

総合論文

平成19年度 生物工学奨励賞(照井賞) 受賞



フォトバイオリアクターによる 有用物質生産のための 生物化学工学的検討



勝田 知尚

A Biochemical Engineering Study of Bioproductions Using Photobioreactor

Tomohisa Katsuda (*Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Hyogo 657-8501*) *Seibutsu-kogaku* **86**: 117-122, 2008.

緑藻, 藍藻, 光合成細菌といった光合成微生物は光合成と関連した特徴的な代謝を有し, 植物と同様に二酸化炭素からグルコースを生産するばかりではなく, クリーンエネルギー源として実用化が期待される水素, 抗酸化作用が注目されているカロテノイドやフィコシアニンといった色素, 高度不飽和脂肪酸や化石燃料の代替として利用可能な炭化水素を生産するものもある. こうした光合成微生物を利用した有用物質生産では, 生育に必要な光エネルギーを供給する光源を備えたフォトバイオリアクターと呼ばれる培養槽を用いる. フォトバイオリアクターには, 密閉型の培養槽にランプを配置したものや, 太陽光を利用するチューブ型, あるいはオープンポンド型のものなどがある. フォトバイオリアクターでは光合成微生物へ効率的に光エネルギーを供給することが肝要で, このためフォトバイオリアクターの設計や光合成微生物を利用したバイオプロセスの運転では, 他の微生物の場合にはない特有の問題を考慮せねばならない. すなわち, 光が培養液に入射し, それを透過する際, 光強度は低下し, スペクトルも変化するという問題である. 光強度とスペクトルはともに光合成微生物の活性を左右する因子であるので, これらの変化は光合成微生物の活性が培養槽内の位置によって変化することの原因となるとともに, そうした不均一な場を光合成微生物が移動することにより生育条件に変動が生じ, 生理的な変化をもたらすことの原因にもなる. 本研究は, こうした光強度とスペクトルの変化をいかに定量化するか, そしてこれ

ら光条件の変動が光合成微生物の生理状態にどのような影響を及ぼし, それをどう活用するかといった問題に興味を向けに行ってきた. 本稿では, はじめに培養液中の光強度分布とスペクトル変化を定量的に表すために提案したモデル式について解説し, 次に光強度分布が光合成微生物の生理状態に及ぼす影響を調べた研究として, 光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* の半連続培養における増殖速度の安定性について述べる. そして, 光強度とスペクトルの変化を有用物質生産に利用した例として, 緑藻 *Haematococcus pluvialis* によるアスタキサンチン生産において行った2段階サイクリック培養法を紹介する.

光合成微生物の培養液中における光強度減衰

光合成微生物の培養液中において光強度がどのように減衰するかを表すモデル式は, 70年代ごろから数多く提案されている. しかし, 光学や電磁気学の理論に基づいて導出されたモデル式は, 非常に高度な計算を必要とする, あるいは決定の非常に困難なパラメーターを含むものが多く, 結局, 培養とは別に光強度と光路長, および細胞密度の関係を調べておき, 得られた経験式を培養に適用するというアプローチがよく採られている. 著者は, 光合成微生物の培養液中における光強度減衰を, 細胞における吸収, ならびに散乱による減衰, 培地による減衰, 光線の拡散による減衰に分けて考え, 細胞における散乱による減衰は, Rose-Lloydの仮説¹⁾を適用すると, 吸収による減衰を表す Lambert-Beer の式と同様に指数関数

で表せることに注目し、これら細胞による光減衰の減衰係数のみを分光光度計によって決定するという、以下に示すようなモデル式を提案した^{2,3)}。

$$\left(\begin{array}{c} \text{懸濁液中} \\ \text{の光減衰} \end{array}\right) = \left(\begin{array}{c} \text{細胞による} \\ \text{減衰} \end{array}\right) \times \left(\begin{array}{c} \text{培地による} \\ \text{減衰} \end{array}\right) \times \left(\begin{array}{c} \text{光線の拡散} \\ \text{による減衰} \end{array}\right)$$

$$\frac{I_{\lambda}}{I_{0,\lambda}} = \frac{I_{\lambda}}{I_{\text{med},\lambda}} \cdot \frac{I_{\text{med},\lambda}}{I_{\text{void},\lambda}} \cdot \frac{I_{\text{void},\lambda}}{I_{0,\lambda}}$$

細胞による減衰について

$$\begin{aligned} \frac{I_{\lambda}}{I_{\text{med},\lambda}} &= \left(\begin{array}{c} \text{吸収による} \\ \text{減衰} \end{array}\right) \times \left(\begin{array}{c} \text{散乱による} \\ \text{減衰} \end{array}\right) = 10^{-\varepsilon_{\text{a,cell},\lambda} CL} \cdot 10^{-\varepsilon_{\text{s,cell},\lambda} CL} \\ &= 10^{-(\varepsilon_{\text{a,cell},\lambda} + \varepsilon_{\text{s,cell},\lambda}) CL} = 10^{-\varepsilon_{\text{cell},\lambda} CL} \end{aligned}$$

培地による減衰について

$$\frac{I_{\text{med},\lambda}}{I_{\text{void},\lambda}} = 10^{-\varepsilon_{\text{med},\lambda} CL}$$

光線の拡散による減衰について

$$\frac{I_{\text{void},\lambda}}{I_{0,\lambda}} = \frac{L_0^2}{(L_0 + L)^2}$$

よって

$$\begin{aligned} \frac{I_{\lambda}}{I_{0,\lambda}} &= 10^{-\varepsilon_{\text{cell},\lambda} CL} \cdot 10^{-\varepsilon_{\text{med},\lambda} CL} \cdot \frac{L_0^2}{(L_0 + L)^2} \\ \therefore I &= \sum_{\lambda} I_{\lambda} = \frac{L_0^2}{(L_0 + L)^2} \sum_{\lambda} I_{0,\lambda} \cdot 10^{-\varepsilon_{\text{cell},\lambda} CL} \cdot 10^{-\varepsilon_{\text{med},\lambda} CL} \end{aligned}$$

ここで、 I_0 と I はそれぞれ入射光強度と培養液中の光強度 [mW cm^{-2}]を表し、 I_{med} と I_{void} はそれぞれ槽内が培地のみ、および空のときの光強度 [mW cm^{-2}]を表す。添字の λ は波長を表す。 C 、 L 、および L_0 は細胞密度 [g cm^{-3}]、光路長 [cm]、光源から受光面までの距離 [cm]を表す。 $\varepsilon_{\text{a,cell}}$ と $\varepsilon_{\text{s,cell}}$ はそれぞれ細胞における吸収と散乱の減

衰係数 [cm g^{-1}]を表し、それらを含めた減衰係数を $\varepsilon_{\text{cell}}$ と表した。また、 ε_{med} は培地の減衰係数 [cm g^{-1}]を表す。

このモデル式は、減衰係数を変更することにより種々の光合成微生物に適用することができるとともに、細胞の色や大きさといった光学的特性が培養中に変化する光合成微生物に対しても、適宜、減衰係数を決定することにより適用できるといった利点がある。図1には、光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* (a) と緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (b) の懸濁液中における光強度の実測値 (実験点) と、このモデル式を用いて算出される推算値 (実線) を示す。これらの光合成微生物は水素生産に用いられ、*R. capsulatus* は有機酸や糖を水素源とした際の収率が高いことで知られている⁴⁻⁶⁾。*R. capsulatus* の細胞はストークス径約 800 nm の桿状で、細胞の色は赤褐色をしている。一方、*C. reinhardtii* の細胞は直径約 5 μm のほぼ球形で、細胞の色は鮮緑色をしている。このように細胞の大きさ、色はまったく異なるが、これらの光合成微生物の減衰係数を分光測定により決定し、それを上記のモデル式に適用することにより、光強度減衰挙動の推算値は実測値をよく満足することが示された。なお、種々の光源に対する適用性も放射スペクトルの異なる3種の光源を用いて確認された。また、図1(c)には、*R. capsulatus* が凝集剤によりストークス径約 200 μm のフロックを形成した際の、培養液中の光強度減衰挙動を示す。このとき凝集体に対する減衰係数を適用することで、推算値は実測値をよく満足することが示された。

上記のモデル式は、波長ごとに光強度の計算を行うためフォトバイリアクター内の光強度分布とともに、スペクトルの変化も容易に推算することができる。図2には、*R. capsulatus* の培養液中において、ハロゲンランプより放射された光のスペクトルが光路長に応じてどのように変化するかを上記のモデル式によって計算した例を

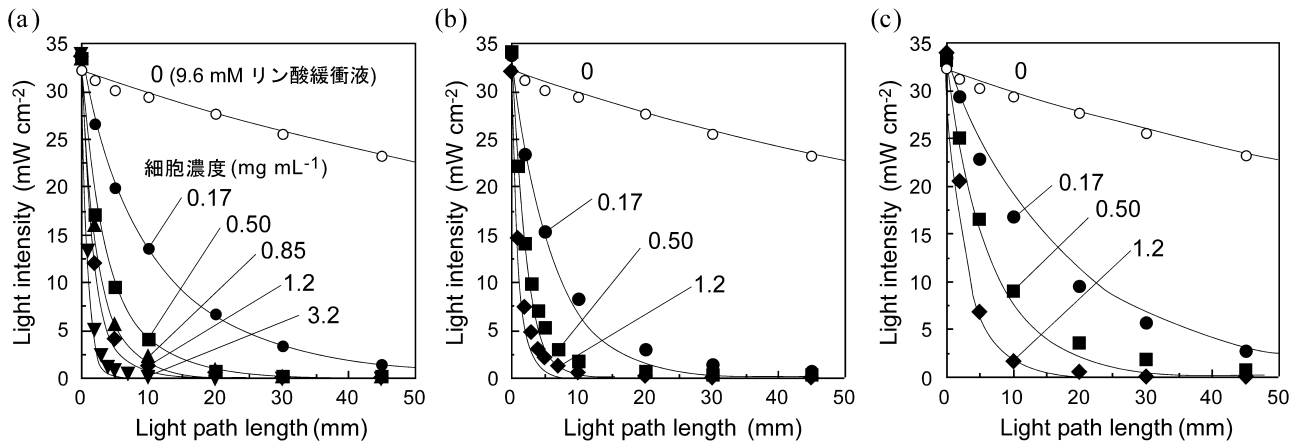


図1. 光合成細菌 *R. capsulatus* (a)、緑藻 *C. reinhardtii* (b)、フロックを形成した *R. capsulatus* (c) の培養液中の光強度分布。実験点、実測値；実線、計算値。

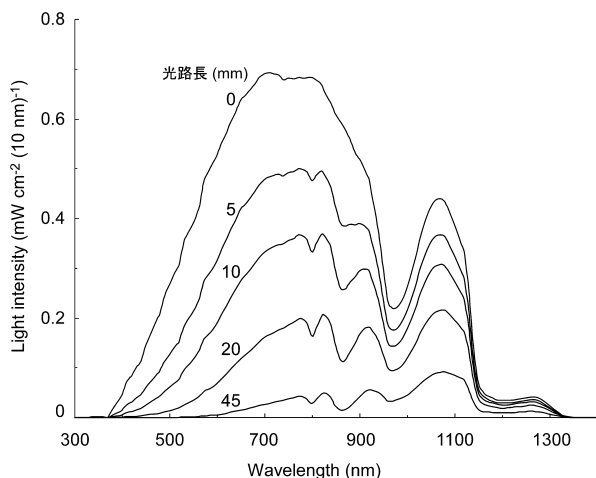


図2. *R. capsulatus* の培養液中における照射光のスペクトル変化. 細胞濃度を 0.17 mg ml^{-1} として算出した.

示す.

上記のモデル式によって推算される光強度減衰挙動は、培養液中を一方向に透過する光線の光強度とスペクトルの変化を表す。よって、光が一方向からのみ入射する平板型などのフォトバイオリアクターでは、上記のモデル式を用いて光強度分布を推算することができる。一方、図3に示した外部照射式円筒型フォトバイオリアクターのように、さまざまな方向から光線が入射するフォトバイオリアクターでは、培養液中の任意の点にはその周囲の全方向から光線が到達し、その点での光強度はそこに到達する各光線の光強度の総和で表されると仮定した、拡散モデル⁷⁾と呼ばれるモデルを適用し、以下の式により光強度分布を推算することができる⁸⁾。

$$I_{(r)} = \int_0^{2\pi} I_{(c,L)} d\theta$$

ここで、

$$L_{(r,\theta)} = -r \cos \theta + \sqrt{R^2 - (r \sin \theta)^2}$$

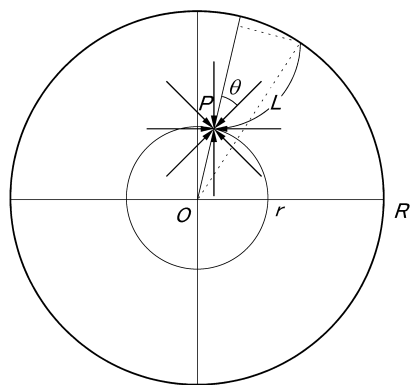


図3. 外部照射式円筒型フォトバイオリアクターにおける拡散モデル. 矢印, 光線.

こうした光強度分布の推算を、光強度と光合成微生物の増殖速度、あるいは有用物質生産速度の関係と組み合わせると、生産性予測を行うことができ、それに基づいてフォトバイオリアクター設計、ならびにフォトバイオペロセス運転の最適化が図られる。

光強度分布の影響

光は光合成微生物の増殖、ならびに有用物質生産に関し、培地に溶解している栄養素と同様に重要な因子である。栄養素の濃度は連続操作によって時間的、ならびに空間的に一定に保持することができるが、光強度は時間的に一定に保持できるものの、空間的に一定にすることはできない。さらに、そうした培養液中の光強度の不均一さは、細胞濃度が高い、または光路長が長い場合に大きくなる。光強度と増殖速度、あるいは物質生産速度の関係は、前述のようにフォトバイオリアクターにおける生産性を予測する際に用いられるが、これを決定する際には、培養液中の光強度分布が変化しないように細胞濃度を一定に保持しつつ培養を行い、測定された速度を培養液中の平均光強度に対して相関づけることが多い。こうした測定では、培養液中に生じる光強度差を小さくするため、細胞濃度を低くするか、光路長を短くした上で測定することが望ましいが、顕著な光強度差がある場合にどのような影響が生じるかについては、ほとんど知られていなかった。そこで筆者らは、平板型フォトバイオリアクターにおいて半連続培養操作を行い、培養液中の光強度分布が *R. capsulatus* の増殖速度に及ぼす影響を検討した^{9,10)}。

図4には平板型フォトバイオリアクターの光路長を20 mm とし、細胞濃度を $0.1, 0.55, 1.0 \text{ mg ml}^{-1}$ として半連続培養を行った際の細胞濃度 (a) と、比増殖速度 (b) の経時変化を示す。本実験の半連続培養操作では、細胞濃度が初期値に対して20%まで増加すると、その増加分に相当する体積の培養液を新鮮な培地に置き換え、細胞濃度を初期値に戻す操作を繰り返した。このとき、フォトバイオリアクター内は窒素ガスにより嫌氣的に保持した。また、培地には窒素源として 7.5 mM 硫酸アンモニウムを加えたRCV培地を用い、光照射はハロゲンランプを用い、培養液中の平均光強度が $0.47, \text{ および } 1.9 \text{ mW cm}^{-2}$ となるよう、細胞濃度に応じて入射光強度を $2.1 - 8.8 \text{ mW cm}^{-2}$ の間で調整した。

図4 (a) では、培養期間中ほぼ一定の増加幅を示した実験に対し白抜きの実験点を、増加幅が漸減した実験に対し黒塗りの実験点をそれぞれ用いた。この図の増加幅に基づいて比増殖速度を算出し、培養時間に対して点綴したのが図4 (b) である。図4 (b) において、白四角の実験

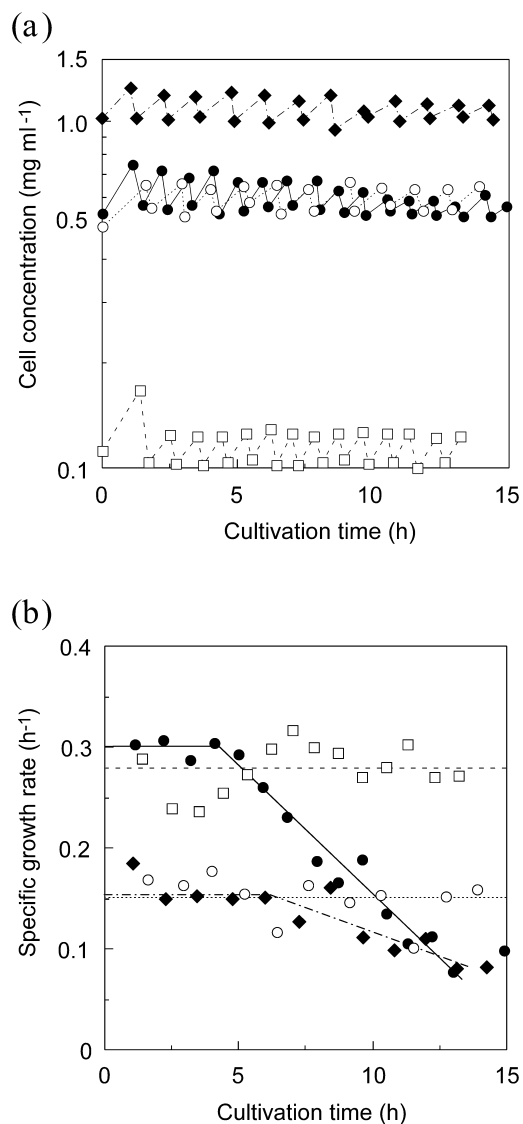


図4. *R. capsulatus*の半連続培養における細胞濃度 (a), および比増殖速度 (b)の経時変化. 光路長: 20 mm. 細胞濃度 (mg ml⁻¹): □, 0.1; ○●, 0.55; ◆, 1.0. 平均光強度 (mW cm⁻²): □●, 1.9; ○◆, 0.47.

点は, 細胞濃度 0.1 mg ml⁻¹ の培養液に入射光強度 3.6 mW cm⁻² で光照射を行った際の比増殖速度を, 黒丸の実験点は, 細胞濃度 0.55 mg ml⁻¹ の培養液に入射光強度 8.8 mW cm⁻² で光照射を行った際の比増殖速度を示す. これら両条件における培養液中の平均光強度は 1.9 mW cm⁻² で等しいが, 白四角の実験では, 比増殖速度がこの微生物株のほぼ最高値である 0.3 h⁻¹ で培養期間中にわたり維持されるのに対し, 黒丸の実験では, 培養開始より 5 h までは 0.3 h⁻¹ で維持されるものの, その後, 急激に 0.08 h⁻¹ まで低下した. 同様に, 白丸と黒菱の実験点は, それぞれ細胞濃度 0.55, および 1.0 mg ml⁻¹ の培養液に入射光強度 2.1, および 3.4 mW cm⁻² で光照射を行った際の比増殖速度を示し, 両条件の平均光強度は 0.47 mW cm⁻²

で等しい. しかし, 白丸の実験では比増殖速度 0.15 h⁻¹ で維持されるのに対し, 黒菱の実験では培養開始より 5 h までは同等の値を示すものの, その後, 急激に低下した. 比増殖速度が 0.3 h⁻¹ で維持された白四角の実験と培養開始 5 h 後から急激に低下した黒丸の実験とで, 透過光強度の入射光強度に対する比を比較すると, 白四角の実験では 3.7 倍であったのに対し, 黒丸の実験では 40 倍と, 大きな違いがあった. 一方, 細胞濃度が 0.55 mg ml⁻¹ で等しい黒丸の実験と白丸の実験とでは, 透過光強度の入射光強度に対する比はともに 40 倍で同じであるが, 黒丸の実験では比増殖速度が途中で急に低下したのに対し, 白丸の実験では, 白四角の実験で得られた半分の値ではあるが, 培養期間中にわたり維持することができた. 以上の結果から, 培養期間中, 比増殖速度を安定して維持できるかどうかは, 透過光強度の入射光強度に対する比の値に依存すること, そして高い比増殖速度ほど, 透過光強度の入射光強度に対する比の値が低い, すなわち培養液中の光強度差が少ない光照射条件を必要とすることが示された. このことは, 光合成微生物の培養を長期間にわたり安定して行うには, こうした光強度分布が光合成微生物に及ぼす影響も加味する必要があることを意味する.

高い比増殖速度を得ようとする際には, 透過光強度の入射光強度に対する比の値を低くするため細胞濃度を下げるか, 透過距離を短くせねばならないのは, 実用上, 不都合である. 著者らは, 比増殖速度の安定性を回復するための手段も見いだした¹¹⁾. ひとつは鉄イオンの添加で, 当時, 培養実験を行っていた学生が, 比増殖速度の低下が見られるはずの条件で予想に反して安定した値を示した際に, フォトバイオリクターの部品のひとつがひどく錆びていたことに気づき, これをきっかけとして見いだした手法である. 図 5 に示すように, いったん比増殖速度が低下した培養液に鉄イオンを初期値の 4 倍濃度となるよう加えると, 比増殖速度は初期値まで回復した. このとき, 鉄イオンは 2 価も 3 価も同等の効果を示した. また, 主光源の反対側から異なるスペクトルの光照射を低強度で行うと, 比増殖速度の低下が緩和されることも見いだした.

これらの結果から, 比増殖速度の低下は酸化還元系か光合成色素に問題が生じていることが予想された. そこで, 0.3 h⁻¹ で比増殖速度を維持することのできた実験と, 途中で低下した実験とで, バクテリオクロロフィル含有率の初期値に対する比の値を経時的に調べた. その結果, この比の値が急速に低下する条件下で比増殖速度の低下が生じたことから, 培養途中で比増殖速度が低下することの直接的な原因は, バクテリオクロロフィルが分解し

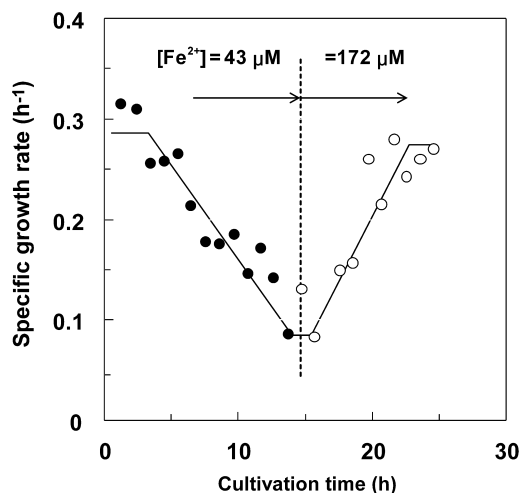


図5. *R. capsulatus*の半連続培養における比増殖速度の回復. 細胞濃度, 0.55 mg ml^{-1} ; 平均光強度, 1.9 mW cm^{-2} .

たためと考えられる. 現在のところ, 培養液中の光強度の差とバクテリオクロフィルの分解との間の作用機序は解明できていないが, 低い光強度下で光合成微生物を培養すると, クロロフィル含有率を高め, その光強度に適応することが報告されている¹²⁾ので, そうした光強度に対する適応反応の関与が予想される.

培養液中の光強度とスペクトルの変化を利用した有用物質生産

緑藻 *Haematococcus pluvialis* は近年, 高い抗酸化作用が注目され, 健康食品としての需要を伸ばしているアスタキサンチンのバイオ生産によく用いられる微生物である. 盛んに増殖する栄養細胞のときには, 緑色, $20 \mu\text{m}$ 程度の涙滴形をしており, 2本の鞭毛によって遊泳する(図6a). 赤色をした同様な形態の細胞がごくまれに観察される(図6b)が, 栄養細胞時にはほとんどアスタキサンチンを蓄積しない. 栄養細胞は栄養素, とりわけ窒素源が枯渇する, あるいは強光に暴露されると, 直径 $50 \mu\text{m}$ 程度の球形の包囊細胞へと変化し, アスタキサンチンを蓄積し始める(図6c). 包囊細胞は増殖も遊泳もしないが, 細胞全体が深赤色となるまでアスタキサンチンを蓄積する(図6d). こうした *H. pluvialis* によりアスタキサンチンを生産する際には, 多くの場合, 増殖期とアスタキサンチン生産期からなる二段階培養法が採られる. 二段階培養法では, 増殖期からアスタキサンチン生産期への移行を速やかに行うことが, 生産を効率的に行うために重要である.

著者らは近年, 紫色から赤色までの各色を取り揃えるようになった発光ダイオードを光源として用い, *H. pluvialis* によるアスタキサンチン生産に及ぼす照射光波

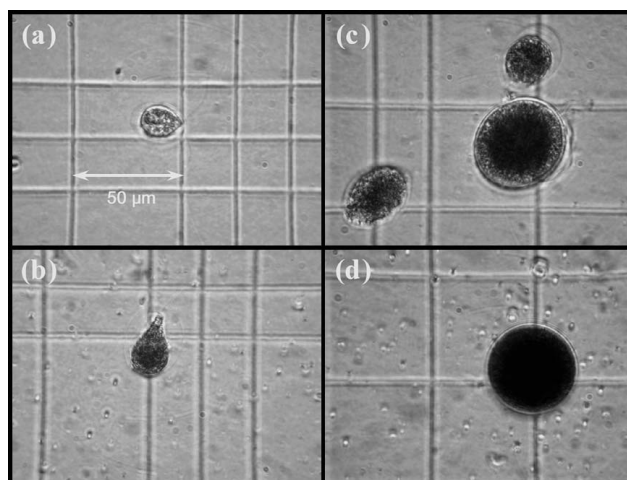


図6. 緑藻 *H. pluvialis* の栄養細胞 (a, b) と包囊細胞 (c, d)

長の影響を検討してきた¹³⁻¹⁷⁾. その結果, 赤色などの長波長の光を比較的強度で照射すると栄養細胞の増殖が促進し, 一方, 青色などの短波長の光を高強度で照射すると包囊化が進み, アスタキサンチン生産が促進することを見いだした. この知見に加え, 図7(a)に示すように, *H. pluvialis* の包囊細胞の培養液を透過した光は, 青色域が少なく, 赤色域が多いスペクトルとなることに注目し, 培養槽を前槽と後槽に分け, 後槽で前槽からの透過光を利用して栄養細胞の増殖を行い, 前槽へ移動することによってアスタキサンチン生産を誘導するといった二段階サイクリック培養法と呼ぶ手法を提案した¹⁸⁾. この手法では, アスタキサンチン生産を誘導する際に光強度を強めるのみならず, 増殖期および生産期にそれぞれ適したスペクトルの光照射を行える利点がある. また, 培養液を透過する光を有効利用することにより, 受光面積あたりの生産性にも有益である.

こうした二段階サイクリック培養操作は繰り返して行うことが可能で, 1000時間にわたる培養期間中, 細胞増殖, ならびにアスタキサンチン生産を安定して行えることが確認された. また, このときのアスタキサンチン生産性を回分式に二段階培養を行った際と比較すると, 約1.6倍程度向上する結果が得られた. こうした二段階サイクリック培養法は, *H. pluvialis* によるアスタキサンチン生産のみならず, 操作因子として光を利用し, 誘導操作を伴う他の二次代謝産物生産にも好適であると思われる.

おわりに

本研究では, 光強度分布とスペクトル変化の定量化を起点として, 光強度分布の影響, 照射光波長の影響, 間

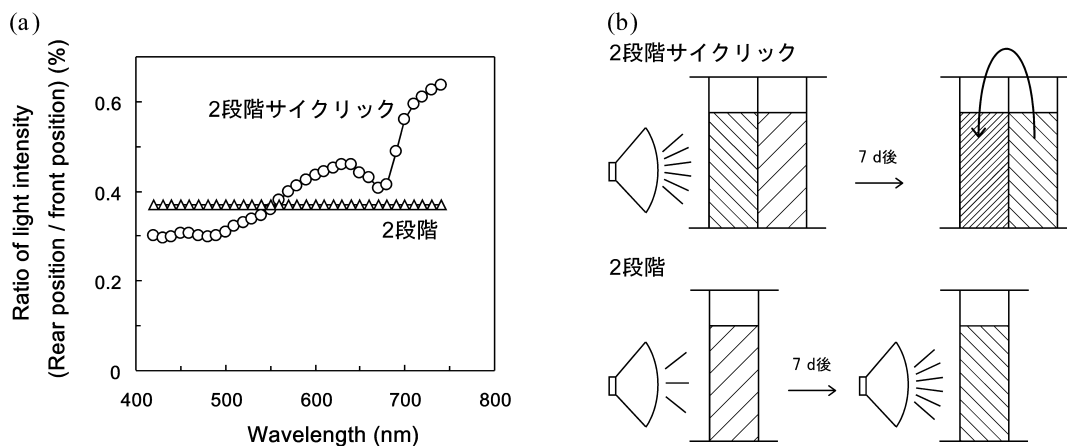


図7. *H. pluvialis* 包囊細胞培養液を透過した光のスペクトル (推算値) (a) と2段階サイクリック培養法の概略図 (b)

欠的光照射の影響^{19,20)}といった光合成微生物の光に対する応答特性を検討し、それらに基づく新規培養法を提案してきた。光合成微生物によるバイオ生産では、CO₂を原料として高付加価値物質を生産できる²¹⁾ことが最大の特徴である。地球温暖化に対する懸念がますます増大しつつある中、こうした特徴から光合成微生物によるバイオ生産は、今後大きな役割を担うことが期待される。化石燃料から用役を得る際には、短時間に多量のCO₂が排出される。これを吸収し固定するには、速度に優れた物理的ないし化学的方法が採られるであろう。しかしこれらの方法は吸収、固定の過程で有用物質を生産しないので大きな経済的負担を伴う。光合成微生物によるバイオ生産は、こうした経済的負担の緩和を図る際に有効な手段となると思われる。

本研究は、大阪市立大学大学院 工学研究科 生物応用化学専攻に在学中より今日に至るまで行ってまいりました。この間、ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました大阪市立大学大学院 工学研究科 大嶋 寛 先生、神戸大学大学院 工学研究科 加藤滋雄先生に心よりお礼申し上げます。また、本研究を行うにあたりご助力いただきました京都女子大学 短期大学部 高桑 進 先生、大阪市立大学大学院 工学研究科 東 雅之 先生、同 五十嵐 幸一 先生、ならびに大阪市立大学大学院 工学研究科 生物応用化学専攻 生物化学工学研究室と神戸大学大学院 工学研究科 応用化学専攻 生物プロセス工学研究室の学生諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Rose, H. E. and Lloyd, H. B.: *J. Soc. Chem. Ind.*, **65**, 52–58 (1946).
- 2) Katsuda, T., Fujii, N., Takata, N., Ooshima, H., and Katoh, S.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **35**, 428–435 (2002).
- 3) 勝田知尚, 加藤滋雄: 神戸大学 VBL 年報, **6**, 185–190 (2001).
- 4) Ooshima, H., Takakuwa, S., Katsuda, T., Okuda, M.,

- Shirasawa, T., Azuma, M., and Kato, J.: *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 470–475 (1998).
- 5) Katsuda, T., Azuma, M., Kato, J., Takakuwa, S., and Ooshima, H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 248–253 (2000).
- 6) Katsuda, T., Ooshima, H., Azuma, M., and Kato, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 220–226 (2006).
- 7) Matsuura, T. and Smith, J. M.: *AIChE J.*, **16**, 321–324 (1970).
- 8) Katsuda, T., Arimoto, T., Igarashi, K., Azuma, M., Kato, J., Takakuwa, S., and Ooshima, H.: *Biochem. Eng. J.*, **5**, 157–164 (2000).
- 9) Katsuda, T., Yegani, R., Fujii, N., Igarashi, K., Yoshimura, S., and Katoh, S.: *Biotechnol. Prog.*, **20**, 998–1000 (2004).
- 10) Yegani, R., Yoshimura, S., Katsuda, T., and Katoh, S.: *Iranian J. Chem. Eng.*, **2**, 15–22 (2005).
- 11) Yegani, R., Yoshimura, S., Moriya, K., Katsuda, T., Katoh, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 672–677 (2005).
- 12) Nakada, E., Nishikata, S., Asada, Y., and Miyake, J.: *J. Mar. Biotechnol.*, **4**, 38–42 (1996).
- 13) Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K., and Katoh, S.: *Enzyme Microb. Technol.*, **35**, 81–86 (2004).
- 14) Katoh, S., Lababpour, A., and Katsuda, T.: *Chem. Eng. Trans.*, **3**, 1671–1675 (2003).
- 15) Lababpour, A., Hada, K., Shimahara, K., Katsuda, T., and Katoh, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 452–456 (2004).
- 16) Lababpour, A., Shimahara, K., Hada, K., Kyoui, Y., Katsuda, T., and Katoh, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 339–342 (2004).
- 17) Yamamoto, H., Hada, K., Yamaji, H., Katsuda, T., Ohno, H., and Fukuda, H.: *Biochem. Eng. J.*, **32**, 149–156 (2006).
- 18) Yoshimura, S., Ranjbar, R., Inoue, R., Katsuda, T., and Katoh, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 97–101 (2006).
- 19) Katsuda, T., Shimahara, K., Shiraishi, H., Yamagami, K., Ranjbar, R., and Katoh, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 442–446 (2006).
- 20) Katsuda, T., Shiraishi, H., Ishizu, N., Ranjbar, R., and Katoh, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 216–220 (2008).
- 21) Ranjbar, R., Inoue, R., Shiraishi, H., Katsuda, T., and Katoh, S.: *Biochem. Eng. J.*, in press (2007). DOI: 10.1016/j.bej.2007.11.010.