

Alcaligenes sp.에 의한 Poly-β-Hydroxybutyric Acid의 축적

임명순 · 손홍주 · 박수민¹ · 이종근 · 이상준*
부산대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹공과대학 섬유공학과

Accumulation of Poly-β-Hydroxybutyric Acid by *Alcaligenes* sp.

Im, Myung-Soon, Hong-Joo Son, Soo-Min Park¹,
Jong-Kun Lee and Sang-Joon Lee*

Department of Microbiology, ¹Department of Textile Engineering,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract — Microorganisms capable of accumulating poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) were isolated from soil by enrichment culture technique. Among them, the strain designated as FL-027 had high PHB productivity and was identified as *Alcaligenes*. The optimal medium composition for cell growth was 8.0 g/l of fructose and 3.0 g/l of (NH₄)₂SO₄, equivalent to C/N ratio 5.04 at pH 7.0 and 30°C. To investigate the optimal conditions for the PHB accumulation, we divided the process into two stages; the first stage for the growth of the cell in nutrient-rich medium and the second stage for the PHB accumulation in nutrient-deficiency medium. The optimal conditions for PHB accumulation were 8.0 g/l of fructose and 0.25 g/l of (NH₄)₂SO₄, equivalent to C/N ratio 60 at pH 6.5 and 30°C. PHB accumulation was stimulated by deficiency of nutrients such as NH₄⁺, Ca²⁺, SO₄²⁻ in medium. Among them, NH₄⁺-deficiency was chosen because of its effectiveness. We found the inhibition of cell growth by fructose in batch culture. In order to keep the fructose concentration at an optimal level, intermittent feeding fed-batch culture was employed, and the cell concentration as high as 10.83 g/l whose PHB content was responsible for 43% of the dry cell weight. The purified PHB was identified as homopolymer of 3-hydroxybutyric acid by using IR and ¹H-NMR.

석유화학 공업과 합성고분자 공업의 급속한 발달로 인해 수천 종의 합성고분자물질이 생산되고 있으며 현재 이들의 저렴한 생산가격, 가공의 용이성으로 인해 일상생활에서 없어서는 안될 일용품이 되었다. 이러한 석유계 합성고분자는 대부분 생물분해가 일어나지 않는 난분해성 물질로서 사용 후 심각한 환경오염을 발생시키고 있으며, 또한 그 제조과정 중에서도 유해한 오염물질을 배출시키고 있다. 이에 따라 합성고분자 제품을 천연고분자 화합물로 대체하여 산업용 및 일상생활에 사용하려는 연구가 많이 진행되고 있는데 그 중에서 가장 주목을 받고 있는 것이 poly-β-hydroxybutyric acid (PHB)이다.

PHB는 1925년 Lemoigne이 파스퇴르 연구소에서 세포로부터 추출해 낸 이후, 많은 생화학자들에 의해 원핵세균들이 산소 또는 인 등이 결핍된 조건에서 에너지원으로 세포 내에 축적한다(1-4)는 사실이 밝혀졌다. PHB는 생분해성 이외에 생체적합성, 압전성, 기체차단효과와 광학적 활성을 가지며, 3-hydroxybutyrate는 혈액성분의 하나로서 포도당 대신 인체에 투입하여 비만치료의 목적으로도 이용할 수 있기 때문(5-9)에 많은 관심을 끌고 있다.

Dawes 등(10)은 PHB는 원핵세균이 불균형한 영양상태에 있을 때 세포내에 축적되는 지방족 폴리에스터라고 보고했으며, King(9)은 *Alcaligenes eutrophus*가 세포건조중량의 80%까지 PHB를 축적한다고 보고했다. 또한 Doi 등(11-14)은 acetate와 propionate를 기질로 하여 *Alcaligenes eutrophus*로부터

Key words: Poly-β-hydroxybutyric acid (PHB), NH₄⁺-deficiency

*Corresponding author

PHB/HV(hydroxyvaleric acid)의 공중합체를 생산하였고 그 생합성경로에 대하여 연구한 바 있다. 한편 국내의 연구동향을 살펴보면 이 등(15, 16)이 메탄올을 기질로 하여 PHB를 축적하는 *Methylobacterium*을 자연계에서 분리하여 최적 생육조건과 최적 PHB축적조건 및 메탄올 이외의 각종 유기화합물을 탄소원으로 하였을 때의 PHB/HV의 공중합체 축적에 관해 연구하였으며, 유 등(17)은 *Alcaligenes eutrophus*의 생육과 PHB축적에 미치는 포도당과 암모늄농도의 영향에 대해 조사하였다.

본 연구에서는 PHB를 생산하는 미생물을 자연계로부터 분리하여 이들 분리균주 중 PHB생산능이 우수한 균주를 선정하여 그 분류학적 위치 및 균체증식과 PHB발효생산을 위한 최적 배양조건 등을 검토하였다. 또한 생산된 PHB를 추출·정제하여 그 구조를 확인하였다.

재료 및 방법

PHB 생산균의 분리

토양 및 하천 등에서 채취한 물은 1 ml, 토양은 0.5 g씩 취하여 과당을 유일한 탄소원으로 하는 분리용 액체배지 10 ml을 첨가한 시험관에 넣어 30°C에서 30시간 동안 왕복진탕배양(120 rpm, 6 cm stroke 진탕배양기)한 후 과당이 함유된 분리용 고체배지에 도말하여 30°C에서 평판배양하였다. 각각 형태가 다른 콜로니들을 새로운 분리용 고체배지에 도말하여 균주를 순수분리하였다. 순수분리된 각 균주의 PHB 생산여부를 조사하기 위하여 각각을 질소원이 결핍된 배지에 접종하여 48시간 배양 후, gas chromatography(Hewlett Packard 5890)를 이용하여 PHB의 생산여부를 확인하였다. GC를 이용한 PHB의 생산여부는 분리균주가 생산한 polymer와 표준 PHB(Aldrich 제품)의 retention time에 의해 확인하였다. 균주 분리를 위해 실험에 사용한 분리용 배지의 조성은 과당 5.0 g/l, NH₄Cl 0.2 g/l, NaH₂PO₄·12H₂O 4.5 g/l, K₂HPO₄ 1.5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/l, FeSO₄·7H₂O 0.05 g/l, CaCl₂·2H₂O 0.005 g/l, 미량원소 4.0 ml/l (ZnSO₄·7H₂O 200 mg, MnCl₂·4H₂O 60 mg, H₃BO₃ 600 mg, CoCl₂·6H₂O 400 mg, CuSO₄·4H₂O 20 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 60 mg per liter)이었다.

분리균의 분류와 동정

분리균의 형태학적, 배양적, 생화학적 제 성질을

Bradshaw의 방법(18), Philipp 등의 방법(19), Macfaddin의 방법(20)에 준하여 검사한 것을 기초로 하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 제 8판(21)과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1(21)에 따라 분류·동정하였다.

균체생육 최적조건의 검토

분리균의 최적 생육조건을 조사하기 위하여 배지 내에 첨가되는 탄소원 농도별, 질소원 종류별 및 농도별, pH 및 배양온도에 따른 생육도를 spectrophotometer(Shimadzu UV-120-2)를 이용하여 660 nm에서의 흡광도로서 측정하였다.

PHB축적 최적조건의 검토

PHB축적에 영향을 미치는 제반요인과 배양조건을 검토하기 위하여 2단계 배양법을 이용하였다. 즉, 1차 배양조건인 균체생육 최적조건하에서 20시간 진탕배양한 균체를 모아 각종 영양염 결핍, C/N ratio, pH 및 배양온도에 따른 2차 배양을 실시하여 균체내 PHB함량을 조사하였다.

발효조 배양

과당 8.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 3.0 g/l이 함유된 멸균배지 2 l를 포함한 5 l 용량의 발효조(B. Braun, Biostat^R E)를 이용하여 배양온도 30°C, 배양 pH 7.0, 교반속도 300 rpm 및 산소 공급량 1 vvm으로 배양하면서 탄소원과 질소원의 소모량, 생육도 및 PHB축적량을 검토하였다. 탄소원의 소모량은 DNS법(19)으로, 질소원의 소모량은 Indo-phenol법(19)으로 측정하였다. 또한 탄소원의 균체생육 및 PHB축적 억제효과를 방지하기 위하여 간헐적으로 과당을 첨가하면서 유가 배양을 실시하였다.

PHB의 정량분석

먼저 시료의 전처리과정으로 배양액 10 ml을 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 2 ml의 메탄올(3% 황산함유)과 2 ml의 클로로포름을 첨가하고 100°C에서 3시간 방치 후 상온까지 냉각시킨 다음, 증류수 1 ml을 가하여 10분간 강하게 진탕하였다. 두층으로 분리된 액을 수분간 방치한 후, 상층을 제거하고 gas chromatography(GC)로 정량하였다(23). GC기종은 Hewlett-Packard 5890, column은 Carbowax M-20 glass(6 feet)를 사용하였고, carrier gas는 N₂, oven temperature는 150°C, flow rate는 30 ml/min, 시료의 주입

량은 2 μ l였으며, detector는 flame ionization detector (FID)를 사용하였다. 표준 PHB는 Aldrich사 제품을 사용하였다.

PHB의 추출 및 정제

수거한 균체를 증류수 및 아세톤으로 씻고 유효염소 농도 10%의 NaOCl로 용균한 후, 40~60°C의 클로로포름으로 여러번 추출한 PHB 용액에 클로로포름의 1~2배 용량의 메탄올을 가하여 PHB를 선택적으로 침전시켜 여과지(Whatmann filter paper No.1)로 여과하였다(24). 이 과정을 여러 차례 반복하여 얻은 PHB를 건조시켜 PHB 구조확인을 위한 실험에 사용하였다.

PHB의 구조확인

세포내 축적된 PHB의 구조는 IR과 ¹H-NMR을 이용하여 검토하였다.

Infra-Red(IR) spectra : 완전건조된 PHB분말 2 mg과 IR spectroscopic grade KBr 198 mg을 혼합·마쇄하여 10톤의 압력하에서 film을 제조하여(25) NICOLET 5-MX spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.

Nuclear magnetic resonance(NMR) spectra : ¹H-NMR spectra는 PHB를 CDCl₂에 녹여 VARIAN 60 MHz NMR spectrometer로 측정하였고 tetramethyl-

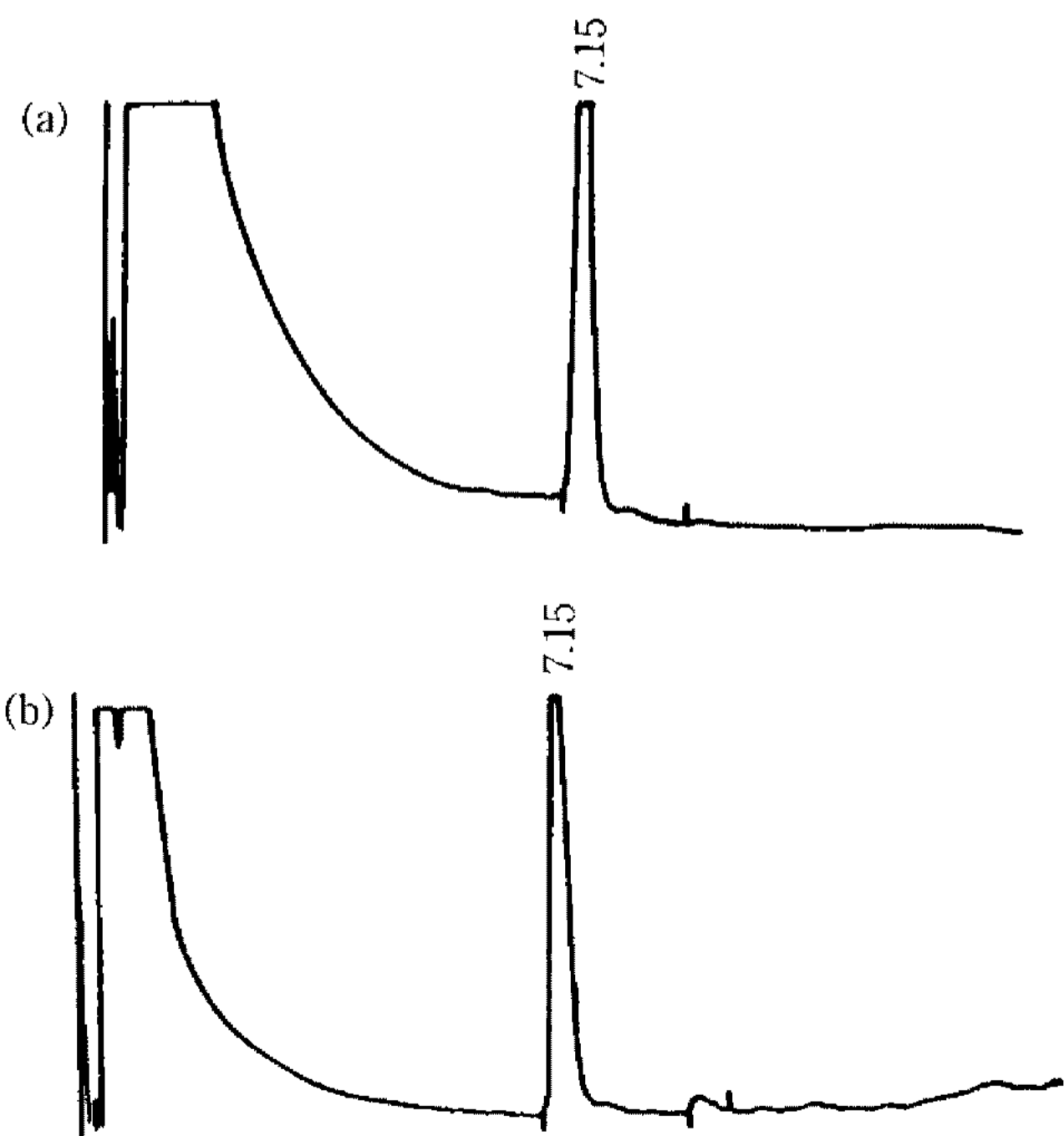


Fig. 1. Gas chromatogram of PHB.
(a) Standard PHB, (b) PHB from *Alcaligenes* sp. FL-027.

silane을 표준물질로 하였다(26).

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

PHB 생산이 확인된 20여 균주를 분리하였으며 이들 중 세포내 PHB축적이 우수한 균주로 FL-027이 선정되었다. 이 균주가 생산한 PHB의 확인은 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 이 균주의 분류학적 위치를 검토한 결과는 Fig. 2 및 Table 1과 같다. 즉, 분리균은 Gram음성균이고 포자를 형성치 않는 화학종속영양균으로 주모에 의한 운동성을 가지며, 또한 탄수화물 발효능은 과당을 제외한 각종 당류에 있어 발효능이 거의 없었다. 이러한 실험결과를 검토한 결과 *Alcaligenes*속으로 동정되었으나 이 속은 종간의 생화학적 제 성질이 유사하기 때문에 유일한 탄소원으로서 탄수화물, 유기산, 아미노산등의 이용성을 검토하여야만 확실한 분류학적 위치의 판정이 가능해지리라 사료된다.

균체생육 최적조건

세포내의 PHB축적을 증가시키기 위해 진행되는 균체의 생육 최적조건을 검토한 결과는 다음과 같다. 탄소원으로서 과당의 농도에 따른 균체의 생육을 조사하기 위해 농도를 0~4.0%로 각각 달리하면서 30°C, 20시간 진탕배양한 결과는 Fig. 3에서 보는 것처럼, 과당의 농도가 0.4%이하에서는 생육이 미약하였고, 0.8%의 농도가 가장 높은 생육을 보였으나 그 이상의 농도에서는 오히려 생육이 저해되었다. 질소원에 따른 영향을 조사하기 위하여 각종 유기 및 무기질소원을 0.1%씩 첨가하여 30°C, 20시간 진탕배양한 결과는 Table 2와 같이 유기질소원들은 무기질소원들보다

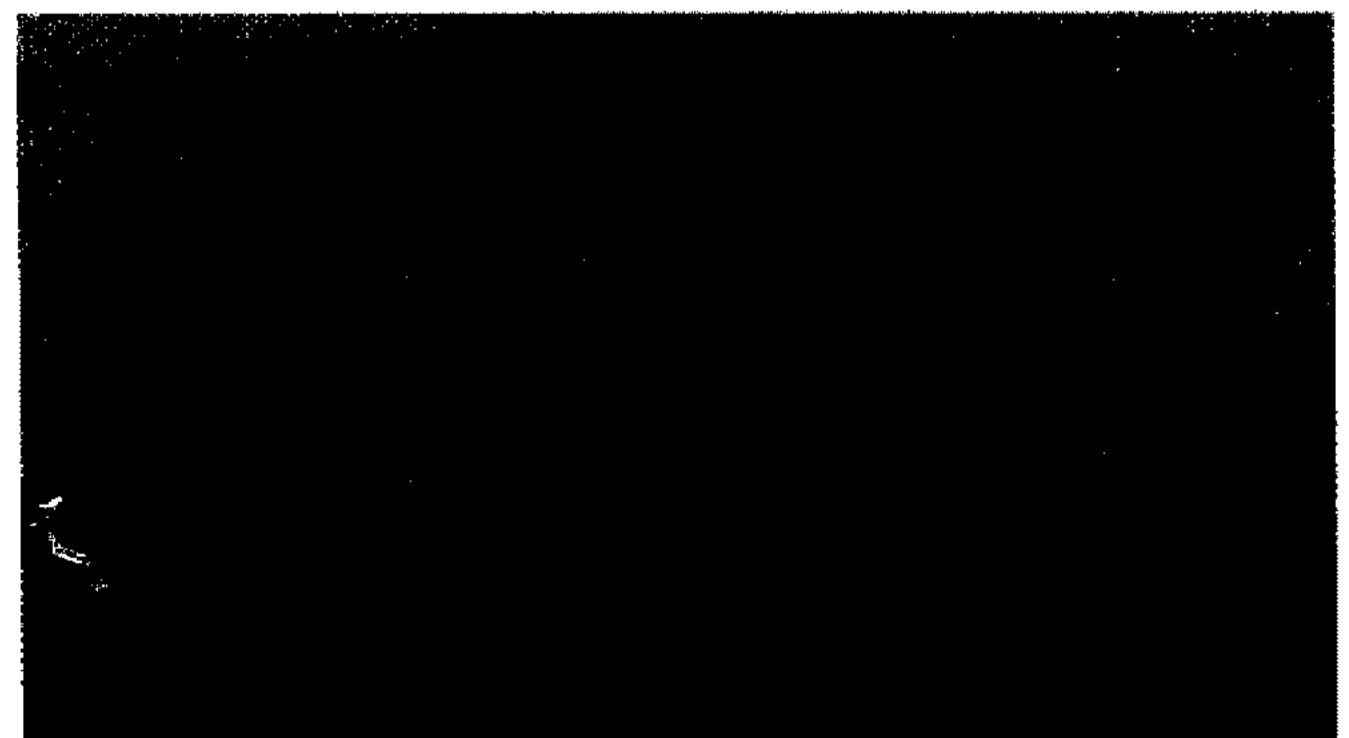


Fig. 2. Photograph of FL-027 strain was stained with Sudan black B.

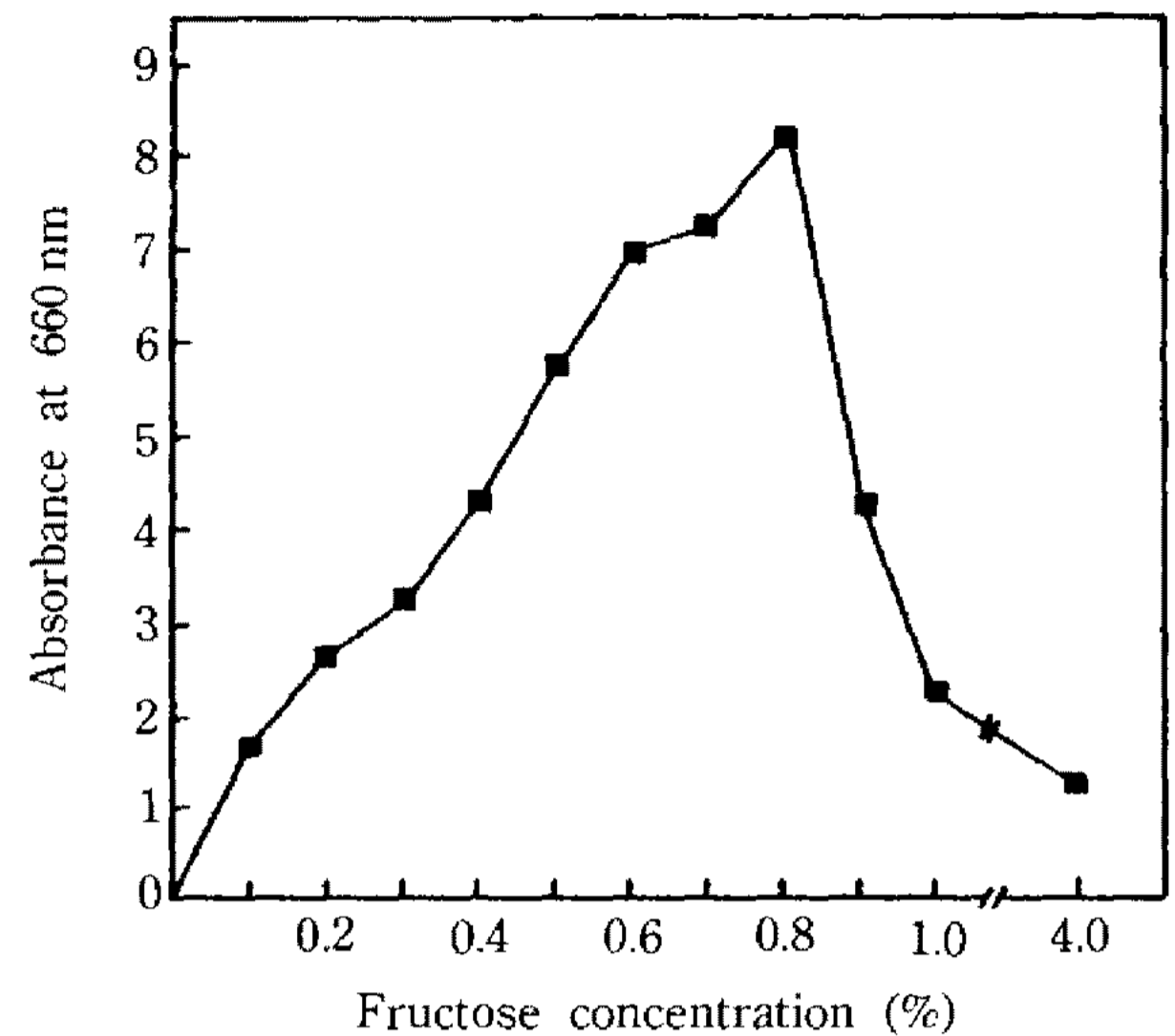
Table 1. Taxonomical characteristics of FL-027 strain

Characteristics	FL-027 strain
Morphological characteristics	
Shape	Rod shape with rounded ends
Cell size(μ)	1.0-1.5 by 3.0-4.6
Motility	Motile by peritrichous flagella
Spore	Non-spore forming
Gram stain	Negative
Cultural characteristics	
Colonies on nutrient agar	Round, entire, convex
Colony surface	Smooth
Colony color	White to pale brown
Hydrolysis of gelatin	Negative
Biochemical characteristics	
Catalase test	Positive
Voges-Proskauer test	Negative
Methyl red test	Negative
Indole test	Negative
Oxidation-fermentation test	Negative
Cytochrome oxidase test	Positive
Simmons citrate test	Positive
Growth on MacConky agar	Positive
Growth on KCN broth	Positive
Growth on SS(salmonella-shigella) agar	Negative
Decarboxylase test:	
Lysine	Negative
Ornithine	Negative
Arginine dehydrolase test	Negative
Urease test	Positive
H ₂ S production	Negative
Starch hydrolysis	Negative
PHB accumulation	Positive

낮은 생육을 보였으며, 무기질소원중 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 가장 높은 생육을 나타내었고 최적농도는 0.3%였다 (Fig.4). 또한 균체생육에 대한 pH와 배양온도를 조사한 결과 pH 7.0(Fig. 5)과 30°C (Fig. 6)에서 최적생육을 나타내었다.

PHB축적 최적조건

PHB축적에 미치는 제반요인을 조사하기 위하여 상기의 균체생육 최적배지에서 1차 배양한 후 균체를 수거하여 각 제반요인에 대한 2차 배양을 실시하였다.

**Fig. 3. Effect of fructose concentration on the growth of *Alcaligenes* sp. FL-027.****Table 2. Effect of nitrogen sources on the growth of *Alcaligenes* sp. FL-027**

Nitrogen source	Growth (O.D. at 660 nm)
None	0.07
NaNO ₂	0.31
NaNO ₃	2.61
NH ₄ Cl	8.56
(NH ₄) ₂ SO ₄	9.56
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4.42
NH ₄ NO ₃	3.97
Bactopeptone	4.10
Polypeptone	5.63
Casamino acid	8.86
Yeast extract	7.53
Malt extract	0.67
Casein	3.88
Lysine	0.89
Asparagine	5.62
Arginine	0.61

각종 영양염의 결핍이 PHB축적에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3에서와 같이 각 영양염이 PHB축적을 향상시켰지만 특히 NH₄⁺가 결핍되었을 때 건조균체량에 대한 PHB축적율이 34%로 가장 높았다. 탄소원과 질소원의 비율이 균체의 PHB축적에 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있는데, 본 분리균의 PHB축적 역시 질소원의 농도에 영향을 받으므로 탄소원인 과당을 최적농도인 0.8%로 고정시키고 (NH₄)₂SO₄의 농도를 0~0.35%까지 조절하여 2차 배양한 결과는

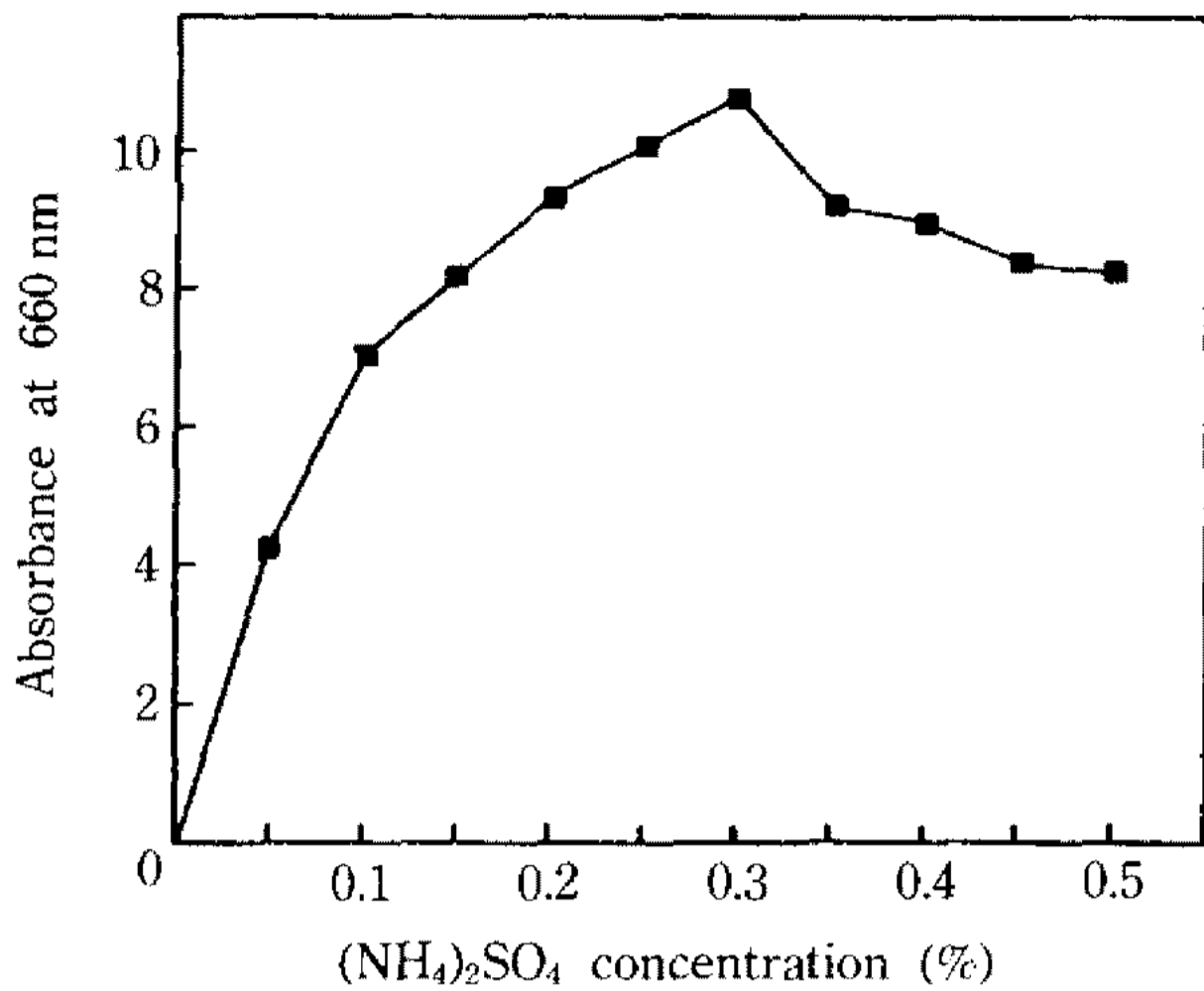


Fig. 4. Effect of concentration of (NH₄)₂SO₄ on the growth of *Alcaligenes* sp. FL-027.

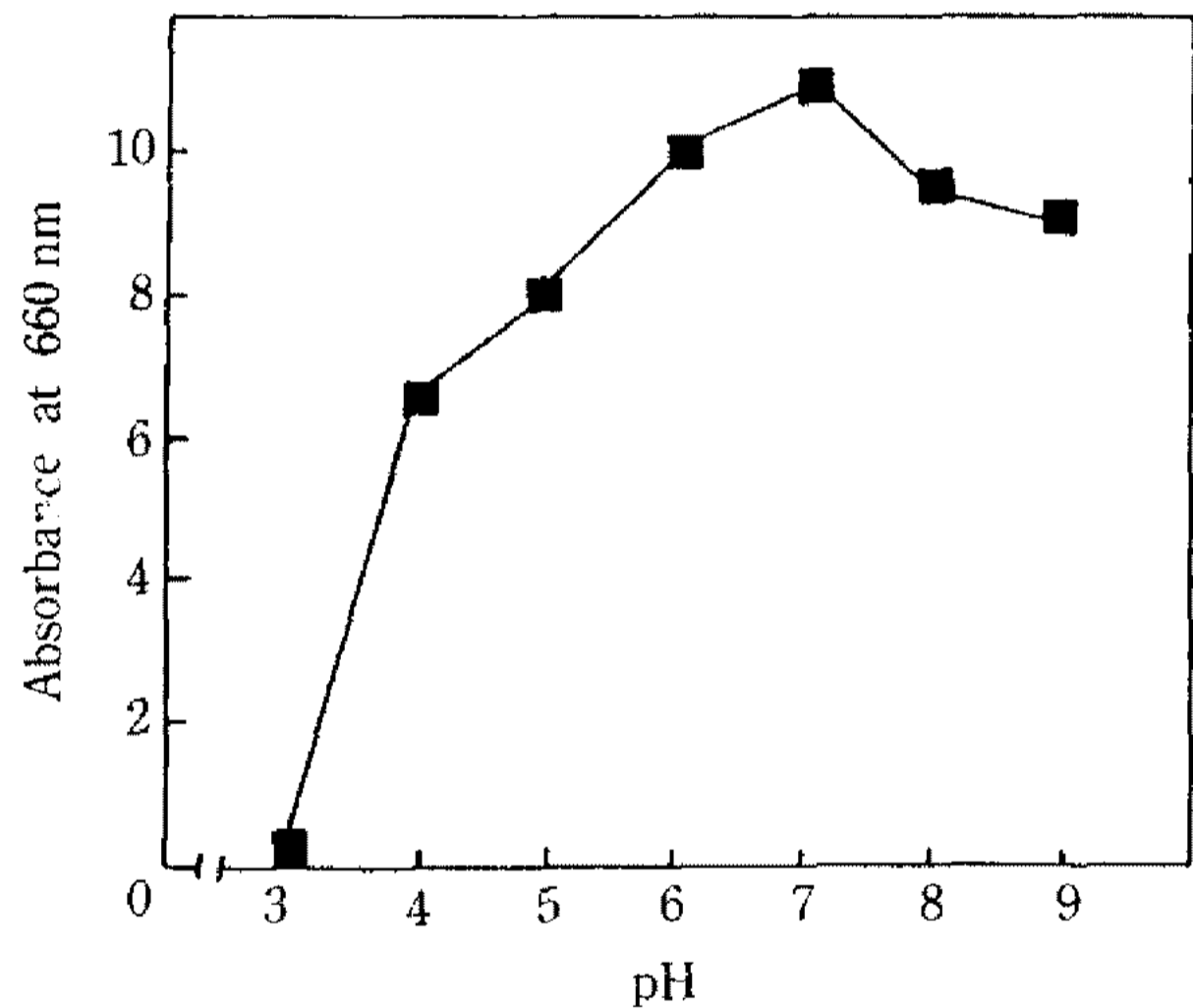


Fig. 5. Effect of pH on the growth of *Alcaligenes* sp. FL-027.

Fig. 7과 같다. 즉 (NH₄)₂SO₄의 농도가 0.3%인 C/N molar ratio가 5.04일 때 균체량이 4.13 g/l로 생육이 가장 좋은 반면, 농도가 0.025%인 C/N molar ratio가 60일 때 PHB축적이 가장 높았다. 이때 2차 배양에서 증식된 균체량은 2.31 g/l으로서 PHB는 건조균체량의 43%였다. 이 결과는 Tal 등(27)과 Suzuki 등(28)이 지적한 바와 같이 C/N molar ratio가 높아질수록 균체생육은 저조하고 PHB축적은 증가한다는 사실과 일치하였다. 이것은 질소원이 제한된 상태에서는 세포내의 pyruvate농도가 정상 생육조건에서보다 높아 acetyl-CoA에 의한 PHB생합성계의 첫 효소인 β-ketothiolase의 활성을 촉진함으로써 PHB가 축적된다는 PHB축적기작을 반영하는 것이라 사료된다. pH와 배양온도에 따른 PHB축적량을 검토한 결과 pH 6.5와

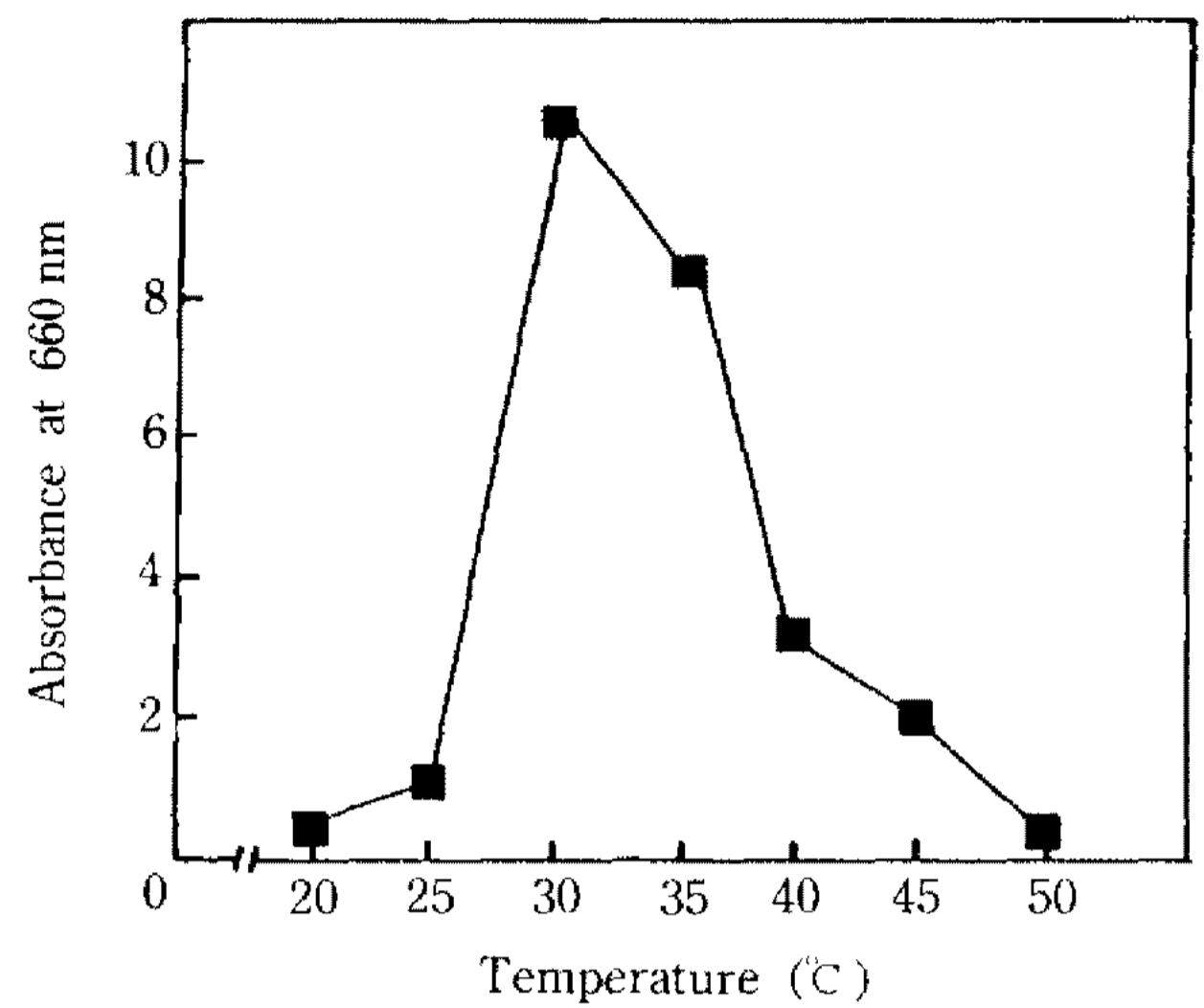


Fig. 6. Effect of temperature on the growth of *Alcaligenes* sp. FL-027.

Table 3. Effect of nutrient-deficiency on cell growth and PHB accumulation in the second stage culture

Deficient nutrient	Dry cell weight(g/l)	Accumulated PHB(g/l)	PHB content* (%)
Ca ²⁺	3.826	0.817	21.35
Na ⁺	3.767	0.752	19.96
K ⁺	3.958	0.745	18.83
SO ₄ ²⁻	1.257	0.362	28.83
NH ₄ ⁺	1.347	0.467	34.68

*Indicated as the percent per dry cell weight.

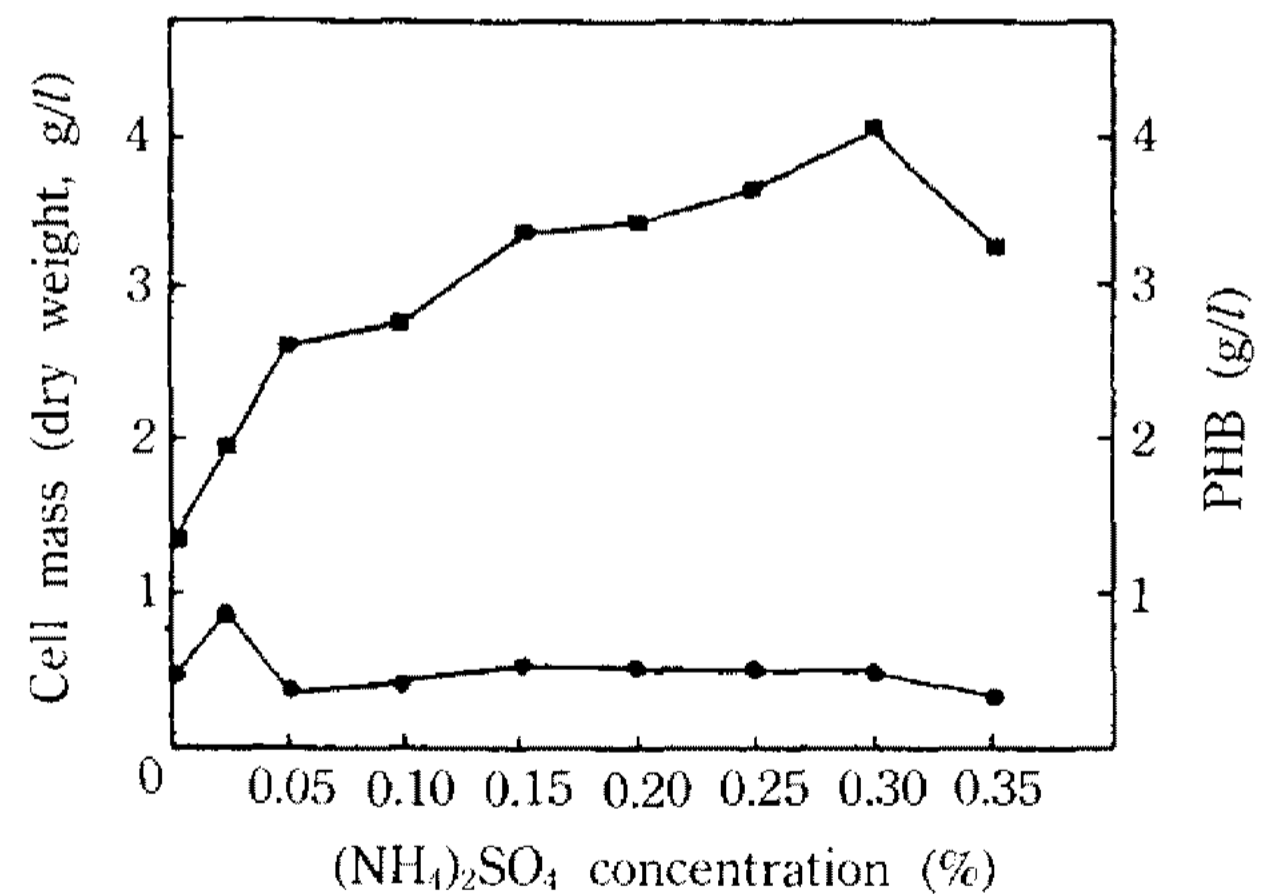


Fig. 7. Effect of concentration of (NH₄)₂SO₄ on the cell growth and PHB accumulation at the second stage of *Alcaligenes* sp. FL-027.

Symbols: —■—, cell mass; —●—, PHB.

30°C에서 가장 좋았다. 이상의 결과에서 고농도의 균체배양 및 PHB축적을 위해서는 회분배양보다는 2단계 유가배양법이 적당함을 알 수 있었다.

발효조 배양

상기의 조건을 바탕으로 발효조에서 회분배양을 실시한 결과는 Fig. 8과 같이 균체집중 후 9시간부터 대수증식기를 나타내어 활발한 성장을 보이다가 18시간 이후부터 정지기를 나타내었다. 유도기와 대수증식기에서 PHB축적은 낮았으며, 18시간 이후 높아졌으나 곧 감소되었다. 이것은 탄소원이 고갈되면서 PHB가 이용되었기 때문이라 사료된다. 간헐적으로 과당을 첨가하면서 유가배양을 실시한 결과는 Fig. 9과 같다. 즉 배양시간 10시간부터 55시간까지는 균체생육을 최대 하기위해 C/N molar ratio를 5.04로 한 배지를 1~2시간간격으로 첨가하였고, 55시간부터 70시간까지는 C/N molar ratio를 60으로 한 배지를 1~2시간간격으로 첨가하여 PHB축적을 유도한 결과 80시간에 균체량은 25.1 g/l였으며 PHB는 10.84 g/l가 생산되어 건조균체량의 43%까지 축적되었다. Suzuki 등(26)은 *methylotrrophus*를 이용하여 149 g/l의 PHB를, 이 등(15)은 *Methylobacterium*을 이용하여 5.5 g/l의 PHB를 축적했다고 보고하였다. 본 연구의

결과는 PHB축적에 있어 다소 우수한 결과를 얻었으나 탄소원인 과당의 경제적 요건과 외국에 비해 매우 낮은 PHB축적을 등을 고려할 때 다양한 탄소원의 이용성 및 유가배양조건의 최적화를 위한 추가적인 연구가 뒤따라야 PHB축적이 더욱 개선될 수 있을 것으로 사료된다. 회분배양과 유가배양에 따른 결과를 Table 4에서와 같이 비교한 결과 유가배양이 균체량과 PHB축적량이 많았으나 기질의 이용면에서는 다소 효과적이지 못했다.

PHB의 구조확인

본 분리균에 의해 생성된 PHB의 구조는 IR과 ¹H-NMR를 이용하여 검토되었다. IR로 분석한 spect-

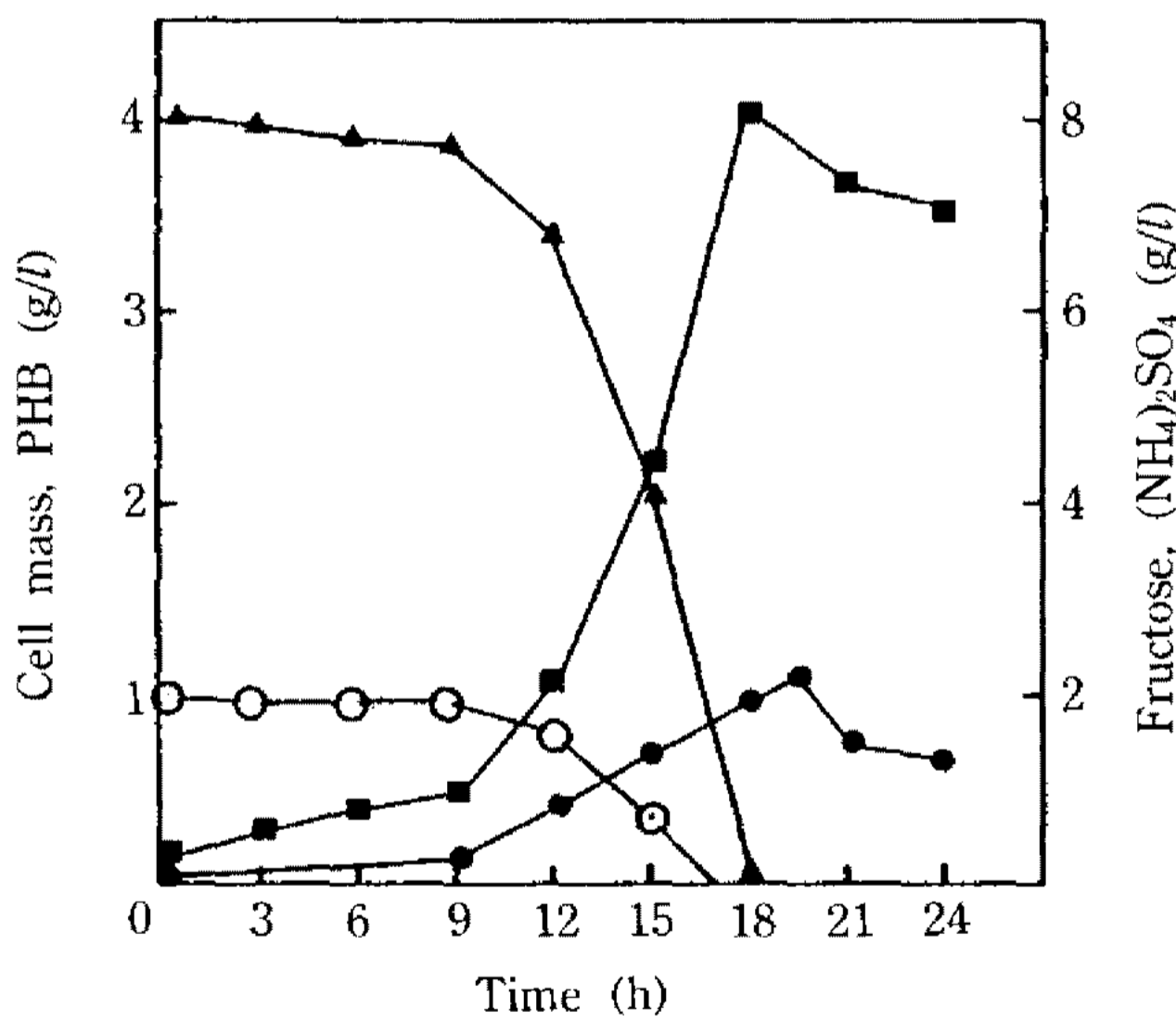


Fig. 8. Time course of batch culture of *Alcaligenes* sp. FL-027.
 Symbols: —■—, cell mass; —●—, PHB; —▲—, fructose; —○—, (NH₄)₂SO₄.

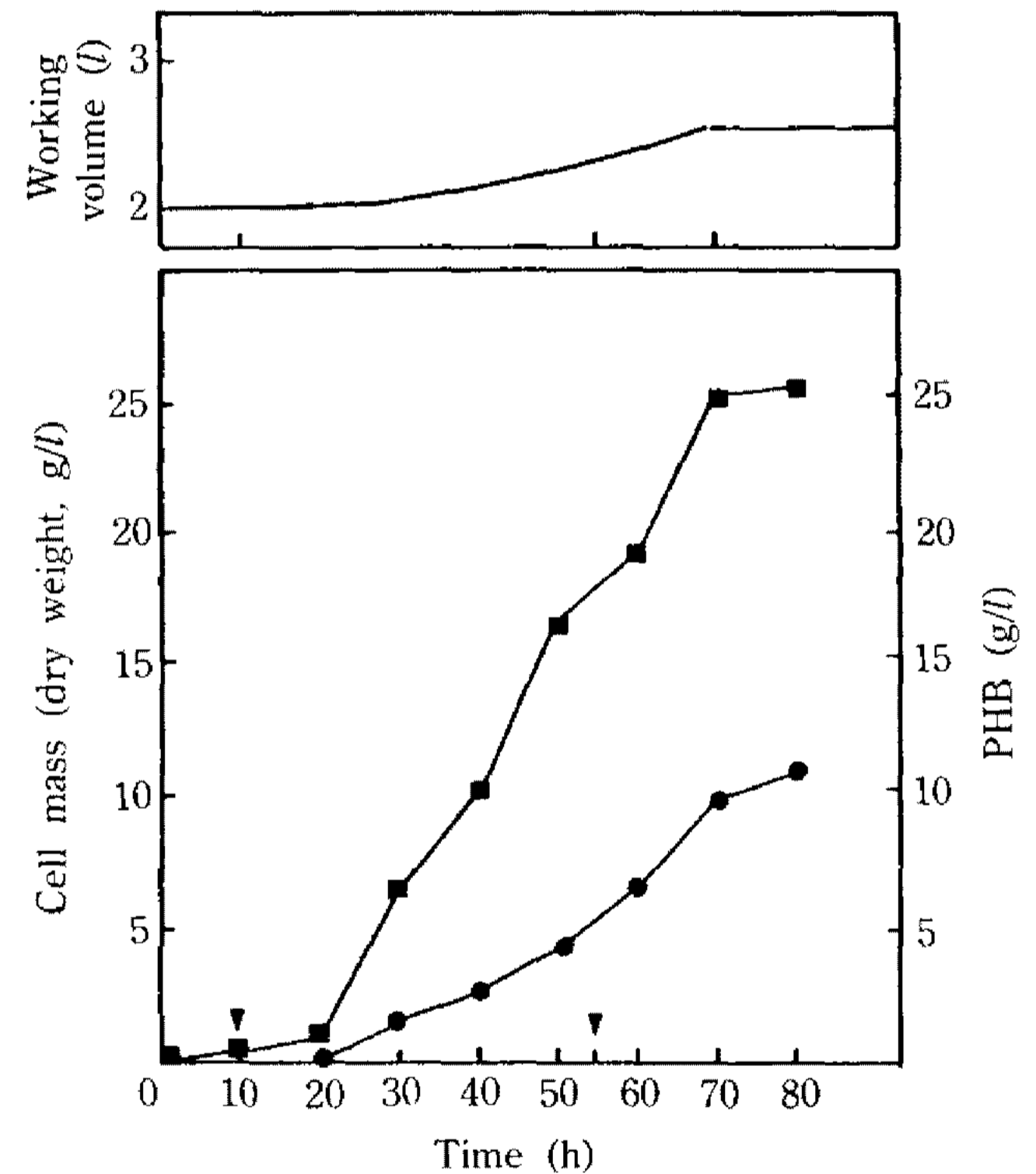


Fig. 9. Changes of cell growth and amount of PHB during intermittent feeding fed-batch culture.
 Symbols: —■—, cell mass; —●—, PHB; ▼, primary feeding (C/N ratio: 5.1), secondary feeding (C/N ratio 50.8).

Table 4. Comparison of cell mass and PHB yield between batch and fed-batch cultures

	Cell mass (g/l)	PHB (g/l)	PHB (%)	Y _{x/s} *	Y _{p/s} **	Culture time(h)
Batch	3.83	1.02	26.6	0.47	0.13	20
Fed-batch	25.10	10.84	43.2	0.18	0.08	72

*Y_{x/s}: yield coefficient for cells on carbon substrate
 **Y_{p/s}: yield coefficient for product on carbon substrate

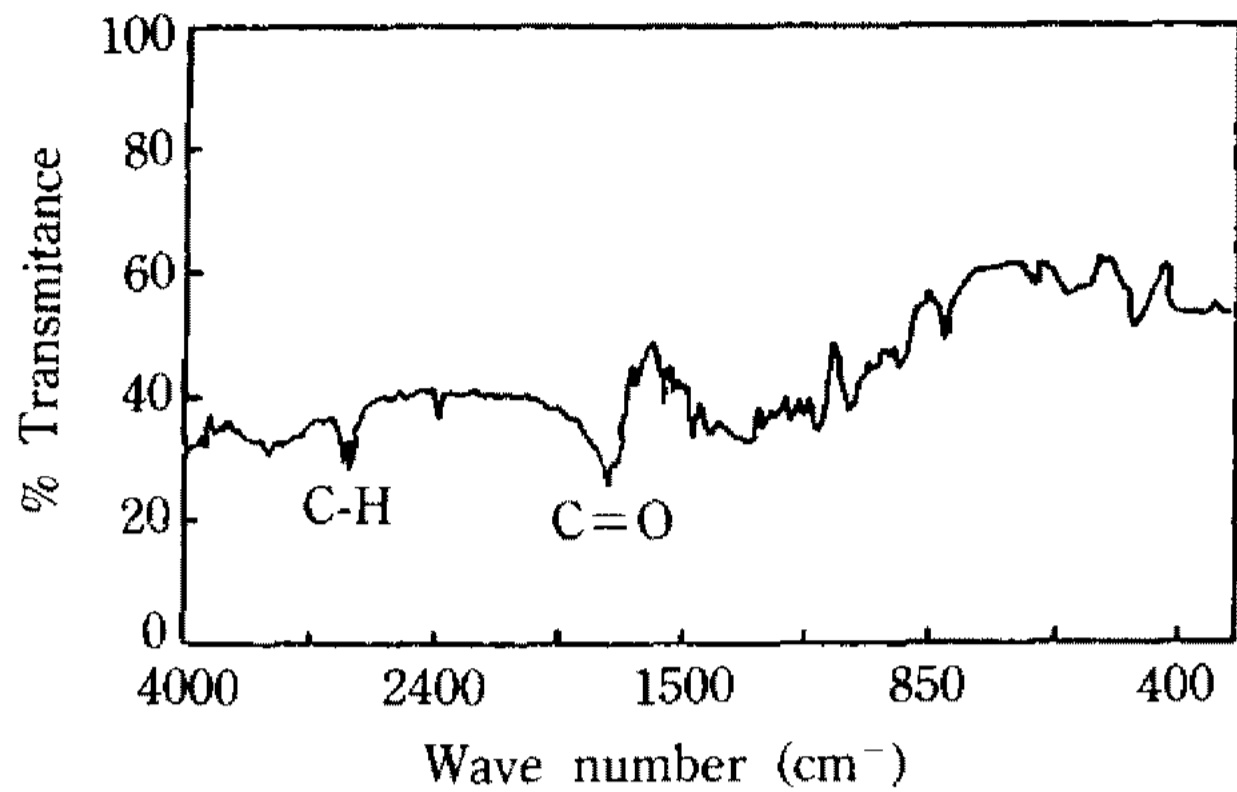


Fig. 10. Infra-red spectrum of PHB from *Alcaligenes* sp. FL-027.

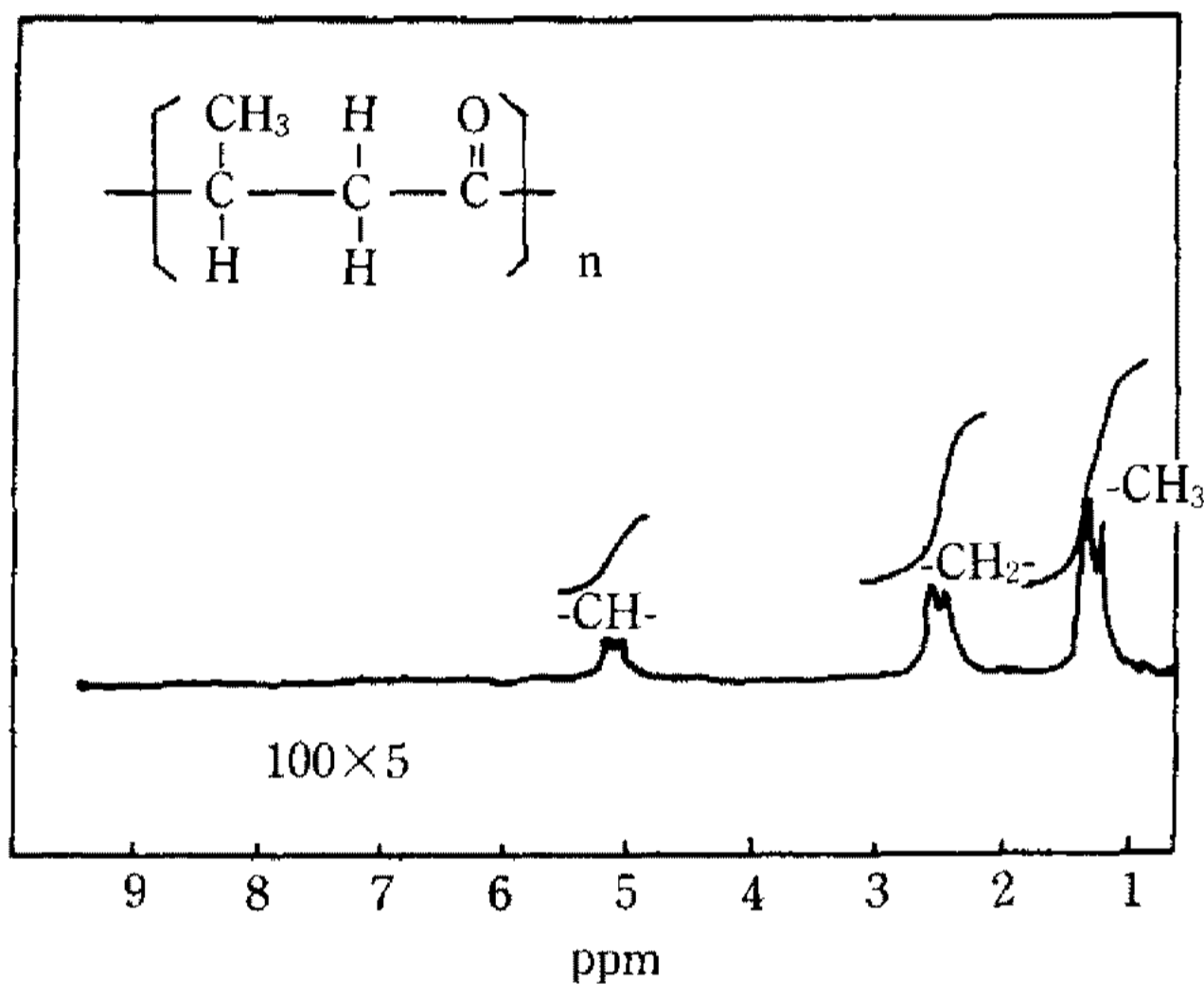


Fig. 11. 60-MHz ¹H-NMR spectrum of PHB from *Alcaligenes* sp. FL-027.

은 Fig. 10과 같이 1700 cm⁻¹ 부근에서 -C=O-의 흡수band가, 3000 cm⁻¹ 부근에서 C-H의 흡수band가 나타나 이들이 존재함을 알았다. 또한 ¹H-NMR로 분석한 spectrum은 Fig. 11과 같이 PHB의 -CH-, -CH₂-, -CH₃ group을 보여주는 3개의 peak가 5, 2.5, 1.4 ppm에서 각각 나타났다. 따라서 본 분리균에 의하여 분리·정제된 PHB는 표준 PHB의 각 functional group들과 조성이 일치하므로 3-hydroxybutyric acid의 homopolymer임을 알 수 있었다.

요 약

토양으로부터 PHB 생산능이 우수한 균주 FL-027을 분리하여 분류학적 제 특성을 검토한 결과 *Alcaligenes*속으로 동정되었다. *Alcaligenes* sp.의 최적생육 조건은 과당 8.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 3.0 g/l(즉 C/N molar ratio가 5.04) 및 pH 7.0과 30°C 였으며, PHB축적은

과당 8.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 0.25 g/l(즉 C/N molar ratio가 60) 및 pH 6.5와 30°C 에서 가장 양호하였다. NH₄⁺, Ca²⁺, SO₄²⁻의 결핍이 PHB축적을 촉진하였으나 이들 중 NH₄⁺가 가장 효과적으로 PHB축적을 유도하였다. 고농도배양을 위해 과당을 간헐적으로 첨가하여 최적농도로 유지하면서 유가배양을 실시한 결과 균체량은 25.1 g/l, PHB축적량은 10.84 g/l로 전조균체량의 43%까지 축적되었다. 분리정제된 PHB를 IR 및 ¹H-NMR로 분석한 결과 3-hydroxybutyric acid의 homopolymer임을 알 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 1990년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술조성비(Bioplastics 개발에 관한 연구)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Dawes, E.A. and P.J. Senior. 1973. Poly-β-hydroxybutyrate. *Adv. Microbiol. Physiol.* **10**: 203-258.
2. Lafferty, R. M., B. Korsatko, and W. Korsatko. 1988. Microbial production of poly-β-hydroxybutyric acid. *Biotechnol.* **6b**: 136-176.
3. Schlegel, H. G., G. Gottschalk, and R. Bartha 1961. Formation and utilization of poly-β-hydroxybutyrate by Knallgas bacteria(*Hydrogenomonas*). *Nature* **191**: 463-465.
4. Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganism: technology and economics, *Trend in Biotechnol.* **5**: 461-465.
5. 유영제. 1988. 미생물 biopolymer의 개발. *산업과 미생물* **4**: 17-21.
6. Griffin, M. and A.N. Magor. 1986. Possible uses of microorganisms in the manufacture of plastics and synthetic fibres. *Biotechnology and Genetic Engineering Review* **4**: 263-290.
7. Holmes, P.A. 1985. Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys. Technol.* **16**: 32-36.
8. Holwell, E.R. 1982. Opportunities in biotechnology for the chemical industry. *Chemistry and Industry* **7**: 598-511.
9. Nigel, B. U. 1986. Polyhydroxybutyrate: a commercial challenge. *Biotechnol.* **86**: 171-177.
10. Alistair, J. A. and E. A. Dawes. 1990. Occurance, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Microbial Rev.* **54**:450-427.

11. Doi, Y., M. Kumioka, Y. Nakamura, and K. Soga. 1986. Biosynthesis of polyesters by *Alcaligenes eutrophus*: incorporation of ^{13}C -labeled acetate and propionate. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1696-1697.
12. Doi, Y., M. Kumioka, Y. Nakamura, and K. Soga. 1986. Nuclear magnetic resonance studies on poly(β -hydroxybutyrate) and copolyester of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H-16. *Macromolecules* **19**: 2860-2864.
13. Doi, Y., M. Kumioka, Y. Nakamura, and K. Soga. 1987. Biosynthesis of unusual copolyester(10 mol% 3-hydroxybutyrate and 90 mol% 3-hydroxyvalerate unit) in *Alcaligenes eutrophus* from penta-noic acid. *J. Chem. Soc. Chem.* 1635-1636.
14. Doi, Y., M. Kumioka, Y. Nakamura, and K. Soga. 1989. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H-16 from ^{13}C -labeled acetate and propionate. *Macromolecules* **20**: 2988-2991.
15. 이용현, 송미연, 이호재. 1990. 분홍색 통성 메탄올 자화세균이 생산하는 poly- β -hydroxybutyrate. *산업미생물학회지* **18**: 273-279.
16. 이용현, 이호재, 박진서. 1991. *Methylobacterium* sp. GL-10이 생산하는 3-hydroxybutyrate와 3-hydroxyvalerate의 copolyester. *산업미생물학회지* **19**: 94-99.
17. 유영제, 이용우. 1990. *Alcaligenes eutrophus* 균주의 성장과 poly- β -hydroxybutyrate 합성에 미치는 포도당과 암모늄농도의 영향. *산업미생물학회지* **18**: 607-612.
18. Bradshaw, L.J. 1979. *Laboratory Microbiology*, 3rd ed. W.B. Saunde Company, Philadelphia.
19. Philipp, G. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington D.C.
20. Macfaddin, J.F. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
21. Buchman, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
22. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, 9th ed. Williams and Wilkins Co.
23. Braunegg, G., B. Sonnleitener and R.M. Lafferty. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 29-37.
24. Stageman, T.F. 1983. *European Patent Application*, **124**: 309-326.
25. Bloembergen, S. and D.A. Holden. 1986. Studies of composition and crystallinity of bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β hydroxyvalerate). *Macromolecules* **19**: 2865-2871.
26. Bluhum, T.L., G.K. Hamer, and R.M. Marchessaul. 1986. Isodimorphism in bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β hydroxyvalerate). *Macromolecules* **19**: 2872-2876.
27. Tal, S. and Y. Okon. 1985. Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* **31**: 608-613.
28. Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizu. 1986. Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- β -hydroxybutyric acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 366-369.

(Received May 15, 1992)