

제조합 대장균에서의 Polyhydroxybutyrate (PHB)의 분자량 조절

†심 상 준 · ¹안토니 신스키

한국과학기술연구원 청정기술연구센터, ¹메사추세츠 공과대학 생물학과
(접수 : 1997. 10. 9., 게재승인 : 1997. 10. 28.)

Molecular weight Control of Polyhydroxybutyrate (PHB) in Recombinant *Escherichia coli*

Sang Jun Sim[†] and Anthony J. Sinskey¹

Clean Technology Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

¹Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, MA 02139, USA

(Received : 1997. 10. 9., Accepted : 1997. 10. 28.)

Two promoters (*trc* and *Pp*) were inserted in PHA operon derived from *Alcaligenes eutrophus* to obtain high chain molecules of polyhydroxybutyrate (PHB) in recombinant *Escherichia coli*. Newly designed PHA operon was used to control the gene expressions of hydroxybutyric CoA and PHA polymerization, separately. Plasmids containing new synthetic operon was transformed into *E. coli* DH5 α and analyzed for PHB production. Without induction of the PHA biosynthetic operon, PHA synthase which has low activity might supply low concentration of initiator during the polymerization reaction, resulting very high molecular weight of polymer. An increase of PHB average molecular weight was observed with decreased IPTG (isopropyl β -Dithiogalactosidase) concentration. When no IPTG was added to the culture of *E. coli* DH5 α /pSJS1 which contained two promoters in PHA operon, high chain polymer having an average molecular weight of 2.5×10^7 was achieved. Analysis of the enzyme activities of PHA biosynthetic enzymes suggests that PHA synthase, the enzyme responsible for polymerizing 3-hydroxybutyric CoA, controls the molecular weight of PHB produced *in vivo*.

Key Words : polyhydroxybutyrate, molecular weight, PHA synthase

서 론

Polyhydroxybutyrate (PHB)는 합성플라스틱의 환경친화적인 대체물로서 가능성을 지니고 있으나 아직 생산단가가 합성플라스틱에 비해 비싸 범용플라스틱으로 이용되는 데에는 많은 애로가 있다(1). 이의 극복을 위해 폐자원의 이용이나 전이식물을 이용한 PHB 합성연구가 활발히 진행되고 있다(2, 3). 그러나 PHB의 이용에 또 하나의 문제점으로 지적되고 있는 것은 물성의 범위가 작아 이용에 한계가 있다는 것이다. 미국의 Monsanto (구 영국의 Zeneca)에서 생산되고 있는 BIOPOL (PHB-HV 공중합체)의 등급은 크게 6가지로 구분되는데 HV의 함량과 가소제의 첨가에 의한 구분이 그것이다. 특히 전이식물의 경우 지방산의 이용이 어려워 공중합체 형성이 어렵기 때문에 물성의 제어에 있어 분자량과 분자량 분포의 제어는 PHB의 상업화에 필

수적이라 하겠다(4). 생물고분자의 물성에 있어 가장 중요한 두 요소인 분자량과 분자량 분포의 제어는 최근 들어 대사공학적인 효소 제어에 의해 가능하게 되었다(5). 제조합 대장균을 이용하여 thiolase와 reductase에 의해 합성된 hydroxybutyryl-CoA 단량체의 중합을 촉매하는 효소인 PHA synthase의 발현을 유전적으로 제어함으로써 *Alcaligenes eutrophus*가 생산하는 2백만 Da에 달하는 고분자의 분자량을 70만 Da까지 낮출 수 있음을 보여주었다. PHB의 생성 기작은 지금까지 알려진 바에 따르면 thiolase, reductase 및 PHA synthase라는 효소를 코딩하는 유전자에 의해 이루어진다(Figure 1).

특히 제조합 대장균은 이와 같은 PHB 생합성을 조절하는 대사공학 연구에 적합한 숙주세포이다. 최근의 연구에서 대장균의 플라즈마막에서 PHB가 비입자 형태로 발견되어 대장균이 PHB의 생산에 유용하게 이용될 수 있는 숙주 중의 하나임이 밝혀졌다(6-8).

본 연구는 PHA synthase의 제어에 의해 PHB의 거대 고분자(giant polymer)를 생합성하는데 그 목적이 있다. 그것을 위해 PHA synthase의 활성을 낮게 유지시켜 고분자중합의 개시 반응 빈도수를 줄여 거대고분자를 생성시키고자 하였다. 이를 위해 앞의 연구(5)에서 이용되었던 PHA synthase의 발현을 향

† Corresponding Author : Clean Technology Research Center,
Korea Institute of Science and Engineering, P.O. Box 131,
Cheongryang, Seoul 136-791, Korea
Tel : +82-2-958-5264, Fax : +82-2-958-5269
E-mail : simsj@kistmail.kist.re.kr

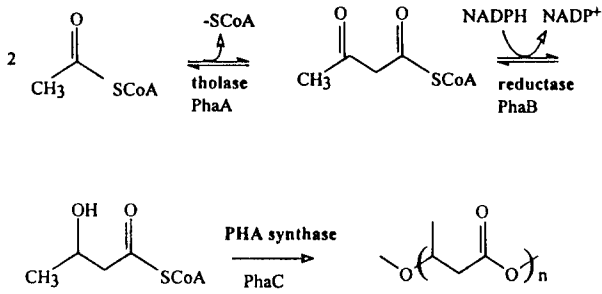


Figure 1. The biosynthetic pathway for polyhydroxyalkanoates (PHA) in *Alcaligenes eutrophus*

상시키기 위해 새로 설계된 pSP2 plasmid에 thiolase를 코딩하는 phaA 유전자 앞에 pBR322에서 유래된 프로모터를 삽입시켜 단량체의 생합성을 유지하고 PHA synthase의 활성을 억제하는 전략을 세웠다.

재료 및 방법

시약

유전자 조작에 이용된 제한효소는 GIBCO BRL에서 구입하였으며 IPTG (isopropyl β -Dithiogalactosidase)는 Boehringer Mannheim에서 구입하였다. 효소활성의 측정을 위해 Acetyl-CoA와 Acetoacetyl-CoA는 Sigma에서 구입하였다. Hydroxybutyryl-CoA는 앞의 실험방법에 따라 합성되었다(9). 단백질 분석 용액은 Bio-Rad에서 구입하였다.

균주 및 Plasmid

PHB의 생성을 위해 plasmid pSJS1과 pSJS2는 DH5 α 에 transformation 되었다. Plasmid pSP2는 pKAS4(10), pTRCN(11), pAeT10(12)으로 부터 설계되었다(5). Plasmid pSJS1은 pSP2를 *Xba*I과 *Bam*HI 절단을 하여 phaC와 phaA 사이에 pPp2에서 얻은 0.17 kb의 Pp 프로모터를 T4 ligase로 연결하여 만들어진 8.37 kb의 plasmid이다. Pp 프로모터에 의한 phaA와 phaB의 발현을 확인하기 위해 pKK223-3 벡터를 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단하여 얻은 4.3 kb와 pSJS1으로 부터 역시 같은 제한효소로 절단된 Pp, phaA, 및 phaB 절편을 프로모터가 없는 pKK223-3에 클로닝하여 pSJS2를 얻어 이를 효소활성측정에 이용하였다.

발효

모든 균주는 포도당 20 g/L, 트립톤 10 g/L, 효모추출물 5 g/L, 염화나트륨 10 g/L의 LB 배지에 50 mg/L의 암피실린과 함께 배양되었다. IPTG를 이용하는 경우, IPTG (0.4 mM)는 배양물의 흡광도가 파장 600 nm에서 0.6에 달할 때 첨가하였다. IPTG의 농도 변화에 따른 분자량의 변화 측정실험을 위해 2.5 L CMF-100 (CHEMAP, 스위스) 시스템을 사용하였고 평균분자량과 효소활성의 변화를 살펴보기 위해 15 L MCS-10 (MBR Bioreactor AG, 스위스)를 이용하였다.

PHB 분리

배양액을 원심분리시켜 (10,000 g) 침전물을 증류수로 세척하

였다. 미생물을 다시 원심분리시키고 클로로포름으로 5시간 동안 재순환 가열하여 이를 소결유리여과를 통해 여과시켜 여과액을 동부피의 핵산을 첨가하여 PHB를 침전시켜 12시간 동안 정지시킨 다음 다시 소결유리 여과를 통해 PHB를 얻는다.

효소 및 화학 분석

Synthase, thiolase 및 reductase의 활성 분석은 전 실험(5)과 동일하다. 발효조로 부터 일정한 간격으로 시료를 채취하여 원심분리한 후 상등액은 버리고 침전물을 -70°C 의 저온에 보관한다. 효소분석을 위해 이를 녹이고 M9 배지에 담가 세가지 효소의 분리를 위해 삼등분하였다. M9 배지는 리터당 6 g의 Na_2HPO_4 , 3 g의 KH_2PO_4 , 0.5 g의 NaCl, 그리고 1 g의 NH_4Cl 등을 포함한다. M9 배지의 세포는 다시 원심분리를 하고 각 효소의 용출액에 담가 초음파(Ultrasonic Processor xL, Farmingdale, NY, USA) 분해를 실시하였다. 이를 다시 48,000 g로 4°C 에서 원심분리하여 수용성단백질 부분을 분리하고 synthase의 경우 수용성부분과 최종 원심분리 이전의 혼합액부분을 같이 활성측정에 이용하였다.

PHA synthase의 활성은 전 실험(11)과 마찬가지로 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)를 이용하여 coenzyme A의 방출을 모니터링하여 분석하였다. 앞에서 언급한 바와 같이 수용성단백질 부분과 수용성 및 불용성 부분의 혼합물을 각각 분석에 이용하여 세포내의 PHB 그라놀에 편재된 활성 synthase의 활성을 간접적으로 측정하였다. 초음파 분해 전에 PHA synthase 시료는 5%의 글리세롤을 포함하는 50 mM의 KH_2PO_4 (pH 7.0) 용액에 용해시켰다.

Acetoacetyl CoA reductase는 NADPH의 산화를 모니터링하여 분석되었다(13). 초음파 분해 전에 reductase 시료는 10 mM의 Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol, 20% glycerol, 그리고 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 용액에 용해시켰다.

β -Ketothiolase 활성은 NAD^+ 의 형성속도를 측정하여 분석하였다 (14). 초음파 분해 전에 thiolase 시료는 10 mM의 Tris-Cl (pH 7.3), 5 mM β -mercaptoethanol 용액에 용해시켰다. 효소활성의 측정은 발효 초기 6시간 동안은 분석을 위한 충분한 세포 농도를 얻을 수 없으므로 그 이후에 시료를 채취하였다.

단백질의 분석은 Bradford dye-binding 방법을 이용하여 측정하였다(15).

포도당의 농도는 HPLC 시스템(1050 Hewlett Packard HPLC System)과 Bio-Rad HPX-87 칼럼을 이용하였다. PHB 농도는 Karr 등이 개발한 HPLC 분석을 이용하였다(16).

PHB 분자량 측정

발효액으로 부터 얻어진 PHB의 분자량은 전 실험과 동일한 방법을 이용하였다(5). Light Scattering 분석은 Wyatt Technology 사(미국)의 Dawn-F-multi-angle laser photometers와 Shodex K-807LC GPC칼럼을 직렬 연결하여 사용하였고 Waters사(미국)의 501 모델 펌프와 410 differential refractometer를 이용하였다. 칼럼은 이용 전에 2,2,2-trifluoroethanol로 평형시켰으며 시료는 35°C 에서 이 용매에 용해시켜 주입하였다. 실험은 세 번 이상의 반복 실험을 통한 평균값을 최종 분자량 및 PDI 값으로 취하였다

결과 및 토론

Pp 프로모터하에서의 *phaA*와 *phaB* 유전자 발현

Pp 프로모터에 의한 *phaA*와 *phaB* 유전자 발현을 확인하기 위해 *Pp*, *phaA*, *phaB*를 포함하는 fragment를 프로모터가 없는 벡터 pKK223-3에 클로닝하여 pSJS2를 얻었다. *E. coli* DH5 α /pSJS2를 12시간 동안 플라스크배양하여 thiolase와 reductase의 활성을 조사하였다. 조사결과 thiolase의 활성은 0.337 unit/mg protein이었고 reductase의 활성은 2.62×10^{-3} unit/mg protein을 나타내었다. 이 실험을 통해 *Pp* 프로모터에 의해 *phaA*와 *phaB* 유전자가 제대로 발현됨을 확인할 수 있었다.

2 L 발효기에서의 IPTG 농도에 따른 PHB 평균분자량의 변화

E. coli DH5 α /pSJS1의 IPTG 농도에 따른 분자량 변화를 살펴보기 위해 0에서 0.4 mM의 IPTG를 배양액의 흡광도 (600 nm)가 0.6에 다다를 때 첨가하여 흡광도의 변화가 없을 때까지 (접종 후 24시간에서 30시간) 발효실험을 2.5 L CMF-100 (CHEMAP, 스위스) 발효기에서 수행하였다. 0에서 0.4 mM 구간에서의 IPTG에 의한 합성오페론의 유도정도는 IPTG의 농도가 커질수록 총 PHB 수율이 증가하는 것으로 나타났다 (Figure 2). 배양액에 IPTG를 첨가하지 않은 경우 PHB 생산이 심각하게 저해됨을 알 수 있었다. PHA synthase 활성의 감소가 PHB의 생산을 저해하는 현상을 확인할 수 있었다. 그러나 PHB 단량체의 존재는 확인하지 않았기 때문에 정확한 대사의 이해를 위해 추가실험이 수행되어야 할 것이다. IPTG의 농도가 0, 0.1, 0.4 mM씩 각각 첨가되었을 때 최종적으로 생성된 PHB의 평균분자량은 각각 5.8×10^6 , 4.33×10^6 , 7.31×10^5 을 나타내어 IPTG 농도 증가에 따른 PHB 평균분자량의 감소를 나타내었다. 이와 같은 경향은 이전의 실험(5)과 일치한다. 세가지 경우의 polydispersity index (PDI) 값의 변화를 살펴보면 높은 IPTG의 농도가 첨가된 경우 높은 PDI를 나타내는 것으로 보아 평균분자량의 감소가 짧은 연결수의 고분자의 출현에 의한 변화임을 간접적으로 시사한다. 또한 이전의 실험을 통하여 이는 PHA synthase의 활성도가 증가할수록 PDI가 커진다는 결과와도 일치한다. 낮은 농도의 IPTG 유도로 인하여 PHA 오페론의 전사

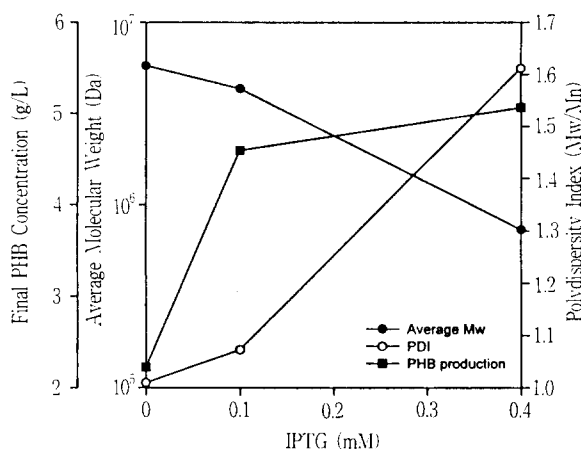


Figure 2. Effects of IPTG concentration on average molecular weight, polydispersity index and productivity of PHB in 2 L fermentations of *E. coli* DH5 α /pSJS1

속도를 줄여 결과적으로 PHA synthase의 활성을 낮추게 되고 이 효소가 관여할 것으로 추측되는 고분자 중합의 초기반응을 억제하여 소수 분자의 중합만을 수행케 함으로써 생성된 PHB의 평균분자량을 올림과 동시에 낮은 분자량분포를 보이게 된다. 따라서 본 실험을 통해 PHA synthase의 활성을 낮추면 거대 고분자의 생성이 가능함을 역설적으로 보여준다.

10리터 반응기에서의 IPTG 농도변화에 따른 PHB 평균분자량의 변화

IPTG에 의한 PHB 오페론의 발현에 의해 생성된 PHB의 평균분자량의 시간에 따른 변화와 분자량분포를 살펴보기 위해 10리터 발효조에서 20 g/L의 포도당이 포함된 LB배지를 이용하여 *E. coli* DH5 α /pSJS1을 배양하였다.

IPTG를 첨가하지 않고 DH5 α /pSJS1을 배양한 결과 대부분의 포도당은 배양시작 후 28시간만에 소비되었다 (Figure 3). 미생물 건조중량과 PHB 함유량은 각각 7.82, 2.99 g/L를 보였다. PHB 분자량은 발효 개시 후 6.15 시간만에 처음으로 분석하였으며 초기 평균분자량은 2.8×10^7 에 달하였으나 곧 6.9×10^6 까지 줄어들었다가 다시 계속 증가하여 배양 개시 후 36시간 후에 2.46×10^7 까지 상승함을 확인할 수 있었다. 이는 DH5 α /pAet41 발효(5)에서 얻은 4.0×10^6 에 비해 6배가 큰 수치이다. 그러나 최종 Polydispersity index (PDI)는 1.13으로 pAet41의 발효와 마찬가지로 발효 전반에 걸쳐 매우 낮은 수치를 보였다. 그러나 평균분자량이 발효 초기에 매우 급격하게 줄었음에도 PDI가 오히려 줄어드는 것은 평균분자량의 변화가 심한 발효 후 6.16 시간에서 9.75 시간 사이의 PHB 생성도 급격하게 증가한 것은 고분자 전구체의 생성속도와 고분자 중합반응 간의 관계를 추후 상대적으로 살펴보아야 할 것으로 사료된다.

0.4 mM의 IPTG를 첨가한 발효에서는 PHB의 생산성에는 큰 변화가 없으나 최종적으로 얻어진 PHB의 분자량은 크게 낮은 수준임을 알 수 있다(Figure 4). 최종 미생물 건조중량과 PHB 함유량은 각각 8.88, 2.513 g/L를 보였다. PHB 분자량은 발효 개시 후 8 시간만에 처음으로 분석되었으며 IPTG의 유도가 없는 경우에 비해 평균분자량의 변화가 거의 없었으며 최종 평균분자량은 9.6×10^5 이었다. 최종 PDI는 1.27로 IPTG의 유도가

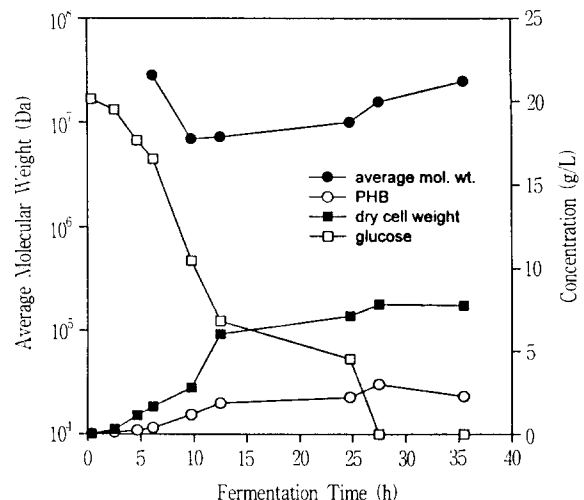


Figure 3. 10 L Fermentation parameter profiles for strain DH5 α /pSJS1 without IPTG

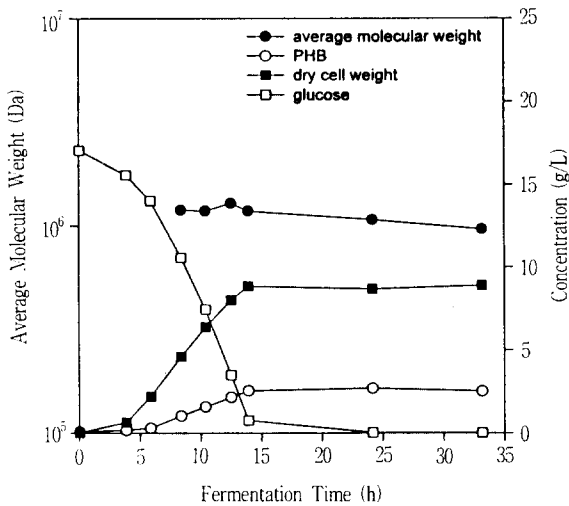


Figure 4. 10 L Fermentation parameter profiles for strain DH5 α /pSJS1 with 0.4 mM IPTG

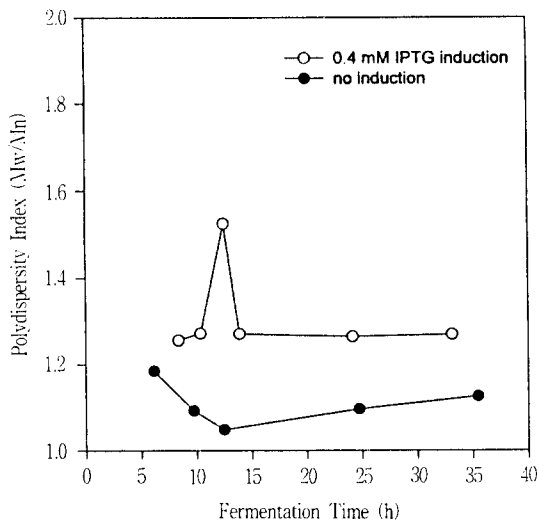
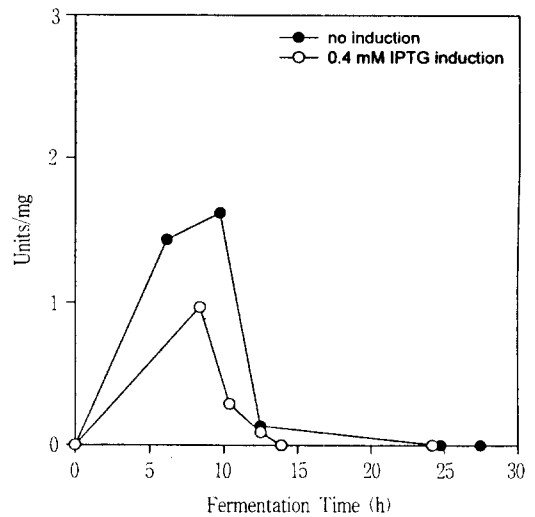


Figure 5. Time courses of polydispersity during the fermentations of *E. coli* DH5 α /pSJS1

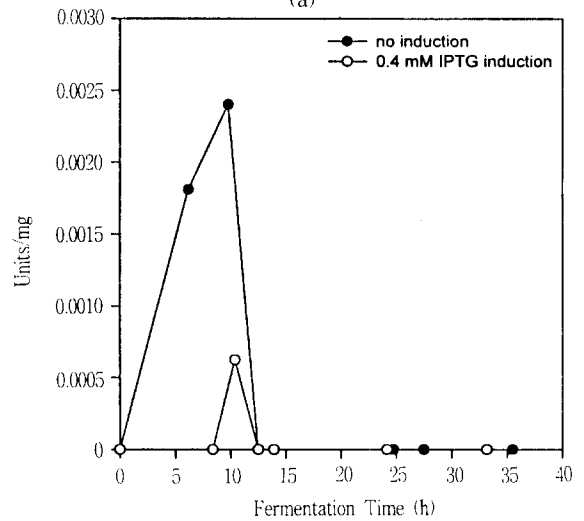
없는 경우에 비해 다소 높음을 알 수 있고 이는 발효중의 PHA synthase활성의 변화가 있었음을 암시한다(Figure 5).

IPTG 농도변화에 따른 PHB 합성유전자의 발현조절과 PHB 분자량의 변화

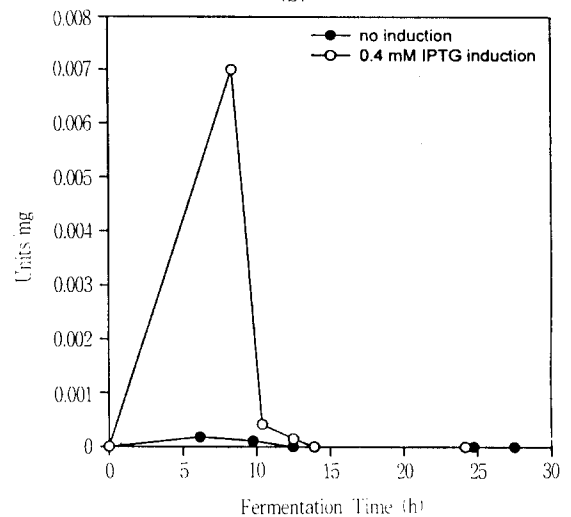
앞의 두 실험에서 얻어진 시료를 이용하여 PHB 합성에 관여하는 효소인 thiolase, reductase, PHA synthase의 활성 변화를 살펴보았다. IPTG를 첨가하지 않은 경우, thiolase의 활성은 발효 개시 후 9.8시간만에 최대치인 1.62 units/mg protein을 보였다(Figure 6 (a)). 반면에 0.4 mM의 IPTG 유도인 경우 이보다 낮은 0.97 units/mg protein의 최대 활성도를 보여 *trc* 프로모터에 의한 *phaA* 유전자의 발현 저해를 간접적으로 추정할 수 있다. 다시말해 *trc* 프로모터와 *Pp* 프로모터의 이중 작용에 의해 *phaA* 유전자의 발현 저해를 초래하였을 것으로 사료된다. Reductase의 활성은 IPTG의 첨가가 없는 경우에 6시간에서 10시간 사이에 최고 0.33 units/mg protein까지 나타내었고 (Figure 6 (b)) 이 활성도는 전 실험(5)에서 얻어진 대부분의 reductase



(a)



(b)



(c)

Figure 6. (a) Thiolase specific activity in soluble lysate fractions of strains DH5 α /pSJS1. (b) Reductase specific activity in soluble lysate fractions of strains DH5 α /pSJS1. (c) Specific activity of synthase in combined soluble and insoluble lysate fractions of strains DH5 α /pSJS1.

활성보다 높은 것이다. 반면에 0.4 mM의 IPTG를 첨가한 실험에서는 오히려 reductase의 활성이 thiolase의 경우처럼 낮아져 0.000625 unit/mg protein의 낮은 활성을 나타내었다. PHA synthase의 활성은 수용성 PHA synthase의 활성이 0.4 mM IPTG의 경우 최대 0.0035 units/mg까지 확인되었으며 총 PHA synthase의 활성은 최대 0.007 units/mg였다 (Figure 6 (c)).

우리는 전 실험(5)에서 PHA synthase의 활성도의 제어를 통해, 다시 말해 PHA synthase의 활성도를 향상시켜 PHB의 평균분자량을 낮춘 바 있다. 본 실험은 이 PHA synthase의 활성을 오히려 낮추어 줌으로써 평균분자량을 극대화시키고자 하였다. 그러나 IPTG의 첨가로 thiolase와 reductase PHB의 활성이 오히려 저하되는 것으로 나타났고 IPTG가 없는 상태에서 오히려 관련 효소들의 활성이 높게 나타났다. 또한 reductase의 저하가 PHB 생산성에 영향을 줄 것이라는 가설은 불충분한 것으로 밝혀졌다. 그것은 IPTG를 첨가하지 않은 경우 높은 활성의 reductase를 얻을 수 있었으나 별다른 PHB 생산성에 증가가 없는 것으로 보아 reductase의 활성보다는 케톤기의 환원을 위해 공급되는 NADPH의 대사공급이 더욱 중요한 것으로 사료되며 이의 명확한 규명을 위해 단량체 또는 전구체의 분석 등 추가실험이 필요하다.

요 약

두 개의 프로모터 (*trc*와 *Pp*)를 *Alcaligenes eutrophus*에서 유래된 PHA 오페론에 삽입하여 재조합 대장균에서 분자량이 큰 polyhydroxybutyrate (PHB)를 얻고자 하였다. 두 개의 프로모터는 hydroxybutyric CoA와 PHA 중합반응의 유전자 발현을 각각 독립적으로 제어하기 위해 설계된 것이다. 새로운 합성오페론을 포함한 플라스미드는 *E. coli* DH5 α 에 transformation 되어 PHB 생산에 이용되었다. 본 실험의 가설로서 PHA 합성 오페론의 IPTG에 의한 유도가 없을 경우 낮은 PHA synthase의 활성이 고분자 중합반응의 개시제 농도를 줄여주어 결과적으로 높은 연결수의 고분자를 생성할 것이라는 모델을 세웠다. 실제로 IPTG의 공급이 없는 발효실험을 통해 평균분자량이 2.5×10^7 인 거대 고분자를 얻을 수 있었다. PHA 생산성에 관여하는 효소의 활성 분석으로 3-hydroxybutyric CoA의 중합을 촉매하는 효소인 PHA synthase의 활성을 가지고 *in vivo*에서 분자량이 제어됨을 확인하였다.

감 사

본 연구의 유전자 조작과 효소활성 측정에 도움을 주었던 미국 METABOLIX 사의 Kristi D. Snell 박사께 감사드리며 KIST의 조영상 박사님과 KAIST 생물공정연구센터의 장호남, 이상엽 교수님께 친절하신 지도에 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Lee, S. Y. (1997), *E. coli* Moves into the Plastic Age *Nature Biotechnology*, **15**, 17.
2. Poirer, Y., D. Dennis, K. Klomparens, and C. Somerville (1992), Polyhydroxybutyrate, a Biodegradable Thermoplastic, Produced in Transgenic Plants, *Science*, **256**, 520-523.
3. Pool, R. (1989), In Search of the Plastic Potato, *Science* **245**, 1187-1189.

4. Poirier, Y., C. Nawrath, and C. Somerville (1995), Production of Polyhydroxyalkanoates, a Family of Biodegradable Plastics and Elastomers, in *Bacteria and Plants, Bio/Technology*, **13**, 142-150.
5. Sim, S. J., S. C. Hogan, K. D. Snell, A. J. Sinskey, C. K. Rha, and J. Stubbe (1997), PHA Synthase Activity Controls the Molecular Weight and Polydispersity of Polyhydroxybutyrate *in vivo*, *Nature Biotechnology*, **15**, 63-67.
6. Reusch, R., T. Hiske, H. Sadoff, R. Harris, and T. Beveridge (1987), Cellular Incorporation of Poly- β -hydroxybutyrate into plasma membranes of *Escherichia coli* and *Azotobacter vinelandii* alters native membrane structure, *Can. J. Microbiol.*, **33**, 435-444.
7. Reusch, R. and H. Sadoff (1988), Putative Structure and Functions of a Poly- β -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate Channel in Bacterial Plasma Membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4176-4180.
8. Reusch, R. (1995), Low Molecular Weight Complexed Poly(3-hydroxybutyrate): a Dynamic and Versatile Molecule *in vivo*, *Can. J. Microbiol.*, **41**, 50-54.
9. Ploux, O., S. Masamune, and C. T. Walsh (1988), The NADPH-linked Acetoacetyl-CoA Reductase from *Zoogloea ramigera*: Characterization and Mechanistic Studies of the Cloned Enzyme Over-produced in *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.*, **174**, 177-182.
10. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY.
11. Gerngross, T. U., K. D. Snell, O. P. Peoples, A. J. Sinskey, E. Cshai, S. Masamune, and J. Stubbe (1994), Overexpression and Purification of the Soluble Polyhydroxyalkanoates Synthase from *Alcaligenes eutrophus*: Evidence for a Required Posttranscriptional Modification of Catalytic Activity, *Biochemistry*, **33**, 9311-9320.
12. 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.
13. Ploux, O., S. Masamune, and C. T. Walsh (1988), The NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductase from *Zoogloea ramigera*: Characterization and Mechanistic Studies of the Cloned Enzyme Over-produced in *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.*, **174**, 177-182.
14. Nishimura, T., T. Saito, and K. Tomita (1978), Purification and Properties of β -Ketothiolase from *Zoogloea ramigera*, *Arch Microbiol.*, **116**, 21-27.
15. Bradford, M. M. (1976), A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248.
16. Karr, D. B., J. K. Waters, and D. W. Emerich (1983), Analysis of Poly- β -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* Bacteroids by Ion-exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1339-1344.