有機酸の選択的分離が可能な リパーゼ-オルガノゲル膜システムの開発

都英次郎¹⁾・丸山達生¹⁾・神谷典穂¹⁾・後藤雅宏^{1, 2)}*

1) 九州大学大学院工学研究院応用化学部門 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1

2) 科学技術振興機構 さきがけ21 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1

Selective Separation of Organic Acids through a Lipase-facilitated Organogel Membrane

Eijiro Miyako¹⁾, Tatsuo Maruyama¹⁾, Noriho Kamiya¹⁾, and Masahiro Goto^{1, 2)}*

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University¹⁾, and PRESTO JST²⁾
6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

We have developed a lipase-facilitated organogel membrane for selective separation of organic acids. We previously demonstrated that lipase-catalyzed reactions drove transport of organic acids through a supported liquid membrane. In this study, a lipase-facilitated liquid membrane was gelled with 12-hydroxystearic acid to stabilize the liquid membrane phase. The lipase-facilitated organogel membrane exhibited the improved stability of the liquid membrane phase compared with a non-gelled supported liquid membrane, although the permeate flux of an organic acid through the organogel membrane was less than that through the non-gelled liquid membrane. The lipase-facilitated organogel membrane demonstrated the selective separation of 3-phenoxypropionic acid from various organic acids due to the substrate specificity of lipases. Enantioselective separation of (S)-ibuprofen from racemic ibuprofen was also achieved owing to the enantioselectivity of lipase.

Key words : enzymatic reaction / lipase / organic acids / organogel membrane / selective separation / supported liquid membrane

1. 緒 言

混合物の中から目的物質を分離する技術は、社

会的・産業的要請が高く、古くから数多くの研究がなされている。膜分離システムは代表的な分離技術の一つであり、その汎用性および比較的容易な操作性から、幅広く利用されている。特に高分子を膜基材とする膜ろ過は、対象物の大きさに基づき物質を分離可能なシステムとしてこれまで多くの実績がある。しかしながら、膜ろ過では、似

* Corresponding Author
Tel / fax : 092-642-3575
e-mail :

Fig. 1 Concept of the separation of organic acids through a lipase-facilitated organogel membrane.

たような大きさに異なる性質を有する物質を分離することは不可能である。一方、構造異性体で代表される類似化合物の精製は、分子のサイズではなくその分子構造の違いにより分離する必要があるため、これまで分子蒸留やクロマトグラフィーが産業的に用いられてきた。しかしながら、これらの方法では大量処理が難しく、精製に手間と時間が要求される。したがって、このような類似化合物を簡便に分離する膜材料の開発の工学的価値は非常に高いと考えられる。

分子構造に基づく選択的分離技術の一つとして、分子認識化合物を用いた支持液膜の研究が数多く報告されてきた^{1,2)}。この支持液膜は、主に金属イオンを分離対象として盛んに研究が行われてきている。例えば、有機溶媒を高分子膜に含浸させ、その有機溶媒中に分子認識能を有する低分子化合物を溶かし込み、金属イオンを選択的に捕捉・分離するというものである。一方、有機化合物の選択的分離に関しては複雑な構造を有する抽出剤を用いた研究例が数例存在するが³⁾、その選択性は十分であるといえない。また、支持液膜は揮発性の溶剤を使用するため液膜の長期安定性に

乏しく、実用化における大きな障害となっている。

一方、生体分子は一般に高い物質認識能を有し、生体内における様々な物質輸送・化学反応に関わっている。特に、生体触媒である酵素は高い基質特異性を有し、無機触媒では実現が困難な高選択的な反応を触媒する。とりわけ酵素リパーゼは、その基質特異性やエナンチオ選択性を生かした数多くの研究が行われている^{4,5)}。そこで我々は、支持液膜にリパーゼ触媒反応を組み込むことで、リパーゼの高い分子認識能に基づく選択的分離が可能な支持液膜をこれまで開発してきた⁶⁻⁸⁾。

支持液膜の大きな問題点である低い液膜安定性を改善する一つの方法論として、液膜のゲル化が挙げられる⁹⁾。低分子オルガノゲル化剤は、比較的少量で有機溶媒中に分子間相互作用による3次元ゲルネットワークを形成することができ¹⁰⁻¹²⁾、液膜相を比較的安定に保持可能である。そこで本研究では、低分子オルガノゲル化剤を用いてリパーゼ-支持液膜のゲル化を行い、リパーゼ-オルガノゲル膜における有機酸の透過挙動ならびにその膜安定性を検討した。

本リパーゼ-オルガノゲル膜による有機酸透過の概念は、リパーゼの触媒反応を駆動力とし、リパーゼに認識された有機酸のみがオルガノゲル膜を透過し、分離されるというものである (Fig. 1). 供給水相中の有機酸A ($R_A\text{COOH}$, 水溶性) は、界面1あるいは供給相中でリパーゼCRL (*Candida rugosa*由来) によって油溶性のエチルエステル体に変換され、オルガノゲル膜中に溶解する. その後、オルガノゲル膜中に溶解した有機酸エチルエステルは、界面2においてリパーゼPPL (porcine pancreas由来) によって加水分解され、回収水相側に溶け込む. つまり、リパーゼによって認識された有機酸Aのみがオルガノゲル膜を透過し、透過側水相に回収されるという仕組みである.

2. 実験条件および測定方法

2.1 試薬

リパーゼCRL (EC 3.1.1.3, Type VII from *Candida rugosa*) とリパーゼPPL (EC 3.1.1.3, Type II from porcine pancreas) はSigma社から市販品を購入し、精製せずにそのまま使用した. 多孔質ポリプロピレンフィルム (Celgard 2500) はCelgard社から提供していただいた. 12-ヒドロキシステアリン酸、3-フェノキシプロピオン酸 (3-PPA)、2-フェノキシブタン酸 (2-PBA)、イブプロフェン (2-(4-イソブチルフェニル) プロピオン酸) は和光純薬 (株) から、2-アミノ-2-フェニルブタン酸 (2-A-2-PBA) はAldrich社から市販品を購入し、それぞれそのまま使用した.

2.2 実験操作

2.2.1 オルガノゲル膜の調製

支持膜として疎水性ポリプロピレンフィルム (Celgard 2500, 孔径; 0.21×10^{-6} m, 膜厚; 25×10^{-6} m, 空隙率; 55%) を用いた. オルガノゲル膜は、 2×10^{-6} m³のイソオクタン (2,2,4-トリメチルペンタン) に低分子オルガノゲル化剤12-ヒドロキシステアリン酸 (10 kg/m^3) を333Kで溶解させた後、Celgard 2500をこの溶媒に数秒含浸させ

ることで調製した.

2.2.2 有機酸の膜透過実験

有機酸の膜透過実験は、取り外し可能な2つのガラスセルからなる膜透過装置を用いて行った. 調製したオルガノゲル膜は2つのガラスセルの間に挟み入れた (有効膜面積は $5 \times 10^{-3} \text{ m}^2$). 実験は、溶液攪拌条件下310 K一定で行った. 供給相 (容積: $55 \times 10^{-3} \text{ m}^3$) には、 30 kg/m^3 のリパーゼCRL, 65 vol%のエタノール水溶液, $10 \times 10^{-3} \text{ mol} \times \text{dm}^3$ の3-PPAを溶解させたMcIlvaine緩衝液 (pH 6.3) を用いた. 一方、回収相 (容積: $55 \times 10^{-3} \text{ m}^3$) には、 20 kg/m^3 のリパーゼPPLを溶解させたMcIlvaine緩衝液 (pH 6.3) を用いた. また、酵素を除いた対照実験も行った. 有機酸の透過量は、供給相と回収相をそれぞれ $0.5 \times 10^{-6} \text{ m}^3$ サンプリングし、シリンジでろ過した後、50 wt%のトリクロロ酢酸を $2.5 \times 10^{-9} \text{ m}^3$ 加え、さらに、シリンジでろ過した後、254 nmの波長でHPLC [LC-10AT, 島津, ODSカラム ($4 \times 250 \text{ mm}$, GLサイエンス)] を用いて測定した.

イブプロフェン (2-(4-イソブチルフェニル) プロピオン酸) の光学分割に関しては、 $10 \times 10^{-3} \text{ mol} \times \text{dm}^3$ のラセミイブプロフェンを供給相に添加し、上記と同様に実験を行った. イブプロフェンの透過量は、254 nmの波長でキラルAD-RHカラム ($4 \times 250 \text{ mm}$, GLサイエンス) を用いて測定した. このとき、鏡像体過剰率 (ee値 = $100 \times ([S] - [R]) / ([S] + [R]) [\%]$) および透過における鏡像体選択率 ($E_{\text{value}} = J_S/J_R$, J_S , J_R はそれぞれ (S) -および (R) -イブプロフェンの初期透過流速 [$\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]) を求めた.

2.2.3 エタノールの透過実験

エタノールの透過実験は、膜透過装置を用い、溶液攪拌条件下310 K一定で行った. 供給相は、50 vol%のエタノール水溶液からなる. 一方、回収相は、McIlvaine緩衝液 (pH 6.3) からなる. エタノールの透過量は、供給相と回収相をそれぞれ $0.5 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ サンプリングし、シリンジでろ過

Fig. 2 Lipase-facilitated transport of 3-PPA (3-phenoxypropionic acid) through the organogel membrane. Lipase-facilitated organogel membrane: 3-PPA concentration in the feed phase (○) and 3-PPA in the receiving phase (●); The control organogel membrane without lipases: 3-PPA in the feed phase (□) and 3-PPA in the receiving phase (■). The feed phase consisted of McIlvaine buffer (pH 6.3), 30 kg/m³ CRL, 10 × 10⁻³ mol/dm³ 3-PPA and 65 vol% of ethanol. The receiving phase consisted of McIlvaine buffer (pH 6.3) containing 20 kg/m³ PPL. The organogel membrane consisted of isooctane containing 10 kg/m³ 12-hydroxystearic acid.

した後、ガスクロマトグラフィー (HP6890, 横川, HP-5MSカラム, J&W Scientific) を用いて測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 有機酸の透過挙動

支持液膜中のイソオクタン (2,2,4-トリメチルペンタン) を低分子オルガノゲル化剤12-ヒドロキシステアリン酸によりゲル化させ、このオルガノゲル膜における3-フェノキシプロピオン酸 (3-PPA) の透過挙動を検討した (Fig. 2)。この結果、供給相にリパーゼCRL, 回収相にリパーゼPPLが存在する場合、時間とともに供給相中の3-PPA濃度が減少し、それと対応するように回収相中の3-

Fig. 3 Transport of 3-PPA through the organogel membrane and the non-gelled liquid membrane. 3-PPA concentration in the receiving phase using the organogel membrane (●) and the non-gelled membrane (■). The feed phase consisted of McIlvaine buffer (pH 6.3) containing 30 kg/m³ CRL, 10 × 10⁻³ mol/dm³ 3-PPA and 65 vol% ethanol. The receiving phase consisted of McIlvaine buffer (pH 6.3) containing 20 kg/m³ native PPL. Both organogel and non-gelled membranes were prepared using isooctane.

PPA濃度は増加した。48時間後には供給相および回収相中の3-PPA濃度はそれぞれ5.3, 4.6 × 10⁻³ mol/dm³に達した後、全く変化が見られなかった。次に、供給相, 回収相いずれかにリパーゼが存在しない場合を検討した結果、3-PPAは全く回収相側に輸送されないことがわかった。これまで、我々はゲル化していない液膜においても同様の知見を得ており、用いる酵素の活性により有機酸の液膜透過挙動に違いが生じることを確認している⁶⁾。これらの結果から、オルガノゲル膜においてもFig. 1に示すようにリパーゼの触媒反応を駆動力に膜を介した3-PPAの輸送が行われたと考えられる。

また、本実験系におけるエタノールの透過挙動を測定した結果、時間とともに供給相中のエタノール濃度が減少し、回収相中のエタノール濃度が増加した。両相のエタノール濃度は、12時間付近で25 vol%に達し、その後変化が見られなかった。

Table 1 Effect of solvents on the initial permeate flux of 3-PPA and on the break point.

Solvents	Oraganogel membrane			Non-gelled liquid membrane*	
	Organogelator concentration	Break point	Initial permeate flux of 3-PPA	Break point	Initial permeate flux of 3-PPA
	[kg/m ³]	[h]	10 ⁻⁶ [mol/(m ² ·s)]	[h]	10 ⁻⁶ [mol/(m ² ·s)]
Benzene	10	150	37	73	196
Toluene	25	150	8	70	223
Cyclohexane	10	150	24	72	159
<i>n</i> -Dodecane	10	143	36	75	88
Isooctane	10	120	133	72	226
<i>n</i> -Octane	10	118	64	72	221
<i>n</i> -Heptane	10	117	57	71	148
<i>n</i> -Hexane	40	117	20	72	216

* Ref. 8.

供給相中のエタノール濃度が減少したため、リパーゼCRLによる3-PPAエチルエステルの合成効率が次第に減少し、48時間付近から3-PPAの透過量に、変化が見られなかったと考えられる。

3.2 オルガノゲル膜の安定性と有機溶媒の種類の影響

液膜をゲル化させないリパーゼ-支持液膜システムとリパーゼ-オルガノゲル膜システムでの3-PPA透過挙動を観察した (Fig. 3)。リパーゼ-オルガノゲル膜の場合、回収相中の3-PPA濃度がおよそ $4.6 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ に到達後、120時間まで変化がなかった。一方、液膜のゲル化を伴わないリパーゼ-支持液膜の場合、回収相中の3-PPA濃度は、50時間で最大になった後、75時間付近から減少し始め、最終的には $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ となった。これは、ゲル化を伴わないリパーゼ-支持液膜システムの場合、75時間付近で液膜の崩壊が起こったため、供給相および回収相の3-PPAが自由に反対側の相に行き来可能な状態となり、最終的に $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ になったと考えられる。つまり、液膜をゲル化することで液膜の安定性が向上することが明らかとなった。一方、透過流束に関しては、オルガノゲル膜では、ゲル化を伴わない液膜と比較して初期透過流束が約6割に減少した。こ

れは、リパーゼCRLによって生成した3-PPAエチルエステル体の膜中での分子拡散が³、オルガノゲル膜中のゲルネットワークによって抑えられたために初期透過流束が減少したと考えられる。

支持液膜中の有機溶媒の種類は、有機化合物の透過量や液膜の安定性を決定する重要な因子の一つである^{1-3, 13, 14}。また、二相系界面を利用した酵素反応は有機溶媒の種類によって酵素活性や選択性が大きく変化することが知られている¹⁵⁻¹⁷。そこで、イソオクタンに加えて7種類の疎水性有機溶媒（トルエン、ベンゼン、シクロヘキサン、*n*-ペンタン、*n*-ヘキサン、*n*-ヘプタン、*n*-オクタン、*n*-ドデカン）を用いてオルガノゲル膜を調製し、3-PPAの初期透過流束とオルガノゲル膜の安定性について検討した (Table 1)。液膜の崩壊により回収相中の3-PPA濃度が減少し始める時間をブレイクポイントと定義し、これを膜安定性の指標とした。オルガノゲル間で初期透過流束を比較したところ、イソオクタンゲルを用いた場合、3-PPAに対する初期透過流束が最大となり、トルエン < *n*-ヘキサン < シクロヘキサン < *n*-ドデカン < ベンゼン < *n*-ヘプタン < *n*-オクタン < イソオクタンの順番に透過流束が増加していることが明らかとなった。これらの透過流束の違いには、次の二点の理由が考えられる。第一に、生成した3-PPAのエチルエステル体の有機溶媒への溶解性、第二

Fig. 4 Transports of organic acids through the lipase-facilitated organogel membrane. The concentrations of (●) 3-PPA, (■) 2-PBA and (▲) 2-A-2-PBA in the receiving phase. The feed phase consisted of McIlvaine buffer (pH 6.3) containing 30 kg/m³ CRL, organic acids (3-PPA, 2-PBA and 2-A-2-PBA, 10×10^{-3} mol/dm³ each) and 65vol% of ethanol. The receiving phase consisted of McIlvaine buffer (pH 6.3) containing 20 kg/m³ PPL. The organogel membrane consisted of isooctane containing 10 kg/m³ 12-hydroxystearic acid.

に水/有機溶媒の二相系界面におけるリパーゼの活性である。リパーゼは油水界面に吸着するが、その酵素活性は有機溶媒の種類に大きく依存することが知られている^{16, 17)}。また、オルガノゲル膜とゲル化を伴わないリパーゼ-支持液膜を比較すると、いずれの有機溶媒を用いた場合もゲル化により初期透過流束の減少が観察された。これは、前述したように3-PPAエチルエステル体の膜中での分子拡散が、オルガノゲル膜中のゲルネットワ

ークによって抑えられたためと考えられる。一方、ブレイクポイントに関しては、いずれのオルガノゲル膜もゲル化を伴わない液膜に比較してブレイクポイントの増加が観測された。これは、オルガノゲル中のゲルネットワークが、有機溶媒を強固に保持し、溶媒の揮発および水相への漏出を防いだためと考えられる。とりわけ、環状構造を有するベンゼン、トルエン、シクロヘキサンなどのオルガノゲル膜では150時間に渡り安定な支持液膜が得られた。また、鎖状構造を有する溶媒は、 n -ヘキサン $<n$ -ヘプタン $<n$ -オクタン $<$ イソオクタン $<n$ -ドデカンとアルキル鎖長の増加に伴い、ブレイクポイントの増加が見られた。また、それぞれのオルガノゲルを目視による観察を行った結果、ベンゼン、トルエン、シクロヘキサンは、透明なゲルを形成しており、 n -ヘキサン、 n -ヘプタン、 n -オクタン、イソオクタン、 n -ドデカンは、白濁したゲルを形成していた。つまり、前者の溶媒ではゲルネットワークが均一に溶媒を保持しているため液膜がより安定性を増したと考えられる。一方、後者の溶媒ではゲルネットワークが不均一に発達しているため、前者に比べて液膜の安定性が低下したと考えられる¹²⁾。

3.3 有機酸の選択的分離

本リパーゼ-オルガノゲル膜システムを利用した有機酸の選択的分離について検討した。有機酸として3-PPAの他に、2-フェノキシブタン酸 (2-PBA) と2-アミノ-2-フェニルブタン酸 (2-A-2-PBA) を供給相に共存させ、イソオクタンからなるオルガノゲル膜における各有機酸の透過挙動を検討した。結果をFig. 4に示した。他の有機酸が共存する状況でも、一級カルボン酸である3-PPAは、前述同様にオルガノゲル膜を介して透過することが確認された。一方、二級カルボン酸である2-PBAも、オルガノゲル膜を透過したが、その透過流束は3-PPAの約三分の一程度であった。三級カルボン酸である2-A-2-PBAは、オルガノゲル膜を全く透過しなかった。一般に、リパーゼの反応性は一級 $>$ 二級 $>$ 三級カルボン酸(あるいはアルコール)

Fig. 5 Enantioselective transport of (S)-ibuprofen through the lipase-facilitated organogel membrane. (S)-Ibuprofen concentrations in the feed phase (○) and the receiving phase (●), (R)-ibuprofen concentrations in the feed phase (□) and the receiving phase (■). The feed phase consisted of McIlvaine buffer (pH 6.3) containing 30 kg/m³ CRL, 10×10⁻³ mol/dm³ racemic ibuprofen and 65 vol% ethanol. The organogel membrane consisted of isooctane containing 10 kg/m³ 12-hydroxystearic acid. The receiving phase consisted of McIlvaine buffer (pH 6.3) containing 20 kg/m³ native PPL.

の順に減少することが知られている^{18~20)}。したがって、リパーゼの基質になりやすい3-PPAが最もオルガノゲル膜を透過しやすく、反応性の劣る2-PBAが透過流速は低いながらも透過し、リパーゼの基質になりにくい2-A-2-PBAはほとんど透過しなかったものと考えられる。これらの結果から、リパーゼの基質特異性に基づく、オルガノゲル膜を介した有機酸の選択的分離が可能であることが示された。

3.4 イブプロフェンの光学分割

光学異性体の分離は、食品、医薬品のみならず様々な分野において極めて重要である。本リパーゼ-オルガノゲル膜システムを用いて、医薬品として用いられているイブプロフェン (2- (4-イソ

ブチルフェニル) プロピオン酸) の光学分割を検討した。10×10⁻³ mol/dm³のラセミックプロフェンを供給相に添加し、各エナンチオマーの透過挙動を調べた (Fig. 5)。その結果、(S)-イブプロフェンが (R)-体 に比して選択的に透過することが明らかとなった。ここで、(S)-イブプロフェンの48時間後の鏡像体過剰率 ee 値と鏡像体選択率 E_{value} を求めたところ、 $ee=60.1$ [%]と $E_{value}=3.92$ が得られた。これまでリパーゼCRLによる加水分解あるいは合成反応を利用したイブプロフェンの光学分割は数多く報告されており^{8, 20~23)}、本システムにおいても、リパーゼCRLのエナンチオ選択性により、オルガノゲル膜を介したイブプロフェンラセミ体の光学分割が可能になったものと推察される。

4. 結 言

本研究では、低分子オルガノゲル化剤を用いリパーゼ-支持液膜のゲル化を行い、リパーゼ-オルガノゲル膜における有機酸の透過挙動ならびにその膜安定性について詳細な検討を行った。その結果、次の3つの知見を得ることができた。(1) リパーゼ反応を駆動力にオルガノゲル膜を介した有機酸の透過に成功した。(2) オルガノゲル化剤で液膜をゲル化させることで、その安定性が大幅に向上することが明らかとなった。(3) リパーゼ-オルガノゲル膜によるエナンチオ選択的な物質透過により、イブプロフェンラセミ体の光学分割を達成した。今後更に検討を進め、生体触媒反応を駆動力に、多様な有用有機化合物に対応可能な支持液膜分離システムを開発したいと考えている。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省21世紀COEプログラム「分子情報科学の機能イノベーション」ならびに向科学技術振興財団の援助により行われた。ここに記して感謝致します。

文 献

- 1) Jönsson JÅ, Mathiasson L : *Trends Anal. Chem.*, **18** 318-334 (1999)
- 2) Jönsson JÅ, Mathiasson L : *J. Chromatogr. A*, **902** 205-225 (2000)
- 3) de Gyves J, de Miguel ER : *Ind. Eng. Chem. Res.*, **38** 2182-2202 (1999)
- 4) Kirchner G, Scollar MP, Klivanov AM : *J. Am. Chem. Soc.*, **107** 7072-7076 (1985)
- 5) Chen C-S, Wu S-H, Girdaukas G, Sih CJ : *J. Am. Chem. Soc.*, **109** 2812-2817 (1987)
- 6) Miyako E, Maruyama T, Kamiya N, Goto M : *J. Biosci. Bioeng.*, **96** 370-374 (2003)
- 7) Miyako E, Maruyama T, Kamiya N, Goto M : *Biotechnol. Lett.*, **20** 805-808 (2003)
- 8) Miyako E, Maruyama T, Kamiya N, Goto M : *Chem. Commun.*, 2926-2927 (2003)
- 9) Neplenbroek AM, Bargeman D, Smolders CA : *J. Membr. Sci.*, **67** 149-165 (1992)
- 10) Tachibana T, Mori T, Hori K : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **53** 1714-1719 (1980)
- 11) Tamura T, Suetake T, Ohkubo T, Ohbu K : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71** 857-861 (1994)
- 12) Terech P, Weiss RG : *Chem. Rev.*, **97** 3133-3159 (1997)
- 13) Branco LC, Crespo JG, Afonso CAM : *Angew. Chem. Int. Edit.*, **41** 2771-2773 (2002)
- 14) Branco LC, Crespo JG, Afonso CAM : *Chem. Eur. J.* **17** 3865-3871 (2002)
- 15) Villela M, Stillger T, Müller M, Liese A, Wandrey C : *Angew. Chem. Int. Edit.*, **42** 2993-2996 (2003)
- 16) Maruyama T, Nakajima M, Ichikawa S, Nabetani H, Furusaki S, Seki M : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **77**, 1121-1126 (2000)
- 17) Maruyama T, Nakajima M, Seki M : *J. Biosci. Bioeng.*, **92** 242-247 (2001)
- 18) Godfrey T : *Lipid. Technol.*, **7** 58-61 (1995)
- 19) Rethwisch DG, Subramanian A, Yi G, Dordick JS : *J. Am. Chem. Soc.*, **112** 1649-1650 (1990)
- 20) Rethwisch DG, Parida S, Yi G, Dordick JS : *J. Membr. Sci.*, **95** 83-91 (1994)
- 21) Klivanov AM : *Acc. Chem. Res.*, **23** 114-120 (1990)
- 22) Goto M, Noda S, Kamiya N, Nakashio F : *Biotechnol. Lett.*, **18** 839-844 (1996)
- 23) Mustranta A : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38** 61-66 (1992)

(受付 2004年2月26日 掲載決定 4月27日)