

## 신규 *Pseudomonas* sp. MBEL21 균주의 Polyhydroxyalkanoates 생산 특성

최종일<sup>1</sup> · 이승환<sup>1</sup> · 이상엽<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>한국과학기술원 생명화학공학과, 생물공정연구센터 및 대사공학 국가지정연구실,  
<sup>2</sup>한국과학기술원 바이오시스템학과

**Isolation and Characteristics of Polyhydroxyalkanoates Producing *Pseudomonas* sp. MBEL21. Choi, Jong-il<sup>1</sup>, Seung Hwan Lee<sup>1</sup>, and Sang Yup Lee<sup>1,2\*</sup>.** <sup>1</sup>Metabolic and Biomolecular Engineering National Research Laboratory, Department of Chemical & Biomolecular Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, <sup>2</sup>Department of BioSystems and Bioinformatics Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Kusong-dong, Yuseong-gu, Taejeon 305-701, South Korea – *Pseudomonas* sp. MBEL21 was newly isolated from soil samples and found to accumulate medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (MCL-PHAs) using oleic acid as a sole carbon source. Among the various nutrient limiting conditions examined, including nitrogen, sulfur and phosphorus, only phosphorus limitation supported the accumulation of MCL-PHAs up to 15 wt% of dry cell weight in flask cultures. MCL-PHAs produced by *Pseudomonas* sp. MBEL21 was mainly composed of 3-hydroxyhexanoate, 3-hydroxyoctanoate, 3-hydroxydecanoate, 3-hydroxydodecanoate and 3-hydroxy-5-cis-tetradecenoate. Fed-batch culture of *Pseudomonas* sp. MBEL21 by novel feeding strategies based on cell growth characteristics was carried out under phosphorus limitation using oleic acid as a sole carbon source. The final cell concentration and PHA content of 82 g/L and 28 wt%, respectively, were obtained. Furthermore, PHA consisted of MCL-hydroxyalkanoates and 3-hydroxybutyrate could be produced using olive oil as a sole carbon source.

**Key words:** *Pseudomonas* sp. MBEL21, PHA, oleic acid, olive oil

Polyhydroxyalkanoates (PHAs)는 과량의 탄소원 존재하에 N, P, S, O, Mg와 같은 필수 영양분이 제한되는 조건에서 미생물들에 의하여 세포내에 축적되어지는 생분해성 polyester 구조의 고분자 물질이다[4, 11, 12, 21]. *Bacillus megaterium*에서 처음으로 poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)]가 발견된 이후[16], 현재까지 다른 탄소원자 숫자와 (R)-치환기를 갖는 단량체로 이루어진 PHA들이 150 종 이상이 보고되고 있다[22].

이러한 PHA는 중합체를 이루고 있는 단량체에 따라서 크게 2개의 그룹으로 나누어진다[12]. 탄소원자의 수가 3-5개를 갖는 단량체로 이루어진 short-chain-length PHAs(SCL-PHAs)와 탄소원자의 수가 6-14를 갖는 단량체로 이루어진 medium-chain-length PHAs(MCL-PHAs)로 나누어진다. 이러한 SCL-PHAs와 MCL-PHAs는 매우 다른 고분자 성질들을 가지고 있다. SCL-PHAs가 높은 결정화도와 깨지기 쉽고, 딱딱한 성질들을 가지고 있으나, MCL-PHAs는 낮은 결정화도와 낮은 유리 전이 온도를 갖는 탄성체의 특성을 가

지고 있다[6, 12]. 따라서 MCL-PHAs는 생분해성 고무나 코팅 재료 등의 상업적 응용 분야로 관심을 끌고 있다[17].

MCL-PHA는 *Pseudomonas oleovorans*[8, 13, 18, 19], *Pseudomonas putida*[5, 7, 9, 14], 그리고 다른 fluorescent *Pseudomonas* 균주[23]를 이용하여 glucose, fatty acids, oils, alkanes, alkanolic acids 등을 탄소원으로 사용하여 생산 되어졌다. 그러나, 낮은 생산성과 PHA 함량 때문에 MCL-PHA의 응용 분야들이 개발되어 있지 못하다.

PHA의 축적을 향상시키기 위하여, 산소, 질소, 황, 마그네슘, 인산 등과 같은 영양분을 제한하는 전략들을 여러 wild-type 균주의 배양에 일반적으로 적용하였다. 또한 이전의 고효율 PHA 생산에 관한 연구로부터, PHA 농도와 생산성은 영양분 제한 시기에 의존한다는 것이 알려졌다[14, 20]. PHA 생산 단가를 낮추기 위하여 저가의 탄소 기질에서의 PHA 생산에 관한 연구도 이루어졌다[3, 5].

본 연구에서는, 토양으로부터 새롭게 분리한 MCL-PHA 생산균주 *Pseudomonas* sp. MBEL21을 이용하여 MCL-PHA의 효율적인 생산을 수행하였다. 또한 탄소원으로 저가의 olive oil을 사용하여 3-hydroxybutyrate가 포함된 PHA의 생산을 보고하고자 한다.

\*Corresponding author  
Tel: 82-42-869-3930, Fax: 82-42-869-8800  
E-mail: leesy@mail.kaist.ac.kr

## 재료 및 방법

### 균주의 분리

토양과 오니 시료를  $10^{-5}$ 에서  $10^{-9}$ 배 희석한 후, 10 g/L oleic acids나 10 g/L olive oil를 0.2 g/L polyoxyethylene 20 cetyl ether (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)와 함께 2% (w/v) agar MR 평판 배지에 도발하여 30°C에서 1-7일 배양하였다. 평판 배지에 나타난 colony들을 PHA 생산 능력을 확인하기 위하여 계속적으로 분리하였다.

### 사용배지

Luria-Bertani(LB) 배지와 단순 배지인 MR 배지를 사용하여 2 단계 플라스크 배양을 수행하였다. 유가식 배양에서는 인산이 제한된 MRP배지를 사용하였다. MR 배지의 조성은 다음과 같다. 6.67 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0.8 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.8 g citric acid, 그리고 5 mL trace metal solution을 배지 1 L에 녹였다. 사용된 trace metal solution의 조성은 5 M HCl 1 L에 10 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g  $\text{CaCl}_2$ , 2.2 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 그리고 0.02 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 로 이루어졌다. 인산이 제한된 MRP 배지(pH 6.5)의 조성은 liter 당 다음과 같다. 4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0.8 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.8 g citric acid, 그리고 5 mL trace metal solution 이다.

### 2 단계 플라스크 배양

LB 배지에서 30°C, 250 rpm에서 24 시간 배양된 후 균체는 원심분리기를 이용하여 회수하였다. 회수된 균체 pellet은 10 g/L oleic acid가 첨가된 MR 배지나 또는 각 영양분이 제거된 배지로 옮겼다[10]. 이후 2 단계로 30°C, 250 rpm에서 48 시간 동안 배양하였다.

### *Pseudomonas* sp. MBEL21의 유가식 배양

균주 배양은 10 g/L의 oleic acid가 첨가된 100 mL MR 배지에서 30°C, 250 rpm에서 24 시간 배양하였다. 유가식 배양은 6.6 L 크기의 jar 발효기(Bioflo 3000, New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, USA)에서 수행하였다. 초기 배지는 10 g/L oleic acid가 첨가된 2.0 L의 인산이 제한된 MRP 배지를 사용하였다. 배지 내의 pH는 28%(v/v)  $\text{NH}_4\text{OH}$ 를 자동으로 첨가함으로써 pH 6.5로 조절하였다. 용존 산소 농도(DOC)는 교반 속도를 최대 1000 rpm으로 높이거나 필요할 경우에는 순수 산소를 첨가하여 30% 포화농도를 유지하였다. 공급 배지로는 순수한 oleic acid와 80 g/L의  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  용액을 사용하였다. 자세한 배양 전략은 결과 및 고찰 부분에 기술하였다.

### 분석 방법

세포 성장은 600 nm에서 흡광도( $\text{OD}_{600}$ ; DU Series 600

Spectrophotometer, Beckman, Fullerton, CA, USA)를 측정함으로써 확인하였다. 흡광도를 측정하기 전에 배지 내에 남아있는 fatty acid를 제거하기 위하여 hexane으로 2 번 세척하고 정제수로 다시 세척하였다. 건조 균체 질량(DCW)과 수분 균체 질량(WCW)은 8 mL의 배양액을 28,000 × g로 30 분 원심분리한 후 측정하였다. 균체 pellet은 hexane으로 두 번 세척한 후 정제수로 세척하여 fatty acid를 완전히 제거하였다. 그리고 나서, pellet의 질량을 측정하여 WCW를 결정하였다. 균체 농도는 배양액의 liter 당 DCW로 정의되었으며, 이전에 보고된 방법[10]으로 건조 균체의 질량을 측정하여 결정하였다. PHA의 농도는 fused silica capillary column(Supelco SPB<sup>TM</sup>-5, 30 m × 0.32 mm, ID 0.25 μm film, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 gas chromatography (Donam Co., Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였으며, benzoic acid를 internal standard로 사용하였다[2]. PHA standard는 이전에 보고된 방법에 따라 용매 추출에 의하여 준비하였다. PHA의 단량체의 조성은  $^{13}\text{C}$  와  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy(AMX 500, Bruker, Germany) 과 gas chromatography(Donam Co., Seoul, Korea)를 이용하여 결정하였다. NMR 시료는  $\text{CDCl}_3$ 에 용해시켰다. 잔여 균체 농도(RCM)는 균체 농도에서 PHA 농도를 뺀 값으로 정의하였다. PHA 함량(wt%)은 균체 농도에 대한 PHA의 농도의 백분율로 정의하였다. 인산의 농도는 ion chromatography(Waters 432, Milford, MA, USA)를 이용하여  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 standard로 이용하여 결정하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 분리와 플라스크 배양

대전 부근의 여러 장소에서 얻어진 토양과 오니 시료에서 oleic acid를 탄소원으로 MCL-PHAs를 생산하는 여러 균주들을 분리하였다. 이들 가운데, 서로 다른 4 가지 MCL-PHA 생산 균주들을 최종적으로 분리하였으며 특성을 연구하였다. 이들 중에서 3개의 균주들은 단지 소량의 MCL-PHA를 축적하였고, 나머지 한 균주만이 다량의 MCL-PHA를 축적하였다. 이 균주의 지방산의 MIDI 분석 결과(MIDI 분석, Microbial ID, Inc., Newark, DE, USA)는 *Pseudomonas* 종들과 99% 이상의 일치율을 보이는 것으로 확인하였으며, 따라서 *Pseudomonas* sp. MBEL21로 명명하였다. *Pseudomonas* sp. MBEL21을 이용한 최적의 PHA 생산 조건을 찾기 위하여 질소, 황, 인산과 같은 영양분의 제한 조건에서의 배양 실험을 수행하였다. 탄소원으로는 oleic acid 나 dodecanoic acid를 사용하였다. Table 1에 플라스크 배양의 결과를 요약하여 나타내었다. 플라스크 배양에서 영양분이 제한되지 않은 MR배지에서는 4.0 g/L의 균체 농도가 얻어졌다. 하지만, 여러 영양분 제한 조건에서의 균체 농도는 영양분 제한이 없을 경우보다도 낮았다. 질소, 인산, 황의 제한이 각각

**Table 1. Effects of nutrient limitation on the production of PHA by *Pseudomonas* sp. MBEL21 using oleic acid as carbon source (10 g/L of oleic acid, 48 h incubation in nutrient limited MR medium at 30°C).**

Limitation	DCW (g/L)	PHA content (%)
No limitation	4	Trace <sup>a</sup>
Nitrogen	1.6	Trace
Phosphorus	2.7	15.3%
Sulfur	2.1	Trace

<sup>a</sup>Trace means that PHA content is lower than 1 wt%.

적용되어졌을 때, 균체 농도는 1.6 g/L, 2.7 g/L, 2.1 g/L가 각각 얻어졌다. 질소와 황이 제한되어졌을 때에는 1 wt%에 못 미치는 PHA 함량이 얻어졌다. 하지만, 인산이 제한된 조건에서는 15 wt%까지 PHA 함량이 증가하였다. 이러한 결과들로부터 PHA를 높은 함량으로 축적하기 위해서는 인산 제한 조건이 다른 영양분의 제한보다 효과적이라는 것을 확인하였다.

***Pseudomonas* sp. MBEL21의 유기식 배양**

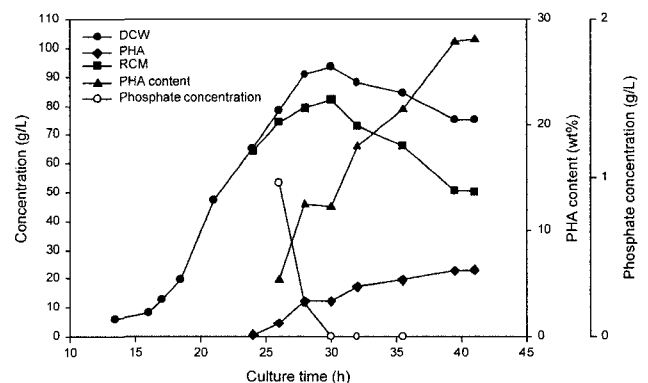
플라스크 배양의 결과로부터, 고농도의 MCL-PHA를 얻기 위한 유기식 배양을 수행하였다. *Pseudomonas* sp. MBEL21의 플라스크 배양 조건이 *P. putida*와 유사하였기 때문에, 이전에 보고된 *P. putida*의 유기식 배양을 위해 개발된 기질 공급 전략을 적용하였다[14]. 하지만, 배양액의 최적의 pH와 탄소원 고갈에 따른 DOC와 pH의 반응이 *P. putida*와는 다르게 나타났다. 그렇기 때문에 *Pseudomonas* sp. MBEL21을 위한 새로운 기질 공급 전략이 필요하였다.

PHA 축적을 위한 최적의 조건은 인산의 제한으로 나타났기 때문에, 4 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>가 들어있는 MRP 배지를 사용하여 유기식 배양을 수행하였다. 실험 결과 최적의 pH는 6.5로 밝혀졌다. 균체 농도가 낮을 경우(DCW < 20 g/L)에는 oleic acid의 고갈에 대해서 DOC와 pH가 반응하지 않기 때문에, 이 경우 균체 성장을 이용하여 수동으로 탄소를 첨가하여 주었다. 균체 성장은 WCW를 이용하여 측정하였으며, WCW 값은 DCW 값의 6배를 가졌다. Oleic acid의 수율은 실험 결과 0.6 g DCW/g oleic acid로 나타났다. 이러한 oleic acid에 대한 균체 수율을 이용하여, 10 g/L oleic acid와 10 mL MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 용액을 WCW가 30 g/L와 50 g/L일 때 첨가하였다.

DCW가 20 g/L에 도달할 경우에는 pH와 DOC이 oleic acid의 고갈에 반응하였다. 하지만, 이 단계에서 oleic acid의 고갈에 대해서 pH가 더 민감하게 반응하기 때문에, DCW의 농도가 70 g/L로 증가할 때까지 pH-stat 기질 공급 전략을 적용하였다. pH가 설정 값(pH 6.5)보다 0.03 증가할 때 배지 내에서의 oleic acid와 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 농도가 각각 10 g/L와 0.2 g/L가 되도록 자동적으로 첨가되었다.

MRP 배지에서는 인산이 제한되었기 때문에, 균체 농도가 높을 때(DCW > 70 g/L)에는 pH의 변화가 매우 불안정하였다. 하지만, 이 단계에서도 DOC이 oleic acid의 고갈에 따라서 급격히 상승하였다. 그렇기 때문에 균체 농도가 70 g/L 이상에서는 pH-stat의 기질 공급 방식이 DO-stat으로 바뀌었다. DOC이 40% 포화 농도(설정 값보다 10% 상승)가 될 때, oleic acid와 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O는 배지내의 농도가 각각 10 g/L와 0.2 g/L가 되도록 자동적으로 첨가되었다.

*Pseudomonas* sp. MBEL21의 유기식 배양에서 시간에 따른 균체 농도, PHA 농도, PHA 함량, 잔여 균체 농도, 인산 농도 등은 Fig. 1에 나타내었다. 41 시간의 배양 이후 얻어진 최종 균체 농도, PHA 함량, PHA 농도는 각각 82 g/L, 28.1 wt%, 23 g/L 였다. 균체 농도는 배양 30 시간 후에 90 g/L 에 도달하였으며, 이 후로 부터는 인산이 고갈된 배양 조건이 이루어졌다. 인산 고갈 후 PHA 함량과 RCM는 12.8 wt%와 80 g/L 에서 28.1 wt%와 49 g/L로 변하였다. 이러한 결과들은 인산의 제한에 의하여 PHA의 축적이 증가하였으며, 인산은 세포 활성을 유지하기 위하여 필수적이라는 사실을 보여주었다. Fig. 2에서는 유기식 배양 동안의 PHA 단량체의 변화를 나타내었다. 인산이 고갈되기 전에는 3-hydroxydecanoate의 분율은 감소하였으며, 3-hydroxyoctanoate와 3-hydroxyhexanoate의 분율은 증가하였다. 하지만, 3-hydroxydodecanoate(C<sub>12</sub>)와 3-hydroxy-5-cis-tetradecenoate(C<sub>14:1</sub>)은 인산이 존재하는 조건에서는 PHA 단량체로는 존재하지 않았다. 이들 두 3-hydroxyalkanoate들은 인산이 고갈된 이후에 PHA로 중합되었다. PHA내의 C<sub>12</sub>와 C<sub>14:1</sub>의 분율은 최종적으로 각각 11 mol%와 16.4 mol%로 증가하였다. *P. putida*의 유기식 배양에서는 배양 도중 PHA 단량체 분율은 거의 일정하였다. 이러한 결과는 인산의 고갈이 β-oxidation 경로의 감소에 의하여 C<sub>12</sub>와 C<sub>14:1</sub> 단량체의 중합을 활성화시킨 것으로 예측된다.



**Fig. 1. Time profiles of cell concentration, residual cell concentration, PHA concentration, phosphate concentration and PHA content during fed-batch cultivation of *Pseudomonas* sp. MBEL21.**

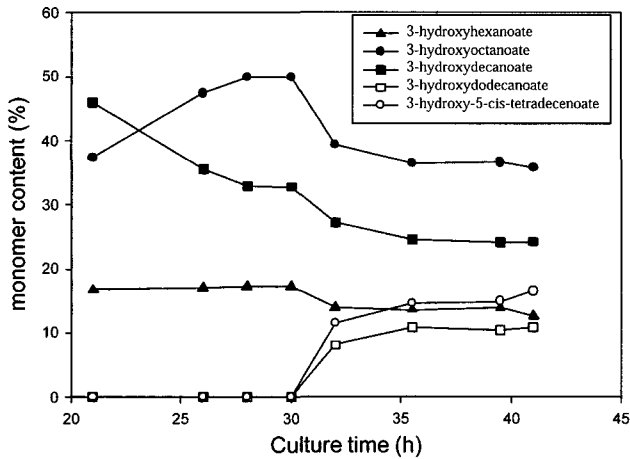


Fig. 2. The change of molar fraction of 3-hydroxyalkanoates in PHA during fed-batch culture of *Pseudomonas sp.* MBEL21.

Table 2. Molar fraction of 3-hydroxyalkanoates in PHA produced by *Pseudomonas sp.* MBEL21 using olive oil as carbon source (10 g/L of olive oil, 48 h incubation in phosphorus limited MR medium at 30°C).

Monomer	C <sub>4</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14:1</sub>
Molar fraction (mol%)	8.2	13.3	58.5	14	3	3

C<sub>4</sub>, 3-hydroxybutyrate; C<sub>6</sub>, 3-hydroxyhexanoate; C<sub>8</sub>, 3-hydroxyoctanoate; C<sub>10</sub>, 3-hydroxydecanoate; C<sub>12</sub>, 3-hydroxydodecanoate; C<sub>14:1</sub>, 3-hydroxy-5-cis-tetradecenoate.

#### Olive oil로부터의 PHA 생산

새롭게 분리된 *Pseudomonas sp.* MBEL21은 olive oil에서 성장하는 것으로 나타났다. *P. putida*와는 다르게 *Pseudomonas sp.* MBEL21은 olive oil을 분해시킬수 있는 lipase를 분비시키는 것으로 예측된다. 따라서 저가의 olive oil로부터 MCL-PHA를 생산하기 위한 플라스크 배양 실험을 수행하였다. 단일 탄소원으로 olive oil을 이용한 2 단계 배양에서 인산을 제한하였을 경우 1.5 g/L의 균체 농도와 9.3 wt%의 PHA 함량이 얻어졌다. 또한, 얻어진 PHA에서 3-hydroxybutyrate(C<sub>4</sub>)를 확인하였다. Oleic acid를 탄소원으로 사용할 경우에는 미량의 C<sub>4</sub> 단량체를 얻었지만, olive oil을 사용할 경우에는 8.2 mol%의 C<sub>4</sub> 단량체를 가지고 있는 PHA를 합성하였다. 이러한 C<sub>4</sub> 단량체와 MCL-hydroxyalkanoate로 이루어진 PHA를 생산하는 여러 균주들이 알려져 있다[1, 10, 15]. C<sub>4</sub>와 MCL-hydroxyalkanoate들이 copolymer를 이루고 있는지, 아니면 poly(3-hydroxybutyrate)와 MCL-PHA가 blend를 이루고 있는지를 확인하는 연구는 진행 중에 있다.

#### 요약

토양으로부터 oleic acid를 탄소원으로 이용하여 MCL-

PHA의 생산능이 우수한 균주를 분리하여 *Pseudomonas sp.* MBEL21이라 명명하였다. *Pseudomonas sp.* MBEL21의 PHA 함량을 증가시키기 위하여 여러 가지 필수 영양분의 제한 조건에서 배양한 결과, 인산이 제한된 조건에서 가장 높은 함량의 PHA를 축적하였다. 고농도의 MCL-PHA 생산을 위한 *Pseudomonas sp.* MBEL21의 유가식 배양 전략을 개발하여 28.1 wt%의 함량으로 23 g/L MCL-PHA를 생산하였다. 또한, 분리된 *Pseudomonas sp.* MBEL21을 olive oil을 탄소원으로 이용하여 배양한 결과 9.3 wt%의 PHA가 축적되어졌으며, MCL-hydroxyalkanoate와 함께 3-hydroxybutyrate의 단량체들로 이루어진 PHA가 확인되어졌다. 이러한 결과들은 분리된 신규 *Pseudomonas sp.* MBEL21이 저가의 olive oil로부터 생분해성 탄성체의 응용분야를 갖는 MCL-PHA를 효율적으로 생산할 수 있다는 것을 보여준다.

#### 감사의 글

이 연구는 과학기술부 국가지정연구실 사업과 BK21 program의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

#### REFERENCES

1. Abe, H., Y. Doi, T. Fukushima, and H. Eya. 1994. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas sp.* 61-3. *Int J Biol Macromol.* 16:115-9.
2. Brauneegg, G., B. Sonnleitner, and R. M. Lafferty. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-3-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6: 29-37.
3. Casini, E., T. C. de Rijk, P. de Waard, and G. Eggink. 1997. Synthesis of poly(hydroxyalkanoate) from hydrolyzed linseed oil. *J. Environ. Poly. Degrad.* 5: 153-158.
4. Doi, Y. 1990. *Microbial polyesters.* VCH, NY, USA.
5. Eggink, G, H. vander Wal, G. N. M. Huijberts, and P. de Waard. 1993. Oleic acid as a substrate for poly-3-hydroxyalkanoate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida*. *Industrial Crops and Products* 1: 157-163.
6. Holmes, P. A. 1988. Biologically produced PHA polymers and copolymers, pp. 1-65. In: D. C. Bassett (ed.) *Developments in crystalline polymers.* Vol 2. London, Elsevier, UK.
7. Huijberts, G. N. M. and G. Eggink. 1996. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas putida* KT2442 in continuous cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 233-239.
8. Kellerhals, M. B., W. Hazenberg, and B. Witholt. 1999. High cell density fermentations of *Pseudomonas oleovorans* for the production of mcl-PHAs in two-liquid phase media. *Enzyme Microb. Technol.* 24: 111-116.

9. Kim, G. J., I. Y. Lee, S. C. Yoon, Y. C. Shin, and Y. H. Park. 1997. Enhanced yield and a high production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in a two-step fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* by combined use of glucose and octanoate. *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 500-505.
10. Lee, S. H., D. H. Oh, W. S. Ahn, Y. Lee, J. Choi, and S. Y. Lee. 2000. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-hexanoate) by high cell density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnol. Bioeng.* **67**: 240-244.
11. Lee, S. Y. 1996. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol.* **14**: 431-438.
12. Lee, S. Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 1-14.
13. Lee, S. Y. 1996. High cell density cultivation of *Pseudomonas oleovorans* for the production of poly(3-hydroxyalkanoates). *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **1**: 51-53.
14. Lee, S. Y., H. H. Wong, J. Choi, S. H. Lee, S. C. Lee, and C. S. Han. 2000. Production of Medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* under phosphorus limitations. *Biotechnol. Bioeng.* **68**: 466-470.
15. Lee, Y., S. H. Lee, and S. Y. Lee. 1999. Fed-batch culture of *Aeromonas hydrophila* for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) using two carbon sources. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **4**: 195-198.
16. Lemoigne, M. 1927. Products of dehydration and of polymerization of  $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Ann. Inst. Pasteur* **41**: 148-165.
17. Preusting, H., A. Nijenhuis, and B. Witholt. 1990. Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly (3-hydroxyalkenoates) produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons. *Macromolecules* **23**: 4220-4224.
18. Preusting, H., R. van Houten, A. Hoefs, E. van Langenberghe, O. Favre-Bulle, and B. Witholt. 1993. 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.
19. Ramsay, B. A., I. Saracovan, J. A. Ramsay, and R. H. Marchessault. 1991. Continuous production of long-side-chain poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates by *Pseudomonas oleovorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 625-629.
20. Ryu, H. W., S. K. Hahn, Y. K. Chang, and H. N. Chang. 1997. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 28-32.
21. Steinbüchel, A. and B. Fütchenbusch. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol.* **16**: 419-427.
22. Steinbüchel, A. and H. E. Valentin. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 219-228.
23. Timm, A. and A. Steinbüchel. 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3360-3367.

(Received Mar. 3, 2004/Accepted June 1, 2004)