

## 재조합 미생물에 의한 Polyhydroxyalkanoates 생산 : 대사공학의 응용

최종일 · 이상엽

한국과학기술원 화학공학과

Polyhydroxyalkanoates(PHAs)는 미생물이 다량의 탄소원 존재하에 영양분 제한 조건에서 탄소원 및 에너지 저장물질로써 합성·축적하는 hydroxyalkanoates로써 이루어진 고분자 물질이다(1,4,13,34). 일반적인 PHA의 구조식은 Fig. 1과 같다.

1926년 Lemoigne에 의해 *Bacillus megaterium*내에서 poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)]가 처음으로 보고된(19) 이후에 단량체인 hydroxyalkanoate내의 main chain carbon 수와 R group의 형태에 따른 수많은 PHA들이 보고되고 있다(38).

하지만 이러한 수 많은 PHA 가운데서 poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)], poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)[P(3HB-co-3HV)], poly(4-hydroxybutyrate) [P(4HB)], poly(3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate) [P(3HHx-co-3HO)] 등 몇몇 PHA만이 미생물내에 다량 축적되며, 세포내의 대사 경로나 응용분야에 대한 연구가 이루어졌다(13,15,16). PHA를 합성할 수 있는 미생물들도 300여종 이상이 보고되었지만, *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, methylophils, pseudomonads 등이 고생산성으로 높은 농도의 PHA를 생산할 수 있는 대표적인 미생물들로 알려졌으며 연구의 주된 대상이 되고 있다(13,15,16).

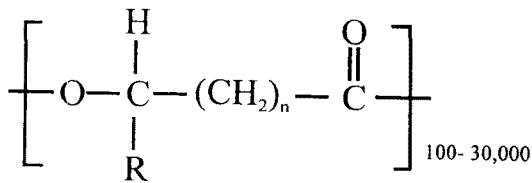
PHA에 관한 초기 연구는 *A. eutrophus*로부터 시작되었는데, 아이러니컬하게도 *A. eutrophus*내에서 P(3HB)를 제거하려는 방향이었다. 60년대초 *A. eutrophus*는 single cell protein의 생산을 위한 산업적 균주로써 관심의 대상이 되었는데, 이때

*A. eutrophus*내에 존재하는 P(3HB)의 제거를 위하여 대사회로와 생합성 경로에 대한 연구가 이루어지게 되었다. Single cell protein을 위한 연구는 pilot plant 규모로까지 확장되었으며, P(3HB) 생합성이 결핍된 돌연변이 *A. eutrophus*가 개발되어졌다. Wild type *A. eutrophus* 균주와 돌연변이주의 영양가(nutritional value)가 쥐, 닭, 그리고 돼지 등에 대한 사료로써 실험되었다. 하지만, 이러한 single cell protein 생산에 관한 연구가 더 이상 관심을 얻지 못하자, single cell protein을 위한 생산공정과 연구결과들은 *A. eutrophus*내의 P(3HB)의 생산쪽으로 그 방향을 바꾸었다(34).

열가소성 고분자로써의 P(3HB)와 P(3HB-co-3HV)의 가능성은 1960년대 초부터 인식되었는데, 이후에 여러 PHA 공중합체들의 합성, 우수한 기계적 물성, 그리고 자연계내에서의 생분해성 등이 밝혀지면서 관심을 끌게 되었다(4). 더욱이 요즘들어 석유합성 고분자들의 폐기물에 의한 환경오염문제가 심각하게 인식됨으로써, 자연계에서 분해되지 않는 plastic 물질의 대체물질로서 PHA는 전세계적으로 활발히 연구가 되어지고 있다.

P(3HB)나 여러 PHA들은 화학적 합성에 의해서도 생산이 가능하지만, bulk product 규모의 생산은 생물학적 공정에 의해서만 가능하다. 하지만 아직까지 bulk product로써의 PHA의 생산단가는 상용합성 고분자에 비교할 때 매우 높기 때문에 생산비용의 절감을 위해 신규 PHA 합성 균주의 분리, 합성 균주의 개발, 고효율 생물학적 생산(발효) 기술 연구, 경제적인 분리·정제 공정의 개발 등에 관한 연구가 전세계적으로 진행되고 있다(13,15,16).

발효에 의한 PHA 생산의 최근 연구에서 높은 농도의 PHA를 고생산성으로 얻은 여러 결과들이 보고되었다. Kim 등은 *A. eutrophus*를 생산균주로 사용하여 50시간만에 164 g/L의 세포농도와 121 g/L의 P(3HB) 농도, 그리고 2.42 g/L-h의 생산성을 얻었다(9). *A. latus*를 이용하여 Yamane 등은 초기 접종량이 13.7 g/L 건조 균체 질량일 때, 18시간만에 143 g/L의 세포농도, 71.4 g/L의 P(3HB) 농도, 그리고 3.97 g/L-h의 생산성을 얻었다(46). 저가의 탄소원 methanol을 이용하는 *Methylobacterium organophilum*을 이용해서 240 g/L의 세포농도, 130 g/L의 P(3HB), 그리고 1.86 g/L-h의 생산성을 얻은 결과가 최근 보고되었다(10). 또한 고농도, 높은 함량의 PHA 생산은



- n = 1 R = hydrogen Poly(3-hydroxypropionate)
- R = methyl Poly(3-hydroxybutyrate)
- R = ethyl Poly(3-hydroxyvalerate)
- R = propyl Poly(3-hydroxyhexanoate)
- R = pentyl Poly(3-hydroxyoctanoate)
- R = nonyl Poly(3-hydroxydodecanoate)

n = 2 R = hydrogen Poly(4-hydroxybutyrate)

Fig. 1. General structure of polyhydroxyalkanoates.

분리·정제 공정의 단순화를 가능하게 하여 여러 고순도, 고효율 분리·정제기술이 개발되었다(13).

이러한 유가식 배양에 의한 미생물로 부터의 P(3HB) 생산은 고농도 세포 배양의 한계에 까지 근접한 것으로써, 생산비용의 절감을 위해 단지 발효기술의 개발에 의한 생산성 향상만으로는 많은 노력을 필요로 한다(14). 따라서 앞으로의 PHA에 관한 연구에는 보다 높은 생산성, 저가의 기질 이용성, 보다 단순한 분리 정제를 위한 세포 파괴의 용이성, 그리고 새로운 PHA 합성능을 가진 균주의 분리나 개발이 필요하다. 이러한 모든 우수한 능력을 가진 균주를 분리하는 것은 많은 어려움이 따르기 때문에 recombinant DNA techniques을 이용한 균주 개발에 많은 연구가 되어지고 있다. 본 총설에서는 PHA 생합성경로, PHA 합성 유전자의 cloning, 그리고 최근 개발되어진 재조합 균주에 관한 연구 결과들을 소개하고자 한다.

### PHA 생합성의 대사 경로

Bacteria 내의 PHA의 생합성에 대해서 4가지 서로 다른 경로들이 존재한다고 알려졌다(34). 이러한 다른 생합성 경로나 또는 이들 가운데서 일부분이 서로 연결되어 여러 다른 PHA의 생합성을 설명하고 있다.

첫 번째 생합성 경로는 가장 널리 알려진 3단계 PHA 생합성 경로로써 *A. eutrophus* 내의 acetyl-CoA로부터 P(3HB)로 되는

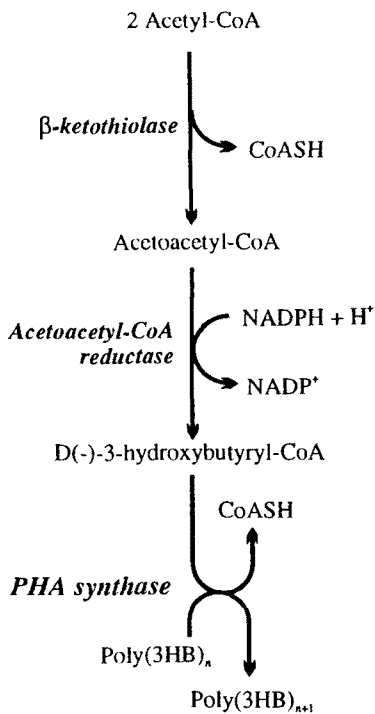


Fig. 2. *Alcaligenes eutrophus* PHA-biosynthetic pathway.

경로가 그 예이다. 두 분자의 acetyl-CoA는  $\beta$ -ketothiolase를 촉매로 하여 생물학적 Claisen condensation에 의해 carbon-carbon 결합이 형성된다. 이러한 첫 번째 반응에 의해 형성된 acetoacetyl-CoA는 NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase에 의해 입체선택적으로 환원되어져 D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA로 변환된다. 이 생합성 경로의 마지막 과정은 D(-)-3-hydroxybutyryl moiety가 polyester 분자에 PHA synthase라는 효소의 촉매작용으로 ester결합을 하는 것이다(*Alcaligenes eutrophus* PHA-biosynthetic pathway, Fig. 2).

두 번째 생합성 경로는 이러한 *A. eutrophus*내의 PHA 생합성 경로에서 변형된 형태인데, *Rhodospirillum rubrum*에서의 PHA 생합성 경로로써 알려졌다. 2분자의 acetyl-CoA로부터  $\beta$ -ketothiolase의 촉매 작용에 의해 형성된 acetoacetyl-CoA는 NADH-dependent reductase에 의해 L(+)-3-hydroxybutyryl-CoA로 환원되어지고, 환원된 L(+)-3-hydroxybutyryl-CoA는 두 개의 enoyl-CoA hydratase에 의해서 D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA로 전환된다. 이러한 D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA가 PHA synthase에 의해 고분자로 중합되는 것이 이 생합성 경로의 마지막 과정이다(*Rhodospirillum rubrum* PHA-biosynthetic pathway, Fig. 3).

PHA 생합성 과정의 세번째 형태는 ribosomal RNA homology group I에 속하는 대부분의 *pseudomonads*에서 일어나는 것으로써 *Pseudomonas oleovorans* PHA-biosynthetic pathway라고 한다. *Pseudomonas oleovorans*와 이 rRNA homology group I에 속하는 다른 bacteria들은 alkane, alkanol, 또는 alkanolate에서 배양될 때 이 세 번째 대사경로에 따라서 main chain의 carbon 수가 6-12 사이인 medium-chain-length 3-hy-

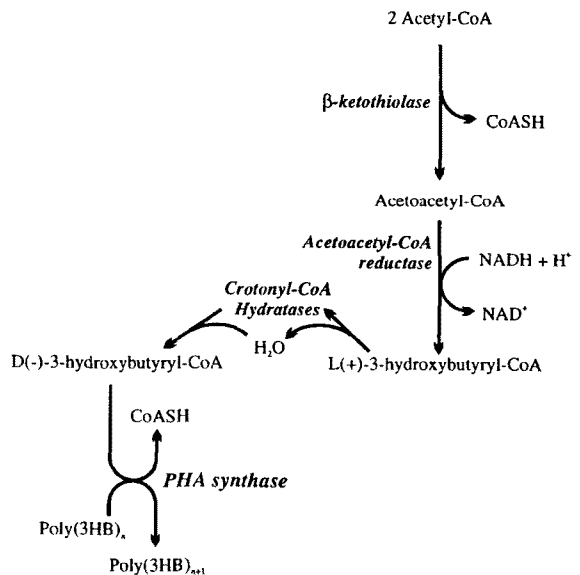


Fig. 3. *Rhodospirillum rubrum* PHA-biosynthetic pathway.

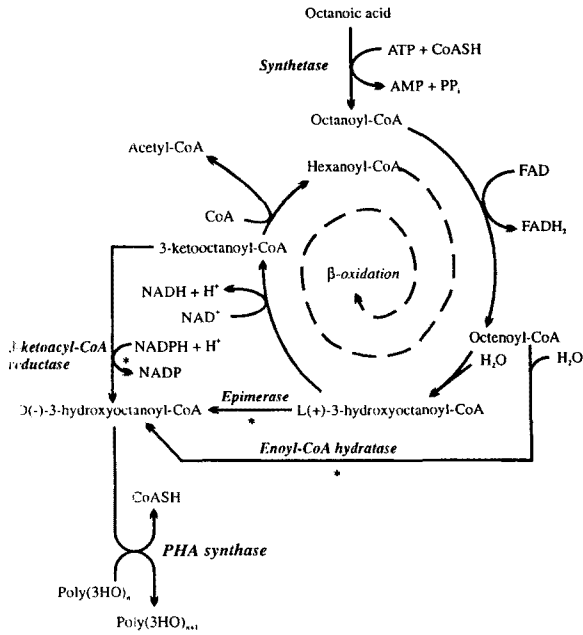


Fig. 4. *Pseudomonas oleovorans* PHA-biosynthetic pathway\*.

droxyalkanoate로 이루어진 PHA를 축적한다. 예로써 octane이 나 octanoate, 또는 octanol을 이용하여 배양하면, 3-hydroxyoctanoate를 주된 구성성분으로 하는 PHA가 축적된다. 이 세 번째 대사경로는 Fig. 4에 나타내었다. 이 대사경로에서는 alkane, alkanol, 또는 alkanolate로부터 유도된 활성화 지방산의 산화과정에서 만들어지는  $\beta$ -oxidation cycle의 중간매개물들이 bacteria내의 PHA 생합성에 관여한다.

네 번째 생합성 경로는 *P. oleovorans*를 제외한 rRNA homology group I에 속하는 거의 모든 pseudomonads내에 존재하는 것으로서 acetyl-CoA로부터 medium-chain-length 3-hydroxyalkanoate로 이루어진 중합체의 생합성에 관여한다. 이 경우 생합성 PHA의 주된 구성성분은 3-hydroxydecanoate (3HD)이다. 이 네 번째 생합성 경로는 아직까지 자세히 연구가 되지 못했으며, 3-hydroxydecanoate의 어떤 유도체가 PHA synthase의 기질로서 사용되는지, 그리고 어떻게 acetyl-CoA로부터 이 3-hydroxydecanoate 유도체가 생합성되는지 밝혀지지 않았다. *P. aeruginosa* 내에서의 poly(3-hydroxydecanoate)의 생합성 경로로써 연구되어졌기 때문에, 이 네 번째 생합성 경로는 *Pseudomonas aeruginosa* PHA-biosynthetic pathway라고 언급되어진다. *P. aureofaciens*, *P. citronellolis*, *P. chlororaphis*, *P. marginalis*, *P. mendocina*, *P. putida*, 그리고 *Pseudomonas sp.* DSM 1650 등이 gluconate에서 배양될 경우 3HD로 이루어진 이러한 PHA를 합성한다고 알려졌다.

### PHA 생합성 유전자들의 분자구조

PHA 생합성 유전자들과 PHA의 대사회로에 밀접히 관여하는 다른 유전자들은 bacteria의 genomes에서 종종 무리를 이루고(clustered) 있다. 이러한 사실은 nucleotide sequence analysis, physical mapping, 그리고 subclone 되어 발현된 효소의 활성에 의해서 밝혀졌다. *A. eutrophus*의 경우  $\beta$ -ketothiolase(*phaA*, 1179 bp 크기), NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase(*phaB*, 738 bp 크기), 그리고 PHA synthase(*phaC*, 1767 bp 크기)는 하나의 operon(*phaC-A-B*)을 이루고 있으며 *phaC*와 *phaA*사이에 84 bp, *phaA*와 *phaB*사이에 74 bp의 intergenic 부분을 가지고 있다.  $\sigma^{70}$  like promoter sequence에 의해 진행되는 전사시작은 대략적으로 *phaC*의 320 bp 정도의 앞쪽에 있으며 전사종료는 *phaB*의 뒷부분에 존재한다고 알려졌다. Northern blot에 의해 대략적으로 4.1 kb 크기의 전사체가 확인되었다(30).

*Chromatium vinosum*의 경우 낮은 분자량을 가진 PHA synthase(*phaC*, 1068 bp 크기)의 57 bp 앞에 PHA synthase activity의 발현을 위해 요구되는 granule-associated 단백질을 coding하는 open reading frame(ORF) (*phaE*, 1074 bp 크기)이 존재해 있다. 이들 두 유전자들은 하나의 operon을 이루고 있는 것으로 생각되며,  $\sigma^{70}$ -dependent promoter는 *phaE*의 앞쪽에서 확인되었다. *phaE*의 부근에 위치하며 반대방향으로  $\beta$ -ketothiolase(*phaA*, 1185 bp 크기)와 NADH-dependent acetoacetyl-CoA reductase(*phaB*, 741 bp 크기)를 coding하는 유전자들이 위치해있다. *phaE*와 *phaA* 유전자들은 서로 반대방향으로 150 bp 정도의 거리를 두고 이루어져있다. *phaA*와 *phaB* 사이에는 2개의 조그마한 ORF (462 bp와 363 bp 크기)들이 존재하고 있으나 그 정확한 역할은 알려져 있지 않다. *phaA*의 promoter도 역시 *E. coli*  $\sigma^{70}$  consensus promoter와 닮았으며 *phaE* promoter와 겹치는 부분이 존재한다고 알려져있다(21,22).

지금까지 분자구조가 알려진, main chain에서 carbon 수가 3~5개 사이를 갖는 short-chain-length PHA를 합성하는 다른 bacteria에서 PHA synthase가 acetyl-CoA로부터 PHA를 합성하는데 필요한 다른 enzyme들을 coding 하는 유전자와 무리를 이루지 않는 경우도 보고되어있다. *Zoogloea ramigera*가 그 예인데,  $\beta$ -ketothiolase를 coding하는 유전자(*phaA*, 1173 bp 크기)와 NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase를 coding 하는 유전자(*phaB*, 723 bp 크기)는 88 bp의 intergenic region을 가지며 *phaA-B* 순으로 하나의 operon을 이루고 있지만 그 근처에 PHA synthase를 coding 하는 유전자는 발견되지 않았다(25). *Rhodococcus ruber*와 *Methylobacterium extorquens*에서도 PHA 생합성에 관여하는 다른 효소들을 coding하는 유전자들로부터 따로 떨어져 있는 *phaC* synthase gene이 발견되었다(36).

rRNA homology group I에 속하는 pseudomonads들의 경우

는 PHA 대사 회로에 관여하는 유전자들이 특이한 구조를 나타내고 있다. *P. oleovorans*와 *P. aeruginosa*는 2개의 PHA synthase genes (*phaC<sub>1</sub>*과 *phaC<sub>2</sub>*, *P. oleovorans*의 경우 각각 1677 bp와 1680 bp, *P. aeruginosa*의 경우 각각 1677 bp와 1680 bp)을 가지고 있으며, 그 사이에 PHA depolymerase를 coding하는 *phaZ*(*P. oleovorans*의 경우 849 bp 크기, *P. aeruginosa*의 경우 855 bp 크기)을 가지고 있다. *P. oleovorans*의 경우에는 *phaC<sub>1</sub>*, *phaZ*, 그리고 *phaC<sub>2</sub>* 유전자들이 각각 68 bp, 122 bp 만큼, *P. aeruginosa*의 경우에는 각각 155 bp와 69 bp 만큼 떨어져 있다. *phaC<sub>2</sub>* 뒤에는 두 균주 모두 615 bp 크기의 ORF가 존재해 있다. 이 ORF의 정확한 역할은 밝혀져 있지 않으나 두 pseudomonads 사이에 매우 높은 유사성을 가지고 있다(6,41).

## PHA 생합성 유전자의 Cloning

1988년 *A. eutrophus*의 PHA 생합성 유전자가 세 개의 서로 다른 연구자들에 의해 *Escherichia coli*에 cloning 되었다(26, 31, 33). 그 후 PHA 생합성에서 가장 중요한 효소인 PHA synthase는 여러 다른 bacteria로부터 cloning 되었다. 지금까지 PHA synthase 유전자의 cloning에 사용된 방법들을 6가지로 나누어서 간략히 설명하겠다.

1. PHA 생합성이 결핍된 돌연변이 균주의 phenotypic complementation에 의한 genomic library의 screening 방법.

PHA 생합성이 결핍된 *A. eutrophus* P(3HB)<sup>4</sup>와 같은 돌연변이주를 PHA 합성 균주의 genomic DNA fragment를 가진 vector들로 형질전환시켜 재조합 *A. eutrophus*에서의 PHA 합성능을 조사한다. PHA 합성조건(과량의 탄소원 존재하에 영양제한 조건)의 고체 배지에서 PHA를 축적하지 못하는 bacteria들은 반투명한 반면, PHA biosynthesis gene을 가진 vector로 형질전환되어 PHA 합성능이 복원된 균주는 불투명한 colony를 나타내게 된다. 이러한 screening 방법에서는 PHA 생합성이 결핍된 돌연변이 균주에서 복제 능력이 있는 vector가 필요하다. 또한 다른 대사회로에는 아무런 영향을 미치지 않고 PHA 생합성 부분만이 결핍된 *A. eutrophus* P(3HB)<sup>4</sup>과 같은 돌연변이 균주가 확보되어야만 한다.

2. *E. coli*와 같이 PHA를 축적하지 못하는 숙주를 이용하여 phenotypic complementation에 의한 genomic library의 screening 방법.

*E. coli*는 분자 생물학적으로 많은 연구가 되어졌기 때문에 많은 vector들이 개발되어 있다. 또한 여러 사용할 수 있는 고효율 형질전환 기술이 개발되어져 있다. 따라서 PHA synthase gene의 cloning을 위해 PHA 생합성능이 결핍된 균주보다 형질전환이 용이하지만, *E. coli*내에서 PHA synthase gene이 heterologous expression이 가능해야 한다는 제한조건이 있다. *E. coli*를 이용한 *A. eutrophus*의 PHA biosynthesis gene의

cloning 경우에는 *E. coli*내에서의 PHA biosynthesis gene의 자체 promoter에 의한 발현이 이루어졌으며, PHA 생합성 유전자내의 자체 promoter만으로 재조합 *E. coli*를 이용한 PHA의 생산이 이루어진다. PHA를 축적하고 있는 재조합 *E. coli*도 고체 배지에서 불투명한 colony를 나타내게 된다.

3. Transposon mutagenesis를 이용하여 얻어진 homologous gene probe를 사용하여 genomic library를 screening하는 방법.

Transposon과 같이 쉽게 검출될 수 있는 특성을 가진 insert를 genomic DNA에 넣으면 PHA synthase에 transposon이 들어가서 PHA 합성능이 결핍된 돌연변이 균주를 얻을 수 있다. 이 균주의 genomic DNA를 제한 효소로 절단하여 얻은 여러 부분들 가운데서 transposon을 갖고있는 부분을 검출하여 확보하면 transposon의 삽입에 의해 비활성화된 synthase gene을 얻을 수 있다. 이 부분을 labeling 처리한 후에 probe로 사용하여 PHA biosynthesis gene의 cloning을 위한 library를 screening할 수 있다. Schubert 등은 *A. eutrophus*에서 PHA 생합성 유전자를 얻기 위하여 Tn5 mutagenesis를 이용하였다(31).

4. Heterologous gene probe를 이용하여 genomic library를 screening 하는 방법.

PHA synthase들은 서로 다른 균주들에서도 높은 homology를 가지고 있다. 따라서 이미 cloning된 균주들의 synthase DNA를 probe로 사용하여 hybridization 등의 방법으로 screening할 수 있다.

5. 여러 PHA synthase gene에서 공통적으로 보존되는 sequence를 이용한 oligonucleotide probe로 genomic library를 screening하는 방법.

이제까지 알려진 PHA synthase의 sequence에서 공통적으로 존재하는 부분들이 있다. 이러한 공통 부분의 sequence를 갖는 oligonucleotide probe를 사용하여 hybridization을 이용하여 screening할 수 있다.

6. 효소활성에 의한 genomic library의 screening 방법.

숙주내에서 PHA synthase 유전자가 발현된다면 PHA의 생합성에 필요한 다른 유전자들이 존재하지 않을 경우에 PHA synthase의 효소 활성 측정용 이용하여 clone을 얻을 수 있다.

지금까지 여러 PHA synthase가 이미 cloning되어있기 때문에 4와 5번 방법이 비교적 쉽게 cloning 방법으로 사용될 수 있다. 위에서 설명한 방법들에 의하여 지금까지 PHA synthase가 cloning된 균주들을 아래에 열거하였다.

*Acinetobacter sp.* (29), *Alcaligenes sp.* SH-69 (11), *Alcaligenes eutrophus* H16 (26, 31, 33), *Chromatium vinosum* D (22), *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* N1 (20), *Lamprocystis roseopersicina* 3112 (20), *Methylobacterium extorquens* IBT6 (45), *Nocardia corralina* (35), *Paracoccus denitrificans* (44), *Pseudomonas aeruginosa* (41), *Pseudomonas citronellolis* (42), *Pseudomonas fluorescens* (35), *Pseudomonas*

*mendocina* (42), *Pseudomonas oleovorans* (6), *Pseudomonas punda* KT2442 (5), *Pseudomonas* sp. (42), *Pseudomonas* sp. strain GP4BH1 (42), *Rhizobium meliloti* (43), *Rhodobacter sphaeroides* (7, 8), *Rhodococcus ruber* PP2 (27), *Rhodospirillum rubrum* Ha (8), *Syntrophomonas wolfei* (23), *Thiocapsa pfennigii* 9111 (20), *Thiocystis violacea* 2311 (20).

### 재조합 균주를 위한 형질전환

재조합 균주를 제작하기 위해서는 새로운 숙주에서 복제가 가능한 vector의 개발과 숙주로의 형질전환 기술이 먼저 확립되어야 한다. 최근의 recombinant DNA techniques의 발달과 PHA 생합성 균주의 분자 생물학적 연구로부터 이러한 문제의 해결책이 제시되었다.

재조합 균주로서 *E. coli*를 사용하는 경우는 이미 많은 연구가 되어져 왔고, 그 결과들이 널리 알려져 있기 때문에 *E. coli* 내에서 복제가 가능한 plasmid와 *E. coli*의 형질전환 기술에 관하여서는 본 총설에서는 언급하지 않겠다. *E. coli* 이외의 PHA 합성 재조합 균주에 사용되는 plasmid와 형질전환 기술에 대해서만 간략히 설명하겠다.

재조합 균주개발을 위한 vector system은 기본적으로 먼저 broad-host-range plasmid를 이용한다. Broad-host-range plasmid란 여러 bacteria에서 복제가 가능한 것으로서 gene cloning 등에도 사용되었으며, 예로써 pHP1014, pKT230, pMM33, pSUP5011, pVK101 등이 있다. pVK101이나 pSUP5011은 재조합 *A. eutrophus*, Pseudomonads 등에 사용된 vector system들이다. 하지만 broad-host-range plasmid는 대부분 낮은 복제수를 가지기 때문에 재조합 균주에서 vector의 gene dosage 효과를 연구하거나 높은 복제수의 vector를 필요로 할 경우 사용상의 문제점이 있다. 재조합 균주에 사용될 vector system의 개발을 위한 다른 방법으로는 이러한 broad-host-range plasmid 대신 재조합 균주를 만들려는 숙주나 이와 유사한 균주에 존재하는 cryptic plasmid를 이용하여 shuttle vector system을 개발하는 것이다. 즉 2개의 *ori*, 재조합 균주내에서 복제를 할 수 있는 *ori*와 원하는 유전자를 가지고 있는 plasmid 자체의 *ori*를 가진 vector system을 제작하는 것이다. 재조합 *Synechococcus*를 위해 사용된 vector는 PHA 생합성 유전자를 가진 pUC plasmid와 *Synechococcus*에서 복제가 가능한 plasmid의 *ori*를 가지고 있다(40).

이러한 vector system을 가지고 재조합 균주로의 형질전환에 사용된 방법으로는 agar plate에서의 mating에 의한 conjugation 방법, calcium chloride에 의한 방법 등이 사용되어졌다. Park 등은 최근에 개발된 형질 전환 방법인 electroporation을 사용하여  $10^{10}$ /mL 농도의 competent cell 50  $\mu$ L를 1  $\mu$ g DNA를 가지고 5 ms의 pulse time 동안 11.5 kV/cm의

pulse 조건에서 *A. eutrophus*의 형질전환 효율  $0.8 \times 10^2$ / $\mu$ g DNA를 얻었다. 이때 형질 전환에 사용된 vector system으로는 broad-host-range plasmid 12 kb 크기의 pKT230를 사용하였다(24). 이러한 vector system과 형질전환기술을 이용하여 PHA 생산을 위해 연구된 재조합 균주들을 대사공학 전략에 대하여 간략히 살핀 후 아래에서 설명하겠다.

### PHA 생산을 위한 Metabolic Engineering

이러한 PHA 생합성 유전자의 cloning과 bacteria의 형질전환 기술을 이용한 recombinant DNA techniques에 의한 균주의 개량은 bacteria내의 대사회로를 변형하거나 새로운 합성경로를 도입하여 기질의 사용 범위를 넓히거나 PHA 합성능을 향상시켜서, PHA의 생산 단가를 절감시키기 위한 연구가 이루어지고 있다. 또한 PHA synthase의 기질 특이성을 이용한 신규 PHA의 합성을 위해 recombinant DNA techniques에 의한 연구도 이루어지고 있다. 이러한 지금까지의 연구를 각각의 균주에 대해서 살펴보겠다.

#### 재조합 *Alcaligenes eutrophus*

지금까지 PHA의 생산에 관하여 가장 많은 연구가 이루어진 균주는 *A. eutrophus*이다. *A. eutrophus*는 높은 P(3HB) 합성능을 가지고 있으며 PHA 생합성 경로의 대부분이 밝혀져 있다. 하지만 *A. eutrophus*는 P(3HB)의 생산을 위한 기질로서 고가의 glucose를 사용하기 때문에 P(3HB)의 생산단가를 낮추기 위하여 *A. eutrophus*의 기질 이용범위를 넓히려는 연구가 이루어졌다.  $\beta$ -galactosidase gene이 *E. coli*의 gal operon과 함께 *A. eutrophus*내에 도입될 때, 재조합 *A. eutrophus*는  $\beta$ -galactosidase의 발현뿐만 아니라 lactose를 이용하여 성장하였으며, 배지내에 galactose는 거의 검출되지 않았다. 하지만 lactose를 이용하는 재조합 *A. eutrophus*는 16시간 정도의 배가시간을 갖는 낮은 성장을 보였다(28). 기질 이용범위를 넓히려는 다른 연구로 levanase 유전자를 발현시켜 sucrose를 가수분해 할수 있는 균주 개발이 있었다. *Bacillus subtilis*의 levanase 유전자를 가진 plasmid pKF4를 이용하여 *A. eutrophus*를 triparental conjugation에 의한 형질전환을 하였다. *Bacillus subtilis*의 자체 promoter를 갖는 이 levanase 유전자는 *A. eutrophus* 내에서 발현하여 sucrose를 가수분해하였다. 하지만 이 경우에도 sucrose에서의 성장은 저하되는 경향을 보였다(3).

Steinbuechel 등은 *A. eutrophus*에서 P(4HB) homopolymer의 생합성능 향상을 위하여 돌연변이 유발에 의하여 얻어진 P(3HB) 생합성이 결핍된 돌연변이주 *A. eutrophus* JMP222를 *A. eutrophus* H16의 PHA 생합성 유전자를 가진 vector로 형질전환하여 건조세포무게의 10%에 불과한 P(4HB) homopolymer를 30%함량까지 증가시켰다(39).

최근 PHA 합성능 향상을 위해 *A. eutrophus*의 PHA 생합성 유전자를 갖는 broad-host-range plasmid를 같은 *A. eutrophus* 내에 재도입하여 재조합 *A. eutrophus*를 개발한 연구가 보고되었다(24). Broad-host-range plasmid pKT230에 *A. eutrophus*의 PHA 생합성 유전자를 도입하고, 만들어진 vector로 electroporation 방법에 의하여 *A. eutrophus*를 형질전환시켰다. 이때 PHA 생합성 관련 효소들이 homologous amplification된 재조합 *A. eutrophus*는 PHA 생합성 관련 효소능( $\beta$ -ketothiolase, NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase, 그리고 PHA synthase)이 원래보다 1.4-2.7배의 증가를 보였으며, PHA 생합성능에서도 약간의 증가를 보였다. 이 때 형질전환을 위하여 개발된 vector들로는 PHA 생합성에 관여하는 3개의 효소를 coding하는 유전자를 모두 가진 것(*phaC-A-B*), 생합성 경로에서의 처음 두 효소만을 가진 것(*phaA-B*), 그리고 PHA synthase 유전자(*phaC*)만을 가진 것들이었는데, PHA 합성능은 PHA synthase만을 가진 것이 그 중에서 가장 높았다.

#### 재조합 *Pseudomonas* 균주와 재조합 *Mycoplana rubra*

*A. eutrophus* PHA 생합성 유전자의 heterologous expression을 갖는 재조합 *Pseudomonas*들에 대한 연구가 보고되었다. Steinbüchel 등은 *A. eutrophus*의 PHA 생합성 유전자를 갖고 있는 broad-host-range plasmid를 이용하여 *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. oleovorans*, *P. putida*, *P. stutzeri*, 그리고 *P. syringae* 등과 같은 rRNA homology group I에 속하는 *Pseudomonas*를 형질전환하였다. 이때 pVK101을 기본으로 하는 vector를 사용하였다. 이들 *Pseudomonas*들은 원래 P(3HB)를 생성하지 못하는 균주들이었지만, *A. eutrophus* 생합성 유전자들이 들어간 재조합 *Pseudomonas* 균주의 경우 건조균체 질량의 8-24.3%까지의 P(3HB) 함량을 보였다(37).

이와 유사한 예로써 methylotrophic bacterium인 *Mycoplana rubra*에 *A. eutrophus*, *C. vinosum* D의 PHA 생합성 유전자 또는 *M. extorquens*의 PHA synthase structural gene를 삽입하였을 경우 P(3HB)의 함량이 9.6에서 25%까지의 증가를 보였다(2).

*Thiocapsa pfennigii*의 PHA 생합성 유전자를 갖는 재조합 *P. putida*의 경우, *T. pfennigii*의 PHA 생합성 유전자의 heterologous expression에 의하여 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyhexanoate, 그리고 3-hydroxyoctanoate로 이루어진 새로운 PHA들이 octanoate를 탄소원으로 하여 배양하였을 때 형성되었다(13).

#### 재조합 *Cyanobacterium*

Anoxygenic photosynthetic bacteria인 cyanobacteria를 이용하여 CO<sub>2</sub>로부터 P(3HB)를 생산하려는 목적으로써 최근 *A. eutrophus*의 PHA 생합성 유전자를 갖는 cyanobacterium인 생물산업

*Synechococcus* sp.에 관한 연구가 보고되었다. *A. eutrophus* PHA 생합성 유전자가 cloning된 pUC19에 pUH24의 *ori*를 도입하여 *Synechococcus* 내에서 복제할 수 있는 shuttle-vector를 제작하였다. P(3HB)를 합성하지 못하는 원래 숙주에 비해서, fluorescent lamp에 의한 조명하에서 재조합 *Synechococcus*는 질소원이 제한될 때 1% P(3HB)를 축적하였다(40).

#### 재조합 *Escherichia coli*와 재조합 *Klebsiella*

1988년 *A. eutrophus*의 PHA 생합성 유전자가 *E. coli*에 cloning된 이후 재조합 *E. coli*를 이용한 PHA의 생산은 여러 면에서 흥미를 끌었다. *A. eutrophus*의 PHA 생합성 유전자를 갖는 재조합 *E. coli*는 flask 배양으로 건조세포질량의 약 90%의 P(3HB)를 축적하였으며, *E. coli*의 빠른 성장 속도, 여러 기질의 이용가능성, 많은 대사 회로 및 분자 생물학적 연구가 이루어진 *E. coli*의 이용성, 고농도 세포배양 기술의 이용가능성 등의 장점을 가지고 있다. 재조합 *E. coli*에서 P(3HB)의 축적에 따른 plasmid의 복제수와 안정성의 효과를 연구하여 높은 gene dosage를 갖는 높은 복제수의 plasmid의 경우 고농도로 P(3HB)를 축적할 수 있었으며, plasmid의 안정성을 위하여 plasmid R1의 *hok/sok* system이 도입되었다(18). Vector와 숙주사이의 관계에서 서로 다른 숙주에 따라 성장속도, 얻을수 있는 최종 세포농도와 생성물 농도, 기질로부터의 생성물 수율, 기질 이용속도, 부산물 생성정도 등이 다르기 때문에 여러 *E. coli*를 대상으로 하여 최적의 숙주가 선택되었다(17). 이렇게 제작된 재조합 *E. coli*는 높은 P(3HB) 농도와 생산성을 보였다. 또한 배지 비용을 낮추려는 목적으로 단순배지에서의 생산능을 연구하여 단순배지에서 복합질소원 첨가시 P(3HB)로 이용가능한 acetyl-CoA와 PHA 생합성 두 번째 효소(NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase)의 보조 인자로 작용하는 NADPH의 양이 증가하여 P(3HB) 합성능이 향상된다는 것이 밝혀졌다(17). 또한 단순배지에서의 낮은 P(3HB) 생산성의 한 원인인 세포의 filamentation을 억제하여 보다 높은 생산성을 얻을 수 있다는 결과도 보고되었다(12).

*E. coli*는 propionate를 효율적으로 이용하지 못하기 때문에 *A. eutrophus*와는 다르게 재조합 *E. coli*는 propionate나 valerate를 보조 기질로써 사용하여도 P(3HB-co-3HV)는 합성이 이루어지지 않는다. 하지만 최근에 *fadR atoC* 돌연변이 균주 *E. coli*를 이용할 경우 propionate 이용에 관계하는 효소들이 발현되어 탄소원으로 propionate와 glucose를 가진 배지에서 P(3HB-co-3HV)이 합성되었다(32). 또한 이러한 돌연변이 균주를 이용하지 않고도 acetate와 oleic acid에서의 적절한 유도에 의해 P(3HB-co-3HV)가 합성될 수 있다는 연구결과가 보고되었다(47).

*E. coli*와 마찬가지로 원래 PHA 생합성 경로가 없는 *Klebsiella*도 *A. eutrophus*의 PHA 생합성 유전자들을 도입하여,

PHA 생산을 위한 재조합 *Klebsiella*에 관한 연구도 이루어지고 있다. *Klebsiella*는 *E. coli*와 많은 부분에서 유전적 유사성을 가지고 있으며, 다양한 기질의 이용가능성, 빠른 성장 속도 등의 장점으로 *E. coli*와 함께 PHA 합성을 위한 재조합 균주로서 고려되고 있다. Sucrose를 이용하여 P(3HB)를 합성할 수 있는 재조합 *Klebsiella*를 얻기위해서 *A. eutrophus* PHA 생합성 유전자를 가지고 있는 pJM9131을 electroporation에 의한 방법으로 여러 sucrose 이용 *Klebsiella*들을 형질 전환하였다. 이러한 재조합 *Klebsiella*들은 sucrose로부터 P(3HB)를 합성하였으며, 재조합 *Klebsiella aerogenes*는 sugarcane molasses로부터 대략적으로 0.8 g P(3HB)/L-h의 생산성으로 P(3HB)를 생산하였다. 또한 *Klebsiella oxytoca fadR* 균주는 glucose와 propionate를 기질로써 사용하였을 때 P(3HB-co-3HV)를 합성하였다(48).

## 결 론

PHA의 상용화를 위한 연구가 전세계적으로 여러 방면에서 진행되고 있다. 그중 recombinant DNA techniques의 발달에 의한 재조합 균주 개발에 관한 연구는 wide type 균주만으로는 만족시킬수 없었던 여러 요구들을 충족시킬수 있다는 점에서 흥미를 끌고 있다. 저가 배지의 이용, 높은 생산성, 새로운 PHA 합성 등을 목적으로 많은 재조합 균주들이 개발되고 있으며, 이를 이용한 많은 생산 연구가 이루어지고 있다. 여기서 한가지 주의할 기울여야 할 것은 재조합 균주의 개발에 있어서 항상 서로 상반되는 두가지 접근 방식이 이루어져왔다는 것이다. 즉 예로써, sucrose와 같은 저가의 기질로부터 PHA를 합성할 수 있는 재조합 균주를 개발하려한다면, levanase 유전자를 *A. eutrophus*와 같은 PHA 합성 균주에 도입하는 방법과 sucrose이용 *E. coli*나 *Klebsiella* 등에 PHA 생합성 유전자를 도입하는 두 가지 다른 접근 방식이 연구되어졌다. 지금까지의 연구 결과로는 후자의 접근 방법이 좋은 연구 결과를 보고하고 있다.

또한 재조합 bacteria 뿐만 아니라 최근 transgenic plant *Arabidopsis thaliana*가 PHA 생산을 위해 연구되어지고 있다(13). 아직까지는 합성능이 낮고 분리 정제면에서 큰 문제점을 가지고 있지만 transgenic plant에서의 PHA 생산은 PHA 생산단가를 전분만큼 낮출수 있다는 가능성을 제시해두고 있다. 하지만 이는 transgenic plant를 연구하는 사람들의 optimistic한 전망이고(실제로는 힘들며), 재조합 균주 개발에 의한 PHA의 고효율 생산이 더 적합한 접근 방법으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 1995년도 교육부 학술 연구 조성비(생물화학공

학, 과제 번호 H-03)에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

- Doi, Y. 1990. Microbial polyesters. VCH, New York.
- Follner, C. G., Muller, S., Steinbuchel, A., Babel, W. 1995. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyric acid by the facultatively methanol-assimilating bacterium *Mycoplana rubra* B346 and recombinant strains. *J. Basic Microbiol.* **35**: 179-188.
- Friehe, K., Lafferty, R. M. 1989. Cloning and expression of the levanase gene in *Alcaligenes eutrophus* H16 enables the strain to hydrolyze sucrose. *J. Biotechnol.* **10**: 285-292.
- Holmes, P. A. 1988. Biologically produced PHA polymers and copolymers, pp. 1-65. In: D. C. Bassett (ed.), Developments in crystalline polymers, Vol. 2. Elsevier, London.
- Huisman, G. W. 1991. Poly(3-hydroxyalkanoates) from *Pseudomonas putida*: from DNA to plastic. Ph.D. Dissertation, Rijksuniversiteit Groningen, the Netherlands.
- Huisman, G. W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier, B., Terpstra, P., Witholt, B. 1991. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans*: identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J. Biol. Chem.* **266**: 2191-2198.
- Husted, E., Steinbuchel, A. 1993. Characterization of the polyhydroxyalkanoate gene locus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 709-714.
- Husted, E., Steinbuchel, A., Schlegel, H. G. 1992. Cloning of poly(3-hydroxybutyric acid) synthase genes of *Rhodococcus sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum* and heterologous expression in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **93**: 73-80.
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., Woo, S. I. 1994. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 892-898.
- Kim, S. W., Kim, P., Lee, H. S., Kim, J. H. 1996. High production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation. *Biotechnol. Lett.* **18**: 25-30.
- Lee, I., Nam, S. -W., Rhee, Y. -H., Kim, J. -Y. 1996. Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of polyhydroxyalkanoate synthase (*phaC*) gene from *Alcaligenes* sp. SH-69. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 309-314.
- Lee, S. Y. 1994. Suppression of filamentation in recombinant *Escherichia coli* by amplified FtsZ activity. *Biotechnol. Lett.* **16**: 1247-1252.
- Lee, S. Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 1-14.
- Lee, S. Y. 1996. High cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Trends. Biotechnol.* **14**: 98-105.
- Lee, S. Y. 1996. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends*

- Biotechnol.* **14**: 431-438.
16. Lee, S. Y., Chang, H. N. 1995. Production of poly-(hydroxyalkanoic acid). *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **52**: 27-58
  17. Lee, S. Y., Chang, H. N. 1995. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* strains: genetic and fermentation studied. *Can. J. Microbiol.* **41(Suppl. 1)**: 207-215.
  18. Lee, S. Y., Yim, K. S., Chang, H. N., Chang, Y. K. 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.
  19. Lemoigne, M. 1926. Products of dehydration and of polymerization of  $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Bull. Soc. Chem. Biol.* **8**: 770-782.
  20. Liebergesell, M., Mayer, F., Steinbuchel, A. 1993. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 292-300.
  21. Liebergesell, M., Schmidt, B., and Steinbuchel, A. 1992. Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. *FEMS Microbiol. Lett.* **99**: 227-232.
  22. Liebergesell, M., Steinbuchel, A. 1992. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D. *Eur. J. Biochem.* **209**: 135-150.
  23. McInerney, M. J., Amos, D. A., Kealy, K. S., Palmer, J. 1992. Synthesis and function of polyhydroxyalkanoates in anaerobic syntrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 195-206.
  24. Park, H. -C., Park, J. -S., Lee, Y. -H., Huh, T. -L. 1995. Manipulation of the genes for poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* **17**: 729-734.
  25. Peoples, O. P., Sinskey, A. J. 1989. Fine structural analysis of *Zoogloea ramigera* *phbA-phbB* locus encoding  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase: nucleotide sequence of *phb-B*. *Mol. Microbiol.* **3**: 357-359.
  26. Peoples, O. P., Sinskey, A. J. 1989. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *J. Biol. Chem.* **264**: 15298-15303.
  27. Pieper, U., Steinbuchel, A. 1992. Identification, cloning and molecular characterization of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase structural gene of the Gram-positive *Rhodococcus ruber*. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**: 73-80.
  28. Pries, A., Steinbuchel, A., Schlegel, H. G. 1990. Lactose- and galactose-utilizing strains of poly(hydroxyalkanoic acid)-accumulating *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas saccharophila* obtained by recombinant DNA technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 410-417.
  29. Schembri, M. A., Bayly, R. C., Davies, J. K. 1994. Cloning and analysis of the polyhydroxyalkanoic acid synthase gene from an *Acinetobacter* sp.: evidence that the gene is both plasmid and chromosomally located. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**: 145-152.
  30. Schubert, P., Kruger, N., Steinbuchel, A. 1991. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate)-, PHB-, biosynthetic operon: identification of the N-terminus of PHB-synthase and identification of the promoter. *J. Bacteriol.* **173**: 168-175.
  31. Schubert, P., Steinbuchel, A., Schlegel, H. G. 1988. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthetic pathway and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 5837-5847.
  32. Slater, S., Gallaher, T., Dennis, D. 1992. Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1089-1094.
  33. Slater, S. C., Voige, W. H., Dennis, D. E. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* **170**: 4431-4436.
  34. Steinbuchel, A. 1991. Polyhydroxyalkanoic acids, pp. 124-213. In: D. Byrom (ed.), *Biomaterials: novel materials from biological sources*. Stockton, New York.
  35. Steinbuchel, A., Aerts, K., Babel, W., Follner, C., Liebergesell, M., Madkour, M. H., Mayer, F., Furst, U. P., Pries, A., Valentin, H. E., Wiczorek, R. 1995. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusion. *Can. J. Microbiol.* **41(Suppl. 1)**: 94-105.
  36. Steinbüchel, A., Hustede, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A., Valentin, H. 1992. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 217-230.
  37. Steinbüchel, A., Schubert, P. 1989. Expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid)-synthetic pathway in *Pseudomonas* sp. *Arch. Microbiol.* **153**: 101-104.
  38. Steinbüchel, A., Valentin, H. E. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 219-228.
  39. Steinbüchel, A., Valentin, H. E., Schonebaum, A. 1994. Application of recombinant gene technology for production of polyhydroxyalkanoic acids: biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) homopolyester. *J. Environ. Polymer Degrad.* **2**: 67-74.
  40. Suzuki, T., Miyake, M., Tokiwa, Y., Saegusa, H., Saito, T., and Asada, Y. 1996. A recombinant cyanobacterium that accumulates poly-(hydroxybutyrate). *Biotechnol. Lett.* **18**: 1047-1050.
  41. Timm, A., Steinbuchel, A. 1992. Cloning and molecular analysis of the polyhydroxyalkanoic acid gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J. Biochem.* **209**: 15-30.



42. Timm, A., Wiese, S., Steinbuchel, A. 1994. A general identification of polyhydroxyalkanoic acid synthase genes from pseudomonads belonging to the rRNA homology group I. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 669-675.
43. Tombolini, R., Povolito, S., Buson, A., Laterza, G., Morea, A., Squartini, A., Casella, S., Nuti, M. P. 1994. Insertional inactivation of the PHA-synthase gene in *Rhizobium meliloti* leads to strains unable to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB). In: Abstracts of the 4th International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Montreal, Que., August 14-18.
44. Ueda, S., Yabutani, T., Maehara, A., Yamane, T. 1996. Molecular analysis of poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis gene from a methylotrophic bacterium, *Paracoccus denitrificans*. *J. Bact.* **178**: 774-779.
45. Valentin, H. E., Steinbuchel, A. 1993. Cloning of the *Methylobacterium extorquens* polyhydroxyalkanoic acid synthase structural gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 309-317.
46. Yamane, T., Fukunaga, M., Lee, Y. -W. 1996. Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. *Biotechnol. Bioeng.* **50**: 197-202.
47. Yim, K. S., Lee, S. Y., Chang, H. N. 1996. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 495-503.
48. Zhang, H., Obias, V., Gonyer, K., Dennis, D. 1994. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1198-1205.