

## FERMENTASI *FED-BATCH* PADA PRODUKSI PLASTIK MUDAH TERURAI POLI(3-HIDROKSIBUTIRAT) DARI ASAM OLEAT

### *FED-BATCH* FERMENTATION ON PRODUCTION OF A BIODEGRADABLE PLASTIC POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) FROM OLEIC ACID

Akmal Djamaan \*, Mohammed Isa Abdul Majid \*\* dan Mohd. Azizan Mohd. Noor \*\*\*

\* Jurusan Farmasi FMIPA, Universitas Andalas, Padang, Indonesia

\*\* Pusat Racun Negara, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia

\*\*\* Pusat Pengajian Sains Kajihiyay, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia

#### ABSTRAK

Proses fermentasi secara *fed-batch* dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan produksi plastik mudah lupus poli(3-hidroksibutirat) dari bahan dasar asam oleat menggunakan bakteri *Erwinia* sp. USMI-20.

Fermentasi dijalankan di dalam labu Erlenmeyer dengan berkapasitas 500 ml pada alat *incubator rotary shaker* suhu 30 °C, agitasi 200 rpm selama 60 jam. Pada awal pengkulturan di dalam medium fermentasi diberikan asam oleat sebanyak 5 g/l, sedangkan substrat asam oleat diberikan secara berulang sebanyak 2,5 g/l pada jam ke-30, 42 dan 54 setelah inkubasi. Pengambilan cuplikan dilakukan setiap 4 jam hingga jam ke-18 dan diikuti setiap 6 jam hingga jam ke-66. Pengamatan dilakukan terhadap kenaikan biomassa sel yang terbentuk, kandungan polimer, konsentrasi polimer dan jumlah asam oleat serta ammonium tersisa di dalam cairan fermentasi.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa dengan metode *fed-batch*, *Erwinia* sp. USMI-20 dapat menghasilkan P(3HB) dengan kandungan polimer maksimum 52 % dari berat kering selnya, konsentrasi polimer 2,8 g/l, berat kering sel 5,4 g/l.

**Kata Kunci** : *Fed-batch*, plastik mudah lupus, poli(3-hidroksibutirat, asam oleat).

#### ABSTRACT

A *fed-batch* fermentation with a purpose to increase the production of biodegradable plastic poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB), from oleic acid by *Erwinia* sp. USMI-20 has been carried out.

Fermentation was conducted in a conical flask in an incubator rotary shaker at temperature of 30 °C, agitation of 200 rpm for 66 hours. At first stage of fermentation process in a mineral medium, 5 ml of oleic acid as the sole carbon source was used while feeding were done with 2.5 ml of oleic acid at 30, 42 and 54 hours of cultivation. Sampels were collected every 4 hours until 18 hours of cultivation and every 6 hours until 66 hours of cultivation. P(3HB) production was characterized based on the increase of dry cells, polymer content, polymer concentration and the amount of oleic acid and ammonium remaining in the culture.

Results showed that by using *fed-batch* technique *Erwinia* sp. USMI-20 could produce P(3HB) with a maximum polymer content of 52 % of the dry cell weight, the concentration of polymer of 2.8 g/l, a dry cell weight of 5.4 g/l.

**Keywords** : *Fed-batch*, biodegradable plastic, poly(3-hydroxybutyrate, oleic acid).

#### PENDAHULUAN

Poli(3-hidroksibutirat), P(3HB), adalah salah satu plastik mudah terurai (*biodegradable plastic*) yang banyak diteliti akhir-akhir ini (Muller dan Seebach, 1993; Miyake *et al.*, 1996; Asada, 1996). Hal ini karena mempunyai sifat fisika dan kimia yang hampir sama dengan plastik sintesis seperti polipropilen, namun bila dibuang ke lingkungan akan terurai (lupus) dengan sempurna (Majid *et al.*, 1999). Dengan menggunakan plastik mudah lupus ini, diharapkan masalah kerusakan lingkungan yang banyak dilaporkan akibat penggunaan plastik sintesis dapat dikurangi.

P(3HB) telah digunakan sebagai bahan botol sampo yang dihasilkan oleh Wella (Jerman) dan helmet bagi pengendara motor di Amerika dan sebagai bahan pembungkus pada berbagai industri makanan dan minuman (Brandl *et al.*, 1995). Dalam bidang farmasi dan kedokteran, P(3HB) telah digunakan sebagai matriks lepas lambat obat (*sustained release*) sehingga kadar obat dapat dibebaskan dalam jumlah yang diinginkan untuk mencapai efek terapi (Miller dan Williams, 1987; Abe *et al.*, 1992). Dilaporkan pula, secara in-vivo polimer ini sangat stabil, penguraiannya sangat lambat dan tidak toksik terhadap sel (Holland *et al.*, 1987). Selanjutnya P(3HB) juga telah digunakan sebagai benang untuk jahitan luka setelah pembedahan dan untuk memperbaiki rekahan tulang yang retak (Doi, 1990). Kajian terakhir juga melaporkan bahwa P(3HB) juga berpeluang digunakan sumber karbon dalam larutan intravena (Poirier, *et al.*, 1995). Di pasaran dunia sekarang ini harga untuk 1 kg P(3HB) adalah US \$ 16.- atau lebih kurang Rp 160.000/kg (Majid *et al.*, 1999).

Pada penelitian terdahulu penulis telah mendapatkan metode fermentasi produksi plastik mudah terurai poli(3-hidroksibutirat), P(3HB) dari bahan dasar asam oleat menggunakan bakteri *Erwinia* sp. USMI-20 secara fermentasi sekelompok (*batch fermentation*) (Akmal, 2001), namun produksi P(3HB) masih relatif rendah, yaitu dengan konsentrasi polimer 2,8 g/l dengan berat kering sel 3,5 g/l. Menurut teori yang dikemukakan oleh Yamane (1993) dari asam oleat dengan rumus kimia  $C_{18}H_{38}O_2$ , koefisien produksi P(3HB) dengan rumus kimia  $(C_4H_6O_2)_n$  adalah 1,38 g/g, yang berarti bahwa dari 1 g asam oleat secara teoritis dapat dihasilkan P(3HB) sebanyak 1,38 g. Jadi kajian fermentasi secara fermentasi batch yang telah dilakukan tersebut masih dapat ditingkatkan produksinya.

Pada artikel ini dilaporkan penggunaan teknik *fed-batch* (suapan) dengan tujuan untuk meningkatkan produksinya. Asam oleat sebagai sumber karbon tunggal diberikan berulang selama proses fermentasi berlangsung, sehingga ketersediaan sumber karbonnya akan lebih terjamin selama fermentasi berlangsung

## METODE

### Pemeliharaan Bakteri *Erwinia* sp. USMI-20

Bakteri *Erwinia* sp USMI-20 ditumbuhkan di atas medium Nutrient Agar (NA) dalam cawan Petri dan agar miring. Inkubasi dalam inkubator suhu 37°C selama 24-48 jam kemudian disimpan di dalam lemari pendingin.

### Pembuatan Inokulum *Erwinia* sp. USMI-20 dalam medium mineral spesifik

Fermentasi dilakukan dalam labu Erlenmeyer 500 ml dalam medium mineral spesifik dengan komposisi sebagai berikut :

Kaliumdihidrogen fosfat	3,7 g/l
Dikalium hidrogen fosfat	5,8 g/l
Amonium hidrogen fosfat	1,1 g/l
Magnesium sulfat 0,1M	10 ml
Larutan Unsur mikro	1,0 ml
Larutan Vitamin	2,5 ml
Minyak Kelapa Sawit	4,6 g
Air suling	hingga 1000 ml

Komposisi larutan unsur mikro adalah sebagai berikut :

Besi (II) sulfat	2,78 g/l
------------------	----------

Mangan (II) klorida		1.98 g/l
Kobal sulfat		2.81 g/l
Kalsium klorida		1.67 g/l
Tembaga (II) klorida		0,17 g/l
Tembaga (II) sulfat		0,29 g/l
Air suling	hingga	1000 ml

Komposisi larutan vitamin adalah sebagai berikut :

Biotin		0.01 g/l
Pantotenat		2.40 g/l
Tiamin HCl		2.00 g/l
Nikotinamida		4.80 g/l
Piridoksin HCl		20.00 g/l
Air suling	hingga	1000 ml

Medium mineral spesifik dibuat dengan melarutkan bahan-bahan yang telah dipaparkan di atas ke dalam air suling steril. Larutan unsur mikro disediakan secara terpisah dengan melarutkan bahan-bahan di atas ke dalam HCl 0,1 N sebelum dicampurkan ke dalam medium. pH medium kemudian disesuaikan menjadi 7,0 dan medium yang tersedia disterilkan dengan otoklaf. Asam oleat dan MgSO<sub>4</sub> disterilkan secara terpisah dan ditambahkan secara aseptik. Larutan vitamin disediakan secara penyaringan (filter bakteri) dan sebanyak 2,5 ml ditambahkan secara aseptik ke dalam medium.

#### **Pengujian pengaruh penambahan (feeding) substrat asam oleat terhadap produksi P(3HB) dan kandungan polimernya**

Dibuat medium mineral spesifik dengan komposisi sebagaimana telah dipaparkan di atas, dengan sumber karbon asam oleat dengan konsentrasi 5 g/l yang telah diperoleh pada kajian sebelumnya (Akmal, 2001). Inokulasi dengan bakteri *Erwinia* sp. USMI-20, kemudian dikulturkan pada suhu 30 °C, PH 7 dan agitasi 200 rpm selama 48 jam. Penambahan (*feeding*) asam oleat diberikan sebanyak 2,5 g/l dengan selang waktu 30 jam, 42 jam dan 54 jam selama pengkulturan. Setelah fermentasi selesai, cairan fermentasi disentrifus dengan kelajuan 10.000 rpm selama 10 menit. Filtratnya diambil dan disimpan untuk penentuan nitrogen dan asam oleat tertinggal di dalam medium. Biomasanya diambil dan dibekukeringkan (*freeze drying*) selama 24 jam. Untuk setiap sampel yang diambil dilakukan analisis berupa: berat sel kering (biomasa), kandungan polimer, asam oleat tertinggal dan nitrogen tertinggal di dalam medium.

#### **Penentuan sisa asam oleat dalam medium**

Ditentukan dengan metode kromatografi gas, dimana asam oleat diubah terlebih dahulu menjadi asam oleat metil ester dengan proses metanolisis. Asam oleat dideteksi dengan kromatografi gas menggunakan internal standar asam kaproat metil ester (Akmal *et al.*, 1998a). Jumlah asam oleat yang masih tertinggal di dalam medium dihitung dari kurva kalibrasi yang dibuat dari asam oleat baku.

#### **Penentuan sisa nitrogen dalam medium**

Digunakan metode kimia dengan menggunakan 2 larutan pereaksi sebagai

Larutan A :	- Fenol	10	g/l
	- Natrium nitropurusid	0,0568	g/l
Larutan B :	- Natrium hidroksida	5	g/l
	- Dinatrium hidrofosfat anhidrous	53,6	g/l
	- Klorox	10	ml

Larutan A dan larutan B dibuat dengan melarutkan bahan-bahan di atas kedalam 1 liter air suling. Sebanyak 5 µl sampel ditambahkan dengan 2,5 ml larutan A, kemudian ditambahkan 2,5 ml larutan B ke

dalam campuran berkenaan. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menyimpan campuran tersebut di dalam es. Absorban (serapan) dibaca pada panjang gelombang 625 nm dengan spektrofotometer. Konsentrasi nitrogen tertinggal di dalam medium ditentukan berdasarkan kurva kalibrasi yang dibuat dengan menggunakan amonium fosfat baku.

#### **Penentuan kandungan P(3HB) dengan kromatografi gas**

Sebanyak 25 mg dari sel kering yang telah dibekukeringkan selama 24 jam, ditambah 2 ml kloroform dan 2 ml campuran metanol-asam sulfat (85:15). Tabung uji diletakkan dengan pembalut teflon untuk menghindarkan kebocoran selama pemanasan dalam blok pemanas (heater block) pada suhu 90° C selama 6 jam. Selanjutnya tabung uji dikeluarkan dari blok pemanas dan dibiarkan sehingga suhunya sama dengan suhu kamar. Kemudian 1 ml air suling ditambahkan kedalam setiap tabung uji dan divortex selama 3 menit. Ini bertujuan untuk mempercepat pemisahan fasa. Lapisan kloroform dikeluarkan dengan pipet Pasteur dan dikeringkan dengan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrous. Selanjutnya larutan kloroform ini digunakan untuk analisis kromatografi gas. Penentuan polimer dengan kromatografi gas dilakukan dengan alat kromatografi gas (Shimadzu GC 14B) dengan kolom kapilari BP-1, gas pembawa nitrogen dan detektor FID. Sebanyak 0,5 ml sampel (dalam kloroform) ditambah 0,5 ml internal standar CAME (Caproic Acid Methyl Ester) dan 0,5 µl dari campuran tersebut digunakan untuk injeksi ke dalam kolom. Program operasi peralatan kromatografi gas adalah sebagai berikut: suhu deteksi 250° C, suhu injektor 260° C, suhu kolom awal 250° C, waktu awal 3 menit, kecepatan laju program 10° C/ menit, suhu akhir 220° C, waktu akhir 0 menit.

#### **Isolasi dan pemurnian P(3HB) yang dihasilkan.**

P(3HB) yang terdapat di dalam sel *Erwinia* sp. USMI-20 setelah pengkulturan dan dibekukeringkan, diekstrak keluar menggunakan kloroform di dalam alat soklet. Larutan kloroformnya di ambil dengan penyaringan dan selanjutnya P(3HB) yang terlarut di dalamnya di endapkan dengan penambahan metanol sambil diaduk perlahan-lahan. Resin P(3HB) yang telah mengendap tersebut disaring dengan bantuan pompa vakum dan dikeringkan pada suhu kamar (Akmal, 1998b).

#### **Penentuan spektrum spektroskopi magnetik inti (NMR)**

Karakterisasi terhadap senyawa hasil pemurnian di atas, kemudian dilakukan analisis NMR yaitu: <sup>13</sup>C dan <sup>1</sup>H sebagai konfirmasi struktur kimia P(3HB) yang dihasilkan. Sampel dilarutkan dalam CDCl<sub>3</sub> dan dianalisis menggunakan alat 270 MHz NMR (Bruker) menggunakan tetrametilsilan (TMS) sebagai baku internal.

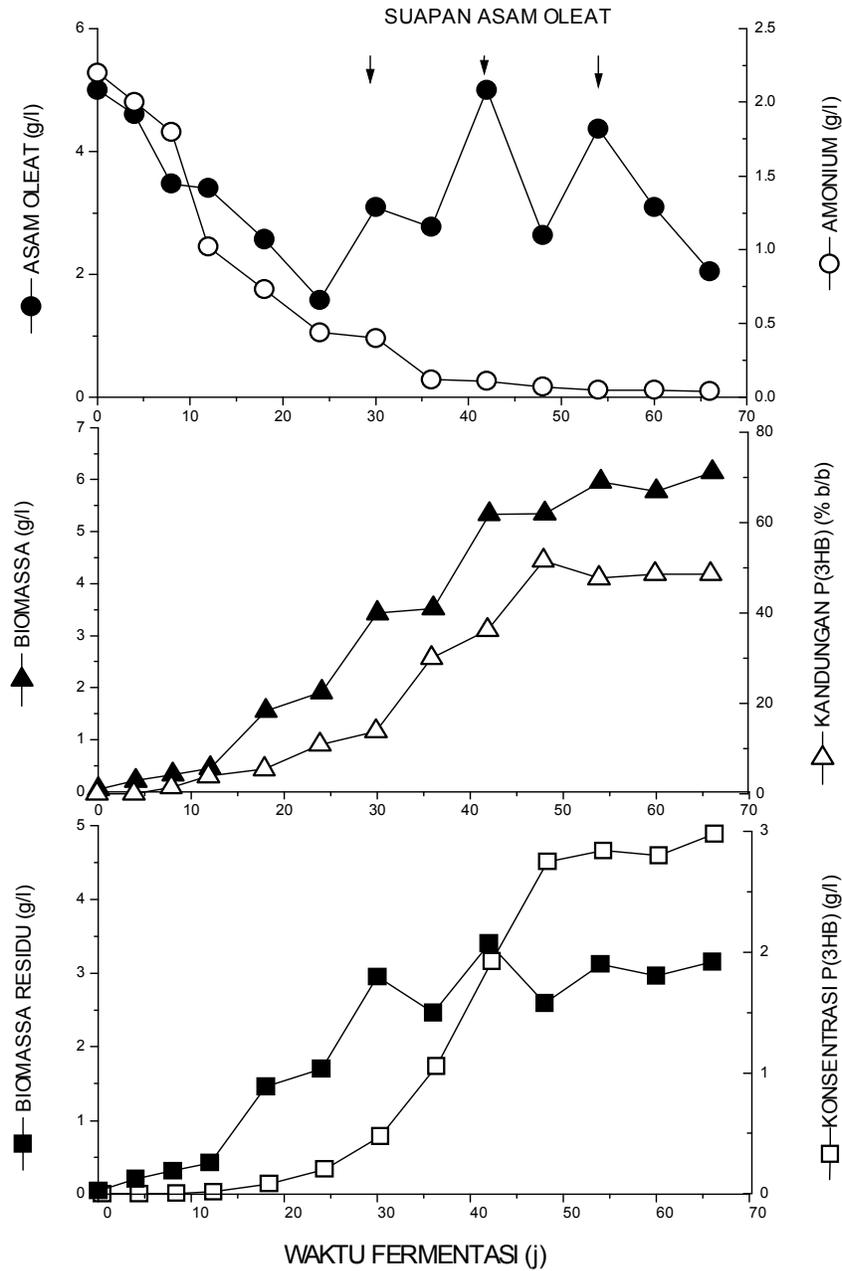
### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Gambar 1 memperlihatkan profil fermentasi *fed-batch* produksi P(3HB) oleh *Erwinia* sp. USMI-20 dalam medium mineral yang mengandung sumber karbon asam oleat 5.0 g/l yang diikuti oleh pemberian berulang asam oleat 2.5 g/l setelah 30, 42 dan 54 jam pengkulturan. Sumber nitrogen dan asam oleat telah digunakan dalam jumlah yang tinggi hingga jam ke 30 pengkulturan, yaitu dengan purata kadar penggunaan 0,06 g/l/j untuk nitrogen dan 0,15 g/l/j untuk asam oleat (Gambar 1). Selepas 30 jam pengkulturan, sumber nitrogen telah menjadi kehabisan, sedangkan sumber karbon telah ditambah dengan pemberian berulang asamoleat 2.5 g/l setelah 30, 42 dan 54 jam pengkulturan. Juga terlihat dengan jelas bahwa jumlah asam oleat di dalam medium berada dalam keadaan berlebihan hingga proses fermentasi dihentikan.

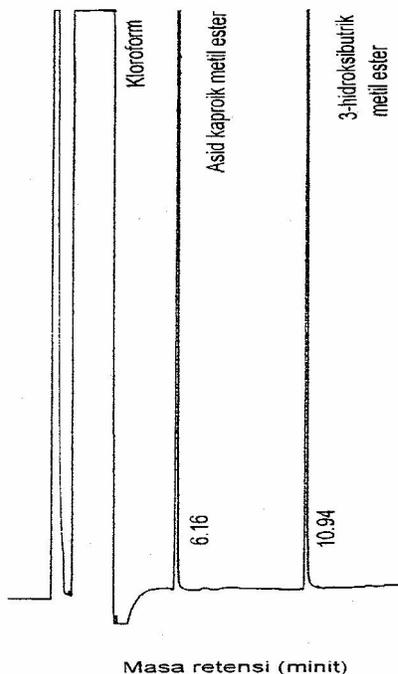
Bila diperhatikan produksi P(3HB), hingga jam ke 30 pengkulturan, ditemui bahwa P(3HB) yang dihasilkan relatif kecil yaitu 13,9 % b/b dengan purata kadar produksi 0,46 g/l/j. Setelah 30 jam pengkulturan, medium fermentasi berada dalam keadaan kekurangan sumber nitrogen dan kelebihan sumber karbon yang disuapkan secara berulang yang diikuti dengan adanya peningkatan produksi P(3HB) yang sangat cepat hingga jam ke 48. Kandungan P(3HB) tertinggi yang dapat dicapai adalah 52 % b/b dengan konsentrasi P(3HB) 2,8 g/l dan berat biomassa sel 5,4 gram. Setelah jam ke 42, produksi P(3HB)

sedikit menurun menjadi 48 % b/b pada jam ke 54 dan kemudian terlihat stabil hingga berakhirnya fermentasi pada jam ke 66.

Dibandingkan dengan cara fermentasi *batch* yang telah dilakukan sebelumnya (Akmal, 2001), terlihat ada kenaikan konsentrasi P(3HB) yang dihasilkan bila menggunakan cara *fed batch* ini, yaitu dari 1,9 g/l P(3HB) menjadi 2,8 g/l dan berat kering sel bakteri dari 3,5 g/l menjadi 5,4 g/l. Ini menunjukkan bahwa metode suapan berulang sumber karbon dapat meningkatkan konsentrasi P(3HB) yang dihasilkan sebesar 47 % dan berat kering selnya sebesar 54 % b/b. Hal ini terjadi karena ketersediaan sumber karbon yang cukup banyak selama fermentasi berlangsung sehingga memungkinkan untuk konversi menjadi P(3HB) oleh *Erwinia* sp. USMI-20 terjadi pada taraf optimal. Di samping itu metode *fed-batch* mempunyai keuntungan lain yaitu pertumbuhan sel bakteri tidak dihambat oleh terlalu pekatnya konsentrasi nutrisi yang diberikan di awal pengkulturan sebagaimana halnya fermentasi *batch* (Stanbury *et al.*, 1995).



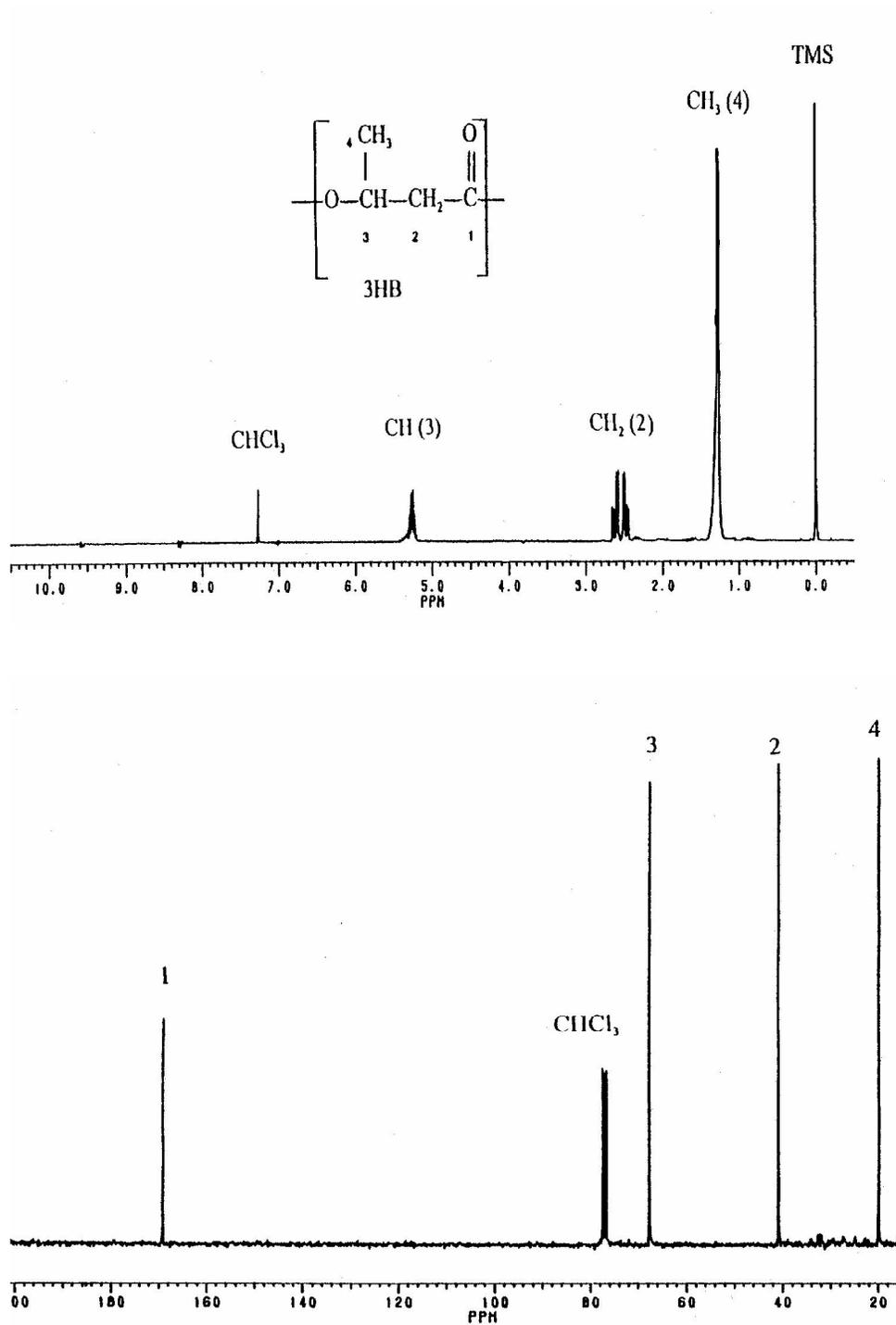
**Gambar 1.** Profil fermentasi *fed-batch* produksi P(3HB) oleh *Erwinia* sp. USMI-20 dari bahan dasar asam oleat



Gambar 2. Kromatografi gas senyawa plastik mudah lupus P(3HB) yang dihasilkan dari bahan dasar asam oleat oleh *Erwinia* sp. USMI-20.

Penggunaan asam oleat sebagai sumber karbon dalam produksi P(3HB) juga telah dilaporkan oleh peneliti lain yaitu Majid *et al.* (1994) menggunakan bakteri *Alcaligenes* sp. AK201. Dilaporkan bahwa kandungan polimer maksimum yang dihasilkan adalah 42 % b/b dengan konsentrasi asam oleat yang diberikan sebanyak 3 g/l.

Selanjutnya, polimer yang telah terakumulasi di dalam sel bakteri tersebut telah diekstrak keluar menggunakan kloroform dan dimurnikan dengan cara rekristalisasi menggunakan metanol. Karakterisasi dari P(3HB) yang telah dihasilkan tersebut ditunjukkan pada kromatogram kromatografi gas (Gambar 2) dan spektrum  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR (Gambar 3). Dari spektrum  $^1\text{H}$  NMR, ditunjukkan adanya 3 puncak spektrum yang terdiri dari: proton yang berasal dari  $\text{H}_3$  pada posisi  $\text{C}_4$  (1.4 ppm), proton yang berasal dari  $\text{H}_2$  pada posisi  $\text{C}_2$  (2.6 ppm) dan proton yang berasal dari  $\text{H}$  pada posisi  $\text{C}_3$  (5.3 ppm). Sedangkan 2 puncak lainnya berasal dari tetrametilsilan (0.0 ppm) dan kloroform (7.3 ppm). Tetrametilsilan dalam hal ini berfungsi sebagai internal standar sedangkan kloroform berasal dari  $\text{CDCl}_3$  yang digunakan sebagai pelarut. Sementara itu, dari spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR dapat diperhatikan adanya 4 puncak spektrum atom karbon yang terdiri dari: karbon pada posisi  $\text{C}_1$  (170 ppm), karbon pada posisi  $\text{C}_2$  (41 ppm), karbon pada posisi  $\text{C}_3$  (68 ppm) dan karbon pada posisi  $\text{C}_4$  (20 ppm), sedangkan 2 puncak lainnya berasal dari tetrametilsilan (0.0 ppm) dan kloroform (77 ppm).



Gambar 3. Spektra 270 MHz <sup>1</sup>H dan <sup>13</sup>C NMR plastik mudah lupus P(3HB) yang dihasilkan oleh bakteri *Erwinia* sp. USMI-20 dari bahan dasar asam oleat secara fermentasi *fed-batch*.

Dengan metode kromatografi gas dilakukan perbandingan kromatogram yang diperoleh dengan kromatogram P(3HB) standar pada keadaan analisis yang sama (Gambar 2). Hasilnya menunjukkan bahwa kedua kromatogram tersebut adalah identik, yaitu berdasarkan munculnya puncak-puncak spektrum pada masa retensi yang sama. Ini bermakna bahwa biopolimer yang dihasilkan oleh *Erwinia* sp. USMI-20 adalah benar P(3HB). Dari spektrum tersebut dan dibandingkan dengan spektrum P(3HB) standar (Doi, 1990) dapat dipastikan bahwa polimer yang dihasilkan adalah P(3HB).

Kemungkinan mekanisme biosintesis P(3HB) di dalam sel *Erwinia* sp. USMI-20 dapat diprediksi berdasarkan siklus  $\beta$ -oksidasi yang dialami oleh asam lemak dalam menghasilkan asetil-KoA dan dengan mempelajari mekanisme biosintesis P(3HB) yang telah dilaporkan oleh *R. eutropha* (Doi *et al.*, 1987; Shi *et al.*, 1997). Biosintesis P(3HB) dimulai dari perubahan asam oleat menjadi asil-KoA dan krotionil sebelum masuk ke dalam siklus  $\beta$ -oksidasi dengan tindakan enzim asil-KoA dehidrogenase. Selanjutnya krotionil akan membentuk L(+)- $\beta$ -hidroksi asil-KoA dengan tindakan enzim enoil-KoA dehidrogenase. Kemudian dilanjutkan dengan pembentukan  $\beta$ -ketoasil oleh tindakan enzim asetoasetil-KoA reduktase, dan pembentukan asil-KoA oleh untuk kemudian berubah menjadi asetil-KoA. Akhirnya dari asetil-KoA dengan bantuan enzim  $\beta$ -ketothiolase, asetoasetil-KoA reduktase dan P(3HB) sintase secara berurutan akan menghasilkan asam poli(3-hidroksibutirat).

## KESIMPULAN

Dari penelitian ini ditunjukkan bahwa dengan metode *fed-batch*, *Erwinia* sp. USMI-20 dapat menghasilkan P(3HB) dengan kandungan polimer maksimum 52 % dari berat kering selnya, konsentrasi polimer 2,8 g/l, berat kering sel 5,4 g/l.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abe, H., Doi, Y., and Yamamoto, Y., 1992, Controlled release of lasted an anti cancer drug from poly(3-hydroxybutyrate) microspheres containing acylglycerols. *Macromolecules. Rev.* A29: 229-235.
- Akmal, D., M.I.A. Majid, and M.N. Azizan, 1998a, Biosynthesis of a copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from palm oil and n-propanol or propionic acid as a second carbon source by *Erwinia* sp.USMI-20, *Program and Abstracts of The International Symposium on Biological Polyhydroxyalkanoates*, 9-11 September 1998, Tokyo, JAPAN
- Akmal, D., M.I.A. Majid, A. Agustien, L.L. Few, M.S. Razip, M.N. Nazalan and M.N. Azizan, 1998b, Production of a copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate) from palm oil and valeric acid by *Erwinia* sp.USMI-20, *Proceeding of The IMT-GT Uninet Conference*, 29-30 August, 1998, Hat Yai, THAILAND, 104-106.
- Akmal, D., 2001, Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) produced by *Erwinia* sp. USMI-20 from oleic acid, *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, 6(1), 1-8
- Asada, Y., 1996, Plastics from the sun and CO<sub>2</sub>. *Look Japan*. July ed.: 26-27.
- Brandl, H., Bachofen, R., Mayer, J. and Wintermantel, E., 1995, Degradation and application of polyhydroxyalkanoates. *Can. J. Microbiol.* 41(Suppl.1): 143-153.
- Doi, Y. Kunioka, M. Nakamura, Y. and Soga, K., 1987. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes autrophus* H16 from <sup>13</sup>C-labelled acetate and propionate. *Macromolecules.* 20: 2988-2991.
- Doi, Y., 1990, *Microbial Polyester*, UCH Publ. Inc., New York, 63-86.
- Holland, S. J., Tighe, B. J. and Could, P. L., 1987, Polymers for biodegradable medical revices, II: Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: hydrolytic degradation studies. *Biomaterials.* 8: 289-295.
- Majid, M. I. A., Hori, K., Akiyama, M. and Doi, Y., 1994, Production of poly(hydroxybutyrate) from plant oil by *Alcaligenes* sp., in: *Biodegradable Plastics and Polymers* (Eds. Doi, Y. and Fukuda, K.), Elsevier Science B.V, Amsterdam, 417-424.

- Majid M.I.A., D. Akmal, L.L. Few, A. Agustien, M S Toh, M.R. Samian, N. Najimudin and M.N. Azizan, 1999, Production of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer poly(3-hydroxy-butyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Erwinia* sp. USMI-20, *Int. J. Biol. Macromol.*, 25: 95-104.
- Miller, N. D. and Williams, D. F., 1987, On the biodegradations of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers. *Biomaterials*, 8: 129-137.
- Miyake, M., Erata, M. and Asada, Y., 1996, A thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, capable of accumulating poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *J. Ferment. Bioeng.* 82: 512-514.
- Müller, H. M. and Sebach, D. 1993. Poly(hydroxyalkanoates): A fifth class of physiologically important organic biopolymers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32: 477-502.
- Poirier, Y., Nawrath, C. and Somerville, C., 1995, Production of poly-hydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Biotechnol.* 13:142-150.
- Shi, H., Shiraishi, M. and Shimizu, K., 1997, Metabolic flux analysis for biosynthesis of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) in *Alcaligenes eutrophus* from various carbon sources. *J. Ferment. Bioeng.* 84: 579-587.
- Stanbury. P. F. , Whitaker, A. and Hall, S. J., 1995, *Principles of Fermentation Technology*, 2<sup>nd</sup>. ed., Pergamon Ltd , Elsevier Science, United Kingdom.
- Yamane, T., 1993, Yield of Poli-D-B-hydroxybutyrate from Various Carbon Sources, A Theoretical Study, *Biotechnol. Bioeng.* 165-170.