

Pilot 규모에서의 재조합 대장균을 이용한 (R)-3-Hydroxybutyric acid 생산

최종일¹ · 이승환¹ · 최성준¹ · 이상엽^{1,2*}

생물공정연구센터 및 대사공학 국가지정연구실, ¹한국과학기술원 생명화학공학과,
²한국과학기술원 바이오시스템학과

Pilot Scale Production of (R)-3-Hydroxybutyric acid by Metabolically Engineered *Escherichia coli*. Choi, Jong-il¹, Seung Hwan Lee¹, Sung Jun Choi¹, and Sang Yup Lee^{1,2*}. Department of Chemical & Biomolecular Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, ¹Metabolic and Biomolecular Engineering National Research Laboratory, ²Department of BioSystems and Bioinformatics Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejeon 305-701, Korea - Production of (R)-3-hydroxybutyric acid (R3HB) by fed-batch culture and continuous culture of metabolically engineered *Escherichia coli* harboring *Ralstonia eutropha* PHB biosynthesis and depolymerase genes was examined in a 30 l pilot-scale fermentor. A new stable two-plasmid system, pBRRed containing the *R. eutropha* PHB depolymerase gene and pMCS105 containing the *R. eutropha* PHB biosynthesis genes, was developed. Among a variety of *E. coli* strains harboring plasmids, recombinant *E. coli* XL-10 Gold (pBRRed, pMCS105) was able to produce R3HB with the highest efficiency in a batch culture. By the fed-batch culture of recombinant *E. coli* XL-10 Gold(pBRRed, pMCS105) in a 30 l fermentor, the final R3HB concentration was 22.4 g/l giving a productivity of 0.97 g/l-h. To produce R3HB to a high concentration with high productivity, a new strategy of fed-batch culture followed by a continuous culture was investigated. The maximum productivity and R3HB concentration were 5.06 g/l-h and 25.3 g/l, respectively. These results show that economical production of R3HB is possible by recombinant *E. coli* in large scale.

Key words: (R)-3-Hydroxybutyric acid, pilot scale, fed-batch culture, continuous culture, recombinant *E. coli*

생물 고분자 polyhydroxyalkanoate(PHA)의 단량체인 광학적으로 순수한 (R)-hydroxycarboxylic acids(RHAs)는 향생제, vitamins, perfumes 및 pheromones 등의 정밀화학 제품과 같은 chiral 화합물의 원료로서 크게 관심을 끌고 있다 [1, 5, 11, 14, 17, 18]. 특히 poly(3-hydroxybutyrate)(PHB)의 단량체인 (R)-3-hydroxybutyric acid(R3HB)는 carbapenem 항생제의 원료가 되는 4-acetoxyazetidinone의 주요한 전구체 물질로서 매우 큰 시장성을 가지고 있다[7]. 하지만 화학적 합성에 의한 RHA의 생산은 높은 생산 단가로 인해 그 응용성이 국한되어 있다[3]. 따라서, 미생물들이 탄소원 및 에너지 저장 물질로서 합성 축적하는 PHA를 분해하여 광학적으로 순수한 단량체를 경제적으로 얻으려는 연구들이 보고되었다. Seebach[15, 16]와 Lee[9] 등은 PHB를 화학적으로 분해하여 R3HB를 생산하려는 연구 결과들을 보고하였지만, 이러한 방법들은 모두 다량의 유기 용매를 사용하고, 복잡한 공정으로 낮은 생산 수율을 갖고 있다.

Lee 등[8]은 PHA 생산 미생물에 존재하는 depolymerization

system을 이용하여 고농도로 PHA를 생산하는 야생 균주에서 *in vivo* depolymerization을 이용하여 RHA를 생산하는 연구 결과를 발표하였다. 이러한 미생물의 depolymerization system을 이용한 R3HB의 생산 비용이 화학적 분해 방법보다 낮다는 것이 경제성 평가로부터 계산되어졌다[3]. 또한 최근에는 PHB 생합성 유전자와 depolymerase 유전자를 동시에 이용하여 RHAs를 발효에 의하여 생산할 수 있는 재조합 대장균이 개발되었다[7]. 개발된 재조합 대장균은 *Ralstonia eutropha*에서 유래한 PHA 생합성 유전자들, β -ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase 및 PHA synthase과 *R. eutropha*에서 유래한 depolymerase 유전자 [12]를 자체 constitutive promoter를 이용하여 발현 시킴으로써 세포내에 PHB를 축적시키지 않고 바로 배지내로 R3HB를 분비하여 생산하였다. 그 결과 단순 배지에서 재조합 대장균의 회분식 배양에 의해 9.9 g/l의 R3HB를 생산하였다[7].

본 논문에서는 PHA 생합성 유전자들과 depolymerase 유전자들을 갖고있는 보다 안정한 재조합 대장균을 개발하였으며, 이를 이용하여 R3HB의 고효율 생산을 위한 30 l의 pilot 규모에서 유가식 배양과 연속식 배양 공정을 개발하였다.

*Corresponding author

Tel. 82-42-869-3930, Fax: 82-42-869-8800

E-mail: leesy@kaist.ac.kr

재료 및 방법

사용 균주 및 Plasmids

본 연구에서 사용된 균주와 plasmid들은 Table 1에 표시하였다. 유전자 조작을 위한 재조합 대장균의 배양은 Luria-Bertani 배지(LB, 10 g of Bacto-tryptone, 5 g of Bacto-yeast extract, 10 g of NaCl per liter)를 사용하였다. 유전자 조작의 일반적인 방법은 이전의 문헌을 참조하였다[13]. Polymerase chain reaction(PCR)은 Expand™ High Fidelity PCR System(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하여 PCR Thermal Cycler MP(Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)로 수행하였다. DNA sequencing은 Bigdye terminator cycle sequencing kit(Perkin-Elmer Co., Boston, MA, USA)과 Taq polymerase를 사용하여 ABI Prism™ 377 DNA sequencer(Perkin-Elmer Co.)로 분석하였다.

배양 조건

재조합 대장균으로부터 R3HB를 생산하기 위하여 단순 배지를 사용하였다. 배지의 조성은 다음과 같다[2]. 6.75 g KH_2PO_4 , 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.7 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.85 g citric acid, 그리고 5 ml trace metal solution을 배지 1 l에 녹였으며 배지의 pH는 6.7로 조절하였다. 사용된 trace metal solution의 조성은 5 M HCl 1 l에 10 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g CaCl_2 , 2.2 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 그리고 0.02 g

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 로 이루어졌다. 탄소원으로는 20 g/l의 glucose를 사용하였으며, 첨가된 thiamine의 농도는 20 mg/l였다. 필요할 경우 항생제를 사용하였으며, 항생제의 농도는 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin과 34 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol 이었다. 유가식 배양중의 pH 조절은 28% 암모니아 용액을 사용하여 조절하였다.

30 l 발효기(KoBiotech Co., 인천, 대한민국)에서의 배양을 위한 증배양은 2.5 l jar 발효기(KoBiotech Co.)에서 수행하였다[2]. 30 l 발효기에서는 10 l의 배양부피를 가졌다.

분석 조건

균체 농도는 일정 부피의 발효액을 원심분리하여 얻어지는 균체를 95°C dry oven에서 일정한 질량이 될 때 까지 건조시킨 후, 발효 부피당 건조 균체 질량으로 정의 하였다. PHB 농도는 *n*-benzoic acid를 internal standard로 사용하여 GC를 이용하여 분석하였다[2]. PHB 함량은 균체 농도에 대한 PHB 농도의 백분율로 표시하였다. 배지내 포도당의 농도는 glucose analyzer(model 2700, Yellow Springs Instruments, USA)를 이용하여 분석 하였다. R3HB의 농도는 high-performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 결정하였다[7]. PHB가 세포내 depolymerase에 의해서 분해가 될 때 대부분이 dimer나 oligomer 형태로 R3HB monomer와 함께 배지내로 분비된다. R3HB dimer와 같은 oligomer는 alkaline 조건에서의 온화한 열처리로 R3HB monomer 형태로 수화되어진다[7].

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

Strain, plasmid or primer	Relevant features	Source or reference
<i>E. coli</i> Strains		
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac F</i> [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Tn10(<i>tet</i> ^r)]	Stratagene ^a
XL10 Gold	<i>Tet</i> ^r Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [<i>F</i> ⁺ <i>proAB lacI</i> ^q Δ <i>M15</i> Tn10 (<i>Tet</i> ^r) Amy Cam ^r]	Stratagene
DH5α	<i>SupE44ΔlacU169(φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	LTI ^b
W3110	<i>F mcrA mcrB IN(rrnD⁻rrnE)1λ</i>	KCTC ^c
Plasmids		
pUCRed	pUC19 derivative; <i>phaZi</i> _{Re} ; Ap ^r	7
pBR322	cloning vehicle; Ap ^r ; Tc ^r	New England Biolabs ^d
pBRRed	pBR322 derivative; <i>phaZi</i> _{Re} ; Ap ^r ; Tc ^r	This study
p5184	pACYC184 derivative; <i>R. eutropha phaCAB</i> _{Re} , <i>parB</i> (<i>hok/sok</i>) locus of plasmid R1; Cm ^r ; Tc ^r	7
pBBR1MCS	cloning vehicle; Cm ^r	4
pMCS105	pBBR1MCS derivative; <i>R. eutropha phaCAB</i> _{Re} , <i>parB</i> (<i>hok/sok</i>) locus of plasmid R1; Cm ^r	This study

^a Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA

^b Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

^c Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, Republic of Korea

^d New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA.

결과 및 고찰

Pilot 규모에서의 배양을 위한 안정한 재조합 대장균 제작
 먼저, Lee and Lee가 개발한 이중 plasmid 시스템 재조합 대장균 XL-1 Blue(pUC19Red, p5184)과 염색체 내 삽입 시스템 재조합 대장균 B-PHA+(pUC19Red_stb)을 이용하여 pilot 규모(30 l) 배양을 수행하였다. 20 g/l의 포도당이 첨가되어 있는 단순배지에서 pilot 규모의 배양결과, 2.5 l의 lab 규모 배양의 균체 농도에 50%에 못 미치는 값을 보였다(data not shown). 따라서, pilot 규모 배양에 적합한 새로운 재조합 균주의 확보가 필요하였다. 이를 위하여 지속적으로 PHA 합성유전자와 분해유전자가 지속적이고 안정적으로 발현되고, pilot 규모에서 생장이 유리한 재조합 대장균 system을 제작하였다. pBR322 plasmid에 *R. eutropha* 유래의 PHA depolymerase 유전자를 도입하여 pBRRed를 제작하고, pSYL105 plasmid로부터 PHA 합성 오페론과 *hok/sok* 유전자를 pBBR1MCS plasmid에 도입하여 pMCS105를 제작하였으며, 이 재조합 plasmid를 Fig. 1에 나타내었다. 동일한 발현 벡터를 이용하더라도 다른 종류의 대장균마다 단백질의 발현 정도가 다르다는 점[6]을 착안하여 이 pBRRed와 pMCS105를 대장균 XL1-Blue, XL-10 Gold, DH5 α , W3110 등에 형질 도입한 후, 각각 배양을 통하여 단량체 합성능과 균체 성장을 관찰 하였다. 회분식 배양은 20 g/l의 포도당이 포함된 단순 배지(초기 pH 6.7) 10 l가 담긴 30 l 발효기에서 37°C, 200 rpm의 조건으로 수행하였다. 각 재조합 대장균에 의한 단량체의 생성능과 균체 농도는 Table 2와 같았다. 형질 전환된 여러 가지 대장균 가운데, XL-10

Table 2. Pilot-scale production of (R)-3-hydroxybutyric acid by various recombinant *E. coli* (pBRRed, pMCS105) in a defined medium^a.

Plasmid	Cell concentration (g/l)	R3HB concentration (g/l)
XL-1 Blue	1.01±0.3	7.63±0.5
XL-10 Gold	1.34±0.3	8.25±0.8
DH5 α	1.21±0.2	4.92±0.5
W3110	2.35±0.4	2.11±0.3

^aCultures were carried out in triplicate.

Gold(pBRRed, pMCS105) 경우 세포 생장이 기존의 시스템에 비하여 높았고, 44 시간에 R3HB 농도가 약 8.2 g/l에 달하였다. 또한, 대장균 균체 내에 PHB 축적현상은 보이지 않았으며, 비록 대부분의 R3HB가 이량체의 형태로 생산되었으나 염기 조건에서 1시간 가열해중으로써 모두 R3HB 단량체 형태로 변환되었다[7]. 이후의 배양에서는 이 재조합 균주를 이용하여 배양을 수행하였다.

초기 탄소원에 대한 영향을 관찰하기 위하여, 초기 포도당 농도를 2, 5, 10, 20 g/l로 하여 회분식 배양을 진행 하였다. Table 3과 같이 포도당의 농도가 5 g/l일 때 단량체의 생산이 거의 없으며, 균체농도가 상대적으로 높았다. 반대로 포도당의 농도가 높은 경우 많은 단량체가 생성 되었다.

Pilot 규모에서의 유가식 배양에 의한 R3HB의 생산

PHA 단량체를 고효율로 생산하기 위하여 유가식 배양을 수행하였다. 회분식 배양에서 얻어진 결과인 초기 탄소원의 농도가 높을 경우 높은 단량체 생산성을 보이나, 균체농도

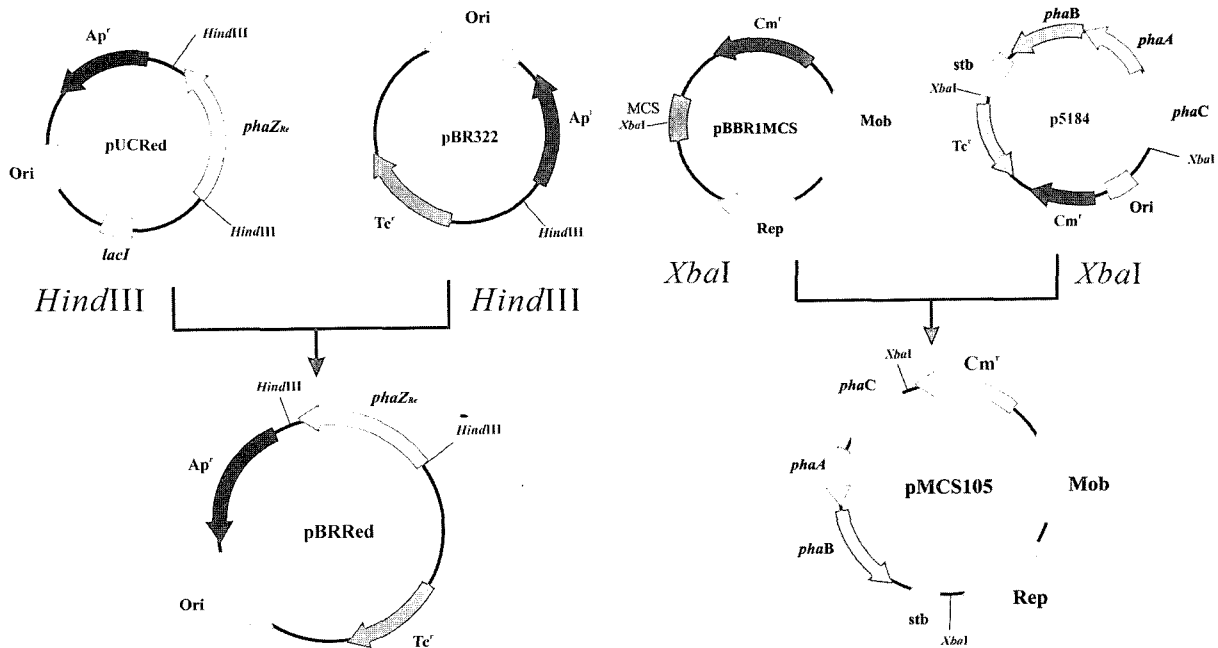


Fig. 1. Construction of plasmids pBRRed and pMCS105.

Table 3. Pilot-scale production of (*R*)-3-hydroxybutyric acid by recombinant *E. coli* XL-10 Gold (pBRRed, pMCS105) in a defined medium^a.

Glucose concentration (g/l)	Cell concentration (g/l)	R3HB concentration (g/l)
2	0.8 ±0.3	0
5	1.81±0.1	0.13±0.02
10	1.55±0.1	3.78±0.3
20	1.3 ±0.1	8.2 ±0.3

^aCultures were carried out in triplicate.

는 낮고, 이와 반대로 초기 탄소원의 경우가 상대적으로 낮을 경우 단량체의 생산은 미미하고, 높은 균체농도를 보이는 현상을 이용하여, 다음과 같은 기질 공급전략을 사용하였다. 세포의 생장이 필요한 초기에는 낮은 포도당 농도(5 g/l)로 배양을 하여 균체 농도를 증가시키고, 균체 농도가 높아 졌을 때(20 g/l 이상) 포도당 농도(20 g/l)를 증가시켜, 단량체의 생산이 용이하게 하였다. 30 l 발효를 위한 증배양은 5 g/l의 포도당을 포함한 1 l의 단순 배지를 이용하여 수행하였다. 배양 온도는 37°C로 제어하였으며, 배양 중의 pH는 포도당의 고갈로 인해 잠시 증가하는 기간을 제외하고는 pH는 28% NH₄OH 용액을 이용하여 6.7을 유지하였다. 유가식 배양의 feeding solution은 500 g/l의 포도당과 20 g/l의 MgSO₄·7H₂O와 250 mg/l thiamine을 이용하였다. 교반속도는 500 rpm까지 조절을 하였으며, 용존 산소량은 포화공기 농도의 40% 이상을 유지하였다. 탄소원의 소모는 pH와 용존 산소량 값의 증가로 미루어 알 수 있었다.

Fig. 2에서 보듯이, 유가식 기질 공급시 포도당의 농도를 5 g/l 이하로 낮게 유지하였을 때는, PHA 단량체의 농도가

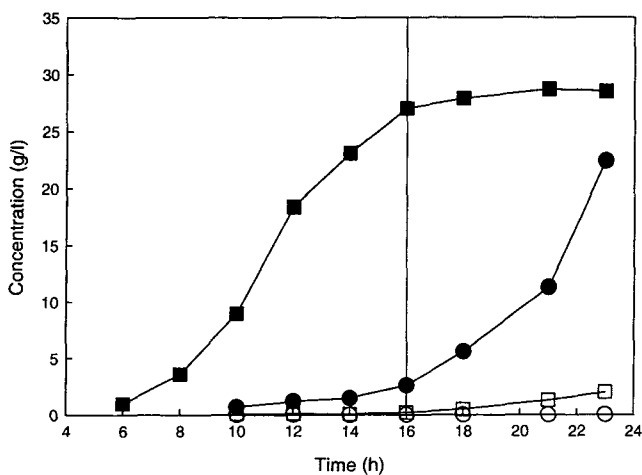


Fig. 2. Time profiles of cell concentration (■), R3HB concentration before (□) and after (●) alkaline heat treatment, and PHB concentration (○) during fed-batch culture of recombinant *E. coli* XL-10 Gold harboring pBRRed and pMCS105 in a chemically defined medium in 30 l fermentor.

매우 낮은 반면(< 3 g/l), 세포의 평균 비성장 속도는 높았다($\mu > 0.3 \text{ h}^{-1}$). 그러나, 16시간 이후부터 유가식 배양중에 첨가되는 포도당의 농도(20 g/l)를 높여서 배양하면, 균체농도의 증가는 보이지 않고, 대부분의 포도당이 단량체를 생성하는데 소모되었다. 최종 균체농도는 28.7 g/l, 단량체의 농도는 22.4 g/l, 생산성은 0.97 g/l-h로 나타났다.

Pilot 규모에서의 연속식 배양에 의한 R3HB의 생산

Pilot 규모에서 유가식 배양으로부터 R3HB를 22.4 g/l의 고농도로 얻을 수 있었지만, 생산성은 0.97 g/l-h의 값을 가졌다. PHA의 생산에 관한 경제성 평가로부터 생산성이 생산 단가에 영향을 미치는 주된 요인들 중의 하나로 밝혀졌기 때문에, 고생산성 R3HB 생산을 위한 연속식 배양을 수행하였다.

본 연구에서는 고효율 연속식 배양을 수행하기 위하여 유가식 배양법을 이용하는 2 단계 배양방법을 사용하였다. 즉, pilot 규모에서 최적화된 유가식 배양을 통하여 균체농도를 높이는 1단계와 dilution rate와 기질의 농도를 조절하여 연속 배양하는 2단계의 두 단계로 나누어 배양을 진행하였다. 유가식 배양으로 얻어진 결과(Fig. 2)를 바탕으로 하여, 수행한 새로운 배양 결과를 Fig. 3에 표시하였다.

1단계 유가식 배양시에는 초기 포도당의 농도를 5 g/l 이하로 유지하여 균체 농도를 증가시켰고, 이후 20 g/l의 포도당 농도가 되도록 포도당 feeding을 조절하였다. 그 결과 23 시간의 배양 시간 이후 균체 농도는 27.35 g/l, R3HB 농도는 23.4 g/l가 얻어졌다. Feeding solution의 첨가에 따라서 30 l 발효기에서의 배지의 부피는 12 l로 증가하였다.

연속식 배양 system은 30 l 규모의 발효기와 peristaltic 펌프(07524-45, Cole-Pharmer사, 미국), 그리고 feeding을 위한 50 l tank로 이루어져 있다. 배지는 50 g/l의 포도당이 첨가되어 있는 단순배지를 사용하였다. 2단계 연속식 배양에

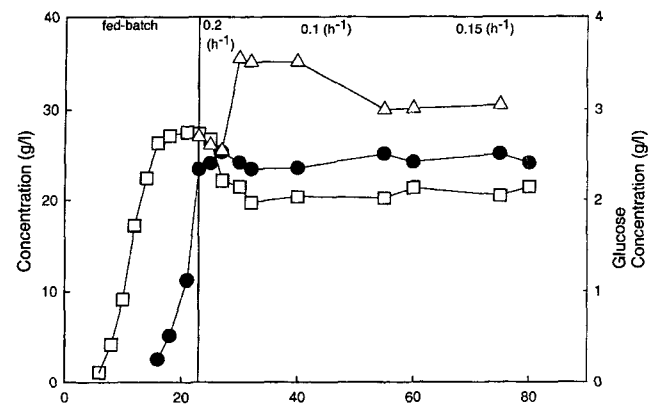


Fig. 3. Time profiles of cell concentration (■), R3HB concentration after alkaline heat treatment (●), and residual glucose concentration (△) during continuous culture of recombinant *E. coli* XL-10 Gold harboring pBRRed and pMCS105 in a chemically defined medium in 30 l fermentor.

서는 포도당의 농도가 50 g/l를 갖는 단순 배지를, dilution rate를 0.2 h⁻¹로 고정하여, 연속 배양을 수행하였다. 연속식 배양을 7시간 동안 수행하는 동안 유출액에서의 R3HB 농도는 24 g/l를 유지하였으나, 균체 농도는 27.35 g/l에서 21.5 g/l로 감소하였다. 이 후 연속식 배양에서 균체 농도를 유지시키기 위하여 dilution rate를 0.1 h⁻¹로 낮추었다. 15시간의 연속식 배양 동안 R3HB의 농도는 23 g/l 이상을 유지하였으며, 균체 농도는 20 g/l 이상으로 일정한 값을 유지하였다. 이후 배양 시간 80시간까지 25시간 동안 dilution rate를 0.15 h⁻¹로 유지하여 연속식 배양을 수행하였다. Dilution rate가 0.15 h⁻¹에서도 R3HB의 농도는 24 g/l 이상을 유지하였으며, 균체 농도는 20 g/l 이상으로 일정한 값을 유지하였다.

이러한 결과들로부터 pilot-scale에서 연속식 배양을 이용하여 고생산성으로 R3HB가 얻어질 수 있다는 것이 확인되었고, 이 결과를 바탕으로 산업적 응용을 위한 장시간 동안의 연속식 배양 연구는 현재 진행되고 있다.

요 약

산업적 R3HB의 생산을 위한 재조합 대장균의 pilot 규모에서의 유가식 배양과 연속식 배양을 연구하였다. Pilot 규모에서의 R3HB 생산을 위하여 안전한 two plasmid system pBRRed와 pMCS105를 제작하였으며, 제작된 plasmids를 이용하여 여러 다른 대장균을 형질 전환하였다. 얻어진 재조합 대장균들을 30 l의 발효기에서 회분식 배양한 결과 대장균 XL-10 Gold(pBRRed, pMCS105)가 가장 높은 R3HB 농도를 보였다. 30 l 발효기에서 대장균 XL-10 Gold (pBRRed, pMCS105)을 유가식 배양한 결과 22.4 g/l의 R3HB가 얻어졌으며, 생산성은 0.97 g/l-h를 보였다. 고농도의 R3HB를 고생산성으로 얻기 위하여 유가식 배양으로 높은 균체 농도를 얻은 후 연속 배양으로 R3HB를 생산하는 전략을 개발하였다. 그 결과 0.2 h⁻¹의 dilution rate에서 R3HB 생산성은 5.06 g/l-h를 보였다. 이러한 결과는 산업적 규모에서 재조합 대장균을 이용하여 R3HB를 고농도, 고생산성으로 얻을 수 있다는 것을 보여준다.

감사의 글

이 연구는 산업자원부 산업기반기술사업과 BK21 program의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다. LG화학 석좌교수 지원에도 감사드립니다.

REFERENCES

1. Chiba, T. and T. Nakai. 1985. A synthetic approach to (+)-thienamycin from methylene (R)-3-hydroxybutanoate. *Chem.*

Lett.: 651-654.

2. Choi, J., S. Y. Lee, K. S. Shin, W. G. Lee, S. J. Park, H. N. Chang, and Y. K. Chang. 2002. Pilot Scale Production of Poly(3-Hydroxy-valerate) by Fed-batch Culture of Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7: 371-374.

3. Choi, J., Y. Lee, and S. Y. Lee. 2004. Simulation and economic evaluation of a process for the production of enantiomerically pure (R)-3-hydroxybutyrate from biopolymer poly(3-hydroxybutyrate). *HwahakGonghak*. In press.

4. Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop II, and K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, **166**: 175-176.

5. Lee, S. Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* **49**:1-14.

6. Lee, S. Y., K. M. Lee, H. N. Chang, and A. Steinbüchel. 1994. Comparison of recombinant *Escherichia coli* strains for synthesis and accumulation of poly-(3-hydroxybutyric acid), and morphological changes. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 1337-1347.

7. Lee, S. Y., and Y. Lee. 2003. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of enantiomerically pure (R)-(-)-hydroxycarboxylic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3421-3426.

8. Lee, S. Y., Y. Lee, and F. Wang. 1999. Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals. *Biotechnol. Bioeng.* **65**: 363-368.

9. Lee, Y., S. H. Park, I. T. Lim, K. Han, and S. Y. Lee. 2000. Preparation of alkyl (R)-(-)-3-hydroxybutyrate by acidic alcoholysis of poly-(R)-(-)-3-hydroxybutyrate. *Enzyme Microb. Technol.* **27**: 33-36.

10. Madison, L. L. and G. W. Huisman. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 21-53.

11. Miltenberger, K. and H. Aktiengesellschaft. 1985-1996. Hydroxycarboxylic acid, aliphatic, p. 507-517. In H.-J. Arpe, E. Biekert, H. T. Davis, W. Gerharz, H. Gerrens, W. Keim, J. L. McGuire, A. Mitsutani, H. Pilat, Sir C. Reece, D. P. Sheetz, H. E. Simmons, E. Weise, R. Wirtz, and H.-R. Wüthrich (ed.), *Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th ed. Wiley-VCH, Weinheim, Berlin, De.

12. Saegusa, H., M. Shiraki, C. Kanai, and T. Saito. 2001. Cloning of an intracellular poly[D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J. Bacteriol.* **183**: 94-100.

13. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

14. Schnurrenberger, P., E. Hungerbühler, and D. Seebach. 1987. Total synthesis of (+)-colletodiol from (S,S)-tartarate and (R)-3-hydroxybutanoate. *Liebigs Ann. Chem.* **1987**: 733-744.

15. Seebach, D., A. K. Beck, R. Breitschuh, and K. Job. 1992. Direct degradation of the biopolymer poly[(R)-3-hydroxybu-

- tyric acid] to (*R*)-3-hydroxybutanoic acid and its methyl ester. *Org. Synth.* **71**: 39-47.
16. Seebach, D. and M. F. Zuger. 1982. Über die depolymerisierung von poly-(*R*)-3-hydroxy-buttersäureester (*PHB*). *Helvetica Chim. Acta*, **65**: 495-503. (In Germany)
17. Steinbüchel, A. and B. Fuchtenbusch. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol.* **16**: 419-427.
18. Steinbüchel, A. and H. E. Valentin. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 219-228.

(Received Jul. 8, 2004/Accepted Sep. 9, 2004)