

第1章 微生物バイオテクノロジーの発展状況

バイオリクター技術

誌名	食品微生物バイオテクノロジー
ISSN	
著者名	
発行元	農林統計協会
巻/号	19号
掲載ページ	p. 121-148
発行年月	1993年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



3. バイオリクター技術

(1) 微生物・酵素の固定化

酵素は一般の化学触媒と異なり、特異性が高く、常温、常圧の緩和な条件下で効率よく反応を触媒することから、食品、医薬品、化学工業などに広く利用されている。しかし、酵素は生物がその置かれた環境下で最も効率よく働くよう淘汰されてきたものであり、利用面からみると必ずしも理想的なものではない。そこで、酵素の本来の機能を残しつつ、さらに利用しやすい形態に変えるべく考案されたものが固定化酵素である。

固定化酵素の研究は、1953年に、Grubhofner & Schleithがジアゾ化したポリアミノポリスチレン樹脂にカルボキシペプチダーゼ、ペプシンなどを共有結合させた例に端を発するとされ、60年に入ると、酵素の機能解明および工業利用の面からの研究開発が活発に行われた。70年代になって、酵素の供給源である微生物菌体をそのまま固定化する、いわゆる固定化微生物の研究が盛んになり、抽出による酵素の安定性や活性の損失を防ぐ有力な手法として広がりを見せた。さらに70年代の後半、微生物を生かし続けたまま、または増殖を伴った状態で固定化させておく固定化増殖微生物が考案され、エタノールや有機酸の連続発酵などに応用されている。また近年では、微生物、酵素に留まらず、動・植物細胞、オルガネラなどを固定化し、微生物では製造困難なアルカロイド、ペプチド、ホルモンなどの生産に応用範囲が拡大している^{8, 9)}。

固定化の手法は、①水不溶性の担体に微生物・酵素を物理的吸着、イオン結合、共有結合を介して固定化する担体結合法、②グルタルアルデヒドなどの二価性官能基をもつ試薬で架橋固定化する架橋法、③網目構造をもつゲルや、半透性膜の中に微生物・酵素を閉じこめる包括法、の三種に大別され^{8, 9)}、1980年代前半までに原理的なところはほぼ確立された。その後、現在に至るまで夥しい数の報告がなされているが、多くはそれらの改良や応用の範囲内にあると考えられる。

ここではその中から、比較的目的新しい視点をもつものに絞りを絞る、レビューする。

1) 固定化手法の開発

(a) 担体

上記の如く、微生物・酵素の固定化手法は1980年頃までにほぼ確立され、その後画期的な報告は数少ないが、興味もたれるものの一つにレクチンを担体とする固定化法がある⁴³⁾。糸状菌や酵母など、真核微生物が生産する酵素には糖鎖をもつものが非常に多いが、酵素を担体に共有結合させるとき、この糖鎖が担体の官能基をマスクするため、固定化収率が大幅に低下することがしばしば起きる⁴³⁾。しかし、糖鎖部分に親和性をもつレクチンを担体とすればその懸念は解消するとともに、高い特異性を利用して効率的な固定化が可能である。これにはセファロースやセファデックスにレクチン（主としてコンカナバリンA, ConA）を結合し、これに酵素を吸着させる方法と、直接酵素にレクチンを作用させ、沈澱不溶化する方法、いわゆるアフィニティプレシピテーションとがある。前者はグルコースオキシダーゼ^{26, 37)}、インペルターゼ^{25, 26, 27)}、グルコアミラーゼ²⁵⁾、セルラーゼ^{18, 25)}、セロビアーゼ^{25, 35, 48)}などに応用され、いずれも熱、pH、変性剤、プロテアーゼ消化などに対して安定性が向上するとともに、基質との連続反応において十分な活性保持力を示すことが明らかにされた。後者は抗原・抗体反応と同様に、糖タンパク質の糖鎖およびタンパク質部分の立体構造と組成が、Con Aに対する親和性を決定していると考えられているが、解離・会合の詳しいメカニズムおよび条件は不明である⁴³⁾。アシルスルファターゼ^{1, 4)}、酸性ホスファターゼ⁴⁾、 β -ガラクトシダーゼ⁴⁾、N-アセチルヘキソサミニダーゼ⁴⁾、ウシプラズマアミンオキシダーゼ²⁸⁾、グルコースオキシダーゼ^{23, 24)}などは、高い活性を保持したままCon Aによって会合沈澱し、 α -メチルグルコシドによって再解離する。沈澱酵素は熱、変性剤に対する安定性が著しく増大した。

アフィニティプレシピテーションは、固定化手法と同時に有力な酵素精製の手段として関心がもたれている。乳酸脱水粗酵素⁴⁵⁾をブルーデキストランに結合させた後、Con Aを添加するとブルーデキストランが酵素を結合したまま沈澱することを利用して、酵素の回収・精製を行ったもので、以後の操作が極めて容易となっている。Con Aは、ブルーデキストランの架橋剤としてこれを重合、沈澱させる働きがあるとされている⁴⁶⁾。

(b) 架橋剤

グルタルアルデヒドは架橋剤として最も応用性の広い試薬であるが、酵素によっては、アミノ基などの官能基を修飾する結果、活性低下を来たすなどの欠点も多い。その改良法として、グルタルアルデヒドのオリゴマーを用いる方法が開発された³⁸⁾。グルタルアルデヒドのモノマーを、pH 8.5のほう酸バッファー中で60°Cに加温、得られた235 nmに吸収極大をもつピークをHPLCで分取。このものは数種のグルタルアルデヒドオリゴマーからなり、アルコール脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素の固定化に供試したところ、モノマーと比較してそれぞれ4倍、13倍の活性歩留まりを示した。一方、固定化蛋白量そのものは変化がないことから、オリゴマーはモノマーのようにシッフ塩基形成試薬として作用するのではなく、アルドール重合によって、二重結合がアミノ基によって置換された状態で作用するものと推察されている³⁸⁾。

また、通常の溶液状態では反応性が低いものに対して、グルタルアルデヒド蒸気の使用が有効であるという報告がある³¹⁾。インクジェットノズルを用いたバイオセンサー用酵素素子の調製で、酵素液をISFET (ion sensitive field effect transistor) 上に噴出・固化させた後、溶液状のグルタルアルデヒドで架橋すると、酵素の溶出や固定化膜内での不均一化を生じ、安定な膜ができにくい。そこでISFET上に酵素液を噴出、乾燥した後、グルタルアルデヒド蒸気を満たしたチャンバー内に一定時間放置し、固定化するものである³¹⁾。この方法は、酵素の損失がなく微細な環境制御が可能であるため、高価な酵素や複合酵素のバイオセンサーチップの調製などに有効であると思われる。

(c) 修飾法

酵素電極の開発では、トリドデシルアミンおよびカルボキシル置換した塩化ポリビニール電極についての例がある⁴⁷⁾。モデル酵素にペニシリナーゼを用いて固定化法の検討を行ったところ、最も安定な酵素電極を得るには、電極を1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドの存在下にウシ血清アルブミンで処理した後、グルタルアルデヒドで架橋固定化するのが最善であることが判明。このものは、アルブミンの保護作用のため、塩を含んだサンプル中でも十分に高いポテンシャルをもち、実用性に優れているとされる⁴⁷⁾。

アンモニア、二酸化炭素、酸素などのガス感応型センサーの電極には、溶存ガス

の透過性の高さからフルオロカーボン膜が最適とされている。しかし、この膜は酵素を固定化するのが容易でないところから、現実にはナイロンネットや酢酸セルロース、プタ腸管などが用いられている。この点を克服すべく新しい手法が開発された³⁴⁾。酵素のアミノ基に、パーフルオロアルキル化合物を結合させてフルオル化した後フルオロカーボン膜に吸着させるもので、ウレアーゼを対象にアンモニア電極の調製を試み、安定な電極の調製に成功している³⁴⁾。

酵素同士を多価性官能試薬で架橋重合し、固定化しようとする試みは以前から行われてきたが、その延長として異なる酵素の架橋重合が検討された⁴¹⁾。トリプシンとキモトリプシンをグルタルアルデヒドで共重合させたところ、活性はもとの酵素の数%に減少したが、トリプシンの自己消化が大幅に抑えられること、酵素密度の向上により、リアクターへの応用の際、容量の大幅な縮小化が可能なことなどが指摘されている⁴¹⁾。

2) 固定化微生物・細胞による酵素の連続生産

固定化酵素・微生物の応用で、近年目につくのは固定化微生物・細胞を用いた各種酵素の連続生産である。特に、大量生産が難しい酵素や特殊な生物由来の酵素生産に有効であるとされている^{8, 17, 32)}。

(a) 微生物

Aspergillus niger c-58-111株によるグルコアミラーゼの連続生産では、孢子を焼結ガラス、または軽石に固定化する方法が良好な結果をもたらしている¹⁹⁾。孢子の生育とともに菌体外にグルコアミラーゼの生産が開始され、24時間毎に酵素を多量に含んだ培養液の回収が可能であった。本固定化菌体は、30回の繰り返し使用後も酵素生産性に変化がみられない¹⁹⁾。

木材腐朽菌によって生産されるリグニナーゼ（リグニンペルオキシダーゼ）は、一般に生産性が低く大量生産は困難とされている。その中で最も強力な生産菌の一つとして知られている、*Phanerochaete chrysosporium*の固定化菌体を用いたリグニナーゼの連続生産が検討された⁹⁾。固定化担体としてナイロンネット、ポリウレタンフォーム、焼結ガラスなどが良好で、いずれも攪拌時における菌糸のせん断耐性が向上するため、長期間にわたる連続培養が可能である。本菌は窒素源が過多になるとリグニナーゼ生産能が著しく低下するので、固定化と窒素の供給量

(2.2~22mM)との関連について検討が行われた⁸⁾。遊離菌体は予想通り、最低窒素濃度(2.2mM)のとき200 U/lと、最大酵素生産能を示したが、それより高濃度では生産能は急激に低下した。一方、ポリウレタンスポンジまたはポリウレタンフォームに固定化した*P. chrysosporium*菌体は、窒素濃度22mMのとき、それぞれ190 U/l, 340 U/lの生産性を示した。後者が遊離菌体を上回るのは、窒素過多による阻害が緩和され、菌そのものの生育が促進されることによると考えられる⁹⁾。

プロテアーゼでは、固定化*Humicola lutea*²⁾を用いた酸性プロテアーゼの生産が試みられている。*H. lutea* 120-5の胞子をポリウレタンスポンジキューブに包埋し、菌糸が十分生育するまで培養した後、プロテイナーゼ生産に供したところ、連続10回の繰り返し使用でも、酵素の生産性は遊離の菌糸とはほとんど同じであったという²⁾。また、スポンジキューブと胞子懸濁液の比は固定化菌体の活性に影響を与え、10:0.5(wt)のときが最も良好であった。一方、フィブリン分解酵素を中心とするプロテアーゼの生産には、アルギン酸カルシウム固定化*Penicillium chrysogenum*が用いられている¹⁷⁾。固定化微生物によるプロテアーゼ生産では、しばしば菌体の自己消化による損失が連続化の障害となるが、*P. chrysogenum*の場合、菌をゲル中に包埋することによって自己消化が抑えられ、安定な酵素生産が観察された。興味深いことに、固定化により各プロテアーゼ種の活性比が変わり、アルギン酸濃度3%、培地50mlに対して10ml容量のゲルを添加したとき、プロテアーゼの中でフィブリン分解酵素の生成比率が最高値を示している。本固定化菌体は、各回分毎に磷酸塩で洗浄した場合、12回まで再使用が可能であった¹⁷⁾。

(b) プロトプラスト

細胞壁が酵素やアミノ酸などの分泌阻害要因となっているときには、プロトプラストの利用が有効である。プロトプラストは一般に外部環境の変化に弱いため、そのままでは長時間の培養が困難であるが、カラギーナンやアルギン酸カルシウムゲルに固定化することにより、この問題点を克服できる例が報告されている^{8, 12, 29, 30)}。

アルギン酸カルシウムに固定化した、*Sporotrichum*のプロトプラスト再生菌糸を用いてリパーゼの連続生産が試みられた²⁹⁾。バッチ法による検討では、通常の固定化菌糸の数倍の生産性を示し、リパーゼの比活性は約4倍となった。固定化プロトプラストは非常に安定であり、120時間の反応後でも高い酵素生産性を保持

していた。活性の保持には、トリスバッファーの添加が非常に効果的であり、トリオレイン、オリーブ油、トリプチリン、オレイン酸ブチルエステル等がリパーゼの誘導物質として有効であったという²⁹⁾。*Sclerotium rolfsii*のアルギン酸カルシウムゲル固定化プロトプラスト¹²⁾ではエンドグルカナーゼ、 β -グルコシダーゼの連続生産が試みられ、5回の反復使用後にそれぞれ初期の36%、および26%の活性を保っていた。また、*Brevibacterium flavum*のカラギーナン固定化プロトプラストによるL-グルタミン酸の生産では³⁰⁾、8回目の使用(192時間)で初期活性の約22%が保持されていた。一方、*Heterobasidium annosum*や*Polyporus pinsitus*のアルギン酸ゲル固定化プロトプラストでは、再生菌糸の形態や酵素活性(リグニナーゼ)がゲルマトリックスによって阻害され、変化することが報告されている⁶⁾。

(c) 原生動物

原生動物は、特殊な酵素の取得源として興味深い対象である。その一例として、テトラヒメナの固定化が検討された³²⁾。通常アルギン酸カルシウムに包埋したテトラヒメナは、ゲル中で生存可能であったが、増殖は起きなかった。一方、中空アルギン酸ゲル固定化テトラヒメナは、 9×10^7 cell/mlまで増殖し、培地を毎日更新してやれば多量のリソソーム酵素を分泌することが判明した。エアリーフト型バイオリクターで半連続的な培養が可能であり、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -ヘキソサミニダーゼ、酸性ホスファターゼなどの酵素を、少なくとも4週間にわたって生産し続けた。中空アルギン酸ゲルは、3カ月間安定に増殖可能なテトラヒメナ細胞を保持することができるため、商業的価値のある酵素の給源として有望であるという³²⁾。

3) 医学・分析化学への応用

バイオセンサーを中心とする分析化学、医学、薬学等への応用は、固定化酵素・微生物研究の中核分野の一つである。固定化手法・素材ともに、価格や安全性からの制約が食品分野などに比べて少なく、今後最も期待のできる分野であろう。

(a) 酵素・蛋白質

TPAなどのグリコプロテイン酵素の定量には、エンザイムイムノアッセイ法が最も一般的であるが、ポリクローンまたはモノクローン抗体の取得が必要である。

この手間を省き、あらゆるグリコプロテインに応用可能な分析手法として、レクチンとの相互作用を利用する、いわゆるLAB(lectin affinity bioassay)が提案されている¹⁶⁾。固定化レクチン(Con A)に、TPA、プラスミノゲン(基質)、フィブリノーゲン(賦活化剤)、色素混合物(S-2251)からなる反応液を加え、レクチンに結合したTPAを分離、発色後、マイクロプレートリーダーで405nmの吸光度を読みとるものである。TPAの結合はマンノースとメチル- α -マンノースによって阻害されるが、グルコース、ラクトースでは阻害されなかった¹⁶⁾。本法の感度は0.5IU/mlであり、抗TPA IgGを用いるイムノアッセイ法と同レベルである。エンザイムイムノアッセイ法では、ポリサッカライド系抗体の固定化法⁵⁾が検討されている。固定化担体としてポリエステル布、固定化試薬として塩化シアヌルを用いることにより、アミノ基や水酸基を有するポリサッカライド系抗体およびハプテンが、収率良く布に固定化されることが明らかにされた。

(b) 核酸塩基

プリン塩基およびそのヌクレオシドなどの核酸関連化合物は、魚介類の鮮度指標として有用であるとされ、種々のバイオセンサーの開発が試みられている⁵⁰⁾。その一環として、プリン塩基およびそのヌクレオシドの、ポストカラムでの高感度検出法の開発が行われた⁵⁰⁾。逆相カラムの通過液を、二種類の固定化酵素(グアナナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ・キサンチンオキシダーゼ)リアクターで反応させ、生成した過酸化水素、尿酸を白金電極で検出する。本法は基質特異性が高く、プリンヌクレオシドやピリミジン塩基には反応しない。プリン塩基(ヒポキサンチン、キサンチン、グアニン、アデニン)、プリンヌクレオシド(イノシン、キサノシン、グアノシン、アデノシン)は10 pmolから5 nmolの広範囲で直線性があり、検出限界は1.2~5.5 pmolであった⁵⁰⁾。また、魚の鮮度測定用にフローインジェクションシステムを導入、簡便化を図った例が報告されている⁴⁹⁾。5'-アデニル酸デアミナーゼリアクター、アルカリフォスファスターゼリアクター、ヌクレオシドフォスホリラーゼ・キサンチンオキシダーゼリアクターの3種のリアクターを用い、サンプル注入後流路を分割してそれぞれのリアクターで反応させ、ペルオキシダーゼ電極に入る直前に再び流路を統一、電流値変化を測定する。感度と電流値から鮮度指標K値を求めるもので、1時間あたり15サンプルの分析が可能であるという⁴⁹⁾。

(c) 糖

グルコースセンサーは、固定化酵素の中でも最も早くから取り組まれた研究課題の一つであり、数多くの研究および実用例がある。最近の研究では、*Zyomonas mobilis*を用いた微生物センサーの例がある⁴⁰⁾。本菌の菌体内オキシドレダクターゼ、グルコノラクトナーゼを用いて、グルコースおよびフルクトースの測定製を試みたものである。トルエン処理により、膜透過性を高めた*Z. mobilis*菌体をゼラチン膜でpH電極に固定化し、酵素反応によって生成した水素イオン濃度を測定することにより、グルコース、フルクトース含量を求める。測定の至適pHおよび温度は、それぞれ6.2、39°Cであり、グルコースで5g/l、フルクトースでは50g/lまで再現性の良い直線が得られるという。動物組織中のグルコース濃度の測定には、固定化グルコースオキシダーゼと化学発光を利用したフローインジェクション分析法が提案されている²²⁾。酵素反応によって発生した過酸化水素をルミノール発光で定量するもので、 10^{-7} ~ 10^{-2} Mの過酸化水素の定量が可能であり、グルコースに対する直線性は 10^{-5} ~ 5×10^{-2} M (1mM濃度で5回繰り返して測定RSD=3%)の範囲内にあった。固定化酵素リアクターは4週間以上に亘って安定に保たれ、1時間当たりの分析可能数は最大20検体であった。このフローインジェクションシステムは、ヒトの抗凝血因子Ⅲの分析に効果を発揮し、YSI社のオフライン分析機と比較しても精度に遜色がなく、迅速性で優れているという²²⁾。

(d) その他の生体成分

アセチルコリンの分析に、生体膜構成成分の蛍光強度変化を利用する方法が開発されている⁷⁾。両親媒性膜の構成成分、ニトロベンゾキサゾールジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン (NBD-PE) の蛍光強度は、膜の物理的、静電的環境によって大きく影響される。膜表面の物理的、静電的性質は選択的反応による人為的制御ができることから、この際生ずる蛍光強度変化を利用すれば溶液中に存在する特定物質の定量が可能である。膜結合酵素、アセチルコリンエステラーゼはアセチルコリンを加水分解して、酢酸とコリンを生成する。本酵素反応を、石英ウェハーに共有結合させたC16脂肪酸からなる、従って少量のNBD-PEを含む単層膜で検知する。酵素反応によって引き起こされた静電的性質の変化にともなって蛍光強度が減少することを利用して、アセチルコリンの定量が可能であり、 $0.1 \mu\text{M}$ から $2 \mu\text{M}$ の間で直線性が得られたという⁷⁾。

医学分野におけるその他の利用としては、固定化マイクロソームのUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼによる薬剤のグルクロン酸化や²⁰⁾、固定化ヘパリナーゼによる血中ヘパリンの除去¹¹⁾などが興味深い。前者では、共有結合、イオン吸着、包括法のうち、ポリエチレンイミン共存下におけるアルギン酸ビーズ包括法のみが有効であったという。抗ヒトエイズウイルス剤である、3'-azido-3'-deoxythymidine(AZT)のグルクロン酸化をモデルにバイオリクターを組み立ててみたところ、カルシウム(12mM)は固定化マイクロソームの安定性を増大し、酵素の比活性は固定化により約5倍に上昇した。Km、Vmの値から、AZTは遊離酵素よりも固定化酵素の基質として好適なことが判明、反応6時間後に得られたAZT-グルクロン酸の量は、遊離酵素の場合の3倍に達した。本法はビリルビン、4-ニトロフェノール、クロフィブリン酸、パープロフェン、デキストロファン、モルフィンなどの薬剤、生理活性物質のグルクロン酸化に有効であることが明らかにされている²⁰⁾。後者では、ヘパリナーゼのセルロースホローファイバーへの固定化が試みられている。ホローファイバーのアルカリ処理(0.05Nの水酸化ナトリウム)と、トリエチルアミンを塩基とする塩化トレスル基の導入により、活性の歩留まりは26.2%、保持力は従来法の3倍となった。4.5 μg protein/cm²の酵素濃度のとき、ヘパリンの分解速度は0.3 mg/h.cm²を示している¹¹⁾。

4) 形質転換微生物の安定化

プラスミドやファージベクターを組み込んだ形質転換微生物による酵素、ホルモン等有用物質の生産では、それら異種DNAの欠落防止が大きな課題である。通常、薬剤耐性などの選択圧をかけながら培養が行われることが多いが、微生物の固定化は欠落防止に効果が大であるとされ、いくつかの試みがなされている^{3, 13, 14, 15, 21, 36, 39, 44)}。

カテコール-2,3-ジオキシゲナーゼ活性を組み込んだ形質転換株、*E. coli*BZ18/pTG201株をカラギーナンゲルビーズに固定化したときの生育状態、形態変化などの観察が行われ、組換え体においても通常の微生物と同様のゲル内増殖が起き、ゲル空隙部では 1.7×10^{11} 個まで増加することが確認された¹⁵⁾。また、培養時の攪拌速度がプラスミドの安定性および酵素生産性に及ぼす影響が、*E. coli* B/pTG 201株を用いて検討されている²¹⁾。遊離菌体とカラギーナンゲル固定化菌体

の両者を非選択培地で比較したところ、固定化菌体ではプラスミドの安定性が増加し、遊離菌体なら急速にプラスミドの欠落が起こるような撹拌速度でも目立った欠落は起きていない。カテコール-2,3-ジオキシゲナーゼは、プラスミドの安定性のため漏出菌体で高い活性発現がみられた。最少培地中では遊離、固定化菌体とも、撹拌速度の上昇とともにプラスミドの安定性は低下したが、LB培地では、菌体濃度が最大になる撹拌速度でも安定性が向上した²¹⁾。キシラナーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドpKK223-200の安定性は、カラギーナンゲルに固定化することにより安定化されるが、安定化の程度はプラスミドのコピー数、菌の生育速度および培地組成に関連したファクターで表されるという¹⁴⁾。また、カテコール-2,3-オキシゲナーゼ遺伝子を導入したpTG201の連続培養における安定性は、ホスト細胞 (*E. coli*) によって異なるが、ゲル内に固定化した場合には安定性に大差はないこと、安定性の増大は固定化細胞間のプラスミド転移やコピー数の増加によるものではないことなどが明らかにされている³⁸⁾。一方、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* の α -アミラーゼを *E. coli* HB101/pH1301 に組み込み、 κ -カラギーナンで固定化、酵素の生産性ならびにプラスミドの安定性に及ぼすグリシン、カラギーナン、KCl濃度の影響が検討されている³⁾。グリシン非存在下では、酵素は組換え *E. coli* のペリプラスム空間に局在し、ごく少量の酵素が培養液中に漏出したが、グリシンを添加すると、固定化菌体のペリプラスムから α -アミラーゼが効果的に生産され、その大部分がゲルマトリックス中にトラップされた。カラギーナンとKCl濃度は酵素の培養液中への漏出に大きく影響、一定の選択圧下においても、長期間培養すると酵素生産性の低いミュータントが出現し、時間経過とともに優勢になった³⁾。また、プラスミド欠損株も培養時間の経過とともに増加の傾向にあった。プラスミドの安定性は菌体固定化、および2%KClの添加によって増大したという³⁾。

5) 無細胞合成系への応用

無細胞合成系を用いたポリペプチドなどの生体成分の合成は、その生体成分が細胞内で不安定である場合、または細胞に対して有害であるような場合に有効な手法であるが、一般に合成系が不安定であり、収率も低いため実用的な意味合いからは、一部を除いてほとんど注目されなかった。しかし、反応の連続化、即ち

ポンプによる基質の連続供給と限外濾過膜による生成物の除去の組み合わせにより、ポリペプチドを長時間に亘って合成することができる可能性が示され、注目されている^{33, 42, 46)}。アミノ酸混合物、ATPおよびGTPを含むバッファーを、1ml/hの流速で無細胞合成系 (*E. coli*または小麦胚芽)を入れたチャンバー (1ml容量)内に送り込み、合成されたポリペプチドを膜を透して系外に取り出す方法で連続化したところ、*E. coli*、小麦胚芽の両合成系で、20時間に亘ってRNA当たり100コピーのウイルスコート蛋白が合成されたという⁴⁶⁾。また、カルシトニンmRNAを用いた系では、mRNA当たり150-300コピーのカルシトニンポリペプチドの生成が確認されている⁴⁶⁾。一方、動物細胞においても限外濾過膜を用いて、ウサギ網状組織の無細胞転写系によるグロビンの合成が試みられ、0.5mlの無細胞系から、100時間後でも約2mgの α および β -グロビンが合成された⁴²⁾。さらに、遺伝子情報解析の一有力手段として、酵母の固定化無細胞タンパク質合成系が報告されている³³⁾。オリゴ(dA)セルロース固定化poly(U)の他、オリゴ(dT)セルロース固定化酵母mRNA、同固定化マウスミエローマmRNA、ATP、GTP、アミノ酸などの混合系を反応させ、mRNAからの翻訳情報の解析を行ったところ、³H-フェニルアラニンの取り込みから*de novo*合成によってポリペプチド鎖が合成されていることが確認された。翻訳効率は均一系(溶液系)に比較して低く、通常不均一系反応と同様、物質移動が律速になっていると考えられた³³⁾。これら無細胞合成系での例は、高等生物の無細胞系におけるmRNAの翻訳や糖鎖の結合など、翻訳後のプロセッシングの解析に有効な手段となり得る可能性を秘めており、興味深い。

(食品総合研究所 春見隆文)

文 献

- 1) Ahmad, A. et al. A novel method for immobilization of chicken brain arylsulfatase A using concanavalin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 732 - 736 (1973)
- 2) Aleksieva, P. & Tchobanov, B. Production of acid proteinases by *Humicola lutea* mycelium immobilized in polyurethane sponge. *Enzyme Microbiol. Technol.* 12, 994 - 996 (1990)

- 3) Ariga, O. et al. Production of thermophilic α - amylase using immobilized transformed *Escherichia coli* by addition of glycine. *J. Ferment. Bioeng.* 71, 397 - 402(1991)
- 4) Bishayee, S. et al. Interaction between concanavalin A and brain lysosomal acid hydrolase. *Biochim. Biophys. Acta* 334, 378 - 388(1974)
- 5) Blais, B. W. & Yamazaki, H. Activation of polyester cloth for the immobilization of a polysaccharide antigen. *Biotechnol. Lett.* 4, 11 - 14 (1990)
- 6) Bottcher, U. F. et al. New form of lignolytically active mycelium generated by immobilization of protoplast isolated from the white rot fungi *Heterobasidium annosum* and *Polyporus pinsitus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 380 - 386(1988)
- 7) Brennan, J. D. et al. Fluorescence transduction of an enzyme - substrate reaction by covalently immobilized monolayers of amphiphiles. *Anal. Chim. Acta.* 255, 73 - 82(1991)
- 8) Chen, A. H. C. et al. Ligninase production by immobilized cultures of *Phanerochaete chrysosporium* grown under nitrogen sufficient conditions. *Enzyme Microbiol. Technol.* 13, 404 - 407(1991)
- 9) 千畑一郎 編. 固定化酵素. 東京, 講談社サイエンティフィック, 1984(1975), 305p.
- 10) 千畑一郎 編. 固定化生体触媒. 東京, 講談社, 1986, 360P.
- 11) Comfort, A. et al. Immobilized enzyme cellulose hollow fibers I. Immobilization of heparinase. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 1366 - 1373(1989)
- 12) Deshpande, M. V. et al. Isolation and immobilization of *Sclerotium rolfsii* protoplasts. *Biotechnol. Lett.* 9, 49 - 52(1987)
- 13) De Taxis du Poet, P. et al. Plasmid inheritability and biomass production: Comparison between free and immobilized cell cultures of *Escherichia coli* BZ18(pTG201) without selection pressure. *J. Bacteriol.* 165, 871 - 877(1986)
- 14) De Taxis du Poet, P. et al. Plasmid stability in immobilized and

- free recombinant *Escherichia coli* JM105(pKK223-200):Importance oxygen diffusion, growth rate, and plasmid copy number. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1548 - 1555(1987)
- 15) Dhulster, P. et al. Culture and bioconversion use of plasmid - harboring strain of immobilized *E. coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20, 87 - 93(1984)
 - 16) Electricwala, A. Lectin affinity bioassay an assay method for glycoprotein enzyme. Biochim. Biophys. Acta. 990, 53 - 58(1989)
 - 17) EL - Aassar, S.A. et al. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 26 - 30(1990)
 - 18) Fadda, M.B. et al. Highly efficient solubilization of natural lignocel - lulosic materials by a commercial cellulase immobilized on various solid support. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19, 306 - 311(1984)
 - 19) Fiedurek, J. & Lobarzewski, J. Glucoamylase biosynthesis by cells of *Aspergillus niger* C - 58 - 111 immobilized in sintered glass and pumice stone. Starch/Starke. 42, 358 - 362(1990)
 - 20) Haumont, M. et al. Immobilization of microsomes into alginate beads is a convenient method for producing glucuronides from drugs. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35, 440 - 446(1991)
 - 21) Huang, J. et al. Agitation of rate effects on plasmid stability in immobilized and free cell continuous cultures of recombinant *Escherichia coli*. Enzyme Microbiol. Technol. 12, 933 - 939(1990)
 - 22) Huang, Y.L. et al. On - line determination of glucose concentration throughout animal cell cultures based on chemiluminescent detection of hydrogen peroxide coupled with flow - injection analysis. J. Biotechnol. 18, 161 - 172(1991)
 - 23) Husain, Q. et al. Entrapment of concanavalin A - glycoenzyme complexes in calcium alginate gels. Biotechnol. Bioeng. 27, 1102 - 1107(1985)
 - 24) Husain, Q. & Saleemuddin, M. Immobilization of glycoenzyme using crude concanavalin A and glutaraldehyde. Enzyme Microbiol. Technol.

- 8,686 - 690(1986)
- 25) Husain, Q. & Saleemuddin, M. An inexpensive procedure for the immobilization of glycoenzymes on Sephadex G - 50 using crude concanavalin A. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 11, 508 - 512(1989)
 - 26) Iqbal, J & Saleemuddin, M. Activity and stability of glucose oxidase and invertase immobilized on concanavalin A Sepharose: Influence of lectine concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 3191 - 3195(1983)
 - 27) Iqbal, J. & Saleemuddin, M. Sucrose hydrolysis using invertase immobilized on concanavalin A - Sepharose. *Enzyme Microbiol. Technol.* 7, 175 - 178(1985)
 - 28) Ishizaki, H. & Yasunobu, K. T. Bovine plasma amine oxidase interaction with concanavalin A in solution and with concanavalin A - Sepharose. *Biochim. Biophys. Acta.* 611, 27 - 34(1980)
 - 29) Johri, B. N. et al. Lipase production by free and immobilized protoplasts of *Sporotrichum - thermophile apinis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 367 - 371(1990)
 - 30) Karube, I. et al. L - Glutamate production by protoplasts immobilized in carrageenan gel. *J. Biotechnol.* 6, 1 - 7(1987)
 - 31) Kimura, J. et al. An immobilized enzyme membrane fabrication method using an ink jet nozzle. *Biosensors.* 4, 41 - 52(1989)
 - 32) Kiy, T & Tiedtke, A. Lysosomal enzymes produced by immobilized *Tetra - hymena thermophila*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 14 - 18(1991)
 - 33) Kobatake, E. et al. Translation of immobilized genetic information by yeast cell - free protein synthesizing system. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 723 - 728(1991)
 - 34) Kobos, R. K. et al. Fluorocarbon - based immobilization method for preparation of enzyme electrodes. *Anal. Chem.* 60, 1996 - 1998(1988)
 - 35) Lee, J. M. et al. Properties and application of immobilized β - D - glucosidase coentrapped with *Zymomonas mobilis* in calcium alginate. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 2441 - 2451(1983)

- 36) Marin - Iniesta, F. et al. Immobilized bacteria and plasmid stability. Ann. NY Acad. Sci. 501, 317 - 319 (1987)
- 37) Mattiasson, B. & Borrebeak, C. Analytical flow system based on reversible immobilization of enzymes and whole cells utilizing specific lectin - glucoprotein interaction. FEBS Lett. 85, 119 - 123 (1978)
- 38) Nakagawa, T. et al. Development of effective cross - linking method for bioactive substance: Enzyme immobilization using glutaraldehyde oligomers. Chem. Pharm. Bull (Tokyo). 37, 2463 - 2466 (1989)
- 39) Nasri, M. et al. Influence of immobilization on the stability of pTG201 recombinant plasmid in some strains of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 53, 740 - 744 (1987)
- 40) Park, J - K & Kim, H - S. A new biosensor for specific determination of glucose or fructose using an oxido - reductase of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Bioeng. 36, 744 - 749 (1990)
- 41) Rajput, Y. S. & Gupta, M. N. Coaggregate of trypsin and chymotrypsin. Biotechnol Bioeng. 31, 220 - 223 (1988)
- 42) Ryabova, L. A. et al. Preparative synthesis of globin in a continuous cell-free translation system from rabbit reticulocytes. Nucleic. Acids Res. 17, 4412 (1989)
- 43) Saleemuddin, M. & Husain, Q. Concanavalin A: A useful ligand for glycoenzyme immobilization - a review. Enzyme Microbiol. Technol. 13, 290 - 295 (1991)
- 44) Sayadi, S. et al. Increased stability of pBR - 322 related plasmid in *Escherichia coli* W3101 grown in carrageenan gel beads. FEMS Microbiol. Lett. 56, 307 - 312 (1988)
- 45) Senstad, C. & Mattiasson, B. Preparation of soluble affinity complexes by a second affinity interaction. A model study. Biotechnol. Appl. Biochem. 11, 41 - 48 (1989)
- 46) Spirin, A. S. et al. A continuous cell - free translation system capable of producing polypeptides in high yield. Science. 242, 1162 - 1164 (1988)

- 47) Taguchi, H. et al. Investigation of methods of enzyme immobilization on a coated - wire electrode for the development of micro - biosensors. *Annal. Chim. Acta.* 228, 159 - 162 (1990)
- 48) Woodward, J. et al. Affinity chromatography of β - glucosidase and endo - β glucanase from *Aspergillus niger* on concanavalin A - Sepharose implications for cellulase component purification and immobilization. *Prep. Biochem.* 16, 337 - 353 (1986)
- 49) Yao, T. & Matsumoto, Y. An electroanalytical method for estimation of fish freshness using a flow injection system with some immobilized enzyme reactors. *Electroanalysis.* 1, 173 - 176 (1989)
- 50) Yao, T. et al. Development of a FIA system with immobilized enzymes for specific post - column detection of purine bases and their nucleosides separated by HPLC column. *J. Biotechnol.* 14, 89 - 98 (1990)

(2) 反応装置

反応装置（バイオリアクター）はその方式から充填層型、攪拌槽型、流動層型、膜型（遊離型、拡散型、強制透過型）に分類できる^{6, 19)}。

1) 充填層型反応装置

固定化酵素、固定化微生物などの固定化生体触媒をカラムにつめて、連続的に原料を上向きあるいは下向きに供給し、生産物を取り出し、連続定常運転を可能としたものが充填層型反応装置である。現在最も一般的な反応装置である。固定化することにより、生体触媒を繰り返し使用でき、充填率を上げることにより容積あたりの生産性の向上、生産コストの低減が可能になる。生成物阻害がみられる反応系に対しては攪拌槽型より有利である^{4, 82)}。

グルコースイソメラーゼによる異性化糖製造において、酵素を含有する菌体をそのまま固定化したもの、抽出酵素を固定化したものなど種々の固定化酵素が市販されており、大型カラムに充填し大量生産が行われている²⁸⁾。固定化酵素の多くは、充填層型が使用される。研究開発例として、固定化グルコアミラーゼによるデンプンの糖化⁶⁾、グルコシルサイクロデキストリンの製造¹⁸⁾、キシロオリゴ糖の製造²⁷⁾、マルトオリゴ糖の製造^{23, 24, 58)}、小麦グルテンからのペプチド製造⁴⁴⁾、魚タンパク質の加水分解⁸⁰⁾、醤油様調味料製造における固定化グルタミナーゼによるグルタミン酸製造および固定化乳酸菌による乳酸発酵^{7, 75)}、トリグリセリドと脂肪酸のエステル交換による油脂の改質³⁷⁾、パーム油のジグリセリド（DG）と脂肪酸をエステル合成させることによる低DGパーム油の製造³²⁾、ヘキサン系でオリーブ油とステアリン酸メチルのエステル交換^{62, 63, 64)}、カカオバター様油脂の製造^{10, 72)}、固定化サーモライシンによるアスパルテム前駆体の合成^{61, 65)}などがみられる。

2) 攪拌槽型、流動層型反応装置

攪拌装置を備えた槽型リアクターで、構造が簡単で、バッチ式、連続式のいずれにも対応できる。通常バッチ式と呼ばれているのは、攪拌槽内で生体触媒を遊離の状態で行うものである。このバッチ法は工業的に広く使用されており、その代表的なものとして、糖化によるグルコースの製造をあげることがで

きる。研究開発例として、乳タンパク質の加水分解による機能性タンパク質の製造において固定化酵素をリアクター内部の二重の攪拌翼で低速に回転させ、チャネリング防止を図ったもの⁶⁰⁾、固定化 β -ガラクトシダーゼを用いた回転カラム式あるいは攪拌式充填層型反応装置による乳糖の加水分解^{14, 15)}、固定化プロテアーゼによる魚タンパク質の加水分解⁸⁰⁾、固定化ホスホリパーゼによるホスファチジルコリン高含量大豆レシチン製造における灌流型の使用²⁵⁾（これは、中心部は反応槽（2重円筒）で、外周部に沈降分離槽を設けており、原料は反応槽の内側に供給され、反応液は外周部の上部から取り出し、固定化酵素は攪拌羽根により反応槽内筒を上昇し、反応槽外筒を下降し循環する）などが報告された。

流動層型は充填層型と攪拌槽型の間位置すると考えることができる。固定化微生物をカラムにつめた場合でも、生物活動に伴うガス発生などにより系がある程度混合されるような場合、あるいはカラムにガスを供給する場合など流動層型とよべる。カラム状でなく三つのそろばん玉を縦につないだ形の容器にアルギン酸ゲルに固定化した酵母をいれて流動層型で使用したF型反応装置とよばれるアルコール製造プラントがパイロットレベルで運転され、実証試験は終了している⁸⁶⁾。固定化酵素と少量の遊離酵素を使用しながら、この流動層型を用いての豆乳中の大豆タンパク質の加水分解によるオリゴペプチドの製造¹⁹⁾、醤油様調味液製造における固定化酵母を利用したアルコール発酵^{20, 67, 68, 75)}、高濃度食酢の製造³⁹⁾などの研究開発報告がみられる。

3) 遊離型膜反応装置

遊離型膜反応装置は攪拌槽反応装置に限外濾過（UF）膜、精密濾過（MF）膜、UF膜と逆浸透膜の中間に位置するナノフィルトレーション（NF）膜などの分離膜を組み込んだものである^{1, 55, 56, 57)}。たとえば酵素による高分子基質の加水分解においては、酵素と基質を遊離の状態では反応装置内に保持し、反応させながら、低分子量の反応生成物を加圧下でUF膜を透過させて連続的に取り出すことが可能である。工業化されたL-アミノ酸製造として、アミノアシラーゼを使用した光学分割⁸⁴⁾、発酵法と組み合わせたL-アスパラギン酸の製造⁸⁹⁾の二つがある。研究開発例として、遊離プロテアーゼによる各種タンパク質の加水分解^{3, 41)}、 β -アミラーゼおよび枝切り酵素によるデンプンからのマルトース生

産⁴⁸⁾、プロテアーゼを用いた魚肉タンパク質からのアミノ酸の連続生産に対して、遊離型膜反応装置の適用⁴⁹⁾、デンプンの加水分解⁷⁴⁾、サイクロデキストリンの製造⁹⁾、油脂の加水分解⁷¹⁾ 屠畜血液タンパク質の酵素分解における攪拌槽型反応と酵素回収のため反応終了後、遠心分離とUF膜分離の併用⁷⁹⁾、半回分式での寒天オリゴ糖の製造²⁶⁾、 α -キモトリプシンによる鎮痛作用を有するジペプチドであるキョートロフィンの合成¹¹⁾、大豆タンパク質の加水分解による機能性タンパク質の製造⁴⁶⁾、乳タンパク質の加水分解による機能性タンパク質の製造^{55, 60)}、マンデル酸脱水素酵素およびギ酸脱水素酵素を反応槽内に保持したままフェニルグリオキシ酸からのマンデル酸の連続生産⁸³⁾、味噌製造において原料を消化した後、固液分離を行い液体部分のみを用いて発酵を遊離型膜装置で行ったもの⁶⁶⁾、遊離型によるエタノール発酵⁴⁰⁾、エタノール発酵におけるパーバパーレーション膜利用^{42, 46)}、固定化酵母によるエタノール発酵とパーバパーレーションの組み合わせ⁷³⁾、 α -アミラーゼとグルコアミラーゼを併用してデンプンスラリーから直接グルコースを生産するために、水性2相分配と膜分離を同時に利用した方法²⁹⁾、乳酸菌の高密度培養²¹⁾の例があげられる。

4) 強制透過型膜反応装置

強制透過型膜反応装置は、多孔質膜内に酵素を固定化した後、低分子基質を加圧透過し生成物を得るものである。強制透過型膜反応装置の特性として、低分子基質を対象とした加水分解や異性化反応に適しており、短時間で反応し、従来の固定化酵素法よりきわめて高い生産性を示すこと、これまで数時間～数日かかっていた反応時間を数秒～数分と著しく短縮できること、圧力により生産性あるいは生産物組成を容易に制御できることが示されている⁵⁵⁾。インベルターゼによる転化糖生産^{50, 51, 52)}、グルコースイソメラーゼによる異性化糖生産⁵³⁾、 β -フラノシダーゼによるフラクトオリゴ糖生産⁵⁴⁾、ラクトースの加水分解³¹⁾、充填層型とこの方式を併用したデンプンの糖化⁶⁾、オリーブ油の加水分解⁴³⁾の報告がある。

5) 拡散型膜反応装置

膜の片側に生体触媒を保持し、原料である基質が膜を透過し、生体触媒と反応

し、生成物はまた、膜を透過して戻っていくという形式をとることも可能である。この場合、膜の透過が圧力ではなく濃度勾配に伴う拡散に依存するため、拡散型膜反応装置と呼ばれる。主に、低分子量物質の加水分解や異性化等を対象にしている。体積あたりの膜面積が広い中空糸膜モジュールが使われる⁵⁵⁾。円筒反応装置内部に円筒の膜をセットした一体型反応装置³⁰⁾、ラクトースの加水分解⁶⁹⁾などが報告されている。

最近、2相系の酵素反応に対してこの拡散型が使用され始めている。膜内あるいは膜面に酵素を担持しておき、膜の1次側に溶質を溶解した有機溶媒を供給し、膜の2次側にpHを制御するための緩衝水溶液を供給する。溶質は、酵素と反応し、生成物はその溶解性に応じて、水相、あるいは有機相に分配される。リパーゼによるトリアセチンの加水分解における動力学⁸⁾、大豆油の加水分解⁷⁰⁾、グリセロールと脂肪酸のエステル合成⁸⁸⁾、オリーブ油の加水分解^{12, 16, 17, 76)}、バター中のグリセリドの加水分解^{33, 34)}水・有機溶媒2相系の反応装置設計⁸⁵⁾、医薬品原料のための光学分割(イブプロフェン)³⁹⁾などに応用されている。アルコール発酵と膜による抽出を組み合わせたものは、パーストラクション法とよばれている^{21, 38)}。

その他の2相系反応装置に関する報告として、超臨界流体を利用した反応装置⁶⁹⁾、気泡塔でのエアーカーに代わって密度の小さい有機溶媒を分散板を通して微細滴で供給し2相分散系を作り、上部で相分離し、水相は円筒の外周部に循環し、有機溶媒相は外部に取り出され、再び系内に循環する新しいタイプの方式⁸¹⁾、同様の方法で魚油中の高度不飽和脂肪酸含量を高めることをねらって、リパーゼ水溶液をカラムユニットに保持し油脂を下部からディスペンサーを利用して微細液滴で供給し反応させる方式⁷⁸⁾、ビプロミキサーを利用したオリーブ油の加水分解²²⁾やアスパルテム前駆体の製造¹⁸⁾などが報告されている。

なお、成書として文献^{4, 5, 28, 82)}をあげるので参照願いたい。

(食品総合研究所 中嶋光敏)

文 献

- 1) Belfort G. Membranes and bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 33,1047

-1066 (1989)

- 2) Bibal, B. et al. High - concentration cultivation of *Lactococcus cremoris* in a cell - recycle reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 746 - 754 (1991)
- 3) Cheryan, M. & Mehaia, M.A. "Membrane bioreactors" . *Membrane Separation in Biotechnology*. McGregor W.C. ed. Dekker, 1986, 255 - 302
- 4) 千畑一郎 編. 固定化生体触媒. 東京, 講談社サイエンティフィック, 1986, 360p.
- 5) 遠藤 勲 ほか. 生物プロセスシステムハンドブック. 東京, サイエンスフォーラム, 1985, 706p.
- 6) 吹野弘武 ほか. "デンプン糖の製造" . 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 1 - 20
- 7) Fukushima, Y. et al. Continuous protease production in a carbon - limited chemostat culture by salt tolerant *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 604 - 609(1989)
- 8) Guit, R.P.M. et al. Lipase kinetics: Hydrolysis of triacetin by lipase from *Candida cylindracea* in a hollow - fiber membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 38, 727 - 732(1991)
- 9) 原 耕三. "サイクロデキストリン" . フーズバイオテクノロジー事典. 東京, 産業調査会, 1988, 246 - 251
- 10) 橋本征雄. 酵素エステル交換によるカカオバター様油脂の製造. *バイオサイエンスとインダストリ.* 47, 36 - 37 (1989)
- 11) Herrmann, G. et al. Scale - up of enzymatic peptide synthesis in an enzyme membrane reactor. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13, 346 - 353(1991)
- 12) 平野二郎, 船田 正. 有用脂質を製造する不均一系バイオリアクター. *油化学.* 36, 729 - 735(1987)
- 13) Hirata, A. et al. Production of aspartame precursor by semicontinuous pulsed extraction column bioreactor retaining free enzyme in an aqueous phase. *Kagaku Kougaku Ronbunshu.* 17, 586 - 588

(1991)

- 14) 本多芳彦. 乳糖分解乳の製造とその技術. 食品と容器. 32, 554 - 562 (1991)
- 15) 本多芳彦 ほか. パイロットプラントスケールの横型回転カラムリアクターによる乳糖の加水分解. 日食工誌. 38, 614 - 619 (1991)
- 16) Hoq, M. et al. Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic membrane bioreactor. J. Am. Oil Chem. Soc. 62, 1016 - 1021 (1985)
- 17) Hoq, M. et al. Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic hollow fiber bioreactors. Agric. Biol. Chem. 49, 3173 - 3178 (1985)
- 18) 石神 博 ほか. " グルコシルサイクロデキストリンの製造 ". 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 21 - 48
- 19) 岩淵洋夫 ほか. " 豆乳による新食品の開発 ". 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 127 - 147
- 20) 兼松善範 ほか. " 熟成白醬油風調味料の製造 ". 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 242 - 269
- 21) Kang, W. et al. Ethanol production in a microporous hollow - fiber - based extractive fermentor with immobilized yeast. Biotechnol. Bioeng. 36, 826 - 833 (1990)
- 22) Kawano, Y. et al. Continuous operation of olive oil hydrolysis with lipase in Vibro Mixer. Biochemical Engineering for 2001. Tokyo, Springer - Verlag, 1992, 472 - 474
- 23) Kimura, T. et al. Continuous production of maltotriose using immobilized *Pseudomonas stutzeri*. Biotechnol. Bioeng. 32, 669 - 676 (1988)
- 24) Kimura, T. et al. Stability of immobilized malto - tetraose - forming amylase from *Pseudomonas stutzeri*. Biotechnol Bioeng. 33, 845 - 855 (1989)
- 25) 工藤 聡, 稲村征夫. " 大豆レシチンの改質 ". 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 355 - 373

- 26) 河野敏明 ほか. "ヘテロオリゴ糖の製造". 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 87 - 105
- 27) 古賀邦正 ほか. "水分活性調整糖物質の開発". 実戦バイオリアクター. 食品化学新聞社, 東京, 1990, 49 - 66
- 28) 小巻利章. 酵素応用の知識. 東京, 幸書房, 1985, 320p.
- 29) Larsson, M. et al. Integration of bioconversion and downstream processing: Starch hydrolysis in an aqueous two - phase system. Biotechnol. Bioeng. 33, 758 - 765 (1989)
- 30) Lechner, M. et al. Lipase production of *Staphylococcus carnosus* in a dialysis fermentor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 345 (1988)
- 31) Lopez - Leiva, M. & Gekas, V. A crossflow immobilized enzyme reactor for the hydrolysis of whey. Process Biochem. 21, 27 - 31 (1986)
- 32) 真壁健太郎 ほか. "食用油脂への機能性の賦与". 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 333 - 354
- 33) Malcata, F.X. et al. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow - fiber reactor: 3. Multiresponse kinetic studies. Biotechnol. Bioeng. 39, 1002 - 1012 (1992)
- 34) Malcata, F.X. et al. Use of a lipase immobilized in a membrane reactor to hydrolyze the glycerides of butteroil. Biotechnol. Bioeng. 38, 853 - 868 (1991)
- 35) Manheim, A. & Cheryan M. Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. J. Food Sci. 55, 381 - 385 (1989)
- 36) 松本直己, 菖蒲正志. "好氣的発酵法による高濃度食酢の製造へのバイオリアクターの応用". 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 289 - 313
- 37) 松本 渉 ほか. "対称型トリグリセリドの製造". 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 314 - 332
- 38) Matusmura, M. et al. Elimination of ethanol inhibition by per - straction. Biotechnol. Bioeng. 28, 534 - 541 (1986)

- 39) McConville, F.X. et al. "Enzymatic resolution of ibuprofen in a multiphase membrane reactor". Biocatalysis. Abramowicz, D.A. ed. New York VNR, 1990, 167 - 177
- 40) Melzoch, K. et al. Application of a membrane recycle bioreactor for continuous ethanol production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 469 - 472 (1991)
- 41) Mehaia, M. & Cheryan, M. "Membrane bioreactors: Enzyme processes". Biotechnology and food process engineering. Schwartzberg and Rao eds. New York, Marcel Dekker, 1990, 67 - 126
- 42) Mori, Y. et al. Ethanol production from starch in a pervaporation membrane bioreactor using *Clostridium thermohydrosulfuricum*. Biotechnol. Bioeng. 36, 849 - 853 (1990)
- 43) Molinari R. et al. Membrane reactor in fatty acid production. J. Membrane Sci. 36, 525 - 532 (1988)
- 44) 本井博文 ほか. "小麦グルテンからの食品素材の製造". 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 106 - 126
- 45) Mulder, M.H.V & Smolders, C.A. Continuous production controlled by membrane processes. Process Biochem. 21, 35 - 39 (1986)
- 46) 長友晋一郎 ほか. "機能性蛋白質の製造 (大豆)". 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 148 - 165
- 47) 中嶋光敏. "バイオリアクターと食品". 食品工業とバイオテクノロジー. 東京, 明文書房, 1989, 69 - 85
- 48) Nakajima, M. et al. Continuous hydrolysis of soluble starch by free β - amylase and pullulanase using an ultrafiltration membrane reactor. Agric. Biol. Chem. 54, 2793 - 2799(1990)
- 49) Nakajima, M. et al. Protease hydrolysis of water soluble proteins using a free enzyme membrane reactors. Process Biochem. 27, 155 - 160(1991)
- 50) Nakajima, M. et al. New enzyme reactor with forced flow of the

- substrate through an enzyme immobilized ceramic membrane.
Agric. Biol. Chem. 52, 357 - 365(1988)
- 51) Nakajima, M. et al. Conversion of sucrose by immobilized invertase in an asymmetric membrane reactor. Process Biochem. 22, 32 - 35(1988)
- 52) Nakajima, M. et al. Forced - flow bioreactor for sucrose inversion using ceramic membrane activated by silanization. Biotechnol. Bioeng. 33, 856 - 861 (1989)
- 53) Nakajima, M. et al. Use of ceramic membrane for enzyme reactors. Pro. Int. Conf. Inorg. Membranes. 257 - 265 (1989)
- 54) Nakajima, M. et al. Development of forced - flow membrane reactor for production of fructooligosaccharides. Proc. Int. Conf. Inorg. Membranes. 930 - 932 (1990)
- 55) 中嶋光敏. 膜バイオリアクターの利用技術. 月刊フードケミカル(1) 81 - 84 (1992)
- 56) 中嶋光敏. "バイオリアクターによる食品加工". 食品工業における科学・技術の進歩Ⅲ. 東京, 光琳, 1988, 147 - 167
- 57) 中嶋光敏, 渡辺敦夫. 食品開発と膜利用技術. 月刊フードケミカル(4), 66 - 72 (1991)
- 58) 中久喜輝夫 ほか. "オリゴ糖の製造". 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 67 - 86
- 59) Nakamura, K. Biochemical reactions in supercritical fluids. Trends in Biotechnol. 8, 288 - 292 (1990)
- 60) 中村哲郎 ほか. "機能性タンパク質の製造(乳)". 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 166 - 184
- 61) Nakanishi, K. et al. Long - term continuous synthesis of aspartame precursor in a column reactor with an immobilized thermolysin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 633 - 636(1990)
- 62) Nakashima, T. et al. Culture conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within

- biomass support particles. J. Ferment. Technol. 66, 441 - 448 (1988)
- 63) Nakashima, T. et al. Intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* using biomass support particles in a circulating bed fermentor. J. Ferment. Bioeng. 68, 19 - 25 (1989)
- 64) Nakashima, T. et al. "A Novel interesterification process for fats and oils using acetone - dried fungus immobilized in biomass support particles". Biochem Engineering for 2001. Tokyo, Springer - Verlag, 1992, 115 - 117
- 65) Nagayasu, T. & Nakanishi, K. "Peptide synthesis in organic solvent with an immobilized enzyme". Biochemical Engineering. Tokyo, Springer - Verlag, 1992, 112 - 114
- 66) 沼田 忠, 松本幹治・"膜型バイオリアクターを用いた味噌の新しい製造方法". メンブレンリアクター応用ハンドブック. 国眼, 松本編. 東京, サイエンスフォーラム, 1990, 145 - 151
- 67) Osaki, K. et al. Fermentation of soy sauce with immobilized whole cells. J. Food Sci. 50, 1289 - 1293 (1985)
- 68) 小澤一広 ほか. "バイオリアクターシステムによる『たまり様調味液』の製造". 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 270 - 288
- 69) Prenosil, J.E. & Hediger, T. Performance of membrane fixed biocatalyt reactors. Biotechnol. Bioeng. 31, 913 - 919 (1988)
- 70) Pronk, W. et al. The hydrolysis of triglycerides by immobilized lipase in a hydrophilic membrane reactor. Biotechnol. Bioeng. 32, 512 - 518 (1988)
- 71) Pronk, W. et al. A hybrid membrane - emulsion reactor for the enzymatic hydrolysis for lipids. J. Am. Oil Chem. Soc. 68, 852 - 856 (1991)
- 72) 澤村紀夫. リパーゼによる油脂のエステル交換. 月刊フードケミカル(7), 49 - 53 (1989)
- 73) Shabtai, Y. et al. Continuous ethanol production by immobilized yeast reactor coupled with membrane pervaporation unit. Biotech

- nol. Bioeng. 38, 869 - 876 (1991)
- 74) Sims, K.A. & Cheryan, M. Hydrolysis of liquefied corn starch in a membrane reactor. Biotechnol. Bioeng. 39, 960 - 967(1992)
- 75) 茂田井宏, 深瀬哲郎. " バイオリアクターによる醤油様調味液の製造" . 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 223 - 241
- 76) Tsai, S.W. et al. Kinetics of enzymatic hydrolysis of olive oil in biphasic organic - aqueous systems. Biotechnol. Bioeng. 38, 761 - 766(1991)
- 77) 田中幸久 ほか. " 魚油による食品素材の製造" . 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 391 - 411
- 78) 田中幸久. バイオリアクターによる魚油の改質. 油脂. 42, 234 - 237 (1989)
- 79) 友田隆造 ほか. " 屠畜血液の有効利用機能性蛋白質の製造 (血液)" . 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 185 - 202
- 80) 上野茂典 ほか. " 魚蛋白の分解" . 実戦バイオリアクター. 東京, 食品化学新聞社, 1990, 203 - 222
- 81) Van Sonsbeek H.M. et al. Hydrodynamic model for liquid - im - pelled loop reactors. Biotechnol. Bioeng. 36, 940 - 946(1990)
- 82) Van't Riet, K. & Tramper, J. Basic bioreactor design. New York, Dekker, 1991, 465p.
- 83) Vasic - Racki, D. et al. Continuous (R) - mandelic acid production in an enzyme membrane reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31, 215 - 222(1989)
- 84) Wandrey, C & Wichmann, R. " Production of L - amino acids in the membrane reactor" . Biotec, 1. Hollenberg & Sahn ed. Stuttgart, Gsutav Fischer, 1987, 85 - 92
- 85) Woodley, J.M. "Two - liquid phase biocatalysis" . Biocatalysis. Abramowicz D.A. ed. New York VNR, 1990, 337 - 356
- 86) 柳生淳二 ほか. " アルコールバイオリアクター" . フーズバイオテクノロジー事典. 東京, 産業調査会, 246 - 251 (1988)
- 87) 山根恒夫. 油脂関連酵素の反応. 油化学. 40(10), 965 - 975 (1991)

- 88) 山根恒夫. "工業的バイオテクノロジーによる機能性油脂の生産". 機能性脂質の開発と応用. 東京, シーエムシー, 1992, 74-92
- 89) 湯川英明 ほか. バイオテクノロジーによるL-アスパラギン酸の製法. 月刊フードケミカル(10) 81-84 (1987)