報 文

ラムノリピッド型微生物バイオサーファクタント
の界面化学的特性

石上 裕*・蒲 康夫*・山口宗男**・中原久恵*・鎌田俊雄*

* 工業技術院化学技術研究所(〒305 茨城県筑波郡谷田部町東 1-1)

** 工業技術院微生物工業技術研究所(〒305 茨城県筑波郡谷田部町東 1-1)

Surface Active Properties of Rhamnolipids as Microbial Biosurfactants

Yutaka ISHIGAMI, Yasuo GAMA, Muneo YAMAGUCHI, Hisae NAKAHARA, and Toshio KAMATA

* National Chemical Laboratory for Industry

(1-1 Higashi, Yatabe-machi, Tsukuba-gun, Ibaraki-ken)

** Fermentation Research Institute

(1-1 Higashi, Yatabe-machi, Tsukuba-gun, Ibaraki-ken)

Studies were carried out to evaluate the surface active properties of rhamnolipid B [2-O-(2-O- α -decanoyl- α -L-rhamnopyranosyl)- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid] and its precursor A as microbial biosurfactants produced by the hydrocarbon-assimilating bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* BOP 100. The micelle formation of the sodium salts of rhamnolipids was confirmed by the detection of critical micelle concentrations (cmc) of A: 6.22×10^{-5} , B: 1.50×10^{-4} M (fluorescence intensity of ANS) and by micellar weight determinations of A: 38000, B: 7000 (light scattering), in spite of the bulky and complicated structures of the micelles, consisting of alternate hydrophobic and hydrophilic portions in contrast to synthetic surfactants. The γ cmc values of the sodium salts of A and B were 28 mN/m, while their interfacial tension was 0.2 and 3.2 mN/m at the interface between 0.1% solution and kerosene. Moreover, highly efficient gross effects were also noted particularly in dispersing, emulsifying, foaming and penetrating action. From these findings rhamnolipids may be concluded to have large surface activity and polyfunctionality on the basis of the amphiphiles as membranous constituents.

1 緒 言

Pseudomonas aeruginosa の発酵液中に各種の代謝産物が含まれ、抗菌作用を示すことが 1930 年ころから知られていた。Jarvis ら¹⁾ は 1949 年炭素源としてバクトペプトン-グリセリンを用い、発酵液中にラムノリピッド 2.5 g/L を得、結核菌に対する抗菌作用を報告した。他に、関連する研究もある^{2), 3)}。その後、炭化水素発酵の研究において、炭化水素資化性の *Pseudomonas* 属菌が炭化水素を菌体内へ取りこむためにラムノリピッドを分泌して炭化水素を乳化し微小化することが明らかにされた^{4)~7)}。これらの糖脂質は 2 分子の

ーヒドロキシデカン酸からなるジラムノシルリピッド (R 1) とモノラムノシルリピッド (R 2) であって、生産菌自身の生育あるいは呼吸を促進し^{7)~10)}、また抗菌・抗ウイルス活性を有する⁶⁾ことが示された。また、山口ら^{11)~13)}は炭化水素資化性菌として自然界から分離した *Pseudomonas aeruginosa* BOP 100 が *n*-パラフィンを資化して Fig.-1 の構造の多鎖アルキル基と二重結合を有する新種のラムノリピッドを産生することを見だし、活性スラッジ法による炭化水素の分解処理に対する促進効果を検討している。さらに、Wagner ら^{14), 15)}も R2 及び R4 の二種の新しいラムノリピッドを含む Fig.-2 のラムノリピッド同族体を分離した。

Fig.-1 Rhamnolipid A and B.

Fig.-2 Other four kinds of rhamnolipid homologues.¹⁴⁾

なお、R 1 及び R 3 は伊藤ら⁶⁾の R-1 及び R-2 と同一であり、R 1~R 4 の生産量は発酵液中最高 15 g/L であった。

さらに、筆者ら¹⁶⁾はラムノリピッド A 及び B が pH に依存して分子集合形態を変換することを報告した。本研究においては、微生物バイオサーファクタントとしてラムノリピッド A 及び B の界面化学的特性を明らかにすることにより、生体膜成分として生体機能との関連の解明を試みるとともに、また生分解性や安全性が大きく、かつ高付加価値の界面活性剤となる可能性につき検討を加えた。

2 実 験

2.1 試 料

2.1.1 ラムノリピッド

自然界から分離した炭化水素資化性菌 *Pseudomonas aeruginosa* BOP 100 を、5% の *n*-パラフィンを含

む無機塩培地 (pH 7.0, 窒素源 NaNO_3) 中において 5 d 振とう培養した。得られた発酵液を硫酸酸性とした後ジエチルエーテル可溶分を抽出し、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール, 95:5)で単離して二種のラムノリピッド A 及び B を得た。さらに、ラムノリピッド A はカーボン処理により、また B はジエチルエーテル-*n*-ヘキサン (8:2) から再結晶することにより精製した。詳細は既報^{11), 12)}に記した。

2.1.2 試 薬

N-(5-フルオレッセンチオカルバモイル)ジパルミトイル-L-ホスファチジルエタノールアミンはアメリカ Molecular Probe 社製、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムは和光純薬工業(株)製の試薬を用いた。エーロゾル OT [1, 2-ビス(2-エチルヘキシルオキシカルボニル)-1-エタンスルホン酸ナトリウム、以下 A. OT と略称する] は和光純薬工業(株)製でアセトン及び石油エーテル不溶分を除いて精製した。硫酸ドデシルナトリウム (SDS) はイーストマンコダック社製試薬をそのまま用いた。ノニルフェニルポリ(オキシエチレン) (11) エーテル (NP-11) はライオン(株)製リポノックス K を用いた。 α -銅フタロシアニンブルー (α -Pc) は住友化学工業(株)製シアニンブルー BB で、平均粒子径 2.0 μm 、比重 1.45、pH 7.0 である。カーボンブラックは三菱化成工業(株) # 33 (ファーマス) で平均粒子径 0.025 μm 、pH 8.5、表面積 95 m^2/g である。その他市販試薬を用いた。

水はイオン交換水のアルカリ性過マンガン酸カリウム水溶液を蒸留した後、パイレックス製カラム (30 mm ϕ 、長さ 450 mm、ガラス管のチップを充填) にて再蒸留したものを用いた。PBS 緩衝液は 1 L 当たり NaCl 18.0g, KCl 10.2 g, Na_2HPO_4 11.5g 及び KH_2PO_4 0.2 g になるように蒸留水を加え、さらに塩酸にて pH 7.35 に調整した。

2.2 実験方法

2.2.1 機器測定

表面張力測定は Wilhelmy 型表面張力計 (島津 ST-1 型) を用いて $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で行った。界面張力測定は Core-Labo 社 (アメリカ) 製スピニングドロップ式モデル 500 界面張力測定装置を用いて $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で行った。蛍光強度による臨界ミセル濃度 (cmc) の測定には、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート (ANS) を溶媒 (PBS 緩衝液, pH 7.35) 中に溶解し、島津蛍光分光光度計 RF-540 型を用いて励起光の波長 390 nm にお

いて 490 nm の蛍光強度がミセルの生成により急増する濃度を求めた¹⁷⁾。光散乱測定は島津光散乱光度計 P G-21 型を用い、セミオクタゴナルセルにて 25°C 及び 35°C で測定した。dn/dc は島津差屈折計 DR-1 型を用いた。水溶液の光学的清浄化に留意し、原液は 60000 g で 1h 遠心した。ガラス器具類はすべて特製の装置を用いてアセトン蒸気で除じん(塵)処理を行った。詳細は既報^{18), 19)} に述べたとおりである。

2・2・2 界面活性

測定法の概略を以下に記す。詳細は当該文献を参照されたい。起泡力：半微量改良 TK 法²⁰⁾ によって測定した。すなわち、高さ 40 cm, 直径 70 mm のガラス製ジャケット付き円筒容器を垂直にセットし、外とうの整温筒には 30°C の湯を循環させ、内側の 400 mL 容目盛り付き泡容器内に試料溶液 5 mL を入れる。そして、泡容器の底の溶液内にさしこんだ空気吹き込み用ガラス管を除いて、泡容器内は外気から遮断されるとともに水 300 mL を貯留したアスピレーターに接続される。アスピレーターの下端のピンチコックを開いて水を流下させることにより試料溶液内に空気が入って発泡するので、流下終了直後 (0 min) から 5 min 経過後までの泡の容積を読んだ。また、泡安定性 $= [(0 \text{ min の泡容} - 5 \text{ min 後の泡容}) \times 100 / 0 \text{ min の泡容}]$ より、泡安定度も計算して求めた。浸透力²¹⁾：厚さ 0.2 cm, $2 \times 2 \text{ cm}$ の正方形のフェルト及び木綿布 (大和紡, 帆布 #6) を試験片として用いた。30 ± 1°C にて自然沈降法により試料溶液面に布がふれた瞬間からストップウォッチを押して計時し、布が液面から完全に離れて沈降する瞬間までの秒数を読んだ。分散力²²⁾：固体微粉末 50 mg を 30 mL 容目盛り付き試験管に取り、試料溶液 20 mL を加えて振とう機で水平に振りまぜ、30°C にて 4 h 静置する。ついで試験管の液面から 5 mL の目盛線までピペットの先端を挿入し、その部分から 2 mL を吸い取り、別の試験管に移す。これに 25 mL の水を加えた希釈液 (A) について積分球式ヘーズメーター (日本電色デジタル濁度計 NDH-20D) を用いて測定し、次式によって分散力を求めた。

分散力 (%) $= (T_0 - T_s) \times 100 / T_s$, ここで、 T_0 ：被検溶液 2 mL に水 25 mL を加えた水溶液の透過率。 T_s ：上記 (A) の透過率。乳化力²¹⁾：30 mL 容の目盛り付き試験管に試料水溶液 3 mL と灯油 2 mL を入れ、振とう機で振りまぜた後直ちに 95°C の恒温水槽に浸漬して時間 (振とう 5 min 後より 120 min 後まで) とともに分離油層、乳化層及び分離水相を読み取り、油層中の乳化油層の面積の百分率を求め、乳化率 (%) として算出した。

3 実験結果

3・1 ミセル形成と表(界)面張力低下作用

Fig.-3 Relation between surface tension and concentration of sodium salts of rhamnolipids in water at 30°C.

ラムノリピッド A 及び B は水中で白濁した分散液を与えるが、それぞれのナトリウム塩 (以下 A-Na 及び B-Na という) は水に透明に溶解した。表面張力対濃度曲線を Fig.-3 に示した。ラムノリピッドナトリウム塩はいずれも臨界ミセル濃度 (cmc) を有し、ミセルを形成することが明らかである。cmc は A-Na が $6.22 \times 10^{-5} \text{ M}$ (0.042%), B-Na が $1.50 \times 10^{-4} \text{ M}$ (0.0124%) であり、 γ_{cmc} は両者ともおよそ 28 mN/m である。B-Na について cmc 以下の単分子溶解領域における $\gamma / \log c$ の勾配から求めた表面占有面積は $79.1 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ であった。ラムノリピッドナトリウム塩は SDS や A. OT のような合成アニオン界面活性剤より界面活性の大きいことが明らかである。また、B-Na のように親水基がジサッカリドとカルボキシラートで、親水性が大きく、かさ高い構造であってもミセル形成の妨げになっていないことがわかる。一方、A-Na の cmc は B-Na よりも小さく、HLB バランスに対応した予想どおりの結果である。次に、両親媒性蛍光色素 (ANS) を用い、PBS 緩衝液 (pH 7.35) 中における蛍光強度対濃度の関係曲線を Fig.-4 に示した。B-Na は cmc に対応すると見られる蛍光強度の立ち上がりが二段、A-Na は三段になっており、一段目のプレミセル (低次会合体)²³⁾ を経て大きなミセルを生成するプロセスが考えられる。三浦ら²⁴⁾ は蛍光強度測定により SDS の第二 cmc を見いだしており、A-Na の三段目、B-Na の二段目は第二 cmc に相当するものと思われる。Fig.-5 には A-Na 及び B-Na 水溶液の水と灯油または *n*-オクタンとの界面張力対濃度曲線を示した。両者とも界面張力低下能が大きく、例えば A-Na の 0.1% 水溶液は灯油-水界面の界面張力を 0.2 mN/m に下げ、B-Na の 0.05% 水

Fig.-4 Relation between fluorescence intensity and concentration of sodium salts of rhamnolipids in PBS buffer (pH 7.35) at 25°C.

Fig.-5 Interfacial tension vs. concentration plots at the interface between kerosene or octane and water at 30°C.

溶液も 3.2 mN/m である。これらの値は合成界面活性剤よりも著しく優れたものである。

さらに、A-Na 及び B-Na のミセルの特性を知るために、PBS 緩衝液 (pH 7.35) 中での光散乱測定を行った。Zimm プロット法から得た第二ビリアル係数 (A_2) = 90×10^{-4} を用いて補正を行い、また $dn/dc = 0.25$ として一濃度近似法¹⁸⁾を適用して、ミセル濃度 ($c - c_0$) が 0.1% の時の散乱図形を Fig.-6 に示した。縦軸の切片の逆数から重量平均の会合分子量 (M_w) を算出し、PBS (pH 7.35) 中、25°C で A-Na: 38,000 (会合数 56); B-Na: 7,000 (会合数 8.5) を得た。B-Na には散乱図形に角度依存性がないので小さい会合体であり、他方 A-Na は傾きがあるので会合体は大きく、また球状ミセルよりも形状がやや円形に近いことが考えられる。さ

Fig.-6 $K(c - c_0)/R_{90}$ vs. $\sin^2(\theta/2)$ plots of sodium salts of rhamnolipids (0.1%) in the PBS buffer (pH 7.35).

らに、いずれの曲線も低角度で下方に落ちこんでいるので大きい会合体の共存が考えられる。Fig.-4 において各曲線の蛍光強度が濃度に依存して二つまたは三つに区分できることから、この区分された領域に対応してミセルの大きさや形状が変化していくことを示すものと推定される。さらに、A-Na は 35°C で会合分子量が 31,000 に減少するので A-Na 分子のカルボキシル基の親水性が増大して会合数に影響を与え、ラムノース基による親水性 (水素結合による水との親和性) の減少の効果の小さいことがわかる。

3・2 界面化学的諸性質

Table-1 に起泡力試験の結果を示した。起泡力及び泡安定性ともに 0.1% 以下の低濃度でラムノリピッドナトリウム塩の方が SDS や A. OT よりも優れていたが、

Table-1 Foaming properties of sodium salts of rhamnolipids.

Surfactant	Concn. (%)	Foam volume (mL)		Foam stability (B/A) × 100 (%)
		0 min (A)	5 min (B)	
A-Na	0.10	258	240	93
"	0.05	145	60	41
"	0.01	125	60	48
B-Na	0.10	275	250	91
"	0.05	268	185	69
"	0.01	252	130	52
SDS	0.50	237	130	54
"	0.10	54	9	17
A. OT	0.50	283	24	8
"	0.10	228	19	8

Table-2 Penetrating properties of sodium salts of rhamnolipids.

Surfactant	Concn. (%)	Sinking time (s) for cotton for felt	
A-Na	0.10	29.6	20.2
"	0.05	68.1	31.1
"	0.01	766	308
B-Na	0.10	780	31.3
SDS	0.50	8.6	52.3
"	0.10	500	303.2
A. OT	0.50	1.2	0.8
"	0.10	4.6	4.2

泡のキメはSDSよりも粗であった。また、B-Naの方がA-Naよりも起泡力や泡安定性が高い。**Table-2**には浸透力を示した。A. OTが抜群に優れているが、ラムノリピッドナトリウム塩も浸透作用を有していることがわかる。また、A-Naの方がB-Naよりも浸透力が高い。これまで直鎖アルキル基を有する界面活性剤は表面吸着濃度が大きく、起泡力が高いといわれているが、A-Na及びB-Naはかさ高い多鎖構造を有するので優れた起泡作用を説明できない。また、ジサッカリドのB-NaがモノサッカリドのA-Naと同等以上の起泡力と泡安定性を有する理由として、糖基が疎水性を示すとともにかさばらない配向構造をとることを仮定すれば理解できる。実際に糖類が疎水性を示す場合のあること²⁵⁾やヒドロキシル基の一部をメトキシル化して水素結合を妨げるとかえって糖の親水性の増すことが知られている。例えば、セルロースは水に不溶であるが、ブドウ糖単位の三つの遊離ヒドロキシル基のうち1.3~2.6個をメトキシル化したメチルセルロースは水に可溶となる²⁶⁾。

Table-3には灯油に対する乳化力を示した。SDSよりも大きい乳化力を有し、表面張力低下能に対応しているものと思われる。久塚ら⁴⁾もラムノリピッドR1が合成非イオン界面活性剤よりも乳化作用の優れていることを示した。また、R1について多価アルコールを用いて油分の乳化を行い、乳化粒子径1 μ m以下の安定な乳化系を得ている²⁷⁾。本研究のラムノリピッドA及びBも乳化組成物の粒子系3 μ m以下の安定な乳化物を得た²⁸⁾。

難分散性の α -Pc及びカーボンブラックに対する分散力を**Table-4**に示した。二つの分散質に対してA-Na及びB-Naは良好な分散作用を示すが、特に0.01%の低濃度においてさえも顕著な分散力を有している。 α -Pc及びカーボンブラックはどちらも疎水性表面を有する。特に前者は著しく、後者は製造時の燃焼工程や酸化処理によって若干のヒドロキシル基やカルボキシル基が存在する。それ故、A-Na及びB-Naは α -Pcの

Table-3 Emulsifying power of sodium salts of rhamnolipids for kerosene.

Surfactant	0.50%	0.10%
A-Na	73	57
B-Na	96	54
SDS	87	70

Table-4 Dispersing power of sodium salts of rhamnolipids.
[α -Cu phthalocyanine blue]

Surfactant	0.10%	0.01%
A-Na	44	36
B-Na	75	46
SDS	33	23
NP-II	71	37
Water	7	7

[Carbon black]

	0.10%	0.10%
A-Na	30	14
B-Na	23	23
SDS	4	3
NP-II	89	8
Water	2	2

疎水表面上に三鎖の炭化水素部が疎水結合して α -Pc粒子に負荷電を与えるとともにラムノース基による粒子表面の被覆効果もあるものと思われる。他方、カーボンブラックに対しては粒子表面上の極性基とA-NaやB-Naの極性基との相互作用を介する分散作用と炭化水素鎖の疎水結合による分散作用が同時に働くため、カーボンブラックに対する分散力は大きくならないことが考えられる。なお、ラムノリピッドA及びBの0.5%水溶液を水酸化ナトリウムでpH 7.0に調整し、成人女性15人に対して皮膚刺激試験を行ったところ、皮膚刺激性は全く認められなかった²⁸⁾。

4 考 察

ラムノリピッドA及びBのバイオサーファクタントとしての化学構造をみると、親水基は1ないし2個のラムノースと1個のカルボキシル基であり、他方親油基は大きく分けて二鎖アルキル型構造であって、そのうちの二鎖はデセノイル基、もう一鎖は二本のヘプチル基を分枝した2-ヒドロキシプロピオニルプロピオン酸で糖基の反対末端にはカルボキシル基を有する。このように、ラムノリピッドは親油基及び親水基がかさ高く、しかも両者が入り組んだ(interpenetrated)構造である。従来から、胆汁酸、カゼイン及びレシチンなどの生体界面活性剤やショ糖脂肪酸エステル、スパン及びトウィーンな

ど天然物改質系界面活性剤が知られているが、合成界面活性剤の構造別ないし合成法に基づく分類^{29)・30)}には入りにくい。既に著者らが報告した多塩基型バイオサーファクタントのスピクリスポール酸やアガリチン酸³¹⁾、さらにスクシノイルトレハロースリピッド³²⁾も同様である。

本研究のラムノリピッド A 及び B とは別に見いだされた四種のラムノリピッド同族体 (Fig.-2) について、Wagner ら¹⁴⁾ は表面張力 25~31 mN/m、界面張力 1 mN/m 以下、cmc として 0.002~0.02% との結果を得ている。R 4 は 2 mol の糖鎖とデカン酸からなる化学構造を有するので最も親水性が大きく、他方 R1 が最も界面活性であることが予期されるが、実験結果を見るといずれも界面活性が大きく、四者の間の性能の差は小さい。詳細に比較すると、(1)糖の数だけが異なる R 1 と R 3 及び R 2 と R 4 とを比べると糖が 1 mol から 2 mol に増すと界面張力低下能が若干増大する、(2)デカノイル基の数だけが異なる R 1 と R 2 及び R 3 と R 4 とを比べるとデカノイル基が 1 mol から 2 mol に増すと cmc が増大する、との結果であった。なお、表面張力及び界面張力の大きさを界面活性の指標として見ると乳化分散作用や起泡作用の大きいことが考えられる。実験結果は予想どおりで、浸透作用もあり、しかも 0.01% 程度の低濃度でそれらの作用を充分に発揮しうることがわかった。

つぎに、ラムノリピッド型バイオサーファクタントが石油微生物 (*Pseudomonas* 属菌) の代謝産物として生物活性を示す点に注目したい。ラムノリピッドは酸性側からアルカリ側まで幅広い水溶性領域を有するが、pH 7.0 の *Pseudomonas* 属菌の生育条件においてラムノリピッドは中和塩になっており菌体外に分泌されて菌体近傍の炭化水素を微小化し、かつ油滴の外周に吸着して油滴表面を細胞膜内の HLB に近づけて菌体内への取りこみを容易にしている⁴⁾ものと考えられる。ラムノリピッドは原核微生物 (*Pseudomonas* 属菌) の細胞膜成分として菌の生育に寄与していることが推定されるが、牛乳の脂肪球が乳せん細胞由来の細胞膜成分によって乳濁液を安定に保持している例³³⁾などを考え合わせると、一般に細胞膜成分がその界面活性に基づいて各種の生物活性の発現に関与するものと思われる。こうした観点から、ラムノリピッドナトリウム塩の分子集合体は濃度に依存して小さいプレミセルから大きいミセル、さらにはベシクルやコアセルバートへと成長でき、しかも pH に依存して容易に分子集合形態の変換を行うことが可能な融通性をも併せ持つことが理解できる。このようにして生体膜成分である微生物バイオサーファクタントの多機能性と環境適合性の一端を明らかにすることができた。

(昭和 62 年 4 月 20 日受理)

文 献

- 1) E. G. Jarvis, M. J. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 4124 (1949)
- 2) G. Hauser, M. L. Karnovsky, *J. Bacteriol.*, **68**, 645 (1954)
- 3) J. R. Edwards, J. A. Hayashi, *Arch. Biochim. Biophys.*, **111**, 415 (1965)
- 4) K. Hisatsuka, T. Nakahara, N. Sano, K. Yamada, *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 686 (1971)
- 5) K. Hisatsuka, T. Nakahara, K. Yamada, *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1361 (1972)
- 6) S. Itoh, H. Honda, F. Tomita, T. Suzuki, *J. Antibiotics*, **14**, 855 (1971)
- 7) S. Itoh, T. Suzuki, *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2233 (1972)
- 8) 中原忠篤, 発酵と工業, **40**, 1019 (1982)
- 9) 中原忠篤, 石油と微生物, **1972** (8), 33
- 10) T. Nakahara, K. Hisatsuka, Y. Minoda, *J. Ferment. Technol.*, **59**, 415 (1981)
- 11) M. Yamaguchi, A. Satoh, A. Yukuyama, *Chem. Ind. London*, **1976**, 741
- 12) 山口宗男, 佐藤昭雄, 行山 煥, 微工研報, No. 51, 35 (1978)
- 13) 山口宗男, 佐藤昭雄, 太宰甫朗, 高原義昌, 微工研報, No. 51, 51 (1978)
- 14) C. Sydatk, S. Lang, U. Matulovic, F. Wagner, *Z. Naturforsch.*, **40 c**, 61 (1985)
- 15) C. Sydatk, S. Lang, F. Wagner, *Z. Naturforsch.*, **40 c**, 51 (1985)
- 16) Y. Ishigami, Y. Gama, H. Nagahora, M. Yamaguchi, H. Nakahara, T. Kamata, *Chem. Lett.*, **1987**, 763
- 17) M. J. Ortner, R. H. Sik, C. F. Chignell, *Molecular Pharmacol.*, **15**, 179 (1979)
- 18) T. Kamata, H. Nakahara, *J. Colloid Interface Sci.*, **43**, 89 (1973)
- 19) 石上 裕, 梶崎英男, 油化学, **25**, 335 (1976)
- 20) 木村和二郎, 矢野 弥, 油化学, **11**, 138 (1962)
- 21) 石上 裕, 油化学, **26**, 781 (1977)
- 22) 石上 裕, 鈴木 茂, 山崎信助, 色材, **56**, 449 (1983)
- 23) 石上 裕, 東工試ニュース・化学工業資料, **7** (4), 72 (1972)
- 24) Y. Kubota, M. Kodama, M. Miura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **46**, 100 (1973)
- 25) 謝名堂昌信, 化学と生物, **22**, 29 (1984)
- 26) 中村亦夫監修, “水溶性高分子” 化学工業日報社(1973), p. 60 (岩田); p. 285 (芝崎)
- 27) 公開特許 昭 59-39338
- 28) 柴山 宇治, 石上ら, 特許出願中
- 29) 佐々木恒隆, 油化学, **17**, 116 (1968)
- 30) 桑村常彦, 油化学, **14**, 483 (1965)
- 31) 石上 裕, 山崎信助, 化技研報, **80**, 231 (1985)
- 32) 石上 裕, 鈴木 茂, 船田 正, 茅野雅子, 内田康一, 田淵武士, 油化学, **36**, No. 11 (1987) 印刷中
- 33) 伊藤敏敏, 中西武雄, 農化, **48**, 239 (1974)