

## Filamentation이 억제된 재조합 대장균에 의한 Poly-3-Hydroxybutyric Acid 합성시 배양온도와 영양분의 영향

이 상엽\*

한국과학기술원 화학공학과 생물공정연구센터

### Effects of Growth Temperature and Nutritional Components on the Synthesis of Poly-3-Hydroxybutyric Acid by Filamentation-Suppressed Recombinant *Escherichia coli*

Lee, Sang-Yup\*

Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center,  
KAIST, Taejeon 305-701, Korea

**Abstract** — The effects of growth temperature and nutritional components on the synthesis of poly-3-hydroxybutyric acid, PHB, by filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli* XL1-Blue (pSYL107) were studied. After culturing XL1-Blue(pSYL107) for 48 hours in complex medium at 30°C, 7.41 g/l of PHB could be obtained with the PHB content and PHB yield of 82% and 0.371 g PHB/g glucose, respectively. Lower concentration of PHB(3.2 g/l) was obtained when cultured at 37°C, which seemed to be due to the instability of this strain having amplified FtsZ activity. The PHB concentration of 3.75 g/l was obtained after culturing 60 hours in R medium supplemented with 20 g/l glucose at 30°C, which was more than twice higher than that obtained with XL1-Blue(pSYL105). This suggested that the enhancement of PHB synthesis by suppressing filamentation was more significant in a defined medium than complex medium. PHB synthesis could be further enhanced by supplementing a small amount of various complex nitrogen sources. When 5 g/l of beef extract was added to a defined medium, PHB concentration, PHB content, and PHB yield obtained after 60 hours of cultivation at 30°C were 7.46 g/l, 86%, and 0.375 g PHB/g glucose, respectively.

가볍고 물성이 다양하며 분해되지 않고 반영구적인 성질을 가져 현대 문명의 총아로 불리우던 플라스틱은 그 썩지 않는 성질로 인해 심각한 환경 오염 문제를 일으키고 있다. 이에 일정시간 사용 후 분해되어 없어지는 생분해성 플라스틱의 개발에 세계 각국이 많은 노력을 경주하고 있다. 이중 많은 연구가 되고 있는 polyhydroxyalkanoate(PHA)는 자연계의 많은 미생물이 질소 등의 영양원이 부족한 성장조건에서 여분의 탄소원으로부터 합성하여 균체내에 입자상으로 축적하는 폴리에스터 물질이다(1). 이중 가장 많이 연구가 된 poly(3-hydroxybutyric acid), PHB와 이의 3-hyd-

roxyvaleric acid와의 공중합체인 P(3HB-co-3HV)는 영국의 ZENECA Bio Products에서 *Alcaligenes eutrophus*를 이용하여 생산하고 있다(2). 그러나 PHA는 기존의 플라스틱에 비해 생산단가가 높아 사용이 제한되고 있으며, 최근에 정리되었듯이 세계 각국 많은 연구진들이 여러 종류의 미생물을 이용하여 배양 방법 최적화에 의한 PHA 생산성 향상에 주력하고 있다(3).

*A. eutrophus* PHA 합성 유전자가 cloning 된 재조합 대장균에 의한 PHB 생산은 빠른 성장 속도, 고농도의 PHB 축적능(4), sucrose 등 다양한 탄소원의 이용가능(5), 분리정제의 용이(6) 등 여러 장점이 있어 최근 많은 연구가 되어 왔다. 본 연구진은 복합 배지에서 재조합 대장균의 pH-stat 방식 유가식 배양에 의해 40시간에 약 80 g/l의 PHB를 생산할 수 있었다(4, 7). 이때 효과적인 PHB의 합성 축적을 위해

**Key words:** *Escherichia coli*, poly(3-hydroxybutyric acid), PHB, filamentation, complex nitrogen source

\*Corresponding author

높은 복제수의 plasmid의 사용이 요구되며, PHB 합성중 plasmid 안정성이 급격히 떨어지므로 plasmid R1의 *parB* 영역 등을 이용하여 안정화시키는 것이 중요한 것으로 나타났다(7). 또한 PHB의 합성능이 가장 뛰어난 대장균의 선별을 위해 K12, B, W, XL1-Blue, DH5 $\alpha$ , HB101, JM109 등을 높은 복제수의 안정한 plasmid pSYL105로 형질전환하여 PHB 합성속도 및 축적능을 비교하였다(8). 포도당이 20 g/l 첨가된 복합배지에서 플라스크 배양시 XL1-Blue와 B가 단위시간·gram 잉여건조균체 농도(residual dry cell mass concentration)당 0.2 g의 속도로 가장 빨리 PHB를 합성하였으며, 48시간 후에 6~7 g/l의 PHB를 축적하였다(8). PHB 생산 단가에 많은 영향을 미치는 배지의 비용을 낮추기 위해 단순배지에서의 유가식 배양을 행한 결과 16 g/l의 낮은 농도의 PHB를 얻었으며(9), 이때 소량의 복합 질소원을 첨가함으로써 PHB 합성능을 두배 이상 증가시킬 수 있었다(10). 재조합 대장균에 의한 PHB 합성시 흥미로운 현상은 균체의 filamentation이 일어나는 것이다(8, 9). Filamentation 현상은 균주에 따라 정도가 달랐으며 PHB를 가장 많이 축적하는 XL1-Blue의 경우 약 20%의 cell population이 8  $\mu$ m 이상 150  $\mu$ m까지 길어졌다(8). 이러한 filamentation의 이유는 필수 세포 분열 단백질(essential cell division protein)인 FtsZ의 활성도 상실이 이유였으며, 이는 대장균의 FtsZ 유전자를 PHA 합성 유전자와 함께 cloning 하여 활성도를 같이 높임으로써 방지할 수 있었다(11). Filamentation은 세포의 성장을 둔화 혹은 정지시키게 되어 균체 배양 효율 및 생산성을 낮추게 된다. 따라서 이를 방지 또는 억제함으로써 재조합 대장균에 의한 PHB의 생산성을 높일 수 있을 것으로 예측할 수 있다. 이에 본 연구에서는 *A. eutrophus* PHA 합성 유전자와 대장균 FtsZ 유전자가 함께 cloning 된 높은 복제수의 안정한 plasmid pSYL107로 형질 전환된 XL1-Blue를 단순배지를 포함한 여러 종류의 배지에서 배양하여 균체의 성장과 PHB의 합성 및 축적 특성을 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 plasmid

PHB 생산 균주로 사용한 대장균은 Stratagene Cloning Systems사(La Jolla, CA, USA)의 XL1-Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac F'*[*proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup> *lacZ* $\Delta$ M15 Tn10(*tet*<sup>r</sup>)]))이었다. 사용된 plasmid는 *A. eutrophus* PHA 합성유전자가 clo-

ning 된 pSYL105(8)와 pSYL105에 대장균 FtsZ 유전자가 cloning 된 pSYL107(11)이었다.

### DNA 조작 및 형질전환

DNA 분리, 제한 효소 절단, 전기 영동 등의 실험은 Sambrook 등(12)의 방법을 따랐으며, 형질전환은 BioRad사(Richmond, CA, USA)의 Gene Pulser를 이용하여 Dower 등(13)의 방법에 따라 electroporation으로 행하였다.

### 배양

대장균의 일반적인 배양에는 Luria-Bertani(LB) 배지(12)를 사용하였고, 균주는 20%(vol/vol) glycerol stock으로 -80°C에 보관하였다. PHB 합성 및 축적 연구를 위한 배지는 복합 배지로서 LB, 단순배지로서는 R 배지(5)를 사용하였다. 이때 포도당을 20 g/l가 되도록 첨가하였다. 또한 PHB 합성을 향상시키기 위하여 단순배지에 다양한 농도의 복합질소원을 첨가하여 사용했는데, 사용된 복합 질소원은 tryptone, yeast extract, peptone, casamino acids와 beef extract(이상 Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), cotton seed hydrolysate와 casein hydrolysate(이상 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), collagen hydrolysate(DGF Stoess, Eberbach/Baden, Germany), corn steep liquor(미원, 서울), 그리고 soy bean hydrolysate(Ajinomoto Co., Tokyo, Japan)이었다. Yeast extract가 첨가된 배지를 제외하고는 모두 10 mg/l의 thiamine을 첨가하였다. Ampicillin은 100 mg/l로 첨가하였다. 배양은 Lee 등(9, 10)의 방법으로 준비된 50 ml의 배지가 담긴 250 ml 삼각플라스크를 사용하여 30 혹은 37°C, 300 rpm에서 행하였다.

### 분석 및 현미경 관찰

건조균체, PHB 및 포도당의 농도는 Lee 등(7-10)이 보고한 방법에 따라 측정하였다. PHB 함량은 PHB 농도 대 건조균체 농도비의 백분율(%)로 정의하였다. PHB 합성속도(g PHB/g residual cell mass·hr)는 시간당 gram 잉여건조 균체당 생성된 gram PHB로 정의하였다. 건조균체수율, PHB 수율 그리고 잉여건조균체 수율은 각각 gram 포도당으로부터 생성된 gram 건조균체, PHB 및 잉여건조균체로 정의하였다. 균체는 phase contrast microscopy(American Optical, Model 1130, Buffalo, NY, USA)로 관찰하였고 Polaroid type 667 film(Cambridge, MA, USA)에 기록하였다.

결과 및 고찰

복합배지에서 XL1-Blue(pSYL107)의 PHB 합성 특성

대장균 FtsZ 유전자가 cloning 된 pSYL107로 형질 전환된 대장균 XL1-Blue를 포도당이 20 g/l 첨가된 복합배지 LB에서 배양하여 균체 성장과 PHB 합성 특성을 살펴보았다. 이미 보고(11)한 바와 같이 FtsZ의 활성도가 증폭된 대장균을 37°C에서 배양할 경우 minicell 형성 등의 문제가 있어 30°C에서도 배양하여 비교하였다. 시간에 따른 건조균체, PHB, 잉여건조균체 농도의 변화를 배양 온도에 따라 각각 Fig. 1 (37°C)과 Fig. 2(30°C)에 나타내었다. 배양 온도가 달라짐으로써 균체 성장과 PHB의 합성능이 현저히 다르게 됨을 볼 수 있었다. 최대 PHB 합성속도는 30과 37°C에서 각각 0.191과 0.207 g PHB/g residual cell

mass·hr이었다. PHB 합성 속도는 배양이 진행됨에 따라 감소하였는데, 37°C에서 배양시 더 빨리 감소하여 약 35시간 후부터는 30과 37°C에서 각각 0.106과 0.040 g PHB/g residual cell mass·hr이었다. 48시간 배양 후 최종 건조균체, PHB, 잉여건조균체 농도는 30°C 배양시 각각 9.04, 7.41, 1.63 g/l로서 37°C 배양시 얻어진 각각 4.08, 3.20, 0.88 g/l보다 높았다(Fig. 1, 2). 참고로 FtsZ 활성도를 증폭시키지 않은 XL1-Blue(pSYL105)를 같은 조건에서 배양하여 얻은 결과와 전반적으로 비교하면 30°C에서는 XL1-Blue(pSYL107)이 PHB를 더 빨리 더 높은 농도로 합성 추적한 반면 37°C에서는 XL1-Blue(pSYL105)가 보다 빨리 높은 농도로 PHB를 합성하였다(11). 온도에 상관없이 비교할 경우 XL1-Blue(pSYL107)을 30°C에서 배양하였을 때 최고의 PHB 농도를 얻을 수 있었다. XL1-Blue(pSYL107)과 XL1-Blue(pSYL105)의 단 한가지의

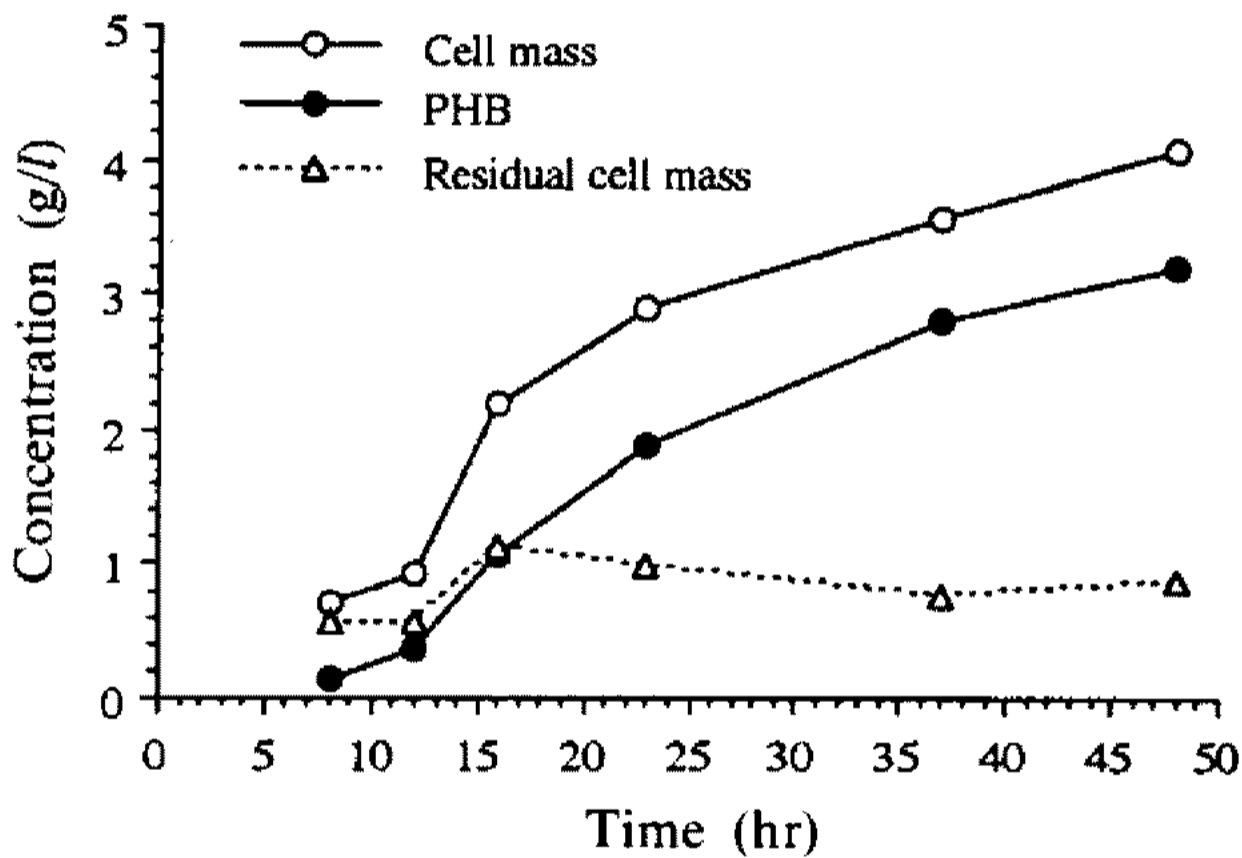


Fig. 1. The time profiles of cell mass, PHB and residual cell mass concentrations during flask culture of XL1-Blue (pSYL107) in LB containing 20 g/l glucose at 37°C.

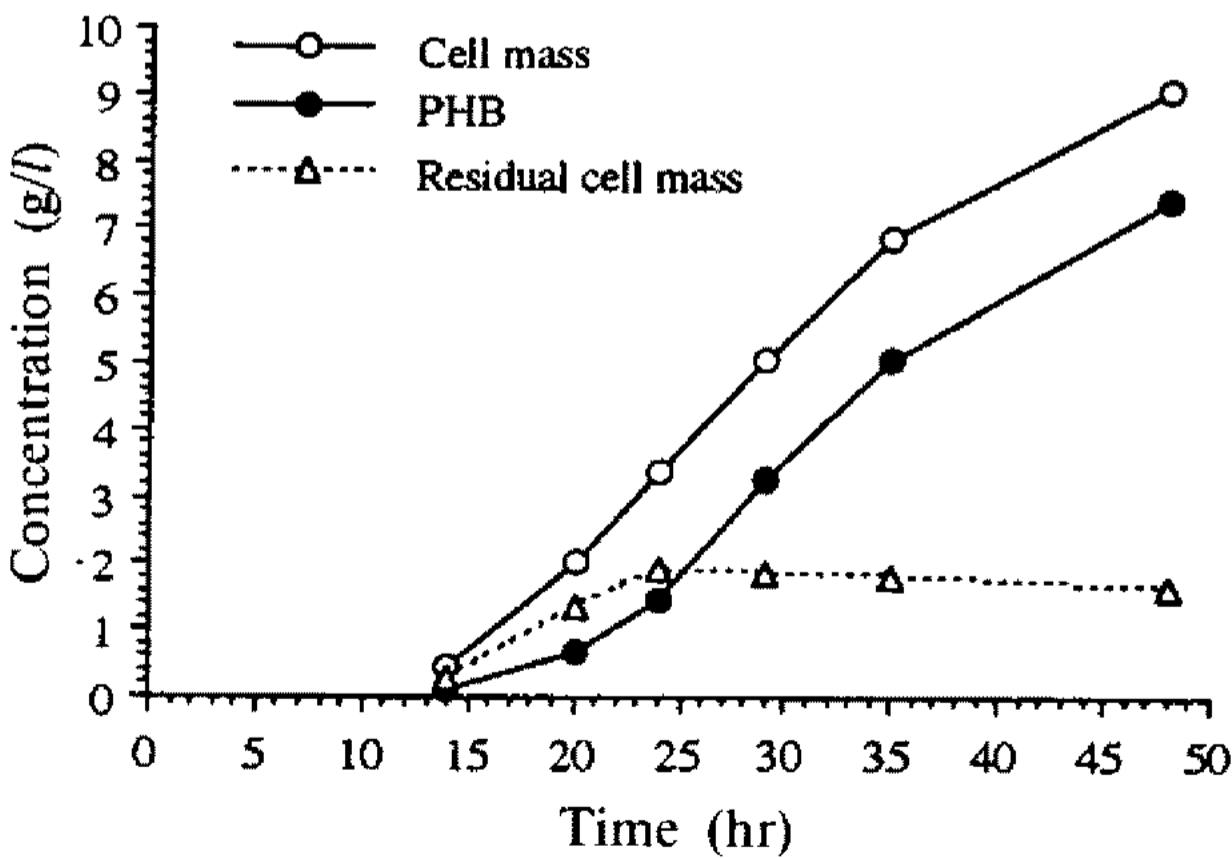


Fig. 2. The time profiles of cell mass, PHB and residual cell mass concentrations during flask culture of XL1-Blue (pSYL107) in LB containing 20 g/l glucose at 30°C.

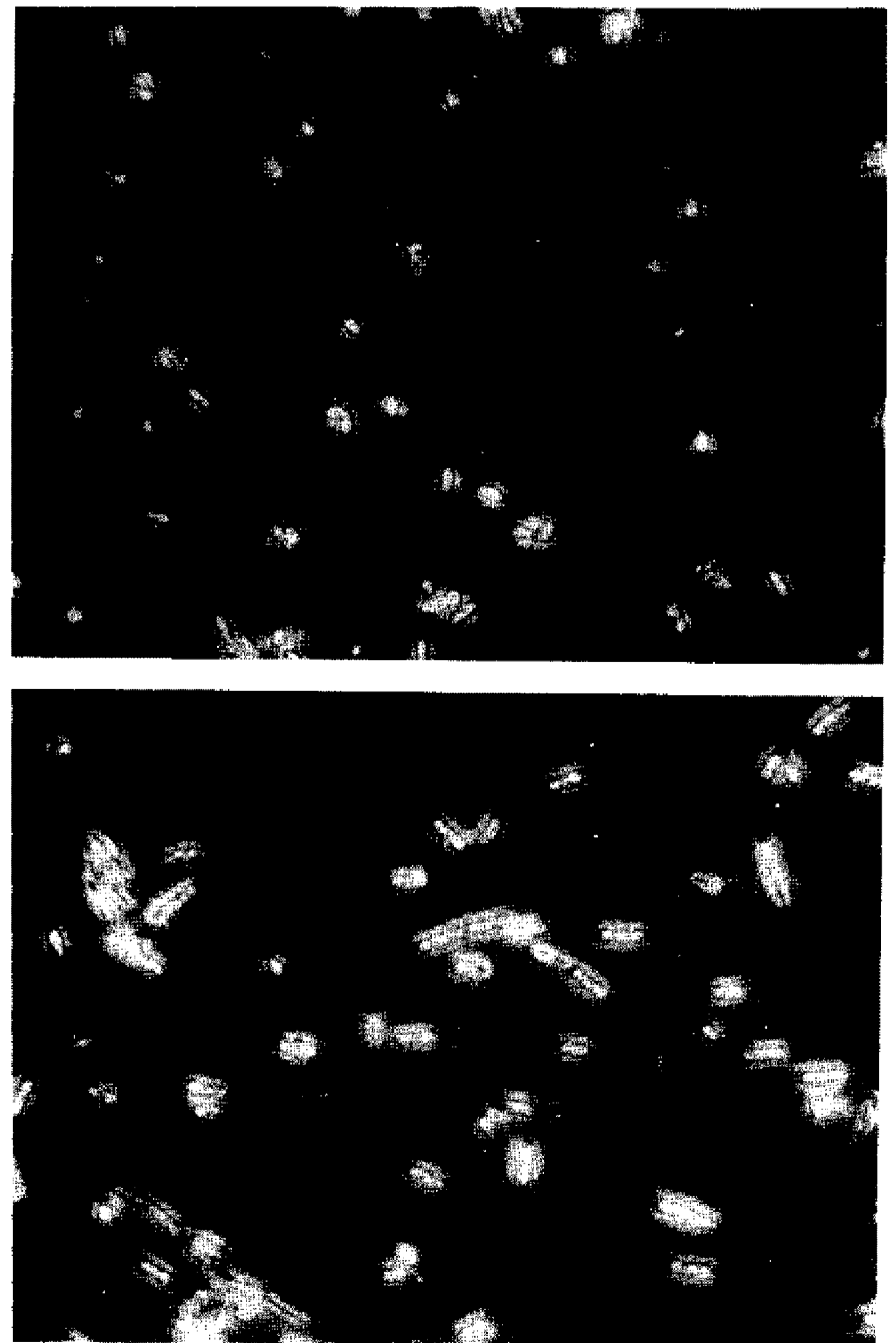


Fig. 3. The phase contrast micrographs of (A) XL1-Blue (pSYL107) and (B) XL1-Blue (pSYL105) cultured for 36 hours in LB containing 20 g/l glucose at 30°C. White shining inclusions are PHB granules. Bars represent 10 μm.

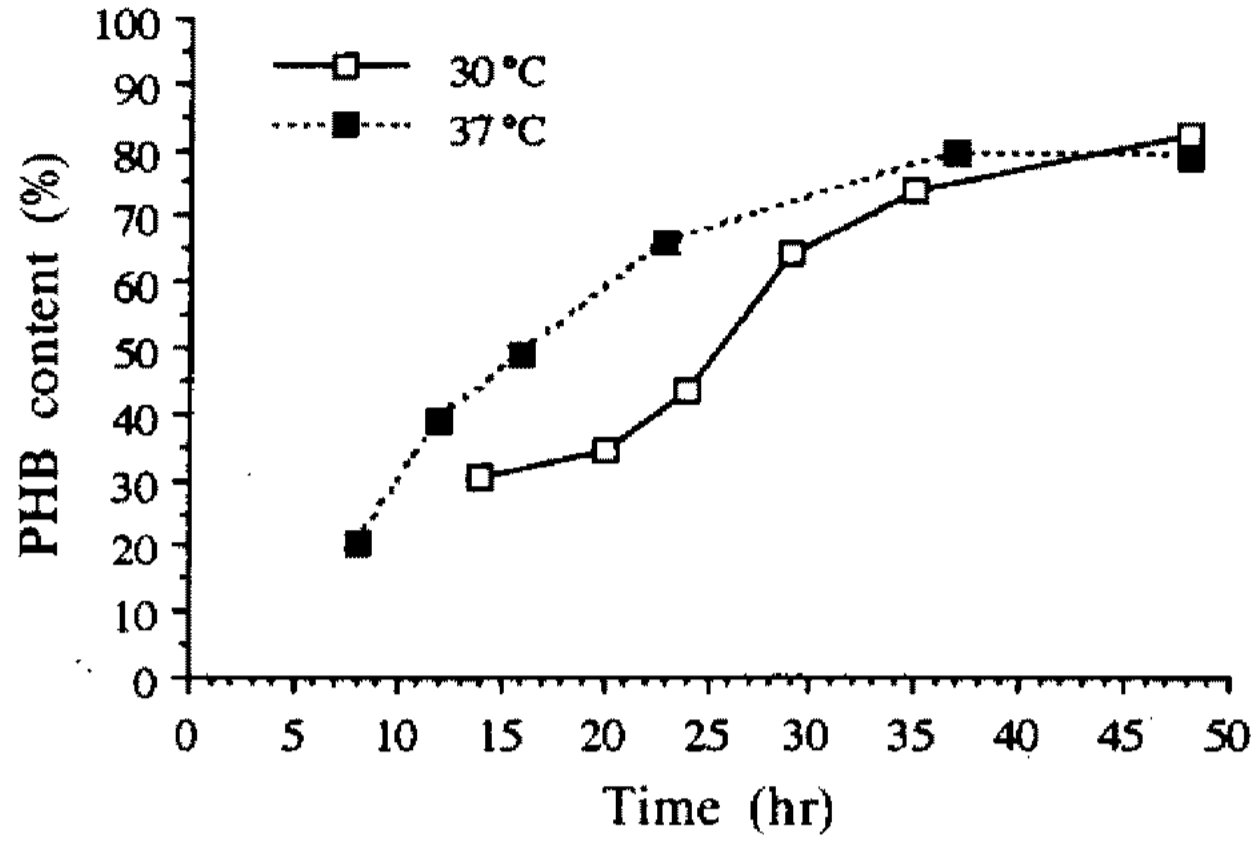


Fig. 4. The time profiles of PHB content during flask culture of XL1-Blue (pSYL107) in LB containing 20 g/l glucose at 30 or 37°C.

차이는 FtsZ 활성도의 증폭 유무이어서 Fig. 3에 보여진 대로 전자는 filamentation이 일어나지 않고 후자는 filamentation이 일어나는 것이므로, 이 결과들은 filamentation의 억제에 의해 PHB의 합성을 증가시킬 수 있음을 보여주는 것이다.

Fig. 4에는 시간에 따른 PHB 함량의 변화를 나타내었다. 30과 37°C에서 배양시 균체의 성장과 PHB 합성이 달랐듯이 PHB 함량의 변화도 틀렸는데 이는 시간에 따른 건조균체와 PHB의 농도 증가를 비교해보면 알 수 있다. 한가지 흥미로운 것은 30과 37°C에서 배양시 얻어진 최종 PHB 농도가 7.41과 3.2 g/l로 두배 이상 차이가 난 반면 PHB 함량은 각각 82와 78%로 별 차이가 없다는 것이다. 이는 Lee와 Chang (10)이 보고한 대로 PHB는 균체내부에 축적되므로 같은 PHB 함량에서도 낮은 잉여건조균체 농도에서의 PHB 축적량은 높은 잉여균체농도에서의 양보다 당연히 낮음을 알 수 있다. 즉, XL1-Blue(pSYL107)을 37°C에서 배양시 얻어진 잉여건조균체 농도는 0.88 g/l로서 30°C에서 얻어진 것의 반 정도이었으므로, 두 온도에서 거의 비슷하게 80%까지 PHB를 축적했음에도 37°C에서의 PHB 농도는 반 정도 밖에 되지 않는 것이다.

Fig. 5에는 30과 37°C에서 배양시 시간에 따른 잉여건조균체와 PHB의 수율 변화를 나타내었다. PHB 수율은 시간에 따라 두 온도 모두에서 증가하는 경향을 보였고, 특히 30°C에서 48시간 배양 후 얻어진 최종 PHB 수율은 0.371 g PHB/g glucose로서 매우 높았다. 37°C에서 배양시는 시간에 따른 PHB 수율의 증가 속도가 약 25시간부터는 느려져서 48시간 후 0.274 g PHB/g glucose를 얻었다. 잉여균체수율은 37°C에서 배양시 초기의 빠른 성장으로 인해 배

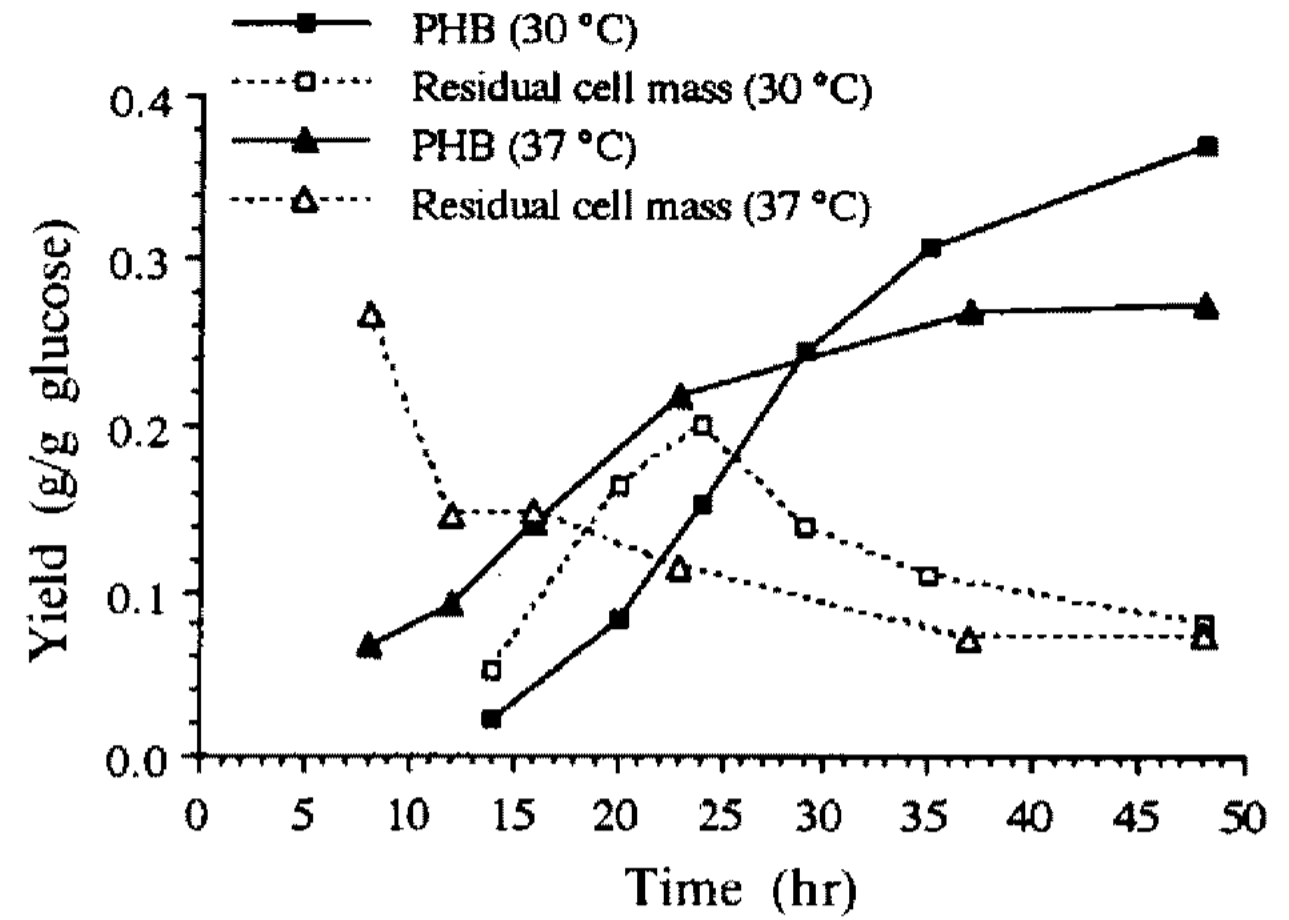
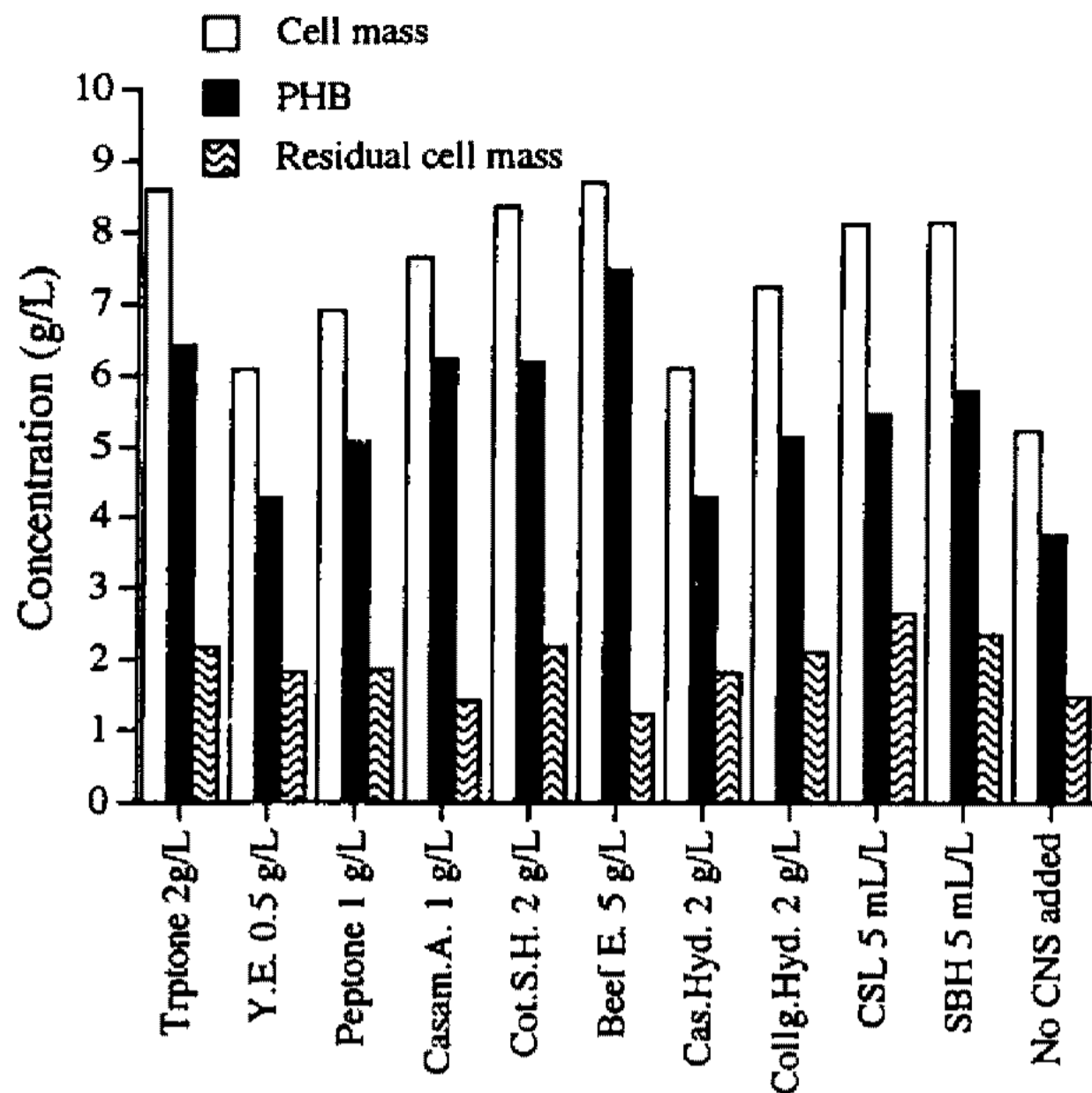


Fig. 5. The time profiles of the yields of PHB and residual cell mass on glucose during flask culture of XL1-Blue (pSYL107) in LB containing 20 g/l glucose at 30 or 37°C.

양 8시간 만에 0.267 g residual cell mass/g glucose 이다가 계속 감소하여 48시간 후에는 0.075 g residual cell mass/g glucose이었다. 30°C에서 배양시 잉여균체 수율은 초기에 증가하여 PHB 합성이 활발하고 잉여균체농도가 거의 일정해지는 24시간 후 0.2 g residual cell mass/g glucose의 최대값을 나타내었다가 그 이후에는 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 배양 온도에 따라 PHB 합성 특성이 확연히 달라짐을 알 수 있었고 30°C에서 filamentation이 억제된 XL1-Blue(pSYL107)을 이용하여 고농도의 PHB를 높은 수율로 얻을 수 있음을 알았다.

#### 단순배지에서 XL1-Blue(pSYL107)의 PHB 합성 및 복합질소원의 효과

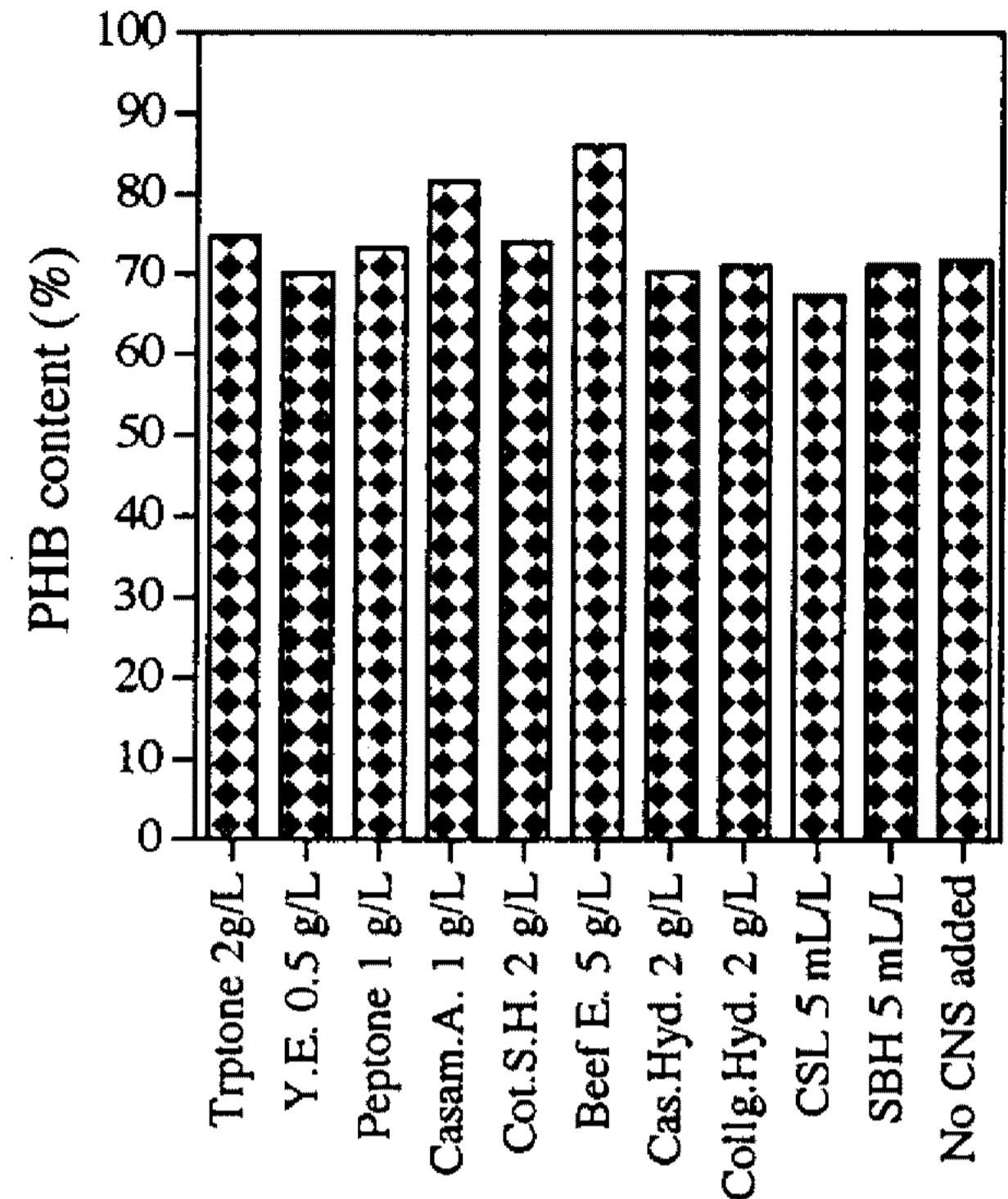
XL1-Blue(pSYL107)을 복합배지를 사용하고 30°C에서 배양시 고농도의 PHB를 얻을 수 있었으므로, 이 재조합 대장균을 이용한 저가의 단순배지에서 효과적인 PHB 생산 가능성을 타진하기 위하여 포도당과 thiamine이 각각 20 g/l와 10 mg/l 첨가된 R 배지 (5)에서 플라스크 배양을 하여 균체 성장과 PHB 축적을 살펴 보았다. 또한 XL1-Blue(pSYL105)의 경우 단순배지에 복합질소원을 소량 첨가 함으로써 PHB 생산능이 두배 이상 향상되었으므로(10), 본 연구에서도 복합 질소원의 첨가에 의한 PHB 합성 증대 효과를 살펴보았다. 이때 사용된 10종류의 복합 질소원은 Lee와 Chang(10)이 XL1-Blue(pSYL105)에 의한 PHB 생산시 찾은 최적 농도가 되도록 첨가되었다. 단순배지에서는 이미 기술한 바와 같이(9, 10) 복합 배지에서보다 성장이 느리고 PHB 합성능이 떨어지므로 30°C에서 60시간 배양하였다. 여러 배지에서



**Fig. 6. Cell mass, PHB and residual cell mass concentrations obtained after culturing XL1-Blue (pSYL107) for 60 hours in a defined medium with or without supplementation of various complex nitrogen sources.**

The abbreviations are: Trptone, tryptone; Y.E., yeast extract; Casam. A., casamino acids; Cot. S.H., cotton seed hydrolysate; Beef E., beef extract; Cas. Hyd., casein hydrolysate; Collg. Hyd., collagen hydrolysate; CSL, corn steep liquor; SBH, soy bean hydrolysate; No CNS added, no complex nitrogen source added.

60시간 배양 후 얻어진 건조균체, PHB, 잉여건조균체 농도를 Fig. 6에 나타내었다. 복합 질소원이 아무것도 첨가되지 않은 단순배지에서 XL1-Blue(pSYL107)의 배양시 60시간 후 건조균체와 PHB 농도가 각각 5.23과 3.75 g/l이었으며, 이는 filamentation이 일어나는 XL1-Blue(pSYL105)를 같은 조건에서 배양시 얻을 수 있었던 3.46과 1.80 g/l(10)와 비교해 보면 건조균체 농도는 약 1.5배, PHB 농도는 2배 이상 증가했음을 알 수 있다. PHB 함량은 71.7%로서 XL1-Blue(pSYL105)로 얻어진 52%에 비해 역시 높았다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이 소량의 복합 질소원을 첨가시 균체 성장과 PHB 축적이 증가함을 알 수 있다. Beef extract를 5 g/l 첨가시 PHB 합성이 가장 증진되었으며 최종 건조균체, PHB 농도는 각각 8.68과 7.46 g/l로서 이는 복합 배지에서 얻어진 결과에 육박하는 높은 수치였다. 이때 PHB 함량은 무려 86%나 되었다. XL1-Blue(pSYL105)의 PHB 합성증진에 가장 효과가 컸던 tryptone과 casamino acids도 역시 XL1-Blue(pSYL107)의 PHB 합성을 증대시켜서 최종 PHB 농도 6 g/l 이상을 얻을 수 있었다. Fig. 6에서 보듯이 복합질소원의 첨가에 의한 잉여건조균체 농도의 변화는



**Fig. 7. The PHB content obtained after culturing XL1-Blue (pSYL107) for 60 hours in a defined medium with or without supplementation of various complex nitrogen sources.**

The abbreviations are the same as in Fig. 6.

크지가 않았고, 이는 복합 질소원이 균체의 성장을 약간 향상시키고 PHB 합성능을 크게 증대시킴을 알 수 있다. Fig. 7에는 여러 배지에서 얻어진 PHB 함량을 나타내었다. Beef extract나 casamino acids 첨가시 PHB 함량이 80%를 넘었고, 단순배지를 포함한 다른 배지에서는 PHB 함량이 약 70% 정도로 비슷하였다.

XL1-Blue(pSYL107)을 각 배지에서 60시간 배양 후 남은 포도당의 농도는 모두 0~0.7 g/l 사이였고, 이 측정치들을 기준으로 PHB와 잉여 건조균체 수율을 계산하여 Fig. 8에 나타내었다. 우선 단순배지에서의 PHB 수율은 0.193 g PHB/g glucose로서 XL1-Blue(pSYL105)로 얻은 수율(10)보다 높았다. 복합질소원 첨가시 PHB 수율 역시 증가하여 beef extract 5 g/l 첨가시 수율은 0.375 g PHB/g glucose로 복합 배지에서 얻은 수율보다 약간 높은 값을 보였고 이는 포도당이 매우 효과적으로 PHB로 전환 됨을 보여주고 고무적이다. 잉여균체수율도 복합질소원의 첨가에 의해 약간씩 증가하였고 corn steep liquor 5 ml/l 첨가시 0.133 g residual cell mass/g glucose로서 가장 높았다.

한가지 흥미로운 것은 FtsZ 활성도가 증폭된 XL1-

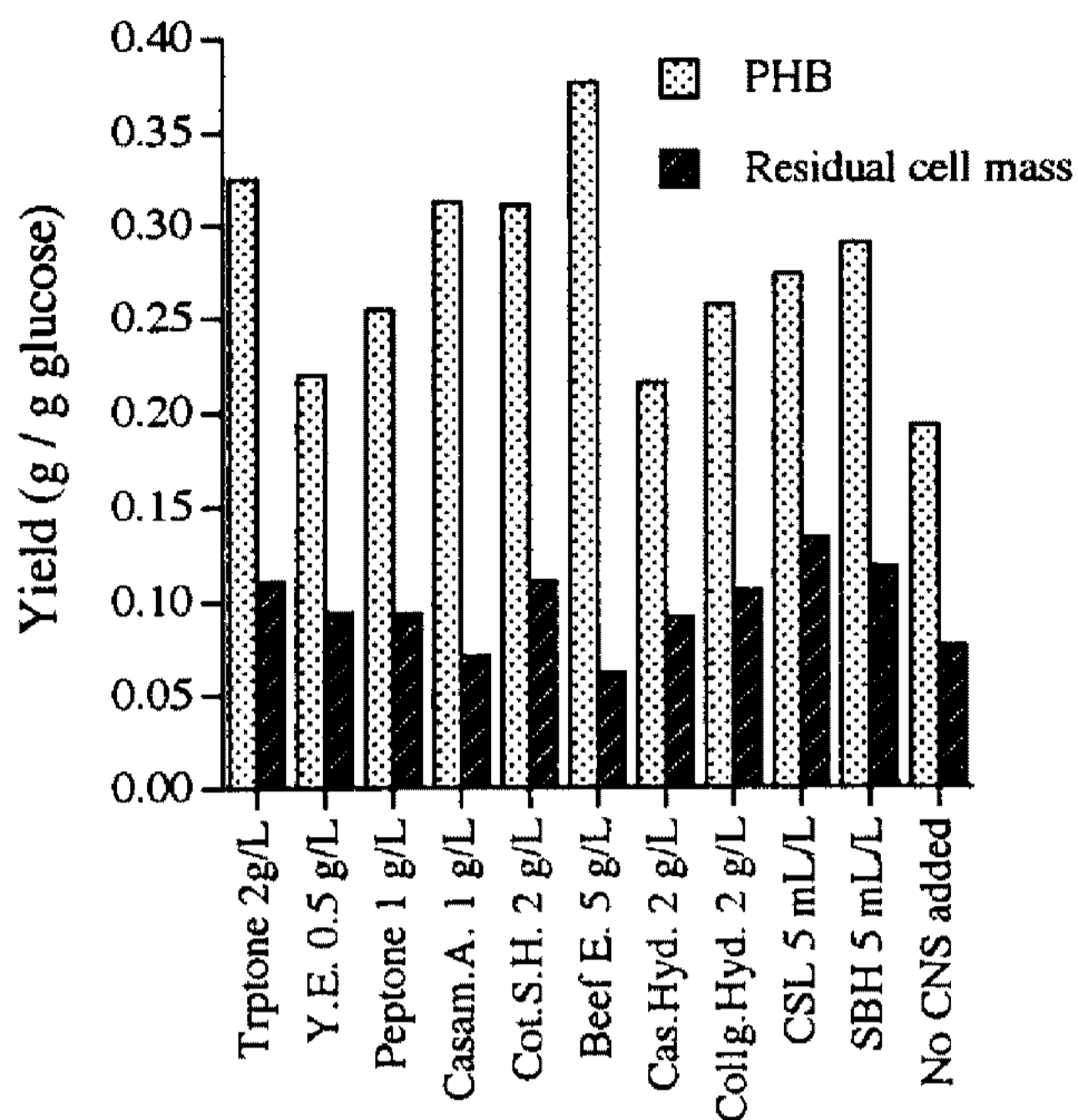


Fig. 8. The yields of PHB and residual cell mass on glucose obtained after culturing XL1-Blue (pSYL107) for 60 hours in a defined medium with or without supplementation of various complex nitrogen sources. The abbreviations are the same as in Fig. 6.

Blue(pSYL107)도 단순배지와 복합질소원이 소량 첨가된 배지에서는 filamentation이 약간 일어났다는 것이다. 그러나 filamentation이 일어난 cell fraction과 filamentation의 정도는 XL1-Blue(pSYL105)를 같은 배지에서 배양했을 때보다 훨씬 적었다(data는 나타내지 않았음). 이렇게 FtsZ 유전자를 가지고 있음에도 filamentation이 일어난 것은 단순배지나 소량의 복합질소원이 첨가된 배지에서는 복합배지와 비교하여 FtsZ의 발현이 적어서 filamentation을 완전히 억제하지 못했기 때문으로 사료된다. 하지만 filamentation을 어느 정도 억제 함으로써 균체의 성장과 PHB 합성능을 향상시킬 수 있었으며, 특히 저가의 단순배지에서는 XL1-Blue(pSYL107)이 XL1-Blue(pSYL105)보다 두배 이상의 PHB를 합성, 축적할 수 있었다.

## 요 약

Filamentation이 억제된 재조합 대장균 XL1-Blue (pSYL107)에 의한 PHB 합성시 배양온도와 영양분이 미치는 영향을 연구하였다. XL1-Blue(pSYL107)을 복합배지, 30°C 에서 48시간 배양 후 7.41 g/l PHB를 얻을 수 있었고, 이때 PHB 함량과 수율은 각각 82%와 0.371 g PHB/g glucose로 매우 높았다. 그러나 37°C

에서 배양시는 증폭된 FtsZ 활성도의 특성으로 인한 균주 불안정성 때문에 PHB 농도는 3.2 g/l로서 더 낮았다. PHB 합성능 향상 효과는 단순배지에서 더욱 두드러져서 포도당이 20 g/l 첨가된 R 배지, 30°C 에서 60시간 배양 후 3.75 g/l PHB를 얻어 이는 filamentation이 일어나는 XL1-Blue(pSYL105)의 배양에 의해 얻어진 1.8 g/l보다 두배 이상 높았다. 다양한 복합질소원의 소량 첨가에 의해 PHB 합성능은 더욱 향상될 수 있었으며 특히 5 g/l의 beef extract 첨가시 얻어진 PHB 농도, 함량, 수율은 각각 7.46 g/l, 86%, 0.375 g PHB/g glucose로 매우 높았다.

## 감사의 글

본 연구의 수행에 있어 여러모로 도움을 주신 화공학과 장호남 박사님과 연구비를 지원해 준 한국과학기술원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Anderson, A.J. and E.A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**: 450-472.
2. Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms: Technology and economics. *Trends Biotechnol.* **5**: 246-250.
3. Lee, S.Y. and H.N. Chang. 1995. Production of poly-(hydroxyalkanoic acid). *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* In press.
4. Kim, B.S., S.Y. Lee, and H.N. Chang. 1992. Production of poly-β-hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **14**: 811-816.
5. Lee, S.Y. and H.N. Chang. 1993. High cell density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as a carbon source. *Biotechnol. Lett.* **15**: 971-974.
6. 한세광, 장용근, 이상엽. 1994. 생분해성 고분자 poly(3-hydroxybutyrate)의 분리정제. *생물공학 News* **1**: 45-52.
7. Lee, S.Y., K.S. Yim, H.N. Chang, and Y.K. Chang. 1994. Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **32**: 203-211.
8. Lee, S.Y., K.M. Lee, H.N. Chang, and A. Steinbuechel. 1994. Comparison of *Escherichia coli* strains for synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) and morphological changes. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 1337-1347.
9. Lee, S.Y., H.N. Chang, and Y.K. Chang. 1994.

- Production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. *Ann. NY Acad. Sci.* **721**: 43-53.
10. Lee, S.Y. and Chang, H.N. 1994. Effect of complex nitrogen source on the synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* in flask and fed-batch cultures. *J. Environ. Polymer Degrad.* **2**: 169-176.
  11. Lee, S.Y. 1994. Suppression of filamentation in recombinant *Escherichia coli* by amplified FtsZ activity. *Biotechnol. Lett.* In press.
  12. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
  13. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.

(Received October 15, 1994)