の H_2S の量は、検出限度 0.1 ppm の北川式検知管（光明理化学工業(株)製）を用いて求めた。なお、 FeS の量は以下の方法によって求めた。希硫酸で培地を pH 5.0 まで下げた後に平均粒径 5 μm の濾紙で培地を濾過し、濾紙上の沈澱物を 6 M 塩酸で溶解させて溶液中の Fe^{2+} の量を o-フェナントロリン比色法により求め FeS の量に換算した。

2.3 QCM による FeS の付着量の in-situ 測定

培地中に生成する FeS の量を in-situ でモニタリングする手段のひとつとして水晶微量天秤法（quartz crystal microbalance: QCM）を用いた。共振周波数 5 MHz の AT カットの水晶板上に金を蒸着して電極とし、これをホルダーに固定して培地中に浸漬した。QCM の質量感度は Sauerbrey の式より、5 MHz, AT カットの電極の場合 $1.77 \times 10^{-8} \text{ gcm}^{-2}\text{Hz}^{-1}$ となる¹²⁾。QCM の共振周波数が一定になった時点で、菌体を接種し、その後の共振周波数の経時変化から電極に付着する FeS の量を求めた。この FeS の付着量と前述の培地中に生成している FeS の量とを比較して相関を調べた。

3. 実験結果および考察

3.1 菌体の生育性

始発培地中の Fe^{2+} の濃度を $3.6 \times 10^{-4} \text{ M} \sim 1.0 \times 10^{-1} \text{ M}$ の範囲で変えた場合の菌体数および培地中に生成し

Fig.1 The growth of sulfate-reducing bacteria and production of hydrogen sulfide in the medium containing Fe^{2+} of the low concentration ($0.00036 \text{ M} \sim 0.1 \text{ M}$).

た H_2S の経時変化を Fig. 1 に示す。 Fe^{2+} が実験範囲では最も低濃度である $3.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ 含む培地の場合、 H_2S が培養 30 時間後から検出され始め、培養 37 時間で最大値 70 ppm に達した後、速やかに減少した。一方、菌体数は培養開始から 40 時間で最大値に達した後、ゆるやかな減少傾向を示した。これに対し、始発培地中に Fe^{2+} を $3.6 \times 10^{-3} \text{ M}$ 以上含む培地の場合、 H_2S は検知管法では検出されず菌体の増殖も 60 時間近くまで継続した。

Fe^{2+} の濃度が $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ の場合、培養 10 時間程度から培地の色が半透明の黄色から少しずつ黒ずんでくる。この黒色は FeS の生成によるものと考えられ、後に述べる培地中の FeS の定量結果および QCM による結果と一致している。このように FeS が生成している条件の場合、 H_2S の生成は検知管法で検出されないことから、下記に示す (1) 式の菌体の異化的硫酸塩還元（乳酸からの原子状水素を用いた硫酸呼吸¹³⁾）によって発生した S^{2-} が (2) 式により直ちに Fe^{2+} と反応して FeS を生成するものと考えられる。 FeS の溶解度積は 25°C において 6.0×10^{-18} と小さく中性では難溶性の沈澱物として培地中に存在する。始発培地中の Fe^{2+} の量が発生する S^{2-} よりも少ない場合、 S^{2-} は FeS に固定されず (3) 式によって H_2S となる。 Fe^{2+} の濃度が最も低い $3.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ の場合、30 時間から 40 時間にかけて H_2S が検出され培地が黒ずんでくるのは、生成した

S^{2-} が (2) 式の反応による Fe^{2+} の当量より過剰となり、固定できなかった S^{2-} が (3) 式の反応によって H_2S となることによる。40 時間以降の H_2S の減少は、菌体が S^{2-} を生成しなくなるとともに培地中へ吹き込んでいる N_2 ガスによって H_2S が系外へ排出されることによるものであろう。いずれにしても 40 時間以降 H_2S の発生は止まり菌体数はこの時期から減少し始める。

さらに Fe^{2+} の濃度を高くした場合の菌体数の経時変化を Fig. 2 に示す。始発培地中に Fe^{2+} を最も高濃度である 0.7 M 含む培地の場合には菌体は速やかに死滅した。また、 Fe^{2+} の濃度が 0.1 M から 0.7 M の範囲では培養初期に菌体数がいったん減少し、培養中期で一時的増加した後急激に減少する。 Fe^{2+} の濃度が 0.7 M で菌体が死滅するのは、高濃度の塩による浸透圧の作用によると考えられる。すなわち、浸透圧が高くなると菌体の細胞内液が細胞外に浸出し細胞が破壊されることになり菌体が死滅する。これを確認するために、 3.6×10^{-4} M の $FeSO_4$ を含む液体培地に所定の濃度の Na_2SO_4 および $NaCl$ を加えて浸透圧を高めた培地での菌体の生育を調べた。この結果を Table 2 に示す。いずれの塩においても Fe^{2+} の濃度が 0.7 M に相当する塩濃度で、ほとんどの菌体が生育できなくなる。また、 Fe^{2+} の濃度が 0.1 M から 0.7 M の範囲で菌体の生育が不安定となるのは、浸透圧が高くなるために菌体の生命活動が弱まり、培養後期における必須栄養基質の低下や阻害物質の蓄積、あるいは細胞内での加水分解酵素の生成に起因する細胞自身の自己分解などの影響を受けやすくなるためと考えられる。

以上述べてきたことをまとめると、始発培地中の Fe^{2+} の濃度が 1.0×10^{-2} M までは、菌体の生育は Fe^{2+} の濃度とともに活発となり、 1.0×10^{-2} M において最高となる。この濃度を越えると菌体の生育は、浸透圧の影響によって生命活動が弱まって不安定になり、 Fe^{2+} の濃度が 0.7 M では浸透圧の直接の影響で死滅する。微生物腐食では菌体が活発に生育していることが腐食促進の条件となるはずであるので、菌体の生育性が高い Fe^{2+} が 1.0×10^{-2} M までの条件で調べることが重要であると考えられる。

3.2 菌体の活性

微量の Fe^{2+} を含む培地中での硫酸塩還元菌の活性は、菌体が生成する H_2S の発生速度によって調べることができるが^{(14), (15)}、始発培地中に Fe^{2+} を 1.0×10^{-2} M 以上の高濃度で含む場合には S^{2-} が直ちに FeS に固定

Fig.2 The growth of sulfate-reducing bacteria in the medium containing Fe^{2+} of the high concentration (0.1 M-0.7 M).

Table 2 Effects of osmotic pressure on growth of bacteria in various salts.

osmotic pressure (kPa)	FeSO ₄			Na ₂ SO ₄			NaCl		
	FeSO ₄ (M)	results		Na ₂ SO ₄ (M)	results		NaCl (M)	results	
3.5×10^{-3}	1.00	X	X	0.59	X	X	0.78	X	X
2.5×10^{-3}	0.70	X	X	0.42	X	X	0.56	X	X
2.1×10^{-3}	0.60	X	X	0.36	X	X	0.48	X	X
1.8×10^{-3}	0.50	X	○	0.28	○	○	0.38	○	○
1.1×10^{-3}	0.30	○	○	0.18	○	○	0.24	○	○
0.4×10^{-3}	0.10	○	○	0.06	○	○	0.08	○	○

○ growth
X no growth

され H_2S が発生することがないので、これを直接測定することが出来ない。そこで、培地中に生成する H_2S の量の代わりに FeS の生成量を測定し、間接的に菌体の活性を調べることが必要となる。

菌体の物質代謝によって培地中に生成する FeS の量の経時変化を Fig. 3 に、QCM の金電極上に付着する FeS の質量変化を Fig. 4 にそれぞれ示す。

Fig. 3 は、菌体の硫酸塩還元（硫酸呼吸）が培養の極く初期から生じていることを示している。また、培地中の Fe^{2+} の濃度が 1.0×10^{-2} M の場合には 20 時間程度から硫酸呼吸が盛んになり、菌体の活性化が進むことがわかる。Fig. 4 に示す QCM のデータはこれらの過程を非常に高感度で検出できることを示している。培地中に生成する FeS の総量と QCM の金電極上に付着する FeS の量の関係を Fig. 5 に示す。両者にはほぼ比例関係が成立し、QCM によって in-situ で培地中に生成

Fig. 3 Relation between amount of FeS and culturing time in the medium containing Fe^{2+} of 1.0×10^{-2} M and 3.6×10^{-3} M.

Fig. 5 Relation between mass change by QCM and amount of FeS in the medium containing Fe^{2+} of 1.0×10^{-2} M (○) and 3.6×10^{-3} M (●).

Fig. 4 Relation between mass change by QCM and culturing time in the medium containing Fe^{2+} of 1.0×10^{-2} M and 3.6×10^{-3} M.

Fig. 6 Relation between logarithm of Fe^{2+} concentration in the medium and amount of FeS.

する FeS を定量できる可能性が示唆された。これまで培養初期段階から培地の FeS の生成を in-situ で高感度で検出する手法がなかったことから、今後 QCM が生成した FeS を検出する有力な手法となり得ると期待される。なお、培養 30 時間後までに培地中に生成する FeS が定常となる理由については pH が 8.0 付近まで上昇することによって硫酸塩還元に関わる酵素が至適 pH からずれて失活していくことや、菌体が齢 (age) を重ねることによって代謝が低下し生命維持のためのエネルギー要求量が低下する (すなわち硫酸呼吸量が減少する) ことなどが考えられるが、現在のところ不明である。前項において Fe^{2+} が実験範囲では最も低濃度である 3.6×10^{-4} M 含む培地で、培養 40 時間後から H_2S の発生が停止したのも同じ理由によると思われる。

Fig. 6 は培養 30 時間までに培地中に生成した FeS の

総量を始発培地中の Fe^{2+} の濃度の対数に対してプロットした結果を示す。なお、培養 30 時間後までに培地中に生成する FeS の総量は一定となるため、ここで示した FeS の量はこの定常値である。生成した FeS の総量は、始発培地中に含まれる Fe^{2+} の量が 1.0×10^{-2} M の場合に最大となり、この濃度を越えると著しく低下する。これらのデータは Fig. 1 に示す培養 30 時間までの菌体数の増加の傾向と一致する。以上の結果から、菌体の FeS 生成作用は培地中の Fe^{2+} の濃度に強く依存し、培養 30 時間までの菌体数の増加の傾向によって決まるといえる。

3.3 SO_4^{2-} 還元過程の速度論的な考察

前項の実験結果にもとづき、 Fe^{2+} と菌体の物質代謝とのかわりに関するモデルを提案した。ここで、酵素反応速度に関しては一般的に広く適応されている

Michaelis-Menten モデル^{16)~18)}に従うものとした。

S^{2-} 発生速度は硫酸塩還元に関わる酵素の反応速度式で表すことができる。硫酸塩還元に関わる酵素は数種類あるが、ここでは簡略化のために一種類として取り扱う。基質 [S] が酵素 [E] と活発な反応中間体である酵素基質複合体 [ES] を形成すると仮定すると、

酵素 [E] がすべて S と結合すると ES 濃度は [E] となる。このとき $K_2[E]$ は最大反応速度 V_m に等しくなる。

$$v = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

これが Michaelis-Menten 式^{16)~18)}で

反応速度 $= r_p$ (生産物生成速度)

$$= -r_s(\text{基質消費速度}) = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

の形となる。 K_m は Michaelis 係数と呼ばれ、この値が小さいほど E と S の親和性は高い。

培地中に残存する硫化水素の量の時間変化、 $d(H_2S)/dt$ は、菌体による S^{2-} 発生速度と FeS 生成による S^{2-} 消失速度とのかねあいで決まり、 $[S^{2-}]$ が定常状態では (6) 式を考慮すると以下のように表すことができる。

$$\begin{aligned} d(H_2S)/dt \\ = K_3N \frac{V_m[SO_4^{2-}]}{K_m + [SO_4^{2-}]} - K_4[Fe^{2+}][S^{2-}] \end{aligned} \quad (7)$$

ここで $[H_2S]$ 、 $[S^{2-}]$ 、 N 、 $[SO_4^{2-}]$ 、 $[Fe^{2+}]$ はそれぞれ H_2S の濃度、 S^{2-} の濃度、菌体数、 SO_4^{2-} の濃度、 Fe^{2+} の濃度で、 K_3 、 K_m 、 K_4 は定数である。

S^{2-} 生成速度は $[SO_4^{2-}]$ が十分小さい場合に $[SO_4^{2-}]$ に比例し、 $[SO_4^{2-}]$ が大きい場合には V_m の値に漸近する。今回の実験において浸透圧の影響を受けない範囲の SO_4^{2-} の濃度が 0.03 M 以下と低いことからこの範囲で、(7) 式の第一項は $[SO_4^{2-}]$ に比例するものとした。

始発培地中の Fe^{2+} の濃度が比較的低い場合、例えば Fe^{2+} を 3.6×10^{-4} M 含む培地の場合、 N は小であるから S^{2-} 発生速度は小となる。 S^{2-} 消失速度も Fe^{2+} の濃度の低下とともに小となる。しかしある時間帯では H_2S が存在しているところから、式 (7) の第一項が第二項に比べて優勢である。また、生成する FeS の量は培地中の Fe^{2+} の濃度で決まる。これに対して Fe^{2+} の濃度が比較的高い場合、たとえば Fe^{2+} を 3.6×10^{-3} M ~ 1.0×10^{-2} M 含む培地の場合、 N が大であるため第一

項は大となり、 Fe^{2+} の濃度が高いために第二項も増大する。しかし、残存する H_2S は検出されないことから第二項が第一項に比べ優勢であり、FeS の生成が認められる。さらに培養初期の Fe^{2+} の濃度が高くなり、 Fe^{2+} が 3.0×10^{-2} M を越える培地の場合、菌体数 N が減少し、 H_2S も検出されないことから第一項も第二項も小となる。

なお、(7) 式において K_m 、 V_m を定数としたがいずれも菌体の代謝に関係するもので、菌体の活性によって変化することが考えられ、厳密な意味では定数とはいえない。Michaelis-Menten 式における基質としての SO_4^{2-} 濃度の影響や Fe^{2+} の菌体の増殖および活性に及ぼす促進剤^{15), 17)}としての効果あるいは菌体数 N の影響も考慮しなければならない。今後 N 、 $[Fe^{2+}]$ 、 $[SO_4^{2-}]$ などが K_m 、 V_m にどうかかわってくるか検討する必要がある。また、始発培地で Fe^{2+} 源として $FeSO_4$ を用いており、 Fe^{2+} と SO_4^{2-} が同時に変化するため、厳密には SO_4^{2-} の変化量に対応する SO_4^{2-} の影響を検討しなければならない。しかし、今回の場合、あらかじめ始発培地中に SO_4^{2-} 源として Na_2SO_4 を 0.02 M 入れていることから、実際の SO_4^{2-} 濃度の幅は浸透圧の影響を受けない範囲で 0.02 M ~ 0.03 M と非常に小さく、この影響は無視できるものとして取り扱った。特に始発培地中の $FeSO_4$ 濃度が低い領域では、 SO_4^{2-} 濃度がほとんど変わらないにもかかわらず、菌体数、活性に著しい違いが生じていることから、これらに関わる効果のほとんどが Fe^{2+} によるものと考えられる。

いずれにしても Fe^{2+} の硫酸塩還元能力に対する影響は、培養のかなり初期の段階から生じている。他の研究者ら^{6), 7)}は、硫酸塩還元菌の硫酸塩還元（異化的な呼吸）が、菌体が十分に生育した後生じることを指摘しているが、今回の一連の結果は菌体が増殖しながら硫酸塩の還元を培養初期の段階から行っていることを示唆している。これは取り扱っている Fe^{2+} の量が他の研究者の報告に比べて一桁以上も大きく、菌体の代謝への影響が異なっているためと考えられる。事実、Fig. 1 の結果は培養初期の Fe^{2+} の量が 3.6×10^{-4} M と大幅に低い場合、他の研究者の結果と同様に、培養開始後 30 時間以上と長時間経過してから硫酸呼吸が生じていることを示している。

以上の結果から、 Fe^{2+} を 1.0×10^{-2} M 含む培地の場合に菌体が最も良く生育し活性も高い状態で FeS を生成し腐食を促進する可能性が考えられる。なお、硫酸塩還元菌による鉄の腐食は、FeS の生成だけではなくこれが部分的に脱落することによるガルバニック腐食で進行することが指摘されている⁷⁾。今後、生成した FeS が 2 次的に鉄の腐食にどのような影響を及ぼすかについて

ても検討する予定である。

4. 結 言

Fe^{2+} の濃度を 3.6×10^{-4} M から 0.7 M の範囲で段階的に変えた培地において、硫酸塩還元菌の菌体数や活性に及ぼす Fe^{2+} の効果を検討した。さらに生成する S^{2-} が直ちに FeS に変わる培地において菌体の活性を *in-situ* で見るひとつの手段として、培地中に生ずる FeS の生成量と QCM の金電極に付着した FeS の量との関係を調べた。その結果、次のような結論を得た。

1) 始発培地中の Fe^{2+} の濃度が 3.6×10^{-4} M から 0.7 M の場合、菌体の生育は Fe^{2+} の濃度 1.0×10^{-2} M で極大となる。この濃度を越えると菌体の生育は、浸透圧と栄養分の低下や老廃物の蓄積などによって弱まり、0.7 M では浸透圧の直接の影響で死滅する。

2) 菌体による FeS 生成の総量は、培養 30 時間までの菌体の生育の傾向に一致する。従って、 Fe^{2+} を 1.0×10^{-2} M 含む培地の場合に菌体が最も生育し活性も高い状態で FeS を作る。

3) QCM 電極上に付着する FeS の量と培地中の FeS の間には直線関係が認められ再現性も良好であったことから、QCM により培地中に生成する硫化鉄の量を *in-situ* で測定出来る可能性が示唆された。

(Manuscript received May 9, 1995 ; in final form July 17, 1995)

参 考 文 献

- 1) C. A. H. von Wolzogen Kühr & L. S. van der Vlugt : *Water (The Hague)*, **16**, 147 (1934); *Corrosion*, **17**, 293 (1961).
- 2) R. A. King, J. D. A. Miller, and D. S. Wakerley : *Br. Corros. J.*, **8**, 89 (1973).
- 3) C. K. Dittmer, R. A. King and J. D. A. Miller : *Br. Corros. J.*, **10**, 47 (1975).
- 4) V. K. Gouda, I. M. Banet, W. T. Riad, and S. Mansour : *Corrosion*, **49**, 66 (1993).
- 5) Little, B., Wagner, P., Ray, R., and Mcneil, M.: *Marine Technology Society. J.*, **24**, 10 (1990).
- 6) 佐々木英次, 中原東朗, 神田幸雄, 大里一夫, 梅野秀夫 : 防食技術, **26**, 77 (1977).
- 7) 佐々木英次, 中原東朗, 神田幸雄, 大里一夫, 梅野秀夫 : 防食技術, **26**, 125 (1977).
- 8) 柳田友道 : 微生物科学 1, p.23, 学会出版センター (1980).
- 9) 馬場文雄, 鈴木紹夫, 瀬尾眞浩 : 「3 協会研究発表会北海道支部講演集 (電気化学協会, 腐食防食協会, 表面技術協会)」, p.28 (1995).
- 10) 馬場文雄, 鈴木紹夫, 瀬尾眞浩 : 「第 41 回腐食防食討論会講演集」, p.337 (1994).
- 11) 須藤隆一 : 環境微生物実験法, p.122, 講談社 (1993).
- 12) M. Seo and K. Yoshida : 12th Scandinavian Corrosion Congress & Eurocorr' 92, 367 (1992).
- 13) 柳田友道 : 微生物科学 1, p.158, 学会出版センター (1980).
- 14) 畑 幸彦, 三好英夫, 門田 元, 木保正夫 : 農水講研報, **8**, 135 (1959).
- 15) 木保正夫, 門田 元, 畑 幸彦, 田島卓明 : 日本水産学会誌, **21**, 113 (1955).
- 16) 川瀬義矩 : 生物反応工学の基礎, p.29, 化学工業社 (1993).
- 17) 石橋貞彦, 遠藤浩良, 東 直彦 : 生化学, p.224, 丸善 (1982).
- 18) 山科郁男, 山羽 力 共訳 : レーニンジャー基本生化学, p.75, 広川書店 (1984).