固定化酵素の利用に関する理論的ならびに実験的研究†

(昭和 56 年度農芸化学奨励賞受賞)

小 林 猛

(名古屋大学農学部, 現在: 名古屋大学工学部)

はじめに

1953 年に Grubhofer ら⁽¹⁾がジアゾ化したポリアミノポリスチレン樹脂に酵素を固定化して以来, 固定化酵素に関する研究報告は指数関数的に増加している. 酵素のもつ特異的な触媒活性を保持したままで, 安定で水に不溶性の酵素, すなわち固定化酵素が水に溶けた状態の酵素と比べて最も優れている点は再利用が容易なことである. 固定化に用いる酵素は通常微生物起源のものであり, 菌体内の酵素を抽出し, 精製し, 固定化すると, この間に相当の酵素活性が失われる. そこで最近では酵素活性の高い微生物を固定化し, 細胞膜の基質透過性をよくする処理をして利用する固定化微生物, さらに生きたまま利用する固定化増殖微生物が開発されてきた.

固定化酵素を工業的に利用する場合, 酵素を固定化するのに要する経費が安価なこと, 固定化後の酵素活性が高いこと, 固定化酵素の操作安定性がよいこと, 目的とする生成物の精製が容易なことなどを解決し, 経済性の高い反応プロセスとすることが必須条件である. これまで, アセチル-DL-アミノ酸を加水分解して L-メチオニンなどの光学活性アミノ酸の製造⁽²⁾など多くの工業的利用例が報告されているが, 食品加工への利用例は固定化グルコースイソメラーゼによる異性化糖製造が報告されているにすぎないので, その可能性について研究した.

また, 反応速度論的観点から固定化酵素が溶液状態の酵素と異なる点は, 固定化酵素が基質や生成物の移動速度の影響を受けやすいので, 固定化酵素反応器の設計を目標とした速度論的研究も行った.

A. 固定化酵素の食品加工への応用

1. 固定化 β -ガラクトシダーゼによる牛乳の処理

コーカシア系統の人種は大人になっても小腸粘膜から乳糖加水分解酵素 β -ガラクトシダーゼを分泌するが, 東洋人の多くは生後まもなく本酵素の分泌能が低下し, 牛乳を飲用すると下痢を起しやすくなる. この対策として牛乳中の乳糖をあらかじめ本酵素によって加水分解しておくことが考えられ, 最近, 低乳糖牛乳が市販された. また, チーズを大量に生産している国ではホエーの主成分であるアルブミンと乳糖を分離した後で, 溶解度が低く, 甘味に乏しい乳糖を加水分解して利用価値を高めようとしている.

これまでの研究者の固定化法をまとめると⁽³⁾, 包括法による本酵素活性の高い微生物菌体の固定化, 本酵素のポリアクリルアミド, コラーゲン, ポリビニルピロリドン, HEMA, セルロースなどによる包括固定化, ポーラスガラス, ポーラスセラミック, ステンレス, イオン交換樹脂, セファロース, ポリイソシアネート, キチンなどに共有結合する固定化など, 非常に多数の方法が報告されている.

1) 酵素の固定化における諸要件 一般に固定化に際して留意すべき点の第一は, 担体の機械的強度や固定化の難易なども含めてどのような固定化方法を用いるかであり, 第二は, 固定化中の酵素の失活を最小にして最大の活性を得るかであり, 第三は, 固定化酵素の操作安定性が高いかどうかである.

第一の点に関しては, 粒径が非常に小さいと反応器の圧力損失が大きくなるので避けたほうが賢明であるし, イオン交換樹脂のような機械的強度の高い担体は反応器への詰め換えが容易であろう.

第二の点に関しては, 高温, 強酸性, 強アルカリ性など苛酷な条件にさらさないようにするとともに, 酵素の

† Theoretical and Experimental Studies on Application of Immobilized Enzymes.

Takeshi KOBAYASHI (Department of Chemical Engineering, Nagoya University, Nagoya 464)

活性中心を保護してやるとよい。われわれはポリアクリルアミドゲル中に本酵素を包括固定する際の可逆的阻害剤やSH化合物の保護効果を調べてみた。酵素製剤として使われている *Aspergillus oryzae* 起源の酵素の場合には、図1に示すようにグルコノ- δ -ラクトンが存在すると、無添加の場合より1.7倍活性が高くなった⁽⁴⁾。しかし、微生物の起源が異なると表1に示すように保護剤の添加効果が異なってくることを認めた。

また、固定化に際して酵素の使用量を多くすればするほど図2のように固定化酵素の活性は高くなるが、活性収率は低下する⁽⁴⁾。したがって使用目的によって最適な酵素の使用量を定める必要がある。

2) 微生物菌体の固定化 菌体内酵素の場合、菌体を破壊し、酵素を抽出して精製すると、タンパク質当りの酵素活性は高くなるが、全活性は低くなるばかりでなく、酵素の製造原価も高くなる。したがって、目的とする酵素活性が高い微生物菌体を直接固定化するほうがよいことも多い。しかし、食品には種々の成分が含まれて

図1 重合前に加える保護剤の β -ガラクトシダーゼ活性に及ぼす影響

●, グルコノ- δ -ラクトン; ○, ガラクトノ- γ -ラクトン; ×, 牛血清アルブミン。

表1 固定化における保護剤の相対活性に及ぼす影響

保 護 剤 (19mg/ml)	相対活性 (%)		
	<i>A. oryzae</i>	<i>K. lactis</i>	<i>E. coli</i>
無 添 加	100	100	100
グルコノ- δ -ラクトン	165	27	6
ガラクトノ- γ -ラクトン	145	162	62
フェニル β -チオガラクトシド	87	-	-
牛血清アルブミン	142	78	110
カゼイン	62	-	-
グルタチオン	162	2	6
ジチオスレイトール	134	142	145

図2 種々の酵素濃度で固定化された β -ガラクトシダーゼの活性(実線)と活性収率(点線)の変化
○, グルコノ- δ -ラクトン添加; ●, グルコノ- δ -ラクトン無添加。

いるから、菌体中に含まれている他の酵素による副反応が起きる可能性もある。そこで、実際に β -ガラクトシダーゼ活性の高い菌体を固定化して牛乳中の乳糖を加水分解してみた⁽⁵⁾。まず、本酵素活性を有する9種の微生物の中から高い比活性を示した3種の微生物 (*Kluyveromyces lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* および *Escherichia coli* E-106) をポリアクリルアミドゲル中に包括固定して、その性質を調べた。

いずれの微生物の場合でも、至適温度、至適 pH、ミハエリス定数、阻害定数などの諸性質は固定化によってほとんど変化しなかった。固定化微生物で処理した牛乳の甘味度は増加し、フレーバーも固定化酵素(部分精製酵素を使用)で処理した場合と比べ遜色はなかった。8回繰り返し使用した結果を図3に示すが、*K. lactis* の活性はほとんど低下しなかった。*K. lactis* は元来がクレーミスなどのアルコール性発酵乳の製造に用いられている微生物であるから、乳糖の加水分解以外の副反応が起きるとしても食品の安全性という点では問題ないと考えられる。

3) 耐熱性酵素の検索 食品加工に固定化酵素を利用する場合、有害物質が食品中に混入しないように注意する必要があるが、これまで食品素材として使用されてきた物質、たとえば、寒天⁽⁶⁾やカラギーナン⁽⁷⁾のような天然多糖類を用いて固定化するのが最も安全と思われる。また、食品は微生物に対する栄養源でもあるので、連続使用時に固定化酵素が微生物に汚染されないような対策が必要である。このためには、過酸化水素などの殺菌剤で間歇的に固定化酵素を洗浄したり⁽⁸⁾、リゾチーム

図3 ●, *K. lactis*; △, *E. coli*; ○, *L. bulgaricus* の固定化微生物; ×, *E. coli* 起源の固定化酵素の再使用
反応条件: pH 6.5, 30°C.

を同時に固定化⁽⁹⁾することも試みられたが、あまり効果的ではない。最も簡便な手段は有害微生物が死滅するような高温処理をすることであるが、このためには耐熱性の高い固定化酵素を用いなければならない。

耐熱性の高いβ-ガラクトシダーゼとして好酸好熱性菌 *Bacillus acidocaldarius* 起源の酵素について検討した⁽¹⁰⁾。本菌は pH 4.0, 65°C でよく増殖し、乳糖を加えると菌体内に誘導的にβ-ガラクトシダーゼが生成する。この酵素の至適温度は70°C, 至適 pH は6.0であった。これをDowex MWA-1にグルタルアルデヒドで架橋結合させる方法などで固定化した。50°Cでの操作安定性はよく、半減期は32日であった。

微生物源によって異なるが、本酵素は生成物のガラクトースによる拮抗阻害をうけることが多い。この場合、反応初速度は次式で表わされる。

$$v = V_m S / \{S + K_m(1 + P/K_i)\} \quad (1)$$

ここで、 S は乳糖濃度、 P はガラクトース濃度である。加水分解反応のタイムコースも(1)式を積分した次式で表わされた。

$$V_m t = K_m(1 + S_0/K_i) \ln S_0/S + (1 - K_m/K_i)(S_0 - S) \quad (2)$$

ここで、 S_0 は乳糖の初濃度で、牛乳の場合には通常120~130mmである。*B. acidocaldarius* 起源の酵素の場合、ミハエリス定数は120mm, 阻害定数は6mmなので、乳糖が10~20%分解した段階で反応速度はかなり低下した。速度論的には K_m 値が小さく、 K_i 値が大きい酵素が望ましいので、このような酵素源の検索を行った。

図4 乳糖の加水分解の経過
○, *B. stearothermophilus* (1.4 U/ml); ●, *B. acidocaldarius* (2.1 U/ml). 反応条件: 125mm 乳糖溶液, pH 6.5, 54°C.

岐阜県平湯温泉の土壌から分離された好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* は60°Cでよく生育し、菌体内に誘導的に生成する酵素の至適温度は68°C, 至適 pH は6.0, K_m 値は4.3mm, K_i 値は50mm以上であった⁽¹¹⁾。乳糖の加水分解の経過を図4に示すが、乳糖が60~70%分解するまではほぼ一定速度で反応が進行した。

牛乳を固定化酵素で高温処理すると、徐々に乳脂肪などが固定化担体上に付着する傾向があり、また高温のため、牛乳の品質が低下する可能性がある。そこで、牛乳の乳脂肪などをあらかじめ分離しておき、40~45°Cで固定化酵素により乳糖を加水分解し、乳脂肪などを再混合し、固定化酵素反応器は間歇的に55°C程度に上げて、有害微生物による汚染を防止するのがよいと考えられる。

2. 固定化プロテアーゼによるチーズ製造

少しデータは古い⁽¹²⁾が、1975年の世界のチーズ生産量は1100万トンである。チーズは図5Aのように作られるが、カード形成のためにレンニン(キモン)を添加する必要がある。レンニンは哺乳中の仔牛の第四胃から分泌されるプロテアーゼの一種で、最近の牛肉に対する需要増のためレンニンの生産量は減少気味である。レンニンあるいはこの代替品として有馬⁽¹³⁾によって開発された微生物レンニンは高い凝乳活性を示すが、タンパク分解活性は低い。もし、タンパク分解活性の高いプロテアーゼを用いると、ホエー除去が完全に行えず、良好なカードができないし、熟成中にもタンパクの分解が進

図 5 チェダーチーズの製造法の流れ図

行し、苦味ペプチドが形成される。

レンニンは κ -カゼインの $-\text{Phe-Met}-$ 間を加水分解し、このためカゼインミセルが不安定化し、凝乳することがわかっている⁽¹⁴⁾。しかし、凝乳したカードの強度が増加してゆくのは物理的過程と考えられている。そこで、タンパク分解活性の高いプロテアーゼでも、固定化して κ -カゼインを限定分解してやれば良好なカードができ、カードの強度も増加して、ホエー除去が十分行えると考えられる。固定化せずにサーモリシンやアルカリプロテアーゼを用いると、図 6 に示すようにカードの強度はあまり高くない。しかし、これらのプロテアーゼも固定化すればカードの強度は直線的に増加する⁽¹⁵⁾。

固定化プロテアーゼも図 5A に示した方法で用いると、乳酸発酵によって牛乳の pH が低下しているので、固定化酵素反応器の中で牛乳が凝固してしまう。これを避けるために Ferrier ら⁽⁸⁾は低温で固定化ペプシンによるカゼインの限定分解を行った。しかし、担体である多孔質ガラスの表面に窒素化合物やシアル酸などが急速に蓄積し、活性低下が著しかった。

そこで従来の伝統的チーズ製造法にとらわれず、図 5B に示したように、まず牛乳の pH を 7~7.5 に上げて凝乳しにくくし、次に固定化プロテアーゼ反応器によるカゼインの加水分解を行い、この後でスターターを接種して乳酸発酵させる方式を考えた⁽¹⁶⁾。固定化法としては Dowex MWA-1 にグルタルアルデヒドでプロテアーゼを架橋結合する方法⁽¹⁷⁾を採用し、反応器としては部分

的に牛乳の凝固が起きたとしても閉塞しにくい流動層型反応器を用いた。また、流速と固定化酵素量を調整することによってカゼインの加水分解度を約 3% に保った。なお、20~50 メッシュの担体粒径の場合、最小流動化速度は 0.4 cm/sec であり、加水分解度が大きくないので反応器中の逆混合の加水分解度に及ぼす影響はほとんどなく、充填層型反応器での加水分解度とはほぼ同じであった。固定化プロテアーゼの半減期は図 7 に示すように、レンニンの場合にはきわめて短く、サーモリシンが最も

図 6 ○, 溶液状のレンニン; □, アルカリ性プロテアーゼ; △, サーモリシンおよび ●, 固定化レンニン; ■, 固定化アルカリ性プロテアーゼ; ▲, 固定化サーモリシンで作ったカードの強さの変化
溶液状酵素の場合は 10 分で、固定化酵素の場合は 20 分で凝乳するようにした。

図 7 x, 固定化レンニン; ●, 固定化アルカリ性プロテアーゼ; ○, 固定化サーモリシンの半減期

安定であった。

このようにして作ったカードには凝乳酵素はまったく含まれていないので、その熟成にはスターターとして用いる乳酸菌のプロテアーゼに依存している。凝乳酵素がカード内に取り込まれている伝統的な方法で作られたチーズのほうが熟成が速いと考えられるが、実際にはこの差はほとんどない。固定化プロテアーゼによる加水分解度と加水分解部位の違いによるものと思われる。熟成中の乳酸菌数や酸度などに若干の差異が認められたが、半年熟成後の官能テストでは従来のものと遜色なかった。

3. 卵白の固定化酵素による処理

1) グルコースの除去 グルコースオキシダーゼを単独あるいはカタラーゼと同時に固定化して、食品中に微量含まれているグルコースの除去用に使用することが期待される。たとえば、乾燥卵白の製造に際し、卵白中に微量存在するグルコースのために褐変が起き、貯蔵中にも、溶解性の低下やフレーバーの変化など好ましくない現象が生じることもある。これらを防止するため、両酵素を固定化してグルコースをグルコン酸に酸化することが考えられる。

グルコースオキシダーゼとカタラーゼを別々に固定化するよりも同時に固定化するほうが、また、酸素の給源として過酸化水素を添加するよりも純酸素ガスを吸収させるほうが図8に示すように効果的であった⁽¹⁸⁾。カタラーゼのほうがグルコースオキシダーゼより熱安定性が悪いので、カタラーゼ活性が過剰な条件で同時固定化する必要が認められた。

図8 グルコースの酸化に及ぼす酸素供給法の影響
○, 純酸素ガス, 同時固定化; □, この条件での残存過酸化水素; △, 純酸素ガス, 別々に固定化; ×, 0.14% 過酸化水素, 同時固定化; ●, 0.14% 過酸化水素, 別々に固定化。

グルコースの酸化反応はピンポン機構で進行する⁽¹⁹⁾。酸素濃度が高ければ、グルコースの酸化初速度は通常のミハリス・メンテン式で表わされる。

$$v = V_m S / (S + K_m) \quad (3)$$

生成物阻害がないとすれば、酸化反応のタイムコースは(3)式を積分して変形したミハリス・メンテン式で表わされる。

$$v_{av} = V_m S_{av} / (S_{av} + K_m) \quad (4)$$

ただし、 S_{av} は初濃度 S_0 と時間 t での濃度の対数平均値である。卵白中のグルコースの酸化過程は(4)式で表わされることがわかった⁽¹⁸⁾。卵白は泡立ちやすいから、カバー付きの回転円盤型反応器が適していると考えられ、酸化反応で消費されただけ酸素ガスを補給してやればよいであろう。

2) 混入卵黄脂質の加水分解 割卵作業が機械化されるにつれて、時によって卵白中に微量の卵黄が混入することがある。このような卵白は泡立ち性および泡安定性が非常に悪くなり、製菓原料として適さない。この泡立ち低下の原因は卵黄中の脂質であるから、これをリパーゼで分解すれば泡立ち性は回復する。しかし、リパーゼ活性が残存していると、製菓に際して添加した食用油脂類が分解されるなどの不都合が生じる。固定化リパーゼで処理すれば卵白中にリパーゼ活性は残存せず、泡安定性も図9に示すように回復した⁽²⁰⁾。

B. 固定化酵素の速度論的研究

酵素を固定化すると、溶液状態の場合とはその特性が変化することが多い。固定化によって酵素の熱安定性が

図9 固定化リパーゼ処理による卵黄混入卵白の泡安定性の回復
卵黄混入率: ○, 0.05%; ×, 0.1%; △, 0.15%。

向上することが多いが、好ましい現象といえよう。これらの変化を的確に把握しないと固定化酵素反応器の設計や制御が困難となる。反応速度に影響する因子としては、1)固定化による酵素のコンホメーション変化、2)誘電率などの微視的環境変化、3)溶液本体における基質および水素イオン濃度と担体近傍における濃度の静電気的作用による分配平衡、4)溶液本体と担体表面間および担体内部での基質や生成物の移動速度、などがあげられる。

コンホメーション変化を予測することは困難であるが、微視的環境変化および静電気的作用による分配平衡についてはある程度予測しうる⁽²¹⁻²³⁾。そこで、物質移動速度が酵素反応速度に及ぼす影響について主に研究した。反応工学の分野では、固体触媒における物質移動速度と反応速度の関係が研究⁽²⁴⁾されているが、これらの研究成果を固定化酵素の場合に適用しうる場合と、そうでない場合がある。

1) 流れの不均一性と反応器出口の生成物濃度 充填層型反応器における基質水溶液は固定化酵素が充填されているため複雑な流れとなり、そのため固定化酵素との接触時間は一様ではない。この影響を調べるために、逆混合モデルを用いて反応器出口の生成物濃度がどのように変化するかをミハエリス・メンテン型の速度式に従う場合に対して理論的に解析し、近似解を出した⁽²⁵⁾。その結果、充填層型反応器では押し出し流れと仮定した場合と大きな差がないことがわかった。しかし、流動層型反応器の場合には流れの均一性を考慮する必要がある。

2) 担体内部での物質移動速度の影響 工業的によく用いられるような大きな粒子径の固定化酵素では、担体内の移動速度が相対的に遅くなって、担体内部の基質濃度は一様ではなくなり、中心部分ではかなり低くなるが多い。このため、観測される反応速度は物質移動速度のことを考慮しない(基質濃度が一様であるとした)場合よりも低くなる。この両者の比を有効係数 E_f という⁽²⁴⁾。したがって、ミハエリス・メンテンの式で反応の全過程が表わされる場合には反応速度は次式で表わされる。

$$v = E_f V_m S / (S + K_m) \quad (5)$$

通常は E_f は 1 以下で、 E_f がほぼ 1.0 なら担体内部での基質濃度は一様で、 E_f が小さければ中心部分の基質濃度は担体表面よりもかなり低いことを意味している。

酵素反応が、1)ミハエリス・メンテン型、2)基質阻害

型、3)拮抗の生成物阻害型、4)非拮抗の生成物阻害型で表わされる場合の有効係数は電子計算機を用いて数値計算により求めねばならないので、これらの反応型の有効係数を求めるためのグラフを作成した⁽²⁶⁾。また、ミハエリス・メンテンの式で反応の全過程が表わされる場合には、次式によって 1.3% 以内の誤差で算出しうる近似式を提案した⁽²⁷⁾。

$$E_f = (E_0 + 2.6 \alpha^{0.8} E_1) / (1 + 2.6 \alpha^{0.8}) \quad (6)$$

ただし

$$\alpha = K_m / S \quad (7)$$

$$E_0 = \begin{cases} 1 & (m \leq 1/\sqrt{3}) \\ 1 - \left[\frac{1}{2} + \cos \frac{1}{3} \left\{ \cos^{-1} \left(\frac{2}{3m^2} - 1 \right) + 4\pi \right\} \right]^3 & (m > 1/\sqrt{3}) \end{cases} \quad (8)$$

$$E_1 = \frac{1}{m} \left(\frac{1}{\tanh 3m} - \frac{1}{3m} \right) \quad (9)$$

$$m = \frac{d_p}{2} \sqrt{\frac{V_m}{2DS}} / \{ (1 + \alpha) \sqrt{1 - \alpha \ln(1 + 1/\alpha)} \} \quad (10)$$

ここで、 D は担体内の基質の拡散係数、 d_p は担体直径、 S は担体表面での基質濃度で、 m は一般化シーレモジュラスとよばれ、 m が 0 に近づくと $E_f \rightarrow 1$ となり、 m が 5 以上では $E_f = 1/m$ で近似しうる。

実験的に有効係数を求めるには、使用中の固定化酵素の反応速度と乳鉢などで担体をすりつぶした場合の反応速度の比をとればよい。このようなことができない場合の有効係数の算出方法も示した⁽²⁸⁾。また、有効係数が 1 よりも小さい場合には、固定化酵素の見かけの操作安定性がよくなり、半減期は 10 倍程度まで長くなることを明らかにした⁽²⁹⁾。固定化酵素の操作安定性を調べるには、反応率が 5% 程度以下になるように固定化酵素を少量充填して行うべきで、反応率が 80~100% のような高い条件で半減期を算出すると、この半減期は固定化酵素の充填量によって変化することを示した⁽²⁹⁾。

3) 粒子・流体間の物質移動速度の影響 Sephadex のように固定化担体の粒子径が小さく、流速が低くなると、ミハエリス定数が流速によって変化することはよく知られている⁽³⁰⁾。これは溶液本体と担体表面間に基質の濃度勾配ができるためで、次式によって近似的に表わせることを示した⁽³¹⁾。

$$K_m(\text{app}) = K_m + 0.75 V_m (1 - \epsilon) / k_L a \quad (11)$$

ここで、 $K_m(\text{app})$ は見かけのミハエリス定数、 ϵ は空

図 10 見かけのミハエリス定数に及ぼす流量の影響

実線は (11) 式による推算値を表わす。

隙率, k_L は物質移動係数, a は単位体積当りの担体表面積である。固定化インペルターゼの場合の (11) 式と実測値との比較を図 10 に示した⁽³¹⁾。

細い管の内壁に酵素を固定化して臨床用の分析に用いるが, この場合も溶液本体と内壁表面との間に基質の濃度勾配が生じることが多い。この場合は見かけのミハエリス定数は次式で表わされる⁽³²⁾。

$$K_m(\text{app}) = K_m + V_m / 2k_L \quad (12)$$

物質移動係数はこの場合には理論的に求められる。

$$k_L = \frac{3}{2} \cdot \frac{\sqrt[3]{12}}{\Gamma\left(\frac{1}{3}\right)} \left(\frac{D^2 u}{RL} \right)^{1/3} \quad (13)$$

ここで, u は平均流速, R は管の半径, L は管の長さ, Γ はガンマ関数である⁽³²⁾。

内壁の酵素活性が高い場合には, 細管出口の生成物濃度は次式で与えられる。

$$P = 2.56(DL/R^2u)^{2/3}S \quad (14)$$

これらの式は Laidler ら^(33,34) により実験的に確かめられている。

これらの研究は名古屋大学農学部清水祥一教授および大宮邦雄博士, Waterloo 大学 M. Moo-Young 教授, Ottawa 大学 K. J. Laidler 教授の御指導および共同研究によるものであり, 深謝いたします。また, これらの研究を行うにあたり御支援いただきました名古屋大学農学部農芸化学科および食品工業化学科の諸先生方, 酵素工学会会員の皆様にご礼申し上げます。

(1) N. Grubhofer and L. Schleith: *Naturwissenschaften*, **40**, 508 (1953).

- (2) I. Chibata, T. Tosa, T. Mori and Y. Matsuo: *Ferment. Technol. Today*, 383 (1972).
- (3) 小林 猛: 酵素工学会第 2 回講演会要旨集, 1979, p.17.
- (4) K. Ohmiya, C. Terao, S. Shimizu and T. Kobayashi: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 491 (1975).
- (5) K. Ohmiya, H. Ohashi, T. Kobayashi and S. Shimizu: *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 137 (1977).
- (6) K. Toda: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1729 (1975).
- (7) 千畑一郎, 土佐哲也: 化学工学, **43**, 276(1979).
- (8) L. K. Ferrier, T. Richardson, N. F. Olson and C. L. Hicks: *J. Dairy Sci.*, **55**, 726(1972).
- (9) B. Mattiasson: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 777 (1977).
- (10) T. Kobayashi, Y. Hirose, K. Ohmiya, S. Shimizu and F. Uchino: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 309 (1978).
- (11) T. Kobayashi *et al.*: in preparation.
- (12) 中西武雄: 発酵と工業, **37**, 141 (1979).
- (13) 有馬 啓: 醸酵協会誌, **30**, 440 (1972).
- (14) P. J. Koning: *Dairy Ind. Inter.*, July, 7 (1978).
- (15) S. Yun, K. Ohmiya, T. Kobayashi and S. Shimizu: *J. Food Sci.*, **46**, 705 (1981).
- (16) K. Ohmiya, S. Tanimura, T. Kobayashi and S. Shimizu: *J. Food Sci.*, **44**, 1584 (1979).
- (17) K. Ohmiya, S. Tanimura, T. Kobayashi and S. Shimizu: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1 (1978).
- (18) T. Kobayashi, T. Ban, S. Shimizu, K. Ohmiya and S. Shimizu: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 506 (1978).
- (19) S. Nakamura and Y. Ogura: *J. Biochem.*, **63**, 308 (1968).
- (20) T. Kobayashi, I. Kato, K. Ohmiya and S. Shimizu: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 413(1980).
- (21) K. J. Laidler and P. S. Bunting: "The Chemical Kinetics of Enzyme Action," 2nd ed., Clarendon Press, London, 1973, p. 240.
- (22) L. Goldstein, Y. Levin and E. Katchalski: *Biochemistry*, **3**, 1913 (1964).
- (23) L. Goldstein and E. Katchalski: *Z. Anal. Chem.*, **243**, 375 (1968).
- (24) C. N. Satterfield: "Mass Transfer in Heterogeneous Catalysis," MIT Press, Cambridge, 1970, p. 129.
- (25) T. Kobayashi and M. Moo-Young: *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 893 (1971).
- (26) M. Moo-Young and T. Kobayashi: *Can. J. Chem. Eng.*, **50**, 162 (1972).
- (27) T. Kobayashi, K. Ohmiya and S. Shimizu:

- J. Ferment. Technol.*, **54**, 260 (1976).
- (28) T. Kobayashi and K. J. Laidler : *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 1 (1973).
- (29) T. Kobayashi, K. Katagiri, K. Ohmiya and S. Shimizu : *J. Ferment. Technol.*, **58**, 23 (1980).
- (30) T. Tosa, T. Mori and I. Chibata : *J. Ferment. Technol.*, **49**, 522 (1971).
- (31) T. Kobayashi and M. Moo-Young : *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 47 (1973).
- (32) T. Kobayashi and K. J. Laidler : *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 99 (1974).
- (33) D. Narinesingh, T. T. Ngo and K. J. Laidler : *Can. J. Biochem.*, **53**, 1061 (1975).
- (34) N. J. Daka and K. J. Laidler : *Can. J. Biochem.*, **56**, 774 (1978).
-