

## 재조합 대장균에서 새로운 코엔자임 에이 트랜스퍼레이즈를 이용한 젓산을 모노머로 함유한 폴리하이드록시알칸산 생산 연구

김유진<sup>1</sup>, 채철기<sup>1</sup>, 강경희<sup>2</sup>, 오영훈<sup>2</sup>, 주정찬<sup>2</sup>, 송봉근<sup>2</sup>, 이상엽<sup>3</sup>, 박시재<sup>1\*</sup>

### Biosynthesis of Lactate-containing Polyhydroxyalkanoates in Recombinant *Escherichia coli* by Employing New CoA Transferases

You Jin Kim<sup>1</sup>, Cheol Gi Chae<sup>1</sup>, Kyoung Hee Kang<sup>2</sup>, Young Hoon Oh<sup>2</sup>, Jeong Chan Joo<sup>2</sup>, Bong Keun Song<sup>2</sup>, Sang Yup Lee<sup>3</sup>, and Si Jae Park<sup>1\*</sup>

Received: 3 January 2016 / Revised: 27 January 2016 / Accepted: 29 January 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Several CoA transferases from *Clostridium beijerinckii*, *C. perfringens* and *Klebsiella pneumoniae* were examined for biosynthesis of lactate-containing polyhydroxyalkanoates (PHAs) in recombinant *Escherichia coli* XL1-Blue strain. The *CB3819* gene and the *CB4543* gene from *C. beijerinckii*, the *pct* gene from *C. perfringens* and the *pct* gene from *K. pneumoniae*, which encodes putative CoA transferase gene, respectively, was co-expressed with the *Pseudomonas* sp. MBEL 6-19 *phaC1437* gene encoding engineered *Pseudomonas* sp. MBEL 6-19 PHA synthase 1 (PhaC1<sub>P<sub>6-19</sub></sub>) to examine its activity for the construction of key metabolic pathway to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-lactate) [P(3HB-co-LA)]. The recombinant *E. coli* XL1-Blue expressing the *phaC1437*

gene and *CB3819* gene synthesized poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] homopolymer to the P(3HB) content of 60.5 wt% when it was cultured in a chemically defined medium containing 20 g/L of glucose and 2 g/L of sodium 3-hydroxybutyrate. Expression of the *phaC1437* gene and *CB4543* gene in recombinant *E. coli* XL1-Blue also produced P(3HB) homopolymer to the P(3HB) content of 51.2 wt% in the same culture condition. Expression of the *phaC1437* gene and the *K. pneumoniae* *pct* gene in recombinant *E. coli* XL1-Blue could not result in the production of PHAs in the same culture condition. However, the recombinant *E. coli* XL1-Blue expressing the *phaC1437* gene and the *C. perfringens* gene could produce poly(3-hydroxybutyrate-co-lactate) [P(86.4mol%3HB-co-13.7 mol%LA)] up to the PHA content of 10.6 wt% in the same culture condition. Newly examined CoA transferases in this study may be useful for the construction of engineered *E. coli* strains to produce PHA containing novel monomer such lactate.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Polyhydroxyalkanoate (PHA), Lactate-containing PHA, Propionyl-CoA transferase

<sup>1</sup>명지대학교 환경에너지공학과

<sup>1</sup>Department of Environmental Engineering and Energy, Myongji University, Yongin 17058, Korea  
Tel: +82-31-324-1337, Fax: +82-31-336-6336  
e-mail: parksj93@mju.ac.kr

<sup>2</sup>한국화학연구원 바이오화학연구센터

<sup>2</sup>Center for Bio-based Chemistry, Division of Convergence Chemistry, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 34114, Korea

<sup>3</sup>한국과학기술원 생명화학공학과

<sup>3</sup>Metabolic and Biomolecular Engineering National Research Laboratory, Department of Chemical and Biomolecular Engineering (BK21 Program), Center for Systems and Synthetic Biotechnology, and Institute for the BioCentury, KAIST, Daejeon 34141, Korea

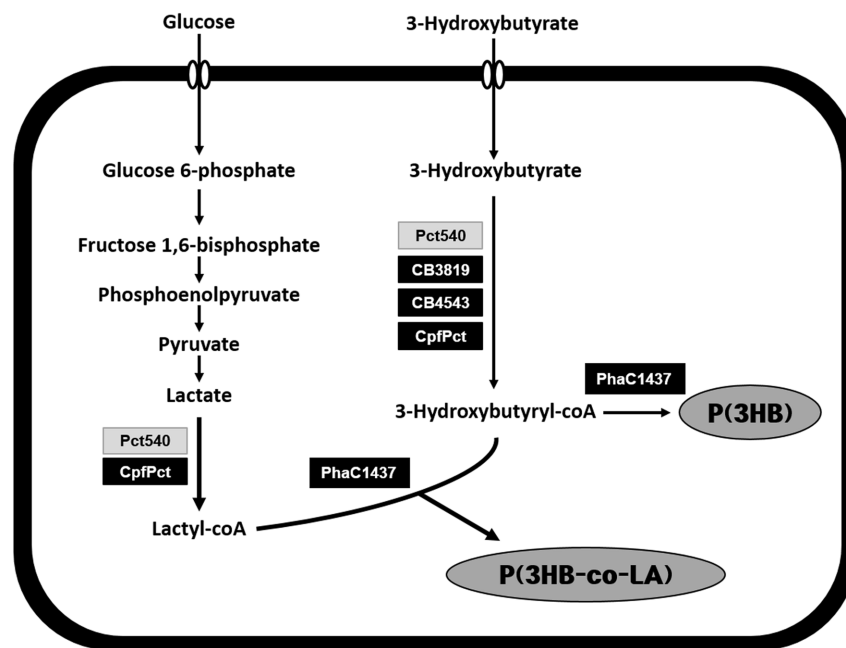
## 1. INTRODUCTION

석유자원의 무분별한 사용으로 인한 환경오염문제 및 고갈 현상으로 인해, 다양한 화학물질, 연료, 고분자물질들을 생

산함에 있어 더 이상 석유화학산업에만 의존할 수 없게 되었다. 따라서 미생물의 발효공정을 이용한 바이오 화학 공정을 통해 석유화학산업을 보완 혹은 대체하고자, 최근 바이오 화학 공정에 대한 많은 연구가 진행되고 있다 [1]. 바이오 화학 공정을 통해 생산되는 대표적인 바이오폴리머에는 폴리하이드록시알칸산 (polyhydroxyalkanoates, PHA), 폴리락틱산 (polylactic acid, PLA), 폴리부틸렌숙신산 (polybutylene succinate, PBS) 등이 있다. PHA는 PHA 생산능력을 지닌 미생물이 탄소원은 과도하게 있으나 생장에 적합하지 않은 성장 환경에 놓여있을 때, 미생물 내부에 에너지 및 환원력을 비축하기 위해 저장하는 물질이다 [2]. PHA는 고분자의 모노머는 미생물의 발효공정으로 생산하고, 고분자 합성은 발효공정을 통해 생산한 고분자 모노머의 화학공정을 통해 생산하는 PLA와 PBS와는 달리, 모노머의 합성부터 고분자 합성까지 미생물의 대사회로에 의해 미생물 체내에서 이루어지는 천연폴리에스터이다. 기존의 폴리에스터는 자연계에서 분해되지 않아 환경문제를 일으키지만, PHA는 미생물에 의해 완전히 생분해되어 친환경적이다. PHA의 모노머는 다양한 하이드록시카르복실산이며,  $\beta$ 탄소에 연결된 펜던트기에 메틸부터 트리데실까지 다양한 알킬기가 위치할 수 있어서, 150종 이상의 하이드록시카르복실산이 PHA의 모노머로서 규명되어있다 [3]. PHA 중 가장 많이 연구되고 있는 모노머는 3-하이드록시부티레이트 (3-hydroxybutyrate, 3HB), 3-하이드록시헥사노에이트 (3-hydroxyhexanoate, 3HHx), 3-하이드록시옥타노에이트 (3-hydroxyoctanoate, 3HO), 3-하이드록시데카노에이트 (3-hydroxydecanoate, 3HD), 3-하이드록시

도데카노에이트 (3-hydroxydodecanoate, 3HDD)가 있으며, 그 중 3HB의 호모폴리머인 폴리-3-하이드록시부티레이트 [P(3HB)]는 PHA 폴리머중에서도 가장 일반적이며, 광범위하게 연구되어있어 상업적으로 관심을 유발하고 있다. [2, 3]. PLA 또한 생분해성이며 퇴비화가 가능하며 인간에게 독성이 적다는 장점을 지니고 있으나, 현재 PLA의 합성공정은 락타이드를 ROP (ring opening polymerization)를 통해 중합하기 때문에 간단하지 않다는 문제가 있다. 또한 PLA의 물성이 잘 부러지고 뻣뻣하다는 단점이 있다. 이를 보완하기 위하여 락테이트와 같은 2-하이드록시카르복실산을 모노머로 포함하는 PHA를 생산하는 연구가 활발히 수행되어, PLA와 PLA공중합체를 PHA와 같이 미생물 내에서 합성하는 것이 가능해졌다 [4-11]. 또한 위와 같은 모노머의 조합을 통해 다양한 물성을 갖는 PLA 공중합체의 합성이 가능해졌다 [4-11]. 본 그룹의 이전 연구에서, lactyl-CoA를 기질로 사용할 수 있는 아미노산 변이가 가해진 *Pseudomonas* sp. 6-19 PHA synthase 변이체와 아미노산변이 및 침묵염기변이 (silent nucleotide mutation)가 가해진 *Clostridium propionicum* propionyl-CoA transferase 변이체를 사용하여 PLA 및 PLA 공중합체 생산 미생물 시스템을 개발해왔다 [4-11].

본 연구에서는 대장균을 비롯한 여러 미생물에서 lactate 및 hydroxycarboxylic acid를 모노머로 함유한 PHA를 보다 효율적으로 합성하기 위해 lactyl-CoA를 합성할 수 있는 새로운 코엔자임에이 트랜스퍼레이즈를 탐색하였다. *Pseudomonas* sp. 6-19 PHA synthase 변이체와 새롭게 탐색한 코엔자임에이 트랜스퍼레이즈로 *E. coli* XL1-Blue를 형질 전환하여 재



**Fig. 1.** Metabolic pathways for P(3HB-co-LA) biosynthesis in recombinant *E. coli* XL1-Blue expressing *C. propionicum* propionyl-CoA transferase and newly screened propionyl-CoA transferase developed in this study. Lactyl-CoA and 3HB-CoA are utilized by PHA synthase for the polymerization to produce P(3HB-co-LA).

조합 대장균을 제작하였고 (Fig. 1), 제작된 재조합 대장균을 이용하여 P(3HB-co-LA) 합성대사회로를 구축하여, P(3HB-co-LA) 및 P(3HB)의 생산능을 확인하였다.

## 2. MATERIALS AND METHOD

### 2.1. 균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된 균주와 플라스미드를 Table 1에 정리하였다. 플라스미드 제작을 위하여 대장균 XL1-Blue를 호스트 균주로 이용하였다. 새로운 코엔자임 에이 트랜스퍼레이즈를 이용한 P(3HB-co-LA)의 생산실험을 위하여 대장균 XL1-Blue를 호스트 균주로 사용하였다. 플라스미드 p619C1437-pct540은 E130D, S325T, S477G, Q481K의 총 4개의 아미노산의 변이가 가해진 *Pseudomonas* sp. 6-19 PHA synthase 유전자 *phaC1437*과 V193A의 아미노산 변이와 T78C, T669C, A1125G, T1158C의 총 4개의 침묵염기변이 (silent nucleotide mutation)가 가해진 *Clostridium propionicum* propionyl-CoA transferase 유전자 *pct540*을 *Ralstonia eutropha* PHA biosynthesis operon promoter로 발현하는 벡터이다 [9].

### 2.2. 플라스미드제작

*Pseudomonas* sp. 6-19 PHA synthase 유전자 *phaC1437*과 새로운 코엔자임 에이 트랜스퍼레이즈 유전자를 발현하는 플라스미드를 제작하기 위해서 p619C1437-pct540을 *Sbf*I과 *Nde*I으로 절단하여 *pct540* 유전자를 제거한 후에 *C. beijerinckii* CB3819 유전자와 CB4543 유전자, *C. perfringens* *pct* 유전자, *Klebsiella pneumoniae* *pct* 유전자를 *Sbf*I과 *Nde*I으로 p619C1437-pct540에 삽입하여 *pct540* 유전자를 치환하였다. 각각의 벡터는 p619C1437-CB3819, p619C1437-CB4543, p619C1437-CpfPct, p619C1437-KpPct로 명명하였다.

### 2.3. 배양조건

클로닝작업을 위해서 대장균 XL1-Blue는 Luria-Bertani (LB) medium (리터당: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl 함유)에서 37°C로 배양하였다. PHA의 생산을 위하여 p619C1437-CB3819, p619C1437-CB4543, p619C1437-CpfPct, p619C1437-KpPct를 함유한 재조합 대장균 XL1-Blue 균주를 100 mL의 MR medium을 함유하고 있는 250 mL 플라스크에서 96시간 동안 배양하였다. 이때, 2 g/L의 sodium 3-hydroxybutyrate (3HB sodium salt, Acros organics, Geel, Belgium)를 3-hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA)의 기질로 제공하기 위해 MR medium에 첨가하였다. 탄소원으로는 20 g/L의 글루코스를 사용하였다. MR medium (pH 7.0)은 다음의 조성으로 구성된다. 6.67 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.8 g/L citric acid, 5 ml/L trace metal solution. 그리고 trace metal solution은 0.5 M HCl 용액에서 다음의 조성으로 구성된다. 10 g/L FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2 g/L CaCl<sub>2</sub>, 2.2 g/L ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 1 g/L CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.02 g/L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O. 글루코스, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, sodium 3-hydroxybutyrate는 개별적으로 멸균하였다. 플라스크 배양은 진탕배양기에서 250 rpm과 30°C에서 수행하였다. 결과는 세 번 반복하여 평균값을 구하였다. Ampicillin (Ap, 50 µg/mL)을 균주의 플라스미드의 안정성을 위하여 배지에 첨가하였다.

### 2.4. 분석조건

PHA의 농도와 PHA 모노머의 조성을 fused silica capillary column (Supelco SPB™-5, 30 m × 0.32 mm ID 0.25 mm film, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 gas chromatography (6890N GC System, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)로 benzoic acid methyl ester를 internal standard로 사용하여 분석하였다 [12]. 건조균체중량 (dry cell weight per liter of culture broth)은 기존에 보고된 방법으로 측정하였다 [13]. PHA con-

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or Plasmids	Relevant Characteristics	Reference or Source
Strains		
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB lac <sup>q</sup> ZM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )].	Stratagene <sup>a</sup>
Plasmids		
p619C1437-pct540	pBluescript KS II(+) derivative; <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis promoter, the <i>phaC1437</i> <sub>P<sub>6-19</sub></sub> gene, the <i>pct540</i> <sub>C<sub>p</sub></sub> gene; Ap <sup>r</sup>	9
p619C1437-CB3819	pBluescript KS II(+) derivative; <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis promoter, the <i>phaC1437</i> P <sub>6-19</sub> gene, the <i>CB3819</i> gene; Ap <sup>r</sup>	This study
p619C1437-CB4543	pBluescript KS II(+) derivative; <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis promoter, the <i>phaC1437</i> P <sub>6-19</sub> gene, the <i>CB4543</i> gene; Ap <sup>r</sup>	This study
p619C1437-CpfPct	pBluescript KS II(+) derivative; <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis promoter, the <i>phaC1437</i> P <sub>6-19</sub> gene, the <i>C. perfringens</i> <i>pct</i> gene; Ap <sup>r</sup>	This study
p619C1437-KpPct	pBluescript KS II(+) derivative; <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis promoter, the <i>phaC1437</i> P <sub>6-19</sub> gene, the <i>K. pneumoniae</i> <i>pct</i> gene; Ap <sup>r</sup>	This study

<sup>a</sup>Stratagene Cloning System, La Jolla, CA, USA.

tent (wt%)는 건조균체중량과 PHA 농도의 비율로 정의된다.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. 새로운 코엔자임 에이 트랜스퍼레이즈의 탐색 및 플라스미드 제작

최근, 본 연구그룹은 *C. propionicum* 유래 propionyl-CoA transferase를 이용해서 lactate를 모노머로 함유한 PHA에 대한 합성을 연구해왔다. 대장균을 비롯한 여러 미생물에서 lactate 및 다른 hydroxycarboxylic acid를 모노머로 함유한 PHA를 합성하기 위해서는 lactate 및 hydroxycarboxylic acid를 lactyl-CoA 및 hydroxyacyl-CoA로 전환하는 CoA transferase가 필수적으로 이용된다. 특히 lactyl-CoA의 경우에는 기존의 CoA synthetase를 이용해서는 합성할 수 없기 때문에 acetyl-CoA를 CoA donor로 이용하여 lactate를 lactyl-CoA로 합성할 수 있는 CoA transferase의 적용이 필수적이다. 따라서 효율적으로 lactate를 비롯한 2-hydroxyacid를 모노머로 함유하는 PHA를 합성하기 위해서는 lactyl-CoA 및 2-hydroxyacyl-CoA를 생산하는 활성이 높은 CoA transferase를 이용해야 한다. 이와 같은 이유로 본 연구에서는 기존에 사용했던 *C. propionicum* 유래 propionyl-CoA transferase이외에 lactate를 모노머로 함유한 PHA합성에 이용할 수 있는 다른 유래의 CoA transferase를 탐색하고자 하였다. BLAST 탐색을 통해 정보를 얻은 *C. propionicum* 유래 propionyl-CoA transferase

와 유사성이 높은 *C. perfringens* *pct* 유전자를 비롯해 *C. beijerinckii*에서 CoA transferase로 annotation된 두 유전자 CB3819, CB4543와 *K. pneumoniae*에서 CoA transferase로 annotation된 *pct* 유전자를 lactate를 모노머로 함유한 PHA생산에 적용하여 실험하였다. 탐색된 CoA transferase의 클로닝을 위하여 해당 미생물의 크로모솜으로부터 CoA transferase 유전자를 PCR 증폭을 통하여 얻었다. *C. beijerinckii*의 CB3819 유전자를 증폭하기 위하여 5'-**cctgcagggtccctcccgtttccattgaaaggactacacaatgaagtaaaaggaatctctat**와 5'-**catatg ctatttaacatatttcaccc**의 프라이머를 사용하였으며 *C. beijerinckii*의 CB4543 유전자를 증폭하기 위하여 5'-**cctgcagggtccctcccgtttccattgaaaggactacaca atgagaaaagtaaaagtttaaac**와 5'-**catatg ttactccctaatccatcaac**의 프라이머를 사용하였다. *K. pneumoniae*에서 *pct* 유전자의 증폭을 위하여 5'-**cctgcagggtccctcccgtttccattgaaaggactacaca atgagcagcaaatattatcgacg**와 5'-**catatg ttatgagtcagaggatgaaattc**를 사용하였다. *C. perfringens* *pct* 유전자의 증폭을 위하여 5'-**cctgcagggtccctcccgtttccattgaaaggactacaca atggttaagagttagttttt**와 5'-**catatg ttatttaagtcccataagct**를 사용하였다. 증폭된 유전자를 각각 *SbfI*과 *NdeI*으로 절단한 후 *SbfI*과 *NdeI*으로 절단한 p619C1437-*pct*540에 *pct*540을 제거하면서 삽입하여 각 유전자를 발현하는 플라스미드를 제작하였다 (Fig. 2)

#### 3.2. 새로운 코엔자임 에이 트랜스퍼레이즈를 이용한 P(3HB-co-LA) 합성

각각의 CoA transferase를 이용한 P(3HB-co-LA) 합성대사회

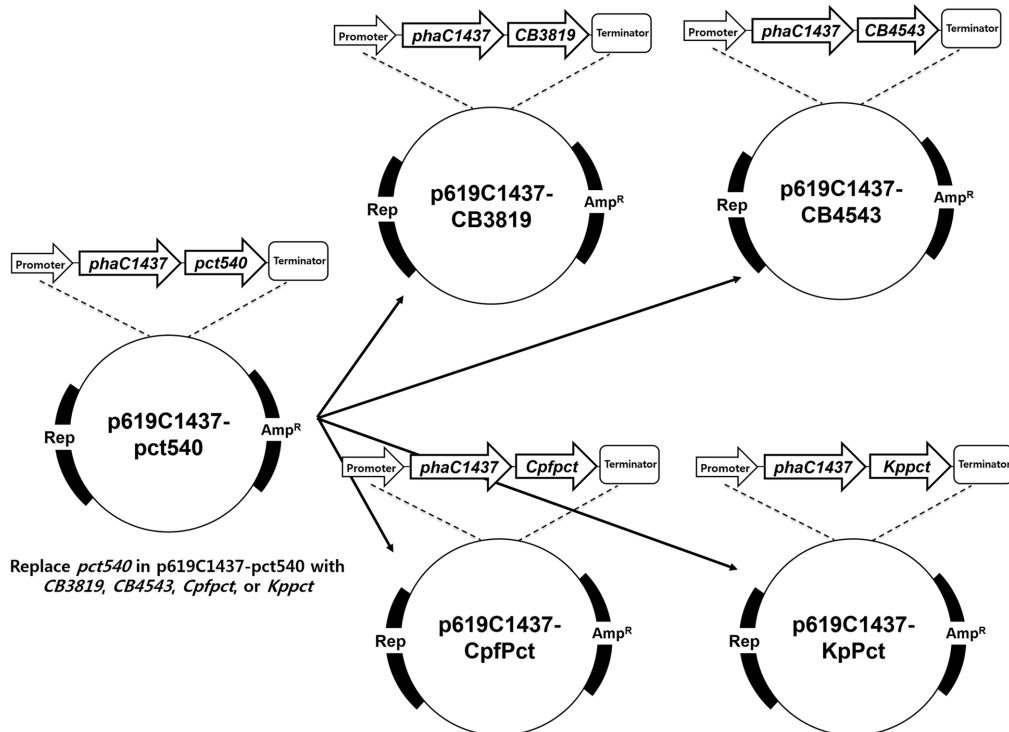


Fig. 2. Construction of plasmids expressing newly screened propionyl-CoA transferase.

로 구축을 확인하기 위하여, p619C1437-CB3819, p619C1437-CB4543, p619C1437-CpfPct, p619C1437-KpPct로 *E. coli* XL1-Blue를 각각 형질전환하여 재조합 대장균을 제작하였다. 제작된 재조합 대장균 XL1-Blue (p619C1437-CB3819), 재조합 대장균 XL1-Blue (p619C1437-CB4543), 재조합 대장균 XL1-Blue (p619C1437-CpfPct), 재조합 대장균 XL1-Blue (p619C1437-KpPct)를 2 g/L의 sodium 3-hydroxybutyrate 가 함유된 MR medium에서 20 g/L의 글루코스를 탄소원으로 이용하여 30°C에서 96시간 동안 배양하였다 (Table 2). 이러한 배양조건에서 PHA synthase의 기질인 3HB-CoA는 배양액에 첨가된 3HB가 propionyl-CoA transferase에 의해 3HB-CoA로 전환되어 생성되며, 또 다른 기질인 lactyl-CoA는 자연적인 lactate 합성회로를 이용하여 글루코스로부터 생산된 lactate가 propionyl-CoA transferase에 의해 lactyl-CoA로 전환되어 생성된다. 재조합 대장균 XL1-Blue (p619C1437-CpfPct)는 이러한 배양조건에서 P(3HB-co-LA)를 합성하였으며, 고분자 내의 lactate 모노머 비율은 13.6 mol%였다. 또한 고분자의 축적률 (PHA content)은 10.6 wt%였다 (Table 2). 하지만 재조합 대장균 XL1-Blue (p619C1437-CB3819)과 재조합 대장균 XL1-Blue (p619C1437-CB4543)은 같은 배양조건에서 P(3HB-co-LA)를 합성하지 못하고 P(3HB)를 합성하였으며, 각각의 P(3HB)의 축적률은 60.5 wt%와 51.2 wt%였다. 또한, 재조합 대장균 XL1-Blue (p619C1437-KpPct)은 같은 배양조건에서 고분자를 전혀 합성하지 못하였다. *C. perfringens* 유래 CoA transferase를 사용하였을 때 획득한 고분자의 축적률 10.6 wt%는 개량된 *C. propionicum* 유래 propionyl-CoA transferase (Pct540)보다는 낮은 수치이지만, 야생형 *C. propionicum* 유래 propionyl-CoA transferase (Pct)와는 비슷한 수치이기 때문에 [9], 향후 위의 결과를 토대로 *C. perfringens* 유래 CoA transferase를 개량한다면 효율적으로 lactate가 함유된 PHA를 합성하는데 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 *C. beijerinckii* CB3819 유전자와 CB4543 유전자는 lactate가 포함되지 않은 PHA를 합성하는데 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

#### 4. CONCLUSION

본 연구진은 lactate를 모노머로 함유한 PHA를 합성하기 위한 대사경로 제작을 위하여 새로운 코엔자임 에이 트랜스퍼레이즈를 탐색하였으며, P(3HB-co-LA) 및 P(3HB)를 합성하

는 재조합 대장균 시스템을 개발하였다. 본 연구진이 개발한 새로운 코엔자임 에이 트랜스퍼레이즈를 이용한다면 다양한 모노머 조성을 지닌 lactate가 함유된 고분자를 생산할 수 있어, 다양한 물성을 지닌 lactate 모노머 함유 고분자를 합성할 수 있을 것으로 기대된다.

#### Acknowledgements

본 연구는 한국연구재단을 통한 미래창조과학부 기후변화 대응 바이오파이너리를 위한 시스템대사공학 원천기술개발 사업 (NRF-2015M1A2A2035810)과 교육부 일반연구자 사업 연구비 (NRF-2013R1A1A2058379)의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

#### REFERENCES

- Oh, Y. H., I. Y. Eom, J. C. Joo, J. H. Yu, B. K. Song, S. H. Lee, S. H. Hong, and S. J. Park (2015) Recent advances in development of biomass pretreatment technologies used in biorefinery for the production of bio-based fuels, chemicals and polymers. *Korean J. Chem. Eng.* 32: 1945-1959.
- Lee, S. Y. (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 1-14.
- Steinbüchel, A. and H. E. Valentin (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 219-228.
- Jung, Y. K., T. Y. Kim, S. J. Park, and S. Y. Lee (2010) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers. *Biotechnol. Bioeng.* 105: 161-171.
- Park, S. J., S. Y. Lee, T. W. Kim, Y. K. Jung, and T. H. Yang (2012) Biosynthesis of lactate containing polyesters by metabolically engineered bacteria. *Biotechnol. J.* 7:199-212.
- Park, S. J., T. W. Lee, S. C. Lim, T. W. Kim, H. Lee, M. K. Kim, S. H. Lee, B. K. Song, and S. Y. Lee (2012) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates containing 2-hydroxybutyrate from unrelated carbon source by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 93:273-283.
- Park, S. J., Y. A. Jang, H. Lee, A. R. Park, J. E. Yang, J. Shin, Y. H. Oh, B. K. Song, J. Jegal, S. H. Lee, and S. Y. Lee (2013) Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the biosynthesis of 2-hydroxyacid containing polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Metab. Eng.* 20: 20-28.
- Park, S. J., K. H. Kang, H. Lee, A. R. Park, J. E. Yang, Y. H. Oh,

**Table 2.** Biosynthesis of P(3HB) and P(3HB-co-LA) by flask cultures of recombinant *E. coli* XL1-Blue

Plasmids	Polymer	LA fraction (mol%)	Polymer content (wt%)
p619C1437-pct540 <sup>a</sup>	P(3HB-co-LA)	49.0	53.5
p619C1437-CB3819	P(3HB)	0	60.5±0.5
p619C1437-CB4543	P(3HB)	0	51.2±0.7
p619C1437-CpfPct	P(3HB-co-LA)	13.6±0.01	10.6±0.7
p619C1437-KpPct		0	0

<sup>a</sup>Data from Yang et al. (2010) [9].

- B. K. Song, J. Jegal, S. H. Lee, and S. Y. Lee (2013) Propionyl-CoA dependent biosynthesis of 2-hydroxybutyrate containing polyhydroxyalkanoates in metabolically engineered *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 165: 93-98.
9. Yang, T. H., T. W. Kim, H. O. Kang, S. H. Lee, E. J. Lee, S. C. Lim, S. O. Oh, A. J. Song, S. J. Park, and S. Y. Lee (2010) Biosynthesis of polylactic acid and its copolymers using evolved propionate CoA transferase and PHA synthase. *Biotechnol. Bioeng.* 105: 150-160.
10. Yang, T. H., Y. K. Jung, H. O. Kang, T. W. Kim, S. J. Park, and S. Y. Lee (2011) Tailor-made type II *Pseudomonas* PHA synthases and their use for the biosynthesis of polylactic acid and its copolymer in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90: 603-614.
11. Yang, J. E., S. Y. Choi, J. H. Shin, S. J. Park, and S. Y. Lee (2013) Microbial production of lactate-containing polyesters. *Microb. Biotechnol.* 6: 621-636.
12. Braunegg, G., B. Sonnleitner, and R. M. Lafferty (1978) A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-b-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6: 29-37.
13. Choi, J., S. Y. Lee, K. Shin, W. G. Lee, S. J. Park, H. N. Chang, and Y. K. Chang (2002) Pilot scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7: 371-374.