光刺激応答性NIPA-CHゲルの 包括固定化担体への利用に関する基礎研究

隈 部 佳* 衛 藤 学*
久 場 隆 広** 楠 田 哲 也**

Application of Light-Stimulus-Responsive NIPA-CH Gels to Immobilized Media

Kei KUMABE*, Manabu ETOH*,
Takahiro KUBA** and Tetsuya KUSUDA**

* Department of Urban and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

** Department of Urban and Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Graduate School, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

Abstract

Recently, biomass immobilization technique has been put to practical use in advanced waste water treatment processes. The conventional immobilization technique, however, poses a problem with respect to mass transfer resistance for substrate and product molecules to the microorganisms inside immobilization gel matrices. The problem can be solved by utilization of functional gels as immobilizing media, which reversibly shrink and swell when external conditions change such as temperature, pH, and solvent composition. In this study, visible light-stimulus-responsive NIPA-CH (N-isopropylacrylamide-Chlorophyllin) gels were applied to examine a possibility of utilization in waste water treatment processes. The purpose of this study is to investigate physical properties of NIPA-CH gels such as swelling ratios, repetitive behaviors, and the influence of the swelling capacity on the immobilized microorganisms. The NIPA-CH gels showed sufficient swelling ratios under cyclic visible light stimuli, and it was suggested that the mass transfer of substrates would be enhanced by the shrinking and swelling effect of the visible light-stimulus responsive NIPA-CH gels.

Key words: chlorophyllin, functional gel, light-stimulus-responsive, N-isopropylacrylamide, volume phase transition

1. は じ め に

閉鎖性水域における窒素、リンによる富栄養化が深刻な問題となっている現在、従来の水処理技術では対応が困難である微量汚染物質の除去が可能となる高度水処理技術の開発が進められている。そこで従来の活性汚泥法に対して、親水性ゲル等に特異な機能を持った微生物を固定化した包括固定化担体の研究が進められており、既にPEG（ポリエチレングリコール）を包括固定化担体とした廃水処理が実用化されている¹⁻³⁾。このような包括固定化法では、増殖速度が遅く、固定化しなければ流出の恐れがあるような微生物を処理システム内に長期間保持することができるメリットがある。しかし、従来型の包括固定化担体では固定化ゲルポリマーの拡散抵抗により、基質および酸素がゲル内部まで十分に到達しない。そのため、ゲルの表層部分の微生物しか廃水処理に利用されず、担体内部の大

部分の微生物は処理に関与しないという欠点がある³⁻⁶⁾。

しかし、温度、pH、光強度、イオン強度等の刺激により、その体積や分子配列を不連続に変えることが出来る刺激応答型機能性高分子ゲルを包括固定化担体として用いることで、上記の問題が解決される可能性がある。即ち、刺激に対するゲルの膨潤・収縮による基質や酸素の内部への移流促進⁷⁻⁸⁾ (Fig.1)、また、それに伴う微生物の生息範囲の深層化などにより微生物による代謝速度が高まり、従来の包括固定化担体以上の廃水処理効果の促進が期待できる。例えば、温度刺激応答性のNIPA (N-isopropylacrylamide)ゲルを用いた研究⁹⁾では、硝化菌を包括固定したNIPAゲルを添加(0.1cm³-gel・cm⁻³-reactor)した4つの反応槽を、恒温条件(25, 28, 35℃)と変温条件(25-35℃間)下で好氣的に連続回分運転し、その硝化活性の比較を行い、実際に硝化促進の実績を上げている。Fig.2はその際の各反応槽の硝化活性の経日変化を示したものの

* 九州大学大学院工学府 都市環境システム工学専攻 〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

** 九州大学大学院工学研究院 環境都市部門 〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

である。このとき、変温条件(25–35℃)下では温度刺激に応じてNIPAゲルの膨潤率は1.0–1.2の範囲で常に変動していた。つまり、膨潤に伴う基質やDOの流入や収縮に伴う生成物の放出が起こり、物質輸送が促進されており、これが、変温条件下において高い硝化活性を示した原因であると考えられた。

本研究では、Fig.1に示すように感温性のNIPAゲルに色素クロロフィリン(Chlorophyllin:CH)を導入したNIPA-CHゲルを包括固定化担体として使用したNIPA-CHの分子構造については文献¹⁰⁾に示されている。NIPA-CHゲルは、光が照射されると、光吸収分子であり可視光領域に吸収域を持つ色素CHが光照射による光エネルギーを熱エネルギーに変換し、そこで生じた局所熱により感温性のNIPAが体積収縮を起こし、光照射を止めると体積膨潤するという可逆的な変化を示す^{11–12)}。このように感温性ゲルと光吸収分子の組み合わせにより、環境的にもクリーンで、相対的に制御が容易な可視光という環境刺激による体積相転移(体積変化)が可能となる。このような光刺激応答性ゲルにおいて、温度刺激応答性ゲル(Fig.2)以上に大きな体積変化を引き起こすことが出来、物質輸送がより促進されれば、さらに高い廃水処理促進効果が期待できる¹³⁾。

そこで、まず、光刺激に対するNIPA-CHゲルの体積相転移速度や変化量、繰り返し応答性、包括固定化した微生物のこれらに対する影響などについて明らかにし、廃水処理を担う微生物の包括固定化担体としての利用の可能性について検討した。

2. 光刺激応答性NIPA-CHゲル及び包括固定化担体の作製

本研究に使用したNIPA-CHゲルは、熱応答性のN-イソプロピルアクリルアミド(NIPA)と色素クロロフィリン(CH)との共重合で合成され、その組成をTable 1に示す。NIPA-CHゲルの組成及び作成方法については文献^{11–12)}を参照し、強度、膨潤率等が最適となるよう組成・方法を調整した。各微生物濃度(SS=0–600mg-SS $\cdot$ L⁻¹-gel)の硝化菌集積培養液に所定量のNIPA, BIS, CHを溶かした高分子溶液を準備する。この高分子溶液を脱気・冷却後、TEMED, APSを順に添加して、容器に流し込み、冷蔵庫中(7℃)に24時間以上放置してゲル化させる。こうしてできたゲルを一辺長4mm程度のキューブ状あるいは所定の厚さに切断したものを実験に使用した。また、Table 1に示すCH量を基本(1.0CH)とし、本論文ではCHを「X」倍導入したゲルを「XCH」と呼ぶこととする。

3. 実験結果及び考察

3.1 NIPA-CHゲルの温度刺激応答

まず、種々のCH濃度で作製されたNIPA-CHゲルの温度刺激に対する応答性を調べた。8種類のCH濃度のNIPA-CHゲル(0.0CH, 0.2CH, 0.4CH, 0.6CH, 0.8CH, 1.0CH, 3.0CH, 5.0CH)を作製し、一辺3–4mm程度のキューブ状に切断する。溶媒として蒸留水80mLを入れた100mLビーカーにキューブ状NIPA-CHゲル10個を設置する。これを恒温水槽中に静置し、ビーカー内の温度が所定の温度となるように調整し

Fig.1 Volume change mechanism (volume phase transition) of NIPA-CH gel and effects of acceleration for water treatment processes (①→②→③→④→⑤→⑥→⑦→①).

Fig.2 Nitrification rate as a function of time by immobilized nitrifiers on NIPA gel under various thermal operations.⁹⁾

Table 1 Composition of NIPA-CH gels and immobilized media.

Composition	Quantity
Main polymer constituent N-Isopropylacrylamide(NIPA)	7.8g
Cross-linker N,N'-Methylene-bis-(acrylamide)(BIS)	0.133g
Chromophore Chlorophyllin coppered trisodium salt(CH)	0.0722g for 1.0 CH
Accelerator N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine(TEMED)	400μL
Initiator Ammonium Persulfate(APS)	0.40g
Solution Distilled Water + Microorganisms	100mL (SS=0–600mg)

Fig.3 Temperature-stimulus response (Swelling ratio M_t/M_0) of NIPA-CH gel with different CH ratio.

た。20℃から40℃まで段階的に温度を上げ、各温度で30分間維持したゲルの質量を測定する。40℃での質量を M_0 、各温度での質量を M_t として膨潤率 M_t/M_0 (無次元)を求めた(Fig.3)。

CH濃度が1.0CH以下のゲルでは、ほとんど温度刺激に対する応答量に差はなく、膨潤率は4～8倍程度であるが、1.0CHから3.0CH、5.0CHへとCH濃度が高くなるにつれて温度応答量は大きくなり、膨潤率は15～30倍となった。これは、CH導入によりCHの有するイオン性官能基であるカルボキシル基($-COO^-$)の効果、つまり、ポリマー鎖のマイナスイオン性基間の斥力によりゲルが水膨潤し、ゲルの吸水性が高くなるために20℃時点での含水量が高く、温度上昇による疎水性の増加に伴い、ゲルから排水(ゲル収縮)される水分量が増加することによる。また、ゲル体積が不連続に変化する体積相転移温度は、膨潤率が大きく変化した34～36℃程度であった。

3.2 各CH濃度での光透過率からのゲルサイズ決定

NIPA-CHゲル膜の光透過特性を調べ、包括固定化担体としてのゲルサイズを概算するため、次式で表されるLambert-Beerの法則を用いた¹³⁾。

$$A = -\log I_t/I_0 = \epsilon c l \quad (1)$$

ここで、 A =吸光度(-)、 ϵ =モル吸光係数($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)、 c =CHモル濃度(M)、 l =溶液層(ゲル膜)の厚さ(cm)、 I_0 =入射光強度、 I_t =透過光強度である。

これより、このゲルのモル吸光係数 ϵ (各物質に特有の値)を計算し、ゲルの光透過性を求めた。厳密に言えばこのLambert-Beerの法則は主に溶液に関して用いられるものであるが、ここではNIPA-CHゲルの光透過特性を定量化するために(1)式によりモル吸光係数を求めた。

まず、光源にレフ110Vランプ(東芝)を使用し、分光測定システム(浜松ホトニクス、PMA-11)を用いて波長627nmにおける透過率(I_t/I_0)を測定し、(1)式より吸光度 A を計算する。縦軸(対数)に吸光度 A 、横軸にゲルの厚さ l をとった直線の傾きが ϵc を示し、CHモル濃度 c は既知であることから各CH濃度での ϵ を求めることができる。測定は、低温(相転移温度以下:20℃)と高温(相転移温度:34℃)域にて行い、体積変化による影響も調べた。検討対象ゲルは0.2、0.4、0.6、0.8CHのものである。

その結果、各ゲルについて20℃のゲル膨潤時も34℃のゲル収縮時もモル吸光係数は1300～1600($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)程度であり、ゲルの収縮による光の透過性にはほとんど差がなかった。そこで、NIPA-CHゲルのモル吸光係数を $\epsilon=1500(M^{-1} \cdot cm^{-1})$ と仮定し、各CH濃度での光透過率とゲル膜厚との関係を求めたものがFig.4である。

1.0～5.0CHゲルにおいて、0.5～2mm程度の厚さで透過率は50%まで低下した。このことは、包括固定する微生物の光吸収あるいは散乱を無視し、廃水処理装置の諸サイズを考慮した上で、包括固定化担体として一辺1～4mm程度のキューブ状ゲルを想定することが可能であることを示している。

3.3 NIPA-CHゲルの光刺激に対する応答

3.3.1 導入CH濃度及び周囲温度と光刺激応答量の関係

Fig.4 Transmittance of NIPA-CH gels.

Fig.5 Swelling and shrinking as a function of CH concentration and light-stimulus response (32℃).

Fig.6 Swelling and shrinking as a function of temperature of solution and light-stimulus response.

NIPA-CHゲル高分子鎖に組み込まれた色素CHが光源より照射された光エネルギーを吸収し、局所熱を発生する。この局所熱により感温性のNIPAが体積変化を起こす、という2段階の反応が光刺激応答のメカニズムである。ここでは、7種類(0.2CH、0.4CH、0.6CH、0.8CH、1.0CH、3.0CH、5.0CH)の一辺3～4mmキューブ状NIPA-CHゲルを作製し、実験に供した。2時間光刺激を与えた後、2時間遮光し、10分おきにゲルの一辺長変化を読み取り顕微鏡(Kagaku Kyoeisya Ltd., PRM-2)で測定した。光源として、SHIMADZU FIBER LIGHT 15V

Fig.7 Response to repetitive light-stimuli (34°C).

150Wハロゲンランプ(FH150A)を用いた。このランプは、熱線カットフィルターにより可視光のみを照射することができるため、熱線による温度上昇はほとんど無視できる。また、測定は恒温水槽中で行い、実験中、バルクの温度を $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 程度の変動に制御した。照射光の照度はゲル表面付近で約 $2.8 \times 10^5 (\text{lux})$ である。光照射2時間後の最も収縮した状態のゲル一辺長を L_0 、各時点でのゲル一辺長を L_t として、体積変化を膨潤率 $L_t^3/L_0^3 = V_t/V_0$ で無次元表示した。

Fig.5はCH量と光刺激応答量の関係を表したもので、ゲル周囲温度は 32°C である。CH濃度が高くなるほど光刺激応答量は増加する。また、1.0CH未満のゲルでは応答量にほとんど差が無いことから、CH量が少なすぎると収縮に十分な局所熱が発生しないことが分かる。Fig.6に、周囲温度条件と光刺激応答量の関係を示した。体積相転移温度に近く、応答量が大きいと思われる $30, 32, 34^\circ\text{C}$ に温度を設定した。これ以上の温度になると体積相転移温度を超えてしまい、大きな体積変化は望めない(Fig.3)。CH量が増えるほど、また、Fig.3に示した体積相転移温度に近いほど、光刺激応答量は大きくなり、 34°C では5.0CHで10倍程度の収縮能力を有する。これはCH濃度の高い方が光エネルギーを熱エネルギーに変換するプロセスが優れていることを意味する。以上の結果から、本研究で用いたNIPA-CHゲルを包括固定化担体として使用する際には5.0CH、 34°C という条件が望ましいと言える。

3.3.2 光刺激に対する繰り返し応答性

Fig.5やFig.6に示したように光刺激によって一度収縮したゲルは初期体積まで回復するのに時間がかかることから、周期的光刺激に対する応答を調べた。3.3.1と同様の実験系において、1.0CH、3.0CH、5.0CHの3種類のNIPA-CHゲルを用いて、光刺激に対する繰り返し応答性を調べた。実験は、体積相転移温度に近い 34°C に保ち、ゲルに1時間光を照射した後、1時間遮光した。これを繰り返して連続30時間測定した。ゲルの一辺長を読み取り顕微鏡で測定し、実験開始1時間後のゲルの一辺長を L_0 、各時点でのゲルの一辺長を L_t として、体積変化を膨潤率 $L_t^3/L_0^3 = V_t/V_0$ で無次元表示した。実験結果をFig.7に示した。

ゲルが光照射前の状態に戻らないのは、実験初期の1サ

Fig.8 Temperature-stimulus response in a high ionic strength solution.

Fig.9 Light-stimulus response in a high ionic strength solution (5.0CH, 34°C).

イクルのみで、その後のサイクルでは、収縮・膨潤のサイクルはほぼ定常状態となった。つまり、最も収縮した時点からの膨潤率がその後の繰り返し応答性にとって重要である。廃水処理において生物反応槽に投入する担体として適用する際には、繰り返し耐性が要求されるが、 34°C 条件下では光刺激によって3倍もの膨潤・収縮能力が繰り返し期待できる。これにより、ゲル内部への基質の十分な移

流・拡散効果が期待でき、微生物を包括固定化した際にその活性を高めることができると考えられる。

3.4 温度刺激応答性に対する溶媒中の共存イオンによる影響

NIPA-CHゲルの膨潤・収縮に共存イオンが与える影響を調べるため、福岡市東部下水処理場の好気槽および消化槽から汚泥懸濁液を採取し、遠心分離・ろ過したろ液を溶媒として、温度刺激実験を行った。

3.1と同様な実験系において、蒸留水(DW)およびイオン強度が高いと考えられる好気槽活性汚泥懸濁液の上澄水(SolventA)、それよりもさらにイオン強度が高いと考えられる嫌気性汚泥消化槽上澄水(SolventB)を溶媒とした。イオン強度を定量化するために、電気伝導度を測定したところ、蒸留水が $1.2(\text{mS}\cdot\text{m}^{-1})$ 、SolventAでは $0.144(\text{S}\cdot\text{m}^{-1})$ 、SolventBでは $0.746(\text{S}\cdot\text{m}^{-1})$ であった。20℃から段階的に40℃まで温度を変化させたときのゲルの体積変化の様子をFig.8に示す。

ゲル膨潤率は、SolventAでは平均31%、SolventBでは平均48%低下した。この結果から、溶媒中のイオン強度がゲルの膨潤・収縮に影響を与えることがわかる。すなわち、イオン強度が高いほどゲルの膨潤率は低下すること、この種のゲルの廃水処理への利用の際には注意を要する。

3.5 光刺激応答性に対する溶媒中の共存イオンによる影響

3.3で行った実験と同様の光刺激応答実験を、イオン強度の高い溶媒中で行った。使用したゲルは5.0CH、ゲル周囲温度は34℃である。溶媒として用いたのは、蒸留水(DW)および好気槽汚泥の上澄水(SolventA)の2種である。実験結果をFig.9に示した。

蒸留水中での光刺激応答と比較すると、溶媒に共存イオンが存在する場合、初期体積からの収縮率においては14倍程度あったものが6倍程度まで低下している。しかし、3.3.2で示したように、連続使用する際には、初期体積からどれだけ収縮したかではなく、最も収縮した後、どれだけ膨潤するかという点が重要である。つまり、実験開始240分後の値から、イオン強度のある場合でも2.5倍程度の繰り返し膨潤率が得られると言える。

3.6 包括固定化した微生物による光透過阻害

5.0CH、3.0CHおよび1.0CHのNIPA-CH包括固定化担体(一辺3~4mm、キューブ状)を用いて、3.3や3.5と同様の実験により微生物が光刺激応答性に与える影響について検討した。ゲルの一辺長を読みとり顕微鏡で測定し、光照射前のゲルの一辺長を L_0 、各時点でのゲルの一辺長を L_t として、体積変化を膨潤率 $L_t^3/L_0^3 = V_t/V_0$ で無次元表示した。実験は、体積相点移温度に近く、光刺激に対する応答量が大いと思われる34℃に保ち、ゲルに2時間光を照射した後、2時間遮光した。Fig.10(a)-(c)に実験結果を示した。(a),(b),(c)はCH濃度がそれぞれ5.0CH、3.0CH、1.0CHにおける結果である。また包括固定化した微生物濃度を高分子溶液中でのSS(0~600mg $\cdot\text{L}^{-1}$ -gel)で表示した。

包括固定した微生物の光吸収・散乱により、微生物濃度

Fig.10 Prevention to light-stimulus response by immobilized microorganisms.(a)5.0CH,(b)3.0CH,and (c)1.0CH.

の増加に伴い NIPA-CH ゲルの膨潤量は低下しているものの、5.0CHのゲルの場合、1時間程度の膨潤時間で3倍程度の十分な膨潤率が得られた。応答量の減少が微生物濃度に一部比例していない理由は、包括固定化の際の微生物の分散が不均一であることに起因していると考えられる。

ここでの最大の微生物濃度は600mg-SS $\cdot\text{L}^{-1}$ -gelと低く、さらに、長期間のこの種のゲルの実使用において、担体内での微生物の増殖を考慮すると、より一層膨潤率の大きな光機能性材料の開発が望まれる。前述のように、本研究で

利用したNIPA-CHゲルでは、光照射によるCHの局所熱生成に伴い温度刺激応答性NIPAが体積相転移を引き起こすメカニズムとなっており、局所熱の散逸は膨潤率の低下を招く。したがって、温度刺激応答性ゲルの利用といった間接的な光刺激応答性物質ではなく、将来、光エネルギーによるゲル分子骨格のコンフォメーションにより、直接的な光誘因性の体積相転移が可能な高品質の光刺激応答性材料¹⁴⁾が開発されれば、廃水処理のための包括固定化担体としてのその利用を検討すべきであろう。また、様々な廃水中の懸濁物質による光の吸収・散乱も予想され、光機能性材料の開発と同時に、光照射方法についての検討も必要である。

4. まとめ

本研究では、光刺激に対するNIPA-CHゲルの体積相転移速度や変化量、繰り返し応答性、包括固定化した微生物のこれらに対する影響などについて明らかにし、廃水処理を担う微生物の包括固定化担体としての利用可能性について検討した。本研究から得られた主な結論を以下に示す。

1) 5.0CHのCH濃度条件で、また、体積相転移温度に近い34℃の温度条件で3倍程度の膨潤という非常に大きな体積変化が起きること、

2) 同条件下において、3倍程度の応答量が繰り返し期待できること、

3) 光透過率等に関する検討から、担体サイズは一辺4mm程度のキューブ状が適当であること、

4) 溶媒に共存イオンが存在する場合、多少の膨潤率の低下は見られるものの、5.0CHにおいて、1時間の膨潤時間で3倍程度という廃水処理の促進効果を得るに十分な膨潤率を確保できること、

5) 微生物を包括固定化することによる光の透過・吸収への阻害はあるものの、600mg-SS・L⁻¹-gel程度の微生物濃度であれば5.0CHのCH濃度条件下で、(1)と同程度の十分な膨潤率を期待できること、等が確認された。

Fig.2の実験に用いられた温度応答機能性NIPAゲルと比較すると、光刺激応答NIPA-CHゲルは約2～3倍の膨潤率を有していた。この温度応答性ゲルでは実際に硝化促進の実績が得られていることから、NIPA-CHゲルを廃水処理へ適用した際にも処理の促進の可能性を十分に期待できる。ただし、光照射に応答するというNIPA-CHゲルの性質上、担体設置槽内のSS成分やゲルに包括固定した微生物そのものにより光吸収・散乱等の阻害を受けることや、システム内での光照射の方法についての検討が必要である。

また、今回の実験で設定したゲル周囲溶媒の温度が34℃という条件は、下水処理においては非現実的な温度であるが、機能性材料分野は日進月歩で進歩しており、今後、より低温でより大きな膨潤・収縮能力のあるものが開発され

る可能性がある。安全性、コスト等の諸条件をクリアすることが出来れば、包括固定化担体のための新材料としての利用を視野に入れることができるであろう。

謝 辞

機能性ゲルに関して様々な形でご指導頂いた九州大学大学院工学研究院入江正浩教授に深く感謝の意を表す。また、本研究は、平成10年度および平成11年度文部省科学研究費（光刺激応答機能性高分子材料の水処理システムへの応用、基盤研究(B)(2)、研究課題番号10555195)の援助を受けて行われたことをここに記して謝意を表す。

(原稿受付 2001年1月25日)

(原稿受理 2001年6月9日)

参 考 文 献

- 1) Emori, H., Nakamura, H., Sumino, T., Takeshima, T. and Motegi, K. (1994) High Rate and Compact Single Sludge Pre-denitrification Process for Retrofit, IAWQ 17th Biennial International Conference, Conference preprint book 1, 31-40.
- 2) 篠塚靖夫 (1998) 既存施設の改造でやれる高度処理技術 - ベガス, 月刊下水道, 21, No.6, 49-52.
- 3) 浦田健一, 村上孝雄, 野月宏美, 樋川資朗, 篠田猛, 白井正明 (1996) 包括固定化硝化細菌による排水の窒素除去技術の開発, 環境研究, No. 103.
- 4) Tjihuis, L. (1994) The Biofilm Airlift Suspension Reactor, Ph.D. thesis, TU Delft.
- 5) 風間哲也, Alvear, O., 大橋昌良, 桃井清至 (1996) 生物膜内硝化活性に及ぼす基質影響の微小電極による評価, 土木学会第51回年次学術講演会, 104-105.
- 6) 大橋昌良, 渡辺亮, 原田秀樹 (1996) 微小電極と数学モデルによる嫌気性微生物グラニュール内の基質濃度とpHプロファイルの評価, 環境工学研究論文集, 33, 235-245.
- 7) Park, T.G. and Hoffman, A.S. (1989) Immobilization of *Arthrobacter simplex* Cells in Thermally Reversible Hydrogels: Comparative Effects of Organic Solvent and Polymeric Surfactant on Steroid Conversion, *Biotechnology Letters*, 11, No.1, 17-22.
- 8) Park, T.G. and Hoffman, A.S. (1989) Immobilization of *Arthrobacter simplex* in a Thermally Reversible Hydrogel: Effect of Temperature Cycling on Steroid Conversion, *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 152-159.
- 9) 進藤建治, 久場隆広, 楠田哲也 (1999) 機能性ゲルの体積相転移が硝化活性にもたらす効果, 土木学会第54回年次学術講演会, VII, 334-335.
- 10) 西山大策, 久場隆広, 楠田哲也 (1998) 機能性物質クロロフィリンを導入した硝化促進型包括固定化担体の開発, 第36回下水道研究発表会講演集, 574-576.
- 11) Suzuki, A. and Tanaka, T. (1994) Phase Transition in Polymer gels Induced by Visible Light, *Nature*, 346, 345-347.
- 12) Suzuki, A., Suzuki, H., Sakashita, O. and Sakuyama, H. (1994) Phase Transition in Polymer gels due to Local Heating by Illumination of Light, *Phase Transitions*, 47, 161-181.
- 13) 岡山繁樹, 高橋義夫, 若松國光, 小泉修 (1981) 生命とエネルギー, 共立出版株式会社, 22-35.
- 14) 入江正浩, 長田義仁, 片山誠二 (1989) メカノケミストリー, 丸善株式会社, 21-53.