

**Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* B-10646 from mixtures of oleic acid and 3-hydroxyvalerate precursors**

Zhila N.O.<sup>1,2,\*</sup>, Kalacheva G.S.<sup>1</sup>, Fokht V.V.<sup>2</sup>, Bubnova S.S.<sup>2</sup>, Volova T.G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”

Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation

<sup>2</sup>Siberian Federal University

79 Svobodnyi Ave., Krasnoyarsk, 660041, Russian Federation

\*Corresponding author E-mail address: [nzhila@mail.ru](mailto:nzhila@mail.ru)

Polyhydroxyalkanoates have attracted much attention as biodegradable alternative to petroleum-based synthetic plastics. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] copolymer is one of the best characterized PHA copolymers because of its high commercial potential. However, commercial use of PHAs has been limited by their high price. One approach to reducing the cost of PHA production is to use inexpensive carbon sources (fatty acids, plant oils, etc.). The aim of this work was to study synthesis of P(3HB-co-3HV) by the *Cupriavidus necator* B-10646 bacterium grown on oleic acid and different biochemical precursors of 3HV. Bacterial cells were grown for 72 h at 30 °C and 200 rpm on an incubator shaker. Salts of propionic or valeric acids were used as precursors of 3HV. The content and the composition of the polymer were determined by gas chromatography of fatty acid methyl esters. Lipids and polymer were extracted from biomass using the method of Folch. The addition of potassium propionate and valerate did not inhibit bacterial growth and polymer synthesis, the cell concentration and polymer content reaching 9.3-9.5 g/L and 80-83%, respectively. The addition of potassium valerate or propionate led to the synthesis of (P(3HB-co-3HV)) copolymer containing 21.2 and 14.3 mol% of 3HV, respectively. The number average molecular weight (Mn) of the polymer synthesized by the bacterium on oleic acid alone was 220 kDa; the polydispersity of the polymer was 3.5. The polymer synthesized in the presence of potassium valerate and propionate was characterized by a lower Mn (156-178 kDa) and a higher polydispersity of the polymer (4.4-4.9). The main fatty acids (FA) of intracellular lipids were oleic (33.26% of the total FA) and palmitic acid (27.48% of the total FA). The addition of potassium propionate or valerate did not cause any significant changes in the composition of the FA of intracellular lipids of the strain studied. This study demonstrates the ability of *C. necator* B-10646 to synthesize P(3HB-co-3HV) from mixtures of oleic acid and 3HV precursors. The

data obtained can be used to develop and implement an economically feasible process of the P(3HV-co-3HV) production.

Key words: *Cupriavidus necator*, 3-hydroxyvalerate, oleic acid, molecular weight, fatty acids

**Биосинтез поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата) бактериями *Cupriavidus necator* В-10646, культивируемыми на смеси из олеиновой кислоты и**

**предшественников 3-гидроксивалерата**

Жила Н.О.<sup>1,2</sup>, Калачева Г.С.<sup>1</sup>, Фохт В.В.<sup>2</sup>, Бубнова С.С.<sup>2</sup>, Волова Т.Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН»

Академгородок, Красноярск, 660036, Россия

<sup>2</sup>Сибирский федеральный университет  
пр. Свободный 79, Красноярск, 660041, Россия

Полигидроксиалканоаты (ПГА) привлекают большое внимание в качестве биоразлагаемой альтернативы синтетическим пластикам. Сополимер поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат) [П(3ГБ-со-3ГВ)] является одним из наиболее охарактеризованных сополимеров ПГА из-за его высокого коммерческого потенциала. Однако применение ПГА, и в частности П(3ГБ-со-3ГВ), ограничено их высокой ценой. Одним из подходов к снижению стоимости производства ПГА является использование недорогих источников углерода (жирных кислот, растительных масел и др). Целью этой работы было исследование синтеза сополимера П(3ГБ-со-3ГВ) бактериями *Cupriavidus necator* В-10646, культивируемыми на олеиновой кислоте с разными биохимическими предшественниками 3ГВ. Бактерии выращивали в течение 72 ч в термостатируемом шейкере-инкубаторе при 30°C и 200 об/мин. В качестве предшественников 3ГВ использовали соли пропионовой или валериановой кислот. Содержание и состав полимера определяли газовой хроматографией метиловых эфиров жирных кислот. Липиды и полимер экстрагировали из биомассы по методу Фолча. Добавление пропионата и валерата калия не ингибировало рост бактерий и синтез полимера. Урожай биомассы и содержание полимера составляло соответственно 9,3-9,5 г/л и 80-83% от веса сухой биомассы. Использование валерата или пропионата калия привело к синтезу бактериями сополимера П(3ГБ-со-3ГВ) с включением 3ГВ соответственно 21,2 и 14,3 мол.%.

Среднечисловая молекулярная масса (Мч) полимера, синтезируемого бактериями при росте исключительно на олеиновой кислоте, составляла 220 кДа, полидисперсность полимера – 3,5. Полимер, синтезируемый в присутствии пропионата или валерата калия, характеризовался более низкой Мч (156-178 кДа) и более высокой полидисперсностью (4,4-4,9). Основными жирными кислотами (ЖК) внутриклеточных липидов бактерий, культивируемых только на олеиновой кислоте, были олеиновая (33,26% от суммы ЖК) и пальмитиновая кислота (27,48% от суммы ЖК). Добавление пропионата или валерата калия не привело к значительным изменениям в составе ЖК внутриклеточных липидов исследуемого штамма. Таким образом, показана способность *C. necator* В-10646, синтезировать П(ЗГБ-со-ЗГВ) при росте на смеси из олеиновой кислоты и предшественников ЗГВ. Полученные данные могут быть использованы для разработки и осуществления экономически обоснованного процесса производства П(ЗГБ-со-ЗГВ).

Ключевые слова: *Cupriavidus necator*, 3-гидроксивалерат, олеиновая кислота, молекулярная масса, жирные кислоты

## Введение

Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются запасными полимерами, накапливаемыми в цитоплазме многих микроорганизмов. Биотехнологическая продукция ПГА всесторонне исследуется из-за их термопластических свойств и биоразрушаемости (Steinbüchel, 2001). Поли(3-гидроксibuтират) (П(ЗГБ)) является самым распространенным представителем ПГА. Однако в связи с высокой кристалличностью и слабой эластичностью П(ЗГБ), наибольший интерес вызывают сополимеры 3-гидроксibuтирата с другими мономерами, например, с 3-гидроксивалератом (ЗГВ), характеризующиеся лучшими физическими свойствами (Chen et al., 2006). Первая попытка выпускать сополимер П(ЗГБ-со-ЗГВ) под торговой маркой БИОПОЛ (BIOPOL™) была предпринята фирмой «Имперская химическая индустрия» (ICI) в 1981 г. (Holmes, 1985). В результате периодического культивирования бактерий на глюкозе и пропионовой кислоте получали сополимер П(ЗГБ-со-ЗГВ) с включением ЗГВ 20 мол.% (Choi, Lee, 1999). В настоящее время показана возможность получения сополимеров с более высоким включением ЗГВ (до 50-70 мол.%) (Shantini et al., 2013; Berezina, Yada, 2016). Однако следует отметить, что прекрасной прочностью и эластичностью обладают уже сополимеры с содержанием ЗГВ на уровне 20-25 мол.% (Luzier, 1992), что делает возможным их использование для изготовления нанокompозитов и медицинских изделий (Yu, Qin, 2014).

На сегодняшний день полная стоимость продукции ПГА намного выше по сравнению с пластиками, получаемыми химическим путем. Одним из основных факторов высокой стоимости ПГА является цена субстратов для роста бактериальных штаммов и синтеза полимера. В связи с этим поиск дешевых источников углерода с целью получения ПГА, а также ПГА сополимеров по более привлекательной цене – важная исследовательская задача. В качестве углеродных субстратов для синтеза ПГА могут быть использованы различные отходы сельскохозяйственных производств, например, сыворотка (Ahn et al., 2001), меласса (Solaiman et al., 2006; Oliveira et al., 2007), животные жиры (Riedel et al., 2015), растительные масла (Fukui, Doi, 1998; Lee et al., 2008; Sudesh et al., 2011; López-Cuellar et al., 2011). Кроме того, рядом исследователей показана возможность синтеза ПГА на жирных кислотах: олеиновой, миристиновой, стеариновой, пальмитиновой, лауриновой (Chee et al., 2010; Ramachandran et al., 2011), однако информации о производителе и степени чистоты жирных кислот в этих работах не приводится.

Наиболее подходящими являются липидоподобные субстраты, а именно растительные масла и жирные кислоты, так как их использование приведет к получению более высоких урожаев ПГА и, следовательно, будет сопровождаться снижением стоимости продукции ПГА (Akiyama et al., 2003; Loo, Sudesh, 2007). Показано, что растительные масла могут значительно улучшить биосинтез ПГА по сравнению с сахарами, которые обычно используются для культивирования бактерий, накапливающих ПГА (Kahar et al., 2004). Кроме того, такие субстраты содержат больше углерода по отношению к массе по сравнению с углеводами. Установлено, что при использовании растительного масла экономический коэффициент по субстрату составляет 0,8, тогда как при использовании глюкозы в качестве единственного источника углерода он снижается до 0,3 (Akiyama et al., 2003).

Целью этой работы было исследование возможности *Cupriavidus necator* В-10646 синтезировать сополимер П(ЗГБ-со-ЗГВ) при выращивании бактерий на олеиновой кислоте с разными биохимическими предшественниками мономера ЗГВ.

## **Материалы и методы**

Бактерии *C. necator* В-10646 выращивали в периодическом двухстадийном режиме, разработанном ранее для синтеза ПГА. Для выращивания бактерий за основу была принята минеральная среда Шлегеля следующего состава:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -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, заполненных культурой на 40% от объема на термостатируемом шейкере-инкубаторе Innova® серии 44 (New Brunswick Scientific, США) при 30 °С. В качестве углеродного субстрата использовали олеиновую кислоту (АО «ЭКОС-1», Россия; степень чистоты - 98-99%) в концентрации 10 г/л (контрольная культура). По мере исчерпания субстрата в течение культивирования делали добавки олеиновой кислоты в концентрации, аналогичной исходной. Для синтеза сополимеров с ЗГВ в культуру, растущую на олеиновой кислоте, на 48 час культивирования добавляли валерат или пропионат калия в концентрации 1 г/л. Длительность культивирования составляла 72 ч. Все эксперименты проведены в трех повторностях.

Урожай биомассы клеток в ходе развития культуры бактерий регистрировали по весу сухого вещества и оптическим показателям культуры. Содержание олеиновой кислоты в среде находили после экстракции ее гексаном на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890A/5975C (США). Содержание и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890A/5975C (США). Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием гельпроникающей хроматографии (хроматограф Agilent Technologies 1260 Infinity (США)) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия). Находили средневесовую ( $M_w$ ) и среднечисловую ( $M_n$ ) молекулярную массу, а также полидисперсность ( $\text{ПД} = M_w/M_n$ ).

Липиды и полимер экстрагировали из биомассы смесью хлороформ-метанол (2:1) по методу Фолча, предварительно отмывая биомассу от олеиновой кислоты кратковременной обработкой гексаном. В конечном экстракте полимер отделяли от липидов осаждением при добавлении двойного объема гексана. Далее проводили метанолиз для получения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) путем добавления смеси метанола и серной кислоты (50:1 по объему), в течение 2 часов при 90 °С. Анализ МЭЖК проводили на хромато-масс-спектрометре GC-MS 7890/5975C (Agilent Technologies, США). Условия анализа: газ-носитель – гелий, скорость 1 мл/мин; колонка HP-FFAP - 30 м, 0,25 мм, температура ввода пробы - 220°C; начальная температура хроматографирования - 120°C; подъем температуры до 230°C со скоростью 5°C/мин, изотермальный режим – 5 мин и последующий подъем температуры до 310°C со скоростью 10°C/мин, изотермальный режим - 3 мин; температура детектора - 230°C;

температура источника ионов - 150°C; электронный удар при 70 eV; определение фрагментов с атомными массами от 30 до 550 amu при 0,5 сек/скан. Идентификацию ЖК проводили по масс-спектрам и сравнением их времен удерживания с таковыми имеющихся стандартов (Serva, Германия; Sigma, США).

### Результаты и обсуждение

Добавление солей органических кислот в исследуемой концентрации, валерата или пропионата калия (1 г/л), не ингибировало рост бактерий *C. necator* В-10646 и синтез полимера, по сравнению с контрольным вариантом без добавления биохимических предшественников. Через 72 часа культивирования урожай биомассы бактерий составлял 9,3-9,5 г/л, содержание полимера – 80-83% от веса сухой биомассы (Таблица 1), что сопоставимо с данными, полученными при культивировании исследуемого штамма на сахарах (Zhila et al., 2015). Marangoni et al. (2000) установил, что использование олеиновой кислоты в качестве дополнительного субстрата (основной субстрат - глюкоза) приводило к увеличению продукции ПГА. Предполагается, что присутствие олеиновой кислоты усиливает работу ферментной системы синтеза ПГА из-за наличия двойной связи при С9 (Ramachandran et al., 2011). В результате β-окисления олеиновой кислоты увеличивается внутриклеточный пул ацетил-СоА, и часть этого пула используется в качестве субстрата для биосинтеза ПГА. Кроме того, из-за окисления формируется дополнительный пул НАДФН (Lee, 1996). Увеличение продукции ПГА показано у *Aeromonas hydrophilia*, *Cupriavidus necator* и рекомбинантного штамма *Escherichia coli* XY1-BluepSY1105, выращиваемых на олеиновой кислоте (Loo et al., 2005).

В составе полимера, синтезируемого *C. necator* В-10646 при росте на олеиновой кислоте, помимо 3-гидроксипропионата, являющегося доминирующим мономером (97,5 мол.%), идентифицированы в небольших количествах и другие мономеры, а именно: 3-гидроксивалерат (2,0 мол.%) и 3-гидроксигексаноат (0,5 мол.%) (Таблица 1). Следует отметить, что при росте на сахарах включение этих мономеров в полимер происходит только при наличии соответствующих прекурсоров (Volova et al., 2014; 2016). Появление 3-гидроксивалерата и 3-гидроксигексаноата также наблюдали в составе полимера, синтезируемого *Alcaligenes* sp. NCIMNo 5085, выращенного на олеиновой кислоте (Srivastava, Tripathi, 2013). Кроме того, интересно отметить, что при росте на олеиновой кислоте - субстрате, содержащем четное количество атомов углерода, в составе полимера идентифицирован мономер с нечетным количеством атомов углерода (3ГВ). Появление мономеров с нечетным количеством атомов углерода (3-гидроксигептаноата) показано

также для *Pseudomonas putida* Bet001, выращенного на олеиновой кислоте (Gumel et al., 2012).

Добавление валерата калия в культуру бактерий *C. necator* В-10646 привело к увеличению содержания ЗГВ в полимере до 21,2 мол.%. Добавление пропионата калия также привело к включению мономеров 3-гидроксивалерата в полимер, однако содержание ЗГВ было несколько ниже (14,3 мол.%) (Таблица 1). Аналогичную ситуацию наблюдали Vhubalan et al. (2008), в работе которых показано более эффективное превращение валерата натрия в ЗГВ по сравнению с пропионатом натрия. Кроме того, в работе Doi et al. (1990) показано, что при использовании валериановой кислоты в качестве единственного источника углерода содержание мономеров ЗГВ было в 2 раза выше, чем при культивировании на пропионовой кислоте.

$M_n$  и  $M_w$  полимера, синтезируемого бактериями при росте на олеиновой кислоте, составляла соответственно 220 и 775 кДа, полидисперсность полимера – 3,5 (Таблица 1). При добавлении индукторов синтеза ЗГВ произошло достоверное снижение  $M_n$ , до 156-178 кДа, что сопровождалось увеличением полидисперсности полимера до 4,4-4,9. Снижение  $M_n$  сополимеров с ЗГВ также наблюдали Chanprateep, Kulpreecha (2006).

Содержание и процентный состав жирных кислот (ЖК), входящих в состав цитоплазматической мембраны бактерий, выращенных на олеиновой кислоте без добавления индукторов, а также с добавлением валерата и пропионата калия, приведены в таблице 2. Состав ЖК внутриклеточных липидов был исследован у бактерий в конце культивирования, в условиях максимальной аккумуляции полимера. В составе ЖК внутриклеточных липидов бактерий, выращенных на олеиновой кислоте, идентифицированы насыщенные и моноеновые ЖК с длиной цепи от 12 до 20 атомов углерода. Основными ЖК были олеиновая (33,26% от суммы ЖК) и пальмитиновая кислота (27,48% от суммы ЖК). ЖК, содержание которых превышало 1% от суммы, представлены как насыщенными (миристиновая, 14:0; стеариновая, 18:0), так и моноеновыми (пальмитолеиновая, 16:1 $\omega$ 7 и цис-вакценовая, 18:1 $\omega$ 7) кислотами. Содержание циклопропановых кислот С-17:0 и С-19:0 составляло 7,54% от суммы ЖК, что в несколько раз ниже, чем при культивировании исследуемого штамма на сахарах (Zhila et al., 2015). Кроме того, как было показано нами ранее, уровень циклопропановых кислот в липидах бактерий, выращиваемых на олеиновой кислоте, практически не менялся в ходе культивирования бактерий, тогда как при культивировании на сахарах отмечены значительные изменения уровня циклопропановых кислот (Zhila et al., 2015). Добавление пропионата или валерата калия в культуральную среду не привело к значительным изменениям в составе ЖК внутриклеточных липидов. Также как и при

выращивании *C. necator* В-10646 только на олеиновой кислоте, основными ЖК внутриклеточных липидов бактерий были олеиновая (31,24-33,96 мол.%) и пальмитиновая (28,04-28,92 мол.%) кислоты.

### **Заключение**

Исследован рост *C. necator* В-10646 и синтез полимера при выращивании бактерий на среде, содержащей олеиновую кислоту и субстраты-предшественники синтеза ЗГВ (пропионат и валерат калия). Бактерии синтезировали сополимер П(ЗГБ-со-ЗГВ) с включением ЗГВ в долях 21,2 и 14,3 мол.% при использовании соответственно валерата и пропионата калия. Полимер, синтезируемый в присутствии предшественников синтеза ЗГВ, характеризовался более низкой  $M_n$  и высокой полидисперсностью по сравнению с полимером, полученным в отсутствие прекурсоров. Наличие предшественников синтеза ЗГВ не повлияло на состав ЖК экстрагируемых липидов бактерий. В результате выполненных исследований олеиновая кислота может рассматриваться в качестве перспективного основного субстрата для роста бактерий *C. necator* В-10646 и синтеза сополимеров с ЗГВ.

### **Благодарности / Acknowledgements**

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта №17-44-240775.

This study was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research and the Government of the Krasnoyarsk Territory, the Krasnoyarsk Regional Fund for the Support of Scientific and Scientific-Technical Activities (Project No. 17-44-240775).

### **Список литературы / References**

Ahn W.S., Park S.J., Lee S.Y. (2001) Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 23(3): 235–240

Akiyama M., Tsuge T., Doi Y. (2003) Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polymer Degradation and Stability*, 80(1): 183–194



Berezina N., Yada B. (2016) Improvement of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) production by dual feeding with levulinic acid and sodium propionate in *Cupriavidus necator*. *New Biotechnology*, 33(1): 231-236

Bhubalan K., Lee W.H., Loo C.Y., Yamamoto T., Tsuge T., Doi Y., Sudesh K. (2008) Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. *Polymer Degradation and Stability*, 93(1): 17-23

Chanprateep S., Kulprecha S. (2006) Production and characterization of biodegradable terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. A-04. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(1): 51–56

Chee J.-Y., Tan Y., Samian M.-R., Sudesh K. (2010) Isolation and characterization of a *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) capable of producing polyhydroxyalkanoate (PHA) from triglycerides, fatty acids and glycerols. *Journal of Polymers and the Environment*, 18(4): 584–592

Chen C.W., Don T.M., Yen H.F. (2006) Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *Process Biochemistry*, 41(11): 2289–2296

Choi J.I., Lee S.Y. (1999) High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10): 4363–4368

Doi Y., Segawa A., Nakamura S., Kunioka M. (1990) Production of biodegradable copolyesters by *Alcaligenes eutrophus*. *Novel biodegradable microbial polymers*. Dawes E.A. (ed.) The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, p. 37-48

Fukui T., Doi Y. (1998) Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(3): 333–336

Gumel A.M., Annuar M.S.M., Heidelberg T. (2012) Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates copolymers produced by *Pseudomonas putida* Bet001 isolated from palm oil mill effluent. *PLOS ONE*, 7(9): e45214

Holmes P.A. (1985) Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology*, 16(1): 32–36

Kahar P., Tsuge T., Taguchi K., Doi Y. (2004) High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability*, 83(1): 79-86

- Lee S.Y. (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(1): 1-14
- Lee W.-H., Loo C.-Y., Nomura C.T., Sudesh K. (2008) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresource Technology*, 99(15): 6844–6851
- Loo C.Y., Sudesh K. (2007) Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*, 2(2): 31–57
- Loo C.Y., Lee W.H., Tsuge T., Doi Y., Sudesh K. (2005) Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. *Biotechnology Letters*, 27(18): 1405–1410
- López-Cuellar M.R., Alba-Flores J., Rodríguez J.N.G., Pérez-Guevara F. (2011) Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1): 74–80
- Luzier W.D. (1992) Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(3): 839-842
- Marangoni C., Furigo A., de Aragao G.M.F. (2000) Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. *Biotechnology Letters*, 22(20): 1635–1638
- Oliveira F.C., Dias M.L., Castilho L.R., Freire D.M.G. (2007) Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 98(3): 633–638
- Ramachandran H., Iqbal N.M., Sipaut C.S., Abdullah A.A. (2011) Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolymer with various monomer compositions by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(6): 867-877
- Riedel S.L., Jahns S., Koenig S., Bock M.C.E., Brigham C.J., Bader J., Stahl U. (2015) Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats *Journal of Biotechnology*, 214:119–127
- Shantini K., Bhubalan K., Yahya A.R.M., Amirul A.A. (2013) Productivity increment of biodegradable and biorenewable copolymer containing 3-hydroxyvalerate monomer initiated by alcohols as precursor substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(7): 1364-1370

Solaiman D.K.Y., Ashby R.D., Foglia T.A., Marmer W.N. (2006) Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6): 783–789

Srivastava S.K., Tripathi A.D. (2013) Effect of saturated and unsaturated fatty acid supplementation on bio-plastic production under submerged fermentation. *3 Biotech*, 3(5): 389-397

Steinbüchel A. (2001) Perspective for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromolecular Bioscience*, 1(1): 1–24

Sudesh K., Bhubalan K., Chuah J.-A., Kek Y.-K., Kamilah H., Sridewi N., Lee Y.-F. (2011) Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5): 1373–1386

Volova T., Kiselev E., Vinogradova O., Nikolaeva E., Chistyakov A., Sukovatyiy A., Shishatskaya E. (2014) A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus eutrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs. *PLOS ONE*, 9(2): e87551

Volova T.G., Syrvacheva D.A., Zhila N.O., Sukovatyiy A.G. (2016) Synthesis of P(3HB-co-3HHx) copolymers containing high molar fraction of 3-hydroxyhexanoate monomer by *Cupriavidus eutrophus* B10646. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(2): 416-425

Yu H.Y., Qin Z.Y. (2014) Surface grafting of cellulose nanocrystals with poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Carbohydrate Polymers*, 101: 471-478

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 Biochemistry*, 50(1): 69–78

Таблица 1. Показатели культуры бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646, культивируемых на олеиновой кислоте в присутствии предшественников синтеза ЗГВ

Table 1. Culture parameters of the *Cupriavidus necator* В-10646 bacterium grown on oleic acid and 3HV precursors

Субстрат	Урожай биомассы, г/л	Полимер, % от веса сухой биомассы	Состав полимера, мол. %			M <sub>ч</sub> , кДа	M <sub>в</sub> , кДа	ПД
			ЗГБ	ЗГВ	ЗГГ			
Олеиновая кислота	9,4±0,4	83±5	97,5±0,4	2,0±0,1 <sup>а</sup>	0,5±0	220±12 <sup>а</sup>	775±21	3,5±0,1 <sup>а</sup>
Олеиновая кислота+валерат калия	9,3±0,5	80±5	78,3±0,4	21,2±0,2 <sup>б</sup>	0,5±0,1	178±11 <sup>б</sup>	790±31	4,4±0,2 <sup>б</sup>
Олеиновая кислота+пропионат калия	9,5±0,2	80±6	85,2±0,3	14,3±0,2 <sup>в</sup>	0,5±0,1	156±10 <sup>б</sup>	758±19	4,9±0,2 <sup>б</sup>
Достоверность эффекта, α=0,05	<i>F</i> = 0,11	<i>F</i> = 0,16		<i>F</i> = 3662		<i>F</i> = 11,2	<i>F</i> = 0,59	<i>F</i> = 26,3

а-в – буквами показаны различия между средними

Таблица 2. Содержание жирных кислот внутриклеточных липидов бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 при росте на олеиновой кислоте в присутствии солей валериановой и пропионовой кислот (% от суммы ЖК, средние  $\pm$  стандартные ошибки)

Table 2. The fatty acid content of intracellular lipids of bacterium *Cupriavidus necator* В-10646 grown on oleic acid in the presence of salts of valeric and propionic acids (% of the total FA, average values  $\pm$  standard errors)

ЖК	Олеиновая кислота	Олеиновая кислота + валерат калия	Олеиновая кислота + пропионат калия
12:0	0,04 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01
i-14:0	0,10 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01
14:0	3,50 $\pm$ 0,01	3,66 $\pm$ 0,02	3,43 $\pm$ 0,06
14:1	0,16 $\pm$ 0,06	0,14 $\pm$ 0,14	0,20 $\pm$ 0,04
i-15:0	0,31 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,02
ai-15:0	0,60 $\pm$ 0,04	0,61 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,02
15:0	0,61 $\pm$ 0,003	0,45 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,04
15:1	0,05 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,04
i-16:0	0,24 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,03
16:1 $\omega$ 9	0,99 $\pm$ 0,05	0,86 $\pm$ 0,03	0,72 $\pm$ 0,01
16:1 $\omega$ 7	8,05 $\pm$ 0,39	7,90 $\pm$ 0,05	7,82 $\pm$ 0,02
16:1 $\omega$ 5	0,08 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,06
16:0	27,48 $\pm$ 1,11	28,04 $\pm$ 1,05	28,92 $\pm$ 1,06
17:0	0,42 $\pm$ 0,82	0,39 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,01
i-17:0	0,16 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,01
ai-17:0	0,76 $\pm$ 0,06	0,76 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,05
17:1	0,86 $\pm$ 0,01	0,99 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,01
C-17:0 <sup>a</sup>	6,06 $\pm$ 0,09	5,89 $\pm$ 0,06	5,90 $\pm$ 0,01
18:1 $\omega$ 9	33,26 $\pm$ 2,57	31,24 $\pm$ 4,02	33,96 $\pm$ 3,06
18:1 $\omega$ 7	10,68 $\pm$ 0,33	10,85 $\pm$ 0,82	10,01 $\pm$ 0,84
18:0	3,80 $\pm$ 0,57	5,11 $\pm$ 0,04	2,71 $\pm$ 0,01
18:1	0,05 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,04
C-19:0 <sup>a</sup>	1,48 $\pm$ 0,01	1,49 $\pm$ 0,03	1,45 $\pm$ 0,01
19:1	0,18 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,04
20:0	0,08 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,04
$\Sigma$ циклопропановых	7,54 $\pm$ 0,11	7,38 $\pm$ 0,08	7,35 $\pm$ 0,023
$\Sigma$ насыщ. <sup>b</sup> / $\Sigma$ ненасыщ. <sup>b</sup>	0,84 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,034

<sup>a</sup> циклопропановая кислота

<sup>b</sup> насыщ. – насыщенные жирные кислоты, включающие циклопропановую кислоту и ОН-кислоты

<sup>b</sup> ненасыщ. – ненасыщенные жирные кислоты