

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
институт  
Базовая кафедра биотехнологии  
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Т.Г. Волова

подпись                      инициалы, фамилия

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_ г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Влияние источников углеродного питания на синтез полимера и состав  
жирных кислот липидов водородоокисляющих бактерий *Cupriavidus  
eutrophus B-10646*

тема

06.04.01 Биология

код и наименование направления

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

код и наименование магистерской программы

Научный руководитель	_____	Зав. Лаб., <u>к.б.н.</u>	<u>Г.С. Калачева</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Научный руководитель	_____	н.с., <u>к.б.н.</u>	<u>Н.О. Жила</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>К.С. Касаткин</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	Зам. Дир., профессор, <u>д.б.н.</u>	<u>Н.Н.Сущик</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2016

## СОДЕРЖАНИЕ

Реферат .....	3
Глава 1. Обзор литературы.....	6
1.1 Водородные бактерии.....	6
1.2 Липиды микроорганизмов .....	7
1.3 Жирные кислоты .....	10
1.4 Основные характеристики ПГА .....	15
1.5 Биосинтез ПГА .....	18
1.6 <i>Cupriavidus eutrophus</i> В-10646, как продуцент ПГА .....	20
Глава 2. Материалы и методы.....	25
2.1 Бактериальный штамм, среда и условия роста.....	25
2.2. Измерение параметров процесса.....	26
2.3. Анализ ПГА структуры .....	26
2.4. Анализ молекулярного веса ПГА.....	27
2.5. Анализ липидов и жирных кислот .....	27
2.6 Статистика .....	29
Глава 3. Результаты и обсуждения .....	30
3.1 Рост и синтез полимера <i>C. eutrophus</i> В-10646 на разных субстратах с добавлением валериановой кислоты.....	30
3.2 Рост и синтез полимера <i>C. eutrophus</i> В-10646 на разных субстратах с добавкой пропионовой кислоты.....	41
Заключение .....	46
Список использованной литературы.....	49

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Влияние источников углеродного питания на синтез полимера и состав жирных кислот липидов водородоокисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646» содержит 52 страниц текстового документа, 34 использованных источников, 7 таблиц, 10 рисунков.

Цель работы:

Изучить влияния источников углеродного питания на накопление полимера и состав жирных кислот липидов водородоокисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646.

*CUPRIAVIDUS EUTROPHUS*, ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ, ЛИПИДЫ, ПОЛИМЕР, ВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ, ПГА, ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ-3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТ)

Задачи:

1. Освоить методы культивирования водородоокисляющих бактерий *C. eutrophus* В-10646 в периодической культуре
2. Изучить динамику накопления биомассы и полимера в условиях периодической культуры *C. eutrophus* В-10646 на разных углеродных субстратах.
3. Определить содержание липидов на разных углеродных субстратах и провести качественный анализ липидов с помощью метода тонкослойной хроматографии
4. Идентифицировать состав жирных кислот с помощью метода ГЖ-МС, и изучить влияние разных углеродных субстратов на состав жирных кислот липидов.

Актуальность работы:

Бактерии *C. eutrophus* В-10646 являются продуцентам ПГА, способные синтезировать полимеры с высоким выходом. Синтез ПГА у *C. eutrophus* тесно связан с метаболизмом липидов, особенно, если в качестве субстратов используются длинноцепочечные ЖК. Бактерии *Cupriavidus eutrophus* мало изучены по составу ЖК и липидов.

## ВВЕДЕНИЕ

Грам-отрицательные факультативные хемолитотрофные бактерии *Cupriavidus eutrophus* B-10646 (ранее *Hydrogenomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Wautersia*) являются наиболее перспективными продуцентами полигидроксиалканоатов (ПГА), способные синтезировать полимеры с высоким выходом (до 80-90 %) и различной химической структурой на широком спектре субстратов.

В последние годы показано, что синтез ПГА у бактерий может быть связан с метаболизмом липидов, особенно, если в качестве субстратов используются или длинноцепочечные жирные кислоты, или растительные масла. Проведенный полный геномный сиквинс типового штамма *Ralstonia eutropha* H16 свидетельствует, что эти бактерии содержат все гены, необходимые для синтеза жирных кислот *de novo*, для транспорта свободных жирных кислот внутрь клетки и их мобилизации через  $\beta$ -окисление. Более того, эти бактерии синтезируют экзогенные липазы, способные деградировать и использовать растительные масла и животные жиры в качестве субстратов для своего роста.

Бактерии *R. eutropha* относятся к наиболее изученным организмам в отношении синтеза ПГА, однако данные по составу липидов и жирных кислот весьма ограничены, несмотря на то, что липидный профиль интенсивно используется в хемотаксономии бактерий, а анализ состава жирных кислот является общепризнанным быстрым методом идентификации видов. Нам известно только несколько работ о составе липидов и жирных кислот водородокисляющих бактерий *Hydrogenomonas eutropha* H-16 и нескольких штаммов *Ralstonia*, свидетельствующих о том, что состав липидов и жирных кислот этого организма характерен для грам-отрицательных бактерий. Ранее нами был изучен спектр жирных кислот липидов *Alcaligenus eutrophus* Z-1 в условиях автотрофного роста и *Wautersia eutropha* B5786 в режиме активного роста и аккумуляции ПГА на

фруктозе и было показано, что в условиях синтеза полимера состав жирных кислот претерпевает существенные изменения за счет усиленного синтеза циклопропановых кислот. Подобные изменения состава жирных кислот были получены при воздействии монооксида углерода на рост и синтез запасных веществ в автотрофной культуре *R. eutropha*.

Жирные кислоты бактерий являются составляющими компонентами клеточных мембран, которые в первую очередь контактируют и реагируют на все изменения в окружающей среде, поддерживая взаимосвязь между структурой и функцией мембраны, сохраняя оптимальную степень текучести липидных компонентов. Изменения в мембранных липидах *R. eutropha* H850 могут индуцироваться органическими загрязнителями или природой ростового субстрата у *Cupriavidus necator* JMP134.

Недавно было показано, что при использовании в качестве субстрата олеиновой кислоты для роста *Cupriavidus eutrophus* B-10646, происходят существенные изменения в составе жирных кислот липидов цитоплазматической мембраны. Поэтому изучение влияния различных ростовых субстратов на состав липидов этих бактерий в условиях оптимального роста и накопления ПГА представляется нам актуальной задачей. Данные, полученные в таких экспериментах, и могут более четко понять связь липидного и ПГА метаболизма [26].

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Водородные бактерии

Большое внимание исследователей привлекает группа литотрофных микроорганизмов и особенно водородоокисляющих бактерий, которые в качестве единственного источника энергии и строительного материала клетки могут использовать водород, кислород и углекислый газ с добавлением незначительных количеств минеральных соединений азота, фосфора, магния и микроэлементов [5, 6, 8, 10].

Водородные бактерии – наиболее эффективное средство превращения энергии водорода в белок. Они могут расти на исключительно минеральном сырье и, обладая высокой скоростью роста, способны накапливать большое количество биомассы. Простой газовый и минеральный составы среды для их выращивания дают возможность получить чистый продукт не загрязненный органическими соединениями, в том числе канцерогенными (бензопирен). Биомасса водородных бактерий содержит 60-80 % белка и имеет хорошо сбалансированный аминокислотный состав. При проточном культивировании бактерии можно выращивать в нестерильных условиях. Водородные бактерии почти не выделяют продуктов метаболизма в жидкую среду и при соблюдении биотехнологического процесса не загрязняют внешнюю среду отходами производства.

Однако культивирование водородных бактерий в автотрофных условиях по некоторым причинам затруднено. Во-первых, к клеткам необходимо подводить большое количество водорода, растворимость которого в минеральной среде при 30-40 °С ничтожна, а потребность в этом газе высока. Так, для получения 1 кг сухой биомассы требуется 6-7 кг газовой смеси, в котором содержится 60-70 % водорода. Во-вторых, смесь водорода и кислорода взрывоопасна. Для выращивания водородных бактерий применяются различные системы культиваторов, отличающиеся способом подачи газов и производительностью.

Эти трудности легко решаются, т.к. водородокисляющие бактерии способны переходить на гетеротрофный рост. В качестве используемых субстратов могут выступать углеводы, в основном фруктоза и глюкоза, глицерин, жирные кислоты, растительные масла, отходы жировых производств [7].

Гетеротрофная сукцессия предполагает обязательное наличие определенного запаса энергии, аккумулированной в органическом веществе. Она заканчивается вместе с исчерпанием ресурса энергии, т. е. после полного разложения исходного субстрата. После этого экосистема перестает существовать, т. е. для нее не определено понятие климакса. В отличие от биогеоценозов, такие экосистемы смертны.

Переключение водородных бактерий на гетеротрофный образ жизни, как правило, снижает их способность окислять молекулярный водород и фиксировать углекислоту. Однако не все органические субстраты и не у всех водородных бактерий действуют на эти процессы одинаково [3]. Поэтому продолжается поиск оптимальных решений условий оптимального роста водородных бактерий. Кроме того, при гетеротрофном росте теряется важное преимущество автотрофного роста, при котором не обязательна стерильность. Культивирование на органических субстратах всегда проводится в строгих стерильных условиях.

## 1.2 Липиды микроорганизмов

Имеющийся огромный материал по липидам микроорганизмов свидетельствует о том, что эти соединения являются необходимыми и выполняют основные и решающие функции в жизни клетки. Однако какие именно функции, в настоящее время определить пока трудно. Бактерии никогда не запасают липиды в виде триациглицеринов, хотя для эукариот эти вещества являются основными резервами клетки. Известно, что для

некоторых бактерий единственным запасным веществом липидной природы служит полимер  $\beta$ -гидрооксимасляной кислоты. Поэтому функция бактериальных липидов как «аккумуляторов» энергии вряд ли является основной. Видимо, физиологический смысл бактериальных липидов проявляется на уровне мембраны или клеточной стенки. Для грамположительных бактерий показано, что их липиды локализируются в цитоплазматической мембране. Месторасположение липидов в грамотрицательных бактериях определить сложнее, что связано с методическими трудностями разделения клеточной стенки и цитоплазматической мембраны [1].

Литературные данные свидетельствуют о том, что большая часть липидов сосредоточена в наружной мембране клеточной стенки и цитоплазматической мембране. Следовательно, бактериальные липиды связаны со структурными элементами клетки, и видимо, на этом уровне регулируют жизнедеятельность микроорганизмов .

Основная часть бактериальных липидов представлена фосфолипидами, гликолипидами, липополисахаридами и другими сложными соединениями. При рассмотрении фосфолипидных компонентов, обнаруженных в бактериях, можно найти много уже известных типов: фосфатидная кислота (ФК), фосфатидиглицерин (ФГ), дифосфатидиглицерин (кардиолипин), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ). На рисунке 1 - Бактериальные липиды.



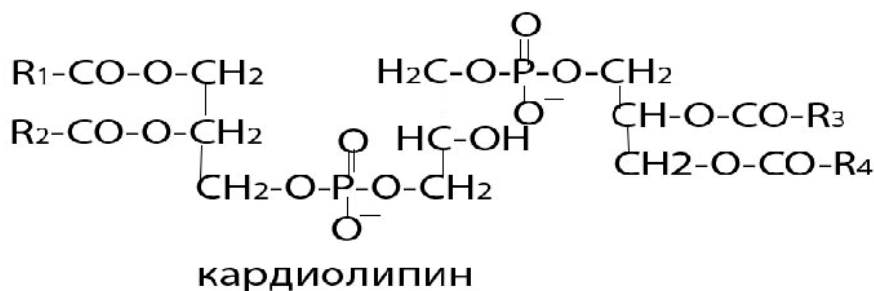
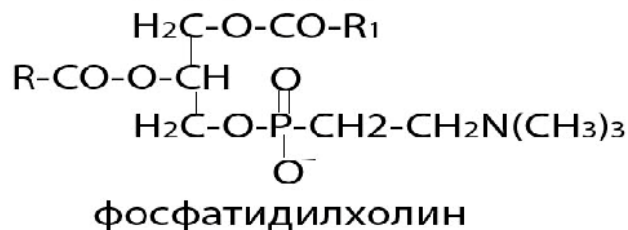
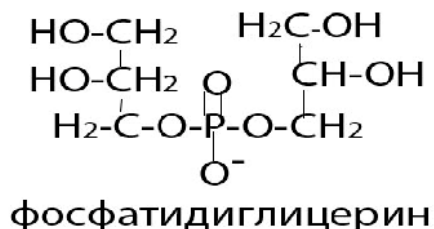
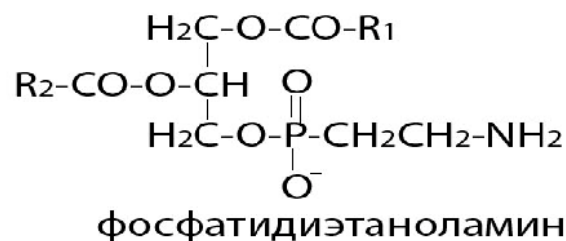
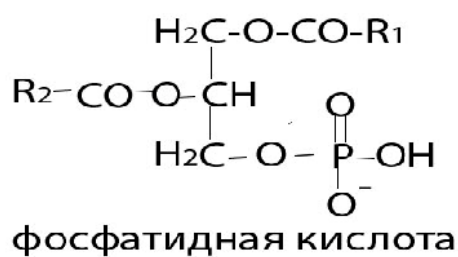


Рисунок 1 - Бактериальные липиды

К самым характерным липидам грамотрицательных бактерий можно отнести липополисахариды, локализующиеся в наружной мембране клеточной стенки и составляющие около 50 % от сухого веса мембраны.

Для ряда бактерий отмечено наличие новых или необычных фосфолипидов – например, ацилпроизводные фосфатидилглицерина, разнообразные лизофосфолипиды и гликофосфолипиды, сульфосфолипиды. Многие бактерии синтезируют метилированные производные фосфатидилэтанолamina – N-метил-фосфатидилэтаноламин и N,N-диметил-фосфатидилэтаноламин.

Фосфолипиды являются основными липидами грамотрицательных бактерий. Для большинства грамотрицательных бактерий характерно высокое содержание фосфатидилэтанолamina. Он может составлять до 90 % от общих фосфолипидов. Содержание фосфатидилглицерина и кардиолипина

колеблется от 5 до 15 %, и их количество зависит от возраста культуры и других факторов роста [9].

Существовало мнение, что фосфатидилхолин не встречается у бактерий, потому что они лишены ферментов, осуществляющих синтез холина. Однако, как оказалось, многие бактерии синтезируют фосфатидилхолин. Для подавляющего большинства грамотрицательных бактерий доминирующим липидом является фосфатидилэтаноламин или его метилированные производные и, за достаточно редким исключением, - фосфатидилхолин [11, 12].

Считалось, что бактерии не синтезируют стерины, эфиры стеринов или стероиды. Все чаще появляются работы, в которых сообщается о содержании этих соединений у различных представителях прокариот [9].

### 1.3 Жирные кислоты

В основном жирные кислоты бактериальных клеток находятся в связанном виде в молекулах ацилсодержащих липидов. Свободные жирные кислоты встречаются в небольших количествах в грамположительных и грамотрицательных бактериях (от 2 до 10 % от суммы липидов) [25].

Липиды бактериальных клеток представлены жирными кислотами с длиной цепи от 10 до 20 атомов углерода, причем преобладают кислоты с 15, 16, 18 и 19 атомами углерода. Они могут быть объединены в четыре главные группы: насыщенные, разветвленные, ненасыщенные и циклопропановые.

Из насыщенных кислот нормального строения наиболее распространенными являются: лауриновая (C12:0), миристиновая (C14:0), пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0). Довольно широко представлены жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода [1]. Из ненасыщенных кислот в липидах бактерий преобладают пальмитолеиновая (C16:1) с двойной связью между 9 и 10 атомами углерода и цис-вакценовая кислота (C18:1) с двойной связью

между 11 и 12 атомами углерода, но в некоторых бактериях, например, *S. butyricum*, обнаружены моноеновые кислоты с другим расположением двойных связей: 7, 8-C16:1 и 9, 10-C18:1. Полиеновые кислоты в бактериальных клетках не найдены [10]. Грамотрицательные бактерии обычно синтезируют насыщенные, моноеновые и циклопропановые кислоты [4, 5, 11]. Соотношение насыщенных, моноеновых и циклопропановых кислот хотя и меняется в различных условиях роста, может быть характерным для определенных представителей прокариот. Так, в *E.coli* содержание цис-вакценовой кислоты превалирует над пальмитолеиновой, а основной насыщенной кислотой является пальмитиновая [17]. Те же закономерности в соотношении жирных кислот найдены и у ряда других грамотрицательных бактерий [15].

В условиях интенсивного роста грамотрицательные бактерии синтезируют небольшое количество циклопропановых кислот, хотя в некоторых тиобациллах их содержание может достигать более 40 % от суммы жирных кислот [14]. Синтез циклопропановых кислот усиливается в стационарной фазе роста, причем увеличение содержания этих кислот коррелирует с уменьшением соответствующих моноеновых кислот, а их сумма остается постоянной. Рядом авторов предложено использовать этот параметр в диагностических целях [2].

Пути синтеза жирных кислот в бактериях в принципе не отличаются от других живых организмов. Синтез жирных кислот осуществляется на АПБ-комплексе с участием ряда ферментов: ацетилтрансацилаза, малонилтрансацилаза, кетоацилсинтаза, кетоацилредуктаза, гидратаза, еноил-редуктаза, тиоэстераза; причем с повторением цикла при каждом удлинении алифатической цепи на 2 атома углерода. Ферменты синтеза жирных кислот локализованы у бактерий между цитоплазмой и внутренней стороной плазматической мембраны. Основными отличиями бактериального цикла синтеза ЖК являются: во-первых, если для животных клеток все

ферменты объединены в мультиферментный комплекс, то в бактериальных клетках все индивидуальные ферменты синтазной системы находятся в виде автономных полипептидов. Во-вторых, механизм образования ненасыщенных жирных кислот происходит без участия кислорода, т.е. без десатураз, а в процессе общего синтеза ЖК.

Реакции синтеза ЖК инициируется образованием малонил-КоА. Синтез малонил-КоА катализируется ацил-КоА карбоксилазой, ферментом, который обнаруживается, по меньшей мере, в двух формах, в различных организмах. В большинстве эукариот ацил-КоА карбоксилаза является большим многофункциональным белком, который состоит из трех активных сайтов, каждый в отдельном домене. В противоположность, большинство бактерий имеют мультипротеиновую ацил-КоА карбоксилазу в виде четырех отдельных белков.

Реакция ацил-КоА карбоксилазы делится на две половины. Первая реакция является активацией фрагмента  $\text{CO}_2$  бикарбоната и его передачи с образованием карбоксибиотина, катализируемая биотин-карбоксилазной субъединицей, кодируемой *accC* геном [18]. Вторая реакция передает группу  $\text{CO}_2$  из карбоксибиотина в ацетил-КоА с образованием малонил-КоА. Эта реакция переноса карбоксильной группы катализируют *AccA* и *AccD* протеины. Чтобы участвовать в синтезе жирных кислот, малонил должен быть перенесен на ацилпереносящий белок (АПБ). Этот перенос катализируется малонил-КоА:АПБ-трансацилазой, кодируемой геном *fabD*. Чувствительные к температуре *fabD* мутации *E.coli*, в частности, блокируют синтез жирных кислот при неблагоприятных температурах [25].

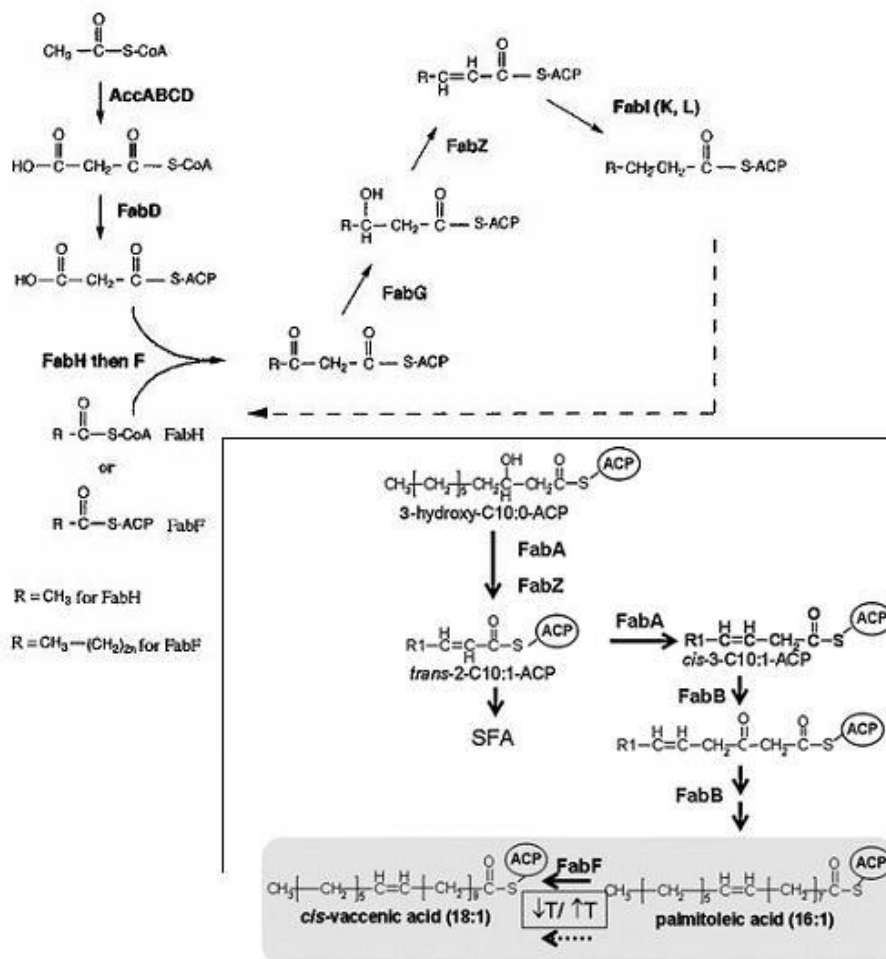


Рисунок 2 - Схема синтеза бактериальных жирных кислот (Cambell and Cronan, 2001)

На рисунке 2 указаны два пути: путь синтеза насыщенных жирных кислот начинается с ацетил-КоА; и второй, выделенный рамкой, путь синтеза ненасыщенных кислот. На первых этапах синтеза жирной кислоты происходит конденсация ацетил-КоА с малонил-АПБ под действием фермента FabH. Затем малонил-АПБ под действием фермента 3-кетоацил-АПБ синтазы II (FabF) конденсируется с ацил-АПБ, образуя ацетоацил-АПБ производное. 3-кетоацил-АПБ редуктаза (FabG) осуществляет гидратирование продукта, превращая его в 3-гидроксиацил-АПБ, который в дальнейшем подвергается дегидратированию и превращению в еноил-АПБ производное под действием фермента 3-гидроксиацил-АПБ дегидразы (FabZ). И заключительной реакцией в этом цикле является реакция

восстановления ненасыщенной связи с помощью еноил-АПБ редуктазы (FabI). Продукт реакции взаимодействует с новой молекулой малонил-КоА и цикл многократно повторяется вплоть до образования остатка пальмитиновой или стеариновой кислот и заканчивается после переноса вновь синтезированных ЖК на фосфолипиды или липополисахариды [31].

Установлено, что у анаэробных бактерий предшественником ненасыщенных жирных кислот служит 3-гидроксидеканоил-АПБ, который является промежуточным метаболитом в синтезе ЖК. Если в дегидратации будет участвовать FabA гидратаза, то образуется цис-3-деценоил-АПБ, из которого в результате элонгации углеродной цепи синтезируются моноеновые кислоты: пальмитолеиновая и вакценовая кислоты. В этой реакции участвуют ферменты FabB и FabF (рисунок 2).

Синтез циклопропановых кислот является основным фактором защиты *E. coli* от кислотного шока. Эти кислоты синтезируются из соответствующих моноеновых кислот путем переноса метильных групп из *S*-аденозил-*L*-метионина на двойные связи цепей, ацилирующих мембранные фосфолипиды под контролем циклопропансинтазы [18]. Введение циклопропанового кольца в молекулу жирной кислоты снижает текучесть мембран, делая ее мало проницаемой для токсичных молекул и протонов, и, тем самым, помогает клеткам адаптироваться к неблагоприятным воздействиям окружающей среды [23].

Бактерии *R. eutropha* относятся к наиболее изученным организмам в отношении синтеза ПГА [24], однако данные по составу липидов и жирных кислот весьма ограничены, несмотря на то что липидный профиль интенсивно используется в хемотаксономии бактерий, а анализ состава жирных кислот является общепризнанным быстрым методом идентификации видов [16]. Известно только несколько работ о составе липидов и жирных кислот водородокисляющих бактерий *Hydrogenomonas eutropha* H-16, и нескольких штаммов *Ralstonia* [19, 20, 21], свидетельствующих о том, что

состав липидов и жирных кислот этого организма характерен для грам-отрицательных бактерий [22]. Ранее российскими исследователями был изучен спектр жирных кислот липидов *Alcaligenes eutrophus* Z-1 в условиях автотрофного роста и *Wautersia eutropha* B5786 в режиме активного роста и аккумуляции ПГА на фруктозе, и было показано, что в условиях синтеза полимера состав жирных кислот претерпевает существенные изменения за счет усиленного синтеза циклопропановых кислот [8]. Подобные изменения состава жирных кислот были получены при воздействии монооксида углерода на рост и синтез запасных веществ в автотрофной культуре *R. eutropha* [28].

#### 1.4 Основные характеристики ПГА

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это полиэфиры гидроксипроизводных жирных кислот, которые синтезируются прокариотами в качестве депо углерода и энергии, как правило, при условии ограничения питательных элементов, но при избытке источника углерода. ПГА играет большую роль в создании заменителей химически синтезированных полимеров, в связи с их механическими свойствами, аналогичными полипропилену, и характеризуются полным биоразложением в природной среде.

В соответствии с количеством атомов углерода, составляющих мономерные единицы, бактериальные ПГА могут быть подразделены на три группы: ПГА с короткой цепью, состоящей из 3-5 атомов углерода, ПГА со средней длиной цепи, состоящей из 6-14 атомов углерода, и длинноцепочечные ПГА. Физические свойства ПГА зависят от их соотношения мономерных единиц. Каждый тип ПГА обычно состоит из 1000-10000 мономеров.

Как следует из рассмотренного выше, отличительной чертой высокомолекулярных соединений является большая длина молекулярных цепей, которая не сопоставима с поперечным размером молекул, близким к таковой для обычных низкомолекулярных соединений.

Состав и строение макромолекул зависят не только от химического состава и строения молекул мономера, но и от способа, с помощью которого осуществлено соединение малых молекул в большие.

При этом как в цепных, так и в ступенчатых процессах синтеза полимеров невозможно представить себе случай, когда все образующиеся макромолекулы имели бы одинаковую степень полимеризации, т. е. одинаковую молекулярную массу.

В любом образце полимера присутствуют вместе макромолекулы разных размеров, т. е. любой полимер неоднороден по молекулярной массе. Следовательно, необходимо говорить о средней молекулярной массе полимера, которая включает молекулярную массу всех макромолекул, усредненную либо по их числу, либо по массе отдельных фракций, имеющих более или менее близкую молекулярную массу. Эта полимолекулярность является одним из основных понятий в химии и физике полимеров. Как мы видели, существенные прочностные свойства полимеров проявляются при довольно больших значениях молекулярной массы (5-10 тыс. ед.) и далее возрастают с ее увеличением. Регулирование молекулярной массы полимера в процессе синтеза является, таким образом, важным фактором влияния на его механические свойства .

Полимолекулярность или полидисперсность полимеров заложена уже в самом характере процессов синтеза, в их статистичности. Поскольку молекулярная масса полимера является среднестатистической величиной, то очевидно, что различные методы определения дают и разные ее значения. Если метод определения слабо чувствителен к молекулам малого размера, то значение молекулярной массы получится выше, чем в случае, если метод



одинаково чувствителен к макромолекулам любого размера. Поэтому значение молекулярной массы, полученное с помощью какого-либо одного метода, не может точно характеризовать соотношение больших и сравнительно малых молекул в данном полимере. Методы определения молекулярной массы полимера в целом или молекулярных масс отдельных фракций обычно объединяют в две группы - среднечисловые и средневесовые. К среднечисловым относят методы, основанные на определении числа молекул в разбавленных растворах полимеров: понижение температуры замерзания раствора (криоскопия), повышение температуры кипения раствора (эбулиоскопия), определение количества концевых групп в макромолекулах, измерение осмотического давления раствора.

Получаемое при этих измерениях значение *среднечисловой молекулярной массы*  $M_n$  представляет собой суммарную массу всех молекул в образце полимера, отнесенную к одной среднестатистической молекуле:

$$M_n = \sum N_x M_x / \sum N_x,$$

где  $x$  изменяется от 1 до  $\infty$ , а  $N_x$  - число молекул с молекулярной массой  $M_x$ .

К средневесовым относят такие методы определения молекулярной массы, которые основаны на установлении массы отдельных макромолекул: измерение скорости седиментации, скорости диффузии, светорассеяния в растворах полимеров. Значение *средневесовой молекулярной массы* -  $M_w$  представляет собой произведение массы всех фракций полимера и молекулярной массы фракции, отнесенной к массе одной фракции:

$$M_w = \sum w_x M_x / \sum w_x = \sum N_x M_x^2 / \sum N_x M_x,$$

где  $w_x$  - масса фракции с молекулярной массой  $M_x$ , т. е.  $w_x = N_x M_x$ ,  $N_x$  - число молекул с молекулярной массой  $M_x$ .

Первым среди выделенных и наиболее полно к настоящему времени охарактеризованным полигидроксиалканоатом является поли(3-гидроксибутират) (ПГБ). Поли(3-гидроксибутират)  $(C_4H_6O_2)_n$  является

гомополимером D(-)-3-β-гидроксимасляной кислоты и представляет собой изотактический полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>). В отличие от сложных синтетических полиэфиров, полигидроксibuтират – это стереорегулярный оптически активный полимер, который образует спирали в растворе и кристаллизуется в сферолиты.

Внутри клеток ПГБ, как и другие ПГА, аккумулируется в цитоплазме в виде сферических включений (гранул) и находится в гранулах в подвижном аморфном состоянии.

Гранулы образованы фибриллярными структурами, которые представляют собой двойные нити в виде закрученных вправо лент. Последние образуют мицеллообразные кристаллы полимера. Плотность и высокая гидрофобность полимерных цепей в гранулах связана с наличием ограничивающих фосфолипидных оболочек, которые расположены монолинейно и укреплены белковыми структурами [13].

### 1.5 Биосинтез ПГА

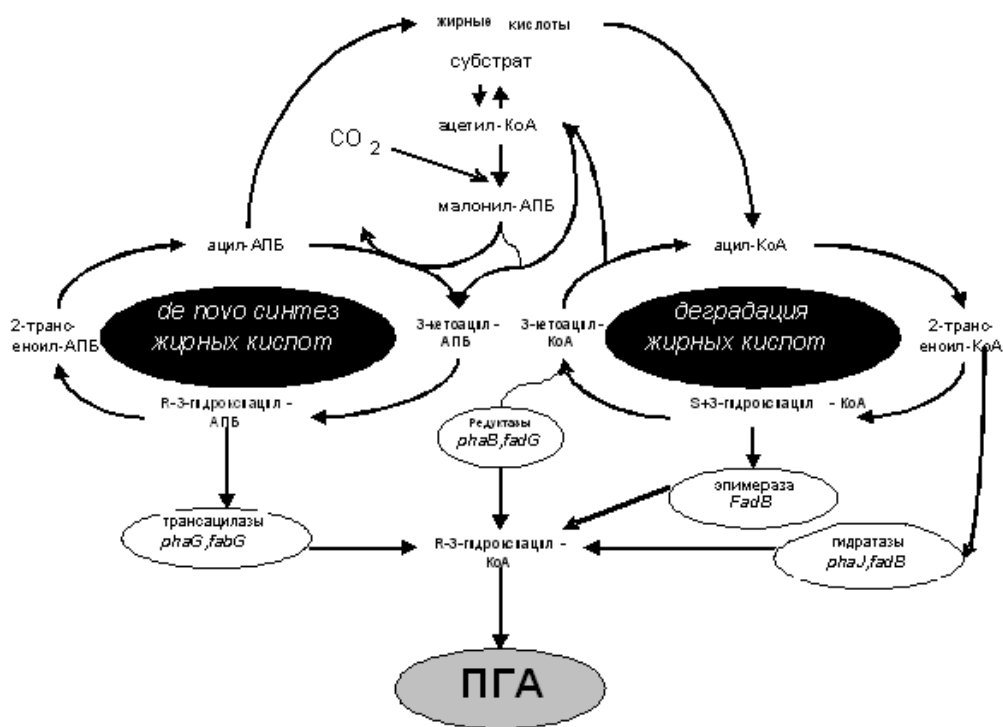
В биосинтезе ПГА участвуют три фермента – β-кетотиолаза (КТ), ацетоацетил-КоА-редуктаза (АА-КоА-редуктаза) и ПГА-синтаза, которые кодируются генами *phbA*, *phbB*, *phbC*, соответственно, образуя один оперон, *phbCAB*. Активность β-кетотиолазы в бактериях, выращенных в условиях лимитирования роста азотом или углеродом, одинакова, что позволило авторам сделать вывод о конститутивном характере синтеза этого фермента.

Высокие внутриклеточные концентрации КоА ингибируют кетотиолазную реакцию у *A. eutrophus*, *Azotobacter beijerinckii*, *Zoogloea ramigera*, что и предопределяет ведущую роль β-кетотиолазы в запуске синтеза полимера. Скорости синтеза полимера определяется вторым ферментом пути синтеза ПГА – АА-КоА-редуктазы, активность которого регулируется НАДФН или высоким соотношением НАДФН/НАДФ. Уровень

активности фермента в бактериях, выращенных в условия лимита по углероду или по азоту, практически одинаков, что свидетельствует о конститутивном синтезе фермента. Фермент отличается высокой специфичностью к длине цепи кетоацил производных КоА у водородных бактерий и активен с  $\beta$ -гидроксиацил-КоА с длиной цепи от 4 до 6 атомов углерода [29].

ПГА-синтаза является ключевым и наиболее изученным ферментом биосинтеза полимера, определяющая тип ПГА. В настоящее время описано более 50 структурных генов синтаз, выделенных из разных микроорганизмов. На основании субстратной специфичности и первичной структуры ПГА-синтазы были разделены на три класса. ПГА-синтаза из *R. eutropha* относится к 1 классу. В клетке ПГА-синтаза находится в двух формах – растворимой и связанной с гранулами полимера. Обе формы наиболее активно используют для построения полимерных молекул короткоцепочечные (от 3 до 5 атомов углерода)  $\beta$ -гидроксиацил-КоА, что было подтверждено *in vitro*. Однако, ПГА-синтаза *in vivo* может включать в полимер в небольших количествах и более длинные гидроксикислоты – C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub> и C<sub>10</sub>, что свидетельствует о более широком спектре используемых ПГА-синтазой субстратов для построения полимеров [26, 27].

Ряд данных свидетельствуют о конститутивном синтезе ПГА-синтазы. В условия лимита по углероду *R. eutropha* синтезирует преимущественно растворимую форму фермента, при переносе культуры в условия лимита по азоту активность растворимой ПГА-синтазы резко падает и в клетках в основном определяют гранулозависимую форму фермента. При этом суммарная активность фермента остается на одном и том же уровне.



Lutke-Eversloh, 2003

Рисунок 3 - Схема синтеза ПГА

Для ряда бактерий синтез ПГА тесно связан с метаболизмом липидов и жирных кислот, для которых источником мономеров для полимера являются промежуточные метаболиты синтеза или бета-окисления жирных кислот – рисунок 4. Поэтому для выбора перспективного продуцента ПГА среди исследованных бактерий необходимо, прежде всего, изучить основные особенности состава липидов этих организмов.

### 1.6 *Cupriavidus eutrophus* B-10646, как продуцент ПГА

*C. eutrophus* B10646 – наиболее изученный представитель ПГА-синтезирующих микроорганизмов, потому что эти бактерии могут накапливать до 80-90 % поли(3-гидроксibuтирата) (ПЗГБ) на простом углеродном субстрате. При фосфорном или азотном лимите *C. eutrophus* B10646 синтезирует большое количество ПЗГБ на простых углеродных

субстратах, таких как фруктоза и глюкоза. Когда в культуральную среду добавляли пропионат натрия или валерат натрия, то бактерии синтезировали гетерополимер поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат) (П(ЗГБ-со-ЗГВ)). В зависимости от соотношения глюкоза/пропионат натрия или валерат натрия в среде, фракция ЗГВ варьировала от 0 до 30 мол. %, а содержание полимера в клетках достигало 70 % от веса сухой биомассы. Бактерии *S. eutrophus* В10646 относятся к перспективным продуцентам, так как они аккумулируют ПГА с высокими выходами на различных субстратах, включая отходы промышленных и сельскохозяйственных производств. Доминирующим мономером в ПГА, синтезируемого природными штаммами водородокисляющих бактерий, однако, является короткоцепочечный 3-гидроксибутират, выходы которого могут достигать в специализированных режимах до 80-90 % от веса сухого биомассы. Бактерии, относящиеся к таксону *Cupriavidus necator*, синтезируют полигидроксиалканоаты с высокими выходами на минимальной солевой среде при нормальном рН и 30 °С, используя в качестве источника углерода углекислоту, а также разнообразную органику, однако из сахаров – только фруктозу. Усиление скорости синтеза ПГА начинается в конце линейной фазы роста бактерий в условиях периодической культуры по мере снижения скорости синтеза белка и достигает максимума на стационарной фазе. Происходит это при так называемом несбалансированном росте, лимитированном одним из элементов минерального питания (азотом, фосфором, серой и др.). Выходы ПГА, длительность ферментационного цикла на различных субстратах при различных режимах выращивания и продуктивность процесса варьируют в широких пределах, соответственно 75-90 %, 60-120 ч, 0,3-2,42 г/л\*ч.

Возможность получения полигидроксиалканоаты (ПГА) различного состава вызывает большой интерес в связи с расширением сферы их использования [2]. Способность аккумулировать те или иные гетерополимерные (ПГА) проявляется по-разному в зависимости от условий

углеродного питания микроорганизмов, а также видовой и штаммовой специфики продуцента. Установлено, что представители рода *Pseudomonas* синтезируют разнообразные и многокомпонентные, в том числе длинноцепочечные ПГА, а для бактерий рода *Ralstonia* (раннее *Alcaligenes*) более характерно образование с высокими выходами двухкомпонентных сополимеров гидроксибутирата и гидроксивалерата, и в меньшей - каких-либо иных ПГА. Так, водородные бактерии *Alcaligenes eutrophus* Н16, АТСС 17699 и др. на средах с валератом и пропионатом синтезируют сополимеры 3-, 4-β-гидроксибутирата, и гидроксивалерата [19]. Различное соотношение ацетата и пропионата в среде как субстрата для роста *Ralstonia* обеспечивало включение мономеров ЗГВ до 50 % от веса сухого вещества клеток [20]. Когда единственным источником углерода служил валерат, у штамма *R. eutropha* NCIMB 11599 молярная фракция ЗГВ достигала 85 мол. %, при использовании смеси 5-хлорвалерата и валерата количество синтезируемого трехкомпонентного ПГА [поли(ЗГБ/ЗГВ/5ГВ)] составила 46% к сухой биомассе при доле 5ГВ – 52 % [29]. При росте бактерий на смеси масляной и пентановой кислот у штаммов *R. eutropha* NCIMB 11599 и Н16 включение ЗГВ в ПГА достигало, соответственно, 90 и 75 мол. %. Показано, что штамм *Alcaligenes sp.* АК201 способен к синтезу поли(ЗГБ/ЗГВ) при использовании для роста жирных кислот с длиной углеродной цепи от C<sub>2</sub> до C<sub>22</sub> [8].

Вопрос о способности представителей рода *Ralstonia* включать в полимеры более длинные мономеры в настоящее время интенсивно дискутируется. Считается, что за качественный состав ПГА ответственна ПГА-синтаза. In vitro реакция полимеризации, катализируемая синтазой из *R. eutropha*, проходит только с гидроксипроизводными кислот, длина цепи которых не превышает 5 атомов углерода. Однако, в последние годы убедительно доказано, что in vivo субстратами синтазы из *Ralstonia* могут быть и более длинные гидроксипроизводные жирных кислот, вплоть до C<sub>12</sub>

[32]. В одной из первых работ было показано, что *Ralstonia eutropha* штамм 5786 при индукции соответствующими кислотами синтезирует трехкомпонентный полимер, в который помимо ГБ и ГВ, включается и гидроксигексаноат. В дальнейшем на рекомбинантных штаммах Денис и соавторы получили полимеры с включением НГ, что позволило им поставить вопрос о более широкой специфичности синтаз *Ralstonia* [19]. Клонирование оперона *Ralstonia eutropha* H16, ответственного за синтез полимер, в мутантный штамм по одному из генов бета-окисления жирных кислот *E. coli* стимулировало при соответствующих добавках синтез гетерополимеров, в составе которых определяли гидроксидеканоат гидроксидеканоат. При ингибировании бета-окисления жирных кислот *Ralstonia eutropha* H16 в присутствии октаноата синтезирует ПГА с НГ и НО [30]. Все эти данные свидетельствуют о более широкой субстратной специфичности синтеза, а расхождения в *in vivo* и *in vitro* реакциях объясняется или микроокружением синтаз в клетке, или временем наблюдения за реакцией. Выявленная способность *Ralstonia* полимеризовать коротко- и среднецепочечные мономеры является важным моментом. С одной стороны представители этого вида бактерий являются наиболее технологичными продуцентами полимера. С другой стороны, расширяется возможность синтеза различных гетерополимеров. Известно, что даже небольшие включения среднецепочечных мономеров существенно меняют свойства полимеров – понижается кристалличность и  $T$  плавления, увеличивается гибкость и упругость, т. е. усиливаются технологические свойства полимера [29].

Показана возможность синтеза разных сополимеров штаммом *Alcaligenes sp.* AR 201 при росте на жирных кислотах с количеством атомов углерода от  $C_2$  до  $C_{22}$ . При использовании кислот с четным количеством атомов углерода бактерии синтезировали только гомополимер ПЗГБ, тогда как при росте на жирных кислотах с нечетным количеством углеродных атомов бактерии синтезировали сополимер ПЗГБ/4ГБ [34].

Согласно литературным данным, для увеличения содержания 4ГБ в сополимере ПЗГБ/4ГБ в питательную среду, содержащую бутиролактон, добавляют ацетат, пропионовую кислоту, аминокислоты. Позитивное влияние данных дополнительных углеродных субстратов на синтез сополимера и соотношение в нем мономеров 3- и 4-гидроксибутирата, возможно, связано с тем, что утилизация этих соединений сопровождается увеличением внутриклеточного пула ацетил-СоА, что, в свою очередь, ингибирует реакцию кетолитизиса 4-гидроксибутирил-СоА до двух молекул ацетил-СоА и, соответственно, приводит к возрастанию содержания во внутриклеточном пуле 4ГБ и последующему включению его в сополимер. Это позволяет в отдельных случаях увеличить включение 4ГБ до 60-80 мол. %, однако при общем низком выходе полимера (до 45% от веса сухой биомассы). Реализованный далее режим выращивания *Cupriavidus eutropha* B10646 на среде, содержащей в качестве основного субстрата пропионовую кислоту в концентрации 2г/л и добавки  $\gamma$ -бутиролактона, обеспечил синтез трехкомпонентного полимера, содержащего, помимо фракции 3ГБ, 8,1 мол. % 4ГБ и 35,2 мол. % 3ГБ. Использование в качестве углеродного питания масляной кислоты с добавками  $\gamma$ -бутиролактона позволило получить в культуре *Cupriavidus eutropha* B10646 более высокие результаты. Урожай бактерий и выход сополимера на этом субстрате варьировали в зависимости от соотношения в культуре масляной кислоты и величины добавки  $\gamma$ -бутиролактона. Максимальные выходы составили соответственно 7,2-8,2 г/л и 81,7-92,7%; при этом содержание 4ГБ в сополимере варьировалось в диапазоне 8,7-24,3 мол. %. Использование в качестве продуцента сополимера ПЗГБ/4ГБ штамма *Cupriavidus eutropha* B10646, обладающего повышенной толерантностью к воздействию  $\gamma$ -бутиролактона в качестве моноуглеродного субстрата, позволило не только повысить содержание мономера 4ГБ в сополимере, но также сократить время культивирования бактерий [33].



## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Бактериальный штамм, среда и условия роста

В этом исследовании использовали отселектированный штамм бактерии *C. eutrophus* В-10646, зарегистрированный в ВКПМ. Данный штамм толерантен ко многим углеродным субстратам (валериановая кислота, гексановая кислота,  $\gamma$ -бутиролактон) при концентрациях 3-5 г/л в культуральной среде и может использовать их для синтеза ПГА, содержащих коротко- и среднецепочечные мономеры.

Бактерии выращивали в периодической культуре, используя заранее разработанный двухфазный процесс для синтеза ПГА на минеральной среде Шлегеля:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -9,1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -1,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,2;  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,025,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -1,0 (г/л) и раствор микроэлементов ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ -0,288;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -0,030;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,008;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -0,008;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,176;  $\text{NaMoO}_4$ -0,050;  $\text{NiCl}_2$ -0,008 (г/л)).

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 1 л при коэффициенте заполнения 0,5 с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) при 30 °C и 200 rpm. Культивирование бактерий проводили 72 часа. В качестве углеродного субстрата использовали фруктозу (ЕС), олеиновую кислоту (Россия) или фруктозу и олеиновую кислоту. Начальные концентрации фруктозы и олеиновой кислоты составляли 10 г/л. При совместном использовании субстратов начальные концентрации фруктозы и олеиновой кислоты были 5 г/л. По ходу роста культуры и исчерпания субстрата делали добавки соответствующих субстратов в культуру в концентрациях, аналогичных исходным.

## 2.2. Измерение параметров процесса

Урожай биомассы клеток в ходе развития культуры бактерий регистрировали по весу сухого вещества и оптическим показателям культуры на спектрофотометре при длине волны 440 нм. Концентрацию фруктозы в среде определяли резорциновым методом. Для измерения концентрации олеиновой кислоты отбирали 20 мл культуральной среды в пластиковые пробирки и центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810R при 6000 оборотов/мин в течение 10 минут. По завершении центрифугирования 5 мл среды после осаждения клеток подкисляли несколькими каплями концентрированной серной кислоты до значения pH=2-3. Уже подкисленную среду переносили в мерную пробирку со шлифом и добавляли 1 мл гексана, закрывали и взбалтывали в течение 1 минуты. Когда происходило расслоение фаз, из верхнего гексанового слоя отбирали по 1 мкл пробы и запускали в хроматограф. Параметры хромато-масс-спектрометра 6890N/5975C (Agilent Technologies). Условия хроматографирования: колонка FFAP капиллярная длиной 30 метров и диаметром 0,25 мм, фаза полярная. Температура ввода пробы составляла 120 °С. В течение 3 минут изотермальный режим, затем 15 °С/мин до 230 °С/мин. Время проведения хроматографирования 16 минут. Запуск проб производили в режиме «split» с расщеплением потока. Температура интерфейса 230°С, спектрометра 150°С.

## 2.3. Анализ ПГА структуры

Внутриклеточную концентрацию ПГА определяли в разные интервалы времени, анализируя образцы сухой клеточной биомассы. Содержание внутриклеточного ПГА и состав выделенных образцов полимера анализировали с помощью GC-MS (7890/5975C, Agilent Technologies, США). Содержание и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра Agilent

Technologies 7890A (США). Для этого сухая биомасса бактерий и полимер были подвержены метанолизу в присутствии серной кислоты и метанола при 80°C в течение 4 часов. Бензойная кислота была использована в качестве внутреннего стандарта для определения общего внутриклеточного ПГА. Мономерные звенья идентифицировали в выделенных и очищенных ПГА образцах на основе их масс-спектров и времени удерживания. Условия хроматографирования – колонка FFAP,

#### 2.4. Анализ молекулярного веса ПГА

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 ( $M_v$ ) и среднечисловую ( $M_n$ ) молекулярную массу, а также полидисперсность ( $PD = M_v/M_n$ ).

#### 2.5. Анализ липидов и жирных кислот

Анализ динамики липидов и состава жирных кислот *C. eutrophus* В-10646 выполняли на образцах, собранных в конце культивирования через 72 часа, когда содержание ПГА высокое. Состав жирных кислот липидов в бактериальных клетках исследовалась при помощи рекомендации Soltani, учитывались, что липиды цитоплазматической мембраны легко экстрагируют смесью органических кислот, но жирные кислоты могут быть извлечены из прочносвязанные липиды только после щелочного гидролиза обезжиренной клеточной биомассы.

Липиды экстрагировали из влажной биомассы по методу Фолча смесью хлороформ-метанол (2:1). Клетки, выращенные на среде с олеиновой кислотой, подвергались краткосрочной обработке гексаном, чтобы удалить

субстрат. В полученном экстракте ПГА отделяли от липидов осаждением двойным объемом гексана. Экстракт липидов (липиды в цитоплазматической мембране) сушили на роторном испарителе и подвергали метанолизу с целью получения метиловых эфиров жирных кислот. Обезжиренная биомасса обрабатывалась в течение одного часа 1 н раствором КОН в 95% этаноле на водяной бане с обратным холодильником. В смесь добавили двойной объем воды и подкисляли, затем жирные кислоты прочносвязанных липидов экстрагировали гексаном, который отгонялся на роторном испарителе, а осадок подвергался метанолизу. Метанолиз жирных кислот длился в течение 2 часов в смеси метанола и серной кислоты (50:1) при температуре 90 °С. Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) анализировали на GC-MS 7890/5975C (Agilent Technologies, США). Условия хроматографирования были следующие: скорость подачи газа гелия осуществлялась на 1 мл мин<sup>-1</sup>; температура инжектора 220°С; начальная температура 120°С; повышение температуры до 230°С со скоростью 5°С мин<sup>-1</sup>, 5 минут в изотермальном режиме и последующее повышение температуры 310°С со скоростью 10°С мин<sup>-1</sup> и 3 минуты изотермального режима; температура интерфейса 230°С; температура источника иона 150°С; электронный удар 70 eV; сканирование фрагментов с атомной масса от 30 до 550 ам при 0,5 с скан<sup>-1</sup>. Идентификацию МЭЖК проводили, сравнивая их время удержания и масс-спектры по имеющим наборам стандартов, сравнением их времени удержания и масс-спектров. В качестве стандартов использовали насыщенные, моноеновым, ди-, три-, тетра-, и пентаеновых кислот с длинной цепи от 10 до 20 атомов углерода, а также β-гидроксикислоты. Расположение двойных связей в моноеновых кислот определяли после получения диметилдисульфидных производных соответствующих метиловых эфиров жирных кислот. Длинноцепочечные β-гидроксикислоты также идентифицировали по анализам соответствующих производных триметил –силиловых производных.

При необходимости липидные экстракты были разделены методом микротонкослойной хроматографии в системе растворителей (гексан: диэтиловый эфир: уксусную кислоту (85:15:1 по объему)), предназначенной для нейтральных липидов, в целях получения фосфолипидной фракции. В качестве сорбента использовали силикагель. Для этого брали стеклянную пластинку 6\*6 см и на нее наносили силикагель. На самой пластинке отмечали направление элюента, потом капиллярами наносили образцы липидов. После пластинка с нанесенными образцами была опущена под углом 45° в специальную камеру с элюентом. Первая полоса сорбента, что соответствует фосфолипидам, была удалена вместе с силикагелем и помещена в пробирку, далее три раза проэкстрагирована в смеси хлороформа и этанола и подвержена метанолизу с целью получения метиловых эфиров жирных кислот. Состав фосфолипидов изучали с помощью двумерной тонкослойной хроматографии с силикагелем. Направление I: хлороформ-метанол-концентрированный аммиак (65:35:5 по объему); Направление II: хлороформ-метанол-ацетон-ледяная уксусная кислота-вода (5:1:2:1:0,5 по объему).

## 2.6 Статистика

Статистический анализ проводили по общепринятым методикам, используя стандартный программный пакет Microsoft Excel. Были найдены средние арифметические и стандартные отклонения.

### Глава 3. Результаты и обсуждения

#### 3.1 Рост и синтез полимера *C. eutrophus B-10646* на разных субстратах с добавлением валериановой кислоты

На рисунке 4 представлены кривые роста бактерий *C. eutrophus B-10646* и накопления полимера при использовании фруктозы, олеиновой кислоты (18:1ω9) и сочетания фруктозы и 18:1ω9. Из рисунка видно, что урожай биомассы и содержание полимера при росте на этих субстратах были сопоставимы и составляли соответственно 5.7-5.9 г/л и 59-64% от веса сухой биомассы. Добавление валериановой кислоты на 24 час культивирования привело к получению гетерополимера, состав которого представлен в Таблице 1. Из таблицы видно, что при использовании всех субстратов бактерии включали 3-гидроксивалерат в полимер, содержание которого в полимере составляло 19-27.6 мол. %. Следует отметить, что при использовании олеиновой кислоты как единственного источника углерода или в сочетании с фруктозой в составе полимера идентифицирован 3-гидроксигексаноат (1.1-1.9 мол. %). Измерение молекулярной массы полимера показало, что максимальные значения  $M_w$  (621 кДа) и  $M_n$  (197 кДа) получены при росте на фруктозе.

Таблица 1

Состав и молекулярно-массовые характеристики полимера бактерий *S. eutrophus* В-10646, выращиваемой на различных углеродных субстратах (72 час культивирования) с валериановой кислотой

Субстрат	С4, мол.%	С5, мол.%	С6, мол.%	Мч, кДа	Мв, кДа	ПД
Фруктоза	74.6	25.4	следы	197	621	3.15
18:1 $\omega$ 9	71.3	27.6	1.1	182	560	3.07
Фруктоза+18:1 $\omega$ 9	79.1	19.0	1.9	169	548	3.25

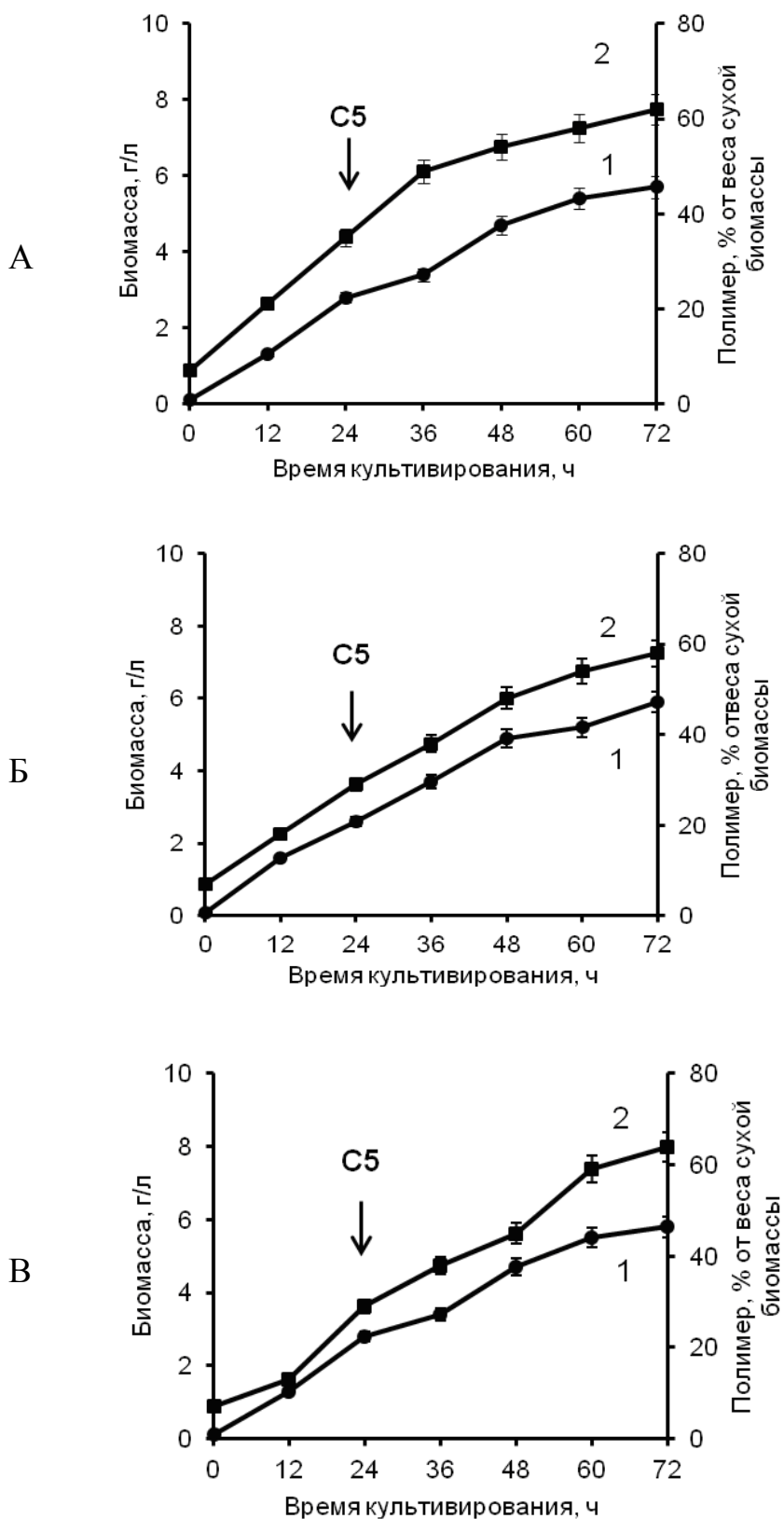


Рисунок 4 - Динамика биомассы (1) и полимера (2), синтезируемого бактериями *C. eutrophus* B-10646 при росте на фруктозе (А), олеиновой кислоте (Б) и смеси фруктозы и олеиновой кислоты (С) при добавлении ко-субстрата (валериановой кислоты).



В таблице 2 показано потребление основных субстратов и ко-субстрата бактериями *C. eutrophus* В-10646. Из таблицы видно, что в конце культивирования валериановая кислота отсутствовала в среде. Потребление фруктозы и олеиновой кислоты при использовании их как единственных источников углерода за 72 ч культивирования бактерий составляло соответственно 17.5 г/л и 9.4 г/л. При совместном использовании фруктозы и олеиновой кислоты потребление фруктозы и олеиновой кислоты составляло соответственно 3.4 и 7.7 г/л

Таблица 2

Содержание фруктозы, валериановой и олеиновой кислот в культуральной среде при выращивании *C. eutrophus* В-10646 на различных углеродных субстратах

Субстрат	Содержание в культуральной среде, г/л								
	18:1ω9			Валериановая кислота			Фруктоза		
	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Фруктоза	-	-	-	1**	-	-	1.4/10*	4.8	1.1
18:1ω9	6.4/10*	6.1	4.2	1**	-	-	-	-	-
Фруктоза+ 18:1ω9	1.4/5*	2.0	0.9	1**	-	-	1.9/5*	4.8	4.7

\* - концентрация субстрата до и после его добавления в культуральную среду,

\*\* - добавка валериановой кислоты

На рисунке 5 показано содержание внутриклеточных липидов у бактерий *C. eutrophus* В-10646 при росте на различных субстратах в присутствии валериановой кислоты. Из рисунка видно, что содержание внутриклеточных липидов на всех приведенных субстратах в конце экспериментов составляло около 2% от сухого веса бактерий и не зависело от используемых субстратов.

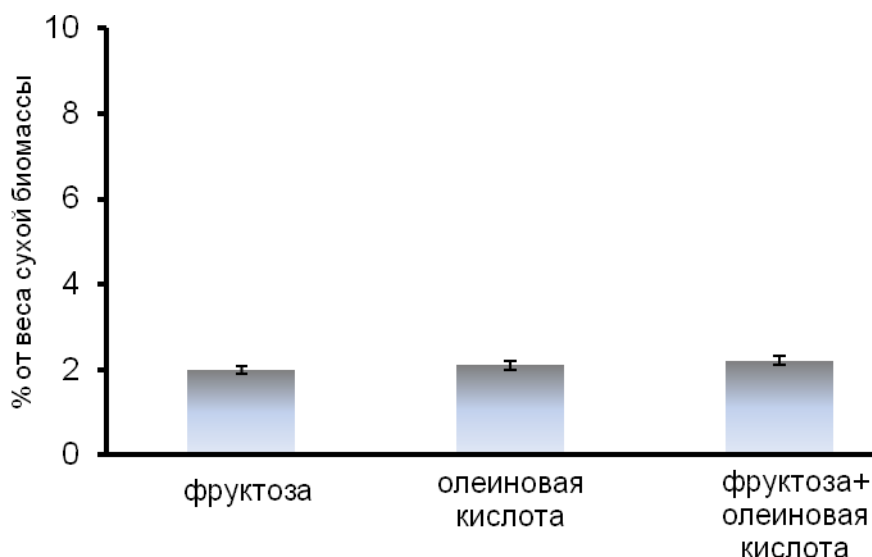


Рисунок 5 - Содержание внутриклеточных липидов у бактерий *S. eutrophus* В-10646 при росте на различных субстратах в присутствии валериановой кислоты

Внутриклеточные липиды относятся к легко выделяемым липидам и входят в состав цитоплазматической мембраны бактерий. Как видно из результатов, полученных с помощью тонкослойной хроматографии (рисунок б), они представлены в основном фракцией полярных липидов и в очень небольшом количестве видны фракции свободных жирных кислот и углеводов. Триацилглицерины (ТАГ), являющие запасными липидами большинства эукариот, в прокариотных клетках бактерий не были выявлены.

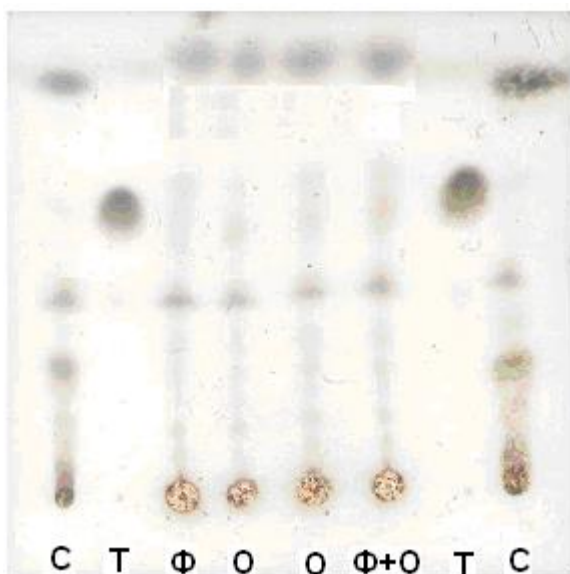


Рисунок 6 - ТСХ нейтральных липидов *S. eutrophus*. С – стандарт: стерин, СЖК, эфиры стеринов. Т- стандарт ТАГ; Ф – фруктоза; О – олеиновая кислота; Ф+О – фруктоза + олеиновая кислота.

Качественный состав нейтральных липидов бактерий практически не менялся в зависимости от использованных субстратов.

Во фракции полярных липидов *C. eutrophus* В-10646 идентифицированы в основном фосфолипиды (рисунок 7). Основным фосфолипидом являлся фосфатидилэтанолами и меньших количествах были определены фосфатидихолин, фосфатидилглицерин и кардиолипин. Существенных отличий в составе фосфолипидов бактерий, выращенных на разных субстратах, не обнаружено.

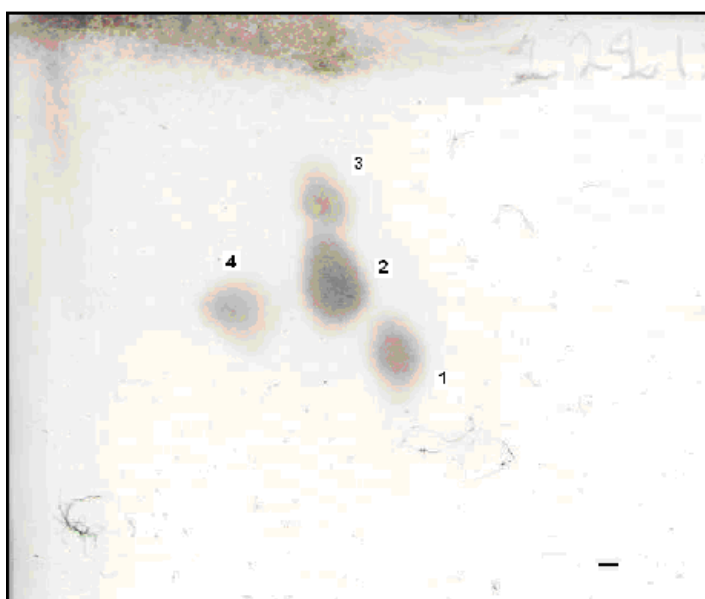


Рисунок 7 - ТСХ фосфолипидов *C. eutrophus* В-10646, выращенный на фруктозе. 1 – фосфатидилхолин; 2 – фосфатидилэтаноламин; 3 – фосфатидилглицерин; 4 – кардиолипин.

В таблице 3 показано распределение жирных кислот в экстрагируемых липидах. Основными ЖК липидов цитоплазматической мембраны бактерий, выращенных на фруктозе, были насыщенные кислоты: пальмитиновая, стеариновая, а также циклопропановые кислоты, содержание которых составляло от 50 до 13 % от суммы жирных кислот, соответственно. Ненасыщенные кислоты содержали одну двойную связь и были идентифицированы как пальмитолеиновая (16:1 $\omega$ 7) и цис-вакценовая (18:1 $\omega$ 7) кислоты. Нужно отметить, что состав ЖК был исследован у культуры в конце роста, поэтому уровень моноеновых кислот был достаточно низким. Обычно в условиях активного роста относительное

содержание пальмитиновой, пальмитолеиной и цис-вакценовой кислот в липидах водородных бактерий приблизительно одинаково и составляло около 30% от суммы ЖК [26]. Относительное содержание циклопропановых кислот не превышало 3 %. Однако в данном исследовании изучали состав ЖК липидов бактерий в условиях максимальной аккумуляции полимера. Поэтому уровень насыщенных и циклопропановых кислот был высок, и соотношение насыщенных и ненасыщенных кислот составило 2.18 (таблица 3).

При выращивании бактерий на смеси олеиновой кислоты с фруктозой и на олеиновой кислоте в составе жирных кислот экстрагируемых липидов выявлены существенные изменения. Во-первых, относительное содержание циклопропановых кислот снижалось в 2 и 3 раза, соответственно. Во-вторых, отношение насыщенных к ненасыщенным кислотам уменьшалось до 0.22 и 0.88, соответственно. Изменение этого соотношения связано с увеличением доли в спектре жирных кислот моноеновых кислот и снижением относительного содержания пальмитиновой кислоты с 48 % у бактерий, выращенных на фруктозе, до 8 % - на олеиновой кислоте. И в-третьих, при выращивании бактерий на субстратах, содержащих олеиновую кислоту, изменяются не только количественные характеристики состава ЖК, но качественные. Так основной моноеновой кислотой в составе ЖК липидов бактерий становится олеиновая кислота, относительное содержание которой увеличивалось до 65 % в липидах бактерий, выращенных только на олеиновой кислоте, и до 30 % - на смешанном субстрате. Нужно отметить, что в результате собственного синтеза жирных кислот образуется в основном цис-вакценовая кислота. Можно полагать, что часть субстрата встраивается в фосфолипиды цитоплазматической мембраны, минуя собственный синтез ЖК и используя специфическую ацилтрансферазу, переносящую олеиновую кислоту с олеил-КоА субстрата на фосфолипиды.

Таблица 3

Состав жирных кислот экстрагируемых липидов *C. eutrophus* В-10646 выращенных на фруктозе и олеиновой кислоте с добавками валериановой кислоты

ЖК	Фруктоза	Фруктоза+ Олеиновая	Олеиновая кислота
10:0	0.01±0.009	0.035±0.005	0.01±0.000
11:0	Сл.	0.015±0.005	0.01±0.000
12:0	0.095±0.015	0.11±0.000	0.05±0.010
i-13:0	Сл.	Сл.	0.015±0.050
13:0	0.03±0.010	0.045±0.005	0.005±0.005
i-14:0.	Сл.	0.015±0.000	0.035±0.050
14:0	1.32±0.080	1.57±0.090	0.505±0.000
14:1	0.01±0.010	0.025±0.000	0.215±0.155
i-15:0	0.06±0.040	0.07±0.010	0.17±0.095
Ai-15:0	0.075±0.035	0.125±0.035	0.57±0.020
15:0	2.44±0.420	2.76±0.380	0.605±0.095
15:1	0.015±0.014	0.025±0.000	0.03±0.010
i-16:0	0.095±0.035	0.1±0.000	0.335±0.005
16:1ω9	Сл.	0.83±0.007	0.97±0.090
<b>16:1ω7</b>	<b>6.465±0.905</b>	<b>9.25±0.820</b>	<b>1.875±0.365</b>
16:1ω5	0.845±0.305	0.46±0.010	0.215±0.195
<b>16:0</b>	<b>48.695±0.215</b>	<b>30.545±3.905</b>	<b>8.705±1.105</b>
17:0	0.635±0.175	1.795±0.015	1.36±0.820
i-17:0	Сл.	0.08±0.020	0.13±0.000
Ai-17:0	Сл.	0.385±0.155	0.835±0.000
17:1	1.89±0.150	1.365±0.345	1.02±0.460
<b>C-17:0</b>	<b>12.49±2.270</b>	<b>3.995±2.505</b>	<b>1.62±0.090</b>
18:2ω6	-	2.45±0.270	1.575±0.075
<b>18:1ω9</b>	<b>2.89±1.270</b>	<b>27.775±2.595</b>	<b>65.48±2.570</b>
<b>18:1ω7</b>	<b>17.75±3.550</b>	<b>9.17±0.620</b>	<b>5.675±0.325</b>
18:0	1.315±0.105	3.00±0.090	4.54±0.570
C-19:0	0.77±0.715	1.80±1.620	0.265±0.000
20:0	-	0.195±0.015	0.16±0.040
20:1	-	1.015±0.775	2.98±0.440
22:0	-	0.03±0.000	-
2-ОН- 16:0	2.04±0.160	0.21±0.000	-
22:1	-	0.125±0.000	-
∑ОН кислот	2.04±0.160	0.21±0.000	-
∑циклопроп.	13.26±3.040	5.79±3.320	1.88±0.170
∑нас/∑ненас	2.18±0.470	0.88±0.045	0.24±0.025

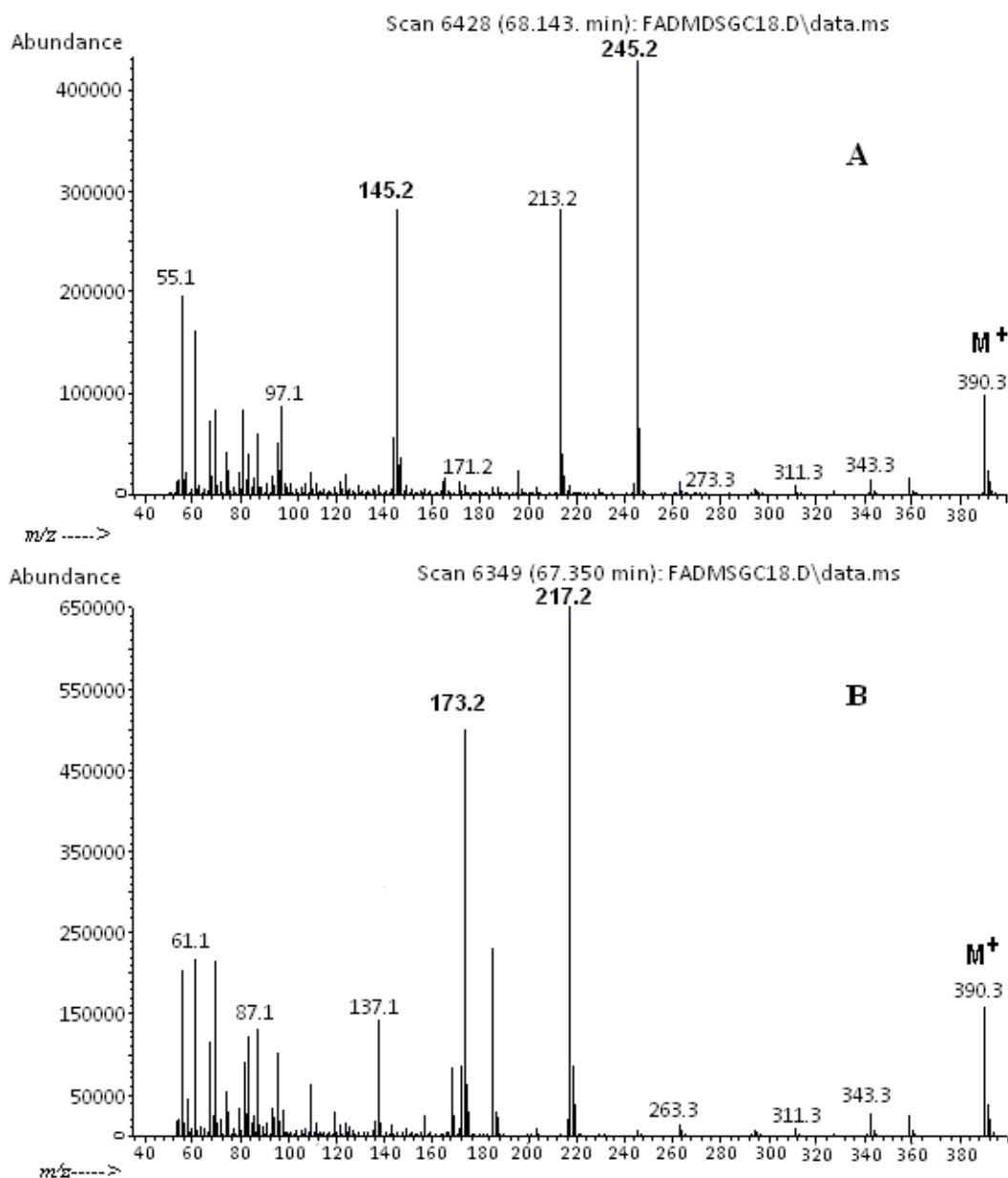


Рисунок 8 - Масс-спектры ДМДС производных метиловых эфиров цис-вакценовой (А) и олеиновой (б) кислот.

Достоверность идентификации олеиновой кислоты в составе липидов *C. eutrophus* В-10646 была подтверждена масс-спектрометрией диметил дисульфидных производных метиловых эфиров цис-вакценовой и олеиновой кислот (Рисунок 9). Молекулярная масса ДМДС изомеров октадеценовой кислоты была 390, а  $m/z$  диагностических фрагментов – 245 и 145 для 18:1 $\omega$ 7 (цис-вакценовая), и 217, 173 – для 18:1 $\omega$ 9 (олеиновая кислота) (рисунок 8).

Таблица 4

Состав жирных кислот прочносвязанных липидов *C. eutrophus* В-10646 выращенных на фруктозе и олеиновой кислоте с добавками валериановой кислоты

ЖК	фруктоза	фруктоза+18:1 $\omega$ 9	18:1 $\omega$ 9
10:0	0.03 $\pm$ 0.170	0.02 $\pm$ 0.000	0.045 $\pm$ 0.015
11:0	0.015 $\pm$ 0.005	0.01 $\pm$ 0.000	-
12:0	0.235 $\pm$ 0.005	0.235 $\pm$ 0.005	0.275 $\pm$ 0.105
13:0	0.295 $\pm$ 0.005	0.3 $\pm$ 0.010	0.265 $\pm$ 0.115
i-14:0	0.055 $\pm$ 0.0350	0.015 $\pm$ 0.005	0.015 $\pm$ 0.005
14:0	18.605 $\pm$ 2.515	18.005 $\pm$ 0.365	21.705 $\pm$ 6.085
14:1 $\omega$ 5	1.015 $\pm$ 0.155	0.615 $\pm$ 0.125	0.94 $\pm$ 0.810
i-15:0	0.19 $\pm$ 0.130	0.07 $\pm$ 0.020	0.105 $\pm$ 0.035
15:0	1.07 $\pm$ 0.240	0.84 $\pm$ 0.040	0.89 $\pm$ 0.280
i-16:0	0.105 $\pm$ 0.085	0.06 $\pm$ 0.030	0.06 $\pm$ 0.020
<b>16:0</b>	<b>10.92<math>\pm</math>4.770</b>	<b>7.985<math>\pm</math>1.145</b>	<b>8.265<math>\pm</math>2.005</b>
<b>16:1<math>\omega</math>7</b>	<b>3.41<math>\pm</math>0.790</b>	<b>3.16<math>\pm</math>0.530</b>	<b>4.415<math>\pm</math>0.455</b>
16:1 $\omega$ 5	0.15 $\pm$ 0.050	0.245 $\pm$ 0.115	0.1 $\pm$ 0,030
i-17:0	-	0.04 $\pm$ 0.000	-
17:0	0.48 $\pm$ 0.270	0.21 $\pm$ 0.050	0.26 $\pm$ 0.100
17:1 $\omega$ 9	0.64 $\pm$ 0.490	0.275 $\pm$ 0.095	0.325 $\pm$ 0.085
<b>c-17:0</b>	<b>0.305<math>\pm</math>0.259</b>	<b>-</b>	<b>0.055<math>\pm</math>0.045</b>
$\beta$ -ОН-12:0	0.565 $\pm$ 0.005	0.49 $\pm$ 0.040	0.345 $\pm$ 0.005
2-ОН-14:0	7.945 $\pm$ 1.185	7.145 $\pm$ 0.615	6.29 $\pm$ 1.400
18:0	0.895 $\pm$ 0.475	1.265 $\pm$ .335	1.17 $\pm$ 0.330
<b>18:1<math>\omega</math>7</b>	<b>1.445<math>\pm</math>0.865</b>	<b>1.29<math>\pm</math>0.310</b>	<b>1.895<math>\pm</math>0.385</b>
<b>18:1<math>\omega</math>9</b>	<b>2.815<math>\pm</math>1.975</b>	<b>9.055<math>\pm</math>3.975</b>	<b>13.04<math>\pm</math>3.560</b>
2-ОН-16:0	0.095 $\pm$ 0.000	Сл.	Сл.
$\beta$ -ОН-14:0	46.345 $\pm$ 6.495	45.7 $\pm$ 6.170	37.695 $\pm$ 11.895
$\beta$ -ОН-16:0	0.93 $\pm$ 0.740	1.06 $\pm$ 0.020	0.735 $\pm$ 0.145
$\Sigma$ ОН-кислот	56.265 $\pm$ 8.495	55.675 $\pm$ 6.905	46.055 $\pm$ 13.575
$\Sigma$ циклопр.	0.305 $\pm$ 0.259	-	0.055 $\pm$ 0.045
Нас/ненасыщ	28.3 $\pm$ 18.830	6.72 $\pm$ 2.600	4.09 $\pm$ 1.160

К прочносвязанные липидам в основном относятся липополисахариды клеточной стенки грам-отрицательных бактерий, а спектр жирных кислот, ацилирующих липид А, отличается от

внутриклеточного состава жирных кислот [29]. Состав жирных кислот прочносвязанных липидов *C. eutrophus* В-10646 характеризовался высоким содержанием длинноцепочечных гидроксикислот, доля которых превышала 50 %, и повышенным содержанием миристиновой кислоты (более 20 % от суммы жирных кислот) (Таблица 4). Циклопропановые кислоты в липополисахаридах не обнаружены. Практически они отсутствовали и в составе прочносвязанных липидов исследованного штамма. Достоверных отличий относительного содержания доминирующих ЖК прочносвязанных липидов бактерий, выращенных на разных субстратах, не выявлено. Отмечено повышение доли олеиновой кислоты при росте культуры на соответствующем субстрате. Но это вероятнее всего связано с тем, что в состав прочносвязанных липидов входят не только жирные кислоты из липополисахаридов, но и ЖК, связанные с внутриклеточными белками, например АПБ и КоА.

Таким образом, на всех перечисленных субстратах *C. eutrophus* В-10646 активно растет и синтезирует полимер. Добавки валериановой кислоты стимулируют синтез гетерополимера с высоким содержанием 3-гидроксивалерата до 25 мол. % на всех субстратах. Основные изменения в липидах связаны с модификацией спектра жирных кислот липидов цитоплазматической мембраны и практически неизменным их составом в липополисахаридах.



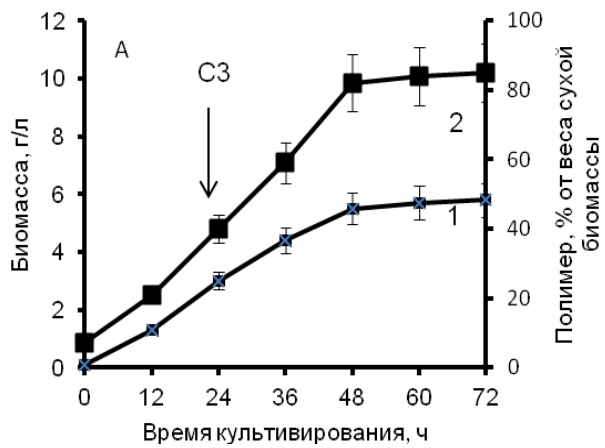
### 3.2 Рост и синтез полимера *C. eutrophus* В-10646 на разных субстратах с добавкой пропионовой кислоты

На рисунке 9 представлены кривые роста бактерий *C. eutrophus* В-10646 и накопления полимера при использовании фруктозы, олеиновой кислоты и сочетания фруктозы и олеиновой кислоты. Из рисунка видно, что урожай биомассы и содержание полимера при росте на этих субстратах были сопоставимы и составляли соответственно 5.9-6.0 г/л и 80-82% от веса сухой биомассы. Добавление пропионовой кислоты на 24 час культивирования привело к получению гетерополимера, состав которого представлен в Таблице 5. Из таблицы видно, что при использовании всех субстратов бактерии включали 3-гидроксивалерат в полимер, содержание которого в полимере составляло 14.2-23.2 мол. %. Следует отметить, что при использовании олеиновой кислоты как единственного источника углерода или в сочетании с фруктозой в составе полимера идентифицирован 3-гидроксигексаноат (0.3-0.6 мол. %). Измерение молекулярной массы полимера показало, что максимальные значения Мв (840 кДа) и Мч (240 кДа) получены при росте на фруктозе.

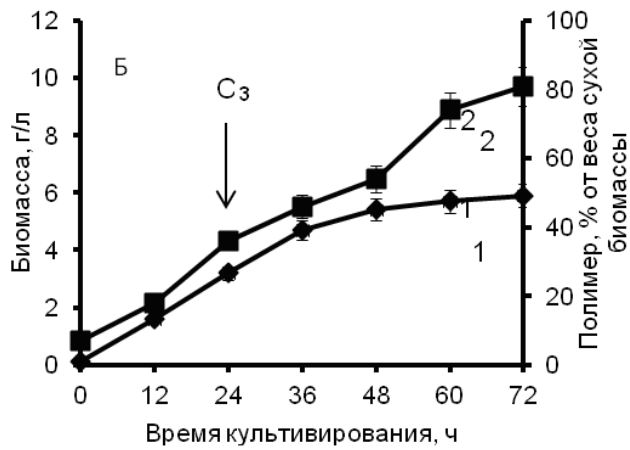
Таблица 5

Состав и молекулярно-массовые характеристики полимера бактерий *C. eutrophus* В-10646, выращиваемой на различных углеродных субстратах (72 час культивирования) при добавлении пропионовой кислоты

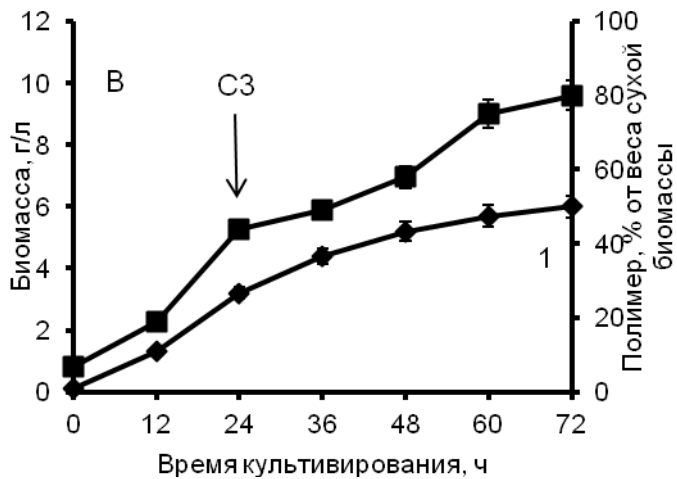
Субстрат	C4 мол.%	C5 мол.%	C6 мол.%	Мч кДа	Мв кДа	ПД
Фруктоза	76.8	23.2	-	240	840	3.50
Олеиновая кислота	85.5	14.2	0.3	150	617	4.11
Фруктоза+олеиновая кислота	82.0	17.4	0.6	144	612	4.25



А



Б



В

Рисунок 9 - Динамика биомассы (1) и полимера (2), синтезируемого бактериями *C. eutrophus* B-10646 при росте на фруктозе (А), олеиновой

кислоте (Б) и смеси фруктозы и олеиновой кислоты (С) при добавлении пропионовой кислоты.

В таблице 6 показано потребление основных субстратов и ко-субстрата бактериями *C. eutrophus* В-10646. Из таблицы видно, что в конце культивирования пропионовая кислота отсутствовала в среде. Потребление фруктозы и олеиновой кислоты при использовании их как единственных источников углерода за 72 ч культивирования бактерий составляло соответственно 17.4 г/л и 9.3 г/л. При совместном использовании фруктозы и олеиновой кислоты потребление фруктозы и олеиновой кислоты составляло соответственно 4.5 г/л и 6.0 г/л

Таблица 6

Содержание фруктозы, пропионовой и олеиновой кислот в культуральной среде при выращивании *C. eutrophus* В-10646 на различных углеродных субстратах

Субстрат	Содержание в культуральной среде. г/л								
	Олеиновая кислота			Пропионовая кислота			Фруктоза		
	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Фруктоза	-	-	-	1 <sup>**</sup>	0	0	1.6/10 <sup>*</sup>	4.2	1.0
Олеиновая кислота	5.4	1.1	0.7	1 <sup>**</sup>	0	0	-	-	-
Фруктоза+олеиновая кислота	1.2	0.2*/5	2.9	1 <sup>**</sup>	0	0	5	2	0.5

\* - концентрация субстрата до и после его добавления в культуральную среду.

\*\* - добавка пропионовой кислоты

На рисунке 10 показано содержание внутриклеточных липидов у бактерий *C. eutrophus* В-10646 при росте на различных субстратах в присутствии пропионовой кислоты. Из рисунка видно, что содержание внутриклеточных липидов не изменялось на всех приведенных субстратах.

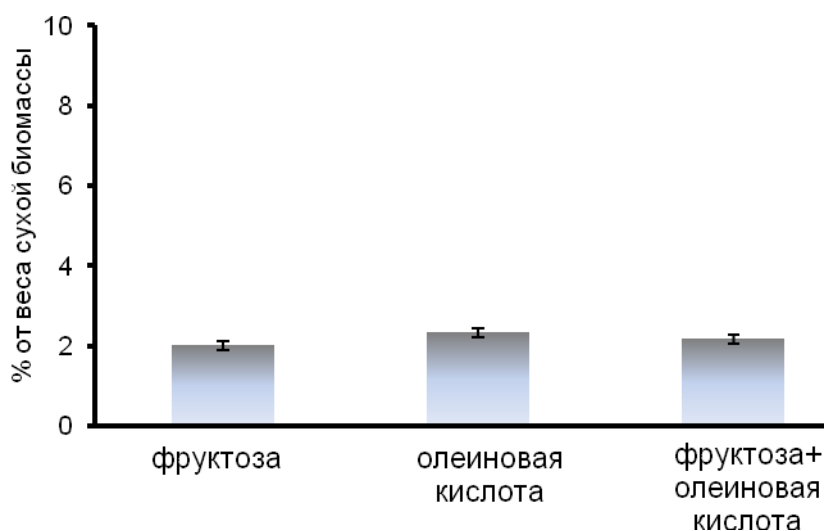


Рисунок 10 - Содержание внутриклеточных липидов у бактерий *S. eutrophus* В-10646 при росте на различных субстратах в присутствии пропионовой кислоты.

Из результатов таблицы 7 видно, что изменения в составе жирных кислот экстрагируемых липидов бактерий, выращенных на разных субстратах, но с добавками пропионовой кислоты в качестве ко-субстратов, имели ту же направленность, что и при добавках валерата. Увеличивалась доля олеиновой кислоты до 60 %, на смешанном субстрате и олеиновой кислоте, и снижалась доля кислот собственного синтеза. Активный синтез циклопропановых кислот на 72 часу роста культуры отмечен только на фруктозе. Отсюда можно сделать вывод, что изменения в составе ЖК экстрагируемых липидов определялся только олеиновой кислотой и не зависел от ко-субстратов, которые практически все встраивались в полимер.

Таблица 7

Состав жирных кислот экстрагируемых липидов *C. eutrophus* В-10646  
выращенных на фруктозе и олеиновой кислоте с добавками пропионовой  
кислоты

ЖК	фруктоза	Фруктоза+18:1 $\omega$ 9	18:1 $\omega$ 9
10:0	0.02±0.000	0.01±0.000	0.01±0.000
12:0	0.025±0.005	0.05±0.010	0.03±0.010
13:0	0.01±0.000	0.01±0.000	0.01±0.000
и-14:0	0.02±0.010	0.04±0.010	0.055±0.005
14:0	1.025±0.015	1.19±0.310	0.765±0.165
14:1 $\omega$ 5	0±0.000	0.075±0.045	0.06±0.020
ai-15:0	0.135±0.075	0.26±0.010	0.345±0.015
i-15:0	0.055±0.025	0.16±0.010	0.205±0.005
15:0	1.675±0.005	0.395±0.045	0.2±0.040
15:1 $\omega$ 6	0.005±0.000	0.01±0.000	0.015±0.005
i-16:0	0.09±0.050	0.195±0.005	0.24±0.010
<b>16:0</b>	<b>33.81±0.470</b>	<b>8.29±0.490</b>	<b>6.46±0.130</b>
16:1 $\omega$ 9	0.835±0.055	0.55±0.130	0.48±0.030
<b>16:1<math>\omega</math>7</b>	<b>5.705±0.185</b>	<b>4.16±0.490</b>	<b>3.735±0.105</b>
16:1 $\omega$ 5	0.285±0.000	0.16±0.020	0.29±0.160
i-17:0	-	0.415±0.265	0.17±0.010
ai-17:0	-	0.485±0.135	0.745±0.015
17:0	1.325±0.315	0.49±0.040	0.29±0.020
17:1 $\omega$ 9	0.455±0.185	0.91±0.490	0.875±0.005
<b>C-17:0</b>	<b>16.54±9.750</b>	<b>1.76±0.470</b>	<b>0.765±0.325</b>
18:0	1.645±0.705	7.905±0.475	11.475±0.145
<b>18:1<math>\omega</math>9</b>	<b>19.12±8.360</b>	<b>59.975±1.775</b>	<b>59.22±0.590</b>
<b>18:1<math>\omega</math>7</b>	<b>11.44±7.820</b>	<b>1.93±1.690</b>	<b>3.375±0.615</b>
18:1 $\omega$ 5	0.685±0.345	0.37±0.060	0.495±0.175
18:2	1.83±0.690	7.55±0.220	7.895±0.475
c-19:0	1.67±0.940	0.905±0.175	0.555±0.195
2-ОН-16:0	1.08±0.350	-	-
20:0	-	0.125±0.015	0.08±0.000
20:1	-	1.43±0.170	1.34±0.020
$\Sigma$ ОН кислот	1.08±0.350	-	-
$\Sigma$ циклопропановых	18.21±10.870	2.665±0.825	1.32±0.520
$\Sigma$ нас./ $\Sigma$ ненас.	1.59±0.000	0.28±0.009	0,28±0,001

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено культивирование бактерии *C. eutrophus* В-10646 в периодической культуре. В качестве углеродного субстрата использовали фруктозу, олеиновую кислоту, смесь олеиновой кислоты с фруктозой и добавками солей валериановой и пропионовой кислот.

В эксперименте с валериановой кислотой:

Потребление фруктозы и олеиновой кислоты при использовании их как единственных источников углерода за 72 ч культивирования бактерий составляло соответственно 17.5 г/л и 9.4 г/л. При совместном использовании фруктозы и олеиновой кислоты потребление фруктозы и олеиновой кислоты составляло соответственно 3.4 и 7.7 г/л.

Добавление валериановой кислоты на 24 час культивирования привело к получению гетерополимера на всех приведенных субстратах, но максимальные значения молекулярной массы полимера, были получены при росте на фруктозе.

Содержание внутриклеточных липидов составляло около 2% от сухой биомассы на всех приведенных субстратах. Качественный состав липидных фракций бактерий также не зависел от используемых субстратов.

Состав жирных кислот липидов цитоплазматической мембраны бактерий существенно менялся в зависимости от субстратов: на фруктозе он характеризовался высоким отношением насыщенных кислот к ненасыщенным более 2.2 за счет преимущественного синтеза пальмитиновой, стеариновой и циклопропановых кислот и низким уровнем моноеновых кислот, представленных пальмитолеиновой и цис-вакценовой кислотами. При выращивании бактерий *C. eutrophus* В-10646 на олеиновой кислоте или на смеси субстратов отношение насыщенных к ненасыщенным кислотам снижалось до 0.2 и 0.9 соответственно. Эти изменения связаны с увеличением доли моноеновых кислот и снижением синтеза циклопропановых

кислот. Основным изомером ненасыщенных кислот была олеиновая кислота, доля которой составила от 30 до 58 % в спектре жирных кислот.

Состав жирных кислот прочносвязанных липидов отличался от экстрагируемых и характеризовался высоким содержанием миристиновой кислоты (до 20 % от суммы ЖК) и длинноцепочечных 3-гидроксикислот (более 50 % от суммы ЖК). Достоверных изменений в составе ЖК липополисахаридов бактерий, выращенных на разных субстратах, не выявлено.

В эксперименте с пропионовой кислотой:

Потребление фруктозы и олеиновой кислоты при использовании их как единственных источников углерода за 72 ч культивирования бактерий составляло соответственно 17.4 г/л и 9.3 г/л. При совместном использовании фруктозы и олеиновой кислоты потребление фруктозы и олеиновой кислоты составляло соответственно 4.5 г/л и 6.0 г/л.

Добавление пропионовой кислоты на 24 час культивирования привело к получению гетерополимера на всех приведенных субстратах, но максимальные значения молекулярной массы полимера были получены при росте на фруктозе.

В составе жирных кислот экстрагируемых липидов бактерий, выращенных на разных субстратах, но с добавлением пропионовой кислоты выявлены те же изменения, что и при использовании валериановой кислоты в качестве ко-субстрата. Отсюда можно сделать вывод, что изменения в составе ЖК экстрагируемых липидов определялся только присутствием в среде олеиновой кислоты и не зависел от ко-субстратов

По результатам проделанной работы были сформулированы следующие выводы:

1. Урожай биомассы и содержание полимера при росте на фруктозе, олеиновой кислоте и смеси фруктозы и олеиновой кислоты с добавлением валериановой или пропионовой кислот были сопоставимы и составляли соответственно 5.7-5.9 г/л и 64-82 % от веса сухой биомассы, соответственно. Добавление индукторов привело к синтезу гетерополимеров с включением 3-ОН-ГВ до 27 мол.% на всех субстратах, не зависимо от используемого ко-субстрата.
2. Вне зависимости, какой субстрат использовался при культивировании, содержание экстрагируемых липидов не менялось и составляло около 2 % на сухую биомассу.
3. Состав ЖК экстрагируемых липидов существенно изменялся в зависимости от использованных субстратов. Основные изменения происходили в присутствии в среде олеиновой кислоты, повышая долю 18:1 $\omega$ 9 в липидах цитоплазматической мембраны до 50 % и выше, но не зависели от ко-субстрата.
4. Состав жирных кислот прочносвязанных липидов отличался от экстрагируемых липидов и характеризовался высоким содержанием миристиновой кислоты и длинноцепочечных 3-гидроксикислот. Достоверных изменений в составе ЖК липополисахаридов бактерий, выращенных на разных субстратах, не выявлено.



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алимов Е.К. Аствацатурьян А. Т. Биосинтез и окисление жирных кислот нормального строения с нечетным числом атомов С, разветвленных и циклопропановых./Успехи современной биологии/1973, в т. 76, № I (4). – С.34-53
2. Андреев Л.В.,Склифас А.Н. О хемотаксономических аспектах липидного обмена бактерий. /В сб. Биохимия и биофизика микроорганизмов. /Межвузовский сб., серия биол., / - Горький - 1977, №5. - С. 3-9
3. Акимова Т.Г. Хаскин В.В. /ЮНИТИ-ДАНА/ - 2007. –495с.
4. Васюренко З.П. Циклопропановые жирные кислоты микроорганизмов/ Успехи современной биологии/1980, в т. 90, №2. - С. 179-192
5. Воронова Е.А. Паничев А.В. Сопоставление спектров жирных кислот бактерий семейства *Vibrionaceae* с помощью метода численного анализа./Биохимия и биофизика микроорганизмов./ - Горький – 1983, №II – С.62-68, 107
6. Заварзин Г. А. Водородные бактерии и карбоксидобактерии./ М.: Наука/ 1978, С. 204
7. Заварзин Г. А., Жилина Т.Н. Миксобактерии в культурах водородных бактерий /Микробиология/ 1971, том 40 – С. 407-412
8. Калачева Г.С., Трубачев И.Н. Липиды водородных бактерий // В сб.: Хемосинтез в непрерывной культуре. /- Новосибирск/- Наука, 1978. С. 89-96
9. Кеслер Т.Г., Вебер М.И., Войтович Я. В. Потребности водородных бактерий на различных источниках азота.//В кн. :Непрерывная культура водородокисляющих бактерий как средство биосинтеза белка. //- Красноярск//- 1974, С. 28-45
- 10.О’Лири. Липиды микроорганизмов./Молекулярная микробиология./ Мир/- 1977, С.201-239

11. Пинчук Л.М., Соколова К.Я. О значении профилей жирных кислот в таксономии энтеробактерий. /Биохимия и биофизика микроорганизмов/ - Горький/-1983, №II, С.53-58
12. Рубан Е.А. Фосфолипиды и фосфолипазы микроорганизмов. /Успехи микробиологии/-1980, №15-С.41-67
13. Тагер А. А. Физико-химия полимеров/Тагер А.А. – Москва: Издательство «Химия». – 1968.-500с.
14. Barridge J.K. Shively J.M. Phospholipids of the Thiobacillus./J. Bacteriol.// - 1968, v. 95. P. 2182-2185
15. Bøe B., Gjerde J. The fatty acid patterns in the classification of some representatives of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae./J.Gen.Microbiol./ - 1980, v.116, №1. P.41-49
16. Buyer J.S. Identification of bacteria from single colonies by fatty acid analysis /J. Microb. Meth./ - 2002. V. 48. P. 259-265
17. Calcott P.H., Petty S. Phenotypic variability of lipids of *Escherichia coli* grown in chemostat culture./PEMS Microbiol. Lett./ - 1980. V.7, № 1, P.23-27
18. Cronan, J.E. Jr. and Rock, C.O. Biosynthesis of membrane lipids. /In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* 2nd ed./American Society for Microbiology /- 1996. P. 612-636
19. Dennis D., McCoy M., Stangl A., Valentin H.E., Wu Z. Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha* /J. Biotechnol./ 1998. V. 64. P. 177-186.
20. Doi Y., Tamaki A., Kunioka M., Soga K. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids / Appl. Microbiol. Biotechnol. /1998. V. 28. P. 330-334.
21. Thiele O.W. The lipids of hydrogen oxidizing bacteria: occurrence of cis-9,10-methylene hexadecanoic acid in *Hydrogenomonas* H-16 /Experientia/- 1971. V. 27. N 15. P. 1268-1269.

22. Thiele O.W., Dreysel J., Hermenn D. The free lipids of two different strains of hydrogenoxidizing bacteria in relation to their growth phases / *Eur. J. Biochem.* / - 1972. V. 29. P. 224-236.
23. Thiele O.W., Thiele C. Lipid patterns of various hydrogen oxidizing bacterial species / *Biochem. Sys. Ecol*/ -1977. V.5. P. 1-6.
24. Galbraith L., Jonsson M.H., Rudhe L. C., Wilkinson S.G. Lipids and fatty acids of *Burkholderia* and *Ralstonia* species / *FEMS Microbiol. Lett.*/- 1999. V. 173. P. 359-364.
25. Grogan D. W., Cronan J.E. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria / *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* /-1977. V. 61. P. 429-441.
26. Kalacheva G. S. and Volova T. G. Fatty Acid Composition of *Wautersia eutropha* Lipids under Conditions of Active Polyhydroxyalkanoates Synthesis / *Microbiology.*/ - 2007. V. 76. No.5. P. 535–540.
27. Lennars W.J. lipid metabolism in the bacteria. / *Acad. Press*/-1967. P175-225
28. Lee S.Y., Choi L., Han K. and Song J.Y. Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria / *Appl. Environ. Microbiol.*/- 1999. V.65. P. 2762-2764.
29. Noda I., Green P. R., Satkowski M. M., and Schechtman L. A. Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers / *Biomacromol.* /2005. V. 6. P. 580-586.
30. Rick, P.D. Lipopolysaccharide biosynthesis. In *Esherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* ed. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanic, B., Schaechter, M. and Umberger, H.E. Washington DC: /American Society for Microbiology/- 1987. Vol. 1. P. 648-538.
31. Riedel S.L., Lu J., Stahl U/, Brigham C.J. Lipid and fatty acid metabolism in *Ralstonia eutropha*: relevance for the biotechnological production of value-added products / *Appl. Microbiol. Biotechnol.*/- 2014. V.98. P.1469–1483

32. Volova T. G., Kalacheva G.S., A. Steinbüchel. Biosynthesis of Multi-Component Polyhydroxyalkanoates by the Bacterium *Wautersia eutropha*/ *Macromol. Symp.* /2008, 269, 1–7
33. Volova T.G., Zhila N.O., Kalacheva G.S., Sokolenko V.A., Sinsky E.J. Synthesis of 3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate Copolymers by Hydrogen-Oxidizing Bacteria /*Applied Biochemistry and Microbiology.*/ 2011. V. 47, No. 5. P. 494–499.
34. Yang YH, Brigham CJ, Budde CF, Boccuzzi P, Willis LB, Hassan MA, Yusof ZAM, Rha CK, Sinskey AJ (2010) Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoates (PHA) production from organic acids by *Ralstonia eutropha*. /*Appl Microbiol Biotechnol*/ 87:2037–2045