

[生物工学会誌 第80号 第3号 95-101. 2002]

オルガノゲル担体に固定化した *Candida rugosa* リパーゼ によるエステル合成の反応条件と連続反応

長山 和史^{1*}・唐岩 克徳¹・植田 章夫¹・今井 正直²高知工業高等専門学校物質工学科,¹ 日本大学生物資源科学部食品科学工学科²¹ 〒 783-8508 高知県南国市物部 200-1² 〒 252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

(平成13年11月15日受付 平成14年1月21日受理)

Reaction Conditions and Continuous Mixed-Flow Esterification Reactions by *Candida rugosa* Lipase Immobilized in AOT Microemulsion-based Organogels

KAZUHITO NAGAYAMA,^{1*} KATSUNORI KARAIWA,¹ AKIO UETA,¹ and MASANAO IMAI² (*Department of Materials Science and Engineering, Kochi National College of Technology, 200-1 Monobe, Nankoku, Kochi 783-8508*¹; *Department of Food Science and Technology, College of Bioresource Sciences, Nihon University, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510*²) *Seibutsu-kogaku* **80**: 95-101, 2002.

Gelatin-containing di-2-ethylhexyl sodium sulfosuccinate (AOT) microemulsion-based organogels (MBGs) were investigated as a reaction medium for the esterification of lauric acid with butyl alcohol catalyzed by *Candida rugosa* lipase. The initial reaction rate was maximum at a $W_G (= [H_2O]/[AOT])$ in the MBG phase) value of 100. The MBG particle radius for reaction-controlled operation is examined as a function of the bulk substrate concentration. Immobilized lipase was also used in a continuous reaction using a reactor fitted with a basket-type impeller. The lipase activity was maintained successfully over a period of 36 d by the removal of water that accumulated in the MBGs using a concentrated AOT solution.

[**Key words:** AOT, microemulsion, lipase, esterification, organogel]

非極性の有機溶媒中において両親媒性分子が自発的に会合することにより形成されるマイクロエマルション系は、有機相内に微視的な油水界面を分散状態で提供することから、リパーゼの触媒活性を効果的に発現させる反応媒体として期待されており、反応活性が最大に発揮される反応条件¹⁻³⁾や反応終了後の酵素回収に関する検討がなされている。⁴⁾

両親媒性分子によるマイクロエマルション系は、生体高分子を添加することによって物理的に安定なゲル組織 (microemulsion-based organogel, MBG) を形成することができるため固定化担体としてその活用を期待することができる。^{5,6)} この手法により調製されるゲル組織は、マイクロエマルションの特異的な界面機能を合わせ持つ酵素の固定化担体として考えることができる。既往の研究

では、ゲル組織の調製条件によって反応活性が異なることや固定化リパーゼの繰返し再利用が可能であることが報告されている。⁷⁻¹⁰⁾

本法による固定化リパーゼを用いる反応プロセスの基礎を確立するためには、反応活性に対するゲル組織条件の影響を解析し、担体内での物質移動抵抗の影響を加味した反応条件を提示することが重要である。加えて、反応プロセスの経済性を高めるうえで連続的な反応操作の検討も重要である。

本研究の目的は、両親媒性分子によるマイクロエマルション系に生体高分子を添加し調製したゲル組織にリパーゼを固定化し、脂肪酸エステル合成を行い、反応活性に対するゲル相水分量の影響を検討するとともに、反応律速の条件を満たす担体粒子径と基質濃度の関係を求

* 連絡先, Corresponding author.

TEL/FAX. 088-864-5571 E-mail: knaga@ms.kochi-ct.ac.jp

めることである。加えて、連続反応操作における反応活性の長期安定性の可能性を求めることである。

実験方法

試薬 両親媒性分子として、スルホこはく酸ジ-2-エチルヘキシルナトリウム（以下 AOT, ナカライテスク 株）を用いた。有機溶媒は、2,2,4-トリメチルペンタン（以下イソオクタン, 和光純薬工業 株）である。生体高分子としてゼラチン（from porcine skin, Bloom 300, Type A, Sigma 社）を用いた。反応基質は、ラウリン酸とブチルアルコール（和光純薬工業 株）である。リパーゼの起源は、*Candida rugosa* (Type VII, 840 units/mg, Sigma 社) を用いた。緩衝液は、50 mM KH_2PO_4 -50 mM NaOH 水溶液 (pH 7.0) である。

固定化リパーゼの調製 AOT 0.47 g をイソオクタン 3.5 ~ 5 cm^3 に溶解し有機相とした。水相は緩衝液 0.5 cm^3 にリパーゼ粉末 100 mg を添加したものである。この有機相と水相を混合することにより W/O マイクロエマルジョン相を形成した。このマイクロエマルジョン相の水分量はカールフィッシャー滴定 (MKS-1s, 京都電子工業 株) により求めた。これより W 値を算定した。一方、ゼラチン相は、ゼラチン粉末 1.3 g に緩衝液 1.5 ~ 3.0 cm^3 をメスピペットを用いて添加することにより形成した。マイクロエマルジョン相とゼラチン相を個別に 328 K (55°C) に昇温させた後、両者を混合攪拌することにより固定化リパーゼを調製した。調製ゲルを室温まで空冷し、253 K (-20°C) にて保存した。

なお、固定化ゲル相の水分量については、マイクロエマルジョン相由来の水分量はカールフィッシャー滴定に基づき決定した。ゼラチン相由来の水分量はピペットによる緩衝液の添加量より明らかである。両相に由来する水分量の和をゲル相水分量とした。本研究の W_G 値は、両相由来の水分子のモル数の和を分子とし、マイクロエマルジョン相由来の AOT 分子のモル数を分母として定義したものである。

反応操作 調製ゲルを 2 ± 0.2 mm 立方角 (平均体積 7 cm^3) にサイジングし、バイアル管 (内径 35 mm) に入れ、ラウリン酸とブチルアルコールの濃度が各々 100 mM となるように調整したイソオクタン溶液 30 cm^3 を添加することにより反応を開始した。バイアル管内は、磁気攪拌子により 6 s^{-1} で攪拌した。また、100 mM ラウリン酸ブチル溶液を用いた加水分解を同様の操作で行った。

一方、本研究では連続反応をバスケット攪拌翼型反応

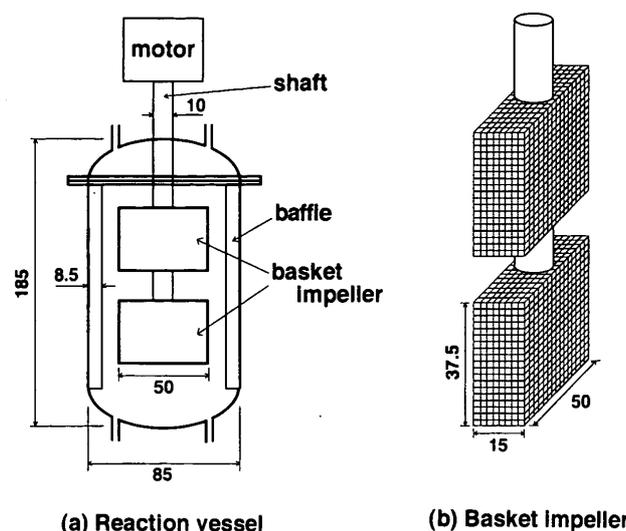


Fig. 1. Experimental apparatus. Dimensions are in mm. Four baffles were installed in the vessel.

器を用いて行った (Fig. 1)。 2 ± 0.2 mm 立方角にサイジングしたゲル粒子 28 cm^3 (約 3500 個) を Fig. 1-b に示したバスケット攪拌翼に充填した。すなわち、バスケット翼側面に取り付けた開閉口より上段ならびに下段バスケットに各々 14 cm^3 を充填したものである。なお、各バスケットの内体積は 22.5 cm^3 である。これを反応器内 (容積 800 cm^3) に設置し、基質溶液を連続供給 (33.3 cm^3/h) することにより反応を開始した。攪拌翼の回転数は、 1.67 s^{-1} とした。反応は、298 K (25°C) にて行った。

本研究では、反応の進行にともなって生成するラウリン酸ブチルエステルを定量し、リパーゼの反応活性を求めた。まず、所定時間ごとにサンプリングを行い、サンプル中のエステル画分を分取するため Florisil (100/200 mesh, 和光純薬工業 株) を用いてカラムクロマト展開 (展開溶媒: 5 v/v% ジエチルエーテル/ヘキサン溶液) により分画した。次に、得られたエステルの画分をガスクロマトグラフィー (GC-8A, 島津製作所; 担体 Unisole 3000/Unipor C, 80/100 mesh, GLサイエンス 株) により定量し、反応生成物の量を求めた。

有効拡散係数の測定 ゲル粒子内での基質の有効拡散係数を逐次溶出法により実測した。調製ゲルを前報⁹⁾ に示したように 1.5 ~ 2.5 mm 立方角にサイジングし、500 mM の基質を含むイソオクタン溶液に室温にて 24 時間浸漬した。ゲル内の基質の溶出は、ステンレスワイヤーに保持した基質を含むゲル粒子をイソオクタン 5 cm^3 に浸すことにより行い、所定時間ごとに順次新規のイソオクタン相にゲル粒子を移した。各フラクション中に溶出した基質の定量は、ガスクロマトグラフィー (GC-8A,

島津製作所；担体 FFAP/Uniport S, 60/80 mesh, GL サイエンス (株) により行った. 実験は 298 K (25°C) にて行った.

分配係数の測定 ゲル相とイソオクタン相の基質の分配係数は, 調製ゲル 7 cm³ と 50 mM の基質を含むイソオクタン溶液 30 cm³ を 7 日間恒温振とう接触させ, 接触後のイソオクタン溶液中の基質濃度をガスクロマトグラフィー (GC-8A, 島津製作所；担体 FFAP/Uniport S, 60/80 mesh, GL サイエンス (株)) により定量し, 両相の基質濃度比から算出した. 実験は 298 K (25°C) にて行った.

結果と考察

本研究では, 固定化リパーゼの反応活性を初期反応速度を求めることにより評価した. また, ゲル相水分量の指標として W_G 値 ($= [H_2O]/[AOT]$ in MBG phase) を定義した.

ゲル相水分量の影響 本法によるゲル組織は, 低い W_G 値の領域において有機相とゼラチン相が分離し調製することができないが, W_G 値が 80 以上の条件下において調製することが可能であった. すなわち, 安定なゲルの調製のために最低限のゲル相水分量の存在が必要であることが認められた.

反応操作開始直後は反応速度が非定常である傾向が認められたので, 速度論解析を進めるに際しては反応速度の定常値が得られる最も早い時点において初期反応速度を定義した. その初期反応速度と W_G 値との関係を示したものが Fig. 2 である. 初期反応速度は, $W_G = 100$ を極大値として変化し, 反応活性が最大に発揮されるゲル相水分量の存在が認められた. 反応活性が最大値を示す

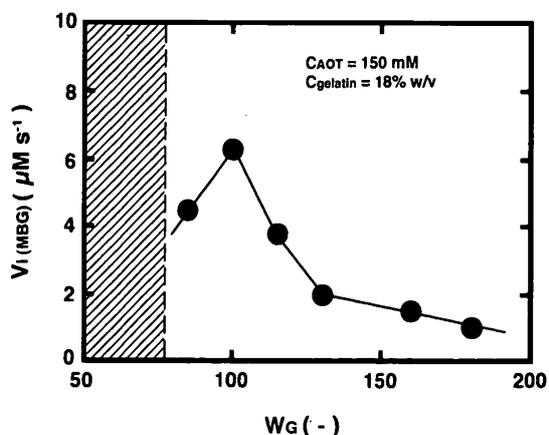


Fig. 2. Effect of W_G value on initial reaction rate. Lauric acid = 100 mM, butyl alcohol = 100 mM. Hatching shows the two-phase region.

W_G 値は, マイクロエマルション系での最適 W 値 ($= [H_2O]/[AOT]$ in w/o microemulsion phase = 10) と比較して 10 倍高い値であった.

W_G 値が相対的に低い領域で反応活性が高く, W_G 値が高い条件下で反応活性が低下する傾向は *Chromobacterium viscosum* リパーゼによるデカン酸オクチル合成での結果⁷⁾ と一致している. 本研究のエステル合成においても相対的に低いゲル相水分量の条件が反応に対して好適であった. ただし, ゲル形成を可能とする最低水分量 ($W_G = 80$) に接近した水分量条件では反応活性が十分高いとはいえない.

一方, 本研究の条件下でラウリン酸ブチルの加水分解の反応速度を予備実験として実測したところ, エステル合成の速度に比較して 1/10 ~ 1/20 程度の低い値 ($0.3 \mu\text{M s}^{-1}$) であった. これより, 正反応であるエステル合成の反応速度に対する逆反応 (加水分解) の影響は, 本研究の範囲内では微小であると考えられる.

一般に固定化酵素の反応活性は, 担体の調製条件や種々の濃度条件によって変化することが知られており, 律速段階の評価を定量的に行うことは反応条件の設定やプロセス設計のうえで重要である. 固定化触媒を用いる際, Thiele modulus (ϕ) を算出し, これより有効係数 η を算定するケースが多い. Thiele modulus を正確に算出するためには真の速度定数が求められている必要があるが, 本系のような酵素反応系では厳密にこれを決定することは実験的にも困難である. そこで, observable modulus ($\Phi = \eta\phi^2 = V_i(\text{MBG})\Gamma_{\text{MBG}}^2/9DeCs$) を用いて有効係数 η の推算を行うことによって, 律速段階に関する考察を試みることとした. $W_G = 100$ の条件における速度定数 (Table 2) により基質本体濃度とミカエリス定数の比である β ($\beta^{\text{LA}} = 6.67, \beta^{\text{BA}} = 1.25$) を算出し, β をパラメータとした η と Φ の関係図¹¹⁾ から両基質ともに $\eta \approx 1$ が求められる. また, Thiele modulus の算出によっても η と ϕ の関係図¹⁷⁾ から $\eta \approx 1$ が求められ, observable modulus と一致した結果であった. このことは, $W_G = 100$ の条件では Table 1 に示すようにラウリン酸の有効拡散係数が極大値を示し, 拡散の影響が最も現れると予想される水分量条件であっても反応律速としてみなせることを示している. 本研究での反応速度は $W_G = 100$ を極大値とする変化を示している. $W_G = 100$ の前後の条件下では, ミカエリス定数が増大することを考慮すると β の値が小さくなるが, $\eta \approx 1$ であることに変更は生じない. このことは本研究のゲル相水分量の設定条件は反応律速下にあることを示すものである.

Table 1. Observable modulus, initial reaction rate and effective diffusion coefficient for lauric acid and butyl alcohol as a function of the W_G value.

W_G	ϕ^{LA}	ϕ^{BTA}	$V_{i(MBG)}$	De^{LA}	De^{BTA}
[-]	[-]	[-]	$[\mu M s^{-1}]$	$[10^{-10} m^2 s^{-1}]$	$[10^{-10} m^2 s^{-1}]$
85	0.02	0.03	4.5	2.3	1.7
100	0.03	0.04	6.3	2.6	1.8
115	0.02	0.02	3.8	2.0	1.8
130	0.01	0.01	2.0	1.5	1.8
160	0.02	0.01	1.5	1.0	1.7

$$\Phi = V_{i(MBG)} r_{MBG}^2 / 9DeC_s, r_{MBG} = 1 \text{ mm}, C_s = 100 \text{ mM for both substrates.}$$

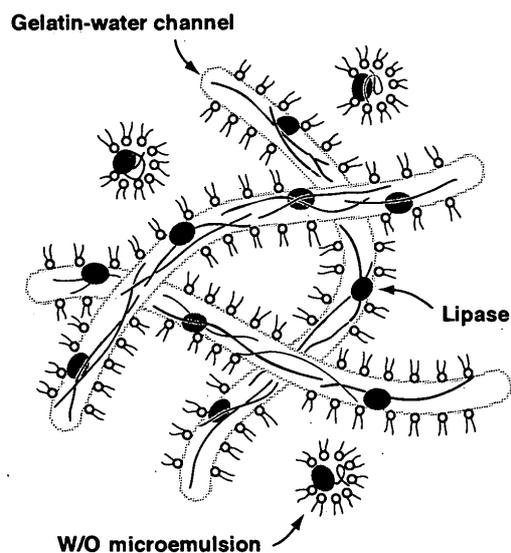


Fig. 3. Structure of AOT microemulsion-based organogel.

本系のゲル組織のイメージは Fig. 3 に模式的に示したように、ゼラチン分子が基本骨格を形成し、その周囲に水相がマイクロなチャンネルを形成し、そのチャンネル間隙に有機相が存在し、両親媒性分子 AOT が水相の周囲に配向吸着をなしたネットワークと考えられている。^{7,15)} また、ネットワーク内の有機相には W/O マイクロエマルション滴も若干存在していることが小角中性子散乱の測定結果から推定されている。^{7,15)} また、リパーゼの存在位置は inner interface と呼ばれるマイクロ界面の水相側領域であると考察されている。¹⁶⁾

一方、AOT 分子集合体に可溶化したリパーゼの分子楕円率に関しては、*C. rugosa* 起源では高い W 値の条件下において増加し、¹²⁾ 一方 *C. viscosum* 起源では、W 値の増大とともに低下し、水相中以下の値を示すものの、さらに W 値が増大すると緩やかな増加傾向に転じることが報告されている。¹³⁾ 分子楕円率の変化は、 α -ヘリックス含量の変化を意味するので、このことは有機相水分量によってリパーゼの分子構造が変化する可能性を示すものである。このことはゲル内の水分量の変化によって水相チャ

ネルの曲率あるいは直径が変化し、界面に存在しているリパーゼの分子構造が影響を受けていることを示唆している。ゲル構造が収縮するような W_G 値の小さい領域では、ゲル内が相対的にやや疎水性の雰囲気となり、酵素分子を構成している疎水性のアミノ酸が分子内部から外部に露出する傾向が強まることも考えられる。水相チャンネルの変化は、界面に存在している両親媒性分子の移動や分子間距離の変動をとめない、これによって局所的な静電的相互作用も変化する可能性がある。初期反応速度が W_G 値によって変化する背景として、このようなゲル相水分量による局所的疎水性の変化や静電的変化によるリパーゼの構造変化を指摘することができる。

反応律速となる条件設定 本法による固定化リパーゼを用いる反応プロセスを設計する基礎として、反応律速となる担体粒子径と基質濃度を定めることは設定条件として重要である。

本研究では全反応過程を通して有効係数が 0.9 以上となる条件が反応律速下にあるものとしてみなした。両基質の液本体濃度を等しく変化させた場合、反応律速となるゲル粒子半径は液本体濃度を変数として Fig. 4 の斜線

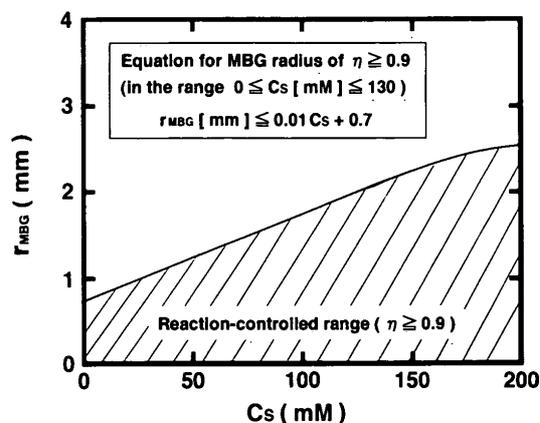


Fig. 4. Relation between MBG particle radius and bulk substrate concentration for an effectiveness factor of 0.9 or above. The hatched area denotes reaction-controlled conditions.

Table 2. Parameters for estimating effectiveness factor of 0.9 and MBG particle radius.

MBG conditions:	$W_G = 100$; $C_{\text{gelatin}} = 18\% \text{ w/v}$; $C_{\text{AOT}} = 150 \text{ mM}$
Kinetic parameters*:	$V_{\text{max(MBG)}} = 10 \mu\text{M s}^{-1}$ $K_m^{\text{LA(MBG)}} = 15 \text{ mM}$ $K_m^{\text{BTA(MBG)}} = 80 \text{ mM}$
Effective diffusion coefficient:	$De^{\text{LA}} = 2.6 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ $De^{\text{BTA}} = 1.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$
Partition coefficient:	$p^{\text{LA}} = 0.85$ $p^{\text{BTA}} = 4.0$

* Kinetic parameters were obtained from esterification using MBGs *ca.* 500 μm in diameter.

領域で表される。なお、ゲル粒子半径は、種々の基質濃度条件のもと両基質の有効係数の積が0.9以上となる点を粒子半径を変数として算出したものであり (Appendix), この算出のために用いた条件を Table 2 に示した。これより、基質濃度範囲 $0 \leq C_s [\text{mM}] \leq 130$ において、反応律速となるゲル粒子の半径を与える実験式として式(1)を得た。

$$r_{\text{MBG}} [\text{mm}] \leq 0.01 C_s + 0.7 \quad (1)$$

連続エステル合成 Fig. 5 にバスケット攪拌翼型反応器を用いた連続エステル合成における反応速度を示す。なお、ゲルの調製条件は前報⁹⁾を参照し、反応活性が最大に発揮される $W_G = 100$, $C_{\text{gelatin}} = 18\% \text{ w/v}$ ならびに $C_{\text{AOT}} = 150 \text{ mM}$ とした。この条件の有効係数は0.97である。反応はイソオクタンのみ存在する反応器内へ基質溶液を供給することにより開始し、滞留時間が24時間となるように液流量($33.3 \text{ cm}^3/\text{h}$)を設定した。Fig. 5 に示

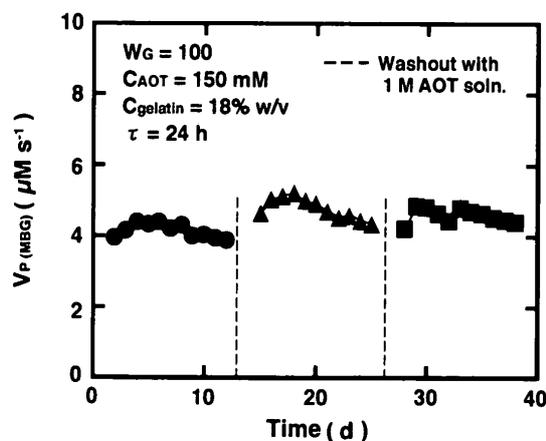


Fig. 5. Continuous esterification using a reactor fitted with a basket-type impeller. Lauric acid = 100 mM, butyl alcohol = 100 mM.

したように固定化リパーゼの反応活性は長時間 (12 日間) にわたり安定的に発揮されることが認められた。約 10 日間を経過したころから反応活性が徐々に低下する傾向が認められた。また、バスケット翼内でのゲルの状態変化として、ゲル粒子が膨潤することが目視によって認められた。これはエステル合成の進行とともに生成する水分子の影響であると考えられる。

ゲル担体内において酵素は、ゲル構成成分との静電的結合や水素結合による多点的な結合により回転分子運動が抑制された状態で固定化され、より剛直な分子構造となり、熱安定性が增大することが報告されている。¹⁴⁾ 本系におけるリパーゼ分子も有機相との接触による分子構造の変化をゼラチン分子との多点結合によって抑制されているものと考えられる。連続反応の進行にともなってゲル粒子内へ水分子が蓄積し、これにともない酵素分子の安定性をもたらしていた多点結合がゲルの膨潤により維持できなくなり、反応活性が徐々に低下したと考えられる。

ゲル内に蓄積した水分子を高濃度 AOT 溶液と接触することにより除去し、反応活性を回復させることができる。^{7,9)} そこで本研究では、連続反応 12 日間ごとに 1 M AOT/イソオクタン溶液による蓄積水分子の除去を行い反応活性の回復操作を実施した。接触操作は、反応器内でゲル粒子を AOT 溶液に浸漬し、24 時間接触させることにより行った。接触操作後、ゲル粒子を連続反応に再度用いた結果、前段と同等のレベルにまで反応活性の回復がみられ、再利用 2 回目あるいは 3 回目ともに同じレベルの反応速度が維持されることが認められた。

以上の結果より、オルガノゲル固定化リパーゼは、定期的に高濃度 AOT 溶液と接触させることにより長期間安定な反応活性を示し、連続的なエステル合成に利用することが可能であることが示された。本系における連続操作での反応速度は、平均して約 $4.5 \mu\text{M s}^{-1}$ であった。ただし、エステル化収率としては約 15% であった。本稿のエステル化収率は必ずしも高いとはいえない。滞留時間は現在 24 時間であるが、たとえば 96 時間にすることにより約 50% の収率を期待することができる。一方、ゲルの充填率は本研究において 3.5% であり、これを 7% 程度まで上げることは比較的容易である。滞留時間を 96 時間とし、充填率を 7% まで高めることにより約 70% のエステル化収率を見込むことができる。

要 約

AOT マイクロエマルジョン系にゼラチンを添加し調

製したゲル組織に *Candida rugosa* リパーゼを固定化し、ラウリン酸ブチル合成を行い、反応活性に対するゲル相水分量の影響を検討し、反応律速を与えるゲル粒子径と基質濃度の関係を求め、連続的な反応操作を行い、以下の結果を得た。1) 固定化リパーゼの反応活性が $W_G = 100$ で最大値を示すことを明らかにした。2) 有効係数の推算を行うことにより、基質の液本体濃度 $0 \leq C_S [\text{mM}] \leq 130$ の範囲において反応律速となるゲル粒子半径の実験式 ($r_{\text{MBG}} [\text{mm}] \leq 0.01 C_S + 0.7$) を得た。3) バスケット攪拌翼型反応器を用いて連続エステル合成を行い、高濃度 AOT 溶液との接触を通じて、固定化リパーゼの反応活性が長期間 (864 時間 (36 日間)) にわたり安定に発揮されることを明らかにした。

Appendix

本稿における反応律速となるゲル粒子の半径を与える実験式 (式(1)) を次のように導出した。

1 基質の不可逆反応に対して、(A1) 式が求められている。

$$\phi = \frac{V_g}{A_g} \sqrt{\frac{V_{\text{max(MBG)}}}{DeK_m(\text{MBG})}} \frac{1}{\sqrt{2(1+\nu)}} \left[\frac{1}{\nu} + \ln \left(1 + \frac{1}{\nu} \right) \right]^{-0.5} \quad (\text{A1})$$

ここで、 $\nu = K_m(\text{MBG})/C_{\text{SR}}$ 、 $C_{\text{SR}} = C_S \times P$ である。

これより、一般化 Thiele modulus (ϕ) の関数として有効係数 η を次式に従って推算することができる。

$$\eta = \frac{1}{\phi} \left(\frac{1}{\tanh(3\phi)} - \frac{1}{3\phi} \right) \quad (\text{A2})$$

(A1) 式中の V_g/A_g は球形粒子の場合 $r_{\text{MBG}}/3$ であるから、 ϕ を r_{MBG} の関数として計算することができ、この ϕ 値に対して (A2) 式より η を算出することができる。

本研究では 2 基質反応であるため、ラウリン酸とブチルアルコールそれぞれに ϕ^{LA} 、 ϕ^{BTA} を設定し、これより各々 η^{LA} 、 η^{BTA} が求められる。

反応全体の有効係数 η^{total} は η^{LA} と η^{BTA} の積であるので、

$$\eta^{\text{total}} = \eta^{\text{LA}} \times \eta^{\text{BTA}} \geq 0.9 \quad (\text{A3})$$

を満たす ϕ 、 r_{MBG} を (A1) (A2) 式より求めることができる。

記号

Ag	: surface area of MBG particle [mm^2]
C_{AOT}	: concentration of AOT in MBG phase [mmol dm^{-3} -MBG phase]
C_{gelatin}	: concentration of gelatin in MBG phase [% w/v-MBG phase]
C_S	: concentration of substrate in organic phase [mmol dm^{-3} -organic phase]
C_{SR}	: concentration of substrate at surface of MBG [mmol dm^{-3} -MBG phase]
De	: effective diffusion coefficient of substrate in MBG particle [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]
$K_m(\text{MBG})$: Michaelis constant in MBG phase [mmol dm^{-3} -MBG phase]
P	: partition coefficient of substrate between MBG phase and bulk organic phase [$\text{mol-MBG phase/mol-organic phase}$]
r_{MBG}	: radius of MBG particle [mm]
t	: reaction time [d]
V_g	: volume of MBG particle [mm^3]
$V_{i(\text{MBG})}$: initial reaction rate in MBG phase [$\mu\text{mol dm}^{-3}$ -MBG phase s^{-1}]
$V_{\text{max(MBG)}}$: maximum velocity in MBG phase [$\mu\text{mol dm}^{-3}$ -MBG phase s^{-1}]
$V_{\text{P(MBG)}}$: reaction rate of ester in continuous esterification [$\mu\text{mol dm}^{-3}$ -MBG phase s^{-1}]
W	: molar ratio of water to AOT in w/o microemulsion phase [$\text{mol-H}_2\text{O/mol-AOT}$]
W_G	: molar ratio of water to AOT in MBG phase [$\text{mol-H}_2\text{O/mol-AOT}$]
<Superscripts>	
BTA	: butyl alcohol
LA	: lauric acid
<Greek letters>	
Φ	: observable modulus ($\equiv \eta\phi^2 = V_{i(\text{MBG})}r_{\text{MBG}}^2/9DeC_S$) [-]
η	: effectiveness factor [-]
τ	: residence time [h]
ϕ	: Thiele modulus [-]

本研究の一部は、科学研究費補助金 (基盤研究 (B) No. 11555211) の助成により行われた。

文献

- 1) Tsai, S. W., Lee, K. P., and Chiang, C. L.: *Biocatal. Bio-transform.*, **13**, 89-98 (1995).
- 2) Krieger, N., Taipa, M. E., Melo, E. H. M., Lima-Filho, J. L., Aires-Barros, M. R. and Cabral, J. M. S.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **67**, 87-95 (1997).
- 3) 長山和史, 山川はるか, 土居俊房, 今井正直: 膜, **26**,

- 52-59 (2001).
- 4) Nagayama, K., Nishimura, R., Doi, T., and Imai, M.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **74**, 121-124 (1999).
 - 5) Quillet, C. and Eicke, H.-F.: *Chimia*, **40**, 233-238 (1986).
 - 6) Haering, G. and Luisi, P. L.: *J. Chem. Phys.*, **90**, 5892-5895 (1986).
 - 7) Jenta, T. R. J., Batts, G., Rees, G. D., and Robinson, B. H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **53**, 121-131 (1997).
 - 8) Stamatis, H. and Xenakis, A.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **6**, 399-406 (1999).
 - 9) Nagayama, K., Karaiwa, K., Doi, T., and Imai, H.: *Biochem. Eng. J.*, **2**, 121-125 (1998).
 - 10) Karlsson, S., Backlund, S., Eriksson, F., and Hedström, G.: *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **10**, 137-147 (1998).
 - 11) Bailey, J.E. and Ollis, D.F.: *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Ed., p. 212-213, McGraw-Hill Book Co. Inc., New York (1986).
 - 12) Walde, P., Han, D., and Luisi, P. L.: *Biochemistry*, **32**, 4029-4034 (1993).
 - 13) 久保井亮一, 山田泰司, 駒沢 勲: 化学工学論文集, **18**, 72-77 (1992).
 - 14) Martinek, K., Klivanov, A. M., Goldmacher, V. S., Tchernysheva, A. V., Mozhaev, V. V., Berezin, I. V., and Glotov, B. O.: *Biochim. Biophys. Acta*, **485**, 13-28 (1977).
 - 15) Atkinson, P. J., Robinson, B. H., Howe, A. M., and Heenan, R. K.: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **87**, 3389-3397 (1991).
 - 16) Stamatis, H., Xenakis, A., Provelegiou, M., and Kolisis, F. N.: *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 103-110 (1993).
 - 17) Blanch, H. W. and Clark, D. S.: *Biochemical Engineering*, p. 127-137, Marcel Dekker, Inc, New York (1997).