天然ポリエステル, ポリ- β -ヒドロキシ酪酸 (PHB)

分解菌による合成ポリエステルの生分解性

田中秀興, 外村健三, 上林 明

(工業技術院微生物工業技術研究所)

昭和 51 年 5 月 19 日 受理

Biodegradability of Synthetic Polyesters by Poly- β -hydroxybutyrate (PHB)-Decomposing Microorganisms

By Hideoki TANAKA, Kenzo TONOMURA and Akira KAMIBAYASHI

Fermentation Research Institute, Agency of Industrial

Science and Technology, Chiba, Japan

The biodegradability of various kinds of synthetic polyesters by poly- β -hydroxybutyrate (PHB)-decomposing microorganisms, two kinds of bacteria and one fungus, was studied.

The bacteria could decompose poly- β -methyl- β -propiolactone and poly- β -propiolactone, but could not decompose poly- α -methyl- β -propiolactone, poly- ϵ -caprolactone and polyglycolide. Furthermore, the biodegradability of other six polyesters which are composed of glycols (ethylene glycol, 1,4-butanediol) and dicarboxylic acids (succinate, adipate, sebacate) was tested, but the results indicating to be non-degradable were obtained.

A PHB-decomposing fungus, Pl, was newly isolated from soil by enrichment culture using PHB as a sole carbon source, and the action of the microorganism on the above indicated synthetic polyesters was studied. Poly- β -methyl- β -propiolactone was more readily decomposed by the fungus than by the bacteria. On the contrary, the fungus had no influence on poly- β -propiolactone at all, while the bacteria almost completely decomposed this polyester. Polyesters which are composed of glycols and dicarboxylic acids were not decomposed by the bacteria, but the polyesters which are composed of adipic acid were almost completely decomposed by the fungus.

The relationship between the structure and the biodegradability of synthetic polyesters is discussed.

(Received May 19, 1976)

緒 言

合成高分子の微生物分解に関して、これまでにポリ- ϵ -カプロラクトン⁽¹⁾, ポリウレタン⁽²⁾, ポリビニルアルコール⁽³⁾, ポリエチレンアジペート⁽⁴⁾, ポリエチレングリコール⁽⁵⁾を分解する微生物がそれぞれ分離され、また、化学合成されたポリ-L-アミノ酸の酵素分解に関する研究も報告されている⁽⁶⁾。しかし、プラスチックなどに多量に使用されているポリエチレン, ポリ塩化ビニル, ナイロン, ポリエチレンテレフタレートなどを分解する微生物は知られていない。

たん白質, 核酸, 多糖類などの生体高分子は、それぞれに特異的に作用する酵素によって生分解されるように、一般に、「微生物によって作られたものは微生物によって分解されやすい」。ところで、ある種の細菌は PHB と呼ばれる天然ポリエステルを菌体内に多量蓄積し⁽⁷⁾, 一方、このポリエステルを分解する細菌も土壌から多数分離されている⁽⁸⁾。

そこで著者らは、PHB と類似の構造を有する合成ポリエステルおよび、それらとはエステル結合の様式が異なる合成ポリエステルの PHB 分解菌による生分解性をしらべ、合成高分子の構造と生分解性との関連を検討し

た。

実験方法

1. ポリエステルの調製

(I) ポリ- β -ヒドロキシ酪酸 (PHB) : PHB を生産する窒素固定菌の培養に Stockdale ら⁽⁹⁾が用いた培地で, *Azotobacter chroococcum* IFO 12393 を振とう培養し, 対数増殖期の終り近くで集菌した菌体から単離した。菌体を水およびアセトンで洗浄した後, Williamson らの方法⁽¹⁰⁾により, アルカリ性次亜塩素酸ナトリウムで菌体を分解して粗 PHB を得た。これをソックスレー抽出器を用いて, アセトンおよびエーテルで洗浄して精製した。PHB 含量は乾燥菌体重量の約 40%。融点: 178~182°C (文献値⁽¹¹⁾ 160~180°C), IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 5.7 μ (C=O) (文献値⁽¹¹⁾ 5.7 μ), UV $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{SO}_4}$: 235 nm (文献値⁽¹²⁾ 235 nm), 分子量: 19, 200。

(II) ポリ- β -メチル- β -プロピオラクトン: クロトン酸に臭化水素を付加させて β -ブロム酪酸とし⁽¹³⁾, これを Shelton らの方法⁽¹⁴⁾で, クロロホルム/水中で炭酸ナトリウムと反応させて単量体のラクトンを得た。次に, このラクトンを山下らの方法⁽¹⁵⁾に従い, トリエチルアルミニウム/水を開始剤として開環重合させてポリエステルとした。反応生成物を塩酸, エタノール, アセトンで洗浄した後, クロロホルム/エーテル系で再沈殿を 2 回くり返した。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 1740 cm^{-1} (C=O), 分子量: 3000。

(III) ポリ- α -メチル- β -プロピオラクトン: メタクリル酸に臭化水素を付加させて β -ブロムイソ酪酸とし⁽¹⁶⁾, (II) の場合と同様の方法で単量体のラクトンを得た後, 開環重合によってポリエステルとした。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 1740 cm^{-1} (C=O), 分子量: 1100。

(IV) ポリ- β -プロピオラクトン (α 型): 市販の β -プロピオラクトンを水酸化カルシウムで乾燥した後, 山下らの方法⁽¹⁶⁾により, 水酸化カリウムを開始剤として重合させた。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 1735 cm^{-1} (C=O), 分子量: 1300。

(V) ポリ- β -プロピオラクトン (β 型): (IV) の水酸化カリウムの代りに, トリエチルアルミニウム/水を開始剤として (II) の場合と同様の方法で重合させた。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 1740 cm^{-1} (C=O), 分子量: 2900。

(VI) ポリ- ϵ -カプロラクトン: 市販の ϵ -カプロラクトンを (II) の場合と同様の方法で, トリエチルアルミニウム/水を開始剤として重合させた。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 1725

cm^{-1} (C=O), 分子量: 15, 400。

(VII) ポリグリコリド: 古川らの方法⁽¹⁷⁾により, 市販のグリコール酸の減圧加熱脱水によって生成した固体を少量の三酸化アンチモンと反応させてグリコリドとし, これを (II) の場合と同様にトリエチルアルミニウム/水によって重合させてポリエステルを得た。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$: 1740 cm^{-1} (C=O), 分子量 900。

(VIII) ポリエチレンサクシネート, (IX) ポリテトラメチレンサクシネート, (X) ポリエチレンアジベート, (XI) ポリテトラメチレンアジベート, (XII) ポリエチレンセバケート, (XIII) ポリテトラメチレンセバケート: それぞれ対応する二塩基酸 (コハク酸, アジピン酸, セバシン酸) とグリコール (エチレングリコール, 1, 4-ブタンジオール) を減圧加熱脱水することによってポリエステルとした。[ポリエステル: IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} (C=O), 分子量] [(VIII): 1730, 700; (IX): 1710~1720, 1680; (X): 1740, 850; (XI): 1730~1737, 1350; (XII): 1740, 980; (XIII): 1730~1740, 1570]

IR スペクトルは, ポリエステルの粉末の KBr 錠剤を日立 EPI-G 2 で測定した。(I)~(VII) の分子量は, フェノールフタレインを指示薬として, ポリエステルのクロロホルム溶液を水酸化ナトリウムのエタノール溶液で滴定することにより, また (VIII)~(XIII) の分子量は, イソシアン酸フェニルでウレタン化したポリエステルを窒素含量をケルダール法で定量する⁽¹⁸⁾ ことによって求めた。いずれも, 数平均分子量である。なお, いずれのポリエステルも, 反応生成物をクロロホルム/エーテル系で再沈殿を 2~3 回くり返して精製した。

2. PHB 分解細菌による合成ポリエステルの生分解性試験

供試菌株: Delafield ら⁽⁸⁾が, PHB を唯一の炭素源とする集積培養によって土壌から分離した 2 株, *Pseudomonas testosteroni* ATCC 17510 および *Alcaligenes paradoxus* ATCC 17718。

試験培地 (培地 A): Delafield ら⁽⁸⁾が, *Pseudomonas* 属細菌による PHB の分解実験に用いた培地。0.033 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 6.80), NH_4Cl 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, クエン酸鉄アンモニウム 0.05 g, CaCl_2 0.005 g, ポリエステル 1.0 g, 蒸留水 1 l。

分解試験方法: ポリエステルを唯一の炭素源とする培地 A (培養液 200 ml/500 ml 三角フラスコ) に, ポリエステルの代りにコハク酸 (1.5 g/l) を唯一の炭素源と

する培地で前培養した菌を接種して 2 週間, 30°C で振とう培養した。培養液を遠心分離し, 沈殿を水洗した後, 凍結乾燥した。これを乳鉢で均一な粉末として, 適量をケルダール分解して沈殿中の窒素量を求め, あらかじめ作成しておいた菌体量～窒素量の相関図から, 沈殿中の菌体量および残存ポリエステル量を求めた。菌体量～窒素量の相関図は, ポリエステルとして PHB を用いた培地 A で生育した菌体をケルダール分解して作成した。なお, ポリエステルの代りにコハク酸を用いた培地 A で生育した菌体についても同様の実験をおこなったが, 窒素含量にはほとんど差がなかった。また, 2 株の供試菌株の間にも差がなかった。一方, 培地 A に菌を接種しないで同様の操作により空試験をおこなうとともに, 沈殿物の IR スペクトルから, 菌の生成およびポリエステル残存の有無を確認した。

3. PHB 分解糸状菌 (P1) による合成ポリエステルの生分解性試験

PHB 分解糸状菌の分離: 培地 B のポリエステルとして PHB を用いた培地に土壌を接種して集積培養をおこない, PHB 分解能を有する糸状菌, P1 を分離した。

試験培地 (培地 B): NaNO_3 3.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, ポリエステル 1.0 g, 蒸留水 1 l (塩酸で pH 6.0 に調整)。

分解試験方法: 培地 B のポリエステルの代りにグルコースを用いた培地で前培養した菌を試験培地に接種した後, 細菌の場合と同様の方法でおこなった。菌体量～窒素量の相関図は, 培地 B のポリエステルとして PHB を用いた培地で生育した菌体を用いて作成した。本糸状菌の場合, 炭素源を PHB からグルコースに変えると, 菌体の窒素含量が約 1/2 に低下した。沈殿の IR スペクトルから, (X) は本菌によってほとんど完全に分解されることが確認されたが, PHB 培地で生育した菌体の窒素含量を用いると, この結果とよく一致した。

4. かび抵抗性試験菌株による合成ポリエステルの生分解性試験

JIS Z 2911-1960 に規定された試験菌株のうち, 第 1 群～第 5 群に属する次の 6 株を培地 B に接種して振とう培養をおこない, 菌の生育度を観察した。Aspergillus niger ATCC 6275 (第 1 群), Penicillium citrinum ATCC 9849 (第 2 群), Mucor spinescens IAM-Mu 3 (第 3 群), Cladosporium herbarum IAM-F 517 (第 4

群), Pullularia pullulans IAM-F 24 (第 4 群), Chaetomium globosum ATCC 6205 (第 5 群)。

実験結果

1. PHB 分解細菌による合成ポリエステルの生分解性

生分解試験に用いた培地は, ポリエステルを唯一の炭素源とするポリエステル-無機塩培地 (培地 A) である。PHB は粉末, フィルムのいずれの形態でも 30°C, 7 日間の振とう培養で完全に分解された。本試験に用いたポリエステルのうち, (I) および (VI) は, クロロホルム溶液からクロロホルムを留去することによってフィルムにすることができたが, その他のポリエステルにはフィルム形成能がなかった。従って, ポリエステルはすべて粉末状のものを培地に分散させて使用した。用いたポリエ

Table I. Biodegradability of Polyesters by *Alcaligenes paradoxus* ATCC 17718 (A) and by a Fungus P1 (B)

Polyester	% Decompn.		% Recovery	
	(A)	(B)	(A)	(B)
(I)	100	100	99	100
(II)	66	79	98	98
(III)	0	0	70	82
(IV)	97	0	93	80
(V)	92	0	96	94
(VI)	0	0	99	95
(VII)	0	0	78	82
(VIII)	0	0	87	90
(IX)	0	0	99	92
(X)	13	97	79	92
(XI)	0	64	97	97
(XII)	0	0	90	89
(XIII)	0	0	98	90

(A) Every culture of the bacterium on a synthetic polyester was carried out at 30°C for 14 days with shaking. In the case of PHB, the culture was carried out for 7 days at 30°C. 200 mg of a polyester was added to 200 ml of the medium A in a 500 ml-flask. % Decompn.: A percentage of the amount of a polyester decomposed to the amount of the polyester recovered in a control experiment. % Recovery: A percentage of the amount of a polyester recovered after incubation in a control experiment to the amount of the polyester initially added to the medium.

(B) Cultural conditions, polyester concentration, and the definitions of % Decompn. and % Recovery are the same as in the case of the bacterial decomposition, except that the medium B was used instead of the medium A.

ステルはいずれも水に不溶の固体であるが、生分解試験と同じ条件下で空試験をおこなって安定性をしらべたところ、大部分のポリエステルは90%以上回収されたが、(III)、(VII) および (X) は70~80%しか回収されず、一部分解がおこるようである (Table I)。培養終了後、遠心分離によって得られた沈殿をケルダール分解して窒素量を求め、菌体量~窒素量の相関図から生成菌体量および残存ポリエステル量を算出して Table I の結果を得た。天然ポリエステルである PHB は、7日間で完全に分解されて消失し、多量の菌体が生成した。これに対して合成ポリエステルのうち、(IV) および (V) は14日間でほとんど完全に分解され、(II) も60%以上分解された。しかし、上記以外の合成ポリエステルは、(X) がわずかに分解されたのみで、その他のものは全く分解されず、菌の生育も見られなかった。*Pseudomonas testosteroni* ATCC 17510 を用いた実験においても、全く同様の結果が得られた。

2. PHB 分解糸状菌, P1 による合成ポリエステルの生分解性

培地 B に P1 株を接種して振とう培養をおこない、細菌の場合と同様の方法で生分解性をしらべた。いずれも PHB 分解能を有する微生物であるが、細菌と糸状菌では、合成ポリエステルに対する生分解性パターンが著しく異なった (Table I)。(IV) および (V) は、細菌によってほとんど完全に分解されたが、糸状菌では全く分解されなかった。一方、(X) および (XI) は細菌によってほとんど、あるいは全く分解されなかったが、糸状菌はこれらのポリエステルをきわめてよく分解した。(II) に対する分解活性は、細菌より糸状菌の方が高かった。上記以外のポリエステルは、細菌の場合と同じく糸状菌によっても全く分解されなかった。

3. かび抵抗性試験菌株による合成ポリエステルの生分解性

JIS Z 2911 に規定された第1群~第5群に属する6株の試験菌株を培地 B に接種して振とう培養し、菌の生育度を観察することにより、これらの菌による合成ポリエステルの生分解性をしらべた (Table II)。P1 株と異なり、どの菌株も (I) または (II) を含む培地に生育しなかった。6株のうち、*Penicillium citrinum* ATCC 9349 と *Pullularia pullulans* IAM-F 24 の2株は、P1 株と同様に (X) および (XI) を唯一の炭素源とする培地に良く生育した。しかし、他の4株はいずれも、どのポリエ

Table II. Action of the Several Fungi used in the Methods of Testing Fungal Resistance (JIS Z 2911-1960)

Polyester	Strain				
	(1-1)	(2-1)	(3-2)	(4-1)	(5-1)
(I)	—	—	—	—	—
(II)	—	—	—	—	—
(III)	—	—	—	—	—
(IV)	—	±	±	—	±
(V)	—	—	±	—	±
(VI)	—	—	—	±	—
(VII)	—	—	—	—	—
(VIII)	—	—	±	—	±
(IX)	±	—	±	—	—
(X)	—	++	±	+	+
(XI)	±	++	±	±	+
(XII)	±	—	±	±	—
(XIII)	±	—	±	—	—

Cultures were carried out at 30°C for 3 weeks in the same medium as that in the case of the strain P 1, with shaking.

Growth: — negative, ± very poor, + rather rich, ++ rich.

Strains: (1-1) *Aspergillus niger* ATCC 6275, (2-1) *Penicillium citrinum* ATCC 9849, (3-2) *Mucor spinescens* IAM-Mu 3, (4-1) *Cladosporium herbarum* IAM-F 517, (4-2) *Pullularia pullulans* IAM-F 24, (5-1) *Chaetomium globosum* ATCC 6205.

ステル培地にも全く生育しなかった。

考 察

1. PHB 分解細菌による合成ポリエステルの生分解性

天然ポリエステル, PHB (I) は、D(—)-β-ヒドロキシ酪酸を単量体単位とする光学活性ポリエステルで、アイソタクチックな構造を有する立体規則性ポリマーである⁽¹⁹⁾。生体内では D(—)-β-ヒドロキシブチリル-CoA の重縮合によって生合成される⁽²⁰⁾が、化学合成的には D(—)-β-メチル-β-プロピオラクトンの開環重合によって得られる⁽²¹⁾。そこで、PHB と類似の構造を有するポリエステル (II)~(VII) をそれぞれ対応するラクトンから合成して、PHB 分解菌による生分解性をしらべ、ポリエステルの構造と生分解性との関連を検討した。(II) は PHB と化学構造は同じだが、光学的に不活性なラセミ体であるにもかかわらず、60%以上分解される。これに対して (II) の β 位のメチル基を α 位に移した構造の (III) は全く分解されない。ところが、PHB または (II),

(III) のメチル基を水素原子で置換した構造の (IV) および (V) は、ほとんど完全に分解される。ポリ-β-プロピオラクトンには、2₁らせん構造のα型と平面ジグザグ構造のβ型の2種の結晶構造があり、それらの IR スペクトルが 1500~1200cm⁻¹ および 1100~900cm⁻¹ で著しく異なる⁽²²⁾。(IV) および (V) は、β-プロピオラクトンをそれぞれ水酸化カリウムおよびトリエチルアルミニウム/水で重合したものだが、それらの IR スペクトルから (IV) がα型、(V) がβ型であることがわかった。Table I から明らかなように、これら2種の結晶構造の違いは、生分解性に対してほとんど影響がないと考えられる。(I)~(V) とは、エステル結合間のメチレン基の数が異なる (VI) および (VII) は、いずれも分解されない。以上のことから、PHB と類似の構造を有する合成ポリエステルの PHB 分解菌による生分解においては、側鎖メチル基および光学活性の有無、あるいは結晶構造の違いは重要でなく、メチル基の置換位置およびエステル結合間のメチレン基の数が重要な因子であると考えられる。

次に、(I)~(VII) とはエステル結合の様式が異なる (VIII)~(XIII) の PHB 分解菌による生分解性をしらべた。これらのポリエステルは、くり返し単位を構成する二塩基酸およびグリコールのメチレン基の数がそれぞれ異なる。(X) がわずかに分解されるが、二塩基酸およびグリコールのメチレン基の数が生分解を受ける (II), (IV) および (V) と同じく2個の (VIII) をはじめ、その他のポリエステルは全く分解されない。従って、PHB 分解菌によるポリエステルの生分解においては、メチル基の置換位置およびエステル結合間のメチレン基のほかに、エステル結合の様式も重要であると考えられる。

PHB 分解菌は、PHB 加水分解酵素を構成的に生産して菌体外に分泌することが知られており⁽⁸⁾、本実験で用いた2株の PHB 分解菌が、(I)~(XIII) に対して全く同じ生分解性パターンを示すことから、(I), (II), (IV) および (V) は、いずれもこの酵素によって分解されると考えられる。

2. PHB 分解糸状菌, P1 による合成ポリエステルの生分解性

PHB と類似の構造を有する (II)~(VII) に対する生分解性パターンが、細菌の場合と著しく異なる。PHB のラセミ体である (II) は、細菌よりもむしろ糸状菌の方がよく分解するようだが、細菌によってほとんど完全に分

解される (IV) および (V) は、糸状菌によって全く分解されない。(III), (VI), (VII) は、やはり分解されない。おそらく、糸状菌と細菌では PHB 分解酵素が全く異なっているであろう。

(I)~(VII) とエステル結合の様式が異なる (VIII)~(XIII) に対する生分解性も、細菌と糸状菌では著しく異なる。細菌は (X) をわずかに分解するだけだが、糸状菌は (X) をほとんど完全に分解し、さらに同条件下で (XI) を 60% 以上分解する。(X) および (XI) はいずれもアジピン酸エステルであり、PHB および (II) とはエステル結合の様式およびエステル結合間のメチレン基数が異なる。従って、PHB および (II) の分解酵素と (X) および (XI) の分解酵素は異なったもので、P1 株はおそらく2種の分解酵素を分泌するものと考えられる。

3. かび抵抗性試験菌株による合成ポリエステルの生分解性

6 株の属が異なる試験菌株はいずれも、PHB およびそれと類似の構造を有する (II)~(VII) の培地には生育しないが、*Penicillium* 属と *Pullularia* 属の2株がアジピン酸エステル (X) および (XI) の培地によく生育する。このことは、P1 株による生分解の項で述べたように、PHB 分解酵素とアジピン酸ポリエステル分解酵素は異なったものであることを支持するものと考えられる。

合成高分子の構造と生分解性との関連を検討するため土壌中に広く分布する種々の細菌によって生産される天

Fig. 1. Unit Structures of Polyesters.

然ポリエステル, PHB を生分解性ポリマーのモデルとした。一方, PHB を分解する微生物も多数分離されているので, PHB 分解菌を用いて PHB と類似の構造を有する合成ポリエステルの生分解性をしらべた。PHB は光学活性でアイソタクチックな立体規則性ポリマーであるが, 核酸, たん白質や多糖類のような他の生体高分子に比べると, その構造は比較的簡単であるといえる。従って, PHB 分解菌(分解酵素)の基質特異性はかなり広いことを期待したが, Table I, II から明らかなように, かなり限られた構造のものしか生分解されない。なお, アジピン酸ポリエステルについては, 本研究のほかにも *Penicillium* 属⁽⁴⁾や *Aspergillus* 属⁽²³⁾の糸状菌によって分解されるという報告があり, 比較的糸状菌によって分解されやすいと考えられる。

要 約

(1) PHB 分解能を有する細菌と糸状菌の合成ポリエステルに対する生分解性は著しく異なった。

(2) PHB のラセミ体である(II)は, 細菌または糸状菌によって 60% 以上分解された。

(3) PHB のメチル基を水素原子で置換した構造の(IV)および(V)は結晶構造が異なるが, 細菌によっていずれもほとんど完全に分解された。しかし, 糸状菌では全く分解されなかった。

(4) メチル基の置換位置またはエステル結合間のメチレン基数が PHB と異なる(III), (VI), (VII)は, 細菌および糸状菌のいずれによっても全く分解されなかった。

(5) (I)~(VII)とはエステル結合の様式が異なる(VIII)~(XIII)は, 細菌によってほとんど, あるいは全く分解されなかった。一方, 糸状菌はアジピン酸ポリエステルである(X), (XI)をほとんど完全に分解した。

(6) 2株の PHB 分解細菌は, 各種の合成ポリエステルに対して, 全く同様の生分解性パターンを示した。

本研究の一部は, 昭和 49 年 4 月, 日本農芸化学会昭和 49 年度大会において発表した。

(1) J. E. Potts, R. A. Clendinning, W. B. Ackart

and W. D. Niegisch : *Tech. Pap., Reg. Tech. Conf., Soc. Plast. Eng., Chicago Sect.*, 1972, p. 63.

- (2) R. T. Darby and A. M. Kaplan : *Appl. Microbiol.*, **16**, 900 (1968).
- (3) T. Suzuki, Y. Ichihara, M. Yamada and K. Tonomura : *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 747 (1973).
- (4) Y. Tokiwa and T. Suzuki : *J. Ferment. Technol.*, **52**, 393 (1974).
- (5) E. L. Fincher and W. J. Payne : *Appl. Microbiol.*, **10**, 542 (1962).
- (6) K. Singh and C. Vézina : *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1165 (1972).
- (7) H. G. Schlegel and G. Gottschalk : *Angew. Chem.*, **74**, 342 (1962).
- (8) F. P. Delafield, M. Doudoroff, N. J. Palleroni, C. J. Lusty and R. Contopoulos : *J. Bacteriol.*, **90**, 1455 (1965).
- (9) H. Stockdale, D. W. Ribbons and E. A. Dawes : *ibid.*, **95**, 1798 (1968).
- (10) D. H. Williamson and J. F. Wilkinson : *J. Gen. Microbiol.*, **19**, 198 (1958).
- (11) D. G. Lundgren, R. Alper, C. Schnaitman and R. H. Marchessault : *J. Bacteriol.*, **89**, 245 (1965).
- (12) R. A. Slepecky and J. H. Law : *Anal. Chem.*, **32**, 1697 (1960).
- (13) A. Michael and G. H. Shadinger : *J. Org. Chem.*, **4**, 128 (1939).
- (14) D. E. Agostini, J. B. Lando and J. R. Shelton : *J. Polym. Sci., Part A-1*, **9**, 2775 (1971).
- (15) 山下雄也, 津田鉄雄, 石川義男, 三浦定美 : 工化, **66**, 110 (1963).
- (16) 山下雄也, 石川義男, 津田鉄雄, 三浦定美 : 同上, **66**, 104 (1963).
- (17) 広野浩由, 和才 剛, 三枝武夫, 古川淳二 : 同上, **67**, 604 (1964).
- (18) 高分子の重合度測定, 高分子実験学講座, 第6巻, 高分子学会編, 共立出版, 1961, p. 231.
- (19) R. Alper, D. G. Lundgren, R. H. Marchessault and W. A. Côté : *Biopolymers*, **1**, 545 (1963).
- (20) E. A. Dawes and D. W. Ribbons : *Bacteriol. Rev.*, **28**, 126 (1964).
- (21) J. R. Shelton, D. E. Agostini and J. B. Land : *J. Polym. Sci., Part A-1*, **9**, 2789 (1971).
- (22) 和才 剛, 三枝武夫, 古川淳二 : 工化, **67**, 601 (1964).
- (23) 佐藤生男, 鈴木周一 : 高分子崩壊利用研究討論会講演要旨, p. 23 (1972).