

TARTU ÜLIKOOL
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

OLIVER MEIKAR

***Pseudomonas mandelii* PC17 ja tema polühüdroksüalkanoaadi
metabolism**

Magistritöö

Juhendaja vanemteadur Allan Nurk

TARTU 2004

Sisukord

Sisukord	3
Kasutatud lühendid ja mõisted	5
1 Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Pseudomonaadid	7
1.1.1 <i>Pseudomonas mandelii</i>	7
1.2 Polühüdrosüalkanoaadid	8
1.2.1 Bakteriaalsed polühüdrosüalkanoaadid	8
1.2.2 Polühüdrosüalkanoaatide süntees	11
1.2.3 Millest sõltub PHA kompositsioon	14
1.2.4 Pseudomonaadide klassifikatsioon PHA akumulatsiooni alusel	15
1.3 PHA operoni ehitus	16
1.3.1 PHA polümeraasid	17
1.3.2 PHA depolümeraasid	18
1.3.2.1 Üldomadused	18
1.3.2.2 Rakuväline PhaZ	19
1.3.2.3 Rakusisene PhaZ	20
1.4 PHA metabolismi regulatsioon	20
1.5 PHA plast	21
1.5.1 PHA plastide omadused ja kasutamine	21
1.5.2 PHA plastide tootmine ja hind	23
Töö eesmärgid	24
2 Eksperimentaalosa	25
2.1 Materjal ja meetodika	25
2.1.1 Bakteritüved ja vektorid	25
2.1.2 Söötmed ja kasvutingimused	25
2.1.3 Testid bakteritüve füsioloogia iseloomustamiseks	27
2.1.4 Glükoosi määramine	28
2.1.5 Lämmastiku määramine	28
2.1.6 Bakteri arvukuse ja keskmise diameetri määramine	29
2.1.7 PHA-graanulite värvimine bakterites sudaanmustaga	29
2.1.8 PHA värvimine Niiluse punasega	29

2.1.9	PHA sünteesi mõõtmise läbivoolutsütomeetriga.....	30
2.1.10	PHA tootmine	30
2.1.11	PHA metanolüüs	30
2.1.12	Metüül-3-hüdroksüalkanoaatide GC-MS analüüs	31
2.1.13	PHA eraldamine	31
2.1.14	PHA sisalduse määramine bakterite kuivkaalust.....	32
2.1.15	DNA eraldamine	32
2.1.16	Elektroforees	33
2.1.17	DNA restriksioon, fosfataasi töötlus ja ligeerimine.....	33
2.1.18	Transformeerimine.....	34
2.1.19	DNA kontsentratsiooni ja bakterisuspensiooni tiheduse määramine.....	34
2.1.20	Polümeraasi ahelreaktsioon	35
2.1.21	Sekveneerimine.....	35
2.1.22	Arvutiprogrammide ja andmepankade kasutamine	36
3	Tulemused ja arutelu.....	37
3.1	<i>Pseudomonas mandelii</i>	37
3.2	Osalise PHA operoni isoleerimine ja kirjeldamine.....	38
3.2.1	<i>Pseudomonas mandelii</i> PC17 PHA depolümeraas (PhaZ)	38
3.2.2	<i>Pseudomonas mandelii</i> PC17 PHA polümeraasid.....	40
3.3	PHA süntees.....	40
3.3.1	PHA süntees limiteerivas söötmes.....	40
3.3.2	PHA süntees mittelimiteerivas söötmes.....	43
3.4	PHA kompositsioon sõltuvalt süsinikuallikast	48
3.5	<i>P. mandelii</i> PC17 klassifitseerimine PHA sünteesi alusel.....	50
3.6	<i>P. mandelii</i> PC17 PHA metabolism.....	50
3.7	PHA metabolismi analüüsimise meetodika	52
3.8	Võimlaik väljund PHA plasti valmistamisel.....	53
	Kokkuvõte.....	55
	Andmete süntees ja perspektiivid	57
	Summary	58
	Kasutatud kirjandus	60

Kasutatud lühendid ja mõisted

ACP	atsüülkandja valk (<i>acyl carrier protein</i>)
ah	aminohape
ap	aluspaar
ATP	adenosiin trifosfaat
ADP	adenosiindifosfaat
CoA	koensüüm A
dest.	destilleeritud
EDTA	dinaatriumetüleendiamiintetraatsetaat
FADH₂	flaviinadeniindinukleotiid (reduktseeritud vorm)
GTP	guanosiin trifosfaat
IPTG	isopropüül- β -D-galaktopüranosiid
kap	(kilo)aluspaar
LB	Luria-Bertani sööde
mcIPHA	keskmise monomeeri pikkusega polühüdrosüalkanoaat (<i>medium chain length polyhydroxyalkanoate</i>)
MP-VP	metüülpunase-Voges-Proskaueri sööde
NADH	nikotiinamiidadeniindinukleotiid (reduktseeritud vorm)
NADPH	flaviinadeniindinukleotiidfosfaat (reduktseeritud vorm)
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon
PHA	polühüdrosüalkanoaat
PhaC	polühüdrosüalkanoaadi süntaas
PhaZ	polühüdrosüalkanoaadi depolümeraas
PHB	polühüdrosübutüraat
PHH	polühüdrosüheksanoaat
PHO	polühüdrosüoktanoaat
PHV	polühüdrosüvaleriaat
RBS	rasvhapete <i>de novo</i> biosünteesi rada
related carbon source	rasvhapped, alkaanid ja alkeenid
non-related carbon source	süsiivesikud
SAP	kreveti aluseline fosfataas (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
SBD	substraadile seondumise domään
scIPHA	lühikese monomeeri pikkusega polühüdrosüalkanoaat (<i>short chain length polyhydroxyalkanoate</i>)
SDS	naatriumdodetsüülsulfaat
TAE	Tris-atsetaat EDTA puhver
TE	Tris/EDTA puhver
Tris	trishüdrosümetüülaminmetaan
U	ühik (<i>unit</i>)
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indüül- β -D-galaktopüranosiid
3HA	3-hüdrosüalkanoaat
3HB	3-hüdrosübutüraat
3HDD	3-hüdrosüdodekanoaat
3HH	3-hüdrosüheksanoaat
3HV	3-hüdrosüvaleriaat

Sissejuhatus

Polühüdrosüalalkanoaadid (PHA) on levinud süsiniku ja energia varuained, mida peamiselt gram-negatiivsed bakterid sünteesivad tingimustes, kus keskkonnas napib mittesüsinikulisi bio-elemente (N, P, S, O). Need erineva kompositsiooniga kuid struktuurilt lihtsad alifaatsed biopolümeerid talletuvad bakterites rakusiseste kehakestena, mis limitatsiooni kadumisel süsiniku ja energia allikana kasutatakse. PHA-d on potentsiaalsed keskkonnasõbralikud bioplastid, mis erinevalt tänapäeval enimkasutatud petroplastidest koosnevad taastuvast toormest ja on looduses täielikult lagunevad. PHA monomeersest koostist varieerides saab toota väga erinevate omadustega PHA plaste. Seetõttu on PHA heteropolümeerid üha enam tähelepanu pälvinud.

PHA-d saab laias laastus jagada kaheks - lühikese monomeeri pikkusega (4-5 süsinikku) ja keskmise monomeeri pikkusega (6-14 süsinikku) PHA. Valdavalt sünteesivad bakterid vaid ühetüübilist PHA-d.

PHA süntees on kompleksne protsess, mis on seotud bakteri kesksete metabolismiradadega, kust pärinevad PHA monomeeride prekursorid- CoA derivaadid. PHA monomeerne koostis sõltub bakteri metabolismiradadest, PHA prekursorimolekule polümeraasile vahendavatest ensüümidest ja PHA polümeraaside spetsiifikast.

PHA-d lagundavad rakusisesed ja rakuvälised PHA depolümeraasid, neist keskmise monomeeri pikkusega PHA spetsiifilisi rakusiseseid depolümeraase on kõige vähem uuritud. PHA metabolism on PHA sünteesi ja selle rakusisese lagundamise pidev tasakaaluline protsess.

PHA metabolsimi uurimine loob võimalused efektiivsemalt toota PHA plasti ja kontrollitult varieerida selle monomeerse koostist. Kuna PHA monomeerne koostis sõltub otseselt rakusisestest süsiniku voogudest, saab PHA-d kasutada ka raku süsiniku metabolismi kirjeldamiseks. Kuna pseudomonaadid on ühed vähestest keskmise monomeeri pikkusega PHA-d sünteesivatest organismidest, on nende PHA metabolismi uurimisel ka suurendatud teaduslikku tähtsust.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Pseudomonaadid

Pseudomonaadid on sirged või veidi kõverad 0,5-1,0 µm diameetriga ja 1,5-5,0 µm pikkused gram-negatiivsed pulkbakterid. Valdavalt on nad liikuvad, ühe või mitme polaarse viburiga. Pseudomonaadid on rangelt respiratoorse metabolismiga, kus hapnik (mõnel juhul ka nitraat) on viimaseks elektroni aktseptoriks; katalaas- ja oksüdaaspositiivsed. G + C molaarne kontsentratsioon DNA-s on 58-70%. Paljudele *Pseudomonas* perekonna liikmetele on omane polühüdrosüalkanoaatide (PHA) süntees. Pseudomonaadide klassifikatsioon PHA akumulatsiooni alusel on esitatud allpool.

Taksonoomiliselt kuuluvad pseudomonaadid gammaproteobakterite alamhõimkonda, seltsi *Pseudomonadales* ning sugukonda *Pseudomonadaceae*. Algselt jagati pseudomonaadid rRNA-DNA hübriidisatsiooni alusel viide homoloogsusgruppi (54). Nüüdseks on II-V homoloogsusgruppi liikmed üle viidud teistesse perekondadesse ja *Pseudomonas* perekonda rühmituvad vaid esimese rRNA homoloogsusgrupi esindajad (7).

16S rRNA alusel koosneb perekond *Pseudomonas* (*sensu stricto*) kahest alajaotusest. Esimene neist koosneb 56 *Pseudomonas*'e liigist jagatuna kuude gruppi: *Pseudomonas syringae* grupp, *Pseudomonas chlororaphis* grupp, *Pseudomonas fluorescens* grupp, *Pseudomonas putida* grupp, *Pseudomonas stutzeri* grupp ja *Pseudomonas aeruginosa* grupp. Teises alajaotuses on kaks tüve: *Pseudomonas pertucinogena* ja *Pseudomonas denitrificans* (7).

1.1.1 *Pseudomonas mandelii*

Pseudomonas mandelii'd kirjeldati esmakordselt 1999. aastal ja nimetati kuulsa Ameerika mikrobioloogi M. Mandel'i järgi (104). Tüvi isoleeriti mineraalveest. *P. mandelii* on liikuv, ühe polaarse viburiga gram-negatiivne asporogeenne pulkbakter, mis toodab fluorestseeruvaid pigmente ning moodustab toiteagaril kasvades siledapinnalisi värvituid kolooniaid. Katalaas- ja oksüdaasest on positiivsed ja rakud on võimelised denitrifikatsiooniks. Tüvi ei suuda hüdrolüüsida tärklist ega želatiini. Kasvuks sobib

temperatuuride vahemik 4-35 °C optimumtemperatuuriga 30 °C ja madal soolade kontsentratsioon (0,8%). Sobivateks süsinikuallikateks on muuhulgas fruktoos, glükonaat, tsitraat, laktaat, propionaat, glütserool, malaat, etanoolamiin ning bensoaat (104).

Pseudomonas mandelii kuulub 16 SrRNA homoloogia alusel *Pseudomonas fluorescens* gruppi (7).

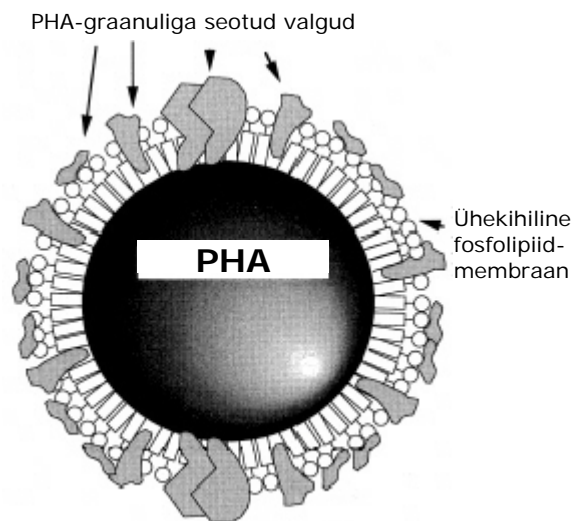
1.2 Polühüdrosüalkanoaadid

1.2.1 Bakteriaalsed polühüdrosüalkanoaadid

Polühüdrosüalkanoaadid (PHA) on lihtsa struktuuriga alifaatsed polüestrid, mida sünteesivad paljud erinevatest ökosüsteemidest pärit gram-posiivsed ja gram-negatiivsed bakterid eluliselt vajalike toitainete (N, P, S, O) näljas, kui nukleiinhapete ja valgu biosüntees on takistatud. PHA talletatakse 0,2-0,5 µm rakusiseste graanulitena ja kasutatakse limitatsiooni kadumisel süsiniku- ning energiaallikana. Tõepoolest, oma madala lahustuvuse ja suure molekulmassi (50-3000 KDa, erandjuhul 20000 KDa) poolest põhjustab PHA rakule tühist osmootset rõhku, olles nii ideaalseks varuaineks (5, 41, 60, 83, 98).

On näidatud, et lisafunktsioonina pakub PHA süntees bakteritele ka rasvhapete detoksifikatsioonimehhanismi (tahkel söötmel), kus rasvhapete CoA-derivaadid polümeriseeritakse, võimaldades PHA⁺ bakteritel kasvada kõrgematel rasvhapete kontsentratsioonidel (53). Kirjeldatud on ka madala molekulmassiga polühüdrosübutüraadi (PHB) (13 KDa) rolli bakterite Ca²⁺ kanalite moodustamisel ja DNA transformatsioonil (60).

Amorfse PHA graanuleid ümbritsevad rakus valkudest ja fosfolipiididest koosnevad ühekihilised membraanid (41, 108). PHA graanuleid on võimalik tuvastada lipofiilsete värvidega, nagu näiteks sudaanmust (29) või Niiluse punane (26, 93). Kataboolsetest valkudest on graanulit ümbritseva membraaniga seotud PHA polümeraasid (PhaC) ja rakusisesed PHA depolümeraasid (PhaZ). Mittekataboolseid PHA-graanulitega seotud valke on hakatud kutsuma fasiinideks (phasin), sõnast PHA-oleosiin, kuna sarnaselt amfipaatsetele oleosiinidele stabiliseerivad ka need hüdrofoobseid (PHA) graanuleid raku hüdrofiilses tsütoplasmas (77, 98) (Joonis 1).

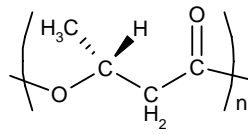


Joonis 1. PHA graanulit ja sellega seotud komponente illustreeriv mudel (suuruste suhted ei vasta tegelikusele) (98).

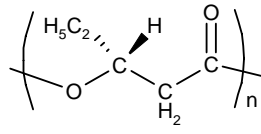
PHA monomeerid on hüdroksükarboksüülhapped, mille karboksüül- ja hüdroksüülrühmad seotakse estersidemeks. Enamasti paikneb hüdroksüülrühm kolmanda süsiniku juures (60). PHA monomeerne koostis sõltub bakteri liigist, süsinikuallika(te)st ja keskkonnatingimustest. Praeguseks on kirjeldatud üle 150 erineva PHA koostises esinevat monomeeri, mille kõrvalahelad võivad olla küllastumata, hargnevad, aromaatsed, sisaldada hüdroksü-, fluoro-, kloro-, bromo- või tsüanorühmi (41, 79, 108). PHA-d jaotatakse monomeeride pikkuse alusel kaheks. Lühikese ahelaga PHA ehk sclPHA (*short chain length* PHA) monomeer koosneb 3-5 süsinikust, 6-14 süsinikuahela pikkused monomeerid moodustavad aga keskmise ahelapikkusega PHA ehk mclPHA (*medium chain length* PHA) (Joonis 2) (41, 76, 85). On näidatud, et Niiluse punane emiteerib sclPHA-d ja mclPHA-d värvides veidi erinevas lainepikkuses valgust (vastavalt ~590 nm ja ~575 nm) (110).

Kui monomeeri hüdroksüülrühm ei asu viimase süsiniku küljes, on hüdroksüalkanoaadil üks kiraalne süsinik, seega 2 isomeeri. Bakteriaalsed PHA-d on *R* konfiguratsioonis (1, 60, 98).

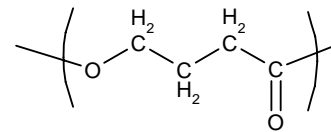
Lühikese monomeeri ahelaga PHA



Polü-(*R*)-3-hüdroksübutüraat
P[(*R*)-3HB]

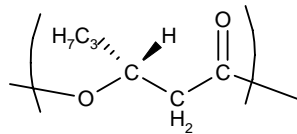


Polü-(*R*)-3-hüdroksüvaleriaat
P[(*R*)-3HV]

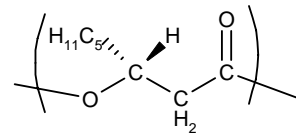


Polü-4-hüdroksübutüraat
P(4HB)

Keskmise pikkusega monomeeri ahelaga PHA



Polü-(*R*)-3-hüdroksüheksanoat
P[(*R*)-3HH]



Polü-(*R*)-3-hüdroksüoktanoat
P[(*R*)-3HO]

Joonis 2. Erinevad bakteriaalsed polühüdroksüalkanoaadid (PHA).

Enam levinud ja enim uuritud PHA on polü-3-hüdroksübutüraat P(3HB), triviaalnimetusega polüvõihape, mis avastati juba 1926 aastal Lemoigne poolt Pasteur'i instituudis. See sclPHA akumulereb enamustes PHA⁺ bakterites(41, 60, 68). Tüüpilised tootjad on *Ralstonia eutropha*, *Zoogloea ramigera* ja *Alcaligenes latus* (5, 60, 96). PHB-d leidub märkimisväärtetes kogustes ka inimese vereplasmas ja selle monomeerid on imetejatel tavalisteks metabolismi vaheühenditeks (59, 60). Samuti on enamus senikirjeldatud PHA depolümeraasidest (PhaZ) PHB-spetsiifilised (41).

Kuigi mclPHA avastati alles 1983. aastal, on tänaseks kirjeldatud paju erinevaid bakteriaalse mclPHA koostises esinevaid monomeere. Need on peamiselt 6 kuni 12 süsinikuhela pikkused 3-hüdroksüalkanoaadid. MclPHA sünteesivõime esineb peaaegu ainuisikuliselt I homoloogusgrupi pseudomonaadidel (38, 61). Nende suutmatus sünteesida PHB-d on kasutatav ka taksonoomilise tunnuseks (7, 38, 44).

Reeglina sünteesivad bakterid vaid ühetüübilist polümeeri- kas sclPHA-d või mclPHA-d. PHA esineb looduses kahes olekus. Rakus on PHA amorfne, olles ümbritsetud valkude ja lipiididega. Amorfset PHA-d suudavad lagundada rakusisesed PhaZ-d (21, 64, 85). Kattemolekulidest vabastatuna või rakust orgaaniliste lahustitega ekstraheerituna tõuseb PHA kristallilisus. Kristalliseerunud PHA-d hüdroolüüsivad rakuvälised PhaZ-d (40, 42, 64, 69, 85).

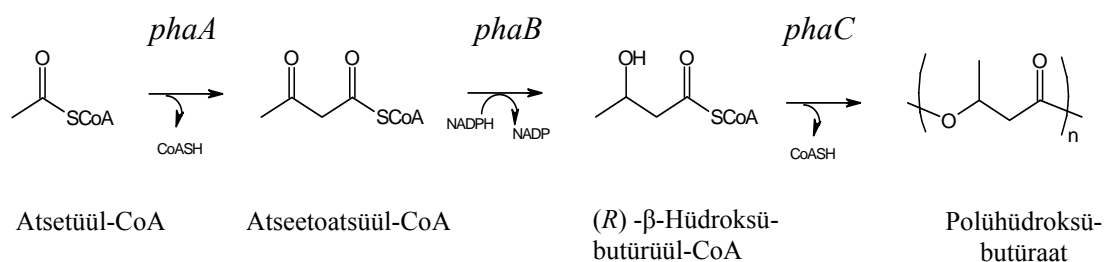
1.2.2 Polühüdrosüalkanoaatide süntees

PHA-de sünteesivõime on levinud väga paljudes erinevate ökoloogiliste nišside ja metaboolsete radadega mikroorganismides, olles neis sõltumatult evolutsioneerunud väga pikka aega. Seetõttu on olemas väga erinevaid PHA tüüpe ja nende sünteesiradade modifikatsioone (41, 60, 63, 83). Sarnase funktsiooniga PHA sünteesi ensüümid võivad olla küllalt erineva suuruse ja aminohappelise koostisega ning esineda genoomis mitme koopiana.

PHA süntees on kompleksne protsess, olles seotud bakteri kesksete metabolismiradadega, millest pärinevad PHA monomeeride prekursorid (CoA derivaadid), inkorporeeritakse mõnede spetsiifiliste ensüümide abil PHA polümeeriks (60, 79). Kuna suur osa sellisest ainevahetusest on väga üldine ja ensüümide funktsioonid asendatavad, on PHA sünteesi võime paari spetsiifilise sünteesiensüümi geeni transformeerimisel saavutatav ka näiteks taimedes (16, 72, 90).

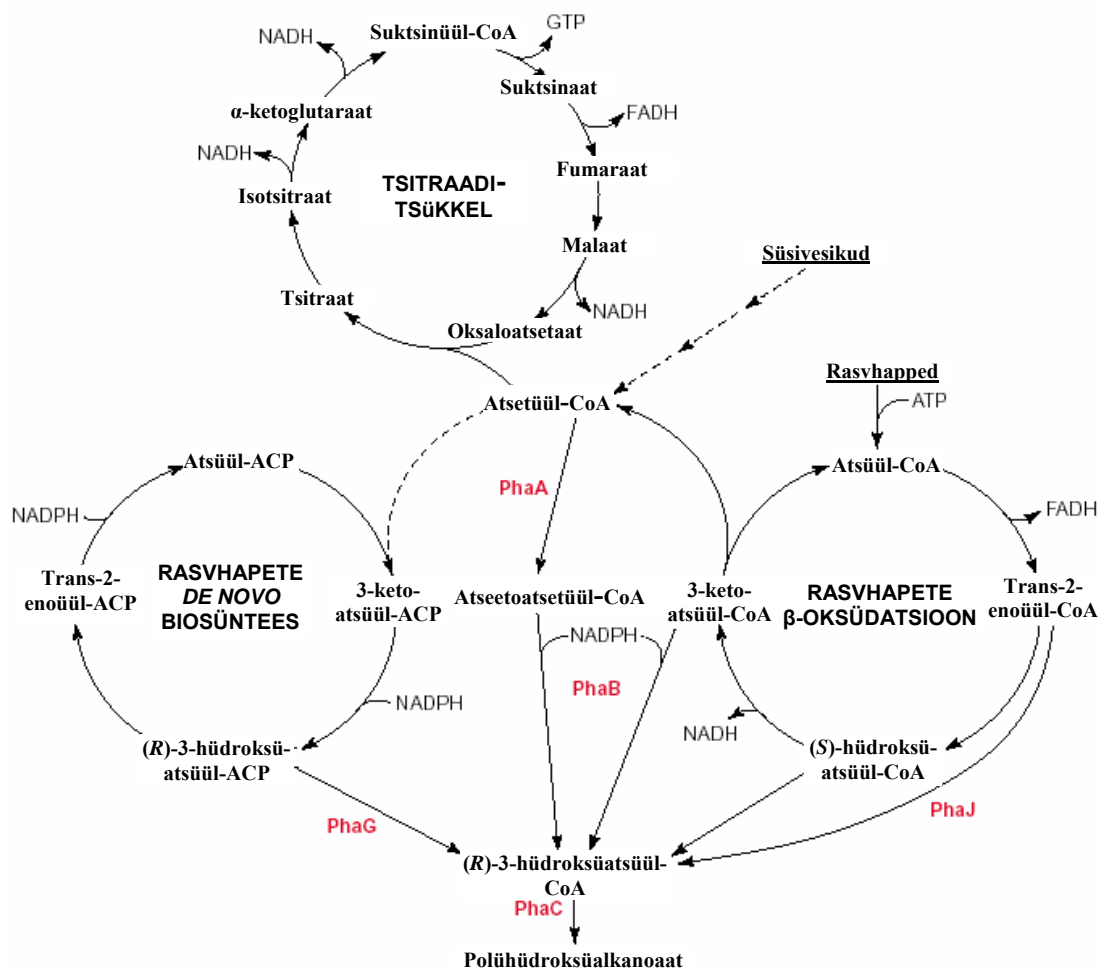
PHA-d sünteesitakse paljudest erinevatest süsinikuallikatest, alates süsihappegaasist (67) ja metaanist (107) ning lõpetades toiduainetetööstuse- ja naftajääkidega (34, 80, 109, 113). PHA sünteesiks on vajalik süsiniku ülekaal ja mingi teise olulise toitainete limitatsioon raku kasvukeskkonnas. Senini on PHA sünteesi kirjeldatud ainult toitainete (N, P, S, O) limiteerivas keskkonnas.

Klassikaline PHB biosünteesirada ehk ahela pikendamisrada (*chain elongation pathway*) hõlmab kolme ensüümi: β -ketoatsüül-CoA tiolaasi (kodeerib *phaA*), NADPH-sõltuvat atsetoatsüül-CoA dehüdrogenaasi (kodeerib *phaB*) ja võtmeensüüm PHA polümeraasi (kodeerib *phaC*) (Joonis 3). Tiolaas ja dehüdrogenaas toodavad PHA monomeere, mida polümeraas polümeriseerib (60, 77, 98). PHA-de *R*-isomeeria tagavad stereoselektiivne dehüdrogenaas ja polümeraas, mis aktsepteerib vaid *R*-stereoisomeere (24, 98).



Joonis 3. PHB klassikaline sünteesirada.

Ahela pikendamisrada PHA sünteesil on kirjeldatud kui substraadiks on heksanoaat (36). Pseudomonaadid akumulereivad peamiselt mclPHA-sid (38, 60, 61, 108). MclPHA prekursorite sünteesiga on seotud kolm peamist sünteesirada: 1) süsinikuahela pikendamine, kus atsüül-CoA-d pikendatakse atsetüül-CoA-ga 2) rasvhapete lagundamine β -oksüdatsioonil 3) rasvhapete *de novo* biosüntees (Joonis 4).



Joonis 4. Peamised mclPHA sünteesirajad bakterites (4).

Olulisemad PHA biosünteesiraja ensüümid on toodud allajoonituna.

PhaA - 3-ketotiilaas;

PhaB - (R)-3-ketoatsüül-CoA reduktaas

PhaC- PHA polümeraas

PhaG - (R)-3-hüdroksüatsüül ACP:CoA transatsülaas

PhaJ - (R)-spetsiifiline enoüül-CoA hüdrataas.

Punktiirjooned kirjeldavad metaboolseid radasid, mille vaheetappe pole välja toodud.

Kui substraadina kasutatakse suhkruid, on mclPHA sünteesirada seotud rasvhapete biosünteesirajaga. Seda väidet tõestavad katsed rasvhapete biosünteesi inhibiitoriga (keruleniin), mis peatas mclPHA sünteesi glükoosist ja temperatuurikatsed, kus

madalamatel temperatuuridel suurenes küllastamata rasvhapete hulk nii membraanilipiidides kui ka PHA-s (60, 108). Süsivesikuid nimetatakse *non-related carbon source* kuna nende struktuur ei ole seotud PHA monomeeride struktuuriga. Põhjus on selles, et suhkrud konverteeritakse algselt atsetüül-CoA molekulideks ja suunatakse seejärel rasvhapete biosünteesiratta. Rasvhapete biosünteesi rada ja PHA sünteesiapparaati ühendab (*R*)-3-hüdroksüatsüül-ACP:CoA transatsülaas (PhaG), mis konverteerib (*R*)-3-hüdroksüatsüül-ACP vastavaks (*R*)-3-hüdroksüatsüül-CoA-ks (20, 32, 78) (Joonis 4). Selle ensüümi puudumisel pseudomonaadides suhkrutest mclPHA-d ei sünteesita (32, 60, 78).

Kui substraadiks on rasvhapped, alkaanid või alkeenid, sünteesitakse PHA rasvhapete β -oksüdatsiooni raja kaudu. Seda kinnitab fakt, et PHA sünteesi rasvhapetest saab peatada akrüülhappega, mis on β -oksüdatsiooni blokaator. Lisaks on PHA monomeeride struktuurid otseselt seotud substraadiks olnud rasvhapete ja süsivesinikega, olles sama pikad või lühendatud 2 süsiniku aatomi kaupa. Selliseid süsinikuallikaid nimetatakse *related carbon sources*, kuna nende struktuur peegeldub ka PHA monomeerides (60, 108).

Rasvhapete β -oksüdatsiooni vaheproduktideks on trans-2-enoüül-CoA, (*S*)-3-hüdroksüatsetüül-CoA ja 3-ketoatsüül-CoA (25). Ükski neist kolmest pole otseseks substraadiks PHA sünteesile. Seega peab eksisteerima ensüüm, mis ühendab omavahel rasvhapete oksüdatsiooni- ja PHA sünteesiraja. See, milline neist kolmest vaheühendist konverteeritakse PhaC substraadiks, (*R*)-3-hüdroksüatsüül-CoA-ks, sõltub bakteritüvest (95). Iga vaheühendi jaoks on oma spetsiifiline ensüüm:

- 1) Hüdrataaside, mida kodeerib phaJ, substraadiks on trans-2-enoüülCoA, hüdrtaasi ning seda on kirjeldatud organismidel nagu *Aeromonas caviae* (23) ning *Pseudomonas aeruginosa* (102).
- 2) Epimeraasid konverteerivad (*S*) konfiguratsioonis oleva 3-hüdroksüatsetüül-CoA (*R*) konfiguratsiooni (60).
- 3) 3-ketoatsüül-CoA reduktaasid (PhaB)– redutseerivad 3-ketoatsüül-CoA 3-hüdroksüatsüül-CoAks.

Ülevaade oletatavast α/β -hüdrolaasil põhinevast 3HA-CoA tioestrite polümerisatsiooni katalüütilisest mehhanismist on toodud hiljuti Rehm'i poolt (77). Sünteesi käigus moodustavad kasvavad hüdrofoobsed polümeeri ahelad graanuli, mis kattub ühekihilise fosfolipiidkihiga. Graanulid võivad omavahel ka suuremateks graanuliteks "kokku

sulada”. Reeglina moodustub pseudomonaadides kaks suurt PHA graanulit. Graanuliga jäävad peale polümeraaside seotuks ka depolümeraasid ning struktuursed ja reguloorsed valgud (77).

Reeglina sünteesivad bakterid kas sclPHA-d või mclPHA-d, mõne üksiku erandina aga ka scl-mclPHA segu. *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodococcus sp.* ja kaks *Aeromonas* tüve toodavad scl-mclPHA segu, kui substraadiks on *related* süsinikuallikas (12, 23, 28, 57).

Scl-mclPHA heteropolümeeri saab toota ka geenmodifitseeritud tüvedes (70, 99).

Pseudomonaadidest on [P(3HB-3HA)] kopolümeeri sünteesijatena kirjeldatud viit tüve. *Pseudomonas sp.* GP4BH1 (101), *Pseudomonas sp.* 61-3 (2), *Pseudomonas sp.* A33 (56), *P. nitroreducens* AS 12343 (112) ja *P. stutzeri* 1317 (111). SclPHA süntees toimub ka siin reservatsioonidega, näiteks *P. stutzeri* toodab väikestes kogustes sclPHA-d ja sedagi vaid teatud süsinikuallikatest (atsetaat, butüraat, valeriaat), *P. nitroreducens* aga ainult mõnest *related* süsinikuallikast nagu oktanoaat, heksanoaat, butüraat (111, 112).

1.2.3 Millest sõltub PHA kompositsioon

PHA monomeerne koostis sõltub kolmest faktorist.

Esiteks mängib olulist rolli bakteri metaboolne süsteem, mis varustab PHA sünteesiaparati PHA prekursorimolekulide- atsüül-CoA tioestritega. Kuna tegu on kesksete metaboliitidega, on bakteri metaboolse süsteemi spetsiifika otseselt seotud PHA koostisega. Niisamuti mõjutavad ka keskkonnatingimused (näiteks temperatuur ja C/N vahekord) läbi bakteri metaboolse süsteemi PHA koostist (60, 61, 111). *P. oleovorans* ei sünteesi mclPHA-d suhkrutest, kuna ta ei suuda funktsionaalselt ekspresseerida oma transatsülaasi (PhaG), mis ühendab otseselt rasvhapete *de novo* sünteesiraja PHA sünteesiga (Joonis 4). *P. oleovorans* 'i *phaG* viimine *lac* promootori alla taastas bakteri võime toota suhkrutest mclPHA-d (31).

Metaboolse insenerimisega on võimalik laiendada bakteri substraadispetsiifikat, suunata PHA prekursorite voolu PhaC-le ja muuta PHA monomeerset koostist (4, 34, 55, 79, 115).

Teiseks saab PHA koostist ja omadusi oluliselt mõjutada substraadiks olnud süsinikuallikatega. Iseäranis selgelt avaldub söötmes kasutatud *related* süsinikuallika

struktuur pseudomonaadide mclPHAs (27, 60). Samuti on näidatud, et *P. oleovorans* ja *P. putida* saavad PHA koostisesse lülitada tsüano-, fenüül-, halogeen- ja teisi funktsionaalseid rühmi vastavate süsinikuallikate olemasolul (37, 46, 92).

Kolmandaks mängib PHA monomeerse koostise puhul rolli ka PHA süntaasi substraadispetsiifilisus, mis on peaaegu alati suunatud kas sclPHA või mclPHA sünteesiks (6). Samas on katsed rekombinantsete tüvedega näidanud, et *Pseudomonas* sp. 61-3 tüvel on kolm PHA süntaasi- üks neist on PHB-spetsiifiline, kaks ülejäänut aktepteerivad PHA prekursoritena aga nii lühikese kui ka keskmise monomeeri ahelapikkusega 3HA-CoA molekulile (61). Selle tulemusena on *Pseudomonas* sp. 61-3 võimeline sünteesima laia spektrit scl ja mclPHA heteropolümeere.

1.2.4 Pseudomonaadide klassifikatsioon PHA akumulatsiooni alusel

PHA süntaasi substraadispetsiifilisuse ja PHA monomeeride tüübi alusel saab pseudomonaadid jagada kolme gruppi (Tabel 1).

Esimene grupp koosneb pseudomonaadidest, mis ei akumulēeri PHA-d. Tüüpiline esindaja on *P. fragi* (20, 100). Lisaks on mainitud ka mõningaid *P. fluorescens* ja *P. stutzeri* tüvesid (100).

Teine ja suurim grupp pseudomonaade toodavad mclPHA-d. *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. mendocina*, *P. putida*, *P. corrugata* akumulēerivad mclPHA-d nii *related* kui ka *non-related* süsinikuallikatest (44, 91, 100, 111)

Related süsinikuallikatel kultiveerides sarnaneb *P. oleovorans* *P. aeruginosa* grupiga, kuid ei suuda samas sünteesida PHA-d *non-related* süsinikuallikatest. Niisamuti ei suutnud *P. resinovorans*, *P. alcaligenes* ning mõned *P. fluorescens* ja *P. syringae* tüved akumulēerida PHA-d (vähemalt mitte märkimisväärses koguses) kui substraadiks oli *non-related* süsinikuallikas (75, 100).

Kolmas grupp pseudomonaade on unikaalsed oma võime poolest sünteesida nii PHB-d kui PHA-d. *Pseudomonas* sp. GP4BH1 (101), *Pseudomonas* sp. 61-3 (2) ja *Pseudomonas* sp. A33 (56) on võimelised sünteesima [P(3HB-3HA)] kopolümeeri nii suhkrutest kui ka alkaanhapetest. *P. nitroreducens* AS 12343 ja *P. stutzeri* 1317 sünteesivad scl ja mclPHA segu aga vaid *related* süsinikuallikatest (111, 112).

Tabel 1. Pseudomonaadide klassifikatsioon substraadispetsiifika ja sünteeitava PHA monomeeride tüübi alusel.

Polümeeri tüüp	scIPHA		mcIPHA		Tüüpesindaja
	Non-related	Related	Non-related	Related	
I					<i>P. fragi</i>
II			X	X	<i>P. aeruginosa</i>
				X	<i>P. oleovorans</i>
III	X	X	X	X	<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3
		X		X	<i>P. nitroreducens</i>

1.3 PHA operoni ehitus

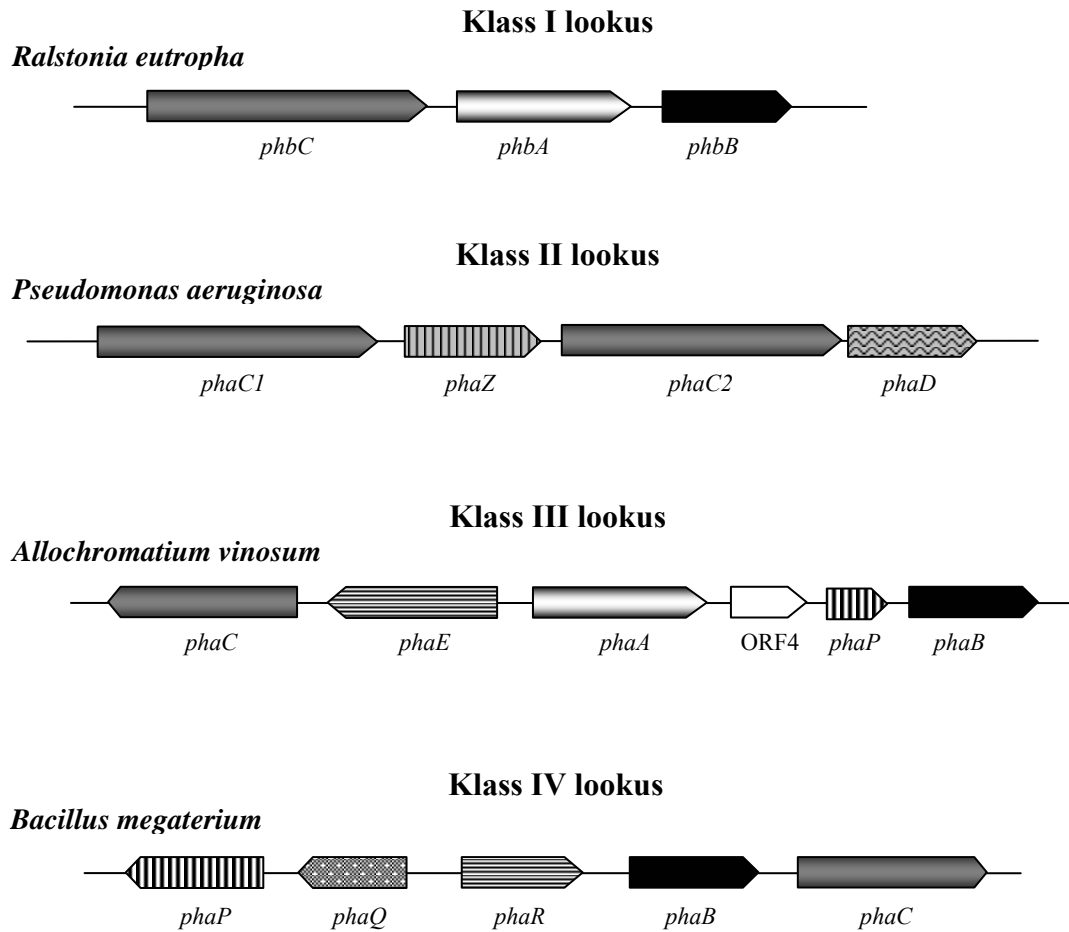
Pika evolutsiooni läbi teinud *pha* geenid võivad genoomis paikneda nii klasterdatuna kui ka hajusalt ja erinevas järjekorras. Arvestades PHA sünteesiradade rohkust, pole mitmekesisuses midagi imeks pandavat. Praeguseks on *pha* operonid lahterdatud 4 klassi (Joonis 5) (60, 77).

Klass I lookused esinevad bakteritel, mis sünteesivad scIPHA-d. Kolm sünteesil osalevat geeni *phbC* (PHA süntaas), *phbA* (β -ketoatsüül-CoA tiolaas) ja *phbB* (atseetoatsetüül-CoA dehüdrogenaas) asuvad kromosoomis reeglina just sellises järjekorras. *phbCAB* operon on kontrollitud ühise promootori poolt ja PHA depolümeraasi (*phaZ*) geen paikneb eraldi (60, 71, 77). Mõningail juhtudel võib ka süntaasigeen eemal paikneda (76). Klass II PHA lookus esineb mcIPHA-d sünteesivatel pseudomonaadidel. Operon koosneb kahest 50-60% ulatuses identsest PHA süntaasi geenist (*phaC1* ja *phaC2*), mille vahel paikneb intratsellulaarse PHA depolümeraasi geen *phaZ*. Neile järgneb seni teadmata funktsiooniga geen *phaD* (60, 77).

Klass III lookusega bakteritel moodustavad PHA operoni *phaE* ja *phaC*. Neist sünteesitakse heterodimeerne PHA polümeraas. Samas lookuses, kuid vastupidises orientatsioonis paiknevad ülejäänud PHA metabolismi geenid *phaA* ja *phaB* (60, 77).

Klass IV PHA süntaasi geenid on leitud *Bacillus* perekonna esindajatel. *phaR*, *phaB* ning *phaC* ees asub ühine promootor. *phaR* kodeerib PHA polümeraasi teist subühikut. Puudu on *phaA*. Vastassuunas on orienteeritud oletatavasti fasiine kodeerivad *phaQ* ja *phaP* geenid (77).

Bakteri genoomis võib olla ka korraga mitu erinevat *pha* lookust, näiteks *Pseudomonas* sp. 61-3 kromosoomis on esindatud nii tüüp I kui ka tüüp II operonid (61).



Joonis 5. *pha* operonide klassifitseerimine

1.3.1 PHA polümeraasid

PHA polümeraasid (PhaC) liidavad PHA monomeeride prekursorid, (*R*)-3-hüdroksü-alkanoaatide CoA-tioestred polümeeriks (Joonis 3). PhaC on (*R*)-stereospetsiifiline.

Tänaseks on erinevaid PHA polümeraase kirjeldatud 59. Oma aminohappelise koostise poolest on nad 8-96% sarnased ja neis võib leida 6 konserveerunud ala, kokku 8 identse aminohappega (77).

Klass I ja klass II lookuste PHA polümeraasid (Joonis 5) on dimeersed valgud, mis koosnevad vaid ühetüübilistest subühikutest (kodeerib *phaC*). Klass I polümeraasid lülitavad PHA koostisesse eelistatult 3-5 süsinikulisi (*R*)-3-hüdroksüürasvhape CoA-tioestred. Klass II polümeraasid eelistavad nende 6-14 süsinikulisi analooge. McIPHA

sünteesivõime on üksikute eranditega omane vaid pseudomonaadidele (klass II) (38, 60, 61, 108).

Klass III ja klass IV lookuste polümeraasid koosnevad kahest erinevast subühikust, millest üht kodeerib *phaC* ja teist vastavalt *phaE* või *phaR* (78).

1.3.2 PHA depolümeraasid

1.3.2.1 Üldomadused

Polühüdrosüalkanoaadi depolümeraasid (PhaZ) on ensüümid, mis hüdrolüüsivad PHA vees lahustuvateks mono-, di- või oligomeerideks (1, 85).

PHA depolümeraasne aktiivsus on bakterite seas laialt levinud. PhaZ-d kodeerivat geeni (*phaZ*) kandvaid baktereid on isoleeritud erinevatest ökosüsteemidest (mage-, sool- ja heitvesi, aktiivmuda, leht- ja okaspuu, liiv-, savi- ja liivsavi muld). Esineb nii aeroobset kui anaeroobset (metanogeenset) PHA degradatsiooni (1, 13, 39, 42, 43, 48, 49, 63). On näidatud, et PHA degradataivsete omadustega bakterid on jõe vee mikrokosmis edukamad kui nende *phaZ* liigikaaslased (82). PHA-d suudab lagundada ka inimene (60).

PhaZ-d on keskmiselt 30-67 KDa suurused (glüko)proteiinid temperatuurioptimumiga 37-61°C ja pH optimumiga 7,5-9,4 (40, 42, 48, 50, 60, 69, 86, 87).

PhaZ-d on praktiliselt ainukesed PHA biolagundajad, kuna lipaasid suudavad hüdrolüüsida vaid polü- ω -hüdrosüalkanoaate (39). Peale selle on kirjanduses mainitud ka PHA oligomeeride hüdrolaase, mis osalevad mõne PhaZ esmaste depolümerisatsiooniproductide hüdrolüüsil monomeerideks ja kannavad süstemaatilist nimetust hüdrosübutüraat-dimeer hüdrolaasid (E.C.3.1.1.22) (114). Kõik seni uuritud PhaZ-d on enantioselektiivsed, hüdrolüüsides vaid looduslikku (*R*)-konfiguratsiooni 3HA estersidet (41).

Substraadispetsiifika alusel saab PhaZ-d jaotada lühikese ja keskmise pikkusega monomeeriahela PHA (Joonis 2) depolümeraasideks (40, 74, 85, 87). Kuna PHB on bakteririigis enim levinud polühüdrosüalkanoaat, on ka PHB depolümeraasid enam levinud ja enim uuritud (13, 74).

Esineb nii intratsellulaarseid kui ekstratsellulaarseid PHA depolümeraase. Valdav tähelepanu on pööratud rakuvälistele PhaZ-dele, mille kohta on töid ilmunud suurusjärgu võrra rohkem kui rakusisestest PhaZ-dest.

Põhjalik ülevaade PHA depolümeraasidest on esitatud antud tööle eelnenud bakalaureusetöös (62).

1.3.2.2 Rakuväline PhaZ

PHA rakuvälised depolümeraasid sarnanevad oma struktuurilt teiste orgaanilisi polümeere lagundavate ensüümidega, nagu tsellulaas, ksülanaas, amülaas ja β -1,3 glükanaas, koosnedes kolmest domäänist: N-terminaalne katalüütiline domään, C-terminaalne PHA spetsiifiline seondumiskompleks ja neid ühendav linkerdomään (40, 42, 68, 69, 87). Erananditeks on bakterite *Alcaligenes faecalis* AE122 ja *P. stutzeri* kahe substraadile seondumise domääniga PhaZ-d (40, 49, 69). Igal domäänil on mitu isovormi. Arvestades erinevate bakterite PhaZ-de teatud domäänide sarnasust, samal ajal kui ülejäänud ensüümi homoloogsus on madal, võib oletada, et bakterid on evolutsiooni jooksul erinevaid PhaZ domääne vahetanud ja kombineerinud (69, 87). Samuti kinnitab PhaZ erinevate domäänide horisontaalset ülekannet *P. lemoignei phaZ6*-e koodonikasutuse võrdlus antud bakteri teiste geenidega (87).

Rakuväliste depolümeraaside N-terminaalses otsas paikneb signaalpeptiid (40).

PhaZ-de katalüütilises domäänis asub lipaaside kõrgelt konserveerunud konsensusjärjestus Gly-X₁-Ser-X₂-Gly (lipaasi boks). Kõik senikirjeldatud PHA depolümeraasid on seriinhüdrolaasid (22, 40, 85-88).

Linkerdomäänide rolliks PhaZ-s on elastselt ühendada katalüüsiv ja substraadile seonduv domään ning hoida nende vahel optimaalset kaugust (40, 69, 87). Linkerdomään ei mõjuta ensüümi PHA-le seondumist ega 3HA di- ja trimeeride hüdrolüüsi, küll aga on tema olemasolu PhaZ-s määrava tähtsusega PHA depolümerisatsioonil (68).

Katsed liitvalkudega on näidanud, et ekstratsellulaarse mclPHA depolümeraasi substraadile seondumise domään suudab spetsiifiliselt ning tugevalt seonduda hüdrofoobsetele PHA kristallidele (9, 43, 69).

1.3.2.3 Rakusisene PhaZ

Intratsellulaarsed PhaZ-d hüdrolüüsivad natiivset, amorfset PHA-d. Nad on oma pikkuse ja aminohappelise järjestuse poolest ekstratsellulaarsetest PhaZ-dest selgelt eristatavad, kuigi mõlemad ensüümid katalüüsivad samu reaktsioone. See on nähtavasti tingitud ensüümide erinevatest töökeskkonna tingimustest ja erinevat tüüpi substraadist (21, 41, 85).

Kokku on sekveneeritud kuus intratsellulaarset mclPHA depolümeraasi (tüvedest: *P. aeruginosa*, *P. resinovorans*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. oleovorans*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *P. putida*). Iseloomustatud on neid minimaalselt. Teada on vaid see, et tegemist on seriini hürdolaasidega, nad sisaldavad eelpoolmainitud lipaasiboksi, ei oma selget domäänset struktuuri ning on omavahel aminohappelise järjestuse poolest väga sarnased (41).

Rakusisene PhaZ-d sünteesitakse juba algselt PHA graanuli pinnale. Sel põhjusel esineb natiivsest tootjast isoleeritud intaktsetel PHA graanulitel vastavates tingimustes autolüüs. Rekombinantse (*phaC⁺*; *phaZ*) *E. coli* PHA graanulitel ei esine autohüdrolüüsi. Kõige vähem on kirjeldatud rakusiseseid mclPHA depolümeraase.

1.4 PHA metabolismi regulatsioon

PHA metabolismi regulatsiooni kohta on kirjanduses vähe andmeid. Üldaktsepteeritud tõeks on PHA akumulatsiooni käivitumine olukorras, kus keskkonnas on süsinikku, aga mõne muu toitaine (N, O, P, S) puudumine takistab raku jagunemist. Kui limitatsioon on möödas, algab ka PHA lagundamine (5, 41, 60).

Bakterid sekreteerivad ekstratsellulaarseid PhaZ-sid süsinukunäljas ja/või 3HA-sarnaste indutseerijate leidumisel keskkonnas (86). Eksogeense süsinikuallika defitsiidi indutseerivat mõju on kirjeldatud ka intratsellulaarsete PhaZ-de puhul, mis on juba algselt sünteesitud PHA graanulite pinnale (97). Regulatsioon toimub transkriptsioonilisel ja ensümaatilisel tasandil. Kuna PHA süntees on tihedalt seotud raku keskse metaboolse süsteemiga, mõjutavad teda ka kõik teised süsteemid, mis reguleerivad raku metabolismi (45).

On näidatud, et tegelikult toimuvad PHA hüdrolüüs ja süntees raku sees üheaegselt ning PHA akumulatsioon või mobiliseerumine määrab ära nende protsesside omavaheline

tasakaal. Arvatakse, et selline süsiniku ringlemise tsüklil PHA metabolismis tagab rakule nn. süsinikupuhvri. Süsteem sarnaneb veereservuaarile, mida pidevalt täidetakse veega (PHA akumulatsioon), kuid samas ka pidevalt tühendatakse, võttes sealt joogivett (PHA mobiliseerimine) (41).

Kuna PHA sünteesi ja hüdrolyüsi ensüüme on edukalt ekspresseeritud teistes organismides, võib eeldada, et olulisi posttranslatsioonilisi modifitseerimisi neil ei esine (14, 21, 33, 51, 55).

Kessler ja Witholt on oma töös oletanud, et PhaZ-de aktiivsuse kontrollil osaleb fosfoenoolpüruvaadi fosfotransferaasi süsteem (45). Kuna PHA-s on talletatud reduktiivjõud, on üks PHA metabolismi regulaator ka NAD^+/NADH suhe rakus (60).

P. fluorescens GK13 ja *P. stutzeri* puhul on näidatud, et PhaZ transkribeeritakse δ^{70} promootorilt (69, 73, 85). *P. aeruginosa*'l ja *P. oleovorans*'il on PHA metabolismiga seoses kirjeldatud δ^{70} - perekonda kuuluvaid δ^E faktoreid, mis mõjutavad periplasmaatilistes funktsioonides või stressivastustes osalevaid valke (18, 73, 94).

1.5 PHA plast

1.5.1 PHA plastide omadused ja kasutamine

Arenenud maades kulub inimese kohta aastas keskmiselt 50 kg plastmassi, millest enamuse moodustavad nafta baasil valmistatud keemiliselt ja bioloogiliselt inertsed plastid (108). Erinevalt neist on PHA-plastid looduses lagunevad, retsükleeritavad ja keskkonnasõbralikud.

PHA on termoplast (10, 60), kusjuures tema termilised, kristallilised ja mehhaanilised omadused sõltuvad oluliselt monomeeridest. Nüüdseks on erinevaid mclPHA monomeere tuvastatud juba üle 150 (41, 77, 108).

PHA plastilised omadused kasvavad ja kristallilised omadused kahanevad tema monomeeride ahelapikkuste ja/või PHA molekulmassi suurenedes. PHB on kristalliseerununa tugev, kuid võrdlemisi jäik materjal, polühüdrosüoktanoaat (PHO) aga juba elastomeer (10, 60, 108). Ka hüdroksüalkanoaatide kopolümeerid on reeglina plastilisemad ja vähem kristalliseerunud kui homopolümeerid (15, 60) (Tabel 2).

Scl-mclPHA kopolümeere on hakatud nende omaduste tõttu üha enam hindama.

Tabel 2. PHA-plasti omaduste võrdlus polüpropüleeniga (60).

Parameeter	PHA ja polüpropüleeni omadused				
	P(3HB)	P(3HB-3HV)	P(3HB-4HB)	P(3HO-3HH)	PP
T _m (°C)	177	145	150	61	176
T _g (°C)	2	-1	-7	-36	-10
Kristallilisus (%)	70	56	45	30	60
Maks. paine (%)	5	50	444	300	400

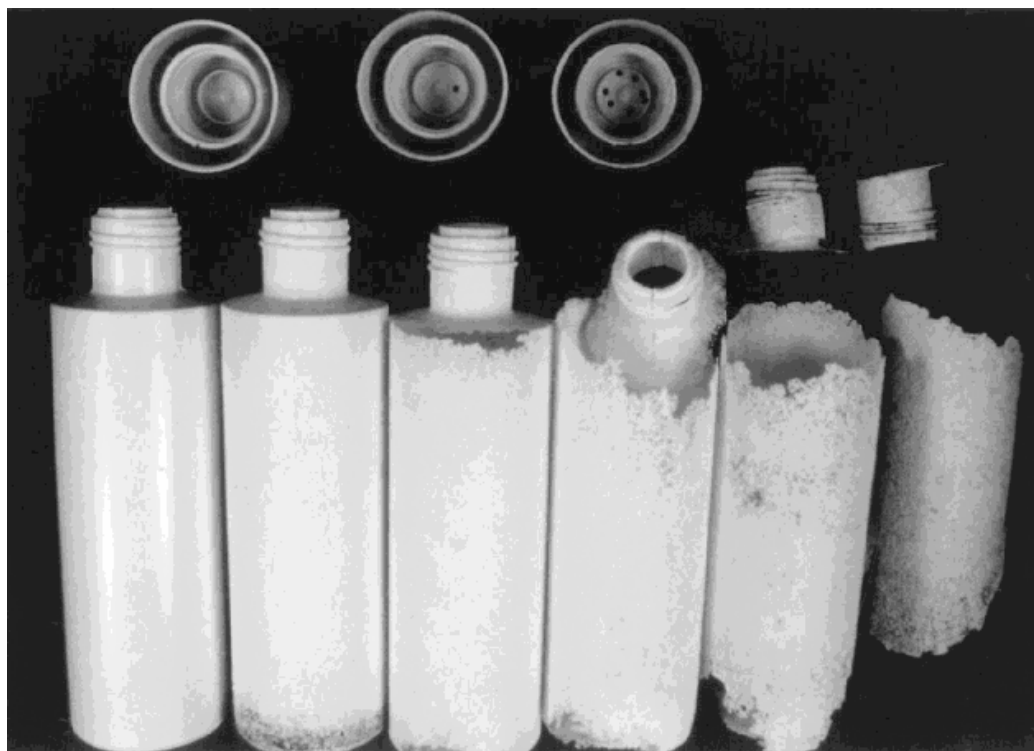
P(3HB)- polü(3-hüdroksübutüraat). P(3HB-3HV)- polü(3-hüdroksübutüraat[80%]-ko-3-hüdroksüvaleriaat[20%]). P(3HB-4HB)- polü(3-hüdroksübutüraat[84%]-ko-4-hüdroksübutüraat[16%]).

P(3HO-3HH)- polü(3-hüdroksüoktanoaat[89%]-ko-3-hüdroksüheksanoaat[11%]). PP- polüpropüleen.

T_m- sulamistemperatuur.

T_g- klaasistumistemperatuur.

PHA-plastist valmistatud kilesid võib kasutada erinevate pakkematerjalidena. Patenteeritud on PHB ja PHB-PHV segude kasutamine looduses lagunevate või komposteeritavate plastpudelite (Joonis 6) ja imikumähkmete ning teiste hügieenitarvete valmistamisel (5, 60, 76).



Joonis 6. P(3HB-3HV) pudeli aeroobne lagunemine roiskveesetetes (keskmine temperatuur 20°C). Proovid võetud 0, 2, 4, 6, 8 ja 10 nädalal (60).

PHA-plasti tähtsus kasvab meditsiinis, kus seda kasutatakse ajutiste implantaatide, meditsiiniliste katematerjalidena arteritel ja närviaksonitel ning ravimi fikseerijatena soovitud toimekohas (52, 59, 81, 108). PHA kuulub veel-põhineva lateksvärvi koostisesse (60). Samuti saab PHA-d kasutada ka toiduainetetööstuses näiteks vahukoore aseaine või närimiskummi valmistamisel (106). Integreerides mclPHA geene puuvillataime (*Gossypium hirsutum*) genoomi, on võimalik toota kuumakindlamat ja vähem soojustjuhtivat puuvilla (16). Pikemate külghelatega PHA-d on kasutatud rõhutundlike liimidena. PHA ahelaid ristsidudes moodustub kummitaoline aine, mida saab rakendada kummitööstuses (60). PHA-d depolümeeriseerides on võimalik toota optiliselt puhtaid hüdroksükarboksüülhappeid keemiatööstuse jaoks (58).

1.5.2 PHA plastide tootmine ja hind

Suurim probleem PHA-plastiga seoses on selle liialt kõrge hind (15 USD/kg) (15, 60, 76). Tööstuslikult on peamisteks PHA produtsentideks rekombinantsete *Escherichia coli* (15, 19, 60, 105) ja *Ralstonia eutropha* (60). Erinevalt looduslikest tootjatest puudub *E. coli* PHA depolümeraasne aktiivsus, ta on kiire generatsiooniajaga ja teda on kergem lüüsida. Rekombinantse *E. coli* PHA sisaldus võib küündida üle 90% raku kuivkaalust (19, 40) ja PHA molekulmass kuni 20000 KDa-ni (98). PHA-d on võimalik toota kõikvõimalikest süsinikuallikatest, mis on bakterite poolt utiliseeritavad s.h. reovesi, nafta- ja toiduainetetööstuse jäägid (34, 109, 113). PHA produktsiooni insenergeneetilist suunamist saab edukalt teostada mitmel erineval tasandil (4). Kirjanduses on soovitatud ka nukleaasi geeni lisamist produtsendi genoomi, mis hõlbustaks PHA eraldamist (10). Kõik need võimalused vähendavad toodetava PHA hinda kuni kahe USD/kg (59, 76, 108). Kasutades taimi bioreaktoritena, langeks PHA tootmishind tavaplastidega konkureerivale tasemele (alla 1 USD/kg). Sarnaselt nukleaasidele võiks siin kasutada lisaks tsellulaasseid ensüüme, et saavutada produtsendi "eneseseedivus". Siin võib taksituseks osutada taimedele omane kompartmentiseeritud metabolism (16, 60, 72, 108).

Töö eesmärgid

Minu käesoleva uurimustöö eesmärkideks on võimaliku mclPHA tootmise tarbeks iseloomustada üht suure protsessiivsusega PHA tootjat bakterit ja kirjeldada PHA sünteesi tingimusi ning sünteesitud PHA koostist. Stereospetsiifliste 3-hüdroksürasvhapete tootmise võimaluste uurimiseks seadsime eesmärgiks ka alustada PHA depolümeraasi iseloomustamist. Kokkuvõttes oleksid käesoleva uurimustöö eesmärgid järgmised:

- Määrata eelnevalt isoleeritud PHA⁺ pseudomonaadi liigiline kuuluvus
- Isoleerida edasiseks uurimiseks PHA operon
- Iseloomustada uuritava pseudomonaadi PHA depolümeraasi
- Iseloomustada PHA sünteesi uuritavas tüves
- Iseloomustada PHA koostise sõltuvust söötmes kasutatud süsinikuallikatest.
- Lisaülesandeks oleks ka sobiva meetodika valik ja optimeerimine PHA metabolismi analüüsimiseks.

2 Eksperimentaalosa

2.1 Materjal ja meetodika

2.1.1 Bakteritüved ja vektorid

Käesolevaa magistr töö objektiks oli tüvi *Pseudomonas mandelii* PC17, mis on isoleeritud Eeva Heinaru poolt poolkoksimägede leoveest kirde-Eestist ja varem identifitseeritud kui *Pseudomonas corrugata* PC17 (30). Tüvi on deponeeritud geenipangas numbri all AY538263. Antud töö käigus läbi viidud 16S rRNA geeni järjestuse ja biokeemiliste testide alusel käsitletakse teda kui *P. mandelii*. Retsipientidena transformatsioonil kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α (84). Kloneerimisvektorina kasutati plasmidi pBluescriptII SK (Stratagene).

2.1.2 Söötmed ja kasvutingimused

Kultuure kasvatati Luria-Bertani (LB) söötmel (66), M9 minimaalsöömel (1x M9 (3); 0,25% mikroelemente (8); 0,1-1% süsinikuallikat) või toitepuljongis (0,8% pulberkontsentraati [Difco]). Polühüdrosüalkanoaadi (PHA) sünteesi initsieerimiseks kasutati lämmastikuvaest M9-N söödet (1x M9 ilma NH₄Cl-ta; 0,25% mikroelemente; 0,1-1% süsinikuallikat). Süsinikuallikatena kasutati glükoosi (20%), heksanoaati ja oktanoaati.

Aereerimiseks loksutati vedelkultuure loksutil 160-180 pööret minutis. Tardsöötmetele lisati agarit (1,5%). Kasutati LB tardsöödet, toitegarit (2,3% pulberkontsentraati [Difco]) ja säilitamissöötmena kasutati M9 minimaalsöödet koos 2,5 mM fenooliga

Kuna transformeerimisel kasutatud plasmid pBluescriptII SK sisaldas selektiivse markerina ampitsilliini resistentsust tagavat geeni, lisati söötmetele transformantide selekteerimiseks ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 μ g/ml. *Pseudomonas mandelii*'d ning *E. coli* DH5 α 't kasvatati temperatuuridel vastavalt 30 ja 37 °C.

Bakteritüve füsioloogiliste omaduste uurimiseks kasutati järgmisi söötmeid:

- Hiltay sööde (0,2% KNO₃, 0,1% asparagiini, 0,5% K-tsitraati, 0,2% KH₂PO₄, 0,2% MgSO₄×7H₂O, 0,02% CaCl₂×6H₂O, FeCl₃ jäljed, 0,008% broomtümoolsinist) (29) – kasutati denitritseerimisvõime olemasolu kontrollimiseks. Rakud külvati vedelsöötme kõrgesse sambasse ning inkubeeriti 30°C juures termostaadis. 3-5 päeva möödudes vaadeldi mullikeste tekkimist söötme pinnale.
- King B sööde (2% peptooni, 1% glütserooli, 0,15% KH₂PO₄, 0,15% MgSO₄×7H₂O, 1,5% agarit; (47) – fluorestseerivate pigmentide tootmise testimiseks. Peale joonkülvu inkubeeriti tassi mõni päev termostaadis, seejärel kontrolliti UV-lambi all fluorestseerivate pigmentide olemasolu külvijoone ümbruses.
- Želatiinisööde (0,8% toitepuljongi kontsentraati [Difco], 15% želatiini) (29) – želatiini hüdrolüüsi (proteasse aktiivsuse) tuvastamiseks. Rakud külvati katseklaasi, inkubeeriti seda 2 nädalat 30°C juures ning asetati seejärel jahedasse. Kui sööde tardus, oli želatiin lagundamata, sellest järeldati želatiini hüdrolüüsi võime puudumist.
- Piimaagar (4%line vesiagar ja 4% piima) (29) – kaseiini hüdrolüüsi tuvastamiseks. Peale 3-4 päeva pikkust inkubatsiooni 30°C juures jälgiti heledate tsoonide tekkimist ümber külvijoone.
- Tärklisesööde (1% peptooni, 0,5% KH₂PO₄, 0,2% tärklist, 1,5% agarit) (29) – amülaasse aktiivsuse tuvastamiseks. Tassi, millele oli külvatud uuritav tüvi, inkubeeriti mõned päevad termostaadis, seejärel valati üle tassi 1-2 ml Lugoli lahust (2 g KJ ja 1 g J 300 ml destilleeritud vee kohta) ning vaadeldi värvivabade tsoonide tekkimist ümber külvijoone.
- Simmonsi tsitratagar (0,2% Na-tsitraati, 0,5% NaCl, 0,02% MgSO₄, 0,1% NH₄H₂PO₄, 0,1% K₂HPO₄, 1,5% agarit, 0,008% broomtümoolsinist) (29) – tsitraadi kasutamise testimiseks.
- Hugh-Leifsoni sööde (0,2% peptooni, 0,5% NaCl, 0,03% K₂HPO₄, 1% glükoosi, 0,003% broomtümoolsinist, 0,3% agarit (35) – kääritamise võime olemasolu testimiseks
- Metüülpunase-Voges-Proskaueri (MP-VP) sööde (0,7% peptooni, 0,5% K₂HPO₄, 0,5% glükoosi) (29) – kääritamistüübi leidmiseks.

- Soolataluvuse testimiseks kasvatati uuritavat tüve erineva NaCl sisaldusega LB-tassidel.

2.1.3 Testid bakteritüve füsioloogia iseloomustamiseks

Endosporide esinemise testimine

Toitepuljongisse külvati külvinõelaga pisut rakke. Inkubeeriti 15 min. 80°C juures ning asetati siis termostaati 30°C juurde. Kasv puljongis näitas spooride olemasolu.

Katalaastest

Katalaasse aktiivsuse tuvastamiseks suspendeeriti uuritava mikroobi rakke vesinikperoksiidis. Kuna katalaas lagundab vesinikperoksiidi veeks ja hapnikuks, oli positiivseks tunnuseks hapnikumullide eraldumine (29).

Oksüdaastest

Filterpaber immutati oksüdaastesti reaktiiviga (35 mg α -naftooli lahustatud 2,5 ml 96% etanoolis, 50 mg dimetüül-*p*-fenüleendiamiini dihidrokloriidi, 7,5 ml dest. vett), filtrile kanti tikuga uuritava mikroobi rakke. Positiivseks reaktsiooniks oli sinaka värvuse teke (29). Oksüdaastest näitab tsütokroom c olemasolu või puudumist.

Trüptofanaasi test ehk indooltest

Testitava ensüümi funktsioon on lagundada aminohape trüptofaan indooliks, ammoniaagiks ja püruvaadiks. Seepärast kasvatati rakke enne trüptofaanirikkal söötmel (LB puljong). Trüptofaanist tekkiv indool akumuleerub söötmesse. Indooli detekteerimiseks lisatakse rakkudega katseklaasi tõmbekapi all Kovacs'i reaktiivi (50 g *p*-dimetüülaminobensaldehüüdi, 750 ml butanooli, 250 ml kontsentreeritud HCl). Positiivseks reaktsiooniks on punase värvuse teke (29).

Voges-Proskaueri test

Eelneval kasvatati rakke mõned päevad MP-VP söötmes. Seejärel lisati kultuurile tõmbekapi all Barriti reaktiivi (0,2 ml 40% KOH segatud 0,6 ml 96% EtOH-ga, milles on lahustatud 6 g α -naftooli). Positiivse reaktsiooni korral ilmus 20 min jooksul punane värvus. Test näitab 2,3-butaandiooli akumulatsiooni söötmesse (29).

Biolog GN MicroPlate™ kasutamine

Rakke kasvatati eelnevalt 24 tundi BUG agaril (Biolog, Inc., Hayward, California, USA). Vastavalt tootja juhendile valmistati inokuleerimisvedelikku bakterisuspensioon, mille optiline tihedus (lainepikkusel 580 nm) jäi vahemikku 0,13-0,15. Suspensioon kanti testplaadi kaevudesse, testplaat pandi termostaati 37°C juurde. Testplaadi kaevud sisaldavad erinevaid süsinikuallikaid koos redoksvärvi tetrasooliumsinisega. Kui bakter oksüdeerib substraati, toimub värvi redutseerimine lillaks formasaaniks, mis registreeritakse multiskaneeriva spektrofotomeetriga. Saadakse metaboolne muster, mida võrreldakse teiste andmebaasis leiduvate testtüvedega.

Kaevudes oleva tetrasooliumsinise redutseerumist mõõdeti 24 ja 48 tunni pikkuse inkubatsiooniaja järel.

2.1.4 Glükoosi määramine

D-glükoosi hulga määramiseks proovides kasutati Roche *D-Glucose* komplekti (Kat. No. 0716251) ja tootja poolt soovitatud protokoll. Analüüs põhines D-glükoosi fosforüleerimisel ja sellele järgneval oksüdeerimisel, mille käigus redutseeritakse NADP. NADPH hulga suurenemine on stöhhiomeetriline D-glükoosi hulgale proovis ja seda mõõdeti lainepikkusel 340 nm.

2.1.5 Lämmastiku määramine

Ammooniumlämmastiku analüüs põhines formaldehüüdi ja ammooniumi kondensatsioonireaktsioonil trimetüleentetraamiidiks. Peale 5 ml supernatandi ja 10 ml dest. vee neutraliseerimist 0,4 N KOH-ga (indikaatoriks oli fenoolftaleiin), lisati 5 ml formaldehüüdi. Moodustunud vesinikioonide hulk leiti titreerimisel 0,5 N KOH-ga. Tulemust mõõdeti 15 ml dest. vee suhtes.

2.1.6 Bakteri arvukuse ja keskmise diameetri määramine

Bakteri arvukus ja keskmine diameeter määrati aparaadiga Beckman Coulter Counter (Beckmann Coulter).

Alternatiivselt määrati bakterite arvukus mikroobi suspensioonis kasutades loendamiskambrit. Bakterid fikseeriti naatriumasiidiga (lõppkontsentratsioon 0,01%) ja loeti 0,00025 mm³ kambris. Enne loendamist proovid lahjendati.

2.1.7 PHA-graanulite värvimine bakterites sudaanmustaga

PHA graanulite olemasolu tuvastamiseks värviti uuritavat tüve sudaanmustaga (0,25% sudaanmust B 70%-lises etanoolis).

in situ kolooniate värvimisel (89) kaeti tardsöötme pind sudaanmusta lahusega ja hoiti 20 minutit. Seejärel valati üleliigne värv ära ja söödet pesti 95%-lise etanooliga.

Mikroskoopimiseks värviti kuumfikseeritud bakteripreparaati 30 minutit sudaanmustaga ja pesti ksülooli või 95%-lise etanooliga (29). Tsütoplasma värvimiseks kasutati 0,5-1% safraniini vesilahust (5 sekundit). Preparaati vaadeldi valgusmikroskoobiga õliimmersioonis 1000-kordse suurendusega. Lipofiilne värv sudaanmust värvib PHA graanulit ümbritseva lipiidkihi mustaks ja safraniin värvib ülejäänud tsütoplasma punaseks.

2.1.8 PHA värvimine Niiluse punasega

Bakteriaalse PHA värvimiseks kasutati ka Niiluse punast (*Nile Red*) (26). Üksikute rakkude värvimiseks lisati 200 µl veega pestud bakterisuspensioonile naatriumasiidi (lõppkontsentratsiooniga 0,01 %) ja 8 µl Niiluse punast (1 mg/1 ml atsetoonis) ning segu inkubeeriti 20 minutit. Valmistati märgpreparaat ja baktereid vaadeldi fluorestsentsmikroskoobiga õliimmersioonisüsteemis.

in situ kolooniate värvimiseks lisati tardsöötmele niiluse punast lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml. Baktereid inkubeeriti 3 päeva ja tardsöödet vaadeldi ultravioletvalguses.

Niiluse punane ergastub lainepikkusel 450-560 nm juures ning emiteerib lainepikkusel 528 nm kuni >600 nm.

2.1.9 PHA sünteesi mõõtmine läbivoolutsütomeetriga

PHA hulga suurenemist rakkudes mõõdeti *Facs Calibur System* läbivoolutsütomeetriga (Becton Dickinson). Selleks värviti vedelsöötimest võetud rakud Niiluse punasega eelpoolmainitud viisil.

2.1.10 PHA tootmine

PHA tootmiseks kasvatati *P. mandelii* rakke 1 ml LB vedelsöötmes üleöö, pesti destilleeritud veega, lisati 15 ml M9 minimaalsöötmele ning kultiveeriti üleöö. Järgnevalt viidi rakud sama söötme suuremasse mahtu (200 ml) ja kasvatati 2 ööpäeva. Süsinikallika kontsentratsioon oli 0,1%.

PHA sünteesiks bakterikultuur tsentrifugeeriti (7000 x g, 10 minutit), viidi 0,1% süsinikuallikaga lämmastikuvaesele M9-N vedelsöötmele ja kasvatati 2 ööpäeva. Olenevalt katsest kasutati süsinikuallikana glükoosi, heksanoaati või oktanoaati. PHA hulga suurendamiseks lisati kasvatuses jooksul heksanoaati ja oktanoaati söötmetele veel 0,1% süsinikuallikat ja glükoosi söötmele veel 0,5% süsinikuallikat.

2.1.11 PHA metanolüüs

PHA hulga ja monomeerse koostise määramiseks rakkudes lõhuti PHA polümeer metanolüüsil monomeerideks (11). Selleks pesti bakteriaalne biomass veega ja lüofiliseeriti. 10 mg lüofiliseeritud bakterimassi derivatiseeriti keeratava korgiga klaasviaalis 0,5 ml kloroformi, 0,5 ml lüüsisegu (85% metanool, 15% väävelhape) ja 40 µl standardi (5 mg/ml naatriumbensoat) juuresolekul 100 °C 3 h. Pärast reaktsiooni lisati segule 0,5 ml dest. vett ja segati voretksil intensiivselt 1 minuti jooksul. Peale faaside

eraldumist viidi alumine orgaaniline faas uude klaasviaali. Veetustamiseks lisati naatriumsulfaati ja edasisteks analüüsideks säilitati segu temperatuuril -20 °C.

2.1.12 Metüül-3-hüdroksüalkanoaatide GC-MS analüüs

3-HA metüülestrid lahutati gaaskromatograafiliselt (Perkin Elmer Autosystem Gas Chromatography) kolonniga PerkinElmer Elite-5 (5% Diphenyl) Dimethylpolysiloxane Capillary Column (30m x 0,25mm) ja määrati nende mass-spektrid (Perkin Elmer Qmass 910 Mass Spectrometer) varemkirjeldatud protokollil alusel (99). Kandjagaasiks oli heelium (1,0 ml/min). Proovimahuks oli 2 µl. *Split Ratio* oli 1:45

Tempeatuuriprogramm oli järgmine: 40 °C (5 min), temperatuuri tõus 15 °C/min 280°-ni, 280°(5 min). Sisend 280 °C, MS ülekandeliin ja ionisaator 200 °C.

Referentsidena kasutati 3-hüdroksüalkaanhapete metüülestreid firmast *Larodan Lipids*.

PHA monomeeride vahekord leiti proovide mass-spektrite piikide ruumalade ja metüül-3-hüdroksüalkanoaatide moolimasside suhtest.

2.1.13 PHA eraldamine

Enne eraldamist kontrolliti PHA graanulite olemasolu bakterite värvimisel sudaanmusta või niiluse punasega.

PHA ekstraheerimiseks kasutati eelnevalt välja valitud ja optimeeritud meetodikat (62). Tsentrifugimisel sadestatud rakud pesti 65°C-se atsetooniga 20 minutit. Alternatiivina bakterimass lüofiliseeriti. Pärast kuivatamist lisati segule 50 mahuosa kloroformi ja inkubeeriti 30 °C, 24 tundi. Lahustunud PHA ja rakujäägid eraldati tsentrifuugimisel (5000 x g, 15 minutit) ja järgneval filtreerimisel läbi kurdfiltrit. PHA sadestati lisades 5 osa 70%-list metanooli ja tsentrifuugides 5000 x g, 15 minutit. PHA kile tootmiseks valati PHA-kloroformsegu vesiagari pinnale ja lasti kloroformil ära auruda.

Atsetooni ja kloroformi proovist eraldamiseks kasutati soojendit ning vaakumpumpa.

2.1.14 PHA sisalduse määramine bakterite kuivkaalust

PHA massi leidmiseks bakterite kuivkaalust määrati algul pestud rakkude kuivkaal ning seejärel sama bakterisuspensiooni PHA sisaldus. Lüofiliseeritud biomass kuivatati termostaadis temperatuuril 105 °C 3 tundi ja kaaluti.

PHA hulga määramiseks bakterisuspensioonis kasutati kloroformekstraktsiooni. Filtreeritud kloroform aurutati ja väljasadenenud PHA-d kuivatati temperatuuril 105 °C, 3 tundi. PHA sisaldus kuivas biomassis leiti kaalude vahest. Teostati mitu kontrollkaalumist.

2.1.15 DNA eraldamine

Genoomse DNA eraldamiseks suspenderiti 5 ml LB söötmes üles kasvanud rakud 250 ml TE 50/5-s (50 mM Tris-HCl; 5mM EDTA, pH 8,0) ja lisati 12 µl lüsotsüümi (10 mg/ml) (Sigma) ning 7 µl RNAas H-d (10 mg/ml) (Fermentas). Segu inkubeeriti 37 °C juures 1 tund. Seejärel lisati 600 µl puhvrit (10 mM Tris-HCl [pH 8,0]; 0,5% SDS; 5 mM CaCl₂) ning proteinaas K (0,1 mg/ml) ja pronaas E (2 mg/ml) (Roche). Segu inkubeeriti 50 °C juures 1 tund. Järgnes fenool- ja kloroformtöötlus, kus reaktsioonisegu pesti 1 mahu tasakaalustatud fenooliga, seejärel 1 mahu fenool-kloroform seguga (1:1) ja lõpuks kaks korda 1 mahu kloroformiga. Iga pesu järel pipeteeriti tsentrifuugimisel (10000 x g, 10 minutit) lahutunud DNA-d sisaldav ülemine vesifaas uude tuubi. DNA sadestati 0,1 osa 3 M KAc ja 0,8 osa isopropanooliga, tekkinud sade keerati külvinõela otsa, pesti 70% etanooliga ning lahustati deioniseeritud vees.

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutades ränioksiidkolonni tehnoloogiat vastavalt DNA *QIAprep Spin Miniprep Kit*'i standardsele protokollile. DNA elueeriti kolonnist vee või puhvriga TE 10/1 (10 mM Tris·Cl, 1mM EDTA, pH 8,0).

Minipreparatsiooniks suspendeeriti rakud puhvril TE 50/5-s (50 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA, pH 8,0) ja lüüsi sama mahu lüüsilahusega (0,2 M NaOH ja 1% SDS). Segu neutraliseeriti sama mahu 3 M KAc-ga ning lahustunud plasmiidne DNA eraldati sademest tsentrifuugimisel 10000 x g, 10 minutit lauatsentrifuugil. Järgnes DNA sadestamine 2,5 mahu 96% etanooliga ja tsentrifuugimisega (10000 x g, 10 minutit) ning

pesemine 70 %-lise etanooliga. Saadud DNA lahustati puhvril TE 10/1 või deioniseeritud vees.

DNA geelist eraldamisel kasutati QIAquick Gel Extraction Kit'i (Qiagen) ja DNA fragmentide puhastamiseks reaktsioonisegust kasutati komplekti QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) ning tootjafirma juhendeid.

2.1.16 Elektroforees

Eri suurusega DNA fragmendid lahutati elektroforeesil horisontaalses agarosgeelis nende liikumise põhjal elektriväljas pingega 100 volti.

Kasutati enamasti 1%-st agarosgeeli 1x TAE puhvril (40 mM Tris-atsetaat/1mM EDTA, pH 8,3). DNA visualiseerimiseks ultravioletvalguses lisati geelile vahetult enne vormidesse valamist etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 25µg/100ml. Elektroforees viidi läbi 1x TAE puhvril.

Enne proovi geeli kaevu kandmist segati proov 6x *Loading Dye*'ga (0,2% broomfenoolsinine; 0,2% ksüleentsüanool; 60% glütserool). DNA fragmentide pikkuste määramiseks foreesiti nendega üheagselt ka vastatavat suurusmarkerit [Gene Rulertm 1Kb DNA ladder, (Fermentas)].

Vajadusel lõigati foreesil lahutunud huvipakkuv DNA fragment geelist välja edasisteks analüüsideks.

2.1.17 DNA restriksioon, fosfataasi töötlus ja ligeerimine

Restriksiooniks kasutati firma Fermentas poolt toodetud klass II restriktase. Vastavalt protokollile oli reaktsioonisegus selleks ette nähtud 10x puhvrit (1/10), DNA-d ja ensüümi.

Takistamaks avatud vektori retsirkulariseerumist teostati vektori 5'-otsmiste fosfaatide hüdrolüüsimine krevetil aluselise fosfataasiga (SAP). Kuna vektor oli eelnevalt restriktasiga avatud, viidi reaktsioon läbi samas puhvril, lisades reaktsioonisegule 1 U (*Unit*) SAP-i 30 µl kohta.

Ligeerimisel liideti DNA fragmendid eelnevalt restriктаasidega avatud vektoritega. Kovalentne side 5'-fosfaat- ja 3'-hüdrosüülrühmade vahel sünteesiti Fermentas'e T4 DNA ligaasiga. Reaktsioonisegu oli 1/10 spetsiaalset 10x puhvrit, mis sisaldas ATP-d lõppkontsentratsiooniga 0,5 mM. Ligeerimist teostati temperatuuril 16 °C üleöö. Et tõsta ligeerimisele järgneva transformeerimise efektiivsust, inaktiveeriti hiljem ligaas, hoides reaktsioonisegu temperatuuril 65 °C, 20 minutit.

2.1.18 Transformeerimine

Kompetentsete rakkude saamiseks töödeldi *E. coli* DH5 α kultuuri Milleri ja Nickoloffi meetodil (65). Kompetentsetesse rakkudesse transformeeriti elektroporeerimise teel uuritavat geeni sisaldav plasmiid pBluescriptII SK. Selleks lisati 40 μ l soolavabale DH5 α bakterisuspensioonile 1-3 μ l inaktiveeritud ligatsioonisegu ja neile rakendati elektrilaeng (25 μ F, 200 Ohm, 2500V). Rakke kasvatati 37 °C loksutil LB puljongis, 1 tund ja külvati seejärel ampitsilliini sisaldavale LB tardsöötmele. Transformantide selekteerimiseks lisati söötmele veel 25 μ l 4% IPTG-d (isopropüül-1-tio- β -D-galaktosiid) ja 10 μ l X-Gal-i (5-bromo 4-kloor-3-indoüül-D-galaktopüranosiid) (20 mg/ml dimetüülformamiidis).

2.1.19 DNA kontsentratsiooni ja bakterisuspensiooni tiheduse määramine

DNA hulga määramisel kasutati spektrofotomeetrit (Ultrospec 3000 pro) mõõtes DNA lahuse neeldumist lainepikkusel 260 nm dest. vee suhtes.

Spektrofotomeetrit kasutati ka bakterisuspensioonis oleva biomassi määramiseks, mõõtes uuritava proovi optilist tihedust lainepikkusel 600 nm.

2.1.20 Polümeraasi ahelreaktsioon

PCR-i reaktsioonid viidi läbi firma Fermentas poolt soovitatud puhvrites (1,5 mM Mg²⁺ ionide manulusel). Peale märklaud DNA (~300 ng) ja praimerite (~300 nM) olid reaktsioonisegus veel 200 µM desoksüribonukleosiid-5'-trifosfaadid. Termoresistentse polümeraasina oli kasutusel *Thermus aquaticus*'e *Taq* DNA polümeraas (lõppkontsentratsiooniga 0,025 U/µl) (Fermentas). Reaktsioonid viidi läbi masinas Mastercycler Personal (Eppendorf). Praimerite sulamistemperatuuri leidmisel kasutati programmi "Oligo Kalkulaator" abi.

PHA operoni isoleerimiseks kasutati PCR-i reaktsioonis erinevate pseudomonaadide PHA polümeraasides konserveerunud alade alusel koostatud primereid Pc-F1 ja PhaC-art-R.

16S rRNA amplifitseerimiseks kasutati primereid PCR I ja PCR II.

Praimeripaarid ja reaktsioonis kasutatud seondumistemperatuurid on toodud tabelis 3. Seondumisetapp kestis 1 minut. Elongatsioonietapi disainimisel lähtuti *Taq* polümeraasi sünteesikiirusest (1 Kap/min) ja optimaalsest temperatuurist (72 °C). DNA kaskikahelad denatureeriti temperatuuril 95 °C, 45 sekundit.

Tabel 3. PCR-is kasutatud praimerid ja nende seondumistemperatuurid (T_m)

Primeri nimi	Järjestus	T _m (°C)
Pc-F1	5' CATCCTCTACTGGAACAACG 3'	50
PhaC-art-R	5' GCCTGCAGTCGAAGATGTAGAACTTGTTG 3'	
PCR I	5' AGAGTTTGATCATGGCTCAG 3'	50
PCR II	5' TACGGTTACCTTGTACGACTT 3'	

2.1.21 Sekveneerimine

Kasutati MegaBACE 1000 sequencer aparati ja komplekti DYEnamicTM ET terminator cycle sequenceing kit (Amersham Pharmacia Biotech) ning tootjafirma poolt soovitatud protokolliga optimeeritud (lahjendatud) varianti.

Reaktsioonisegu sisaldas vastavat reaktsiooni puhvrit (*reagent mix*), 0,2-0,5 µg DNA-d ja umbes 5 pmol primereid.

16S rRNA sekveneerimisel kasutati SEQ ja S4 praimereid (103) ja pBluescriptII SK vektorisse kloneeritud DNA fragmentide sekveneerimisel kasutati vastavaid vektorispetsiifilisi praimereid T3 M13/pUC pärisuunaline praimer ja T7 M13/pUC vastassuunaline praimer (Fermentas) (Tabel 4).

Reaktsioonid viidi läbi PCR-i masinas järgmistel tingimustel: denaturatsioon 95 °C 20 sekundit, praimerite seondumine 15 sekundit, elongatsioon 60 °C 1 minut. Praimerite seondumistemperatuurid on toodud tabelis 4. Tsükleid korrati 40 korda.

Tabel 4. Sekveneerimisel kasutatud praimerid ja nende seondumistemperatuurid (T_m)

Primeri nimi	Järjestus	T _m (°C)
T3	5´ GTAAAACGACGGCCAGT 3´	52
T7	5´ CAGGAAACAGCTATGAC 3´	50
SEQ1	5´ GTATTACCGCGGCTGCTGG 3´	55
SEQ2	5´ TTGCGCTCGTTGCGGGACT 3´	55
SEQ3	5´ ACGGGCGGTGTGTACAAG 3´	50
SEQ1F	5´ AGCAGCCGCGGTAATACGG 3´	55
SEQ2F	5´ CCGCAACGAGCGCAACCC 3´	55
S4	5´ CCAGGGTATCTAATCC 3´	45

2.1.22 Arvutiprogrammide ja andmepankade kasutamine

Antud uurimistöös kasutati järgmisi programme ja andmebaase:

Blast II NCBI	nukleotiidsete ja aminohappeliste järjestuste homoloogide otsimisel ja reastamisel (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
DNAsis Bioedit	DNA- ja valgujärjestuste analüüsiks
Oligo kalkulaator	Oligote T _m -i leidmiseks (http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html)
Translator	Valgu aminohappelise järjestuse leidmiseks (http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html)
Ribosomal Database Project II (17)	16S rRNA järjestuse reastamiseks bakterite 16S rRNA andmebaasi vastu. (http://rdp.cme.msu.edu/html/)
ORF-finder	DNA järjestuse lugemisaamade leidmiseks (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)

3 Tulemused ja arutelu

3.1 *Pseudomonas mandelii*

Antud uurimustöö tarbeks vajaminevat PHA tootjat ja lagundajat hakati otsima varem poolkoksimägede leoveest Kirde-Eestist isoleeritud pseudomonaadide seast (30). Uuritav tüvi valiti välja teiste PHA⁺ bakterite hulgast PHA sünteesivõime alusel, mida hinnati minimaalsöötmel kasvanud kultuuride värvimisel sudaanmustaga.

Tüve iseloomustamisel saadi järgmised tulemused:

Selekteeritud tüvi on aeroobne gram-negatiivne, liikuv, asporogeenne pulkbakter, mis moodustab ümaraid, siledad ja mittepigmenteerunud kolooniaid. KingB söötmel toodavad rakud fluorestseeruvat pigmenti. Katalaas- ja oksüdaastest on positiivsed, glükoosi kääritamise test negatiivne. Tüvi ei hüdrolüüsi tärklisi ja želatiini ega redutseeri nitraati. Tüvi kasvab 4 ja 37 °C juures, kuid mitte 41 °C juures ega ka mitte kõrges soolakontsentratsioonis (5% ja 7%). Utiliseeritavateks substraatideks on muuhulgas glükoos, fruktoos, ksüloos, tsitraat, sahharoos, trehaloos, suktsinaat, 2-aminoetanol, histidiin, D- ja L-alaniin, tween 80, äädikhape, sipelghape, piimhape, glütserool, atsetaat, fenool ja *parakresool*. Substraadina ei kasutata laktoosi, maltoosi ja tween 40-t. Polühüdrosüalkanoaati toodetakse nii suhkrutest kui rasvhapetest. Rakuväliste proteaaside olemasolu ei tuvastatud. Biolog GN MicroPlate andmetel saadi suurim sarnasus *Pseudomonas corrugata*'ga (60%). Teiste tüvede sarnasus jäi alla 10%.

Uuritava tüve 1461 aluspaari pikkuse 16S rRNA järjestuse võrdlemisel Ribosomal Database Project II andmebaasi järjestustega leiti suurim sarnasus *Pseudomonas mandelii*'ga (99,5%). Kui välja jätta äärmised nukleotiidid, mis on meil sekveerimata (*P. mandelii* täispikk 16S rRNA geen koosneb 1518 bp-st, mida on 57 bp võrra enam kui meil sekveeritud), erinesid kaks järjestust ainult ühe nukleotiidi poolest – *P. mandelii*'l oli 1424. positsioonis G, meie poolt uuritaval tüvel A. Teiste andmebaasis olevate liikide 16S rRNA järjestuses oli erinevusi rohkem.

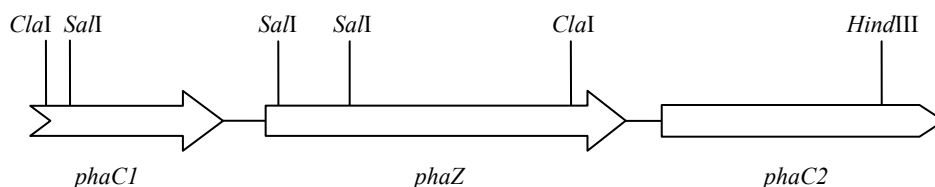
Selekteeritud tüve füsioloogiline profiil on väga sarnane *P. mandelii* kohta avaldatuga. Siiski leidub üks erand- uuritav tüvi ei redutseeri nitraati, kuid *P. mandelii*'d on kirjeldatud nitraatreduktaas positiivsena. Sellele vaatamata viitavad eelkõige

biokeemilised ja geneetilised omadused tugevalt sellele, et meie poolt uuritav tüvi on *P. mandelii*. Seega käsitletakse tüve antud töös kui *Pseudomonas mandelii* PC17.

3.2 Osalise PHA operoni isoleerimine ja kirjeldamine

Kuna PC17-ne PHA operoni isoleerimine *southern* hübridiseerimisel osutus keeruliseks, isoleeriti osaline PHA operon PCR-meetodil, kasutades PHA polümeraaside konserveerunud aladele disainitud primereid Pc-F1 ja PhaC-art-R. Tulemuseks saadi umbes 2400 aluspaari pikkune DNA fragment, mis kloneeriti vastavalt skeemile joonisel 7. Uuritava DNA fragmendi *ClaI-HindIII* restriksiooniga tekkinud 750 ap *ClaI-HindIII* ja 1,4 kap *ClaI-ClaI* fragmendid kloneeriti vektorisse pBluescript II KS. 1,4 kap fragmenti lõigati *SalI* restriktasiga ja subkloneeriti. Kloonid transformeeriti elektroporatsioonil *E. coli* DH5 α -sse ja sekveneeriti vektori universaalprimerite T3 ja T7 abil.

Tüvel PC17 tuvastati klass II PHA operoni struktuur, koosnedes kahest PHA polümeraasi geenist, mida eraldas PHA intratsellulaarse depolümeraasi geen. Selline struktuur on omane kõigile mclPHA-d sünteesivatele pseudomonaadidele (Joonis 5).



Joonis 7. *P. mandelii* PC17 osaline PHA operon.

3.2.1 *Pseudomonas mandelii* PC17 PHA depolümeraas (PhaZ)

Sekveneeritud järjestuse suurim lugemisraam on pikkusega 858 ap. Sellest tuletatud valgu järjestuse pikkus on 285 ah, mis on arvestusliku molekulmassiga 31157 Da. Tuletatud järjestuse võrdlus valkude andmebaasi vastu kinnitas, et uuritav lugemisraam kodeerib PHA depolümeraasi, mis on kõrgelt homoloogne bakterite *Pseudomonas fluorescens*

(95%), *Burkholderia caryophylli* (92%), *Pseudomonas chlororaphis* (91%), ning *Pseudomonas* sp. 61-3 (91%). PhaZ-dega.

Eelpoolmainitud PHA depolümeraasid moodustavad koos veel kümne PhaZ-ga omaette homoloogse rühma, millel ülejäänud seniavaldatud 22 PhaZ-ga homoloogia praktiliselt puudub, ka üksikute domäänide tasemel. Samuti on ülejäänud PhaZ-d umbes 1,7 korda suuremad. Ainuke homoloogia, mis leidub kõikides PhaZ-des, erinevates seriini hüdrolaasides ja ka lipaasides, on lipaas boksi muster (G-X₁-S-X₂-G) (Joonis 8). Järelikult omab eelpoolmainitud homoloogne PhaZ-de rühm (s.h. PC17-ne PhaZ) kas teistsugust domäänsset struktuuri või puudub see tal üldse.

Kuna *Ps. oleovorans*'i ja *Ps. aeruginosa* PhaZ-sid on kirjeldatud intratsellulaarsete ensüümidena, on nähtavasti ka PC17-ne PhaZ rakusisene ensüüm. Seda oletust kinnitavad veel tema vähene sarnasus ekstratsellulaarsete PhaZ-dega (homoloogiat alla 6%) ja signaaljärjestuse puudumine valgu N-terminuses.

PhaZ _{Pma} i	yldygvnaigvswggallaqqfa
PhaZ _{Psp} i	yldygvnvgvswggallaqqfa
PhaZ _{Ppu} i	yldygvsaigvswggallaqqfa
PhaZ _{Pol} i	yldygvnviigvswggallaqqfa
PhaZ _{Pae} i	yldygvnaigvswggallaqqfa
PhaZ _{Pre} i	yldygvsvigvswggallaqqfa
PhaZ _{Pst} e	andanrrfitglssggamalvaa
PhaZ _{Cte} e	niatdqisvsglssggfmanqlg
PhaZ _{Cac} e	kidktqttvsglssggfmavqlh
PhaZ _{Rpi} e	aidpnqvyvaglssgggmtmvlg
PhaZ _{1Ple} e	sidpsrvvyvtglsagafmttvma
PhaZ _{6Ple} e	nidpnqiyisglssgaaethvlg
PhaZ _{Afa} e	ardpnqvyiaglssgasfantta
PhaZ _{Sex} e	qynigstyvsglssggfmanqmh
Hüdrolaas _{ASP}	elgleqvdlvnsfgglalala
Hüdrolaas _{Bha}	dlgveqsivcgyngaliaqlfa
Hüdrolaas _{Dra}	asglrcaplfghslggevifdla
Esteraas _{Ppu}	kmglhnttvighsmgsmtagvla
Peptidaas _{Lde}	qlgldqihllgqswgmlialiyl
Esteraas _{Pae}	aigvrrlhlagnsmgghiaalya
Konsensus	G S G

Joonis 8. Erinevate PhaZ-de ja seriini hüdrolaaside võrdlus konserveerunud lipaas boksi alal. i- intratsellulaarne PhaZ; e- ekstratsellulaarne PhaZ; Pma- *P. mandelii* (märgitud kastiga), Psp- *P. species* 61-3; Ppu- *P. putida*; Pol- *P. oleovorans*; Pae- *P. aeruginosa*; Pre- *P. resinovorans*; Pst- *P. stutzeri*; Cte- *Comamonas testosteroni*; Cac- *C. acidovorans*; Rpi- *Ralstonia pickettii*; Ple- *P. lemoignei*; Afa- *Alcaligenes faecalis*; Sex- *Streptomyces exfoliatus*; Asp- *Acinetobacte* sp.; Bha- *Bacillus halodurans*; Dra- *Deinococcus radiodurans*; Lde- *Lactobacillus delbrueckii*.

3.2.2 *Pseudomonas mandelii* PC17 PHA polümeraasid

Sekveneritud geeniga külgnevate alade homoloogsusotsingu põhjal selgub ootuspäraselt, et *P. mandelii* PC17 *phaZ*-ga külgnevad polühüdrosüalkanoaadi polümeraaside geenid (*phaC1* ja *phaC2*).

Uuritava tüve PHA polümeraaside osalised järjestused (vastavalt 460 ning 672 ap) vastavad ligikaudu ühele kolmandikule senikirjeldatud PHA süntaaside täispikkustest. Osaline *phaC1*-e järjestusest tuletatud valgujärjestus sarnaneb kõige rohkem *P. chlororaphis*'e (90%), *P. fluorescens*'i (88%) ning *Pseudomonas* sp. 61-3 (86%) *PhaC1*-dele. *phaC2*-e järjestusest tuletatud valgujärjestus sarnaneb enim *P. fluorescens*'i (84%), *Pseudomonas* sp. 61-3 (82%) ja *P. chlororaphis*'e (79%) *PhaC2*-ga.

3.3 PHA süntees

Antud uurimustöö üheks eesmärgiks oli kirjeldada *P. mandelii* PC17 PHA sünteesivõimet ja optimeerida PHA sünteesi protokoll. Katseid teostati nii PHA sünteesi indutseerivas lämmastikuvaeses söötmes, kui ka mittelimeerivas mineraalsöötmes.

3.3.1 PHA süntees limiteerivas söötmes

PHA sünteesi jälgimiseks kasvatati rakud eelnevalt üles mittelimeerivates tingimustes 0,2%-lise glükoosi manulusel ja viidi seejärel lämmastikuvaesele glükoosiga söötmele, milles oli 0,4% glükoosi. PHA akumulatsiooni kirjeldamiseks vaadeldi rakkude keskmise diameetri muutust. Katset teostati mitmes korduses, kasutades raku suspensioone, millel olid erinevad nii rakkude algne arvukus kui ka algne diameeter. PHA akumulatsiooni käigus suurenesid söötme optiline tihedus (OD) ja rakkude diameeter võrdeliselt, kuid rakkude arvukus jäi enam-vähem samaks. Maksimaalselt suurenes rakkude keskmine diameeter 1,04-st kuni 1,5 mikromeetrini (andmed mitte näidatud). See tähendab umbes kolmekordset raku ruumala suurenemist. Niiluse punasega värvitud rakkude mikroskoopimine, PHA koguse määramine lüofiliseeritud rakkudest ning metanolüüsitud

biomassi GC-MS analüüsimine näitas, et raku diameeter suurenes koos sünteesitava polümeeri hulgaga. PHA hulk rakkude kuivkaalu kohta oli sõltuvalt süsinikuallikast 62-69% (Tabel 6).

Joonisel 9 on toodud kaks PHA akumulatsiooni katset lämmastik-limiteeritud söötmetes 0,4% glükoosi manulusel. Katsetes erineb rakkude algne arvukus ja algne keskmine diameeter.

Esimesel juhul (A) on tegu eelnevalt M9 minimaalsöötmele üles kasvatatud rakkudega, teisel juhul (B) aga M9-N limiteerivast söötimest ümber külvatud PHA-d sünteesiva kultuuriga.

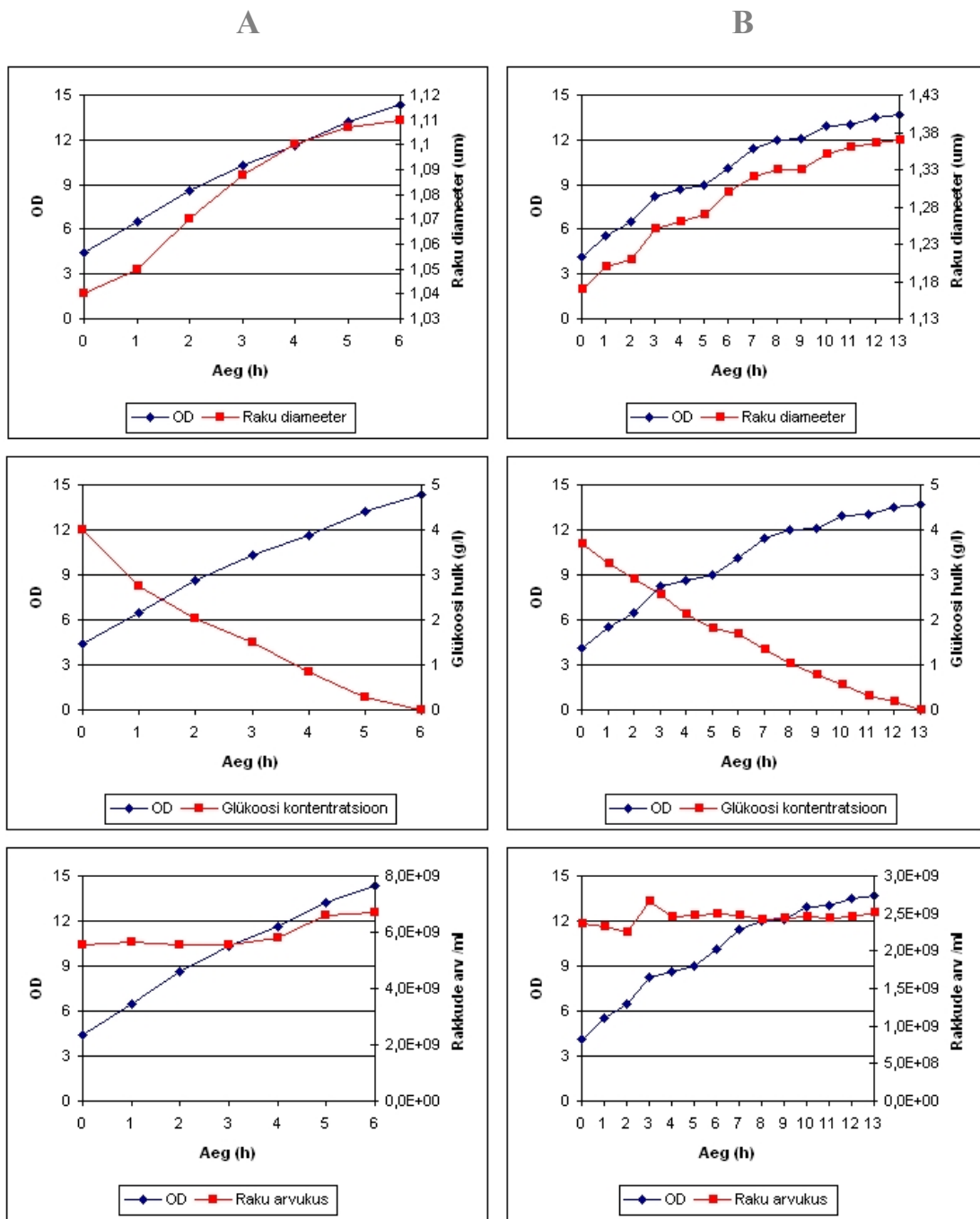
M9 minimaalsöötimest pärit rakkude (A) inokulumi algne OD ja rakkude keskmine diameeter olid vastavalt 4,45 ja 1,04 (μm). Kasvatuse käigus M9-N söötmes tarbiti glükoos 6 tunni jooksul, raku diameeter suurenes 1,11 μm -ni ja OD 14,3-ni. Rakkude arvukus suurenes katse jooksul $5,53 \times 10^9$ kuni $6,8 \times 10^9$ rakku/ml.

Algselt PHA-d sisaldavate rakkude (B) keskmine diameeter ja OD olid vastavalt 1,17 (μm) ja 4,15. Kasvatuse käigus M9-N söötmes tarbiti glükoos 13 tunni jooksul, raku diameeter suurenes 1,37 μm -ni ja OD 13,66-ni. Rakkude arvukus püsis, $2,25 \times 10^9$ ja $2,66 \times 10^9$ rakku/ml vahel.

Katsetulemuste erinevus raku keskmise diameetri kasvu (PHA akumulatsiooni) ja protsessi kestvuse osas on seletatav rakkude algse arvukuste erinevusega. Teise katse puhul (B) oli rakkude arvukus kolm korda väiksem. Nii jagus iga rakule kolm korda enam glükoosi PHA sünteesiks ja kultuuril kulus rohkem aega kogu glükoosi tarbimiseks.

Perioodilistes kultuurides on rakkude algne arvukus ja glükoosi kontsentratsioon olulised optimeerimist nõudvad parameetrid. Kõrgem glükoosi kogus raku kohta suurendab PHA sünteesi hulka, kuid teatud punktist muutub see inhibeerivaks. Väiksema rakkude algne arvukuse juures on võimalik iga raku kohta toota rohkem PHA-d, kuid see võtab rohkem aega.

Tulemustena võib väita, et PHA süntees limiteerivas söötmes on rakujagunemisega mitteseotud protsess. PHA akumulatsiooni tõttu kasvab raku ruumala ja suureneb inokulumi OD.



Joonis 9. Limiteerivates tingimustes inokuleeritud *Pseudomonas mandelii* PC17 optilise tiheduse graafik koos muutustega raku keskmises diameetris, glükoosi kontsentratsioonis ja raku arvukuses kahes PHA sünteesi katses (A ja B).

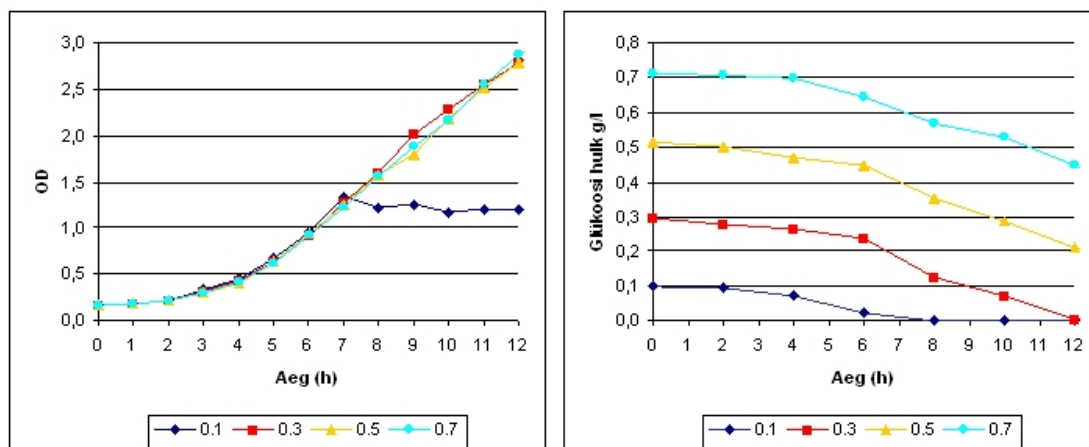
3.3.2 PHA süntees mittelimiteerivas söötmes

Vastupidiselt kirjanduses laialt aktsepteeritud arvamusele, et PHA süntees ei toimu raku jagunemise ajal, leiti Niiluse punasega värvitud rakke mikroskoobiga vaadates, et PC17 akumuleerib PHA-d ka mittelimiteerivas söötmes, olles eksponentsiaalses kasvufaasis (Joonis 11).

Mittelimiteerivas söötmes toimuva PHA sünteesi täpsemaks kirjeldamiseks optimeeriti meetod PHA hulga mõõtmiseks Niiluse punasega värvitud rakkude fluorestsentsi intensiivsuse alusel FACS läbivoolutsütomeetriga.

Katse jooksul vaadeldi värvitud rakke ka fluorestsentsmikroskoobiga. Lisaks mõõdeti söötmete optilisi tihedusi (OD) ja glükoosi kontsentratsioone. PC17-ne kasvuparameetreid jälgiti neljal erineva glükoosi algkontsentratsioonil (1, 3, 5 ja 7 g/l). Hiljem teostatud samalaadses katses mõõdeti ka rakkude arvukust.

Erinevatel glükoosikontsentratsioonidel kasvanud rakud jõudsid eksponentsiaalsesse kasvufaasi üheaegselt, kuid selle pikkus sõltus algselt söötmes olnud glükoosikontsentratsioonist (Joonis 10).

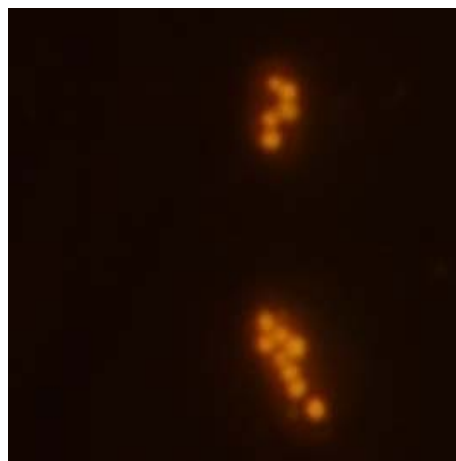
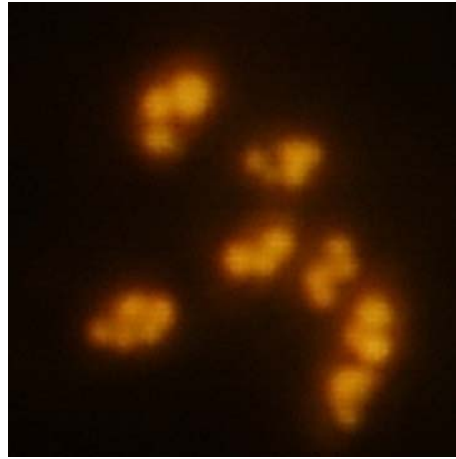
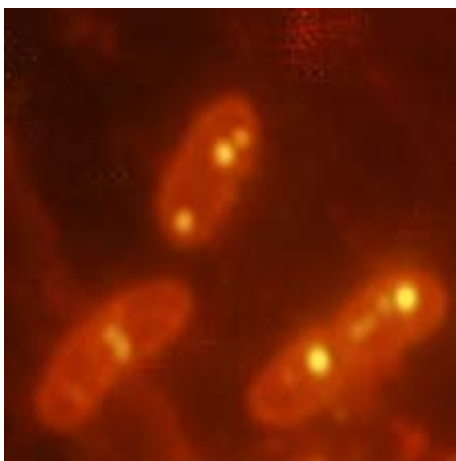
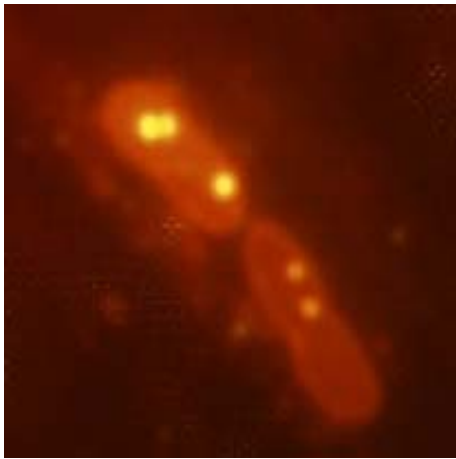
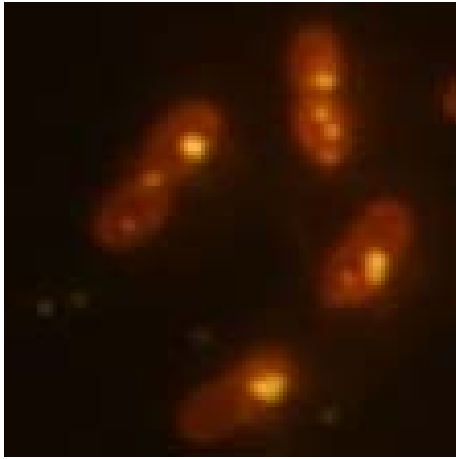


Joonis 10. *P. mandelii* PC17 kasvatused mittelimiteerivas söötmes glükoosi kontsentratsioonidel 0,1; 0,3; 0,5 ja 0,7%. Vasemal graafikul on toodud kultuuride optilise tiheduse ja paremal glükoosi kontsentratsioonide muutus ajas.

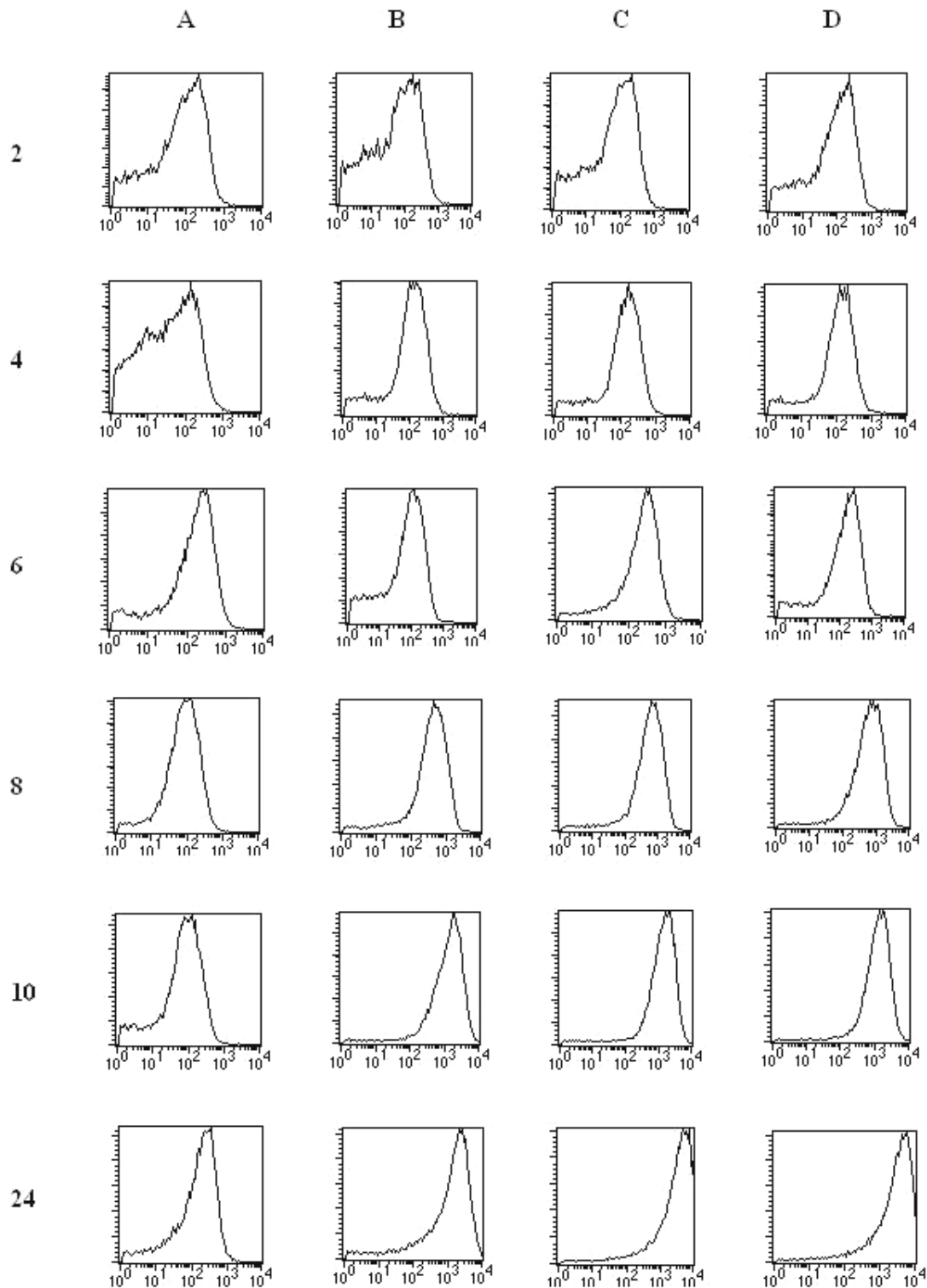
0,1% glükoosiga söötmes jõudsid PC17 rakud statsionaarsesse kasvufaasi umbes 7 tunni jooksul kui glükoos oli ära tarvitatud. Niiluse punasega värvitud rakkude mikroskoobiga vaatlemisel täheldati sel ajal kõikide söötmete rakkudes väikeseid PHA graanuleid, kuid märgatavat PHA sünteesi ei tuvastatud (Joonis 11). Sellegi poolest on ka väheldane PHA süntees nendel tingimustel seni kirjeldamata tulemus.

Kõikide kõrgema glükoosi kontsentratsiooniga söötmetes algas lisaks eelpoolmainitule ulatuslik PHA süntees umbes kuuendal tunnil, eksponentsiaalses kasvufaasis. Kaheksandal tunnil oli rakkude fluorestsents nendes kultuurides suurenenud üle kahe korra, veel 2 tundi hiljem juba 6-10 korda (Joonis 12).

24 tundi pärast söötmete inokuleerimist andsid 0,3%-lise glükoosisöötme rakud umbes 10x tugevana fluorestsentsignaali kui algselt, 0,5 ja 0,7%-lise söötme rakud aga umbes 20x tugevama signaali. See on loogiline, kuna 0,3%-ses söötmes oli selleks ajaks glükoos tarbitud ning PHA metabolismi tasakaal rakus nihkunud PHA lagundamise suunas. 0,5%-ses ja 0,7%-ses söötmes glükoosi veel jagus.

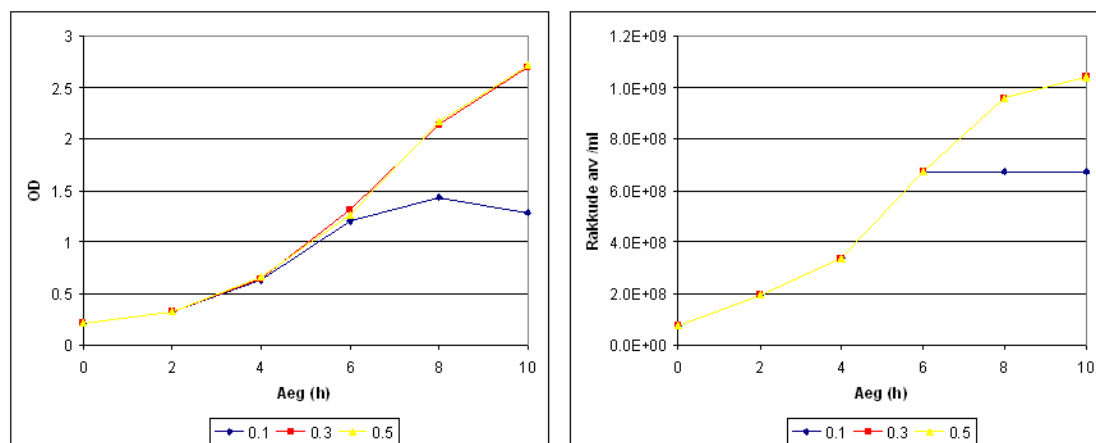


Joonis 11. Niiluse punasega värvitud *P. mandelii* PC17 rakud ja PHA graanulid. Ülemises reas on mittelimeeriva söötme eksponentsiaalse kasvufaasi alguses olevad rakud. Alumises reas on toodud eksponentsiaalse kasvufaasi lõpu ja stacionaarse kasvufaasi rakud. Sellised nägid välja ka limiteerival M9-N söötmel kasvatatud rakud. Rakkude suurendused on piltidel erinevad.



Joonis 12. FACS läbivoolutsütomeetri mõtetulemused Niiluse punasega värvitud PC17 kultuuridest kasvatatuna M9 mineraalsöötmel erinevatel glükoosi kontsentratsioonidel (A=1 g/l; B=3 g/l; C=5 g/l; D= 7 g/l). Vasakus tulbas on toodud söötmete inokuleerimisest möödunud aeg. Iga diagrammi x-telg kirjeldab fluorestsentsi aktiivsust logaritmilises skaalas.

Hiljem teostatud samalaadses katses 0,1%, 0,3% ja 0,5% glükoosiga söötmetega, kus mõõdeti rakkude arvukust täheldati, et rakkude jagunemine PHA sünteesi ajal ei peatunud ning toimus erinevate glükoosi kontsentratsioonidega proovides sarnase kiirusega, kuni süsinikuallikat keskkonnas jätkus (Joonis 13).



Joonis 13. *P. mandelii* PC17 kasvatused mittelimiteerivas söötmes glükoosi kontsentratsioonidel 0,1; 0,3; ja 0,5%. Vasemal graafikul on toodud kultuuride optilise tiheduse ja paremal rakkude arvukuse muutus ajas.

P. mandelii PC17 rakkudes ilmneb mittelimiteerival söötmel, rakkude jagunemise käigus vähesel määral (kuid pidevalt) PHA konstitutiivne süntees. Seega PHA sünteesi ja lagundamise tasakaal on nendes tingimustes veidi nihutatud PHA sünteesi poole. Teatud hetkest eksponentsiaalses kasvufaasis, kui keskkonnas on veel süsinikuallikat, algab *P. mandelii* PC17 tüvel intensiivne PHA süntees, mille tulemusel täituvad rakud mõne tunni jooksul suure hulga PHA graanulitega.

Sellist nähtust, kus looduslik tüvi sünteesib mittelimiteerivates tingimustes PHA-d, ise samaaegselt eksponentsiaalses kasvufaasis jagunedes, ei ole varem kirjeldatud. Hoopis vastpidi- üldlevinud seisukohaks on, et PHA süntees rakkudes on rakujagunemisega mitteseotud protsess mis ilmneb vaid teatud toitainete limitatsiooni korral (5, 41, 60, 83, 98).

Üks võimalus selle nähtuse seletamiseks oleks, et mingi toitainete kontsentratsiooni langus alla teatud piiri, käivitab PHA sünteesimehhanismi. 0,1% glükoosisisaldusega söötme rakud selle piirini lihtsalt ei jõudnud, kuna neil oli selleks ajaks juba glükoos ära tarbitud (Joonis 10).

Kontrollimaks, kas M9 söötme lämmastik võiks eksponentsiaalses kasvufaasis limiteerivaks osutuda ja põhjustada PC17 rakkudes ebatavalist PHA akumulatsiooni, viidi

läbi kasvatused M9 söötmes erinevatel glükoosi kontsentratsioonidel. Ammooniumlämmastiku hulka mõõdeti samal kellaajal kolme päeva jooksul. Nagu näha tabelist 5, ei saa lämmastiku puudus limiteerida bakterikultuuri kasvu selle eksponentsiaalses faasis, kuna inokuleerimisjärgsel päeval on lämmastikku söötmes piisavalt alles. Küll võib aga lämmastiku kontsentratsioon vahemikus 100-160 mg/l olla PHA sünteesi intseerivaks faktoriks PC17-ne puhul.

Tabel 5. Lämmastiku hulga vähenemine tüve PC17 kasvatamisel erinevatel glükoosi algkontsentratsioonidel M9 söötmes, kolme päeva jooksul.

Algne glükoosi hulk söötmes (g/l)	Lämmastiku hulk proovis mg/l		
	Esimene päev	Teine päev	Kolmas päev
2	238	159,6	148,4
4	238	96,6	95,2
6	238	89,6	43,4
8	238	96,6	39,2

3.4 PHA kompositsioon sõltuvalt süsinikuallikast

Tüve PC17 kasvatati limiteerival söötmel, erinevatel süsinikuallika substraatidel, milleks olid nn. *related carbon source*, nagu glükoos ja *non-related carbon source*, nagu heksanoaat ja oktanoaat. Lüofiliseeritud ja metanolüüsitud biomass analüüsiti gaaskromatograaf-mass spektromeetriga (GC-MS). Huvitaval kombel esines kõikides metanolüüsitud biomassiproovides nii sclPHA kui ka mclPHA monomeeride metüülestreid (Tabel 6):

Glükoosil kasvatatud PC17-ne metanolüüsitud biomassis esines valdavalt 3-hüdrosübutüraadi (Met-3-HB), seejärel ka 3-hüdrosüdekanoaadi (Met-3-HD), 3-hüdrosüoktanoaadi (Met-3-HO) ja 3-hüdrosüdodekanoaadi (Met-3-HDD) metüülestreid. Esines ka metüül-3-hüdrosütetradekanoaadi (Met-3-HTD) jälgi. Metüleeritud 3-hüdrosüheksanoaati (Met-3-HH) proovis ei tuvastatud.

Kui substraadina kasutati heksanoaati, oli tulemus veidi homogeensem. Peamiseks 3-hüdroksühappe metüülestriks oli taas Met-3HB, seejärel aga Met-3HH, ülejäänud C8-C12 metüülestreid esines minimaalses koguses.

Oktanoaadil kasvatatud PC17-ne matanolüüsitud biomassis leidis enim Met-3HO-d, seejärel Met-3HB-d, Met-3HH.

Tabel 6. *P. mandelii* PC17 PHA hulk rakkude kuivkaalust ja koostis sõltuvalt süsinikallikast.

Substraat	PHA hulk rakkude kuivkaalus (%)	PHA monomeerne koostis (mol%)				
		3HB	3HH	3HO	3HD	3HDD
Glükoos	65	87,1	-	3,6	8,9	0,4
Heksanoaat	69	56,5	41,5	0,9	0,6	0,5
Oktanoaat	62	16	4	80	-	-

3HB- 3-hüdroksübutüraat, 3HH- 3-hüdroksüheksanoaat, 3HO- 3-hüdroksüoktanoaat, 3HD- 3-hüdroksüdekanoaat, 3HDD- 3-hüdroksüdekanoaat

Tegu on märkimisväärse tulemusega, kuna pseudomonaade, kes suudavad sünteesida nii scl kui ka mclPHA segu on kirjeldatud vaid mõni üksik. Neid, kes suudavad seda teha nii *related* süsinikuallikatest kui ka *non-related* süsinikuallikatest on veelgi vähem (vt. “Pseudomonaadide klassifikatsioon PHA akumulatsiooni alusel”). Täiesti omapärane on ka 3HB monomeeride nii suur osakaal kõikides analüüsitud proovides. SclPHA süntees ei ole pseudomonaadidele omane ja seda on kasutatud lausa taksonoomilise tunnuseks.

Kuna PHA osakaal moodustas limiteerivas söötmes kasvatatud rakkude kuivkaalust märkimisväärse osa (62-69%) (Tabel 6), sai lüofiliseeritud biomassi füüsikaliste omaduste alusel ennustada selles oleva PHA kompositsiooni. Glükoosist sünteesitud PHAd sisaldav biomass oli rabe ja pulbristus käitlemisel. Selle tingis kristalliliste omadustega PHB, mida oli lüofiliseeritud biomassis üle 50%. PHO on aga elastomeer ja kuna ta moodustas oktanoaadil kasvanud rakkude kuivkaalust ligi poole, oli lüofiliseeritud biomass kummjas ja elastne. Heksanoaadil kasvanud lüofiliseeritud biomassi plastilised omadused olid midagi vahepealset, meenutades rabadat kummi.

3.5 *P. mandelii* PC17 klassifitseerimine PHA sünteesi alusel

Käesolevas uurimustöös oleme pseudomonaade klassifitseerinud nende poolt sünteesitud polümeeri ja selleks kasutatud süsinikuallika tüüpide alusel (vt. Kirjanduse ülevaade).

Kuna antud tüvi suutis sünteesida nii sel kui ka mclPHA-d ja seda nii *related* kui ka *non-related* süsinikuallikatest, klassifitseerub ta kolmanda grupi *Pseudomonas* sp. 61-3 rühma. Koos *Pseudomonas* sp. 61-3, *Pseudomonas* sp. GP4BH1-e ja *Pseudomonas* sp. A33-ga esindab *P. mandelii* PC17 PHA metabolismi mõttes kõige tavatumat pseudomonaadide rühma.

3.6 *P. mandelii* PC17 PHA metabolism

PHA sünteesi uurimist saab kasutada ühe vahendina kirjeldamiseks bakteri metabolismi iseärasusi, kuna PHA monomeerne koostis kajastab rakusiseseid süsinikuvoogusid (60). PHA koostise ja substraadispetsiifika alusel saab eeldada ka teatud PHA metabolismiga seotud ensüümide ekspressiooni uuritavas tüves. Tõenäoliselt kasutab PC17 PHA sünteesiks kõiki peamisi PHA-ga seotud sünteesiradu: rasvhapete β -oksüdatsioon, rasvhapete *de novo* biosüntees ja klassikaline PHB sünteesirada PHA metabolismi detailne skeem on toodud joonisel 14.

Glükoos metaboliseeritakse rakus püruvaadiks ja edasi konverteeritakse atsetüül-CoA-ks. PC17 puhul viiakse osa sellest PHB, teine osa aga mclPHA koostisesse. MclPHA sünteesitakse läbi rasvhapete *de novo* biosünteesiraja (RBS), kus 3-hüdroksüatsüül-ACP:CoA transferaas (PhaG) vahendab 3-hüdroksüatsüül-ACP molekulide ülekannet vastavateks CoA-derivaatideks, mis lülitatakse PHA koostisesse. Tüve PC17 puhul on eelistatud 10-süsinikulused ACP derivaadid, kusjuures 3-hüdroksüheksanoati PHA koostisesse nendel tingimustel ei lülitata (Tabel 6).

3-hüdroksübutüraat jõuab PHA koostisesse tõenäoliselt läbi klassikalise PHB raja (Joonised 3 ja 14). 3HB saab pärineda RBS rajast juhul, kui malonüül-ACP kondenseeritakse atsetüül-ACP-ga ja 3-hüdroksübutüürüül-ACP muudetakse esimesel tsüklil PhaG vahendusel PHB polümeraasi substraadiks.

Kuna heksanoaadist lülitub polümeeri koostisesse peale 3HB monomeeride ka 8,10 ja 12 süsinikulisi 3-hüdroksühappeid, on PHA sünteesil olnud kaasatud *de novo* rasvhapete sünteesirada. 3HB-CoA molekulid võivad siin PHA süntaasini jõuda kolmel võimalikul viisil: 1) läbides rasvhapete lagundamisrajas ühe ringi, 2) klassikalist PHB sünteesirada pidi või 3) rasvhapete *de novo* biosünteesirajast eelpool mainitud viisil.

Kui substraadiks on oktanoaat, suunatakse tõenäoliselt sellest enamus läbi rasvhapete β -oksüdatsiooni raja otse PHA koostisesse enne atsetüül-CoA eraldamist. Ülejäänust väiksem osa teeb tsükli ühe ringi ja viiakse PHA koostisesse 3-hüdroksüheksanoaadina, suurem osa metaboliseeritakse aga asetüül-CoA molekulideks ja suunatakse sealt edasi PHB koostisesse. Ka siin ei saa välistada rasvhapete *de novo* biosünteesirada

Tõenäoliselt viiakse enamus substraadiks olnud rasvhapete molekule PHA koostisesse otse β -oksüdatsiooni tsüklist. Kui need oleks lagundatud atsetüül-CoA molekulideks ja suunatud PHA koostisesse hoopis läbi RBS raja, ei saaks PHA monomeerid ja substraadiks olnud rasvhappe struktuur nii palju sarnaneda. Sellisel juhul pidanuks enamus asetüül-CoA molekule olema konverteeritud 3HB-ks, nagu see oli glükoosi puhul.

Heksanoaati kasutades viiakse tõenäoliselt väike osa substraadiks olnud rasvhappe süsinikust PHA koostisesse ka üle β -oksüdatsiooni ja atsetüül-CoA ning läbi *de novo* biosünteesi raja, kuna polümeeri koostises esines heksanoaadist 2, 4 ja 6 süsiniku võrra pikemad monomeere (Tabel 6).

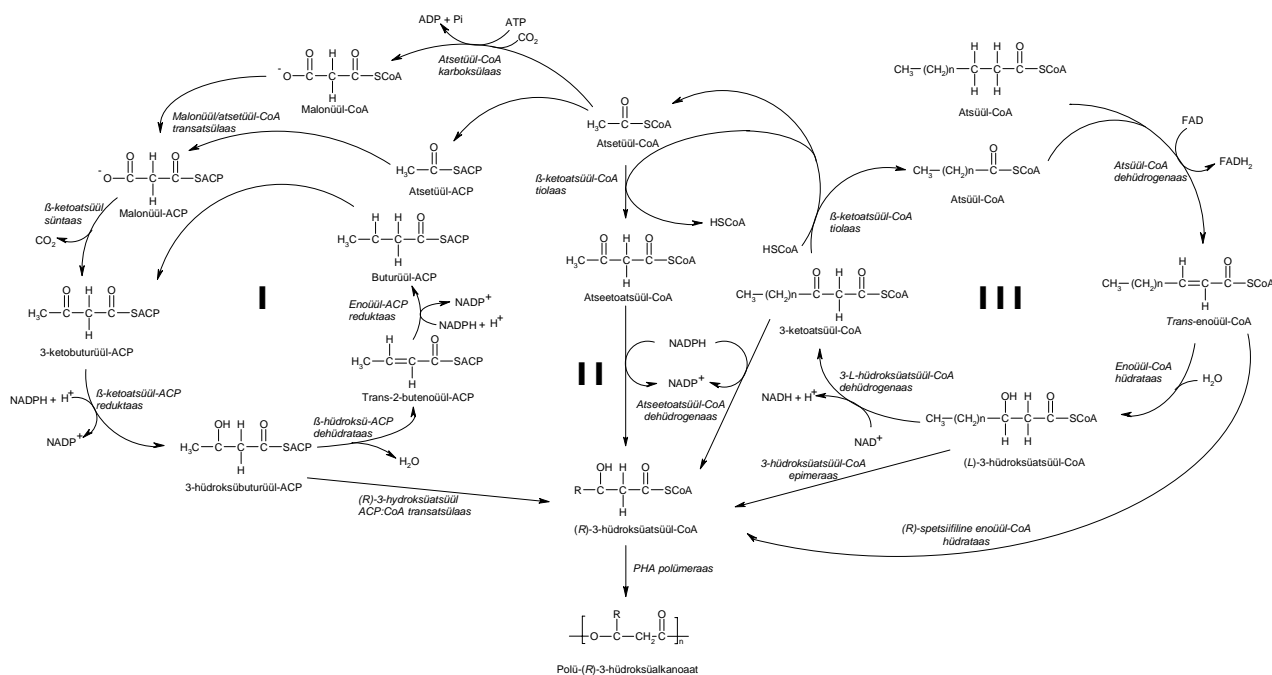
Usutavasti viiakse PHB klassikalise biosünteesi raja kaudu PHA koostisesse ka 3HB-st pikema monomeeri ahelaga 3HA-sid. Sellisel juhul redutseeritakse β -oksüdatsioonitsüklist pärit atseetoatsüül-CoA molekul atseetoatsüül-CoA dehüdrogenaasi poolt otse vastavaks 3-hüdroksüatsetüül-CoA-ks või liidetakse talle eelnevalt veel β -ketoatsüül-CoA tiolaasi poolt atstüül-CoA molekul.

Samas võib püstitada ka hüpoteesi, et PC17-1 klassikalist PHB sünteesirada ei esinegi ja kõik atsetüül-CoA molekulid on 3HB-ks konverteeritud ainult läbi RBS-raja. See eeldaks aga PhaG spetsiifilist afiinsust 3HB-APC molekulide suhtes, sest 87,1% glükoosist sünteesitud PHAst oli sclPHA koosnedes 3HB monomeeridest (Tabel 6). Kirjanduse andmetel vahendab PhaG pseudomonaadises aga mclPHA sünteesi (20, 31, 60, 78). Eelnevat hüpoteesi saaks kontrollida mitmel viisil: RBS-rada või PhaG-d blokeerides või klassikalise PHB raja geene (*phaA* ja *phaB*) geene otsides.

PC17-1 on teiste pseudomonaadidega võrreldes mitmekülgne PHA sünteesi mehhanism. Tõenäoliselt on selleks üheaegselt kaasatud nii rasvhapete β -oksüdatsiooni, *de novo* biosünteesi kui ka klassikalise PHB sünteesi rajad.

PHA heterotüüpsuse tõttu peavad PC17-1 esinema PHA sünteesi võtmeensüümidenä nii scl- kui ka mclPHA spetsiifilised polümeraasid.

Kuna glükoosist sünteesitakse ka mclPHA-d, peab PC17-1 olema ka PHA süntaasi ja RBS-rada ühendav 3-hüdroksüatsüül-ACP:CoA transferaas või analoogne süsteem. Eelpoolmainitud arutelule toetudes peab PC17-1 esinema ka vähemalt üks β -oksüdatsiooni vaheprodukte PHA polümeraasile vahendav rada.



Joonis 14. PHA peamised sünteesirajad: I- Rasvhapete *de novo* biosüntees; II- Rasvhapete β -oksüdatsioon; III- PHB klassikaline sünteesirada ehk ahela pikendamise rada (*chain elongation pathway*).

3.7 PHA metabolismi analüüsimise meetodika

Antud uurimustöö raames on toimunud pidev PHA metabolismi analüüsimise meetodika väljatöötamine ja optimeerimine.

Kõigepealt leiti optimaalseim PHA eraldusviis, arvestades eelkõige saadava PHA fraktsiooni puhtust ja saagist (62). Vastavalt meetodikale saab muuta PHA füüsikalisi tingimusi: koroformis lahustunud PHAst lahusti ära aurutamise teel saadud PHA kile on oluline polümeeri biofüüsikaliste omaduste hindamisel; metanooliga sadestamisel saadud PHA pulber sobib süsinikuallikaks söötmete valmistamiseks.

Kirjandusandmetele toetudes töötati välja PHA GC-MS analüüsimeetod. Sellele eelnes polümeeri lagundamine derivatiseerimise teel happelises keskkonnas.

Algselt kasutati PHA graanulite tuvastamiseks nende värvimist sudaanmustaga. Tunduvalt efektiivsemaks osutus aga PHA värvimine Niiluse punasega. Niiluse punast tardsöötmele lisades on võimalik *in vivo* selekteerida kolooniaid nende PHA sünteesivõime alusel. Erinevalt sudaanmustast seondub Niiluse punane otseselt PHA-ga ja tulemus on fluorestsentsmikroskoobis tunduvalt täpsemalt interpreteeritav. Seda arvesse võttes optimeeriti ka PHA akumulatsiooni analüüsimismetoodika FACS-iga, mõõtmaks PHA hulga muutusi rakus. Enne seda oli kasutuses kaudsem meetod - rakkude keskmise diameetri mõõtmine.

Tulevikus on plaanis PHA metabolismi uurimida ka geeniekspressiooni ja valgu tasandil ning alustada ka (*R*)-3-hüdroksüalkanoaatide tootmise meetoodika väljatöötamist.

3.8 Võimlaik väljund PHA plasti valmistamisel

PHA on looduslik kopolümeer, mille omadused sõltuvad tema monomeeride struktuurist, nende vahekorrast ja PHA molekulmassist. PHA füüsikalise-keemiliste omaduste modifitseerimiseks tuleb geenteeniliste meetoditega muuta produktsiooni geeniregulatsiooni ja kasutada rangelt defineeritud söötmeid. Praktikas on see väga teadusmahukas ja kallis ettevõtmine.

Alternatiivne variant kopolümeeride tootmiseks on eelnevalt valmistada mono- või oligohomomeerid, need siis soovitud vahekorras kokku segada ning repolümeeriseerida. Sellise meetodiga saab luua väga erinevaid defineeritud struktuuriga PHA-sid. *in vitro* blokk-süntees võimaldab PHA ahelatesse liita ka mitte-PHA järjestusi, kui neis on karboksüül- ja hüdroksüülrühm (näiteks polülaktaat, polüetüleenglükool). Ka PHA ahelate pikkust saab sellel meetodil reguleerida. Nii suureneks PHA-plasti omaduste varieerimise võimalus veelgi.

PHA tootmiseks tuleb eelnevalt uurida PHA sünteesimehhanismi. Antud uurimustöös kasutatud tüvi sobib selleks ideaalselt, kuna erinevalt valdavast enamusest teistest bakteritest, on ta võimeline tootma eritüüpse PHA segu ja seda nii suhkrutest kui rasvhapetest. See tähendab, et PC17 on varustatud mitmekesise PHA sünteesiaparaadiga. Hüdroksüalkanoaatide saamiseks tuleb PHA depolümeerida. Valides sobivaid ensüüme ja tingimusi, saab toota PHA monomeere, oligomeere või erineva suurusega PHA blokke. Protsessi efektiivsus tõuseks depolümeraaside sidumisel kolonnidesse. PhaZ-de tundmaõppimine on oluline ka erinevate PHA-plastide biolagunemisomaduste väljaselgitamisel ja PHA tootmise optimeerimisel.

Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli ühe suure protsessiivsusega polühüdrosüalkanoaadi (PHA) tootja iseloomustamine ning tema PHA metaboolse süsteemi kirjeldamine. Tüvi iseloomustati geneetilise, biokeemiliste ja füsioloogiliste tunnuste põhjal. PHA metabolismi uurimiseks selgitati kõigepealt uuritava tüve PHA operoni struktuur ja teostati seejärel PHA depolümeraasi ning sellega külgnevate alade järjestuste võrdlusanalüüs. Viidi läbi bakterite PHA sünteesi multiparameetiline analüüs limiteerivas ja mittelimitteerivas söötmes. PHA metabolismi kirjeldamiseks analüüsiti erinevatel substraatidel sünteesitud PHA hulka kuiva biomassi kohta ja selle monomeerset koostist. Kokkuvõttes oleksid käesoleva uurimustöö tulemused järgmised:

- Geneetilise, biokeemiliste ja füsioloogiliste tunnuste kõrvutamisel identifitseeriti PC17 tüvi antud uurimustöös kui *Pseudomonas mandelii*.
- PC17-l on pseudomonaadidele iseloomulik klass II tüüpi PHA operon, mis koosneb kahest PHA polümeraasi geenist (*phaC*) ja neid eraldavast PHA depolümeraasi geenist (*phaZ*).
- Tüve PC17 PHA depolümeraasi nukleotiidsest järjestusest tuletatud valgujärjestus moodustas teiste senikirjeldatud rakusiseste depolümeraasidega homoloogse rühma, sarnanedes enim *Pseudomonas fluorescens*'i (95%), *Burkholderia caryophylli* (92%), *Pseudomonas chlororaphis*'e (91%), ning *Pseudomonas* sp. 61-3 (91%) PHA depolümeraasidele. Rakuväliste PhaZ-dega esines homoloogiat vaid lipaas boksi alas. Tüve PC17 PHA depolümeraas on tõenäoliselt rakusisese aktiivsusega ensüüm.
- PHA süntees lämmastikuaeses söötmes on rakujagunemisega mitteseotud protsess. PHA akumulatsiooni käigus suureneb võrdeliselt PHA hulgaga rakkude diameeter. PC17-ne poolt toodetud PHA osakaal kuiva bakteribiomassi kohta oli sõltuvalt süsinikusubstraadist 62-69%.
- PC17-l toimub PHA süntees ka mittelimitteerivas söötmes rakkude jagunemise käigus. See on erinev üldlevinud seisukohast, et PHA süntees ei ole rakkude jagunemisega seotud ja et see toimub vaid limiteerivates tingimustes.

- PC17 aktsepteerib PHA sünteesiks süsinikusubstraadina nii *related* kui ka *non-related* süsinikallikaid. Mõlemaist substraaditüübist sünteesitakse lühikese ja keskmise monomeeriahela pikkusega PHA heteropolümeeri.
- PHA sünteesi substraadispetsiifika ja PHA monomeeride tüübi alusel lahterdub PC17 kolmandasse pseudomonaadide gruppi, esindades PHA metabolismi mõttes kõige tavatumat ja harvaesinevamat pseudomonaadide rühma.
- PC17 kasutab PHA sünteesiks tõenäoliselt kõiki peamisi PHA-ga seotud sünteesiradu: rasvhapete β -oksüdatsiooni, rasvhapete *de novo* biosünteesi ja klassikalist PHB sünteesirada ning ka vastavaid ensüüme, mis vahendavad PHA monomeeride prekursorimolekule PHA polümeraasile. Uuritav tüvel esinevad nii lühikese- kui ka keskmise ahela pikkusega PHA spetsiifilised süntaasid ja depolümeraas(id).
- Käesoleva uurimustöö raames on välja töötatud PHA metabolismi uurimise metoodika: optimeeritud on PHA tootmise ja eraldamise protokollid, välja on arendatud PHA sünteesi jälgimise ja mõõtmise meetodid ning kirjanduse abil on lahendatud ka PHA monomeerse koostise analüüsimise küsimus.

Andmete süntees ja perspektiivid

Käesoleva magistritöö objektiks on väga huvitavate omadustega bakter, olles tänuväärseks materjaliks edaspidisel PHA metabolismi uurimisel. Seda ennekõike kolmel põhjusel:

Esiteks esindab ta PHA metabolismi mõttes kõige tavatumat pseudomonaadide rühma, sünteesides lühikese ja keskmise monomeeriahela pikkusega PHA segu ning seda nii *related* kui ka *non-related* süsinikallikatest. Täiesti omapärane on ka uuritava tüve poolt sünteesitud PHA monomeeri tüüpide vahekord kõikides analüüsitud proovides. Nimelt ei ole lühikese monomeeriahela pikkusega PHA pseudomonaadidele üldse omane ja seda on kasutatud lausa taksonoomilise tunnuseks (7, 38, 44).

Teiseks on antud tüvi täiesti omapärane oma võime poolest sünteesida PHA-d ka mittelimitereivates tingimustes, kuna on üldlevinud seisukoht, et PHA süntees käivitub siis, kui keskkonnas on piisavalt süsinikku, kuid napib mõnda teist toitainet (N, O, P, S) (5, 41, 60, 83, 98).

Kolmandaks on *P. mandelii* PC17 näol tegu ka märkimisväärse PHA tootjaga (üle 60% raku kuivmassist). Antud uurimustöö autor on arvamusel, et PHA hulka raku kuivmassis on PHA sünteesiprotsessi optimeerides võimalik veelgi tõsta.

Edaspidi on plaanis välja selgitada *P. mandelii* PC17-l mittelimitereivas söötmes esineva PHA sünteesi põhjused. Kavandame PHA prekursorimolekulide voogude uurimist metabolismiradasid blokeerides, näiteks keruleniini ja akrüülhappega, mis blokeerivad vastavalt rasvhapete *de novo* biosünteesi raja ja rasvhapete β -oksüdatsiooni raja (60). Soovime välja selgitada, kas scl-mclPHA sünteesi ja hüdrolyüüsi eest vastutavad üks universaalne PHA süntaas ja PHA depolümeraas või on neid *P. mandelii* PC17 genoomis mitu. Peale selle on plaanis PHA metabolismi geenide ekspressioonialnalüüs *real-time* PCR-iga – huvitaval kombel pole seda kirjanduses peaaegu mainitud. Kavas on ka katseid valgu tasandil.

Kaugemas perspektiivis näeme (*R*)-3-hüdroksüalkanoaadi mono- di- ja oligomeeride tootmist ja kasutamist biodegradeeruva plasti valmistamisel ning selle omaduste muutmisel.

Antud uurimustöö tulemused on vormistamisel kaheks teadusartiklikuks.

Summary

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are widely spread bacterial storage materials synthesised in the limitation of vital elements such as nitrogen, phosphor, sulphur and/or oxygen. These simple aliphatic polyesters are accumulated as intracellular inclusion bodies, which, after the limitation, are depolymerised and used as sources of carbon and energy,

PHAs are classified as short-chain-length PHAs (comprising of 3 to 5 carbons per monomer) and medium-chain-length PHAs (comprising of 6 to 14 carbons per monomer). Scl-PHA is very abundant, while mcl-PHA is almost exclusively produced only by pseudomonads.

Since PHAs have thermoplastic properties, they are potential environmentally friendly plastics, which, compared to commonly used petroplastics, are made of redux material and are completely biodegradable. Due to the variety of their physiochemical properties, scl-mclPHA heteropolymers have especially high potential.

PHA synthesis is connected with bacterial central metabolic system, where the precursors of PHA monomers- 3-hydroxy fatty acid CoA-thioesters are derived from. PHA metabolism is an equilibrium between PHA synthesis and intracellular degradation.

The aim of present work was to characterize a pseudomonas strain PC17 and to investigate its PHA metabolic system. This included the characterization of PHA synthesis conditions, the characterization of PHA monomer composition and its dependence on carbon sources used in media. For future analyses, PHA operon structure was to be characterized with the isolation PHA depolymerase. Additional task was to choose and optimise methods for investigation of PHA metabolism.

Conclusions based on the experiments described in this paper are as following:

- By its genetic, biochemical and physiological characteristics, strain PC17 used in current study was identified as *Pseudomonas mandelii*.
- PC17 has a pseudomonas-specific class II PHA operon, consisting of two PHA polymerase genes (*phaC*) separated by PHA depolymerase gene (*phaZ*).
- The *phaZ* of PC17 is 858 base pairs long and codes a 285 amino acids long peptide (deduced molecular weight is 31157 Da), which showed highest homology to the PhaZ-s of *Pseudomonas fluorescens* (95%), *Burkholderia caryophylli* (92%), *Pseudomonas chlororaphis* (91%), and *Pseudomonas* sp. 61-3 (91%). No homology with extracellular PhaZ-s was found, except for conserved lipase box

residue. This all assumes, that the isolated gene encodes probably an intracellular PHA depolymerase.

- PHA synthesis in nitrogen-limited media is a non-growth associated process. During PHA synthesis, cell size enlarged on behalf of accumulated PHA. Amount of PHA per dry cell weight was 65-69%
- PC17 is also able to accumulate PHA during growth in non-limiting media in exponential growth phase.
- PC17 synthesises scl- and mcl-PHA heteropolymer from both, related and non-related carbon sources.
- By the classification of pseudomonads based on PHA accumulation properties, PC17 belongs to the 3rd class, being the rare case of pseudomonas, which is able to synthesise both scl- and mcl-PHA, from related and non-related carbon sources.
- For PHA synthesis, PC17 probably uses all three main PHA-involved pathways: fatty acid β -oxydation, fatty acid *de novo* biosynthesis and chain elongation pathway and the respective enzymes that derive PHA monomer precursors to PHA polymerases. Additionally, PC17 has scl and mcl specific PHA polymerases and depolymerase(s).
- As one aim of this study, methods for investigating PHA metabolism were optimised: PHA production and extraction from cells, observing and measuring PHA synthesis in cells and PHA monomer content analyses.

Kasutatud kirjandus

1. Abe H, Doi Y. 1999. Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers. *Int J Biol Macromol* 25: 185-92.
2. Abe H, Doi Y, Fukushima T, Eya H. 1994. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. 61-3. *Int J Biol Macromol* 16: 115-9
3. Adams MH. 1959. Bacteriophages. 445-7.
4. Aldor IS, Keasling JD. 2003. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr Opin Biotechnol* 14: 475-83
5. Anderson AJ, Dawes EA. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev* 54: 450-72
6. Anderson AJ, Haywood GW, Dawes EA. 1990. Biosynthesis and composition of bacterial poly(hydroxyalkanoates). *Int J Biol Macromol* 12: 102-5
7. Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 4: 1563-89
8. Beachop T, Elsdon SR. 1960. The growth of microorganism in relation of their energy supply. *J Gen Microbiol* 23: 469-47.
9. Behrends A, Klingbeil B, Jendrossek D. 1996. Poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases bind to their substrate by a C-terminal located substrate binding site. *FEMS Microbiol Lett* 143: 191-4.
10. Boynton ZL, Koon JJ, Brennan EM, Clouart JD, Horowitz DM, et al. 1999. Reduction of cell lysate viscosity during processing of poly(3-hydroxyalkanoates) by chromosomal integration of the staphylococcal nuclease gene in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 65: 1524-9.
11. Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller RC. 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of new poly(3-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Applied & Environmental Microbiology* 54: 1977-82
12. Brandl H, Knee EJ, Jr., Fuller RC, Gross RA, Lenz RW. 1989. Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly (beta-hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. *Int J Biol Macromol* 11: 49-55
13. Budwill K, Fedorak PM, Page WJ. 1992. Methanogenic degradation of poly(3-hydroxyalkanoates). *Appl Environ Microbiol* 58: 1398-401.
14. Choi JI, Lee SY. 1999. High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 65: 4363-8.
15. Choi MH, Yoon SC, Lenz RW. 1999. Production of poly(3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid) and poly(4-hydroxybutyric acid) without subsequent degradation by *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Appl Environ Microbiol* 65: 1570-7.
16. Chowdhury B, John ME. 1998. Thermal evaluation of transgenic cotton containing polyhydroxybutyrate. *Therm Acta* 313: 43-53.
17. Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, et al. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* 31: 442-3

18. Deretic V, Schurr MJ, Boucher JC, Martin DW. 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J Bacteriol* 176: 2773-80.
19. Fidler S, Dennis D. 1992. Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 9: 231-5.
20. Fiedler S, Steinbuchel A, Rehm BH. 2000. PhaG-mediated synthesis of Poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of medium-chain-length constituents from nonrelated carbon sources in recombinant *Pseudomonas fragi*. *Appl Environ Microbiol* 66: 2117-24
21. Foster LJ, Lenz RW, Fuller RC. 1994. Quantitative determination of intracellular depolymerase activity in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing poly-3-hydroxyalkanoates with long alkyl substituents. *FEMS Microbiol Lett* 118: 279-82.
22. Foster LJ, Stuart ES, Tehrani A, Lenz RW, Fuller RC. 1996. Intracellular depolymerase and polyhydroxyoctanoate granule integrity in *Pseudomonas oleovorans*. *Int J Biol Macromol* 19: 177-83.
23. Fukui T, Doi Y. 1997. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J Bacteriol* 179: 4821-30
24. Fukui T, Shiomi N, Doi Y. 1998. Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. *J Bacteriol* 180: 667-73.
25. Garrett RH, Grisham CM. 2000. Biochimie. *Ann Biol Clin (Paris)* 58: 767-8
26. Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100: 965-73
27. Hang X, Lin Z, Chen J, Wang G, Hong K, Chen GQ. 2002. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* YS1. *FEMS Microbiol Lett* 212: 71-5
28. Haywood GW, Anderson AJ, Williams DR, Dawes EA, Ewing DF. 1991. Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126. *Int J Biol Macromol* 13: 83-8
29. Heinaru E, Talpsep E. 1998. Mikrobioloogia praktikum.: 14, 9.
30. Heinaru E, Truu J, Stottmeister U, Heinaru A. 2000. Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol- degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiol Ecol* 31: 195-205.
31. Hoffmann N, Steinbuchel A, Rehm BH. 2000. Homologous functional expression of cryptic phaG from *Pseudomonas oleovorans* establishes the transacylase-mediated polyhydroxyalkanoate biosynthetic pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 665-70
32. Hoffmann N, Steinbuchel A, Rehm BH. 2000. The *Pseudomonas aeruginosa* phaG gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. *FEMS Microbiol Lett* 184: 253-9.
33. Hong K, Chen GQ, Yu PH, Zhang G, Liu Y, Chua H. 2000. Effect of C:N molar ratio on monomer composition of polyhydroxyalkanoates produced by *Pseudomonas mendocina* 0806 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* YS1. *Appl Biochem Biotechnol* 84-86: 971-80

34. Hong K, Leung YC, Kwok SY, Law KH, Lo WH, et al. 2000. Construction of recombinant *Escherichia coli* strains for polyhydroxybutyrate production using soy waste as nutrient. *Appl Biochem Biotechnol* 84-86: 381-90.
35. Hugh R, Leifson E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J Bacteriol* 66: 24-6
36. Huijberts GN, de Rijk TC, de Waard P, Eggink G. 1994. ¹³C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *J Bacteriol* 176: 1661-6
37. Huijberts GN, Eggink G, de Waard P, Huisman GW, Witholt B. 1992. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl Environ Microbiol* 58: 536-44
38. Huisman GW, de Leeuw O, Eggink G, Witholt B. 1989. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* 55: 1949-54
39. Jaeger KE, Steinbuchel A, Jendrossek D. 1995. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyze poly(omega-hydroxyalkanoates). *Appl Environ Microbiol* 61: 3113-8.
40. Jendrossek D, Frisse A, Behrends A, Andermann M, Kratzin HD, et al. 1995. Biochemical and molecular characterization of the *Pseudomonas lemoignei* polyhydroxyalkanoate depolymerase system. *J Bacteriol* 177: 596-607.
41. Jendrossek D, Handrick R. 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol* 56: 403-32
42. Kasuya K, Inoue Y, Tanaka T, Akehata T, Iwata T, et al. 1997. Biochemical and molecular characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase of *Comamonas acidovorans* YM1609, isolated from freshwater. *Appl Environ Microbiol* 63: 4844-52.
43. Kasuya K, Ohura T, Masuda K, Doi Y. 1999. Substrate and binding specificities of bacterial polyhydroxybutyrate depolymerases. *Int J Biol Macromol* 24: 329-36.
44. Kessler B, Palleroni NJ. 2000. Taxonomic implications of synthesis of poly-beta-hydroxybutyrate and other poly-beta-hydroxyalkanoates by aerobic pseudomonads. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 2: 711-3
45. Kessler B, Witholt B. 2001. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J Biotechnol* 86: 97-104.
46. Kim YB, Lenz RWaF, R.C. 1992. Poly(beta-hydroxyalkanoate) copolymers containing brominated repeating units produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules* 25: 1852-7
47. King EO, Ward MK, Raney DE. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* 44: 301-7
48. Kita K, Ishimaru K, Teraoka M, Yanase H, Kato N. 1995. Properties of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from a marine bacterium, *Alcaligenes faecalis* AE122. *Appl Environ Microbiol* 61: 1727-30.
49. Kita K, Mashiba S, Nagita M, Ishimaru K, Okamoto K, et al. 1997. Cloning of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from a marine bacterium, *Alcaligenes faecalis* AE122, and characterization of its gene product. *Biochim Biophys Acta* 1352: 113-22.
50. Klinke S, Dauner M, Scott G, Kessler B, Witholt B. 2000. Inactivation of isocitrate lyase leads to increased production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 66: 909-13.

51. Klinke S, Ren Q, Witholt B, Kessler B. 1999. Production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 65: 540-8.
52. Koosha F, Muller RH, Davis SS. 1989. Polyhydroxybutyrate as a drug carrier. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 6: 117-30
53. Kranz RG, Gabbert KK, Madigan MT. 1997. Positive selection systems for discovery of novel polyester biosynthesis genes based on fatty acid detoxification. *Appl Environ Microbiol* 63: 3010-3.
54. Krieg NR, Holt JG. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 140-74 pp.
55. Kusaka S, Iwata T, Doi Y. 1999. Properties and biodegradability of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-hydroxybutyrate] produced by a recombinant *Escherichia coli*. *Int J Biol Macromol* 25: 87-94.
56. Lee EY, Jendrossek D, Schimer A, Choi CY, Steincuchel A. 1995. Biosynthesis of copolymers consisting of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from 1,3-butanediol or from 3-hydroxybutyrate by *Pseudomonas* sp. A33. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 901-9
57. Lee SH, Oh DH, Ahn WS, Lee Y, Choi J, Lee SY. 2000. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnol Bioeng* 67: 240-4
58. Lee SY. 1999. *Patent No. WO 99/29889*
59. Lee SY, Choi J, Wong HH. 1999. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. *Int J Biol Macromol* 25: 31-6.
60. Madison LL, Huisman GW. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 21-53.
61. Matsusaki H, Manji S, Taguchi K, Kato M, Fukui T, Doi Y. 1998. Cloning and molecular analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *J Bacteriol* 180: 6459-67.
62. Meikar O. 2001. Polühüdrosüalkanoaat *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüvest: polühüdrosüalkanoaadi depolümeraasi geeni kloneerimine ja molekulaarne kirjeldamine. Tartu Ülikool: Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut, Geneetika õppetool
63. Mergaert J, Webb A, Anderson C, Wouters A, Swings J. 1993. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Appl Environ Microbiol* 59: 3233-8.
64. Merrick JM, Steger R, Dombroski D. 1999. Hydrolysis of native poly(hydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *Int J Biol Macromol* 25: 129-34.
65. Miller EM, Nickoloff JA. 1995. *Escherichia coli electrotransformation*. 105-13 pp.
66. Miller JH. 1992. *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor, New York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
67. Miyake M, Takase K, Narato M, Khatipov E, Schnackenberg J, et al. 2000. Polyhydroxybutyrate production from carbon dioxide by cyanobacteria. *Appl Biochem Biotechnol* 84-86: 991-1002.
68. Nojiri M, Saito T. 1997. Structure and function of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *J Bacteriol* 179: 6965-70.

69. Ohura T, Kasuya KI, Doi Y. 1999. Cloning and characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase gene of *Pseudomonas stutzeri* and analysis of the function of substrate-binding domains. *Appl Environ Microbiol* 65: 189-97.
70. Park SJ, Ahn WS, Green PR, Lee SY. 2001. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Biotechnol Bioeng* 74: 81-6
71. Peoples OP, Sinskey AJ. 1989. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC). *J Biol Chem* 264: 15298-303
72. Poirier Y. 1999. Production of new polymeric compounds in plants. *Curr Opin Biotechnol* 10: 181-5.
73. Prieto MA, Buhler B, Jung K, Witholt B, Kessler B. 1999. PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for pha genes. *J Bacteriol* 181: 858-68.
74. Quinteros R, Goodwin S, Lenz RW, Park WH. 1999. Extracellular degradation of medium chain length poly(beta-hydroxyalkanoates) by *Comamonas* sp. *Int J Biol Macromol* 25: 135-43.
75. Ramsay BA, Saracovan I, Ramsay JA, Marchessault RH. 1992. Effect of nitrogen limitation on long-side-chain poly-beta-hydroxyalkanoate synthesis by *Pseudomonas resinovorans*. *Appl Environ Microbiol* 58: 744-6
76. Reddy CS, Ghai R, Rashmi, Kalia VC. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour Technol* 87: 137-46
77. Rehm BH. 2003. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J* 376: 15-33
78. Rehm BH, Kruger N, Steinbuchel A. 1998. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The PHAG gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase. *J Biol Chem* 273: 24044-51
79. Ren Q, Sierro N, Kellerhals M, Kessler B, Witholt B. 2000. Properties of engineered poly-3-hydroxyalkanoates produced in recombinant *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 66: 1311-20.
80. Rhu DH, Lee WH, Kim JY, Choi E. 2003. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waste. *Water Sci Technol* 48: 221-8
81. Robert MH, Dusica M, Geoffrey N, Ralph A. 2000. *Patent No. US6146665*
82. Ruiz JA, Lopez NI, Mendez BS. 1999. Polyhydroxyalkanoates degradation affects survival of *Pseudomonas oleovorans* in river water microcosms. *Rev Argent Microbiol* 31: 201-4.
83. Salehizadeh H, Van Loosdrecht MC. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol Adv* 22: 261-79
84. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1988. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor, New York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
85. Schirmer A, Jendrossek D. 1994. Molecular characterization of the extracellular poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] depolymerase gene of *Pseudomonas fluorescens* GK13 and of its gene product. *J Bacteriol* 176: 7065-73.
86. Schirmer A, Jendrossek D, Schlegel HG. 1993. Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] by bacteria: purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Appl Environ Microbiol* 59: 1220-7.

87. Schöber U, Thiel C, Jendrossek D. 2000. Poly(3-hydroxyvalerate) depolymerase of *Pseudomonas lemoignei*. *Appl Environ Microbiol* 66: 1385-92.
88. Shinohe T, Nojiri M, Saito T, Stanislawski T, Jendrossek D. 1996. Determination of the active sites serine of the poly (3- hydroxybutyrate) depolymerases of *Pseudomonas lemoignei* (PhaZ5) and of *Alcaligenes faecalis*. *FEMS Microbiol Lett* 141: 103-9.
89. Sinclair JL, Ghiorre WC. 1989. Distribution of aerobic bacteria, protozoa, algae and fungi in deep substrate surface sediments. *Geomicrobiol J* 7: 15-31
90. Snell KD, Peoples OP. 2002. Polyhydroxyalkanoate polymers and their production in transgenic plants. *Metab Eng* 4: 29-40
91. Solaiman DK, Ashby RD, Foglia TA. 2002. Physiological characterization and genetic engineering of *Pseudomonas corrugata* for medium-chain-length polyhydroxyalkanoates synthesis from triacylglycerols. *Curr Microbiol* 44: 189-95
92. Song JJ, Yoon SC. 1996. Biosynthesis of Novel Aromatic Copolyesters from Insoluble 11-Phenoxyundecanoic Acid by *Pseudomonas putida* BM01. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 536-44
93. Spiekermann P, Rehm BH, Kalscheuer R, Baumeister D, Steinbüchel A. 1999. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch Microbiol* 171: 73-80
94. Steinbüchel A, Hustede E, Liebergesell M, Pieper U, Timm A, Valentin H. 1992. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 9: 217-30
95. Steinbüchel A, Lütke-Eversloh T. 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem Engin J* 16: 81-96
96. Steinbüchel A, Schlegel HG. 1991. Physiology and molecular genetics of poly(beta-hydroxy-alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol Microbiol* 5: 535-42
97. Stuart ES, Foster LJ, Lenz RW, Fuller RC. 1996. Intracellular depolymerase functionality and location in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing polyhydroxyoctanoate. *Int J Biol Macromol* 19: 171-6.
98. Sudesh K, Abe H, Doi Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci* 25: 1503-55
99. Timm A, Byrom D, Steinbüchel A. 1990. Formation of blends of various poly (3-hydroxyalkanoic acid) by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33: 296-301
100. Timm A, Steinbüchel A. 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* 56: 3360-7
101. Timm A, Wiese S, Steinbüchel A. 1994. A general method for identification of polyhydroxyalkanoic acid synthase genes from pseudomonads belonging to the rRNA homology group I. *Appl Microbiol Biotechnol* 40: 669-75
102. Tsuge T, Fukui T, Matsusaki H, Taguchi S, Kobayashi G, et al. 2000. Molecular cloning of two (R)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. *FEMS Microbiol Lett* 184: 193-8

103. Vedler E, Koiv V, Heinaru A. 2000. Analysis of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pEST4011 of *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* strain EST4002. *Gene* 255: 281-8
104. Verhille S, Baida N, Dabboussi F, Izard D, Leclerc H. 1999. Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 22: 45-58
105. Wang F, Lee SY. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 63: 4765-9.
106. Weisheng L. 1988. *Patent No. WO 99/39588*
107. Wendlandt KD, Jechorek M, Helm J, Stottmeister U. 2001. Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *J Biotechnol* 86: 127-33
108. Witholt B, Kessler B. 1999. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr Opin Biotechnol* 10: 279-85.
109. Wong AL, Chua H, Yu PH. 2000. Microbial production of polyhydroxyalkanoates by bacteria isolated from oil wastes. *Appl Biochem Biotechnol* 84-86: 843-57.
110. Wu HA, Sheu DS, Lee CY. 2003. Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *J Microbiol Methods* 53: 131-5
111. Xi J, Wu Q, Yan Y, Zhang Z, Yu PH, et al. 2000. Hyperproduction of polyesters consisting of medium-chain-length hydroxyalkanoate monomers by strain *Pseudomonas stutzeri* 1317. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78: 43-9
112. Yao J, Zhang G, Wu Q, Chen GQ, Zhang R. 1999. Production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas nitroreducens*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75: 345-9
113. Yu J. 2001. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *J Biotechnol* 86: 105-12.
114. Zhang K, Shiraki M, Saito T. 1997. Purification of an extracellular D-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase from *Pseudomonas* sp. strain A1 and cloning and sequencing of its gene. *J Bacteriol* 179: 72-7.
115. Zinn M, Witholt B, Egli T. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Deliv Rev* 53: 5-21