

## 微生物による石けん廃液よりアミノ酸の生産について

増田 博, 村木 弘行

(昭和40年10月15日受理)

### Production of Amino Acids from Waste Soap Liquor by Microbes

By Hiroshi MASUDA and Hiroyuki MURAKI

Fermentative production of alanine was experimented from waste soap liquor by strains isolated and selected from soil and cheese samples. Waste soap liquor was previously neutralized, filtered, evaporated in vacuum to contain 30.06 % glycerol, and filtered again to remove crystallized sodium chloride. The medium contained 3.3 Vol. % of this filtrate, 0.4 % urea as nitrogen source, mineral salts and yeast extracts. Alanine produced in the medium was about 6 g/l, with possibility to be increased by modification of culture method. The best yield of alanine was obtained by a strain similar to *Brevibacterium incertum*. Waste soap liquor was found to be as favorable carbon source as pure glycerol.

#### 緒 言

多価アルコール類の微生物による代謝については、すでに 2, 3-ブタンジオールやグリセリンなどに関する多くの研究があり、また発酵生産培地としても、宮地ら ('62)<sup>1)</sup> によってエタンジオール、プロパンジオールを原料とする L-グルタミン酸の発酵生産が試みられている。著者らは種々の多価アルコール、特にこれまで生理的活性の知られていない合成多価アルコールの微生物による代謝を研究し、エタンジオール、1, 2-プロパンジオール、1, 3-および 1, 4-ブタンジオール、グリセリン、マニトールなどの多価アルコールを唯一の炭素源として生育し、培地中に多量のアミノ酸を生成蓄積する菌株のあることを見出した<sup>2, 3)</sup>。これらの多価アルコールの中で、グリセリンは油脂の構成成分として広く天然に存在するものであり、油脂を分解して石けんを分離した残渣、すなわち石けん廃液中には 5~10% 程度のグリセリンがふくまれている。この廃液はグリセリンの精製原料として用いられるのが通常であるが、グリセリンを唯一の炭素源として生育できる微生物に対しては、発酵生産培地として使用できる可能性があり、さき到大塚ら ('58)<sup>4)</sup> は石けん廃液を培地として食飼料用酵母の製造に成功している。著者らはグリセリンを炭素源として生育し、アミノ酸を生成蓄積しうる菌株を使用して、石けん廃液を原料とするアミノ酸の発酵生産を試み、ある程度の成果をあげることができた。本報ではアラニンの生産に関して報告する。

## 実験方法

## 1. 供試石けん廃液

本実験で供試した石けん廃液は牛脂を主原料とし、アルカリ法で得られたものであって赤褐色、強アルカリ性を呈する。これを塩酸で中和すると、非常に高濃度の塩化ナトリウムを生成し、菌の生育を阻害するので、脱塩処理が必要であった。脱塩には種々の方法が考えられるが、本実験では実験室的方法として、次のように減圧濃縮して塩化ナトリウムを析出させ、ろ過する方法を用いた。

石けん廃液 1 l に対し 49.5 ml の比率で濃塩酸を加えて pH 7.0 まで中和し、一旦ろ過して生成する沈殿（除蛋白剤のアルミニウム化合物）を除去した。ろ液中のグリセリンは 4.93%、塩化ナトリウムは 7.82% であった。これを減圧で約 1/6 容になるまで濃縮し、析出する塩化ナトリウムをろ過する。ろ液はグリセリン 30.06%、塩化ナトリウム 22.4% をふくむものとなった。以下の実験において、石けん廃液とよんで供試したのは、このろ液である。

## 2. 培地組成

TABLE I に示す組成の各培地を使用した。

TABLE I  
使用培地の組成  
*Composition of the Culture Media Used*

Sign		M-1	M-2	U	S	G
Waste soap liquor <sup>a)</sup>	Vol %	—	—	—	3.3 <sup>e)</sup>	—
Glycerol	%	4.0	4.0	4.0	—	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	%	1.0	—	—	—	—
NH <sub>4</sub> Cl	%	—	1.0	—	—	—
Urea	%	—	—	0.6	0.4	0.4
NaCl	%	0.5	0.5	0.5	(0.7) <sup>f)</sup>	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	%	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	%	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Yeast Ex.	%	—	0.02	0.02	0.02	0.02
Glucose	%	—	0.2	0.2	0.1	0.1
Fe <sup>++</sup> <sup>b)</sup>	ppm	—	2	2	2	2
Mn <sup>++</sup> <sup>c)</sup>	ppm	—	2	2	2	2
CaCO <sub>3</sub> <sup>d)</sup>	%	2.5	2.5	—	—	—
pH		7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

a) Neutralized and evaporated to 30.06 % glycerol and 22.4 % NaCl.

b) FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O was used.

c) MnSO<sub>4</sub> · 4 H<sub>2</sub>O was used.

d) Heat-sterilized separately and added to the medium when inoculation.

e) Corresponding to about 1 % glycerol.

f) Contained in 3.3 Vol. % waste soap liquor.

### 3. 分析方法

#### (1) アミノ酸に対する Paper chromatography (以下 PC と略記)

ろ紙: 東洋ろ紙, No. 50

展開溶媒: n-ブタノール:酢酸:水 (4:1:2) およびフェノール:水 (10:2)

展開方法: 二次元上昇法。ただし生成されるアミノ酸は数種類にすぎず、一次元でも充分な分離が可能であったので、差支えない場合は n-ブタノール:酢酸:水による一次元上昇法をも用いた。

発色: 水飽和 n-ブタノールにとかした 0.1% ニンヒドリン溶液

#### (2) グリセリンの定量方法

HARVEY 氏 (51)<sup>9)</sup> の方法を参照し、酸化法を用いて定量した。試料 5 ml に 10 N 硫酸 1 ml を加え、10 時間エーテル抽出して油脂や脂肪酸を除去する。エーテル不溶部を加熱してエーテルを除き、グリセリン濃度に応じて適当な定容にみたらす。その 2 ml を遠心沈殿管にとり、20%硫酸銅 0.2 ml を加え、よく混合する。5 分後に水酸化カルシウム 0.28 g を攪拌しながら加え、30 分以上放置する。次にアセトンをふくまないアルコール 2 ml を加え、74°C の湯煎上で 10 分間加熱し、冷却してから遠心分離する。残渣は 2 ml のアルコールで 2 回洗い、洗液を上澄と合わせる。これから低温でアルコールを溜去し、ふたたび定容にみたらす。その 5 ml をとり、66.6% の硫酸 3 ml と標準濃度の重クロム酸カリ液を加え沸とう湯煎中で 2 時間加熱してグリセリンを酸化させる。冷却してから硫酸第一鉄アンモニウム液の過剰量を加えて残存する重クロム酸カリを還元し、さらに残存する硫酸第一鉄アンモニウムを過マンガン酸カリ液で滴定する。その滴定値からグリセリンの酸化のために消費された重クロム酸カリの量を求め、試料のグリセリン量を計算した。7.4576 g/l の重クロム酸カリ溶液の 1 ml はグリセリン 1 mg に相当する。

#### (3) アンモニア態窒素の定量方法

通気法<sup>9)</sup> によった。すなわち試料に過剰の 10% 炭酸ナトリウムを加えてアルカリ性とし、45°C で 90 分間はげしく通気して、排出されるアンモニアを一定量の N/50 硫酸に吸収せしめ、残存する硫酸を N/50 酸性ソーダで滴定してアンモニア量を計算する。

#### (4) 尿素の定量方法

ウレアーゼ法<sup>7)</sup> によった。大豆を粉碎し、5 倍容の水で約 1 時間振盪しつ抽出し、抽出液をろ過して 5 倍容のアルコール・エーテル混液 (4:1) の中に注ぎ、生成する沈殿を集めて真空乾燥し、粗ウレアーゼ標品を調製する。このウレアーゼの適当量とトルオール少量とを試料に加え、密栓して室温に一昼夜放置し、生成するアンモニアを定量する。別に定量した遊離のアンモニアを差引いて尿素量を算出する。

#### (5) アラニンの定量方法

PC によってアラニンを分離し、アラニンのスポットに相当する部分を切り取り、蒸留水で溶出してニンヒドリン法<sup>9)</sup> によって比色定量した。

#### (6) 塩化ナトリウムの定量方法

硝酸銀滴定法<sup>9)</sup> によった。

## (7) pH の測定方法

東洋 pH 試験紙により, pH 6.8~8.0 は phenol red を, pH 8.0~9.6 は thymol blue を用いた。

## (8) 供試菌株の生育度の測定方法

日立製作所製 FPW-4 型光電比色計を用い, 主波長 500  $m\mu$  で吸光度を測定し, これを菌の生育度の指標とした。

## 実 験 結 果

## 1. グリセリンよりアラニン生成能のある菌株の分離および選択

最初に予備実験として標品グリセリンを炭素源として著量のアラニンを生成蓄積しうる細菌を自然界から分離した。

## (1) 分 離 源

山梨県内で採取した土壌 20 点, チーズ 4 点 (デンマーク製 2 点, フランス製 1 点, 国内産 1 点) を分離源とした。

## (2) 分 離 方 法

M-1 培地 (TABLE I) 20 ml を 50 ml 容三角フラスコに分注して 110°C, 5 分間殺菌し, これに約 0.1 g の分離源試料を投入, 混和して, 時々攪拌しながら 30°C で 3 日間培養した。培養液を殺菌水で希釈し, ブイヨン寒天上で平板塗まつを行って, 発現したコロニーをブイヨン寒天斜面上にうつし, さらに平板培養を繰返して純粋とした。分離された菌株は総計 90 株であった。

## (3) アラニン生成菌の選択

前項で分離された 90 株の菌株に対して次のようにスクリーニング・テストを行ってグリセリンよりアラニン生成能の強い菌株を選択した。

5 ml の M-2 培地 (TABLE I) を 15×170 mm の試験管に分注して 110°C, 5 分間殺菌し, これに 30°C で約 20 時間新たに培養したブイヨン寒天斜面から供試菌株を接種し, 160 r p. m., 振幅 72 mm の往復振盪機により 30°C で振盪培養した。培養 2, 4, 6 日目に培養液の一部をとり, PC によりアラニン生成の有無を検した。生成量の多少はスポットの大きさおよび呈色度によって判定した。なお, これと同時に植菌しない培地, および他の組成は同一でグリセリンのみをふくまない培地に同一条件で同一菌株を接種培養したものを PC 試料として, アラニン生成に対する対照とした。

その結果, 供試した 90 株の中で, 何らかのアミノ酸を多少でも生成したものは 30 株にのぼったが, 特にアラニンの生成が顕著なものは TABLE II に示す 9 株であった。アラニン以外の生成アミノ酸としては, グルタミン酸, バリンおよびロイシンと思われるものが主であった。

これらの 9 菌株の中, SN-2, SN-5, CA-3, RQ-3, DA-1 の 5 株はチーズよりの分離菌であり, S-7-2, S-11-1, S-13-1, S-19-3 の 4 株は土壌よりの分離菌である。

## 2. 窒素源として尿素使用の可否

培地の窒素源として硫酸アンモニウムや塩化アンモニウムのようなアンモニウム塩を用

TABLE II  
グリセリンよりアラニン生成菌株  
*Strains that Formed Alanine from Glycerol*

Strain No.	Culture days : 2	Amino acids detected by paper chromatography					
		2		4		6	
		Alanine	Others <sup>a)</sup>	Alanine	Others <sup>a)</sup>	Alanine	Others <sup>a)</sup>
SN-2	+	+		+		+	
SN-5	+	+		+		+	±
CA-3	+			+		+	
RQ-3	+			+		+	
DA-1	+			+		+	
S-7-2	+			+		+	+
S-11-1	+			+	+	+	+
S-13-1	+			+		+	
S-19-3	+			+	±	+	

a) The main other amino acids were glutamic acid, valine and leucines.

TABLE III  
窒素源として尿素と塩化アンモニウムの比較  
*Suitability of Urea as Nitrogen Source*

Strain No.	Medium used <sup>a)</sup>	Culture days	Cell growth	Final pH of culture broth	Amino acids detected in culture broth by paper chromatography	
					Alanine	Others <sup>b)</sup>
SN-2	M-2	4	+	7.2	+	
	U	4	+	9.0	+	
SN-5	M-2	4	+	7.4	+	±
	U	4	+	8.4	+	+
CA-3	M-2	4	+	5.6	+	
	U	4	+	8.6	+	
RQ-3	M-2	4	+	7.2	+	
	U	4	+	8.6	+	
DA-1	M-2	4	+	8.0	+	
	U	4	+	9.3	+	
S-7-2	M-2	4	+	6.0	+	+
	U	4	+	9.0	+	+
S-11-1	M-2	4	+	7.6	+	+
	U	4	+	8.8	+	+
S-13-1	M-2	4	+	6.2	+	
	U	4	+	8.8	+	
S-19-3	M-2	4	+	7.8	+	
	U	4	+	9.2	+	

a) See TABLE I.

b) See TABLE II.

いると、窒素の消費に伴って培地の pH が酸性にかたむき、このため炭酸カルシウムのような中和剤を添加したり、あるいは培養途中でアンモニアを用いて pH の調整を行う必要を生ずる。そこでアンモニウム塩の代わりに尿素を窒素源として用いた培地 (TABLE I, U 培地) を使用して、これに前項の培養方法に準じて選択菌株を接種培養し、菌株の生育度およびアミノ酸生成の有無 (PC による) を、アンモニウム塩培地 (M-2) の場合と比較検討し、窒素源として尿素が使用できるかどうかを試験した。

結果は TABLE III に示した通りで、菌の生育についてもアミノ酸生成についても、塩化アンモニウムと比べて尿素を用いた場合はほとんど差がなく、むしろすぐれている場合が多い。ただし尿素を用いると pH が 9 以上に上昇する場合のあることが認められ、このような場合は逆に酸を用いて pH を調整する必要がある。この点に留意すれば尿素はアミノ酸生成のための窒素源として適当なものと認められる。

### 3. 石けん廃液よりアラニンの生成

#### (1) 石けん廃液に対する優良菌株の選択

さきに標品グリセリンを用いて選択した 9 株 (TABLE II) の菌株に対し、さらに石けん廃液を炭素源とした培地 (TABLE I, S 培地) を用いて選択試験を行い、アラニン生成の特に顕著な菌株を決定した。方法は前の選択試験と同様である。培養液のペーパークロマトグラムにおけるアラニンのスポットの大きさおよび呈色度から、アラニンの生成量を判定し、最もすぐれた菌株として SN-2, DA-1, S-11-1 の 3 菌株を選択した。

#### (2) 選択菌株による石けん廃液よりアラニンの生成経過

前項において選択した 3 優良菌株を用い、石けん廃液培地におけるアラニン生成経過の定量的追跡を試みた。

a) 培養方法: 使用培地としては、石けん廃液培地 (TABLE I, S 培地) と共に、標品グリセリンを用いてほぼ同一組成の培地 (TABLE I, G 培地) を調製し、両者におけるアラニン生成を比較して、石けん廃液の培地炭素源としての適性を検討した。

各培地 30 ml を 500 ml 容肩付フラスコに分注し、殺菌してから新らしく培養したアियोン寒天斜面から供試菌株を接種して、140 r.p.m., 振幅 72 mm の往復振盪機により、30 °C で振盪培養した。培養中に、2, 4, 6, 8 日目に培養液の一部をとり、グリセリン、尿素の減少量、アラニン、アンモニア態窒素の量、培養液の pH、および接種菌株の生育度を測定した。

b) 結果: TABLE IV に示した通りで、各供試菌株とも類似の経過をとり、アラニンの蓄積が最大に達するのは 6 日目であって、グリセリンの消費、アラニンの生成の速度は決して早いとはいえない。6 日目をすぎるとアラニンの量は減少の傾向を示す。アラニンの最大蓄積量が最も多いのは S-11-1 であった。また S 培地は G 培地と比べてやゝすぐれた菌の生育度およびアラニンの生成を示し、石けん廃液は何らの阻害物質をもふくまず、発酵生産培地としての適性はグリセリンと同等以上であることが認められた。

### 4. 優良菌株の分類学的性質

前項の試験で最もすぐれたアラニン生成能を示した菌株 S-11-1 について、常法<sup>10, 11)</sup> によって主要な分類学的諸性質を検討した結果を TABLE V に示した。この結果から菌株

S-11-1 は *Brevibacterium incertum* に近縁の菌と思われる。

## 考 察

### 1. 培地のピオチン濃度について

微生物によるアミノ酸の生産については、培地中のピオチン量がきわめて大きな問題であって、これを最適範囲に調整することが必要である<sup>12, 13)</sup>。したがって石けん廃液をアミノ酸生産培地として使用する場合は、先ずその中のピオチン含量を明確にすることが必要と思われる。本実験では石けん廃液中のピオチンの bioassay に成功しなかったため、この点については全く不十分であって、ある程度のアラニンの生成が認められたといっても本実験における培養条件が最適か否かはなお疑問であり、今後さらに検討を試みたい。

TABLE IV

選択菌株による石けん廃液よりアラニンの生成

*Production of Alanine from Waste Soap Liquor by Selected Strains*

Strain	Medium <sup>a)</sup>	Culture days	Glycerol remained	Glucose remained	Urea remained	Alanine formed	NH <sub>3</sub> -N	Degree of growth <sup>b)</sup>	pH of broth
			g/l	g/l	g/l	g/l	g/l		
SN-2	G	0	10.7	0.9	3.2	0.8	0.1	0.113	7.4
		2	8.4	—	2.4	2.9	0.5	0.435	9.0
		4	6.4	—	1.0	3.9	0.9	0.545	9.3
		6	5.3	—	0.4	4.6	1.0	0.582	9.3
		8	5.1	0.1	0.3	4.2	0.8	0.566	9.3
	S	0	11.1	0.9	3.2	0.9	0.2	0.082	7.4
		2	8.3	—	2.2	3.2	0.3	0.324	8.8
		4	6.9	—	1.2	4.5	0.6	0.304*	9.2
		6	5.7	—	0.5	4.7	0.8	0.450*	9.3
		8	5.4	0.1	0.3	4.4	0.7	0.442*	9.3
DA-1	G	0	10.7	0.9	3.2	0.9	0.1	0.090	7.4
		2	7.9	—	2.4	3.4	0.5	0.310	9.1
		4	5.9	—	1.1	4.2	0.9	0.320	9.3
		6	5.2	—	0.5	4.7	1.0	0.312	9.3
		8	4.8	0.2	0.3	4.2	0.8	0.295	9.3
	S	0	11.1	0.9	3.2	0.9	0.2	0.056	7.4
		2	8.3	—	2.2	3.7	0.3	0.254	8.5
		4	6.3	—	2.0	4.7	0.6	0.725	9.3
		6	5.0	—	0.9	5.1	0.5	0.438*	9.3
		8	4.7	0.1	0.2	4.8	0.5	0.432*	9.3
S-11-1	G	0	10.7	0.9	3.2	0.8	0.1	0.079	7.4
		2	7.0	—	2.3	3.9	0.6	0.328	8.8
		4	4.6	—	1.3	5.3	0.8	0.400	9.2
		6	3.2	—	0.5	5.9	0.8	0.385	9.3
		8	3.0	0.2	0.2	5.6	0.7	0.383	9.3
	S	0	11.1	0.9	3.2	0.9	0.2	0.068	7.4
		2	7.5	—	2.1	4.1	0.4	0.312	8.6
		4	5.2	—	1.2	5.7	0.6	0.640	9.2
		6	3.5	—	0.4	6.2	0.6	0.280*	9.3
		8	3.2	0.1	0.2	5.9	0.5	0.274*	9.3

a) See TABLE I.

b) Absorbance of culture broth at 500 m $\mu$ .

\* Culture broth was diluted to threefold volume.

TABLE V

## 菌株 S-11-1 の主要性質

*Description of Strain S-11-1*

- 
- (1) Microscopic observations : Rods with rounded ends, 1.0 by 2.0 to 4.0  $\mu$ , occurring singly, motile, Gram-positive, no endospore.
- (2) Agar colonies : growth scant, convex, circular, entire, glistening, white.
- (3) Agar slant : growth moderate, filiform, convex, glistening, creamy white, medium unchanged.
- (4) Potato slant : no growth.
- (5) Gelatin stab : scanty growth on surface, no liquefaction.
- (6) Nutrient broth : growth scant, sediment scant, light turbidity.
- (7) Physiological properties :
- a) Opt. Temp. : 25–30°C, scanty growth at 37°C after 6 days.
  - b) Litmus milk : decolorized and coagulated after 7 days, peptonized, became alkaline after 9 to 12 days.
  - c) Indole : not produced.
  - d) Nitrites : produced from nitrates.
  - e) Hydrogen sulfide : not produced (slightly produced after 11 days).
  - f) Methyl red test : negative.
  - g) VOGES-PROSKAUER test : negative.
  - h) Catalase : strongly positive.
  - i) Urease : negative.
  - j) Microaerophilic.
  - k) Cleavage of carbohydrates : acid but no gas from glucose, fructose, mannose, galactose, maltose, sucrose, raffinose, glycerol, sorbitol and mannitol ; no acid and no gas from xylose, arabinose and lactose ; starch not hydrolyzed.
  - l) Citrates : not utilized as sole carbon source.
- 

## 2. 石けん廃液の前処理について

石けん廃液中にふくまれる多量のアルカリを, 本実験では中和, 濃縮によって塩化ナトリウムの結晶を析出せしめて除去したが, 処理液中には, なお多くの塩化ナトリウムが残存し, その培地中の濃度が過度に高くなることを防ごうとすれば, グリセリンの初発濃度も低くせざるを得ず, したがって高濃度のアラニンの蓄積は望めない結果となった。そこで今後の問題として, たとえばイオン交換のような処理方法を検討し, 培地中の塩類濃度を高めることなくグリセリンの初発濃度を高くすることを考える必要がある。

## 3. 使用菌株について

本実験で菌株の選択のために分離した菌株総数は90株にすぎず, 優良菌株を広く検索したとは決していえない。さらに広範囲の検索をくりかえすことによって, さらにすぐれた菌株を分離できる可能性が考えられる。また菌株の選択により, アラニンのみでなく, 他のアミノ酸の生産培地として石けん廃液を利用できる可能性も充分あるものと考えられる。

## 4. アラニンの生成量について

本実験の結果では, 供試菌株によるグリセリンの消費は, なお速いとはいえず, またアラニンの生成量も充分高いとはいえない。しかし, 上記のような諸条件に対して今後検討

を加えることによって、さらにアラニン生成量を高め得る可能性はあるであろう。本実験の結果によって、少なくとも石けん廃液の発酵生産培地としての使用適性は確認されたものと考えられる。

### 要 約

土壌およびチーズを分離源として、グリセリンを炭素源として生育し、培地中にアラニンを生成蓄積し得る菌株を検索し、その分離菌株を用いて石けん廃液を原料とするアラニンの発酵生産を試みた。その結果、石けん廃液は発酵生産培地の炭素源として十分な適性を持つものであることを認めた。培地中に蓄積されたアラニン濃度は約 6 g/l で、必ずしも高いとはいえないが、今後の培養条件に対する検討によって向上させることができると思われる。最もすぐれたアラニン生成を示した菌株について分類学的諸性質を試験した結果、*Brevibacterium incertum* に近縁のものであった。

終りに終始御指導を戴いた故多田靖次先生、ならびに本稿に対し御校閲を賜った林武先生に深謝の意を表します。

### 文 献

- 1) 宮地昇, 松井俊規, 北井淳夫, 刀根弘, 角田俊直: 発酵による L-グルタミン酸製造法 特公, 昭37-9298
- 2) 多田靖次, 村木弘行: 多価アルコールよりアミノ酸の製造方法 特許 第444358号
- 3) 多田靖次, 村木弘行: 多価アルコール類よりアミノ酸の製造方法 特公, 昭39-20215
- 4) 大塚謙一, 多田靖次: 石けん廃液(グリセリン含有液)よりの食飼料用酵母の製造について 農化, **32**, 805 (1958)
- 5) HARVEY, S. C. and V. HIGBY: A microcolorimetric method for the determination of glycerol. *Arch. Biochem.*, **30**, 14 (1951)
- 6) 中川一郎: 栄養学実験書, 初版, p. 472, 朝倉 (1955)
- 7) 東大農学部農芸化学教室: 実験農芸化学, 6版, 上巻 p. 73, 朝倉 (1958)
- 8) YEMM, E. W. and E. C. COCKING: The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst*, **80**, 209 (1955)
- 9) 高木誠司: 定量分析の実験と計算, 4版, 第2巻 p. 235, 共立 (1952)
- 10) Society of American Bacteriologists: *Manual of microbiological methods*. McGraw-Hill (1957)
- 11) *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 7th Ed., Williams & Wilkins Co. (1957)
- 12) 田中勝宣, 岩崎彪, 木下祝郎: L-グルタミン酸発酵に関する研究(第5報) 細菌によるグルタミン酸蓄積現象とビオチン 農化, **34**, 593 (1960)
- 13) 田中勝宣, 秋田定夫, 木村一雄, 木下祝郎: 同上(第6報) *Micrococcus glutamicus* の代謝におけるビオチンの役割 同誌, **34**, 600 (1960)