

Effect of Organic Acid Substrates on the Composition of Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Produced by Alcaligene

陳怡如、涂瑞澤；洪淑嫻

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

ABSTRACT

The bio-polymer, PHBV (poly-hydroxybutyrate-co- hydroxyvalerate), having physical properties similar to poly-propylene, is a kind of polyester produced by microorganisms. The application of PHBV is quite extensive because it is suitable for current polymer processing. Since PHBV is biodegradable, its usage is even more significant for environmental protection. The *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*) was under various time of feeding sodium propionate or valerate in order to study: the microbial growth rate, the PHBV accumulation, the consumption of carbon、nitrogen、sodium propionate and valerate substrates during fermentation. Results show that, the microbial growth rate, biomass increase and PHBV accumulation at different stage of feeding propionate and valerate from the largest to smallest have the order of later, middle and early. The order of the mass fraction in biomass from high to low is early, middle and later stage when the propionate was fed. For the valerate case, early stage is the highest, and the middle and the later stage are about the same. Therefore, feeding propionate or valerate at the early stage can produce a PHBV product with a higher HV mole fraction. For the carbon sources, average specific glucose and propionate consuming rates were explored. The specific consuming rate is the substrate consumption per unit residual biomass within a unit time. The average specific consuming rate of propionate fed at an early stage is the highest, and the PHBV has the highest HV mole fraction and the average specific PHV production rate is the highest for this stage. The mass fraction of PHBV in biomass among three stages has no substantial difference. All of them contain about 58% PHBV, but higher than those of feeding propionate. The HV:HB mole ratio in PHBV, just like the case of feeding propionate, is the highest when the valerate was fed at an early stage (HB:HV = 0.23 : 0.77); while the middle and the latter stages have no substantial difference (about 0.76:0.24). The order of average specific carbon source (glucose and valerate) consuming rates is later > middle > early. The specific microbial growth rates are early > middle > later. This may suggest that organic acidic substrates such as propionate and valerate are toxic to *Alcaligenes eutrophus*.

Keywords : PHBV ; feedback culture ; sodium propionate ; valerate ; specific growth rate ; specific consumption rate

Table of Contents

封面內頁	頁次	簽名頁	授權書	1	iii	中文摘要	iv	英文摘要	ix
目錄	vi	誌謝	viii	目錄	xix	圖目錄	xix	圖目錄	xix
第一章	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	17	2.5 PHB(V)製法	18	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	3.3.1.2 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.....	62	3.3.2.2 PHBV的生產.....	66
3.3.3 後期饋料.....	68	3.3.3.1 菌體生長、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	3.3.4.1 菌體生長、葡萄糖、戊酸鈉及氮源.....	90	3.3.4.2 PHBV分析.....	94
3.3.4.2 PHBV的生產.....	98	3.3.4.3 後期饋料.....	104	3.3.4.3.1 菌體生長、葡萄糖、戊酸鈉及氮源.....	98
3.3.4.3.2 PHBV的生產.....	101	3.3.4.3.2 PHBV的生產.....	108	3.3.4.3.3 PHBV的生產.....	108
3.3.4.3.3 PHBV的生產.....	108	3.3.4.3.4 不同時期饋料戊酸鈉之比較.....	111	3.3.4.3.4 不同時期饋料戊酸鈉之比較.....	111
第四章 丁酸饋料對 <i>Ralstonia eutropha</i> 生產PHBV之影響.....	77	4.1 前言.....	77	4.2 材料與方法.....	80
4.1 前言.....	77	4.2.1 實驗材料.....	80	4.2.2 培養條件.....	82
4.2 材料與方法.....	80	4.2.3 分析方法.....	85	4.3 結果與討論.....	89
4.2.1 實驗材料.....	80	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
4.2.2 培養條件.....	82	4.3.1.2 PHBV分析.....	94	4.3.1.2 PHBV分析.....	94
4.2.3 分析方法.....	85	4.3.2 中期饋料.....	98	4.3.2.1 菌體生長、葡萄糖、戊酸鈉及氮源.....	98
4.3 結果與討論.....	89	4.3.2.2 PHBV的生產.....	101	4.3.2.2 PHBV的生產.....	101
4.3.1 前期饋料.....	89	4.3.3 後期饋料.....	104	4.3.3 後期饋料.....	104
4.3.1.1 菌體生長、葡萄糖、戊酸鈉及氮源.....	90	4.3.3.1 菌體生長、葡萄糖、戊酸鈉及氮源.....	104	4.3.3.1 菌體生長、葡萄糖、戊酸鈉及氮源.....	104
4.3.1.2 PHBV分析.....	94	4.3.3.2 PHBV的生產.....	108	4.3.3.2 PHBV的生產.....	108
4.3.2 中期饋料.....	98	4.3.3.3 PHBV的生產.....	108	4.3.3.3 PHBV的生產.....	108
4.3.2.1 菌體生長、葡萄糖、戊酸鈉及氮源.....	98	4.3.3.4 不同時期饋料戊酸鈉之比較.....	111	4.3.3.4 不同時期饋料戊酸鈉之比較.....	111
4.3.2.2 PHBV的生產.....	101	第五章 結論與未來展望.....	114	5.1 結論.....	114
4.3.2.3 PHBV的生產.....	101	5.1 結論.....	114	5.2 未來展望.....	116
4.3.3 後期饋料.....	104	5.2 未來展望.....	116	參考文獻.....	119
4.3.3.1 菌體生長、葡萄糖、戊酸鈉及氮源.....	98	參考文獻.....	119	附錄.....	127
4.3.3.2 PHBV的生產.....	101	附錄.....	127	圖 目錄	21
4.3.3.3 PHBV的生產.....	108	圖 2-1 不同碳源生產PHA的合成代謝路徑.....	21	圖 2-2 <i>Alcaligenes eutrophus</i> 生產PHA的合成與降解代謝路徑.....	22
4.3.3.4 不同時期饋料戊酸鈉之比較.....	111	圖 2-3 由 <i>Alcaligenes eutrophus</i> 生產PHBV的合成路徑.....	23	圖 2-3 由 <i>Alcaligenes eutrophus</i> 生產PHBV的合成路徑.....	23
第五章 結論與未來展望.....	114	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
5.1 結論.....	114	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
5.2 未來展望.....	116	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 3-4 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
參考文獻.....	119	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
附錄.....	127	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 3-6 中期饋料丙酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	63
圖 目錄	21	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 2-1 不同碳源生產PHA的合成代謝路徑.....	21	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 3-8 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 2-2 <i>Alcaligenes eutrophus</i> 生產PHA的合成與降解代謝路徑.....	22	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 2-3 由 <i>Alcaligenes eutrophus</i> 生產PHBV的合成路徑.....	23	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 3-10 後期饋料丙酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	69
圖 3-1 取樣分析流程圖.....	44	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 3-2 前期饋料丙酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線圖.....	55	圖 3-11 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 3-12 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 3-3 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 3-12 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 3-4 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 3-13 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 4-1 PHA之一般化學式與代表意義.....	79
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 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 3-6 中期饋料丙酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	63	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 3-7 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 4-3 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 3-8 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 4-4 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 3-9 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 4-5 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 3-10 後期饋料丙酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	69	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 3-11 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 4-7 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 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 4-8 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 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 4-9 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 4-1 PHA之一般化學式與代表意義.....	79	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 4-2 前期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	90	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 4-3 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 4-12 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 4-4 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 4-13 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	12
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	表 目錄	12	表 2-1 不同菌種所生產 PHB 平均分子量.....	10
圖 4-6 中期饋料戊酸鈉的批次發酵下菌體濃度檢量線.....	98	表 2-1 不同菌種所生產 PHB 平均分子量.....	10	表 2-2 商業化的生物分解塑膠.....	12
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 2-2 商業化的生物分解塑膠.....	12	表 2-3 各國生物分解性塑膠的應用情形.....	14
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 2-3 各國生物分解性塑膠的應用情形.....	14	表 2-4 各種可生產PHB的微生物.....	25
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 2-4 各種可生產PHB的微生物.....	25	表 2-5 基質、PHB收率和生產PHBV之基質成本.....	28
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 2-5 基質、PHB收率和生產PHBV之基質成本.....	28	表 2-6 不同4-羥基烷類標準品、 ϵ -內酯、及含4-羥基烷類為單體組成的純化PHA.....	35
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 2-6 不同4-羥基烷類標準品、 ϵ -內酯、及含4-羥基烷類為單體組成的純化PHA.....	35	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
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 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 3-2 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
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 3-2 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 3-3 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 目錄	12	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 3-4 不同時期饋料丙酸鈉重要實驗結果的比較.....	76
表 2-1 不同菌種所生產 PHB 平均分子量.....	10	表 3-4 不同時期饋料丙酸鈉重要實驗結果的比較.....	76	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 2-2 商業化的生物分解塑膠.....	12	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 4-2 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 2-3 各國生物分解性塑膠的應用情形.....	14	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 4-3 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 2-4 各種可生產PHB的微生物.....	25	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 4-4 不同時期饋料戊酸鈉的重要實驗結果的比較.....	111
表 2-5 基質、PHB收率和生產PHBV之基質成本.....	28	表 4-4 不同時期饋料戊酸鈉的重要實驗結果的比較.....	111		
表 2-6 不同4-羥基烷類標準品、 ϵ -內酯、及含4-羥基烷類為單體組成的純化PHA.....	35				
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 3-2 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 3-3 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 3-4 不同時期饋料丙酸鈉重要實驗結果的比較.....	76				
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 4-2 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 4-3 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 4-4 不同時期饋料戊酸鈉的重要實驗結果的比較.....	111				

REFERENCES

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- ϵ -羥基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). Bolembergen, S., D. A. Holden, G. K. Hamer and T. L. Bluhm, Marchessault RH Studies of composition and crystallinity of Bacterial poly(γ -hydroxy butyrate-co- γ -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- γ 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- γ -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- γ -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 (γ -Hydroxybutyrate-co- γ -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 polyhydroxyalkanoate production in bacteria, *Tibtech.*, 14 : 431-438 (1996b). Liu, F. W., L. D. Ridgway., T. Gu and Z. Shen, Production of poly- γ -hydroxybutyrate on molasses by recombinant *E. coli*, *Biotechnology letters.*, 20 : 345-348 (1998). Page, W. J. and O. Knosp, Hyperproduction of poly- γ -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 : 1334-1339 (1989). Page, W. J., Production of poly- γ -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. Klomprens 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- γ -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- γ -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- γ -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. Whitton 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).