

Journal of Siberian Federal University. Biology 2 (2015 8) 220-235

~ ~ ~

УДК 579.222

To the Question About Intracellular Polyhydroxybutyrate Degradation

Natalia O. Zhila^{a,b},
Galina S. Kalacheva^{*a,b} and Tatiana G. Volova^{a,b}
^aInstitute of Biophysics SB RAS
50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia
^bSiberian Federal University
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia

Received 12.01.2015, received in revised form 19.02.2015, accepted 18.04.2015

*The investigation of dynamics of 1,2¹⁴C-acetate flows was carried out in three different regimes of bacteria *Cupriavidus eutrophus* B-10646 biosynthesis on fructose and acetate: a) in the phase of accumulation of polyhydroxybutyrate; b) in the phase of intracellular PHB degradation and the synthesis of nitrogen compounds; c) in the phase of resynthesis of PHB. It has been shown that in regime of PHB accumulation 80 % of labeled carbon was used for synthesis of PHB. At the condition of PHB degradation both synthesis and degradation take place simultaneously. This confirms the cyclic nature of PHB metabolism.*

*Keywords: *Cupriavidus eutrophus* B-10646, 1,2¹⁴C-acetate, polyhydroxybutyrate, biosynthesis, intracellular degradation.*

DOI: 10.17516/1997-1389-2015-8-2-220-235.

© Siberian Federal University. All rights reserved

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

К вопросу о внутриклеточной деградации полигидроксибутирата

Н.О. Жила^{а,б}, Г.С. Калачева^{а,б}, Т.Г. Волова^{а,б}

^аИнститут биофизики СО РАН

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

^бСибирский федеральный университет

Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

Исследованы в динамике потоки меченого углеродного субстрата (1,2¹⁴C-ацетата) в меняющихся режимах биосинтеза бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646 при росте на фруктозе и ацетате: а) в ходе накопления запасного соединения – полигидроксибутирата (ПГБ), б) эндогенной деградации ПГБ и синтеза азотсодержащих компонентов, в) ресинтеза ПГБ. Показано, что при выращивании бактерий *C. eutrophus* B-10646 в режиме аккумуляции ПГБ на фруктозе и ацетате в период накопления полимера в среднем около 80 % радиоуглерода направляется на его синтез. Установлено, что в условиях, благоприятных для внутриклеточной деградации ПГБ, также происходит синтез полимера, что подтверждает предположение об одновременном синтезе и деградации полимера в клетках бактерий.

Ключевые слова: *Cupriavidus eutrophus* B-10646, 1,2¹⁴C-ацетат, полигидроксибутират, биосинтез, внутриклеточная деградация.

Введение

Полигидроксиалканоаты (ПГА), активно изучаемые в настоящее время в связи с их биодegradируемостью, относятся к резервным макромолекулам и образуются прокариотами при несбалансированном росте как эндогенное депо энергии и углерода. ПГА синтезируются в ходе сложного многоступенчатого биосинтетического процесса, каждую стадию которого катализируют специфические ферменты. Синтез ПГА в общих чертах сходен у различных микроорганизмов, но наиболее изучены пути синтеза полигидроксибутирата (ПГБ) у типового штамма *Ralstonia eutropha* H16 в различных условиях несбалансированного роста (Lee, 1996; Fukui et al., 2013; Shimizu et al., 2013; Przybylsky et al., 2015).

Биосинтез ПГБ начинается с конденсации двух молекул ацетил-КоА до

ацетоацетил-КоА, восстанавливающийся затем до D(-)-3-гидроксибутирил-КоА и далее включающийся в полимерную цепь. Все эти этапы катализируются в основном тремя ферментами: β -кетотиолазой, НАДФН зависимой ацетоацетил-КоА-редуктазой и ПГБ-полимеразой (синтазой) (Haywood et al., 1989). Факторы, регулирующие их активности на генетическом и молекулярном уровнях, интенсивно изучаются, и считается, что β -кетотиолаза запускает синтез полимера, редуктаза регулирует скорость синтеза ПГБ, а синтаза отвечает за качественные характеристики полимера (молекулярный вес, мономерный состав) и конечный выход ПГА (Lawrence et al., 2005; Fukui et al., 2013; Sznajder et al., 2015).

Однако процесс формирования полимера достаточно сложен и определяется не только

ферментами синтетической ветви цикла ПГА, но и другими аспектами полимерного метаболизма. Не менее важной представляется роль ферментов деполимеризующей ветви цикла ПГА, которые могут регулировать как молекулярный вес ПГА, так и его конечный выход. Однако процесс внутриклеточной деградации ПГБ менее изучен. Деградация ПГА происходит через гидролиз и тиолиз. Последняя реакция является результатом действия ПГА-синтазы, но в обратном направлении. Впервые возможность участия ПГА-синтазы не только в синтезе, но и в деградации полимера показана в работе Uchino and Saito (2006). Но физиологическая значимость этой реакции пока не ясна.

Гидролиз и тиолиз полимера происходят под действием ПГА-деполимераз. Впервые деполимеразный ген в *Ralstonia eutropha* H16 был клонирован в 2001 г. (Saeguse et al., 2001), а в 2003 г. были охарактеризованы еще 3 деполимеразы (York et al., 2003). В настоящее время известно 7 типов деполимераз, две из них (*phaZ1* and *phaZ6*) активно экспрессируются в фазу аккумуляции ПГА (Lawrence et al., 2005; Shimizu et al., 2013; Sznajder et al., 2015). В процессе гидролиза полимера образуются мономеры и олигомеры. Последние разрушаются до мономеров под действием гидролаз. В *Ralstonia eutropha* обнаружены две гидролазы, участвующие в разрушении олигомеров (Kobayashi et al., 2005).

Существует достаточно много фактов, свидетельствующих о том, что синтез и деградация полимера в клетке происходят одновременно. Впервые предположение о циклической природе метаболизма ПГА в *Alkaligenus eutrophus* было высказано Дои с соавторами (Doi et al., 1990), которые показали, что перенос культуры, выращенной на пентановой кислоте, а следовательно, синтезирующей ПГА с высоким содержанием 3-гидроксивале-

рата (3-ГВ) – до 49 мол % в ПГА, на среду с бутиратом происходит заметное снижение фракции 3-ГВ в полимере (до 19 %) без изменения его содержания в клетке. Аналогичные результаты для бактерий *R. eutropha* NCIMB 11599 были получены Шенгом с соавторами (Shang et al., 2005). В работе (Taidi et al., 1995) в опытах с *A. eutrophus* NSMB40529 и меченой глюкозой выявлено, что накопление метки в полимере продолжалось даже после прекращения его аккумуляции. Кроме того, показано, что в процессе синтеза полимера происходила постепенная замена полимера с высокой молекулярной массой полимером с более низкой молекулярной массой. Однако в работе Хэйвуда с соавторами (Haywood et al., 1989) доказательств существования одновременного синтеза и деградации ПГБ у бактерий *A. eutrophus*, культивируемых в хемостате, находящихся в устойчивом состоянии лимитирования азотом, не получено. Нами установлено, что в период накопления полимера в клетках активность деполимеризующих полимер ферментов (ПГБ-деполимеразы и гидроксibuтиратдегидрогеназы) была низкой и проявлялась только при стимулировании эндогенной деградации ПГБ (культивирование бактерий при лимите или отсутствии экзогенного источника углерода и энергии) (Volova et al., 2004). Противоречивость данных разных авторов была несколько разрешена недавней работой Учино с соавторами (Uchino et al., 2007), которые показали, что в нативных гранулах полимера, во-первых, локализуются все ферменты синтеза полимера (β -кетотиолаза, редуктаза и синтаза) и деполимеразы *PhaZa1*, обладающая тиолазной активностью, продуктом реакции которой является 3-НВ-СoA. Следовательно, деградация полимера является энергонезависимым процессом и может происходить одновременно с его синтезом. Во-вторых, баланс между синтезом и деградацией полимера

регулируется внутриклеточными концентрациями ключевых метаболитов – КоА, ацетил-КоА, ЗНВ-КоА, НАД⁺/НАД, т.е. на субстратном уровне. В более ранней работе (Handrick et al., 2000) авторы предсказали возможность регулирования активностей синтазы и деполимеразы в зависимости от концентраций специфических субстратов – ЗНВ-КоА – для синтазы и ПГБ – для деполимеразы. Авторы предположили, что эти ферменты могут отвечать за сбалансированные изменения потока углерода, исходящие из углеводного субстрата через ацетил-КоА. Если клетка при росте не испытывает дефицита в углероде, уровень ацетил-КоА выше его потребления, активность синтазы будет высока, а активность деполимеразной ветви будет снижена, что стимулирует синтез ПГБ. Снижение поступления углеродного субстрата приведет к снижению концентрации ацетил-КоА, и, следовательно, будет повышаться активность деполимераз, поэтому необходимо изучать механизм регуляции активностей этих двух ветвей одновременно в условиях синтеза и деградации ПГБ.

Понимание механизмов взаимодействия двух ветвей метаболизма ПГА важно для направленного изменения свойств и структур синтезируемых клетками полимеров. Одним из подходов к изучению этих взаимодействий является выяснение внутриклеточного распределения меченого субстрата в процессе роста бактерий в условиях синтеза и деградации полимера.

Публикации, посвященные анализу метаболических путей цикла ПГБ с применением меченого субстрата, немногочисленны. В работе (Haywood et al., 1989) было исследовано включение ¹⁴C в *Alcaligenes eutrophus* NCIB 11599. Авторы показали, что динамика включения радиоуглерода в полимер аналогична динамике биомассы. Учино с соавтора-

ми (Uchino et al., 2007) использовали меченый ацетил-КоА для доказательств способности нативных ПГБ гранул катализировать все реакции, приводящие к синтезу полимера. С помощью меченого ¹⁴C-ПГБ авторы показали тиолазную активность ПГБ-синтазы (Uchino and Saito, 2006). В работе Shimizu et al. (2013) был использован NaH¹³CO₃ для выяснения роли цикла Кальвина в синтезе ПГБ. При исследовании закономерностей образования сополимеров 3-НВ/3-НВ метилотрофными бактериями в присутствии меченых по углероду ко-субстратов (пропионата и валерата) показано, что количество радиоуглерода в сополимере от общего количества радиоактивности, найденной в биомассе, может составлять от 16 до 69 % (Korotkova et al., 1999). Других данных по изучению метаболизма ПГА микроорганизмов с мечеными субстратами в доступной нам литературе не найдено.

Целью настоящей работы было исследование распределения радиоуглерода среди макромолекул у бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646 при аккумуляции и эндогенной деградации полигидроксibuтирата.

Материалы и методы

Исследован штамм *Cupriavidus eutrophus* В-10646 (ранее *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Wautersia*, *Cupriavidus*) (Vanechoutte et al., 2004), депонированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) (Волова, Шишацкая, 2012). Штамм имеет широкий органотрофный потенциал и может использовать большой спектр органических субстратов. *C. eutrophus* В-10646 толерантен к ряду органических субстратов, таких как валериат, гексаноат, бутиролактон в концентрациях от 3 до 5 г/л в культуральной среде, которые используются для синтеза коротко- и среднецепочечных ПГА (Волова, Шишацкая, 2012; Volova et al., 2014).

Условия культивирования

Культивирование бактерий *C. eutrophus* В-10646 проводили в колбах объемом 1 л на минеральной среде Шлегеля следующего состава (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 9.1; KH_2PO_4 – 1.5; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.25; NH_4Cl – 1.0 (Schlegel et al., 1961). Микроэлементы вводили по прописи Хоагленда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор микроэлементов содержит (г/л): H_3BO_3 – 1.5; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.03; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.008; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.008; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.176; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.05; NiCl_2 – 0.008.

Бактерии выращивали в режиме синтеза и деградации полимера (Волова и др., 1992; Kalacheva and Volova, 2007). На первом этапе бактерии культивировали с лимитированным содержанием азота в среде (50 % от потребностей культуры в элементе) в режиме максимальной аккумуляции полимера. На втором этапе добавляли в культуру хлорид аммония (1 г/л) для инициирования процесса деградации полимера; третий этап аналогичен первому (после исчерпания NH_4Cl снова были созданы условия для накопления полимера). Проведено три эксперимента. В первом эксперименте в качестве углеродного субстрата использовали фруктозу, поддерживая ее концентрацию в среде на уровне 10-13 г/л и снижая до 5 г/л в фазу деградации полимера. В остальных экспериментах в качестве углеродного субстрата использовали ацетат натрия (5 г/л). pH среды поддерживали на уровне 7.0 – 7.2 добавлением в среду титрующего агента (100 мл CH_3COOH /л дистиллированной воды); pH среды измеряли pH-метром (pH-Meter 766, Calimatic, Germany).

В первом и втором экспериментах в культуру бактерий вносили меченый углеродный субстрат (1,2- ^{14}C -ацетат) на стадии синтеза полимера (24-й час культивирова-

ния), а в третьем эксперименте – на стадии внутриклеточной деградации (115-й час культивирования) – 0.02 и 0.04 мкКи/мл соответственно. Пробы культуры для анализов отбирали через 0.5, 1 и 2 ч после добавления метки; далее отбор проб производили через 10-28 ч в течение экспериментов. При наступлении третьей фазы эксперимента культивирование продолжали 38-75 ч. Анализировали динамику радиоактивности культуральной среды, биомассы, липидов, полимера и «активной» биомассы (биомасса без липидов и полимера).

Аналитические методы

Биомассу культуры определяли по весу сухого вещества и измерением оптической плотности. Содержание аммонийного азота в культуральной среде определяли с реактивом Несслера. Концентрацию глюкозы – в среде резорциновым методом.

Содержание полимера в биомассе измеряли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза проб сухой биомассы на хромато-масс-спектрометре (7890/5975C, Agilent Technologies, U.S.) (Brandl et al., 1988), используя в качестве внутреннего стандарта бензойную кислоту, и весовым методом после экстракции хлороформом и осаждения гексаном.

Молекулярный вес ПГБ исследовали гель-проникающей хроматографией (модель 1260 Infinity, Agilent Technologies, США) с рефрактометрическим детектором, используя колонку Agilent PLgel Mixed-C. В качестве элюента был применен хлороформ. Калибровка проводилась по полистириновым стандартам (Fluka, Швейцария, Германия). Были определены средневесовая молекулярная масса – M_w , среднечисловая молекулярная масса – M_n и полидисперсность ($D = M_w/M_n$).

Липиды и полимер из биомассы выделяли смесью хлороформа и метанола (2:1, по объему). Полимер отделяли от липидов осаждением двойным объемом гексана (Калачева, Волова, 2007). Полученный экстракт липидов переносили в предварительно взвешенную колбу, растворитель отгоняли на роторном испарителе, доводили в эксикаторе до постоянного веса и взвешивали.

Определенный объем культуральной среды, биомассу, полимер, липиды и «активную» биомассу, предварительно взвешенные, помещали в пластиковые виалы («Perkin Elmer/Packard», США) с 10 мл сцинтилляционного раствора (10 г 2,5 – дифенилоксазола, 0,25 г 1,3-ди-2,5-фенилоксазолил бензола, 100 г нафталина в 1 л диоксана). Радиоактивность проб измеряли на сцинтилляционном счетчике Tri-Carb 2100 TR («Packard Instrument Company», США).

Результаты и обсуждение

Рост культуры на фруктозе

Длительность эксперимента на фруктозе составила 256 ч. Периодичность отбора проб была следующей: первый отбор проб произвели при плотности биомассы около 1 г/л, затем через 24 ч, когда плотность биомассы составила около 2,5 г/л, был добавлен меченый ацетат и в течение часа были отобраны две пробы. Затем периодичность отбора проб составила 24-28 ч.

Содержание основных субстратов в среде показано на рис. 1а. В течение роста концентрация фруктозы поддерживалась на уровне 10-13 г/л, но в период эндогенной деградации полимера содержание этого субстрата было снижено приблизительно в 2 раза (до 5-6 г/л), а затем возвращено к исходным значениям. Содержание азота в среде к началу активного синтеза полимера снижалось с 1 г/л до аналитического нуля. На втором этапе культивиро-

вания после однократного внесения хлористого аммония концентрация азота поднималась до исходного уровня, а затем в течение 72 ч снова падала до нуля (рис. 1а).

Кривые роста и динамика накопления ПГБ у бактерии *C. eutrophus* В-10646, выращиваемой на фруктозе в режиме, позволившем организовать смену направленности синтеза основных (азотсодержащие компоненты) и запасных (полигидроксibuтират) клеточных макромолекул, представлены на рис. 1б. В течение первого периода (41-136 ч) были созданы условия для аккумуляции полимера в клетках (дефицит азота в среде). Во втором периоде роста (136-208 ч) на полной питательной среде происходила эндогенная деградация полимера; на третьем этапе после исчерпания азота из культуральной среды (208-256 ч) происходил ресинтез полимера, а затем его деградация, связанная с прекращением роста культуры и ее гибелью.

Концентрация биомассы несущественно возрастала в течение 100 ч культивирования и не превышала 4 г/л. После внесения в среду азота на 136-й час эксперимента биомасса увеличилась более чем в 2 раза (с 4 до 9 г/л). По мере исчерпания в среде азота рост клеток прекратился и концентрация биомассы несколько снизилась – до 7,3 г/л и оставалась на этом уровне до конца эксперимента (рис. 1б). В начале роста азотсодержащие вещества клетки составляли более 60 % от сухого веса биомассы, а содержание полимера не превышало 22 % (рис. 1б). По мере исчерпания в среде азота происходили существенные изменения в составе биомассы. Уровень полимера в биомассе возрастал до 80-88 % (или с 0,2 до 3,9 г/л), при этом содержание общего азота снижалось до 1,2-2 % или 8-12 % белка. На втором этапе опыта, после добавления в среду хлорида аммония, были созданы условия для перераспределения углерода, запасенного в

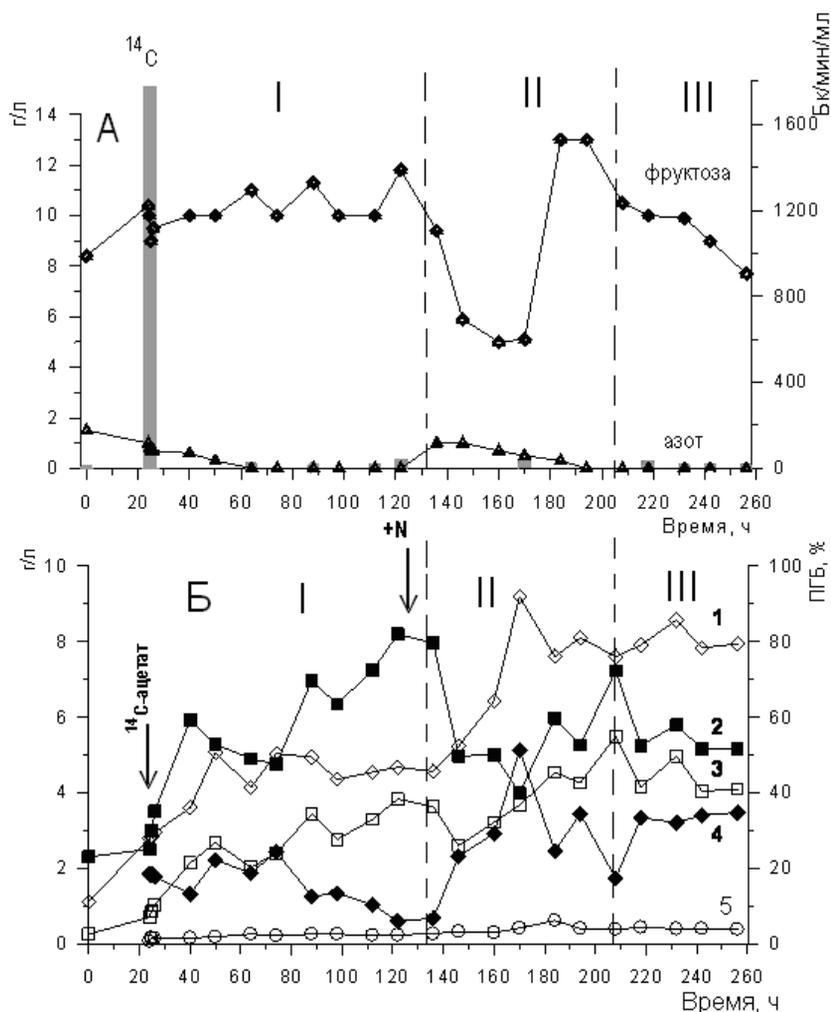


Рис. 1. Содержание в культуральной среде фруктозы (г/л), азота (г/л) и 1,2-¹⁴С-ацетата (МБк/мин/мл) (а) и показатели культуры бактерий (б) (1 – биомасса, г/л; 2 – ПГБ, %; 3 – «активная» биомасса, г/л; 4 – ПГА, г/л; 5 – липиды, г/л) при выращивании *Cupriavidus eutrophus* B-10646 при смене режимов биосинтеза (I), внутриклеточной деградации (II) и ресинтеза ПГБ (III). Стрелками показано добавление в культуру 1,2-¹⁴С-ацетата и хлорида аммония

полимере, в другие синтетические пути. При этом содержание полимера в биомассе снизилось до 40 % и увеличивалось содержание азотистых компонентов клетки (до 4.5 % общего азота или 25 % белка). После исчерпания в среде азота снова наблюдался ресинтез полимера и снижение в клетках общего азота. Следует отметить, что изменяющиеся ростовые условия существенно влияли на соотношение полимера и общего азота в клетках, при этом

содержание липидов оставалось практически постоянным на протяжении всего опыта и составляло 5-7 % от сухого вещества.

На фоне этих изменений было измерено распределение активности в культуральной среде, биомассе и отдельных фракциях клетки. В течение первых 2 часов культивирования после внесения 1,2-¹⁴С-ацетата количество меченого углерода в культуральной среде резко упало с 1776 до 10-12 Бк/мин/мл

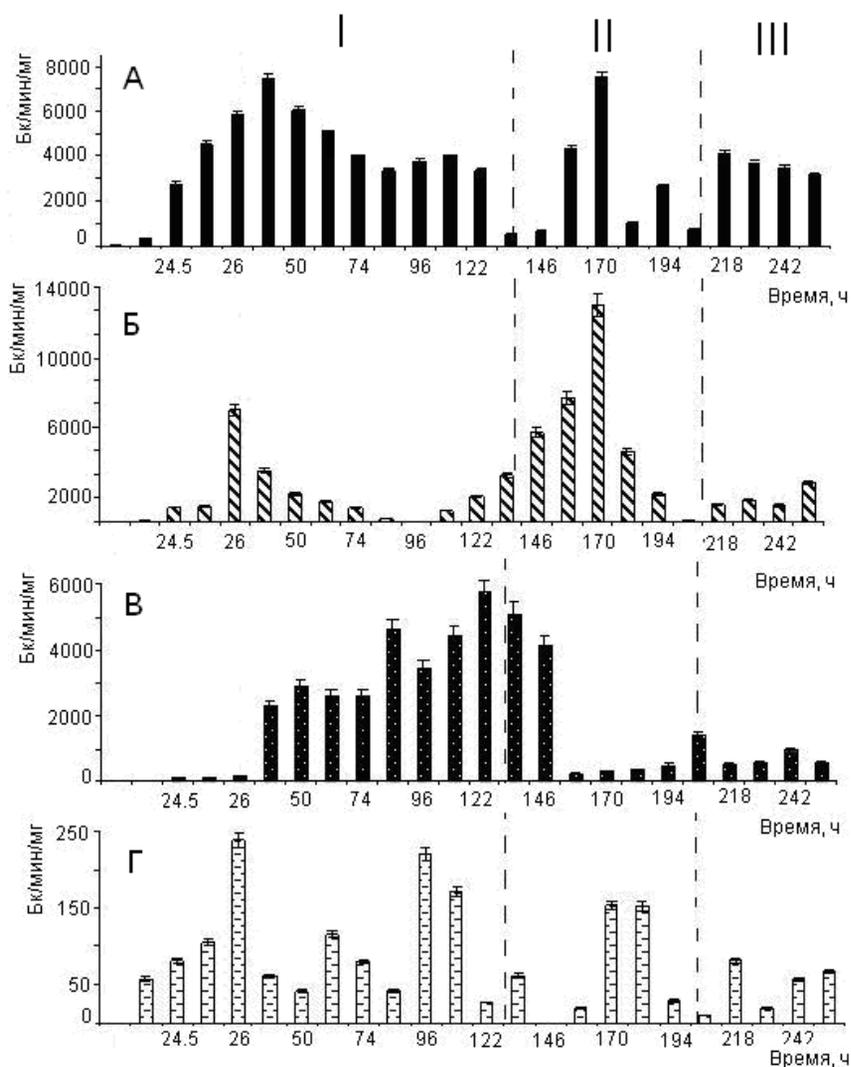


Рис. 2. Динамика удельной активности радиоуглерода в биомассе *Cupriavidus eutrophus* B-10646 (а), «активной» биомассе (б), ПГБ (в) и липидах (г) при смене режимов биосинтеза (I), деградации (II), ресинтеза ПГБ (III)

(рис. 1). Метка практически сразу же начала включаться в биомассу (рис. 2а) и в первую очередь во фракцию липидов (рис. 2г). Затем отмечалось появление метки в «активной» биомассе (рис. 2б) и только после 40 часов роста культуры меченый углерод активно начал включаться в полимер и уровень включения ^{14}C возрастал вплоть до перехода культуры на 2-й этап роста на полной питательной среде (рис. 2в), сопровождающий деградацией полимера и активизацией синтеза азотсодержа-

щих соединений. Включение радиоуглерода в полимер уменьшилось (рис. 2в) на фоне существенного увеличения метки в «активной» биомассе (рис. 2б).

На третьем этапе (начиная с 208 ч) после исчерпания азота в культуре снова были созданы условия для накопления в клетках полимера. Культивирование бактерий на среде без азота сопровождалось сначала увеличением пула полимера от 40 до 72 %, однако в дальнейшем синтез полимера прекратился,

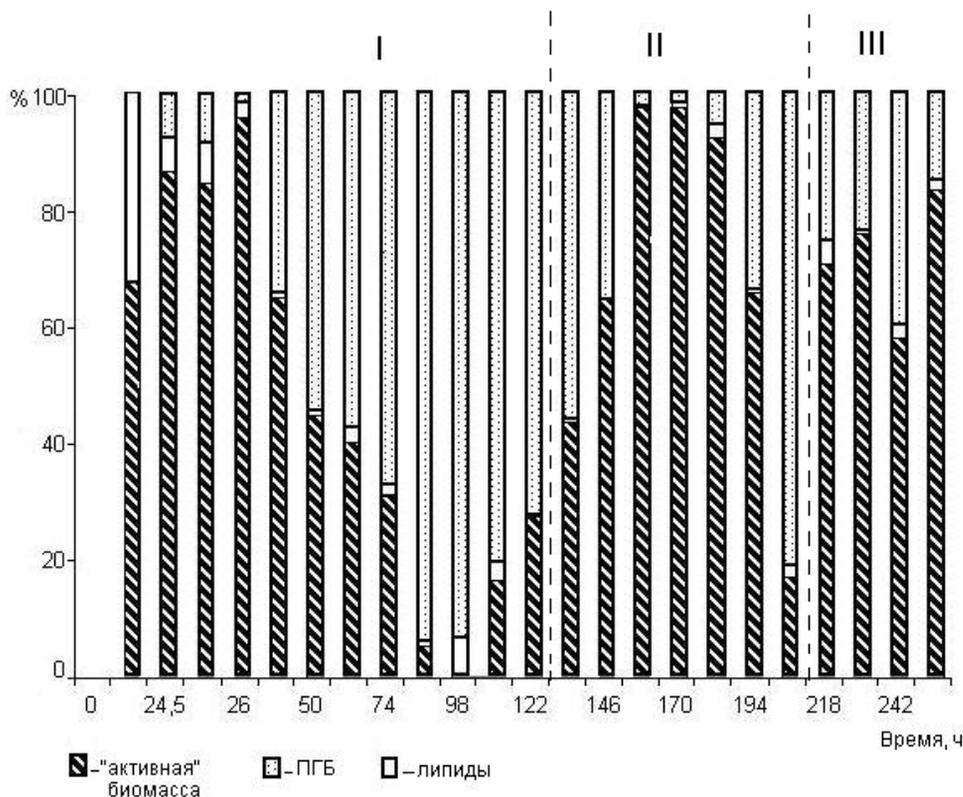


Рис. 3. Распределение радиоуглерода среди липидов, полимера и «активной» биомассы бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646 при выращивании на фруктозе при смене режимов «синтез (I) – деградация (II) – ресинтез (III) ПГБ»

его содержание в клетках снизилось до 50 % и оставалось на этом уровне до конца эксперимента. Практически не менялась концентрация и «активной» биомассы. Увеличение ^{14}C в полимере и соответствующее снижение метки в «активной» биомассе отмечалось только на 208-м часу роста культуры, далее содержание метки в этих фракциях снижалось и мало изменялось до конца опыта (рис. 2).

На рис. 3 показано относительное распределение радиоуглерода среди фракций макромолекул – липидов, полимера и «активной» биомассы – при смене режимов «синтез-деградация-ресинтез» полигидроксibuтирата (рис. 3). В первой точке отбора проб метка в первую очередь включалась в липиды и «активную» биомассу. И только через 0.5 ч после

добавления метки наблюдалось небольшое включение ^{14}C в полимер. По мере возрастания пула полимера в клетках концентрирование радиоуглерода в этой фракции увеличивалось (более 85 %) на фоне снижения радиоактивности в «активной» биомассе (до 11.5 %). На втором этапе эксперимента, в период деградации полимера, наблюдалось снижение доли радиоактивности во фракции полимера (до 3 %) и увеличением доли ^{14}C в «активной» биомассе (до 96 %) (рис 3). При переходе клеток в третий период роста культуры, после исчерпания азота в среде, ресинтез полимера сопровождался увеличением доли меченого углерода во фракции полимера и снижением доли метки в «активной» биомассе. Такое распределение было кратковре-

Таблица 1. Среднечисловая молекулярная масса (Mn), средневесовая молекулярная масса (Mw) и полидисперсность (Đ) полимера, полученного при выращивании *Cupriavidus eutrophus* В-10646 при смене режимов «синтез(I)-деградация(II)-ресинтез(III)» полигидроксibuтирата при выращивании на фруктозе

Час (этап)	Mn, Da	Mw, Da	Đ
98 (I этап)	308759 ± 5860	664503 ± 19945	2.15 ± 0.005
116 (I этап)	251053 ± 664	814376 ± 15926	3.25 ± 0.070
160 (II этап)	203773 ± 8163	667977 ± 21833	3.28 ± 0.025
170 (II этап)	110475 ± 74	356012 ± 2009	3.23 ± 0.015
208 (III этап)	241102 ± 692	610957 ± 1890	2.54 ± 0.015
242 (III этап)	109156 ± 692	309765 ± 1890	2.84 ± 0.015
256 (III этап)	156922 ± 4474	422885 ± 15566	2.69 ± 0.025

менным, и в последние часы роста культуры относительное содержание меченого углерода в полимере снижалось, а в активной биомассе увеличивалось, что может свидетельствовать о деградации полимера в конце эксперимента.

Таким образом, при эндогенной деградации полимера основной поток углеродсодержащих продуктов, образующихся при его деградации, перенаправлялся на синтез азотсодержащих соединений и, наоборот, при исчерпании азота наступала фаза ресинтеза полимера. В период эндогенной деградации полимера его содержание в клетках снижалось (от 88 до 40 %), при этом молекулярная масса в течение короткого периода времени (6-12 ч) могла резко снизиться в 2-3 раза (от 814 до 300 кДа) (табл. 1). Эти результаты важны для технологии получения ПГБ как в части общих выходов ПГБ, так и его характеристик.

Рост культуры на ацетате

Рост бактерий *C. eutrophus* В-10646 на ацетате отличался от роста этих бактерий на фруктозе. Во-первых, бактерии росли менее интенсивно и максимальное накопление биомассы составляло 4.5–4.7 г/л сухого вещества

(рис. 4, 5). Во-вторых, в двух сериях экспериментов на ацетате азот в среде до конца не использовался и в фазу синтеза полимера составлял 0.2 г/л (рис. 4, 5).

Во втором эксперименте 1,2-¹⁴С-ацетат был добавлен на 23-й час роста культуры, в период начала синтеза ПГБ, как и на фруктозе, а в 3-м эксперименте – на 115-й час, в фазу деградации ПГБ. Все показатели роста культуры в этих двух опытах практически не различались (рис. 4 и 5).

Максимальных значений биомасса (до 4.5–4.7 г/л) достигала в фазу деградации ПГБ, а затем незначительно падала до 3.9 г/л в фазу ресинтеза полимера и оставалась на этом уровне до конца опытов. Концентрация ПГБ увеличивалась в клетках с 22.4 % до 71–73 % на первом этапе роста (фаза накопления полимера), снижалась до 49.0 % в период деградации полимера (2-й этап) и опять возрастала до 70 % на последнем этапе роста бактерий, но к концу эксперимента снижалась до 46–55 % (рис. 4, 5).

Во втором эксперименте в течение первого часа культивирования после добавления 1,2-¹⁴С-ацетата в начале роста (23-й час) количество меченого углерода в культуральной среде снизилось незначительно, и только к

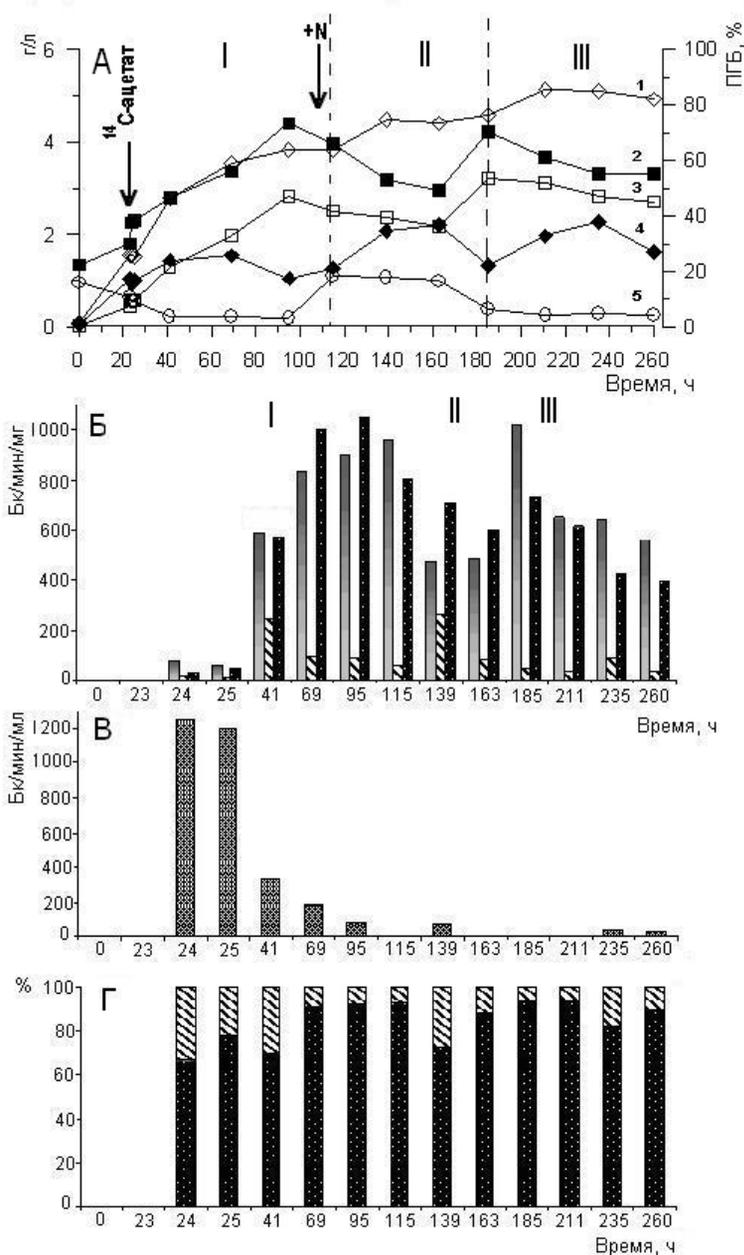


Рис. 4. Показатели культуры *Cupriavidus eutrophus* B-10646 при выращивании на ацетате (А) (1 – биомасса, г/л; 2 – ПГБ, %; 3 – «активная» биомасса, г/л; 4 – ПГА, г/л; 5 – азот в среде, г/л); Б – динамика удельной активности радиоуглерода в биомассе (■), «активной» биомассе (▨) и ПГБ (■); В – в культуральной среде (▨); Г – распределение радиоуглерода среди «активной» биомассы (▨) и ПГБ (■) при смене режимов биосинтеза (I), деградации (II) и ресинтеза (III) полимера

41-му часу роста бактерий упало в 6.0 раз, с 1200 до 200 Бк/мин/мл, продолжая снижаться до 100 Бк/мин/мл в конце эксперимента (рис. 4в).

Динамика изменения радиоактивности полимера и «активной» биомассы представлена на рис. 4б. В отличие от эксперимента на фруктозе уже через час после добавления

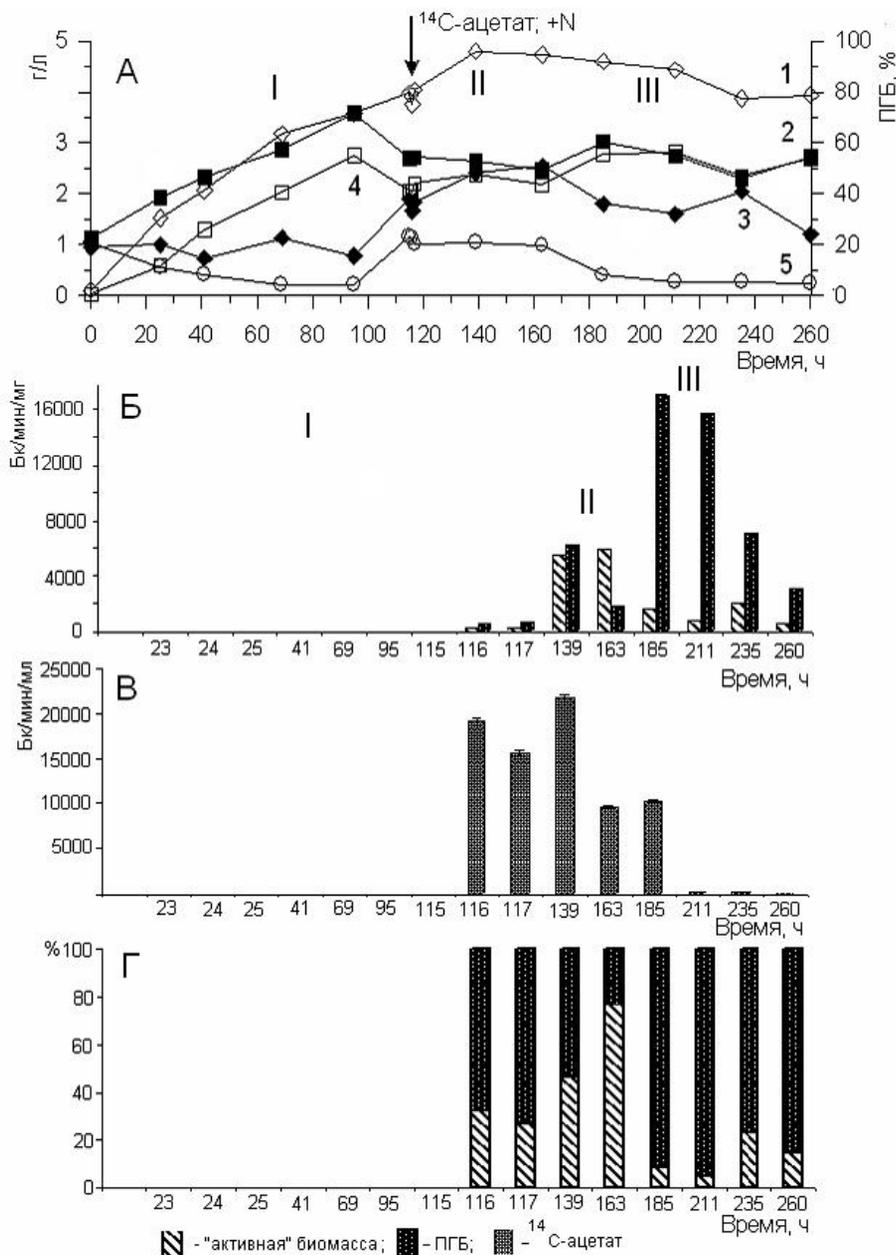


Рис. 5. Показатели культуры *Cupriavidus eutrophus* B-10646 при выращивании на ацетате, 1,2-¹⁴C-ацетат добавлен в период деградации полимера (А) (1 – биомасса, г/л; 2 – ПГБ, %; 3 – «активная» биомасса, г/л; 4 – ПГА, г/л; 5 – азот в среде, г/л); Б – динамика удельной активности радиоуглерода в «активной» биомассе и ПГБ; В – в культуральной среде; Г – распределение радиоуглерода среди «активной» биомассы и ПГБ при смене режимов биосинтеза (I), деградации (II), ресинтеза (III) ПГБ

меченого ацетата ¹⁴C был зафиксирован как в «активной биомассе», так и в полимере (рис. 4б). Причем доля радиоуглерода оставалась всегда выше в полимере, чем в «ак-

тивной» биомассе на протяжении всего эксперимента (рис. 4б). Отмечалось снижение радиоактивности в полимере на втором этапе опыта в период деградации с 92 до 72 % и со-

ответствующее увеличение в «активной» биомассе с 8 до 28 % (рис. 4г). На третьем этапе эксперимента все показатели включения ^{14}C в полимер и «активную» биомассу вернулись на уровень этапа синтеза полимера, т.е. потоки углерода из системы синтеза основных соединений снова перераспределились на образование полимера.

Вероятность одновременного синтеза и деградации полимера, неоднократно высказываемая рядом исследователей (Doi et al., 1990; Taidi et al., 1995; Shang et al., 2005), была проверена в эксперименте, заключающемся в добавлении $1,2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата в культуру бактерий в период эндогенной деградации полимера (рис. 5). Установлено, что уже через час после добавления меченого ацетата ^{14}C был зафиксирован как в «активной биомассе», так и в полимере. К концу первого часа культивирования после добавления $1,2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетата количество меченого углерода в культуральной среде составило около 20 000 Бк/мин/мл и сохранялось на этом уровне в течение 22 ч роста культуры, а затем снизилось практически в 2 раза до 10 000 Бк/мин/мл и не менялось в течение последующих 23 ч. На 211-й час культивирования произошло снижение радиоактивности в культуральной среде до 200 Бк/мин/мл, которая оставалась на этом уровне до конца 3-го этапа эксперимента.

В период внутриклеточной деградации полимера должен реализоваться синтез азотсодержащих соединений, поэтому вполне логично включение ^{14}C в «активную биомассу». Однако на данном этапе, когда происходила деградация полимера, зафиксировано включение радиоуглерода в ПГБ, что свидетельствует об одновременной деградации и синтезе полимера. Показано, что через 1-2 ч после добавления метки основная доля радиоактивности сосредоточена в полимере (до 70 %) (рис. 5г). В течение последующей деградации

полимера (до 162 ч) отмечено снижение относительной радиоактивности ПГБ и увеличение доли в «активной» биомассе (соответственно с 70 до 24 и с 30 до 76 %). На третьем этапе (начиная с 185 ч) после снижения азота в культуральной среде снова были созданы условия для накопления в клетках полимера. В результате ресинтеза полимера на этом этапе произошло перераспределение ^{14}C : доля радиоуглерода во фракции азотсодержащих веществ снизилась до 5 %, а в пуле полимера, напротив, увеличивалась до 95 %. Таким образом, потоки углерода из системы синтеза основных соединений перераспределились на образование полимера.

Известно, что бактериальные клетки, использующие ацетат в качестве основного ростового субстрата, синтезируют все клеточные макромолекулы и поддерживают энергетический статус через цикл трикарбонных кислот (ЦТК). Это показано в серии работ, в которых описана динамика синтеза ПГА на ацетате различными микробными культурами. При анализе метаболических путей углерода у бактерий *A. eutrophus* H16 (ATCC 17699) при росте на ацетате было показано, что в условиях лимита по азоту около 50 % субстрата направляется на синтез полимера, около 40 % теряется с CO_2 и только около 15 % идет на синтез других компонентов клетки (Shi et al., 1997). Подобные результаты получены при росте метилотрофных бактерий *Methylobacterium extorquens* на 2^{14}C -ацетате в азот-дефицитных условиях: 54 % радиоуглерода обнаружено в CO_2 , 35 % – в полимере, 11 % – в биомассе (Korotkova et al., 1999). Поэтому не удивительно, что в наших экспериментах на ацетате доля включения метки в полимер значительно превышала уровень включения ^{14}C в «активную» биомассу. А в период накопления полимера в *C. eutrophus* В-10646 основная часть ^{14}C (более 80 % ра-

диоуглерода) идет на синтез полимера, около 20 % – на синтез азотсодержащих веществ. В период деградации полимера, как показано, происходил одновременно и его синтез, что согласуется с циклической природой метаболизма полимера в бактериях (Doi et al., 1990; Taidi et al., 1995; Shang et al., 2005).

Заключение

Показано, что при эндогенной деградации полимера основной поток углеродсодержащих продуктов, образующихся при его деградации, перенаправляется на синтез азотсодержащих соединений и, наобо-

рот, при исчерпании азота наступает фаза ресинтеза полимера. В период эндогенной деградации полимера его содержание в клетках может резко снизиться (от 70-80 до 40-50 % и менее), при этом молекулярная масса в течение короткого периода времени (6-12 ч) резко падает в 2-3 раза (от 800-400 до 150 кДа и менее). Синтез полимера у бактерии *C. eutrophus* В-10646 происходит не только в условиях, оптимальных для его накопления (дефицит азота), но и во время внутриклеточной деградации полимера, что подтверждает предположение циклической природы метаболизма ПГБ.

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

Список литературы

1. Волова Т.Г., Калачева Г.С., Константинова В.М., Пузырь А.П. (1992) Влияние условий роста на накопление полиоксibuтирата водородными бактериями. Прикладная биохимия и микробиология 28: 221-232 [Volova T.G., Kalacheva G.S., Konstantinova V.M., Puzyr A.P. (1992) Effect of growth conditions on polyhydroxybutyrate accumulation by hydrogen bacteria. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 28: 221–232 (in Russian)].
2. Волова Т.Г., Шишачкая Е.И. Штамм бактерий ВКПМ В-10646 – продуцент полигидроксиалканоев и способ их получения. Патент РФ No. 2439143. Зарегистрирован 10.01.2012.
3. Brandl H., Gross R.A., Lenz R.W., Fuller C.W. (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential application as biodegradable polyesters. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1977-1982.
4. Doi Y., Segawa A., Kawaguchi Y., Kunioka M. (1990) Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiology Letters 67: 165-170.
5. Fukui T., Chou K., Harada K., Orita I., Nakayama Y., Bamba T., Nakamura S., Fukusaki E. (2013) Metabolite profiles of polyhydroxyalkanoate-producing *Ralstonia eutropha* H16. Metabolomics 10 (2): 190-202.
6. Handrick R., Reinhardt S., Jendrossek D. (2000) Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. J. Bacteriol. 182 (20): 5916-5918.
7. Haywood G.W., Anderson A.J., Dawes E.A. (1989) The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoates synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol. Lett. 57: 1-6.
8. Kalacheva G.S., Volova T.G. (2007) Fatty acid composition of *Wautersia eutropha* lipids under conditions of active polyhydroxyalkanoates synthesis. Microbiology 76 (5): 535-540.

9. Kobayashi T., Uchino K., Abe T., Saito T. (2005) Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* 187: 5125-5135.
10. Korotkova N.A., Doronina N.V., Trotsenko Yu.A. (1999) Biosynthesis of the copolymer of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate in *Methylobacterium extorquens*: metabolism of propanol, propionate, pentanol, and valerate. *Microbiology* 68(3): 296-303.
11. Lawrence A.G., Schoenheit J., He A., Tian J., Liu P., Stubbe J., Sinskey A.J. (2005) Transcriptional analysis of *Ralstonia eutropha* genes related to poly-(R)-3-hydroxybutyrate homeostasis during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 663-672.
12. Lee S.Y. (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioengineer.* 49: 1-14.
13. Saegusa H., Shiraki M., Kanai C., Saito T. (2001) Cloning intracellular poly[D-(-)-3-hydroxybutyrate]-oligomer hydrolase in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* 183: 94-100.
14. Schlegel H.G., Kaltwasser H., Gottshalk G. (1961) Ein submersverfahren zur kultur wasserstoffoxydierenden bakterien: wachstumphysiologische untersuchung. *Arch. Mikrobiol.* 38: 209-222.
15. Shang L., Yim S.C., Park H.G., Chang H.N. (2004) Sequential feeding of glucose and valerate in a fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* for production of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with high 3-hydroxyvalerate fraction. *Biotechnol. Prog.* 20: 140-144.
16. Shi H., Shiraishi M., Shimizu K. (1997) Metabolic flux analysis for biosynthesis of poly(β -hydroxybutyric acid) in *Alcaligenes eutrophus* from various carbon sources. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84: 579-587.
17. Shimizu R., Choi K., Orita I., Suzuki Y., Nakamura S., Fukui T. (2013) Detection of phase-dependent transcriptomic change and Ribosko-mediated CO₂ fixation into poly(3-hydroxybutyrate) under heterotrophic condition in *Ralstonia eutropha* H16 based on RNA-seq and gene deletion analyses. *BMC Microbiology* 13 (169): 1-14.
18. Sznajder A., Pfeiffer D., Jendrossek D. (2015) Comparative proteome analysis four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl. Environ. Microbiol.* 85: 1847-1858.
19. Taidi B., Mansfield D.A., Anderson A.J. (1995) Turnover of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. *FEMS Microbiology Letters* 129: 201-206.
20. Vanechoutte M., Kampfer P., De Baere T., Falsen E., Verschraegen G. (2004) *Wautersia gen. nov.*, a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia [Pseudomonas] syzygii* (Roberts et al. 1990) *comb. nov.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 317-327.
21. Volova T.G., Kalacheva G.S., Gorbunova O.V., Zhila N.O. (2004) Dynamics of activity of the key enzymes of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Ralstonia eutropha* B5786. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40 (2): 170-177.
22. Volova T.G., Kiselev E.G., Shishatskaya E.I., Zhila N.O., Boyandin A.N., Syrvacheva D.A., Vinogradova O.N., Kalacheva G.S., Vasiliev A.D., Peterson I.V. (2013) Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO₂ and H₂ of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646. *Biores.Technol.* 146: 215-222.

23. Volova T., Kiselev E., Vinogradova O., Nikolaeva E., Chistyakov A., Sukovaty A., Shishatskaya E.I. (2014) A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus euthrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs. PLOS ONE 9: 1–15.
24. Uchino K., Saito T. (2006) Thiolysis of poly(3-hydroxybutyrate) with polyhydroxyalkanoate synthase from *Ralstonia eutropha*. J. Biochem. 139: 615-621.
25. Uchino K., Saito T., Gebauer B., Jendrossek D. (2007) Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA. J. Bacteriol. 189 (22): 8250-8256.