

알코올 첨가 탄소원에 의한 PHB 및 P(HB-co-HV)의 생합성에 관한 연구

김범상 · 조근도 · 오준택 · 김우식[†]

연세대학교 공과대학 화학공학과
(1993년 12월 6일 접수, 1994년 3월 18일 채택)

The Effects of Alcohols in Substrate on the Biosynthesis of PHB and P(HB-co-HV)

Bum Sang Kim, Geun Do Cho, Joon Taek Oh and Woo Sik Kim[†]

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea
(Received 6 December 1993; accepted 18 March 1994)

요 약

본 연구에서는 상업화 균주인 *Alcaligenes eutrophus* NCIB 11599를 이용하여 글루코오스와 비교적 저가의 새로운 탄소원인 알코올을 사용, PHB 및 P(HB-co-HV)의 합성과 그 물성에 관하여 연구하였다. 알코올은 methanol, ethanol, propanol, butanol 및 pentanol 등을 사용하였다. 0.4 g/L 이하의 알코올을 10 g/L 글루코오스와 함께 탄소원기질로 사용한 경우, 균의 비증식속도와 고분자의 축적율이 향상되었다. 비증식속도에 있어서는 ethanol을 첨가한 경우 최고 12%, pentanol의 경우 최고 20%, 그리고 고분자의 축적율에 있어서는 ethanol의 경우, 최고 40%, pentanol의 경우 최고 36%의 향상을 보였다. Methanol을 제외한 홀수개의 탄소수를 가진 알코올(propanol, pentanol)을 글루코오스와 함께 기질로 사용한 경우 P(HB-co-HV) 공중합체를 얻을 수 있었으며, 공급 탄소원중의 알코올의 함량이 증가할수록 공중합체내의 HV함량이 증가하였다. Propanol과 pentanol을 첨가하여 합성한 공중합체의 융점은 기질중의 알코올 함량이 증가할수록 감소하여 propanol을 사용한 경우 142°C 까지 떨어졌다. 한편 그 이외의 알코올(methanol, ethanol, butanol)을 사용할 경우에는 합성된 고분자의 융점이 알코올의 함량에는 무관하게 175°C로 일정하였다.

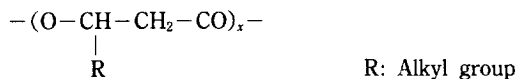
Abstract—This study is concerned with the synthesis and the properties of PHB and P(HB-co-HV) copolymer in *Alcaligenes eutrophus* NCIB 11599 using glucose and alcohol as carbon sources. Alcohols such as methanol, ethanol, propanol, butanol and pentanol were used as carbon sources. When less than 0.4 g/L alcohol with 10 g/L glucose was added as a carbon source with glucose, the specific growth rate and the polymer accumulation rate were improved compared with using only glucose as a carbon source. The specific growth rate was increased to a maximum of 12% and 20% in ethanol and pentanol added substrate respectively. The polymer accumulation rate was increased to a maximum of 40% and 36% in ethanol and pentanol added substrate. P(HB-co-HV) copolymer was obtained when propanol or pentanol was used as a substrate with glucose. The HV fraction in copolymer was increased according to the increase of alcohol concentration in substrate. The melting temperature of copolymer synthesized by propanol or pentanol was decreased according to the increase of alcohol concentration. When propanol was used as a substrate, the melting temperature of copolymer was decreased to 142°C. On the other hand, the melting temperature of polymer synthesized by methanol, ethanol or butanol added substrate was constant at 175°C, the melting temperature of PHB.

1. 서 론

최근 우리 나라를 비롯한 세계 각국에서 환경보전에 관한 관심이 증대되면서 미생물에 의하여 분해 가능한 플라스틱을 개발하기 위한 연구가 증가되고 있다. 그 중 하나의 방법으로서 폴리부타디엔, 폴리에스테르 등과 같은 기존의 플라스틱에 전분 또는 가공된 전분을 첨가하여 공중합물로 만드는 방법이 있는데, 이 방법은 경제적인 면에서는 다른 생분해성 플라스틱에 비해 유리하나, 제품의 물성이 떨어지기 때문에 사용에 한계가 있는 것으로 알려져 있다. 반면에 미생물을 이용하여 생산되는 생분해성 고분자인 PHB와 PHA는 기존의 플라스틱과 유사한 성질을 가지며 성형, 용융, 방사가 자유로울 뿐 아니라 기존의 고분자와 blending이 가능하며 체내에서 대사물질로 사용되어 생체적합성이 우수하고 부작용이 없는 등 수많은 잠재적 응용 가능성으로 인해 가장 주목받는 bioplastics이다[1-4].

박테리아를 이용한 발효과정을 얻을 수 있는 PHA 중에서 제일 처음 알려진 것으로는 3-hydroxybutyric acid의 반복단위를 갖는 천연 polyester인 poly-3-hydroxybutyrate(PHB)가 있다. 현재 가장 널리 알려진 PHB는 너무 딱딱하고 부서지기 쉬워서 그 용도에 제한을 받는다. 그러나 PHB사슬에 다른 hydroxyalkanoate(HA)를 공단위체(comonomer)로 가지게 함으로써 물성이 크게 개량될 수 있고, 따라서 그 용도가 다양해질 수 있다[5-7].

최근에 3HB 대신에 다른 구조의 3HA를 가진 여러 가지의 P(3HA) 공중합체가 다양한 종류의 박테리아에서 분리, 제조되었으며 그 구조는 다음과 같다.



박테리아의 종류와 탄소원의 종류(alkane, alcohol, alkanolic acid)에 따라 여러 가지 사슬길이(C₃-C₁₂)의 3HA 단위를 가진 중합체가 얻어질 수 있다. 수많은 박테리아종에서 연구가 가장 많이 되어 있는 것은 *Alcaligenes eutrophus*이며, *Pseudomonas oleovorans*는 가장 다양한 구조의 PHA를 만들 수 있다고 알려져 있다.

*A. eutrophus*에 의해 탄소수가 다른 alkanolic acid에서 얻어질 수 있는 P(3HA)의 구조는 alkanolic acid의 종류에 따라 다르다. 즉 짝수의 탄소수를 가진 alkanolic acid(acetic acid, butyric acid, hexanoic acid)로는 P(3HB) 단독중합체가 얻어지며, 홀수의 탄소수를 가진 alkanolic acid(propionic acid, pentanoic acid)에서는 3HB와 3HV의 공중합체인 P(3HB-co-3HV)가 얻어진다[8, 9]. 탄소원으로 3-hydroxypropionic acid, 1,5-penta-

nediol 또는 1,7-hexanediol을 사용한 경우에는 3HB와 3-hydroxypropionate(3HP)의 공중합체인 P(3HB-co-3HP)가 얻어지기도 한다. 같은 박테리아로 3HB와 4-hydroxybutyrate(4HB)의 공중합체인 P(3HB-co-4HB)를 얻을 수도 있는데, 이 때 사용되는 탄소원으로는 4-hydroxybutyric acid, 3-chlorobutyric acid, γ -butyrolactone, 1,4-butanediol, 1,6-hexanediol 등이 있다. 또 4-hydroxybutyric acid와 pentanoic acid를 함께 사용하면 3HB, 4HB 및 3HV 단위를 모두 가진 삼원중합체(terpolymer)가 얻어지기도 한다. 이와 같이 적당한 박테리아와 탄소원의 종류 및 양을 조절함으로써 여러 가지 구조를 가진 PHA공중합체를 제조할 수 있다. 이러한 공중합체의 조성 및 구조는 X-선 회절법, IR, H-NMR 또는 C-NMR 등으로 조사 분석될 수 있다[7, 10].

P(HB-co-HV)공중합체의 성질은 잘 알려져 있지는 않으나 대체적으로 HV가 사슬에 삽입됨에 따라 결정화도, melting temperature, flexural modulus가 낮아지며 impact strength는 증가하는 것으로 보고되었다[11].

본 연구에서는 상업화 균주인 *Alcaligenes eutrophus* NCIB 11599를 이용하여 글루코오스와 비교적 저가의 새로운 기질인 알코올을 사용, PHB 및 P(HB-co-HV)의 합성과 그 물성에 관한 연구를 행하였다.

2. 실험

2-1. 실험방법

본 실험에서 사용한 균주는 영국의 ICI사에서 사용한 상업화 균주인 *Alcaligenes eutrophus* NCIB 11599를 사용하였다. 균주의 활성을 유지하기 위해 1주일에 한 번씩 사면배지에서 교대 배양하였다. 고상사면배지에 종균을 보존하는 한편, 삼각플라스크에 일부의 균을 접종시켜 24시간 동안 예비배양을 행한 후 이를 원심분리하여 균체를 세척하고 무균상태에서 Erlenmeyer플라스크 또는 미생물배양기에 접종하였다. 이 때 사용된 배지 조성은 Table 1과 같다.

발효기에서의 배양온도는 온도 제어기를 통해 34°C를 유지하였으며, pH는 1N의 NaOH를 이용하여 6.8-7.0으로 일정하게 유지하였다. 용존산소 수준(dissolved oxygen tension)은 교반 속도조절기와 산소 공급을 통해 20% 이상 유지하였다. 소포제는 silicone제인 KM 73(일본 신성화학)을 사용하였으며, antifoam electrode sensor와 소포제어기(antifoam controller)를 통해 투입량을 조절하였다.

또한 알코올의 각 농도에 대한 비교 실험을 위하여 진탕배양기(shaking incubator)를 이용하였으며, 이 때

Table 1. Medium composition for the batch fermentation

Component	Concentration(g/l)
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3.34
KH ₂ PO ₄	0.83
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	0.6646
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.001
H ₃ BO ₃	0.0003
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0002
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0001
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.00003
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.00002
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.00002
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00001
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1
Yeast extract	0.2
Glucose	10
Alcohol	0.1-2.5

진탕배양기의 온도는 균성장시의 최적 온도인 34℃로 유지시켰다. 진탕배양기 실험에는 300 ml Erlenmeyer 플라스크를 이용하여 알코올의 농도를 달리한 배양액 10 ml를 넣은 후 비교실험을 행하였다. PHA의 측정 단계에서는 NH₄⁺를 제한 요소로 하였다.

2-2. 분석방법

2-2-1. 균체 건조 질량 측정

균체 건조 질량은 분광광도계(Shimadzu Double Beam Spectrometer UV-200S)를 사용하여 배양액을 0.9% NaCl 수용액으로 희석한 후 660 nm에서 optical density를 측정하고 검량선을 사용하여 건조 균체 질량으로 환산하였다.

2-2-2. 기질 농도 분석

배양액중의 ammonium ion 농도는 Berthelot 반응을 이용하여 측정하였다. 탄소원 농도는 효소법을 이용하여 측정하였다. 알코올의 농도분석은 Shimadzu사의 gas chromatography를 이용하여 측정하였다.

2-2-3. PHA의 정량·정성 분석

PHA의 정량 분석은 Shimadzu사의 gas chromatography 7-A FID를 이용하여 분석하였다. 분석 방법은 다음과 같다.

(1) 일정량의 건조 균체를 vial병에 넣고 2 mL의 DCE (1, 2-dichloroethane)와 염산(HCl)과 n-propanol을 1 : 4로 혼합한 용액 2 ml를 가하고, 내부 표준시료(internal standard)인 benzoic acid ethylester 200 µl를 가한 후 밀봉한다.

Table 2. Operation conditions of gas chromatography for PHA analysis

Condition	Value
Column	2 m×4 mm steel
Support	Chromosorb WHP 80/100 mesh
Coated material	10% AT-1200+1% H ₃ PO ₄
Injection temp.	200℃
Column temp.	180℃
Ar flow rate	40 ml/min
Injection volume	1.0 µl

(2) 2시간 동안 100℃에서 중탕한다.

(3) 상온으로 냉각한 후 4 ml의 증류수를 가한 후 20-30초간 흔든다.

(4) Heavier phase를 GC로 분석한다.

GC의 분석 조건을 Table 2에 나타내었다.

2-2-4. PHA의 T_m(melting temperature)의 측정

PHA의 T_m은 DTA를 이용하여 측정하였다. 온도를 4℃/min으로 승온시켜 25℃에서 300℃까지의 범위에서 측정하였으며 기준물질로는 α-alumina(α-Al₂O₃) powder를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 알코올 종류 및 함량이 균 성장에 미치는 영향

알코올은 methanol, ethanol, propanol, butanol 및 pentanol 등을 사용하였는 바, 알코올만을 기질로 사용하였을 경우에는 균 성장이 매우 늦어 글루코오스와 알코올을 일정비율로 혼합하여 기질로 사용하였다. 균 성장에 알코올이 미치는 영향을 알아보기 위해 알코올의 농도를 변화시켜 가며 글루코오스만을 기질로 사용하는 경우의 성장속도와 비교하였다.

알코올의 함량을 변화시켜 가며 비증식속도(specific growth rate)를 관찰한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이 결과 알코올의 함량이 0.4 g/l 이하에서는 글루코오스만을 기질로 사용하였을 때와 비교하여 비증식속도가 약간 향상되었거나 무관하였고 그 이상에서는 감소한 것을 알 수 있었다. Ethanol의 경우 최고 12%, pentanol의 경우 최고 20%의 비증식속도 향상을 보였다. 한편 propanol과 butanol의 경우에 있어서는 다른 알코올에 비해 기질 저해가 심하게 일어나는 것을 알 수 있었다. 그리고 소량의 알코올을 첨가해 준 경우에 있어서 최대균체량이 글루코오스만을 기질로 사용한 경우에 비해 커짐을 알 수 있었다. 즉 알코올이 대사되어 균 성장상에 탄소원으로 사용됨을 알 수 있었다. Fig. 2에 그 대표적인 것을 나타내었다. 이로써 기질중의 소량의 알코올은

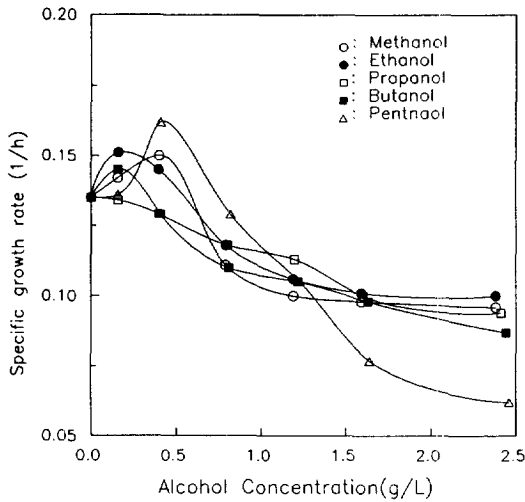


Fig. 1. Effect of alcohol concentration on the specific growth rate of *A. eutrophus* (Glucose conc. : 10 g/l).

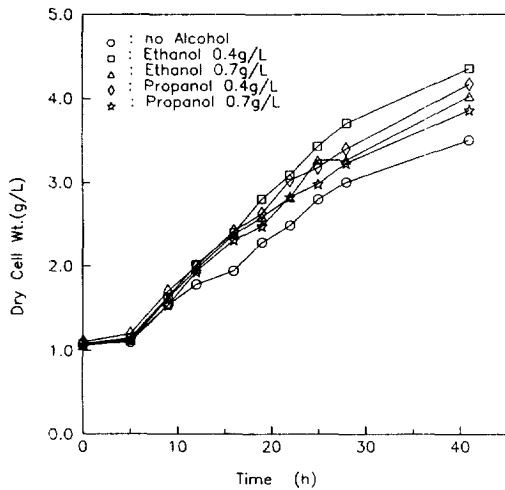


Fig. 2. Effect of alcohols on the time courses of dry cell weight.

균성장을 촉진시켜 비증식속도를 증가시킴을 알 수 있었다.

3-2. 알코올 및 글루코오스의 소비에 대한 고찰

소량의 알코올을 글루코오스와 함께 기질로 사용하는 경우에 있어서 시간에 따른 기질의 농도변화를 측정하기 위하여 비증식속도에 큰 효과를 준 ethanol과 HV단량체를 생성할 수 있는 propanol을 알코올중에서 대표적인 기질로 사용하였다.

배양초기에는 알코올의 농도가 거의 일정하게 유지

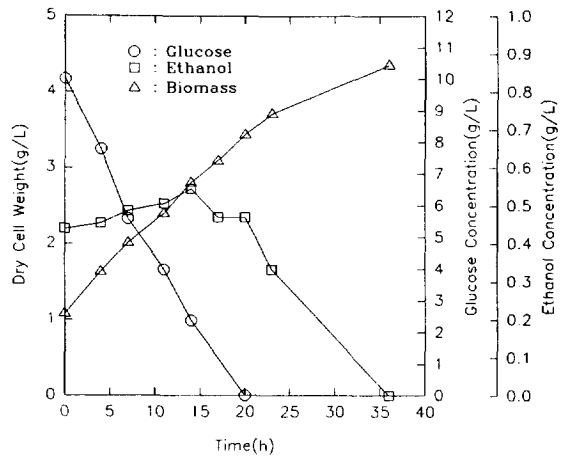


Fig. 3. Time courses of biomass, glucose and ethanol of *A. eutrophus*.

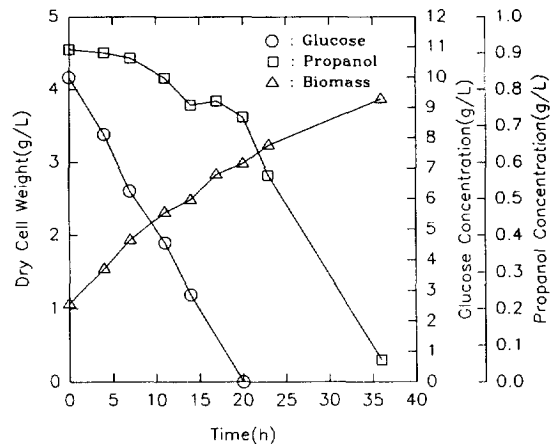


Fig. 4. Time courses of biomass, glucose and propanol of *A. eutrophus*.

되다가 글루코오스가 완전히 소비된 후(약 20시간)부터는 Fig. 3 및 4와 같이 급격히 그 양이 감소되는 것을 볼 수 있다. 이것은 초기에는 균이 글루코오스를 주된 기질로 사용하다가 글루코오스가 완전히 소비된 이후부터 알코올을 기질로 사용하기 때문으로 사료된다. 그러나 균체량이 증가함에 따라 propanol의 경우에 있어서는 미미하지만 감소되는 경향을 보였으며, ethanol의 경우에는 그 농도가 증가하다가 글루코오스가 소비되면서 감소하는 것으로 미루어 대사산물로 ethanol이 생성됨을 확인할 수 있다.

이와 같은 결과로부터 고농도 발효시에는 배양액내 ethanol 농도의 영향을 고려해 주어야 함을 알 수 있

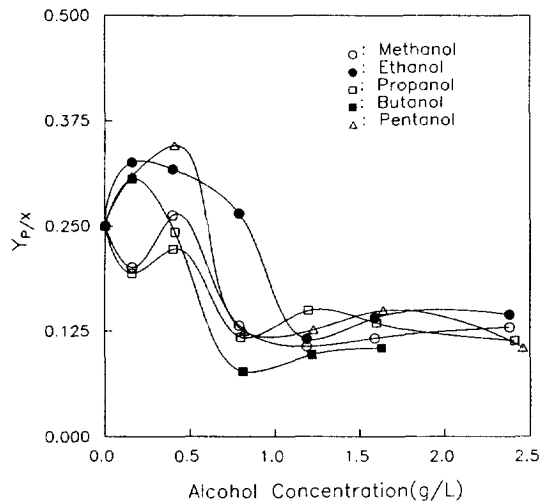


Fig. 5. Polymer yield on biomass $Y_{P/X}$ as a function of alcohol concentration at 48 hrs (Glucose conc.: 10 g/l).

었다.

3-3. 알코올 종류 및 함량이 고분자 합성에 미치는 영향

3-3-1. 고분자 축적율

균이 성장함에 따라 균체내 고분자가 축적됨을 확인하였는 바, 48시간이 지난 후의 총 균체량에 대한 고분자 축적율을 Fig. 5에 나타내었다. 탄소원으로 글루코오스만을 사용하여 얻은 축적율과 비교하여 볼 때 적은 알코올을 함량(0.4 g/l 이하)에서는 균체내 고분자 축적율이 알코올의 양에 비교적 무관하였으나 알코올의 함량이 증가함에 따라 급격히 감소하였다. Ethanol과 pentanol을 소량(0.2-0.4 g/l) 사용한 경우 글루코오스만을 기질로 사용한 경우에 비해 고분자 축적율이 향상되었는 바, 이는 ethanol과 propanol을 소량 첨가하였을 경우 비증식속도가 증가하여 이로 인해 균체내 질소원 등의 제한 효과가 더 크게 나타났기 때문으로 사료된다. 본 실험에서는 ethanol의 경우 최고 40%, pentanol의 경우 최고 36%의 축적율 향상을 보였다.

3-3-2. 합성 공중합체내의 HV 함량 변화

Methanol을 제외한 홑수개의 탄소수를 가진 알코올인 propanol과 pentanol을 사용하였을 경우 HB와 HV의 공중합체가 합성됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 탄소수가 홑수개인 기질을 탄소원으로 사용하는 경우에는 HB와 HV의 공중합체가 합성된다는 기존의 연구결과 [7-9]와 일치하였고, 짝수개의 탄소수를 가진 알코올에서는 PHB만이 합성됨을 확인할 수 있었다.

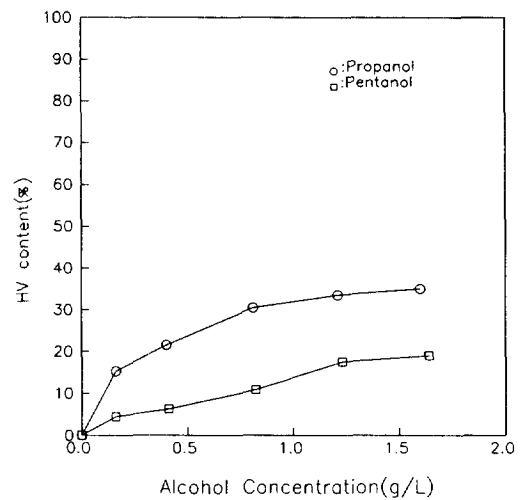


Fig. 6. The HV content in copolymer as a function of alcohol concentration at 36 hrs.

여기서 methanol의 경우 홑수개의 탄소를 가진 기질임에도 불구하고 HV가 생성되지 않는 이유는 HV생성의 생합성 경로에서 HV의 생성은 propionyl-CoA이 존재하여야만 가능하나 [12] methanol은 구조식이 $\text{CH}_3\text{-OH}$ 로서 그 구조상 propionyl-CoA를 생성할 수 없기 때문에 홑수개의 탄소수를 가졌으면서도 HV단량체를 생성하지 못하는 것으로 사료된다.

합성한 공중합체내의 HV함량은 propanol을 사용한 경우가 pentanol을 사용한 경우보다 크게 나타났고, 공급 탄소원중의 알코올의 함량이 증가할수록 공중합체내의 HV함량이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 6).

따라서 알코올의 종류 및 농도를 조절하여 원하는 정도의 HV를 포함하는 공중합체를 합성할 수 있을 것으로 사료된다.

3-4. 알코올 종류 및 함량이 고분자의 T_m 에 미치는 영향

Methanol, ethanol 및 butanol을 기질로 사용한 경우에는 고분자의 용점(melting temperature)이 175°C 로 일정하였고, propanol과 pentanol을 기질로 사용하여 합성한 고분자의 용점은 이 보다 낮은 값을 나타내었다. 이로부터 propanol과 pentanol을 기질로 사용한 경우, P(HB-co-HV)의 공중합체가 합성되었음을 예측할 수 있었다. Propanol과 pentanol을 사용하여 합성한 고분자의 용점은 각각의 알코올의 함량이 증가할수록 비선형적으로 감소하여 propanol을 사용한 경우 142°C 까지 떨어짐을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 공중합체내의 HV함량이 증가함에 따라 공중합체의 연성이 증

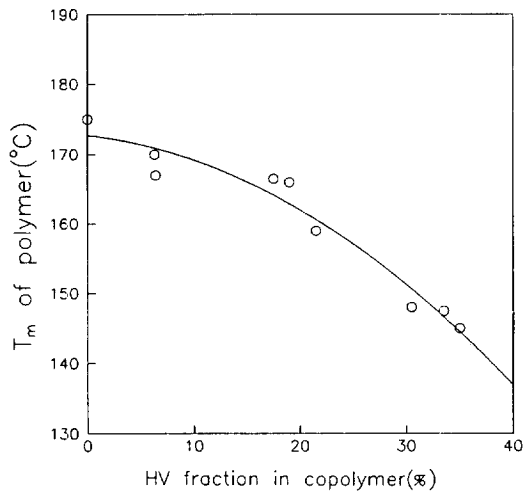


Fig. 7. Effect of HV content in copolymer on melting temperature, T_m , of copolymer of this study.

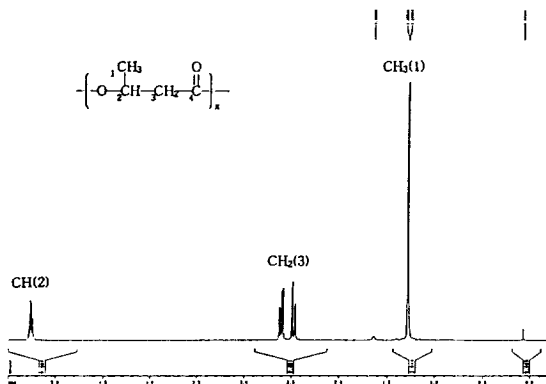


Fig. 8. 500-MHz ^1H NMR spectrum of PHB sample of this study.

가하며 융점이 낮아진다는 기존의 보고[7, 13]와 일치함을 보여 주었다. 합성된 고분자중의 HV 단량체 함량과 T_m 의 관계를 Fig. 7에 나타내었다. 한편 methanol, ethanol, butanol을 사용한 고분자의 T_m 은 순수한 PHB의 값과 같아 methanol, ethanol 및 butanol을 사용하여 합성한 고분자는 순수한 PHB임을 예측할 수 있었다.

3-5. PHB 및 PHA의 분석

3-5-1. NMR을 이용한 PHB 및 PHA의 정성분석

본 실험에서 얻은 PHB 및 P(HB-co-HV) 공중합체의 500-MHz ^1H NMR과 400-MHz ^1H NMR 분석결과를 Fig. 8과 9에 각각 나타내었다.

분석결과로부터 본 실험에서 얻은 고분자가 PHB 및

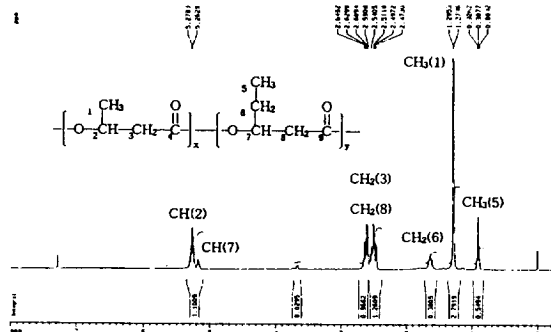


Fig. 9. 400-MHz ^1H NMR spectrum of P(HB-co-HV) sample of this study.

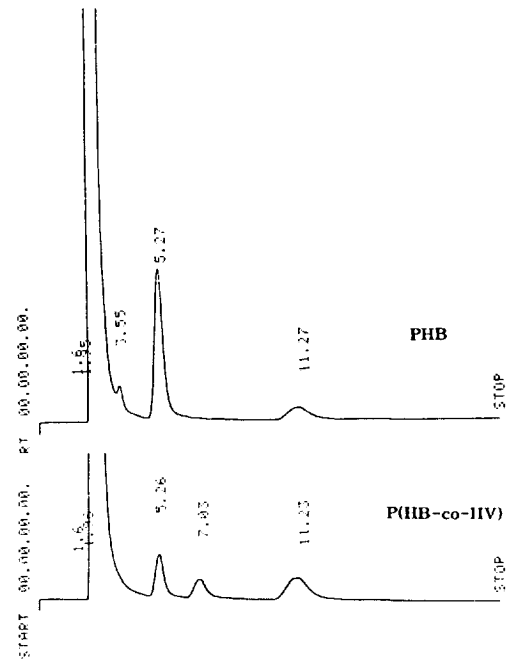


Fig. 10. Gas chromatograph peaks of PHB and P(HB-co-HV) samples.

P(HB-co-HV) 공중합체와 같은 구조를 가짐을 확인하였다[10, 14].

3-5-2. GC를 이용한 PHB 및 PHA의 정성, 정량분석
현재까지의 GC를 이용한 분석은 PHB분석에 국한되어 발표되고 있으나 본 실험결과를 통해 HB와 HV 공중합체의 분석에도 이용될 수 있음을 확인하였다. 기존의 문헌[10, 14]에 의하면 PHA의 정성적 및 정량적 분석은 대부분 NMR 등을 이용하고 있으나 NMR은 분석시간이 오래 걸리는 등 간편히 사용하기에는 어려

움이 있다.

Gas chromatography를 이용한 PHA의 분석은 최근 몇몇 문헌을 통하여 발표된 바[15], GC를 이용한 분석법은 기존의 UV 및 Gravimetry법 또는 NMR법에 비해 재현성 및 정확성에 있어서 보다 간편하고 발전된 방법이라고 할 수 있어 많은 연구가 기대된다.

본 연구에서도 GC를 이용한 PHB 분석법을 PHA의 정량 분석에도 응용하여 간편하고 정확하게 분석할 수 있음을 확인하였다. HB 단량체의 peak와 HV 단량체의 peak가 확실히 분리됨을 볼 수 있었으며 HV 단량체의 양에 비례하여 peak의 크기가 증가함을 알 수 있었다. 이를 Fig. 10에 나타내었다.

이러한 방법을 응용한다면 HB와 HV의 공중합체 뿐만 아니라 여러 단량체로 된 생분해성 고분자의 분석에도 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

4. 결 론

글루코오스와 알코올을 탄소원으로 함께 사용하여 *A. eutrophus*의 성장속도 및 PHA의 생합성에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

알코올의 함량을 0.4 g/l 이하로 첨가하여 준 경우 글루코오스만을 기질로 사용하였을 때보다 비증식속도가 다소 향상된 결과를 나타내었으며, 그 이상의 농도에서는 감소하였다. Ethanol의 경우 최고 12%, pentanol의 경우 20%까지 비증식속도가 증가하였다. 또한 알코올 함량이 0.4 g/l 이하에서는 균체내 고분자 축적율이 알코올의 양에 비교적 무관하였으나 알코올의 함량이 증가함에 따라 급격히 감소하였다. 그러나 ethanol과 pentanol을 소량(0.2-0.4 g/l) 사용한 경우 글루코오스만을 기질로 사용한 경우에 비해 고분자 축적율이 향상되었으며 ethanol의 경우 최고 40%, pentanol의 경우 최고 36%의 축적율 향상을 보였다. Methanol을 제외한 홑수개의 탄소수를 가진 알코올(propanol, pentanol)을 글루코오스와 함께 사용한 경우 P(HB-co-HV) 공중합체를 얻을 수 있었으며, 합성한 고분자중의 단량체 HV의 함량은 propanol을 첨가한 경우가 pentanol을 첨가한 경우보다 크게 나타났다. 또한 공급 탄소원중의 알코올의 함량이 증가할수록 공중합체내의 HV 함량이 증가하였다. Propanol과 pentanol을 첨가하여

합성한 고분자의 T_m 은 알코올의 함량이 증가할수록 비선형적으로 감소하였으며, 그 이외의 알코올(methanol, ethanol, butanol)을 사용하여 얻은 고분자의 T_m 은 알코올의 함량에는 무관하게 175°C로 일정하였다.

감 사

본 연구는 미원 중앙연구소의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. King, P. P.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **32**, 2(1982).
2. Suzuki, T., Deguchi, H., Yamane, T., Shimizu, S. and Gekko, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 487 (1988).
3. 이동호, Doi, Y. and Soga, K.: *Polymer(Korea)*, **12** (2), 129(1988).
4. 임진빈: *J. of Korea Ind. & Eng. Chemistry*, **3**(3), 371(1992).
5. Holmes, P. A.: *Phys. Technol.*, **16**, 32(1985).
6. 안광덕: *Polymer(Korea)*, **11**(4), 378(1987).
7. 이동호: *Polymer Sci. and Technol.*, **2**(5), 332(1991).
8. Do, Y., Tamaki, A., Kunioka, M. and Soga, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 330(1988).
9. Timm, A., Byrom, D. and Steinbüchel, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 296(1990).
10. Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K.: *Macromolecules*, **19**, 1274(1986).
11. Bloembergen, S., Hoden, D. A., Hamer, G. K., Blum, T. L. and Marchessault, R. H.: *Macromolecules*, **19**, 2865(1986).
12. Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K.: *Macromolecules*, **20**, 2988(1987).
13. Owen, A. J.: *Colloide & Polymer Sci.*, **263**, 799 (1985).
14. Sogn, M. Y., Lee, H. J. and Lee, Y. H.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**(3), 273(1990).
15. Riis, V. and Mai, W.: *J. Chromatography*, **445**, 285 (1988).