

Cloning of Polyhydroxybutyrate operon and Phage Φ x174 E Gene in Separate Plasmids and Analysis of E Gene Function in Facilitating Polyhydroxybutyrate Production in E.coli

Received: 14 July 2014

Revised: 3 December 2014

Accepted: 10 December 2014

ABSTRACT

Hadi Shirzad^{1*}
Mojtaba Saadati²
Vahid Kholghi Oskoei³

¹Assistant Professor, Technology Management Department, Police Sciences and Social Studies Institute, Tehran, Iran.

²Professor, Department of Biology, Emam Hossein University, Tehran, Iran.

³MSc, Research and Studies Organization of Police, Tehran, Iran.

Background: Polyhydroxybutyrate is a biodegradable plastic that has widespread application in various industries and in the field of medical equipment production. In E.coli, the most cost of Polyhydroxybutyrate production (PHB) is related to its extraction and purification processes. E gene of Phage Φ x174 with conformation of membrane tunnel is used for lysing the hosted bacteria. This study was conducted to investigate the function of E gene in conformation of membrane tunnel and release of produced PHB in E.coli.

Materials and Methods: In this study, after amplification with polymerase chain reaction (PCR), PHB operon was cloned by pUC18 while its expression controlled by operon promoter. E gene was amplified with PCR and cloned by pMR103 plasmid while its expression controlled by T7 promoter. Lysis process and conformation of membrane tunnel were evaluated by electronic microscope. Analysis of produced PHB was performed by gas chromatography and Sudan staining.

Results: With activation of E gene and lysis of bacteria, optical density of specimen decreased. In the analysis of bacterial debris which achieved from E.coli medium by electronic microscope, we observed membrane pores in lysed bacteria. The results of gas chromatography and Sudan staining showed that PHB granules have been released to medium by conformation of membrane tunnel.

Conclusion: Lysis E gene can be used for decreasing the cost and facilitating the extraction of PHB in E.coli that can be applied for manufacture of disposable medical and operating room equipment.

Keywords: bioplastic, polyhydroxybutyrate, E gene, E. coli

*Corresponding Author:

Hadi Shirzad

Tel: (+98)2181823741

e-mail: hadi_shirzad@yahoo.com

کلونینگ اپران پلی هیدروکسی بوتیرات و ژن E باکتریوفاژ در پلاسمیدهای جداگانه و بررسی عملکرد ژن E در تسهیل تولید پلی هیدروکسی بوتیرات در اشریشیا کولی

تاریخ پذیرش: ۱۹ آذر ۱۳۹۳

تاریخ اصلاح: ۱۲ آذر ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۲۳ تیر ۱۳۹۳

چکیده

مقدمه: بیوپلاستیک پلی هیدروکسی بوتیرات کاربرد گسترده در صنایع مختلف و ساخت تجهیزات پزشکی دارد. هزینه های استخراج و تخلیص پلی هیدروکسی بوتیرات در اشریشیا کولی، بخش اعظم هزینه های تولید را به خود اختصاص داده است. ژن E باکتریوفاژ Φ x174 با ایجاد تونل غشایی برای لیز باکتری میزبان استفاده می شود. هدف از انجام این مطالعه، بررسی عملکرد ژن E در ایجاد تونل غشایی و رهاسازی پلی هیدروکسی بوتیرات تولیدشده در اشریشیا کولی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، اپران پلی هیدروکسی بوتیرات بعد تکثیر اولیه با واکنش زنجیره پلی مرز توسط پلاسمید pUC18 کلون و تحت کنترل پروموتور اپران بیان شد. ژن E نیز پس از تکثیر با واکنش زنجیره پلی مرز توسط پلاسمید pMR103 کلون و تحت کنترل پروموتور T7 بیان گردید. برای بررسی تشکیل تونل غشایی در باکتری میزبان از میکروسکوپ الکترونی استفاده شد. ارزیابی پلی هیدروکسی بوتیرات تولیدی با کروماتوگرافی گازی و رنگ آمیزی سودان سیاه انجام شد.

یافته ها: با فعال شدن ژن E و لیز باکتری، جذب نوری نمونه کاهش یافت. در بررسی بقایای باکتریایی به دست آمده از محیط کشت باکتری نوترکیب با میکروسکوپ الکترونی، منافذ غشایی در باکتری های لیز شده دیده شد. نتایج رنگ آمیزی سودان سیاه و کروماتوگرافی گازی نشان داد که گرانول های پلی هیدروکسی بوتیرات در اثر ایجاد تونل های غشایی در محیط کشت آزاد شده است.

نتیجه گیری: ژن لیز E می تواند برای کاهش هزینه و تسهیل استحصال پلی هیدروکسی بوتیرات در باکتری در اشریشیا کولی به کار رود که می تواند در ساخت تجهیزات یکبار مصرف پزشکی و اتاق عمل مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه ها: بیوپلاستیک، پلی هیدروکسی بوتیرات، ژن E، باکتری E.coli

هادی شیرزاد^{۱*}مجتبی سعادت^۲وحید خلقی اسکوئی^۳

^۱استادیار، گروه مدیریت فن آوری، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، تهران، ایران.
^۲آستاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.
^۳کارشناسی ارشد، سازمان تحقیقات و مطالعات ناجا، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول:

هادی شیرزاد

تلفن: ۰۲۱۸۱۸۲۳۷۴۱ (+۹۸)

پست الکترونیک:

hadi_shirzad@yahoo.com

مقدمه

۳-۵. پلی هیدروکسی بوتیرات^۱ پلی استری با نقطه ذوب ۱۳۰ درجه بوده و کاملاً قابل تجزیه زیستی می باشد [۶ و ۷]. این پلیمر محصول جذب کربن است و توسط میکروارگانیسم ها به عنوان ذخیره زمانی که سایر منابع انرژی در دسترس نیستند، به کار می رود [۸]. ژن های بیوسنتزی پلی هیدروکسی بوتیرات باکتری رالستونیا یوتروفا که در سال ۱۹۸۸ کلون گردیده اند [۹]، در قالب یک اپران در

بیوپلاستیک ها که به نام پلاستیک های آلی نیز نامیده می شوند نوعی پلاستیک هستند که از فرآورده های گیاهی نظیر روغن های گیاهی، نشاسته ذرت، نشاسته نخودفرنگی و یا توسط میکروارگانیسم ها تولید می شوند [۲ و ۱] و قابل تجزیه زیستی بوده که کاربرد گسترده در ساخت تجهیزات الکترونیکی و پزشکی دارند [

به طور مشابه ناحیه موردنظر با استفاده از پرایمرهایی که دارای یک جایگاه برش NcoI در پایانه ۵' و یک جایگاه برش با آنزیم BamHI در پایانه ۳' بودند، تکثیر و با برش محصول PCR و پلاسمید pMR103 توسط آنزیم‌های BamHI و NcoI، ژن E در داخل pMR103 قرار داده شد [۱۹]. ژن E در پلاسمید pMR103 تحت کنترل پروموتور T7 بوده که با اضافه شدن ایزوپروپیل بتا-دی-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) و تحریک تولید T7 RNA polymerase، فعال می‌گردد. پلاسمیدهای نوترکیب حاصل، مطابق روش کلرید کلسیم ذکر شده در کتاب کلون کردن مولکولی [۲۰] به داخل باکتری حاوی اپران پلی هیدروکسی بوتیرات منتقل شدند. جهت انتخاب کلونی حاوی DNA موردنظر مجدداً از PCR کلونی‌های تشکیل شده استفاده گردید.

تحریک بیان ژن لیز E

یک تک کلونی از باکتری ترانسفورم حاوی ژن لیز E در ۳ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب رشد داده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از آن در ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت دارای کانامایسین رشد داده شد تا به جذب نوری OD_{490} ۰/۴ رسید. در ادامه ۳ میلی‌لیتر از آن به عنوان نمونه پیش از القا برداشته و به مابقی با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار IPTG اضافه شد. در نهایت به مدت ۲ ساعت در فواصل زمانی ۱۵ دقیقه‌ای از کشت باکتری، نمونه‌برداری انجام گرفت و جذب نوری ۶۰۰ nm آن‌ها تعیین گردید.

بررسی فرآیند لیز باکتری با میکروسکوپ الکترونی نگاره^۴ (SEM) از بقایای باکتریایی موجود در رسوب بدست آمده در محیط کشت، باکتری نوترکیب پس از القا توسط IPTG برای بررسی تشکیل تونل غشایی و احیاناً گرانول‌های پلی هیدروکسی بوتیرات باقی‌مانده در باکتری‌ها استفاده شد. ابتدا با استفاده از سانتریفوژ رسوب حاصل از مرحله قبل از محیط کشت جدا شد. سپس این رسوب به روش رقت متوالی الکل آبگیری شد و در الکل مطلق سوسپانسیون گردید. در ادامه جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره به دانشکده داروسازی دانشگاه تهران ارسال گردید.

بررسی کیفی پلی هیدروکسی بوتیرات در سلول با استفاده از رنگ‌آمیزی سودان سیاه

باکتری اشیریشیا کولی جهت سنتز پلی هیدروکسی بوتیرات استفاده می‌شوند [۱۰-۱۲]. هزینه‌های مربوط به خالص‌سازی و استحصال، بخش اعظم هزینه‌های تولید را در فرآیندهای زیستی به خود اختصاص می‌دهند. استفاده از ترکیبات شیمیایی و آنزیم‌ها جهت لیز باکتری اولاً هزینه بالایی را به فرآیند تحمیل می‌کند و ثانیاً خود به مراحل تخلیص می‌افزاید. روش‌های فیزیکی نیز مشکلات مربوط به دما و نیز برهم زدن ساختار گرانول‌های حاوی پلیمر را به همراه دارد [۱۳ و ۱۴]. باکتریوفاژ $\Phi x174$ دارای یک ژن لیز به نام E است [۱۵] که بیان این ژن چه از ژنوم باکتریوفاژ یا از پلاسمید، برای لیز کردن اشیریشیا کولی لازم و کافی است [۱۶]. محصول ژن E یک پروتئین تراغشایی با ۹۱ اسیدآمین و وزن مولکولی ۱۰۵۰۰ دالتون است [۱۷ و ۱۸]. این پروتئین، ساختمانی الیگومری تشکیل می‌دهد که به درون غشاهای داخلی و خارجی نفوذ می‌کند و تونلی را تشکیل می‌دهد [۱۸]. در مورد اشیریشیا کولی این تونل بین ۴۰ تا ۲۰۰ نانومتر قطر دارد. پس از باز شدن این تونل، محتوای سلولی باکتری از آن خارج می‌شود، در نتیجه فضای خالی باقی می‌ماند که عاری از اسیدهای نوکلئیک، ریبوزوم‌ها یا دیگر ترکیبات می‌باشد [۱۷]. اپران پلی هیدروکسی بوتیرات و ژن E به صورت همزمان در E.coli کلون و القاء لیز باکتری توسط ژن E و تولید پلی هیدروکسی بوتیرات نشان داده شده بود [۱۹]. در مقاله حاضر عملکرد ژن E در ایجاد تونل غشایی و لیز باکتری توسط میکروسکوپ الکترونی و ارزیابی پلی هیدروکسی بوتیرات تولیدشده مورد بحث قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

کلون کردن ژن لیز E و اپران پلی هیدروکسی بوتیرات در باکتری اشیریشیا کولی

به منظور کلون کردن اپران پلی هیدروکسی بوتیرات، نخست با استفاده از پرایمرهای دارای سایت برش، آنزیم EcoRI با تکنیک واکنش زنجیره پلی‌مراز^۱ (PCR) تکثیر شد. در ادامه بعد از برش محصول PCR و پلاسمید pUC18 با آنزیم EcoRI، به کمک DNA لیگاز T4 اپران پلی هیدروکسی بوتیرات در داخل pUC18 قرار داده شد [۱۹]. قطعه تکثیرشده در بردارنده هر سه ژن اپران PHB و نیز ناحیه پروموتوری مربوطه بود. برای کلون کردن ژن E

یافته‌ها

کلون کردن ژن لیز E و اپران پلی هیدروکسی بوتیرات در باکتری اشریشیا کولی

با تکثیر اپران پلی هیدروکسی بوتیرات با تکنیک PCR، قطعه‌ای به طول ۴۶۷۸ bp تشکیل شد. به منظور تأیید منطقه تکثیرشده، محصول PCR با آنزیم NdeI برش داده شد که دو قطعه ۱۰۷۱ نوکلئوتید و ۳۶۰۷ نوکلئوتید ایجاد کرد (شکل ۱). با تکنیک PCR ژن E تکثیر شد و یک قطعه ۲۶۷ bp ایجاد نمود. جهت اطمینان از تکثیر ناحیه موردنظر از آنزیم HindII استفاده گردید که دو قطعه با اندازه‌های ۸۹ و ۱۸۷ جفت بازی ایجاد کرد (شکل ۲). پس از انتقال پلاسمید نوترکیب حاوی ژن لیز E و پلاسمید حاوی اپران پلی هیدروکسی بوتیرات به باکتری اشریشیا کولی با تکنیک PCR، کلونی‌های ترانسفورم شده با پلاسمیدهای نوترکیب شناسایی شد.

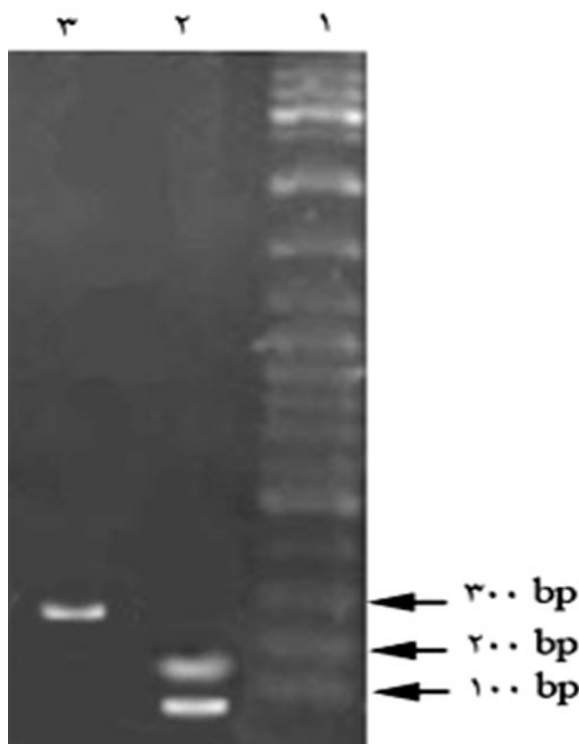
فعال سازی ژن لیز E با القا توسط IPTG

پس از تأیید انتقال پلاسمید نوترکیب دارای ژن E به باکتری، ژن E

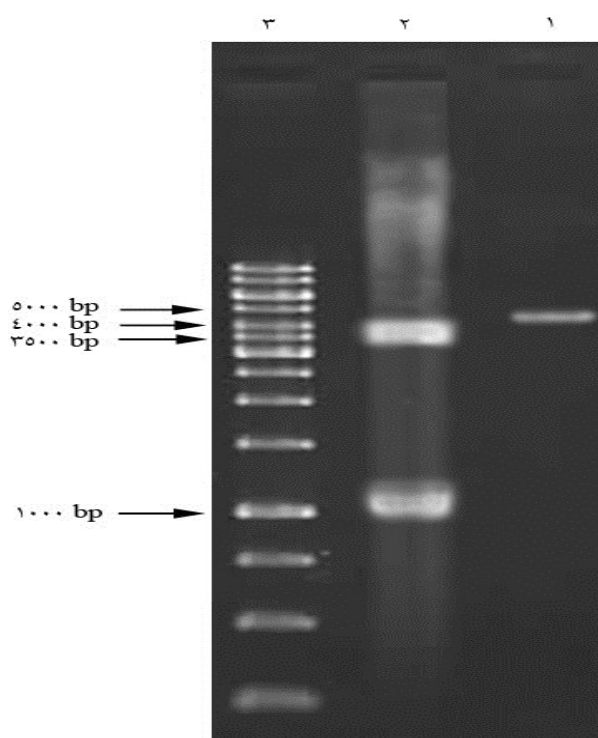
ابتدا گسترشی از باکتری موردنظر بعد از کشت تهیه شد. در ادامه به مدت ده دقیقه سودان سیاه به گسترش افزوده شد، با آب مورد شستشو قرار گرفت و سپس نمونه با زایلن شستشو شد. در مرحله بعدی نمونه با سافرانین ۵/۰ درصد به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه شستشو گردید و پس از آن با آب شسته شد. در نهایت نمونه رنگ آمیزی شده بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر مشاهده شد.

کروماتوگرافی گازی

جهت تعیین ماهیت گرانول‌های مشاهده شده از کروماتوگرافی گازی استفاده شد. در این روش، ابتدا ۵ ml از توده زیستی را جدا کرده و پس از انحلال در کلروفرم و هیدرولیز بیوپلیمر در محیط اسیدی، پلی هیدروکسی بوتیرات با استفاده از متانول به متیل استر بوتانوئیک اسید تبدیل شده و پس از جداسازی، فاز آلی حاوی متیل استر به دستگاه GC^۱ منتقل می‌شود. نتایج آن به صورت منحنی مشخص می‌گردد. در این روش، محاسبات بر مبنای نسبت سطح زیر پیک متیل استر به سطح زیر پیک استاندارد داخلی (اسید بنزوئیک) می‌باشد.

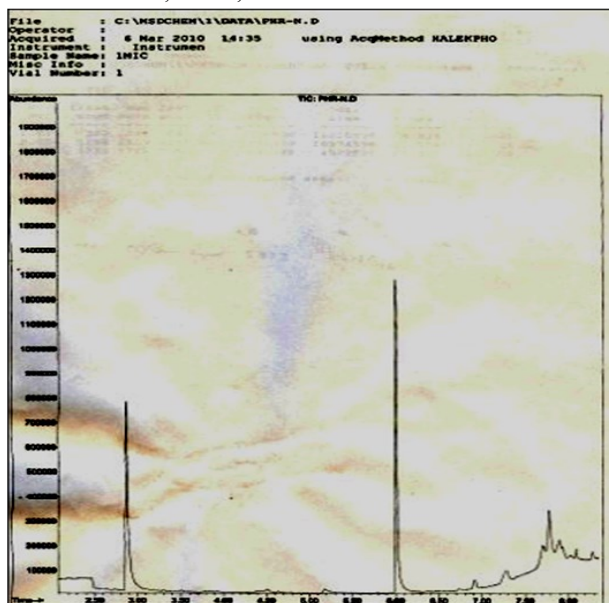


شکل ۲: تأیید قطعه‌ی ژنی E تکثیر شده توسط هضم آنزیمی. ستون ۱ مربوط است به اندازه نمای DNA (Laddeer 1kb, Fermentas, Russia) ستون ۲ محصول هضم آنزیمی و ستون ۳ محصول PCR می‌باشد.



شکل ۱: بررسی الگوی هضم آنزیمی اپران PHB تکثیر شده. ستون ۱ محصول PCR، ستون ۲ محصول هضم آنزیمی اپران تکثیر شده و ستون ۳ اندازه نمای DNA را نشان می‌دهد.

¹: Gas Chromatography

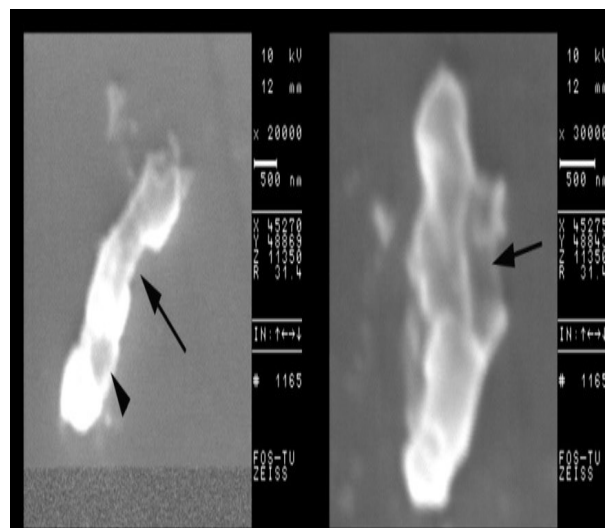


شکل ۴: نتایج مربوط به کروماتوگرافی گازی محصول PHB. قله‌ی زمان ۳ دقیقه مربوط است به مونومرهای حاصل از PHB، و قله‌ی زمان ۶ دقیقه مربوط است به اسید بنزوئیک که به عنوان کنترل داخلی به کار می‌رود.

مناسب پلاستیک‌ها مورد توجه قرار گرفتند اما هزینه‌های بالای فرآیند تولید مانع از جایگزینی این دسته از پلیمرها به جای پلاستیک‌های صنعتی شده است. این امر حتی با استفاده از سوبستراهای ارزان قیمت و میزبان‌های سریع رشدی نظیر اشریشیا کولی نیز هنوز مرتفع نشده است [۲۱-۲۳]. یکی از علل بالا بودن هزینه‌های تولید، هزینه‌های مربوط به استحصال و خالص سازی است [۲۴].

روش‌های گوناگونی جهت آزادسازی پلی هیدروکسی بوتیرات وجود دارد، اما این روش‌ها کیفیت پلیمر را پایین می‌آورند و خود هزینه‌ای به فرآیند می‌افزایند و در پاره‌ای موارد خود آلودگی را اضافه می‌کنند که بایستی مورد پالایش و حذف قرار گیرند و حتی بدتر از آن باعث آلودگی زیست‌محیطی گردند [۲۴-۲۶].

سیستم هضم با واسطه ژن E از باکتریوفاژ Phage Φx174 که با ایجاد تونل در غشای باکتری‌های گرم منفی به واسطه اختلاف فشار اسمزی منجر به تخلیه محتوای سلولی به بیرون و لیز باکتری می‌شود [۲۷]، به عنوان ابزار مناسبی برای آزادسازی فرآورده باکتری



شکل ۳: تصویر SEM از باکتری‌های لیز شده. پیکان‌ها تونل غشایی ایجاد شده را نشان می‌دهند. نوک پیکان شکل سمت چپ احتمالاً مربوط است به یک گرانول PHB باقی مانده در باکتری.

با القا توسط IPTG فعال شد. سپس جذب نوری نمونه اندازه‌گیری گردید. جذب نوری نمونه کاهش یافته بود که نشان از لیز باکتری‌ها در نتیجه فعال شدن ژن لیز E دارد.

تشکیل تونل‌ها در غشاء باکتری نو ترکیب توسط ژن لیز E در بررسی بقایای باکتریایی موجود در رسوب بدست آمده در محیط کشت باکتری نو ترکیب پس از القا توسط IPTG با میکروسکوپ الکترونی، منافذ ایجاد شده در غشای باکتری‌های لیز شده به وضوح به دیده می‌شد. همچنین گرانول پلی هیدروکسی بوتیرات که در داخل باکتری باقی مانده است، مشاهده شد (شکل ۳).

شناسایی گرانول‌های پلی هیدروکسی بوتیرات تولید شده در رنگ آمیزی سودان سیاه وجود گرانول‌های سیاه رنگ مشخص گردید. جهت تعیین ماهیت این گرانول‌ها از کروماتوگرافی گازی استفاده شد. با مقایسه کروماتوگرام به دست آمده برای نمونه مجهول تزریق شده به دستگاه کروماتوگرافی با کروماتوگرام مربوط به نمونه استاندارد ماهیت گرانول‌های مشاهده شده، تأیید شد (شکل ۴). با توجه به سطح زیر نمودار، مقدار پلیمر در حدود ۳ هزارم گرم در هر میلی لیتر می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری

بیوپلاستیک‌ها با توجه به قابلیت تجزیه زیستی، به عنوان جایگزین

7. Zhang S, Yasuo T, Lenz RW, Goodwin S. Kinetic and mechanistic characterization of the polyhydroxybutyrate synthase from *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules* 2000; 1: 244-51.
8. Madison LL, Huisman GW. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63: 21-53.
9. Schubert P, Krüger N, Steinbüchel A. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly (3-hydroxybutyrate) biosynthetic operon: identification of the N terminus of poly (3-hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter. *J bacteriol* 1991; 173: 168-75.
10. Gillespie TE, Flatt AE, Youm Y, Sprague BL. Biomechanical evaluation of metacarpophalangeal joint prosthesis designs. *J Hand Surg Am* 1979; 4: 508-21.
11. Schubert P, Steinbüchel A, Schlegel HG. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1988; 170: 5837-47.
12. Slater SC, Voige W, Dennis D. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J bacteriol* 1988; 170: 4431-6.
13. Resch S, Gruber K, Wanner G, Slater S, Dennis D, Lubitz W. Aqueous release and purification of poly (beta-hydroxybutyrate) from *Escherichia coli*. *J biotechnol* 1998; 65: 173-82.
14. Hori K, Kaneko M, Tanji Y, Xing XH, Unno H. Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. *Appl microbiol biotechnol* 2002; 59: 211-6.
15. Hutchison CA 3rd, Sinsheimer RL. The process of infection with bacteriophage phi-X174. X. Mutations in a phi-X Lysis gene. *J Mol Biol* 1966; 18: 429-47.
16. Henrich B, Lubitz W, Plapp R. Lysis of *Escherichia coli* by induction of cloned phi X174 genes. *Mol Gen Genet* 1982; 185: 493-7.
17. Hoffelner H, Haas R. Recombinant bacterial ghosts: versatile targeting vehicles and promising vaccine candidates. *Int J Med Microbiol* 2004; 294: 303-11.
18. Altman E, Young K, Garrett J, Altman R, Young R. Subcellular localization of lethal lysis proteins of bacteriophages lambda and phiX174. *J virol* 1985; 53: 1008-11.
19. Shirzad H, Saadati M, Sistani RN. Inverted metabolic engineering of *E. coli* to produce PHB and simplifying of lysis process, using gene E from phage PhiX174. *JAUMS* 2010; 7: 248-55. (Persian)
20. Sambrook J, Russell DW, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set). Cold Spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor, New York 2001; 10.

نوترکیب در بیوتکنولوژی مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه مشابه مشخص شد که گرانول های پلی هیدروکسی بوتیرات از طریق تونل غشایی ایجاد شده توسط ژن E خارج شده و اجزای پوششی باکتری را می توان با سانتیفریژ گرادینت چگالی جدا کرد [۱۳].

بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی بدست آمده از بقایای باکتریایی پس از القا با IPTG نشان داد که با فعال شدن ژن E، تونل های غشایی در سطح باکتری نوترکیب تشکیل شده است. بررسی های انجام شده با روش رنگ آمیزی سودان سیاه و کروماتوگرافی گازی نشان داد که پلی هیدروکسی بوتیرات تولید شده توسط باکتری نوترکیب به صورت گرانول در محیط کشت آزاد شده است. با توجه به اینکه لیز باکتری با ژن E روش بسیار ملایمی است، گرانول های پلی هیدروکسی بوتیرات تخریب نمی شود و غشای سلولی در حین تخلیص پلی هیدروکسی بوتیرات حذف می شود [۲۸].

نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که استفاده ژن لیز E می تواند در کاهش هزینه و تسهیل استحصال پلی هیدروکسی بوتیرات تولید شده توسط باکتری نوترکیب بکار گرفته شود که به واسطه این امر می تواند در ساخت تجهیزات یکبار مصرف پزشکی و اتاق عمل مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Chua H, Yu PH, Ma CK. Accumulation of biopolymers in activated sludge biomass. *Appl Biochem Biotech* 1999; 77-79: 389-99.
2. Kim HM, Ryu KE, Bae K, Rhee YH. Purification and characterization of extracellular medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Pseudomonas* sp. RY-1. *J Biosci Bioeng* 2000; 89: 196-8.
3. Peelman N, Ragaert P, De Meulenaer B, Adons D, Peeters R, Cardon L, et al. Application of bioplastics for food packaging. *Trends Food Sci Tech* 2013; 32: 128-41.
4. Wu Q, Wang Y, Chen GQ. Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2009; 37: 1-12.
5. Philip S, Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2007; 82: 233-47.
6. Qi Q, Rehm BH. Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. *Microbiology* 2001; 147: 3353-8.

21. Suriyamongkol P, Weselake R, Narine S, Moloney M, Shah S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. *Biotechnol Adv* 2007; 25: 148-75.
22. Choi J-i, Lee SY, Han K. Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4897-903.
23. Hori K, Kaneko M, Tanji Y, Xing XH, Unno H. Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. *Appl microbiol biotechnol* 2002; 59: 211-6.
24. Hejazi P, Vasheghani-Farahani E, Yamini Y. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly(beta-hydroxybutyrate) recovery. *Biotechnol Prog* 2003; 19: 1519-23.
25. Chen Y, Chen J, Yu C, Du G, Lun S. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant–chelate aqueous system. *Process Biochem* 1999; 34: 153-7.
26. Ojumu T, Yu J, Solomon B. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. *Afr J Biotechnol* 2004; 3: 18-24.
27. Young KD, Young R. Lytic action of cloned phi X174 gene E. *J virol* 1982; 44: 993-1002.
28. Schroll G, Resch S, Gruber K, Wanner G, Lubitz W. Heterologous phi X174 gene E-expression in *Ralstonia eutropha*: E-mediated lysis is not restricted to gamma-subclass of proteobacteria. *J biotechnol* 1998; 66: 211-7.

