

락톤류로부터 *Hydrogenophaga pseudoflava*와 *Ralstonia eutropha* H16 두 세균에 의한 공중합 PHA의 합성 및 미세구조적 특성 연구

장영옥 · 남원 · 최문환 · 송재준¹ · 윤성철*
경상대학교 생명과학부 생물신소재연구실

Synthesis of Copolymeric PHA by *Hydrogenophaga pseudoflava* and *Ralstonia eutropha* H16 from Various Lactones and Their Microstructural Studies. Jang, Young-Ok, Won Nam, Mun-Hwan Choi, Jae-Jun Song¹, and Sung-Chul Yoon. *Biomaterials Science Laboratory, Division of Life Science, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea, ¹Department of Polymer Science and Engineering, University of Massachusetts, Amherst, MA01003, USA* – Two types of copolyesters, poly(3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid)[P(3HB-co-4HB)] and poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid)[P(3HB-co-3HV)], with various monomer ratios and different degree of microstructural heterogeneity were synthesized from *Ralstonia eutropha* H16 and *Hydrogenophaga pseudoflava* by using γ -butyrolactone and γ -valerolactone, respectively. The two bacteria showed a large difference in the utilization of γ -butyrolactone for cell growth and PHA synthesis. *H. pseudoflava* synthesized P(3HB-co-4HB) copolyesters with a wide range of 4HB content from 13 to 96 mol% depending on culture conditions, while *R. eutropha* H16 was able to synthesize the copolyesters containing less than 20 mol% of 4HB. An increase in the 4HB content in the P(3HB-co-4HB) copolyesters synthesized by *H. pseudoflava* induced a lowering of their melting temperatures as well as their enthalpies of fusion. The increase in the 4HB content, however, increased the rate of degradation by an extracellular P(3HB) depolymerase. NMR spectroscopy and differential scanning calorimetry showed that the P(3HB-co-4HB) copolyesters from *H. pseudoflava* were generally microstructurally heterogeneous. The P(3HB-co-4HB) copolyesters synthesized by *R. eutropha* H16 were rather random copolymers showing less microstructural heterogeneity than those synthesized by *H. pseudoflava*. The NMR D value analysis suggested that the monomer distribution of the P(3HB-co-3HV) copolymers from the two bacteria were relatively random.

Key words: SCL-PHA, γ -butyrolactone, γ -valerolactone, NMR, microstructural heterogeneity, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Ralstonia eutropha* H16

다양한 세균들에 의해 탄소원과 에너지원의 저장물로써 세포내에 축적되는 미생물 폴리에스터(polyhydroxyalkanoic acids, PHAs)는 기존의 합성고분자(예, 폴리프로필렌)와 유사한 물성과 뛰어난 생분해성으로 인하여 난분해성 합성 플라스틱 대체품 개발차원에서 국내외적으로 많은 연구가 진행되어 왔다[1,2,8]. 아직까지 합성플라스틱에 비해 미생물 폴리에스터의 생산비용이 너무 높으므로 최근에는 생산 비용을 낮추기 위해 값싼 기질의 이용성[15,30] 재조합 대장균[11,13]이나 형질도입된 식물[20,28]을 이용한 대량생산의 방법들이 활발히 시도되고 있다. 다른 한편으로는 미생물 폴리에스터를 기능성 신소재로 개발하여 약물전달시스템(DDS), 외과수술용 봉합사, 비료나 농약의 방출조절 등의 의료용소재 분야와 농업 분야에 응용하려는 시도도 이

루어지고 있다[7].

지금까지 밝혀진 미생물 폴리에스터중 homopolymer로 알려진 것은 poly-3-hydroxybutyrate[P(3HB)], poly-3-hydroxyvalerate[P(3HV)], poly-4-hydroxybutyrate[P(4HB)] 등 몇 가지 되지 않는다[6,17,22,25]. 이들 세가지 homopolymer들은 각각 175, 112, 56°C의 용융온도와 15, 0, -44°C의 유리전이온도를 가지며, P(4HB)는 P(3HB)보다 약 200배 이상 유연하다. 그러므로 폴리머의 열적·기계적 성질들은 모노머의 종류에 따라 크게 달라진다. 그리고 같은 모노머 종류로 구성된 두 공중합체가 비슷한 모노머 조성비를 가질지라도 미세구조가 다르면 열전이와 기계적 강도 같은 물리화학적 성질 및 효소에 의한 분해속도가 완전히 달라지게 된다[8,29]. 따라서 미생물 폴리에스터를 공중합형 기능성 신소재로 개발하기 위해서는 먼저 폴리머의 모노머 조성 및 미세구조를 적합한 용도에 맞게 조절할 수 있어야 한다. 이를 위해서는 세균의 종류, 탄소원의 이용성, 배양조건의 변화 등에 따라 폴리에스터의 합성과 분해동안 세균들의 세포내에

*Corresponding author
Tel. 0591-751-5942, Fax. 0591-759-0187
E-mail: scyoona@nongae.gsnu.ac.kr

서 일어나는 생리적 특성을 이해하는 것이 중요하다.

P(3HB-co-3HV) 공중합폴리머는, 1981년 영국의 ICI사에서 최초로 glucose와 propionic acid로부터 *Ralstonia eutropha*에 의해 생산, "Biopol"이라는 상품명으로 시판한 이래 산업적 대량생산 측면에서 많은 연구가 이루어지고 있다. 그러나 대부분의 세균들이 이러한 공중합체들을 합성하기 위해서는 주탄소원외에 propionate나 valerate 같은 precursor 기질을 공급해야 하는데, 이러한 기질들의 이용은 상대적으로 낮은 농도에서도 독성이 강할뿐 아니라 가격이 비싸기 때문에 산업적 생산에 커다란 단점이 되고있다 [9,21]. 그러나 최근에 Anderson과 Haywood 등은 *Rhodococcus* sp., *Nocardia* sp., *Corynebacterium* sp. 등의 그람 양성세균들이 단일 탄소원으로서 모노머 구조와 전혀 상관없는(unrelated) glucose와 같은 단순 탄수화물로부터 P(3HB-co-3HV) 공중합체를 축적한다고 보고하였다[14]. 또한 Steinbüchel에 의해 *R. eutropha*의 R3 돌연변이주도 unrelated 단일 탄소원으로부터 P(3HB-co-3HV) 공중합체를 합성할 수 있다고 보고되었다[26].

폴리머에 4HB 모노머의 도입은 Doi 등에 의해 처음 보고되었다[10,18]. 이들은 *R. eutropha* H16을 이용하여 다양한 모노머 조성비를 가지는 3HB와 4HB로 구성된 공중합체들을 합성하였다. 최근에 Saito와 Doi는 4-hydroxybutyric acid나 1,4-butanediol 단독탄소원에서 성장시킬 때 건조세포중량의 약 21~28 wt%까지 P(4HB) homopolymer를 축적하는 *Comamonas acidovorans* DS-17을 분리하였다[22]. 또한 윤 등은 *Hydrogenophaga pseudoflava* 균주가 glucose와 γ -butyrolactone의 공동기질에서 다양한 모노머 조성의 P(3HB-co-4HB) 공중합체들을 축적하며, 단독기질로 γ -butyrolactone으로부터 배양방법에 따라 P(3HB-co-4HB) 공중합체나 P(4HB) homopolymer를 합성한다고 보고하였다[4,6].

본 연구에서는 대표적 short-chain-length(SCL)-PHA 합성 세균인 *R. eutropha* H16과 *H. pseudoflava*를 이용 3HV와 4HB 모노머를 생산하는 락톤형의 여러 가지 precursor들을 공동기질로 이용하여 공중합 PHA를 합성할때 두 세균이 합성한 공중합폴리에스터의 미세구조적 차이가 어떠한지를 조사하였다. 그리고 *H. pseudoflava*에 의해 합성된 P(3HB-co-4HB) 공중합체들의 열적 성질을 조사하여 미세구조와의 상관관계를 조사하였다. 마지막으로 *R. eutropha* H16에 의해 모노카이복시산 기질농도 등에 따라 미세구조가 바뀌는 여러 P(3HB-co-3HV) 공중합체가 합성됨을 NMR 분광학에 의해 확인하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 SCL-polyesters의 대표적 생합

성 세균인 *Hydrogenophaga pseudoflava* ATCC 33668과 *Ralstonia eutropha* H16(ATCC 17699)으로 American Type Culture Collection에서 구입하였다. 본 연구에 사용한 배지는 nutrient broth 배지, Luria-Bertani(LB) 배지, 그리고 mineral salt 배지였다. Nutrient broth 배지(1% yeast extract, 1.5% nutrient broth, 0.4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0)는 균주의 유지와 보관, 그리고 종 배양을 위해 사용하였으며, 고체배지를 위해 1.5%의 Bacto agar를 첨가하였다. 폴리머 축적 없이 세균이 잘 자랄 수 있는 영양배지로는 LB 배지를 사용하였는데, tryptone 10 g, yeast extract 5 g, 그리고 NaCl 10 g이 1 L(pH 7.0)에 들어있는 배지였다. PHA 생합성에서는 mineral salt 배지를 사용하였으며, 조성은 다음과 같다. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, NaHCO_3 0.4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{citrate}$ 0.05 g, microelement 용액 1 ml이 1 L의 30 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ buffer (pH 7.0)에 들어있으며, 각 탄소원과 질소원 (황산암모늄)의 농도는 필요에 따라 변화시켰다.

배양시간에 따른 세포성장의 측정

균체성장은 세포 배양동안 4~5 시간별로 분광광도계(Spectronic 20)를 이용하여 660 nm에서 배양액의 흡광도를 측정함으로써 관찰하였다. 그리고 시간에 따른 탄소원과 질소원의 소모, PHA의 함량 및 모노머의 조성변화 등을 관찰하기 위하여 4~5 시간별로 세포배양액을 분리하여 원심분리후, 배지 상등액과 세포 침전물을 따로 회수하였다. 배지에 남아있는 NH_4^+ 의 양은 Nessler 시약법으로 정량하였다[12]. 시간에 따른 γ -butyrolactone의 양과 PHA의 모노머 조성변화는 Carbowax column(Hewlett Packard)과 flame ionization detector(FID)가 장치된 gas chromatograph(Hewlett Packard 5890A)로 분석하였다[3,4].

폴리에스터의 생합성 및 순수분리

*H. pseudoflava*와 *R. eutropha* H16 균주를 각각 5 ml의 nutrient broth가 들어 있는 시험관에 접종후 약 15 시간동안 배양하였다. 1단계 배양에서는 접종액을 PHA 합성배지에서 약 72 시간 배양하여 폴리머 축적을 유도하였고, 2단계 배양에서는 접종액을 영양배지에서 24 시간 배양한후 PHA 합성배지로 옮겨 폴리머 합성을 유도하였다. *H. pseudoflava*와 *R. eutropha* H16를 각각 35°C와 30°C에서, 190 rpm으로 조절된 진탕배양기(고려기기, 서울, 한국)에서 호기성조건으로 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리(7,000 rpm, 10 min)하여 건조시킨 후 세포내의 폴리에스터를 클로로포름 용액으로 추출하고 메탄올 용액에 침전시켜 순수분리 하였다[4]. 폴리머의 purity는 gas chromatography 분석으로 확인하였다[3,4].

폴리에스터의 분석방법

NMR spectroscopy

순수분리된 폴리머들의 모노머 unit의 정량적 조성은 ^1H NMR(Bruker-DRX 500 MHz spectrometer)로 결정하였다 [4,5]. 폴리에스터들의 dyad sequence를 결정하기 위해 Varian UNITY-300 spectrometer 또는 Bruker-DRX 500 NMR spectrometer로부터 ^1H noise decoupled ^{13}C NMR 스펙트럼을 구하였다[4,29].

Differential scanning calorimetry(DSC)

폴리에스터들의 유리전이온도(glass transition temperature, T_g), 용점(melting temperature, T_m), 융해열(enthalpy of fusion, ΔH) 등은 TA differential scanning calorimeter (DuPont 2100, DSC V4.0B)를 이용하여 측정하였다. 세포로부터 분리, 건조된 폴리머 시료들은 평형에 가까운 결정화가 일어나도록 실온에서 약 10주정도 보관한 후 열분석을 시행하였다. 각 시료의 양은 약 10 mg정도로 하였다. 시료를 먼저 -100°C 에서 200°C 까지 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 로 가열한 후 식혔다가 다시 같은 조건하에서 가열하였다. T_m 과 ΔH 는 DSC endotherm으로부터 구하였고, T_g 는 열용량의 변화가 일어나는 지점의 mid-point를 택하였다. calorimetric calibration에는 indium(In)을 이용하였다.

Enzymatic degradation

*Hydrogenophaga pseudoflava*로부터 분리된 P(3HB-co-4HB) 공중합체들의 효소적 분해를 관찰하기 위해 클로로포름에 폴리머들을 녹여 5% 용액(wt/v)으로 만든 후 필름으로 casting하였다[23]. 50 mM Tricine-NaOH/0.01 mM CaCl_2 용액(pH 8.0)에 2.0 cm^2 표면적($1.0\text{ cm} \times 1.0\text{ cm}$)의 필름들과 *Aspergillus fumigatus*의 PHB 분해효소 20 μl (42 $\mu\text{g}/\text{ml}$ protein)를 넣은 후 45°C 에서 일정시간 간격으로 폴리머의 감량 등을 관찰하였다[23].

Measurement of microstructural heterogeneity

공중합체들의 미세구조의 불균일성 정도는 ^{13}C NMR data로부터 계산된 parameter D에 의해 결정될 수 있다 [10,16]. $D=(F_{BB}F_{VV})/(F_{VB}F_{BV})$ 로 정의된다. F_{ij} 는 두 모노머 i , j 가 공중합할 때 이웃하는 모노머 i , j 의 순서에 따라 결합된 dyad fraction이다. Bernoullian random model을 따른다면 D 값이 1인 공중합체는 random copolymer이며, 1보다 큰 D 값을 가지는 공중합체들은 blocky copolymer이다.

결과 및 고찰

락톤의 단독기질로부터 공중합폴리에스터의 생합성

1단계 배양법을 이용하여 다양한 lactones에서 *R. eutropha* H16과 *H. pseudoflava*를 배양하였을 때 두 세균 모두 $\text{C}_4\text{-C}_6$ 의 γ -락톤에서는 세포성장 및 폴리머 합성을 보이지만 $\text{C}_8\text{-C}_{10}$ 의 락톤에서는 자라지도 않았다(Table 1). *H. pseudoflava*의 경우 5 mM의 황산암모늄이 들어있는 PHA

합성배지에서 탄소원으로 낮은 농도(0.9 g/L)의 γ -butyrolactone을 이용하였을 때는 성장하였으나 락톤의 농도가 더 높아지면 세포가 자라지 못하였다. 세포성장 농도에서 세포가 성장을 하기까지는 3~4일의 긴 유도기가 필요했고, 합성된 폴리머는 3HB와 4HB의 공중합체였다. *R. eutropha* H16은 높은 γ -butyrolactone의 농도에서도 잘 자라나 4HB 함량이 매우 낮은 P(3HB-co-4HB) 폴리머를 합성하였다. ϵ -Caprolactone에서 *H. pseudoflava*가 자라지 못한 반면, *R. eutropha*는 4.12 g/L의 높은 농도에서도 좋은 성장을 보였고 4HB 함량도 γ -butyrolactone에서보다 더 잘 폴리머로 도입되었다. 그러나 락톤의 농도에 상관없이 4HB 함량이 약 35 mol%로 일정하므로 다양한 조성의 P(3HB-co-4HB) 공중합체를 얻을 수 없었다. γ -Valerolactone 기질에서 *H. pseudoflava*는 1.06 g/L 이하의 낮은 농도에서만 성장가능하고 P(3HB-co-3HV) 공중합체를 합성하였다. 반면, *R. eutropha* H16은 높은 γ -valerolactone 농도에서도 잘 자라며 3HV 함량이 80 mol% 이상인 P(3HB-co-3HV) 공중합체를 합성하였으나, 기질의 농도에 상관없이 공중합체중의 3HV 함량이 일정하였다.

당과 락톤의 공동기질로부터 공중합폴리에스터의 생합성

1단계 배양에 의해 락톤의 단독기질에서 두 세균 모두 조성이 다양한 3HB와 3HV 또는 3HB와 4HB의 공중합체를 합성하지 못하므로 이를 위해 공동기질 배양을 수행하였다. 공동기질 배양이란 세포 성장에 이용성이 높은 탄소원과 3HV나 4HB의 축적을 위해 모노머와 구조가 유사한 precursor 탄소원을 동시에 합성 배지에 첨가하여 세포를 배양하는 것이다. 세포 성장에 이용되는 기질의 조사에서 *H. pseudoflava*는 glucose에서 성장율이 가장 좋았던 반면, *R. eutropha* H16은 fructose에서 가장 잘 자랐다(data는 보이지 않았음). 다양한 농도의 γ -butyrolactone과 10 g/L fructose 공동기질에서 *R. eutropha* H16을 배양하였을 때 γ -butyrolactone의 농도가 증가해도 4HB 함량은 20 mol% 이하로 낮은 P(3HB-co-4HB) 폴리머들이 합성되었다(Table 2). 그러나 glucose와 γ -butyrolactone의 공동기질에서 자란 *H. pseudoflava*는 γ -butyrolactone의 농도가 증가함에 따라 4HB 함량이 66 mol%까지 증가하는 다양한 조성의 공중합체를 합성하였다. *R. eutropha* H16이 합성한 P(3HB-co-4HB) 공중합체들은 1에 가까운 D 값을 가지는 미세구조가 매우 균일한 폴리머였다. 반면, 이전의 실험에서, *H. pseudoflava*에 의해 합성된 P(3HB-co-4HB) 공중합체들은 3.31~11.27의 높은 D 값을 가지며 미세구조가 매우 균일하지 못하였다[4]. 당과 γ -valerolactone의 공동기질에서 두 세균 모두 락톤의 농도가 증가함에 따라 3HV 함량이 약 60 mol%까지 증가하는 다양한 조성의 P(3HB-co-3HV) 공중합체를 합성하였다. 두 세균에 의해 glucose와 γ -valerolactone의 공동기질로부터 합성된 P(3HB-co-3HV)

공중합체들은 모두 1에 가까운 D 값을 가지는 random copolymer였다.

2단계 배양에 의해 락톤으로부터 공중합 폴리에스터의 생합성

공중합모노머인 3HB가 거의 도입되지 않는 3HV나 4HB homopolymer를 합성하기위해 두 세균을 2단계 배양하였다. 2단계 배양법이란 일반적으로 폴리머 축적은 거의 일어나지 않고 세포성장이 왕성한 영양배지에서 1단계로 세포를 배양한 후 폴리머 축적이 유도되는 합성배지로 세포만을 옮겨 2단계로 배양하는 방법이다. 1단계의 LB 배지에서 자란 *H. pseudoflava* 세포들을 회수하여 γ -butyrolactone(2.24 g/L)과 0.6 g/L의 황산암모늄이 첨가된 PHA 합성배지로 옮긴후 48 시간동안 배양했을때 4HB 함량이 약 96 mol%인 P(3HB-co-4HB) 공중합체가 합성되었다(Table 3). 그러나 *H. pseudoflava*는 1단계의 질소원이 풍부한 조건하에서도 P(3HB)를 약 11%(PHB weight/cell dry weight)정도 세포내에 축적하였다(data는 보이지 않았음). 1단계에서 축적된 P(3HB)는 2단계 배양동안 빠른속도로 분해됨과 동시에 4HB 시슬내로 재도입되므로 순수한 P(4HB)를 합성할 수 없다는 것이 이전의 실험에서 ^{13}C NMR 분석으로 확인되었다[6]. *R. eutropha* H16의 경우, 2단계 배양에 의해서도 γ -butyrolactone의 농도증가에 상관없이 4HB 함량이 약 15 mol%로 일정한 P(3HB-co-4HB) 공중합체가 합성되었다(Table 3). 두 세균을 2단계 배양에 의해 γ -valerolactone에서 배양했을때 *H. pseudoflava*는

3HV 모노머가 약 85 mol%까지 도입되는 P(3HB-co-3HV) 공중합체를 합성하였으나, *R. eutropha* H16은 3HV 함량이 20 mol% 이하로 낮은 폴리머들을 합성하였다.

P(3HB-co-4HB) 공중합체의 특성

*H. pseudoflava*에 의해 glucose와 γ -butyrolactone의 공동기질로부터 합성된 P(3HB-co-4HB) 공중합체들은 4HB 함량이 증가함에 따라 T_m 과 ΔH 값이 감소하였다(Table 4). 3HB와 4HB가 51:49로 도입된 공중합체의 경우 52.5와 130.3°C에서 두 개의 T_m 이 관찰되었다. *Aspergillus fumigatus*로부터 분리된 P(3HB) depolymerase 효소에 의한 분해속도 실험에서 4HB 함량이 증가함에 따라 P(3HB-co-4HB) 공중합체 필름들의 분해속도는 증가하였다(Table 4). 이것은 P(3HB-co-4HB) 공중합체의 분해속도가 폴리머의 결정성과 강한 관계가 있음을 나타낸다.

γ -Butyrolactone의 대사조절에 의한 P(3HB-co-4HB) 공중합체의 합성과 미세구조 특성

γ -Butyrolactone에서 두 세균이 세포성장과 폴리머 조성에 있어 큰 차이를 보이는 것은 기질대사에 대한 생리적 차이때문인 것으로 보인다. 4-Hydroxybutyric acid(4HBA)의 대사에 관여하는 효소들중 4HBA dehydrogenase가 acetyl-CoA와 4HB-CoA의 농도를 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고된바 있다[6,27]. γ -Butyrolactone도 ring-opening 과정을 제외하고는 4HBA와 비슷한 대사경로를 거쳐 분해되리라 생각된다. *R. eutropha* H16은 γ -

Table 1. Biosynthesis of copolyesters by *R. eutropha* H16 and *H. pseudoflava* from various lactones using one-step cultivation

	carbon source	(g/L)	culture time(h)	cell dry weight (g/L)	polyester content (wt%)	polyester composition (mol%) ^{a)}		
						3HB ^{b)}	4HB	3HV
<i>R. eutropha</i> H16	γ -butyrolactone	2.24	72	0.396	13	96	4	
	γ -butyrolactone	3.36	72	1.105	17	95	5	
	γ -valerolactone	2.12	72	0.903	12	18		82
	γ -valerolactone	3.18	72	1.140	14	16		84
	γ -valerolactone	4.24	72	1.182	19	17		83
	γ -caprolactone	2.06	72	1.600	19	100		
	ϵ -caprolactone	2.06	72	2.251	26	64	36	
	ϵ -caprolactone	3.09	72	2.639	31	66	34	
	ϵ -caprolactone	4.12	72	1.371	38	70	30	
	γ -octanoic lactone	0.49	240	no growth				
	γ -nonanoic lactone	0.49	240	no growth				
	γ -decanolactone	0.38	240	no growth				
	<i>H. pseudoflava</i>	γ -butyrolactone	0.09	168	0.658	8	44	56
γ -valerolactone		1.06	120	0.873	10	69		31
γ -caprolactone		1.03	96	1.013	13	100		
ϵ -caprolactone		1.03	240	no growth				
γ -octanoic lactone		0.49	240	no growth				
γ -nonanoic lactone		0.49	240	no growth				
γ -decanolactone		0.38	240	no growth				

a) Calculated from ^1H NMR and GC data.

b) 3HB, 3-hydroxybutyric acid; 4HB, 4-hydroxybutyric acid; 3HV, 3-hydroxyvaleric acid.

Table 2. Biosynthesis of copolyesters by *R. eutropha* H16 and *H. pseudoflava* from the mixed substrates of sugars/lactones using one-step cultivation

	carbon source	(g/L)	culture time (h)	cell dry weight (g/L)	polyester content (wt%)	polyester composition (mol%) ^{a)}			D ^{c)}
						3HB ^{b)}	4HB	3HV	
<i>R. eutropha</i> ^{d)} H16	γ -butyrolactone	2.24	48	3.47	54	88	12		1.32
	γ -butyrolactone	4.48	72	2.34	38	84	16		
	γ -butyrolactone	6.72	192	2.77	42	86	14		
	γ -butyrolactone	8.96	192	3.10	49	84	16		
	γ -valerolactone	2.12	48	5.00	49	86		14	1.87
	γ -valerolactone	4.24	48	4.85	50	80		20	
	γ -valerolactone	6.36	48	3.41	48	60		40	
	γ -valerolactone	8.48	72	2.11	36	38		62	
<i>H. pseudoflava</i> ^{e)}	γ -butyrolactone	1.12	72	3.40	71	87	13		6.25
	γ -butyrolactone	1.68	72	3.54	71	78	22		6.98
	γ -butyrolactone	2.24	72	2.87	63	75	25		8.28
	γ -butyrolactone	2.80	120	1.49	38	51	49		11.27
	γ -butyrolactone	3.36	120	1.53	35	34	66		3.31
	γ -valerolactone	1.06	72	3.46	68	80		20	1.62
	γ -valerolactone	1.59	72	4.04	68	71		29	1.21
	γ -valerolactone	2.12	72	3.82	66	52		48	1.48
	γ -valerolactone	2.65	72	3.50	54	45		55	1.35
	γ -valerolactone	3.18	72	2.46	57	39		61	1.30

a) Calculated from ¹H NMR and GC data.

b) 3HB, 3-hydroxybutyric acid; 4HB, 4-hydroxybutyric acid; 3HV, 3-hydroxyvaleric acid.

c) $D = (F_{BB}F_{VV}) / (F_{BV}F_{VB})$, where F_{BB} stands for mole fraction of -3HB-3HB- sequence, F_{VV} for mole fraction of -3HV-3HV- sequence, F_{BV} for mole fraction of -3HB-3HV- sequence, and F_{VB} for mole fraction of -3HV-3HB- sequence. The mole fraction of the dyad sequences was determined from the ¹³C NMR spectra. The calculated data from each run are within $\pm 5\%$ error range.

d) Ten grams of fructose was co-fed to the medium in initial cultivation of *R. eutropha* H16.

e) Ten grams of glucose was co-fed to the medium in initial cultivation of *H. pseudoflava*. The data were cited from Ref. 4.

Table 3. Biosynthesis of copolyesters by *R. eutropha* H16 and *H. pseudoflava* from γ -butyrolactone or γ -valerolactone as a sole carbon source using two-step cultivation

	carbon source	(g/L)	culture time (h)	cell dry weight (g/L)	polyester content (wt%)	polyester composition (mol%) ^{a)}		
						3HB ^{b)}	4HB	3HHV
<i>R. eutropha</i> H16	γ -butyrolactone	2.24	48	3.06	9	86	14	
	γ -butyrolactone	3.36	48	3.87	10	85	15	
	γ -butyrolactone	4.48	48	4.77	11	85	15	
	γ -butyrolactone	5.60	48	4.98	11	83	17	
	γ -valerolactone	2.12	48	3.24	14	82		18
	γ -valerolactone	3.18	48	3.01	16	81		19
<i>H. pseudoflava</i>	γ -butyrolactone	1.12	48	1.94	19	23 \pm 1	77 \pm 1	
	γ -butyrolactone	2.24	48	2.20	23	4 \pm 2	96 \pm 2	
	γ -butyrolactone	3.36	48	2.10	17	13 \pm 2	87 \pm 2	
	γ -valerolactone	1.06	15	2.45	21	45		55
	γ -valerolactone	2.12	15	2.62	25	22		78
	γ -valerolactone	3.18	24	2.94	30	15		85

a) Calculated from ¹H-NMR and GC data.

b) 3HB, 3-hydroxybutyric acid; 4HB, 4-hydroxybutyric acid; 3HV, 3-hydroxyvaleric acid.

butyrolactone의 단독기질(Table 1)에서 성장동안 빠른 시간 내에 4HBA dehydrogenase를 대량 발현하여 γ -butyrolactone을 대부분 acetyl-CoA로 전환시킨다[6]. 반면에, *H. pseudoflava*의 경우, 낮은 기질농도에서도 4HBA dehydrogenase의 발현을 위해 긴 유도기가 필요하고 발현

정도도 낮으므로, 세포성장은 낮으나 4HB 함량이 약 50 mol% 정도 도입된 P(3HB-co-4HB) 공중합체가 합성되었을 것으로 생각된다[6].

Table 2의 당과 γ -butyrolactone의 공동기질에서, *R. eutropha*의 경우 γ -butyrolactone을 단독기질로 이용할때와

마찬가지로 락톤이 공동기질인 fructose와 함께 세포성장을 위해 빠르게 대사되므로 폴리머중의 4HB 함량이 20 mol% 이하로 낮다고 생각된다. 그러나 *H. pseudoflava*는 공동기질로 첨가한 glucose를 이용하여 세포성장을 하는 동안 γ -butyrolactone 단독기질에서와는 달리 짧은 배양시간(72 시간)내에 4HBA dehydrogenase가 거의 발현되지 못할 것이다. 따라서 대부분의 γ -butyrolactone이 acetyl-CoA 대신에 4HB-CoA로 전환되어 폴리머 사슬내로 도입되므로 락톤의 농도증가에 따라 4HB 함량이 증가되었다고 생각된다. 공중합체중의 3HB 모노머들은 공동기질로 첨가된 glucose로부터 축적된 것이다[4]. 이러한 사실은 Table 3의 2단계 배양의 결과에서도 추측할 수 있다. *H. pseudoflava*가 2단계 배양의 γ -butyrolactone이 첨가된 합성배지에서 짧은 배양시간(48 시간)동안 매우 낮은 수준의 4HBA dehydrogenase의 활성에 의해 acetyl-CoA의 공급이 충분하지 않으므로 3HB 모노머들이 거의 형성되지 않았을 것으로 생각된다[6].

R. eutropha H16에 의해 합성된 P(3HB-co-4HB) 폴리머는 1에 가까운 D 값을 가지는 random copolymer였다 (Table 2). 이미 Doi 등에 의해서도 *R. eutropha* H16에 의해 합성된 P(3HB-co-4HB) 공중합체들은 미세구조가 균일한 random copolymer였다고 보고된바 있다[10]. 그러나 *H. pseudoflava*로부터 합성된 폴리머는 1보다 아주 큰 D 값(3.31~11.27)을 가지는 조성이 매우 다른 공중합체들이 섞여있는 상태였다. 두 세균에 의해 합성된 P(3HB-co-4HB) 폴리머의 D 값이 큰 차이를 보이는 것은 역시 γ -butyrolactone의 이용성 때문인 것으로 생각된다. *R. eutropha* H16의 경우 fructose와 γ -butyrolactone이 배양초기부터 동시에 세포성장과 폴리머 축적에 빠르게 이용되므로 균일한 미세구조를 가진 P(3HB-co-4HB) 공중합체가 합성되었을 것이다. 그러나 *H. pseudoflava*는 72 시간의 짧은 배양동안 세포성장에는 주로 glucose만을 이용하고 γ -butyrolactone은 4HB 전구체 생산에 이용한다[4]. 따라서 세포성장이 활발한 배양초기에는 주로 γ -butyrolactone으로부터 4HB-rich한 폴리에스터가 축적되는 반면 배양 후기에는 세포성장에 더 이상 이용되지 않고 남아있는 glucose로부터 3HB-rich한 폴리에스터가 축적되어, 최종적으로 합성된 폴리머는 4HB-rich 폴리머와 3HB-rich 폴리머의 혼합물, 미세구조가 매우 균일하지 못하였을 것으로 생각 된다.

P(3HB-co-4HB) 공중합체의 미세구조와 열적성질사이의 상관관계

일반적으로 두 다른 폴리머들의 mixture는 그들 사이의 불리한 열역학적 상호작용 때문에 두 개의 다른 domain에서 결정화가 일어난다[19,29]. 이렇게 형성된 섞이기 어려운 폴리머 blend를 용융시키면 두 개의 melting endotherm이 보인다. *H. pseudoflava*에 의해 합성된 P(3HB-

co-4HB) 공중합체들중 D=11.27 시료는 53°C 근처와 130°C에서 두 개의 endotherm을 보였다(Fig. 1). 이러한 사실은 *H. pseudoflava*에 의해 합성된 D=11.27의 P(3HB-co-4HB) 공중합체가 3HB-rich 폴리머와 4HB-rich 폴리머의 mixture라는 것을 증명해주며, DSC transition으로부터 또한 폴리머의 미세구조 불균일성을 확인할 수 있음을 의미한다.

미세구조가 조절된 P(3HB-co-3HV) 공중합폴리에스터의 생합성

미생물에 의한 기질 이용성과 PHA 미세구조사이의 상관관계를 이해하는 것은 응용성에 적합한 고분자를 합성해야 하는 점에서 중요하다. 따라서 락톤이외의 기질 이용성에

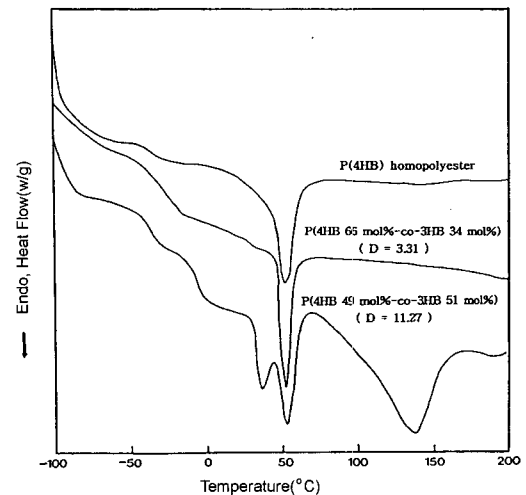


Fig. 1. Thermal transitions of P(4HB) homopolymer and P(3HB-co-4HB) with different NMR D values. Samples were prepared as described in "Materials and methods".

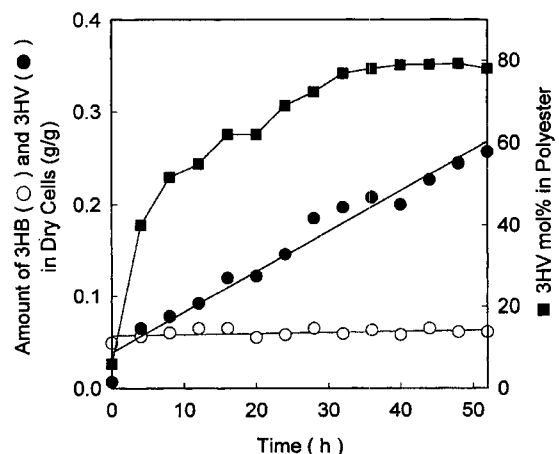


Fig. 2. Time course of composition change of the polyester in *R. eutropha* H16 grown on valeric acid(25 g/L) as a single carbon source(2nd step cultivation). The 3HV mol% in polyester was relative mole percent for the 3HV monomer of total PHA accumulated in dried cells.

Table 4. Thermal properties and NMR microstructures of P(3HB-co-4HB) copolyesters^{a)} synthesized by *H. pseudoflava* from the mixed substrates of glucose and γ -butyrolactone

copolyesters	T _g (°C)	T _m (°C)	Δ H (J/g)	weight loss rate (mg/cm ² hr)	D ^{b)}
P(87 mol% 3HB-co-13 mol% 4HB)	1.7	169.0	53.3	0.242	6.25
P(78 mol% 3HB-co-22 mol% 4HB)	-10.5	161.2	31.8	0.219	6.98
P(75 mol% 3HB-co-25 mol% 4HB)	-14.0	163.4	39.1	0.260	8.28
P(51 mol% 3HB-co-49 mol% 4HB)	-15.0	52.8±130.3 ^{c)}	15.9	0.461	11.27
P(34 mol% 3HB-co-66 mol% 4HB)	-20.0	52.3	12.7	0.755	3.31

^{a)} The data were those obtained with the polymer samples in Table 2.

^{b)} $D=(F_{BB}F_{VV})/(F_{BV}F_{VB})$, where F_{BB} stands for mole fraction of -3HB-3HB-sequence, F_{VV} for mole fraction of -3HV-3HV-sequence, F_{BV} for mole fraction of -3HB-3HV-sequence, and F_{VB} for mole fraction of -3HV-3HB-sequence. The mole fraction of the dyad sequences was determined from the ¹³C NMR spectra. The calculated data from each run are within $\pm 5\%$ error range.

^{c)} Two endotherms were observed.

Table 5. NMR microstructure of P(3HV-co-3HB) copolyesters synthesized by *R. eutropha* H16 from the mixed substrates of butyrate/valerate or a single carbon source of valerate using two-step cultivation

carbon source (g/L)	cell dry weight (g/L)	polyester content (wt%)	polyester composition (mol%) ^{a)}		dyad sequence				D ^{c)}
			3HB ^{b)}	3HV	F _{BB}	F _{BV}	F _{VB}	F _{VV}	
bu(17.5) + val(2.5)	6.6	38.5	90	10	0.76	0.10	0.10	0.04	3.04
bu(15.0) + val(5.0)	7.1	42.0	83	17	0.64	0.14	0.15	0.07	2.13
bu(12.5) + val(7.5)	5.3	30.7	64	36	0.44	0.19	0.19	0.18	2.19
bu(10.0) + val(10.0)	5.6	23.0	53	47	0.31	0.23	0.21	0.25	1.60
bu(7.5) + val(12.5)	5.7	20.7	47	53	0.25	0.20	0.25	0.30	1.50
bu(5.0) + val(15.0)	5.5	25.9	28	72	0.12	0.14	0.20	0.54	2.31
bu(2.5) + val(17.5)	5.7	26.5	27	73	0.11	0.12	0.23	0.54	2.15
valerate (5)	4.9	16.1	51	49	0.24	0.17	0.21	0.38	2.55
valerate (10)	4.3	16.5	48	52	0.24	0.15	0.25	0.36	2.30
valerate (15)	4.4	19.6	38	62	0.16	0.14	0.23	0.47	2.34
valerate (20)	4.3	23.8	25	75	0.08	0.09	0.20	0.63	2.80
valerate (25)	4.9	23.5	20	80	0.08	0.07	0.13	0.72	6.33
valerate (30)	3.2	4.7	59	41	0.36	0.20	0.16	0.28	3.15

^{a)} Calculated from ¹H NMR and GC data.

^{b)} 3HB, 3-hydroxybutyric acid; 3HV, 3-hydroxyvaleric acid.

^{c)} $D=(F_{BB}F_{VV})/(F_{BV}F_{VB})$, where F_{BB} stands for mole fraction of -3HB-3HB- sequence, F_{VV} for mole fraction of -3HV-3HV- sequence, F_{BV} for mole fraction of -3HB-3HV- sequence, and F_{VB} for mole fraction of -3HV-3HB- sequence. The mole fraction of the dyad sequences was determined from the ¹³C NMR spectra. The calculated data from each run are within $\pm 5\%$ error range.

대해서도 연구할 필요가 있다. *H. pseudoflava*는 모노카아복시산과 디카아복시산에서 전혀 성장을 하지 않는 것으로 보고되었다[4]. 그러나 *R. eutropha* H16은 2단계 배양에서 이러한 카아복시산을 이용하여 PHA를 합성하는 것으로 알려져 있다[24]. *R. eutropha* H16을 2단계 배양에 의해 valerate 단독기질이나 butyrate와 valerate의 공동기질에서 배양하였을 때 다양한 조성의 P(3HB-co-3HV) 공중합체가 합성되었다(Table 5). Valerate 단독기질의 경우 기질의 농도가 증가함에 따라 3HV 함량도 증가하였다. 25 g/L의 valerate 농도에서 3HV 함량은 약 80 mol%였다. 그러나 3HV 함량이 급격히 증가하므로써 D 값이 약 2.5에서 6.3으로 증가하였다. 이것은 높은 기질농도에서 3HV 함량의 급격한 증가로 인해 합성된 폴리머가 random type의 공중합체를 이루지 않고 3HB-rich 폴리머와 3HV-rich 폴리머가 서로 섞여있는 mixed type의 공중합체를 형성함을 의미

한다. Fig. 2는 2단계 배양의 valerate 단독기질에서 시간에 따른 폴리머 조성변화를 관찰한 것이다. 1단계 영양배지에서 축적된 3HB는 2단계 배양동안 일정하게 유지되었고, 2단계에서는 valerate로부터 3HV만이 꾸준히 축적되었다. 이로부터 2단계 배양에 의해 valerate에서 자란 세포에서는 1단계에서 축적된 P(3HB) 폴리머와 2단계에서 축적된 3HV-rich 폴리머가 서로 섞여 있다는 것을 알 수 있다. Butyrate와 valerate의 공동기질에서도 valerate 농도가 증가함에 따라 3HV 함량이 증가하였다(Table 5). 특히 두 기질의 농도가 비슷할 때 3HB와 3HV의 상대적 함량이 거의 같으며 D값도 거의 1에 가까운 random copolymer가 합성되었다. 이것은 비슷한 농도에서 폴리머 축적에 두 기질이 거의 같은 속도로 이용되기 때문인 것으로 생각된다. Fig. 3의 시간에 따른 폴리머의 조성변화로부터 이러한 사실을 확인할 수 있다.

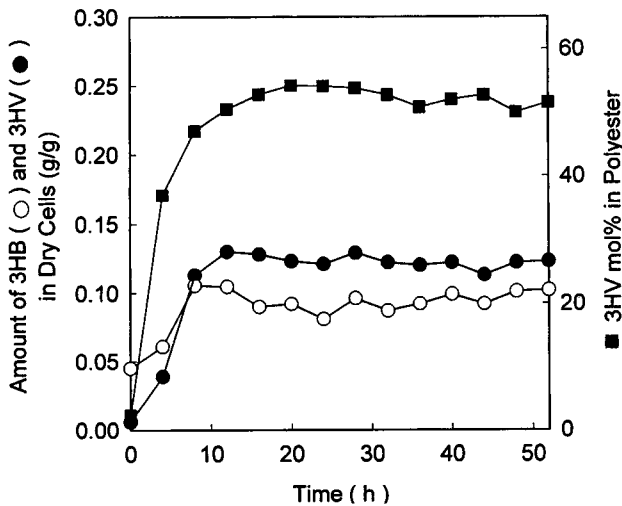


Fig. 3. Time course of composition change of the polyester in *R. eutropha* H16 grown on the mixed substrates of butyrate (10 g/L) and valerate (10 g/L) (2nd step cultivation). The 3HV mol% in polyester was relative mole percent for the 3HV monomer of total PHA accumulated in dried cells.

요 약

R. eutropha H16과 *H. pseudoflava*는 γ -butyrolactone과 γ -valerolactone을 이용하여 미세구조가 다른 다양한 조성의 P(3HB-co-4HB)와 P(3HB-co-3HV) 공중합체를 각각 합성하였다. 두 세균은 세포성장과 PHA 합성에 대한 γ -butyrolactone의 이용성에 큰 차이를 보였다. *H. pseudoflava*는 배양조건에 따라 γ -butyrolactone로부터 4HB 함량이 13~96 mol%로 다양한 조성의 P(3HB-co-4HB) 공중합체들을 합성하였던 반면, *R. eutropha* H16은 4HB 함량이 20 mol% 이하인 공중합체들만 합성할 수 있었다. *H. pseudoflava*에 의해 합성된 P(3HB-co-4HB) 공중합체들의 4HB 함량이 증가함에 따라 용점과 용해열의 값은 감소하였으나, P(3HB) 분해효소에 의한 분해속도는 증가하였다. *H. pseudoflava*에 의해 합성된 P(3HB-co-4HB) 공중합체들은 일반적으로 불균일한 미세구조를 보였으며, 이것은 NMR과 DSC 분석에 의해 확인되었다. *R. eutropha* H16에 의해 합성된 P(3HB-co-4HB) 공중합체들은 *H. pseudoflava*에 의해 합성된 공중합체들에 비해 균일한 미세구조를 보이는 random copolymers였다. *R. eutropha* H16과 *H. pseudoflava* 두 세균에 의해 합성된 P(3HB-co-3HV) 공중합체들은 NMR 분석으로부터 계산된 D 값에 의하면 상대적으로 random하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 지원(KOSEF 97-0401-03-01-3)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Anderson, A. J. and E. A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**: 450-472.
- Brandl, H., R. A. Gross, R. W. Lenz, and R. C. Fuller. 1990. Plastics from bacteria and for bacteria: poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **41**: 77-93.
- Brandl, H., R. A. Gross, R. W. Lenz, and R. C. Fuller. 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1977-1982.
- Choi, M. H., J. J. Song, and S. C. Yoon. 1995. Biosynthesis of copolyesters by *Pseudomonas pseudoflava* from various lactones. *Can. J. Microbiol.* **41**(Suppl. 1): 60-67.
- Choi, M. H. and S. C. Yoon. 1994. Polyester biosynthesis characteristics of *Pseudomonas citronellolis* grown on various carbon sources, including 3-methylbranched substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3245-3254.
- Choi, M. H., S. C. Yoon, and R. W. Lenz. 1999. Production of poly(3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid) and poly(4-hydroxybutyric acid) without subsequent degradation by *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1570-1577.
- Colin, W. P. and S. Akhtar. 1996. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **18**: 133-162.
- Doi, Y. 1990. *Microbial polyesters*. VCH Publishers, New York.
- Doi, Y., M. Kunioka, Y. Nakamura, and K. Soga. 1986. Nuclear magnetic resonance studies on poly(β -hydroxybutyrate) and a copolyester of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Macromolecules*. **19**: 2860-2864.
- Doi, Y., Y. Nakamura, and K. Soga. 1988. Nuclear magnetic resonance studies on unusual bacterial copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate. *Macromolecules* **21**: 2722-2727.
- Fidler, S. and D. Dennis. 1992. Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 231-236.
- Fischer, R. B. and D. G. Peters. 1968. Quantitative chemical analysis. W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa. 677-679.
- Hahn, S. K., Y. K. Chang, and S. Y. Lee. 1995. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 34-39.
- Haywood, G. W., A. J. Anderson, D. R. Williams, and E. A. Dawes. 1991. Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126. *Int. J. Biol. Macromol.* **13**: 83-88.
- Hepner, L. 1996. Cost analysis of fermentation processes.

- Chimia*. **50**: 442–443.
16. Kamiya, N., Y. Yamamoto, Y. Inoue, R. Chujo, and Y. Doi. 1989. Microstructure of bacterially synthesized poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Macromolecules*. **22**: 1676–1682.
 17. Kim, B. K., S. C. Yoon, J. D. Nam, and R. W. Lenz. 1997. Effect of C/N ratio on the production of poly(3-hydroxyalkanoates) by the Methylophilic *Paracoccus denitrificans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 391–396.
 18. Kunioka, M., Y. Kawaguchi, and Y. Doi. 1989. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 569–573.
 19. Olabisi, O., L. M. Robeson, and M. T. Shaw. 1979. Polymer-Polymer Miscibility. Academic Press, New York.
 20. Poirier, Y., D. E. Dennis, K. Klomparens, and C. Somerville. 1992. Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science* **256**: 520–523.
 21. Ramsay, B. A., K. Lomaliza, C. Chavarie, B. Dubé, P. Bataille, and J. A. Ramsay. 1990. Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2093–2098.
 22. Saito, Y. and Y. Doi. 1994. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*. *Int. J. Biol. Macromol.* **16**: 99–104.
 23. Scherer, T. M., R. C. Fuller, R. W. Lenz, and S. Goodwin. 1999. Hydrolase activity of an extracellular depolymerase from *Aspergillus fumigatus* with bacterial and synthetic polyesters. *Polymer Deg. Stab.* **64**: 267–275.
 24. Song, J. J., Y. C. Shin, and S. C. Yoon. 1993. Polyester biosynthesis of *Alcaligenes eutrophus* H16(ATCC 17699) from various mono- and dicarboxylic acids and diols. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 123–128.
 25. Song, J. J., Y. C. Shin, and S. C. Yoon. 1993. P(3HB) accumulation in *Alcaligenes eutrophus* H16(ATCC 17699) under nutrient-rich condition and its induced production from saccharides and their derivatives. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 115–122.
 26. Steinbüchel, A. and U. Pieper. 1992. Production of copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 1–6.
 27. Valentin, H. E., G. Zwingmann, A. Schönebaum, and A. Steinbüchel. 1995. Metabolic pathway for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Eur. J. Biochem.* **227**: 43–60.
 28. van der Leij, F. R. and B. Witholt. 1995. Strategies for the sustainable production of new biodegradable polyesters in plants: a review. *Can. J. Microbiol.* **41**(Suppl. 1): 222–238.
 29. Yoon, S. C. and M. H. Choi. 1999. Local sequence dependence of polyhydroxyalkanoic acid degradation in *Hydrogenophaga pseudoflava*. *J. Biol. Chem.* **274**: 37800–37808.
 30. Zhang, H., V. Obias, K. Gonyer, and D. Dennis. 1994. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1198–1205.

(Received January 10, 2000)