

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ *METHYLOPHILUS QUAYLEI* И *METHYLORUBRUM EXTORQUENS* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Е.Р. Митина, А.Б. Мин, А.Б. Пшеничникова

ФГБОУ ВПО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва, Россия

Поли-3-гидроксibuтират (ПГБ) – синтезируемый бактериями биоразлагаемый и биосовместимый пластик, схожий по свойствам с полипропиленом. Применение этого биополимера в промышленности ограничено его стоимостью, определяемой, прежде всего, источником углерода. Одним из доступных углеродных субстратов является метанол. Известно много метилотрофных бактерий, синтезирующих ПГБ, например, *Methylorubrum extorquens* – розовокрашенная факультативная метилотрофная бактерия. С целью увеличения конверсии метанола в продукты в настоящей работе использовали смешанную культуру метилотрофных бактерий *Methylorubrum extorquens* (ВКПМ В-13995), накапливающих ПГБ в биомассе, и *Methylophilus quaylei* (ВКМ В-2338Т), секретирующих высокомолекулярный экзополисахарид (ЭПС).

Бактерии выращивали в минеральной среде с 1 % метанола в конических колбах при 28° С и 170 об/мин в течение 48 ч. Культуры с заданным соотношением штаммов составляли с использованием уравнений зависимости мутности бактериальных суспензий от концентрации клеток, полученных для каждого штамма. Соотношения штаммов в смешанной культуре определяли в момент внесения инокулята (0 ч) и в конце культивирования (48 ч) высевом на плотные питательные среды и рассчитывали как отношение колониеобразующих единиц. Колонии *Methylorubrum extorquens* отличали по розовой окраске. Биомассу от бесклеточной жидкости отделяли центрифугированием. Содержание ПГБ в сухой биомассе контролировали методом Зевенхузена, а концентрацию ЭПС в бесклеточной жидкости определяли антроновым методом.

Выделение продуктов проводили после центрифугирования культуральной жидкости. Биомассу промывали метанолом для отделения липидов, затем хлороформом экстрагировали поли-3-гидроксibuтират. Из хлороформного экстракта ПГБ осаждали пятикратным объемом диэтилового эфира. Структуру ПГБ подтверждали методом¹ Н- и ¹³ С-ЯМР-спектроскопии. Из бесклеточной жидкости экзополисахарид осаждали двукратным объемом ацетона, фракционный состав ЭПС определяли методом гель-фильтрации на Toyopearl HW-65 Fine.

Начальные соотношения бактерий *Methylorubrum extorquens* и *Methylophilus quaylei* были выбраны равными 9:1 и 6:1 соответственно. Проводили культивирование чистых и смешанных культур выбранных штаммов. Продуктивность чистой культуры *Methylorubrum extorquens* по сухой биомассе составила 1,0±0,3 г/л за 48 часов при содержании ПГБ в биомассе 25 % и концентрации ЭПС в бесклеточной жидкости 0,15±0,01 г./л, для *Methylophilus quaylei* продуктивность по биомассе составила 0,7±0,1 г/л, ПГБ отсутствовал, а содержание ЭПС в культуральной жидкости составило 0,69±0,05 г./л. В смешанных культурах бактерия *Methylophilus quaylei* росла более активно – соотношение штаммов через 48 часов культивирования в культурах с начальным соотношением *Methylorubrum extorquens*: *Methylophilus quaylei* 9:1 и 6:1 составило 1:1 и 1:2 при продуктивности по суммарной биомассе 1,1±0,1 г/л и 1,0±0,3 г/л, по ЭПС – 0,49±0,01 г./л и 0,55±0,01 г./л и с содержанием ПГБ в суммарной биомассе 21 и 12 % соответственно. Структура ПГБ в чистых и смешанных культурах была идентична. Увеличение содержания в смешанной культуре бактерии *Methylorubrum extorquens*, имеющей меньшую скорость роста, позволило повысить продуктивность по ПГБ. ЭПС, выделенный из чистой культуры *Methylophilus quaylei*, был представлен тремя основными фракциями: 4,5–8,4 МДа (36 % от общей массы ЭПС), 1,6–3,7 МДа (45 %) и 0,4–0,6 МДа (19 %), в культуре *Methylorubrum extorquens* обнаружено две фракции ЭПС: 1,1–3,7 МДа (71 %) и 32–60 кДа (29 %). В смешанной культуре обнаружены все фракции ЭПС чистых культур.

Таким образом, продуктивность по поли-3-гидроксibuтирату и экзополисахариду в смешанных культурах падает незначительно по сравнению с чистыми, и смешанная культура метилотрофных бактерий *Methylorubrum extorquens* и *Methylophilus quaylei* может служить продуцентом этих биополимеров.