

Phân lập và định danh phân tử chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp Polyhydroxybutyrate tại TP Hồ Chí Minh

Huỳnh Văn Hiếu^{1*}, Trần Hoàng Dũng², Lê Tuấn Lộc²
Chung Anh Dũng³, Phạm Công Hoạt⁴

¹Khoa Khoa học Nông nghiệp - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

²Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

³Phòng Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam

⁴Bộ Khoa học và Công nghệ

Ngày nhận bài 1.10.2015, ngày chuyển phân biện 5.10.2015, ngày nhận phân biện 9.11.2015, ngày chấp nhận đăng 16.11.2015

Sản xuất polymer sinh học đang là chủ đề nổi bật trong lĩnh vực công nghệ sinh học nhờ khả năng ứng dụng cao của chúng trong đời sống. Nhiều vi sinh vật hoang dại và tái tổ hợp đã được chọn lựa do khả năng sản xuất polyhydroxybutyrate (PHB) trong tự nhiên. Trong nghiên cứu này, các tác giả tiến hành phân lập và sàng lọc một số chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp PHB bằng thuốc nhuộm Sudan black B và định danh các chủng tiềm năng bằng trình tự vùng 16S rARN. Kết quả đã phân lập được 6 chủng, phân làm 2 nhóm là *Enterobacter* (*Pseudomonas stutzeri* strain H6, *Enterobacter* sp. H12, *Klebsiella* sp H14, *Enterobacter* sp. H56, *Enterobacter cloacae* strain H62) và *Bacillus* (*Bacillus* sp. H37). Trong đó có 2 dòng có thể định danh đến loài, số còn lại chỉ nhận diện đến chi.

Từ khóa: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, polyhydroxybutyrate, 16S rARN.

Chỉ số phân loại 2.8

Isolation and molecular identification of polyhydroxybutyrate-producing bacterial strain in Ho Chi Minh city

Summary

Production of biopolymer is one of the topics attracting a great deal of interest in the field of biotechnology; it is considered having significant applications in our daily life. Various microorganisms, including wild types and recombinants have been selected due to their capability to produce Polyhydroxybutyrate (PHB). In this study, the authors attempted to isolate and select several bacterial strains which can biosynthesize PHB by Sudan Black B stain and identified the potential ones by 16S rRNA. Six bacterial strains were identified and classified into two groups: *Enterobacter* (*Pseudomonas stutzeri* strain H6, *Enterobacter* sp. H12, *Klebsiella* sp H14, *Enterobacter* sp. H56, *Enterobacter cloacae* strain H62) and *Bacillus* (*Bacillus* sp. H37). Two of them can be identified to the species, while the remaining ones can only be identified to the genera.

Keywords: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, Polyhydroxybutyrate, 16S rRNA.

Classification number 2.8

Đặt vấn đề

PHB là tên gọi của polymer thuộc họ polyhydroxyalkanoate (PHA), chúng là các polymer thuộc lớp polyester với các đơn phân là nhiều loại (R)-hydroxyalkanoate. Chúng được tổng hợp trong tự nhiên bởi quá trình lên men các đường hay chất béo. PHA là một họ polymer lớn, bao hàm hơn 150 đơn phân khác nhau và hơn 100 cấu trúc polymer đã được mô tả, trong đó PHB chính là thành viên đầu tiên của họ PHA được khám phá và là loại polyester phổ biến nhất, được biết đến nhiều nhất và đóng vai trò nổi bật trong sản xuất và ứng dụng [1].

Hướng nghiên cứu sản xuất polymer phân hủy sinh học từ các vật liệu có nguồn gốc thiên nhiên đã bắt đầu từ hơn 30 năm nay. Đáng chú ý là việc sản xuất PHB từ các vi sinh vật. Chúng được tổng hợp tự nhiên trong tế bào chất của một số loài vi khuẩn. Đây là các polyester có tính chất tương tự nhựa tổng hợp. Nhờ đặc tính dẻo, đàn hồi, chịu nhiệt cao, dễ bị phân hủy hoàn toàn bởi các vi sinh vật mà không sản

*Tác giả liên hệ: Email: hieuhv@hoidoanhnan.vn; Tel: 0913758542

sinh độc tố, PHB đang được xem như một nguồn thay thế lý tưởng cho nhựa tổng hợp. PHB đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực từ y học, nông nghiệp cho đến công nghiệp. Tuy nhiên cho đến nay, các sản phẩm từ PHB vẫn chưa được sản xuất và sử dụng rộng rãi do việc sản xuất PHB đòi hỏi đầu tư cao [1].

Hiện nay, có hơn 300 loài vi sinh vật được biết là có khả năng sinh tổng hợp PHA (PHB nói riêng): vi khuẩn dị dưỡng, tự dưỡng, hóa dưỡng, vi khuẩn quang hợp, vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí và cả vi khuẩn cổ. Tuy nhiên, không phải tất cả đều được con người nghiên cứu ứng dụng trong việc sản xuất PHA theo quy mô công nghiệp phục vụ nhu cầu thị trường. Các chủng sinh vật thích hợp cần thỏa mãn điều kiện tăng trưởng nhanh, năng suất và mật độ tích trữ sản phẩm cao, tỷ lệ sản phẩm trên sinh khối cao, sử dụng hiệu quả các nguyên liệu rẻ tiền dễ kiếm, việc tách chiết sản phẩm từ sinh khối không quá khó khăn, và sản phẩm tạo thành có các tính chất lý hóa đạt yêu cầu của nhà sản xuất [1-3].

Một số loài đang được giới khoa học nghiên cứu như các vi khuẩn *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. oleovorans*...), *Azotobacter vinelandii*, một số vi khuẩn quang hợp như: *Spirulina platensis*, *Nostoc muscorum*, *Synechocystis* sp., đặc biệt là vi khuẩn *Alcaligenes eutrophus* (còn gọi là *Ralstonia eutropha* hay *Cupriavidus necator*) và *Alcaligenes latus* là 2 chủng vi khuẩn có năng suất sinh tổng hợp PHB cao và được giới nghiên cứu dành nhiều sự chú ý [4].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp PHB tại khu vực TP Hồ Chí Minh. Mẫu được thu thập, sàng lọc bằng nhuộm màu Sudan black B, phân tích vùng 16S rARN để so sánh đánh giá tìm kiếm các chủng vi sinh vật tương cận.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Địa điểm và môi trường phân lập, tăng sinh

Mẫu đất, nước, bùn cống rãnh có nhiều vi sinh vật sinh tổng hợp PHB được lấy ở khu vực TP Hồ Chí Minh theo phương pháp thường quy.

Môi trường phân lập: glucose 10 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,4 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,012 g/l, $Na_2MoO_4 \cdot 12H_2O$ 0,01 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 0,1 g/l, $CaCO_3$ 0,25 g/l, pH 6,8.

Môi trường dinh dưỡng nhân sinh khối: $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 4,8 g/l, KH_2PO_4 2,65 g/l, $(NH_4)_2SO_4$

4 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,01 g/l, khoáng vi lượng(*) 1 g/l, pH = 6,8.

Môi trường lên men: glucose 20 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 4 g/l, KH_2PO_4 13,3 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,2 g/l, citric acid 1,7 g/l, khoáng vi lượng(*) 10 ml, pH = 6,8.

Dung dịch khoáng vi lượng(*): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 g/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2,25 g/l, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1,0 g/l, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,5 g/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2,0 g/l, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 0,23 g/l, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 0,1 g/l, HCl 35% 10 ml.

(*: thông số lấy theo El-sayed và cs, 2009) [5].

Sàng lọc nhanh các chủng vi khuẩn ngoài tự nhiên có khả năng sản xuất PHB bằng thuốc nhuộm Sudan black B

Tất cả các chủng vi khuẩn đã phân lập đều được kiểm tra khả năng tạo PHB bằng phương pháp nhuộm các khuẩn lạc điển hình với thuốc nhuộm Sudan black B. Vi khuẩn được nuôi trên môi trường thạch dinh dưỡng cung cấp 1% glucose, trong điều kiện ủ ấm 30°C trong 24-48 giờ. Sau đó, đổ thuốc nhuộm Sudan black B 3% ngập mặt thạch và để yên khoảng 30 phút rồi rửa lại thạch bằng cồn 96% để loại bỏ thuốc nhuộm thừa. Các khuẩn lạc bắt màu xanh đen với Sudan black B cho kết quả dương tính [6].

Thu nhận ADN tổng số vi khuẩn

Vi khuẩn được nuôi tăng sinh (16-18 giờ ở 28°C) trong 20 ml môi trường tăng sinh khối, sau đó cho vào ống ly tâm 2 ml đem ly tâm thu cặn. Thu nhận ADN tổng số của vi khuẩn bằng phương pháp của Doyle and Doyle (1997) có hiệu chỉnh cho phù hợp thực tế phòng thí nghiệm.

Khuếch đại và phân tích trình tự 16S rARN

Vùng gen 16S rARN được khuếch đại với đoạn môi 27F:

5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

và 1522 R: 5'-AAGGAGGTTATCCANCCRCA-3' [7].

Thành phần của một phản ứng PCR bao gồm PCR buffer 10X 2,5 μ l, $MgCl_2$ 0,75 μ l, dNTP 0,5 μ l, môi 1 μ l, khuôn ADN 1 μ l, Taq polymerase 0,2 μ l, nước cất vừa đủ 25 μ l. Hỗn hợp được trộn đều, chuyển vào máy PCR và tiến hành chạy với chế độ nhiệt 94°C trong 3 phút để làm biến tính hoàn toàn ADN khuôn, tiếp theo là 30 chu kỳ phản ứng lặp lại gồm 3 bước: 94°C trong 3 phút để biến tính ADN, 54°C trong 30 giây để gắn môi

và 72°C trong 1 phút 30 giây để kéo dài chuỗi, sau đó đến thời gian ủ ở 72°C trong 7 phút và giữ mẫu ở 4°C đến khi phân tích.

Giải và hiệu chỉnh trình tự ADN

Điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1%, sản phẩm đạt yêu cầu chất lượng sẽ được giải trình tự 2 chiều bằng chính cặp mỗi khuếch đại của Công ty MacroGen (Hàn Quốc). Kết quả giải trình tự được hiệu chỉnh trước khi phân tích. Loại bỏ những tín hiệu không chính xác ở hai đầu trình tự khảo sát, kiểm tra và hiệu chỉnh các vị trí trình tự không đồng nhất ở hai chiều kết quả bằng phần mềm ChromasPro và SeaView.

So sánh với cơ sở dữ liệu GenBank

Sau khi hiệu chỉnh các sai lệch, trình tự liên ứng (consensus) được rút ra từ kết quả trình tự hai chiều đã kiểm tra các sai lệch. Trình tự liên ứng là trình tự cuối cùng cho đoạn ADN được thu nhận để phân tích. Trình tự phân tích trong nghiên cứu này được so sánh với trình tự 16S rARN trên dữ liệu GenBank (NCBI) bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Các trình tự tương đồng trong khoảng từ 90 đến 99% được thu thập để tạo bộ dữ liệu trước khi phân tích đa dạng di truyền.

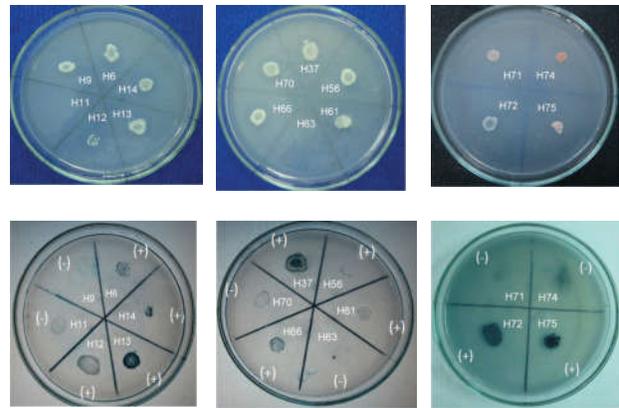
Xây dựng cây phát sinh loài để đánh giá đa dạng di truyền

Xác định mô hình tiến hóa cho khối dữ liệu 16S rARN bằng jModeltest. Các thông số tiến hóa phù hợp nhất được trích xuất, nhập vào phần mềm MEGA 6.0 để xây dựng cây phát sinh chủng loài bằng phương pháp Maximum Likelihood với 1.000 lặp lại.

Kết quả và thảo luận

Kết quả phân lập và sàng lọc nhanh dòng vi khuẩn sinh tổng hợp PHB

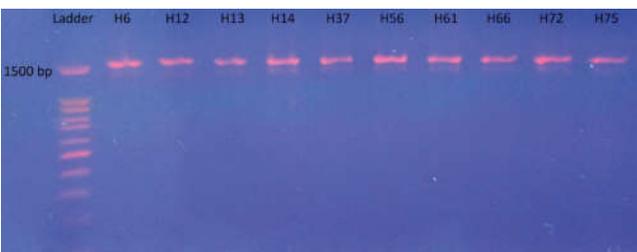
Từ các mẫu bùn nước thải, chúng tôi đã phân lập 122 chủng vi khuẩn ký hiệu H1 đến H122 dựa trên màu sắc và kích thước khuẩn lạc. Chúng tôi tiến hành sàng lọc nhanh các chủng sinh tổng hợp PHB bằng Sudan black B, sử dụng chủng *Ralstonia eutropha* (NBRC 102504, National Institute of Technology and Evaluation) làm đối chứng dương (nuôi cấy trong đĩa petri riêng). Kết quả thu được 10 trong 122 chủng vi khuẩn có khả năng tích lũy PHB: H6, H12, H13, H14, H37, H56, H61, H66, H72 và H75.



Hình 1: đại diện các chủng trước và sau khi nhuộm với Sudan black B, trong đó H6, H12, H13, H14, H37, H56, H61, H66, H72 và H75 cho kết quả dương tính; các mẫu H9, H11, H63, H70, H71 và H74 cho kết quả âm tính

Tách ADN tổng số, khuếch đại và giải vùng gen 16S

Kết quả khuếch đại vùng gen 16S rARN bằng kỹ thuật PCR thể hiện trên hình 2, kích thước sản phẩm nằm trong khoảng trên 1.500 bp như mong đợi, sáng, rõ, đẹp, đậm màu, đạt tiêu chuẩn để giải trình tự.



Hình 2: kết quả điện di sản phẩm PCR

Giải trình tự 2 chiều bằng chính cặp mỗi khuếch đại cho thấy, ngoài 2 mẫu H13 và H66 không cho kết quả, các mẫu còn lại đều cho kết quả rõ, đẹp. Sau khi hiệu chỉnh, trình tự liên ứng thu được của mẫu H6 là 1.262 bp, H12 là 1.441 bp, H14 là 1.455 bp, H37 là 1.292 bp, H56 là 1.433 bp, H61 là 1.457 bp, H72 là 1.447 bp và H75 là 1.440. Phân tích sơ bộ các trình tự thu được cho thấy H37 và H75 là giống nhau 100%, do đó chúng tôi loại mẫu H75 ra khỏi bộ dữ liệu phân tích.

Định danh phân tử dựa trên trình tự 16S rARN

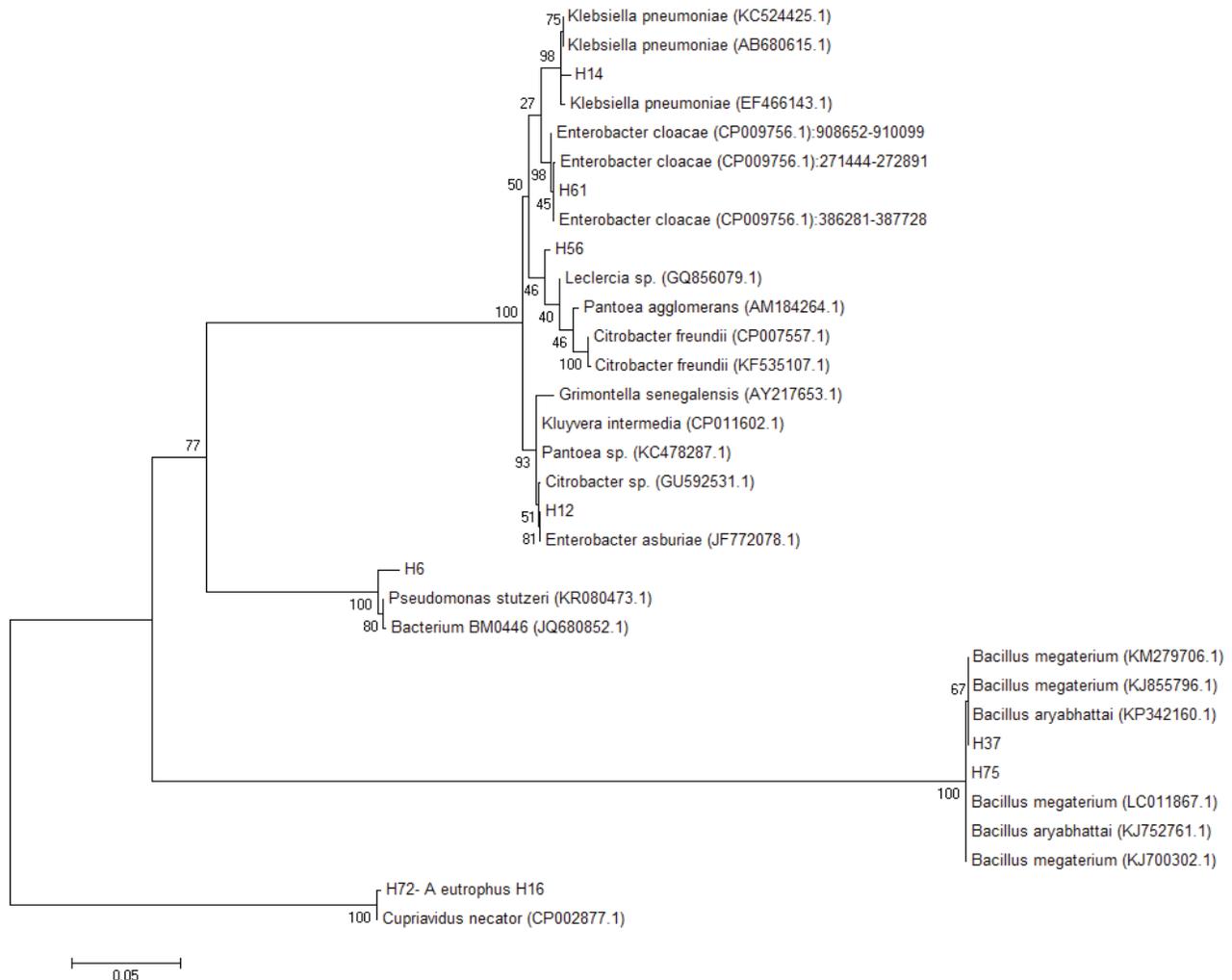
Trình tự H6 được so sánh với ngân hàng GenBank, bằng công cụ BLAST cho thấy, H6 có quan hệ rất gần với nhóm *Pseudomonas stutzeri* (KR080473.1, KR149277.1, KM357382.1, KJ782620.1, KF835758.1, HF571096.1). Các trình tự tương đồng được thu thập, sắp cột thẳng hàng, loại bỏ vùng không có khả năng so sánh. Độ dài trình tự phân tích là 1.261 bp. Tính toán khoảng cách di truyền với mô hình tiến hóa Kimura-3-parameter với phân bố gamma (hệ số gamma là 1 cho các vị trí biến

thiên). Kết quả cho thấy, H6 có khoảng cách di truyền với các mẫu *Pseudomonas stutzeri* chỉ khoảng 0,007 (tức 0,7% nằm trong giới hạn dưới 3% để xác lập cùng loài). Chúng tôi đặt tên là *Pseudomonas stutzeri* strain H6.

Thực hiện phép phân tích tương tự như trên cho chủng H12 cho thấy, chủng H12 có quan hệ gần với các chủng *Kluyvera* sp., *Pantoea* sp., *Cedecea*, *Citrobacter* và *Enterobacter asburiae* (CP011602.1, JF772078.1, KC478287.1, Q417446.1, Q416219.1, JN990088.1, M161855.1, GU592531.1, HM161853.1, GQ416218.1, JF772066.1, JF772103.1.) đều thuộc họ vi khuẩn đường ruột *Enterobacteriaceae*. Khoảng cách di truyền dựa trên 1.411 bp cho thấy, chủng H12 có khoảng cách di truyền 0,001 (tức 0,1%) so với *Cedecea* sp. THK-CF217 (KJ769172.1), *Pantoea* sp. FC 1 (KC478287.1) và *Enterobacter asburiae* strain LSRC90 (JF772078.1); và khoảng cách này tăng lên từ 0,003 khi so với các chủng

khác. Do vậy, chúng tôi tạm kết luận dòng H12 thuộc họ *Enterobacteriaceae* và tạm đặt tên là *Enterobacter* sp. H12. Dòng H12 cần thêm các dữ liệu sinh hóa và di truyền khác để xác lập tên la tinh chính xác.

Trình tự gen 16S rARN dòng H14 có quan hệ khá gần gũi với dòng *Klebsiella* khi so sánh trên GenBank (KC153267.1, HQ783348.1, HQ783422.1, HQ783281.1, DQ100465.1, AB681138.1, KC524425.1 và EF466143.1). Khoảng cách di truyền thấp nhất mà chúng tôi thu được là 0,004 (tức 0,4%) giữa H14 và *Klebsiella* sp. NBRC 100048 (AB681138.1). Khoảng cách này tăng dần lên nhưng vẫn gần với các dòng *Klebsiella* sp. Điều này đi đến kết luận H14 là *Klebsiella* sp. và chúng tôi đặt tên là *Klebsiella* sp. H14. *Klebsiella* sp. là nhóm có khả năng sinh tổng hợp PHB và đã được ứng dụng trong vài nghiên cứu để sản xuất PHB sử dụng mật rỉ đường làm cơ chất [8].



Hình 3: vị trí phân loài chủng vi khuẩn sinh tổng hợp PHB thu thập tại TP Hồ Chí Minh qua cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự vùng 16S RNA

Trình tự vùng 16S rARN của dòng H37 trùng khớp 100% với trên 50 dòng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus*, cụ thể là *Bacillus aryabhatai* và *Bacillus metagemium* (như KC934802.1, KC466246.1, JX971507.1, JX867734.1, HE821233.1, JN874761.1, JF895478.1 và FR746086.1). Hai chủng này thường nằm chung trong 2 cụm trên cây phát sinh chủng loài. Chúng cũng được sử dụng để sản xuất các polymer sinh học. Khoảng cách di truyền của dòng H37 và các chủng có quan hệ gần là 0% tính cho 1.292 vị trí phân tích. Do vậy, chúng tôi tạm kết luận H37 là *Bacillus* sp. H37.

So sánh trình tự 16S rARN của dòng H56 cho thấy, dòng H56 cũng thuộc họ vi khuẩn *Enterobacteriaceae*, có quan hệ gần với *Leclercia* sp. (GQ856079.1), *Enterobacter* sp. (HE662680.1), *Citrobacter* sp. (GU592531.1)... Khoảng cách di truyền giữa dòng H56 với các dòng khác thấp nhất là 0,01 (tức 1%). Điều này gợi ý H56 là *Enterobacter* sp. H56.

Dòng H61 khi phân tích cho thấy, trình tự 16S rARN cũng tương đồng với các dòng thuộc họ vi khuẩn đường ruột *Enterobacter*, trong đó có dòng *Enterobacter* sp. (JN644526.1, FJ868806.1, EF551364.1, CP003678.1, JN644608.1). Khoảng cách di truyền tính cho 1.441 bp với 22 trình tự họ *Enterobacter* cho thấy khoảng cách thấp nhất là 0,003 (tức 0,3%) là giữa dòng H61 và dòng *Enterobacter cloacae* strain GGT036 (CP009756.1). Trong phạm vi 22 trình tự phân tích, khoảng cách này chỉ tăng lên đến 0,005 và các dòng tương cận đều là *Enterobacter cloacae*. Điều này gợi ý H61 là chủng vi khuẩn *Enterobacter cloacae*. Do vậy, chúng tôi đặt tên chủng H61 là *Enterobacter cloacae* strain H62. Dòng *Enterobacter* sp. ít được chú ý trong sản xuất PHB, mãi gần đây, Samrot A.V và cs (2010) [9] mới báo cáo dòng *Enterobacter cloacae* SU-1 có khả năng tích lũy PHA mạch trung bình. Và gần đây nhất là 2 dòng *Enterobacter* khác là *Enterobacter* sp. SEL2 và *Enterobacteriaceae bacterium* sp. PFW1 được Naheed N và cs (2012) [10] sử dụng để lên men sinh tổng hợp PHB bằng mật rỉ đường.

Kết quả định danh phân tử dựa trên vùng 16S cho thấy, các chủng phân lập phân thành 2 nhóm: (1) nhóm *Enterobacter* gồm *Pseudomonas stutzeri* strain H6; *Enterobacter* sp. H12, *Klebsiella* sp. H14, *Enterobacter* sp. H56, *Enterobacter cloacae* strain H62 và (2) nhóm *Bacillus* bao gồm *Bacillus* sp. H37. Trong đó, chỉ có 2 dòng có thể định danh đến loài, số còn lại chỉ nhận diện đến chi. Điều này phù hợp với nhận định của Paradis (2005) [11] khi chứng minh rằng việc sử dụng vùng 16S rARN không giúp giải quyết vị trí phân loại chi tiết của nhóm *Enterobacter* bằng trình tự ADN của hai vùng kết hợp elongation factor Tu gene (tuf) và F-ATPase β -subunit gene (atpD).

Kết luận

Từ các vùng nước thải ở khu vực TP Hồ Chí Minh, chúng tôi phân lập, sàng lọc và định danh được 6 chủng vi khuẩn có khả năng sinh PHB là chủng *Pseudomonas stutzeri* strain H6, *Enterobacter* sp. H12, *Klebsiella* sp. H14, *Enterobacter* sp. H56, *Enterobacter cloacae* strain H62 và *Bacillus* sp. H37. Tuy nhiên, chưa có kết luận cụ thể về mức độ tăng trưởng và năng suất sinh tổng hợp PHB trong môi trường nuôi cấy dành cho sản xuất và cần có thêm các nghiên cứu sâu hơn về vấn đề này để xác định giá trị kinh tế và tiềm năng ứng dụng của chúng.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã tài trợ cho đề tài độc lập cấp nhà nước mã số ĐTĐL.2012.G/35 để thực hiện công trình này.

Tài liệu tham khảo

- [1] Volova T.G (2004), *Polyhydroxyalkanoates-plastic materials of the 21st century: production, properties, applications*, New York, NY: Nova publishers.
- [2] Kim B.S, Chang H.N (1995), "Control of glucose feeding using exit gas data and its application to the production of PHB from tapioca hydrolysate by *Alcaligenes eutrophus*", *Biotechnology Techniques*, **9(5)**, pp.311-314.
- [3] Tian P, Shang L, Ren H, Mi Y, Fan D, Jiang M (2009), "Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: current research and development", *African Journal of Biotechnology*, **8(5)**, pp.709-714.
- [4] Choi J.I, Lee S.Y (1997), "Process analysis and economic evaluation for Poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation", *Bioprocess Engineering*, **17(6)**, pp.335-342.
- [5] El-Sayed A.A, Abdelhady H.M, Abdel Hafez A.M, Khodair T.A (2009), "Batch Production of PHB by *Ralstonia eutropha* and *Alcaligenes latus* using bioreactor different culture strategies", *Journal of Applied Sciences Research*, **5(5)**, pp.556-564.
- [6] Liu M, González J.E, Willis L.B, Walker A.C (1998), "A novel screening method for isolating exopolysaccharide-deficient mutants", *Applied and Environmental Microbiology*, **64(11)**, pp.4600-4602.
- [7] Lee J.N, Shin H.D, Lee Y.H (2003), "Metabolic Engineering of Pentose Phosphate Pathway in *Ralstonia eutropha* for Enhanced Biosynthesis of Poly- β -hydroxybutyrate", *Biotechnology Progress*, **19(5)**, pp.1444-1449.
- [8] Zhang H, Obias V, Gonyer K, Dennis D (1994), "Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains", *Applied and Environmental Microbiology*, **60(4)**, pp.1198-1205.
- [9] Samrot A.V, Avinesh R.B, Sukeetha S.D, Senthilkumar P (2010), "Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Enterobacter cloacae* SU-1 during growth with two different carbon sources in batch culture", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **163(1)**, pp.195-203.
- [10] Naheed N, Jamil N, Hasnain S, Abbas G (2012), "Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in *Enterobacter* sp. SEL2 and *Enterobacteriaceae bacterium* sp. PFW1 using sugar cane molasses as media", *African Journal of Biotechnology*, **11(16)**, pp.3321-3332.
- [11] Paradis S, Boissinot M, Paquette N, Bélanger S.D, Martel, E.A, Boudreau D.K, Picard F.J, Ouellette M, Roy P.H, Bergeron M.G (2005), "Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase β -subunit", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, pp.2013-2025.