

酸類基質對 *Alcaligenes eutrophus* 生產 PHBV 組成影響之研究 = effect of organic acid substrates on the composition of poly(hyd)

陳怡如、涂瑞澤；洪淑嫻

E-mail: 9019869@mail.dyu.edu.tw

摘要

PHBV (poly-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) 是一種由微生物所產生之酯類共聚物，其物理特性與聚丙烯 (polypropylene) 相仿，可應用目前習用之高分子加工程序成型，適用的範圍相當廣泛。因 PHBV 具有生物可分解之特性，在環保意識高漲的今日，其應用更具有意義。本實驗以 *Alcaligenes eutrophus* (現改名為 *Ralstonia eutropha*) 為實驗菌株，經二次活化與預培養後，固定溫度 (26 °C)、pH 值 (7) 及轉速 300 rpm 以發酵槽進行約 70 h 的實驗，在不同時間饋料丙酸鈉或戊酸鈉進行批次發酵培養，探討菌體生長、PHBV 累積、碳源及氮源變化情形。由實驗結果得知，無論饋料丙酸鈉或戊酸鈉培養，菌體生長速率、菌體濃度及 PHBV 含量由高至低依次為後期、中期，最後是前期饋料。菌體中 HB : HV 的莫耳百分比的含量比較，丙酸鈉饋料培養，HB 的莫耳百分比由高至低排列結果，分別是前、中及後期，顯示在前期饋料丙酸鈉培養下 HV 的含量最高；以戊酸鈉饋料培養，中期與後期的 HB 也比前期高，中期與後期饋料的 HB 比例相當。因此若要得到較高的 HV 百分比的產物，則以前期饋料有機酸為佳。前期饋料在發酵早期就有 HV 生產，且 HV 含量都高於 HB，在三種不同時間饋料有機酸發酵比較下，能得到較高 HV 百分比。在葡萄糖平均比消耗速率方面，饋料丙酸鈉由高至低的順序分別是前、後及中期；以戊酸鈉饋料是後、中及前期。葡萄糖平均比消耗速率值越高，表示每克淨菌體要消耗更多的葡萄糖，影響葡萄糖平均比消耗速率因素有：饋料有機酸對菌體生長的影響與用於累積 HB 或增殖菌數的能量代謝使用上，因此饋料丙酸鈉與戊酸鈉之間不呈規則排列。綜合比較三槽，有二個時期葡萄糖的比消耗速率較高，其一是進入生長期時葡萄糖快速消耗，其二是氮源消耗完後數小時，是 PHBV 大量累積期，因此這兩個時間葡萄糖的比消耗速率最高。在丙酸鈉與戊酸鈉平均比消耗速率方面，由高至低的順序都是前、中及後期。表示前期饋料對菌體而言是有毒害的，因此前期饋料有機酸對菌體生長速率有影響。但只要饋料濃度控制得當，有機酸是累積 HV 的良好碳源，戊酸鈉饋料濃度要比丙酸鈉濃度更低。戊酸鈉與丙酸鈉饋料比較而言，戊酸鈉比消耗速率比丙酸鈉大，因此饋料戊酸鈉較丙酸鈉有較高的 PHBV 含量與 HV 莫耳百分比，顯示在生產 PHBV 效益上 戊酸鈉較丙酸鈉有效，然如前面所強調，饋料戊酸鈉時，其濃度應有適當的控制。

關鍵詞：PHBV；批次發酵培養；丙酸鈉；戊酸鈉；比生長速率；比消耗速率

目錄

封面內頁 頁次 簽名頁 授權書1.....	iii
中文摘要.....	iv
英文摘要.....	vi
誌謝.....	viii
目錄.....	ix
圖目錄.....	xiii
表目錄.....	xv
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
2.1 生物分解性塑膠背景.....	3
2.2 PHB與PHBV簡介.....	5
2.2.1 合成.....	5
2.2.2 物性.....	8
2.2.3 價格.....	10
2.2.4 應用情形.....	12
2.2.5 台灣分解性塑膠之研發.....	13
2.3 微生物的代謝作用.....	15
2.3.1 一次代謝的生合成.....	15
2.3.2 二次代謝的生合成.....	15
2.3.3 微生物生長和產物形成的關係.....	17
2.4 PHB(V)的代謝過程.....	18
2.5 PHB(V)製法.....	24
2.5.1 菌種.....	24
2.5.2 基質.....	26
2.5.3 生產技術.....	28
2.5.4 產品回收.....	31
2.5.4.1 溶劑法.....	31
2.5.4.2 非溶劑法.....	32
2.5.5 PHB(V)測定.....	32
2.5.5.1 GC測定法.....	33
2.5.5.2 NMR測定法.....	34
2.6 發酵槽簡介.....	36
2.6.1 發酵槽硬體結構.....	36
2.6.2 發酵槽滅菌.....	39
第三章 丙酸鈉在不同饋料時間對 <i>Ralstonia eutropha</i> 生產 PHBV 之影響.....	42
3.1 前言.....	42
3.2 材料與方法.....	44
3.2.1 實驗材料.....	45
3.2.1.1 菌株.....	45
3.2.1.2 培養基.....	45
3.2.1.3 儀器設備.....	46
3.2.1.4 藥品.....	47
3.2.2 培養條件.....	47
3.2.2.1 活化.....	47
3.2.2.2 預培養.....	48
3.2.2.3 發酵槽培養.....	48
3.2.3 分析方法.....	50
3.2.3.1 菌體量.....	50
3.2.3.2 葡萄糖消耗量.....	50
3.2.3.3 氮源消耗量分析.....	51
3.2.3.4 PHBV分析.....	52
3.3 結果與討論.....	54
3.3.1 前期饋料丙酸鈉的批次發酵.....	54
3.3.1.1 菌體生長、葡萄糖、丙酸鈉及氮源.....	54

PHBV的生產.....	58	3.3.2中期饋料.....	62	3.3.2.1菌體生長、葡萄糖、丙酸鈉及氮源.....	68
源.....	62	3.3.2.2 PHBV的生產.....	66	3.3.3 後期饋料.....	68
葡萄糖、丙酸鈉及氮源.....	68	3.3.3.2 PHBV的生產.....	72	3.3.4 不同時期饋料丙酸鈉的比較.....	74
較.....	74	第四章 丁酸饋料對 <i>Ralstonia eutropha</i> 生產PHBV之影響.....	77	4.1 前言.....	77
言.....	77	4.2 材料與方法.....	80	4.2.1 實驗材料.....	80
4.2.2 培養條件.....	82	4.2.3 分析方法.....	85	4.3 結果與討論.....	89
論.....	89	4.3.1前期饋料.....	89	4.3.1.1 菌體生長、葡萄糖、戊酸鈉及氮源.....	90
源.....	90	4.3.1.2 PHBV分析.....	94	4.3.2中期饋料.....	98
糖、戊酸鈉及氮源.....	98	4.3.2.2 PHBV的生產.....	101	4.3.3 後期饋料.....	104
4.3.3.1 菌體生長、葡萄糖、戊酸鈉及氮源.....	104	4.3.3.2 PHBV的生產.....	108	4.3.4 不同時期饋料戊酸鈉之比較.....	111
之比較.....	111	第五章 結論與未來展望.....	114	5.1 結論.....	114
5.2 未來展望.....	116	參考文獻.....	119	附錄.....	127
錄.....	127	圖目錄		圖 2-1 不同碳源生產PHA的合成代謝路徑.....	21
Alcaligenes eutrophus生產PHA的合成與降解代謝路徑.....	22	圖 2-2		圖 2-3 由Alcaligenes eutrophus生產PHBV的合成路徑.....	23
圖 3-1 取樣分析流程圖.....	44	圖 3-2 前期饋料丙酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線圖.....	55	圖 3-3前期饋料丙酸鈉的批次發酵下，菌體量、葡萄糖、丙酸鈉與氮源濃度對時間之關係圖.....	56
圖 3-2 前期饋料丙酸鈉的批次發酵下，菌體量、葡萄糖、丙酸鈉與氮源濃度對時間之關係圖.....	59	圖 3-4前期饋料丙酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	59	圖 3-5 前期饋料丙酸鈉的批次發酵下，菌體量、淨菌體、PHBV、HB及HV 含量對時間之關係圖.....	61
圖 3-3 前期饋料丙酸鈉的批次發酵下，菌體量、淨菌體、PHBV、HB及HV 含量對時間之關係圖.....	61	圖 3-6 中期饋料丙酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	63	圖 3-7中期饋料丙酸鈉的批次發酵下，葡萄糖、丙酸鈉與氮源濃度對時間之關係圖.....	64
圖 3-4 前期饋料丙酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	65	圖 3-8中期饋料丙酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	65	圖 3-9中期饋料丙酸鈉的批次發酵下，菌體量、淨菌體、PHBV、HB及HV含量對時間之關係圖.....	67
圖 3-5 前期饋料丙酸鈉的批次發酵下，菌體量、淨菌體、PHBV、HB及HV 含量對時間之關係圖.....	67	圖 3-10 後期饋料丙酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	69	圖 3-11後期饋料丙酸鈉的批次發酵下葡萄糖、丙酸鈉與氮源濃度對時間之關係圖.....	70
圖 3-6 中期饋料丙酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	63	圖 3-12後期饋料丙酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	71	圖 3-13 後期饋料丙酸鈉的批次發酵下菌體量、淨菌體、PHBV、HB、HV含量對時間之關係圖.....	73
圖 3-7 中期饋料丙酸鈉的批次發酵下，葡萄糖、丙酸鈉與氮源濃度對時間之關係圖.....	64	圖 4-1 PHA之一般化學式與代表意義.....	79	圖 4-2 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	90
圖 3-8 中期饋料丙酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	65	圖 4-2 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	90	圖 4-3 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下，菌體量、葡萄糖、戊酸鈉與氮源濃度對時間之關係圖.....	91
圖 3-9 中期饋料丙酸鈉的批次發酵下，菌體量、淨菌體、PHBV、HB及HV 含量對時間之關係圖.....	67	圖 4-3 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下，菌體量、葡萄糖、戊酸鈉與氮源濃度對時間之關係圖.....	91	圖 4-4前期饋料戊酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	95
圖 3-10 後期饋料丙酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	69	圖 4-4 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	95	圖 4-5 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度、淨菌體、PHBV、HB、HV對時間之關係圖.....	96
圖 3-11 後期饋料丙酸鈉的批次發酵下葡萄糖、丙酸鈉與氮源濃度對時間之關係圖.....	70	圖 4-5 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度、淨菌體、PHBV、HB、HV對時間之關係圖.....	96	圖 4-6 中期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	98
圖 3-12 後期饋料丙酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	71	圖 4-6 中期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	98	圖 4-7中期饋料戊酸鈉的批次發酵下，菌體量、葡萄糖、戊酸鈉與氮源濃度對時間之關係圖.....	100
圖 3-13 後期饋料丙酸鈉的批次發酵下菌體量、淨菌體、PHBV、HB、HV含量對時間之關係圖.....	73	圖 4-7 中期饋料戊酸鈉的批次發酵下，菌體量、葡萄糖、戊酸鈉與氮源濃度對時間之關係圖.....	100	圖 4-8中期饋料戊酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	102
圖 4-1 PHA之一般化學式與代表意義.....	79	圖 4-8 中期饋料戊酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	102	圖 4-9 中期饋料戊酸鈉的批次發酵下，菌體量、淨菌體、PHBV、HB及HV 含量對時間之關係圖.....	103
圖 4-2 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	90	圖 4-9 中期饋料戊酸鈉的批次發酵下，菌體量、淨菌體、PHBV、HB及HV 含量對時間之關係圖.....	103	圖 4-10 後期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	105
圖 4-3 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下，菌體量、葡萄糖、戊酸鈉與氮源濃度對時間之關係圖.....	91	圖 4-10 後期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	105	圖 4-11後期饋料戊酸鈉的批次發酵下，菌體量、葡萄糖、戊酸鈉及氮源濃度對時間之關係圖.....	106
圖 4-4 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	95	圖 4-11 後期饋料戊酸鈉的批次發酵下，菌體量、葡萄糖、戊酸鈉及氮源濃度對時間之關係圖.....	106	圖 4-12 後期饋料戊酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	107
圖 4-5 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度、淨菌體、PHBV、HB、HV對時間之關係圖.....	96	圖 4-12 後期饋料戊酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	107	圖 4-13 後期饋料戊酸鈉的批次發酵下，淨菌體、PHBV、HB及HV含量對時間之關係圖.....	110
圖 4-6 中期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	98	圖 4-13 後期饋料戊酸鈉的批次發酵下，淨菌體、PHBV、HB及HV含量對時間之關係圖.....	110	表目錄	
圖 4-7 中期饋料戊酸鈉的批次發酵下，菌體量、葡萄糖、戊酸鈉與氮源濃度對時間之關係圖.....	100	表 2-1 不同菌種所生產 PHB 平均分子量.....	10	表 2-1 不同菌種所生產 PHB 平均分子量.....	10
圖 4-8 中期饋料戊酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	102	表 2-2 商業化的生物分解塑膠.....	12	表 2-2 商業化的生物分解塑膠.....	12
圖 4-9 中期饋料戊酸鈉的批次發酵下，菌體量、淨菌體、PHBV、HB及HV 含量對時間之關係圖.....	103	表 2-3 各國生物分解性塑膠的應用情形.....	14	表 2-3 各國生物分解性塑膠的應用情形.....	14
圖 4-10 後期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	105	表 2-4 各種可生產PHB的微生物.....	25	表 2-4 各種可生產PHB的微生物.....	25
圖 4-11 後期饋料戊酸鈉的批次發酵下，菌體量、葡萄糖、戊酸鈉及氮源濃度對時間之關係圖.....	106	表 2-5 基質、PHB收率和生產PHBV之基質成本.....	28	表 2-5 基質、PHB收率和生產PHBV之基質成本.....	28
圖 4-12 後期饋料戊酸鈉的批次發酵下淨菌體濃度對時間指數關係圖.....	107	表 2-6 不同4-羥基烷類標準品、 γ -內酯、及含4-羥基烷類為單體組成的純化PHA.....	35	表 2-6 不同4-羥基烷類標準品、 γ -內酯、及含4-羥基烷類為單體組成的純化PHA.....	35
圖 4-13 後期饋料戊酸鈉的批次發酵下，淨菌體、PHBV、HB及HV含量對時間之關係圖.....	110	表 3-1 前期饋料丙酸鈉的批次發酵下不同階段的比消耗速率與比生產速率.....	58	表 3-1 前期饋料丙酸鈉的批次發酵下不同階段的比消耗速率與比生產速率.....	58
表目錄		表 3-2 中期饋料丙酸鈉的批次發酵下不同階段的比消耗速率與比生產速率.....	66	表 3-2 中期饋料丙酸鈉的批次發酵下不同階段的比消耗速率與比生產速率.....	66
表 2-1 不同菌種所生產 PHB 平均分子量.....	10	表 3-3 後期饋料丙酸鈉的批次發酵下不同階段的比消耗速率與比生產速率.....	72	表 3-3 後期饋料丙酸鈉的批次發酵下不同階段的比消耗速率與比生產速率.....	72
表 2-2 商業化的生物分解塑膠.....	12	表 3-4 不同時期饋料丙酸鈉重要實驗結果的比較.....	76	表 3-4 不同時期饋料丙酸鈉重要實驗結果的比較.....	76
表 2-3 各國生物分解性塑膠的應用情形.....	14	表 4-1 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下不同階段的比消耗速率與比生產速率.....	93	表 4-1 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下不同階段的比消耗速率與比生產速率.....	93
表 2-4 各種可生產PHB的微生物.....	25	表 4-2 中期饋料戊酸鈉的批次發酵下不同階段的比消耗速率與比生產速率.....	101	表 4-2 中期饋料戊酸鈉的批次發酵下不同階段的比消耗速率與比生產速率.....	101
表 2-5 基質、PHB收率和生產PHBV之基質成本.....	28	表 4-3 後期饋料戊酸鈉的批次發酵下不同階段的比消耗速率與比生產速率.....	108	表 4-3 後期饋料戊酸鈉的批次發酵下不同階段的比消耗速率與比生產速率.....	108
表 2-6 不同4-羥基烷類標準品、 γ -內酯、及含4-羥基烷類為單體組成的純化PHA.....	35	表 4-4 不同時期饋料戊酸鈉的重要實驗結果的比較.....	111	表 4-4 不同時期饋料戊酸鈉的重要實驗結果的比較.....	111

參考文獻

王奕隆，由Alcaligenes eutrophus 生產生物可分解塑膠的能量模式，大葉大學碩士論文，台灣(1997)。王韻婷，高分子生物塑膠生產菌之分離，特性分析及其高分子合成基因之選殖，台灣大學農業化學研究所碩士論文，台北(2000)。向明，微生物發酵的放大，in “生物技術的發展與應用”，(田蔚城編彙)，151-164。九州圖書，台北(1998)。何志煌，植物二次代謝物的生產，in “生物技術的發展與應用”，(田蔚城編彙) 207-212。九州圖書，台北，(1998)。吳欣達，聚- γ -羥丁酸其衛生聚合物生化製程開發，大葉大學碩士論文，彰化，台灣(1998)。張庭愷，利用Alcaligenes eutrophus 生產poly- γ -hydroxybutyric acid 之發酵與控制策略之研究，大同工學院碩士論文，台北

(1998)。許鴻淵、尹維松、江淑芬、楊建俊，新塑膠時代的來臨，美國飼料穀物協會(1995)。陳義融，發酵法生物性塑膠的生產與利用(上)，化學工業資訊月刊，3:59-62(1988)。陳義融，發酵法生物性塑膠的生產與利用(下)，化學工業資訊月刊，4:33-36(1988)。劉永銓，淺談發醱槽之滅菌，化工，47(3):134-137(2000a)。劉鐵虎譯，取代不腐塑膠「生物聚合物」摩拳擦掌，中國時報二月二十一日(2000b)。

Alderate, J. E., D. W. Karal and C. H. Park, Production of poly hydroxy butyrate homopolymer and copolymer from ethanol and propanol in a fed-batch culture, *Biotechnol. Prog.*, 9 : 520-525 (1993). Anderson, A. J. and E. A. Dawes, Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial use of bacterial polyhydroxyalkonates, *Microbiol.*, 54 : 450-472 (1990). Barham, P. J. and A. Selwood, Extraction of poly(beta-hydroxybutyric acid), *Eur. Pat. Appl.* 58480 (1982). Berger, E., J. A. Ramsay, B. A. Ramsay, C. Chavarie and G. Braunegg, PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass, *Biotech. Tech.*, 3 : 227-232 (1989). Bolebergen, S., D. A. Holden, G. K. Hamer and T. L. Bluhm, Marchessault RH Studies of composition and crystallinity of Bacterial poly(-hydroxy butyrate-co- -hydroxyvalerate), *Macromolecules.*, 19:2865-2871 (1986). Brandl, H., R. A. Gross, R. W. Lenz and R.C. Fuller, Plastics from bacteria and for bacteria, *Biochem. Eng.*, 41 : 77-93 (1990). Braunegg G., B. Sonnleitner and R. M. Lafferty, Extraction of poly(beta-hydroxybutyric acid) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 629 (1978). Byrom, D., Polymer synthesis by microorganism, technology and economics, *Biotech.*, 5 : 246-250 (1987). Cornibert, J. and R. H. Marchessault, Physical properties of Poly-b hydroxybutyrate, IV. conformational analysis and crystalline structure, *J. Mol. Biol.*, 71 : 735-756 (1972). Delafield, F. P., M. Doudoroff, N. J. Paileroni, J. Lusty and R. Contopoulos, Decomposition of poly-b-hydroxybutyrate by pseudomonads, *J. Bacteriol.*, 91 : 1455-1466 (1965). Doi, Y., M. Kunioka, Y. Nakamura and K. Soga., Nuclear magnetic resonance studies on unusual bacterial copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate, *Macromolecules.*, 21 : 2722-2727 (1988). Gostomski, P. A., and H. R. Bungay, Effect of glucose and NH₄⁺ levels on poly (b-hydroxybutyrate) production and growth in a continuous culture of *Alcaligenes eutrophus*, *Biotechnol. Prog.*, 12 : 234-239 (1996). Henry, E. V. and D. Dennis, Production of poly (3-hydroxy butyrate-Co-4- hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose, *J. Biotechnol.*, 58 : 33-38 (1997). Holmes et al., Beta-hydroxybutyrate polymers, European patent, 0,052,459 (1985). Holmes, P. A., Applications of PHB-A microbially produced biodegradable thermoplastic, *Phys. Technol.*, 16 : 32-36 (1985). Juettner R. R., R. M. Lafferty and H. J. Knackmuss, Beta-hydroxybutyrate polymers, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1 (1975) 233-236. Kim, B. S., S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang and S. I. Woo, Production of poly (3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control, *Biotechnol. Bioeng.*, 43 : 892-898 (1994). Kunioka, M., Y. Kawaguchi and Y. Doi., Production of biodegradable co-polyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30 : 569-573 (1989). Lafferty, R. M. and E. Heinzle, Microbiological methods, U.S. Pat. 4,138,291 (1978). Lafferty, R. M., B. Korsatko and W. Korsatko, Microbial production of poly-b-hydroxybutyric acid, *Biotechnol.*, 6b : 135-176 (1988). Lee, E. Y. and C. Y. Choi, Structural identification of polyhydroxyalkanoic acid (PHA) containing 4-hydroxyalkanoic acids by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and its application to bacteria screening, *Biotechnol. Tech.*, 11 : 167-171 (1997). Lee, I. Y, Mi Kyoung Kim, Guk Jin Kim, Ho Nam Chang, and Young Hoon Park, Production of Poly (-Hydroxybutyrate-co- -Hydroxyvalerate) From Glucose and Valerate in *Alcaligenes ertrophus* *Biotechnol Letters.*, 17:6 571-574 (1995). Lee, S. Y., Bacterial polyhydroxyalkanoates, *Biotechnol. Bioeng.*, 49 : 1-14 (1996a). Lee, S. Y., K. M. Lee, H. N. Chang and A. Steinbuchel, Comparison of *Escherichia coli* strains for synthesis and accumulation of poly-(3-hydroxybutyric acid), and morphological changes, *Biotechnol. Bioeng.*, 44 : 1337-1347 (1994a). Lee, S. Y., K. S. Yim, H. N. Chang and Y. K. Chang, Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly (3-hydroxybutyric acid) in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, 32 : 203-211 (1994b). Lee, S. Y., Plastic bacteria ? Progress and prospects for polyhydro-xyalkanoate production in bacteria, *Tibtech.*, 14 : 431-438 (1996b). Liu, F. W., L. D. Ridgway., T. Gu and Z. Shen, Production of poly-s-hydroxybutyrate on molasses by recombinant *E. coli*, *Biotechnology letters.*, 20 : 345-348 (1998). Page, W. J. and O. Knosp, Hyperproduction of poly-b-hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 : 1334-1339 (1989). Page, W. J., Production of poly-b-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38 : 117-121 (1992). Park, C. H. and V. K. Damodaran, Biosynthesis of poly (3-hydroxy butyrate-co-3-hydroxyvalerate) from ethanol and pentanol by *Alcaligenes eutrophus*, *Biotechnol. Prog.*, 10 : 615-620 (1994). Poirier, Y., D. E. Dennis, K. Klomparens and C. Somerville, Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants, *Science.*, 256 : 520-523 (1992). Pool, R., In search of the plastic potato, *Science.*, 245 : 1187-1189 (1989). Preusting, H., R. V. Houten, A. Hoefs, E. K. V. Langenberghe, O. Favre-Bulle and B. Witholt, High cell density cultivation of *Pseudomonas oleovorans*: growth and production of poly (3-hydroxyalkanoates) in two-liquid phase batch and fed-batch systems, *Biotechnol. Bioeng.*, 41 : 550-556 (1993). Ramsay, B. A., G. M. Znoj and David G. C, Formal kinetics of poly- -hydroxybutyric acid (PHB) production in *Alcaligenes eutrophus* H16 and *Mycoplanarubra* R14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium-limited batch cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, July : 152-156 (1986). Riis V. and Mai W. , Gas chromatographic determination of poly- -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis, Elsevier Science Publishers B.V., 445 : 285-289 (1988). Saito, T., K. Suzuki, J. Yamamoto, T. Fukui, K. Miwa, K. Tomita, S. Nakanishi, S. Odani, J. I. Suzuki and K. Ishikawa, Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the gene for poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*, *J. Bacteriol.*, 171 : 184-189 (1989). Schmidt, J. B. Biederman and H. Schmiechen, Ger. (East) Pat. DD 223,428 (1985). Schubert, P., A. Steinbuchel and H. G. Schlegel, Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* poly-b-hydroxybutyrate synthetic pathway and synthesis of PHB in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 170 : 5837-5847 (1988). Sonnleitner, B., E. Heinzle, G. Braunegg and R.M. Lafferty, *Eruopean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 7 : 1-10 (1979). Vanlautern, N. and J. Gilain, Process for separating poly-beta-hydroxybutyrates from a biomass, U.S. Pat. 4,310,684 (1982). Walker, J., J. R. Whittton and B. Alderson, Extraction of poly (beta-hydroxybutyric acid), *Eur. Pat. Appl.* 46,017 (1982). William,

J. P., J. Manchak and B. Rudy, Formation of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Appl. and Environ. Microbiol.*, sept. : 2866-2873 (1992). Williams, J. P., Production of poly- -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31 : 329-333 (1989). Yabuuchi, E., Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta, and Y. Nishiuchi. Transfer of two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. : proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb, nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) . *Microbiol. Immunol.* 39 : 897-904 (1995). Yamane, T., Yield of poly-D(-)3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study, *Biotechnol. Bioeng.*, 41 : 165-170 (1993). Yim, K.S., S.Y. Lee and H.N. Chang, Synthesis of poly-(3-hydroxy butyrate-co-3-hydroxybutyrate) by recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. and Bioeng.*, 49 : 495-503 (1996).