

Pseudomonas sp. HJ에 의한 포도당으로부터 Poly(3-Hydroxybutyric-Co-3-Hydroxyvaleric) Acid의 생합성에 대한 보조기질의 영향

손 홍 주 · 고 명 선 · †이 상 준
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Effect of Cosubstrate on the Production of Poly(3-Hydroxybutyric-Co-3-Hydroxyvaleric) Acid from Glucose by *Pseudomonas* sp. HJ

Hong-Joo Son, Myung-Seun Ko, and Sang-Joon Lee[†]

Dept. of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National Univ., Pusan 609-735, Korea

ABSTRACT

Poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid(PHB/HV) copolymer synthesis by *Pseudomonas* sp. HJ from glucose and cosubstrate was investigated. Taxonomic analysis suggested that *Pseudomonas* sp. HJ was best matched to *Pseudomonas picketti* having 78.8% similarity. *Pseudomonas* sp. HJ produced PHB/HV copolymer containing 60.8 mol% HV and 44.9 mol% HV when supplied with hexadecane and propionic acid as a cosubstrate, respectively. The HV composition in PHB/HV copolymer was controlled by varying the concentration of hexadecane and propionic acid. Propionic acid added after 24 hours of incubation was incorporated as the HV monomer in the PHB/HV copolymer up to 49.6 mol%.

서 론

플라스틱산업은 19세기 후반에 셀룰로이드가 합성 재료로서 사용되기 시작하면서 생활전반에 큰 혁명을 일으키기 시작하였다. 특히 최근 수십년간 중합체에 대한 화학적 지식과 성형가공 기술이 크게 진보함에 따라 견고성, 내구성, 내식성, 경량성 및 안정성 등이 더욱 향상되어 광범위한 분야에서 다양한 용도로 합성 플라스틱이 사용되고 있다. 그러나 합성 플라스틱은 사용 후 폐기시 토양, 하천 등의 자연 생태계에서 생물에 의해 분해가 되지 않는 특성을 가지고 있어 환경보존 차원에서 심각한 문제를 일으키고, 포장지의 경우 한번 사용하면 버리기 때문에

생산량이 증가할수록 폐기물 처리상의 문제를 발생시킨다. 플라스틱 제조 공정중에서도 많은 폐기물과 유독가스가 발생되어 대기오염을 가중시킬 뿐만 아니라, 가공의 용이성과 최종제품의 유연성을 증가시키기 위하여 첨가하는 가소제인 polychlorinated biphenyl과 dioctylphthalate는 생물에 의하여 분해가 잘 되지 않는 난분해성 물질로서 환경오염상의 문제뿐만 아니라 신경성 질환을 유발하는 등 보건 위생학적인 문제도 야기하고 있다(1).

따라서 폐기 후 자연계에서 분해되어 지구물리화학적 순환 사이클로 흡수될 수 있는 “분해성 합성 고분자 물질”을 찾아서 대량으로 생산할 수 있는 공정을 확립하는 것이 장래 파급될 환경오염 문제와 부존자원 문제를 근원적으로 해결할 수 있을 것으로 예상되며, 또한 수요의 증가에 따른 경제적 가치도

† Corresponding Author

엄청날 것으로 사료된다.

생분해성 고분자중에서 합성플라스틱의 대체물질로서 가장 주목을 받고 있는 것이 바로 poly- β -hydroxybutyric acid(PHB)인데, 합성플라스틱과 비슷한 물성을 가지고 있어 그 잠재적 응용 가능성이 매우 크다(2, 3). 그러나 PHB는 brittleness와 stiffness가 매우 커서 실제 응용면에서 많은 문제점이 있다(4). 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 hydroxybutyric acid monomer와 $C_5 \sim C_{10}$ 정도의 β -hydroxyacid monomer로 구성된 poly-hydroxyalkanoate(PHA)에 대한 연구가 활발히 진행중인데 그 중에서 특히, PHB chain에 valeric acid가 공중합되어 있는 poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid(PHB/HV)가 연구의 대상이 되고 있다(5, 6). PHB/HV polymer는 유연성이 높고, copolymer내의 HV 함량에 따라 다양한 물성을 가지게 되므로 PHB homopolymer가 가지는 단점을 극복할 수 있고, 다양한 용도로 개발 가능성이 높아 산업적으로 그 가치를 인정받고 있다(7).

Ramsay 등(8)은 *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas pseudo-flava*, *Pseudomonas cepacia*, *Micrococcus halodentrificans* 등이 포도당과 propionic acid를 기질로 하여 PHB/HV copolymer를 합성하였다고 하였으며, Doi 등(9)은 valeric acid를 탄소원으로 하여 *Alcaligenes eutrophus*로부터 HV 함량이 90 mol%인 PHB/HV copolymer를 합성하였고, valeric acid와 butyric acid를 적당하게 혼합함으로써 다양한 mol%를 가진 PHB/HV를 합성할 수 있었다고 하였다. Rhee 등(10)에 의하면 *Alcaligenes* sp. SH-69는 포도당을 탄소원으로 하여 HV 함량이 3 mol%인 PHB/HV를 합성할 수 있었으며, 유가배양에 의하여 36g/L의 PHB/HV가 생산되었다고 보고하였다.

이와 같이 *Alcaligenes eutrophus* 등과 같은 일부 세균의 경우, 주 탄소원(main substrate)인 포도당 외에 HV monomer의 전구체로 작용하는 보조 탄소원(cosubstrate)인 propionic acid나 valeric acid를 배지내에 첨가할 때 PHB/HV copolymer를 세포내에 축적하는 것으로 밝혀졌다(11, 12).

본 실험에서는 전보(13)에서 보고한 *Pseudomonas* sp. HJ의 명확한 동정을 위한 수처분류와 보조 기질이 PHB/HV의 monomer에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 *Pseudomonas* sp. HJ로서 질소원이 제한된 조건에서 단일 탄소원인 포도당으로부터 PHB/HV를 생산하는 특성을 가지고 있었다(13). 배양을 위한 기본배지의 조성은 포도당 1.0%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%, K_2HPO_4 0.3%, KH_2PO_4 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.002%였으며, pH 7.0, 37°C에서 flask 배양하였다. 이때 250mL 삼각 flask에 배지 100mL을 첨가하여 200rpm으로 회전진탕배양하였다.

형질분석

수처분류는 표현론적 유사성에 기초를 두고 있으

Table 1. Taxonomic unit characters used for the numerical taxonomy of *Pseudomonas* sp. HJ.

Growth characters : growth at aerobic condition, 4°C, 42°C, MacConkey agar, KCN broth, and 4.5% NaCl
Biochemical characters : gelatin liquefaction, citric acid utilization, hydrolysis of starch, casein, PHB, esculin, and Tween 80, production of catalase, cytochrome oxidase, urease, arginine dehydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, lecithinase, phosphatase, pyocyanine, pyoverdin, phenazine, diffusible pigment, fluorescent pigment, indole, and H ₂ S, nitrate and nitrite reduction, ONPG, VP, MR, PHB accumulation
Morphological characters : flagellum number, spore formation
Acid from carbohydrate(1%, w/v) : glucose, lactose, maltose, mannitol, salicin, sucrose, xylose
Utilization as a sole carbon and energy source(0.1%, w/v) : glucose, xylose, arabinose, fructose, mannose, rhamnose, lactose, cellobiose, maltose, ribose, galactose, trehalose, sucrose, starch, inositol, ribitol, glycerol, mannitol, sorbitol, salicin, inuline, dodecane, hexadecane, propionic acid, decanoic acid, citric acid, acetic acid, gluconic acid, tartaric acid, adipic acid, succinic acid, malic acid, benzoic acid, maleic acid, 3-hydroxybutyric acid, nonanoic acid, oxalic acid, butyric acid, pentanoic acid, hexanoic acid, heptanoic acid, octanoic acid, lysin, α -ketoglutaric acid, arginine, isoleucine, ornithine, glycine, glutamic acid, ethanol, buthanol, propanol

므로, 표현형을 나타내는 단위형질(unit character) 인자로서 각종 유기화합물의 이용능과 생화학적 특성을 이용하였으며, 구체적인 형질들은 Table 1에서 보는 바와 같이 95개이었다. 문헌조사(14, 15)를 통하여 공시균 *Pseudomonas* sp. HJ와 유사하다고 판단되는 대조균주들을 선정하였는데, 생화학적 제 특성을 수치분류화한 동일 집괴내의 균주들은 상호 간 형질의 특성이 유사하므로, *Pseudomonas* 속내의 균주들을 대상으로 이들간의 key test가 되는 형질의 특성을 조사하여 대조균주를 선정하였다. 이들간의 유사도는 Jaccard coefficient를 이용하여 구하였다(16). 이 유사도를 기초로 하여 균주간 유사도의 집괴분석으로 유사도 수치도를 작성하였다. 유사도의 수치도 작성을 위한 프로그램은 Statistical Ecology, A Primer on Methods and Computing (17)내의 수치분류 프로그램인 cluster.bas로서, 이 프로그램은 유클리드 거리계수 방법에 의한 유사도 지수를 산출하게 되어 있기 때문에 Q basic으로 본 실험방법에 맞는 조합계수법으로 다시 변형하여 personal computer로 분석하였다. 분석처리한 결과는 백분율(%)로 나타내었다.

보조기질 첨가에 의한 PHB/HV 생산의 검토

보조기질로서 hexadecane과 propionic acid를 1%의 포도당이 함유된 생육 최적배지에 각 농도별로 첨가하여 37°C, 200rpm에서 48시간동안 배양한 후 건조균체량, 균체내 PHA 및 HV 함량을 측정하였다. 또한 생육 최적배지에서 *Pseudomonas* sp. HJ를 배양하면서 보조 기질로 0.2%의 propionic acid를 각각 배양 초기(0시간), 대수기 초기(11시간), 대수기 중기(18시간) 및 대수기 말기(24시간)에 공급하여 배양한 후 건조균체량, 균체내 PHA 및 HV 함량을 측정하였다.

분석방법

생육도의 측정은 membrane filtration method에 의한 건조균체량으로 측정하였다. 건조균체량은 배양액중의 균체를 생리적 식염수로 2번 세척한 후, 0.2 μ m의 pore size를 가진 membrane filter로 집균하여 100°C에서 항량이 될 때까지 건조함으로써 그 중량을 측정하였다. 경우에 따라서는 균체 현탁액의 OD와 건조균체량과의 표준곡선으로부터 간접적으로 측정하였다. 이때 균체 현탁액의 OD와 건조균체량 사이에는 다음의 관계가 있었다.

Dry cell weight(g/L)

$$= (0.4688 \times A_{660}) + 0.0288$$

균체의 PHA 정량은 GC로 실시하였다(18). 즉 배양액으로부터 회수한 건조균체 50mg을 chloroform 2mL와 메탄올(3% H₂SO₄ 함유) 2mL가 첨가된 screw cap tube에 넣어 100°C에서 3시간 30분동안 반응시킨 후 상온으로 냉각시켰다. 이 용액에 증류수 1mL를 첨가하여 강하게 진탕함으로써 PHA를 methylesterification시켰다. 원심분리로 수용액층, 균체층, 유기용매층으로 분리한 후, 유기용매층 2 μ l를 GC에 주입하였다. 이때 사용한 GC는 HP-5890A였으며, 컬럼은 10% Carbowax 20M-ON glass를 사용하였고, 운반기체는 N₂, oven temperature는 160°C, 유속은 30ml/min였으며, 불꽃이온화검출기를 사용하였다. 표준 PHB/HV는 Aldrich 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

수치분류

전보(13)에서 보고한 바와 같이 공시균 *Pseudomonas* sp. HJ는 hexane, hexadecane, propionic acid, varelic acid, octanoic acid, decanoic acid 등으로부터 PHB/HV copolymer를 합성하였다. 일반적으로 *Pseudomonas oleovorans*(19), *Pseudomonas resinovorans*(20), *Pseudomonas putida*(21) 등의 *Pseudomonas* 속은 사용된 탄소원의 종류에 따라 다양한 조성의 PHA를 합성하는 것으로 알려져 있으나 본 균주는 HV monomer 외의 다른 monomer는 전혀 합성하지 않아 기존에 보고된 결과와 다른 양상을 보여주었다. 따라서 본 공시균은 일반적으로 보고된 *Pseudomonas* 속과는 다른 특이한 생리적 성질을 가진 새로운 종(species)일 가능성이 높았다.

Pseudomonas 속을 포함한 세균의 분류 및 동정에 diagnostic key와 identification table 등을 이용한 생화학적 동정이 많이 이용되어 왔으나, 이러한 통상적인 방법에 의한 다양한 세균들의 동정은 일부 세균에 있어 정확성이 부족하고 또한 그 과정이 매우 복잡한 작업이라고 하였다(15). 따라서 최근 생화학적 제 특성을 수치화하여 세균을 분류하는 수치분류와 화학적 분류, ribosomal RNA의 pattern 등을 조사하여 계통발생학적으로 세균을 분류하는 연구가 많이 진행되고 있다. 특히 수치분류는 새로운 분류학적 가설을 설정하고 이를 검증하는데 큰 도움

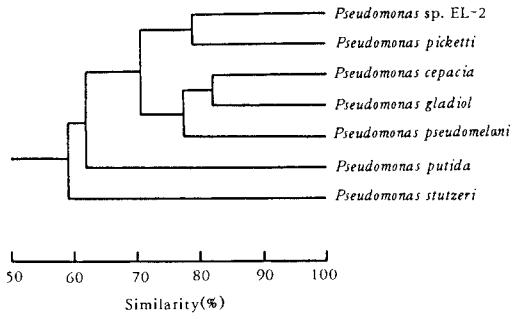


Fig. 1. Dendrogram showing similarity relationships among *Pseudomonas* strains based on the *Sj*coefficient.

을 주며, 분류의 전반에 관한 일반적인 정보를 일목요연하게 제공해 준다. 또한 규모가 작은 분류군이더라도 이를 검출할 수 있게 하며, 특히 논란이 되고 있는 분류군의 명확한 한계를 설정해 준다(22). 즉 일반적인 방법에 의해서 결과의 판정이 어려운 형질을 많이 소유한 생물들에 있어서는 그 분류의 윤곽을 빠르게 제시해 줄 수 있는 특징을 가지고 있다. 따라서 공시균의 보다 정확한 동정을 위하여 수치분류를 실시하였다. 즉 API system과 통상적인 방법에 의하여 공시균 *Pseudomonas* sp. HJ와 대조균주들에 대한 95가지 형질의 특성을 조사한 결과(미제시)를 이용하여 *Pseudomonas* sp. HJ와 각 대조균주간의 유사도를 산출하였다. 이러한 유사도를 집괴 분석한 후, 수치도를 작성한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 즉 공시균 *Pseudomonas* sp. HJ는 각 대조균주들중에서 *Pseudomonas picketti*와 가장 유사도가 높은 것으로 나타났다(78.8%). 그러나 통상적인 수치분류에서 동일 군중에 포함될 수 있는 유사도는 85% 정도인 것으로 알려져 있으므로, 본 공시균 *Pseudomonas* sp. HJ는 *Pseudomonas* 속의 다른 종(species)이거나 새로운 종일 가능성이 높았다.

최근 *Rhodococcus* sp., *Corynebacterium hydrocarboxydans*, *Nocardia lucida* 등은 포도당, 과당, acetic acid, succinic acid, lactic acid 등의 unrelated carbon source(2, 7)로부터, *Haloferax mediterranei*, *Rhodobacter sphaeroides*, 일부 non-sulphur purple bacteria 등은 전분, acetic acid 등의 unrelated carbon source로부터 PHB/HV를 합성하는 것으로 밝혀졌다(2, 23, 24). 또한 *Pseudomonas*

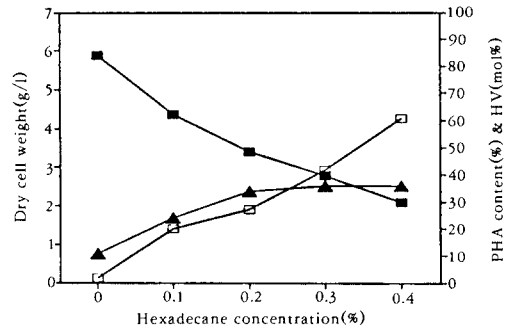


Fig. 2. Effect of hexadecane concentration on the PHB/HV production by *Pseudomonas* sp. HJ. Culture was carried out for 48 hour in optimal growth medium containing different hexadecane concentrations. —■—, dry cell weight; —▲—, PHA content; —□—, HV.

*aeruginosa*는 과당이나 포도당과 같은 unrelated carbon source로부터 poly(HB/HD/HDD)를 합성하는 것으로 밝혀졌다(25, 26). 그러나 아직까지 어떻게 해서 unrelated carbon source로부터 HV monomer가 PHB/HV copolymer로 incorporate되는지는 밝혀져 있지 않다. 결론적으로 자연계에는 아직까지 분리되지 않은 특이한 생리적 성질을 가진 PHA 생산 미생물이 많으리라 사료되므로 PHA 대량생산 연구와 함께 균주 탐색도 꾸준히 이루어져야 하겠다.

보조기질의 농도에 의한 영향

전보(13)에서 hexadecane, propionic acid 등을 탄소원으로 사용하였을 때에는 HV monomer의 비율이 49~74 mol%로 매우 높았다고 보고하였다. 이러한 결과는 최적의 균체 생육을 나타내는 탄소원을 1차 기질로 하고, HV 함량의 증가를 나타낸 기질들을 2차 기질로 사용시 균체 생육의 큰 저해없이 HV 함량이 높은 PHA copolymer를 생산할 수 있다는 하나의 가능성을 제시하고 있다. 따라서 hexadecane과 propionic acid를 1%의 포도당이 함유된 생육 최적배지에 각 농도별로 첨가하여 48시간 동안 배양한 결과는 Fig. 2와 Fig. 3에서 보는 바와 같다. Hexadecane의 경우, 농도가 높아질수록 균체 생육은 점차 감소되었으나, HV 함량은 점차 증가하여 0.4%를 첨가하였을 때에는 60.8 mol%까지 축적

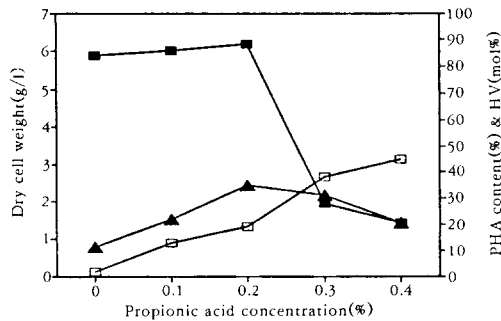


Fig. 3. Effect of propionic acid concentration on the PHB/HV production by *Pseudomonas* sp. HJ. Culture was carried out for 48 hour in optimal growth medium containing different propionic acid concentrations. —■—, dry cell weight; —▲—, PHA content; —□—, HV.

되었다. 또한 PHA 축적율은 0.2% 이상의 농도에서 34~36%로, hexadecane을 첨가하지 않았던 경우(10.8%)보다 향상되었다. 이러한 결과는 hexadecane은 균체 생육에는 이용되지 않고, 단지 PHA 생산에만 이용되는 것으로 해석될 수 있다. 현재까지 hexadecane을 PHB/HV 생산의 전구체로 사용한 예는 보고된 적이 없다. Propionic acid의 경우, 0.3% 이상의 농도에서 균체 생육은 크게 저해되었으며, 동시에 PHA 축적율도 감소하였으나 HV 함량은 계속 증가하여 0.4%를 첨가하였을 경우 44.9 mol%까지 증가하였다. 즉 hexadecane의 경우와 마찬가지로 HV 함량은 초기 propionic acid 농도에 비례하여 증가하였는데, 이러한 양식은 Zhang 등 (27)에 의해서 보고된 바 있다. 즉 이들은 recombinant *Klebsiella oxytoca*의 경우, propionic acid 농도가 0mM에서 10mM로 증가될수록 HV 함량은 57 mol%까지 증가한다고 하여 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다. 0.2% 이하의 propionic acid가 첨가된 경우 균체 생육은 6.25g/L으로, propionic acid를 첨가하지 않았던 경우(5.89g/L)보다 오히려 우수하였으며, PHA 축적율도 34.8%로 가장 높았다. 이러한 결과는 hexadecane의 경우와는 달리, 0.2% 정도의 propionic acid는 PHA 생산뿐만 아니라 균체 생육에도 이용될 수 있다는 사실을 나타낸다. 즉 배양도중 포도당이 모두 소비되면 propionic acid가 탄소원으로 이용될 수 있음을 의미한다. *Alcaligenes*

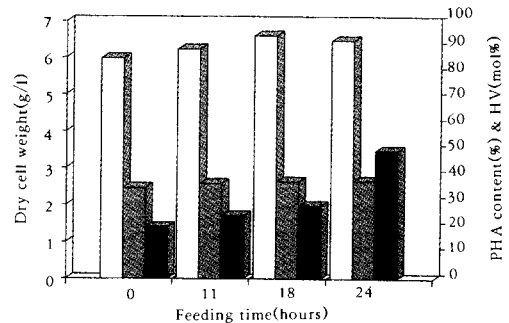


Fig. 4. Effect of propionic acid feeding time on the PHB/HV production by *Pseudomonas* sp. HJ. □, Dry cell weight; ■, PHA content; ▨, HV.

*eutrophus*의 경우 0.1%의 propionic acid 농도에서 균체 생육이 거의 정지된다고 보고되었다. 따라서 본 공시균으로부터 PHB/HV copolymer의 합성은 *Alcaligenes eutrophus*의 경우보다 효율적임을 알 수 있다.

상기의 결과는 *Alcaligenes eutrophus*(11, 12)의 경우와 마찬가지로 1차 탄소원(포도당)과 2차 탄소원(propionic acid)을 적당한 비율로 조합하여 첨가함으로써 다양한 mol%의 HV를 함유하는 PHB/HV를 합성할 수 있는 가능성을 제시해 줌과 동시에 결과적으로 이러한 다양한 mol%의 HV를 갖는 PHB/HV를 이용하여 PHB homopolymer로서는 제조하기 어려운 bottle, film 등을 자유롭게 성형가공할 수 있음을 보여준다.

Propionic acid 공급시기에 의한 영향

HV 전구체로서 propionic acid를 사용할 때, 그 공급시기에 따라 전조균체량, PHA 축적율 및 HV 함량이 영향을 받는 것으로 보고되어 있다(27). 따라서 1%의 포도당이 함유된 생육 최적배지에서 공시균을 배양하면서 0.2%의 propionic acid를 각각 배양 초기(0시간), 대수기 초기(11시간), 중기(18시간) 및 말기(24시간)에 첨가하여 48시간 동안 배양한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 공급시기에 따라 균체 생육, PHA 축적율 및 HV 함량이 변화하였다. Propionic acid를 균체 생육이 활발한 대수기 중기에 첨가했을 때 균체 생육이 6.60g/L으로 가장 우수하였으므로, 세포의 생육 활성이 가장 활발한 시기가 propionic acid에 의한 생육 저해현상

을 방지할 수 있는 가장 좋은 시기라 사료된다. PHA 축적율은 조사한 전 시간대에서 35.2~38%로, 첨가시간에 거의 영향을 받지 않았다. 그러나 HV 함량은 첨가시간이 지연될수록 점차 증가하기 시작하였는데, 배양 초기에 propionic acid를 첨가하였을 경우 19.9 mol% 였으나, 대수기 말기에 첨가하였을 경우에는 49.6 mol%까지 증가하였다. 이때 균체 생육은 감소되지 않고 비교적 일정하였기 때문에 첨가된 propionic acid가 균체 생육보다는 HV 합성에 많이 이용되었으리라 추측된다. Recombinant *E. coli*(28)의 경우, 배양초기보다 대수기 중기에 propionic acid를 첨가했을 때 HV 함량이 가장 높아 본 연구결과와 일치하였으나, recombinant *Klebsiella oxytoca*(27)의 경우 첨가시간에 관계없이 HV 함량이 거의 일정하였고, 또한 PHA 축적율도 대수기 말기에 첨가한 경우가 가장 높아 본 연구결과와는 다소 상이하였다.

요 약

본 연구에서는 단일 탄소원인 포도당으로부터 PHA를 생산하는 공시균 *Pseudomonas* sp. HJ를 보다 정확하게 동정하기 위하여 수치분류를 실시하였으며, 또한 보조기질을 첨가하였을때의 PHB/HV 합성 양상을 검토하였다. *Pseudomonas* sp. HJ는 각 대조균주들중에서 *Pseudomonas picketti*와 가장 유사도가 높은 것으로 나타났다(78.8%). 그러나 수치분류에서 동일 군종에 포함될 수 있는 유사도는 85% 정도인 것으로 알려져 있으므로, 본 공시균 *Pseudomonas* sp. HJ는 *Pseudomonas* 속의 다른 종(species)이거나 새로운 종(species)일 가능성이 높았다. 보조기질로 hexadecane과 propionic acid를 각각 0.4%씩 첨가했을 경우, 농도증가에 비례하여 HV 함량은 점차 증가하여 각각 60.8 mol%, 44.9 mol%까지 축적되었다. PHB/HV내의 HV 함량은 propionic acid나 hexadecane의 농도를 달리하여 첨가함으로써 조절할 수 있었다. 보조기질로 propionic acid 0.2%를 대수기 중기인 배양 18시간에 첨가하였을때 균체 생육이 가장 우수하였으나, HV monomer의 비율은 대수기 말기인 배양 24시간대에 첨가하였을때 49.6 mol%로 가장 높았다.

참고문헌

1. 도갑수(1994), 생물공학 NEWS, 1(3), 33.
2. H. Brandl, R. A. Gross, R. W. Lenz, and R. C. Fuller(1990), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **41**, 77.
3. N. L. Uttley(1986), Polyhydroxybutyrate : A Commercial Challenge, Proc. BIOTECH'86, pp. 171-177, Online Publications, UK.
4. B. A. Ramsay, J. A. Ramsay, and D. G. Cooper(1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(3), 584.
5. D. Byrom(1987), *Trends in Biotechnology*, **5**, 461.
6. 土肥 義治(1988), *Bioindustry*, **5**(9), 5.
7. A. J. Anderson and E. A. Dawes(1990), *Microbiol. Rev.*, **53**(4), 450.
8. B. A. Ramsay, K. Lomaliza, C. Claude, B. Dube, P. Bataille, and J. A. Ramsay(1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(7), 2093.
9. Y. Doi, A. Tamaki, M. Kunioka, and K. Soga (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 330.
10. Y. H. Rhee, J. H. Jang, and P. L. Rogers (1993), *Biotech. Lett.*, **15**(4), 377.
11. Y. Doi, M. Kunioka, Y. Nakamura, and K. Soga (1986), *Macromolecules*, **19**, 2860.
12. Y. Doi, A. Tamaki, M. Kunioka, and K. Soga (1987), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1635.
13. 손홍주, 민관필, 이상준(1995), 한국생물공학회지, **10**(4), 349-357.
14. N. R. Krieg and J. G. Holt(1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
15. R. Y. Stainer, N. J. Palleroni, and M. Doudoroff(1966), *J. Gen. Microbiol.*, **43**, 159.
16. P. H. A. Sneath and R. R. Sokal(1973), *Numerical Taxonomy*, W. H. Freeman and Company, San Francisco.
17. J. A. Ludwig and J. F. Reynolds(1988), *Statistical Ecology*, John Wiley and Sons, Toronto.
18. G. Braunegg, B. Sonneleitner, and R. M. Lafferty(1978), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 29.
19. B. A. Ramsay, I. Saracovan, J. A. Ramsay, and R. H. Marchessault(1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(3), 625.
20. B. A. Ramsay, I. Saracovan, J. A. Ramsay,

- and R. H. Marchessault(1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(2), 744.
21. G. N. M. Huijberts, G. Eggink, P. de Waard, G. W. Huisman, and B. Witholt(1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(2), 536.
 22. 고철환(1988), 수리분류학, 민음사.
 23. J. G. Lillo and F. R. Valera(1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(8), 2517.
 24. M. Liebergesell, E. Hustede, A. Timm, A. Steinbüchel, R. C. Fuller, R. W. Lenz, and H. G. Schlegel(1991), *Arch. Microbiol.*, **155**, 415.
 25. G. W. Haywood, A. J. Anderson, and D. F. Ewing(1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(11), 3354.
 26. A. Timm and A. Steinbüchel(1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(11), 3360.
 27. H. Zhang, V. Obias, K. Gonyer, and D. Dennis(1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1198.
 28. S. Slater, T. Gallaher, and D. Dennis(1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1089.