

平成20年度 生物工学奨励賞（照井賞）受賞



バイオプラスチックの
環境低負荷型発酵生産法に
関する研究

柘植 丈治



Development and Environmental Assessment of Fermentation Process
for Biopolyester Production

Takeharu Tsuge (Department of Innovative and Engineered Materials, Tokyo Institute of Technology,
4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8502) Seibutsu-kogaku **87**: 72-78, 2009.

はじめに

細菌やアーキアなどの一部の微生物は、その細胞内にポリヒドロキシアルカン酸（PHA）とよばれる脂肪族ポリエステルを蓄積する。微生物にとってPHAは、貧栄養時に備えて蓄える炭素およびエネルギー貯蔵物質であり、これを蓄えることで生育環境中での生存性を高めることができる。一方でPHAは、生分解性や生体適合性などの機能性を有し、かつ、天然由来の物質としては珍しく熱可塑性を示すバイオプラスチックでもある^{1,2}。再生可能なバイオマス資源や二酸化炭素から合成が可能のため、近年では、石油系プラスチックの代替材料としてPHAを使用することに工業的な注目が集まりつつある。

発酵合成PHAの実用化は着々と進みつつあるが、非可食性バイオマスの利用、生産コストの低減、PHAの高性能化、製造プロセスの環境影響評価など、いくつかの課題が解決されないままとなっている。筆者はこれら課題に対して、(1) 未利用バイオマスから得られる低分子有機酸を流加する培養法の開発、(2) 高性能PHAを大豆油やグルコースから高収率で得る発酵法の確立、(3) 培養データに基づいたPHA製造プロセスの環境影響評価、について取り組んできた。本稿では、これらの研究成果について紹介したい。

PHAの種類と物性

本論に入る前にPHAの種類と高分子物性について概

表1. 3HBモノマーを主成分とするPHA

| 合成細菌 | 炭素源 | ポリマー |
|---------------------------|------------------|--|
| <i>Ralstonia eutropha</i> | 糖類 植物油 脂肪酸 | $\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O}) \right]_x$ P(3HB) |
| <i>Ralstonia eutropha</i> | プロピオン酸 ペンタン酸 | $\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O}) \right]_x \left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O}) \right]_y$ P(3HB-co-3HV) |
| <i>Aeromonas caviae</i> | 植物油 脂肪酸 | $\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O}) \right]_x \left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O}) \right]_y$ P(3HB-co-3HHx) |

説しておきたい (表1)。微生物が合成するPHAの中で、もっとも多く見かけるのがポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸] (略してP(3HB)) である。P(3HB)のガラス転移点は約4°C、融点は約175°Cの結晶性高分子である。ガラス転移点が室温以下であるため、成形後に時間経過と共に二次結晶化が進行し、材料としての脆性が増す。この二次結晶化を抑える手段として一般的なのが、P(3HB)の共重合体化である。第二成分モノマーをP(3HB)連鎖に少量取り込ませることで、結晶の形成を抑制または遅延化させることができる。

第二成分モノマーの中で共重合化するのが最も容易なモノマーは、炭素鎖数5の(R)-3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)である。しかしながら、その共重合体P(3HB-co-3HV)においては、3HBと3HVの構造上の類似から共結

晶化が起きるため、3HVの二次結晶化を抑える効果はあまり高くない。炭素鎖数6の(R)-3-ヒドロキシヘキサン酸(3HHx)との共重合体P(3HB-co-3HHx)においては共結晶化が起こらないため、低密度ポリエチレンに類似した柔軟な高性能材料となる^{3,4)}。

一方で、P(3HB)は硬くて脆いという物性上の問題で繊維化は困難であったが、超高分子量P(3HB)は高強度な繊維やフィルムに加工できることから^{5,6)}、高性能PHAの範疇に含まれるようになった。微生物が一般的に合成するP(3HB)の重量平均分子量は50万~100万g/molであるが、超高分子量P(3HB)は300万g/molを超えるポリマーと定義されている。このように非常に高い分子量のP(3HB)は、遺伝子組換え大腸菌を用いて生産することができる。

低分子有機酸のpH-stat供給法

バイオマス資源を総合的に活用するためには、食糧と競合しない非可食性バイオマスを燃料やプラスチックの原料として利用する必要がある。なかでも、木質系バイオマスに多く含まれるキシロースについては、資化性を示す微生物が少ないことから、高度利用法に関する研究開発が望まれる糖質である。PHA生産菌においても、キシロース資化性が低いものが多く、キシロースから直接PHAを合成することは容易ではない。しかしながら、嫌気性細菌の中には、高いキシロース資化性を有するものがあり、たとえば、*Lactococcus lactis* IO-1のような乳酸球菌は、キシロース(C5)を乳酸(C3)と酢酸(C2)の低分子有機酸に高い収率で変換することができる⁷⁻⁹⁾。このような嫌気性細菌のすぐれたバイオコンバージョン能力を利用することで、キシロースから有機酸を経由してPHAへと変換するプロセスを確立することができる¹⁰⁻¹²⁾。キシロースの有機酸変換に関してはすでに詳細な検討がなされているので、本研究では、PHA生産菌株である*Ralstonia eutropha*によってこれら有機酸からPHAを生産する発酵プロセスの開発について検討を実施した。特に、有機酸基質による*R. eutropha*の菌体増殖阻害を回避することによりPHAの高生産性を可能とする流加培養制御技術の確立を目的とした。

まず、乳酸の単独基質を用いて、その濃度を低く維持するための流加法として、固定化酵素式のオンライン乳酸アナライザーを用いる方法とpH-stat feed法について検討した。オンライン乳酸アナライザーを用いた基質供給法では、乳酸濃度を確実に阻害レベル以下の一定値に制御することが可能であったが、培養液のpH制御との兼ね合いで基質溶液に用いた乳酸ナトリウム水溶液のナトリウム塩が培養液中に蓄積し、その結果、菌体増殖が

抑制され高菌体濃度には至らなかった。一方、培養液pHが7.0を超えたときに乳酸溶液を供給しpHを7.0未満に制御するpH-stat feed法では、ナトリウム塩を使用しないため菌体増殖は良好であった。したがって、乳酸を基質として用いる培養ではpH-stat feed法の方が効果的であった。

乳酸を過不足なく、かつ阻害レベル以下に制御することにより、さらに高い菌体生産性が得られると考えられる。しかしながら、乳酸溶液のみを基質溶液としてpH-stat feed法により供給すると、培養液中の乳酸濃度は徐々に減少し、その濃度を一定レベルに維持することは不可能であった。そこで、pH-stat feed法による流加培養系の物質収支と培養液の酸塩基平衡の関係を解析することにより、培養液中における乳酸濃度低下の原因を探り、その解決策を検討した。そして、乳酸濃度の減少は、アンモニウムイオン濃度の減少に対応して新たな酸塩基平衡が形成されることによって起きたものと推測し、これを解決するために乳酸とアンモニア水からなる混合基質溶液を供給した(図1)。乳酸とアンモニア水を共に供給しても、培養液中の乳酸濃度を完全に維持することはできなかったが、その減少幅を小さく抑えることが可能であった。次に、基質溶液に乳酸ナトリウム塩を少量添加し、培養液中のナトリウムイオン濃度を増加させて酸と塩基の平衡関係を変化させることにより、乳酸濃度を一定値に維持することを試みた。その結果、培養15時間目まで乳酸濃度を約2g/lに維持することができ、菌体増殖は大幅に改善された。

一般にPHAの蓄積は、炭素源以外の栄養素を制限することによって促進させることが可能で、菌体増殖期とPHA蓄積期からなる二段培養法を用いることで効率的なPHA生産を行うことができる(図2)。そこで、高濃度

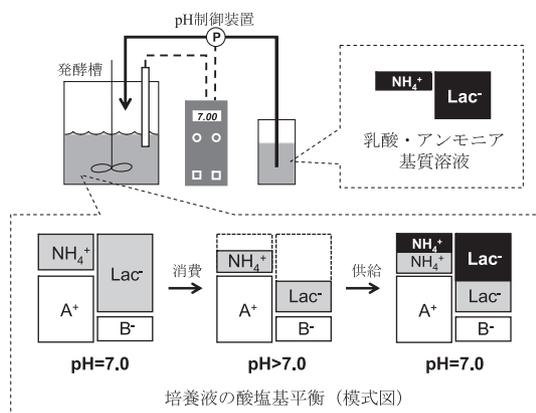


図1. pH-stat feed法による乳酸基質供給。菌体によって消費される基質と同量の基質が供給できれば、その濃度は一定に維持できる。ここで、A⁺はカチオン、B⁻はアニオン、Lac⁻は乳酸イオン、NH₄⁺はアンモニウムイオンを表す。

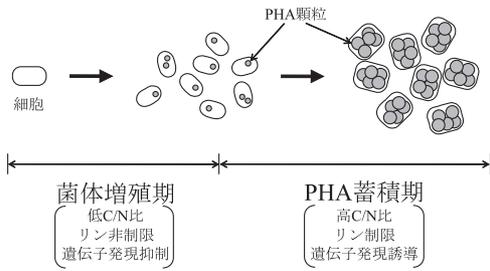


図2. PHA発酵生産における二段培養法

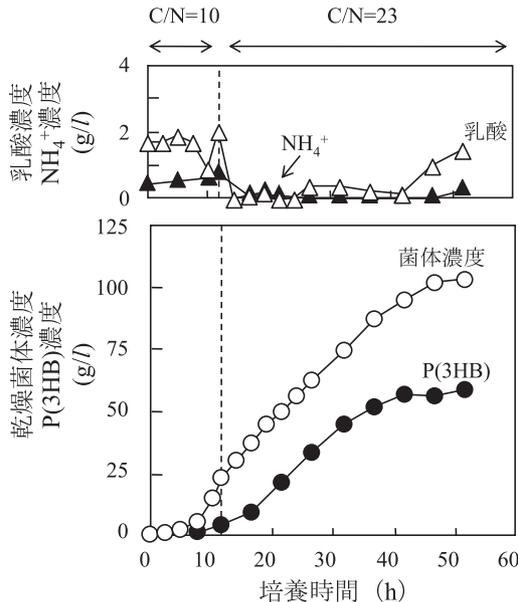


図3. *R. eutropha*によるP(3HB)の生産. 乳酸をpH-stat feed法(pH=7.0)により供給した. 培養12時間目に基質溶液のC/N比を変更してP(3HB)の蓄積を促進させた.

に生育させた菌体を窒素源制限状態に移し、P(3HB)生産を行わせる検討を行った. 供給する基質溶液の炭素源と窒素源の比率(C/N比)を、菌体増殖期には10に、その後23に変更して培養を行うと、菌体は約60wt%のP(3HB)含有率を保ちながら増殖し、培養52時間で菌体濃度は103 g/lに達した(図3). このときのP(3HB)生産性は1.2 g/l・hであり、乳酸を基質に用いて高い生産性を実現することに成功した¹³⁾. 乳酸を基質としてPHAの発酵生産を行った報告は他にもあるが¹⁴⁾, これほどまでに高い生産性は達成されていない. また、pH-stat feed法は、酢酸やプロピオン酸などの他の低分子有機酸にも適用することが可能であった^{15,16)}.

pH変化を指標とする混合有機酸供給法

さらに、乳酸と酢酸の混合有機酸をP(3HB)に変換するための基質供給法について検討を行った. まず、前述のpH-stat feed法で乳酸と酢酸の混合有機酸を供給する

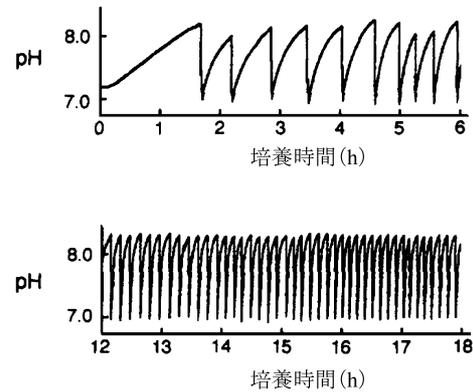


図4. 培養液pHの変化速度を指標にして混合有機酸を供給した培養のpH経時変化. pHの上昇は主に有機酸の消費によるものであり、その上昇速度が設定値以下になった場合に混合有機酸を供給しpHを7.0に戻した.

培養を行ったが、菌体に消費されにくい酢酸が培養液中に蓄積し、酢酸の生育阻害作用により菌体濃度が低く抑えられる結果となった. 培養液中の全有機酸濃度を低く維持するには、基質の消費状態を把握しながら混合有機酸溶液の供給を行う以外に方法はないと考え、pHの変化量から基質の減少量を推定し、その推定に応じて混合有機酸溶液を供給するpH-dependent feed法の構築を試みた. pH-stat feed法では、培養液pHが7.0を超えると酸性基質を供給しpHを7.0未満に制御するが、新たに開発した供給法ではpH変化速度を指標にすることで酸性基質の供給間隔を任意に設定できるようにした. そのため、酢酸のように資化速度の遅い有機酸の消費を待って、次の混合有機酸を供給することが可能になった. その反面、pH制御の間隔が長くなるため培養液pHは大きく変動する(図4).

このpH-dependent feed法を用いて、1分間のpH変化がゼロに低下した時点で基質溶液の供給を行うように制御を行ったところ、従来のpH-stat feed法と比較して約6倍高い菌体濃度を得ることが可能であった. さらに、pHの変化速度が基質供給直後における初速度の5%以下に低下した時点で次の基質供給を行う制御では、菌体濃度は45 g/l (pH-stat feed法と比較して約19倍高い菌体濃度)にまで増加し、pHの変化速度を指標として基質供給のタイミングを決める方法は、資化性の異なる酸性基質を同時に供給する場合に非常に有効であった. さらに、同じ制御プログラムを用いて、培養24時間目に混合有機酸溶液のC/N比を10から50に変更する二段培養法を行うと(図5)、菌体濃度は73 g/l、P(3HB)濃度は55 g/lにまで増加し、非常に高いP(3HB)生産性(1.3 g/l・h)を実現することができた¹⁷⁾. 基質間で資化速度が異なる混合有機酸を用いて、このような高密度培養に成功した

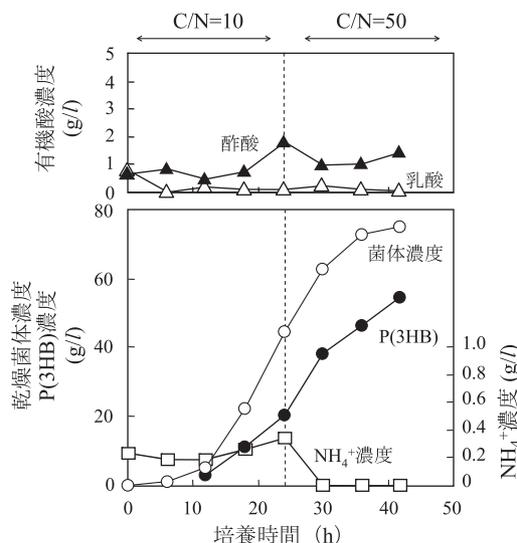


図5. *R. eutropha* による P(3HB) の生産. 乳酸と酢酸を等モル混合した有機酸を pH-dependent feed 法により供給した. 培養 24 時間目に基質溶液の C/N 比を変更して P(3HB) の蓄積を促進させた.

事例は、筆者の知る限り他には報告されていない。

植物油からの高性能ポリマー生産

次に、実用的な高分子物性を有する PHA をバイオマスから発酵生産する取り組みについて紹介したい。とくに大豆油やパーム油などの植物油は、その供給能力の大きさから工業原料としての利用が期待できるバイオマスである。

R. eutropha は、植物油を炭素源として多量の P(3HB) を合成するが、このポリマーは室温状態で長時間放置すると二次結晶化により脆くなる欠点がある。一方、*Aeromonas caviae* は、植物油から P(3HB-co-3HHx) を合成する能力がある。この共重合体は、二次結晶化が進行しにくく、フィルムや繊維に加工が可能な高性能な PHA である³⁾。しかしながら、*A. caviae* は最大で 30 wt% 程度しか PHA を蓄積する能力がなく、この微生物を宿主に用いて P(3HB-co-3HHx) を効率的に生産することは不可能であった⁴⁾。

Fukui らによって *A. caviae* の PHA 合成酵素やその代謝経路に関する研究が行われ、この細菌が P(3HB-co-3HHx) を合成できるのは、PHA 合成酵素のモノマー認識能の幅広さに起因していることが示された¹⁸⁾。さらに、PHA 蓄積欠損株である *R. eutropha* PHB-4 株を宿主として、*A. caviae* 由来の PHA 重合酵素遺伝子を組み込んだ組換え株が育種され、植物油から 80 wt% を超える高含率で P(3HB-co-3HHx) を合成することが可能になった¹⁹⁾。

著者らは、この組換え株の培養条件を最適化することで、大豆油を炭素源として P(3HB-co-3HHx) の生産を

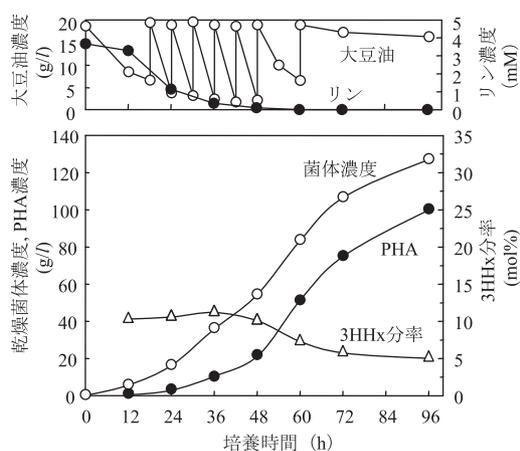


図6. 組換え *R. eutropha* による P(3HB-co-3HHx) の生産. 炭素源には大豆油を用い、リン源を制限することで PHA の蓄積を促進させた。

行った (図6)。培養液中の大豆油濃度は約 20 g/l に制御するために適宜添加を行い、途中からリン源制限とすることで PHA の蓄積を促進させた。培養 96 時間で、128 g/l の乾燥菌体量、PHA 含有率は 71 wt% が得られ、大豆油からの対原料収率は 0.74 g-PHA/g-大豆油であった²⁰⁾。グルコースなどの糖類を炭素源として PHA の合成を行うと、その対原料収率は 0.3–0.4 g-PHA/g-糖であることから、植物油を用いることで 2 倍近く高い対原料収率が得られたことになる。植物油においてこのような高収率が得られるのは、エステル結合を形成するためには水分子が付加される必要があるのと、代謝経路における二酸化炭素の排出が少ないことに起因している。その意味で植物油は PHA の発酵基質に適しており、他の基質に比べて生産時における環境負荷やコストの削減が期待できる。

超高分子量ポリマーの発酵生産

発酵用基質として一般的なグルコースは、超高分子量 P(3HB) の原料として利用することが適している。超高分子量 P(3HB) も、実用的な物性を有する高性能材料である。

大腸菌 (*Escherichia coli*) は、本来 PHA を合成しない細菌であるが、PHA 生合成遺伝子群を導入することで PHA を合成させることができる。一方で、遺伝子組換え大腸菌が合成する P(3HB) は、重量平均分子量で 300 万 g/mol を超える非常に高い分子量を有することがわかっている^{5,22)}。この理由は、本来 PHA 合成細菌に備わっている分子量を制御する機構が、大腸菌には備わっていないためと思われる。また、大腸菌の増殖中に PHA を蓄積させると、細胞分裂が抑制され細胞が繊維化する。これも、PHA 蓄積細胞における分裂機構が大腸菌には欠如しているため、大腸菌で PHA を生産しようとする高濃

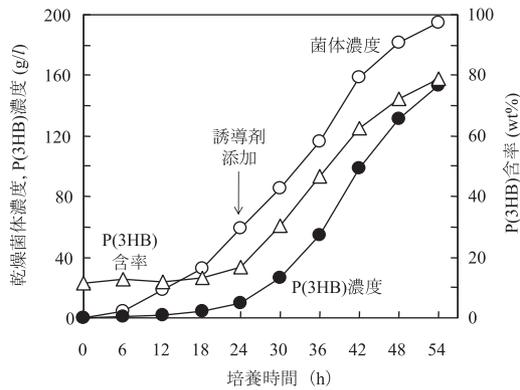


図7. 組換え大腸菌による超高分子量 P(3HB) の生産. 炭素源にはグルコースを用い, 誘導剤 (IPTG) を添加することで P(3HB) の蓄積を促進させた.

度の菌体を得ることが難しい. その解決策の一つとして, 細胞分裂に参与するタンパク質 (FtsZ) を PHA 蓄積菌体に過剰発現させることにより, 細胞の繊維化を抑制し, 効率的に P(3HB) を生産する手法が確立されている. これは, 菌体増殖と P(3HB) 合成を同時に行う増殖連動型の生産方法で, 培養31時間で菌体濃度 194 g/l, P(3HB) 含率 73 wt% が成し遂げられている²¹⁾.

筆者らは, 誘導剤の添加により P(3HB) 合成を促す誘導型生産法に着目し, 菌体増殖と P(3HB) 蓄積を別々に行わせることにより効率的に P(3HB) を生産する方法を開発した. この方法は, 菌体増殖時にはなるべく P(3HB) の蓄積を抑えさせ, 菌体増殖がある目標値に達したときに誘導剤 (IPTG) を添加して P(3HB) 合成酵素遺伝子を発現させ, ポリマーが高含率で得られるまで蓄積を行わせるものである (図7). グルコースを炭素源として P(3HB) の生産実験を行ったところ, 最大で 201 g/l の乾燥菌体濃度と 80 wt% の P(3HB) が得られた^{23,24)}. また, 合成された P(3HB) の重量平均分子量は 480 万 g/mol の超高分子量体で, その分散度は 1.5 であった (図8). この方法では, 0.37 g-P(3HB)/g-グルコースの対原料収率で超高分子量 P(3HB) を生産することができた. 一概に比較はできないが, 増殖連動型の生産方法では対原料収率が 0.28 g-P(3HB)/g-グルコースと報告されているので²¹⁾, 誘導型生産法により大幅に対原料収率を改善できたことになる.

発酵生産プロセスの環境影響評価

再生可能なバイオマスから生産された PHA は, 使用後に二酸化炭素と水に生分解されたとしても大気中の二酸化炭素濃度をこれ以上増大させる心配がなく, 環境低負荷型の高分子材料と考えることができる. では, 「どの程度環境に与える負荷が少ないのか」という問いに対して, これまで科学的な根拠に基づいた実証がなされていない

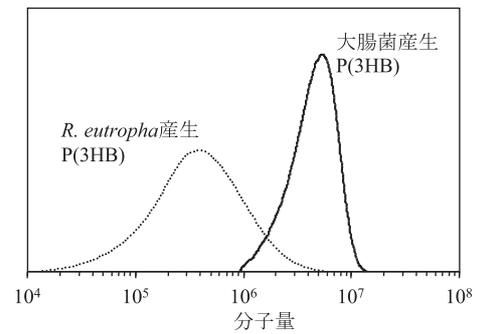


図8. 合成された P(3HB) の分子量. 大腸菌産生 P(3HB) の重量平均分子量は 480 万 g/mol, 分散度は 1.5.

かった. PHA といえども, その製造工程では電気やガスなどの化石燃料由来するエネルギーを必要とする. そのため, 製造時に投入されるエネルギーを考慮すると, PHA は石油をベースにした合成プラスチックよりも環境負荷が大きいのではないかという意見もある. そこで, 前述した P(3HB-co-3HHx) と超高分子量 P(3HB) の発酵生産プロセスを取り上げ, ライフサイクルアセスメント (LCA) の手法にもとづき環境に与える影響について評価を行った²⁵⁻²⁷⁾.

LCA とは, ある製品のライフサイクル (資源採取, 生産, 輸送, 使用, リサイクル, 廃棄) において, 環境に与える影響を定量的に評価する一つの手法である. 本研究では, 10 l 容発酵槽を用いた培養結果に基づき, PHA を年間 5000 トン製造するプロセスを想定して, 大気中の二酸化炭素から PHA の精製樹脂を得るまでの調査範囲において, 投入されるエネルギー量 (化石資源量) および排出される二酸化炭素量を計算した. また, その結果を, ヨーロッパプラスチック生産者協会 (APME) から公表されている石油ベースの汎用樹脂 5 種類の分析結果と比較した.

実現可能と思われる発酵条件を選定し, 大豆油からの P(3HB-co-3HHx) 製造を試算すると, エネルギー投入量で 51 MJ/kg, 排出二酸化炭素量で 0.2 kg/kg と見積もられた. また, グルコースからの P(3HB) 製造では, エネルギー投入量で 68 MJ/kg, 排出二酸化炭素量で 1.4 kg/kg と見積もられた (図9).

石油系の汎用樹脂では, 1 kg の製品あたり 77-87 MJ のエネルギーが投入されるので, PHA 製造では 10-40% 投入されるエネルギーが少ない. 投入エネルギーの内訳を見てみると, 汎用樹脂では約半分が原料として用いられるフィードストックエネルギーであるが, PHA ではすべてがプラントの運転に用いられるプロセスエネルギーである. 現時点では, 汎用樹脂の製造プロセスの方がプロセスエネルギーの投入量は少ない. しかし, これらの

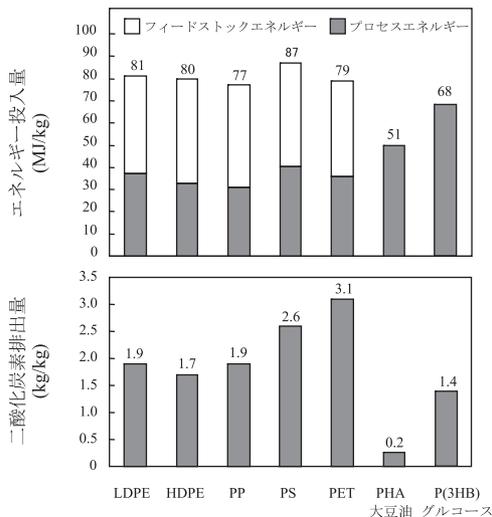


図9. プラスチック1 kgを製造する際に投入されるエネルギー量と排出される二酸化炭素量。LDPE, 低密度ポリエチレン; HDPE, 高密度ポリエチレン; PP, ポリプロピレン; PS, ポリスチレン; PET, ポリエチレンテレフタレート。

プロセスは長い時間をかけて改良され、すでに確立された製造方法である。発酵プロセスもまだまだ改良の余地があり、それに伴い投入されるプロセスエネルギーも低下していくと期待できる。排出二酸化炭素量で比較を行うと、石油系の汎用樹脂では1 kgの製品あたり1.7–3.1 kgの二酸化炭素が排出されるが、PHAでは0.2–1.4 kgと著しく少ない。PHAにおいてこのような低い値になるのは、大気中の二酸化炭素に由来する原料を用いているためである。

これらの比較から、PHA製造プロセスは投入エネルギー量と排出二酸化炭素量が共に石油系汎用樹脂よりも少なく、環境に対しての負荷が少ないと結論できる。著者ら以外にもPHAの発酵生産についてLCAを行った報告があり、環境負荷が石油系汎用樹脂より少ないという共通した結論に至っている^{28–30)}。ちなみに、一足先に商業生産が始まったポリ乳酸に関しては、実際の製造プロセスにおいて投入エネルギー量は54 MJ/kg、温暖化ガス排出量は1.8 kg/kg(二酸化炭素換算)と報告されている³¹⁾。

おわりに

PHAのような生分解性を兼ね備えたバイオマスプラスチックは、将来、全プラスチック生産量の約20%を占めると予想されている。とくに、食品用包装用フィルムや紙おむつなどの回収が困難でリサイクル化が難しい製品に利用されることが期待されている。現在、アメリカや中国などにおいてPHAの微生物プラントの建設が進みつつあり、近い将来には年5万トンの規模で供給が始まる予定である。その一方で、世界的な食糧危機を背景

に、バイオ燃料などの原料を非可食性のバイオマス資源に転換することが求められている。今後、PHA生産においても非可食性資源への転換が必須になるであろう。本研究では、基礎データの不足から、木質系バイオマスから低分子有機酸を経由してPHAを生産するプロセスに関しての環境影響評価は行わなかったが、同様のプロセスについてハワイ大学のYuらによって評価が行われ、環境負荷が少ないことが示されている³⁰⁾。21世紀の重要な課題である持続可能な循環型社会の実現に向けて、PHAの発酵生産法が、生産コスト、材料物性、環境負荷のバランスの取れた高分子合成プロセスとして大きく発展することを期待したい。

本研究を遂行するにあたり九州大学大学院農学研究所の石崎文彬教授(現九州大学名誉教授)、東京工業大学大学院総合理工学研究科の土肥義治教授(現理化学研究所理事)、近畿大学産業理工学部の中賢二教授から御懇篤なる御指導と御助言を賜りました。本研究は、プリハルディ・カハル博士研究員、秋山稔研究員をはじめとする東京工業大学土肥研究室の皆様、理化学研究所高分子化学研究室の皆様、九州大学微生物工学研究室の皆様から多大なるご協力を得て進めてまいりました。ここにあらためて感謝申し上げます。

文 献

- 1) Tsuge, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 579–584 (2002).
- 2) 柘植丈治, 土肥義治: ケミカル・エンジニアリング, **46**, 520–527 (2001).
- 3) Tsuge, T., Kikkawa, Y., and Doi, Y.: *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **5**, 449–453 (2004).
- 4) 松本圭司, 大窪雄二: 生物工学, **86**, 537–539 (2008).
- 5) Iwata, T.: *Macromol. Biosci.*, **5**, 689–701 (2005).
- 6) 岩田忠久, 柘植丈治, 田中稔久: プラスチックス, **56**, 62–66 (2005).
- 7) Ishizaki, A. and Ueda, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 287–290 (1995).
- 8) Tanaka, K., Komiyama, A., Sonomoto, K., Ishizaki, A., Hall, S., and Stanbury, P. F.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 160–167 (2002).
- 9) 石崎文彬: 生物工学, **78**, 2–12 (2000).
- 10) Tanaka, K., Katamune, K., and Ishizaki, A.: *Biotechnol. Lett.*, **15**, 1217–1222 (1993).
- 11) Tanaka, K., Katamune, K., and Ishizaki, A.: *Can. J. Microbiol.*, **41** Suppl. 1, 257–261 (1995).
- 12) 石崎文彬, 小林元太, Vonkaveesuk, P., 柘植丈治, 田中賢二: 化学工学論文集, **25**, 136–142 (1999).
- 13) Tsuge, T., Tanaka, K., Shimoda, M., and Ishizaki, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 404–409 (1999).
- 14) Linko, S., Vaheri, H., and Seppälä, J.: *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 401–406 (1993).
- 15) Sugimoto, T., Tsuge, T., Tanaka, K., and Ishizaki, A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 625–631 (1999).
- 16) Kobayashi, G., Tanaka, K., Itoh, H., Tsuge, T., Sonomoto, K., and Ishizaki, A.: *Biotechnol. Lett.*, **22**, 1067–1069

- (2000).
- 17) Tsuge, T., Tanaka, K., and Ishizaki, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 545–550 (2001).
 - 18) Fukui, T. and Doi, Y.: *J. Bacteriol.*, **179**, 4821–4830 (1997).
 - 19) Fukui, T. and Doi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 333–336 (1998).
 - 20) Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K., and Doi, Y.: *Polym. Degrad. Stab.*, **83**, 79–86 (2003).
 - 21) Wang, F. and Lee, S. Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4765–4769 (1997).
 - 22) Agus, J., Kahar, P., Abe, H., Doi, Y., and Tsuge, T.: *Polym. Degrad. Stab.*, **91**, 1138–1146 (2006).
 - 23) Kahar, P., Agus, J., Kikkawa, Y., Taguchi, K., Doi, Y., and Tsuge, T.: *Polym. Degrad. Stab.*, **87**, 161–169 (2005).
 - 24) Agus, J., Kahar, P., Abe, H., Doi, Y., and Tsuge, T.: *Polym. Degrad. Stab.*, **91**, 1645–1650 (2006).
 - 25) Akiyama, M., Tsuge, T., and Doi, Y.: *Polym. Degrad. Stab.*, **80**, 183–194 (2003).
 - 26) 柘植丈治, 土肥義治 : *OHM*, **90**, 34–39 (2003).
 - 27) 田口精一, 柘植丈治, 土肥義治 : 化学経済, **51**, 32–38 (2004).
 - 28) Kim, S. and Dale, B. E.: *Environ. Sci. Technol.*, **42**, 7690–7695 (2008).
 - 29) Harding, K. G., Dennis, J. S., von Blottnitz, H., and Harrison, S. T. L.: *J. Biotechnol.*, **130**, 57–66 (2007).
 - 30) Yu, J. and Chen, L. X. L.: *Environ. Sci. Technol.*, **42**, 6961–6966 (2008).
 - 31) Vink, E. T. H., Rabago, K. R., Glassner, D. A., and Gruber, P. R.: *Polym. Degrad. Stab.*, **80**, 403–419 (2003).