

Alcaligenes eutrophus *phbCAB* Operon의 재조합과 Poly- β -hydroxybutyric Acid의 대장균내 축적

김경태 · 박진서 · 박해철 · 이용현 · 허태린*

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Construction of the Recombinant *phbCAB* Operon of *Alcaligenes eutrophus* for Accumulation of Poly- β -hydroxybutyric Acid in *Escherichia coli*

Kim, Gyung-Tae, Jin-Seo Park, Hae-Chul Park,
Yong-Hyun Lee and Tae-Lin Huh*

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences,
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — In order to achieve poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) production using recombinant DNA in various host bacterial cells, the isolation of genes for PHB biosynthesis was attempted. As a result, a 5.2 Kb DNA fragment containing *phbCAB* operon of *Alcaligenes eutrophus* was isolated by colony hybridization using synthetic oligodeoxyribonucleotides as probes. The constructed recombinant plasmid pSK(+)-*phbCAB* operon was transferred to *Escherichia coli*, and the obtained transformant accumulated considerable amount of PHB. Morphological change of transformant with PHB granule was observed by light microscopy and electron microscopy. The accumulated yield of PHB by *Escherichia coli* harbouring the recombinant *phbCAB* operon in 2.5l fermentor was in the range of 35~70% during 18 h cultivation in Luria broth media containing 20 g/l glucose. These results suggested that complete gene for PHB biosynthesis was cloned and successfully expressed in *Escherichia coli*.

Poly- β -hydroxybutyric acid(PHB)는 균체내의 탄수화물저장물질로서 β -hydroxybutyric acid가 중합된 분자량이 $10^6 \sim 10^8$ 정도인 polymer로서 자연계에서 쉽게 분해되는 생분해성 고분자 물질이다. 대표적인 PHB 생산균주인 *Alcaligenes eutrophus*(1)내에서의 PHB 생합성은 *phbC*, *phbA*, 그리고 *phbB* 유전자들로 구성된 *phbCAB* operon에 의해 이루어진다고 밝혀져 있다. 즉 PHB의 생합성 경로는 *phbA* 유전자 산물인 β -ketothiolase에 의해 2분자의 acetyl-CoA가 acetoacetyl-CoA로 축합되고, 다음에는 acetoacetyl-CoA가 *phbB* 유전자 산물인 acetoacetyl-CoA reductase에 의해 β -hydroxybutyryl-CoA로 환원되어진 후, 최종

적으로 *phbC* 유전자산물인 PHB synthase에 의해 PHB로 전환 축적된다(2).

자연계에서 PHB를 가장 많이 축적시킬 수 있다고 알려진 *Alcaligenes eutrophus*에서는 균체내의 PHB가 에너지원으로서 탄소원은 충분하지만 세포 구성 영양소원인 nitrogen, magnesium, phosphate, 또는 sulfate 등이 제한될 경우에 주로 축적되는 것으로 알려져 있다(1). 따라서 PHB를 균체내에 다량 축적시키기 위해서는 우선 균체를 증식시킨 후 다시 배지조건을 변형시켜 PHB 생산을 유도시키는 등의 산업적인 대량생산에는 부적합한 2단계 배양기술이 요구된다.

한편 사용미생물의 종류와 propionate, valerate, 1, 4-butanediol과 같은 다양한 탄소원을 기질로 사용함으로써 polymer의 종류와 분자량이 다양한 copolymer(3, 4)를 생산할 수 있으나, *Alcaligenes eutro-*

Key words: Poly- β -hydroxybutyric acid, *Alcaligenes eutrophus*, *phbCAB* operon, *Escherichia coli*

*Corresponding author

*phus*는 이용 가능한 탄소원이 제약되므로 여러 종류의 copolymer를 생산하기 어려운 문제점이 있다. 이런 문제점들을 해결하기 위하여서는 이용가능한 탄소원들이 다양하며 PHB를 생산하기 위한 전구체인 acetyl-CoA가 충분히 축적되는 생리대사작용을 갖는 다양한 미생물들을 이용하여 재조합 유전자에 의한 PHB 및 그 관련 copolymer들의 생산을 시도해볼 필요가 있다.

이를 위한 첫단계로 PHB 생합성 재조합 유전자의 구성을 위한 PHB 합성 유전자원을 확보하고자 하였다. 이에 따라 비교적 PHB 생합성 경로와 관련 유전자의 구성이 잘 밝혀져 있는 *Alcaligenes eutrophus*의 PHB 생합성 유전자를 유전자원으로 하여 대장균내에서 유전자의 재조합과 분리를 시도하였으며, 발효조에서 재조합 유전자에 의해 대장균내에 축적된 PHB의 양을 조사함으로써 재조합 *phbCAB* operon의 분리와 대장균내 유전자 발현정도를 확인하고자 연구하였다.

재료 및 방법

사용균주와 플라스미드

PHB 생합성 유전자인 *phbCAB* operon의 gene source로는 PHB 생산균주로 알려진 *Alcaligenes eutrophus* H16(ATCC 17699)의 염색체 유전자를 사용하였다. 유전자의 분리와 재조합을 위한 cloning vector 및 subcloning vector로는 플라스미드 pUC119(5)와 플라스미드 pSK(+)(6)을 사용하였으며, 또한 재조합 유전자의 숙주세포로는 대장균 DH5 α 를 사용하였다.

사용시약

Agarose, acrylamide는 Bethesda Research Laboratory사(Gaithesburg, MD)의 제품을 사용하였으며, 제한효소와 T4 DNA ligase들은 Promega사(Madison, WI)의 것을 구입하여 사용하였다. DNA sequencing은 United States Biochemical사(Cleveland, OH)의 제품인 Sequenase kit를 사용하여 실시하였고, 방사능 동위원소들인 [α -³²P]dCTP(3000 Ci/mmol), [γ -³²P]ATP(3000 Ci/mmol), 그리고 [α -³⁵S]dATP(500 Ci/mmol)은 Amersham사의 제품을 사용하였다.

Nitrocellulose membrane은 Schleicher & Schuell사(Keene, NH), nylon membrane은 Du Pont-New

England Nuclear사의 GeneScreen을 사용하였다. 이외의 기타 일반시약들은 시판되는 1급 이상의 분석용을 사용하였다.

배지 및 배양조건

Alcaligenes eutrophus H16의 균체 증식은 NR 배지(7)를 사용하여 30°C에서 배양하였으며, 대장균의 경우는 LB 배지(8)에서 37°C로 배양하였다. 플라스미드를 갖는 대장균 형질전환체의 선별은 ampicillin이 50 μ g/ml 첨가된 LB 배지에서 행하였으며, 재조합 DNA의 선별은 ampicillin이 첨가된 LB 배지에서 X-gal과 IPTG를 첨가하여 사용하였다. 그리고 재조합 유전자에 의한 PHB 축적량은 ampicillin과 0~40% (w/v) 농도의 포도당이 함유된 LB 배지에서 배양하여 검토하였다.

염색체 유전자의 분리

Alcaligenes eutrophus H16 균주를 300 ml의 NR 배지로 30°C에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 얻은 균체로부터 염색체 유전자를 Brown 등의 방법(9)에 따라 분리하여 사용하였다.

플라스미드의 분리 및 형질전환

플라스미드 DNA는 alkaline lysis 방법(10)에 의하여 분리하였으며, 대장균내로의 형질전환은 RbCl/CaCl₂ 방법(11)에 의하여 실시되었고, 플라스미드가 도입된 형질전환체의 선별은 ampicillin이 50 μ g/ml 포함된 LB 배지에서 수행되었다.

DNA sequencing

DNA sequencing은 dideoxynucleotide-chain termination 방법(12)에 따라 실시하였다. 플라스미드 pUC119에 재조합된 유전자의 DNA sequencing은 pUC forward sequencing primer를 사용하였다.

Oligonucleotide의 제조

phbCAB operon의 분리를 위한 oligonucleotide probe들은 DNA synthesizer를 사용한 Phosphoramidite 방법으로 합성하였다. 합성된 oligonucleotide들은 Peoples 등(13)의 보고에 따라 *phbB* 유전자의 부분적인 염기서열들인 다음과 같은 4종류였다.

probe 1; 5'GGTATCGGAACCGCCATTTGCCA-GCGGCTGGCCAA3'

probe 2; 5'AAGTCGCTGGAGCAGCAGAAGGC-CCTGGGCTTC3'

probe 3; 5'CGTCGCGACGATCTTGTCGAGC-CGTCCTGGC3'

probe 4; 5'GTCGGCGCCGGTTCGAGAAACCG-GACTCCTCCGACG3'

이들은 [γ - 32 P]ATP와 T4 polynucleotide kinase (14)를 이용해 end-labeling한 후 사용하였다.

Southern hybridization

Alcaligenes eutrophus H16 염색체 DNA를 제한효소로 절단한 뒤 agarose gel 전기영동하였다. 이들을 capillary blot transfer법(15)에 따라 GeneScreen membrane에 transfer하고, 32 P가 labeling된 합성 oligonucleotide 및 DNA들을 probe로 사용하여 Southern hybridization을 실시하였다. Hybridization의 조건은 5×Denhardt's 용액과 200 µg/ml salmon sperm DNA, 그리고 0.1% SDS가 포함된 6×SSC(0.15 M sodium chloride and 0.015 M sodium citrate, pH 7.0) 용액에서, oligonucleotide probe의 경우 42°C에서, 그외의 DNA probe들은 65°C에서 hybridization한 후 실온 또는 65°C에서 2×SSC 및 0.2×SSC로 세척한 후 X-ray film에 노출시켰다.

Colony hybridization

PHB 생합성 유전자들을 갖는 대장균 형질전환체의 선별을 위해서는 ampicillin이 포함된 LB agar에서 생육하는 colony들을 다시 nitrocellulose circle위에 tooth-picking하고 이들을 ampicillin이 포함된 LB agar 배지에서 37°C로 6시간 배양하였다. 배양된 균체를 Grunstein과 Hogness의 방법(16)에 따라 nitrocellulose circle 위에서 lysis한 후 DNA들을 denaturation과 renaturation을 시켜 32 P가 labeling된 probe들과 Southern hybridization을 하는 colony hybridization을 실시하였다.

PHB의 축적 확인 및 정량

재조합 유전자에 의해 대장균내에 축적되는 PHB의 축적은 광학현미경(×1,000)과 전자현미경(×20,000)으로 세포내의 PHB granule의 생성을 관찰하여 확인하였다. 축적되는 PHB의 양은 배양된 재조합 유전자 형질전환체를 원심분리하여 균체를 수거한 뒤 유효염소농도 10%인 NaOCl로 용균하고, 40~60°C의

CHCl₃로 추출한 후, 추출된 PHB를 60°C에서 진공 건조하여, 얻어진 건조분말을 H₂SO₄ 원액으로 처리하여 crotonic acid로 전환시킨 후 210 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(17). 이때 표준물질로는 Sigma사(St. Louis, MO)의 PHB를 사용하였다.

당분석

배지의 잔류 포도당 농도는 DNS법(18)으로 정량하였으며, 표준물질로는 포도당을 사용하였다.

결과 및 고찰

phbAB 유전자의 분리 및 확인

phbCAB operon의 분리를 위한 첫단계로 먼저 *phbAB* 유전자의 분리를 시도하였다. 이를 위하여 밝혀진 *phbAB* 유전자 서열(13)을 바탕으로 합성한 바 있는 oligonucleotide들을 probe로 사용하였다. 제한효소 *Pst*I으로 절단된 *Alcaligenes eutrophus* H16 염색체 DNA를 *phbAB* 유전자의 유전자원으로 사용하여 플라스미드 pUC119의 *Pst*I 절단부위에 ligation하고 대장균 DH5α를 형질전환시켰다. 얻어진 형질전환체들을 ampicillin과 X-gal, 그리고 IPTG가 포함된 LB agar 배지에서 배양하여 재조합 플라스미드를 갖는 형질전환체들을 선별하였다.

선별된 재조합 형질전환체들 중 재조합 *phbAB* 유전자를 포함하는 형질전환체를 최종선발하기 위하여 얻어진 형질전환체들을 nitrocellulose circle에 tooth-picking하여 옮긴 후 용균시키고 여기에 32 P-labeling된 4종류의 oligonucleotide들을 동시에 probe들로 사용한 Southern hybridization을 시키는 colony hybridization을 실시하였다.

32 P-labeling된 oligonucleotide들과 hybridization되어 X-ray film상에서 positive signal을 보여주는 형질전환체들을 선별한 뒤 ampicillin이 첨가된 LB배지에서 액체배양하고 이들로부터 플라스미드 DNA들을 분리하였다. 얻어진 재조합 플라스미드 DNA들을 제한효소 *Pst*I으로 다시 절단한 결과 Fig. 1과 같이 2.3 Kb 크기의 DNA 조각이 플라스미드 pUC119에 삽입되어 있음을 확인하였다.

또한 얻어진 재조합 유전자에 실제로 *phbAB* 유전자가 포함되어 있는지를 확인하기 위하여 2.3 Kb 유전자 조각과 삽입된 방향이 반대로 된 재조합유전자들을 다시 선별한 후 pUC forward sequencing primer를 사용해 DNA sequencing을 실시하였다. 그

결과 얻어진 재조합 유전자는 Fig. 2에서와 같이 Peoples 등(13)이 보고한 *phbA* 유전자 및 *phbB* 유전자와

동일한 염기서열을 하고 있음을 확인하였다.

***phbCAB* operon의 분리 및 확인**

얻어진 *phbAB* 유전자를 다시 DNA probe로 사용하여 PHB 합성에 필요한 *phbCAB* operon이 모두 포함된 유전자조각의 분리를 시도하였다. 이를 위하여 *Alcaligenes eutrophus*의 *phbCAB* operon내에 존재하고 있지 않은 것으로 알려진(2, 13) 제한효소 *EcoRI*과 *SmaI*에 의해 이중절단된 *Alcaligenes eutrophus* 염색체 DNA를 agarose gel 전기영동하고 GeneScreen membrane에 옮겨 ³²P가 labeling된 2.3 Kb 크기의 *phbAB* 유전자와 Southern hybridization을 실시하였다. 이 결과 Fig. 3에서와 같이 5.2 Kb 정도 크기의 염색체 DNA 조각만 hybridization이 되는 것으로 나타나 이 조각내에 *phbCAB* operon이 존재하고 있음을 확인할 수 있었다.

위의 결과를 바탕으로 *Alcaligenes eutrophus* 염색체 DNA를 제한효소 *EcoRI*과 *SmaI*으로 이중 절단시키고 agarose gel 전기영동한 후 약 5.2 Kb 크기를 갖는 DNA 조각들을 agarose gel로부터 GeneClean kit(Bio

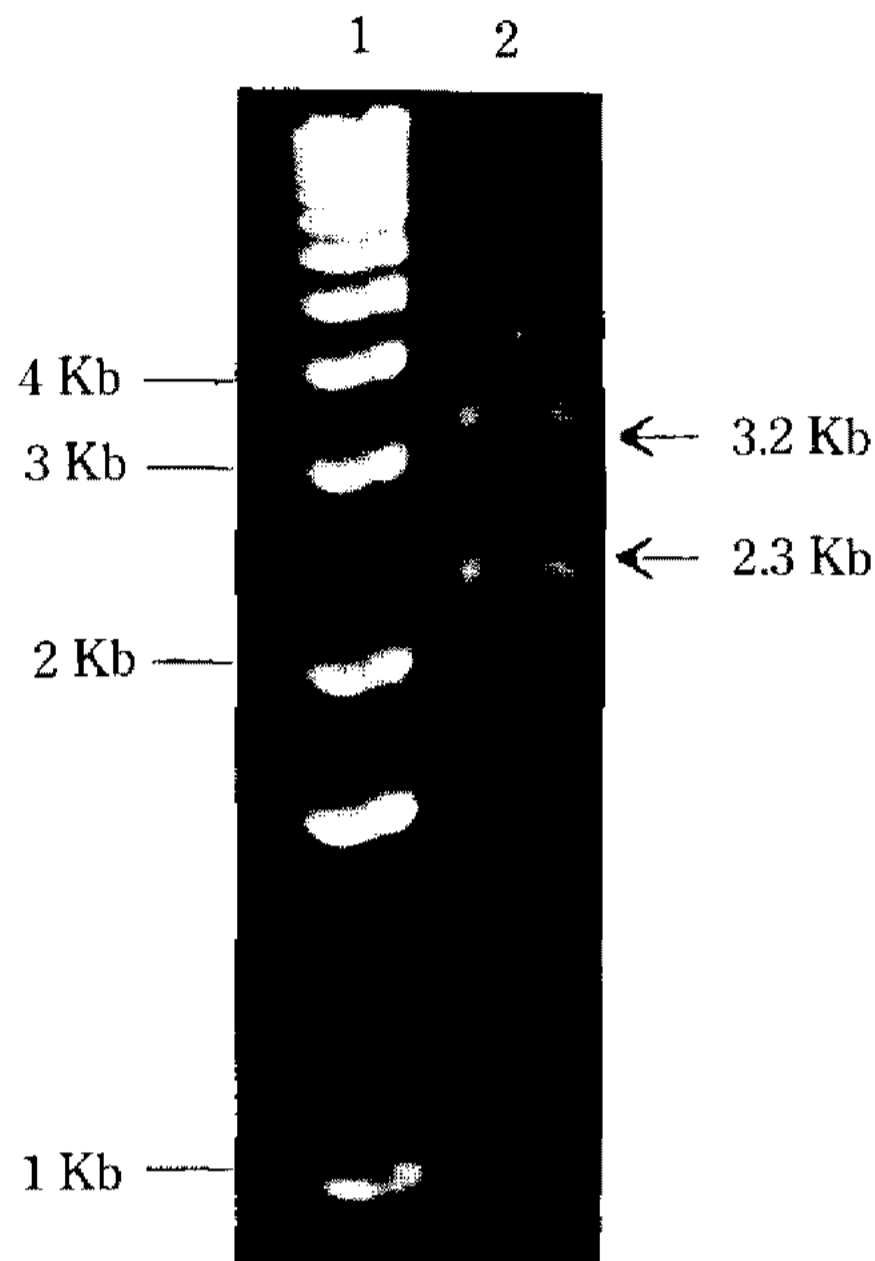


Fig. 1. Restriction pattern of the recombinant pUC119-*phbAB* gene.
Lane 1; 1 Kb ladder, size marker, Lane 2; pUC119-*phbAB* digested with *PstI*

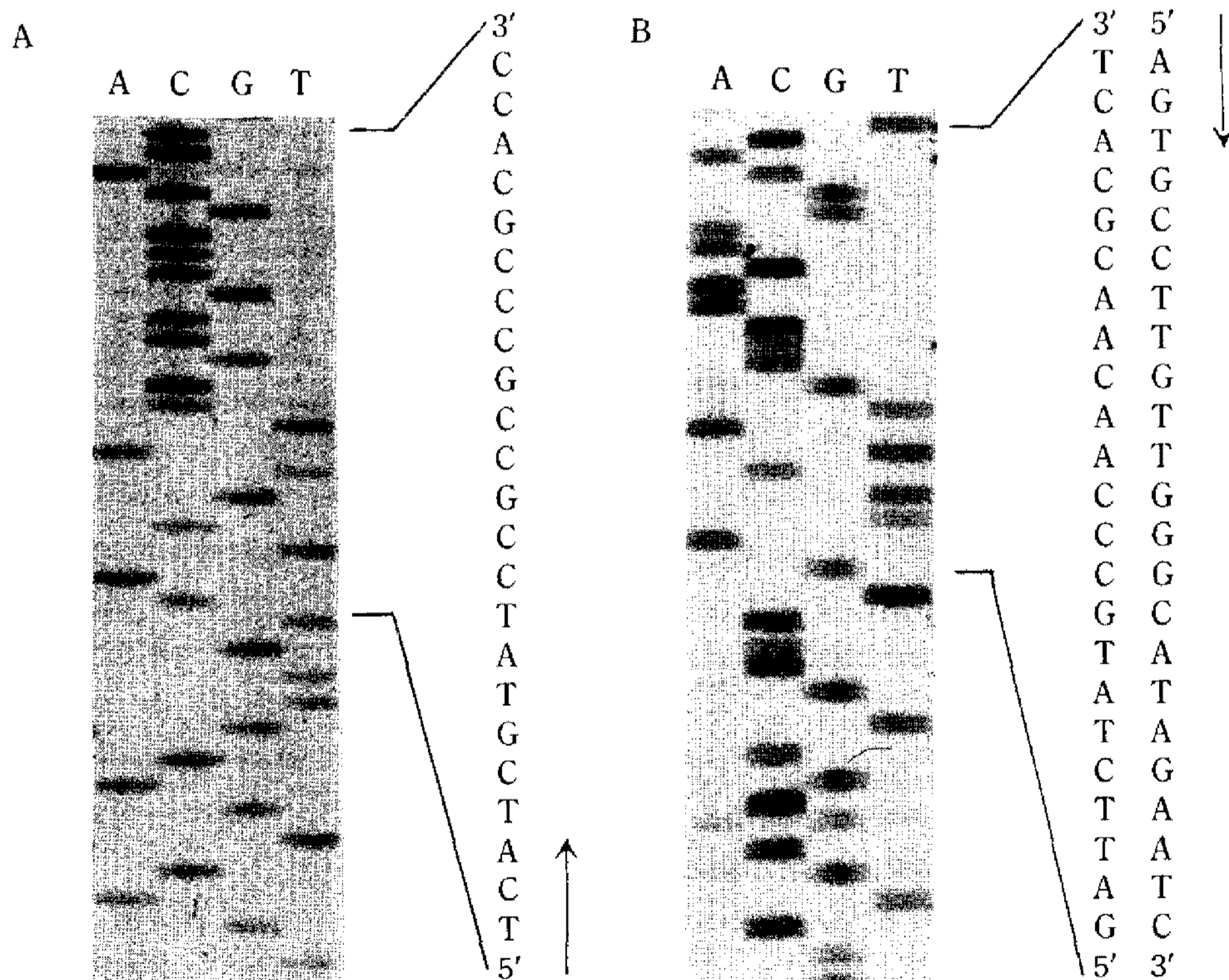


Fig. 2. Identification of DNA sequencing for *phbAB* gene in the recombinant plasmid.
Arrow indicates the reading direction of the nucleotide sequence.
A: DNA sequence matched with the protein coding sequence near N-terminal region of *phbA* gene
B: DNA sequence matched with 3'-untranslated region of *phbB* gene

101)를 사용하여 분리 정제하였다. 분리된 DNA 조각들을 같은 제한효소들로 절단된 플라스미드 pSK (+)에 ligation하여 대장균 DH5 α 를 형질전환시키고, 얻어진 형질전환체들을 ³²P가 labeling된 2.3 Kb 크기의 *phbAB* 유전자와 Southern hybridization시키는 colony hybridization을 실시하였다. X-ray film에서

positive signal을 보여주는 형질전환체들을 ampicillin이 포함된 LB액체배지에서 배양후 플라스미드 DNA들을 분리하였다.

얻어진 플라스미드 DNA들중 제한효소 *EcoRI*과 *SmaI*으로 절단시 5.2 Kb 크기의 DNA 조각이 재조합되어 있는 것을 선발하였으며, 이 재조합 플라스미드를 pHB52라고 명명하였다(Fig. 4A). 재조합 플라스미드 pHB52는 *phbC* 유전자내에 0.6 Kb 간격으로 존재한다고 알려진 2개의 제한효소 *PstI* 작용부위가 존재하고 있는 것으로 나타났으며, 동시에 *phbAB* 유전자가 포함된 2.3 Kb 크기의 *PstI* 절단 DNA 조각도 존재하는 것으로 확인되어(Fig. 4B) 제한효소 *PstI*의 작용부위와 DNA 절편조각의 크기가 Peoples 등(2, 13)이 보고한 PHB 생합성 유전자의 제한효소 지도와도 일치하는 것을 알 수 있었다.

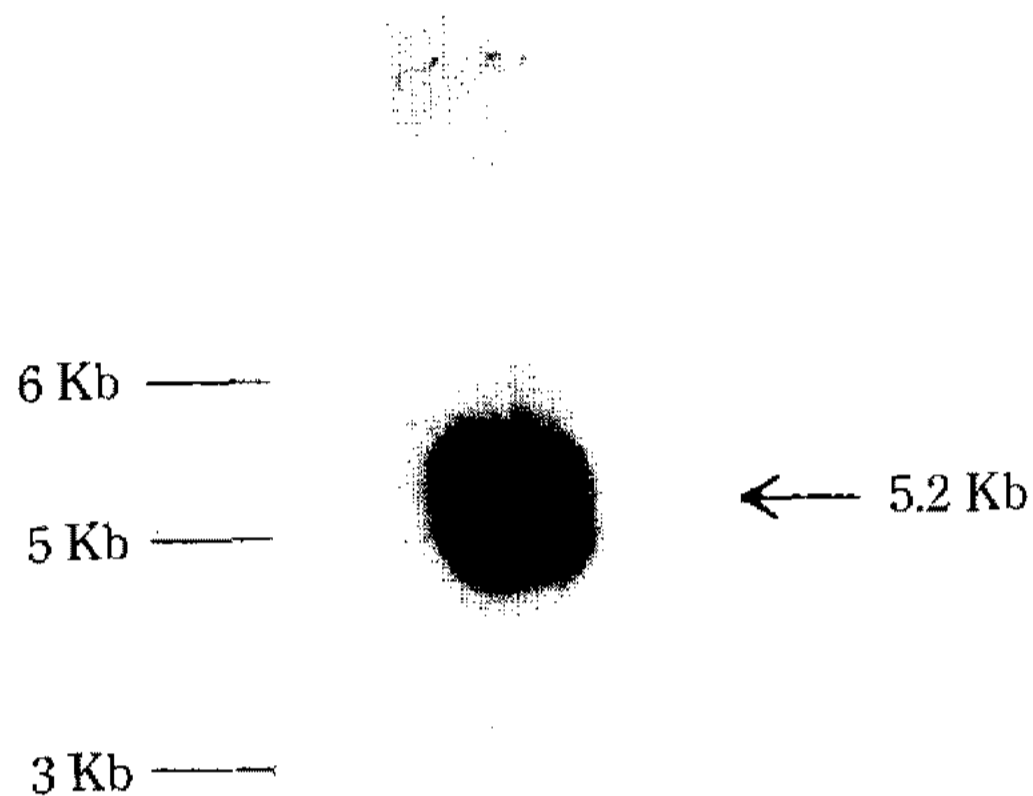


Fig. 3. Southern hybridization analysis for *phbCAB* operon in *Alcaligenes eutrophus* chromosomal DNA.

형질전환체내의 PHB 관찰

플라스미드 pHB52가 도입된 대장균 형질전환체들을 LB 배지에서 10시간 액체배양시킨 후 광학현미경과 전자현미경을 사용하여 대장균의 세포 morphology 변화를 확인하였다. Fig. 5에서와 같이 배양된

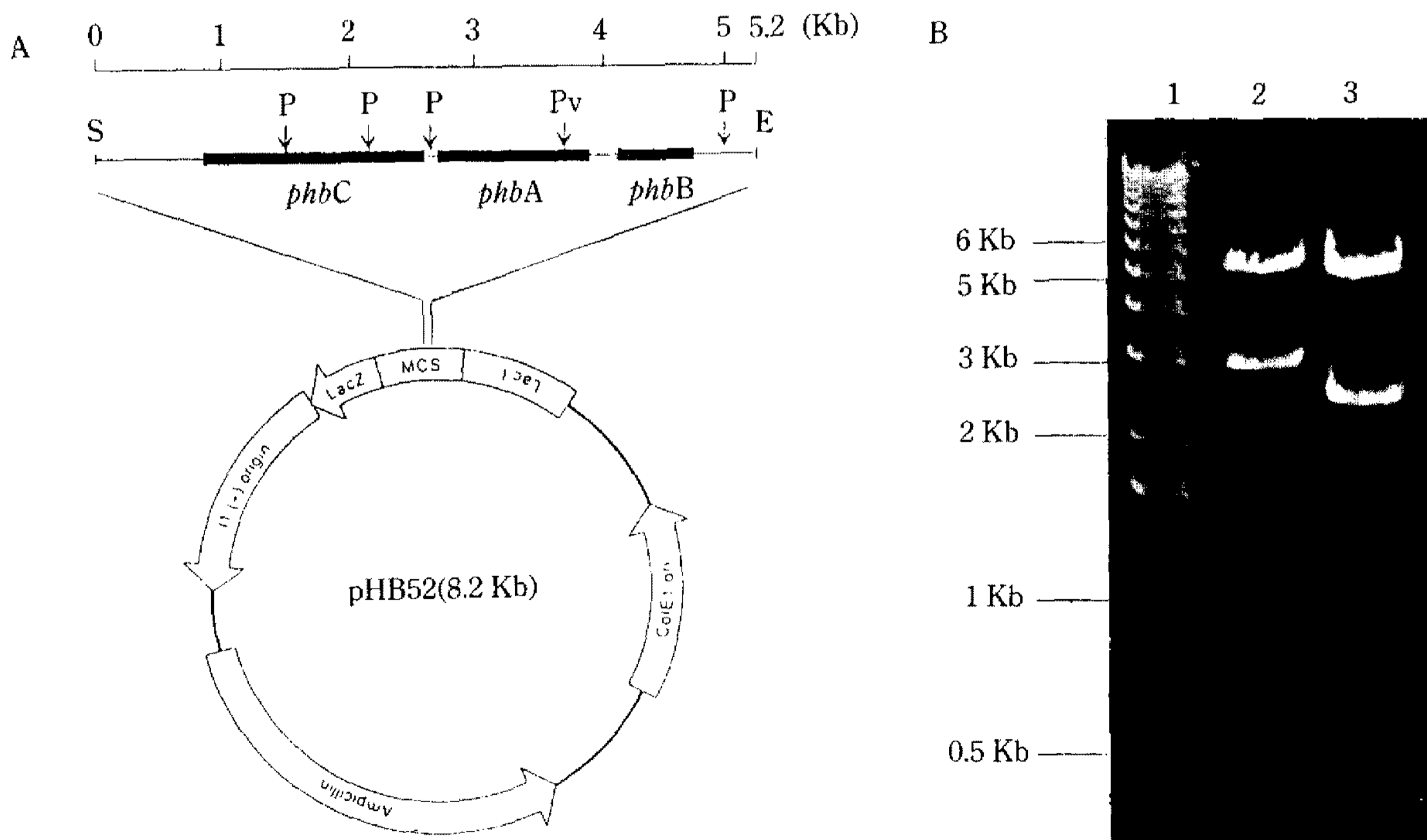


Fig. 4. Characterization of the recombinant *phbCAB* operon.

A: Plasmid structure for recombinant plasmid pHB52 harbouring *phbCAB* operon. Restriction endonucleases: E; *EcoRI*, P; *PstI*, Pv; *PvuI*, S; *SmaI*

B: Restriction pattern for recombinant plasmid pHB52.

Lane 1: 1 Kb ladder, size maker, Lane 2: pHB52 double digested with *EcoRI* and *SmaI*, Lane 3: pHB52 digested with *PstI*.

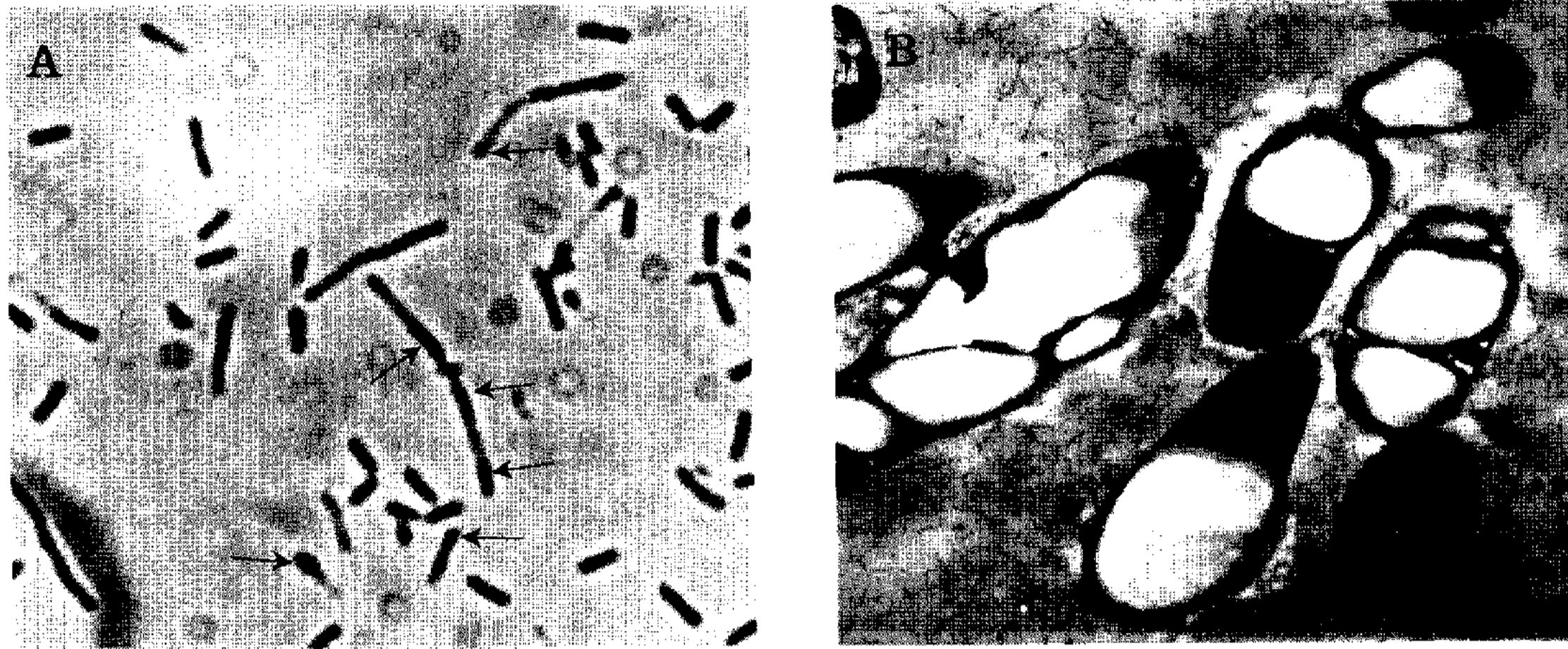


Fig. 5. Photomicrography of *Escherichia coli* transformant harbouring recombinant plasmid pHB52.
 A: Light microscopic photogram; Arrow indicates the formation of intracellular granule by the accumulation of PHB. Magnification, $\times 1,000$
 B: Transmission electron microscopic photogram. Magnification, $\times 20,000$

대장균 형질전환체들은 재조합 pHB52 플라스미드가 도입되지 않은 숙주에 비하여 대장균의 길이가 길어지는 것이 광학현미경 상에서 관찰되었으며, 또한 전자현미경 상에서도 세포내에 축적된 PHB granule (19)들을 관찰할 수 있었다. 이에 따라 얻어진 재조합 플라스미드 pHB52내에는 PHB를 생합성하는데 필요한 완전한 *phbCAB* operon이 재조합되어 있으며 대장균내에서 정상적으로 발현됨을 확인할 수 있었다.

발효조에서 형질전환체의 배양과 PHB 축적

재조합 유전자를 사용한 대장균내에서의 PHB 생산 가능성 및 이에따른 문제점들을 검토하기 위하여 초기실험으로 발효조에서 재조합 형질전환체를 배양하여 배양시간 및 포도당 농도변화에 따른 PHB 축적량의 변화를 조사하였다.

발효조 배양을 위해 사용된 배지는 포도당이 20 g/l 함유된 LB 배지였으며, pH는 7.0, 교반속도는 400 rpm, 그리고 air flow rate는 1 vvm으로 유지하였고 2.5l 발효조내에서 배양하였으며 그 결과를 Fig.6에 나타내었다.

PHB의 축적은 세포성장과 동시에 이루어졌으며, 포도당이 고갈됨에 따라 PHB도 축적이 중지되었다. 18시간 배양 후 PHB 축적농도는 2.65 g/l로서 축적율은 35%였다. 축적을 면에서 볼 때 배양초기에 PHB 축적율이 70%까지 증가하였으나 배양시간이 증가함에 따라 축적율은 35%까지 감소하였고, 포도당이 거의 고갈되는 시점에서부터는 상기 수준을 유지하였

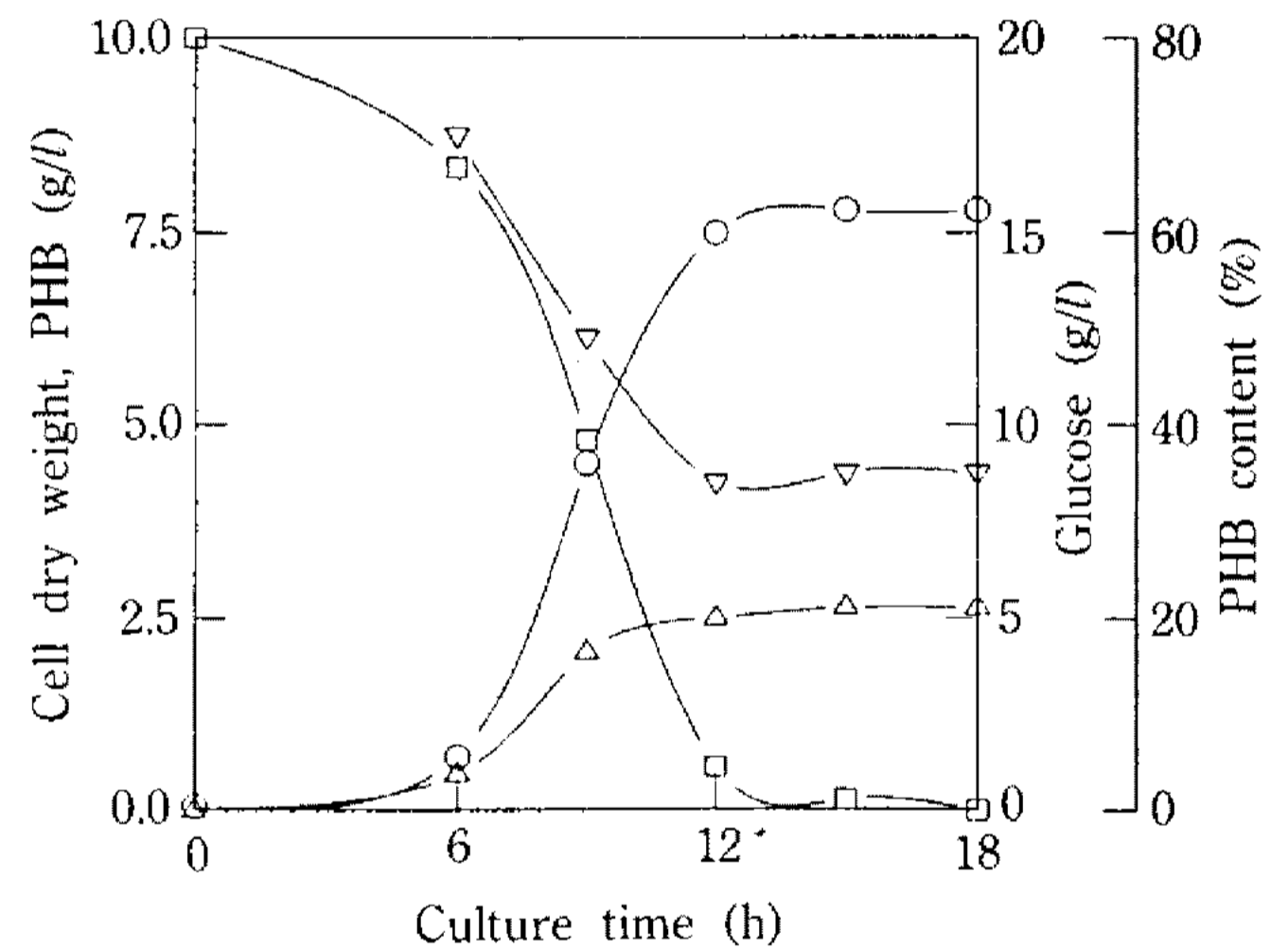


Fig. 6. Batch cultivation for *Escherichia coli* harbouring recombinant plasmid pHB52.
 Fermentation was performed in LB media supplemented with 20 g/l glucose in 2.5l fermentor, pH 7.0, and 37°C.
 ○; cell dry weight, △; PHB, □; glucose, ▽; PHB content

다.

이는 배양초기에는 세포생육이 느리고 대사과정이 원활하지 못하여 glycolysis에 의해 생성된 acetyl-CoA가 TCA cycle에 사용되기보다는 multi-copy로 존재하는 재조합 유전자의 산물로서 세포내에 다량 존재하는 PHB 생합성 효소들의 작용에 의해서 PHB의 합성에 사용되어진 반면, 배양시간이 진행됨에 따라 세포 성장 및 대사작용이 원활하게되어 생성된

acetyl-CoA가 PHB 합성 보다는 아미노산 및 에너지원의 생산에 우선적으로 이용되었기 때문인 것으로 보여진다.

이와 함께 대장균의 배양기간이 경과하는 동안 이들내에 존재하던 재조합 유전자들의 상실이나 재조합된 유전자의 부분적인 결손, 또는 변형에 의하여 세포당 PHB의 축적률이 저하되었거나 이때 상대적으로 PHB가 소량 축적된 세포의 성장속도가 빨라지게 됨으로서 PHB의 세포당 축적률이 저하되는 것으로도 사료된다. 이러한 결과는 배양초기에는 PHB가 상당량 축적되어 크기가 증가되고 부피도 큰 재조합형질전환체들이 많았으나 배양이 진행됨에 따라 이와 같은 세포의 숫자가 줄어드는 Fig. 5의 현미경상의 관찰결과로도 유추할 수 있었다. 앞으로 대장균내에서 재조합 유전자에 의한 PHB의 다량생산을 위한 배양조건의 최적화, 그리고 재조합 유전자들의 발현 정도와 이에 따른 플라스미드 안정성의 검토 등을 포함한 배양공학적 연구가 요망된다.

요 약

재조합 유전자를 사용하여 생분해성 플라스틱으로 알려진 PHB를 다양한 숙주박테리아들내에서 생산하기 위한 시도에 필수적으로 요구되는 PHB 생합성 유전자의 유전자원을 확보코자하였다. 이를 위하여 합성 oligodeoxyribonucleotides probe들과 colony hybridization 방법을 이용하여 *Alcaligenes eutrophus*로부터 *phbCAB* operon을 포함하는 5.2 Kb DNA 절편을 분리하였다. 플라스미드 pSK(+)에 재조합되어진 *phbCAB* operon을 대장균에 도입하여 배양하면서 PHB 축적에 의한 형질전환체의 morphology 변화와 생성된 PHB granule의 형성을 광학현미경과 전자현미경 상에서 각각 확인하였다. 또한 얻어진 형질전환체를 20 g/l 포도당을 함유하는 LB배지를 사용하여 fermentor에서 18시간 배양한 결과 세포건조 중량의 35~70%에 이르는 PHB가 축적되고 있음을 확인함으로써, PHB 생합성 유전자가 재조합되어 대장균내에서 정상적으로 발현되고 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 1992년도 교육부의 유전공학분야 학술연구조성비에 의해서 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Repaske, R. and A.C. Repaske. 1976. Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 585-591.
2. Peoples, O.P. and A.J. Sinskey. 1989. Poly- β -hydroxybutyrate(PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: identification and characterization of the PHB polymerase gene(*phbC*). *J. Biol. Chem.* **264**: 15298-15303.
3. Suzuki, T., H. Deguchi, T. Yamane, S. Shimizu and K. Gekko. 1988. Control of molecular weight of poly- β -hydroxybutyric acid produced in fed-batch culture of *Protomonas extorquens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 487-491.
4. Haywood, G.W., A.J. Anderson and E.H. Dawes. 1989. A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoate by Bacteria. *Biotechnol. Lett.* **11**: 471-476.
5. Bolivar, F. and K. Backman. 1979. Plasmid of *E. coli* as cloning vector. *Meth. Enzymol.* **68**: 245-280.
6. Short, J.M., J.M. Fernandez, J.A. Sorge and W.D. Huse. 1988. λ ZAP: A bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7583.
7. Sambrook, J., E. Fritsch and T. Manatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
8. Doi, Y., A. Tamaki, M. Kunioka and K. Soga. 1988. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 330-334.
9. Brown, T.A. 1990. *In Gene Cloning*, Champan and Hall Pub. Co., N.Y., 27-35.
10. Birhoim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
11. Sambrook, J., E. Fritsch and T. Manatis. 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 1st ed., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
12. Sanger, G., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
13. Peoples, O.P. and A.J. Sinskey. 1989. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: characterization of the genes encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* **264**: 15293-15297.

14. Richardson, C.C. 1981. Bacteriophage T4 polynucleotide kinase. In P.D. Boyer(ed.), *The enzymes*, 3rd ed, academic press, New York, 14: 229.
15. Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **88**: 503-217.
16. Grunstein, M. and D.S. Hogness. 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contained a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 3961.
17. Law, J.H. and R.A. Slepecky. 1960. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* **82**: 33-36.
18. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
19. Slater, S.C., W.H. Voige and D.E. Dennis. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* **170**: 4431-4436.

(Received April 6, 1993)