

## 효소에 의한 polycaprolactone 생분해의 최적조건

김연철 · 전해상 · 장호남 · 우성일

한국과학기술원 화학공학과/생물공정연구센터  
(1992년 6월 23일 접수, 1992년 10월 19일 채택)

## Optimal Conditions for Enzymatic Degradation of Polycaprolactone

Yeon Chul Kim, Hae Sang Jun, Ho Nam Chang and Seong Ihl Woo

Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center,  
KAIST, Deaduk Science Town, Taejon 305-701, Korea  
(Received 23 June 1992; accepted 19 October 1992)

### 요 약

효소에 의한 고분자의 생분해성 평가의 기초자료 확립을 위해 여러 가지 미생물에서 추출한 lipases를 이용해 polycaprolactone(PCL)의 효소에 의한 생분해성을 조사하였다. *Pseudomonas* sp.에서 추출한 lipase가 PCL을 가장 잘 가수분해시킴을 알았다. 그리고, PCL의 생분해성 평가를 위해 기질 농도, 효소 농도와 반응 시간을 최적화하였다. 기질 농도 30 g/L, 효소 농도 30 mg/L, 반응 시간 15-20시간이 효소에 의한 PCL의 생분해 최적 조건이었다. 또한, 필름, coarse powder, fine powder 형태의 PCL 시료를 가지고 효소에 의한 생분해에 미치는 고분자 표면적의 효과를 관찰하였다. 고분자의 표면적이 넓을수록, 즉 fine powder가 생분해가 가장 잘 일어났다.

**Abstract**—The enzymatic degradation of polycaprolactone(PCL) was investigated using lipases obtained from different microorganisms by measurement of weight loss and total organic carbon(TOC) concentration. Lipase from *Pseudomonas* sp. was able to degrade PCL most efficiently. In this study, three major variable, enzyme concentration, substrate concentration, and reaction time, were optimized to enhance biodegradation of PCL. The optimal condition of biodegradation of PCL was achieved at the substrate concentration of 30 g/L, the enzyme concentration of 30 mg/L, and the degradation time of 15-20 hours. Three different forms of PCL, film, fine powder, and coarse powder, were investigated to understand the effect of surface area on the degradation rate. PCL with large surface area(fine powder) was degraded most efficiently by lipase obtained from *Pseudomonas* sp.

### 1. 서 론

현재 사용되고 있는 플라스틱 생산품의 1/3 정도가 비교적 짧은 시간 동안에만 사용되는 일회용 포장 용도로 사용되어 이들의 폐기물은 해양환경이나 토양환경에 누적되어 쉽게 눈에 띄일 뿐 아니라 분해되는데 수백 년이 걸려 이들 폐기물의 처리가 새로운 문제로

대두되고 있다. 그러므로 이들 폐플라스틱에 대한 문제를 궁극적으로 해결하기 위해 분해성 플라스틱을 사용하여야 하며, 세계 각국에서는 일회용 용품에 비분해성 플라스틱의 사용을 규제하고 있다[1-5]. 생분해성 고분자를 개발하였다 할지라도 그것의 생분해성을 정확히 평가할 수 있는 방법이 필요한데 국제적으로 인정되는 평가방법이 아직 없는 형편이다. 또한 분해성에

관한 정확한 정의조차 확립되어 있지 않은 상태이다[6]. 일반적으로 알려진 생분해성 평가방법으로는 효소에 의한 방법, 미생물에 의한 방법, 토양에 의한 방법이 있다[7]. 이 중 효소에 의한 방법은 효소의 가수분해 작용의 결과 고분자의 일부가 저분자화하여 반응액 중으로 용해되어 나온 것을 측정하거나, 중량감소, 분자량 변화 등을 관찰하는 것이다[8,9]. 이 방법은 고분자의 주쇄내에 효소의 기질 특이성을 만족시켜 줄 amide나 ester 결합 등이 있어야 하므로 효소 선택에 문제가 있으나, 정량성 및 재현성이 우수한 실험 데이터를 얻을 수 있는 장점이 있다. 이 방법은 특히 소요되는 기간이 짧기 때문에 생분해성 고분자 개발을 위하여 분자설계를 수행하는 초기단계에 있어서 가장 적합한 것으로 알려져 있다. 미생물에 의한 분해성 평가는 ASTM G21-70으로 알려진 플라스틱 재료의 곰팡이 저항성 시험이 있는데 한 달 정도의 기간이 소요되고 곰팡이의 성장 상태를 육안으로 관찰한다[10]. 이 방법에서는 균과 고분자의 접촉이 안 좋은 점에 착안하여 이 등[11]은 이 방법을 수정한 soft agar overlay 방법을 개발하였다. 또, 주로 Albertsson 등[12]은  $^{14}\text{C}$ 가 불규칙하게 분포된 고분자를 합성해 배양하면서  $^{14}\text{CO}_2$ 의 발생량을 알아보는 방법을 제안하였다. 이 외에도 균주를 screening하기에 적당한 clear zone method가 있고, ASTM G22-76으로 알려진 bacteria에 대한 저항성 시험 등이 있다[13, 14]. 토양에 의한 방법은 쓰레기 처리 상황 및 실제 자연환경에서의 생분해성을 중시한 방법으로 장기간이 소요되고, 재현성이 낮은 문제점이 있으나, 새로운 생분해성 고분자를 개발하였을 때에는 꼭 행해져야 하는 방법이다[15]. 재현성을 높이기 위해 indoor soil box를 만들어 실험하기도 한다. 이 세 방법 이외에도 compost실험, macroorganisms에 의한 분해, 의료용에 사용하기 위한 *in vivo*(implant) test, 해양환경에서의 사용을 고려한 marine simulation 등이 행해지고 있다[16-19].

한편 Narayan은 환경분해성 고분자를 설계함에 있어서 비분해성 고분자의 주쇄내에 광화학적, 생물학적 또는 화학적으로 분해가 가능한 분자쇄를 삽입하여 비분해성 고분자를 환경분해성 고분자로 한다는 구상을 발표한 바 있다[20]. 실제 대부분의 고분자가 분자량이 높은 경우에는 생분해성이 없지만 oligomer로 되면 생분해성을 나타낸다[21]. 따라서 고분자를 우선 oligomer로 만들 수 있는 생물학적 trigger를 분자내에 삽입한다는 Narayan의 구상은 타당성이 있다. Polycaprolactone(PCL)은 caprolactone의 개환 중합반응에 의해 제조되는 선형지방족 폴리에스테르로, 주쇄내에 가수분해가 가능한 ester linkage를 포함하고 있고, 여러 가지 고분자와 혼화성을 가지므로, 생분해성 trigger로서 사용가

Table 1. Properties of lipases

Lipase	Source	Temperature	pH
Lipase F	<i>Rhizopus javanicus</i>	30-45°C	5.0-7.5
Lipase D	<i>Rhizopus delemar</i>	30-45°C	5.0-7.0
Lipase CE	<i>Humicola lanuginosa</i>	40-60°C	5.5-8.5
Lipase CES	<i>Pseudomonas</i> sp.	40-65°C	5.0-10.0
Lipase N	<i>Rhizopus niveus</i>	30-45°C	5.0-7.0

능하다[22]. 또한 PCL은 곰팡이에 의해 분해된다는 보고가 있다[13, 23-25].

본 연구의 목적은 효소에 의한 고분자의 생분해성 평가에서 최적화가 이루어져 있지 않은 점에 착안하여, 생분해성 trigger로 사용가능한 PCL을 기질로 효소에 의한 생분해성 평가방법의 최적 조건을 확립하는데 있다. 또한 후에 PCL을 생분해성 trigger로 사용한 고분자 또는 다른 생분해성 고분자의 효소에 의한 생분해성 평가방법의 기초자료로 사용하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 고분자 분말 시료 및 고분자 필름의 제조

Pellet 형태의 PCL은 Aldrich Chemicals Co.로부터 구입하였고, 또한 Union Carbide Co.로부터 fine powder 형태의 Tone polymer P-767을 구입하여 사용하였다. Pellet 형태의 PCL은 chloroform에 용해시킨 후, 여기에 methanol을 한 방울씩 가했다. Methanol 용액에서 얻어진 분말 형태의 침전물은 30°C의 진공 오븐에서 24시간 동안 건조 후 사용하였다. PCL 필름은 PCL을 용해시킨 tetrahydrofuran(THF)용액을 casting 표면인 유리 petri dish 위에서 일반적인 solvent casting 방법을 사용하여 제조하였다. 제조된 필름은 상온의 후드에서 12시간동안 방치해 solvent가 날아가도록 한 후, 남아 있는 solvent를 제거하기 위하여 30°C의 진공 오븐에서 24시간 동안 건조시켜 사용하였다.

### 2-2. 효소

사용한 효소는 Amano 제약회사(일본) 제품이었으며, *Humicola lanuginosa*, *Pseudomonas* sp., *Rhizopus niveus*, *Rhizopus javanicus*, 그리고 *Rhizopus delemar*에서 추출한 5가지의 lipase로 최적 온도와 pH를 Table 1에 나타내었다. 이 효소들은 4°C의 냉장고에 보관해 사용하였다.

### 2-3. 생분해성 평가

PCL의 생분해성은 구성물의 가수분해 정도를 total organic carbon(TOC) 농도를 측정함과 동시에 PCL의 중

량감소를 측정하여 살펴보았다. 각 반응물은 400  $\mu\text{mol}$ s의 phosphate buffer(pH 7.0), 고분자, 효소를 포함해 전체부피가 10 mL를 이루도록 하였다. 이 반응물을 37°C, 180 rpm의 rotary shaking incubator(국제 과학, Model SH-1B)에서 반응시켰다. 반응 후 반응물을 filter paper(TOYO, No. 2)로 걸러 고체는 30°C의 진공 오븐에서 24시간 동안 건조 후 중량 감소를 측정하였고, 여액은 TOC analyzer(Beckman Model 915-B, U.S.A.)를 사용해 TOC 농도를 측정하였다. 이와는 별도로 두개의 control samples를 사용하였다. 즉, 하나는 기질 control 시료로 기질인 고분자를 넣지 않고 효소만을 넣어 효소 자체에 의한 TOC 농도를 알아보았다. 또 다른 하나는 효소 control 시료로 고분자만을 넣어 수용액에 의한 고분자의 가수분해 정도를 알아보았다. 필름의 경우는 위의 실험과 동시에 표면의 변화를 보기 위해 금으로 코팅한 후 scanning electron microscopy(SEM; Philips, 525M/535M, Netherlands)로 관찰하였다.

#### 2-4. TOC analyzer의 표준 시료 곡선

Anhydrous potassium biphthalate( $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ ) 2.125 g을  $\text{CO}_2$ -free water로 1 L의 volumetric flask에서 용해시켜 1,000 ppm의 organic carbon 용액을 만든다. 이 용액으로부터 20, 40, 60, 80, 100 ppm의 표준용액을 만들어, 각각 50  $\mu\text{L}$ 를 취해 total carbon 표준 시료 곡선을 얻었다. 무기 탄소의 경우는 먼저 4.404 g의 anhydrous sodium carbonate( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )를 약 500 mL의  $\text{CO}_2$ -free water에 녹이고, 여기에 3.479 g의 anhydrous sodium bicarbonate( $\text{NaHCO}_3$ )를 가해 1 L의 volumetric flask에서 용해시켜 1,000 ppm의 inorganic carbon 용액을 만든 후 위와 같은 방법으로 무기 탄소 표준 시료 곡선을 얻었다. TOC 농도는 total carbon 농도에서 inorganic carbon 농도를 빼서 계산하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 최적 효소의 선택

Polyester를 분해할 수 있는 균주로부터 고분자를 가수분해할 수 있는 효소는 lipase임이 보고되었다[26]. 따라서 본 연구에서는 여러 가지 미생물에서 추출한 lipase로 PCL의 생분해성을 조사하였다. 400  $\mu\text{mol}$ s phosphate buffer(pH 7.0), 30 g/L의 PCL powder, *H. lanuginosa*, *Pseudomonas* sp., *R. niveus*, *R. javanicus*, *R. delemar*에서 추출한 lipase가 각각 30 mg/L가 되도록 하고, 전체부피는 10 mL를 이루도록 하여 실험했다. Fig. 1(a)는 각 효소에 의한 PCL의 중량감소를 나타내고, Fig. 1(b)는 TOC 농도를 나타낸 것이다. 이 결과들은

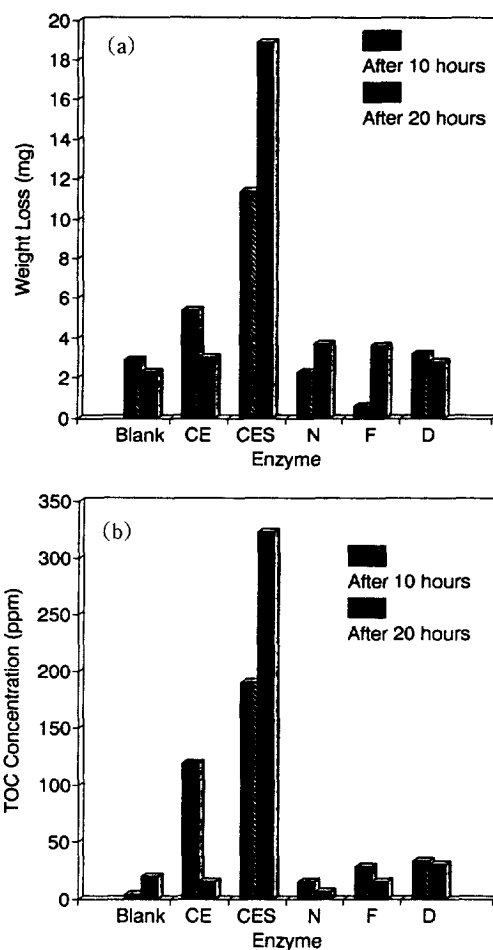


Fig. 1. Enzymatic degradation of PCL by different lipases.

(a) Weight Loss and (b) TOC Concentration(CE: *Humicola lanuginosa*, CES: *Pseudomonas* sp., N: *Rhizopus niveus*, F: *Rhizopus javanicus*, D: *Rhizopus delemar*).

같은 경향을 보여주고 있는데, 이것은 PCL의 중량감소가 PCL 중의 ester결합이 효소에 의해 가수분해되어 PCL의 일부가 저분자화하여 용액 중의 soluble carbon이 되는 것을 의미한다. Tokiwa와 Suzuki의 보고에 의하면, *R. delemar*에서 추출한 lipase가 가수분해 능력이 뛰어나다고 발표하였으나[8], Fig. 1에서 보여주듯이 *R. delemar*보다는 *Pseudomonas* sp.에서 추출한 lipase가 PCL의 가수분해 능력이 가장 뛰어남을 알 수 있었다. 그러므로 최적효소로 *Pseudomonas* sp.에서 추출한 lipase로 실험을 수행하였다.

#### 3-2. 반응 시간

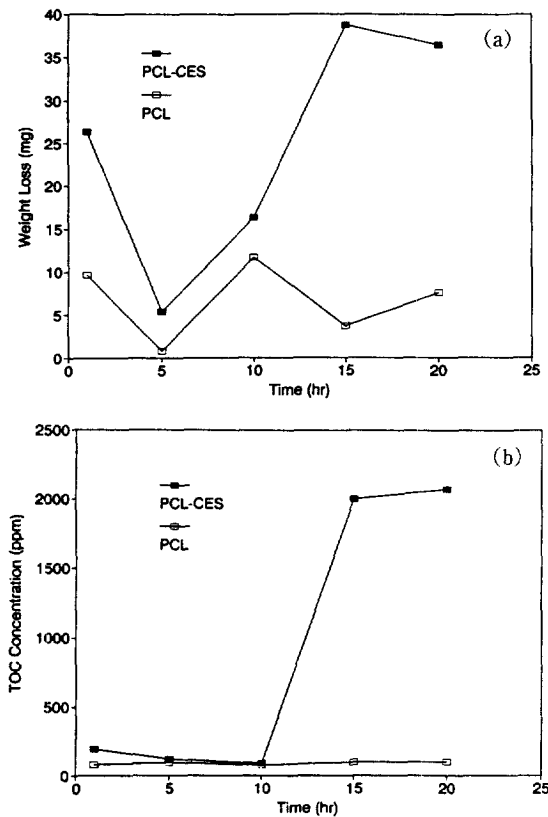


Fig. 2. Time course of enzymatic degradation of PCL by *Pseudomonas sp.* lipase.

(a) Weight Loss and (b) TOC Concentration.

효소에 의한 생분해성 평가의 가장 큰 장점은 다른 방법에 비해 짧은 시간에 행할 수 있다는 것이다[7]. 그러므로 생분해 정도를 나타낼 수 있는 최단시간을 찾기 위해 *Pseudomonas sp.*에서 추출한 lipase 30 mg/L와 30 g/L의 PCL powder를 이용해 실험하였다. Fig. 2(a)에는 이 실험에 의한 중량 감소를 Fig. 2(b)에는 TOC 농도를 나타내었다. 그림에서 PCL이라 표시된 것은 물에 의한 가수분해를, PCL-CES로 표시된 것은 물과 효소에 의한 가수분해를 나타낸다. 그러므로 PCL과 PCL-CES의 차이가 효소에 의한 가수분해를 나타낸다. 여기에서 PCL-CES의 TOC 농도는 반응액의 TOC 농도에서 기질 control에 의한 TOC 농도를 빼서 계산하였다. Fig. 2에 의하면 10시간까지는 효소에 의한 가수분해가 거의 없고, 10시간이 지나야 효소에 의한 가수분해가 진행되어 15시간 이상이 되면 생분해 정도를 확실하게 나타낼 수 있다. Huang은 합성고분자가 효소에 의해 분해되기 위해서는 고분자의 주쇄가 효소의 active

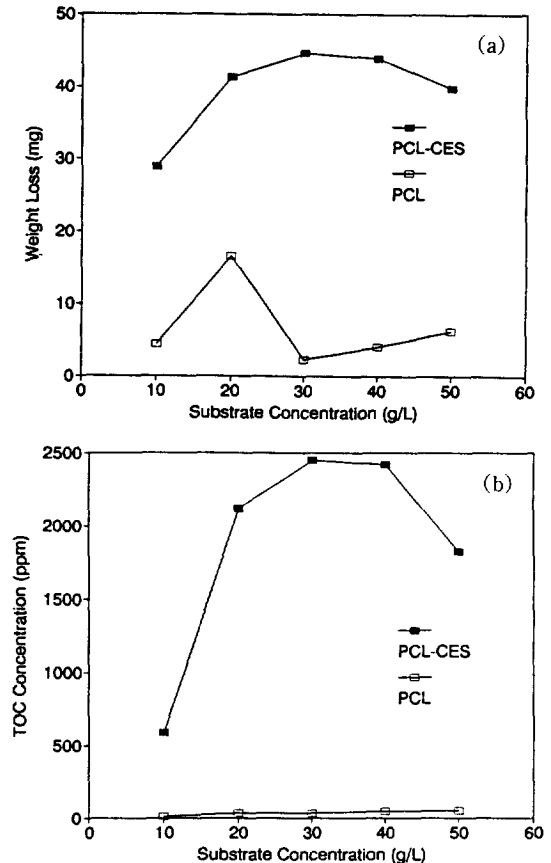


Fig. 3. Effect of substrate concentration on enzymatic degradation of PCL by *Pseudomonas sp.* lipase.

(a) Weight Loss and (b) TOC Concentration.

site에 맞아야 한다고 했다[27]. 고분자의 주쇄가 너무 길면 효소의 active site에 맞지 않기 때문에 이 결과는 먼저 PCL의 ester 결합 일부가 물에 의해 가수분해되어 효소의 active site에 맞도록 저분자화되고나서 효소에 의해 생분해되어 물에 용해되는 것으로 추측된다.

### 3-3. 기질 농도와 효소 농도의 최적화

빠른 시간안에 PCL을 효과적으로 생분해하기 위해 기질(PCL) 농도와, 효소 농도를 최적화하기 위한 실험을 수행하였다. 최적 기질 농도를 찾기 위해 10, 20, 30, 40, 50 g/L로 PCL의 농도를 변화시키고, 효소는 *Pseudomonas sp.*에서 추출한 lipase 30 mg/L를 사용하여 16시간 동안 반응시켰다. Fig. 3(a), (b)는 이 실험에 의한 각각의 중량감소와 TOC 농도를 나타낸다. 여기에서도 PCL-CES와 PCL의 차이가 효소에 의해 가수분해된 양을 나타낸다. 이 결과에 의하면 기질 농도가

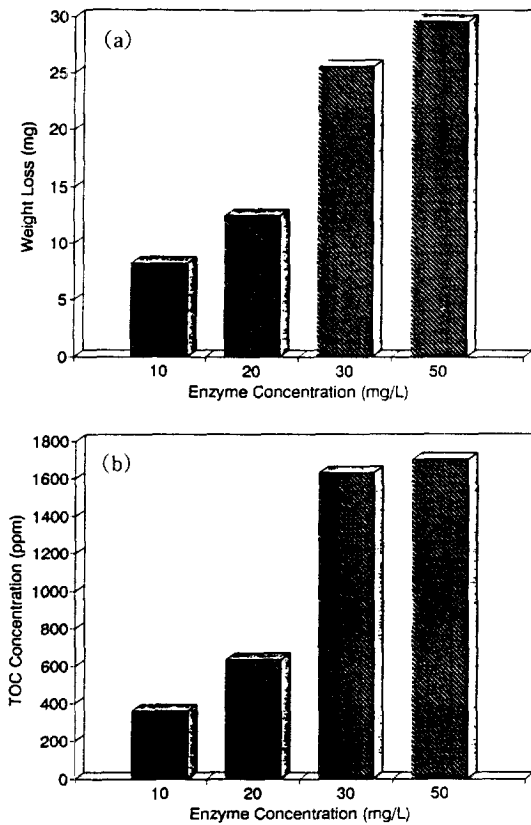


Fig. 4. Effect of enzyme concentration on enzymatic degradation of PCL by *Pseudomonas* sp. lipase.  
(a) Weight Loss and (b) TOC Concentration.

30 g/L까지는 농도가 증가함에 따라 가수분해 정도도 증가하나, 그 이상의 농도에서는 가수분해 정도가 감소함을 보여준다. 이는 *Pseudomonas* sp.에서 추출한 lipases가 PCL에 의해 기질 저해(substrate inhibition)를 받는 것으로 생각된다. 그러므로 최적의 기질 농도는 30 g/L임을 알 수 있었다.

최적 효소 농도를 찾기 위한 실험은 30 g/L의 PCL과 *Pseudomonas* sp.에서 추출한 lipase의 농도를 변화시키면서 수행하였고, 그 결과를 Fig. 4(a), (b)에 나타내었다. 효소 농도는 30 mg/L나 50 mg/L일 때 결과에 큰 차이가 없는 것으로 보아 최적 효소 농도는 30 mg/L임을 알 수 있다.

### 3-4. 고분자 표면적의 효과 및 생분해에 따른 표면의 변화

합성 고분자의 수용액에서의 효소에 의한 생분해는 bulk 반응이라기 보다는 표면 반응이고, 고분자의 크기,

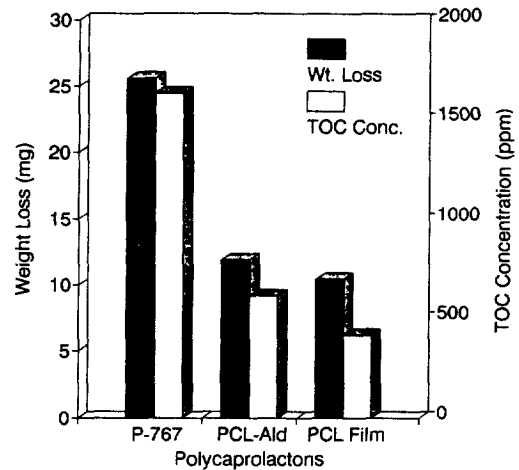
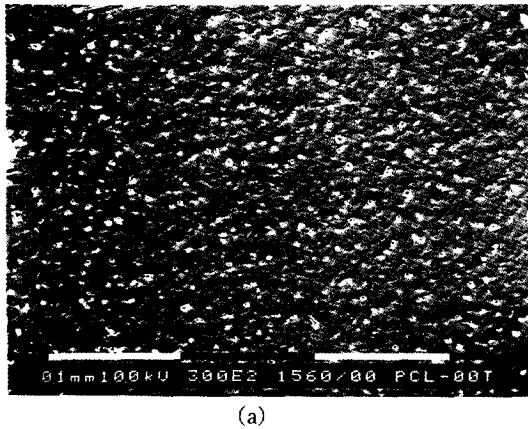


Fig. 5. Effect of surface area on enzymatic degradation of PCL by *Pseudomonas* sp. lipase(P-767: fine powder, PCL-Ald: coarse powder, PCL film: 6×6 mm<sup>2</sup> films).

모양, 표면적 등은 생분해 속도에 큰 영향을 미치는 비균일계 반응이다[27]. 따라서 효소에 의해 생분해성을 평가함에 있어 고분자의 표면적, 물리적 또는 화학적 구조는 매우 중요하다. 이 중에서 PCL의 생분해에 미치는 표면적의 효과를 알아보기 위해 아주 미세한 분말인 P-767, Aldrich사의 PCL로 제조한 큰 분말 및 필름 각각 30 g/L를 *Pseudomonas* sp.에서 추출한 lipase 30 mg/L로 16시간 반응시켰다. 그 결과를 Fig. 5에 나타내었는데, 표면적이 가장 넓은 P-767이 가수분해가 가장 많이 되었음을 보여주고 있다. 따라서 PCL의 표면적이 커질수록 lipase에 의해 생분해가 잘 됨을 알 수 있었다. 필름의 경우 생분해 전과 후의 표면 변화를 SEM으로 관찰하였다. Fig. 6은 효소와 반응시키기 전의 PCL의 solvent-casting 필름의 표면을 나타낸 것이고, Fig. 7은 효소에 의한 생분해 후의 표면을 나타낸 것이다. Fig. 6에 나타나 있는 조그만 구멍들은 solvent-casting시 solvent가 날아간 자리이다. Fig. 5에 의하면 Aldrich사의 PCL로 제조한 큰 분말과 필름은 생분해 정도가 거의 비슷함을 보이는데, 이것은 다음의 두 가지 이유로 추측가능하다. 하나는 필름 표면에 있는 많은 구멍 때문에 큰 분말과 표면적이 비슷할 수 있다. 또 다른 하나는 두 회사의 고분자의 분자량 차이에 의한 것일 수 있다. 이는 Potts 등[21]의 결과에 따른 가정이다. Fig. 7에 나타낸 바와 같이 구멍이 생분해 전에 비해 훨씬 많아짐과 동시에 구멍의 크기도 더 커졌는데 이것이 바로 효소에 의해 PCL이 생분해되어짐을 보여주는 것이다. Cook 등[23]에 의하면 PCL은 먼저 비결정성 부분이



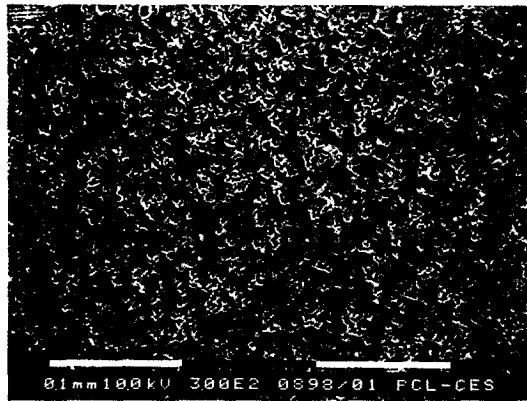
(a)



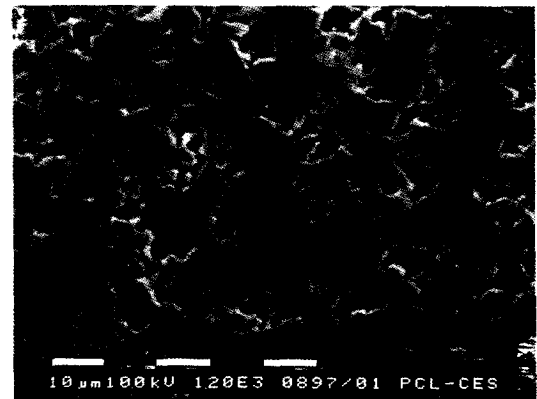
(b)

Fig. 6. SEM of the PCL film before enzyme reaction.

(a) X 300 and (b) X 1200.



(a)



(b)

Fig. 7. SEM of the PCL film after enzyme reaction.

(a) X 300 and (b) X 1200.

생분해되고 나서, 나중에 결정성 부분도 생분해 된다고 하였는데, Fig. 7에서 구멍이 생긴 부분이 비결정성 부분으로 추측된다.

#### 4. 결 론

(1) PCL의 중량 감소는 PCL 중의 ester결합이 효소에 의해 가수분해되어 용액 중의 soluble carbon으로 되었기 때문이다. 그러므로 고체의 중량감소와 용액의 TOC 농도가 같은 경향을 보였다.

(2) 여러 가지 lipase 중 *Pseudomonas* sp.에서 추출한 lipase가 PCL의 가수분해 능력이 가장 뛰어났다.

(3) 실험에 의해 찾은 생분해 최적 조건은 기질 농도, 30 g/L; 효소 농도, 30 mg/L; 반응 시간, 15-20 hours이

었다.

(4) PCL은 먼저 물에 의해 가수분해되어 효소가 공격할 만큼까지 저분자화된 후 효소에 의해 가수분해되어 용액 중의 soluble carbon으로 된다.

(5) 효소에 의한 생분해로 인해 PCL 필름의 표면에 구멍이 많아지고 더 커졌으며, 표면적이 가장 큰 P-767이 가수분해가 가장 잘 되었으며, 효소에 의한 생분해는 표면적의 크기에 영향을 받는다.

본 연구에서는 효소에 의한 PCL의 생분해 평가방법의 최적조건을 제시하였는데, 앞으로 이 최적조건을 기초로 하여 PCL과의 블렌드 및 ester linkage를 포함한 다른 생분해성 고분자의 생분해성 평가를 할 예정이다. 그리고 생분해성 고분자의 분해 반응기구에 중요한 역할을 하는 효소의 형태[28], 즉 endo-enzyme인지 exo-en-

zyme인지를 밝히는 것도 중요한 문제이다. 또한 PCL의 분해 생성물[24]이 아직 확실히 밝혀지지 않았는데 이 분해 생성물이 무엇인지를 밝혀내고 이의 독성여부를 판단하는 것도 중요하다.

## 감 사

Lipases를 분양해 주신 KAIST 생물공학과와 이준식 교수님께 감사를 드립니다. 본 연구는 생물공정연구센터의 연구비 지원(1991-92)를 받아서 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. Taylor, L.: *CHEMTECH*, September, 542(1979).
2. Leaversuch, R.: *Modern Plastics Int.*, October, 94 (1987).
3. Evans, J. D. and Sikdar, S. K.: *CHEMTECH*, January, 38(1990).
4. Swift, G.: Proceedings of the International Symposium on Biodegradable Polymers, Tokyo, Japan, Oct. 29-31, pp. 35-44(1990).
5. Kumar, G. S., Kalpagam, V. and Nandi, U. S.: *J. M. S.-Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **C22**, 225(1982-83).
6. Narayan, R.: Proceedings of the First International Scientific Consensus Workshop on Degradable Materials, Toronto, Canada, Nov. 2-4, pp. 1-10 (1989).
7. Tokiwa, Y.: *工業材料*, **38**, 39(1990).
8. Tokiwa, Y. and Suzuki, T.: *Nature*, **270**, 76(1977).
9. Huang, S. J., Bell, J. P., Knox, J. R., Atwood, H., Bansleben, D., Bitritto, M., Borghard, W., Chapin, T., Leong, K. W., Natarjan, K., Nepumuceno, J., Roby, M., Soboslai, J. and Shoemaker, N.: Proceedings of the 3rd International Biodegradation Symposium, Ed. Sharpley, J. M. and Kaplan, A. M., Appl. Sci. Pub., New York, pp. 731-741(1976).
10. ASTM G21-70, 1989 Annual Book of ASTM Standards, Vol. 8.03.
11. Rhee, Y. H., Lee, J. A., Maeng, P. J. and Jun, C. L.: *Kor. J. Microbiol.*, **28**, 158(1990).
12. Albertsson, A.-C., Andersson, S. O. and Karlsson, S.: *Polym. Deg. Stab.*, **18**, 73(1987).
13. Fields, R. D., Rodriguez, F. and Finn, R. K.: *J. Appl. Polym. Sci.*, **18**, 3571(1974).
14. ASTM G22-76, 1989 Annual Book of ASTM Standards, Vol. 8.03.
15. Goheen, S. M. and Wool, R. P.: *J. Appl. Polym. Sci.*, **42**, 2691(1991).
16. Madder, W. J. and Chapman, G. M.: *Plastics Eng.*, July, 31(1989).
17. Wool, R. P. and Goheen, S. M.: Proceedings of the International Symposium on Biodegradable Polymers, Tokyo, Japan, Oct. 29-31, pp. 137-143(1990).
18. Pitt, C. G., Chasalow, F. I., Hibionada, Y. M., Klimas and Schindler, A.: *J. Appl. Polym. Sci.*, **26**, 3779 (1981).
19. Gonsalves, K. E., Patel, S. H. and Chen, X.: *J. Appl. Polym. Sci.*, **43**, 405(1991).
20. Narayan, R.: Proceedings of the International Symposium on Biodegradable Polymers, Tokyo, Japan, Oct. 29-31, pp. 35-44(1990).
21. Potts, J. E., Clendinning, R. A., Ackart, W. B. and Niegisch, W. D.: "Polymers and Ecological Problems", Plenum Press, New York, pp. 61-79(1973).
22. Goldberg, D., Eaton, R. F. and Rocky, J. F.: Union Carbide Chemicals and Plastics Technology Corporation(1990).
23. Cook, W. J., Cameron, J. A., Bell, J. P. and Huang, S. J.: *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.*, **19**, 159(1981).
24. Tokiwa, Y., Ando, T. and Suzuki, T.: *J. Ferment. Technol.*, **54**, 603(1976).
25. Benedict, C. V., Cook, W. J., Jarrett, P., Cameron, J. A., Huang, S. J. and Bell, J. P.: *J. Appl. Polym. Sci.*, **28**, 327(1983).
26. Tokiwa, Y. and Suzuki, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 265(1977).
27. Huang, S. J.: "Comprehensive Polymer Science", Vol. 6, Ed. Allen, S. G. and Bevington, J. C., Pergamon Press, Oxford, pp. 597-606(1989).
28. Jarrett, P., Benedict, C. V., Bell, J. P., Cameron, J. A. and Huang, S. J.: "Polymers as Biomaterials", Plenum Press, New York, pp. 181-192(1985).