

# 環境適応型分解性ポリエステル共重合体の 酵素分解における pH の影響

堤 主計\* 田所 海彦\* 久保田 信\* 早瀬 伸樹\* 中川 克彦\*

## The Effect of pH on Enzymatic Degradation of Environment-adaptable Copolyesters

Chikara TSUTSUMI\*, Umihiko TADOKORO\*, Makoto KUBOTA\*, Nobuki HAYASE\*  
and Katsuhiko NAKAGAWA\*

The effect of pH on enzymatic degradation of poly(butylene succinate) (PBS), poly(butylene succinate adipate) (PBSA), poly(butylene succinate lactate) (PBSL), poly(butylene adipate terephthalate) (PBAT) and poly(ethylene succinate) (PES) was studied using six kinds of lipases in citrate buffer solution (pH 3-6), phosphate buffer solution (pH 6-8) and glycine-NaOH buffer solution (pH 9-10), respectively. In a 50-mL sample tube, the lipase was dissolved in each buffer at 5 U/mg polymer. The optimal pH of lipase on enzymatic degradation test was 4 for lipase A, 6 for lipase AK and PS and 7 for lipase CA, F and MML, respectively. Lipase AK, CA and PS were able to degrade specific polyester (PBSA and PES) in the comparatively large pH range. PBSA and PES was easy to be degraded by the used lipase.

### 1. 緒言

これまでプラスチックは、軽量で機械的強度もあり、耐久性も備え加工がしやすい等の利点から市場を著しく拡大してきた。このような特性のため、プラスチックやフィルム、合成繊維、合成ゴムなどの高分子化合物は、石油などの化学資源を原料に安価に大量に生産され、多くの分野で用いられ、我々の生活を豊かにしてきた。<sup>1)3)</sup>

しかしながら、合成高分子材料は「腐らない」という特性を有するために自然界では分解されず、深刻な問題となっている。プラスチックは腐らないため山や海、川などに流出して散乱ゴミとなると、いつまでも消えずに残ってしまう。これらは海や川に棲む魚や鳥などの生物にも多大な影響を及ぼしている。<sup>1),4)</sup>

以上のような問題から、土壌、コンポスト、池、海などの自然界で容易に分解される環境適応型分解性ポリマーが開発・販売されている。自然環境中で分解されるポリマーは、「天然高分子」<sup>5),6)</sup>、「微生物生産型高分子」<sup>7),8)</sup>、「合成高分子」<sup>9),10)</sup> に分類され、前者 2 つの高分子は、物性や加工性

がやや劣るが、合成高分子は分解性の制御が容易で汎用性高分子と同等の物性を持つ高分子を安価に合成することができるため、注目されている。

合成高分子（ポリエステル）は、直鎖状化合物の縮重合体と環状化合物の開環重合体に分類され、それぞれ汎用ポリマーの代替品として注目されている。縮重合体として 1,4-ブタンジオールを基本構成単位とするポリブチレンサクシネート（PBS）、ポリブチレンサクシネートアジペート（PBSA）、ポリブチレンサクシネートラクテート（PBSL）、ポリブチレンアジペートテレフタレート（PBAT）、そして、エチレングリコールから構成されるポリエチレンサクシネート（PES）などが、開環重合体としてポリ乳酸やポリグリコリドなどが市販されている。

これら市販されている分解性重合体は、様々な分解性の評価がなされている。PBS と PBSA は、活性汚泥、土壌、コンポストにおける分解<sup>11),12)</sup>、あるいは、*Candida cylindracea* 由来のリパーゼによる分解<sup>13)</sup> が報告されている。PBS はリパーゼ AK による 70°C での分解性<sup>14)</sup> や分解中に発生する CO<sub>2</sub> ガスにより分解性が評価されている。<sup>15)</sup> また、PBSA は

平成 24 年 8 月 31 日受付 (Received Aug. 31, 2012)

\* 新居浜工業高等専門学校生物応用化学科 (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Niihama National College of Technology, Niihama, 792-8580 Japan)

*Candida cylindracea* や *Rhizopus delemere* 由来のリパーゼによる分解において、アジペートユニット (A) が分解に及ぼす影響について評価されている。<sup>16)</sup> PBAT のリパーゼ (*Pseudomonas* sp.由来) による分解において、構成ユニットの組成の違いによる分解性の評価や結晶性を決定する因子であるアニーリング温度について、熱的特性や分解性に及ぼす影響が Z. Gan らによって報告されている。<sup>17)</sup> X. He らは、*Pseudomonas cepacia* 由来のリパーゼによる 50°C での PBSL の分解試験において、ブチレンサクシネートユニット (BS) とラクテートユニット (L) の構成比の違いにより分解性が大きく異なることを報告している。<sup>18)</sup> 開環重合体であるポリ乳酸も、プロテイナーゼ K による分解性<sup>19), 20)</sup> やコンポストや緩衝溶液中における分解性の評価がされている。<sup>20)</sup>

本研究室では、上記市販の分解性ポリマーの分解性について評価してきた。<sup>21)-24)</sup> 環境適応型分解性ポリマーの分解試験において、ポリマーの酵素分解に及ぼす諸因子についても研究を行っている。酵素分解に及ぼす因子は、温度<sup>25)</sup>、pH<sup>22)</sup>、<sup>25)</sup>、酵素濃度<sup>24)</sup>、組成比<sup>20)</sup>、結晶性<sup>20)</sup>などがあり、これらについて評価してきた。これらのうち、pH については、広範な領域での評価が十分に行われていないため、本実験では酸性領域からアルカリ領域までの範囲において、酵素分解性を調査した。

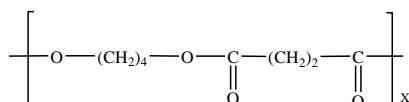
本実験では、現在市販されている環境適応型分解性ポリエステルのうち、ポリブチレンサクシネート (PBS)、ポリブチレンサクシネートアジペート (PBSA)、ポリブチレンサクシネートラクテート (PBSL)、ポリブチレンアジペートテレフタレート (PBAT)、ポリエチレンサクシネート (PES) を分解試験に用いた。

## 2. 実験

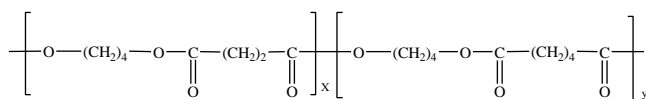
### 2-1. 試料

クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸二水素一ナトリウム、リン酸一水素二ナトリウム、グリシン、水酸化ナトリウムは和光純薬工業(株)製のものを使用した。環境適応型分解性ポリエステル共重合体は、ポリブチレンサクシネート (PBS) (昭和高分子 (株)、商品名: ビオノーレ 1001)、ポリブチレンサクシネートアジペート (PBSA) (昭和高分子 (株)、商品名: ビオノーレ 3001)、ポリブチレンサクシネートラクテート (PBSL) (三菱化学 (株)、商品名: GS Pla AZ91T)、ポリブチレンアジペートテレフタレート (PBAT) (BASF、商品名: エコフレックス)、ポリエチレンサクシネート (PES) ((株) 日本触媒、商品名: ルナーレ SE) を用いた。ポリマーの構造式と構成ユニットの組成比を以下に示す。ポリマーの分子量、熱的特性を Table 1 に示す。また、本研究で使用したリパーゼを Table 2 に示す。

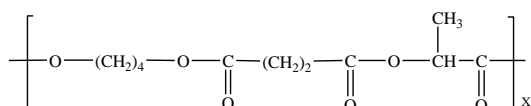
• PBS (B/S 比: 50/50)



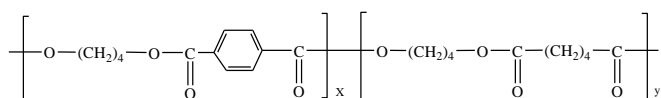
• PBSA (B/S/A 比: 50/40/10)



• PBSL (B/S/L 比: 48/50/2)



• PBAT (B/A/T 比: 50/26/24)



• PES (E/S 比: 50/50)

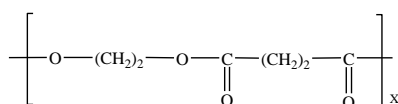


Table 1. Properties of biodegradable polyester.s

Polymer	$M_n/10^4$ <sup>a)</sup>	$M_w/M_n$ <sup>a)</sup>	$T_m$ <sup>b)</sup> °C	$-\Delta H_m$ <sup>b)</sup> J/g	$T_g$ <sup>b)</sup> °C
PBS	13.2	1.68	111.8	129.3	-31.2
PBSA	6.4	1.72	96.7	85.6	-41.2
PBSL	7.8	2.45	106.8	80.9	-30.3
PBAT	4.4	2.33	43.3、 123.8	28.2	-31.3
PES	9.4	3.40	94.6	69.9	-6.8

a) Determined by GPC. b) Determined by DSC.

Table 2. Lipases used in enzymatic degradation.

Lipase	Source	Company	Activity (U/mg)
A	<i>Aspergillus niger</i>	Amano	60
AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano	25
CA	<i>Candida antarctica</i>	SIGMA	10
F	<i>Rhizopus</i> sp.	Amano	150
MML	<i>Mucor minehei</i>	SIGMA	4307
PS	<i>Burkholderia cepacia</i>	Amano	30

Amano: Amano Enzyme inc., SIGMA: SIGMA-ALDRICH, Wako: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

## 2-2. 高分子の諸物性の測定

分解試験に用いる生分解性ポリマーの数平均分子量 ( $M_n$ ) および分子量分布 ( $M_w/M_n$ ) は、(株) 日立製作所製 GPC (D-2520、カラム温度 40°C、示差屈折計 (RI) 検出器) により、溶離液としてクロロホルムを用いて流速 1 ml/min で、標準ポリスチレンによる検量線を作成し決定した。分離用カラムは K-804L (Shodex) を、ガードカラムとして K-G (Shodex) を用いた。

ポリマーの熱的特性は (融点 ( $T_m$ )、ガラス転移点 ( $T_g$ )、融解熱 ( $\Delta H_m$ )) は (株) リガク製の示差走査熱量計 (Thermo Plus 2 / DSC8230) を用いて測定した。測定は昇温速度 10 °C/min、窒素雰囲気下で行い、 $T_m$  と  $\Delta H_m$  は first heating、 $T_g$  は second heating において決定した。

共重合体の組成比は、400 MHz (JEOL JNM-ECP 400) の核磁気共鳴装置を用い、 $^1\text{H}$  NMR 測定により決定した。

## 2-3. 緩衝溶液の調整

### 2-3-1. クエン酸緩衝溶液の調整

本実験で使用した 50 mM クエン酸緩衝溶液 (pH 3.0~6.0) は以下のようにして調製した。クエン酸 ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}=210.14$ ) を 5.2533 g 精秤し、500 ml のイオン交換水に溶解させ、溶液 A を作製した。同様にクエン酸ナトリウム ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}=294.10$ ) を 7.3525 g 精秤し、500 ml のイオン交換水に溶解させ、溶液 B を作製した。溶液 A、B を混合させ、pH メーターを用いて緩衝溶液 (pH 3.0~6.0) を調製した。

### 2-3-2. リン酸緩衝溶液の調整

50 mM リン酸緩衝溶液 (pH 6.0~8.0) は次の方法により調整した。リン酸二水素一ナトリウム ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4=119.98$ ) を 2.995 g 秤量し、500 ml のイオン交換水に溶解させ、溶液 C を作製した。同様に、リン酸一水素二ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4=141.96$ ) を 3.549 g 秤量し、500 ml のイオン交換水に溶解させ、溶液 D を作製した。溶液 C、D を混合させ、pH メーターを用いて緩衝溶液 (pH 6.0~8.0) を調製した。

### 2-3-3. グリシン-NaOH 緩衝溶液の調製

50 mM グリシン - NaOH 緩衝溶液は以下のように調製した。グリシン ( $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}=75.07$ ) を 3.0 g 精秤し、200 ml のイオン交換水に溶解させ、溶液 E を作製した。同様に、水酸化ナトリウム ( $\text{NaOH}=40.00$ ) を 0.4 g 精秤し、50 ml のイオン交換水に溶解させ、溶液 F を作製した。E 溶液を 125 ml、F 溶液を 22 ml を混合させ、最後に全量が 500 ml になるようにイオン交換水で調製した。pH メーターを用いて値を確認した。pH 10 の緩衝溶液については、E 溶液を 125 ml、F 溶液を 80 ml を混合させ、最後に全量が 500 ml になるようにイオン交換水で調製し、pH メーターを用いて値を確認した。

## 2-4. 酵素分解試験

本研究では 6 種類の異なるリパーゼを分解試験用酵素として用いた。各リパーゼはポリマー 1 mg 当たり 5 U の濃度になるように各緩衝溶液にサンプル管瓶 (50 ml) 中で溶解し、分解温度である 37°C に達するまで恒温水槽中に約 15 分間放置した。ソルベントキャスト法により作製したフィルムを約 30 mg になるように切断し、精密電子天秤で精秤した後、網目約 1×1 mm のポリエチレンメッシュシートの袋に封入した後、上記酵素溶液に入れ分解試験を行った。分解はサンプル管瓶を往復振とう (100 回/min) しながら行った。酵素溶液はリパーゼの失活を防ぐために 2 日おきに交換した。ポリマーサンプルは 20 時間ごとに取り出し水洗後、十分に水分を取り除き、真空乾燥を 3 時間行った。酵素分解試験後のサンプルの重量を精秤し、残存重量率により分解性を評価した。

## 3. 結果および考察

### 3-1. リパーゼ A の酵素分解試験における pH の影響

リパーゼ A は、*Aspergillus niger* 由来の酵素である。*A. niger* は、真菌に属する菌類であり、カビの一種である。カビの生育可能 pH 領域は 2~8.5 であり、最適 pH は 4~4.5 と非常に狭い領域となっている。最適 pH が 4~4.5 であることから、このような菌類から抽出された酵素も最適 pH は同じ領域であることが多い。従って、市販の環境適応型分解性ポリエステルのリパーゼ A による酵素分解試験において、これらポリエステルは、酸性領域でよく分解されることが予想される。

リパーゼ A による 5 種の環境適応型分解性ポリエステル (PBS、PBSA、PBSL、PBAT、PES) の pH 3~10 における酵素分解試験の結果を Fig. 1 に示す。縦軸に示す残存重量率は、120 時間後の値を示す。横軸は pH を示すが、pH 3~6 はクエン酸緩衝溶液 (酸性領域) を、pH 6~8 はリン酸緩衝溶液 (中性領域) を、pH 9~10 はグリシン-NaOH 緩衝溶液 (アルカリ領域) を使用した。分解試験の結果、PBS、PBSL、PBAT は、全ての pH において、ほとんど分解されなかった。

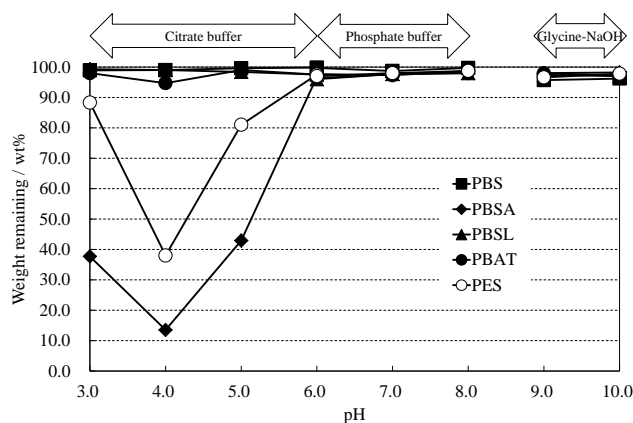


Fig. 1 Effect of pH on enzymatic degradation of biodegradable polyester by lipase A.

しかしながら、PBSA と PES は、酸性領域においてリパーゼ A によって分解されやすく、pH 4 で最も分解されていた。PBSA と PES は、pH 4 で 120 時間後に 13.5% と 38.0% にまでそれぞれ分解されていた。この pH は、カビの生育最適 pH と近似しており、リパーゼ A の最適 pH は、4 付近であることが分かった。

### 3-2. リパーゼ AK の酵素分解試験における pH の影響

Fig. 2 は、リパーゼ AK による環境適応型分解性ポリエステル酵素分解試験の結果 (pH 3~10) を示す。リパーゼ AK による分解試験の結果は 120 時間後の残存重量率である。リパーゼ AK も A と同様に PBS、PBSL、PBAT はほとんど分解されておらず、リパーゼ AK によって分解されにくかった。一方、PBSA や PES は、リパーゼ AK により分解されやすかった。PES は、酸性領域やアルカリ領域でリパーゼ AK による分解はあまり早くないが、pH 6 で最もよく分解されており、120 時間で 69.0% (リン酸緩衝溶液) の残存重量率であった。同じように、PBSA も pH 6 で最も早く分解されており、120 時間で完全に分解した。(クエン酸緩衝溶液) ただ、PBSA はこれらポリエステルの中で最も分解されやすく<sup>21), 23), 24)</sup>、酸性領域やアルカリ領域においても、分解を確認することができた。PBSA の分解で、pH 5 においても分解されやすくなっていたことから、リパーゼ AK は、中性領域よりもやや酸性側の領域に最適 pH が存在していると考えられる。

リパーゼ AK は、*Pseudomonas fluorescens* (蛍光菌) 由来の酵素であり、自然界に広く分布し、植物に病原性を示す。また、食品の腐敗の原因菌として知られている。*Pseudomonas* 属細菌は、水中、土壌等自然界に広く分布しており、中性領域での生育を好む細菌である。従って、*P. fluorescens* 由来のリパーゼ AK が pH 6 で最も分解活性が高いことは、このような生育 pH 領域に一致しているといえる。

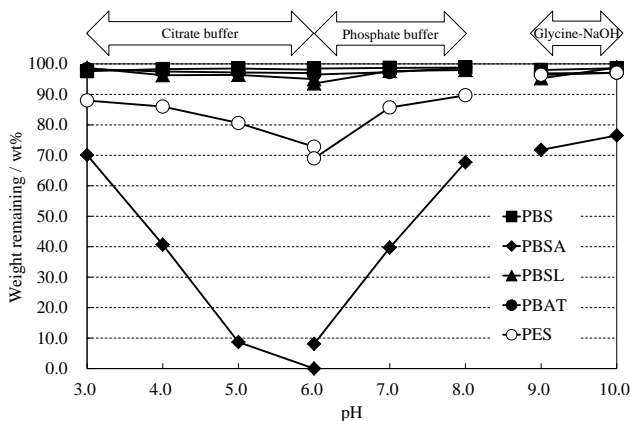


Fig. 2 Effect of pH on enzymatic degradation of biodegradable polyester by lipase AK.

### 3-3. リパーゼ CA の酵素分解試験における pH の影響

リパーゼ CA (SIGMA-ALDRICH 製) は、Novozymes 製の Novozym 435 (*Candida antarctica* 由来リパーゼ B をアクリル系ビーズに固定化した固定化酵素) と同等のリパーゼであり、組換え体を *Aspergillus niger* で発現させたものである。Novozym 435 は、最適温度 65°C、最適 pH 7.5-8.0<sup>26)</sup> であることから、リパーゼ CA も同等の性質を有しているといえる。また、Novozym 435 は、リパーゼの中でもエステル基に対する加水分解や縮合反応において触媒活性が高く、食品、油脂加工、医薬などいろいろな分野で利用されている。研究分野においても広く活用されており、有機合成<sup>27)</sup> や重合<sup>28)</sup> などの触媒としてよく用いられている。

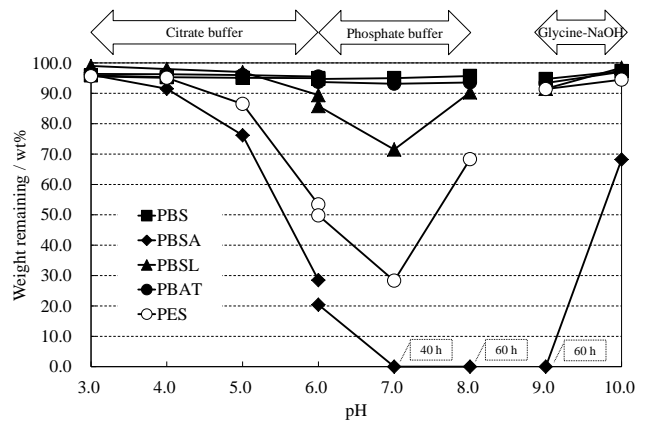


Fig. 3 Effect of pH on enzymatic degradation of biodegradable polyester by lipase CA.

リパーゼ CA による環境適応型分解性ポリエステル酵素分解試験の結果 (pH 3~10) を Fig. 3 に示す。和光純薬工業 (株) 製の *Candida antarctica* 由来リパーゼ CAL-B は、リパーゼ B (SIGMA-ALDRICH 製) と同等品であるが、この酵素は、今回用いた環境適応型分解性ポリエステル共重合体を最もよく分解することを報告している。<sup>21), 24)</sup> 今回の pH の影響における分解試験においても、共重合体を最も早く分解した。PBS と PBAT は、他のリパーゼ同様に 120 時間ではほとんど分解していなかった。PBSL は、他のリパーゼではほとんど分解されなかったが、リパーゼ CA によって分解されやすく、pH 7 でよく分解されており、残存重量率は 71.5% であった。PES は、リパーゼにより分解されやすいポリエステルであり、pH 7 で 28.3% にまで分解されていた。PBSA は、他の結果をみて分かるように最も分解されやすいポリエステルであり、pH 7~9 で 120 時間までに完全に分解された。ただし、pH 8、9 においては、完全に分解されるまでに 60 時間を要したのに対し、pH 7 では、40 時間で完全に分解された。従って、PBSA も pH 7 で最も早く分解されたことになる。以上の結果をまとめると、リパーゼ CA は、pH 7.0 で最も分解速度が速く、最適 pH は 7 であった。pH 7~8 の間については、分解試験を行っていないため、詳細な最適 pH は今後解明する

ことになるが、実験の最適値は、報告されている最適 pH とほぼ一致していた。

### 3-4. リパーゼ F の酵素分解試験における pH の影響

Fig. 4 は、リパーゼ F による環境適応型分解性ポリエステル分解試験の結果 (pH 3~10) を示す。リパーゼ F は、*Rhizopus sp.*由来の酵素であり、*Rhizopus* 属細菌は、湿った有機物表面に出現する一般的なカビである。基質表面の菌糸がクモの巣に似ていることから、和名で「クモノスカビ」と呼ばれている。この菌は、pH 4.0~7.0 付近で増殖可能であり、最適 pH は、約 pH 5.5~6.0 である。従って、本実験において、分解における最適 pH は、弱酸性領域に存在することが予想される。

分解試験の結果、PBS、PBSL、PBAT は全 pH において、ほとんど分解されていなかったが、PBSA や PES は中性領域で分解が確認された。PBSA は、pH 5 以下あるいは 8 以上で分解は緩慢であったが、pH 6、7 では分解がやや早くなり、pH 7 で 120 時間後に 75.1% にまで分解されていた。PES は、PBSA ほどの分解性は見られなかったが、pH 7 でリパーゼによる分解を確認することができた。PES の分解では、pH 7 で残存重量率 89.3% であった。リパーゼ F は、リパーゼ CA と同様に、最適 pH は 7 であることが分かった。

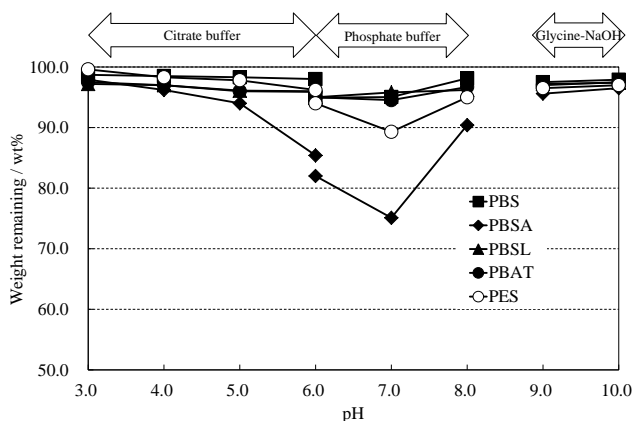


Fig. 4 Effect of pH on enzymatic degradation of biodegradable polyester by lipase F.

### 3-5. リパーゼ MML の酵素分解試験における pH の影響

リパーゼ MML は、*Mucor minehei* 由来の酵素であり、*Mucor* 属 (ケカビ属) 細菌は、*Rhizopus* 属細菌同様に湿気の多い有機物上に出現する、一般的なカビである。*Mucor* 属細菌の生育 pH は、*Rhizopus* 属細菌とほぼ同じであることから、分解試験においても、リパーゼ F と同様の結果になると思われる。

リパーゼ MML による環境適応型分解性ポリエステルの酵素分解試験の結果 (pH 3~10) を Fig. 5 に示す。これまでの実験において、PBSA は最も分解されやすいポリエステルであったが、PBS、PBSL、PBAT と同じようにこのリパーゼによって、ほとんど分解されなかった。PES は、リパーゼ MML

によって唯一分解されたポリエステルであり、中性領域で分解されやすく、残存重量率は pH 7 で最も低い 64.7% であった。リパーゼ MML も、リパーゼ CA や F と同様に最適 pH が 7 であった。

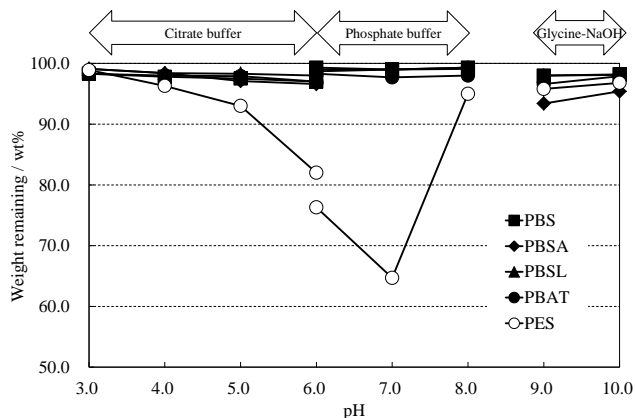


Fig. 5 Effect of pH on enzymatic degradation of biodegradable polyester by lipase MML.

### 3-6. リパーゼ PS の酵素分解試験における pH の影響

リパーゼ PS は、*Burkholderia cepacia* に由来する酵素であるが、以前は、*B. cepacia* は *Pseudomonas* 属細菌に分類されていた。この細菌は、自然環境に常在する細菌であるが、病院環境から、緑膿菌と同様に湿潤した環境から検出されるため、別に分類された菌である。この細菌は、中性領域で生育することができるが、リパーゼ PS の最適 pH は、5-9 であることがメーカーから公表されている。ポリエステルの分解試験において、リパーゼ PS の最適 pH を評価した。

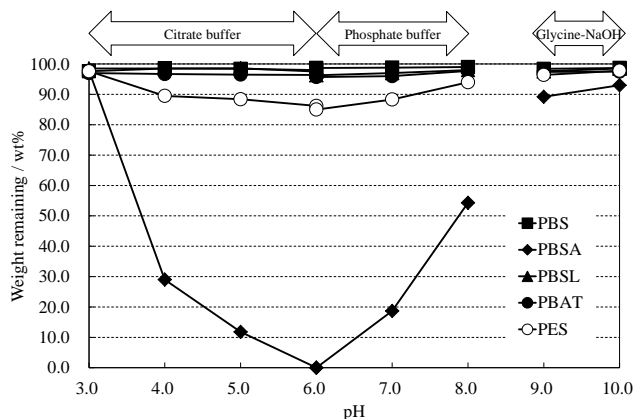


Fig. 6 Effect of pH on enzymatic degradation of biodegradable polyester by lipase PS.

Fig. 6 は、リパーゼ PS による環境適応型分解性ポリエステルの酵素分解試験の結果 (pH 3~10) を示す。これまでの分解試験でも確認されたように、PBS、PBSL、PBAT はリパーゼ PS による分解はみられず、これらポリエステルは、酵素により分解しにくい構造であるといえる。理由として、結

晶性の大きさを表す  $\Delta H_m$  が、PBS や PBSL で大きく、PBAT は分解されにくい構造である芳香族環を含有 (24 mol%) していることが考えられる。一方、PBSA や PES は他の分解試験でも分解されたように、リパーゼ PS でも分解が確認できた。PBSA は、pH 4-8 の広い範囲で分解されやすく、pH 6 で最も分解が早くなっており、120 時間で完全に分解された。リパーゼ PS は、用いたリパーゼの中で広い pH 範囲で活性を有していることが分かった。PES はやや分解が遅いが、PBSA の結果と同様に広い pH 範囲 (pH 4-8) で残存重量率は、ほぼ同程度であった。PES の分解試験においても、pH 6 で最も分解が早く、86.2% (リン酸緩衝溶液) にまで低下した。

#### 4. 結論

(1) PBSA と PES は、分解されやすい環境適応型分解性ポリエステルであり、PBSA は、最も分解されやすいポリエステルであることが確認できた。

(2) リパーゼ A は、pH 4 で最も分解活性が高いことが分かった。

(3) リパーゼ AK と PS は、ポリエステルの分解において、最適 pH が 6 であることが明らかとなった。

(4) リパーゼ CA、F、MML は、分解において、最適 pH 7 の特徴を有していることが分かった。

(5) リパーゼ AK、CA、PS は、比較的広い pH 範囲で特定のポリエステルを分解できる能力があった。

#### 参考文献

- 1) 生分解性プラスチックのおはなし、土肥 義治、(財) 日本規格協会 (1991).
- 2) 実用化進む生分解性プラスチック、白石 信夫ほか、工業調査会(2000).
- 3) トコトンやさしい生分解性プラスチックの本、生分解性プラスチック研究会、日本工業新聞社 (2004).
- 4) 生分解性ポリマーのはなし、望月 正嗣、日本工業新聞社 (1995).
- 5) M. S. Huda, L. T. Drzal, A. K. Mohanty and M. Misra, *Compos. Sci. Technol.*, **66**, 1813-1824 (2006).
- 6) C. Chang, M. He, J. Zhou and Lina Zhang, *Macromolecules*, **44**, 1642-1648 (2011)
- 7) S. Warwel, C. Demes and G. Steinke, *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem*, **39**, 1601-1609 (2001).
- 8) C. Hong, H. Hao and W. Haiyun, *Biomass and Bioenergy*, **33**, 721-727 (2009).
- 9) R. M. Michell, A. J. Müller, V. Castelletto, I. Hamley, G. Deshayes and P. Dubois, *Macromolecules*, **42**, 6671-6681 (2009).
- 10) C. Tsutsumi, N. Fukukawa, J. Sakafuji, K. Oro, K. Hata, Y. Nakayama and T. Shiono, *J. Appl. Polym. Sci.*, **121**, 1431-1441 (2011).
- 11) M. Nishioka, T. Tsuzuki, Y. Wanajyo, H. Oonami and T. Horiuchi, *Biodeg. Plastics and Polymers*, 584-590 (1994).
- 12) K. Tomita, Y. Kuroki, N. Hayashi and Y. Komukai, *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 350-352 (2000).
- 13) M. S. Nikolic and J. Djonlagic, *Polym. Degrad. Stab.*, **74**, 263-270 (2001).
- 14) M. A. Khan, K. M. I. Ali, F. Yoshii and K. Makuuchi, *Polym. Degrad. Stab.*, **63**, 261-264 (1999).
- 15) M. Abe, K. Kobayashi, N. Honma and K. Nakasaki, *Polym. Degrad. Stab.*, **95**, 138-143 (2010).
- 16) V. Tserki, P. Matzinos, E. Pavlidou, D. Vachliotis and C. Panayiotou, *Polym. Degrad. Stab.*, **91**, 367-376 (2006).
- 17) L. Zhao and Z. Gan, *Polym. Degrad. Stab.*, **91**, 2429-2436 (2006).
- 18) L. Tan, Y. Chen, W. Zhou, H. Nie, F. Li and X. He, *Polym. Degrad. Stab.*, **95**, 1920-1927 (2010).
- 19) M. S. Reeve, S.P. McCarthy, M. J. Downey and R. A. Gross, *Macromolecules*, **27**, 825-831 (1994).
- 20) C. Tsutsumi, K. Yamamoto, A. Ichimaru, M. Nodono, K. Nakagawa and H. Yasuda, *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.*, **41**, 3572-3588 (2003)
- 21) 堤 主計、藤井 美咲、小松 万記、早瀬 伸樹、中川 克彦、新居浜工業高等専門学校 第 45 巻 35-38 (2009).
- 22) 堤 主計、小松 万記、藤井 美咲、早瀬 伸樹、中川 克彦、新居浜工業高等専門学校 第 45 巻 39-42 (2009).
- 23) 堤 主計、武市 知大、藤井 美咲、早瀬 伸樹、中川 克彦、新居浜工業高等専門学校 第 46 巻 43-46 (2010).
- 24) 堤 主計、白石 春菜、早瀬 伸樹、中川 克彦、新居浜工業高等専門学校 第 47 巻 37-42 (2011).
- 25) C. Tsutsumi, N. Hayase, K. Nakagawa, S. Tanaka and Y. Miyahara, *Macromol. Symp.*, **197**, 431-442 (2003).
- 26) 石井 三千代、鈴木 えりか、阿保 正伸、醗酵工学会誌、**66(5)**, 408-410 (1988).
- 27) A. Kurata, S. Takemoto, T. Fujita, K. Iwai, M. Furusawa and N. Kishimoto, *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*, **69**, 161-167 (2011).
- 28) R. K. Srivastava and A.-C. Albertsson, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **43**, 4206-4216 (2005).