

미생물 합성에 의한 poly(3-hydroxybutyrate)의 분자량과 말단관능기 제어

Control of Molecular Weight and Terminal Groups of Poly(3-hydroxybutyrate) in Bio-synthesis

*Corresponding author

Chan Woo Lee
(cwlee@hoseo.edu)

이찬우

호서대학교 바이오산업학부

Chan Woo Lee

Department of Innovative Industrial Technology, Hoseo University, Asan, Korea

Received_March 27, 2018

Revised_May 01, 2018

Accepted_June 07, 2018

Textile Coloration and Finishing

TCF 30-2/2018-6/130-140

©2018 The Korean Society of Dyers and Finishers

Abstract In the bio-synthesis of poly(3-hydroxybutyrate)(PHB), which is a kind of poly(3-hydroxyalkanoate)(PHA), aimed to control the low molecular weight of PHB and obtain a telechelic PHB. As a result of incubation of *R. eutropha* at 30°C with ethylene glycol added as a chain transfer agent, PHB content on the dry cell weight increased up to 24h, however, it decreased after that, and the molecular weight of PHB increased from 9h to 12h, and then, decreased up to 72h. The decrease of the content and the molecular weight of PHB indicates that PHB was decomposed as an energy source in bacterial cells and was incorporated into metabolic pathways. ¹H-NMR of the obtained PHB after incubation for 72h was measured to determine the terminal groups of the PHB during incubation. As the results of ¹H-NMR measurement, the peaks derived from ethylene glycol in both terminals of PHB were observed. Which indicate that the terminal reaction was caused by the addition of ethylene glycol, and that telechelic PHB having hydroxyl group at the both terminals where molecular weight was controlled was successfully synthesized.

Keywords *bio-synthesis, low molecular weight, terminal groups, telechelic, poly(3-hydroxybutyrate), energy source, chain transfer agent*

1. 서 론

플라스틱제품은 우리들 생활을 풍요하고 편리하게 한 크나큰 원동력이었다고 말하여도 과언이 아니며, 플라스틱산업은 석유화학과 함께 발전하여, 플라스틱 문명이라고 말할 정도로 현대사회의 축이 되어왔다. 플라스틱은 사용목적에 따라 다양한 물성으로 조제하고 가공이 가능함과 아울러 저가이며 안정한 재료임으로 인해 우리의 생활과 산업활동에서 없어서는 안 될 필수품이 되었다.

그러나 대량으로 생산, 소비되며 석유자원을 토대로

한 플라스틱은 자연환경에서 분해되지 않는 것이 대부분으로 사용 후 처리방법인 소각으로 인해 지구가 오염되어 현재 급부상되고 있는 기후변화 및 지구온난화 등의 심각한 문제가 대두되고 있으며, 원유의 공급불안정화 및 가격 급상승 등으로 인하여 석유에 의존하지 않는 바이오를 기초로 한 폴리머의 기대가 높아지고 있다. 바이오를 기초로 한 폴리머의 하나로서 미생물에 의해 생산되는 폴리에스테르가 존재하며 미생물중에는 에너지 저장물질로서 폴리에스테르를 합성하고, 균체 내에 과립상으로 축적되어 있는 것들이 있다.

Table 1에 미생물이 합성하는 대표적인 폴리에스테

Table 1. Representative bio-polymers and PHA-producing strains

PHA	Strain	Structure
PHB	Many strains	
PHBV	Ralstonia eutropha Bacillus megaterium Pseudomonas cepacia	
PHBH	Aeromonas caviae Aeromonas hydrophila	
PHA	Pseudomonas putida Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas oleovorans	

- PHB : poly(3-hydroxybutyrate)
- PHBV : poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)
- PHBH : poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)
- PHA : poly(3-hydroxyalkanoate)

르를 나타내었으며, 이들은 전부 hydroxyalkanoic acid를 모노머 단위로 하는 고중합체의 폴리머로서 poly(3-hydroxyalkanoate)(PHA)라 불리어 진다. 미생물은 질소 및 인 또는 미량금속의 부족 등으로 인하여 증식이 부적합한 조건하에서도 외계의 탄소원으로부터 PHA를 합성하며, 성장환경속에서 섭취하는 탄소원이 고갈되면 체내의 PHA를 분해하여 에너지생산 및 아미노산 합성을 위하여 사용한다¹⁻⁹⁾.

PHA는 열가소적 특성으로 인해 자연계에 존재하는 각종의 미생물에 의해 분해 및 자원화되고 더욱이 재생 가능한 자원인 당 및 식물유로부터 생산이 가능하기 때문에 지속 가능형의 플라스틱재료로서 주목되어 지고 있으나, 견고하여 부러지기 쉬운 단점으로 인하여 응용 범위가 한정되어 있다.

따라서 본 연구에서는 이와 같은 결점을 보완하고 물성향상과 PHA의 유효활용을 도모하기 위하여 공중합

에 의한 물성개선 및 PHB세그먼트화에 의한 PHA의 저분자량화와 말단관능기 제어를 실시, 쇄연장을 가능케 하여 최종적으로 고분자량화시켜 PHA의 단점을 개선하고자 한다¹⁰⁾. 또한 우수한 물성을 지닌 PHA를 대량 축적한 미생물을 육종시키기 위하여는 PHA생합성에 관한 분자레벨에서의 기초적 지식과 더불어 세포내에서의 탄소대사를 이해하고 세포가 좋은 효율로 PHA를 생합성할 수 있도록 대사를 제어할 필요가 있다¹¹⁻¹⁶⁾.

본 연구에서는 전배양의 단계부터 연쇄이동(連鎖移動)제로서 ethylene glycol(EG)을 첨가하여 저분자량화를 도모하였으며, 미생물합성 한 PHB를 부분 가수분해하여 생성된 PHB올리고머와 succinic anhydride를 반응시켜 양 말단에 카르복실기를 지닌 telechelic PHB 올리고머를 합성하여 PHB의 기능을 도모함과 동시에 분자량 제어를 위해 개시반응에 관여하는 primer의 구조해석을 실시하고자 한다.

2. 실험

2.1 미생물

Ralstonia eutropha H16(ATCC 17699) 균주는 이화학연구소(Japan) 바이오리서치센터로부터 제공 받은 건조균체를 NB배양액(Nutrient Broth medium)에서 희석 후, 보통의 한천(寒天)배양액(Nutrient Agar medium)속의 30°C에서 16시간동안 표면에 도말(塗抹)평판배양 후, NB배양지의 30°C에서 16시간 동안 진탕(振盪)배양하였다. 배양액과 30% glycerol 용액을 500 μ l씩 1.5ml의 에펜틀튜브에 분배하여 -30°C에서 냉동보존하였다.

2.2 배양액 조성

증식용 배양액 즉, Nutrient Broth medium(NB배양액)의 조성 및 Micro mineral solution의 조성을 나타내었다.

Nutrient Broth medium 조성:

NH₄Cl ; 0.009mol/L(0.50g/L), Na₂HPO₄ ; 0.03mol/L(3.32g/L), KH₂PO₄ ; 0.02mol/L(2.80g/L), MgSO₂ ; 0.001mol/L(0.12g/L).

Micro mineral solution 조성:

FeCl₃/6H₂O ; 0.07mol/L(20.0g/L), MnCl₂/4H₂O ; 0.002mol/L(0.05g/L), CuSO₄/5H₂O ; 0.001mol/L(0.03g/L), ZnSO₄/7H₂O ; 0.003mol/L(0.1g/L), CaCl₂/H₂O ; 0.007mol/L(10.0g/L).

이상의 물질을 0.5N HCl에 용해시켜 제조하였다.

2.3 *Ralstonia eutropha*의 배양

PHB의 미생물합성은 2단계의 배양법[전배양(1 step), 본배양(2 step)]으로 실시하며, 배양의 스케일은 3.0L의 플라스크에 1.0L의 배양액을 채취하여 30°C의 항온에서 120rpm으로 진동배양을 실시하였다. PHB의 축적 시, 재현성이 좋은 결과를 얻기 위하여, PHA 생산배양지에 미생물을 배양하기 전에 균체량을 충분히 증식시켜 활성화시킬 필요가 있으며, 냉동시켜 놓은 균체를 얼음물 속에서 해동시켜 NB배양액에서 약 20시간 배양하여 균체를 활성화시킨 후, 배양액을 12,000rpm으로 2분간 원심분리하여 집균시킨 후, glucose(3%)를 탄소원으로 한 PHA 생산배양지에 균체를 옮겨 본 배양한 후, 배양액에서 세정 후 동결건

조시켰다.

동결건조시킨 균체에 클로로포름 약 3.0g/L을 첨가하여 실온에서 48시간 교반한 후, 추출액을 여과하여 메탄올에 적하시켜 재침전하였다. 본 배양의 배양시간을 변화시킴에 의해 합성된 PHB의 분자량과 구조의 경시변화를 관찰하였다. 또한 두 배양단계에서 연쇄이동제로서 전 배양에 3%, 본 배양에 5%의 ethylene glycol을 첨가하였다.

2.4 PHB의 부분적 가수분해

균체로부터 회수한 PHB를 1.0g/200ml의 농도로 클로로포름에 용해시켜, 5N HCl 50ml를 첨가하여 40°C에서 72시간 교반한 후, 클로로포름층만을 회수하여 이온교환수로 세정, 10배량의 디에틸에테르에 재침전시켜, 상층의 맑게 용해된 올리고머를 감압증류하여 농축시켜 회수한다.

2.5 PHB올리고머의 succinylation

PHB올리고머 10mg을 클로로포름 1ml에 용해시켜 succinic anhydride 20mg, pyridine 50 μ l을 첨가한 후, 40°C에서 48시간 교반 후, 이온교환수로 세정하여 감압증류시켜 용액을 제거한다.

2.6 측정

¹H NMR측정으로는 Bruker ARX spectrometer(500 MHz)를 사용하였으며, 용액으로는 chloroform-d를 사용하였다.

내부기준물질로는 tetramethylsilane(TMS)를 사용하였으며, 분자량측정은 LC-20AD pump와 RID10A로 구성되어진 Shimazu GPC system을 사용하여, TSKgel GMHHR-M칼럼에 chloroform용액을 유속 1.0mL/min으로 측정하였으며, 분자량의 교정에는 polystyrene 기준샘플을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 *Ralstonia eutropha*의 배양

3.1.1 배양시간과 수량

PHA의 생산배양지로부터 집균시켜 동결건조 한 건조 균체중량을 dry cell weight(d. c. w.)로 표현하고 추출하여 얻은 PHB중량의 건조 균체중량에 대한 비율

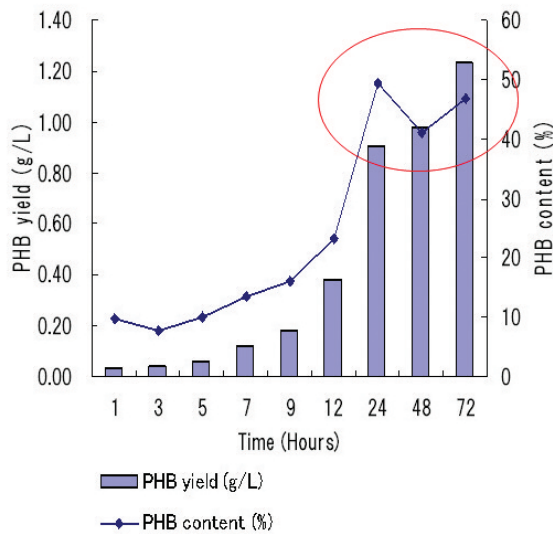


Figure 1. Time-dependent changes in yield and content of PHB.

R. eutropha(3g/L) was incubated with glucose(3wt%) and ethylene glycol(5wt%) at 30°C.

을 PHB 함유량(%)으로 하였다.

Figure 1에 나타난 것과 같이 건조균체중량과 PHB 수량은 배양시간이 경과함에 따라 PHB의 수량은 72시간 계속 증가하였으나, 균체내의 PHB함유량은 24시간까지는 증가하였으나 그 이후로는 감소하는 경향이 관찰되어 이와 같은 결과는 합성된 PHB가 재차 에너지원으로서 분해되어 사이클적인 대사경로가 도입되는

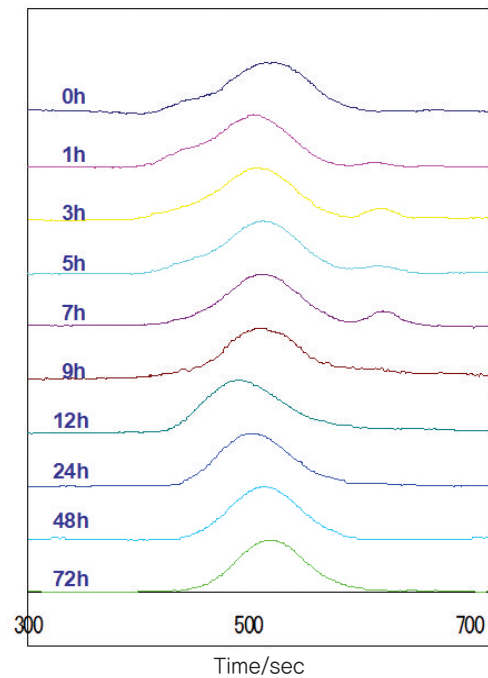


Figure 2. GPC curves of time-dependent changes in the molecular weight of PHB accumulated in cells.

R. eutropha(3g/L) was incubated at 30°C.

것으로 생각된다.

3.1.2 배양시간과 분자량

Figure 2와 Table 2에 PHB의 배양시간에 의한 분자량의 변화를 관찰하여 본 배양시간의 경과에 의해 얻

Table 2. Results of the bio-synthesis of PHB

Run	Time ^{a)} (h)	d.c.w. ^{b)} (g/L)	P(3HB) Yield (g/L)	P(3HB) Concent ^{c)} (%)	Mn (10 ³ Da)		PDI	
					A ^{d)}	B ^{e)}	A	B
1	0	0.34	0.03	9	34	-	3.4	-
2	1	0.36	0.04	10	65	2.9	3.1	1.1
3	3	0.55	0.04	8	57	2.5	3.1	1.1
4	5	0.59	0.06	10	50	2.5	3.2	1.2
5	7	0.87	0.12	14	46	2.2	2.9	1.2
6	9	1.13	0.18	16	38	-	4.0	+
7	12	1.66	0.39	23	54	-	3.2	-
8	24	1.83	0.90	49	52	-	2.4	-
9	48	2.38	0.98	41	43	-	2.3	-
10	72	2.64	1.24	47	32	-	2.6	-

a) : Incubation time at second stage
d) : High molecular weight component

b) : Dry cell weight
e) : Low molecular weight component

c) : Relative to dry cell weight

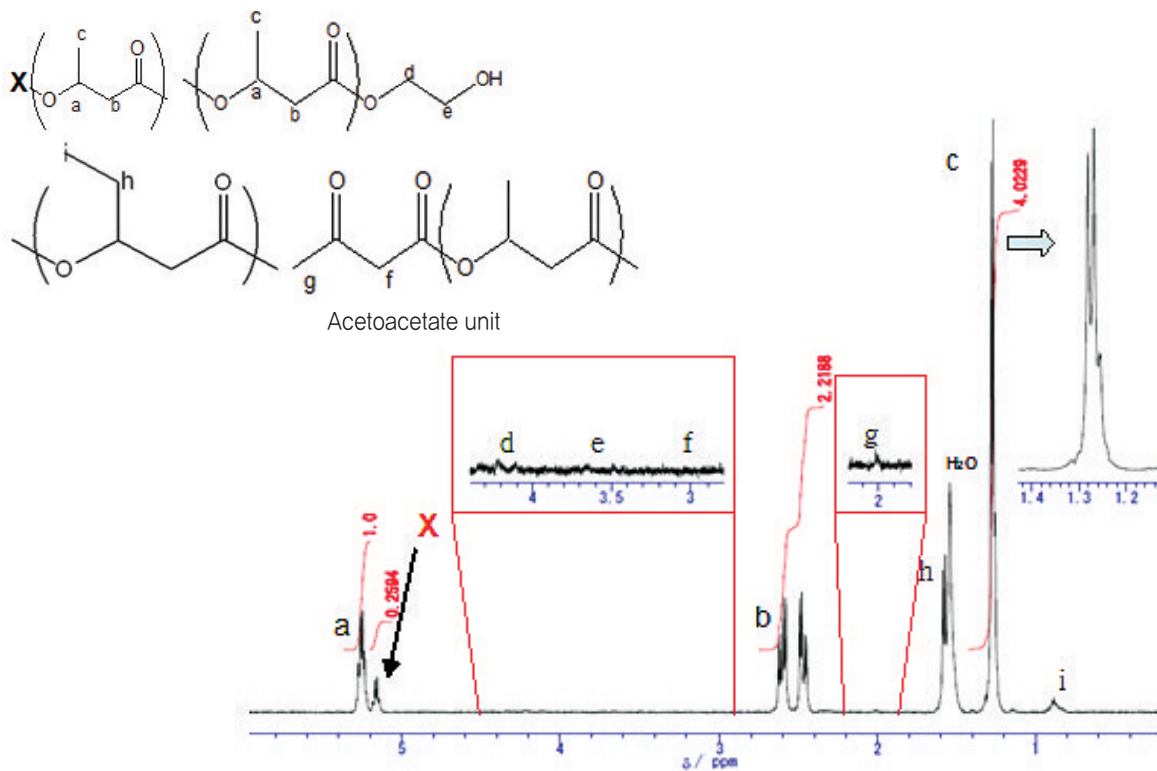


Figure 3. 500 MHz ^1H NMR spectra of *R. eutropha* was incubated with ethylene glycol in N-limited medium for 7h at 30°C.

은 PHB의 결과를 나타내었다. 전 배양과 본 배양의 두 단계에서 연쇄이동제로서 각각 3wt%와 5wt%의 에틸렌글리콜을 첨가하여 진행하였으며, 본 배양 초기에는 두 개의 봉우리를 가진 이봉성의 분자량분포가 관측되었으나, 배양 후기에는 저분자량의 피크는 소실되었다. 또한 본 배양에 있어 1~9시간까지는 고분자량체의 저분자량화가 시간이 경과함에 따라 진행되었으나, 9~12시간을 경계로 상승한 후, 재차 감소하는 결과가 관측되었다. 이와 같은 분자량의 저하도 축적된 PHB가 분해되어 에너지원으로서 대사된 것으로 예측되며, 전 배양과 후 배양 모두 에틸렌글리콜을 첨가함에 의해 저분자량화가 진행됨을 확인하였다. 또한 0~1시간, 9~12시간 사이에 관측된 분자량의 증가에 관하여 전자는 원래 축적되었던 PHB가 쇠연장되고, 후자는 배양 초기에 축적된 저분자량체가 쇠연장되어 고분자량화된 것으로 생각된다.

3.2 배양시간에 의한 PHB의 구조해석

재침전후의 PHB ^1H NMR측정결과를 Figure 3, Figure 4에 나타내었다.

Figure 3에 배양초기의 저분자량체와 고분자량체가 혼합되어 존재하고 있는, 배양시간이 7시간의 PHB ^1H NMR스펙트럼을 나타내었으며, Figure 4에는 고분자량체만의, 배양시간 72시간의 PHB ^1H NMR스펙트럼을 나타내었다.

두 종류의 스펙트럼 모두 δ 5.3ppm(a)에 메틴, δ 2.4~2.7ppm(b)에 에틸, δ 1.3ppm(c)에 메틸기 유래의 전형적인 PHB의 강한 시그널이 관측되었으며¹⁷⁻²⁰, Figure 4에 나타낸 것과 같이 δ 4.2ppm(d)과 δ 3.8ppm(e)부근에 ethylene glycol에 의한 정지말단의 acetoacetic acid 단위도 확인되었다. 이것은 분자량이 제어되어 양쪽 하이드록실기 말단의 PHB가 생성되었음을 시사하며²¹⁻²⁴ acetoacetate 단위의 존재는 이것이 primer의 한 종류로서 관여한 가능성을 시사하였다. 또한 h 및 i에 관측된 것과 같이 3-hydroxyvalerate(3-HV)단위와 acetoacetate단위로 확신되는 피크도 확인되었다.

Figure 3에는 δ 5.2ppm(X)에 저분자량체에서 유래된 것으로 확신되는 메틴의 시그널과 확대그림의 적분치로부터 δ 1.3ppm부근에 에틸유래의 시그널이

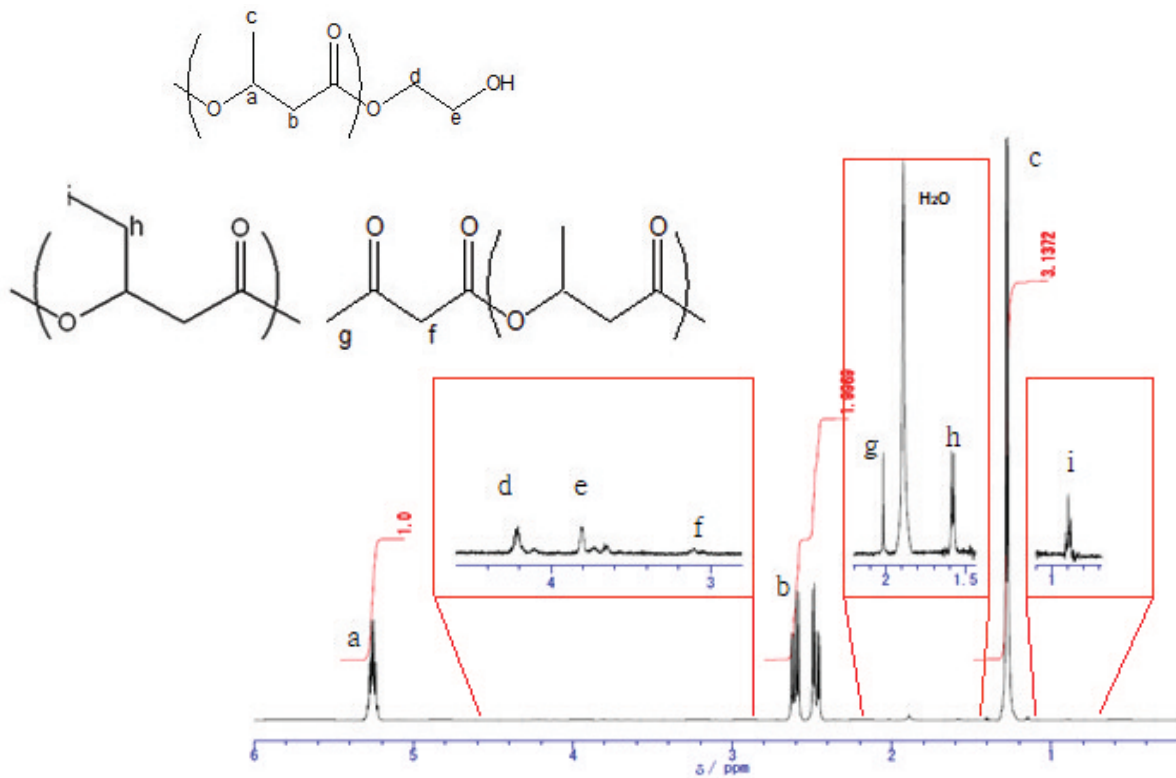


Figure 4. 500 MHz ¹H NMR spectra of *R. eutropha* was incubated with ethylene glycol in N-limited medium for 72h at 30°C.

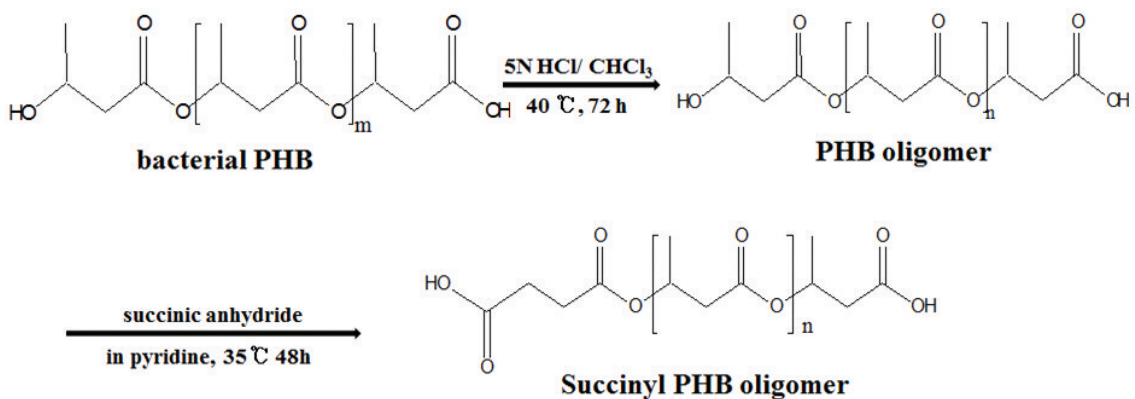
약간 중복되어 나타난 것도 확인되었다.

연쇄이동제의 첨가에 의한 저분자량화는 어느 정도 쇄연장이 진행된 후에 연쇄이동이 형성되어 분자량이 수만까지 증가되었으며, 보다 고도의 분자량제어를 위하여는 primer의 구조해석과 그들에 관여되는 대사경로 및 조절이 향후의 필수과제로 남아있어 Scheme 1의 메카니즘과 같이 미생물합성 한 PHB를 부분가수분해에 의해 올리고머화한 후, succinic anhydride과

반응시켜 양말단에 카르복실기를 지닌 telechelic PHB 올리고머를 합성하여 PHB의 기능화를 도모하고, PHB의 미생물합성에 개시반응의 primer로서 succinic acid가 관여함을 확인하고자하는 연구를 진행하였다.

3.3 PHB의 가수분해에 의한 분자량변화

Figure 5에 각각의 미생물합성 한 PHB의 GPC측정



Scheme 1. End group modification of PHB.

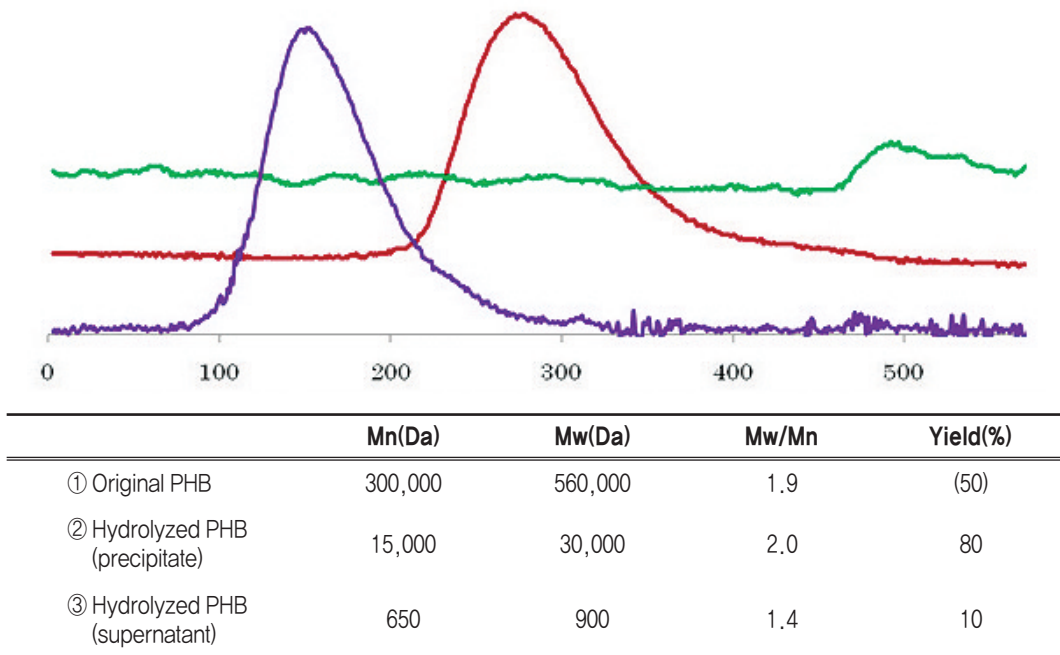


Figure 5. GPC curves of the PHB synthesized by bacteria and PHB oligomer after hydrolysis.

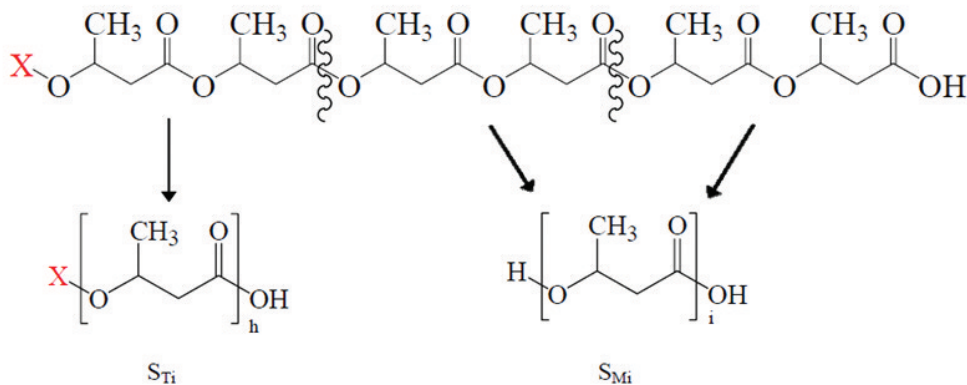
결과를 나타내었으며, 그 결과 PHB의 분자량은 수평균분자량(Mn) 300,000이었으나, 가수분해 후 디에틸에테르에 재침전시켜, 용해되지 않은 고분자량체의 PHB의 분자량은 수평균분자량 15,000이고, 용해된 저분자량체의 분자량은 650이었다. 이와 같은 결과로부터 가수분해가 진행되었음을 확인하였으며, 산 가수분해 후의 디에틸에테르에 가용 PHB와 불가용 PHB의 분자량에 크나큰 차이가 관측된 것으로는 불균일계에서 가수분해가 진행되어 가수분해의 진행이 불균일한 것이 원인으로 생각된다. 가수분해 후의 PHB올리고머의 ¹H NMR피크로부터 succinic acid말단 피크가 관

측되지 않은 것은 succinic acid기가 연결된 올리고머 STi가 PHB올리고머 SMi에 대하여 1/500(650/300000)의 몰비 정도 밖에 존재하지 않기 때문에 ¹H NMR에서는 검출되지 않은 것으로 생각된다(Scheme 2).

3.4 ¹H NMR에 의한 PHB의 구조해석

Figure 6에 미생물합성 한 PHB의 ¹H NMR측정결과를 나타내었다. 5.3ppm에 PHB의 반복단위인 메틸기, 2.5ppm에 메틸렌기, 1.2ppm에 메틸기의 피크가 관측되었으나, 말단의 피크는 관측되지 않았다.

Figure 7, Figure 8에 가수분해 후의 PHB올리고



Scheme 2. Partial hydrolysis of PHB.

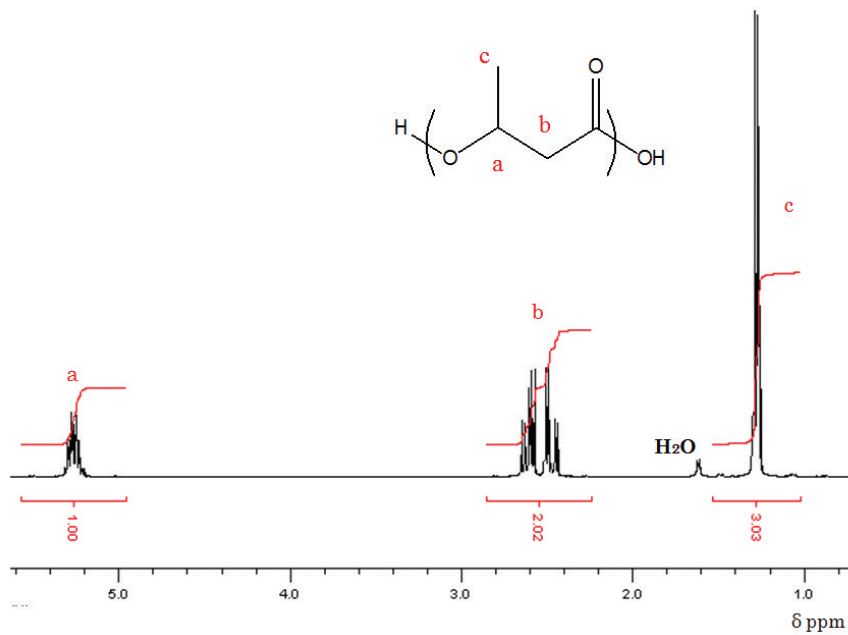


Figure 6. ¹H NMR spectrum of PHB synthesized by bacteria.

며(supernatant, precipitate)의 ¹H NMR측정결과를 나타내었다. PHB 말단의 메틴기가 4.2ppm에서 관측되었다. 또한 디에틸에테르에 용해된 PHB올리고머의 ¹H NMR측정(Figure 7)에는 3.7ppm에도 피크가 관측되었으며 이것은 모노머 유래의 피크라 생각된다.

말단에 succinic acid가 결합된 올리고머의 피크는

어떠한 경우에도 검출되지 않았다. 또한 succinyl반응 후의 PHB올리고머의 ¹H NMR측정결과를 Figure 9에 나타내었다. 5.2ppm, 1.6ppm에 반응전에 관측되지 않은 피크가 검출되어 이것이 succinic acid이 결합된 PHB올리고머의 말단메틴기, 메틸기(각각 d', e'의 피크) 유래의 피크라 생각된다. 또한 2.7ppm에 suc-

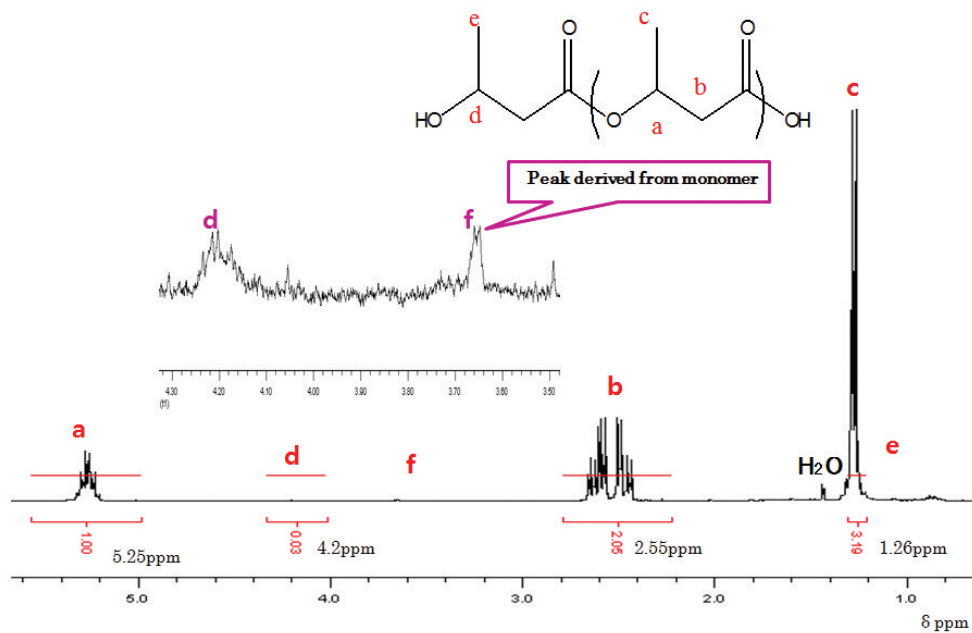


Figure 7. ¹H NMR spectra of PHB oligomer(supernatant).

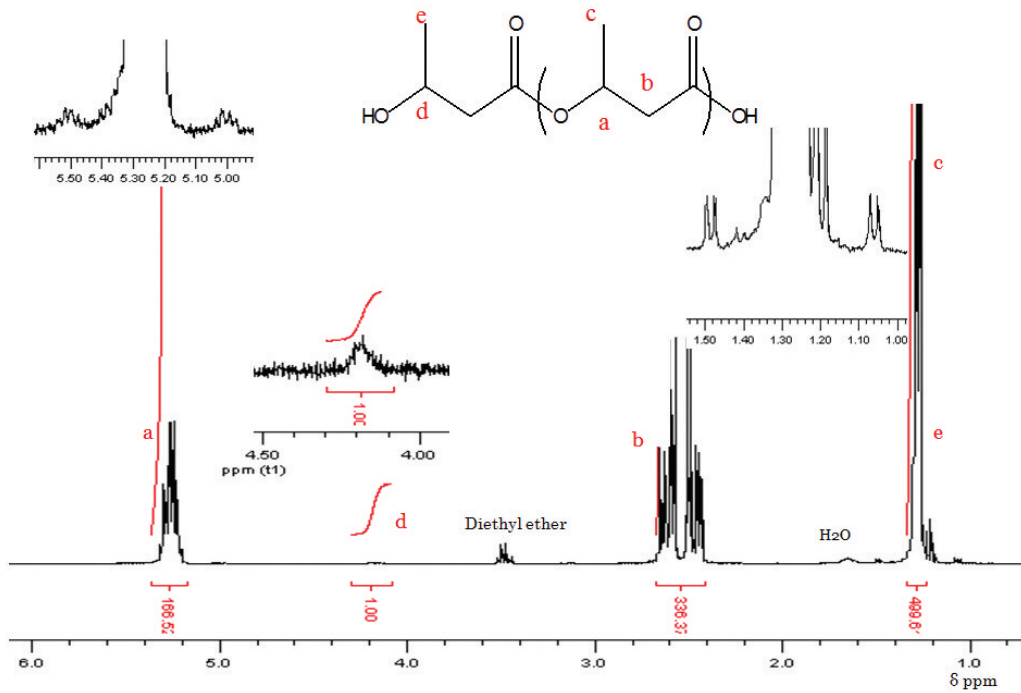


Figure 8. ¹H NMR spectra of PHB oligomer(precipitate).

cinic acid기의 메틸렌기(Figure 9의 g, f의 피크)유래의 피크가 확인되었다. 이와 같이 succinylation반응후에 succinic acid기 말단에 결합된 피크가 관찰됨으로서 succinylation이 순조롭게 진행됨을 확인하였다.

4. 결 론

PHB의 유효활용을 도모하기 위하여 미생물합성 과정에서 분자량 및 말단관능기 제어를 실시하여 생성된

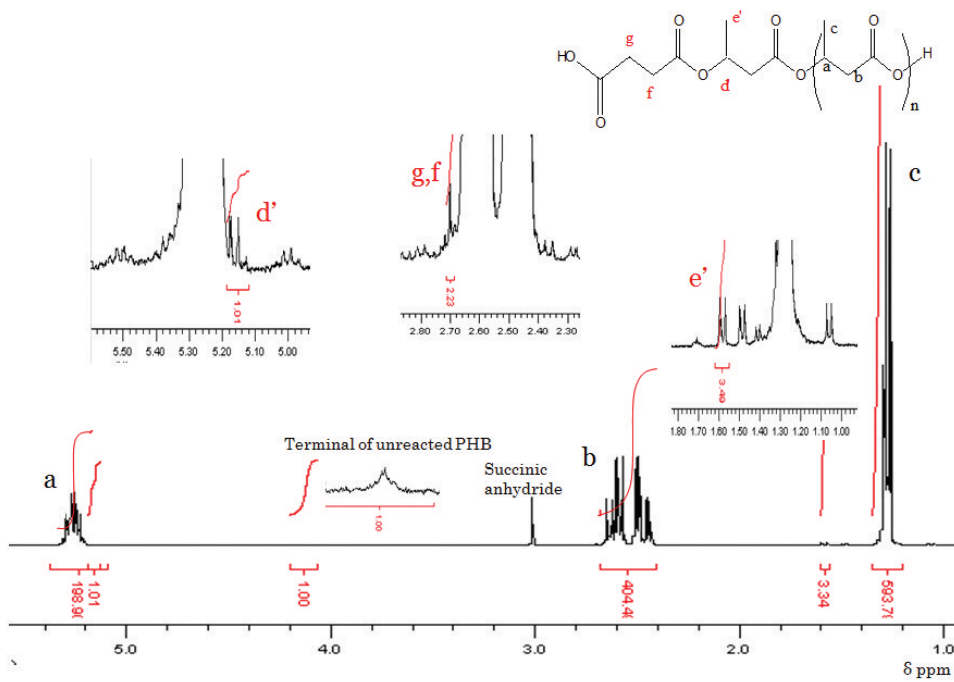


Figure 9. ¹H NMR spectra of succinyl PHB oligomer .

PHB의 분자량의 경시변화를 GPC측정에 의해 관찰하였다.

ethylene glycol이 연쇄이동제로서 역할을 함에 의해 PHB가 저분자량화됨이 확인되었으며, ethylene glycol이 첨가되지 않은 control 및 ethylene glycol이 첨가된 PHB 모두 배양초기에는 이봉성 분자량분포가 관측되었으나, 본 배양 12시간이후에는 저분자량체 유래의 피크가 손실되었다. 이와 같은 결과로 배양초기에 합성된 저분자량체가 PHB중합의 개시 메카니즘에 관여함을 예측할 수 있었으며, 또한 ¹H NMR측정에 의한 폴리머의 말단구조해석에서는 ethylene glycol에 의한 정지반응시에 관측되는 하이드록실에틸 말단기유래의 시그널이 확인되었다. 또한 PHB올리고머에 succinic anhydride을 반응시킴에 의해 하이드록실기 말단에 succinic acid기가 도입 가능함을 시사하였다.

이상의 결과로 PHB합성의 개시반응은 하이드록실기를 갖지 않은 primer가 관여하여 HB의 반복단위가 계속 연장됨에 의해 중합이 진행됨을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단(NRF)의 기본연구 지원사업(2015R1D1A1A01056755)의 지원으로 진행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. G. Q. Chen, A Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHA) Based Bio- and Materials Industry, *Chem. Soc. Rev.*, **38**(8), 2434(2009).
2. S. Y. Dai and Z. Li, Enzymatic Preparation of Novel Thermoplastic Di-block Copolyesters Containing Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and Poly(epsilon-caprolactone) Blocks via Ring-opening Polymerization, *Biomacromolecules*, **9**(7), 1883(2008).
3. S. Fiedler, A. Steinbüchel, and B. H. A. Rehm, PhaG-mediated Synthesis of Poly(3-hydroxyalkanoates) Consisting of Medium-chain-length Constituents from Nonrelated Carbon Sources in Recombinant *Pseudomonas Fagi*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(5), 2117(2000).
4. C. S. Ha and W. J. Cho, Miscibility, Properties, and Biodegradability of Microbial Polyester Containing Blends, *Prog. Polym. Sci.*, **27**(4), 759(2002).
5. S. K. Misra, S. P. Valappil, I. Roy, and A. R. Boccaccini, Polyhydroxyalkanoate(PHA)/inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications, *Biomacromolecules*, **7**(8), 2249(2006).
6. F. Ravenelle and R. H. Marchessault, One-step Synthesis of Amphiphilic Diblock Copolymers from Bacterial Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid], *Biomacromolecules*, **3**(5), 1057(2002).
7. A. Romano, L. H. W. V. Plas, B. Witholt, G. Eggink, and H. Mooibroek, Expression of Poly-3-(R)-hydroxyalkanoate(PHA) Polymerase and Acyl-CoA-transacylase in Plastids of Transgenic Potat Leads to the Synthesis of a Hydrophobic Polymer, Presumably Medium-chain-length PHAs, *Planta*, **220**(3), 455(2005).
8. Y. Saito, S. Nakamura, M. Hiramitsu, and Y. Doi, Microbial Synthesis and Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate): PHB and Hydroxyalkanoate Polymers, *Polym. Int.*, **39**(3), 169(1996).
9. X. W. Shen, Y. Yang, J. Jian, Q. Wu, and G. Q. Chen, Production and Characterization of Homopolymer Poly(3-hydroxyvalerate)(PHV) Accumulated by Wild Type and Recombinant *Aeromonas Hydrophila* Strain 4AK4, *Bioresour Technol*, **100**(18), 4296(2009).
10. K. Yamanaka, Y. Kimura, T. Aoki, and T. Kudo, End-Group Analysis of Bacterially Produced Poly(3-hydroxybutyrate): Discovery of Succinate as the Polymerization Starter, *Macromolecules*, **42**(12), 4038(2009).
11. Y. Kawaguchi and Y. Doi, Kinetics and Mechanism of Synthesis and Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes Eutrophus*, *Macromolecules*, **25**(9), 2324(1992).
12. Y. Jia, W. Yuan, J. Wodzinska, C. Park, A. J. Sinskey, and J. Stubbe, Mechanistic Studies on Class I Polyhydroxybutyrate(PHB) Synthase from *Ralstonia eutropha*: Class I and III Synthases Share a Similar catalytic Mechanism, *Biochemistry*, **40**(4), 1011(2001).
13. S. Zhang, S. Kolvek, R. W. Lenz, and S. Goodwin, Mechanism of the Polymerization Reaction Initiated and Catalyzed by the Polyhydroxybutyrate Synthase of *Ral-*

- stonia eutropha, *Biomacromolecules*, **4**(3), 504(2003).
14. R. J. Griebel and J. M. Merrick, Metabolism of Poly- β -Hydroxy butyrate: Effect of Mild Alkaline Extraction on Native Poly- β -Hydroxy butyrate Granules, *J. Bacteriol.*, **108**(2), 782(1971).
 15. L. L. Madison and G. W. Huisman, Metabolic Engineering of Poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to Plastic, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**(1), 21(1999).
 16. A. Steinbuchel and B. Fuchtenbusch, Bacterial and Other Biological Systems for Polyester Production, *Trends Biotechnol.*, **16**(10), 419(1998).
 17. Y. Doi, M. Kunioka, Y. Nakamura, and K. Soga, Proton and Carbon 13 NMR Analysis of Poly(β -hydroxybutyrate) Isolated from *Bacillus megaterium*, *Macromolecules*, **19**(4), 1274(1986).
 18. Y. Doi, M. Kunioka, Y. Nakamura, and K. Soga, Nuclear Magnetic Resonance Studies on Poly(β -hydroxybutyrate) and a Copolyester of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate Isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16, *Macromolecules*, **19**(11), 2860(1986).
 19. G. Yu and R. H. Marchessault, Characterization of Low Molecular Weight Poly(β -hydroxybutyrate)s from Alkaline and Acid Hydrolysis, *Polymer*, **41**(3), 1087(2000).
 20. S. Nguyen, G. Yu, and R. H. Marchessault, Thermal Degradation of Poly(3-hydroxyalkanoates): Preparation of Well-Defined Oligomers, *Biomacromolecules*, **3**(1), 219(2002).
 21. G. Adamus, Structural Analysis of Poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate-co-L-lactide] Copolyesters by Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**(15), 2477(2007).
 22. S. Carroccio, P. Rizzarelli, C. Puglisi, and G. Montaudo, MALDI Investigation of Photooxidation in Aliphatic Polyesters: Poly(butylene succinate), *Macromolecules*, **37**(17), 6576(2004).
 23. P. Rizzarelli, C. Puglisi, and G. Montaudo, Matrix-assisted Laser Desorption/ionization Time-of-flight/time-of-flight Tandem Mass Spectra of Poly(butylene adipate), *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**(11), 1683(2006).
 24. M. Kawalec, G. Adamus, P. Kurcok, M. Kowalczyk, I. Foltran, M. L. Focarete, and M. Scandola, Carboxylate Induced Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate)s, *Biomacromolecules*, **8**(4), 1053(2007).