

УДК 328

БИОСИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА НА ГЛИЦЕРИНЕ DELFTIA SP. LP-1***Е.Н. Капаруллина, Н.В. Агафонова, Н.В. Доронина***

Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуцзино, Россия

Полигидроксibuтират (ПГБ) – термопластичный, биоразлагаемый и биосовместимый полимер, потенциальные сферы применения которого включают биомедицину, пищевую и косметическую промышленность, упаковку и сельское хозяйство. Накопление ПГБ широко распространено среди микроорганизмов, к продуцентам ПГБ относятся представители родов *Cupriavidus* (*Ralstonia*), *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Allochromatium*, *Aeromonas* и др. и в том числе многие метилотрофы (*Methylorubrum*, *Methylobacterium*) на различных источниках углерода и энергии (Волова, Шишацкая, 2011; Порошина с соавт., 2014; Доронина с соавт., 2015). Известно, что представители рода *Delftia* также способны к синтезу ПГБ (Tsuge et al., 2004; Chen et al., 2012).

Большой научно-практический интерес представляет синтез биodeградируемых и биосовместимых пластиков из дешевого непищевого сырья и отходов агрокомплексов и различных производств, в том числе биодизеля, побочным продуктом которого является глицерин в высоких концентрациях в смеси с C₁-субстратами. Глицерин перспективен в качестве субстрата для биосинтеза биопластиков и поиск микроорганизмов-продуцентов биополимеров на этом субстрате весьма актуален.

Цель данной работы – определение молекулярной массы образцов ПГБ при культивировании штамма *Delftia* sp. Lp-1 на минеральной среде с глицерином и молекулярно-генетический анализ фрагмента гена *phaC*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование и анализ ПГБ. Из клубеньков люпина *Lupinus polyphyllus* L. на среде с метанолом нами выделен новый штамм *Delftia* sp. Lp-1 (ВКМ В-3039), являющийся фитосимбионтом и обладающий широким спектром механизмов стимуляции роста различных растений (Агафонова с соавт., 2017). Изолят является факультативным метилотрофом, способен расти на ряде C₁-, полиуглеродных субстратах и глицерине. Штамм *Delftia* sp. Lp-1 выращивали на простой минеральной

среде «К» (г/л: KH_2PO_4 – 2.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.025; NaCl – 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.002; $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ – 1 л) в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с 200 мл среды и 0.2 % глицерина при 29 °C на роторной качалке (180 об/мин) в течение 3–5 сут. pH среды в процессе культивирования поддерживали добавлением 10 % NaOH. Содержание биомассы определяли, измеряя оптическую плотность OP_{600} в 0.5 см кювете на спектрофотометре Specol 221 (Германия) и пересчитывали на вес сухой биомассы по калибровочной кривой. Выделение ПГБ из биомассы проводили как описано ранее (Ежов с соавт., 2013). Молекулярную массу (Мм) полимеров определяли вискозиметрическим методом, измеряя вязкость раствора ПГБ в хлороформе при 30 °C (Мышкина с соавт., 2010).

Выделение и анализ ДНК. ДНК выделяли с использованием набора ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (“Zymo Research”, США) в соответствии с рекомендациями фирмы – производителя. Фрагмент гена *phaC* (550 п.н.), кодирующего полигидроксibuтират синтазу, амплифицировали, используя праймеры, согласно ранее описанному протоколу (Замахаева с соавт., 2016). Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 1 %-ном агарозном геле. Выделение и очистку фрагментов ДНК из легкоплавкой агарозы проводили на колонках с использованием набора Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (“Zymo Research”, США), согласно инструкции фирмы-производителя. Секвенирование ПЦР-фрагментов проводили с помощью набора реактивов CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing kit (“Beckman Coulter”, США) на анализаторе CEQ2000 XL (“Beckman Coulter”, США).

Молекулярно-генетический анализ. Предварительный скрининг сходства последовательностей гена *phaC* проводили по базе данных GeneBank [NCBI] с помощью пакета программ BLAST [<http://ncbi.nlm.nih.gov>]. Обработку и перевод нуклеотидных последовательностей гена *phaC* в аминокислотные проводили с использованием Gene Runner, версия 3.05 [Hastings Software, Inc.]. Последовательность белка PhaC выравнивали с последовательностями референтных штаммов ближайших прокариот с помощью программы CLUSTAL W (Thompson et al., 1997). Филогенетический анализ выполнен при помощи программы MEGA5 (Tamura et al., 2011). Филограммы строили методами “neighbor-joining” и “maximum-likelihood” (Saitou, Nei, 1987). Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью “bootstrap – анализа” 1000 альтернативных филограмм.

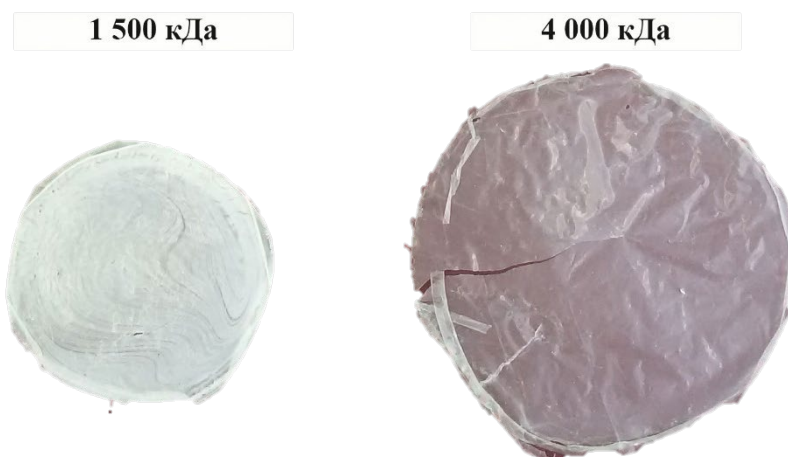


Рис. 1. Внешний вид образцов пленок ПГБ из биомассы штамма *Delftia* sp. Lp-1 на глицерине.

Показано, что при росте *Delftia* sp. Lp-1 на глицерине синтезировался биополимер с высокой молекулярной массой (Мм) от 1500–4000 кДа (рис. 1), что превышает Мм полимера у *Methylobacterium extorquens* (ранее *Methylobacterium extorquens*) – одного из известных метилотрофных продуцентов полигидроксibuтиратсинтазы (ПГБВ) из метанола-сырца (Ежов с соавт., 2010; Порошина с соавт., 2014). Выход ПГБ от массы сухих клеток штамма *Delftia* sp. Lp-1 составил 12–15 %. Полимер с Мм 4000 кДа обладал высокой эластичностью и прочностью. Известно, что ПГБ с Мм от 1000 до 10000 кДа является перспективным для использования в медицине (кардиохирургия, противоспаечные и шовные материалы, основа для доставки лекарственных препаратов, восстановление костной ткани и при конструировании эндопротезов) (Волова с соавт., 2014; Галузина с соавт. 2015; Насонова с соавт., 2015).

По данным секвенирования фрагмента гена *phaC* ПГБ-синтазы, штамм *Delftia* sp. Lp-1 имел 96–99 % идентичности аминокислотных последовательностей с таковыми у представителей рода *Delftia* (рис. 2). Показано, что ПГБ – синтаза нашего штамма отнесена к ПГБ-синтазам I класса и наиболее близка таковым у различных штаммов вида *D. acidovorans* (98.4–99 %). Интересно отметить, что ПГБ – синтазы представителей рода *Delftia* образуют отдельную ветвь (рис. 2) среди представителей других родов, имеющих фермент I класса.

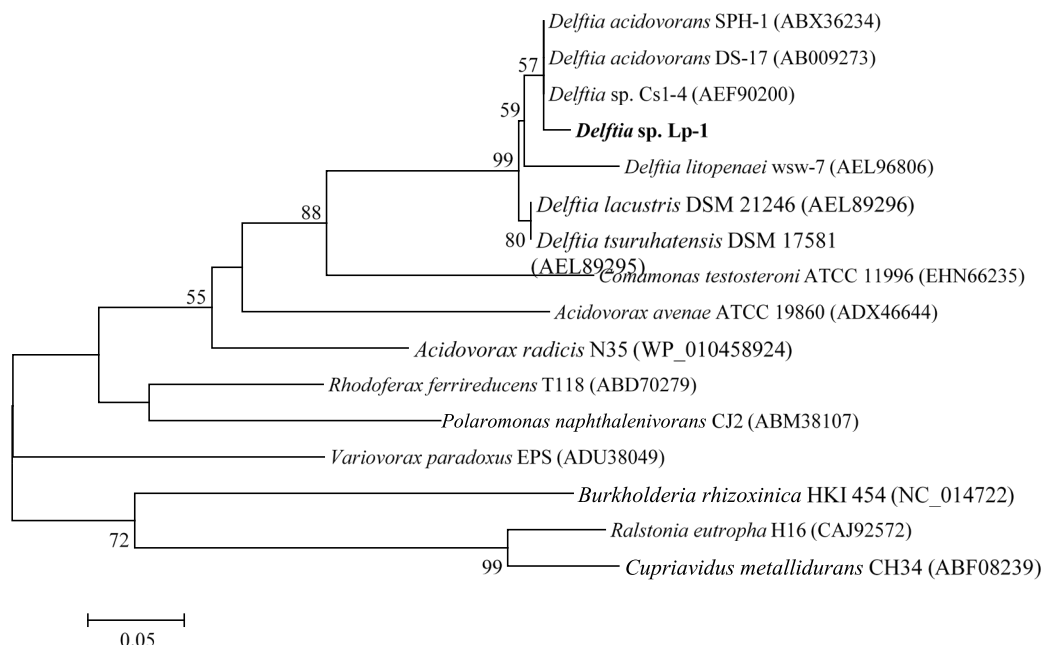


Рис. 2. Филогенетическое положение штамма *Delftia* sp. Lp-1 на основе сравнения аминокислотных последовательностей белка PhaC среди представителей порядка Burkholderiales с ПГБ-синтазами I класса. Шкала соответствует 5 аминокислотным заменам на каждые 100 аминокислот (эволюционное расстояние). Использован метод “maximum-likelihood”

Таким образом, впервые для *Delftia* sp. Lp-1 показана способность синтезировать ПГБ с высокой молекулярной массой, и очевидна перспективность этого штамма в качестве продуцента биоразлагаемого и биосовместимого пластика из недорогого побочного продукта промышленности – глицерина.

ЛИТЕРАТУРА

- Агафонова Н.В. и др. Новый фитосимбионт из рода *Delftia*, способный к автотрофной метилотрофии // Микробиология. 2017. Т. 86. № 1. С. 88–98.
- Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение. Красноярск: «Красноярский писатель», 2011. 392 с.
- Волова Т.Г., Винник Ю.С., Шишацкая Е.И., Маркелова Н.М. Биомедицинский потенциал разрушаемых полигидроксиалканоатов: экспериментально-клинические исследования. Красноярск: «Версо», 2014. -332 с.
- Галузина Т.В., Герасин В.А., Доронина Н.В., Ежов В.А., Троценко Ю.А., Киприанов С.В., Иванов А.О., Филатова М.П., Шклярчук Б.Ф. Структура и свойства полигидроксиалканоатов, синтезируемых *Methylobacterium halotolerans* C2 и *Methylobacterium extorquens* G10, из метанола и его смеси с пентанолом // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2015. Т. 57. № 6. С. 511–520.
- Доронина Н.В. и др.. Аэробные метиловобактерии – перспективные объекты современной биотехнологии (обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. 2015. Т. 51. № 2. С. 111–121.
- Ежов В.А., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Биосинтез полигидроксибутиролалерата с разной молекулярной массой при росте *Methylobacterium extorquens* G-10 на смеси метанола и пентанола // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 2. С. 171–174.

Замахаева С.А. и др. Клонирование и характеристика полигидроксibuтиратсинтазы из *Methylobacterium extorquens* AM1 // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. Биология. Т. 2. № 9. С. 169–179.

Замахаева, С.А., Фёдоров, Д.Н., & Троценко, Ю.А. (2017). Метилотрофные продуценты биопластиков (Обзор) // Прикл. биохим. микробиол., 53(4), 351–362.

Мышкина В.А., Иванов Е.А., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Филатова Е.В., Ружицкий А.О., Бонарцева Г.А. Биосинтез сополимера поли-3-гидроксibuтирата-3-гидроксивалерата штаммом *Azotobacter chroococcum* 7Б // Прикл. биохим. микробиол. 2010. Т. 46. № 3. С. 315–323.

Насонова М.В. и др. Скорость резорбции трансплантата на основе полигидроксиалканоатов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2015. № 1. С. 39–45.

Порошина М.Н., Доронина Н.В., Ежов В.А., Троценко Ю.А. Сравнительная характеристика биосинтеза полигидроксibuтирата *Methylobacterium extorquens* G10 и *Methyloligella halotolerans* C2 на метаноле // Прикл. биохим. микробиол. 2014. Т. 50. № 3. С. 283–288.

Chen W.M., Lin Y.S., Sheu D.S., Sheu S.Y. *Delftia litopenaei* sp. nov., a poly-beta-hydroxybutyrate-accumulating bacterium isolated from a freshwater shrimp culture pond // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 2315–2321.

Saitou N., Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 405–425.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin, F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 4876–4882.

Tsuge, T., Imazu, S.I., Takase, K., Taguchi, S., Doi, Y. An extra large insertion in the polyhydroxyalkanoate synthase from *Delftia acidovorans* DS-17: its deletion effects and relation to cellular proteolysis. // FEMS Microbiol. Lett. 2004. V. 231(1). P. 77–83.