総説

酵素膜について

功 刀 滋

1. はじめに

酵素膜(Enzyme membrane)とは、何らかの方法によって酵素を膜状の担体に“固定化”したものを指している。酵素を種々の不溶性の担体に固定化しその触媒としての利用性を高めようという、いわゆる固定化酵素の技術はもう三十年以上の歴史を持ち^{1~3)}、1960年代の終りからは工業的な成功をおさめたものであるが、膜状のものといってもその範疇を出るものではない。しかし膜状のものはそれ自身の性質として透過・分離という面をあわせもっているのも、それらと酵素による触媒反応とがカップリングすることになる。生体内において多くの酵素が膜酵素として存在し、高度な選択的・能動的輸送にかかわっていることを考えると、そのモデルとしての研究に興味がひかれる。また固定化酵素の実用化においては物質の分離プロセスがなお大きな問題となるが、反応と分離の一体化という点からも注目されるであろう。

酵素膜の研究自体でもざっと二十年の歴史があり⁴⁾、その成果の中でも重要なものの一つにいわゆるバイオセンサーの技術があると思われるが、この点に関しては既に多くの優れた総説があるので^{5~7)}、ここでは触れない。また酵素膜と題したが、酵素だけに限らず細胞やオルガネラなどを含む系についても若干紹介し、さらに膜を使った広義の酵素反応器(メンブレンアクター)についても触れるつもりである⁸⁾。

2. 膜の素材と製法

原理的には造膜性の材料であれば酵素固定化の対象とすることができるが、調製の難易や膜生成中の酵素の失活、生成膜からの酵素の脱離や膜中への基質の拡散など多くの因子によって素材は限定される。通常、固定化酵

素の調製法は、共有結合法、包括法、吸着法および架橋法などに分類されるが¹⁾、膜状にする場合でもこれらの分類はそのまま適用されよう。また二つ以上の方法を組み合わせることもある。

以下に、使用する素材別にいくつかの研究例を紹介する。

2.1 コロジオン

古くから知られているこの膜素材の上に酵素を吸着させ、その後ビスジアゾベンゼンジスルホン酸などで架橋させる方法が初期の研究に多く用いられた。とくに生体膜モデルとしての観点から、Weizmann研究所のグループが、パバインやアルカリホスファターゼを固定化した膜について理論的な解析をも含めた検討を行なっている^{9~12)}。

2.2 セルロース系

同じく多糖類でも、セルロース紙やカルボキシメチルセルロース紙、ジエチルアミノエチルセルロース紙、セロハンなどにパーオキシダーゼ、ラクターゼ、ペニシリンアミダーゼなどを固定化した例が報告されており^{13~19)}、膜とは言えないまでもその芳芽的なものと言えるであろう。またセロハン系の透析膜の片側にウレアーゼなどを共有結合させ尿素分解型の透析器の開発をめざした研究もある²⁰⁾。

2.3 コラーゲン

コラーゲンは懸濁液を展開して乾固させれば膜化できるが、既にできたコラーゲン膜に酵素溶液を浸潤させることによって酵素膜とすることができる。またコラーゲンと酵素タンパク質との間でイオン結合や水素結合などによって不溶性のコンプレックスを形成させ、それを展開・乾固して膜化させることもできる^{21,22)}。これらをさらにグルタルアルデヒドなどで架橋することもある^{23,24)}。高分子量のコラーゲンからなる膜を酸メチル化し、アジド化の後に酵素を共有結合させる方法もとられている^{25,26)}。鈴木グループは電気泳動の原理を使い、酵素溶液を含むコラーゲン懸濁液から電気化学的に酵素コラーゲン膜を作成する方法を開発し²⁷⁾、多数の酵素系に適用している^{5~7,28)}。この方法では酵素だけでなく微生物

Enzyme Membranes for Bioreactors

SHIGERU KUNUGI

Department of Applied Chemistry, Fukui University

福井大学工学部応用反応化学科 助教授(工博)

菌体なども固定化することができる。

2.4 合成ポリマー

固定化酵素の先駆として Grubhofer らがポリアミノスチレンのジアゾ化によりペプシンなどを固定化した例や²⁹⁾、Weizmann 研のグループがマレイン酸-エチレン共重合体にトリプシンを結合させてゲル粒状物を得た研究³⁰⁾をはじめとして、多くの合成ポリマーが固定化酵素の担体として使われてきた。包括法による固定化材料として最もよく使われているポリアクリルアミドゲルでも膜状に成型することができるが、膜やシート状として使われるものとしてはナイロンとポリビニルアルコール(PVA)が中心であろう。

Hornby のグループは管状や膜状の6-ナイロンのアミノ基やカルボキシル基を利用して、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)や乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、グルコースオキシダーゼ(GOD)、ウレアーゼなどを固定化し、臨床用自動分析機への応用を試みた^{31~33)}。三山らは側鎖にジメチルアミノ基を有するナイロン6を四級化して得たカチオン性のナイロンフィルムに、イオン結合によりウレアーゼ、ウリカーゼを固定化し、四級ポリマーの特性が酵素活性に反映されることを示している³⁴⁾。

PVA からは紫外線やγ線の照射による架橋、あるいは凍結乾燥などによって膜状の固定化酵素を得ることができる^{35~38)}。また、スチルバゾリウム残基などの光架橋性基を導入した PVA が調製され(図1)、インペルターゼやカタラーゼのほか種々の酵素を固定化した膜がつ

図1 スチルバゾリウム基を有する PVA の光架橋⁴¹⁾

くられている^{39~42)}。他に、PVAとエチレンの共重合体の膜をアミノアセタール化した後酵素を固定化し、透過反応器に応用しようという試みも報告されている⁴³⁾。

2.5 反応性プレポリマー

福井らのグループは、固定化酵素の調製時にモノマーを重合する方法では、モノマーや開始剤による酵素への悪影響を伴うことなどを解決するために、ポリエーテル-ウレタン系⁴⁴⁾および光架橋性のポリエーテル-アク

図2 ウレタン系(PU)および光架橋性(PEGM, ENT, ENTP)プレポリマーの構造⁴⁶⁾

リル系⁴⁵⁾のプレポリマーによる固定化法を開発した(図2)⁴⁶⁾。これらはいずれも膜状として成型される。これらによる酵素膜などの透過特性を検討した例はまだ少ないが⁴⁷⁾、応用性の高い素材であると思われる。この場合にはプレポリマー中のエーテル基の種類や長さなどを変えることにより、生成する酵素膜の性質をコントロールすることができ、またオルガネラや細胞を固定化することも可能である。図3にその一例を示す⁴⁸⁾。

図3 光架橋性プレポリマーによって固定化された *Arthrobacter simplex* の示すไฮドロコルチゾン転換活性に与えるプレポリマー中の ENTP-2000/ENT-4000 混合率の影響⁴⁸⁾

ウレタン系プレポリマー法の一つとして、イソシアネート基を適当なブロック剤で保護しその反応性や発泡性をコントロールする方法も考えられている⁴⁹⁾。

2.7 限外濾過 (UF) 膜

高性能の UF 膜が入手できるようになっているが、こ

図4 平膜型UF膜リアクターの一例⁶²⁾
セルラーゼ等によるセルロースの分解システム

図5 ホローファイバー型膜リアクター^{61-b)}

れらを使って、例えばUF膜上に高分子化血清アルブミンと共に酸性ホスファターゼを積層して膜を調製する方法がある⁶⁰⁾。他の方法でもよく、濾過プロセスからみれば好ましくない濃度極値を利用して支持層(UF膜)の上にタンパク質の膜を形成させるわけである。UF膜の特性をさらに生かしたものとして、膜で区切られた溶液の中に可溶性の酵素を“閉じ込める”という考えや、UF膜の多孔性の支持層へ酵素溶液を含浸させるやり方がある。膜の形態には平膜型のもの(図4)とホローファイバー型(図5)のものがある。Ronyによって提唱されたこの方法は⁵¹⁾、以来多くの実験的、理論的研究が積み重ねられてきた^{52, 53)}。“固定化”された酵素は多岐にわたり、アルカリホスファターゼ⁵⁴⁾、ADH⁵⁵⁾、 α -ガラクトシダーゼ、インペルターゼ^{56, 57)}、 β -グルコシダーゼ⁵⁸⁾、グルコースイソメラーゼ⁵⁹⁾、アミログリコシダーゼ、ウレアーゼ⁶¹⁾、セルラーゼ⁶²⁾等々である。この方法では一切の化学的な処理が不要であり、酵素だけでなく酵母や大腸菌などの菌体を閉じ込めることもできる⁶³⁻⁶⁵⁾。従来型の醗酵槽と濾液のサーキュレーターとを膜を介して結びつけることによる連続醗酵や⁶⁶⁾、細胞培養系との組み合わせによる人工臓器の開発など⁶⁷⁻⁶⁹⁾より広範囲な応用が考えられている。

2.8 高分子化補酵素-補酵素の固定化

多くの酵素はその触媒能力の発現に補欠分子(補酵素)を必要とするが、固定化酵素ではその酵素上への着脱や再生が問題となる。そこで酵素だけでなく補酵素をも固定化することが考えられた^{70, 71)}。酵素膜でも上記のUF膜リアクターを含めて事情は同じであり、そのために多くの高分子化された補酵素(NAD^+ や ATP^*)が

*1 ATPは本来基質としてとり扱うもので、補酵素ではないが、再生システムまで含めて考えると、広い意味で“補欠”分子として考えることができる。

調製されている。

高分子化の方法としてはポリエチレンジイミンやポリリジンなどのアミノ基を含む高分子にサクシニル化NAD⁺を結合させる^{71,72)}ほか、アルギン酸やデキストリンなどの多糖類系^{74~79)}、アクリル系のコポリマー^{80~83)}、ポリエチレングリコール^{84,85)}などがある。山崎らは図6のような三種のNAD誘導体(1, 2, 3)と7種のモノマー(A~MA)を組み合わせて21種の高分子化NADを合成し、スパーサーやモノマーの長さや疎水性、イオン性などと補酵素活性との関係を明らかにしている^{88-a)}。

- A : R₁=H, R₂=NH₂
 H : R₁=H, R₂=NHCH₂CH₂OH
 E : R₁=H, R₂=NHCH₂CH₃
 D : R₁=H, R₂=N(CH₂CH₃)₂
 M : R₁=H, R₂=N(CH₃)₂
 AC : R₁=H, R₂=OH
 MA : R₁=CH₃, R₂=NH(CH₂)₆NH₃⁺·Cl⁻

図 6 ^{88-a)}

(a)

(b)

図7 高分子化NAD(a)あるいは脂質コーティング((b), 実線の円)によるマイクロカプセル補酵素再生システム^{87,89)}

2.9 マイクロカプセル

UF膜リアクターで示されたと同様の考えでマイクロカプセル(MC)の半透性を使う方法がある。ChangらはコロジオンよりなるMCの中にヘキソキナーゼ(HK)とピルビン酸キナーゼとを封入し、ATPおよびADPを再生させることに成功した⁸⁶⁾。またADHとリンゴ酸デヒドロゲナーゼ系に、デキストランによって高分子化したNADを組み入れることにより、NADの連続再生を行った(図7(a))⁸⁷⁾。さらにナイロン膜製のMCの表面を脂質で覆うことにより⁸⁸⁾、高分子化しなくても補酵素(NADPH)を多酵素系とともに封じ込めうることを見出し連続再生系を開発している(図7(b))⁸⁹⁾。

3. 酵素膜の特性とその制御

3.1 均一膜

前述のように酵素膜では酵素反応と透過(拡散)とがカップリングしており、この様な系に対する理論的取り扱いはい前から行われている。

いま酵素膜を挟んで二つの溶液をおいた槽を考える(図8)。膜内の一点における基質(S)および生成物(P)の濃度変化は、 D_S 、 D_P をそれぞれSとPの拡散係数、 v_E を酵素反応の速度とすると(x :膜厚方向の座標)

$$\frac{\partial S}{\partial t} = D_S \cdot \left(\frac{\partial^2 S}{\partial x^2} \right) - v_E \quad (1)$$

$$\frac{\partial P}{\partial t} = D_P \cdot \left(\frac{\partial^2 P}{\partial x^2} \right) + v_E \quad (2)$$

と表現される。膜内での定常状態を仮定すれば $\partial S / \partial t = \partial P / \partial t = 0$ であるから

$$D_S \left(\frac{\partial^2 S}{\partial x^2} \right) = v_E \quad (3)$$

$$D_P \left(\frac{\partial^2 P}{\partial x^2} \right) = -v_E \quad (4)$$

が成立する。

図 8

v_E の形と膜-溶液界面での条件(境界条件)が問題になるが、最も単純な酵素反応

を考えると(K_m は左向きを正とした時の平衡定数)

$$v_E = k_{cat} \cdot E \cdot S / (K_m + S) \quad (6)$$

(E , S はこの場合それぞれの濃度)となるので, v_E は S に関して双曲線関数となる。ただし S が K_m に対して非常に小さい場合には

$$v_E = (k_{cat} / K_m) \cdot E \cdot S \quad (7)$$

となり, v_E は S に比例する。簡単のためこのような系でしかも拡散層の影響を考えないとすると,

[境界条件 I] 両側の溶液中に P がなく, 片側(L)のみ

に S が存在する場合 ($S_L = S$, $S_R = 0$,

$$P_L = P_R = 0)$$

には膜内の S と P の分布は図 9 (a) のようになり¹⁰⁾,

[境界条件 II] 両側の溶液中に S が同一濃度で存在し,

P はともに 0 である場合 ($S_L = S_R = S$,

$$P_L = P_R = 0)$$

には図 9 (b) のようになる。

しかし実際には v_E は式 (6) のように単純でないことが多く, たとえば pH や P の濃度に影響をうける。一例として, k_{cat}/K_m が

$$k_{cat}/K_m = (k_{cat}/K_m)_0 / (1 + H^+ / K_1 + K_2 / H^+) \quad (8)$$

のようにあらわされる場合(ごくふつうのベル型の pH 依存性を示す)を考える。反応の進行に伴って H^+ が生成されるような酵素に対し, 境界条件 I のもとで L 側の溶液の pH を pK_2 より高く設定すると振動現象が観測される。図 10 はパパインによるアルギニンエステルの加水分解反応での実例であるが⁹⁰⁾, このような結果はシミュレーションによっても裏づけられている⁹¹⁾。また GOD

図 10 パパイン膜において観測された振動⁹⁰⁾

(a)

(b)

図 9 均一膜内の S , P の分布¹⁰⁾

(a) 境界条件 I; (b) 境界条件 II, 図中の数字は $\alpha = \{(k_{cat}/K_m) \cdot E_0 / D_S\}^{1/2}$ の値

とウレアーゼの組み合わせ(反応とともに前者はpHを下げ後者は上げる)でもはっきりした空間的秩序化が見られたという記載がある⁹²⁾。過剰な基質による阻害現象や生成物による阻害がある場合には v_E はそれぞれ

$$v_E = k_{cat} \cdot E \cdot S / (K_m + S + K_{SI} \cdot S^2) \quad (9)$$

$$v_E = k_{cat} \cdot E \cdot S / (K_m(1 + P/K_{PI}) + S) \quad (10)$$

と書け、これらの場合もまた特異な現象が期待される。

3.2 異方性の影響

膜内における酵素の分布もまた大きな影響を与える。単純な例として、膜内の酵素濃度が x に比例して増加する($E = \alpha \cdot x$, α は比例定数)場合を考えると式(7)の条件下では、 $v_E = \alpha' \cdot S \cdot x$ である。境界条件ⅡのもとではL側からR側へ見かけ上Pの“汲み上げ”がおり、その効率(γ : |膜→RへのPの流れ| / |膜→LへのPの流れ|)は D_S と膜厚(l)をパラメーターとして図11のような変化をする⁹³⁾。一方境界条件Ⅰのもとでは、膜の方向が問題となるが、膜のS, Pの分布は図12のようになり、R側へのPの輸送効率(F_{Pd}/F_{Su})は酵素高濃度側がR側を向いている方が高くなる(表1)⁹⁴⁾。

酵素膜を作成する場合には種々の因子から生成した膜内部の酵素分布は均一とならないことが多いので、このような異方性の効果は興味深いのであるが^{95~97)}、生体膜では多くの点において非対称性がみられることが強く指摘されてきており⁹⁸⁾、そのモデル化という点からも重要なことである⁹⁹⁾。中村らは膜内でのイオン性物質の分布を電場によりコントロールする方法を開発し¹⁰⁰⁾、それを非対称酵素膜の調製に応用して上の理論的予測に基本的には類似した現象を観測している¹⁰¹⁾。

図11 Pの汲み上げ効率の変化⁹³⁾

実線 $l = 0.01$ cm, 点線 $l = 0.1$ cm
 D_S ; A, 5×10^{-7} ; B, 10^{-6} ; C, 2×10^{-6} ;
 D, 5×10^{-6} ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
 $K = (k_{cat} / K_m) \cdot \alpha$

3.3 多酵素系

複数の酵素を固定化し、共役反応や連続反応に対する触媒能を上げようという試みが早くからあり¹⁰²⁾、2.7~2.9でもその一部を紹介したが、膜の場合に複数の酵素を固定化したものは、生体膜との類似性においても興味深い。BrounらはSを再生する二段の反応系($S \xrightarrow{E_1} P$

図12 膜内のS(a), P(b)の分布⁹⁴⁾

A, B, Cは表1の各行に対応

表1 膜内の酵素分布の影響⁹⁴⁾

膜内の 酵素濃度	(膜→RへのPの流れ) (L→膜へのSの流れ)	(膜→RへのSの流れ) (L→膜へのSの流れ)
均一膜(A)	0.252	0.032
L側が高い(B)	0.222	0.068
R側が高い(C)	0.385	0.107

図13 二酵素膜でのS(実線)とP(破線)の分布¹⁰³⁾

E_1 が $0 \sim e$ の間に, E_2 が $e \sim 2e$ の間にある。

A, 初期状態($S_L = S_R$) ; B, 定常状態($S_L < S_R$)

— $E_2 \rightarrow S$)を触媒する二つの酵素を均一に分布させた膜と、別々に積層させた膜について解析を行い、後者では図13のような膜内での濃度パターンが発生することを示し、またHKとホスファターゼからなる積層膜をグルコースのみを透過させる膜で覆うことによって、グルコースを濃縮する膜系ができると報告している¹⁰³⁾。さらに二つの酵素(たとえばLDHとADH)に加えて前述の高分子化NADをも膜中に固定化することにより、均一溶液よりも効率のよいNAD再生系をつくった例も報告されている¹⁰⁴⁾。

3.4 複合膜系における制御

酵素膜と別の性質の膜を組み合わせることによって、膜の透過性を制御しようという試みがある。古くは陽イオン交換膜と陰イオン交換膜に挟まれ、バブリン溶液で基質存在下に起電力を測定した例がある¹⁰⁵⁾。Tannyらは多孔性膜の一方をアミノ化ポリプロモエチルフェニレンオキシドでコートしてカチオン膜とし、他方にゼラチン架橋法によってウレアーゼを固定化した膜により、尿素の透過の促進がみられること、それは生成物であるカルバメートアニオンがカチオン膜中の Cl^- と置きかわる

図14 アニオン交換膜とウレアーゼ膜の複合膜内で考えられる尿素および生成物イオンの動き¹⁰⁶⁾ 図15 グルコース応答膜の概念図^{107,108)}

ことによっていることを示した(図14)¹⁰⁶⁾。また石原らは GOD を固定化したアクリルアミド膜とニコチンアミド基を持ったコポリマー膜(酸化還元膜)¹⁰⁷⁾あるいはポリアミン膜¹⁰⁸⁾とを組み合わせることにより, GOD の生成物によってひきおこされる膜内の酸化還元反応あるいは酸塩基反応を介してグルコースに反応したインシュリンの透過性の変化をもたらすことができると報告している(図15)。

3.5 外部因子による制御

膜系の特性を外部から制御できれば非常に有用である。外部因子としては光, 電場などが考えられた。軽部らは光制御系として, コラーゲンなどの酵素膜にスピロピラン化合物を導入したものを調製し, 光照射による異性化反応を利用して酵素膜の性質を変えた^{109, 110)}。図16はコラーゲンの方にスピロピランを結合した場合である。さらに彼らはコラーゲン膜中に液晶物質(4-メトキシベンジリデン-4'-n-ブチルアニリン)を導入することにより, 膜中でのリパーゼの活性を電場によって変化させることを示している¹¹¹⁾。

図16 スピロピラン導入ウレアーゼコラーゲン膜の活性の官能基含量(a)および pH (b) 依存性¹¹¹⁾

○, 暗所; ●, 可視光照射

Vallinらはアルブミンとの架橋によってナイロングレーティングの上に作成したウレアーゼ膜の活性が, 電流によって変化することを明らかにしたが, この場合には膜内での pH 値が電流によって変化するのが原因であろう¹¹²⁾。

これらの他に, 多孔性ポリ塩化ビニル膜上に固定化された GOD の活性が, 膜に与えられる応力によって変化することや¹¹³⁾, 磁場によるコントロールの試みも報告されている²⁸⁾。

4. おわりに

以上, 簡単に酵素膜についての研究をまとめてみた。リアクターへの応用は現在ではむしろ UF 膜などの系への動向が強いように思われるが, 薄膜化技術や新しい膜素材との結合とともに, 膜内でのタンパク分子の配向・分布・高次構造化などを高度にコントロールすることができるになれば, 酵素膜の新しい展開となるであろう。いわゆる分子素子, バイオ素子と呼ばれるもの^{114~116)}もその一つであると考えられる。

最後に, 本稿を書くにあたって御助言いただきました, 福井大学中村良治教授, 京都大学伊勢典夫教授, 北野博巳博士に感謝します。

文 献

- 1) 千畑一郎編, “固定化酵素”, 講談社, 1975
- 2) K. Mosbach 編, “Methods in Enzymology, Vol. 44; Immobilized Enzyme”, Academic Press, 1976
- 3) 福井三郎他編, “酵素工学”, 東京化学同人, 1981
- 4) R. Goldman, H. I. Silman, S. R. Caplan, O. Kedem, E. Katchalski, *Science*, **150**, 758 (1965)
- 5) 鈴木周一, 軽部征夫, 膜, **6**, 148 (1981)
- 6) 軽部征夫, 膜, **7**, 332 (1982)
- 7) a, 相澤益男, 化学総説, **45**, 148 (1984); b, 軽部征夫, 同誌, **45**, 156 (1984)
- 8) a, 前田英勝, 膜, **9**, 14 (1984); b, 古崎新太郎, 同誌, **9**, 93 (1984); c, 前田英勝, 化学総説, **45**, 165 (1984)
- 9) R. Goldman, O. Kedem, H. I. Silman, S. R. Caplan, E. Katchalski, *Biochemistry*, **7**, 486 (1968)
- 10) R. Goldman, O. Kedem, E. Katchalski, *ibid.*, **7**, 4518 (1968)
- 11) R. Goldman, O. Kedem, E. Katchalski, *ibid.*, **10**, 165 (1971)
- 12) J. A. DeSimone, S. R. Caplan, *ibid.*, **12**, 3032 (1973)
- 13) H. H. Weetall, N. Weliky, *Anal. Biochem.*, **14**, 160 (1966)
- 14) G. Kay, M. D. Lilly, A. K. Sharp, R. J. H. Wilson, *Nature*, **217**, 641 (1968)
- 15) E. Sélegny, G. Broun, *J. Chim. Phys.*, **66**, 391 (1969)
- 16) a, D. A. Self, G. Kay, M. D. Lilly, *Biotech. Bioeng.*, **11**, 337 (1969); b, R. J. H. Wilson, M. D. Lilly, *ibid.*, **11**, 349 (1969); A. K. Sharp, G. Kay, M. D. Lilly, *ibid.*, **11**, 363 (1969)
- 17) M. D. Lilly, *ibid.*, **13**, 589 (1971)
- 18) G. Broun, D. Thomas, G. Gellf, D. Domurado, A. M. Berjonneau, C. Guillon, *ibid.*,

- 15, 359 (1973)
- 19) G. Broun, E. Sélegny, S. Avrameas, D. Thomas, *Biochim. Biophys. Acta*, **185**, 260 (1969)
- 20) a, 西村哲夫, 三田共栄, 功刀 滋, 伊勢典夫, 日化 38 秋季年会(名古屋)予稿集, 1252 (1978); b, 伊勢典夫, “バイオリアクターサブシステムの研究開発報告書”, 東京大学他, 1979, p. 56
- 21) K. Venkatasubramanian, W. R. Vieth, S. S. Wang, *J. Ferment. Technol.*, **50**, 600 (1972)
- 22) S. S. Wang, W. R. Vieth, *Biotech. Bioeng.*, **15**, 93 (1973)
- 23) F. Hsieh, B. Davidson, W. R. Vieth, *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **26**, 631 (1976)
- 24) S. R. Jefferies, J. L. Gutmann, *Biotech. Bioeng.*, **24**, 1327 (1982)
- 25) P. R. Coulet, J. H. Julliard, D. C. Gautheron, *ibid.*, **16**, 1055 (1974)
- 26) F. Paul, P. R. Coulet, D. C. Gautheron, J. Engasser, *ibid.*, **20**, 1785 (1978)
- 27) I. Karube, S. Suzuki, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **47**, 51 (1972)
- 28) 鈴木周一, 膜, **2**, 373 (1977)
- 29) N. Grubhofer, L. Schleith, *Naturwiss.*, **40**, 508 (1953)
- 30) L. Goldstein, Y. Levin, E. Katchalski, *Biochemistry*, **3**, 1913 (1964)
- 31) W. E. Hornby, H. Fillipuson, *Biochim. Biophys. Acta*, **220**, 343 (1970)
- 32) W. E. Hornby, D. J. Inman, A. McDonald, *FEBS Lett.*, **23**, 114 (1972)
- 33) D. J. Inman, W. E. Hornby, *Biochem. J.*, **129**, 255 (1972)
- 34) H. Miyama, T. Kobayashi, Y. Nosaka, *Biotech. Bioeng.*, **26**, 1390 (1984)
- 35) W. J. Blaedel, T. R. Kissel, R. C. Boguslaski, *Anal. Chem.*, **44**, 2030 (1972)
- 36) H. Maeda, H. Suzuki, A. Yamaguchi, *Biotech. Bioeng.*, **15**, 603 (1973)
- 37) K. Imai, T. Shiomi, K. Sato, A. Fujishima, *ibid.*, **25**, 613 (1983)
- 38) 南部昌生, 高分子加工, **32**, 523 (1983)
- 39) K. Ichimura, S. Watanabe, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, **18**, 891 (1980)
- 40) 上野勝彦, 市村国宏, 白木 勝, 津田圭四郎, 日化誌, **1984**, 378
- 41) K. Ichimura, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, **22**, 2817 (1984)
- 42) G. Manecke, W. Beier, *Angew. Makromol. Chem.*, **113**, 179 (1983)
- 43) a, 内田孝三, 塩見友雄, 今井清和, 日化 46 秋季年会(新潟), (1982)
b, 宮 正光他, 高分子学会北陸支部第 33 回研究発表講演会(金沢), (1984)
- 44) S. Fukushima, T. Nagai, K. Fujita, A. Tanaka, S. Fukui, *Biotech. Bioeng.*, **20**, 1465 (1978)
- 45) S. Fukui, A. Tanaka, T. Iida, E. Hasegawa, *FEBS Lett.*, **66**, 179 (1976)
- 46) S. Fukui, A. Tanaka, *Adv. Biochem. Engin. Biotech.*, **29**, 1 (1984)
- 47) E. Sada, S. Katoh, M. Terashima, *Biotech. Bioeng.*, **25**, 317 (1983)
- 48) K. Sonomoto, A. Tanaka, T. Omata, T. Yamane, S. Fukui, *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **6**, 325 (1979)
- 49) 功刀 滋, 中村良治, 北野博巳, 高分子学会北陸支部第 33 回研究発表講演会(金沢), (1984)
- 50) G. Greco Jr., D. Albanesi, M. Cantarella, V. Scardi, *Biotech. Bioeng.*, **22**, 215 (1980)
- 51) a, P. R. Rony, *ibid.*, **13**, 431 (1971); b, P. R. Rony, *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 8247 (1972)
- 52) R. R. Chambers, W. Cohen, W. H. Baricos, 文献 2) の pp. 291
- 53) H. Kitano, N. Ise, *Trends in Biotech.*, **2**, 5 (1984)
- 54) J. C. Davis, *Biotech. Bioeng.*, **16**, 1113 (1974)
- 55) G. J. Fink, V. W. Rodwell, *ibid.*, **17**, 1029 (1975)
- 56) R. A. Korus, A. C. Olson, *ibid.*, **19**, 1 (1977)
- 57) R. W. Silman, L. T. Black, J. E. McGhee, E. B. Ragley, *ibid.*, **22**, 533 (1980)
- 58) D. B. Van Dongen, D. O. Cooney, *ibid.*, **19**, 1253 (1977)
- 59) R. A. Korus, A. C. Olson, *J. Food. Science*, **42**, 258 (1977)
- 60) J. M. Engasser, J. Caumon, A. Marc, *Chem. Engin. Sci.*, **35**, 99 (1980)
- 61) a, H. Kitano, S. Yoshijima, S. Hotogi, N. Ise, *Biotech. Bioeng.*, **22**, 2633 (1980); b, H. Kitano, S. Yoshijima, N. Ise, *ibid.*, **22**, 2643 (1980)
- 62) I. Ohlson, G. Trägårdh, B. H.-Hägerdal, *ibid.*, **26**, 647 (1984)
- 63) J. K. Kan, M. L. Shuler, *ibid.*, **20**, 217 (1978)
- 64) J. Wiśniewski, T. Winnicki, K. Majewska, *ibid.*, **25**, 1441 (1983)
- 65) D. S. Inloes, W. J. Smith, D. P. Taylor, S. N. Cohen, A. S. Michaels, C. R. Robertson, *ibid.*, **25**, 2653 (1983)
- 66) K. H. Kyung, P. Gerhardt, *ibid.*, **26**, 252 (1984)
- 67) R. A. Knazek, R. M. Gullino, R. O. Kohler, R. L. Dedrick, *Science*, **178**, 65 (1972)
- 68) a, W. L. Chick, A. A. Like, V. Lauris, *ibid.*, **187**, 847 (1975); b, W. L. Chick, J. J. Perna, V. Lauris, D. Low, P. M. Galletti, G. Panol, A. D. Whittemore, A. A. Like, C. K. Colton, M. J. Lysaght, *ibid.*, **197**, 780 (1977)
- 69) K. Ku, M. J. Kuo, J. Delente, B. S. Wildi,

- J. Feder, *Biotech. Bioeng.*, **23**, 79 (1981)
- 70) K. Mosbach, p.-O. Larsson, C. Lowe, 文献2) のpp. 859
- 71) 山崎幸苗, 前田英勝, 有合協誌, **41**, 1088 (1983)
- 72) a, J. R. Wykes, P. Dunnill, M. D. Lilly, *Biochim. Biophys. Acta*, **286**, 260 (1972); b, J. R. Wykes, P. Dunnill, M. D. Lilly, *Biotech. Bioeng.*, **17**, 51 (1975)
- 73) S. Yamazaki, H. Maeda, H. Suzuki, *ibid.*, **18**, 1761 (1976)
- 74) a, P. Davies, K. Mosbach, *Biochim. Biophys. Acta*, **370**, 329 (1974); b, P.-O. Larsson, K. Mosbach, *FEBS Lett.*, **46**, 119 (1974)
- 75) M. Aizawa, R. W. Coughlin, M. Charles, *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 233 (1976)
- 76) Y. Morikawa, I. Karube, S. Suzuki, *ibid.*, **523**, 263 (1978)
- 78) K. Murata, K. Tani, J. Kato, I. Chibata, *J. Appl. Biochem.*, **1**, 283 (1979)
- 79) Y. Sakaguchi, T. Murachi, *ibid.*, **2**, 117 (1980)
- 80) a, C. W. Fuller, H. J. Bright, *J. Biol. Chem.*, **252**, 6631 (1977); b, C. W. Fuller, J. R. Rubin, H. J. Bright, *Eur. J. Biochem.*, **103**, 421 (1980)
- 81) M. Muramatsu, I. Urabe, Y. Yamada, H. Okada, *ibid.*, **80**, 111 (1977)
- 82) F. le Goffic, S. Sicsic, C. Vincent, *ibid.*, **108**, 143 (1980)
- 83) a, Y. Yamazaki, H. Maeda, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2277 (1981); b, Y. Yamazaki, H. Maeda, A. Kamibayashi, *Biotech. Bioeng.*, **24**, 1915 (1982)
- 84) S. Furukawa, N. Katayama, T. Iizuka, I. Urabe, H. Okada, *FEBS Lett.*, **121**, 239 (1980)
- 85) R. Wichmann, C. Wandrey, A. F. Bückmann, M.-R. Kula, *Biotech. Bioeng.*, **23**, 2789 (1981)
- 86) J. Campbell, T. M. S. Chang, *Biochim. Biophys. Acta*, **397**, 101 (1975)
- 87) J. Grunwald, T. M. S. Chang, *J. Appl. Biochem.*, **1**, 104 (1979)
- 88) A. M. Rosenthal, T. M. S. Chang, *J. Memb. Sci.*, **6**, 329 (1980)
- 89) Y. T. Yu, T. M. S. Chang, *FEBS Lett.*, **125**, 94 (1981)
- 90) A. Naparstek, D. Thomas, S. R. Caplan, *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 643 (1973)
- 91) S. R. Caplan, A. Naparstek, N. J. Zabusky, *Nature*, **245**, 364 (1973)
- 92) G. Nicolis, I. Prigogine, "Self-organization in nonequilibrium systems", John Wiley, 1977, chap. 14
- 93) M. Kubín, P. Špaček, *Polymer*, **14**, 505 (1973)
- 94) T. Çiftçi, W. R. Vieth, *J. Mol. Catal.*, **8**, 455 (1980)
- 95) H.-D. Juang, H.-S. Weng, *Biotech. Bioeng.*, **26**, 623 (1984)
- 96) S. H. Park, S. B. Lee, D. D. Y. Ryu, *ibid.*, **23**, 2591 (1981)
- 97) A. Borchert, K. Buchholz, *ibid.*, **26**, 727 (1984)
- 98) J. E. Rothman, J. Lenard, *Science*, **195**, 743 (1977)
- 99) W. R. Krigbaum, R. A. Majeski, *Macromol.*, **10**, 1117 (1977)
- 100) Y. Nakamura, Y. Saitoh, Y. Obata, S. Kunugi, 織学誌, **41**, T-173 (1985)
- 101) S. Kunugi, H. Kodama, H. Yamada, Y. Nakamura, 織学誌, 印刷中
- 102) a, K. Mosbach, B. Mattiason, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 2084, 2093 (1970); b, B. Mattiason, K. Mosbach, *Biochim. Biophys. Acta*, **235**, 253 (1971)
- 103) G. Broun, D. Thomas, E. Selegny, *J. Membrane Biol.*, **8**, 313 (1972)
- 104) Y. Morikawa, I. Karube, S. Suzuki, *Biochim. Biophys. Acta*, **523**, 263 (1978)
- 105) B. Blumenthal, S. R. Caplan, O. Kedem, *Biophys. J.*, **7**, 735 (1967)
- 106) G. B. Tanny, O. Kedem, Z. Bohak, *J. Membrane Sci.*, **4**, 363 (1979)
- 107) K. Ishihara, M. Kobayashi, I. Shinohara, *Makromol. Chem. Rap. Comm.*, **4**, 327 (1984)
- 108) K. Ishihara, M. Kobayashi, N. Ishimaru, I. Shinohara, *Polymer J.*, **16**, 625 (1984)
- 109) a, I. Karube, Y. Nakamoto, K. Namba, S. Suzuki, *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 975 (1976); b, I. Karube, Y. Nakamoto, S. Suzuki, *ibid.*, **445**, 774 (1976)
- 110) a, Y. Nakamoto, I. Karube, S. Terawaki, M. Nishida, S. Suzuki, *J. Ferment. Tech.*, **55**, 409 (1977); b, Y. Nakamoto, M. Nishida, I. Karube, S. Suzuki, *Biotech. Bioeng.*, **19**, 1115 (1977)
- 111) I. Karube, Y. Yugeta, S. Suzuki, *ibid.*, **19**, 1493 (1977)
- 112) D. Valin, C. Tran-Minh, *Biochem. Biophys. Acta*, **571**, 321 (1979)
- 113) Y. Ishimori, I. Karube, S. Suzuki, *Biotech. Bioeng.*, **23**, 2601 (1981)
- 114) F. L. Carter, "Molecular Electronic Devices", Marcel Dekker, New York (1982)
- 115) 田伏岩夫, 小夫家芳明, 山村和夫, 化学, **39**, 40 (1984)
- 116) 穴戸昌彦, 現代化学, **162**, 57 (1984)

(昭和60年2月9日受理)