

УДК 579.6

Synthesis and Intracellular Degradation of P(3HB)/DEG Copolymers by *Cupriavidus eutrophus* B-10646

Natalia O. Zhila*

*Institute of Biophysics SB RAS
50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia
Siberian Federal University
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia*

Received 28.12.2015, received in revised form 13.02.2016, accepted 01.05.2016

*The study addresses synthesis and intracellular degradation of copolymers consisting of 3-hydroxybutyrate and diethylene glycol (P(3HB)/DEG) by *Cupriavidus eutrophus* B-10646. DEG addition to the medium at concentrations of 10-30 g/L did not influence the yields of biomass and polymer. During intracellular degradation, content of P(3HB)/DEG copolymers and homopolymer P(3HB) decreased at 1.1-1.2 and 1.8 times respectively. Bacterial cells grown in the medium with DEG synthesized copolymer consisting of polymer fractions with low molecular weight (62-217 kDa) and high molecular weight (2810-4860 kDa), whose contents were 78.1-96.4 % and 3.6-21.9 %, respectively, depending on the culture growth phase. DEG addition to the medium caused changes in the content of fatty acids of intracellular lipids, increasing their saturation.*

Keywords: P(3HB)/DEG copolymers, molecular weight, intracellular degradation, fatty acids.

DOI: 10.17516/1997-1389-2016-9-2-136-144.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: lhab@ibp.ru

Синтез и внутриклеточная деградация сополимеров П(ЗГБ)/ДЭГ в культуре природного штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646

Н.О. Жила

Институт биофизики СО РАН
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50
Сибирский федеральный университет
Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

Исследован синтез и внутриклеточная деградация диблок-сополимеров 3-гидроксибутирата и диэтиленгликоля (П(ЗГБ)/ДЭГ) культурой Cupriavidus eutrophus B-10646. Показано, что добавление ДЭГ в среду в концентрации 10-30 г/л не влияло на общий выход биомассы клеток и полимера. Установлено, что сополимеры с ДЭГ в меньшей степени, чем гомополимер П(ЗГБ), подвергаются внутриклеточной деградации (их содержание снижалось соответственно в 1.1-1.2 и 1.8 раза). Синтезируемые бактериями сополимеры П(ЗГБ)/ДЭГ состояли из низкомолекулярной (62-217 кДа) и высокомолекулярной (2810-4860 кДа) фракций, содержание которых равнялось соответственно 78.1-96.4 и 3.6-21.9 % в зависимости от фазы роста культуры. Показано увеличение насыщенности внутриклеточных липидов Cupriavidus eutrophus B-10646, растущих в присутствии ДЭГ.

Ключевые слова: сополимеры П(ЗГБ)/ДЭГ, молекулярная масса, внутриклеточная деградация, жирные кислоты.

Введение

Перечень известных природных полимеров гидроксипроизводных алкановых кислот (полигидроксиалканоев – ПГА) постоянно пополняется. В зависимости от набора и соотношения мономеров, образующих ПГА, их базовые свойства значительно изменяются (Sudesh et al., 2000; Chanprateep, 2010; Chen, 2010; Volova et al., 2013). Это делает актуальным поиск штаммов и условий для синтеза новых типов полимеров этого класса.

Полиэтиленгликоли (ПЭГ), включая диэтиленгликоль (ДЭГ), являясь нейтральными водорастворимыми относительно нетоксичными полиэфирами, могут агрегироваться с фосфолипидами и белками. С 1996 г. стали

появляться работы, посвященные изучению микробиологического синтеза сополимеров ПГА/ПЭГ. Установлено, что при добавлении в среду ПЭГ возможен микробиологический синтез ПГА нового типа с образованием диблока ПГА/ПЭГ, где карбоксильный конец (-COOH) цепей ПГА ковалентно связан эфирной связью с цепью ПЭГ. Это явление было названо «PEGylation» (Foster, 2007).

У большинства бактерий биосинтез и эндогенная деградация ПГА представляют собой циклический метаболический процесс. В условиях дефицита по углероду и избытка азота, необходимого для синтеза основных клеточных макромолекул (белков, нуклеиновых кислот), клеточный пул ПГА вовлекает-

ся в метаболизм, в ходе которого полимеры разрушаются под действием внутриклеточных деполимераз и используются клетками в качестве источника энергии и углерода. Эндогенный метаболизм ПГА затрудняет получение общих высоких выходов полимеров и влияет на содержание в них отдельных мономеров. Известно, что ПГА-деполимеразы характеризуются относительной субстратной специфичностью. Так, например, ПГА-деполимеразы *Hydrogenophaga pseudoflava* обладают специфичностью к следующим мономерам, снижающейся в ряду ЗГБ>ЗГВ>4ГБ (Yoon and Choi, 1999). ПГА-деполимеразы *Pseudomonas oleovorans* характеризуются различной специфичностью по отношению к короткоцепочечным и среднецепочечным ПГА, а также обладают несходной структурой (Stuart et al., 1996; Foster et al., 1996). В литературе есть только одна публикация, в которой исследована внутриклеточная деградация сополимеров, содержащих ПЭГ, а именно П(ЗГБ/ЗГВ)/ПЭГ200, в которой показано, что деградация П(ЗГБ/ЗГВ)/ПЭГ200 происходила в меньшей степени, чем П(ЗГБ) и сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) (Saha et al., 2007).

Цель данной работы – исследование биосинтеза и эндогенной деградации диблок сополимеров П(ЗГБ)/ДЭГ в культуре *Cupriavidus eutrophus* B-10646 и анализ влияния ДЭГ на молекулярную массу сополимера и состав жирных кислот внутриклеточных липидов.

Материалы и методы

В работе использовали штамм водород-окисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646, депонированный в ВКПМ, которые выращивали в разработанных режимах синтеза и деградации полимера, определяемых вносимыми в культуру потоками углеродного субстрата и азота (Волова и др., 1992; Volova et al., 2013, 2014). На первом этапе бактерии

культивировали с лимитированным содержанием азота в среде (50 % от потребностей культуры в элементе) в режиме максимальной аккумуляции полимера. На 72-й ч культивирования в среду добавляли хлорид аммония (1 г/л) для инициирования процесса деградации полимера. В качестве углеродного субстрата использовали фруктозу, поддерживая ее концентрацию в среде на уровне 10-13 г/л и снижая до 1-2 г/л в фазу деградации полимера. Для получения сополимеров П(ЗГБ)/ДЭГ в культуру на 24-й ч культивирования добавляли диэтиленгликоль (ДЭГ) (ОАО «Нижнекамскнефтехим», Россия) в концентрации 10, 20 или 30 г/л. Все эксперименты проведены в трех повторностях.

Урожай биомассы клеток в ходе развития культуры бактерий регистрировали по весу сухого вещества и оптическим показателям культуры. Концентрацию фруктозы в среде анализировали резорциновым методом. Содержание и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890A (США). Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (США) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия). Находили средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность ($PD = M_w/M_n$). Содержание ДЭГ в сополимере определяли 1H ЯМР спектроскопией растворов ПГА на ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III 600 (Германия) в Красноярском региональном центре коллективного пользования СО РАН.

Липиды экстрагировали из биомассы смесью хлороформ-метанол (2:1) по методу Фолча. В конечном экстракте полимер от-

деляли от липидов осаждением при добавлении двойного объема гексана. Метанолиз жирных кислот проводили в смеси метанола и серной кислоты (50:1 по объему) в течение 2 ч при 90 °С. Анализ МЭЖК осуществляли на хромато-масс-спектрометре GC-MS 7890/5975C (Agilent Technologies, США). Идентификацию ЖК проводили по масс-спектрам и сравнением их времен удерживания с такими имеющимися стандартов (Serva, Германия и Sigma, США). Основные методы анализа липидов и жирных кислот подробно описаны в наших работах (Kalacheva and Volova, 2007; Kalacheva et al., 2002).

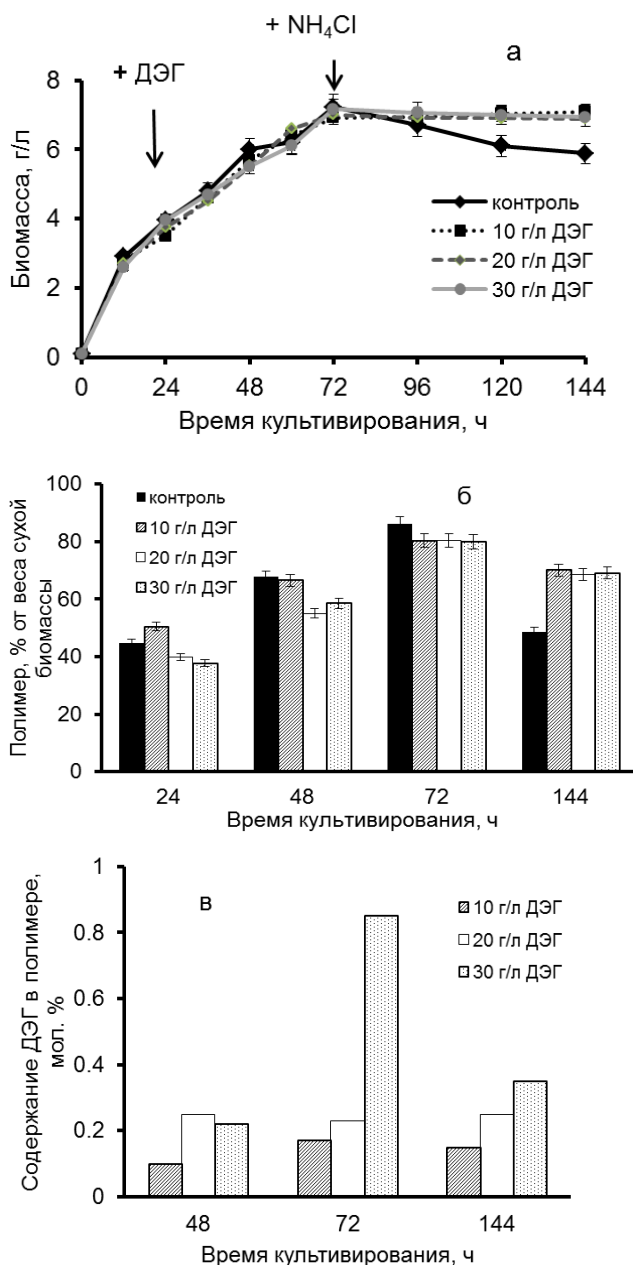
Результаты и обсуждение

Исследовано влияние различных концентраций ДЭГ (10-30 г/л) на урожай биомассы, общий выход сополимера, молекулярный вес и включение мономеров ДЭГ в полимер. Добавление ДЭГ в среду не влияло на рост бактерий и синтез полимера на первом этапе, когда в культуру подавали полную питательную среду и лимитированную концентрацию азота (50 % от физиологической потребности). К концу первой фазы культивирования (фаза синтеза полимера) урожай биомассы и содержание полимера составляли соответственно 7.0-7.2 г/л и 79-86 % от веса сухой биомассы (рис.). Однако к концу второй фазы культивирования, когда в клетках неизбежно проявляются процессы внутриклеточной деградации полимера, отмечены существенные различия показателей культур, растущих в присутствии в среде ДЭГ или без него (контрольная культура). В контрольной культуре к концу второй фазы концентрация клеток снизилась на 20 % до 5.88 г/л, а содержание сополимера упало в 1.8 раз, до 49 % от веса сухой биомассы. В отличие от контрольной культуры в культуре бактерий, растущих в присутствии ДЭГ, отмечено снижение пула полимера до

69-70 % (от веса сухой биомассы). Урожай биомассы клеток при этом практически не изменялся, составляя 6.8-6.9 г/л.

Показано, что с увеличением концентрации ДЭГ в среде росло и содержание ДЭГ в сополимере П(3ГБ)/ДЭГ (рис.). Так, на 72-м ч культивирования содержание ДЭГ в полимере составляло 0.17, 0.23 и 0.85 мол. % при концентрации ДЭГ в среде 10, 20 и 30 г/л соответственно. К концу фазы внутриклеточной деградации содержание ДЭГ практически не изменилось при концентрации ДЭГ в среде 10 и 20 г/л, однако при увеличении концентрации ДЭГ до 30 г/л содержание ДЭГ в полимере снизилось до 0.35 мол. %.

Добавление ДЭГ в культуру привело к синтезу полимера, представленного двумя фракциями (низкомолекулярной (НМ), 62-217 кДа и высокомолекулярной (ВМ), 2810-4860 кДа) (табл. 1). Распределение фракций полимера НМ и ВМ было неодинаковым в течение культивирования: на 48-й ч культивирования доля ВМ и НМ фракций составляла соответственно около 20 и 80 %. К концу первой фазы культивирования бактерий (72 ч) доля ВМ-фракции снизилась до 4.2-5.4 %. Гетерогенность полимера по величине молекулярной массы описана и другими авторами для бактерий *Alcaligenes latus* DSM 1122 и *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17699 при росте на среде, содержащей ПЭГ-200 (Ashby et al., 1999). Кроме того, известно, что с увеличением концентрации ДЭГ в среде происходит снижение молекулярной массы низкомолекулярной фракции полимера, что согласуется с данными других авторов, показавших снижение Мв полимера при добавлении ДЭГ в среду (Shi et al., 1996; Ashby et al., 1997; Zanzig et al., 2003; Sanguanchairaiwong et al., 2004). В фазе внутриклеточной деградации полимера произошло снижение доли высокомолекулярной фракции, что, возможно, связано как с



Динамика биомассы (а) бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646, содержания полимера (б) и диэтиленгликоля (ДЭГ) в сополимере П(3ГБ)/ДЭГ (в) в ходе накопления (до 72-го ч) и внутриклеточной деградации (после 72-го ч) полимеров при культивировании с различными концентрациями ДЭГ в среде

распадом полимера с высокой молекулярной массой, так и с синтезом низкомолекулярного полимера. Ресинтез полимера во время внутриклеточной деградации полимера был показан нами ранее (Жила и др., 2015). В кон-

трольной культуре зарегистрированное снижение M_w полимера практически в два раза (от 1506 до 804 кДа) к концу 1-го этапа культивирования согласуется с ранее полученными данными других авторов для бактерий

Таблица 1. Показатели молекулярной массы (Мв, кДа) и полидисперсности (ПД) П(ЗГБ) и сополимеров П(ЗГБ)/ДЭГ во время синтеза (до 72-го ч) и внутриклеточной деградации (144-й ч) полимера у бактерии *Cupriavidus eutrophus* B-10646, культивируемой при различных концентрациях диэтиленгликоля (ДЭГ) в среде

Время, ч	10 г/л ДЭГ			20 г/л ДЭГ			30 г/л ДЭГ			контроль	
	Мв	ПД	Фракция, %	Мв	ПД	Фракция, %	Мв	ПД	Фракция, %	Мв	ПД
24-й ч	1500	2.58	100	1660	2.52	100	1630	2.55	100	1560	2.54
48-й ч	3160	1.30	19.5	2900	1.39	21.9	2810	1.43	21.9	1200	3.55
	217	2.92	80.5	138	3.33	78.1	113	3.54	78.1		
72-й ч	4300	1.14	4.4	4110	1.18	5.4	4860	1.16	4.2	804	3.95
	138	2.33	95.6	89	2.18	94.6	67	2.17	95.8		
144-й ч	4080	1.18	3.9	4240	1.15	3.6	4250	1.17	3.8	936	3.32
	134	2.23	96.1	89	2.24	96.4	62	2.15	96.2		

Alcaligenes eutrophus и *Pseudomonas putida* (Shimizu et al., 1993; Hori et al., 1994; Taidi et al., 1995; Tanadchangsang and Yu, 2012). Увеличение Мв полимера до 936 кДа на 2-м этапе, по всей видимости, связано с распадом фрагментов цепей П(ЗГБ) с низкой молекулярной массой.

В ходе исследования физиологического состояния культуры *C. eutrophus* B-10646, находящейся в режиме синтеза и внутриклеточной деградации П(ЗГБ)/ДЭГ, изучено влияние ДЭГ на состав жирных кислот липидов (ЖК), которые во многом определяют состояние и проницаемость цитоплазматической мембраны прокариот. Следует отметить, что данных о влиянии ПЭГ в процессе PEGylation и синтеза ПГА/ПЭГ на состояние клеточных мембран и на величину включения ПЭГ в ПГА/ПЭГ в литературе не представлено. Вместе с тем в 80-90-х гг. прошлого столетия при изучении физиологической роли ПЭГ было показано, что он влияет на проницаемость мембран в результате адсорбции клеточными мембранами, связываясь с головными группами фосфолипидов, которые поддерживают текучесть мембраны (Yamazaki and Ito, 1990).

Установлено, что к концу первого этапа культивирования бактерий в среде с ДЭГ

сумма циклопропановых и насыщенных ЖК (за счет 14:0, 16:0) увеличивается на фоне снижения ненасыщенных кислот (16:1 ω 7, 18:1 ω 7) (табл. 2). В результате этого насыщенность липидов в целом возрастала от 2.65 до 3.23-3.28. Этот эффект зарегистрирован нами ранее в культурах *R. eutropha* B5786, *C. eutrophus* B-10646 в режиме аккумуляции ПГА по мере старения и возрастания внутриклеточного пула полимера (Kalacheva and Volova, 2007; Zhila et al., 2015). При сочетанном воздействии на культуру, синтезирующую ПГА, постороннего ингибитора (монооксида углерода как компонента синтез-газа) и лимитирования по азоту насыщенность липидов возрастала в 2.0-2.7 раза за счет снижения содержания ненасыщенных жирных кислот (в основном пальмитолеиновой, С16:1) и повышения насыщенных (пальмитиновой С16:0) и С17- и С19-циклопропановых кислот (Volova et al., 2015). Известно, что такое перераспределение в составе ЖК микроорганизмов влияет на текучесть и проницаемость мембраны, обеспечивая повышение ее «жесткости» и устойчивости к воздействию неблагоприятных факторов и снижению проницаемости для ингибирующих субстратов. В данной работе установлено, что в период внутрикле-

Таблица 2. Состав жирных кислот внутриклеточных липидов бактерии *Cupriavidus eutrophus* B-10646, культивируемой при различных концентрациях диэтиленгликоля (ДЭГ) в среде (% от суммы жирных кислот)

Жирная кислота	Стадия синтеза полимера (72-й ч)				Стадия деградации полимера (144-й ч)			
	10 г/л ДЭГ	20 г/л ДЭГ	30 г/л ДЭГ	контроль	10 г/л ДЭГ	20 г/л ДЭГ	30 г/л ДЭГ	контроль
14:0	1.08	0.94	0.85	0.63	0.67	0.77	0.62	1.29
16:1 ω 7	5.93	6.28	5.62	5.42	5.59	4.67	3.30	6.29
16:0	64.99	66.62	60.99	59.11	49.62	52.38	57.35	57.39
c-17:0*	8.40	7.10	12.49	9.69	16.51	18.56	13.59	11.14
18:1 ω 9	0.10	0.18	0.15	0.08	0.15	0.18	0.23	0.13
18:1 ω 7	13.86	13.65	14.55	18.37	19.27	16.28	16.60	16.10
18:0	1.24	1.25	1.07	2.22	2.29	1.56	1.74	1.74
c-19:0*	0.30	0.54	1.04	0.68	3.11	2.29	2.90	1.17
Другие**	4.10	3.44	3.24	3.80	2.79	3.31	3.67	4.75
Σ циклопропановые	8.70	7.64	13.53	10.37	19.62	20.85	16.49	12.31
Σ насыщ./ Σ ненасыщ.	3.23	3.19	3.28	2.65	2.60	3.11	3.20	2.68

* - циклопропановая жирная кислота.

** - 14:1 ω 5, 15:0, 15:1 ω 6, 16:1 ω 5, 17:0, 17:1 ω 9

насыщ. – насыщенные жирные кислоты, включая циклопропановые жирные кислоты, ненасыщ. – ненасыщенные жирные кислоты.

точной деградации блок-сополимера П(ЗГБ)/ДЭГ произошли изменения в составе ЖК внутриклеточных липидов бактерий главным образом за счет снижения кислот С16 ряда и увеличения ЖК С18 ряда и циклопропановых кислот, что привело к незначительному снижению насыщенности внутриклеточных липидов. Увеличение циклопропановых ЖК также отмечено и в контрольной культуре.

Заключение

Показано, что бактерии *Cupriavidus eutrophus* B-10646 при росте в присутствии ДЭГ синтезируют сополимеры П(ЗГБ)/ДЭГ с содержанием ДЭГ 0.1-0.85 мол. %. В период внутриклеточной деградации наибольшие

изменения, заключающиеся в снижении биомассы и в большей степени содержания полимера, отмечены в контрольной культуре. Синтезированы образцы сополимера П(ЗГБ)/ДЭГ и установлено, что он гетерогенен по молекулярно-массовым характеристикам и представлен двумя фракциями: низкомолекулярной (62-217 кДа) и высокомолекулярной (2810-4860 кДа), доля которых менялась в зависимости от фазы роста культуры. Добавление ДЭГ в среду привело к увеличению насыщенности внутриклеточных липидов *Cupriavidus eutrophus* B-10646 за счет жирных кислот 14:0, 16:0 на фоне снижения содержания моноеновых кислот (16:1 ω 7, 18:1 ω 7).

Работа выполнена за счет средств государственного задания на проведение фундаментальных исследований РАН (проект № гос. регистрации 01201351505).

Список литературы

Волова Т.Г., Калачева Г.С., Константинова В.М., Пузырь А.П. (1992) Влияние условий роста на накопление полиоксибутирата водородными бактериями. *Прикладная биохимия и микробиология*, 28: 221-232 [Volova T.G., Kalacheva G.S., Konstantinova V.M., Puzyr A.P. (1992) Effect of growth conditions on polyhydroxybutyrate accumulation by hydrogen bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology* [Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya], 28: 221-232 (in Russian)].

Жила Н.О., Калачева Г.С., Волова Т.Г. (2015) К вопросу о внутриклеточной деградации полигидроксibuтирата. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*, 8: 220-235 [Zhila N.O., Kalacheva G.S., Volova T.G. (2015) To the question about intracellular polyhydroxybutyrate degradation. *Journal of Siberian Federal University. Biology* [Zhurnal Sibirskogo federalnogo universiteta. Biologiya], 8: 220-235 (in Russian)].

Ashby R.D., Shi F., Gross R.A. (1997) Use of poly(ethylene glycol) to control the end group structure and molecular weight of poly(3-hydroxybutyrate) formed by *Alcaligenes latus* DSM 1122. *Tetrahedron*, 53: 15209-15223.

Ashby R.D., Shi F., Gross R.A. (1999) A tunable switch to regulate the synthesis of low and high molecular weight microbial polyesters. *Biotechnol. Bioeng.*, 62: 106-113.

Chanprateep S. (2010) Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng.*, 110: 621-632.

Chen G.-Q. (2010) Industrial production of PHA. *Plastics from bacteria. Natural functions and applications*. Chen G.-Q., Steinbüchel A. (eds.) Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, p. 121-132.

Foster L.J.R., Stuart E.S., Tehrani A., Lenz R.W., Fuller R.C. (1996) Intracellular depolymerase and polyhydroxyalkanoate granule integrity in *Pseudomonas oleovorans*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 19: 177-183.

Foster L.J.R. (2007) Biosynthesis, properties and potential of natural-synthetic hybrids of polyhydroxyalkanoates and polyethylene glycols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75: 1241-1247.

Hori K., Soga K., Doi Y. (1994) Effects of culture conditions on molecular weights of poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from octanoate. *Biotechnol. Lett.*, 16: 709-714.

Kalacheva G.S., Volova T.G. (2007) Fatty acid composition of *Wautersia eutropha* lipids under conditions of active polyhydroxyalkanoates synthesis. *Microbiology*, 76: 535-540.

Kalacheva G.S., Zhila N.O., Volova T.G. (2002) Lipid and hydrocarbon compositions of collection and wild sample of the green microalga *Botryococcus*. *Aquat. Ecol.*, 36: 317-330.

Saha S.P., Patra A., Paul A.K. (2007) Studies on intracellular degradation of polyhydroxyalkanoic acid-polyethylene glycol copolymer accumulated by *Azotobacter chroococcum* MAL-201. *J. Biotechnol.*, 132: 325-330.

Sanguanchaipaiwong V., Gabelish C.L., Hook J., Scholz C., Foster L.J.R. (2004) Biosynthesis of natural-synthetic hybrid copolymers: polyhydroxyoctanoate-diethylene glycol. *Biomacromolecules*, 5: 643-649.

Shi F., Ashby R., Gross R.A. (1996) Use of poly(ethylene glycol)s to regulate poly(3-hydroxybutyrate) molecular weight during *Alcaligenes eutrophus* cultivations. *Macromolecules*, 29: 7753-7758.

Shimizu H., Tamura S., Shioya S., Suga K.-I. (1993) Kinetic study of poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (PHB) production and its molecular weight distribution control in a fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Ferment. Bioeng.*, 76: 465-469.

Stuart E.S., Foster L.J.R., Lenz R.W., Fuller R.C. (1996) Intracellular depolymerase functionality and location in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing polyhydroxyalkanoate. *Int. J. Biol. Macromol.*, 19: 171-176.

Sudesh K., Abe H., Doi Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, 25: 1503-1555.

Taidi B., Mansfield D.A., Anderson A.J. (1995) Turnover of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.*, 129: 201-206.

Tanadchangsaeng N., Yu J. (2012) Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. *Biotechnol. Bioeng.*, 109: 2808–2818.

Volova T.G., Kiselev E.G., Shishatskaya E.I., Zhila N.O., Boyandin A.N., Syrvacheva D.A., Vinogradova O.N., Kalacheva G.S., Vasiliev A.D., Peterson I.V. (2013) Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO₂ and H₂ of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646. *Bioresour. Technol.*, 146: 215-222.

Volova T., Kiselev E., Vinogradova O., Nikolaeva E., Chistyakov A., Sukovaty A., Shishatskaya E. (2014) A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus eutrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs. *PLoS One*, 9: 1-15.

Volova T.G., Zhila N.O., Shishatskaya E.I. (2015) Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) by the autotrophic CO-oxidizing bacterium *Seliberia carboxydohydrogena* Z-1062. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 1377-1387.

Yamazaki M., Ito T. (1990) Deformation and instability in membrane structure of phospholipid vesicles caused by osmophobic association: mechanical stress model for the mechanism of poly(ethylene glycol) induced membrane fusion. *Biochemistry*, 29: 1309-1314.

Yoon S.C., Choi M.H. (1999) Local sequence dependence of polyhydroxyalkanoic acid degradation in *Hydrogenophaga pseudoflava*. *J. Biol. Chem.*, 274: 37800-37808.

Zanzig J., Marimuthu B., Werka J., Scholz C. (2003) Investigation of the impact of poly(ethylene glycol)-modulation of poly(b-hydroxybutyrate) synthesis on cell interactions of the resulting polymers. *J. Bioact. Compat. Polym.*, 18: 339-354.

Zhila N., Kalacheva G., Volova T. (2015) Fatty acid composition and polyhydroxyalkanoates production by *Cupriavidus eutrophus* B-10646 cells grown on different carbon sources. *Process Biochem.*, 50: 69-78.