

OBTENCION DE PLASTICOS BIODEGRADABLES POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE BACTERIAS DE LOS GENEROS *Pseudomonas* y *Azotobacter*

J. C. QUAGLIANO¹ y SILVIA S. MIYAZAKI¹

Recibido: 10/04/96

Aceptado: 13/11/96

RESUMEN

Aislados de bacterias del género *Azotobacter* fueron obtenidos de muestras de suelos rizosféricos para determinar que tipo de biopolímeros eran producidos en condiciones adecuadas. Dos cepas de colección del género *Pseudomonas* fueron estudiadas en condiciones de deficiencia nutricional en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos fueron: 1) *Azotobacter* acumula polímeros de baja flexibilidad y de estructura lineal, mientras 2) *Pseudomonas* produce biopolímeros de estructura ramificada con mayor flexibilidad. El efecto promotor de dos ácidos orgánicos fue verificado.

Palabras clave: *Azotobacter*, *Pseudomonas*, biopolímeros, poli-hidroxiálcanoatos

OBTAINMENT OF BIODEGRADABLE PLASTIC POLYHYDROXY ALKANOATES FROM *Pseudomonas* and *Azotobacter* BACTERIA

SUMMARY

Bacterial isolates from the *Azotobacter* genus were obtained from rhizospheric soil samples to determine which type of biopolymers were produced in adequate conditions.

Two collection strains of the genus *Pseudomonas* were studied in deficient conditions in the culture media. The results obtained were: 1) *Azotobacter* accumulates low flexibility polymers of linear structure, meanwhile 2) *Pseudomonas* produced biopolymers of ramified structure and higher flexibility. Enhanced effect of two organic acid on PHB yield was verified.

Key words: *Azotobacter*, *Pseudomonas*, biopolymers, polyhydroxyalkanoates

INTRODUCCION

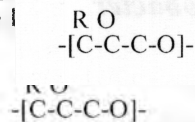
Los polihidroxiálcanoatos (PHAs) son una familia de poliésteres biológicos que se acumulan en los microorganismos bajo condiciones de deficiencia nutricional como ser falta de nutrientes tales como nitrógeno, fósforo, oxígeno o microelementos en el medio de cultivo (Anderson y Dawes, 1990). Se acumulan bajo la forma de gránulos intracitoplasmáticos, donde los polímeros se acumulan en una forma osmóticamente inerte. Debido a su naturaleza

biológica pueden biodegradarse, una vez aislados y purificados de las bacterias. Además son polímeros termoplásticos, y pueden ser aplicados a diferentes usos en medicina (liberación lenta de fármacos y drogas), en la industria del envase y en agricultura.

La causa bioquímica de la biosíntesis de materiales de reserva se debe a la falta de nitrógeno, de manera que el metabolismo se deriva a la acumulación de biopolímeros en lugar de a la formación de aminoácidos y proteínas.

¹Cátedra de Microbiología, Centro de Investigaciones Biotecnológicas en Microorganismos (CIBEM), Facultad de Agronomía, UBA, Av. San Martín 4453 (1417) Buenos Aires, Argentina.

Existen más de 80 tipos diferentes de polímeros (Lee, 1996) que difieren en cuanto a la estructura y longitud de l



pero solamente el poli-3-hidroxitirato co-hidroxitirato (PHBV) ha sido producido por ICI de Inglaterra en gran escala a partir de bacterias del género *Alcaligenes*. Hoy en día los costos de producción respecto de los polímeros sintético son altos, ya que es necesario el uso de grandes fermentadores y el proceso requiere la utilización de solventes orgánicos para la extracción del poliéster, lo que obliga a disponer de sistemas cerrados de recuperación de los mismos.

Una gran cantidad de géneros microbianos son capaces de producir PHAs, pero los más estudiados son *Alcaligenes*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas* y *Azotobacter*.

En *Alcaligenes* se acumulan copolímeros compuestos por hidroxibutirato-hidroxitirato (HBHV) con diferente relación de acuerdo a las condiciones de producción (Anderson *et al*, 1990). *Methylobacterium* produce polímeros de bajo peso molecular, pero por otra parte el medio de cultivo es económico (Suzuki y Yamane, 1986). *Pseudomonas* produce varias clases de PHA, desde homopolímeros lineales a copolímeros ramificados (Brandl 1988, Haywood 1990, Daniel 1992). Por último, de *Azotobacter* se obtienen normalmente homopolímeros lineales, de mayores ventajas en aplicaciones médicas como por ejemplo la liberación prolongada de fármacos. En este artículo se ha efectuado un análisis del tipo de polímeros obtenidos a partir de dos géneros, y evaluamos cualitativamente las propiedades físicas de los biopolíesteres purificados. Dos ácidos orgánicos que podrían ser incorporados a los polímeros por el sistema enzimático de la polimerasa (Doi *et al*, 1987) fueron ensayados, evaluando su influencia sobre el rendimiento.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

1. *Pseudomonas oleovorans* SK2669 y *Pseudomonas aeruginosa* O1 pertenecen al cepario de la Facultad de Agronomía, World Federation of Culture Collections N°307.

Se conservan en glicerol a -20°C. 2. *Azotobacter chroococcum* 6B, 11, CR fueron aisladas de muestras de suelos e incluidas en la colección mencionada. *Azotobacter chroococcum* CR fue aislado de una muestra de suelos empetrolados de Comodoro Rivadavia, Chubut, (CR) Argentina provista por la Estación Experimental del INTA de Trelew. *Azotobacter chroococcum* 6B y 11 fueron aislados de muestras de suelo rizosférico del campus de la Facultad de Agronomía.

Medios de cultivo

En la primera etapa de obtención de biomasa se utilizó el medio completo, caldo nutritivo. Se adicionó con la fuente de carbono a utilizar en una segunda etapa en el medio salino mínimo (MSM), con el fin de favorecer la expresión de las enzimas. El medio MSM posee la siguiente composición (g/l): KH_2PO_4 1,5; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,3; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02; citrato amónico férrico 0,0012; solución de elementos traza 10 ml, H_2O esp 1000 ml. Se ajusta el pH a 7. La solución de elementos traza posee la siguiente composición (mg): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100; $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 30; H_3BO_3 300; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200; $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30; H_2O esp 1000 ml. El medio completo de triptona contiene (g/l): peptona de caseína 10 y cloruro de sodio 5. El pH se regula a 7.3.

Para *Azotobacter* sp. se utilizó el medio productivo de Burk con glucosa como fuente de carbono. El medio posee la siguiente composición (g/l): glucosa 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,012; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,01; K_2HPO_4 2 y NaCl 0,4.

Método de cultivo para la producción de poli-hidroxicarboxilatos a partir de bacterias del género *Pseudomonas*.

Se cultivaron dos cepas de *Pseudomonas* en medio sólido en placas de Petri con agar nutritivo. Luego de incubadas a 30°C en estufa las colonias fueron transferidas a erlenmeyers de 125 ml de capacidad conteniendo 10 ml de caldo nutritivo, al que se le incorporó una fuente de carbono al 0,5% (octanoato sódico para la especie *P. oleovorans* y gluconato sódico para la *P. aeruginosa*). Los recipientes fueron incubados en un agitador rotatorio a 90 rpm y a 30°C durante 15 a 18 horas.

Un volumen de cultivo crecido (2 ml) fue inoculado en erlenmeyers de 500 ml con 100 ml de los medios para *P. oleovorans* y *P. aeruginosa*, y el procedimiento de cultivo se siguió como se indica más arriba.

Una vez obtenida la biomasa en medio completo, como lo es el caldo nutritivo, se transfirieron las células a medio salino mínimo (MSM) con octanoato sódico para *Pseudomonas oleovorans* SK2669 y gluconato sódico como fuente de carbono para el caso de *Pseudomonas aeruginosa* O1.

Se utilizaron erlenmeyers de 2 l con 500 ml de medio salino mínimo (MSM), incubándose en las mismas condiciones, excepto que el tiempo de cultivo fue de 48 horas.

Una vez finalizada la incubación, los microorganismos fueron cosechados por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos.

Se lavó con buffer fosfato, se congeló el pellet obtenido y el mismo fue liofilizado durante 24 horas a -53°C y 3×10^{-3} Mbar (Labconco Corp., USA).

Cultivo de *Azotobacter chroococcum*

Se cultivó en una secuencia de dos etapas utilizando caldo nutritivo en la primera etapa de crecimiento celular. El cultivo crecido se centrifugó en esterilidad a 10.000 rpm durante 15 minutos y el pellet se transfirió al medio productivo de Burk con glucosa. Se cultivó a 220 rpm y 29°C , cosechándose por centrifugación a diferentes tiempos.

Procedimiento de extracción

El liofilizado (pulverizado en mortero) se colocó en cilindros de extracción de papel de filtro dentro de un aparato de Soxhlet y se extrajo en forma continua con cloroformo durante 24 horas.

Procedimiento de purificación

El extracto clorofórmico se concentró desde un volumen de 250 ml en un rotoevaporador hasta un volumen de 25 ml. Luego un volumen de extracto concentrado fue reprecipitado en 10 volúmenes de etanol en baño de hielo. El biopolímero reprecipitado fue filtrado por un filtro de cerámica sinterizado o bien fue centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos. El PHA obtenido se secó en estufa a 60°C hasta llegar a peso constante.

Procedimiento analítico

Se realizaron tinciones con Azul de Nilo que fueron observadas en un microscopio óptico con un aumento de 1000X adaptado para luz fluorescente a 466 nm. Se colocaron los portaobjetos en el colorante fluorescente durante 10 minutos a 55°C .

Luego se lavaron con agua y por último con ácido acético al 8%. Como control positivo se utilizó la cepa *Bacillus megaterium* 447 (Gerhardt, 1994).

Determinación cromatográficas

Para la determinación cromatográfica los biopolímeros acumulados en aproximadamente 2 mg de células

liofilizadas fueron convertidos en sus derivados ésteres metílicos volátiles (derivatización) por reacción con 1 ml de cloroformo y 1 ml de la mezcla metanol:ácido sulfúrico concentrado 85:15 en un tubo Pyrex con tapa de rosca y sellado con cinta de Teflón. Se colocaron los tubos en un baño a 100°C durante 140 minutos. Luego se extrajeron 3 μl de la fase orgánica inferior con una jeringa calibrada Hamilton y se inyectaron en el cromatógrafo.

Las corridas cromatográficas se efectuaron en un cromatógrafo Gow-Mac series 7850 con detector FID (flame ionization detector) y una columna con Reoplex 400 como fase líquida y Chromosorb 80/100 como fase estacionaria. El gas transportador fue N_2 a 30 psi y las corridas fueron efectuadas isotérmicamente a 150°C . Los resultados cromatográficos se registraron por medio de un integrador Hewlett-Packard 3395.

RESULTADOS

Tinciones

Las tinciones efectuadas con Azul de Nilo y observadas por fluorescencia dieron resultados negativos a 24 horas de cultivo para las dos cepas estudiadas de *Pseudomonas* sp., tanto en medio sólido como en medio líquido. Recién entre 40 y 50 horas se observó fluorescencia anaranjada al microscopio (acumulación de PHA), mientras que a 72 horas no se observó fluorescencia, indicando que hubo degradación del polímero.

Obtención del biopolímero

Se obtuvo con *P. aeruginosa* O1 un rendimiento de 14,2% del peso seco en bioplástico usando el medio mineral MSM. El rendimiento celular (lioilizado) fue de 227 mg/l.

Luego de purificado y reprecipitado presentó un color oscuro con una estructura flexible de características reológicas tipo goma. El tiempo de retención del patrón disponible de decanoato de metilo y el de la muestra fueron coincidentes a los 4,9 minutos, como se muestra en la Figura 1. También se observan un pico adicional a tiempo de retención de 7,55 minutos, mayor que el correspondiente al decanoato de metilo (tiempo de retención 4,9 minutos). Con *P. oleovorans* SK2669 se obtuvo un rendimiento celular de 360 mg/l, siendo el rendimiento en bioplástico del 7% del peso seco. En este caso los tiempos de retención del patrón de octanoato de metilo y de la muestra fueron los mismos a 2,4 minutos (Figura 2). Los extractos clorofórmicos purificados y evapora-

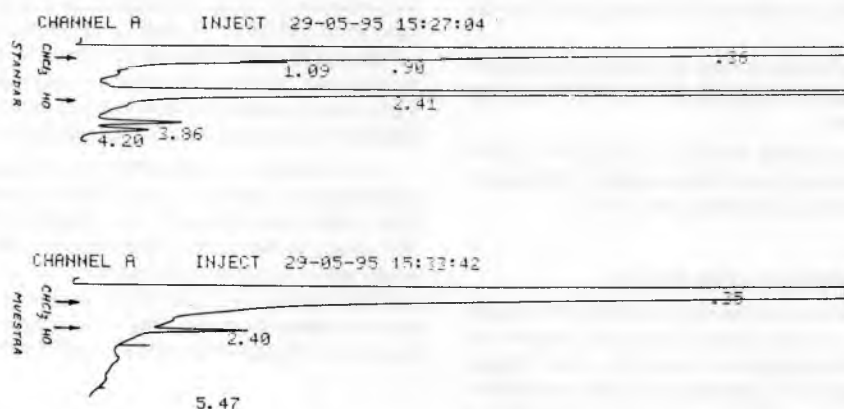


Figura 1: Cromatograma correspondiente al derivatizado de 2 mg de un cultivo liofilizado de *Pseudomonas oleovorans* SK2669 en medio MSM a 48 horas de incubación a 220 rpm y 30°C.

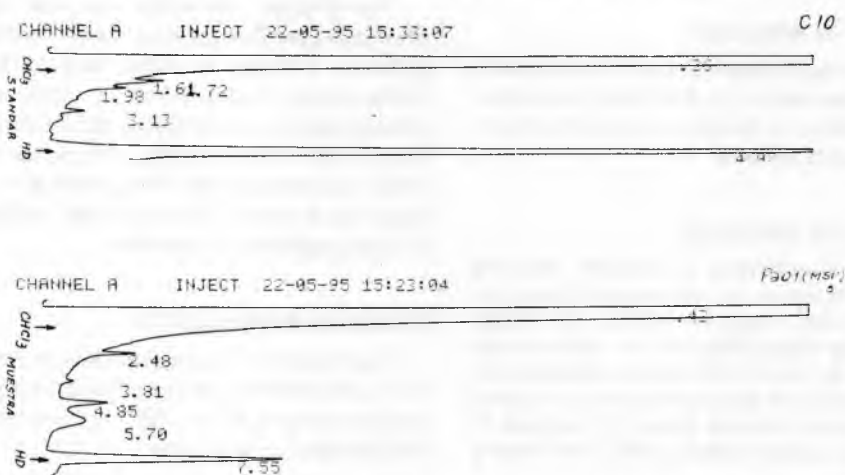


Figura 2: Cromatograma correspondiente al derivatizado de 2 mg de un cultivo liofilizado de *Pseudomonas aeruginosa* 01 en medio MSM a 48 horas de incubación a 220 rpm y 30°C.

dos rindieron películas de estructura flexible del tipo goma como con *P. aeruginosa* 01.

Rendimiento en diferentes medios

P. oleovorans SK2669 fue cultivada en dos medios de cultivo completos y se lo comparó con el medio salino MSM. Los resultados se indican en el Cuadro N° 1, observándose un aumento de diez veces en el rendimiento de masa seca para la cepa crecida en los medios completos y con respecto al PHA el rendimiento fue cuatro veces mayor.

Rendimiento de PHA con tres cepas de *A. chroococcum*

En un proceso de cultivo en dos etapas, utilizando la cepa 11, se obtuvo un rendimiento final de PHB del 22% del peso seco, dicha acumulación se registró a las 21 horas de cultivo bajo las condiciones indicadas (Materiales y Métodos). A las 48 horas se observó una disminución en la acumulación de PHA hasta 1,8%, en ese momento el rendimiento en biomasa fue de 3 g/l, correspondiente a una densidad óptica de 1,5.

Cuadro N° 1: Rendimiento de *P. oleovorans* SK2669 en diferentes medios de cultivo (composición en Materiales y Métodos). mliof: masa liofilizada, R DW: rendimiento base peso seco, R PHA: rendimiento de PHA base peso seco

Medio de cultivo	mliof (mg)	R DW (g/l)	R PHA (%DW)
caldo nutritivo	13,3	1,3	3,1
caldo triptona	57,8	1,2	3,3
MSM 0,5% caprilato	18,5	0,15	13,3

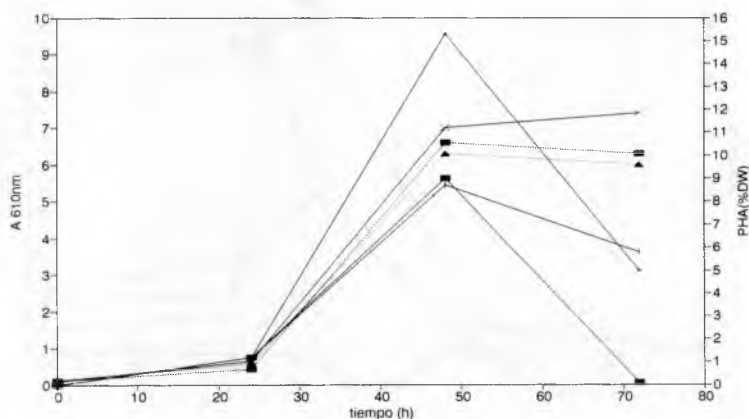
Con la cepa denominada CR el rendimiento final de PHA fue de 1,6% a 48 horas. Con la cepa 6B, también a 48 horas de cultivo, el rendimiento final de PHA fue del 2%. Los cromatogramas indicaron en todos los casos la obtención de polímeros de estructura química poli-3-hidroxiбутirato (PHB). Los resultados se resumen en el Cuadro N°2.

Cuadro N° 2: Rendimiento celular base peso seco (R DW) y rendimiento de PHB (R PHB) con tres cepas de *A. chroococcum* aisladas de muestras de suelos cultivadas por medio de un proceso en dos etapas (ver Materiales y Métodos)

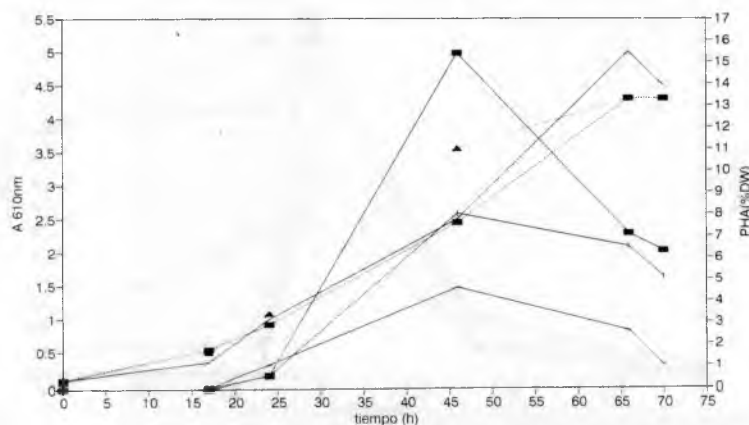
Cepa de <i>Azotobacter</i>	tiempo (h)	R DW (g/l)	R PHA (%DW)
6B	48	4,8	2
11	21	2,6	22
11	48	3,0	1,8
CR	48	3,9	2

Efecto del ácido valérico y ácido hexanoico agregados en fase logarítmica y en fase estacionaria

En las figuras 3 y 4 se muestra el efecto del agregado de ácidos orgánicos sobre el rendimiento en PHB, utilizando la bacteria *A. chroococcum* cepa 6B. Se observó en general que los ácidos inhiben en un 2% el crecimiento de la biomasa bacteriana.



Figuras 3 : Efecto del agregado de ácido isovalérico en fase logarítmica a un cultivo de *A. chroococcum* 6B en medio productivo de Burk en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos. X : Absorbancia a 610nm control, ■ : A 610nm 0,05%, ▲ : A 610nm 0,1%, + : PHB control, ■ : PHB con 0,05%, * : PHB 0,10%



Figuras 4: Efecto del agregado de ácido isovalérico en fase estacionaria a un cultivo de *A. chroococcum* 6B en medio productivo de Burk en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos. X : Absorbancia a 610nm control, ■ : A 610nm 0,05%, ▲ : A 610nm 0,1%, + : PHB control, ■ : PHB con 0,05%, * : PHB 0,10%

El ácido isovalérico agregado hasta una concentración final de 0,1%, a 24 horas (fase logarítmica) y de 0,05% incorporado a 44 horas de incubación (fase estacionaria), tuvo efecto promotor respecto del rendimiento máximo de PHB.

Pudo observarse (figura 4) que el agregado de ácido a una concentración final de 0,1% en fase estacionaria fue altamente inhibitorio respecto de la acumulación de PHB.

Luego del máximo de acumulación cerca de 48 horas el polímero se degradó en todos los casos, aumentando la velocidad de degradación respecto del control.

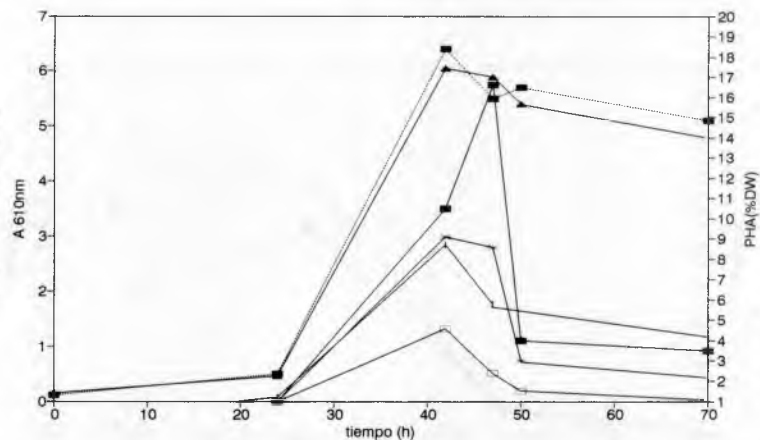
El ácido hexanoico agregado en fase logarítmica (figura 5) a una concentración final de 0,2% actuó inhibiendo la síntesis del PHA. En fase estacionaria la inhibición se produjo en el máximo de acumulación a 48 horas con 0,2%, pero luego la velocidad de

degradación fue notablemente menor, por lo que el PHB mantuvo altos valores respecto de concentraciones menores a 0,2% (figuras 6). No se observaron para ambos ácidos la aparición de otros picos cromatográficos indicativos de la biosíntesis de copolímeros. La degradación procedió una vez entrado el cultivo en fase estacionaria, cerca de 48 horas de cultivo. En el caso de la adición en fase logarítmica la velocidad de degradación disminuyó desde 0,05% a 0,2% de ácido, con esta última concentración la velocidad de degradación es similar a la del sistema control.

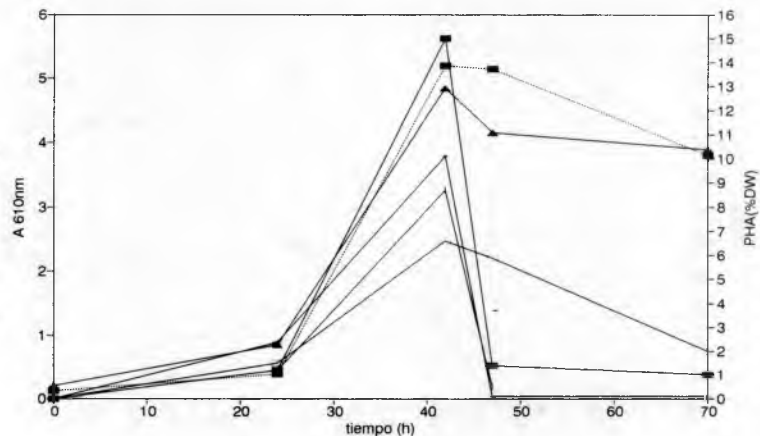
DISCUSION

Los resultados cromatográficos demuestran la obtención de polihidroxioctanoato (PHO) y de polihidroxidecanoato (PHD) a partir de *P. oleovorans* SK2669 y de *P. aeruginosa* 01, respec-

Figuras 5: Efecto del agregado de ácido hexanoico en fase logarítmica a un cultivo de *Azotobacter chroococcum* 6B en medio productivo de Burk en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos. ■: A 610nm 0,05%, ▲: A 610nm 0,1%, +: PHB control, ▣: PHB con 0,05%, * : PHB 0,10%, □: PHB 0,2%.



Figuras 6: Efecto del agregado de ácido hexanoico en fase estacionaria a un cultivo de *Azotobacter chroococcum* 6B en medio productivo de Burk en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos. ■: A 610nm 0,05%, ▲: A 610nm 0,1%, +: PHB control, ▣: PHB con 0,05%, * : PHB 0,10%, □: PHB 0,2%.



tivamente. En el caso de esta última bacteria se obtuvo un pico cromatográfico a mayor tiempo de retención que el decanoato de metilo, lo cual puede interpretarse como una fracción de monómero hidroxidodecanoato (HDD) en el biopolíéster.

Los rendimientos relativos en los tres medios de cultivo ensayados indicaron que el rendimiento en PHAs es mayor en el caso de un medio deficiente en algún nutriente esencial (nitrógeno, en este caso). La deficiencia en nitrógeno permite que el metabolismo microbiano desvíe el camino biosintético de formación de materiales de reserva y no de aminoácidos y proteínas (Anderson y Dawes, 1990).

Azotobacter acumuló PHA dentro de un mismo orden para las tres cepas estudiadas.

Esto indicó que existe un sistema enzimático único para un mismo género y especie, independientemente de la cepa estudiada. No obstante, los rendimientos pueden diferir en más de un orden en función de variables simples como ser el tiempo de cultivo y el pH (Carter y Dawes, 1979).

Respecto del efecto del agregado de los dos ácidos orgánicos en fase estacionaria sobre el rendimiento en PHB en *Azotobacter* pudo deducirse que muestran un efecto promotor hasta 0,05%. Utilizando concentraciones mayores de los ácidos el efecto es del mismo orden que en el control (ácido hexanoico) o bien inhibitorio. En fase estacionaria el agregado de ácido isovalérico debe ser menor a 0,1% para obtener un efecto promotor. Agregado al 0,1% en fase estacionaria disminuyó la velocidad de degradación, ya que esta alta concentración actuaría inhibiendo la enzima depolimerasa. En fase loga-

rítmica el agregado debe ser mayor (0,1%) para lograr un efecto promotor, pues el microorganismo se encuentra en activo crecimiento, y utilizaría parte del ácido orgánico agregado para producir biomasa no-PHB. El ácido hexanoico en alta concentración (0,2 %) inhibió el rendimiento máximo de PHB, sin embargo al ser agregado en fase estacionaria de crecimiento e inhibir la enzima depolimerasa permitió mantener altos valores de PHB. Dado que el periodo en el que se produce el máximo de PHB es reducido (menor a 5 horas) la inhibición de la depolimerasa ayudaría a poder cosechar el cultivo con menor riesgo de sufrir pérdidas notables de rendimiento por degradación enzimática.

Los polímeros obtenidos por *casting* mostraron notables diferencias en sus propiedades de flexibilidad. Los obtenidos a partir de *Pseudomonas* sp. (monómeros de ocho o más carbonos) fueron muy flexibles, en comparación con los rígidos y cristalinos obtenidos de *Azotobacter* (Page y Knosp, 1989), de unidad estructural de 4 átomos de carbono.

CONCLUSIONES

Se informa la obtención de biopolíesteres con diferentes propiedades de flexibilidad, de acuerdo al sistema enzimático de cada microorganismo utilizado. El efecto promotor sobre el rendimiento de compuestos involucrados en el metabolismo de los PHA y ácidos grasos fue demostrado en *Azotobacter*, agregados en dos fases del crecimiento.

Estos PHAs pueden utilizarse en diferentes aplicaciones, trabajos que se encuentran en curso.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, A., E. DAWES, G. HAYWOOD and D. BYROM European patent 90304267.9, April 1990.
- ANDERSON, A. and E. DAWES 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Reviews* 54,1, 450-472.
- BRANDL, H., R. GROSS, R. LENZ and R. FULLER 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1977-1982.

- CARTER, I. and E. DAWES** 1979. Effect of oxygen concentration and growth rate on glucose metabolism, poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and respiration of *Azotobacter beijerinckii*. *J. Gen. Microbiol* 110, 393-400.
- DANIEL, M., J. CHOI, J. KIM and M. LEBEAULT** 1992. Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly- β -hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium *Pseudomonas* 135. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 702-706.
- DOI, Y., M. TAMAKI, M. KUNIOKA and K. SOGA** 1987. Biosynthesis of an unusual copolyester (10% mol 3-hydroxybutyrate and 90% mol 3-hydroxyvalerate units) in *Alcaligenes eutrophus* from pentanoic acid *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1635-1636.
- GERHARDT, P.** Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington DC. 1994.
- HAYWOOD, G., A. ANDERSON, D. EWING and A. DAWES** 1990. Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 40135. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3354-3359.
- LEE, S.** 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. and Bioengineering* 49:1, 1- 14.
- PAGE, W. and KNOSP O.** 1989. Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 :1334-1339.
- SUZUKI, T., T. YAMANE and S. SHIMIZU** 1986. Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 322-329.