

ポリビニルピロリドンをマトリックスとした 光硬化性樹脂による酵素の固定化

福永 公寿*・山下 信**・木村 允*

Immobilization of Glucoamylase with Use of Photo-crosslinkable Resin Prepolymer Containing Poly (N-vinylpyrrolidone)

Kimitoshi FUKUNAGA*, Makoto YAMASHITA** and Makoto KIMURA*

Abstract

A novel convenient method for entrapping enzymes or microbial cells by the use of photo-crosslinkable resin prepolymer containing poly(N-vinylpyrrolidone) and ethyleneglycol dimethacrylate was described. Glucoamylase, used as test enzyme, was entrapped successfully and easily in the resin formed by the illumination with a Hg lamp. The relative activity of the glucoamylase entrapped in the resin was affected by the proportion of enzyme and prepolymers in the immobilization system. The entrapped glucoamylase showed about 4.5 times higher K_m value and about 2.5 times lower V_{max} value compared with the native glucoamylase (pH 4.5, 35°C, substrate: maltose). The pH and temperature dependencies of the enzyme reaction were also compared between the entrapped and native glucoamylases.

1. 緒 言

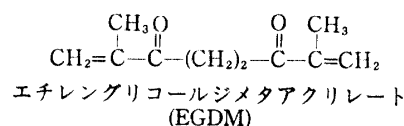
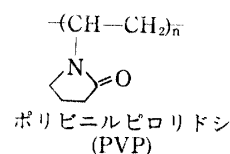
酵素の利用は人類の歴史とともに始まったといえるほど古い。とくに最近では生化学、応用微生物学などの進歩により食品、医薬品、繊維工業など広い分野にわたっている。一般に酵素反応は水溶液の状態では基質に作用させる回分法によって行なわれ、酵素は反応終了後に目的物を取り出すときに変性除去している。そこで酵素の本来の特性を生かし、利用に適したように酵素の性質を改善する試みが行なわれるようになった。そのような方法の1つとして酵素を触媒活性を保有したまま一定の空間内にとどめ連続反応、再利用を可能にする酵素の固定化¹⁾が1960年代以後盛んに研究されている。酵素の固定化には大別して担体給合法、架橋法、包括法がある。包括法には酵素をゲルの格子の中に包み込む格子型および半透膜性の皮膜により被覆するマイクロカプセル型とがあり、単一および複数の酵素、微生物菌体、オルガネラなどの固定化に利用できる。格子型ではポリアクリルアミドゲル²⁾により固定

化する方法が最も広く用いられている。著者らはポリビニルピロリドン (PVP) が親水性で生体に無害である点に着目し、PVPをマトリックスとした酵素の包括光固定化法を開発してその特性をしらべた。

2. 実験および結果

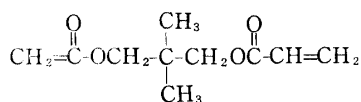
2.1 試 薬

PVP自身には光重合性はないのでPVPのポリマー鎖を光増感剤の存在下で、感光性の2または3官能性モノマーで架橋させる方法を用いた。架橋剤としては次の化合物を用いた。

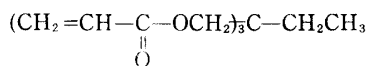


* 化学工学科

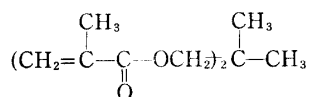
** セメダイン(株)



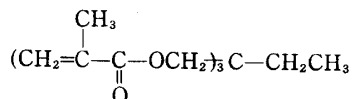
ネオペンチルグリコールジアクリレート
(NPGDA)



トリメチロールプロパントリアクリレート
(TMPA)



ネオペンチルグリコールジメタアクリレート
(モノサイザー TD1523)
(NPGDM)



トリメチロールプロパントリメタアクリレート
(モノサイザー TD1500)
(TMPM)

PVP は平均分子量 36 万および 4 万のものを使用し、増感剤としてはベンゾインエチルエーテル (BEE) を用いた。酵素はグルコアミラーゼ (起源 *Rhizopus delemar*, 天野製薬グルクザイム 6000 から単離精製したもの) を用いた。糖濃度はグルコスタット試薬で分析した。

2.2 固定化法の確立

実験前は PVP の溶解促進作用で緩衝液中の酵素と架橋剤, PVP, BEE が均一溶液となることを予想したが, 水が存在すると水相と油相とが分離してしまい酵素がとり込まれなかった。そこで架橋剤が液体物質であるので緩衝液を使用せずに各成分を混ぜ合わせてから光照射して固定化した。一般に有機溶媒中で酵素を固定化すると失活すると言われており³⁾, このような固定化法で酵素活性が保持されているのは PVP が酵素に対して特異な保護作用を有しているからと考えられる。確立した固定化法は次のとおりである。

テフロン製の直径 3.5 cm, 深さ 3 mm の円形のわく組みに約 6×6 cm の大きさのプラスチックフィルム (家庭用, 商品名ポリラップ, サランラップなど) をしき, PVP と酵素の所定量および BEE を加え, これに架橋剤の一部を加えて全体が均一になるようによく

練り合わせる。さらに残りの架橋剤を追加してよく混合してプラスチックフィルムで上からシールする (四方の端はセロファンテープで止める)。上から水銀ランプからの紫外線を片面, およそ 20 分間づつ光照射してしばらく熟成させたのち, 約 3×3 mm の大きさに切断し, 5% グルタルアルデヒド水溶液に 20 分間浸して緩衝液* で十分洗浄した。これを減圧乾燥して低温で保存して反応に用いた。得られた固定化酵素の厚さは 1~1.5 mm であった。

2.3 固定化酵素の特性の評価

反応器には図 1 に示す邪魔板 4 枚を付した攪拌槽を恒温浴に浸して用いた。反応液は 50 cm³ で液高さは 30 mm であった。他の反応条件を同一にして攪拌速度の影響をしらべた結果を図 2 に示す。攪拌回転数が 200 rpm 以上では外部拡散の影響が無視できることがわかったので以後の実験は 200 rpm で反応を行なった。

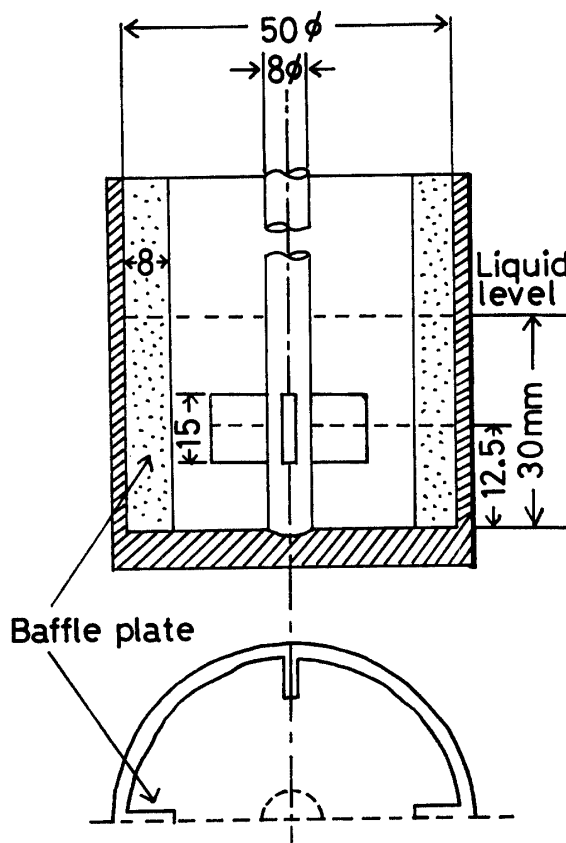


Fig. 1 Reactor.

* 酢酸緩衝液 (塩濃度 0.1 M)

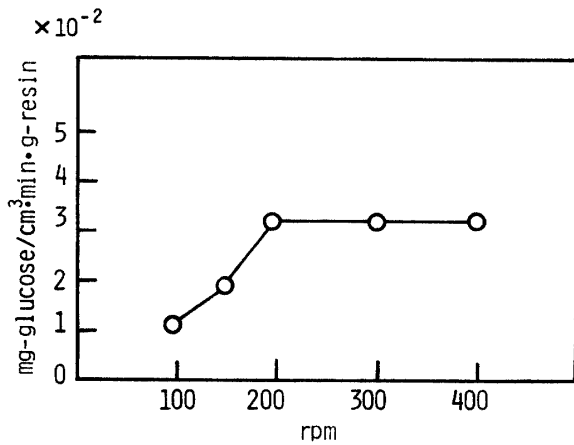


Fig. 2 Effect of stirring speed on the reaction rate of PVP-entrapped glucoamylase.

2.4 固定化におよぼす諸条件の影響

2.4.1 マトリックス組成の影響

まず PVP と EGDM を用いて、PVP と架橋剤との最適比を求める実験を行なった。その総量を 1g とし、グルコアミラーゼは 50 mg, BEE も 50 mg に固定し、PVP と EGDM との比をいろいろ変化させて得られた固定化酵素の活性で比較した。結果を表 1 に示す。PVP と EGDM はおよそ 1:1 の重量比で使用するとよいことがわかる。なお PVP は平均分子量が 4 万の

ものの方が効果的であったので、以後の実験ではすべてこれを用いた。

Table 1 Effects of the composition of matrix

PVP (g)	EGDM (g)	Activity (Unit)
0	1.0	0.012
0.2	0.8	0.231
0.4	0.6	0.200
0.8	0.2	0.186

* Glucoamylase used were 50 mg and benzoin ethyl ether used were 50 mg.

** Reaction condition: maltose 1.09 g/50 cm³, pH 4.5, 35°C.

*** 1 Unit=(1 μmole of maltose consumed)/min·cm³.

2.4.2 架橋剤の種類の影響

架橋剤の量を 0.5 g, PVP 0.5 g, BEE を 50 mg にそれぞれ固定し、架橋剤の種類をいろいろ変えて得られた固定化酵素の活性を相当する量の遊離酵素の活性との比（活性収率）で比較した。結果は表 2 にまとめた。大差はないが 3 官能性モノマーよりも 2 官能性モノマーの方が良好であると判断し、以後の実験には EGDM を使用した。

Table 2 Effects of polymerization reagents

Cross-linking Agent	Native glucoamylase (mg)	Activity of PVP-entrapped glucoamylase (mg-glucose/cm³·min·g-resin) × 10²	Activity yield (%)
EGDM	20.0	9.70	37.3
EGDM	10.6	5.32	38.6
EGDM	6.8	3.44	38.9
TMPT	19.7	6.02	23.5
TMPT	10.4	5.37	39.7
TMPT	6.6	3.12	36.4
NPGDM	20.0	8.61	33.1
NPGDM	10.0	5.15	39.6
NPGDM	6.0	2.98	38.2
TMPTM	20.0	4.94	19.0
TMPTM	10.0	2.63	20.2
TMPTM	6.0	3.00	38.4
NPGDA	20.0	6.11	23.5
NPGDA	10.0	5.20	40.0
NPGDA	5.8	2.25	29.8

* Reaction condition: maltose 1.09 g/50 cm³, pH 4.5, 35°C.

2.4.3 酵素使用量と固定化酵素活性との関係

PVP, EGDM, BEE をそれぞれ 0.5 g, 0.5 g, 50 mg と一定にしておいて使用酵素量を変化させ活性収率を求めた。結果を表3に示す。使用酵素量とともに活性は着実に増加するが活性収率は担体 1 g あたり 20 mg 付近で最高となり、それ以上酵素密度を上げてかえって活性収率は減少する。これは使用酵素量の増加とともに漏出酵素量が増加するためと思われる。したがって以後の固定化実験では酵素量は 20 mg とした。

2.4.4 固定化酵素量

仕込み酵素量のうちの程度の量が固定化されるか知らべため、得られた固定化酵素を蒸留水中ですりつぶし、水溶液の総タンパク質量をビウレット法⁴⁾で求めた。分析における基準タンパク質はウシ血清アルブミンを用いた。本研究で用いたグルコアミラーゼのタンパク質含量は 0.85 mg/mg-enzyme であった。20 mg の酵素を PVP と EGDM を用いて固定化した固定化酵素からとりだした液中のタンパク質含量から求めた酵素量は3つの試料に対して 18 mg, 20 mg, 16 mg であり、20 mg の酵素を使用した場合 90%以上の酵素が固定されることがわかった。

2.5 固定化酵素の特性

2.5.1 固定化グルコアミラーゼ活性の温度依存性

固定化グルコアミラーゼの活性の温度変化は図3のようになった。相対活性の温度変化は遊離のグルコアミラーゼとほとんど変わらないが(図4)、遊離酵素は 57°C では 20分後に失活がみられるが、固定化酵素の場合は 57°C でも失活しないのでやや熱安定性が増加するといえる。一般に固定化により酵素の熱安定性は増加するが、グルコアミラーゼの場合は熱安定性がかえって減少するという報告⁵⁾も多い。

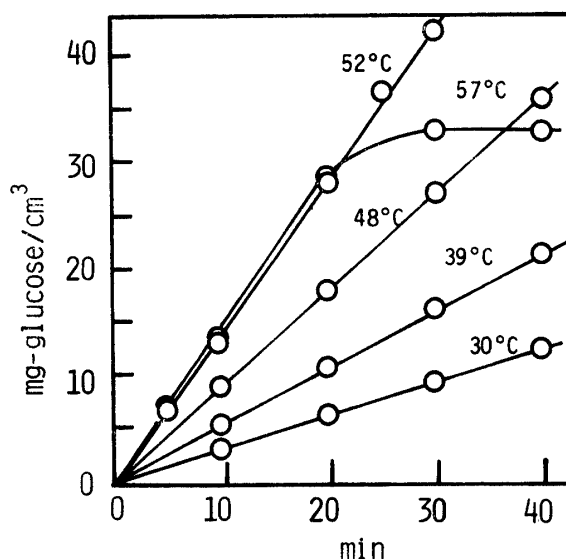


Fig. 3-1 Increase of glucose concentrations with time at various temperatures for free glucoamylase.

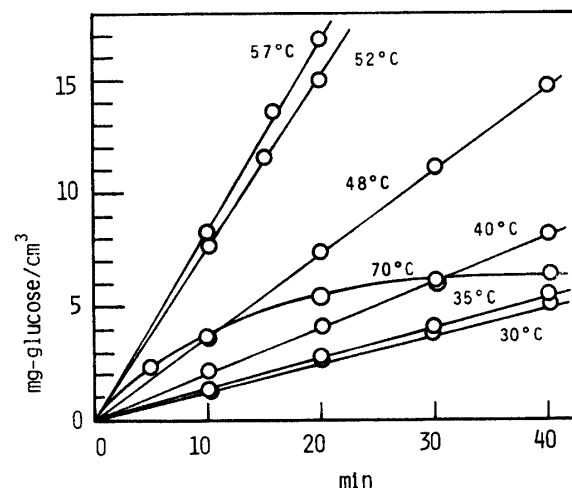


Fig. 3-2 Increase of glucose concentrations with time for PVP-entrapped glucoamylase.

Table 3 Activity yield of PVP-entrapped glucoamylase

Native glucoamylase (mg)	Activity of PVP-entrapped glucoamylase (mg-glucose/cm ³ ·min·g-resin) × 10 ²	Added activity (mg-glucose/cm ³ ·min) × 10	Activity yield (%)
20	9.38	2.47	38.0
25	7.26	1.95	37.3
50	7.41	3.83	19.4
100	8.07	7.57	10.7
200	2.96	5.31	5.6
300	6.10	8.56	7.1
500	5.60	8.51	7.1

* PVP: 0.5 g, EGDM: 0.5 g, BEE: 50 mg.

** Reaction condition: maltose 1.09 g/50 cm³, pH 4.5, 35°C.

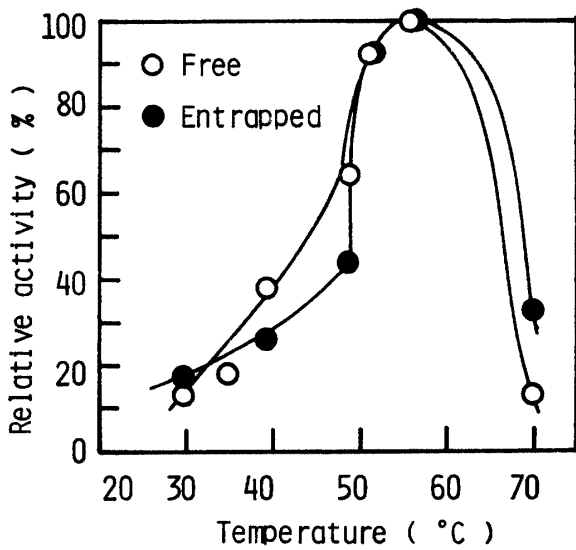


Fig. 4 Temperature-dependency of glucoamylase reaction.

2.5.2 固定化グルコアミラーゼ活性の pH 依存性

固定化グルコアミラーゼの活性の pH 依存性は図 5 のようになった。至適 pH は固定化により変化していないが相対活性は遊離酵素とくらべ高 pH 域 (5~6) で比較的高くなっている。

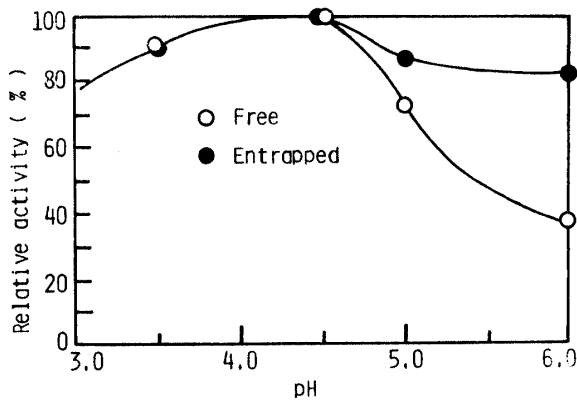


Fig. 5 pH-Dependency of glucoamylase reaction.

2.5.3 固定化酵素の有効係数

固定化酵素中の総タンパク質含量を測定したときのように蒸留水中ですりつぶした固定化酵素を用いて反応を行ない、pH 4.5、基質濃度 22.1 mg/cm³、基質液 50 cm³ でのグルコース生成速度を実測し、3 mm 角、厚さ 1 mm の対応する固定化酵素によるグルコース生成速度を割ると 0.15 であった。したがって本固定化法で得られる固定化酵素の有効係数は本研究で一般的に用いている反応条件下では 0.15 程度であると考えられる。

2.5.4 固定化グルコアミラーゼの Michaelis 定数

遊離の酵素反応は Michaelis-Menten の式であらわれ、固定化酵素反応も Michaelis-Menten 型の反応であるとすれば反応速度式はそれぞれ

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}, \quad v_{app} = \frac{V_{max}^{app}[S]}{K_m^{app} + [S]} \quad \dots\dots (1)$$

である。ここで、 v, v_{app} : 基質濃度 $[S]$ のときの反応速度およびみかけの反応速度、 K_m, K_m^{app} : Michaelis 定数およびみかけの Michaelis 定数

(1) 式の Lineweaver-Burk プロットをとると直線関係が得られ、勾配から K_m/V_{max} 、切片から $1/V_{max}$ が得られ、 K_m と V_{max} を求めることができる。

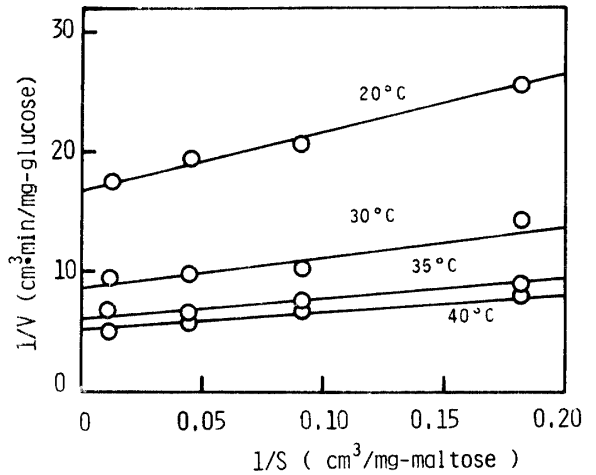


Fig. 6 Lineweaver-Burk plots of free glucoamylase.

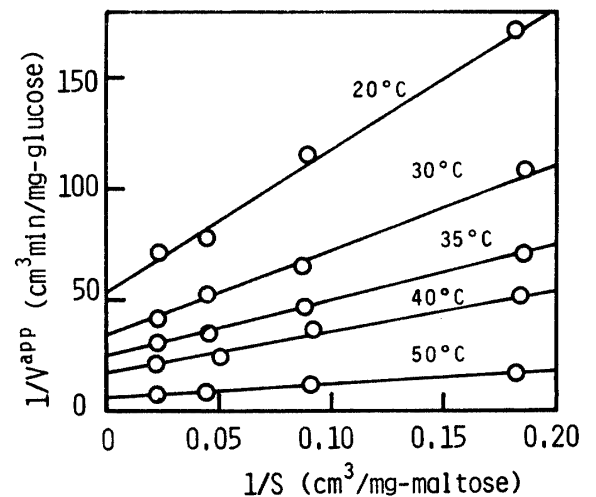


Fig. 7 Lineweaver-Burk plots of PVP-entrapped glucoamylase.

図 6 および 図 7 に各温度におけるそれぞれの Lineweaver-Burk プロットを示す。図から求めた遊離

Table 4 Kinetic parameters of free and PVP-entrapped glucoamylase

Enzyme	Temperature (°C)	20	30	35	40	50
	Parameter					
Free	K_m (mg-glucose/cm ³)	2.98	3.10	3.01	3.14	—
	V_{max} (mg-glucose/cm ³ ·min)	5.98×10^{-2}	1.16×10^{-1}	1.67×10^{-1}	1.96×10^{-1}	—
PVP-entrapped	K_m^{app} (mg-glucose/cm ³)	12.26	13.12	13.45	13.96	13.64
	V_{max}^{app} (mg-glucose/cm ³ ·min)	1.89×10^{-2}	3.03×10^{-2}	6.74×10^{-2}	1.80×10^{-1}	1.82×10^{-1}

* pH 4.5.

および固定化酵素反応に対する Michaelis 定数, 最大反応速度を表4に示す. 固定化グルコアミラーゼの K_m^{app} は cho ら⁶⁾ の活性炭にカーボジイミド法で固定化したグルコアミラーゼ (pH 4.5, 35°C, 基質マルトース) の 15.5 mg/cm^3 と, 権藤ら⁷⁾ のコラーゲン固定化グルコアミラーゼの 3.65 mg/cm^3 (pH 4.5, 35°C, 基質マルトース) との中間の値となったが, 活性炭固定化グルコアミラーゼの値にかなり近く, 本固定化法で得られる細孔径などの粒内特性は活性炭に定性的に類似しているものと思われる.

2.5.5 固定化グルコアミラーゼ反応の活性化エネルギー

グルコアミラーゼの遊離と固定化酵素反応における活性化エネルギーをいろいろな反応温度で実測した最大反応速度を用いて求めた. 図8に Arrhenius プロット

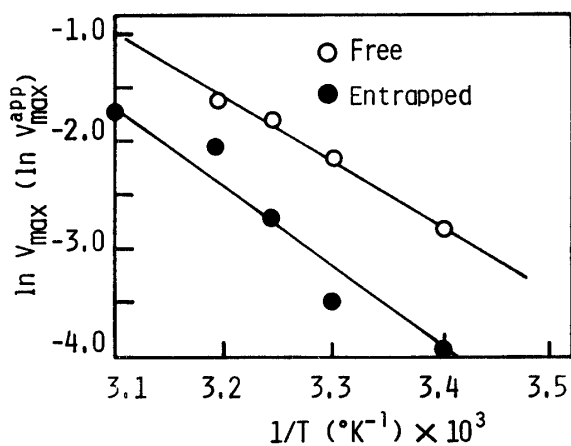


Fig. 8 Arrhenius plots of free and PVP-entrapped glucoamylase.

トを示す. 図から得られた活性化エネルギーは遊離, 固定化グルコアミラーゼに対してそれぞれ 11.6, 14.6 kcal/g-mol である. この値はコラーゲン包括固定化グルコアミラーゼの値⁷⁾, それぞれ 10.9, 14.3 kcal/g-mol に近い.

2.6 固定化グルコアミラーゼを用いたカラム反応器によるマルトースの加水分解反応

固定化酵素反応を攪拌反応器で行なう際に激しい攪拌は担体ゲルや粒子の破損をもたらすことが多く, 工業化されている固定化酵素反応の多くはカラム反応器を用いている. 本研究で得られた固定化酵素は比較的硬い粒子状であり空間率の大きいカラムが得られるので, 通常のをわらかいゲル状カラムよりも有利と思われるので固定化グルコアミラーゼを用いたカラム反応器でマルトースの加水分解反応を 35°C で行なった.

2.6.1 実験および実験結果

実験装置の概略を図9に示す. カラム (内径 6 mm, 長さ 20 cm のガラス円管) に固定化グルコアミラーゼを充てんし (充てん高さ 14 cm), 任意の空間速度で基質のマルトースの緩衝液溶液を送る. 定常状態になっ

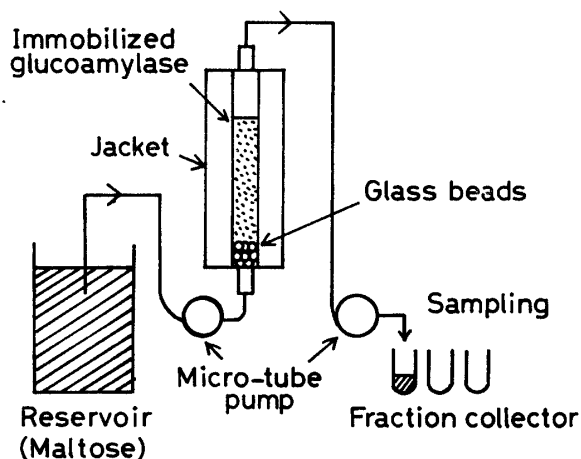


Fig. 9 Schematic diagram of continuous column reactor.

たのちフラクションコレクターで出口液を一定量づつ収集し, グルコスタット試薬を用いてグルコース濃度を定量した. なお固定化酵素粒子は攪拌反応器での諸データと比較するため, ほぼ同じ大きさ (3 mm 角) に切断したものを充てんした. 基質濃度を 9.87~150.2 mM に変化させ, 空間速度も 0.6~2.7 cm/s の

Table 5 Effect of flow rate on column reaction

Substrate (mM)	Flow rate (cm ³ /min)	Superficial velocity (cm/min)	Space time τ (min)	Concentration of glucose (mM)	Fractional conversion X(-)
9.87	0.199	0.703	19.9	7.77	0.394
	0.281	0.940	14.1	6.11	0.310
	0.348	1.23	11.1	5.11	0.259
	0.453	1.60	8.7	4.33	0.219
	0.555	1.96	7.1	3.77	0.191
	0.734	2.60	5.4	3.11	0.156
30.6	0.181	0.640	21.9	14.7	0.239
	0.266	0.940	14.9	10.7	0.176
	0.338	1.19	11.7	10.2	0.166
	0.435	1.54	9.1	8.44	0.138
	0.549	1.94	7.2	7.94	0.130
	0.758	2.68	5.2	7.11	0.116
60.6	0.201	0.771	19.7	21.8	0.180
	0.287	1.02	13.8	17.2	0.142
	0.351	1.24	11.3	15.5	0.128
	0.454	1.60	8.7	13.8	0.114
	0.552	1.95	7.2	11.4	0.094
	0.748	2.64	5.3	8.94	0.074
100.4	0.204	0.720	19.4	25.9	0.129
	0.287	1.01	13.8	19.7	0.098
	0.354	1.25	11.2	15.8	0.079
	0.450	1.59	8.8	12.5	0.062
	0.561	1.98	7.1	10.6	0.054
	0.774	2.74	5.1	9.66	0.048
150.2	0.205	0.724	19.3	30.6	0.102
	0.286	1.01	13.9	23.8	0.079
	0.356	1.26	11.1	18.0	0.060
	0.458	1.62	8.7	15.8	0.053
	0.552	1.95	7.2	15.4	0.051
	0.753	2.66	5.3	13.2	0.044

範囲で変化させて得た実験結果を表5に示す。

2.6.2 カラム反応器による固定化グルコアミラーゼ反応の解析

固定化酵素反応は(1)式と同様に(2)式のようにあらわされる。

$$R = \frac{V_{max}^{app} \cdot S}{K_m^{app} + S} \quad \dots\dots (2)$$

ここで、R: 固定化酵素反応速度 (M/S), V_{max}^{app} : 外部拡散抵抗のある固定化酵素反応のみかけの最大速度 (M/S), S: 基質濃度 (M), K_m^{app} : 外部拡散抵抗のある固定化酵素反応のみかけの Michaelis 定数 (M)

カラム反応器における連続の式は(3)式で、カラム内の流れがピストン流で定常状態を仮定すれば(4)式のようになる。

$$\frac{\partial S}{\partial t} = D_z \cdot \frac{\partial^2 S}{\partial z^2} + D_r \cdot \frac{1}{r} \cdot \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial S}{\partial r} \right) - U_s \cdot \frac{\partial S}{\partial z} - R \quad \dots\dots (3)$$

$$U_s \cdot \frac{\partial S}{\partial z} = -R \quad \dots\dots (4)$$

ここで、t: 時間 (S), D: 拡散係数, z: 軸方向の距離 (cm), r: カラム半径方向の距離 (cm), U_s : 反応液の空間速度 (cm/s)

(4)式を $z=0$ で $S=S_0$, $z=H$ で $S=S_i$ の境界条件のもとで積分すると

$$S_0 - S_i = K_m^{app} \ln (S_i/S_0) + V_{max}^{app} \tau \quad \dots\dots (5)$$

ここで、 τ : 滞留時間 ($=H/U_s$) (S), H: カラム反応器の充填高さ (cm), S_0 : カラム入口での基質濃度 (M), S_i : カラム出口における基質濃度 (M)

転化率 $X(=1-S_i/S_0)$ を(5)式に代入すると

$$S_0 X = K_m^{app} \ln (1-X) + V_{max}^{app} \tau \quad \dots\dots (6)$$

となる。(6)式から $\ln(1-X)$ と $S_0 X$ のプロットの勾配と切片とからみかけの速度定数 K_m^{app} と V_{max}^{app} とを求めることができるが、これらの値は反応液の流速(空間速度)とともに変化する⁸⁾ので、無限大の流速での外部拡散抵抗を除いた真の値を求める必要がある。

Lee ら⁹⁾ はカラム反応器による固定化酵素反応において外部拡散抵抗のない速度定数を決定する方法を考案した。すなわち、(6) 式を τ で割ると

$$\left(\frac{1}{\tau}\right)S_0X = (K_m^{app}/\tau) \ln(1-X) + V_{max}^{app} \quad \dots\dots (7)$$

また $\lim_{x \rightarrow 0} \frac{\left(\frac{1}{\tau}\right)S_0X}{\ln(1-X)} = -S_0 \quad \dots\dots (8)$

であり、(8) 式は S_0X/τ と $\ln(1-X)/\tau$ のプロットの勾配が外部拡散抵抗のない場合 ($X \rightarrow 0$), $-S_0$ に等しいことを示しているの、原点を通過して等濃度直線(同じ基質濃度についての S_0X/τ 対 $\ln(1-X)/\tau$ のプロット)と勾配が $-S_0$ の直線とが接する(交差する)点を結ぶと、この直線は外部拡散抵抗のない条件下での(7) 式をあらわし、その勾配と切片とから外部拡散抵抗のない K_m^{app} と V_{max}^{app} とを求めることができる。

表5のデータから求めた S_0X 対 $\ln(1-X)$ および S_0X/τ 対 $\ln(1-X)/\tau$ のプロットを図10および図11に示す。図中の X はマルトースの転化率である。図から $K_m^{app} = 36.7 \text{ mM}$, $V_{max}^{app} = 1.55 \text{ mM/min}$ (35°C) が得られた。これらの値はマルトースの濃度についてであり、さきの攪拌槽での結果と比較するためグルコース濃度に換算すると $K_m^{app} = 13.2 \text{ mg/cm}^3$, $V_{max}^{app} = 5.58 \times 10^{-1} \text{ mg/cm}^3\text{min}$ であり、攪拌槽での値 ($K_m^{app} = 13.5 \text{ mg/cm}^3$, $V_{max}^{app} = 6.74 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$

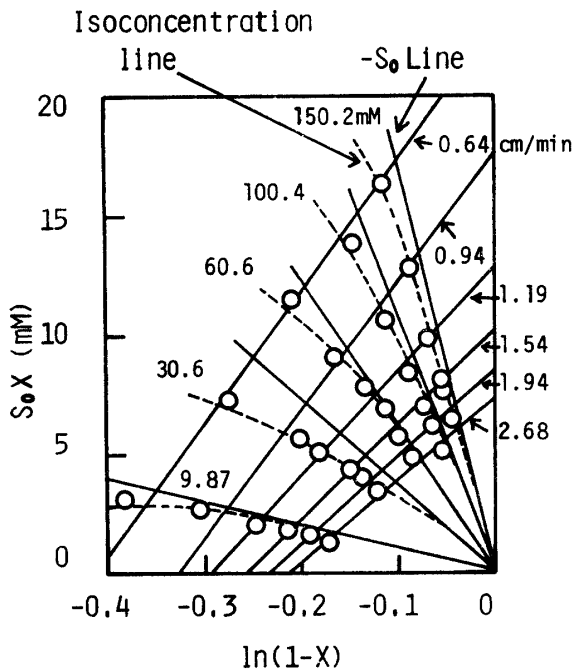


Fig. 10 Conventional plot of S_0X vs $\ln(1-X)$ for the PVP-entrapped glucoamylase system.

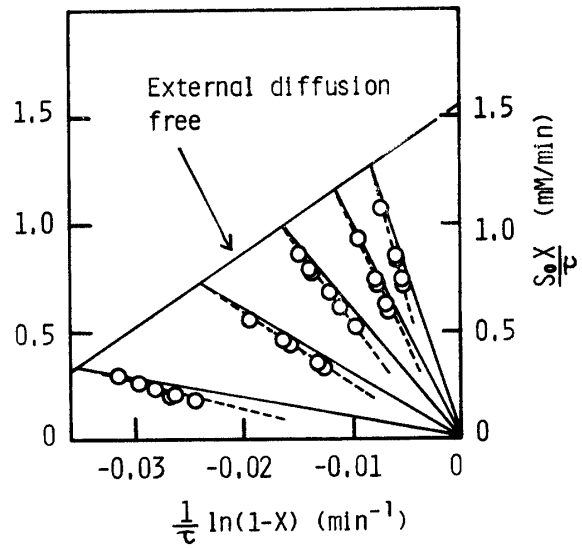


Fig. 11 Plot of S_0X/τ vs $\ln(1-X)/\tau$.

min, 35°C) に K_m^{app} はほぼ一致した。

2.7 固定化酵素のくり返し使用実験

本法による固定化グルコアミラーゼの耐久性をみるため pH 4.5, 35°C で回分式攪拌槽で1時間反応させ、洗浄、乾燥したのち、さらに同一条件で新しい基質と反応させる操作を50回くり返して酵素活性の変化を測定したのが図12である。活性は安定しており、

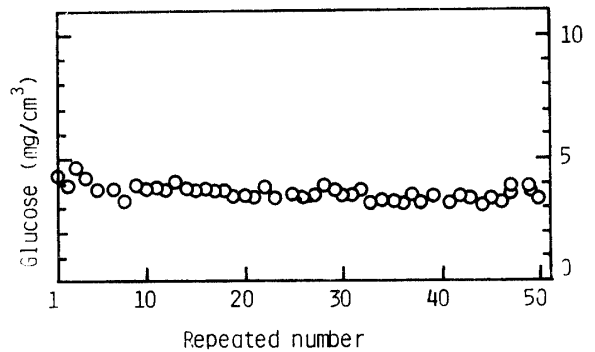


Fig. 12 Repeated use of PVP-entrapped glucoamylase.

Reaction condition: maltose $1.09 \text{ g}/50 \text{ cm}^3$, pH 4.5, 35°C . Each assay was done for 1 hour.

活性の劣化が一次式に従うとして提出されている劣化速度式¹⁰⁾ から活性の半減期 $t_{1/2}$ を求めると 581 時間となった。

$$t_{1/2} = 0.693/Kd, \quad Kd = \frac{2.303}{\theta} \log \frac{E_0}{E_\theta}$$

ここで E_0, E_θ : それぞれ時間 0, θ における固定化酵

素の活性

この値は十分に大きい。

3. 結 言

PVP と EGDM の混合液を光硬化させることにより酵素が固定化されることがわかった。これを担体としてグルコアミラーゼを固定化して粒子状の固定化グルコアミラーゼを得た。マルトースを基質とした攪拌槽反応器およびカラム反応器を用いて次のような知見を得た。担体 1g あたり 20mg 以下の酵素使用量では 90% 以上の酵素が固定化され、有効係数 0.15 程度の固定化酵素が得られる。その活性は長時間安定（半減期 581 時間）していることがわかった。固定化グルコアミラーゼの活性の pH 依存性は固定化によって変化しないが、熱安定性は遊離酵素よりやや良くなることがわかった。PVP は生体に対して無害であることが知られており、その特性を生かした応用が期待される。

終わりに実験に協力された今城 修氏（現山陽信販（株））ならびに、モノサイザー TD-1500 シリーズを提供して頂いた大日本インキ化学工業株式会社（関西樹脂技術研究所）に感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 千畑一郎：固定化酵素，講談社サイエンティフィック（1975）；千畑一郎，土佐哲也：生化学実験講座，5 下，東京化学同人（1975）
- 2) P. Bernfeld and J. Wan: *Science*, **142**, 678 (1963)
- 3) 福井三郎，田中渥夫：化学と生物，**19**, 620 (1981)；D. H. Pliura and J. B. Jones: *Can., J. chem.*, **58**, 2633 (1980)
- 4) A. G. Gornall, C. S. Bardawill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949)
- 5) R. Goldman, L. Goldstein, and E. Katchalski: *Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports*, p. 24, Academic Press, New York (1971)；A. Flynn and D. B. Johnson, *J. Biochem.*, **8**, 501 (1977)
- 6) Y. K. Cho and J. E. Bailey, *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1651 (1978)
- 7) 神谷英和，大崎知恵，榎藤晋一郎，化学工学論文集，**4**, 522 (1978)
- 8) A. Bar-Eli and E. Katchalski, *J. Biol. Chem.*, **238**, 1690 (1963)；D. M. Lilly, W. E. Hornby, and E. M. Crook, *Biochem. J.*, **100**, 718 (1966)；R. N. Mukherjea, P. Bhattacharya, B. K. Ghosh, and D. K. Taraphdar, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1259 (1977)
- 9) S. B. Lee and D. D. Y. Ryu, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1499 (1979)
- 10) L. Y. Ho and A. E. Humphrey, *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 291 (1970)

(昭和 57 年 4 月 20 日 受理)